

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590562

研究課題名(和文) HTLV-1感染ヒト化マウスを用いたATL発症過程特異的細胞変異の同定

研究課題名(英文) Characterization of cellular phenotypes specific for the ATL development in HTLV-1 infected humanized mouse

研究代表者

藤澤 順一 (Fujisawa, Jun-ichi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：40181341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ATLの病態を呈するHTLV-1感染ヒト化マウスにおいて、CD25陰性およびCD25陽性感染T細胞のNOGマウスでの造腫瘍性を検討したところ、CD25陽性細胞のみが腫瘍を形成した。両感染細胞集団における遺伝子発現を解析したところ、ともに制御性T細胞特異的な遺伝子および突然変異導入に関与するAPOBEC3Bが活性化されていた。また、CD25の発現と平行してBATF3、SYK等の遺伝子の活性化が観察されたが、ゲノムレベルでの変異は検出されなかったことから、HTLV-1感染による白血病発症過程には、エピゲノミックな調節が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tumorigenesis of CD25-negative and -positive CD4 T cells isolated from HTLV-1-infected humanized mice that exhibit ATL-like symptoms was examined by transplanting cells to the spleen of NOG mouse and only CD25-positive HTLV-1-infected CD4 T cells was found to form tumor. cDNA microarray analysis demonstrated that several genes related to the regulatory T-cells and a cellular mutator gene, APOBEC3B, were activated upon HTLV-1 infection. Genes for BATF3 and SYK were upregulated in parallel with the expression of CD25. Since no sign of mutation in the level of host genome was detected, the epigenetic modifications are suggested to be mainly involved in the leukemogenesis of HTLV-1 infected humanized mouse.

研究分野：ウイルス腫瘍学

キーワード：ウイルス ATL 動物モデル HTLV-1

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、ヒト血球系を持つヒト化マウスに HTLV-1 を感染させることで、感染 1~2 ヶ月で感染 CD4 T 細胞のポリクローナルな異常増殖を、感染 3~4 ヶ月においてはオリゴクローナルな CD25 陽性 CD4 T 細胞の腫瘍性増殖を観察し、感染 4 ヶ月以降には花弁様分葉核を持つリンパ球の出現を確認する等、ATL 様病態の再現に成功した。また、同一脾臓内の CD25 陰性および CD25 陽性細胞集団の両者に同一感染クローンの存在が確認され、かつ CD25 陽性集団でのクローン選択がより進行していたことから、病態の進展に伴う CD25 陰性感染クローンの CD25 陽性への形質転換が強く示唆された。

## 2. 研究の目的

HTLV-1 感染ヒト化マウスを用い、感染初期から感染末期の各段階における、腫瘍細胞としての形質、細胞内シグナル、遺伝子発現、ジェネティックあるいはエピジェネティックな変異を経時的・網羅的に解析し、ATL 発症に至る感染細胞の段階的な形質変化と遺伝子変異の実態を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト化マウスの作製と HTLV-1 感染

ヒト化マウスは、ヒト臍帯血から磁気ビーズ法にて精製した CD133 陽性造血幹細胞(5x10<sup>4</sup>個)を NOD-SCID/IL2R<sup>-</sup> chain knock-out (NOG-SCID) マウス骨髄内に移植することで作製した。移植 4~5 ヶ月後、線照射(10Gy)HTLV-1 感染 Jurkat 細胞(JEX28; 2x10<sup>5</sup>個)を腹腔内に注入し HTLV-1 を感染させた。HTLV-1 感染後、経時的に採取した末梢血および体重減少を指標として供死したマウスより分離した脾臓細胞を、セルソーター(FACS CANTO II)を用いてヒト血球表面マーカー (CD45、CD3、CD4、CD8、CD25)の解析し、分離したゲノム DNA より、プロウイルス量を算出した。

### (2) HTLV-1 感染 CD4T 細胞の分離

HTLV-1 非感染 CD4T 細胞、HTLV-1 感染 CD25 陰性および陽性 CD4T 細胞は、HTLV-1 非感染あるいは感染ヒト化マウスより分離した脾臓細胞から、セルソーター(FACS ARIA)を用いて分離・精製した。分離したそれぞれの細胞から、フェノール法にてゲノム DNA を、TRIzol 試薬(Invitrogen)にて RNA を精製した。

### (3) NOG マウスにおける腫瘍増殖能

白血病型あるいはリンパ腫型の病態を示した HTLV-1 感染ヒト化マウスの脾臓より分離した CD25 陰性および陽性 CD4T 細胞それぞれ 1x10<sup>5</sup>個を、NOG マウスの脾臓へ直接移植し、脾腫の形成を検討した。

### (4) cDNA マイクロアレイ解析

HTLV-1 非感染ヒト化マウス脾臓より分離した CD4T 細胞、および同一 HTLV-1 感染ヒト化マウスの脾臓より分離した CD25 陰性および陽性

CD4T 細胞から精製した RNA を標品とした cDNA マイクロアレイ解析は、北海道システムサイエンス社に委託し、Agilent Technologies, SurePrintG3 Human GE 8x60K を用いておこなった。

### (5) NOG マウスにおける腫瘍増殖能

白血病型あるいはリンパ腫型の病態を示した HTLV-1 感染ヒト化マウスの脾臓より分離した CD25 陰性および陽性 CD4T 細胞それぞれ 1x10<sup>5</sup>個を、NOG マウスの脾臓へ直接移植し、脾腫の形成を検討した。

### (6) マイクロアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション

比較ゲノムハイブリダイゼーション解析は北海道システムサイエンス社の受託解析としておこない、ヒト化マウス作製に用いたヒト臍帯血および HTLV-1 感染ヒト化マウスの脾臓より分離した CD25 陽性 CD4T 細胞から精製したゲノム DNA を標品として、Agilent Technologies, SurePrintG3 CGH Human 1x1M を用いた。

### (7) 次世代シーケンサーを用いた癌関連遺伝子パネルの変異解析

白血病様病態を示した HTLV-1 感染ヒト化マウスの脾臓より分離した CD25 陰性および陽性 CD4T 細胞のゲノム DNA における 50 種類の癌関連遺伝子の遺伝子変異を、Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 を用いて、タカラバイオ株式会社バイオメディカルセンターに委託し解析した。

## 4. 研究成果

### (1) CD25 陰性および CD25 陽性感染 CD4T 細胞の免疫不全 NOG マウスにおける腫瘍形成能

HTLV-1 感染ヒト化マウスで再現された ATL 様病態の発現過程において、Tax 発現 CD25 陰性感染 CD4T 細胞から Tax 陰性 CD25 陽性 CD4T 細胞へのクローンレベルでの形質転換が想定されたことから、これら細胞間の腫瘍増殖性の相違を明らかにする目的で、免疫不全 NOG マウスにおける腫瘍形成能を比較検討した。

同一の HTLV-1 感染ヒト化マウス(表 1 ; Y520)脾臓より分離・精製したそれぞれ 10<sup>5</sup>個の CD25 陰性(ウイルス感染率[プロウイルスロード ; PVL]25-30%)あるいは CD25 陽性 CD4T 細胞 (PVL;104-110%) を NOG マウス腹腔内に移入したが、何れも腫瘍細胞の増殖を観察できなかった。そこで、同数の細胞を NOG マウス脾臓内に移植したところ、CD25 陽性 CD4T 細胞を移植した場合のみ、移植 4~6 ヶ月で感染細胞の腫瘍性増殖が観察された(3 匹中 3 匹: 3/3, 表 1 および表 2)。したがって、HTLV-1 感染 CD4T 細胞の CD25 陰性から陽性への転化にともない腫瘍増殖性が獲得されたことが強く示唆された。

表1. HTLV-1感染ヒト化マウスT細胞の  
NOGマウス脾臓移植による腫瘍形成

個体 番号	感染 期間	病態	CD25(-)		CD25(+)	
			PVL(%)	腫瘍形成	PVL(%)	腫瘍形成
Y508	15w	リンパ腫	29.5	0/2	103.6	0/3
Y520	18w	白血病	25.3	0/2	109.2	3/3

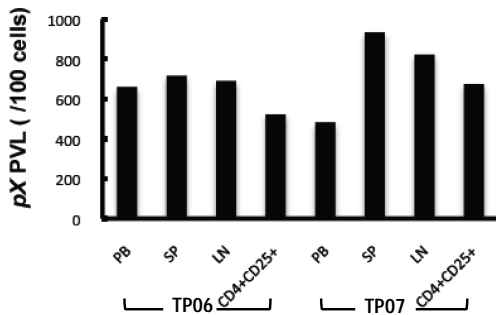
表2. CD25(+)/HTLV-1感  
染T細胞による腫瘍形成

個体 番号	移植 期間	脾臓(mg)
TP06	6w	296
TP07	4w	324
TP08	6w	172

非感染マウス ~50

しかしながら、腫瘍細胞中に移植前(プロウイルスロード PVL;109%)に最大の占有率(20%)を示した感染クローンは検出されず、また感染細胞のPVLが400~900%を示したため(図1)、クローン解析は不可能であった。腫瘍を形成した感染細胞をさらにNOGマウス脾臓内に経代移植を試みたが、腫瘍は形成されなかったことから、多重感染により細胞の造腫瘍性が変化したと考えられた。

図1. 移植腫瘍細胞のプロウイルスロード



また、末梢血では感染細胞数が白血病型の1/10以下に維持されるがリンパ節の肥大が見られるリンパ腫様の病態を示したHTLV-1感染ヒト化マウス脾臓より分離したCD25陽性CD4T細胞(PVL約100%)を脾臓に移植しても腫瘍細胞の増殖は得られなかった(0/2)ことから、CD25の陽性転換に加えて、増殖のニッチ形成に参与する形質の獲得が脾臓中での腫瘍性増殖に参与している可能性が示された。

(2) HTLV-1感染に伴うCD4T細胞における遺伝子発現の変化

HTLV-1感染ヒト化マウスで再現されたATL様病態の発現過程において想定されたTax発現CD25陰性感染CD4T細胞クローンのTax陰性CD25陽性腫瘍増殖性細胞への転換機構を明らかにする目的で、非感染CD4T細胞および感染CD25陰性あるいは陽性CD4T細胞における遺伝子発現の相違をcDNAマイクロアレイにて解析した。その結果、HTLV-1感染によりグランザイムB遺伝子の発現が100倍以上に、CADM-1およびCD70の遺伝子発現が10~20倍近く上昇することが明らかとなり、これまでATL細胞にお

いて報告されている制御性T細胞あるいは活性化T細胞としての形質が、同マウスモデルのATL様細胞で確認された。さらに、これらの発現は全てCD25の発現とともに2倍近く上昇し、腫瘍性増殖との関連が示唆された。

また、近年、腫瘍細胞ゲノムDNAへの点突然変異導入における役割が報告されているシチジンデアミナーゼAPOBEC3Bの遺伝子発現が、HTLV-1感染により、CD25陰性感染細胞で17倍、CD25陽性感染細胞では34倍上昇しており、同遺伝子産物のATL発症過程における宿主遺伝子突然変異への関与が注目された。

一方、T細胞の分化・増殖における調節機能が知られるBATF3、C/EBP、TCF4、WNT5B等の転写因子遺伝子の発現が、CD25の発現と平行して7~8倍上昇したことから、Tax発現の抑制をはじめとする感染細胞の形質転換との関連が示唆された。また、末梢性T細胞リンパ腫細胞に特徴的に発現することが知られるチロシンキナーゼSYKの発現が、CD25発現の陽性転換時に20倍近く上昇していることから、腫瘍増殖性獲得との関連および標的治療の対象として今後の解析が期待される。

表3. HTLV-1感染により発現上昇する細胞遺伝子  
(抜粋) [fold activation]

遺伝子名	遺伝子産物	非感染 CD4	HTLV-1感染		
			CD25 (-)	CD25 (+)	(+)/(-)
GZMB	granzyme B	1	143	284	2
CD86	CD86 molecule	1	20.7	28	1.4
CADM1	cell adhesion molecule 1	1	17.3	47.6	2.8
APOBEC3B	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	1	16.8	34.2	2
CD70	CD70 molecule	1	9	22.9	2.5
IFNG	interferon gamma	1	8.4	11.5	1.4
BATF3	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3	1	9.2	72.2	7.9
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	1	2.1	16.2	7.9
SYK	spleen tyrosine kinase	1	1.1	19.4	17.3
IL2RA	interleukin 2 receptor, alpha	1	4.2	157.9	37.6

3) HTLV-1感染CD4T細胞における宿主遺伝子のゲノムレベルでの変異

HTLV-1感染CD4T細胞における宿主遺伝子変異の有無をマイクロアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)で検討したが、移植に供した造血幹細胞と造腫瘍性を示したCD25陽性感染CD4T細胞間で、T細胞受容体遺伝子領域以外での相違は検出されなかった。また、次世代シーケンサーを用いた発がん遺伝子パネルの変異解析もおこなったが、CD25陰性および陽性の感染CD4T細胞において、いずれも有意な塩基配列上の変異は検出できなかった。これらの結果は、Tax発現CD25陰性からTax陰性CD25陽性への転換をとまなうHTLV-1感染CD4T細胞における造腫瘍性の獲得は、ゲノムレベルでの変異ではなく、エピゲノミックな修飾による可能性を強く示唆している。

(4) HTLV-1 感染ヒト化マウス CD4T 細胞の ex vivo 培養による Tax 発現の再活性化

Tax 陰性 CD25 陽性 CD4T 細胞も ex vivo で培養することにより、Tax 発現 CD25 陰性感染 CD4T 細胞と同様、Tax の発現が再活性化されたが、感染細胞当たりの Tax 発現量は CD25 陰性細胞と比較して有意に低かった。この事実は、CD25 陽性 CD4T 細胞における HTLV-1 プロウイルスの発現抑制がエピゲノミックな修飾に依っている可能性を示唆している。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

藤澤順一 : HTLV-1 感染の動物モデル、細胞、査読無、2014, 26: 12-19

藤澤順一 : ATL マウスモデルの樹立とその新知見、血液内科、査読無、2014, 69: 394-399

Tezuka K, Xun R, Tei M, Ueno T, Tanaka M, Takenouchi N, Fujisawa J-i: An animal model of adult T-cell leukemia: humanized mice with HTLV-1-specific immunity. Blood 査読有り 2014, 123: 346-355

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 K-T, 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 Journal 査読有り 2013, 3: e132(ページなし)

[学会発表](計12件)

田中正和、李成一、荀潤澤、姚錦春、藤澤順一 : Taxペプチドワクチンのヒト化マウス鼻腔投与によるHTLV-1感染防御、第60回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日、パシフィコ横浜(横浜)

Tanaka M, Lee S-il, Xun R, Yao J, Fujisawa J-i : Long peptides vaccine to Tax suppressed the overgrowth of HTLV-1-infected lymphocytes in humanized mouse model. 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日、パシフィコ横浜(横浜)

Fujisawa J-i, Tanaka M, Ueno T, Xun R, Yao J, Lee S-il : Mouse model of ATL. 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日、パシフィコ横浜(横浜)

田中正和、李成一、荀潤澤、姚錦春、藤澤順一 : ヒト化マウスを用いた HTLV-1

感染防御ワクチンの開発、第1回日本HTLV-1学会学術集会、2014年8月23日、東京大学医科学研究所講堂(東京)

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-The、緒方正男、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 2013年12月3日、神戸国際会議場(神戸)

Tezuka K, Ikebe E, Iha H, Ueno T, Xun R, Fujisawa J-i : Inhibition of ATL development by HSP90 inhibitor 17-DMAG in humanized mouse model.(ヒト化マウスモデルにおける HSP90 阻害剤 17-DMAG 投与による ATL 発症抑制) 第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日、パシフィコ横浜(横浜)

Tezuka K, Tei M, Ueno T, Xun R, Iha H, Fujisawa J-i: Inhibition of ATL development in humanized mouse model by AZT/INF treatment. 16th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses, 27 June 2013, Montreal, Canada.

Tezuka K, Tei M, Ueno T, Xun R, Fujisawa J-i: Carrier model of HTLV-1 infection in humanized NOG mice. 16th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses, 27 June 2013, Montreal, Canada.

手塚健太、上野孝治、鄭真美、荀潤澤、竹之内徳博、藤澤順一 : HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いた抗 ATL 治療法の評価、第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月14日、大阪国際会議場(大阪)

手塚健太、鄭真美、上野孝治、荀潤澤、藤澤順一 : Carrier model of HTLV-1 infection in humanized NOG-mouse、第71回日本癌学会学術総会、2012年09月20日、札幌市教育文化会館(札幌)

手塚健太、上野孝治、鄭真美、荀潤澤、田中正和、竹之内徳博、藤澤順一 : IBMI-ヒト化マウスを用いたHTLV-1感染マウスモデル、第1回 ATLシンポジウム、2012年08月25日、東京大学医科学研究所講堂(東京)

藤澤順一：ATL-like phenotype in HTLV-1  
infected humanized mouse model、25th  
International Conference on Antiviral  
Research、2012年04月17日、ロイトン札幌  
(札幌)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/microbiol/>

[http://www.kmu.ac.jp/graduate\\_school/2671t8000008f16.html](http://www.kmu.ac.jp/graduate_school/2671t8000008f16.html)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

藤澤 順一 (FUJISAWA, Jun-ichi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：40181341