

図1 HTLV-1 感染細胞から ATL 細胞へ

感染初期には Tax, HBZ の他に Rex, p12 などのウイルス因子によって感染細胞は様々な影響を受ける。長期間の潜伏期を経て不死化、腫瘍化した細胞ではウイルス因子の発現はまれであり、ゲノム、エピゲノムの異常によって ATL 細胞の特徴が維持される。

態は説明できない。ほかには p27, Rb, Fas などの遺伝子変異が報告されている。

我々は最近、168 例の ATL 患者に対して SNP アレイをベースとした高解像度コピー数解析を行い、データベースに登録したり。これは CGH では検出不可能な、コピー数の変化を伴わないヘテロ接合性消失 (LOH) や片親性ダイソミー (UPD) の検出も可能である。UPD は古典的な癌抑制遺伝子の不活化のメカニズムの一つであり、また活性化型の遺伝子変異が腫瘍集団に固定する際の重要なメカニズムとなっていることが示されていることから、SNP アレイによるこうした UPD のマッピングは、ATL の腫瘍化の分子機構を明らかにしていく上で有用である。

3. ATL 細胞のエピゲノム異常

ATL におけるエピジェネティック異常は、まだ全体像がつかめていないのが現状である。DNA のメチル化については様々な解析方法が開発されており、ATL 細胞においては p16, MEL18, KLF4, EGR3 などの転写に関わる CpG アイランドの異常なメチル化が報告されている⁹⁾。これらは機能的にも ATL 細胞の生存や細胞周期制御を担っており、エピジェネティックな異常が癌抑制性遺伝子の発現を抑制していると考えられる。特に p16 については、上述したゲノムの欠損も一定の頻度で観察されており、DNA の欠損とメチル化の両面で抑制されている。また最近、同じく細胞周期抑制因子である CDKN1A (p21) についても同様に

エピジェネティックな抑制が報告されており⁹⁾、p16, p21, p53 などの細胞周期チェックポイントからの脱制御が ATL 細胞の特徴と言える。

ヒストンの科学修飾は非常に多くのバリエーションがあり、ATL についてはほとんど全体像が見えていない。しかし、多くのがん細胞の悪性度と強くリンクしている Polycomb ファミリーによる H3K27 のトリメチル化を介した転写抑制については、ATL 細胞の生存や病気の予後に関わることが報告されている⁷⁾。我々は Polycomb ファミリーの EZH2 や SUZ12 の過剰発現が miRNA の発現を抑制することによって、ATL 細胞の恒常的な NF-κB 経路の活性化を支配していることを明らかにしたり。Polycomb による広範な遺伝子発現抑制は、細胞の正常な分化や機能に必須であると同時に、バランスが崩れることによって細胞に重大な影響を及ぼすと考えられ、がん全体における分子標的の最重要候補の一つとなっている。今後、網羅的解析との組み合わせにより、ATL 細胞のエピゲノム異常の詳細が明らかにされるであろう。

4. ATL 細胞におけるシグナル伝達経路と発現異常

ゲノム及びエピゲノムの異常によって正常から逸脱した遺伝子発現は、各々が独立したイベントではなく、シグナル伝達系を使って密接に関わり合い、より複雑なネットワークを形成している。シグナル伝達経路は細胞の正常な機

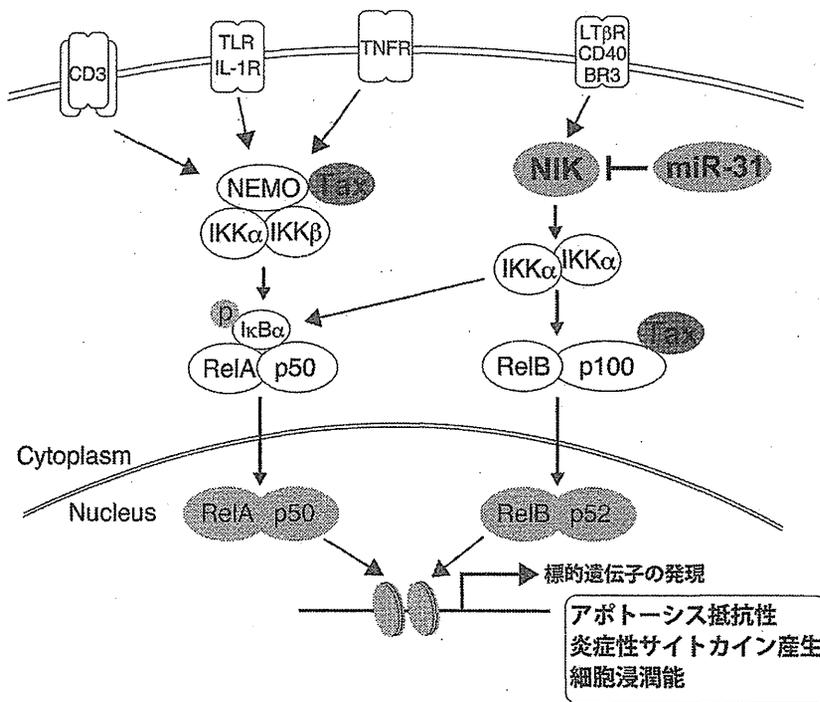


図2 NF-κBシグナル経路とHTLV-1/ATL

感染細胞ではTaxが主にNEMO, p100との結合を介して定型的, 非定型的経路を強烈に活性化する。一方, ATL細胞ではTaxの発現はまれであり, NIKの過剰発現によってNF-κBシグナルが恒常的に活性化されている。

能に関わる遺伝子発現制御に必須であり, 経路の構成因子の質と量の変化は, シグナルによって増幅, 拡散し, 細胞の重大な結果を及ぼす。分子標的として有望なのは, こうした異常を示すシグナル経路の鍵分子である。

ATLには特徴的なシグナル伝達異常があり, 特に腫瘍細胞の生存と増殖に重要なのがNF-κB経路とJAK/STAT経路である⁹⁾。また最近の阻害剤を用いた研究や変異の解析から, mTOR経路やNotch経路などの, 他のがん研究で明らかにされているがん関連シグナルがATLにおいても活性化していることが明らかにされつつある。さらに最近の展開として, 別々のシグナル伝達経路同士の複雑なクロストークが, がんシグナルの増幅と恒常性に寄与していることも示唆されており, 改めてシグナル伝達研究の推進がATLの分子レベルの理解に必須であると考えられる。

薬剤等で特異的にNF-κB経路を阻害すると, ATL細胞に強烈なアポトーシスを誘導することから⁹⁾, ATL細胞はNF-κB経路に依存した状態であると考えられる(Oncogene Addiction)。HTLV-1感染細胞ではウイルス遺伝子であるTaxがNF-κBの定型的及び非定型的経路を劇的に活性化するが, Taxの発現が認められないATL細胞におけるNF-κB経路の活性化メカニズムは不明であった。その後, 遺伝子発現解析によってNF-κB Inducing Kinase (NIK)のmRNAの過剰発現が恒常的なNF-κB

の活性化に寄与していることが明らかになった¹⁰⁾。NF-κB経路の活性化は様々なサイトカインやBCL-x1, XIAPなどの抗アポトーシス因子の発現を誘導し, 細胞の増殖能, 生存能に寄与する(図2)。

ATL細胞の個々の発現異常は多岐にわたる。IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10などのサイトカインの高発現は, レセプターの発現と協調して腫瘍細胞の増殖に関わる。ATL細胞特異的な細胞表面タンパク質としてはOX40, CCR4, TSLC1などが同定されており, 腫瘍細胞マーカーや分子標的の有用な候補として研究が盛んに行われている。またATL細胞はFoxP3を発現しており, 制御性T細胞由来であることが示唆されている。最近の網羅的発現解析により, ATL細胞の遺伝子発現パターンは明らかにされ, 臨床応用の分子基盤が出来つつある。今後は細胞機能や発症メカニズムに関わる遺伝子の同定や, 感染初期から腫瘍化までの遺伝子発現異常のダイナミズムの検討が課題である。

5. miRNAによる新たな展開

近年の生物学で最も発展したのがmiRNAである。1993年に線虫で初めてmiRNAが発見されて以来, 急速に研究が進展し, miRNAに関する知識も深まってきた。miRNAは遺伝子発現全体を制御する上流の分子群であり, がんやウイルス感染症を考える上でも欠かす事のでき

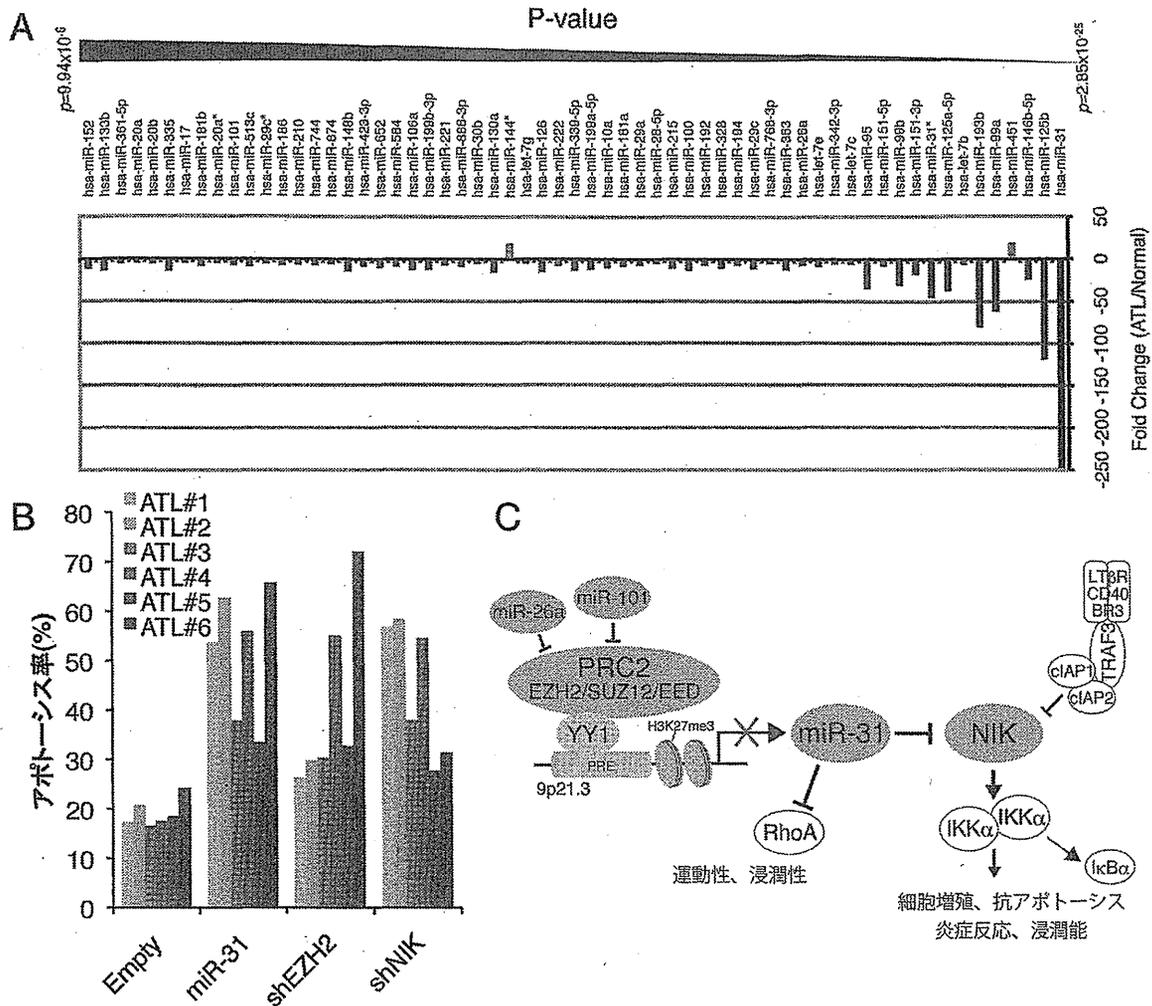


図3 ATL細胞におけるmiRNAの発現パターンと分子標的の可能性

- (A) ATL細胞のmiRNA発現異常。ATL40例と正常CD4+T細胞22例について網羅的なmiRNA発現解析を行った。ATLで異常を示したmiRNAは、そのほとんどが減少傾向であった。
- (B) ATL細胞に対するmiR-31の導入実験。ATL患者由来新鮮腫瘍細胞に対して、レンチウイルスベクターを用いてmiR-31の導入、EZH2もしくはNIKのノックダウンを行うと、アポトーシスが誘導される。これらの因子の発現量がATL細胞の生存に寄与していると考えられる。一方、正常T細胞は同様の処理では細胞死が誘導されない。
- (C) miR-31をとりまく分子メカニズム。ゲノムの欠損とPolycomb依存的なエピジェネティックな異常によってmiR-31の発現が抑制されると、標的遺伝子であるNIKやRhoAなどの発現量が上昇し、細胞に重大な影響を与える。

ない因子として位置づけられている。miRNAによる遺伝子発現制御機構の詳細は他の文献を参考されたい¹⁰⁾。特筆すべきは、miRNAの存在が示されて以降、遺伝子発現制御研究は飛躍的に進展したことである。

ATL, HTLV-1関連分野におけるmiRNAの研究報告は、他の疾患と比較するとそれほど多くはない。しかし細胞株及び臨床検体による系統的且つ網羅的解析によって全体像はクリアになりつつある。我々はATL細胞の分子病態の全体像をつかむために、HTLV-1感染者コホート共同研

究班JSPFADの全面的協力を得て、ATL40例のmiRNAの網羅的な発現解析を行った。加えて、mRNA発現及びゲノムDNAコピー数の大規模な統合解析を行うことにより、ATL細胞の分子レベルの全体像をデータとして取得することに成功した。ATLでは61種の異常発現miRNAがあり、そのうち59種のmiRNAが正常T細胞に比べて低値を示すことがわかった(図3A)。これは、腫瘍細胞はmiRNAの発現が低下傾向にあるという他のがん研究の結果と一致している。これらのmiRNAはATL細胞の

新たな分子マーカーであり、また一つひとつが腫瘍細胞の特徴に寄与していると考えられる。

61種の発現異常 miRNAのうち、miR-31が例外なくすべてのATL患者で著しく減少していた(0.00403倍)。miR-31の発現減少は、乳がんにおける転移、浸潤過程において重要であることが報告されている¹²⁾。我々は、miR-31の著しい減少がATL細胞の特徴を反映していると考え、ATL細胞の mRNA 発現プロファイルの結果と統合し、さらに *in vitro* の複数の実験を経て、miR-31の新規標的遺伝子として、ATL細胞におけるNF- κ B活性化の原因遺伝子であるNIKを見いだした(図2)。実験の結果、正常T細胞ではmiR-31の発現が比較的高くNIKの発現を抑制しているが、miR-31の異常な発現低下がNIKの発現誘導とそれに伴うNF- κ B経路の恒常的活性化を誘発することがわかった。さらにATL細胞株及び新鮮ATL細胞に対してmiR-31を再導入すると細胞死が誘導された¹³⁾。このことは、miR-31の細胞内レベルが腫瘍細胞の表現型に直接影響していることを意味し、新しい分子標的としての有用性が示された(図3B)。

ATL臨床検体を詳細に解析した結果、ゲノムの欠損と上述したPolycombファミリー依存的なエピジェネティックな異常によって、miR-31の発現欠失がすべてのATL患者で起こっていることがわかった。さらに、PolycombファミリーがmiR-31を抑制することによってNIK-NF- κ B経路を活性化する分子機構は、ATLだけでなく乳がん細胞やB細胞における免疫応答反応においても保存されていた。Polycombファミリー、NF- κ B経路、miR-31はそれぞれが単独で多彩な機能によって、細胞の恒常性や分化などの様々なプロセスに関わると同時に、さらにクロストークを形成することによって、より複雑な遺伝子発現制御ネットワークを形成していると考えられる(図3C)。我々の実験結果は、長らく不明であったATL細胞におけるNF- κ B経路の恒常的活性化の詳細な分子機構を明らかにした。ATL細胞はこの分子ネットワークの異常に依存しており、Polycombの制御、もしくはmiR-31の補充による新たな治療法の開発につながると期待される。

6. 今後の展望

ゲノム、エピゲノムの異常を背景として、細胞周期の脱制御、miRNAの発現低下、シグナル伝達経路の恒常的活性化が

ATL細胞の特徴である。またHTLV-1由来因子による病原性が *in vivo* の様々なステージにおいて証明され始めている。今後は、これまでの感染細胞株や終末像である新鮮ATL細胞の詳細なデータをまとめ、感染細胞の恒常性の破綻、感染クローンの変遷、発症や薬剤耐性の分子メカニズム、などについて取り組む必要があるだろう。

文 献

- 1) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, *et al.* Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-Dependent NF- κ B Pathway in Adult T Cell Leukemia and Other Cancers. *Cancer Cell* 21: 121-135, 2012.
- 2) Kamada N, Sakurai M, Miyamoto K, *et al.* Chromosome abnormalities in adult T-cell leukemia/lymphoma: a karyotype review committee report. *Cancer Res.* 52: 1481-1493, 1992.
- 3) Tsukasaki K, Krebs J, Nagai K, *et al.* Comparative genomic hybridization analysis in adult T-cell leukemia/lymphoma: correlation with clinical course. *Blood* 97: 3875-3881, 2001.
- 4) Oshiro A, Tagawa H, Ohshima K, *et al.* Identification of subtype-specific genomic alterations in aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 107: 4500-4507, 2006.
- 5) Yasunaga J, Taniguchi Y, Nosaka K, *et al.* Identification of aberrantly methylated genes in association with adult T-cell leukemia. *Cancer Res.* 64: 6002-6009, 2004.
- 6) Watanabe M, Nakahata S, Hamasaki M, *et al.* Downregulation of CDKN1A in adult T-cell leukemia/lymphoma despite overexpression of CDKN1A in human T-lymphotropic virus 1-infected cell lines. *J. Virol.* 84: 6966-6977, 2010.
- 7) Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, *et al.* Overexpression of Enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy. *Haematologica* 96: 712-719, 2011.
- 8) Hall WW and Fujii M. Deregulation of cell-signaling pathways in HTLV-1 infection. *Oncogene* 24: 5965-5975, 2005.
- 9) Watanabe M, Ohsugi T, Shoda M, *et al.* Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF-kappaB, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood* 106: 2462-2471, 2005.
- 10) Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, *et al.* Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood* 111: 5118 - 5129, 2008.
- 11) He L, and Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5: 522-531, 2004.
- 12) Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, *et al.* A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 137: 1032-1046, 2009.

2. HTLV-1 感染症と miRNA

山岸 誠, 渡邊 俊樹

東京大学大学院新領域創成科学研究科
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野

HTLV-1 はウイルス遺伝子産物によって感染 T 細胞を不死化, 腫瘍化に導くが, 成人 T 細胞白血病 (ATL) を発症するまでの長い潜伏期間の背景にある分子機構は不明な点が多い。感染細胞及び ATL 細胞において様々な遺伝子発現異常が各々の特徴に寄与しているが, 一方でそれらを制御する上流のイベントは不明な点が多かった。miRNA による遺伝子発現調節という新たな概念が提唱されて以来, HTLV-1/ATL の領域においても複数の研究報告があり, 分子レベルでの理解が深まったと言える。特に, ATL の多数の臨床検体を用いた網羅的解析の結果から, 腫瘍細胞の特徴の 1 つである NF- κ B の恒常的活性化の分子メカニズムが明らかとなった。miRNA を介したエピジェネティック制御と NF- κ B 経路のクロストークも明らかとなり, miRNA 研究から新たな分子機構も提唱された。一方で HTLV-1 の生活環と miRNA の関わりや miRNA 発現異常の原因解明など, 今後の課題は多い。miRNA は多機能性であり, これらの分子基盤の創設が HTLV-1 研究の今後の発展に寄与すると考えられる。

序論

microRNA (miRNA) は 19 – 24mer の非コード RNA で, 標的遺伝子の 3' UTR に結合し, RNA の分解と翻訳阻害を誘導する。標的遺伝子の認識には揺らぎがあるため, 一つの miRNA が複数の遺伝子発現に対して抑制的に働くことができる^{1,2,3)}。進化的にも保存性が高く, 発生や分化, 各細胞の機能において不可欠であることは十分に証明されている^{4,5)}。また疾患研究の成果から, miRNA の存在量のバランスが細胞の運命を支配していることも明らかである^{6,7,8)}。ウイルス学においても miRNA 研究は盛んに進められており, 新たなパラダイムを提供している。それは, 外来種で

あるウイルスは, 宿主細胞の miRNA パターンに影響され, また逆にそのパターンに影響を与えるということである。つまり宿主側はウイルスに対する防御機構として miRNA を利用するし, 一方でウイルスによる宿主 miRNA 発現への影響は, ウイルスによる病原性の本質の一つであることも示唆されている⁷⁾。さらに, 主にヘルペスウイルスにおいて, ウイルス自身がゲノム上に miRNA をコードし, 自身の生活環の維持と宿主に与える病原性に貢献することも報告されている^{7,9,10)}。短い RNA がウイルスと宿主の両者に与えるインパクトは, 発見当初の予想を遥かに超えるものであったと言えるであろう。

HTLV-1 研究領域における miRNA 研究は, 未だ発展途上であり, 十分に理解が進んでいないのが現状である。それは, HTLV-1 がウイルス学的手法によって感染実験を進めることが極めて困難であり, HTLV-1 と miRNA の直接的な因果関係を証明することが容易でないことに起因する。しかし, HTLV-1 感染によって樹立された細胞株や感染細胞の終末像である成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞の詳細な解析が行われ, HTLV-1 に関連する miRNA の全体像はクリアになりつつある。本総説では, HTLV-1/ATL 研究領域の成果をまとめ, ウイルスと miRNA の関係, 及び miRNA 異常による分子病態を概説し, miRNA 研究の

連絡先

〒108-8639

東京都港区白金台 4-6-1

東京大学大学院新領域創成科学研究科

メディカルゲノム専攻病態医療科学分野

TEL: 03-5449-5298

FAX: 03-5449-5418

E-mail: myamagishi@mgs.k.u-tokyo.ac.jp

tnabe@ims.u-tokyo.ac.jp

今後の発展と課題について議論する。

HTLV-1 由来 miRNA の存在について

現在までに、EBV や KSHV などのヘルペスウイルス属を中心に、200 を超える多くのウイルス由来 miRNA が発見されている⁷⁾。これらの DNA ウイルスは、宿主 miRNA と同様にウイルス由来 miRNA を転写から Drosha - Dicer - RISC を経る miRNA の成熟過程をそのまま利用できる。また、ウイルス由来 miRNA は他のウイルスタンパク質と異なり短い RNA であるため免疫原性がなく、ウイルスの複製と潜伏化に適した環境を誘導することができる。さらに少しの変異が及ぼす影響が大きく、二本鎖 DNA の両方を効率よく利用できるという利点も、DNA ウイルスが miRNA をコードする理由であると考えられている。同様の事実はレトロウイルス属にも当てはまることであり、HIV-1 を中心に多くの研究者によって探索が行われている^{10,11,12,13)}。HTLV-1 についてもウイルス由来 miRNA の存在が期待された。Li らはステムループ構造を予測するアルゴリズムを利用して HTLV-1 のセンス鎖に 3 つ、アンチセンス鎖に 8 つの miRNA を予測している¹⁴⁾。一方 Lin らは HTLV-1 感染細胞株 MT-2 細胞の 18-24 塩基の RNA から cDNA ライブラリを作成し、698 クローンのシークエンスを行ったが、HTLV-1 由来 miRNA は発見されなかったと報告している¹³⁾。Ruggero らは総説中でさらに詳細に解析したと言及しているが、やはり非常に限定的な検出しかされなかったと述べている¹⁵⁾。総合すると、HTLV-1 由来 miRNA は存在したとしても、限定された環境下でしかも非常に低レベルであることが想定される。ウイルス由来 miRNA は相補鎖のウイルス RNA に perfect match であり、ウイルスの複製効率とウイルス遺伝子による病原性に強く影響を与える。また多くの宿主遺伝子に対しても影響を及ぼすと考えられる。HTLV-1 が固有の miRNA を発現するか、またそれがどのような機能をもつのかという点は、生理的条件下における詳細な解析により、今後結論が出されるであろう。

HTLV-1 と宿主 miRNA の関係

他のウイルスと同様に、HTLV-1 も RNA として転写される際には複雑な 3' UTR 構造を持ち、宿主及びウイルス由来 miRNA の標的となる条件を満たしている。HIV-1 に関しては複数の研究グループによって宿主 miRNA によるウイルス RNA の抑制と潜伏化誘導が報告されている^{16,17,18)}。この時、HIV-1 RNA は APOBEC3G とともに、P-body に存在することが示されている¹⁸⁾。一方 HTLV-1 については、アルゴリズムを用いた標的予測では複数の宿主 miRNA が HTLV-1 RNA に結合できることが予測されているが^{15,19)}、実験的な検証は行われていない。今後、これらの miRNA 群の発現量とウイルスの複製レベルの関係を調べることに

より明らかになるであろう。また、後述する網羅的な miRNA 発現解析の結果と統合することにより、有益な情報が得られると期待される。

一方、HTLV-1 が miRNA の合成経路に対して与える影響については少しずつ理解が進んでいる。Lin らは、宿主の持つ siRNA による標的遺伝子のノックダウン機構に対して、HTLV-1 Tax は大きな影響を与えなかったことから、Tax は RNAi の機構とはリンクしないとしている¹³⁾。一方 Abe らは、HTLV-1 Rex が Dicer と結合し、shRNA から siRNA への成熟過程に影響を与えることを報告している²⁰⁾。またつい最近、Rahman らは Jurkat 細胞に Tax を導入した際の miRNA の発現パターンを網羅的に解析した²¹⁾。Tax を導入した細胞では 2 倍以上変化した 41 種の miRNA のうち、35 種の miRNA が減少していた。Tax が miRNA 合成経路に対してどのような分子機構で影響を与えるのか興味深い。また HTLV-1 は主に Tax を介して感染細胞のシグナル伝達系を攪乱することにより^{22,23)}、miRNA の発現パターンにも大きく影響を与えると考えられる。miRNA の個別の機能が少しずつ明らかとなっており、改めて HTLV-1 が宿主 miRNA に与える影響の解析が求められている。

HTLV-1 感染細胞における遺伝子発現異常と miRNA

標的遺伝子発現の恒常性の維持が miRNA の本来の機能の一つと言えるが、HTLV-1 感染細胞や ATL 腫瘍細胞では、その恒常性の破綻が明らかに証明されている。Cyclin-CDK 経路、p53 経路、JAK-STAT 経路などの異常の他に、特に NF- κ B シグナルの著しい活性化が特徴的である^{22,24)}。HTLV-1 感染細胞においてはウイルス遺伝子産物である Tax が NF- κ B の定型的 (canonical) 及び非定型的 (noncanonical) 経路を強烈に活性化し、その結果、感染細胞はアポトーシス抵抗性を獲得する^{22,23,25,26)}。一方で、ATL 細胞においては Tax の発現は非常に限定的であり、代わりに NF- κ B の非定型的経路の上流に位置する NF- κ B inducing kinase (NIK) が ATL 細胞において過剰に発現し、恒常的な NF- κ B 経路の活性化を誘導する²⁷⁾。現在までに様々な NF- κ B 経路の阻害剤が開発され、いずれも感染細胞や ATL 細胞に対して強力なアポトーシスを誘導することから、感染細胞及び ATL 細胞は NF- κ B 経路に "addict" した状態であると考えられる^{28,29,30,31,32,33,34,35)}。また興味深い事に、HTLV-1 感染キャリアから分離した末梢血単核球 (PBMC) からは、通常 Tax の発現が認められないが、やはり NF- κ B 経路が活性化しているデータが示された²⁸⁾。このことから NF- κ B 経路の活性化は HTLV-1 感染症に対する重要な分子標的であると言える。NIK は ATL だけでなく、多発性骨髄腫やびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) などの造血器系腫瘍や、乳がんなどの固形がんにおいても重要な分子標的である^{36,37,38,39)}。NIK の発現レベルは正常

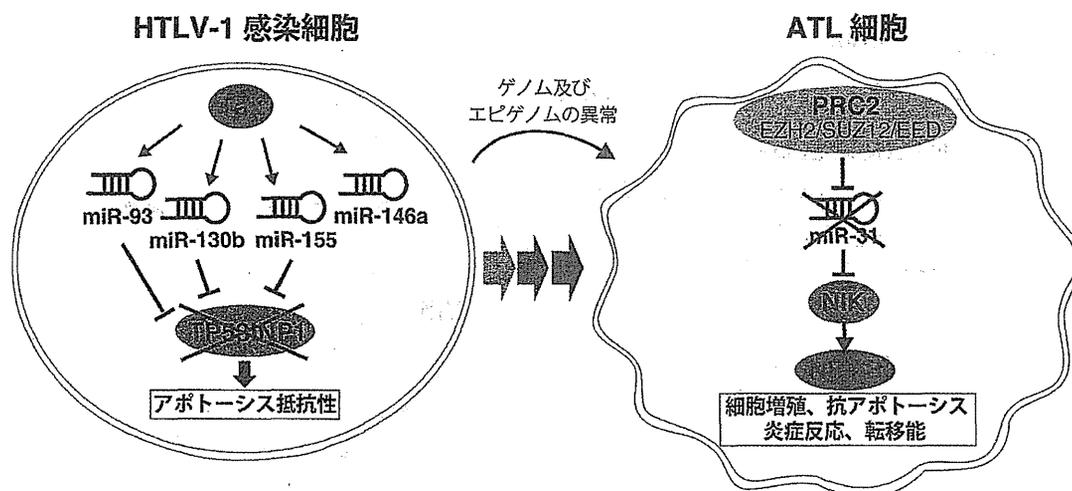


図1 HTLV-1 感染細胞と ATL 細胞における miRNA の異常

感染細胞では Tax によって複数の miRNA が発現誘導され、共通の標的遺伝子である TP53INP1 の発現が減少し、その結果アポトーシス抵抗性が獲得される。一方で ATL 細胞では、ゲノム及びエピゲノム異常の蓄積によって miR-31 の発現が例外なく欠損し、NIK の発現を介した NF- κ B 経路の恒常的活性化が誘導される。

細胞では主にタンパク質レベルで制御されているが⁴⁰⁾、ATL 細胞における NIK mRNA の上昇や、他のがんにおける NIK 依存的な NF- κ B 経路の活性化メカニズムは明らかになっていなかった。

HTLV-1 の感染が宿主の miRNA パターンに与える直接的な影響は、正確に評価する実験系に高いハードルがある。HIV-1 のように簡便で正確な感染実験系を構築するのが困難であり、また HTLV-1 感染個体からリンパ球のごく一部に相当する感染細胞集団を濃縮する系も確立されていない。従って HTLV-1 感染によって樹立された細胞株による評価が行われている。

Pichler らは、ATL 及び HAM/TSP (HTLV-1 関連脊髄症) 患者由来細胞株、HTLV-1 や Tax によってトランスフォームされた細胞株を用いて miRNA の発現レベルを検討した⁴¹⁾。検討した miRNA は ATL 細胞の起源とされている制御性 T 細胞において重要な miRNA 群⁴²⁾、及び当時明らかにされていたがん関連 miRNA 群に限定している。その結果、HTLV-1 関連細胞株で miR-21, miR-24, miR-146a, miR-155 が発現上昇し、miR-223 が発現減少していることを明らかにした。またそのうち miR-146a の過剰発現は Tax による NF- κ B 経路の活性化が原因であることも明らかにしている。miR-146a は EBV の LMP1 による NF- κ B 経路の活性化によっても誘導されることが報告されている^{43,44)}。

Yeung らは、7 種類の HTLV-1 関連細胞株と 4 例の急性型 ATL 細胞を用いて 327 種の miRNA の網羅的解析を行った⁴⁵⁾。対照群には正常の PBMC を用いている。彼らはさらに PMA によって PBMC を活性化させた際に上昇する miRNA 群で絞り込みを行い、HTLV-1 感染と T 細胞の活性化によって上昇する miRNA として miR-18a, miR-93,

miR-130b を報告している。そのうち、miR-93 と miR-130b の共通する標的遺伝子として TP53INP1 を見だし、HTLV-1 感染細胞において、miR-93 及び miR-130b の過剰発現が TP53INP1 の発現を低下させることにより、細胞生存の獲得に寄与していることを明らかにした。Pichler らが報告した miR-155 は Yeung らの ATL 細胞における過剰発現 miRNA のリストにも含まれているが、実はその一年前に miR-155 が同じく TP53INP1 を標的とすることが膵臓がんの研究から報告されている⁴⁶⁾。TP53INP1 は様々な固形がんで癌抑制因子として注目されている^{47,48,49,50)}。また KSHV が発現する miR-K12-11 が miR-155 と高いホモロジーを持ち、miR-155 の過剰発現と同様に B 細胞の増殖をミミックするという興味深い報告もある⁵¹⁾。HTLV-1 感染細胞においては、複数の miRNA で制御される TP53INP1 の発現低下が重要な役割を持つものと考えられる (図 1)。miR-155 の発現は B 細胞株においては LPS によって、前駆脂肪細胞においては TNF- α によって、それぞれ NF- κ B 依存的に発現が誘導されることが報告されている^{52,53)}。また miR-130b のプロモーターにも NF- κ B 結合配列があり、上記の miR-146a と同様に、Tax によって miR-130b の発現が誘導される⁴⁵⁾。

ATL における miRNA 異常

Yeung らは 4 例の臨床検体を用いることで ATL 腫瘍細胞における miRNA についても検討している⁴⁵⁾。また 2010 年に Bellon らは、同様に 7 例の ATL 検体について 3 例の正常 PBMC もしくは CD4+ T 細胞と比較を行っている⁵⁴⁾。その結果 ATL では miR-150, miR-155, miR-223, miR-142-3p, miR-142-5p が上昇し、miR-181a, miR-132,

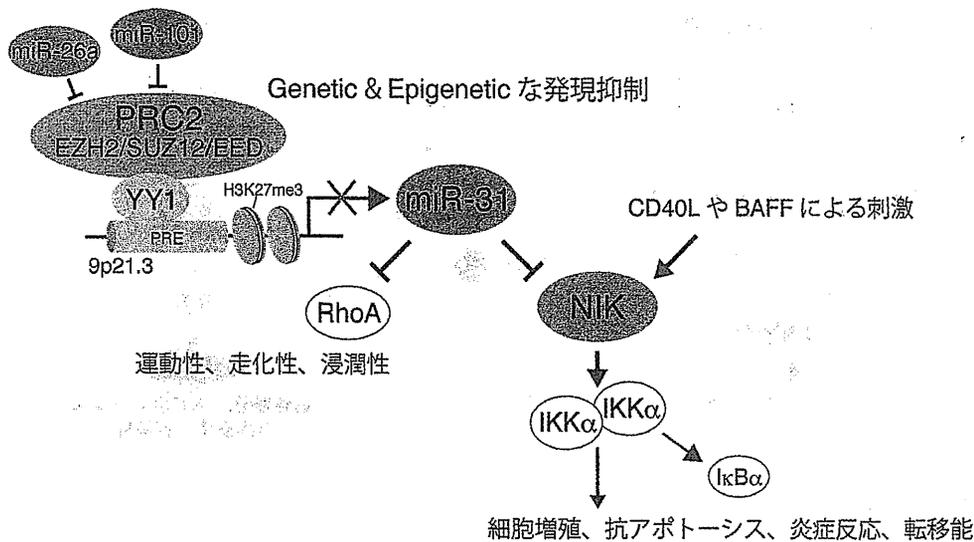


図2 ATL細胞におけるmiR-31を取り巻く分子メカニズム

Polycomb 依存的な miR-31 の発現低下は NIK などの標的遺伝子を介して細胞の表現型に影響する。この分子間の関係は様々な細胞種で保存されており、各因子の存在量のバランスによって均衡が保たれている。バランスを崩した細胞は悪性化をたどると考えられる。

miR-125a, miR-146b が減少していると報告している。miR-155 の発現上昇は Pichler ら, Yeung らの報告と一致している。また興味深いことに, Yeung らと Bellon らはそれぞれ、患者由来 ATL 細胞と HTLV-1 によって樹立された細胞株は異なる miRNA 発現パターンを示すと言及している。

上記の3つの報告^{41,45,54}では異常を示す miRNA パターンが多様であり、統一したデータが得られていない。その原因は、解析する症例数が少なく、異常を示す miRNA の絞り込みが甘いことが原因であると考えられる。また最近の知見から、リンパ球の各サブセットで miRNA の発現パターンが大きく異なることもわかっており^{55,56}、ATL 細胞に対する正確な比較対象 (=CD4+ T 細胞) を用意することが、ATL 細胞の異常を正確につかむことにつながると考えられる。また臨床検体については、腫瘍細胞集団と正常細胞の割合も結果に大きく影響するポイントである。

最近我々は、以上の問題に対して回答を得た。我々は HTLV-1 感染者コホート共同研究班 JSPFAD (<http://www.htlv1.org/>) の全面的協力を得て、世界で初めて ATL 患者由来腫瘍細胞の DNA, mRNA, miRNA の大規模な統合解析を完了した⁵⁷。miRNA 解析のサンプルにはプロウイルス量の多い (=腫瘍細胞の割合が高い) 40 例の ATL 患者由来細胞を用い、さらにコントロール群には ATL 群と年齢を一致させた健康人 CD4+ T 細胞 22 例を用いた。アジレント社の 723 種のヒト miRNA と 76 種のウイルス由来 miRNA を網羅した microarray を用い、非常に厳しい検定をかけて異常 miRNA を割り出した結果、そ

れまでに報告されていた上記の miRNA パターンと異なり、ATL では 61 種の異常 miRNA のうち 59 種の miRNA が正常 T 細胞に比べて著しく低値を示すことがわかった。これは、腫瘍細胞は miRNA の発現が低下傾向にあるという他のがん研究の結果と一致している^{58,59}。減少している miRNA リストには、すでに癌抑制性 miRNA として報告されている Let-7 ファミリー⁶⁰ や miR-101⁶¹ など含まれていた。これらの 61 種の miRNA は ATL 細胞の新たな分子マーカーであり、また一つひとつが機能的に腫瘍細胞の特徴に寄与していると考えられる。我々のデータにおいても、上記の先の3つのグループによって報告されている miR-155 の発現上昇が示されていたが、厳しい統計的有意差 ($p < 0.00001$) は見られなかったため、リストから除外している (筆者ら, unpublished data)。

miR-31 の機能と発現欠損の分子メカニズム

ATL 細胞で見つかった 61 種の発現異常 miRNA のうち、miR-31 が例外なくすべての ATL 患者で減少し、且つ減少のレベルが著しいことに気がついた (0.00403 倍, $p = 2.85 \times 10^{-25}$)。miR-31 の発現減少は、乳がんにおける転移、浸潤過程において重要であることが報告されている^{62,63}。我々は、miR-31 の著しい減少が ATL 細胞の特徴を反映していると考え、ATL 細胞の mRNA 発現プロファイルの結果と統合し、さらに *in vitro* の複数の実験を経て、miR-31 の新規標的遺伝子として、ATL 細胞における NF- κ B 活性化の原因遺伝子である NIK を見いだした。実験の結果、正常 T 細胞では miR-31 の発現が比較的高く NIK の発現

miRNA	標的遺伝子	参考文献
HTLV-1 感染細胞株		
上昇		
miR-155	TP53INP1	41,54
減少		
miR-150		45,54
miR-223		41,45,54
ATL 細胞		
上昇		
miR-150		45,54
miR-155	TP53INP1	45,54
減少		
miR-31	NIK, RhoA	45,57
miR-125a		54,57
miR-126		45,57
miR-130a		45,57
miR-146b		54,57
miR-181a		54,57
miR-355		45,57

図3 HTLV-1/ATL における miRNA 発現異常

HTLV-1 及び ATL 関連領域の研究のうち、複数の論文で報告されているものを示した。掲載した標的遺伝子は、それらの報告の中で実験的に検証されている遺伝子のみを示している。

を抑制しているが、miR-31 の異常な発現低下が NIK の発現誘導とそれに伴う NF- κ B 経路の恒常的活性化を誘発することがわかった (図1)。さらに ATL 細胞株及び新鮮 ATL 細胞に対して miR-31 を再導入すると細胞死が誘導された⁵⁷⁾。このことは、miR-31 の細胞内レベルが腫瘍細胞の表現型に直接影響していることを意味し、新しい分子標的としての有用性が示された。

ATL 臨床検体を詳細に解析した結果、miR-31 の発現欠失はゲノムの欠損と Polycomb ファミリー依存的なエピジェネティックな異常によって、すべての ATL 患者で起こっていることがわかった。さらに、Polycomb ファミリーが miR-31 を抑制することによって NIK - NF- κ B 経路を活性化する分子機構は、ATL だけでなく乳がん細胞や B 細胞における免疫応答反応においても保存されていることを明らかにした^{57,64)}。Polycomb ファミリー、NF- κ B 経路、miR-31 はそれぞれが単独で多彩な機能を有しており^{65,66, 67,68,69,70,71,72,73)}、細胞の恒常性や分化などの様々な機能に必須であると同時に、さらにクロストークを形成することによって、より複雑な遺伝子発現制御ネットワークに昇華させていると考えられる (図2)。我々の実験結果は、ATL 細胞はこの分子ネットワークに依存していることを示しており、エピジェネティックの制御、もしくは miR-31 の補充による新たな治療法の開発につながると期待される。

今後の展望

複数の研究グループによって詳細に解析され^{41,45,54,57)}、HTLV-1 感染細胞及び ATL 腫瘍細胞の miRNA 発現パターンはほぼ明らかになった (図3)。しかし、実際に異常 miRNA の機能とその影響を詳しく解析されているのは miR-93, miR-130b, miR-155 及び miR-31 だけである。標的遺伝子として明らかになった TP53INP1 や NIK にとどまらず、個々の miRNA とその標的遺伝子が感染細胞や腫瘍細胞に対してどのような役割を持つかが、今後の研究課題である。miRNA の標的遺伝子は複数のアルゴリズムによって予測可能であるが、物理的な抑制効果の検証と、標的遺伝子側の機能や挙動も重要な指標となり、従って多角的な実験的検証が必須となることを特筆しておく。

一方で、HTLV-1 と miRNA の研究はまだ始まったばかりである。残っている疑問点は以下に挙げられる。① HTLV-1 が宿主 miRNA システムに与える影響について、感染によって樹立された細胞株からの情報だけでなく、感染というイベントが宿主 miRNA に与えるインパクトについて詳細に検討する必要がある。特に Tax, Rex, HBZ などのウイルス因子が miRNA の合成経路に対してどのような影響を与えるのかは今後の課題である。Rahman らが報告した Tax による宿主 miRNA に対する全体的な抑制効果

は²¹⁾、我々が明らかにしたATLにおけるmiRNAの全体的な減少⁵⁷⁾とリンクするのか、今後の展開が待たれる。②HTLV-1 RNAが宿主もしくはHTLV-1由来miRNAの標的となるのか、実験的検証が必要である。近年になってHTLV-1の伝播様式やレセプターが少しずつ明らかとなっており^{74,75,76,77)}、またHTLV-1やTaxによる病原性がin vivoにおいても様々なステージにおいて証明され始めている^{78,79,80)}。様々な環境下におけるHTLV-1の生活環に対してmiRNAがどのような影響を与えるのか、重要な研究課題である。③HTLV-1由来miRNAの存在について、上述したように、ヘルペスウイルスのような高発現miRNAはHTLV-1には存在しないと考えられるが、次世代シーケンサ等の技術導入により明らかにされると期待される。④HTLV-1感染細胞からATL細胞のmiRNAパターンの変遷について、感染細胞はTaxによるNF- κ B経路の活性化が良く反映されている一方⁴⁵⁾、終末像であるATLのmiRNAの発現異常は非常に特徴的であり、ゲノム及びエピゲノムの異常によって誘導されるmiRNAパターンにaddictしていると考えられる⁵⁷⁾。どのような分子機構でATL細胞が形成されていくか、エピジェネティックやmiRNA合成経路の詳細な解析が必要である。⑤HTLV-1に関連する他の疾患とmiRNAについて、HAM/TSPやHTLV-1関連ぶどう膜炎(HU)などの疾患についてはmiRNAの検討は行われていない。各疾患の分子病態を理解する上でmiRNAの網羅的な検討は必須である。また感染キャリアにおけるmiRNAパターンを把握することで、発症の分子メカニズムの一端が明らかにされるであろう。

おわりに

1993年に線虫で初めてmiRNAが発見されて以来^{81,82)}、急速に研究が進展し、miRNAに関する知識も深まってきた。miRNAは遺伝子発現全体を制御する上流の分子群であり、ウイルス感染症を考える上でも欠かす事のできない因子として位置づけられている。ウイルス学のように生理学的意義を検討する学問においては、予測や他の報告だけに頼らず、実験的検証が正しい情報発信に重要である。HTLV-1感染症の分子レベルの理解と治療法の開発を目指す上で、miRNA研究の推進は急務であると考えられる。

参考文献

- 1) Bartel DP: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233, 2009.
- 2) Cullen BR: Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol. Cell* 16: 861-865, 2004.
- 3) Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP: Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19: 92-105, 2009.
- 4) Xiao C, Rajewsky K.: MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 136: 26-36,

- 2009.
- 5) Gangaraju VK, Lin H.: MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 116-125, 2009.
- 6) Ventura A, Jacks T.: MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell* 136: 586-591, 2009.
- 7) Skalsky RL, Cullen BR.: Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 64: 123-141, 2010.
- 8) Lujambio A, Lowe SW.: The microcosmos of cancer. *Nature* 482: 347-355, 2012.
- 9) Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T.: Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304: 734-736, 2004.
- 10) Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grässer FA, van Dyk LF, Ho CK, Shuman S, Chien M, Russo JJ, Ju J, Randall G, Lindenbach BD, Rice CM, Simon V, Ho DD, Zavolan M, Tuschl T.: Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods* 2: 269-276, 2005.
- 11) Omoto S, Ito M, Tsutsumi Y, Ichikawa Y, Okuyama H, Brisibe EA, Saksena NK, Fujii YR.: HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA. *Retrovirology* 1: 44, 2004
- 12) Bennasser Y, Le SY, Benkirane M, Jeang KT.: Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity* 22: 607-619, 2005.
- 13) Lin J, Cullen BR.: Analysis of the interaction of primate retroviruses with the human RNA interference machinery. *J. Virol.* 81: 12218-12226, 2007.
- 14) Li SC, Shiao CK, Lin WC.: Vir-Mir db: prediction of viral microRNA candidate hairpins. *Nucleic Acids Res.* 36: D184-D189, 2008.
- 15) Ruggero K, Corradin A, Zanolletto P, Amadori A, Bronte V, Ciminale V, D'Agostino DM.: Role of microRNAs in HTLV-1 infection and transformation. *Mol. Aspects Med.* 31: 367-382, 2010.
- 16) Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, Huang W, Squires K, Verlinghieri G, Zhang H.: Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat. Med.* 13: 1241-1247, 2007.
- 17) Wang X, Ye L, Hou W, Zhou Y, Wang YJ, Metzger DS, Ho WZ.: Cellular microRNA expression correlates with susceptibility of monocytes/macrophages to HIV-1 infection. *Blood* 113: 671-674, 2009.
- 18) Nathans R, Chu CY, Serquina AK, Lu CC, Cao H, Rana TM.: Cellular microRNA and P bodies modulate host-HIV-1 interactions. *Mol. Cell* 34: 696-709, 2009.
- 19) Hakim ST, Alsayari M, McLean DC, Saleem S, Addanki KC, Aggarwal M, Mahalingam K, Bagasra O.: A large number of the human microRNAs target lentiviruses, retroviruses, and endogenous retroviruses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369: 357-362, 2008.
- 20) Abe M, Suzuki H, Nishitsuji H, Shida H, Takaku H. Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Rex protein with Dicer suppresses RNAi silencing. *FEBS Lett.* 584: 4313-4318, 2010.
- 21) Rahman S, Quann K, Pandya D, Singh S, Khan ZK, Jain P.: HTLV-1 Tax Mediated Downregulation of miR-

- NAs Associated with Chromatin Remodeling Factors in T Cells with Stably Integrated Viral Promoter. *PLoS One* 7: e34490, 2012.
- 22) Hall WW, Fujii M.: Deregulation of cell-signaling pathways in HTLV-1 infection. *Oncogene* 24: 5965–5975, 2005.
 - 23) Boxus M, Twizere JC, Legros S, Dewulf JF, Kettmann R, Willems L.: The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* 5: 76, 2008.
 - 24) Matsuoka M, Jeang KT.: Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat. Rev. Cancer* 7: 270–280, 2007.
 - 25) Ruben S, Poteat H, Tan TH, Kawakami K, Roeder R, Haseltine W, Rosen CA.: Cellular transcription factors and regulation of IL-2 receptor gene expression by HTLV-I tax gene product. *Science* 241: 89–92, 1988.
 - 26) Yoshida M.: Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 475–496, 2001.
 - 27) Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, Sugimoto H, Martinez Bruyn VJ, Iwasaki Y, Matsubara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I, Inazawa J, Utsunomiya A, Watanabe T, Masuda T, Yamamoto N, Yamaoka S.: Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood* 111: 5118–5129, 2008.
 - 28) Watanabe M, Ohsugi T, Shoda M, Ishida T, Aizawa S, Maruyama-Nagai M, Utsunomiya A, Koga S, Yamada Y, Kamiyama S, Okayama A, Kikuchi H, Uozumi K, Yamaguchi K, Higashihara M, Umezawa K, Watanabe T, Horie R.: Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF-kappaB, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood* 106: 2462–2471, 2005.
 - 29) Dewan MZ, Terashima K, Taruishi M, Hasegawa H, Ito M, Tanaka Y, Mori N, Sata T, Koyanagi Y, Maeda M, Kubuki Y, Okayama A, Fujii M, Yamamoto N.: Rapid tumor formation of human T-cell leukemia virus type 1-infected cell lines in novel NOD-SCID/gammac(null) mice: suppression by an inhibitor against NF-kappaB. *J. Virol.* 77: 5286–5294, 2003.
 - 30) Satou Y, Nosaka K, Koya Y, Yasunaga JI, Toyokuni S, Matsuoka M.: Proteasome inhibitor, bortezomib, potently inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells both in vivo and in vitro. *Leukemia* 18: 1357–1363, 2004.
 - 31) Ohsugi T, Kumasaka T, Ishida A, Ishida T, Horie R, Watanabe T, Umezawa K, Yamaguchi K.: In vitro and in vivo antitumor activity of the NF-kappaB inhibitor DHMEQ in the human T-cell leukemia virus type I-infected cell line, HUT-102. *Leuk. Res.* 30: 90–97, 2006.
 - 32) Horie R, Watanabe T, Umezawa K.: Blocking NF-kappaB as a potential strategy to treat adult T-cell leukemia/lymphoma. *Drug News Perspect.* 19: 201–209, 2006.
 - 33) Sanda T, Asamitsu K, Ogura H, Iida S, Utsunomiya A, Ueda R, Okamoto T.: Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel IkappaB kinase inhibitor. *Leukemia* 20: 590–598, 2006.
 - 34) Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Koeffler HP, Taguchi H.: Fludarabine induces apoptosis of human T-cell leukemia virus type 1-infected T cells via inhibition of the nuclear factor-kappaB signal pathway. *Leukemia* 21: 1044–1049, 2007.
 - 35) Uota S, Zahidunnabi Dewan M, Saitoh Y, Muto S, Itai A, Utsunomiya A, Watanabe T, Yamamoto N, Yamaoka S.: An IkappaB kinase 2 inhibitor IMD-0354 suppresses the survival of adult T-cell leukemia cells. *Cancer Sci.* 103: 100–106, 2012.
 - 36) Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, Lenz G, Hanamura I, Wright G, Xiao W, Dave S, Hurt EM, Tan B, Zhao H, Stephens O, Santra M, Williams DR, Dang L, Barlogie B, Shaughnessy Kuehl WM, Staudt LM.: Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12: 115–130, 2007.
 - 37) Pham LV, Fu L, Tamayo AT, Bueso-Ramos C, Drakos E, Vega F, Medeiros LJ, Ford RJ.: Constitutive BR3 receptor signaling in diffuse, large B-cell lymphomas stabilizes nuclear factor- κ B-inducing kinase while activating both canonical and alternative nuclear factor- κ B pathways. *Blood* 117: 200–210, 2011.
 - 38) Yamamoto M, Ito T, Shimizu T, Ishida T, Semba K, Watanabe S, Yamaguchi N, Inoue JI.: Epigenetic alteration of the NF-kappaB-inducing kinase (NIK) gene is involved in enhanced NIK expression in basal-like breast cancer. *Cancer Sci.* 101: 2391–2397, 2010.
 - 39) Thu YM, Su Y, Yang J, Splittgerber R, Na S, Boyd A, Mosse C, Simons C, Richmond A.: NF- κ B inducing kinase (NIK) modulates melanoma tumorigenesis by regulating expression of pro-survival factors through the β -catenin pathway. *Oncogene*: advance online publication, 2011.
 - 40) Sun SC.: Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res.* 21: 71–85, 2011.
 - 41) Pichler K, Schneider G, Grassmann R.: MicroRNA miR-146a and further oncogenesis-related cellular microRNAs are dysregulated in HTLV-1-transformed T lymphocytes. *Retrovirology* 5: 100, 2008.
 - 42) Cobb BS, Hertweck A, Smith J, O'Connor E, Graf D, Cook T, Smale ST, Sakaguchi S, Livesey FJ, Fisher AG, Merckenschlager M.: A role for Dicer in immune regulation. *J. Exp. Med.* 203: 2519–2527, 2006.
 - 43) Motsch N, Pfuhl T, Mrazek J, Barth S, Grässer FA.: Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol.* 4: 131–137, 2007.
 - 44) Cameron JE, Yin Q, Fewell C, Lacey M, McBride J, Wang X, Lin Z, Schaefer BC, Flemington EK.: Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *J. Virol.* 82: 1946–1958, 2008.
 - 45) Yeung ML, Yasunaga J, Bennasser Y, Dusetti N, Harris D, Ahmad N, Matsuoka M, Jeang KT.: Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein

- 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1. *Cancer Res.* 68: 8976–8985, 2008.
- 46) Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, Garcia S, Nowak J, Yeung ML, Jeang KT, Chaix A, Fazli L, Motoo Y, Wang Q, Rocchi P, Russo A, Gleave M, Dagorn JC, Iovanna JL, Carrier A, Pébusque MJ, Dusetti NJ.: Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104: 16170–16175, 2007.
- 47) Gommeaux J, Cano C, Garcia S, Gironella M, Pietri S, Culcasi M, Pébusque MJ, Malissen B, Dusetti N, Iovanna J, Carrier A.: Colitis and colitis-associated cancer are exacerbated in mice deficient for tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Mol. Cell. Biol.* 27: 2215–2228, 2007.
- 48) Ito Y, Motoo Y, Yoshida H, Iovanna JL, Takamura Y, Miya A, Kuma K, Miyauchi A.: Decreased expression of tumor protein p53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) in breast carcinoma. *Anticancer Res.* 26: 4391–4395, 2006.
- 49) Jiang PH, Motoo Y, Garcia S, Iovanna JL, Pebusque MJ, Sawabu N.: Down-expression of tumor protein p53-induced nuclear protein 1 in human gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 12: 691–696, 2006.
- 50) Bonazzi VF, Irwin D, Hayward NK.: Identification of candidate tumor suppressor genes inactivated by promoter methylation in melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 48: 10–21, 2009.
- 51) Gottwein E, Mukherjee N, Sächse C, Frenzel C, Majoros WH, Chi JT, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Ohler U, Cullen BR.: A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* 450: 1096–1099, 2007.
- 52) Thompson RC, Herscovitch M, Zhao I, Ford TJ, Gilmore TD.: NF-kappaB down-regulates expression of the B-lymphoma marker CD10 through a miR-155/PU.1 pathway. *J. Biol. Chem.* 286: 1675–1682, 2011.
- 53) Liu S, Yang Y, Wu J.: TNF α -induced up-regulation of miR-155 inhibits adipogenesis by down-regulating early adipogenic transcription factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414: 618–624, 2011.
- 54) Bellon M, Lepelletier Y, Hermine O, Nicot C.: Dereglulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood* 113: 4914–4917, 2009.
- 55) Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP.: MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303: 83–86, 2004.
- 56) Lu LF, Liston A.: MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology* 127: 291–298, 2009.
- 57) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T.: Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-Dependent NF- κ B Pathway in Adult T Cell Leukemia and Other Cancers. *Cancer Cell* 21: 121–135, 2012.
- 58) Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR.: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834–838, 2005.
- 59) Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA.: Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 67: 2456–2468, 2007.
- 60) Roush S, Slack FJ.: The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol.* 18: 505–516, 2008.
- 61) Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, Laxman B, Cao X, Jing X, Ramnarayanan K, Brenner JC, Yu J, Kim JH, Han B, Tan P, Kumar-Sinha C, Lonigro RJ, Palanisamy N, Maher CA, Chinnaiyan AM.: Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 322: 1695–1699, 2008.
- 62) Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szász AM, Wang ZC, Brock JE, Richardson AL, Weinberg RA.: A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 137: 1032–1046, 2009.
- 63) Valastyan S, Benaich N, Chang A, Reinhardt F, Weinberg RA.: Concomitant suppression of three target genes can explain the impact of a microRNA on metastasis. *Genes Dev.* 23: 2592–2597, 2009.
- 64) Uribealago I, Ballare C, Croce LD.: Polycomb Regulates NF- κ B Signaling in Cancer through miRNA. *Cancer Cell* 21: 5–7, 2012.
- 65) Sparmann A, van Lohuizen M.: Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6: 846–856, 2006.
- 66) Simon JA, Kingston RE.: Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 697–708, 2009.
- 67) Rouas R, Fayyad-Kazan H, El Zein N, Lewalle P, Rothé F, Simion A, Akl H, Mourtada M, El Rifai M, Burny A, Romero P, Martiat P, Badran B.: Human natural Treg microRNA signature: role of microRNA-31 and microRNA-21 in FOXP3 expression. *Eur. J. Immunol.* 39: 1608–1618, 2009.
- 68) Liu CJ, Tsai MM, Hung PS, Kao SY, Liu TY, Wu KJ, Chiou SH, Lin SC, Chang KW.: miR-31 Ablates Expression of the HIF Regulatory Factor FIH to Activate the HIF Pathway in Head and Neck Carcinoma. *Cancer Res.* 70: 1635–1644, 2010.
- 69) Creighton CJ, Fountain MD, Yu Z, Nagaraja AK, Zhu H, Khan M, Olokpa E, Zariff A, Gunaratne PH, Matzuk MM, Anderson ML.: Molecular Profiling Uncovers a p53-Associated Role for MicroRNA-31 in Inhibiting the Proliferation of Serous Ovarian Carcinomas and Other Cancers. *Cancer Res.* 70: 1906–1915, 2010.
- 70) Valastyan S, Weinberg RA.: miR-31: A crucial overseer of tumor metastasis and other emerging roles. *Cell Cycle* 9: 2124–2129, 2010.
- 71) Hayden MS, Ghosh S.: Signaling to NF-kappaB. *Genes*

- Dev. 18: 2195–2224, 2004.
- 72) Bonizzi G, Karin M.: The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25: 280–288, 2004.
 - 73) Hayden MS, Ghosh S.: Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132: 344–362, 2008.
 - 74) Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL.: The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* 115: 449–459, 2003.
 - 75) Ghez D, Lepelletier Y, Jones KS, Pique C, Hermine O.: Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. *Retrovirology* 7: 99, 2010.
 - 76) Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Bangham CR.: Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 299: 1713–1716, 2003.
 - 77) Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A, Gout O, Alcover A, Thoulouze MI.: Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat. Med.* 16: 83–89, 2010.
 - 78) Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katanoh H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW.: Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat. Med.* 12: 466–472, 2006.
 - 79) Ohsugi T, Kumasaka T, Okada S, Urano T.: The Tax protein of HTLV-1 promotes oncogenesis in not only immature T cells but also mature T cells. *Nat. Med.* 13: 527–528, 2007.
 - 80) Banerjee P, Tripp A, Lairmore MD, Crawford L, Sieburg M, Ramos JC, Harrington W Jr, Beilke MA, Feuer G.: Adult T-cell leukemia/lymphoma development in HTLV-1-infected humanized SCID mice. *Blood* 115: 2640–2648, 2010.
 - 81) Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854, 1993.
 - 82) Wightman B, Ha I, Ruvkun G.: Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855–862, 1993.

III. 新規抗ウイルス薬の開発動向と展望

抗 HTLV-1 薬開発の現状

中野和民 渡邊俊樹

Current status and problems of anti-HTLV-1 drug development

Kazumi Nakano, Toshiki Watanabe

Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences,
The University of Tokyo

Abstract

HTLV-1 is one of the two pathogenic human retroviruses that causes adult T-cell leukemia (ATL), HTLV-1-associated myelopathy (HAM) and HTLV-1 uveitis (HU). Treatment of ATL is still very difficult today, thus search for new agents that target specific molecules are under way. For treatment of HAM and HU, suppression of HTLV-1 replication appears to be important, as well as prevention of ATL development. Considering the common characteristics as human retroviruses, application of anti-HIV drugs appears to be a reasonable strategy, although it is not yet clinically tested for HTLV-1. Research of agents specific to HTLV-1 viral products needs to be encouraged to develop HTLV-1-specific anti-viral agents.

Key words: suppression of viral replication, HTLV-1 proviral load, NF- κ B inhibitor, anti-HIV drugs

はじめに

ヒトT細胞白血病ウイルス (human T cell leukemia virus type-1: HTLV-1) は成人T細胞白血病 (ATL), HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) および HTLV-1 ぶどう膜炎 (HU) などの疾患を引き起こすレトロウイルスである¹⁾。現在我が国では、HTLV-1 キャリアが108万人前後存在すると推定されている。HTLV-1の感染によって引き起こされるこれらの疾患は、ウイルスの増殖そのものによって引き起こされるものではなく、慢性感染の状態が基盤となって、感染細胞の腫瘍化 (ATL) あるいは免疫機能の攪乱 (HAM および

HU) によって発症すると考えられている¹⁾。したがって、'抗ウイルス薬' としての議論は、大きくは '関連疾患の治療薬' としての広義の枠組みと、本来の '抗ウイルス薬' の観点からの議論がありうると考える。

本稿では、この2つの視点から現在の状況をまとめることにする。

1. HTLV-1 関連疾患治療薬

1) ATL の治療

ATLは主に母乳を介した垂直感染の後、50-60年の臨床的潜伏期を経て発症する。ATLはHTLV-1感染細胞の腫瘍化によって引き起こさ

東京大学大学院新領域創成科学研究科、メディカルゲノム専攻

れる疾患であり、その発症には、HTLV-1そのものの作用による感染細胞の多クローン性増殖とその後の長期にわたる潜伏期間の間に感染細胞に蓄積した遺伝子異常による腫瘍化および単クローン性増殖の2つの相があると考えられる。

治療方針は基本的にATLの病型分類(急性型、リンパ腫型、慢性型、くすぶり型)に基づいて選択される。予後不良とされる急性型およびリンパ腫型に関しては、長年にわたる精力的な臨床研究にもかかわらず、多剤併用療法の予後は依然として不良で、生存中央値は1年前後である¹⁾。比較的予後が良いとされる慢性型とくすぶり型でも、生存中央値が4.1年であり、適切な治療法の開発が必要である²⁾。現在我が国では、ATL細胞に高発現するCCR4を標的にした抗CCR4抗体療法や、欧米で報告されているインターフェロン α /ジドブジン(IFN/AZT)併用療法の治験が行われている。

キャリアからの発症予防という観点からは、発症高危険群の同定と発症の予防介入が課題となる。ATL発症の危険因子の一つが末梢血中のウイルス感染細胞数(ウイルスロード:VL)であることが明らかになった。末梢血単核球中の感染細胞の割合(VL)が4%以上のキャリアが危険群であり、これ以下のVLを示すキャリアからの発症は認められていない³⁾。したがって、VLを減少させることが発症予防につながると考えられ、有効な薬剤の検討が進められている。

2) HAMの治療

慢性進行性の痙攣対麻痺を症状とするHAMに対しては、抗ウイルス薬による感染細胞の減少を目指す治療法がないため、病状の改善あるいは進行抑制効果のある副腎ステロイド剤が中心となっているが、治療効果には限界があり、今後の新たな治療薬開発が期待される¹⁾。

3) HUの治療

急性または亜急性の目の炎症であるHUは、眼内へのリンパ球の浸潤をその特徴とする。したがって、突然発症する‘霧視’が主な症状である。治療としては、副腎皮質ステロイド剤の局所投与が有効である。しかし、約60%が再発し、長期予後は必ずしも良好ではない¹⁾。

2. 抗HTLV-1薬の開発

上記のように、ATL、HAMおよびHUなどのHTLV-1関連疾患の場合、いったん発症すると、寛解を期待できる決定的な治療法はいまだ確立されていない。したがって、‘感染させない(感染予防)’‘発症させない(発症予防)’という観点からの介入の必要性が重視されるようになってきた。

本項では、抗HIV薬の応用やHTLV-1ウイルス遺伝子産物を標的として利用するものなど、様々な視点から抗HTLV-1薬の可能性について紹介する。概略を図1にまとめて示した。

1) 抗HIV薬の応用

同じヒトレトロウイルスに対する抗ウイルス薬として、抗HIV-1薬の開発と実用化が広く進められている。HIV-1は突然変異に基づく薬剤耐性を獲得しやすいため、現在では、標的の異なる複数の薬剤を使用する多剤併用療法が行われている(HAART療法)。その結果、AIDS発症率は著しく低下した。レトロウイルスに共通の生活環を考慮すると、逆転写阻害剤やインテグラーゼ阻害剤など、HIV-1の感染の成立を阻害する薬剤は、HTLV-1への応用も期待できる。一方、AIDSの発症は爆発的なウイルスの再活性化と直接関連しており、ウイルス複製と発症との関係がいまだ不明確なHTLV-1関連疾患とは発症機構が根本的に異なることから、直接的な応用は適切でないと考えられる。したがって、HTLV-1のもつ病原性因子を標的とした抗ウイルス薬や、感染および潜伏のメカニズムを阻害するHTLV-1特異的な薬剤の開発が必要であることは明らかである。

2) HTLV-1特異的阻害剤

a. HTLV-1病原性因子を標的とする阻害剤

抗HTLV-1薬として、HTLV-1の病原性発現にかかわることが知られているウイルス分子を標的とした薬物の開発は重要な課題である。以下に代表的なウイルス分子ごとに概説する。

a) Tax

HTLV-1 LTRの強力な転写促進因子であり、

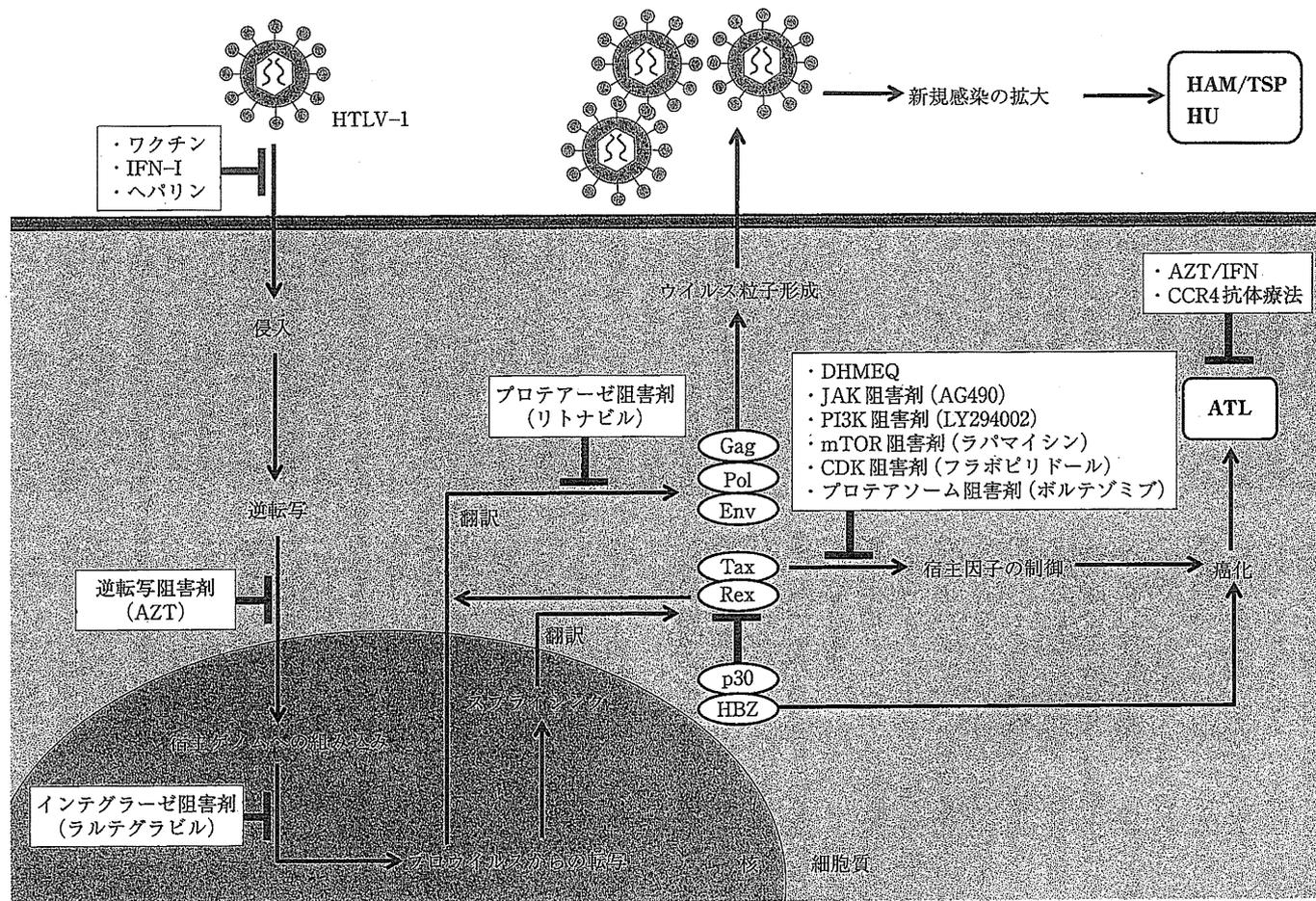


図1 HTLV-1の生活環と候補阻害薬

HTLV-1の生活環を模式的に示し、それぞれの過程を標的とする候補薬物を挙げた。これらは、逆転写阻害剤以外はほとんど実験的な検討が行われていない。主な理由は、HIVと異なり、HTLV-1はその増殖が直接病原性発現につながると考えられてこなかったこと、および *in vitro* でのウイルス学的実験法が難しく、実験系が確立していないことによる。

癌原タンパク質でもある Tax は、感染初期の HTLV-1 のウイルス複製において中心的な役割を果たす。また、Tax は数々の宿主因子と相互作用することによって細胞恒常性を乱し、細胞の増殖と不死化を誘因すると考えられている⁴⁾。Tax は宿主細胞の NF- κ B 経路、mTOR、AKT、JAK/STAT などの経路を活性化して、細胞増殖および抗アポトーシスに働いている。このような Tax の機能を標的とした薬剤の候補として、NF- κ B 阻害剤 (DHMEQ)、JAK 阻害剤 (AG490)、PI3K 阻害剤 (LY294002)、mTOR 阻害剤 (ラパマイシン)、CDK 阻害剤 (フラボピリドール) などの薬剤効果が検討されている。Tax は細胞周期の制御にかかわる pRb をプロテアソームを介して選択的に分解することが知られているため、プロテアソーム阻害剤 (ボルテゾミブ) の有効性も検討されている。

また Tax と宿主細胞のエピジェネティクス制御分子との相互作用は広く知られている。したがって、個別の分子との相互作用の制御を目指した薬物の開発も重要な課題となると考える。

b) Rex

HTLV-1 の RNA 結合タンパク質 Rex は、Tax と同様に感染後最初に発現するウイルス因子で、HTLV-1 から転写される mRNA に特異的に結合し、主に HTLV-1 の構造タンパク質 (Gag, Pro, Pol, Env) をコードする非スプライス型、または 1 回スプライス型の不安定な mRNA を選択的に細胞質へ輸送し、翻訳系に持ち込む機能を持ち、HTLV-1 の自己複製に不可欠な因子である⁴⁾。Rex はリン酸化によって活性化され、特にセリン・スレオニンキナーゼ阻害剤の一つである H-7 が Rex のリン酸化を阻害し、その機能を低下させる⁵⁾。また Tax と Rex は、HTLV-1 の完全スプライス型 tax/rex mRNA のフレーム II と III にそれぞれコードされており、この mRNA は、やはりウイルスタンパク質の p30II によって特異的に核小体に拘束され、タンパク質への翻訳が抑制されることが知られている⁶⁾。よって、p30II の機能を利用して Tax と Rex という主要な増殖因子の機能を制御することが可能かもしれない。

c) HBZ

3'-LTR の U5 領域から相補鎖側が転写された mRNA にコードされる約 25 kDa のタンパク質で、宿主の複数の bZIP タンパク質と相互作用して、その転写活性を制御していると考えられている⁷⁾。HBZ は ATL の発症に深くかかわりがあるとの報告があるが、分子としての HBZ の機能は Tax の転写活性化機能に対し拮抗的に働くことが知られており、また、*hbz* RNA そのものも細胞の増殖に働くとの報告もある。HBZ の機能とその分子メカニズムについての知見に基づき阻害剤の開発を進めることが期待される。一方、HBZ の発現そのものを制御するという視点もある。HTLV-1 プロウイルスでは 2 つの LTR のうち、5'-LTR が選択的に DNA メチル化され、3'-LTR にはメチル化が起らない。この選択的メチル化機構の解明を通じて、3'-LTR の活性を抑制する方法を検討する観点も重要であろう。

b. HTLV-1 の生活環に対する阻害剤

抗 HIV 薬と同様の観点から、ウイルスの複製過程に即して薬物を開発する視点が重要である。HTLV-1 に関して各複製過程ごとに検討する。

a) 感染時

HTLV-1 の感染レセプターが Glut-1 および Nuropilin-1 であると最近明らかになった⁸⁾。これらのレセプター分子に加え細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグルカンとの結合が必須である。ヘパリンがウイルス粒子の回収率を高めるが、そのウイルス粒子の感染効率抑制効果が報告された⁹⁾。この知見は HTLV-1 に特異的なウイルス感染阻止法の開発に参考になるであろう。

b) エントリーから潜伏まで

HTLV-1 ゲノム RNA が標的細胞内に侵入した後は、HIV-1 と同様に DNA へ逆転写され、宿主ゲノムへの組み込み、そしてプロウイルスからの mRNA の転写およびウイルスタンパク質の翻訳、という過程をたどる。逆転写および組み込みには、ウイルス由来の逆転写酵素およびインテグラーゼが用いられる。よって、HTLV-1 のこれらのプロセスを妨げて感染の成立を阻害するために、HIV-1 で既に効果が確認

されている逆転写阻害剤(AZT)やインテグラーゼ阻害剤(ラルテグラビル), プロテアーゼ阻害剤(リトナビル)などの効果が期待できるだろう。このうち、逆転写阻害剤に関しては既に報告があり、テノホビルが最も強い活性を示す¹⁰⁾。

c) 潜伏期

HTLV-1 キャリアの感染細胞ではウイルス複製は抑制されている。一方で感染細胞には確実に遺伝子異常が蓄積されていき、最終的には腫瘍化クローンが出現する。キャリアのATL発症予防を目指す抗HTLV-1薬の開発には、遺伝子異常の蓄積の仕組みを理解する必要がある。著者らは、キャリア体内で繰り返されるウイルスの再活性化と再潜伏化がその基盤であると想定しているが、実際の分子機構は不明であり、今後の研究課題である。

ATLとは異なり、HAMの発症機構としては、宿主側の免疫応答不全により、HTLV-1の複製、二次感染を抑制しきれず、感染細胞が臓器に浸潤した状態で、それに対する過剰な免疫応答が起こり、ついには浸潤組織、つまりは自己の組織の破壊につながると考えられている。つまり

HAMにおいては、高いウイルスロードとウイルス複製の制御が課題となる。したがって、各種逆転写阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、プロテアーゼ阻害剤などの有用性が検討課題であろう。

おわりに

現在、抗HTLV-1薬の開発は、HIV-1に対する抗ウイルス薬の開発と実用化に比べ、非常に遅れを取っている。特に我が国での実験室レベルでのHTLV-1のウイルス学的研究は、研究費のサポートがなかったことによって、非常に低調であった。ウイルス学研究の成果がHTLV-1特異的な抗ウイルス薬の開発に結びついていないのが現状である。今後は基礎と臨床の研究者が更に協力を深め、HTLV-1の感染および増殖と疾患の発症との関係についての知識を積み上げるとともに、有効な抗HTLV-1薬の開発には、このウイルスの病原性因子、あるいは生活環境のどの局面を標的とするべきなのか、更に研究と検討を進めていく必要があるだろう。

■ 文 献

- 1) 渡邊俊樹ほか(編): HTLV-1と疾患, 文光堂, 2007.
- 2) Takasaki Y, et al: Long-term study of indolent adult T-cell leukemia-lymphoma. *Blood* **115**: 4337-4343, 2010.
- 3) Iwanaga M, et al: Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. *Blood* **116**: 1211-1219, 2010.
- 4) Johnson JM, et al: Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). *Int J Exp Pathol* **82**: 135-147, 2001.
- 5) Adachi Y, et al: Protein kinase inhibitor H-7 blocks accumulation of unspliced mRNA of Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I). *Biochem Biophys Res Commun* **169**: 469-475, 1990.
- 6) Ghorbel S, et al: Human T-cell leukemia virus type I p30 nuclear/nucleolar retention is mediated through interactions with RNA and a constituent of the 60 S ribosomal subunit. *J Biol Chem* **281**: 37150-37158, 2006.
- 7) Matsuoka M, Green PL: The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology* **6**: 71, 2009.
- 8) Ghez D, et al: Current concepts regarding the HTLV-1-receptor complex. *Retrovirology* **7**: 99, 2010.
- 9) Pais-Correia AM, et al: Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med* **16**: 83-89, 2010.
- 10) Hill SA, et al: Susceptibility of human T cell leukemia virus type I to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Infect Dis* **188**: 424-427, 2003.

The CD3 versus CD7 Plot in Multicolor Flow Cytometry Reflects Progression of Disease Stage in Patients Infected with HTLV-I

Seiichiro Kobayashi¹, Yamin Tian^{1,2}, Nobuhiro Ohno³, Koichiro Yuji³, Tomohiro Ishigaki⁴, Masamichi Isobe³, Mayuko Tsuda³, Naoki Oyaizu⁵, Eri Watanabe⁴, Nobukazu Watanabe⁴, Kenzaburo Tani², Arinobu Tojo^{1,3}, Kaoru Uchamaru^{3*}

1 Division of Molecular Therapy, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, **2** Department of Molecular Genetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan, **3** Department of Hematology/Oncology, Research Hospital, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, **4** Laboratory of Diagnostic Medicine, Division of Stem Cell Therapy, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, **5** Clinical Laboratory, Research Hospital, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Abstract

Purpose: In a recent study to purify adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL) cells from acute-type patients by flow cytometry, three subpopulations were observed in a CD3 versus CD7 plot (H: CD3^{high}CD7^{high}; D: CD3^{dim}CD7^{dim}; L: CD3^{dim}CD7^{low}). The majority of leukemia cells were enriched in the L subpopulation and the same clone was included in the D and L subpopulations, suggesting clonal evolution. In this study, we analyzed patients with indolent-type ATL and human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) asymptomatic carriers (ACs) to see whether the CD3 versus CD7 profile reflected progression in the properties of HTLV-I-infected cells.

Experimental Design: Using peripheral blood mononuclear cells from patient samples, we performed multi-color flow cytometry. Cells that underwent fluorescence-activated cell sorting were subjected to molecular analyses, including inverse long PCR.

Results: In the D(%) versus L(%) plot, patient data could largely be categorized into three groups (Group 1: AC; Group 2: smoldering- and chronic-type ATL; and Group 3: acute-type ATL). Some exceptions, however, were noted (e.g., ACs in Group 2). In the follow-up of some patients, clinical disease progression correlated well with the CD3 versus CD7 profile. In clonality analysis, we clearly detected a major clone in the D and L subpopulations in ATL cases and, intriguingly, in some ACs in Group 2.

Conclusion: We propose that the CD3 versus CD7 plot reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I. The CD3 versus CD7 profile will be a new indicator, along with high proviral load, for HTLV-I ACs in forecasting disease progression.

Citation: Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, et al. (2013) The CD3 versus CD7 Plot in Multicolor Flow Cytometry Reflects Progression of Disease Stage in Patients Infected with HTLV-I. PLoS ONE 8(1): e53728. doi:10.1371/journal.pone.0053728

Editor: Jean-Pierre Vartanian, Institut Pasteur, France

Received: August 31, 2012; **Accepted:** December 4, 2012; **Published:** January 22, 2013

Copyright: © 2013 Kobayashi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: uchimaru@ims.u-tokyo.ac.jp

Introduction

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) is the agent that causes HTLV-I-associated diseases, such as adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL), HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), and HTLV-I uveitis (HU) [1–3]. Approximately 10–20 million people are infected with the HTLV-I virus worldwide [4]. The lifetime risk of developing ATL is estimated to be approximately 2.5–5% [5,6]. ATL includes a spectrum of diseases that are referred to as smoldering-, chronic-, lymphoma-, and acute-type [7,8]. The chronic and smoldering types of ATL are considered indolent and are usually managed with watchful waiting until the disease progresses to aggressive

(lymphoma- or acute-type) ATL [9]. Because the prognosis of ATL is poor with current treatment strategies, factors to forecast progression to ATL from asymptomatic carriers (ACs) have been researched [10–13] in the hope that they will be useful for preventive therapy under development in the early malignant stage.

Various cellular dysfunctions induced by viral genes (e.g., tax and HBZ), genetic and epigenetic alterations, and the host immune system are considered to cooperatively contribute to leukemogenesis in ATL [14–16]. However, the complex mechanism may hinder determination of a clear mechanism of the pathology and make discovery of risk factors difficult. In a prospective nationwide study in Japan, high proviral load (VL,

Table 1. Clinical profile of patients infected with HTLV-I and normal controls.

Clinical subtype	Number of cases	Male	Female	Age (range)	WBC(μ l) (range)	Lymphocytes(%) (range)	Abnormal lymphocytes(%) (range)
HTLV-1 AC	40	12	28	49.9 (28–70)	5525 (2680–10360)	35.9 (22.4–59.5)	0.9 (0.0–4.4)
Smoldering	7	4	3	55.3 (43–77)	5944 (3680–8710)	32.5 (13.4–47.5)	5.8 (0.7–16.5)
Chronic	7	4	3	52.7 (37–60)	9180 (4070–12790)	45.8 (35.0–61.5)	9.2 (3.4–12.7)
Acute	13	4	9	58.8 (42–74)	15328 (4450–41480)	16.3 (1.7–50.5)	40.3 (3.0–89.6)
Normal controls	10	6	4	47.4 (27–66)	ND	ND	ND

WBC: white blood cells (normal range, 3500–9100/ μ l).

AC: asymptomatic carrier.

ND: analysis were not performed.

Average of age, WBC, lymphocytes (%) and abnormal lymphocytes (%) are shown.

The proportion of abnormal lymphocytes in peripheral blood WBCs was evaluated by morphological examination.

doi:10.1371/journal.pone.0053728.t001

over 4.17 copies/100 peripheral blood mononuclear cells) was found to be a major risk factor for HTLV-I AC developing into ATL [13]. Although VL indicates the proportion of HTLV-I-infected cells, it does not indicate size or degree of malignant progression in each clone; *i.e.*, it does not directly indicate progression of disease stage in HTLV-I infection. Moreover, the majority of ACs with high VL remained intact during the study period, indicating that a more accurate indicator of progression is needed.

In our recent study to purify monoclonal ATL cells from acute-type patients by flow cytometry, three subpopulations were observed in a CD3 versus CD7 plot of CD4⁺ cells (H: CD3^{high}CD7^{high}, D: CD3^{dim}CD7^{dim}, L: CD3^{dim}CD7^{low}), and the majority of ATL cells were enriched in the L subpopulation [17]. Clonality analyses revealed that the D and L subpopulations contained the same clone, suggesting clonal evolution of HTLV-I-infected cells to ATL cells. From these findings, we speculated that the CD3 versus CD7 profile may reflect disease progression in HTLV-I infection. In this study, the CD3 versus CD7 profile by flow cytometry, combined with molecular (clonality and proviral load) characterizations, were analyzed in patients with various clinical subtypes (HTLV-I AC, and indolent and aggressive ATL). We found that the CD3 versus CD7 profile reflected disease progression of HTLV-I-infected cells to ATL cells. We also discuss the significance of this analysis as a novel risk indicator for HTLV-I ACs in forecasting progression to ATL.

Materials and Methods

Cell lines and patient samples

TL-Om1, an HTLV-I-infected cell line, established Dr. Hinuma's laboratory [18], was provided by Dr. Toshiaki Watanabe (The University of Tokyo, Tokyo, Japan) and was cultured in RPMI-1640 medium containing 10% fetal bovine serum. Peripheral blood samples were collected from inpatients and outpatients at our hospital from August 2009 to November 2011. All patients with ATL were categorized according to Shimoyama's criteria [7,8]. Patients with various complications, such as autoimmune

disorder and systemic infections, were excluded. Lymphoma-type patients were excluded because ATL cells are not considered to exist in peripheral blood of this clinical subtype. In patients with ATL receiving chemotherapy, blood samples were collected before treatment or during the recovery phase between chemotherapy sessions. Samples collected from 10 healthy volunteers (mean age: 47.4 years; range: 27–66 years) were used as normal controls.

The present study was approved by the research ethics committee of the institute of medical science, the university of Tokyo. Subjects provided written informed consent.

Flow cytometry and cell sorting

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparin-treated whole blood by density gradient centrifugation, as described previously [17]. Cells were stained using a combination of phycoerythrin (PE)-CD7, APC-Cy7-CD3, Pacific Blue-CD4, and Pacific Orange-CD14. Pacific Orange-CD14 was purchased from Caltag-Invitrogen (Carlsbad, CA). All other antibodies were obtained from BD Biosciences (San Jose, CA). Propidium iodide (PI; Sigma, St. Louis, MO) was added to the samples to stain dead cells immediately prior to flow cytometry. A BD FACS Aria instrument (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA) was used for all multicolor flow cytometry and cell sorting. Data were analyzed using the FlowJo software (TreeStar, San Carlos, CA).

Quantification of HTLV-I proviral load by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR)

The HTLV-I proviral load in FACS-sorted PBMCs was quantified by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR; TaqMan method) using the ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) as described previously [13,17]. Briefly, 50 ng of genomic DNA was extracted from human PBMCs using a QIAamp DNA blood Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany). Triplicate samples of the DNA were amplified. Each PCR mixture, containing an HTLV-I pX region-specific primer pair at 0.1 μ M (forward primer 5'-CGGATACCCAGTCTACGTGTT-3' and reverse primer 5'-