

論文の内容の要旨

論文題目

次世代シーケンサーを用いたレトロウイルス clonality 解析システムの構築

氏名 安原 桜

HTLV-1 と ATL

HTLV-1 はヒトにおいて最初に同定されたレトロウイルスであり、成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell Leukemia, ATL) の原因ウイルスである。

ATL は様々な病態、臨床経過をとり、①急性型、②慢性型、③くすぶり型、④リンパ腫型の 4 つの病型と急性転化の 1 つの病態に分類される。ATL の病型は急性型、慢性型は早急な治療を必要とする Aggressive タイプと経過観察を行う慢性型、くすぶり型の Indolent タイプに大きく分類することができる。

HTLV-1 キャリアと感染細胞率 (ウイルスロード)

ヒトの T リンパ球に HTLV-1 が感染すると、1 細胞あたり 1 個のプロウイルスがランダムに組み込まれる。HTLV-1 感染者の血液中の全リンパ球数とプロウイルス数を Real time PCR により測定することで全リンパ球中の HTLV-1 感染細胞の含有率が測定できる。ほとんどの無症候性キャリアの場合、全リンパ球中約 1%前後が感染細胞である。この感染細胞率 (ウイルスロード) が 4%を超えると ATL 発症リスクが増加することが大規模コホート研究(JSPFAD)によって報告されている (Iwanaga et al., Blood 2010)。

クローナリティ解析

ATL 細胞はサザンブロット法で解析すると、HTLV-1 のモノクローナルな組み込みが検出される。従って、ATL は HTLV-1 感染細胞が腫瘍化してモノクローナルに増殖したものと考えられている。無症候性キャリアにおいては、感染細胞はポリクローナルな集団であるが、そのうちの特定のクローンが増殖してモノクローナルな増殖が認められる状態が ATL である。HTLV-1 感染細胞のクローナリティを経時的に解析することができれば、クローナルな増殖の実態と経緯が明らかになり、ATL 発症リスクを予測することができると考えられる。既存の HTLV-1 感染細胞のクローナリティ解析はサザンブロット、もしくは Inverse PCR 法であるがこれらの方法では、感度に限界があり、全 HTLV-1 キャリアのクローナリティ解析を行うことはできない。サザンブロット法は

ウィルスロードが数%以上の場合のみクローナリティ解析が可能であり、ウィルスロードの低い HTLV-1 キャリアのクローナリティ解析には利用できない。Inverse PCR 法の場合、PCR の増幅バンドの濃淡からクローナリティを判断することになり定量性に欠ける。既存システムでは全 HTLV-1 キャリアの感染細胞のクローナリティを包括的に解析することは不可能である。

新規 HTLV-1 感染細胞クローナリティ解析システム

我々は次世代シーケンサーを利用した全 HTLV-1 キャリアの HTLV-1 感染細胞クローナリティ解析システムの構築を試みた。HTLV-1 感染キャリアのウィルスロードの平均は全リンパ球中の 1% 前後であるため、Nested splinkerette PCR 法を用いて HTLV-1 ゲノム組み込み部位を濃縮し、シーケンスを行った。シーケンサーは illumina 社 HiSeq 利用し、ペアエンドシーケンスを行った。

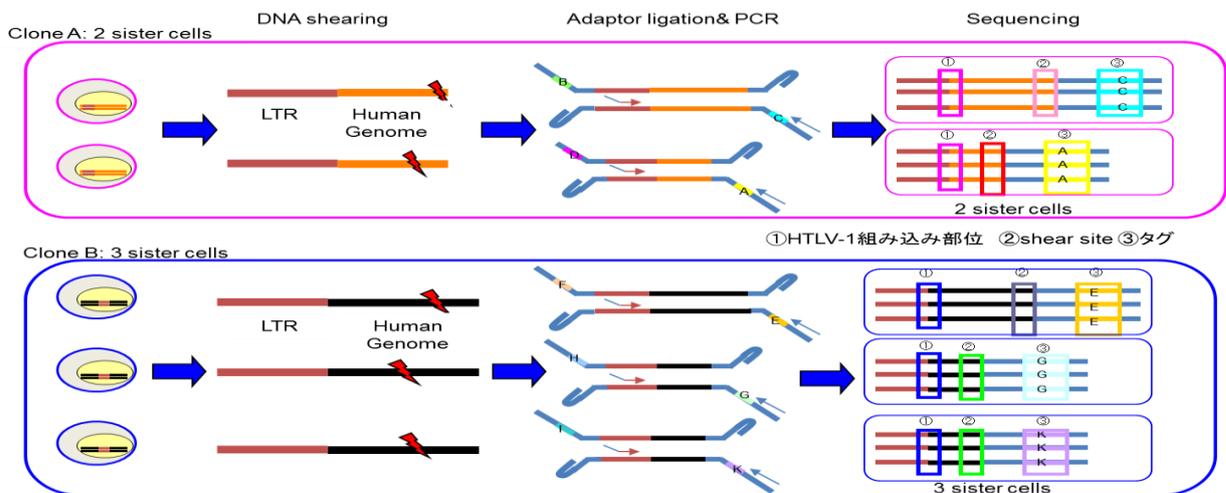


Fig1 HTLV-1 感染細胞クローナリティ解析システムの概要

クローナリティ解析を行うためには I.各クローンを識別する指標、II.各クローンを構成する細胞数を計測するための指標、この 2つを検出することが必要である。

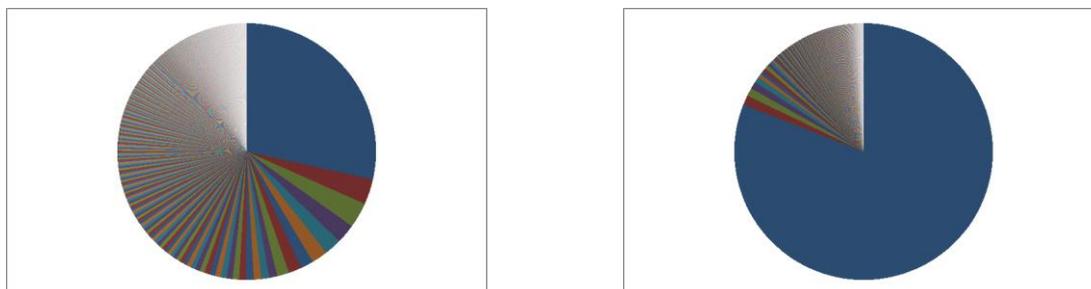
各クローンを識別する指標は HTLV-1 プロウィルスのヒトゲノム組み込み部位を利用した。HTLV-1 キャリアは血液中有に数十から数千のクローンを持っていると予測されており、HTLV-1 プロウィルスのゲノム組み込み部位はクローンごとに異なる。HTLV-1 3'LTR に特異的なプライマーを作成し PCR を行うことでクローンの組み込み部位が得られる (Fig1 の①)。シーケンサーから得られた配列中に LTR 配列を含むリードを blast を用いて抽出し、LTR 配列をトリミングしたリードをヒトゲノムにマッピングしゲノム組み込み部位を同定した。

各クローンを構成する細胞数 (sister cell) を計測するための指標としてゲノムの断片化処理で生じるゲノムの shear site、およびランダムな 8bp のタグ配列を利用した。sister cell ごとに断片化されるゲノム位置 (shear site) は異なる。同じ shear site が生じた場合、PCR duplicates とみなすことで sister cell 数を計測することができる。しかし、サンプル処理の方法論的制約により shear site は各組み込み部位に最大でも 400 カ所程度である。モノクローナルな増幅を示す ATL 細胞では、同一クローンに属する細胞数が膨大であり、shear site を共有する可能性が高く、sister cell の細胞数の上限は 400 個前後となる。この限界を克服する為に、タグ配列と shear site 両方

を考慮した sister cell の計測システムを構築した。ランダムな 8bp のタグを組み込んだアダプターを利用し PCR を行くと、各 sister cell に対応する特異的なタグ配列が得られる。先行研究で構築された解析システムは shear site のみ利用し、統計的に sister cell 数を補正しているが、限界がある。同じ shear site をもつ配列が複数存在する場合もタグ配列を利用することで PCR duplicate と異なる sister cell 由来配列を識別することが可能となり、より正確なクローナリティ解析が可能になると期待できる。

タグ配列の検証

急性型 ATL 患者のリンパ球から抽出したゲノム DNA を用いて、タグ配列の有無によるクローナリティ解析結果について検証した。real time PCR によるウィルスロードは 32.56%であった。shear site のみ利用した場合、shear site、タグ配列を利用した場合どちらも Major clone が検出された。Major clone のクローナリティはタグ配列の有無により全く異なる結果が得られた。Shear site から得られる Major clone の Sister cell 数は全 HTLV-1 感染リンパ球 3256 中 912 (28.0%) であった。全 HTLV-1 感染細胞数は 10,000 リンパ球中に存在する HTLV-1 感染リンパ球をウィルスロードより算出した。タグ配列を利用することで同じ shear site を持つシーケンスリードを sister cell の違いにより区別した結果、Major Clone の Sister cell を全 HTLV-1 感染リンパ球 3256 中 2621(80.5%)得ることができた。上記の結果より、タグ配列を用いることで Major clone のクローナリティが大きく変化することが明らかとなった。急性型 ATL はモノクローナルな HTLV-1 の組み込みが確認されることがわかっている。タグ配列を利用したクローナリティがより正確である可能性が高いと考えられる。



A) shear site を利用した場合

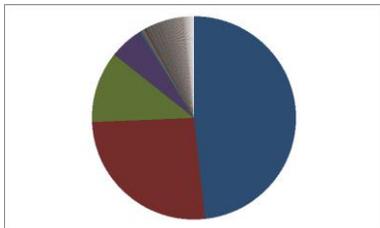
B) Shear site とタグ配列を利用した場合

Fig2 タグ配列を利用した急性型 ATL クローナリティ解析

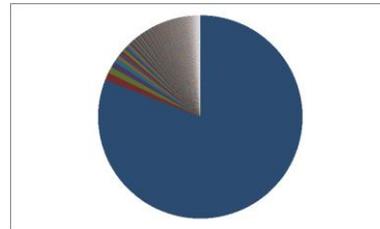
病型の異なる ATL のクローナリティ解析

ウィルスロードが同レベルの異なる病型を示す ATL 患者のクローナリティを比較した(Fig3 A,B)。くすぶり型、及び急性型 ATL 患者リンパ球から抽出したゲノムを使用した。ウィルスロードはそれぞれ 31.15%、32.56%である。ウィルスロードより算出した 10,000 リンパ球中に存在する全 HTLV-1 感染細胞数は 3115、3256 である。クローンはそれぞれ、くすぶり型検体は 220 クローン、急性型検体は 325 クローン得られた。くすぶり型、急性型 ATL 検体から得られた Major clone のクローナリティはそれぞれ 1503 (48.2%)、2621(80.5%)であった。Second Major clone のクローナリティはそれぞれ 812 (26.0%)、102 (1%) であった。急性型 ATL の場合、major clone が全 HTLV-1 感染細胞の大半を占めているのに対してくすぶり型の場合その割合が少ない。また、急性型 ATL は second major clone の割合は小さいのに対して、くすぶり型 ATL の場合その割合

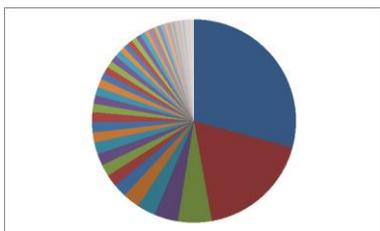
が大きい。くすぶり型は異常リンパ球の割合が 5%以上という以外は無症候性キャリアとほとんど変わらない。ウィルスロードが同程度のくすぶり型患者、無症候性キャリアの HTLV-1 感染細胞クローナリティを比較した(Fig3 C,D)。ウィルスロードはそれぞれ 9.01%、7.57%であった。ウィルスロードより算出した 10,000 リンパ球中に存在する全 HTLV-1 感染細胞数は 901、757 である。くすぶり型検体から 52 クローン、無症候性キャリア検体から 827 クローン得られた。Major clone のクローナリティはそれぞれ 263(27%)、83(10%)であった。また Second Major clone のクローナリティは 161 (16%)、38 (5%) であった。2 検体を比較すると、Major clone のクローナリティが異なることが確認できた。



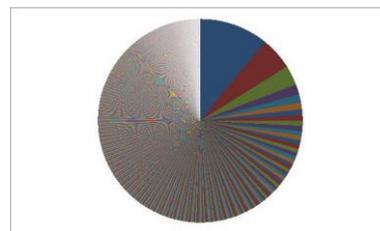
A)くすぶり型 ATL(31%)のクローナリティ



B)急性型 ATL(32%)のクローナリティ



C)くすぶり型 ATL(9%)のクローナリティ



D)無症候性キャリア(7%)のクローナリティ

Fig.3 病型の異なる ATL 患者のクローナリティ解析 (%はウィルスロードを示す)