

平成22年5月28日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17013046

研究課題名（和文） 成人T細胞白血病発がんの分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of leukemogenesis in ATL

研究代表者

松岡 雅雄 (MATSUOKA MASAO)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：10244138

研究成果の概要（和文）：

成人T細胞白血病（ATL）細胞におけるヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）プロウイルスの解析から Tax は約60%の症例で発現していないことを明らかにした。HTLV-1プロウイルスのナンセンス変異の多くはAPOBEC3Gによって組み込み前に生じていることを明らかにした。また5'側LTRの欠失もプロウイルス組み込み前に発生しているものがあることを見出した。しかしHTLV-1のアンチセンス転写産物であるHTLV-1 bZIP factor（HBZ）ではナンセンス変異は見つかっていない。このことからHBZがATL細胞に必須であることが示唆された。HBZ遺伝子の転写は全てのATL症例で見つかり、また増殖促進効果も認められた。HBZトランスジェニックマウスではTリンパ腫と炎症性疾患の発生が認められ、腫瘍・炎症というHTLV-1によって起こる病態においてHBZが中心的な働きをしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Analyses of HTLV-1 provirus in ATL cases showed that Tax was not expressed in about 60% of cases. Nonsense mutations in HTLV-1 provirus of ATL cases were found in all viral genes except HBZ gene, and generated by APOBEC3G before integration. In addition, deletion of 5' LTR of HTLV-1 provirus in ATL cases also occurred before integration. These findings suggest significance of HBZ gene in ATL cases. The HBZ gene transcript was found in all ATL cases, and had growth-promoting activity. In HBZ transgenic mice, T-cell lymphomas and inflammatory diseases occurred, indicating that HBZ gene plays a central role in the pathogenesis by HTLV-1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	10,700,000	0	10,700,000
2006年度	10,700,000	0	10,700,000
2007年度	10,700,000	0	10,700,000
2008年度	10,700,000	0	10,700,000
2009年度	10,700,000	0	10,700,000
総計	53,500,000	0	53,500,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：ヒトT細胞白血病ウイルス1型、成人T細胞白血病、ウイルス発がん

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1型(human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1)の感染によって惹起される末梢性Tリンパ球の悪性腫瘍である。ATLは約60年という長い潜伏期間の後に約5%のキャリアが発症する。HTLV-1がコードするTax蛋白質は腫瘍化に中心的な役割を担っていると考えられるが、腫瘍となった段階では発現しないものが多い。従って、HTLV-1による発がん機構においてHTLV-1がコードするウイルス遺伝子の果たす役割に関しては不明なままであった。

2. 研究の目的

HTLV-1感染により感染細胞のクローナル増殖が引き起こされるが、これはTaxを始めとするウイルス蛋白質の作用により細胞遺伝情報システムの異常(転写亢進、抑制、シグナル伝達系の変調、DNAメチル化機構の攪乱など)が引き起こされるためであり、この異常が細胞側に genetic, epigenetic な機構に

より固定され、発がんに至るものと考えられる。本研究ではウイルス、宿主ゲノム変化の両面から、ATLの発がん機構を解析し、その総合的理解を行うと共に新たな治療上の標的分子を同定し、この難治性腫瘍の治療法開発を目指す。

3. 研究の方法

- 1) HTLV-1プロウイルスの解析：ATL症例、HTLV-1キャリアからHTLV-1プロウイルスを増幅し塩基配列を決定した。
- 2) HBZトランスジェニックマウスの作成：CD4特異的プロモーター・エンハンサーによりHBZ遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成した。

4. 研究成果

- 1) HTLV-1プロウイルスのDNAメチル化が内部より起こり進展していくことを明らかにした (Taniguchi et al. Retrovirology, 2005)。ATL細胞では5'LTRにおけるメチル化が強い場合が

多く tax 遺伝子発現を抑制する機序と考えられた。全ての ATL 細胞で 3' LTR はメチル化されていなかった。

- 2) HTLV-I プロウイルスのマイナス鎖にコードされる HBZ 遺伝子の新たなプライミングを同定し全ての ATL 細胞で発現していることを明らかにした (Satou et al, PNAS, 2006)。shRNA による HBZ 遺伝子の発現抑制により ATL 細胞の増殖が抑制されたこと、ヒト T 細胞株に HBZ を発現させ増殖促進効果が認められたことなどから HBZ 遺伝子が ATL 細胞の増殖に関与することを明らかにした。DNA chip による解析により HBZ 遺伝子の発現により E2F1 遺伝子の転写活性化が起こることが示された。HBZ 遺伝子はタンパク質としては Tax によるウイルス遺伝子の転写活性化を抑制するが増殖促進には RNA が関与することを示した。HBZ 遺伝子をマウス CD4 特異的プロモーター・エンハンサーによって発現させた所、脾臓で CD4 陽性細胞数の増加を認め生体内でも HBZ 遺伝子が増殖促進効果を有することが明らかとなった。
- 3) 2 型欠損型プロウイルスの解析： 5' 側 LTR を欠失する 2 型欠損型プロウイルスを有する ATL 12 症例を解析し、その組み込み部位の解析を行った。12 例の内、8 例は組み込み前に欠損が起こっており、4 例では、組み込み後に欠損が起こっていることが示された。2 型欠損型プロウイルスの全塩基配列を解析しウイルス遺伝子の構造を解析した結果、構造が保存されている遺伝子は HBZ のみであった。この結果から HBZ 遺伝子が発がん過程で重要な働きをしていることが示唆された。また 2 型欠損型プロウイルスの頻度をキャリアで測定すると約 4%

以下であり、ATL における頻度 (27%) よりも有意に低かったことから 2 型欠損型プロウイルスが発がんの過程で選択されていることが明らかとなった。

- 4) HBZ 遺伝子の細胞増殖作用の解析： HBZ RNA が E2F1 の転写を亢進し増殖促進に作用していることを報告したが、HBZ RNA と結合する宿主タンパク質を Three hybrid 法により単離した。
- 5) HBZ トランスジェニックマウスの解析： CD4 特異的プロモーター・エンハンサーで HBZ を発現させたトランスジェニックマウスでは、経過と共に皮膚炎の頻度が増している。皮膚では CD4 陽性 T リンパ球の浸潤が認められた。また肺胞中隔でも CD4 陽性 T リンパ球の浸潤が確認された。HTLV-I キャリアでも皮膚・肺胞中隔への感染細胞浸潤が報告されており、HBZ がこのような浸潤傾向の原因遺伝子であることが示唆される。発がんへの影響をみるために p53 ノックアウトマウスとの交配実験を行ったが、p53 欠損は HBZ による発がん過程に影響を与えなかった。また tax トランスジェニックマウスを HBZ トランスジェニックマウスと交配したが、やはり T リンパ腫の発生頻度は増加しなかった。
- 6) HBZ と結合する宿主因子の探索： HBZ と結合する宿主タンパク質を yeast two-hybrid 法によりスクリーニングして JunB, ATF3, p300 などを同定した。ATF3 に関しては免疫沈降法により結合を確認すると共に ATL 細胞で高発現していることを見出した。ATF3 のノックダウンにより ATL 細胞の増殖が抑制されることから ATF3 の高発現が増殖に関連していることが推測される。
- 7) ATL 症例、キャリアの全プロウイルス配

列を決定し、gag, pol, env の構造遺伝子だけでなく、tax, rex の調節遺伝子、p12, p13, p30 のアクセサリ遺伝子に多くの non-sense 変異、欠失を見いだしたが、HBZ 遺伝子には全くそのような変異・欠失は認められなかった。tax 遺伝子には 60 例中、10 例でナンセンス変異、欠失等を認めた。ナンセンス変異は同定された 29 変異の内、27 変異がトリプトファンに起こっていた。変異部分の塩基配列をみると TGG が TGA, TAG というストップコドンに変わっていた。この G-to-A 変異はレトロウイルスの逆転写反応の際に APOBEC3G によって起こる変異と一致しており、APOBEC3G の関与が疑われた。全プロウイルス中の塩基配列の解析から G-to-A 変異は TGG, CGG を標的にしており APOBEC3G の標的配列と一致していた。以上の結果から ATL 症例のプロウイルスに認められたナンセンス変異は APOBEC3G によりウイルス感染時に形成されていることが明らかとなった。

- 8) HBZ プロモーターの解析:3' 側 LTR に存在する HBZ 遺伝子のプロモーターを同定し、その転写をコントロールする主な転写因子が Sp1 であることを明らかにした。HBZ には spliced HBZ と unspliced HBZ の 2 種類の転写産物があるが、増殖促進効果を有するのは spliced HBZ のみであることを明らかにした。Spliced HBZ の第一エクソンは Rex responsive element に相当し RNA は強い 2 次構造を取ることが知られている。HBZ の第一エクソンは、その相補鎖であり、やはり強い 2 次構造を取るため、その部分が宿主因子との相互作用をして増殖促進効果を発揮していると予想される。

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 26 件)

1. Zhao T, Yasunaga J-I, Satou Y, Nakao M, Takahashi M, Fujii M, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. **Blood** 113: 2755-2764, 2009. 査読有
2. Yoshida M, Satou Y, Yasunaga J-I, Fujisawa JI, Matsuoka M. Transcriptional control of spliced and unspliced *HTLV-1 bZIP factor* gene. **J Virol** 82: 9359-9368, 2008. 査読有
3. Matsuoka M and Jeang KT. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nat Rev Cancer** 7: 270-280, 2007. 査読有
4. Miyazaki M, Yasunaga J-I, Taniguchi Y, Tamiya S, Nakahata T, and Matsuoka M. Preferential Selection of HTLV-1 Provirus Lacking the 5' LTR during Oncogenesis. **J Virol**, 81: 5714-5723, 2007. 査読有
5. Satou Y, Yasunaga J-I, Yoshida M, Matsuoka M. The HTLV- I bZIP factor gene mRNA supports proliferation of adult T-cell leukemia cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 103: 720-725, 2006. 査読有
6. Tamaki H, Matsuoka M. Donor-derived adult T-cell leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. **N Eng J Med** 354: 1758-1759, 2006. 査読有

7. Miyazato P, Yasunaga J-I, Taniguchi Y, Koyanagi Y, Mitsuya H, and Matsuoka M. De novo Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 infection of human lymphocytes in NOD-SCID, common g-chain knockout mice. **J Virol** 80: 10683-10691, 2006.
査読有

[学会発表] (計 52 件)

1. Matsuoka M. The Roles of HTLV-1 bZIP Factor Gene in Oncogenesis. The 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses. Salvador, Brazil, July 1-4, 2009.
2. Matsuoka M. HTLV-I bZIP Facotr Gene and Oncogenesis by HTLV-I. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.
3. Matsuoka M. Molecular mechanisms of leukemogenesis in HTLV-1 induced adult T-cell leukemia. THE 19TH INTERNATIONAL SYPOSIUM Infection, Cancer and Prevention. Tokyo, Japan, Feb 21-23, 2006.
4. Matsuoka M. Molecular mechanism of leukemogenesis from HTLV-I infection to onset of ATL. The 12th International Conference on Human Retrovirology. Montego Bay, Jamaica. Jun 22-25, 2005.

[図書] (計 1 件)

1. Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I. The Lymphoma, 2nd ed., Edited by

Canellos, G. P., Lister, T. A., Young, B. p464-475, 2006.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 雅雄 (MATSUOKA MASAO)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：10244138

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし