

201313038A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ヒトATL及びHBZトランスジェニックATL発症マウスを用いた
比較ゲノム解析によるATL発症機構の解析

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 森下 和広

平成26(2014)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
ヒトATL及びHBZトランスジェニックATL発症マウスを用いた 比較ゲノム解析によるATL発症機構の解析 森下和広	----- 1
II. 分担研究報告	
1. ヒトATLに関する研究 森下和広	----- 7
2. HTLV-1/HBZに関する研究 安永純一郎	----- 10
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 15

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

ヒトATL及びHBZトランスジェニックATL発症マウスを用いた比較ゲノム解析による
ATL発症機構の解析

研究代表者：森下 和広 宮崎大学・医学部 教授

研究要旨

ヒトT細胞白血病ウイルス1型（human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1）は感染後、約60年という長い潜伏期間の後に、一部のキャリアに成人T細胞白血病（adult T-cell leukemia: ATL）を引き起こす。このことは、ATLが宿主側のゲノム異常やエピゲノム異常の蓄積による多段階発がん機構に基づき発症することを示唆している。HTLV-1のマイナス鎖にコードされるHTLV-1 bZIP factor (HBZ) は全てのATL細胞で発現しており、ATL細胞の増殖に必須であると考えられる。HBZ・TGはTリンパ腫および全身性の炎症を発症する。本研究ではATLの統合的ゲノム解析およびHBZ・TGマウスのリンパ腫のゲノム・エピゲノム異常を比較検討し、HTLV-1感染からATL発症機構を明らかにする。ATLの原因遺伝子群 ZEB1(TCF8)、EPC1、NDRG2、BCL11B、TSLC1/CADM1を同定した。NDRG2は生体防御ストレス応答遺伝子でありPTEN結合タンパク質としてPP2AをリクルートしPI3K/AKT情報伝達をPTENリン酸化により不活化する活性を持つ。ATLにおいて転写低下しておりPI3K/AKT情報伝達系の恒常的活性化があり、これはATL発症初期より見られHTLV-1感染防御の破綻が示唆された。CADM1高発現機構はNFkB情報伝達に依存し、HTLV-1ITAXによる活性化が見られた。H25年度は、網羅的発現解析により、HBZ-Tg由来T細胞ではシトシン脱アミノ化酵素 Activation-induced cytidine deaminase (AID)をコードする遺伝子 *Aicda* の発現が亢進していることを見出した。HBZはTGF-β/Smad経路を介して *Aicda* のプロモーターを活性化した。また、HBZ-Tgに発生したTリンパ腫由来の細胞株 Ht48 のエクソーム解析では、G-to-A および C-to-T 変異が他の変異に比較し高頻度に認められ、AID発現亢進の関与が疑われる。これらの所見はHBZによるAIDの異常発現が宿主遺伝子の点変異を誘導し、発がんに関与することを示唆している。HBZによる抑制はさらにエピゲノム異常の表定期遺伝子の一つになっており、HTLV-1ウイルス感染症からATL発症において重要な役割を有することが示唆される。

研究分担者

京都大学ウイルス研究所 講師 安永純一郎

A. 研究目的

成人T細胞白血病(ATL)はHTLV-1感染より数十年を経て白血病化する難治性白血病であるが、ゲノム異常の蓄積が著しく、固形癌に近い複雑核型を示す。このためATLにおける白血病発症にはHTLV-1感染後に多くのゲノム異常、エピゲノム異常が蓄積し多因子による発症が考えられる。さらにHTLV-1ウイルスのHTLV-1 bZIP factor (HBZ) は全てのATL細胞で発現し、ATL細胞におけるHBZのノックダウンは細胞増殖を抑制する。さらにはHBZトランスジェニックマウスがT細胞リンパ腫を発症することからHBZはATLの発がんには必須であると考えられる。本研究ではそこで我々はATL細胞およびHBZトランスジェニックマウスを用いて全ゲノム、エピゲノム解析を行い、発症の分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

1. ATLにおけるゲノム異常の探索と発症関連遺伝子群の機能解析

1)網羅的メチル化解析

前年度に引き続き、Illuminaメチル化アレイ解析を詳細に検討し、ATL発症に関わる遺伝子群を単離する。またパイロット研究として、急性型ATL検体をHTLV-1+/1分画し、それぞれ2検体をエクソームシーケンシング、RNAシーケンシングを行い、点突然変異の探索並びにスプライス異常・融合遺伝子等の検討を行う。

2)白血病関連遺伝子群のin vitro、in vivo実験

これまで単離した遺伝子群の機能を明らかにするため複合的な実験を行う。NDRG2・PTENに関しては質量分析計による網羅的結合タンパク質群の単離を行い、PTENキナーゼの同定並びにPTENリン酸化機構の解明を進める。CADM1に関してはプロモーターアッセイを中心にATL細胞における遺伝子発現機構の解明を目指す。BCL11Bにおいては発現様式の検討と、TGマウスの作製、過剰発現細胞株の樹立と遺伝子発現解析等を進める。またNDRG2のATLにおける低発

現機構の解明と、HTLV-1感染防御機構としての働きの検討を行う。

2. HBZ-Tgに発症するTリンパ腫におけるゲノム異常の探索

1) HBZ-Tg由来Tリンパ腫細胞株の樹立

HBZ-Tg由来Tリンパ腫細胞を免疫不全マウスであるNOD-SCID/IL2Rgamma KOマウス(NSGマウス)に移植し、生体内で継代・維持することが可能な細胞株を樹立した。さらには、野生型C57BL/6への生着、in vitroでの培養・維持を試みた。

2) HBZ-Tg由来Tリンパ腫細胞における遺伝子変異の網羅的探索

HBZ-TgのTリンパ腫から樹立した細胞株を用いて、エクソーム解析を行った。具体的にはAgilent社のSureSelect XT Mouse All Exonキャプチャライブラリを使用し、サンプル中のエクソンを濃縮、ライブラリを作成した。ディープシーケンシスはイルミナ社MiSeqを用いて実施した。データ解析に関しては、BWAでゲノムにマッピングし、PicardToolsで重複リードを除去、Samtools mpileupでSNPコール、アノテーションはANNOVARを利用した。さらに、non-synonymous SNPsを抽出し、変異のインパクトを推定するためにPROVEANを使って予測した。

3) HBZによる発現プロファイル変化の解析

HBZによる宿主細胞での発現プロファイルの変化を、Affymetrix社のマイクロアレイを用いて包括的に比較解析した。具体的には、以下のサンプルを用いた。

・HBZ-TG由来CD4+Tリンパ球 vs 野生型マウスCD4+Tリンパ球

・HBZ-TG由来制御性Tリンパ球 vs 野生型マウス制御性Tリンパ球

(倫理面への配慮)

患者検体の使用に関しては、宮崎大学医学部医の倫理審査会の承認(承認番号784)をうけ、同意(インフォームドコンセント)の上で使用を行っている。組み換えDNA実験を行うにあたり、宮崎大学(承認番号:268)及び京都大学遺伝子組み換え実験委員会(承認番号:100182)の承認を受けて実施している。実験動物に関しては宮崎大学動物実験委員会の承認(2010-509-3、510-3、525-5、534-3、505-3)及び京都大学動物実験委員会の承認(承認番号:承認番号:D13-01、D13-02)を受け使用を行っている。利益相反に関しては、宮崎大学及び京都大学利益相反委員会が設置され適切に処理されている。

C. 研究結果

1. ATLにおけるゲノム異常の探索と発症関連遺伝子群の機能解析

急性型ATLに対する統合的ゲノム解析により、ATL発症関連遺伝子群として、ZEB1/TCF8、NDRG2、BCL11B、TSLC1、EPC1/AXSL2融合遺伝子を同定した。今回NDRG2の機能解析を行い、NDRG2をPTEN結合タンパク質として同定した。NDRG2はPP2A phosphataseをリクルートし、PTEN脱リン酸化状態に保ちPTENの有するphosphatase活性を活性化状態にする働きを同定した。ATLにおいてNDRG2は発現低下状態にあり、そのためPTENは恒常的にリン酸化状態を保ちPI3K/AKT情報伝達系が活性化状態となった。そのNDRG2低下の原因としてメチル化はHTLV-1Taxに依存しており、HTLV-1感染初期からのメチル化が示唆された。そこでゲノムワイドメチル化アレイ解析を行い網羅的遺伝子発現解析との統合解析によりPTHLHを含む脱メチル化高発現遺伝子群38、NDRG2を含む高メチル化低発現遺伝子群36を同定した。NDRG2以外での原因遺伝子単離を行っている。CADM1プロモーターアッセイによりNF- κ B活性化が発現調節に関わっており、しかもHTLV-1Taxによる直接間接的な役割が示唆された。TSLC1 TGマウス、BCL11BTGマウスにおいてもTリンパ腫が認められてきたのでさらなる検討を進めている。

2. HBZ-TGに発症するTリンパ腫におけるゲノム異常の探索

HBZ-TG由来のTリンパ腫細胞をNSGマウスに移植し、腫瘍の生着および継代を行った。継代を繰り返す間に、生着までの期間が短縮し、さらには野生型マウスにおいても腫瘍を形成することが可能となった。本細胞株はin vitroでも維持培養が可能であった。

3. HBZによる発現プロファイル変化の解析

HBZ発現細胞ではアポトーシス誘導遺伝子である*Bim*と*FasL*の発現が低下していることを見出した。*Bim*および*FasL*の発現には転写因子FoxO3aが重要な役割を果たすことが知られている。我々はHBZがFoxO3aと結合し、細胞内局在を変えること、またDNA結合能を阻害することを見出した。これらの作用により、HBZはFoxO3aの転写活性を阻害し、*Bim*および*FasL*の発現を抑制すると考えられた。さらに、ATL細胞株の一部、Jurkat-HBZには*Bim*プロモーターにおけるH3の脱アセチル化が認められ、HBZのエピゲノム異常への関与も示唆された。

一方、酵母ツーハイブリッドにてHBZがヒストン修飾酵素と結合することが示唆された。その中で、

アセチル化に關与する EPC-1、脱メチル化に關与する FBXL11 に関しては、免疫沈降にて HBZ との結合を確認した。

D. 考察

本年度の解析から HBZ は *Aicda* の転写を誘導することが明らかとなり、Foxp3 の誘導機序と同様に、TGF- β /Smad 経路の活性化に關連していることが示唆された。AID は様々な悪性腫瘍にて発現上昇することが報告されており、G-to-A 変異、C-to-T 変異導入の原因となることが知られている。HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞株 Ht48 によるエクソーム解析にて、これらの変異が高頻度に生じていることが判明した。これらの所見は HBZ 自身が遺伝子変異を誘導する機能を有していることを示唆しており、多段階発がん機構の一つである可能性がある。今後、HBZ-Tg から得られたゲノム情報と ATL 患者の情報と比較することにより、発がんにより重要なゲノム異常の特定が期待できる。

E. 結論

HBZ-Tg 由来 T 細胞では *Aicda* の発現が亢進していた。HBZ は TGF- β /Smad 経路を介して *Aicda* のプロモーターを活性化することが判明した。HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞株 Ht48 では、G-to-A および C-to-T 変異が他の変異に比較し高頻度に認められたことから、HBZ による *Aicda* 転写亢進が宿主遺伝子の点変異を誘導し、発がんに關与する可能性が示唆された。

。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakahata S, Ichikawa T, Maneesaay P, Saito Y, Nagai K, Tamura T, Manachai N, Yamakawa N, Hamasaki M, Kitabayashi I, Arai Y, Kanai Y, Taki T, Abe T, Kiyonari H, Shimoda K, Ohshima K, Horii A, Shima H, Taniwaki M, Yamaguchi R, Morishita K.: Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers *Nature Comm.* 2014 5:3393.
2. Kai H, Akamatsu E, Torii E, Ko-dama H, Yukizaki C, Akagi I, Ino H, Sakakibara Y, Suiko M, Yamamoto I, Okayama A, Morishita K., Kataoka H, Matsuno K.: Identification of a bioactive compound against adult T-cell leukemia from bitter gourd Seeds. *Plants* 2014 3:18-26.
3. Yamamura A, Miura K, Karasawa H, Morishita K., Abe K, Mizuguchi Y, Saiki Y, Fukushima S, Kaneko N, Sase T, Nagase H, Sunamura M, Motoi F, Egawa S, Shibata C, Unno M, Sasaki I, Horii A.: Suppressed expression of NDRG2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 441:102-7.
4. Ikebe E, Kawaguchi A, Tezuka K, Taguchi S, Hirose S, Matsumoto T, Mitsui T, Senba K, Nishizono A, Hori M, Hasegawa H, Yamada Y, Ueno T, Tanaka Y, Sawa H, Hall W, Minami Y, Jeang KT, Ogata M, Morishita K., Hasegawa H, Fujisawa J, Iha H.: Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATL model mice. *Blood Cancer J.* 2013 3:e132.
5. Sugie S, Mukai S, Tsukino H, Toda Y, Yamauchi T, Nishikata I, Kuroda Y, Morishita K., Kamoto T.: Increased plasma caveolin-1 levels are associated with progression of prostate cancer among Japanese men. *Anticancer Res.* 2013 33:1893-7.
6. Yamasaki M, Mine Y, Nishimura M, Fujita S, Sakakibara Y, Suiko M, Morishita K., Nishiyama K.: Genistein induces apoptotic cell death associated with inhibition of the NF- κ B pathway in adult T-cell leukemia cells. *Cell Biol Int.* 2013 37:742-7.
7. Saito Y, Kaneda K, Suekane A, Ichihara E, Nakahata S, Yamakawa N, Nagai K, Mizuno N, Kogawa K, Miura I, Itoh H, Morishita K.: Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1-regulated GPR56. *Leukemia.* 2013 27:1637-49.
8. Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J., Takai K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP Factor Suppresses Apoptosis by Attenuating the Function of FoxO3a and Altering Its Localization. *Cancer Res*, 74; 188-200, 2014.
9. Miura M, Yasunaga J., Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, Akari H, Matsuoka M. Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. *Retrovirology*, 10; 118, 2013.
10. Matsuoka M and Yasunaga J. Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. *Curr Opin Virol*,

2. 学会発表

1. Kaneda K, Morishita K.: Integrin A6 as a special marker of refractory leukemia is important for maintaining of leukemia stem cells. The 11th Stem Cell Research Symposium. (第11回幹細胞シンポジウム) 文京区. 2013.5.17
2. Nakahata S, Morishita K.: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. CANADA (Montreal). 2013.6.26-30
3. 市川朝永、中畑新吾、森下和広: がん抑制遺伝子 NDRG2 による HTLV-1/Tax 誘導性 NF κ B 活性抑制機構の解析. 第34回日本炎症・再生医学会. 京都. 2013.7.2
4. 市川朝永、中畑新吾、藤井雅寛、伊波英克、森下和広: NDRG2 は PP2A リクルーターとして PTEN 及び NIK 活性調節に関わる. 第6回 HTLV-1 研究会・シンポジウム. 港区. 2013.8.25
5. 中武彩子、小林行治、西片一朗、中畑新吾、岩永正子、相良康子、北中明、天野正宏、前田宏一、末岡榮三朗、瀬戸口充、岡山昭彦、宇都宮與、下田和哉、渡邊俊樹、森下和広: 血中可溶性 CADM1/TSLC1 測定による ATL 診断法の開発. 第6回 HTLV-1 研究会・シンポジウム. 港区. 2013.8.25
6. 西片一朗、市川朝永、中畑新吾、藤井雅寛、伊波英克、白神俊幸、田中勇悦、森下和広: ATL 細胞における CADM1 高発現は HTLV-1 Tax を含む NF- κ B 活性化に依存する. 第6回 HTLV-1 研究会・シンポジウム. 港区. 2013.8.24-25 (ポスター)
7. 市川朝永、田村知丈、中畑新吾、迫田隅男、森下和広: がん抑制遺伝子 NDRG2 欠損マウスによる 4-NQO 誘導性口腔がん発症機構の解析. 第86回日本生化学会大会. 横浜. 2013.9.11
8. 市川朝永、田村知丈、中畑新吾、迫田隅男、森下和広: がん抑制遺伝子 NDRG2 欠損マウスによる 4-NQO 誘導性口腔がん発症機構の解析. 第86回日本生化学会大会. 横浜. 2013.9.11 (ポスター)
9. 兼田(中島)加珠子、井川香織、太田智美、岡本朝久、帖佐悦男、迫田隅男、森下和広: MEL/1PRDM16 による骨分化制御機構の解明. 第86回日本生化学会大会. 横浜. 2013.9.12 (ポスター)
10. Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K.: NDRG2 inactivation in cancer cells leads to activation of the P13K/AKT pathway via sustained phosphorylation of PTEN. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜. 2013.10.3 (ポスター)
11. Ichikawa T, Nakahata S, Tamura T, Sakoda S, Morishita K.: Molecular mechanisms of 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO)-induced oral carcinogenesis in NDRG2-deficient mice. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜. 2013.10.5
12. Nagai K, Nakahata S, Ichikawa T, Meda K, Utsunomiya A, Kanai Y, Sueoka E, Morishita K.: DNA methylation profiles of various types of ATLL associated with development of ATLL. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜. 2013.10.5 (ポスター)
13. Kaneda K, Suekane A, Saito Y, Yamakawa N, Kurosawa J, Morishita K.: Investigation of therapeutic efficacy of neutralizing antibody of integrin for AML. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜. 2013.10.5 (ポスター)
14. Yamamoto H, Yokoyama K, Lu J, Oba S, Kawamata T, Yoshimi A, Morishita K., Kurokawa M, Koutani A: Identification of miRNA targeting Evi 1. 第75回日本血液学会学術集会. 札幌. 2013.10. (ポスター)
15. Kaneda K, Suekane A, Yamakawa N, Saito Y, Morishita K.: Survival and drug resistance of LSCs Cell by integrin alpha 6 in EVI1^{high} AML. 第75回日本血液学会学術集会. 札幌. 2013.10. (ポスター)
16. Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K.: Down-regulation of NDRG2 induces activation of the P13K pathway through PTEN inactivation in ATL. 第75回日本血液学会学術集会. 札幌. 2013.10. (ポスター)
17. 兼田(中島)加珠子、末金彰、斎藤祐介、森下和

- 広：GPR56 は白血病幹細胞の新規治療標的である。第 36 回日本分子生物学会年会。神戸。2013.12.3 (ポスター)
18. 兼田(中島)加珠子、井川加織、太田智美、黒木修司、関本朝久、帖佐悦男、迫田隅男、森下和広：骨軟骨分化制御における MEL1/PRDM16 の機能解析。第 36 回日本分子生物学会年会。神戸。2013.12.3 (ポスター)
 19. 伊波英克、池辺詠美、川口晶、手塚健太、田口慎也、廣瀬仁志、西園晃、堀光雄、長谷川寛雄、山田恭暉、上野孝治、田中勇悦、澤洋文、Hall William W、南康文、Jeang Kuan-Teh、緒方正雄、森下和広、長谷川秀樹、藤澤順一：Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATL model mice. 第 36 回日本分子生物学会年会。神戸。2013.12.5 (ポスター)
 20. Miura Michi, Junko Tanabe, Kenji Sugata, Tiejun Zhao, Guangyong Ma, Paola Miyazato, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: STLV-1 infected Japanese macaque as a model of HTLV-1 infection: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
 21. Azusa Tanaka-Nakanishi, Jun-ichiro Yasunaga, Ken Takai, Masao Matsuoka: Molecular mechanisms of apoptosis suppression by HTLV-1 bZIP factor in HTLV-1 infected cells: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
 22. Guanyong Ma, Jun-ichiro Yasunaga, Jun fan, Shin-ichi Yanagawa, Masao Matsuoka: HTLV-1 mediated dysregulation of the Wnt pathways: Roles of Tax and HBZ: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
 23. Akihiro Kawatsuki, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: HTLV-1 bZIP factor suppresses c-Fos transcription and impairs T cell activation: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
 24. 松岡雅雄、安永純一郎：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による発がん：Tax と HBZ の拮抗と協調：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場 (兵庫県)、2013 年 11 月 10-12 日
 25. 安永純一郎：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による病原性発現メカニズム：第 4 回ナノバイオ創薬研究シンポジウム、京都大学杉浦ホール、2013 年 3 月 9 日
 26. 安永純一郎：HTLV-1 がコードする二つのがん遺伝子 tax と HTLV-1 bZIP：第 15 回白馬シンポジウム in 名古屋、(独) 国立病院機構名古屋医療センター (愛知)、2013 年 7 月 19-20 日
 27. 田中梓、安永純一郎、高井健、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor(HBZ)は転写因子 FoxO3a の機能を阻害することによりアポトーシスを抑制する：第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム (東京医科学研究所講堂)、2013 年 8 月 25-26 日
 28. 田中梓、安永純一郎、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor suppresses intrinsic and extrinsic apoptotic pathways by targeting FoxO3a:第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2013 年 10 月 3-5 日
 29. 三浦未知、趙鉄軍、馬広勇、安永純一郎、松岡雅雄：Simian T-cell leukemia virus type 1-infected Japanese Macaques as a model for HTLV-1 research: 第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2013 年 10 月 3-5 日
 30. Jun-ichiro Yasunaga, Guangyong Ma, Jun Fan, Shin-ichi Yanagawa, Masao Matsuoka: Perturbation of the Wnt pathway by HTLV-1 is important in viral replication and cell proliferation: 第 75 回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館 (北海道)、2013 年 10 月 11-13 日
 31. 菅田謙治、安永純一郎、三浦未知、明里宏文、小柳義夫、小原道法、松岡雅雄：組換えウイルスを用いた抗 HTLV-1 ワクチンの作製と Macaque 属での応用：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場 (兵庫県)、2013 年 11 月 10-12 日
 32. 園直希、馬広勇、萩屋啓太、安永純一郎、松岡雅雄：FBXL11 は HTLV-1 bZIP factor と Tax の機能を共に増強し ATL 細胞の増殖を促進する：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場 (兵庫県)、2013 年 11 月 10-12 日
 33. 紀ノ定明香、安永純一郎、伊豫田智典、稲葉カヨ、松岡雅雄：HBZ による CD4 陽性 T 細胞増殖促進の免疫学的機序：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場 (兵庫県)、2013 年 11 月 10-12 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願番号：特願2011-508324

名称：PTENのリン酸化抑制剤又は脱りん酸化剤

特許権者：宮崎大学、宮崎県産業振興機構

発明者 森下和広 中畑新吾

登録日 平成26年4月11日

2. 実用新案登録

3. その他

ヒト ATL 及び HBZ トランスジェニック ATL 発症マウスを用いた比較ゲノム解析による ATL 発症機構の解析
(ヒト ATL に関する研究)

研究代表・分担者：森下 和広 宮崎大学医学部 教授

研究要旨

成人 T 細胞白血病(ATL)の発症機構を解明するため、統合的ゲノム解析を行い、ATL 発症関連遺伝子候補として、CADM1/TSLC1、ZEB1(TCF8)、EPC1、NDRG2、BCL11B を同定した。NDRG2 は新規 PP2A・PTEN 結合タンパク質であり、PTEN・C 端脱リン酸化により、ストレス感染等による PI3K/AKT 情報伝達系を負に制御する役割を有することを同定した。ATL での NDRG2 欠失は PTEN の恒常的リン酸化による不活化をもたらす PI3K/AKT の恒常的活性化に繋がっていた。NDRG2 は HTLV-1 TAX、EZH2 活性化によりメチル化・発現低下を引き起こし、感染防御としての PI3K/AKT・NFκB 情報伝達系の抑制がかからず、その後のゲノムエピゲノム異常の蓄積を促進することが示唆された。さらに HTLV-1 感染に伴うエピゲノム異常と TAX 非依存的エピゲノム異常の解析を、網羅的メチル化解析を行い、関連遺伝子群を同定した。さらにこれまでに同定した因子群の機能をさらに *in vivo* 実験により証明中である。

A. 研究目的

成人T細胞白血病(ATL)はHTLV-1感染より数十年を経て白血病化する難治性白血病であるが、ゲノム異常の蓄積が著しく、固形癌に近い複雑核型を示す。このためATLにおける白血病発症にはHTLV-1感染後に多くのゲノム異常、エピゲノム異常が蓄積し多因子による発症が考えられる。そこで我々はATLに対する統合的ゲノム解析を行い、染色体転座集中領域の同定、並びに高密度SNPアレイを用いたゲノム欠失増幅領域の同定、並びに網羅的遺伝子発現解析を通じてATL発症関連遺伝子を複数個単離してきた。さらにくすぶり型、慢性型ATLを含むATLのゲノム解析とエピゲノム解析を行い、これらの遺伝子群の機能異常を明らかにし、HTLV-1感染からATL多段階発がんの解明、ATL病態に即した新規診断法や治療法の開発につなげる。

B. 研究方法

ATL のゲノム解析のため、くすぶり型、慢性型、急性型 ATL 症例合計 74 症例の高密度 SNP アレイ解析を用いて、ゲノム欠失増幅領域を同定し、cDNA オリゴヌクレオチドアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析との組み合わせで、ATL 発症関連因子群を同定した。同様に HumanMethylation 450 beadschip (Illumina)を用い各種 ATL 検体 31 症例、健常人 DNA5 症例、Tax 不死化リンパ球 3 症例、HTLV-1 感染細胞株 5 株、ATL 細胞株 6 株の whole genome メチル化解析を行った。NDRG2 及び PTEN 結合タンパク質を網羅的に同定し、その遺伝子群の検討を進めた。また同定した遺伝子群の機能解析としてびに遺伝子改変マウスを用いた白血病発症機構について検討、さらに特異的抗体の開発並びに、その抗体機能について検討する。

(倫理面への配慮)

患者検体の使用に関しては、宮崎大学医学部医の倫理審査会の承認(承認番号 784)をうけ、同意(インフォームドコンセント)の上で使用を行っている。組み換え DNA 実験を行うにあたり、宮崎大学(承認番号: 268)の承認を受けて実施している。実験動物に関しては宮崎大学動物実験委員会の承認(2010-509-3、510-3、525-5、534-3、505-3)を受け使用を行っている。利益相反に関しては、宮崎大学利益相反委員会が設置され適切に処理されている。

C. 研究結果

急性型ATLの統合的ゲノム解析からZEB1/TCF8、EPC1/AXSL2融合遺伝子、NDRG2、BCL11B、TSLC1を白血病関連遺伝子群として同定している。NDRG2は新規PTEN結合タンパク質として新に同定し、PTENに結合しフォスファターゼPP2AをリクルートしPTEN・C端脱リン酸化調節に関わる因子であることを同定した。ATLにおいてNDRG2の発現低下はPTEN-C端の高頻度リン酸化をきたし、PTEN不活化はPI3K/AKT情報伝達系の恒常的活性化に繋がっていた(Nature Comm 2014)。このPTENリン酸化酵素について、候補遺伝子を特定し現在そのリン酸化機構を検討しており、PTENリン酸化を阻害する事による治療法の開発に繋がりたい。またこのPTENリン酸化は細胞膜BST2タンパク質に由来しており、BST2はバイオフィーム構造をとりHTLV-1のウイルス感染を防御する役割を持つ。さらにwhole genomeメチル化解析によりNDRG2はくすぶり型、慢性型ATLでも高率にメチル化されており発症初期よりNDRG2は低発現していることが分かった。このメチル化反応とHTLV-1感染の

関連性について検討したところ、TAX発現に依存した、EZH2遺伝子高発現、NDRG2プロモーターのヒストン脱アセチル化はメチル化亢進を引き起こすことが示唆される結果を得ている。NDRG2欠損マウスは多種類の癌の発症ばかりで無く、心筋梗塞や脂肪肝など生活習慣病も引き起こす事から、癌ばかりで無く生活習慣病モデルマウスとしての利用が考えられる。CADMITGマウスの解析並びにBCL11B TGマウスを樹立し、白血病化の解析を続けている。

D. 考察

同定した NDRG2 は元来の機能が感染等のストレス刺激による細胞内情報伝達系を負に制御し、細胞に恒常性をもたらす遺伝子として考えられる。HTLV-1 感染により TAX 発現に伴うメチル化異常はこの NDRG2 のメチル化を促し、低発現に繋がる事が示唆された。従って HTLV-1 感染はそのゲノムエピゲノム異常を引き起こす重要な引き金となっており、TAX や HBZ のゲノムエピゲノムに及ぼす影響を検討しつつ ATL の発症機構を検討することは重要な手がかりになると思われる。

E. 結論

新規に単離した NDRG2 に関連する PTEN リン酸化酵素は治療の標的になり得る可能性が有り、さらなる検討が必要である。また HTLV-1 感染以降のゲノム異常・エピゲノム異常は TAX/HBZ の機能に依存していることが示唆されるため、HTLV-1 ウイルス感染症による影響を検証しつつ ATL 発症を段階的に検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakahata S, Ichikawa T, Maneesaay P, Saito Y, Nagai K, Tamura T, Manachai N, Yamakawa N, Hamasaki M, Kitabayashi I, Arai Y, Kanai Y, Taki T, Abe T, Kiyonari H, Shimoda K, Ohshima K, Horii A, Shima H, Taniwaki M, Yamaguchi R, Morishita K.: Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers *Nature Comm.* 2014 5:3393.
- 2) Kai H, Akamatsu E, Torii E, Ko-dama H, Yukizaki C, Akagi I, Ino H, Sakakibara Y, Suiko M, Yamamoto I, Okayama A, Mor-ishita K, Kataoka H, Matsuno K.: Identification of a bioactive compound against adult T-cell leukemia from bitter melon seeds. *Plants* 2014 3:18-26.
- 3) Yamamura A, Miura K, Karasawa H, Morishita K,

Abe K, Mizuguchi Y, Saiki Y, Fukushige S, Kaneko N, Sase T, Nagase H, Sunamura M, Motoi F, Egawa S, Shibata C, Unno M, Sasaki I, Horii A.: Suppressed expression of NDRG2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 441:102-7.

- 4) Ikebe E, Kawaguchi A, Tezuka K, Taguchi S, Hirose S, Matsumoto T, Mitsui T, Senba K, Nishizono A, Hori M, Hasegawa H, Yamada Y, Ueno T, Tanaka Y, Sawa H, Hall W, Minami Y, Jeang KT, Ogata M, Morishita K, Hasegawa H, Fujisawa J, Iha H.: Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATL model mice. *Blood Cancer J.* 2013 3:e132.
- 5) Sugie S, Mukai S, Tsukino H, Toda Y, Yamauchi T, Nishikata I, Kuroda Y, Morishita K, Kamoto T.: Increased plasma caveolin-1 levels are associated with progression of prostate cancer among Japanese men. *Anticancer Res.* 2013 33:1893-7.
- 6) Yamasaki M, Mine Y, Nishimura M, Fujita S, Sakakibara Y, Suiko M, Morishita K, Nishiyama K.: Genistein induces apoptotic cell death associated with inhibition of the NF- κ B pathway in adult T-cell leukemia cells. *Cell Biol Int.* 2013 37:742-7.
- 7) Saito Y, Kaneda K, Suekane A, Ichihara E, Nakahata S, Yamakawa N, Nagai K, Mizuno N, Kogawa K, Miura I, Itoh H, Morishita K.: Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1-regulated GPR56. *Leukemia.* 2013 27:1637-49.

2. 学会発表

- 1) Kaneda K, Morishita K.: Integrin A6 as a special marker of refractory leukemia is important for maintaining of leukemia stem cells. The 11th Stem Cell Research Symposium. (第 11 回幹細胞シンポジウム) 文京区. 2013.5.17
- 2) Nakahata S, Morishita K.: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. CANADA (Montreal). 2013.6.26-30
- 3) 市川朝永、中畑新吾、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 による HTLV-1/Tax 誘導性 NF κ B 活性抑制機構の解析. 第 34 回日本炎症・再生医学会. 京都. 2013.7.2
- 4) 市川朝永、中畑新吾、藤井雅寛、伊波英克、森下和広：NDRG2 は PP2A リクルーターとして PTEN 及び NIK 活性調節に関わる. 第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム. 港区. 2013.8.25
- 5) 中武彩子、小林行治、西片一朗、中畑新吾、岩永正子、相良康子、北中明、天野正宏、前田宏一、末岡榮三朗、瀬戸口充、岡山昭彦、宇都宮與、下田和哉、渡邊俊樹、森下和広：血中可溶性 CADM1/TSCL1 測定による ATL 診断法の開発. 第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム. 港区. 2013.8.25

- 6) 西片一朗、市川朝永、中畑新吾、藤井雅寛、伊波英克、白神俊幸、田中勇悦、森下和広：ATL細胞における CADM1 高発現は HTLV-1 Tax を含む NF- κ B 活性化に依存する。第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム。港区。2013.8.24-25 (ポスター)
- 7) 市川朝永、田村知丈、中畑新吾、迫田隅男、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 欠損マウスによる 4-NQO 誘導性口腔がん発症機構の解析。第 86 回日本生化学会大会。横浜。2013.9.11
- 8) 市川朝永、田村知丈、中畑新吾、迫田隅男、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 欠損マウスによる 4-NQO 誘導性口腔がん発症機構の解析。第 86 回日本生化学会大会。横浜。2013.9.11 (ポスター)
- 9) 兼田(中島)加珠子、井川香織、太田智美、岡本朝久、帖佐悦男、迫田隅男、森下和広：MEL/PRDM16 による骨分化制御機構の解明。第 86 回日本生化学会大会。横浜。2013.9.12 (ポスター)
- 10) Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K : NDRG2 inactivation in cancer cells leads to activation of the P13K/AKT pathway via sustained phosphorylation of PTEN. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜。2013.10.3 (ポスター)
中畑新吾、市川朝永、齋藤祐介、新井康仁、滝智彦、谷脇雅史、森下和広：癌細胞における NDRG2 の不活性化は PTEN の恒常的なリン酸化を促し、P13/AKT 経路の活性化を引き起こす。第 72 回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.3 (ポスター)
- 11) Ichikawa T, Nakahata S, Tamura T, Sakoda S, Morishita K : Molecular mechanisms of 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO)-induced oral carcinogenesis in NDRG2-deficient mice. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜 2013.10.5
市川朝永、中畑新吾、田村知丈、迫田隅男、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 欠損マウスにおける 4-NQO 誘導性口腔がん発症機構の解析。第 72 回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.5
- 12) Nagai K, Nakahata S, Ichikawa T, Meda K, Utsunomiya A, Kanai Y, Sueoka E, Morishita K : DNA methylation profiles of various types of ATLL associated with development of ATLL. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜。2013.10.5 (ポスター)
長井健太郎、中畑新吾、市川朝永、前田宏一、宇都宮典、金井弥栄、末岡榮三朗、森下和広：ATLL の DNA メチル化は ATLL の発症に関連する。第 72 回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.5 (ポスター)
- 13) Kaneda K, Suekane A, Saito Y, Yamakawa N, Kurosawa J, Morishita K : Investigation of therapeutic efficacy of neutralizing antibody of integrin for AML. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜。2013.10.5 (ポスター)
兼田(中島)加珠子、末金彰、齋藤祐介、山川哲生、黒澤仁、森下和広：AML に対するインテグリン中和抗体の治療効果に関する検討。第 72 回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.5 (ポスター)
- 14) Yamamoto H, Yokoyama K, Lu J, Oba S, Kawamata T, Yoshimi A, Morishita K, Kurokawa M, Koutani A : Identification of miRNA targeting Evi 1. 第 75 回日本血液学会学術集会。札幌。2013.10. (ポスター)
- 15) Kaneda K, Suekane A, Yamakawa N, Saito Y, Morishita K : Survival and drug resistance of LS Cs Cell by integrin alpha 6 in EVI1^{high} AML. 第 75 回日本血液学会学術集会。札幌。2013.10. (ポスター)
- 16) Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K. : Down-regulation of NDRG2 induces activation of the P13K pathway through PTEN inactivation in ATL. 第 75 回日本血液学会学術集会。札幌。2013.10. (ポスター)
- 17) 兼田(中島)加珠子、末金彰、齋藤祐介、森下和広：GPR56 は白血球幹細胞の新規治療標的である。第 36 回日本分子生物学会年会。神戸。2013.12.3 (ポスター)
- 18) 兼田(中島)加珠子、井川加織、太田智美、黒木修司、関本朝久、帖佐悦男、迫田隅男、森下和広：骨軟骨分化制御における MEL1/PRDM16 の機能解析。第 36 回日本分子生物学会年会。神戸。2013.12.3 (ポスター)
- 19) 伊波英克、池辺詠美、川口晶、手塚健太、田口慎也、廣瀬仁志、西園晃、堀光雄、長谷川寛雄、山田恭暉、上野孝治、田中勇悦、澤洋文、Hall William W、南康文、Jeang Kuan-Teh、緒方正雄、森下和広、長谷川秀樹、藤澤順一：Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATL model mice. 第 36 回日本分子生物学会年会。神戸。2013.12.5 (ポスター)

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願番号：特願 2011-508324

名称：PTEN のリン酸化抑制剤又は脱リン酸化剤

特許権者：宮崎大学、宮崎県産業振興機構

発明者 森下和広 中畑新吾

登録日 平成 26 年 4 月 11 日

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

ヒト ATL 及び HBZ トランスジェニック ATL 発症マウスを用いた比較ゲノム解析による ATL 発症機構の解析

研究代表者：森下 和広 宮崎大学医学部 教授

研究分担者：安永 純一郎 京都大学ウイルス研究所 講師

研究要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は感染後、約 60 年という長い潜伏期間の後に、一部のキャリアに成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) を引き起こす。このことは、ATL が宿主側のゲノム異常やエピゲノム異常の蓄積による多段階発がん機構に基づき発症することを示唆している。HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は全ての ATL 細胞で発現しており、ATL 細胞の増殖に必須であると考えられる。さらに HBZ トランスジェニックマウス (HBZ-Tg) が T リンパ腫および全身性の炎症を発症することから、HTLV-1 の病原性に重要かつ不可欠な役割を果たしていると考えられる。本課題では HBZ による病原性発現機序について解析している。

H25 年度は、網羅的発現解析により、HBZ-Tg 由来 T 細胞ではシトシン脱アミノ化酵素 Activation-induced cytidine deaminase (AID) をコードする遺伝子 *Aicda* の発現が亢進していることを見出した。HBZ は TGF- β /Smad 経路を介して *Aicda* のプロモーターを活性化した。また、HBZ-Tg に発生した T リンパ腫由来の細胞株 Ht48 のエクソーム解析では、G-to-A および C-to-T 変異が他の変異に比較し高頻度に認められ、AID 発現亢進の関与が疑われる。これらの所見は HBZ による AID の異常発現が宿主遺伝子の点変異を誘導し、発がんに関与することを示唆している。

A. 研究目的

HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は全ての ATL 細胞で発現し、ATL 細胞における HBZ のノックダウンは細胞増殖を抑制する。さらには HBZ トランスジェニックマウスが T 細胞リンパ腫を発症することから HBZ は ATL の発がんにも必須であると考えられる。本研究では ATL 細胞および HBZ トランスジェニックマウスを用いて遺伝子の包括的解析を行い、発症の分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

1. HBZ-Tg に発症する T リンパ腫におけるゲノム異常の探索

1) HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞株の樹立
HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞を免疫不全マウスである NOD-SCID/IL2Rgamma KO マウス (NSG マウス) に移植し、生体内で継代・維持することが可能な細胞株を樹立した。さらには、野生型 C57BL/6 への生着、in vitro での培養・維持を試みた。

2) HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞における遺伝子変異の網羅的探索

HBZ-Tg の T リンパ腫から樹立した細胞株を用いて、エクソーム解析を行った。具体的には

Agilent 社の SureSelect XT Mouse All Exon キャプチャライブラリを使用し、サンプル中のエクソンを濃縮、ライブラリーを作成した。ディープシーケンシスはイルミナ社 MiSeq を用いて実施した。データ解析に関しては、BWA でゲノムにマッピングし、PicardTools で重複リードを除去、Samtools mpileup で SNP コール、アノテーションは ANNOVAR を利用した。さらに、non-synonymous SNPs を抽出し、変異のインパクトを推定するために PROVEAN を使って予測した。

2. HBZ による発現プロファイル変化の解析

HBZ による宿主細胞での発現プロファイルの変化を、Affymetrix 社のマイクロアレイを用いて包括的に比較解析した。具体的には、以下のサンプルを用いた。

- ・HBZ-TG 由来 CD4+T リンパ球 vs 野生型マウス CD4+T リンパ球
- ・HBZ-TG 由来制御性 T-リンパ球 vs 野生型マウス制御性 T リンパ球

(倫理面への配慮)

組み換え DNA 実験を行うにあたり、京都大学遺伝子組み換え実験委員会の承認を受けて実施した (承認番号: 100182)。また、動物実験

を行うにあたり、京都大学動物実験委員会の承認の下に行った(承認番号:D13-01、D13-02)。

C. 研究結果

1. HBZ-Tg に発症する T リンパ腫におけるゲノム異常の探索

1) HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞株の樹立

HBZ-TG 由来の T リンパ腫細胞を NSG マウスに移植し、腫瘍の生着および継代を行った。継代が可能であったのは 1 種類のみであり、本細胞株を Ht48 と命名した。継代を繰り返す間に、生着までの期間が短縮し、さらには野生型マウスにおいても腫瘍を形成することが可能となった。Ht48 は in vitro でも維持培養が可能であった。

2) HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞における遺伝子変異の網羅的探索

Ht48 から genomic DNA を抽出し、エクソーム解析を行った。マウスゲノム配列 mm10 との比較の結果、Ht48 では 6361 種類の遺伝子変異が検出された。変異の内訳に関しては、G-to-A 変異 (1334 箇所)、C-to-T 変異 (1319 箇所) と他の変異に比較して頻度が高かった (G-to-T: 236 箇所、G-to-C: 223 箇所、C-to-G: 216 箇所、C-to-A: 233 箇所、T-to-C: 967 箇所、T-to-G: 229 箇所、T-to-A: 164 箇所、A-to-T: 197 箇所、A-to-C: 238 箇所、A-to-G: 1005 箇所)。

2. HBZ による発現プロファイル変化の解析

マイクロアレイの結果、HBZ-Tg 由来の CD4+ T 細胞および制御性 T リンパ球ではシトシン脱アミノ化酵素 Activation-induced cytidine deaminase (AID) をコードする遺伝子 *Aicda* の発現が亢進していることが示唆された。複数の HBZ-Tg から CD4+ T-cell を分離し *Aicda* の発現を realtime PCR にて確認したところ、HBZ-Tg 群にて有意に *Aicda* の転写が亢進していた (WT vs HBZ-Tg, $p=0.0173$)。さらにルシフェレースアッセイにて HBZ は TGF- β /Smad 経路を介して *Aicda* のプロモーターを活性化することが明らかとなった。

D. 考察

本年度の解析から HBZ は *Aicda* の転写を誘導することが明らかとなり、Foxp3 の誘導機序と同様に、TGF- β /Smad 経路の活性化に関連していることが示唆された。AID は様々な悪性腫瘍にて発現上昇することが報告されており、G-to-A 変異、C-to-T 変異導入の原因となることが知られている。HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞株 Ht48 によるエクソーム解析にて、これらの

変異が高頻度に生じていることが判明した。これらの所見は HBZ 自身が遺伝子変異を誘導する機能を有していることを示唆しており、多段階発がん機構の一つである可能性がある。今後、HBZ-Tg から得られたゲノム情報と ATL 患者の情報を比較することにより、発がんにより重要なゲノム異常の特定が期待できる。

E. 結論

HBZ-Tg 由来 T 細胞では *Aicda* の発現が亢進していた。HBZ は TGF- β /Smad 経路を介して *Aicda* のプロモーターを活性化することが判明した。HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞株 Ht48 では、G-to-A および C-to-T 変異が他の変異に比較し高頻度に認められたことから、HBZ による *Aicda* 転写亢進が宿主遺伝子の点変異を誘導し、発がんに関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J, Takai K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP Factor Suppresses Apoptosis by Attenuating the Function of FoxO3a and Altering Its Localization. **Cancer Res**, 74; 188-200, 2014.
2. Miura M, Yasunaga J, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, Akari H, Matsuoka M. Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. **Retrovirology**, 10; 118, 2013.
3. Matsuoka M and Yasunaga J. Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. **Curr Opin Virol**, 3; 684-691, 2013.

2. 学会発表

1. Miura Michi, Junko Tanabe, Kenji Sugata, Tiejun Zhao, Guangyong Ma, Paola Miyazato, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: STL V-1 infected Japanese macaque as a model of HTLV-1 infection: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
2. Azusa Tanaka-Nakanishi, Jun-ichirou Yasunaga,

- Ken Takai, Masao Matsuoka: Molecular mechanisms of apoptosis suppression by HTLV-1 bZIP factor in HTLV-1 infected cells: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
3. Guanyong Ma, Jun-ichiro Yasunaga, Jun fan, Shin-ichi Yanagawa, Masao Matsuoka: HTLV-1 mediated dysregulation of the Wnt pathways: Roles of Tax and HBZ: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
 4. Akihiro Kawatsuki, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: HTLV-1 bZIP factor suppresses c-Fos transcription and impairs T cell activation: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
 5. 松岡雅雄、安永純一郎: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による発がん: Tax と HBZ の拮抗と協調: 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場 (兵庫県)、2013 年 11 月 10-12 日
 6. 安永純一郎: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による病原性発現メカニズム: 第 4 回ナノバイオ創薬研究シンポジウム、京都大学杉浦ホール、2013 年 3 月 9 日
 7. 安永純一郎: HTLV-1 がコードする二つのがん遺伝子 tax と HTLV-1 bZIP: 第 15 回白馬シンポジウム in 名古屋、(独) 国立病院機構名古屋医療センター (愛知)、2013 年 7 月 19-20 日
 8. 田中梓、安永純一郎、高井健、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor(HBZ)は転写因子 FoxO3a の機能を阻害することによりアポトーシスを抑制する: 第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム (東京医科学研究所講堂)、2013 年 8 月 25-26 日
 9. 田中梓、安永純一郎、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor suppresses intrinsic and extrinsic apoptotic pathways by targeting FoxO3a: 第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川県)、2013 年 10 月 3-5 日
 10. 三浦未知、趙鉄軍、馬広勇、安永純一郎、松岡雅雄: Simian T-cell leukemia virus type 1-infected Japanese Macaques as a model for HTLV-1 research: 第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川県)、2013 年 10 月 3-5 日
 11. Jun-ichiro Yasunaga, Guangyong Ma, Jun Fan, Shin-ichi Yanagawa, Masao Matsuoka: Perturbation of the Wnt pathway by HTLV-1 is important in viral replication and cell proliferation: 第 75 回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館 (北海道)、2013 年 10 月 11-13 日
 12. 菅田謙治、安永純一郎、三浦未知、明里宏文、小柳義夫、小原道法、松岡雅雄: 組換えウイルスを用いた抗 HTLV-1 ワクチンの作製と Macaque 属での応用: 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場 (兵庫県)、2013 年 11 月 10-12 日
 13. 園直希、馬広勇、萩屋啓太、安永純一郎、松岡雅雄: FBXL11 は HTLV-1 bZIP factor と Tax の機能を共に増強し ATL 細胞の増殖を促進する: 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場 (兵庫県)、2013 年 11 月 10-12 日
 14. 紀ノ定明香、安永純一郎、伊豫田智典、稲葉カヨ、松岡雅雄: HBZ による CD4 陽性 T 細胞増殖促進の免疫学的機序: 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場 (兵庫県)、2013 年 11 月 10-12 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表

研究代表者 宮崎大学医学部 教授 森下和広
 研究分担者 京都大学ウイルス研究所 講師 安永純一郎

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsuoka M, <u>Yasunaga J.</u>	Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor.	Curr Opin Virol.	3	684-691	2013
Miura M, <u>Yasunaga J.</u> , Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, Akari H, Matsuoka M.	Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection.	Retrovirology	10	118	2013
Tanaka-Nakanishi A, <u>Yasunaga J.</u> , Takai K, Matsuoka M.	HTLV-1 bZIP factor suppresses apoptosis by attenuating the function of FoxO3a and altering its localization.	Cancer Res.	74	188-200	2014
Nakahata S, Ichikawa T, Maneesaay P, Saito Y, Nagai K, Tamura T, Manachai N, Yamakawa N, Hamasaki M, Kitabayashi I, Arai Y, Kanai Y, Taki T, Abe T, Kiyonari H, Shimoda K, Ohshima K, Horii A, Shima H, Taniwaki M, Yamaguchi R, <u>Morishita K.</u>	Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers.	<i>Nature Comm.</i>	5	3393	2014
Kai H, Akamatsu E, Torii E, Kodama H, Yukizaki C, Akagi I, Ino H, Sakakibara Y, Suiko M, Yamamoto I, Okayama A, <u>Morishita K.</u> , Kataoka H, Matsuno K	Identification of a bioactive compound against adult T-cell leukemia from bitter gourd Seeds.	<i>Plants</i>	3	18-26	2014
Yamamura A, Miura K, Karasawa H, <u>Morishita K.</u> , Abe K, Mizuguchi Y, Saiki Y, Fukushige S, Kaneko N, Sase T, Nagase H, Sunamura M, Motoi F, Egawa S, Shibata C, Unno M, Sasaki I, Horii A.	Suppressed expression of NDRG2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	441	102-107	2013

Ikebe E, Kawaguchi A, Tezuka K, Taguchi S, Hirose S, Matsumoto T, Mitsui T, Senba K, Nishizono A, Hori M, Hasegawa H, Yamada Y, Ueno T, Tanaka Y, Sawa H, Hall W, Minami Y, Jeang KT, Ogata M, Morishita K. , Hasegawa H, Fujisawa J, Iha H	Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATL model mice.	<i>Blood Cancer J.</i>	3	e132	2013
Sugie S, Mukai S, Tsukino H, Toda Y, Yamauchi T, Nishikata I, Kuroda Y, Morishita K. , Kamoto T.	Increased plasma caveolin-1 levels are associated with progression of prostate cancer among Japanese men.	<i>Anticancer Res.</i>	33	1893-1897	2013
Yamasaki M, Mine Y, Nishimura M, Fujita S, Sakakibara Y, Suiko M, Morishita K. , Nishiyama K.	Genistein induces apoptotic cell death associated with inhibition of the NF- κ B pathway in adult T-cell leukemia cells.	<i>Cell Biol Int.</i>	37	742-747	2013
Saito Y, Kaneda K, Suekane A, Ichihara E, Nakahata S, Yamakawa N, Nagai K, Mizuno N, Kogawa K, Miura I, Itoh H, Morishita K.	Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1-regulated GPR56.	<i>Leukemia</i>	27	1637-1649	2013



Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor

Masao Matsuoka and Jun-ichirou Yasunaga

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) spreads primarily by cell-to-cell transmission. Therefore, HTLV-1 promotes the proliferation of infected cells to facilitate transmission. In HTLV-1 infected individuals, the provirus is present mainly in effector/memory T cells and Foxp3+ T cells. Recent study suggests that this immunophenotype is acquired by infected cells through the function of HTLV-1 bZIP factor (HBZ). Tax, which is encoded by the plus strand, is crucial for viral replication and *de novo* infection, while HBZ, encoded by the minus strand, is important for proliferation of infected cells. Importantly, HBZ and Tax have opposing functions in most transcription pathways. HBZ and Tax cooperate in elaborate ways to permit viral replication, proliferation of infected cells and propagation of the virus.

Addresses

Institute for Virus Research, Kyoto University, 53 Shogoin Kawaharacho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

Corresponding author: Matsuoka, Masao (mmatsuok@virus.kyoto-u.ac.jp)

Current Opinion in Virology 2013, 3:684–691

This review comes from a themed issue on **Virus replication in animals and plants**

Edited by Ben Berkhout and Kuan-Teh Jeang

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 21st September 2013

1879-6257/\$ – see front matter, © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2013.08.010>

Introduction

Transmission of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is confined to three routes; mother-to-infant, sexual parenteral transmission, and blood transfusion/needle sharing [1]. A striking feature of this virus is that HTLV-1 is transmitted primarily in a cell-to-cell fashion, and infectivity of free virions is very poor. By contrast, another human retrovirus, human immunodeficiency virus (HIV), transmits by both cell-free and cell-to-cell contact. The transmission of HTLV-1 requires living infected cells in breast milk, semen and blood products. To facilitate its transmission, this virus increases the number of infected cells *in vivo* by stimulating their proliferation.

HTLV-1 was discovered in 1980 as the first human retrovirus [2,3]. Thereafter, this virus was found to be linked with a human disease, adult T-cell leukemia (ATL) [4]. Subsequently it was found that this virus also

causes another disease, HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), as well as HTLV-1 uveitis, infective dermatitis, and myopathy [1]. These diseases are thought to be associated with the fact that infected host immune cells proliferate *in vivo*. In this review, we summarize recent findings on the replication of HTLV-1, the proliferation of infected cells, and HTLV-1 propagation — matters which are closely related for this virus.

Virus entry and cell-to-cell transmission

Unlike HIV, HTLV-1 can infect a variety of cells; its receptor is thought to be a commonly expressed molecule [5]. It has been reported that HTLV-1 envelope protein interacts with three cellular molecules, heparan sulfate proteoglycan (HSPG) [6], neuropilin-1 [7], and a glucose transporter, GLUT1 [8], for entry into cells. Conformational changes of the complex consisting of the HTLV-1 virion and these molecules are thought to occur sequentially during the entry step. First, the HTLV-1 envelope attaches to HSPG, and it then forms complexes with neuropilin-1, which results in stabilization of the complex. Thereafter, GLUT1 is associated with the complex, and finally triggers the fusion process necessary to viral entry [9*].

In vitro experiments showed that free virions had poor infectivity, while co-culture of uninfected cells with HTLV-1 infected cells easily established HTLV-1 infected cells [10]. It has been reported that cell-mediated infection of HTLV-1 is 10,000 times more efficient than cell-free infection, while cell-to-cell infection by HIV-1 is only twice as efficient as cell-free infection [11]. Three models for the mechanism of cell-to-cell infection by HTLV-1 have been proposed: (1) virological synapse [12] and (2) biofilm [13**], and (3) cellular conduits [14]. HTLV-1 infected cells form a virological synapse with uninfected cells; ICAM-1 and LFA-1 are implicated in this synapse formation. Tax is also implicated, specifically in microtubule reorientation [15]. Indeed, Tax enhances cell-to-cell infection [11]. On the other hand, there is evidence to support the biofilm model as well. HTLV-1-infected T cells retain viral particles with virally-induced extracellular matrix components, including collagen, agrin, tetherin and galectin-3 [13**]. By cell contact, these viral assemblies adhere to other cells, resulting in infection with HTLV-1.

An increased number of infected cell augments the chances of transmission. Indeed, for mother-to-infant

transmission, it has been reported that infants have higher chances of getting infected from mothers with higher proviral loads [16].

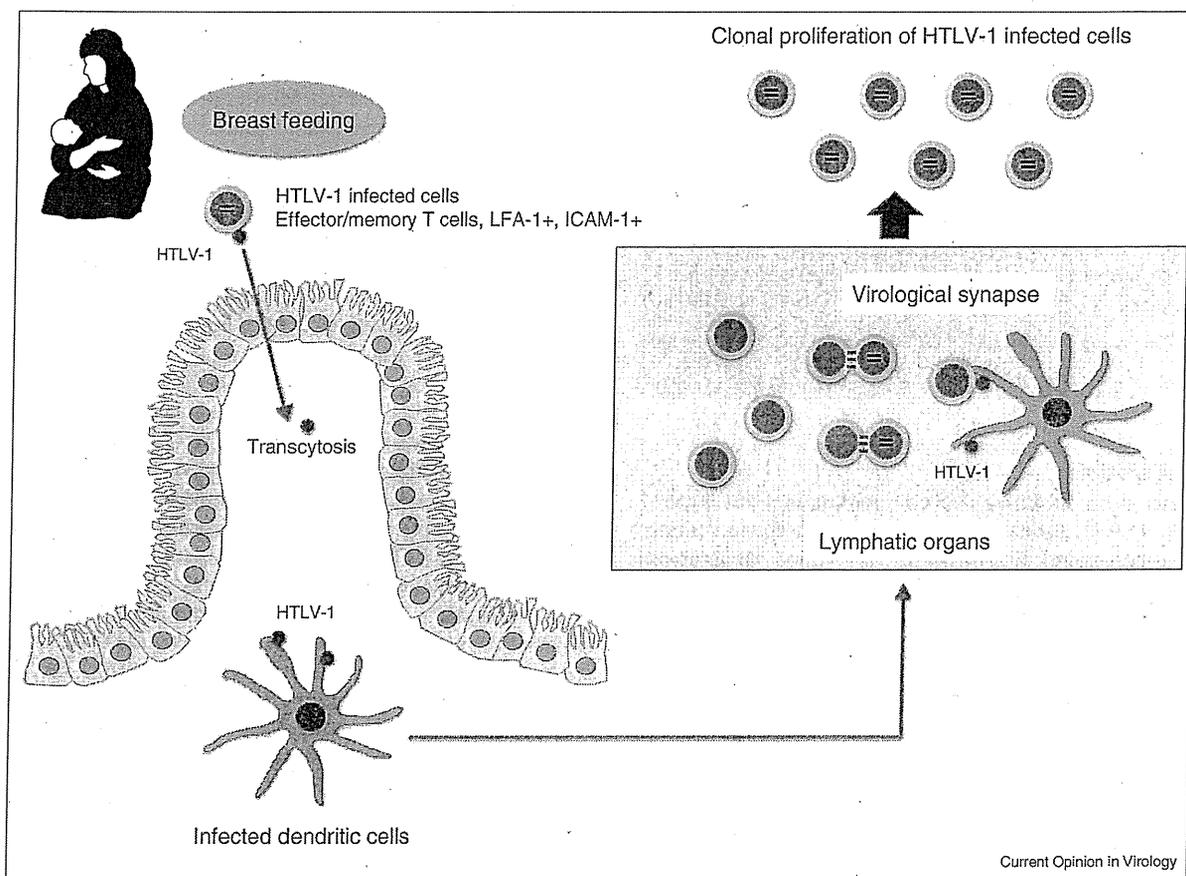
Transmission of HTLV-1

HTLV-1 can be transmitted by breast-feeding, sexual contact and blood transfusion. This transmission requires living infected cells, since this virus transmits mainly by cell-to-cell contact (Figure 1). Therefore HTLV-1 infected cells are hypothesized to have attributes that promote their entry into breast milk and semen. It has been reported that breast milk contains T-cells, most of which are effector/memory T cells expressing LFA1 and ICAM-1 [17], and HTLV-1 provirus has been detected in such effector/memory T cells [18]. These findings suggest that HTLV-1 may confer a phenotype to infected cells that facilitates their entry into breast milk. What component of HTLV-1 confers this effector/memory phenotype to HTLV-1 infected cells? Transgenic expression of HBZ

in CD4+ T cells increased the number of effector/memory T cells and regulatory T cells, while transgenic mice expressing Tax had no change in the phenotype of CD4+ T cells [19**]. This clearly demonstrates that the immunophenotypes of ATL cells and HTLV-1 infected cells are conferred by HBZ, not by Tax. This conferred phenotype, which involves high levels of expression of adhesion molecules, enables HTLV-1 infected cells to enter into breast milk and semen (Figure 1).

Next, the virus must override epithelial barriers. How does HTLV-1 cross the alimentary tract? Recently, it has been shown that free infectious HTLV-1 virions could cross the epithelial barrier via a transcytosis mechanism [20*]. HTLV-1 virions could then infect human dendritic cells (DCs) that exist in the epithelial barrier [21]. Infected DCs likely migrate to draining lymph nodes and then form virological synapses with T cells (Figure 1). It is difficult to infect T cells by free virus *in vitro*.

Figure 1



Transmission and *de novo* infection with HTLV-1. HTLV-1 is transmitted via breast feeding, sexual intercourse, and blood transfusion. For any of these routes, living infected cells are essential. HTLV-1 infected cells have the immunophenotypes of effector/memory T cells or regulatory T cells. These cells tend to enter breast milk. HTLV-1 enters into the alimentary tract by transcytosis, and infects dendritic cells. Infected DCs transmit virus to uninfected T cells via virological synapses. Then infected T cells expand clonally *in vivo*.

However, free virus can infect DCs, and infected DCs can propagate HTLV-1 infection, suggesting that DCs are the spreader of this virus *in vivo* [21]. Expression of adhesion and co-stimulatory molecules is crucial for immunological synapses between T cells and DCs [22]. Thus, the immunophenotypes (effector/memory T cells, regulatory T cells, and enhanced expression of adhesion molecules) conferred by HBZ are crucial for the further spread of this virus *in vivo*. Thus, using HBZ, HTLV-1 induces infected cells to acquire certain immunophenotypes that facilitate its entry into the body and its subsequent spread within the body.

Clonal proliferation of HTLV-1 infected cells

After infection, HTLV-1 spreads by cell-to-cell infection and DC mediated infection. This *de novo* infection of cells is thought to form a pool of infected cells at an early phase of infection. In an experiment using immunodeficient mice with human lymphocytes, administration of reverse transcriptase inhibitors, tenofovir disoproxil fumarate (TDF) or azidothymidine (AZT) beginning after one week of infection could neither block nor decrease proviral load of HTLV-1, while TDF or AZT could block infection when they were injected at the same time of infection [23]. These results suggest that a pool of HTLV-1 infected clones is generated at very early phase of infection, and after that time, clonal proliferation of infected cells is predominant. This notion is also supported by clinical findings that reverse transcriptase inhibitors or integrase inhibitors did not alter proviral load in HTLV-1 infected individuals [24,25].

After this early stage of *de novo* infection, HTLV-1 infected clones are subject to selection by both host immunological attack and viral gene expression. In seroconvertors, the clonality of HTLV-1 infected cells was not stable at an early phase, but then stabilized at the chronic carrier state phase [26], indicating that HTLV-1 infected clones are selected at early phase of infection, and then, selected clones survive *in vivo*.

Since the HTLV-1 provirus integrates at random sites within the host genome, the clonality of HTLV-1 infected cells can be analyzed by studying these integration sites. Inverse PCR has been used to identify the integration sites and determine the clonality of infected cells [27,28]. Recently, high-throughput sequencing has been shown to be capable of detailed analysis of clonality [29**]. It is well known that HAM/TSP patients possess higher proviral loads compared with asymptomatic carriers. Analysis of clonality using high-throughput sequencing revealed that the abundance of each clone did not differ, but the number of different clones increased in HAM/TSP patients compared with asymptomatic carriers [29**]. By contrast, the abundance of certain clones increased in patients coinfecting with HTLV-1 and strongyloides, and in infective dermatitis

patients with HTLV-1 infection (IDH patients) [30*]. It is noteworthy that ATL develops relatively frequently in IDH patients and HTLV-1 carriers coinfecting with strongyloides, while the occurrence of ATL is not so frequent in HAM/TSP patients [31]. Thus the enhanced abundance of clones and increased cell division might promote the development of ATL.

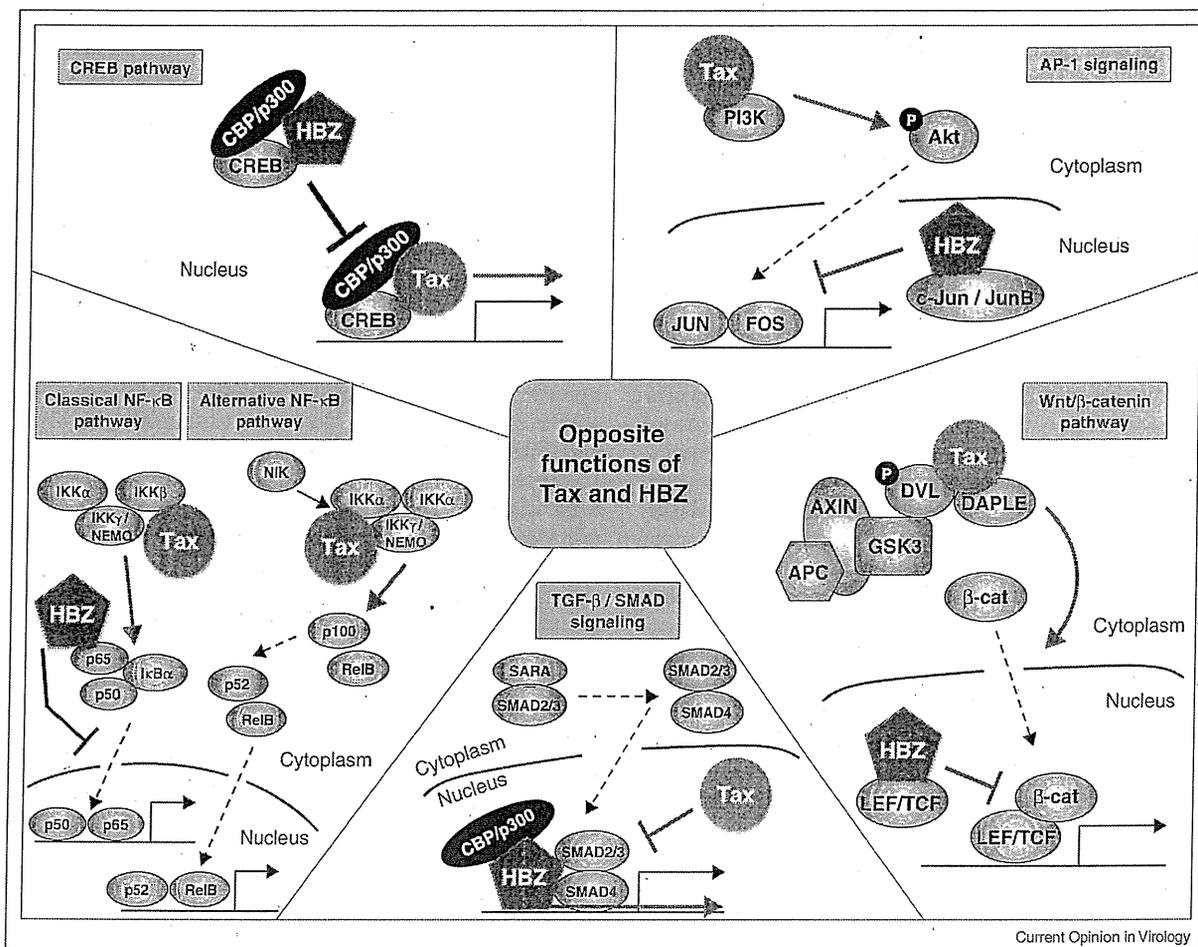
What drives cell division of HTLV-1 infected cells? HBZ is ubiquitously expressed in ATL cells and HTLV-1 infected cells *in vivo*, and promotes their proliferation [32]. In addition, Tax enhances mitogenic antigen-receptor signals [33,34]. The details of the mechanisms by which HBZ and Tax stimulate cell proliferation are complex and fascinating. In fact, HBZ and Tax have opposite effects on most signaling pathways [35] (Figure 2). For example, Tax activates the AP-1, NFAT, and CREB pathways while HBZ suppresses them [36,37]. Conversely, Tax inhibits TGF- β /Smad pathway whereas HBZ activates it [38]. Tax activates both the canonical and non-canonical NF- κ B pathways [39]. HBZ inhibits only the canonical NF- κ B pathway by interacting with p65. Expression of Tax promotes cell proliferation and simultaneously induces cellular senescence by induction of p21 and p27. HBZ prevents Tax induced cellular senescence by inhibiting p65 [40]. Thus, the elaborate interactions of various signaling pathways with Tax and HBZ control the proliferation of HTLV-1 infected cells. In addition to this relationship between HBZ and Tax, it has been reported that HBZ mRNA has growth-promoting activity [32], indicating another complex connection of HBZ as RNA and protein.

Furthermore, we have reported that HBZ suppresses the canonical Wnt pathway by inhibiting DNA binding by TCF-1/LEF-1 transcription factors, while Tax activates canonical Wnt signaling [41]. By contrast, HBZ enhances the transcription of Wnt 5a, which is a ligand for the non-canonical Wnt pathway. The canonical Wnt pathway is predominant during the development of T cells in the thymus, while non-canonical Wnt signaling is activated in peripheral T cells. These findings suggest that HBZ modulates the intra-cellular environment of peripheral T cells, which are natural target of this virus.

Control of transcription of viral genes

The HTLV-1 provirus encodes the regulatory genes (*tax* and *rex*) and the accessory genes (*p12*, *p13*, *p30*, and *HBZ*) in pX region; these genes regulate viral replication and the proliferation of infected cells [1]. For their transcription, the LTRs at each end of the provirus are used as promoters: the 5'/LTR and 3'/LTR control the transcription of the viral genes encoded in the plus and minus strands of the provirus, respectively (Figure 3). Since the plus strand of the provirus encodes all structural proteins and the viral genomic RNA, 5'/LTR-mediated transcription is required for viral replication and transmission. Tax

Figure 2



Current Opinion in Virology

Opposite functions of Tax and HBZ. Tax and HBZ have opposite functions in many signaling pathways. Tax activates the CREB pathway by recruiting CREB and CBP/p300 to the promoters of target genes, whereas HBZ also interacts with the same proteins, suppressing Tax-mediated transcription. Tax activates both the classical and the alternative NF- κ B pathways, and HBZ selectively suppresses classical signaling by targeting p65. Tax activates PI3K and induces the transcription of AP-1 target genes. HBZ negatively regulates this pathway by its inhibitory interactions with c-Jun and JunB through their bZIP domains. Tax forms a complex with DAPLE and DVL, and activates the canonical Wnt pathway. HBZ interacts with LEF-1/TCF-1 at point further downstream in this pathway and suppresses the transcription of the target genes. Tax has a negative effect on the TGF- β /SMAD pathway; however, HBZ activates it by interacting with SMAD2/3 and recruiting CBP/p300 to the promoters of the target genes.

is a potent activator of viral transcription through the 5'/LTR. Tax does not bind to DNA, but activates the transcription of target genes by recruiting various transcription factors and modifying the epigenetic status of promoter regions [42]. The association between Tax and CREB is crucial for viral gene transcription. There are three 21-bp repeat elements, called Tax-responsive elements (TREs), located in 5'/LTR, and the Tax-CREB complex recruits several histone acetyltransferases including CREB binding protein (CBP), p300, and p300/CBP-associated factor (PCAF) to the LTR, resulting in induction of viral expression. In addition to Tax, some cellular signaling machinery can enhance the activity of

the 5'/LTR. It has been shown that immune stimulation via T-cell receptor signaling activates the 5'/LTR [34,43]. Another study showed that apoptotic signals induced viral transcription [44]. 5'/LTR activation by these signals might be advantageous to efficient viral transmission and to viral 'escape' from a dying host cell.

Importantly, viral replication is actually suppressed *in vivo* [45], while viral antigens including Tax are quickly expressed in infected cells after they are transferred to *ex vivo* culture [46]. Host immune surveillance eliminates infected cells by targeting viral antigens. Among viral proteins, Tax is a major target of cytotoxic T-cells (CTLs)