

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19580

研究課題名(和文) HTLV-1プロウイルスのエピジェネティクス解析によるATL発症機序の研究

研究課題名(英文) Epigenetics analysis of HTLV-1 provirus for pathogenesis of ATL

研究代表者

勝屋 弘雄 (Katsuya, Hiroo)

熊本大学・エイズ学研究センター・特任助教

研究者番号：80632041

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(ATL)の細胞株と患者検体の両方においてHTLV-1プロウイルスの3'LTR近傍にヌクレオソームフリー領域(NFR)を認めた。そのNFRにおいてエンハンサー領域に特徴的なヒストン修飾パターンが観察され、機能解析によって同領域に有意なエンハンサー活性があることを見出した。また転写因子のSRFとELK-1が同NFR配列に直接結合し得ることが確認された。以上より、このNFRがエンハンサーとして機能し、3'LTRからアンチセンスにコードされるHBZの転写活性に関与し、HTLV-1持続感染とATLの発症機序に寄与している可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The nucleosome-free region (NFR) was found near the 3'LTR of HTLV-1 provirus by MNase-sequence in both an ATL cell line and PBMCs from the ATL patients. Chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) showed the histone modification pattern of enhancer regions in the NFR, such as H3K4me1, H3K4me2, and H3K27Ac. The enhancer function of the NFR was also confirmed by Luciferase Reporter Assay. Furthermore, the binding of transcriptional factors, SRF and ELK-1, was detectable in the NFR by ChIP-seq and electrophoretic mobility shift assay. These data suggests that the NFR in HTLV-1 provirus plays a role of enhancer for HBZ expression, which is reverse-transcribed from 3'LTR, and might contribute to persistent infection in infected individuals.

研究分野：血液内科

キーワード：HTLV-1 成人T細胞白血病-リンパ腫 エンハンサー

1. 研究開始当初の背景

レトロウイルスであるヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)は母乳によりTリンパ球に感染し、ヒトゲノムに組み込まれた状態で持続感染をおこす。それにより成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)を発症するが、その頻度はHTLV-1キャリアの一生で約5%と低い。ATLは臨床的特徴により急性、リンパ腫型、慢性型、くすぶり型の4つに分類される。近年、我々が行った全国調査での結果では、生存期間中央値はそれぞれ、8か月、11か月、32か月、55か月であり(Katsuya H, et al, Blood, 2015)、いまだに予後不良な疾患である。発症率は高くないが一旦発症するとその予後は極めて不良であるため、発症の予防法や発症予測法につながる発症メカニズムの解明は重要な課題である。

ATLの発症にはウイルス側と宿主側因子の両方が重要である。

(1) 宿主側因子

患者検体における全エクソン解析・全ゲノム解析・トランスクリプトーム解析などを用いた研究では、*PLCG1*、*PRKCB*、*CARD11*などの機能獲得型変異や*CARD11*、*IKZF2*、*TP73*などの遺伝子内欠失などが認められた(Kataoka K, et al, Nat Genet, 2015)。これらの異常は、T細胞の分化・増殖にかかわる経路やがん免疫からの回避に関わる経路に関連しており、ATLの発症に関わる宿主側の因子が明らかにされた。

(2) ウイルス側因子

HTLV-1ウイルス抗原の発現制御機構やウイルスタンパクの機能に関する解析が進められてきた。HTLV-1にコードされるウイルス蛋白の一つであるTaxは、プロウイルスのプロモーターである5'側 long terminal repeat (5'LTR)を介して、ウイルス遺伝子の転写を活性化する因子として同定された。しかし、ATLを発症した症例では半数以上でtax遺伝子が発現していないことが明らかになった。その後の研究で、3'LTRからマイナス鎖にコードされる*HBZ*遺伝子がATL細胞でも恒常的に発現していることが確認され、さらにTリンパ球の増殖を促進することが明らかになった(Satou Y, et al, PNAS, 2006)。Taxは細胞障害性Tリンパ球が認識する主要なウイルス抗原であり、ATL細胞ではその発現が抑制されることにより免疫監視機構からの逃避が可能となり、さらに*HBZ*により感染細胞の増殖を維持していることが考えられる。taxの発現が抑制されている原因として、5'LTRのDNAメチル化、tax遺伝子の変異・欠失、5'LTRの欠失の3つの機構が報告されている。しかし、これらのいずれも検出されない場合も多く、また*HBZ*の発現が恒常的に発現している機序も不明な点が多い。

2. 研究の目的

最近、我々はプローブを用いたウイルスDNA濃縮法と次世代シーケンサーを組み合

わせた高精度なプロウイルスのエピジェネティクス解析法を確立した。これを用いたエピジェネティクスなアプローチにより、HTLV-1持続感染、そしてATL発症に関わるプロウイルスの転写制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) プローブを用いたエンリッチメント法
ヒトゲノム(約30億塩基対)に比してウイルスゲノム(約9千塩基)は極めて微量である。そのため、シーケンサーから得られる情報はその大部分がヒトゲノムの情報となる。プロウイルスのシーケンスリード数を効率よく十分に確保するためには、プローブを用いたHTLV-1プロウイルス領域の断片のみをエンリッチメントする方法を開発した。これを下記の次世代シーケンスの前に実施する。

(2) MNaseシーケンス(MNase-seq)
ヌクレオソームフリー領域(NFR、オープンクロマチン領域)を特定するために、Micrococcal Nucleaseを用いた。その後プローブによるエンリッチメント法を実施し、次世代シーケンサーを行った。検体としてはHTLV-1感染細胞株と症例検体末梢血単核細胞(PBMC)を用いた。

(3) クロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)

ヒストン修飾や転写因子の抗体で免疫沈降し、プローブを用いたウイルスDNAを濃縮した後、次世代シーケンサーを行った。

(4) ルシフェラーゼレポーターアッセイ
ルシフェラーゼレポーターベクターにNFRを挿入したプラスミドを用いて、NFRのエンハンサー活性について検証した。

(5) ゲルシフトアッセイ

HTLV-1プロウイルス配列のビオチン標識プローブと転写因子を強制発現させた細胞のLysateを用いて、転写因子が目的ウイルス配列に直接結合するか確認した。

4. 研究成果

(1) ヌクレオソームフリー領域(NFR)の検出

2つの細胞株と1例のキャリア、2例のATL患者のPBMCを用いて、MNase-seqを行った。その結果、3'LTR近傍に160bpのNFRが存在していることを発見した。これは細胞株にのみならず、患者検体においても同NFRが確認

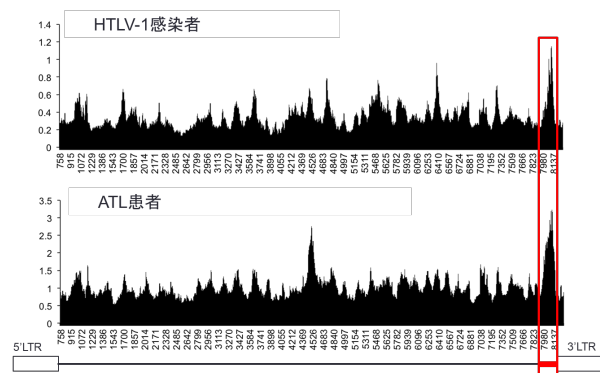


図1 MNaseシーケンスによるヌクレオソームフリー領域

された(図1)。

(2) ヒストン修飾パターンの同定

HTLV-1 プロウイルスのヒストン修飾パターンを同定するために ChIP-seq を行った。その結果、NFR においてエンハンサー領域に特徴的なヒストン修飾マーカ (H3K4me1、H3K4me2、H3K27Ac) が観察された (図2)。

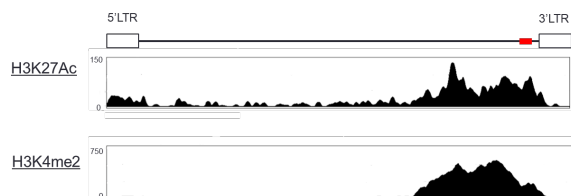


図2 ChIP-seqによるヒストン修飾パターン

(3) エンハンサー機能解析

3' LTR はマイナスにコードされる HBZ のプロモーターであることが知られているため、この NFR はそのエンハンサー領域の可能性があると考えた。そこでルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、この NFR のエンハンサー機能を検討した。HBZ のプロモーターである 3' LTR をプロモーターとして使用したベクターを作製し、NFR を含む領域と含まない領域をベクターに挿入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。NFR を挿入したベクターでは、約 3 倍のエンハンサー活性を認めた。さらに、8 つの細胞株と 4 例の HTLV-1 キャリア、11 例の ATL 患者の PBMC を用いて、同領域の DNA 配列解析を行った。その結果、各細胞株及び症例で塩基配列が高度に保存されていることを確認した。

(4) 転写因子の検索

このヌクレオソームフリー領域における転写因子結合予測をデータベースにおいて検索し、候補となる転写因子 (STAT3、GATA3、MEF2C、CREB、CBP、p300、ATF4、SRF、ELK-1) の ChIP-seq を行った。このうち、SRF と ELK-1 の同領域への局在が確認された (図3)。6 例の ATL 患者の PBMC においても、同様に SRF と ELK-1 の NFR への局在が確認された。

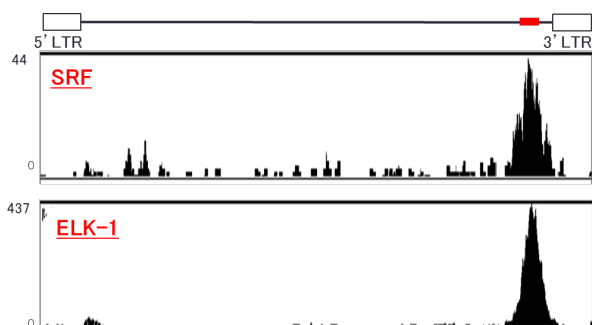


図3 転写因子のChIP-seq

(4) ゲルシフトアッセイによる転写因子結合解析

NFR の配列をプローブとして用いて、SRF と ELK-1 のゲルシフトアッセイを行った。抗

SRF 抗体、抗 ELK-1 抗体を加えることによって、スーパーシフトバンドが観察された。さらに、NFR の SRF と ELK-1 結合領域に変異を導入したコンペティターアッセイでも、これらが同 NFR 配列に直接結合し得ることが確認された。SRF と ELK-1 は結合部位 DNA とともに Ternary complex を形成し、転写を活性化することが知られている。

以上のように、プローブを用いたウイルス DNA 濃縮法と次世代シーケンサーを組み合わせたエピジェネティクス解析法により、HTLV-1 プロウイルスの 3' LTR 近傍に NFR が存在することを見出し、そこにエンハンサーに特徴的なヒストン修飾マークを認めた。機能解析では、その NFR はエンハンサー機能を有しており、2 つの転写因子 SRF と ELK-1 が結合し Ternary complex を形成していることが確認された。この 3' LTR 近傍の NFR がエンハンサーとして機能し、HBZ の恒常的な発現に貢献することで HTLV-1 の持続感染に寄与している可能性が考えられる。

今後、SRF および ELK-1 に対する siRNA を用いて、SRF および ELK-1 をノックダウンした時の HBZ の発現を検討する。

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 6 件)

1. Satou Y, Katsuya H, Fukuda A, et al. Dynamics and mechanisms of clonal expansion of HIV-1-infected cells in a humanized mouse model. *Sci Rep*. 2017; 31;7:6913.
doi: 10.1038/s41598-017-07307-4
2. Katsuya H, Ishitsuka K. Treatment advances and prognosis for patients with adult T-cell leukemia-lymphoma. *J Clin Exp Hematop*. 2017; 27;57:87-97.
doi: 10.3960/jslrt.17008.
3. Katsuya H, Shimokawa M, Ishitsuka K, et al. Prognostic index for chronic- and smoldering-type adult T-cell leukemia-lymphoma. *Blood*. 2017; 6;130: 39-47.
doi: 10.1182/blood-2017-01-757542.
4. Miyazato P, Matsuo M, Katsuya H, Satou Y. Transcriptional and Epigenetic Regulatory Mechanisms Affecting HTLV-1 Provirus. *Viruses*. 2016; 16;8
doi: 10.3390/v8060171.
5. Miyazato P, Katsuya H, Fukuda A, Uchiyama Y, Matsuo M, Tokunaga M, Hino S, Nakao M, Satou Y. Application of targeted enrichment to next-generation sequencing of retroviruses integrated into the host human genome. *Sci Rep*. 2016; 20;6:28324.
doi: 10.1038/srep28324.

6. Satou A, Asano N, Kato S, Katsuya H, et al. FoxP3-positive T cell lymphoma arising in non-HTLV1 carrier: clinicopathological analysis of 11 cases of PTCL-NOS and 2 cases of mycosis fungoides. *Histopathology*. 2016; 68:1099-108. doi: 10.1111/his.12885.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Paola Miyazato, Hiroo Katsuya, Asami Fukuda, Yoshikazu Uchiyama, Misaki Matsuo, Michiyo Tokunaga, Shinjiro Hino, Mitsuyoshi Nakao, Yorifumi Satou, Targeted enrichment: novel approach to analyze the integrated HTLV-1 provirus through next-generation sequencing, 18th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, March 7-10, 2017, Tokyo

2. Hiroo Katsuya, Misaki Kakoki, Takahumi Noguchi, Yuki Inada, Paola Miyazato, Misaki Matsuo, Hiroyuki Hata, Tokio Tani, Yorifumi Satou, Possible Involvement of YB- in the Abnormal Nuclear Shape of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma Cells, The 18th International Conference on Human Retrovirology, March 7-10, 2017, Tokyo.

3. 佐藤賢文、勝屋弘雄、福田麻美、三沢尚子、伊東潤平、内山良一、宮里パオラ、Mohammad S Islam, Ariberto Fassati, Charles RM Bangham、小柳義夫、佐藤圭、次世代シーケンシングによるヒト化マウス HIV-1 感染モデルにおけるウイルス感染細胞クローン動態解析、第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会、5月18-20日、2017、熊本。

4. 宮里パオラ、タン ベンジー ジェックヤン、徳永美知代、松尾美沙希、勝屋弘雄、稲田優紀、佐藤賢文、Integral transcriptomic and epigenetic analyses of HTLV-1 proviruses in infected cell、第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、8月18 - 20日、2017、大阪。

5. Hiroo Katsuya, Lucy B. M. Cook, Aileen G. Rowan, Yorifumi Satou, Graham P. Taylor and Charles R. M. Bangham, Phosphatidylinositol 3-kinase- (PI3k-) is a potential therapeutic target in adult T-cell leukemia-lymphoma, 第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、8月18 - 20日、2017、大阪。

6. 松尾美沙希、宮里パオラ、勝屋弘雄、稲田優紀、徳永雅仁、宇都宮與、野坂生郷、畑裕之、佐藤賢文、HTLV-1 新規エンハンサーの分子メカニズムおよび組み込み部位周辺宿主ゲノムとの機能的相互作用解析、第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、8月18 - 20日、2017、大阪。

7. Misaki Kakoki, Hiroo Katsuya, Takafumi Noguchi, Yuki Inada, Paola Miyazato, Misaki Matsuo, Benjy Tan Jek Yang, Islam

Mohammad Saiful, Hiroyuki Hata, Tokio Tani, Yorifumi Satou, Possible involvement of YB-1 in abnormal nuclear shape of adult T-cell leukemia-lymphoma cells, 第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、8月18 - 20日、2017、大阪。

8. Misaki Kakoki, Hiroo Katsuya, Takafumi Noguchi, Yuki Inada, Paola Miyazato, Misaki Matsuo, Masahito Tokunaga, Atae Utsunomiya, Hiroyuki Hata, Tokio Tani, Yorifumi Satou, Possible involvement of YB-1 in abnormal nuclear shape of adult T-cell leukemia-lymphoma cells, 第 7 9 回日本血液学会学術集会、10月20-22日、2017、東京。

9. 松尾 美沙希、宮里 パオラ、勝屋弘雄、稲田優紀、徳永 雅仁、宇都宮 與、野坂 生郷、畑裕之、佐藤 賢文、第 65 回日本ウイルス学会学術集会、10月24-26、2017、大阪。

10. 稲田 優紀、勝屋 弘雄、宮里 パオラ、Benjy Tan Jek Yong、岩瀬 早織、鹿子木 実咲、松尾 美沙希、Islam Mohammad saiful、徳永 まさとし、佐藤 知雄、畑 裕之、山野 嘉久、宇都宮 與、佐藤 賢文、Highly sensitive viral RNA-seq is a powerful tool to analyze the viral transcripts in HTLV-1 infected individual、第 65 回日本ウイルス学会、10月24 - 26日、2017、大阪。

11. 宮里パオラ、タン ベンジー ジェックヤン、徳永美知代、勝屋弘雄、松尾美沙希、稲田優紀、伊東潤平、佐藤賢文、転写調節メカニズムの解明へ向けた HTLV-1 感染細胞のプロウイストランスクリプトーム解析 (Transcriptomic analysis of HTLV-1 proviruses in infected cells: hints to elucidate the mechanisms of transcriptional regulation)、第 40 回日本分子生物学会年会、12月6-9日、2017、兵庫

12. Yuki Inada, Hiroo Katsuya, Paola Miyazato, Benjy Tan Jek Yang, Saori Iwase, Misaki Kakoki, Misaki Matsuo, Islam Mohammad Saiful, Masahito Tokunaga, Hiroyuki Hata, Yoshihisa Yamano, Atae Utsunomiya, Yorifumi Satou, Highly sensitive viral RNA-seq is a powerful tool to analyze the viral transcripts in HTLV-1-infected individuals, The 59th American Society of Hematology, December 9-12, 2017, Atlanta.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織
(1)研究代表者

勝屋 弘雄 (KATSUYA Hiroo)
熊本大学エイズ学研究センター・特任助教
研究者番号：80632041

(2)連携研究者

佐藤 賢文 (SATOU Yorifumi)
熊本大学エイズ学研究センター・教授
研究者番号：70402807

(3)研究協力者

宮里 パオラ (MIYAZATO Paola)
熊本大学国際先端医学研究機構・特任助教
研究者番号：90573105