

**厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（がん関係研究分野）
分担研究報告書**

ATL 症例の HTLV-1 プロウイルス解析

研究分担者：松岡 雅雄 京都大学ウイルス研究所 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) は成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) の原因ウイルスであるが、ATL 細胞では、限られたウイルス遺伝子の発現しか認められない。ATL 症例は Tax, HBZ を発現するものと HBZ のみを発現するものに分けられる。HBZ のみを発現する症例は、Tax を発現しうるものと、最早、発現できないタイプに分類できる。我々の解析により全症例の約 30% は Tax を発現できないタイプのプロウイルスを有していた。Tax を標的とする治療法の適応患者選択に重要な情報であると考え、HTLV-1 のモデルとなるサル T 細胞白血病ウイルス 1 型 (STLV-1) の解析を行い、STLV-1 が極めて HTLV-1 と類似した機能を有することを見出した。

A. 研究目的

HTLV-1 によって引き起こされる ATL では、発現するウイルス遺伝子は限られている。Tax は抗原性が高く、細胞傷害性 T リンパ球の標的となるために、その発現は抑制されており、症例によっては発現できない遺伝子の変異・欠失、DNA メチル化が起こっていることが報告されている。Tax を標的とした治療法を考える場合、腫瘍細胞が Tax を発現できるか否かは最も重要な問題であり、我々は樹状細胞治療適応症例での HTLV-1 プロウイルスを解析して、治療の feasibility を検討すると共に、Tax 発現抑制機構を明らかにすることを目的としている。HTLV-1 に対する免疫応答を解析する場合に適切な動物モデルは、これまでなかった。我々はサル T 細胞白血病ウイルス 1 型 (STLV-1) 感染ニホンザルが HTLV-1 の良い感染モデルとなるかを検討した。

B. 研究方法

1) tax の第一、第二エクソンは PCR でゲノム DNA から増幅して塩基配列を決定した。5'側 long terminal repeat (LTR) の DNA メチル化は sodium bisulfite 法で解析した。5'側 LTR の欠損は long-distance PCR で検出した。
2) STLV-1 の tax, STLV-1 bZIP factor (SBZ) 遺伝子発現ベクターを構築し、NF-kB, TGF- β , AP-1, NFAT, Wnt 経路に対する効果を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるプロウイルス解析は京都大

学倫理委員会の承認 (承認番号 G-311, 844) を基に遂行している。動物実験に関しては、動物愛護法に基づいた京都大学動物委員会の承認を得て遂行している。(承認番号: D13-02)

C. 研究結果

1) ATL 症例の解析から 12% の症例では tax 遺伝子にナンセンス変異が検出された。また、約 12% では 5'側 LTR の高メチル化が認められた。約 30% では 5'側 LTR が欠失しており、このように 5'側 LTR が欠失・メチル化されている場合、tax に変異・欠失がある症例では Tax は発現できないことが示唆される。一方、tax 遺伝子の転写が検出された症例 (34%) に加えて、tax 遺伝子配列が保持され、5'側 LTR にメチル化、欠失がない症例は Tax を発現することが可能であり、このような症例は Tax に対する免疫治療の対象となるものと推測された。この結果からみて、約半数の ATL 症例は Tax に対する免疫治療の適応になるものと推測される。

2) STLV-1 がコードする Tax (sTax)、STLV-1 bZIP factor (SBZ) の機能解析
STLV-1 の全塩基配列を決定し、HBZ と相同性がある、SBZ をコードするオープンリーディングフレームを見出した。HBZ と同様のスプライシングを確認できた。SBZ の発現を RT-PCR で確認した。この SBZ を発現ベクターに組み込み、解析を行った。sTax は Tax と同様に NF-kB, AP-1, NFAT 経路を活性化した。同様に sTax もこれら

の経路を活性化した。我々は HBZ が NF- κ B, NFAT, AP-1 経路を阻害して、TGF- β /Smad 経路を活性化することを報告しているが、SBZ も同様の機能を有していた。HBZ を T リンパ球に発現させると Foxp3 遺伝子の発現を誘導するが、SBZ をマウス T リンパ球に発現させると同様に Foxp3 遺伝子の発現が誘導された。以上のことから STLV-1 がコードする Tax, SBZ は HTLV-1 の Tax, HBZ と極めて良く似た機能を有することが明らかになった。

D. 考察

Tax は抗原性が高く細胞傷害性 T リンパ球の標的となりやすい。このため免疫治療の標的としては優れているが、ウイルスは Tax を発現しにくくする戦略を進化させている。一方、HBZ は恒常的に発現しており免疫治療の標的となりうるが、抗原性は低い。Tax を標的とした免疫治療を行う場合、その症例が Tax を発現しうるかを解析することは必須である。本臨床研究では、症例の HTLV-1 プロウイルスを迅速に診断するようになっており、治療の合理性を担保するようになっている。

HTLV-1 の動物モデルとしては、トランスジェニックマウス、ヒト化マウスなどが存在する。トランスジェニックマウスは導入遺伝子産物に免疫応答をみることができないという欠点があり、ヒト化マウスでのヒト免疫能も十分ではない。このため HTLV-1 に対する免疫応答の解析に適切なモデルが求められていた。本研究により、STLV-1 の Tax, SBZ が HTLV-1 Tax, HBZ と極めて類似した活性を有することが明らかとなった。また、1 頭の高齢の STLV-1 感染ニホンザルで T リンパ腫の発症が確認されており、STLV-1 が HTLV-1 と同様の病原性を有することが示された。ニホンザルはヒトに対する抗体が使用可能であることが多く、極めて優れた動物モデルである。実際、STLV-1 感染 T リンパ球は CCR4 陽性であり、抗 CCR4 抗体でプロウイルス量が減少することを確認できている。

E. 結論

HTLV-1 プロウイルス解析から Tax に対する免疫治療法適応基盤を明らかにした。HTLV-1 のモデルとして STLV-1 感染ニホンザルが有用であることを示した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J-I, Takai K and 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. Zhao T, Coutts A, Xu L, Yu J, Ohshima K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor supports proliferation of adult T cell leukemia cells through suppression of C/EBP α signaling. *Retrovirology*, 10:159, 2013.
3. Miura M, Yasunaga J-I, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, Akari H and 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.
4. Yamamoto-Taguchi N, Satou Y, Miyazato P, Ohshima K, Nakagawa M, Katagiri K, Kinashi T, and Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor induces inflammation through labile Foxp3 expression. *PLoS Pathogens*, 9: e1003630, 2013.

2. 学会発表

1. Matsuoka M: Molecular Pathogenesis by HTLV-1 bZIP Factor: The 15th Annual International Meeting of the Institute of Human Virology, Moscow, Russia, September 8-12, 2013.
2. Matsuoka M: How human T-cell leukemia virus type 1 induces diseases: FRONTIERS OF RETROVIROLOGY, Churchill College, Cambridge University, UK, September 16-18, 2013.
3. 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
4. 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
5. Yasunaga J-I, Guangyong Ma, Jun Fan, Yanagawa S-I, Matsuoka M: 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

6. 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
7. 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
8. 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
9. 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

特になし