

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ソームを濃縮、ライブラリを作成した。ディープシーケンシングはイルミナ社 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, $p=0.0173$)。さらにルシフェラスアッセイにて 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: 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.
2. 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.
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, Guanyong 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