

論文審査の結果の要旨

氏名 安原（青木） 桜

本論文では、ヒト白血病ウイルス HTLV-1 感染細胞が腫瘍化することで発症する成人 T 細胞白血病(ATL)の発症に関わる分子機構の理解を目指して、腫瘍細胞(ATL 細胞)のクローン性増殖の実態を明らかにすることを旨とした。がんの研究において、腫瘍細胞のクローンとしての増殖とそのプログレッションにおける変化(クローナリティ)は、浸潤・転移や薬剤耐性の分子機構を理解する上で重要な視点である。ATL のユニークな点は、ATL 細胞がレトロウイルスである HTLV-1 感染細胞であるということから、ATL 細胞の「感染細胞としてのクローン」と「遺伝子変異などの特徴に基づく一般的ながん細胞におけるクローンの概念」の二つの視点があり得るということである。従来、サザンブロット法による解析結果から、ATL 細胞は HTLV-1 感染細胞の単クローン性増殖が本態であると考えられてきた。また、ATL は臨床病型として、くすぶり型(smoldering type)、慢性型(chronic type)、急性型(acute type)およびリンパ腫型(lymphoma type)の 4 型が区別され、予後と密接に相関することが知られている。

一方、PCR を利用した解析から、ATL 発症以前の HTLV-1 感染者(キャリア)の生体内では、感染細胞の多数のクローンが存在していることが示されていた。本論文では、種々の病型の ATL 患者個体内における感染細胞クローンの数と個々のクローンのサイズを明らかにする解析系を開発すること、及びそれを用いた実際の検体の解析により、ATL 細胞のクローナリティを明らかにすることを旨とした。

まず Inverse PCR 法を用いた解析で、20 検体中、19 検体で ATL クローンの候補を検出することができた。しかし、Inverse PCR 法を用いる場合には、HTLV-1 組み込み部位と制限酵素サイトの距離等により PCR による検出が不安定であることなどが問題であることが確認された。

そこで我々は、最近報告された次世代シーケンサーを用いて HTLV-1 のヒトゲノム組み込み部位のゲノム配列を決定し、クローンサイズを解析する系を改良して、定量性と感度の向上を目指した。申請者は統計的な補正に頼らず、直接感染細胞を個別に識別できるシステムの開発を目指した。具体的にはランダムな塩基配列 8bp のタグ配列を追加したアダプターを用いて感染細胞の定量を行った。タグのバリエーションは 4 の八乗 (65,536) 種類あり DNA shear site を組み合わせると 2600 万以上の細胞を識別できる。検証実験では、ATL2 検体を用いて再現性について検証した結果、いずれも上位 10 クローンのクローンサイズ再現性が確認された。次に、くすぶり型 2 検体、急性型 1 検体、無症候性キャリア 1 検体を用いてクローナリティの特徴を比較検討した。その結果、急性型 ATL は Major clone が全体の 80%以上を占めていたのに対して、くすぶり型 2 検体は Major clone、Second major clone が大きな割合を占めており、2 つの Major clone があるという点では類似していたが、そのクローナリティは異なっていた。感染細胞数の割合を示すウィルスロードが 30%と 7%で異なっており、30%の検体では Major clone の割合が大きく、急性型に近かったことから急性転化のリスクが高いことが予想された。これらの結果は、Inverse PCR を用いて検証した結果、つまり、くすぶり型 ATL では複数の Major clone が検出されるという知見とよく合致するが、前者は半定量的であり、新測定系は定量性に優れているという違いがある。

JSPFAD コホート研究により、末梢血ウイルスロード 4%以上がキャリアからの ATL 発症リスクファクターであることが示されている。しかし、感染細胞のクローナリティと ATL 発症との関係は明らかでない。新規に確立した解析システムを用いることで、急性型とくすぶり型 ATL におけるクローナリティの違いが示され、一方、無症候性キャリアはポリクローナルであることが示された。従って、ATL 発症リスクファクターの評価には、ウイルスロードに加えて、クローナリティの重要性が示された。これらの結果をもとに、ATL の病型分類、予後予測をモデル図として表した。ウイルスロードとクローナリティ解析を組み合わせることで早期 ATL 発症予測また ATL 予後予測、ATL 病型分類に貢献することが期待される。

したがって、博士(生命科学)の学位を授与できると認める。

以上1902字