

令和 元年 9 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：16KK0206

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を用いた国際間比較研究（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Epigenetics analysis of HTLV-1 provirus through international comparison (Fostering Joint International Research)

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） 11,500,000円

渡航期間： 5ヶ月

研究成果の概要（和文）：HTLV-1に対するDNAプローブによるプロウイルスの濃縮法を併用した次世代シーケンシングを用いて、HTLV-1の3'LTR近傍にエンハンサー領域が存在することを明らかにした。このエンハンサー領域が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た。HTLV-1濃縮法を用いたDNA-seqでは、欠損型プロウイルスの感染クローンは全長型よりも有意にクローン性増殖を起こしていた。ウイルス遺伝子の発現が阻害されることが感染細胞のクローン性増殖に有利に働いている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HTLV-1の新たな転写制御メカニズムを見出した。ウイルス遺伝子であるHBZの恒常的発現の機序の一つである可能性がある。HBZはHTLV-1感染細胞の増殖に関与することが知られており、今後のHTLV-1感染細胞の増殖制御に関与する研究につなげることができる。

研究成果の概要（英文）：We have developed the use of DNA probes for the capture of HTLV-1 fragments from a library prepared for next-generation sequence to efficiently analyze epigenetic features of the provirus. Using this approach, we found the novel enhancer region near the 3' LTR in HTLV-1. This enhancer region might contribute to keep HBZ expression constant, and thus maintain persistent HTLV-1 infection. DNA-capture-seq, furthermore, revealed that infected clones with defective-type provirus exhibited higher degree of clonal abundance than those with full-length type. This finding indicated that defective proviruses, which could not produce viral antigens, should allow the infected cell to escape from the host immune surveillance, resulting in clonal expansion of the infected cells.

研究分野：血液学

キーワード：HTLV-1 成人T細胞白血病・リンパ腫 レトロウイルス 転写制御

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) に感染している一部のキャリアは、HTLV-1 関連脊髄症(HAM)を代表とする慢性進行性炎症性疾患や造血器腫瘍である成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATL)を発症する。HAM の発症メカニズムとしては、HTLV-1 感染 T 細胞が脊髄に浸潤し、ウイルス抗原である Tax を標的としたウイルス特異的免疫応答が生じることで、その炎症反応により脊髄障害がおこる。一方で ATL に関しては、Tax の発現が認められる症例は 40%以下であり、ウイルス抗原の発現抑制による免疫逃避機構が発症の要因の一つと考えられている (Matsuoka M. et al, Nat Rev 2007)。先行研究において CTCF という分子がウイルスゲノムに結合してゲノムの境界領域の役割を果たすことが見出されており、この境界領域の存在により、5'LTR 側からのエピジェネティックな抑制が 3'LTR に及ぶのを防いでいると考えられる (Satou Y. et al, PNAS 2016)。しかし、3'LTR から転写される HBZ を恒常的に活性化状態に保持する積極的なメカニズムが存在するか否かについてはこれまでに報告はない。

Tax の発現抑制機構として、tax 遺伝子の変異、プロモーター領域のメチル化、5'LTR 領域の欠損が知られている。欠損型プロウイルスに関して、従来の方法では増殖した ATL クローンで解析されており、無症候性キャリアや HAM 患者での欠損型ウイルスの存在やその割合は報告されていない。またウイルス抗原の発現抑制による免疫逃避機構が ATL 発症の要因の一つとして考えられているが、欠損型ウイルスが感染細胞クローン性増殖にどの程度関与しているかは明らかでない。

## 2. 研究の目的

我々はプロウイルスのエピジェネティック制御をより詳細に解析するために、プローブを用いた HTLV-1 プロウイルスの濃縮法を併用した次世代シーケンシングを報告した。これを用いて、日本のみならず共同研究施設である英国の非症候性 HTLV-1 キャリアと ATL 患者の末梢血単核球(PBMC)検体におけるクロマチン免疫沈降法と次世代シーケンサー (ChIP-seq) を使ったプロウイルスのエピジェネティクス解析を行う。さらにプロウイルスゲノム領域に結合する未知の分子を探索し、HTLV-1 転写制御メカニズムを明らかにする。また HTLV-1 ウイルス抗原の発現抑制機構の一つとして HTLV-1 プロウイルス構造異常も知られており、このプロウイルス構造と感染細胞のクローン性増殖との関連も明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1) DNA プローブを用いた HTLV-1 プロウイルスのエンリッチメント法

DNA 断片ライブラリーに HTLV-1 に対するビオチン結合プローブを加え、ハイブリダイズさせる。ストレプトアビジンを加え、濃縮した HTLV-1 DNA を用いて次世代シーケンシングを行う。

### 2) HTLV-1 プロウイルスのエンリッチメント法を用いたクロマチン構造とエピジェネティクス解析

- ・クロマチン構造解析のための MNase-seq
- ・ヒストン修飾パターン解析のための ChIP-seq
- ・ウイルスの転写制御に関わる転写因子結合解析のための ChIP-seq

### 3) エンハンサー機能確認のためのルシフェラーゼ解析

### 4) 転写因子結合確認のためのゲルシフトアッセイ

### 5) Molecular clone を用いたエンハンサー機能解析

### 6) HTLV-1 プロウイルス構造と感染クローン解析のためのプロウイルスのエンリッチメント法を用いた DNA-seq(DNA-capture-seq)

## 4. 研究成果

### 1) HTLV-1 プロウイルスの新たなエンハンサー領域

MNase-seq により ATL 細胞株において HTLV-1 プロウイルスの 3'LTR 近傍に顕著なヌクレオソームフリー領域が存在すること明らかになった (Figure 1)。その領域は無症候性キャリアや ATL 患者においても確認された。HBZ のプロモーターを使用したベクターを作製し、ヌクレオソームフリー領域をベクターに挿入したときのルシフェラーゼ活性を測定すると、この領域はエンハンサー機能を有していることが示された。

ChIP-seq では、その周辺領域にはエンハンサー領域周辺で観察される H3K4me1 や H3K4me2、H3K27Ac のヒストン修飾が観察された (Figure 1)。

### 2) エンハンサー領域に結合する転写因子

ヌクレオソームフリー領域にどのような転写因子が結合しているのか調べるために、転写因子結合予測を行った。候補となる転写因子のうち Serum response factor (SRF) と Ets-like transcription factor-1 (Elk-1) という 2 つの転写因子がエンハンサー領域に結合するということが確認された。これらの転写因子は無症候性キャリアや ATL 患者

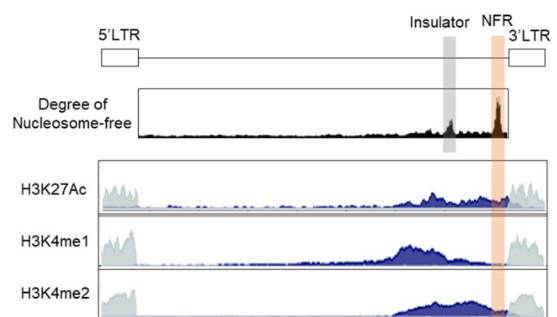


Figure 1. ATL細胞株 (ED) のNFRとヒストン修飾パターン

の検体においても認められた。

SRF の結合部位のみの変異、Elk-1 の結合部位のみの変異、またその両方に変異を入れたベクターを作成しシフェラーゼ解析を再度行った。転写因子結合部位の単独変異では活性は著しくなく、両変異ではエンハンサー活性が低下した。このことから、SRF と Elk-1 は協同してエンハンサー活性に関与していることが示唆された。

ヌクレオソームフリー領域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。

### 3) ヌクレオソームフリー領域の HBZ 発現に対する影響

SRF と ELK-1 の同領域への局在が HBZ の発現にどのように影響するか調べるために、野生型ウイルスおよびエンハンサーに変異を挿入した変異型ウイルスを Jurkat 細胞に感染させた細胞を樹立し、HBZ の発現を qRT-PCR で定量した。その結果、変異型ウイルスにおける HBZ の発現は野生型に比べて顕著に低下することが確認された。

これらの結果から、3' LTR 近傍の NFR がエンハンサーとして機能し、3' LTR の転写の活性化に寄与することが示唆された。これより同エンハンサー領域が 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た。

### 4) DNA-capture-seq によるプロウイルス構造と感染細胞のクローナリティー解析

プロウイルス構造と感染細胞のクローナリティーの関連を明らかにするために、エンリッチメント法を組み合わせた DNA-capture-seq を実施した。シーケンスにより得られたリードのうち、ウイルスとホストのキメラリードから感染細胞の組み込み部位を知ることが可能であり、またキメラリード数からクローナリティーを算出した。各感染クローンのプロウイルス構造は、ウイルスとホストのキメラリードから定義した (Figure 2)。ウイルス配列が 5' と 3' LTR の場合は、全長型、5' 側が LTR より内側の場合は 5' 欠損型、3' 側が LTR より内側の場合は 3' 欠損型とした。

無症候性キャリア 24 例、HAM29 例、ATL45 例の患者検体を用いて DNA-capture-seq を行った。無症候性キャリア全例で 207、HAM で 306、ATL で 215 の感染クローンが検出された。クローナリティー解析では無症候性キャリアや HAM と比較して、ATL において有意に感染細胞のクローン性増殖が確認された。欠損型プロウイルスは、無症候性キャリアや HAM においても約 2 割の感染クローンで観察された。ATL 患者の増殖クローンでは約 4 割で欠損型プロウイルスが確認された。プロウイルス構造とクローン性増殖との関連の解析結果では、欠損型プロウイルスの感染クローンは全長型よりも有意にクローン性増殖を起こしていることが明らかになった。5'LTR 側の欠損はウイルス遺伝子の一つである *tax* 発現が阻害されるため、宿主免疫監視機構から逃れることによりクローン性増殖に有利に働いている可能性が示された。

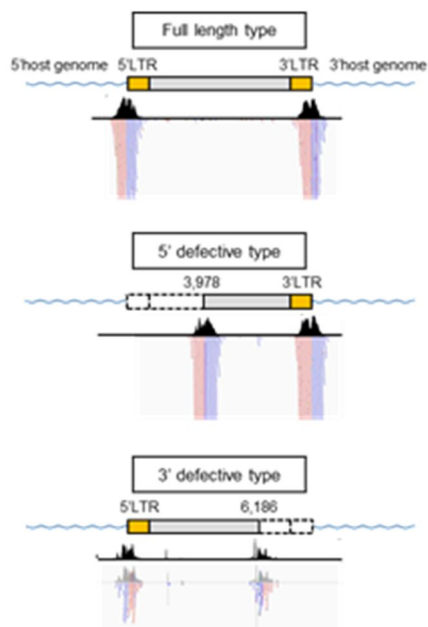


Figure 2. ウイルスとホストのキメラリードから得られるプロウイルス構造

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件、すべて査読あり)

1. [Katsuya H](#), Cook LBM, Rowan AG, Satou Y, Taylor GP, Bangham CRM. Phosphatidylinositol 3-kinase- (PI3K- ) is a potential therapeutic target in adult T-cell leukemia-lymphoma. *Biomark Res.* 2018;18;6:24. doi: 10.1186/s40364-018-0138-7.
2. Satou Y, [Katsuya H](#), Fukuda A, Misawa N, Ito J, Uchiyama Y, Miyazato P, Islam S, Fassati A, Melamed A, Bangham CRM, Koyanagi Y, Sato K. 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
3. [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.
4. [Katsuya H](#), Shimokawa M, Ishitsuka K, Kawai K, Amano M, Utsunomiya A, Hino R, Hanada S, Jo T, Tsukasaki K, Moriuchi Y, Sueoka E, Yoshida S, Suzushima H, Miyahara M, Yamashita K, Eto T, Suzumiya J, Tamura K. Prognostic index for chronic- and smoldering-type adult T-cell leukemia-lymphoma. *Blood.* 2017; 6;130: 39-47.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 勝屋弘雄、イスラム サイフル、宮里パオラ、タンベンジー・ジェック・ヤング、岩瀬早織、松尾美沙希、佐藤知雄、野坂生郷、徳永雅仁、宇都宮與、山岸誠、内丸薫、渡邊俊樹、山野嘉久、佐藤賢文、The nature of HTLV-1 provirus in infected individuals analyzed by HTLV-1 DNA capture sequencing、第 5 回日本 HTLV-1 学会学術集会、2018 年
2. 松尾美沙希、上野孝治、宮里パオラ、勝屋弘雄、徳永雅仁、野坂生郷、宇都宮與)、藤澤順一、佐藤賢文、HTLV-1 内に存在する新規エンハンサー領域の分子メカニズム解析、第 5 回日本 HTLV-1 学会学術集会、2018 年
3. 松尾美沙希、上野孝治、宮里パオラ、勝屋弘雄、徳永雅仁、野坂生郷、宇都宮與)、藤澤順一、佐藤賢文、Molecular Characterization of a New HTLV-1 Enhancer、第 66 回日本ウイルス学会学術集会。2018 年
4. Benjy Tan Jek Yang, Katsuya Hiroo, Miyazato Paola, Uchiyama Yoshikazu, Sakurai Yasushi, Satou Yorifumi, HTLV-1-infected Asymptomatic Carriers versus ATL PBMCs: A Single-Cell Transcriptional Profiling Approach、第 66 回日本ウイルス学会学術集会、2018 年
5. Paola Miyazato, Benjy Tan Jek Yang, Michiyo Tokunaga, Hiroo Katsuya, Misaki Matsuo, Junpei Ito, Yasuhiro Murakawa, Yorifumi, HTLV-1 RNA の転写後調整における ZC3HAV1 タンパク質の役割、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年
6. 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, 2017
7. Hiroo Katsuya, Misaki Kakoki, Takahumi Noguchi, Yuki Inada, Paola Miyazato, Misaki Matsuo, Hiroyuki Hata, Tokio Tani, Yorifumi Satou, Possible Involvement of YB-1 in the Abnormal Nuclear Shape of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma Cells, The 18th International Conference on Human Retrovirology, 2017
8. 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、次世代シーケンズ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、2017
9. 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。
10. 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、2017
11. 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、2017
12. 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、2017
13. 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、2017
14. 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、2017
15. 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、徳永雅仁、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、2017
16. 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립トーム解析、第 40 回日本分子生物学会年会、2017
17. 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, 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

研究協力者氏名：佐藤 賢文

ローマ字氏名：Yorifumi Satou

所属研究機関名：熊本大学

部局名：エイズ学研究センター

職名：教授

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：チャールズ バンガム

ローマ字氏名：Charles Bangham

所属研究機関名：インペリアル大学

部局名：医学部免疫学講座

職名：教授

〔その他の研究協力者〕

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。