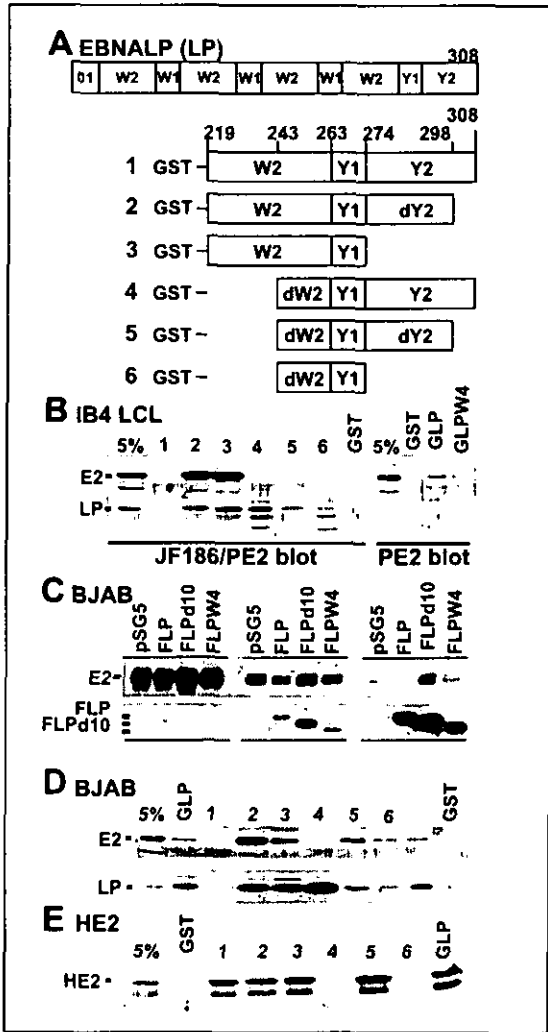
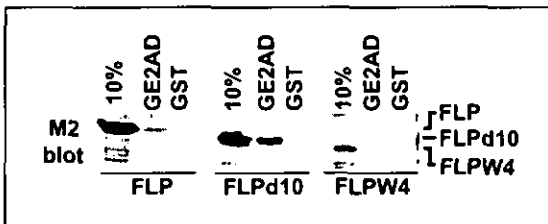


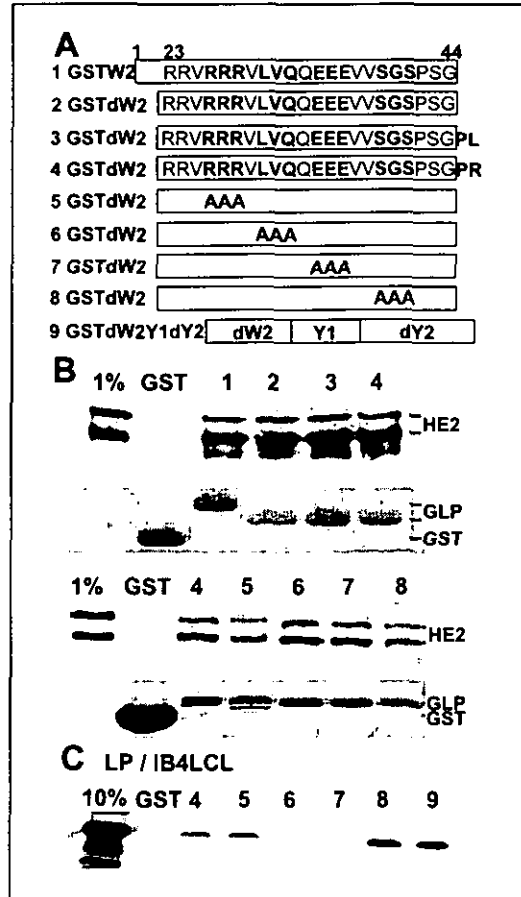
1



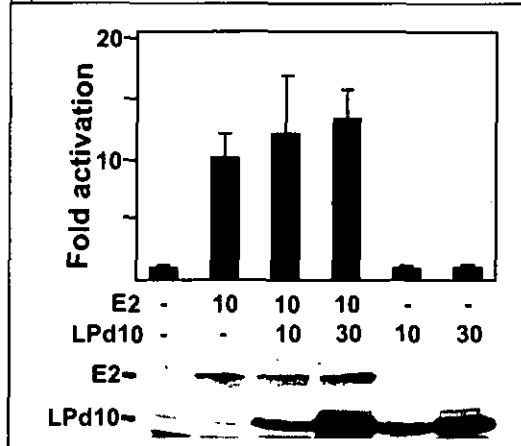
2



3



4



## 5. 婦人科腫瘍とヒト乳頭腫ウイルス遺伝子型に関する研究

分担研究者 松倉 俊彦 国立感染症研究所主任研究官

**研究要旨** 昨年度、子宮頸部扁平上皮癌 294 例に存在するヒト乳頭腫ウイルス (HPV) 遺伝子型をプロットハイブリダイゼーション法で調べたが、63 例 (21%) は HPV 陰性だった。そこで、より高感度な PCR 法で 294 例の内 250 例について HPV を再検索した。その結果、240 例 (96%) に HPV が検出された。しかし、複数の HPV 型が 29 例 (12%) に認められた。また PCR 法だけで検出された HPV はプロットハイブリダイゼーション法では検出されず、一細胞当たり 0.05 コピー以下しか存在していない事が判明した。この事から、PCR 法で検出された HPV を全て癌の起因子とするのは早計であり、起因 HPV (driver) と非起因 HPV (passenger) の区別が不可欠である事が明らかとなった。そして、その区別は癌組織内のコピー数によってのみ可能と考えられた。

### A. 研究目的

昨年度、子宮頸部扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma: SCC) に存在するヒト乳頭腫ウイルス (human papillomavirus: HPV) をプロットハイブリダイゼーション法で調べたが、294 例中 63 例 (21%) は陰性だった。そこで、この陰性例を含む 250 例について PCR 法で再検査し、検索法による差異を明らかにする事とした。

### B. 研究方法

SCC 組織より抽出した全 DNA 各々 100 ng を使用して、種々の HPV 遺伝子型の L1 ORF 領域を検出可能な MY09/MY11 プライマーで PCR を行った。そして生成産物の内側に位置する GP5+/GP6+プライマーを用いて塩基配列を調べた。得られた配列 (GP5+プライマーで約 350 ベース、GP6+で約 150 ベース) をデータベースある HPV の塩基配列と比べて遺伝子型を同定した。同一 SCC 検体にプライマーにより異なる HPV 型が同定されることがあった

為、250 検体から得られた 500 の配列を各々比較した。そして、既知遺伝子型との類似性が 95%以上のものを該当遺伝子型、80-94%のものを未同定の HPV、80%以下は HPV 陰性とした。今回未同定とした塩基配列は複数の HPV 型が存在するものであり、PCR 産物をクローニングした後塩基配列を分析する事により同定可能と考えられる。

### C. 研究成果

表 1 に検索結果をまとめた。まず、プロットハイブリダイゼーション法で HPV 型が同定された 142 例の内、HPV 18, 56, 16, 31, 33, 35 陽性例はいずれかのプライマーで同じ HPV 型が同定された。しかし、HPV 39, 82, 52, 58, 67 陽性例では異なる HPV 型が検出された。また、同一検体に異なる二種の HPV 型が認められるものもあつた。一方、プロットハイブリダイゼーション法で未同定の HPV が検出された 48 例では HPV 16, 31, 33, 58 等が 34 例に、HPV 6,

18 が 15 例に同定された。そして、HPV 6 と 16 が 3 例、HPV 6 と 18 が 1 例、HPV 33 と 16 が 1 例に重複して認められた。さらに、プロットハイブリダイゼーション法で HPV 陰性の 60 例では HPV 16, 18 が各々 24 例、15 例に検出された。そして、HPV 6 と 16 が 3 例、HPV 6 と 45 が 2 例、HPV 11 と 16 が 2 例、HPV 56 と 16 が 1 例に重複して認められた。

そこで、PCR 法でのみ検出された HPV 型をプローブとして該当する検体をプロットハイブリダイゼーション法で再度調べた。しかし、いずれの場合も陽性シグナルは得られなかった。従って、これら PCR 法で検出された HPV のコピー数は 0.05 コピー以下である事が明らかとなった。

図 1 に今回 PCR 法で同定された HPV 型と昨年度報告した 294 例の SSC にプロットハイブリダイゼーション法で検出された HPV 型を示した。PCR 法での未同定 HPV は除いてある。HPV 6, 18, 16 等が PCR 法で異常な頻度で検出されている事が判る。そこで塩基配列解析に用いたプライマーと PCR 及びプロットハイブリダイゼーション法で検出された標準 HPV 遺伝子型の該当する部分の塩基配列を比較した。表 2 に各型について異なるヌクレオチドの数を示した。両プライマーと 2 ヌクレオチドの違いがあるのは HPV 18 と 16 のみであった。また、3 ヌクレオチドの違いは HPV 6, 11, 33, 35, 45 に過ぎない。一方、HPV 39, 82 等プロットハイブリダイゼーション法で検出されたにもかかわらず PCR 法で同定出来なかったものは 7 ヌクレオチド以上もの違いがあつた。この事から PCR 法での検索成績は使用したプライマーの特異性を強く反映した結果と考えられた。

#### D. 考 察

本研究は現在世界中で認知されている PCR

法による疫学的事実「HPV16 と 18 が子宮頸癌の高度危険型である」に決定的な疑問を投げかけるものと成った。即ち、いかなるプライマー系を使用した PCR 法でも限られた HPV 型を選択的に検出する危険から免れ得ない事が明らかとなった。従って、従来の疫学結果は再考されなければ成らないだろう。

更に、PCR 法は HPV 遺伝子の数百塩基対の存在を検出するに過ぎない。また、そのコピー数は一細胞当たり 0.05 以下であり、実際の数値は知る事が出来ない。HPV 感染から発癌に至る長い期間を考慮すれば、PCR 法で癌組織に検出された HPV を即く癌の起因子とするのは危険で、癌形成後の HPV 感染をも考慮しなければならないのではないのか。ウイルス DNA が癌組織内に長期に渡って存在していたより確かな情報として、昨年明らかにしたウイルス遺伝子の長さ及びコピー数が必要ではないだろうか。

#### E. 結 論

PCR 法でほぼ全例の子宮頸部扁平上皮癌に性器型 HPV DNA が認められた。しかし、検出された HPV を癌の起因子とするのは早計であり、起因 HPV (driver) と非起因 HPV (passenger) との区別が不可欠である。それは組織内のコピー数によってのみ可能と考える。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

なし。

#### G. 知的所有権の取得状況

なし。

図1 PCR法とプロットハイブリダイゼーション法で同定されたHPV遺伝子型の比較

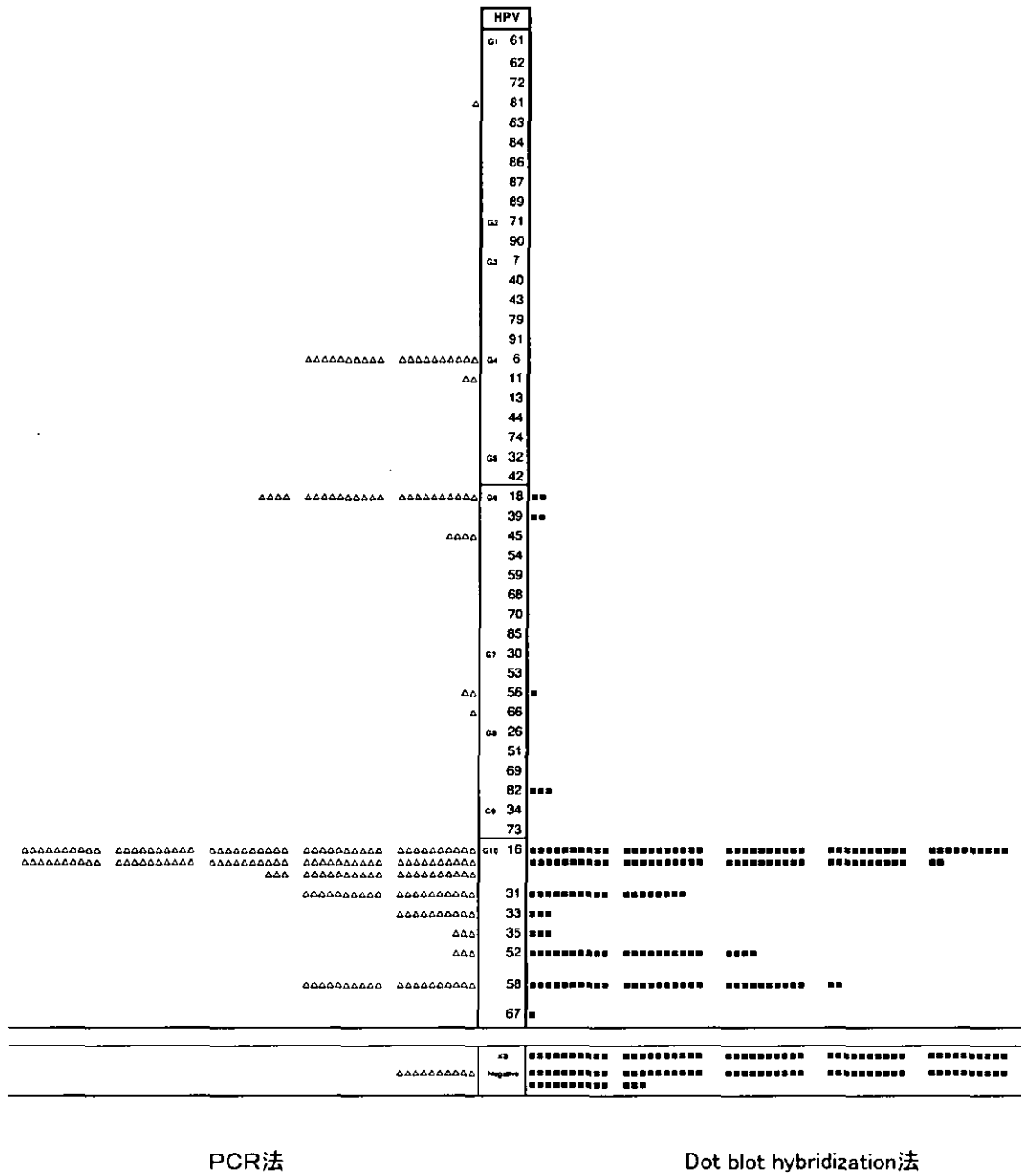


表1 子宮頸部扁平上皮がんに関与するPCR産物の塩基配列解析により同定されたHPV遺伝子型

No. of SCC	HPV types identified by blot hybridization														Total
	18	39	56	82	16	31	33	35	52	58	67	subtotal	XB	Negative	
G1 HPV 81 <sup>a</sup>	2	2	1	3	70	14	3	3	18	25	1	142	48	60	250
G4 HPV 6						[1]						[1]	[9]	[1*]	[1*]
HPV 11														[10]	[20]
G6 HPV 18	2							1				3	5 [1*]	15	23 [1*]
HPV 45											[1*]	[1*]		[3*]	[4*]
G7 HPV 56														[1]	[2]
HPV 66		[1]													[1]
G10 HPV 16	[1*]				53 [2,12*]				[2*]	1 [2]		54 [4,15*]	15 [11*]	9 [15*]	78 [4,41*]
HPV 31						10 [4]				1		11 [4]	1 [2]	2	14 [6]
HPV 33									2 [1]			5 [1]	3 [1]		8 [2]
HPV 35												1 [2*]			1 [2*]
HPV 52									2 [1]			2 [1]			2 [1]
HPV 58										5 [12*]		5 [12*]	[1*]		5 [13*]
XP	[1,1*]	[1*]	[1*]	3	2 [12,3*]	[4*]	[2]	5 [2,2*]	3 [12,2*]	[1]	13 [30,13*]	1 [8,7*]	10 [9,3*]	24 [47,23*]	
Negative								4		1	5	3	2	10	

XB and XP refer to unidentified HPV sequences. <sup>a</sup>No. of cases determined by each sequence primer is indicated, determined by both GP5+ and GP6+ primers [determined only by GP5+ or only by GP6+ is indicated by an asterisk].

表 2 GP5+/GP6+ プライマーの特徴

HPV	No. of nt <sup>a</sup> mismatches	
	23 nt/ GP5+	25 nt/ GP6+
81	2	2
6	1	2
11	1	2
18	1	1
39	4	3
45	3	0
56	1	3
66	2	4
82	6	4
16	2	0
31	1	3
33	1	2
35	3	0
52	5	2
58	3	2
67	2	2

<sup>a</sup>nucleotides.

## 6. 成人型T細胞白血病の新しい免疫学的治療法の開発

分担研究者 牧野 正彦 国立感染症研究所部長

**研究要旨** HTLV-I が感染し癌化した CD4 陽性 T 細胞の増殖により発症する成人 T 細胞白血病 (ATL) の発症を予防する免疫学的方策は確立されていない。この白血化 CD4 陽性 T 細胞のアポトーシスを誘導するためには、キラー活性を有する CD8 陽性 T 細胞を効率的に活性化することが重要であり、CD8 陽性 T 細胞の活性化には、生体内で最も有能な樹状細胞 (DC) を用いる必要がある。HTLV-I 感染無症候性キャリアー (AC) の末梢単球由来未熟 DC は、正常健常者の未熟 DC に比し、成熟化が進行しており、正常健常者アロ T 細胞を強く活性化し、IFN- $\gamma$  の産生を誘導した。また、AC 患者 DC は、外来性ウイルス抗原非パルス下で、自己 CD8 陽性 T 細胞を刺激し、CD45RA<sup>-</sup>・CD45RO<sup>+</sup>のメモリー T 細胞を産生した。メモリー T 細胞の産生には、CD40 リガンドによる DC の活性化が不可欠であった。しかし、CD27・CD28・CCR7 抗原の陰転化は誘導されず、DC 刺激による effector 細胞への分化誘導および活性化は観察されなかった。そこで、AC 患者 CD8 陽性 T 細胞を HTLV-I 抗原をパルスした DC で 1 週間刺激した後、さらに T 細胞を CD40 リガンド存在下で 4 日間培養すると、自己 HTLV-I 感染 CD4 陽性 T 細胞を殺戮し得るキラー T 細胞の分化誘導が可能であった。従って、末梢単球由来 DC を用いた CD8 陽性メモリー T 細胞の産生は、ATL の発症を予防する有効な手段となり得ると想定された。

### A. 研究目的

成人 T 細胞白血病 (ATL) の免疫学的発症予防法の開発を目的とした。ATL は HTLV-I 感染後長い潜伏期間を経て発症するが、無症候性キャリアー期には、CD8 陽性キラー T 細胞が作動して、種々の原因で産生された白血化 CD4 陽性 T 細胞を対外に排除していると想定されている。従って、白血化細胞を対外に排除し得る CD8 陽性キラー T 細胞を必要に応じて効率よく産生することが ATL 発症予防策として重要であり、そのためには、HTLV-I 抗原特異的メモリー CD8 陽性 T 細胞を維持する必要がある。一方、昨年我々は、HTLV-I キャリアー (AC) の末梢単球由来樹状細胞は、外

来性 HTLV-I 抗原非存在下で自己の CD8 陽性 T 細胞を刺激し、活性化させ、IFN- $\gamma$  を産生することを明らかにした。そこで、AC 患者 DC は自己の CD8 陽性 T 細胞を刺激し、メモリータイプ CD8 陽性 T 細胞を産生し得るか検討した。

### B. 研究方法

AC 患者末梢血の供与を受けリンパ球を分離した。プラスチック付着性単球を分離した後、GM-CSF と rIL-4 を用いて DC を分化誘導した。CD8 陽性 T 細胞の精製は、マグネットビーズ付着モノクローナル抗体を用い、CD4 陽性および MHC class II 抗原陽性細胞を除去

することで Negative selection 法により行った。HTLV-I 抗原は HTLV-I 持続感染細胞 MT-2 を sonicate して、その細胞上清を回収して得た。メモリー T 細胞の産生は、外来性 HTLV-I 感染 DC あるいは非感染 DC で自己の CD8 陽性 T 細胞を 10 日間刺激し、得られた T 細胞より CD8 陽性 T 細胞をマグネットビーズ付着抗 CD8 モノクローナル抗体を用い、Positive selection 法で精製し、その細胞表面抗原を FACScalibur を用いて解析した。CD45RA・CD45RO・CD28・CD27・CCR7 抗原の発現を調べた。また、CD8 陽性キラー T 細胞は、HTLV-I 抗原パルス DC で自己 CD8 陽性 T 細胞を 7 日間刺激した後、CD8 陽性 T 細胞を上記の方法で精製し、CD40 リガンドを用い再刺激して誘導した。この CD8 陽性細胞のキラー活性は、自己の HTLV-I 感染 CD4 陽性 T 細胞をターゲットとして CTL assay にて測定した。HTLV-I 刺激感染細胞株は、AC 患者末梢リンパ球を 6 ヶ月間 IL-2 存在下で培養することで得た。

#### (倫理面への配慮)

国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し理解（インフォームドコンセント）を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

#### C. 研究結果

AC 患者 DC は、外来性ウイルス抗原非存在下で自己の CD8 陽性 T 細胞を刺激し、大量の IFN- $\gamma$  を産生した。さらに、AC 患者 DC は成

熟化誘導因子非存在下で正常健常者アロジョーニック T 細胞を刺激し、IFN- $\gamma$  の産生を誘導したが、その程度は正常健常者由来 DC に比し有意に強かった。そこで、AC 患者 DC を用いて自己の CD8 陽性 T 細胞を 10 日間刺激したところ、CD45RA<sup>-</sup>・CD45RO<sup>+</sup>のメモリー T 細胞が得られた。しかし、CD28・CD27・CCR7 抗原いずれも陽性であり、陰転化は得られなかった。さらに、これらメモリー T 細胞の産生には、DC の CD40 リガンド処理が不可欠であった。そこで、得られたメモリー T 細胞が自己 HTLV-I 感染 CD4 陽性 T 細胞を殺戮し得るキラー T 細胞に分化し得るか検討した。HTLV-I 抗原パルス・CD40 リガンド処理 DC で 7 日間刺激した CD8 陽性 T 細胞を、CD40 リガンド存在下でさらに 4 日間刺激した後、CD8 陽性 T 細胞を Positive selection 法で精製し、エフェクターとして用いた。HTLV-I 持続感染細胞をターゲットとし、CTL assay を行った。その結果、エフェクター細胞は HTLV-I 持続感染細胞を効率よく殺戮し、アポトーシスを誘導した。

#### D. 考察

HTLV-I 感染無症候性キャリアーは、ATL 発症の恐怖に常にさらされている。しかし、現在未だに ATL の発症を未然に防ぐ予防法は存在せず、ウイルスを対外へ排除するための有効な手段もない。ATL はウイルス感染から 40～60 年の長期を経て発症するが、この間、CD8 陽性 T 細胞が偶発的に産生された白血化細胞の排除に当たっていると想定されている。一般に、キラー T 細胞の産生には少なくとも 2 回の抗原刺激が必要である。従って、産生された白血化細胞に対し迅速に対応するためには、抗原特異的メモリータイプ CD8 陽性 T 細胞を体内に維持しておかなければならない。つま



り、機能的 CD8 陽性 T 細胞を十分量維持することが、現行では最も有効な ATL 発症予防法と考えられる。AC 患者末梢単球由来 DC は、ウイルス非感染者に比し、DC の成熟化が進行し、HTLV-I 抗原を細胞内に保有している可能性が考えられたが、その抗原の性状を特定するには至らなかった。しかし、これら DC を用い自己 CD8 陽性 T 細胞を刺激すると、やがてはキラー T 細胞へ分化し得るメモリー T 細胞を産生することが可能であった。この際、キャリアー DC は、CD4 陽性 T 細胞が産生する CD40 リガンドによる Conditioning が必要であったが、この DC は自己 T 細胞を活性化し、IFN- $\gamma$  を産生したことから、活性化 CD4 陽性 T 細胞のみが産生する CD40 リガンドを供給することも可能と考えられた。本研究を通じ、新しい ATL 予防法を構築する糸口が明らかにされた。

## E. 結論

HTLV-I 無症候性キャリアー末梢単球由来樹状細胞を用い、HTLV-I 感染 CD4 陽性 T 細胞を殺戮し得るキラー CD8 陽性 T 細胞を容易に活性化するメモリー CD8 陽性 T 細胞の産生が可能となった。ATL 発症予防法確立の糸口が見つかった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 牧野正彦. らい菌と樹状細胞の相互作用. 臨床免疫 39(2):109-115, 2003.
- 2) Maeda Y., M. Gidoh, N. Ishii, C. Mukai, and M. Makino. Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium*

*leprae*-derived antigens. Cell. Immunol., 222:69-77, 2003.

- 3) Maeda, Y., P. J. Brennan, and M. Makino. Studies of lipoproteins of *Mycobacterium leprae*. Jpn. J. Leprosy, in press, 2004.
- 4) Kai, M., Y. Maeda, S. Maeda, Y. Fukutomi, K. Kobayashi, Y. Kashiwabara, M. Makino, M. A. Abbasi, M. Z. Khan, and P. A. Shah. Active surveillance of leprosy contacts in country with low prevalence rate. Intl. J. Lepr. Other Mycobact. Dis., in press, 2004.

### 2. 学会発表

#### 国際学会

Makino M., Y. Maeda, H. Kimura, and F. Takeshita. Up-regulation of antigen presenting function of mycobacteria infected macrophage. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 38<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Newark, USA, July 21-23, 2003.

#### 国内学会

- 1) 牧野正彦, 前田百美. タイプ 1 細胞性免疫を誘導するらい菌抗原の探索. 第 76 回日本細菌学会総会 2003 年 4 月 熊本
- 2) 中田 登, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 前田伸司, 松岡正典, 牧野正彦. 大腸菌口抗酸菌シャトルコスミドを用いたらい菌 Thai53 株整列クローンライブラリの作製と遺伝子解析. 第 76 回日本細菌学会総会 2003 年 4 月 熊本
- 3) 甲斐雅規, 藤田由希子, 矢野郁也, 牧野正彦. らい菌由来糖脂質の解析. 第 76 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2003 年 7 月 神戸
- 4) 宮本友司, 武下文彦, 中田 登, 前田百

- 美, 甲斐雅規, 牧野正彦, 向井 徹. 抗酸菌 Fibronectin Attachment Protein の機能解析. 第 76 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2003 年 7 月 神戸
- 5) 前田百美, 遠藤真澄, 寺尾恵治, 牧野正彦. シュワン細胞とらい菌の相互作用の解明. 第 76 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2003 年 7 月 神戸
- 6) 武下文彦, 向井 徹, 宮本友司, 牧野正彦. らい菌 Fibronectin Attachment Protein (FAP)を標的にした DNA ワクチンの検討. 第 76 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2003 年 7 月 神戸
- 7) 甲斐雅規, 中田 登, 牧野正彦. 速発育性抗酸菌 *M. smegmatis* のトランスポゾン変異株ライブラリーの作製と解析. 第 86 回日本細菌学会関東支部総会 2003 年 10 月 横浜.
- 8) 宮本友司, 武下文彦, 中田 登, 前田百美, 甲斐雅規, 牧野正彦, 向井 徹. *Mycobacterium smegmatis* 由来 Fibronectin Attachment Protein の解析. 第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 神戸.
- 9) 牧野正彦, 前田百美, 木村博昭, 武下文彦, 稲垣勝也. らい菌感染マクロファージの抗原提示能の増強. 第 33 回日本免疫学会総会 2003 年 12 月 福岡.
- 10) 福富康夫, 牧野正彦. マクロファージ内におけるらい菌増殖機構. 第 33 回日本免疫学会総会 2003 年 12 月 福岡.

3. その他 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

- |   |        |    |
|---|--------|----|
| 美, 甲斐雅規, 牧野正彦, 向井 徹. 抗酸菌 Fibronectin Attachment Protein の機能解析. 第 76 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2003 年 7 月 神戸 | 3. その他 | なし |
|---|--------|----|
- 5) 前田百美, 遠藤真澄, 寺尾恵治, 牧野正彦. シュワン細胞とらい菌の相互作用の解明. 第 76 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2003 年 7 月 神戸
  - 6) 武下文彦, 向井 徹, 宮本友司, 牧野正彦. らい菌 Fibronectin Attachment Protein (FAP)を標的にした DNA ワクチンの検討. 第 76 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2003 年 7 月 神戸
  - 7) 甲斐雅規, 中田 登, 牧野正彦. 速発育性抗酸菌 *M. smegmatis* のトランスポゾン変異株ライブラリーの作製と解析. 第 86 回日本細菌学会関東支部総会 2003 年 10 月 横浜.
  - 8) 宮本友司, 武下文彦, 中田 登, 前田百美, 甲斐雅規, 牧野正彦, 向井 徹. *Mycobacterium smegmatis* 由来 Fibronectin Attachment Protein の解析. 第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 神戸.
  - 9) 牧野正彦, 前田百美, 木村博昭, 武下文彦, 稲垣勝也. らい菌感染マクロファージの抗原提示能の増強. 第 33 回日本免疫学会総会 2003 年 12 月 福岡.
  - 10) 福富康夫, 牧野正彦. マクロファージ内におけるらい菌増殖機構. 第 33 回日本免疫学会総会 2003 年 12 月 福岡.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得           なし
2. 実用新案登録   なし