

平成30年 8月28日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14388

研究課題名(和文) 早期ATLL発症マウスにおける発症原因遺伝子の探索

研究課題名(英文) Identification of ATLL-associated genes in Rapid ATLL model mouse

研究代表者

齋藤 益満 (Saito, Masumichi)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官

研究者番号：20571045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病・リンパ腫(ATLL)発症マウスを作製し、ATLL発症原因遺伝子の探索を行った結果、HTLV-1点突然変異あるいは5'側欠失によるHBZ遺伝子発現亢進がATLL発症に関連することを明らかにした。さらに5'側欠失をもつHTLV-1におけるHBZ発現亢進は、mir-324-3Pからの発現抑制を回避によることを明らかにした。興味あることに、約40%のATLLにおいてmir-324-3P領域のヘテロ欠失が認められたことから、ATLLにおいてがん抑制遺伝子として機能することが強く示唆された

研究成果の概要(英文)：In ATLL model mouse, we found that point mutations and 5' deletions of HTLV-1 induce HBZ activation. Furthermore, the HBZ activation mechanism on HTLV-1 carrying the deletion was due to disruption of mir-324-3P mediated HBZ repression. Interestingly, we also found that mir-324-3P was deleted in about 40% of ATLL cases. This result strongly suggests that mir-324-3P might function as a tumor suppressor gene in the process of ATLL development

研究分野：総合生物、腫瘍学

キーワード：実験動物モデル

1. 研究開始当初の背景

HTLV-1 感染から長い年月を経て発症する ATLL の原因が、ウイルス遺伝子発現に加え、さまざまな細胞内遺伝子変異の蓄積とそれに伴う遺伝子発現変化であると考えられている (*Matsuoka, M, Retrovirology, 2005*)。そのため、過去数十年間にわたり、われわれを含む多くの研究者が、多種・多様なゲノム解析、遺伝子発現解析技術を駆使し、ATLL 発症原因遺伝子の同定を試みた。その結果、*TCF8*、*BCL11b* や *miR-31* など、多数の遺伝子が発症原因の候補遺伝子として同定された (*Sasaki, H, et al, Blood, 2004, Kurosawa, N, et al, PloS One, 2013, Yamaguchi, M, et al, Cancer Cell, 2012* など)。しかしながら、これら候補遺伝子がどのように ATLL 発症に関与しているかは未だ不明であり (単独あるいはコンビネーション? それとも別の遺伝子が関与??)、ATLL の染色体異常の頻度と複雑さがそれを困難にさせている最大の理由であった (*Saitou, M, et, al, Journal of human genetics, 2001, Itoyama-T, et, al, Blood, 2001* など)。

2. 研究の目的

ATLL 発症メカニズム解明の解決策として、われわれが作製した ATLL 発症ヒト化マウスは極めて有用なツールと考えられる。このマウスでは HTLV-1 感染後わずか 8 週間で ATLL を発症するため、必要最小限の遺伝子変異と発現変化だけが誘導されている可能性が高い。そこでわれわれはヒト化マウス

由来 ATLL の遺伝子発現・変異解析から発症原因遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

ATLL 発症ヒト化マウスあるいは ATLL 患者由来 HTLV-1/EBV 感染 B 細胞株を移植したマウスを作製し、ATLL 細胞における遺伝子発現変化解析と染色体異常解析に必要なサンプルを採取する。

4. 研究成果

(1) 3 種類の ATLL 患者由来

HTLV-1/EBV 感染 B 細胞株をマウスに移植した結果、Tax 発現低下と HBZ 発現亢進が認められた 2 種類の細胞株 (LMY3B と OATL9) のみ腫瘍形成能を示した。Tax 発現低下と HBZ 発現亢進が HTLV-1 点突然変異によって引き起こされることを見出した (図 1)。

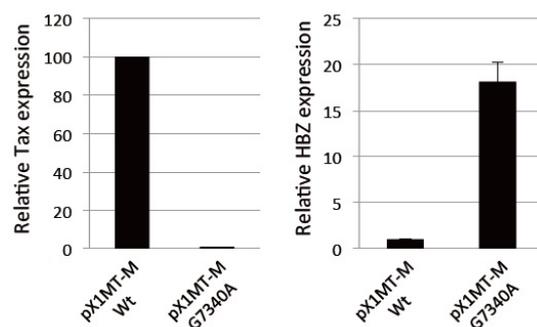


図1 HTLV-1点突然変異によるTax発現低下とHBZ発現亢進

(2) 腫瘍形成能を示した 2 種類の

HTLV-1/EBV 感染 B 細胞株について染色体異常解析を行ったところ、LMY3B では非常に複雑な染色体異常が認められ、OATL9 では B 細胞リンパ腫で認められる典型的な染色体異常が認められた (図 2)。

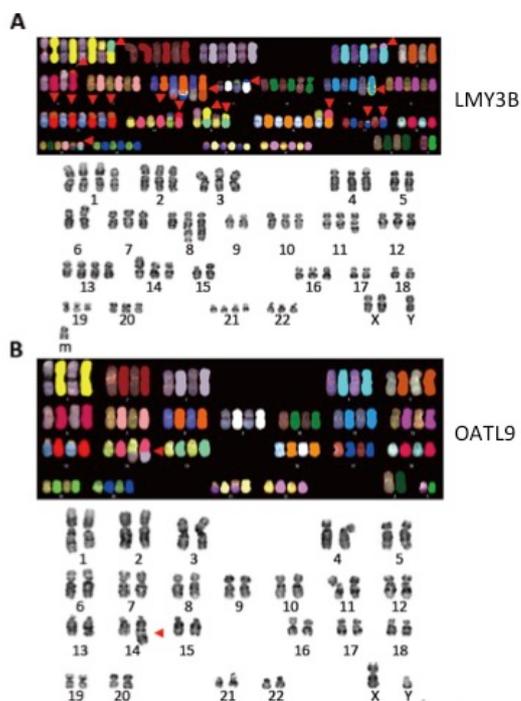


図2 HTLV-1/EBV感染B細胞株における染色体異常

(3) 約50%のATLLで認められる5'側欠失をもつHTLV-1も点突然変異をもつHTLV-1と同様にTax発現低下とHBZ発現亢進を引き起こすことを見出した。これらの結果は、ATLL発症には免疫原性の高いTaxの発現低下による免疫からの逃避と細胞増殖や抗アポトーシス機能をもつHBZの発現亢進が必要であることが明らかとなった(図3)。

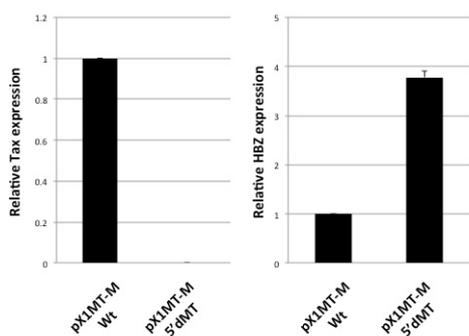


図3 HTLV-1の5'側欠失によるTax発現低下とHBZ発現亢進

(4) 5'側欠失をもつHTLV-1で引き起こさ

れるTax発現低下とHBZ発現亢進はHBZ発現抑制機能を示すmir-324-3Pからの回避であることを明らかにした(図4)。

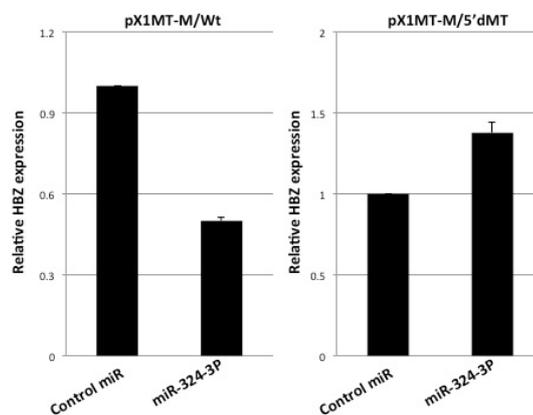


図4 mir-324-3PによるHBZ発現抑制とHTLV-1の5'欠失によるHBZ発現抑制阻害

(5) 約40%のATLLにおいてHBZ発現抑制機能を示すmir-324-3Pのヘテロ欠失が認められたことから、ATLLにおけるmir-324-3Pのがん抑制遺伝子として機能することが強く示唆された(図5)。

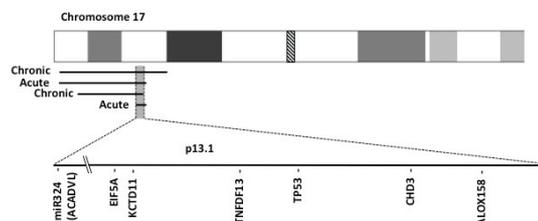


図5 ATLLにおけるmir-324-3Pのヘテロ欠失

(6) ATLL発症ヒト化マウス由来ATLL細胞を免疫不全マウスに再移植した結果、全く増殖が認められなかった。そのためATLL患者ではATLL細胞増殖を促す支持細胞の存在が示唆されたため、HTLV-1/EBV感染B細胞株との同時移植を行った。その結果、ATLL発症ヒト化マウス由来ATLL細胞の増殖が誘導された。実際、得られた組織片を用いた免疫染色よ

り二つの細胞が共局在していることを明らかにした (図 6)。

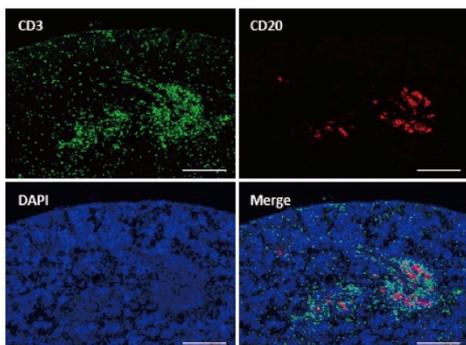


図6 HTLV-1/EBV感染B細胞株によるATLL細胞増殖誘導と脾臓における共局在

<引用文献>

Matsuoka, M, Retrovirology, 2005

Sasaki, H, et al, Blood, 2004

Kurosawa, N, et al, PloS One, 2013

Yamaguchi, M, et al, Cancer Cell, 2012

Saitou, M, et, al, Journal of human genetics, 2001

Itoyama-T, et, al, Blood, 2001

5. 主な発表論文等

<学術論文> (計 2 件)

1. Takuro Fukumoto*, Emi Ikebe*, Masao Ogata, Kazuhiro Kohno, Madoka Kuramitsu, Yusuke Sato, Nichole Fife, Takashi Matsumoto, Takaaki Yahiro, Masanori Ikeda, Shuichi Kusano, Akihiko Okayama, Mitsuo Hori, Naoki Hijiya, Yoshiyuki Tsukamoto, Yuka Hirashita, Masatsugu Moriyama, Kamruddin Ahmed, Hiroo Hasegawa, Akira Nishizono, Masumichi Saito[#], and Hidekatsu Iha[#], Complete Sequences of the HTLV-1 Proviral Genomes from

Newly Established ATL cell-lines in Oita Prefecture, Japan, Genome

Announcements (genomeA00090-18R2, in press), 2017

*equally contribution (first author), [#] equally contribution (corresponding author)

2. Kuramitsu M, Sekizuka T, Yamochi T, Firouzi S, Sato T, Umeki K, Sasaki D,

Hasegawa H, Kubota R, Sobata R,

Matsumoto C, Kaneko N, Momose H,

Araki K, Saito M, Nosaka K, Utsunomiya

A, Koh KR, Ogata M, Uchimaruru K,

Iwanaga M, Sagara Y, Yamano Y,

Okayama A, Miura K, Satake M, Saito M,

Itabashi K, Yamaguchi K, Kuroda M,

Watanabe T, Okuma K, Hamaguchi I.

Proviral Features of Human T Cell

Leukemia Virus Type 1 in Carriers with

Indeterminate Western Blot Analysis

Results. J Clin Microbiol. 2017

Sep;55(9):2838-2849

<学会発表> (計 3 件)

1. 第 4 回日本 HTLV-1 学会、成人 T 細胞白血病・リンパ腫患者における

HTLV-1/EBV 共感染 B 細胞の存在意義、齋藤益満、伊波英克、長谷川寛雄、他 35 名

2. 第 4 回日本 HTLV-1 学会、成人 T 細胞

白血病・リンパ腫における HBZ 活性化-

miR-324-3P による HBZ 発現抑制の崩壊 -、

松橋一彦、齋藤益満、他 19 名

3. 第 6 回研究交流フォーラム、HTLV-1(ヒ

様式 F-19-1

ト T 細胞白血病ウイルス I 型)

感染者を対象とした非ホジキンリンパ腫発症リスク評価・判定法の開発、斎藤益満 (単独)

<図書> (計 0 件)

<産業財産権>

○出願状況 (計 2 件)

名称：非ホジキンリンパ腫発症のリスク判定補助法

発明者：斎藤益満、伊波英克、長谷川寛雄

権利者：国立感染症研究所、大分大学、長崎大学

種類：特許

番号：特願 2016-150300

出願年月日：平成 28 年 7 月 29 日

国内外の別：国内

名称：非ホジキンリンパ腫発症のリスク判定補助法

発明者：斎藤益満、伊波英克、長谷川寛雄

権利者：国立感染症研究所、大分大学、長崎大学

種類：特許

番号：特願 2016-226343

出願年月日：平成 28 年 11 月 21 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

<受賞歴> (計 2 件)

1. TOBIRA 第 6 回研究交流フォーラムにおいて講演し、第 5 回 TOBIRA 研究助成とびら賞、平成 29 年 5 月 12 日

2. 第 4 回日本 HTLV-1 学会において、研究発表者である松橋一彦先生が若手研究者賞 (YIA) を受賞、斎藤益満 (研究代表者)、平成 29 年 8 月 19 日

<その他>

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斎藤 益満 (MASUMICHI, Saito)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官

研究者番号：20571045

(2) 研究分担者

日吉 真照 (MASATERU, Hiyoshi)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官

研究者番号：40448519

(3) 連携研究者

伊波 英克 (HIDEKATSU, Iha)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：50242631

長谷川 寛雄 (HIROO, Hasegawa)

長崎大学・医学部・准教授

研究者番号：0039816