

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12602
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2016
課題番号：15K19020
研究課題名(和文) HTLV-1 感染 T 細胞における TGF-beta の役割

研究課題名(英文) Roles of TGF-beta in HTLV-1-infected T cells

研究代表者

永野 佳子 (Nagano, Yoshiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：10723819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病(Adult T cell Leukemia; ATL)はヒトT細胞白血病ウイルスI型(Human T cell Leukemia Virus-1; HTLV-1)の感染に起因する。ATLではHTLV-1特異的免疫応答が抑制されており、また感染細胞自身が制御性T細胞様と言われる。本研究では免疫抑制性サイトカインTGF-betaおよびIL-10によるHTLV-1感染細胞の制御を調べた。その結果、調べた感染細胞株はTGF-betaに対する応答性は弱いに対し、IL-10によって増殖亢進している可能性のあることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Adult T cell Leukemia (ATL) is caused by infection with Human T cell Leukemia Virus-1 (HTLV-1). HTLV-1-specific immune responses are suppressed in ATL, and infected cells themselves are reported to be regulatory T cell-like. In this study, we investigated the regulation of HTLV-1-infected cells by immune suppressive cytokines, TGF-beta and IL-10. We found that the infected cell lines tested responded to TGF-beta weakly whereas IL-10 may promote proliferation of HTLV-1-infected cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：HTLV-1 ATL TGF-beta IL-10

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (Adult T cell Leukemia; ATL) はヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (Human T cell Leukemia Virus-1; HTLV-1) の感染を原因とし、感染から長い年月を経て感染者の一部に発症する極めて予後不良の腫瘍である。

ATL 患者に見られる HTLV-1 特異的な免疫応答の抑制は、ATL 治療において克服されるべき課題であるが、その機序は十分には明らかにされていない。HTLV-1 感染細胞は制御性 T 細胞 (Treg) 様のフェノタイプを示すことから、感染細胞自身が免疫抑制に働く可能性が考えられる (1)。ATL では感染細胞が異常に増殖するので、感染細胞自身の増殖制御や感染細胞による免疫系への影響は ATL における免疫抑制機構の理解に重要である。

代表的な免疫抑制性サイトカインに Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) および Interleukin-10 (IL-10) がある。これら免疫抑制性サイトカインの関与が予想されるが、ATL におけるその役割は十分解明されていない。

TGF-beta は生体内に広く発現するサイトカインである。リンパ球や上皮細胞の増殖抑制を初め、細胞外マトリックス産生や血管新生、アポトーシス誘導など多様な活性を持つ。このため、TGF-beta シグナルの異常は癌をはじめとする様々な疾患を引き起こすと考えられている。TGF-beta は癌の進行において二面性の作用を示す。初期の癌では細胞増殖抑制やアポトーシス誘導により癌抑制的に働くのに対し、進行した癌では浸潤や転移の促進、免疫抑制などに働き癌を促進する (2)。

TGF-beta による免疫抑制性機構の一つとして、近年では TGF-beta が Treg の末梢での誘導に働くこと、Treg が TGF-beta を産生しエフェクター T 細胞に抑制的に働くことが明らかにされている。また、TGF-beta が腫瘍における細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の機能や増殖を抑制することも示されている (3)。

ATL 患者では白血病細胞が高レベルの TGF-beta を発現するという報告 (4, 5) や HTLV-1 感染細胞が TGF-beta の増殖抑制に抵抗性を示すという報告 (6, 7) はあるものの、その分子機構には議論の余地がある。HTLV-1 タンパク質 Tax や TGF-beta シグナル抑制因子の異常発現、TGF-beta シグナルネガティブフィードバックレギュレーターの高発現などにより TGF-beta シグナルが抑制される一方、HTLV-1 アンチセンス転写産物 HBZ による TGF-beta シグナル増強も知られる (8-11)。また、過剰産生された TGF-beta が免疫系に対しどのように働くのかはよく理解されていない。

IL-10 も、TGF-beta 同様、免疫抑制や抗炎

症作用を持つサイトカインである。ATL 患者の血清中では、無症候キャリアや健常人に比べ高濃度の IL-10 が検出されることが報告されている (12)。しかし、ATL の病態にどのように働いているのかは十分明らかとなっていない。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では、免疫抑制性サイトカインである TGF-beta や IL-10 が ATL における免疫抑制に働くと予想し、HTLV-1 感染細胞の TGF-beta や IL-10 の産生能、これらのサイトカインによる感染細胞自身の制御に加え、他の免疫細胞に与える作用を明らかにすることを目的とした。また、これらサイトカインが HTLV-1 感染細胞や ATL 細胞をどのように制御するか、細胞増殖や生存に焦点を当ててその分子機構を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

所属研究室では、これまでに ATL 患者を含む HTLV-1 感染者の末梢血から IL-2 依存性の HTLV-1 感染 T 細胞株 (以下 ILT) を多数樹立している。

本研究では、ILT を含む種々の HTLV-1 感染 T 細胞株や非感染 T 細胞株を用いて、まず免疫抑制性サイトカインの産生能を定量的 PCR や ELISA などの方法を用いて評価した。

また、ILT や HTLV-1 非感染細胞株の培養液中にリコンビナントのリガンドを添加し、TGF-beta や IL-10 がこれらの細胞株の増殖に与える影響を調べた。同時に、これらのサイトカインの細胞内シグナルの強度について、レポーターアッセイやウエスタンブロット、定量的 PCR などの方法を用いて評価した。

さらに、これらのシグナルの ILT における伝達・調節機序を調べるため、関連分子のノックダウンを行った。

4. 研究成果

当研究室で樹立した HTLV-1 感染者末梢血由来の IL-2 依存性 HTLV-1 感染細胞株 (ILT) や、IL-2 非依存性 HTLV-1 感染細胞株、HTLV-1 非感染細胞株を用いて、TGF-beta や IL-10 の産生量を測定した。その結果、用いた感染細胞株の TGF-beta 産生量は非感染細胞株よりやや多い程度であった。これに対し、IL-10 は高産生する細胞株と極めて産生の低い細胞株を認めた。

また、ATL における免疫抑制因子による HTLV-1 特異的 CD8+T 細胞の増殖制御を調べるための実験系を至適化した。健常人の末梢血から末梢血単核球を単離し、CD8+T 細胞を濃縮したものをリコンビナント TGF-beta および TGF-beta 中和抗体を添加して培養し、中

和抗体の至適濃度を決定した。

感染細胞内における TGF-beta や IL-10 の作用機序を調べるため、これらの細胞内シグナルを検出するレポーター遺伝子を導入した感染、非感染細胞株を作成し、シグナル伝達分子のウエスタンブロットや標的遺伝子の定量的 PCR 等の実験系を作成した。これらを用いた検討の結果、感染細胞株では有意に TGF-beta の応答性が弱いことが分かった。一方、IL-10 は感染細胞の増殖を亢進する可能性が示唆された。

その細胞内メカニズムを調べるため、HTLV-1 感染細胞にてシグナル伝達分子や抑制分子、高発現分子などの発現を siRNA により抑制した。

その結果、ILT において TGF-beta 標的遺伝子の発現を basal レベルで抑制している分子を見いだした。しかしこの抑制は TGF-beta シグナル依存的ではなく、別の機序があると考えられた。また ILT 細胞内の TGF-beta シグナルを抑制しているのは別の分子であると考えられた。

また、IL-10 シグナルの下流因子や関連する分子の発現等を感染細胞で詳細に調べ、IL-10 による HTLV-1 感染細胞の増殖制御を担う分子を明らかにした。

以上より、調べた 2 つの免疫抑制性サイトカインは、感染細胞内でシグナルが弱いことで増殖抑制に抵抗性となる (TGF-beta)、感染細胞の増殖を積極的にサポートする (IL-10) という異なる働き方でがん細胞の増殖を有利にしている可能性が考えられる。感染細胞自身が免疫抑制細胞のように振る舞うとすると、これらのサイトカインによる感染細胞の増殖制御は免疫抑制機序解明の糸口となりうるかも知れない。

<引用文献>

- 1 Chen *et al.*, Int Immunol. 2006;18:269-77
- 2 Roberts and Wakefield, PNAS 2003;100:8621-3
- 3 Thomas and Massagué, Can. Cell 2005;8:369-80
- 4 Kim *et al.*, J Exp Med. 1990;172:121-9
- 5 Tendler *et al.*, J Cell Biochem. 1991;46:302-11
- 6 Höllsberg *et al.*, J Immunol. 1994;153:566-73
- 7 Yoshida *et al.*, Blood 2004;103:2753-60
- 8 Lee *et al.*, JBC. 2002;277:33766-75
- 9 Yoshida *et al.*, Blood. 2004;103:2753-60
- 10 Nakahata *et al.*, Oncogene. 2010;29:4157-69
- 11 Zhao *et al.*, Blood. 2011;118:1865-76
- 12 Inagaki *et al.*, Int J Cancer. 2006;118:3054-61

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

①Leila Sawada, Yoshiko Nagano, Atsuhiko Hasegawa, Sayaka Ito, Tomoo Sato, Yoshihisa Yamano, Yuetsu Tanaka, Takao Masuda, Mari Kannagi
IL-10-mediated Signals as a Switch to Proliferation in HTLV-1-infected T Cells
2017年3月10日(金)
第18回国際ヒトレトロウイルス HTLV 会議
ホテルグランドアーク半蔵門(東京都千代田区)

②SAWADA Leila, NAGANO Yoshiko, HASEGAWA Atsuhiko, ITO Sayaka, SATO Tomoo, YAMANO Yoshihisa, TANAKA Yuetsu, KANNAGI Mari
IL-10-mediated signals promote proliferation of HTLV-1-infected cells derived from HAM/TSP patients through survivin induction via STAT3 activation
2016年12月5日(月)
第45回日本免疫学会学術集会
沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)

③Sawada, Leila, 永野 佳子, 長谷川 温彦, 金井 光, 佐藤 知雄, 山野 嘉久, 田中 勇悦, 神奈木 真理
IL-10 は survivin と IRF 4 の誘導を介して HTLV-1 感染細胞の増殖を促進する
2016年10月7日(金)
第75回日本癌学会学術総会
パシフィコ横浜(横浜市)

④SAWADA Leila, NAGANO Yoshiko, HASEGAWA Atsuhiko, NOGAMI Kai, SATO Tomoo, YAMANO Yoshihisa, TANAKA Yuetsu, KANNAGI Mari
IL-10 regulates growth and virus expression in IL-2-dependent Human T-cell leukemia virus type-1 infected T-cells
第44回日本免疫学会学術集会
2015年11月18日(水)
札幌コンベンションセンター(札幌市)

⑤Leila Sawada, Yoshiko Nagano, Atsuhiko Hasegawa, Hikari Kanai, Kai Nogami, Tomoo Sato, Yoshihisa Yamano, Yuetsu Tanaka, Mari Kannagi
IL-10 induces cell growth and suppresses virus expression in IL-2-dependent Human T-cell leukemia virus type-1 infected T-cells
第2回日本 HTLV-1 学会学術集会
2015年8月23日(日)
東京大学医科学研究所(東京都港区)

()

⑥永野 佳子、Sawada Leila、長谷川 温彦、
野上 開、佐藤 知雄、山野 嘉久、田中 勇悦、
神奈木 真理
HTLV-1 感染細胞の増殖性とウイルス発現に
対する IL-10 の役割
第 74 回日本癌学会学術総会
2015 年 10 月 8 日(木)
名古屋国際会議場 (名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永野 佳子 (Nagano, Yoshiko)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教
研究者番号：10723819

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし