

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19610

研究課題名(和文) ヒトT細胞白血病ウイルス1型の血液幹細胞への感染を介する新たな潜伏感染拡大機構

研究課題名(英文) HTLV-1 infection to hematopoietic stem cells

研究代表者

松岡 雅雄 (Matsuoka, Masao)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：10244138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：HTLV-1感染は主にCD4陽性T細胞に認められるが受容体はGLUT-1であり様々な細胞に感染しうる。同一感染者の異なる細胞系列に同じHTLV-1プロウイルス組み込み部位を検出しHTLV-1が血液幹細胞に感染していることを見出した。異なる細胞系列で検出された同じ組み込み部位のCD4陽性リンパ球における割合を検討したところ16-35%が感染した血液幹細胞に由来すると推測された。約半数のHTLV-1組み込み部位が1年後にも存在することを見出した。HTLV-1感染血液幹細胞が持続的に存在することを示している。この持続性の血液幹細胞への感染がATL発症の基盤となっている可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HTLV-1の血液幹細胞への感染は否定されてきたが、今回の研究はこれを証明し、HTLV-1の感染拡大様式に新たな知見をもたらした。我々の研究を発表した後にATL患者で同じHTLV-1プロウイルス組み込み部位を有しているが異なるT細胞受容体再構成を有する症例が複数報告された。HTLV-1が感染した未熟な細胞が白血病となっていることを示しており、我々の研究はATLの発症機構に新たな展開をもたらす知見である。

研究成果の概要(英文)：HTLV-1 infects mainly CD4+ T cells in vivo. However, its receptor is glucose transporter 1 (GLUT-1). We found the same integration sites in the different hematopoietic cells, indicating that HTLV-1 infects hematopoietic stem cells. The proportion of infected CD4+ T cells with identical integration sites is 16-35%. More than half of infected neutrophils exist over one year. Presence of HTLV-1 infected hematopoietic stem cells is possibly the basis for leukemogenesis by HTLV-1.

研究分野：ウイルス学、血液学

キーワード：HTLV-1 Tax 血液幹細胞 成人T細胞白血病 HTLV-1関連脊髄症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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) は CD4 陽性 T リンパ球の悪性腫瘍である成人 T 細胞白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) を引き起こす。HTLV-1 感染は主に CD4 陽性 T 細胞に認められるが、そのレセプターはグルコーストランスポーター GLUT-1 であり様々な細胞に感染しうる。しかし、HTLV-1 が血液幹細胞に感染することは、これまで否定されてきた。しかし、我々はサル T 細胞白血病ウイルス 1 型感染ニホンザルの様々な臓器・組織での Tax 発現を解析した。その結果、末梢血、骨髄で Tax 発現が高いという結果を得た。Tax は新規感染に必須のウイルスタンパク質であり、Tax 発現があるということは新規感染が起こっている可能性を示している。次世代シーケンサーを始めとする実験方法の飛躍的な発展により、これまで不可能であった解析が可能となっている。次世代シーケンサーを使った HTLV-1 プロウイルスの組み込み部位の網羅的な解析は感染細胞の動態などで多くの成果を上げてきた。

2. 研究の目的

本研究では次世代シーケンサーによる HTLV-1 プロウイルスの解析により感染細胞の由来を明らかにすることを目的とした。本研究は、血液幹細胞への HTLV-1 感染の病態における意義、ATL 発症との関連を明らかにすることを目的としており、HTLV-1 研究に新たな展開をもたらすと考える。

3. 研究の方法

1) HTLV-1 プロウイルス組み込み部位を同定するためにゲノム DNA を超音波処理し、その後、アダプターを連結し PCR で増幅した。増幅産物のコンタミネーションを避けるために各血球系で別のライブラリを作成し、解析を行った。
2) 好中球を患者検体より分離してサイトスピンでスライドグラスに固定して抗 Tax 抗体を用いて染色した。蛍光顕微鏡で陽性細胞を同定した。
3) HAM 患者末梢血単球を樹状細胞へと分化させ、レポーター細胞株 (Jurkat に Tax 反応性プロモーターで Tomato 色素を発現するコントラクトを有する) との共培養により、樹状細胞からの感染伝播を可視化する。HAM 患者の血液より、フィコールにて PBMC を分離し CD14 陽性 T 細胞を iMag positive selection Beads を使用して単離する。その後、5% human serum, 10nM IL-4, 10nM GM-CSF, 10uM インテグラーゼ阻害剤 (RAL) を加えた AIMV medium にて 5 日間培養する。RAL は HTLV-1 新規感染を阻止するために用いている。その後、RAL を除去して JET-WT35 と共培養を行い 48 時間後に蛍光顕微鏡にて観察を行う。JET-WT35 は Tax の発現で蛍光色素 tomato を発現するレポーター遺伝子を有する Jurkat T 細胞である。

4. 研究成果

1) 異なる血液系細胞における HTLV-1 プロウイルス組み込み部位の同定
HTLV-1 キャリア、HAM 患者から CD4 陽性 T リンパ球、CD8 陽性 T リンパ球、B リンパ球、好中球、単球を分離した。ゲノム DNA を抽出後、各々のサンプルから異なるライブラリを作成して、別個に HTLV-1 プロウイルスの組み込み部位を決定した。その結果、異なる血球系で同じ組み込み部位が存在した。この場合、感染細胞のコンタミネーションが最も問題となるが、コンタミネーションの場合は CD4 陽性 T リンパ球が最も多くなる。しかし、各血球系で多く認められる組み込み部位が異なることから、この感染は未熟な血球系細胞で起き分化したことが明らかになった。CD4 陽性 T リンパ球で同定された組み込み部位の中で他の血球系でも認められた割合は 16-35%であった。一方、感染細胞率が少ない B リンパ球では 75-90%と高率に他の血球系と同じ組み込み部位を有していた。CD4 陽性 T リンパ球は末梢での新規感染があるが、他の血球系、特に T リンパ球以外は骨髄での感染が主である可能性がある。

2) 好中球における Tax 発現の解析

DNA レベルでの感染が証明できたが、Tax の発現を好中球で検討するために HAM 患者の末梢血から好中球を分離してサイトスピンでスライドグラスに固定し、抗 Tax 抗体と反応させた。好中球の証明のために同時に抗ミエロペルオキシダーゼ抗体を使って染色した。好中球の中で頻度は低いが Tax, ミエロペルオキシダーゼを同時に発現する細胞を同定した。このことから好中球の感染が確認された。Tax 発現好中球の同定から T リンパ球と異なり好中球では Tax 発現が起こっている可能性が示唆され、その発現は炎症等に関わっていることが予想される。

3) 持続性感染

本研究から血液幹細胞への HTLV-1 感染が示唆されたが、その感染が持続性であるかを検討した。HAM 患者サンプルで各血球系細胞における HTLV-1 プロウイルスの組み込み部位を同定し、同じ患者の 1 年後の好中球で HTLV-1 プロウイルス組み込み部位を同定した。その結果、好中球の HTLV-1 プロウイルス組み込み部位の約半数が 1 年前のサンプルで同定されていた。この結果から HTLV-1 感染血液幹細胞は持続的に存在して各血球系細胞へと分化していることが示された。

4) HTLV-1 感染単球からの新規感染

HTLV-1 感染単球は T リンパ球との接着により新規感染を起こすリザーバーとなっている可能性がある。HAM 患者より分離した単球を樹状細胞へと分化させ、Tax レポーターを有する細胞と反応させたところ、Tax 発現を認め新規感染を起こしうる状態となっていることが示された。

本研究成果を報告してから、アメリカの研究グループが ATL 患者において同じ HTLV-1 プロウイルスの組み込み部位を有するが、異なる T 細胞受容体遺伝子再構成を示すことを報告した。この結果は T 細胞受容体遺伝子再構成が起こる前に HTLV-1 が感染した細胞が ATL となっていることを示している。すなわち我々が本研究で明らかにした血液幹細胞への HTLV-1 感染が ATL 発症の基盤となっている可能性が示されている。本研究は、これまで信じられていた末梢レベルでの HTLV-1 感染だけではなく骨髄での血液幹細胞への感染が HTLV-1 の体内伝播に重要であること明らかにし、HTLV-1 研究に新たな知見をもたらすものとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Yasuma-Mitobe, K., and Matsuoka, M.	4. 巻 9
2. 論文標題 The Roles of Coinhibitory Receptors in Pathogenesis of Human Retroviral Infections.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 2755
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2018.02755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inoue, Y., Endo, S., Matsuno, N., Kikukawa, Y., Shichijo, T., Koga, K., Takai, A., Iwanaga, K., Nishimura, N., Fuji, S., Fukuda, T., Nosaka, K., and Matsuoka, M.	4. 巻 54
2. 論文標題 afety of mogamulizumab for relapsed ATL after allogeneic hematopoietic cell.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplant.	6. 最初と最後の頁 338-342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41409-018-0291-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 6.Song Z, Wu W, Chen M, Cheng W, Yu J, Fang J, Xu L, Yasunaga J-I, Matsuoka M, and Zhao T.	4. 巻 92
2. 論文標題 Long noncoding RNA ANRIL supports proliferation of adult T-cell leukemia cells through cooperation with EZH2.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 not dermined
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00909-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 8.Sato T, Coler-Reilly ALG, Yagishita N, Araya N, Inoue E, Furuta R, Watanabe T, Uchimaru K, Matsuoka M, Matsumoto N, Hasegawa Y, and Yamano Y.	4. 巻 278
2. 論文標題 Mogamulizumab (Anti-CCR4) in HTLV-1-Associated Myelopathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 N Engl J Med	6. 最初と最後の頁 529-538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1056/NEJMoa1704827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mahgoub M, Yasunaga J-I, Iwami S, Nakaoka S, Koizumi Y, Shimura K, and Matsuoka M.	4. 巻 378
2. 論文標題 Sporadic on/off switching of HTLV-1 Tax expression is crucial to maintain the whole population of virus-induced leukemic cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 529-538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1715724115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furuta Rie, Yasunaga Jun-ichirou, Miura Michi, Sugata Kenji, Saito Akatsuki, Akari Hirofumi, Ueno Takaharu, Takenouchi Norihiro, Fujisawa Jun-ichi, Koh Ki-Ryang, Higuchi Yusuke, Mahgoub Mohamed, Shimizu Masakazu, Matsuda Fumihiko, Melamed Anat, Bangham Charles R., Matsuoka Masao	4. 巻 13
2. 論文標題 Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1006722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1006722	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka Azusa, Matsuoka Masao	4. 巻 9
2. 論文標題 HTLV-1 Alters T Cells for Viral Persistence and Transmission	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2018.00461	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Tomoo, Coler-Reilly Ariella L.G., Yagishita Naoko, Araya Natsumi, Inoue Eisuke, Furuta Rie, Watanabe Toshiki, Uchimaru Kaoru, Matsuoka Masao, Matsumoto Naoki, Hasegawa Yasuhiro, Yamano Yoshihisa	4. 巻 378
2. 論文標題 Mogamulizumab (Anti-CCR4) in HTLV-1?Associated Myelopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 New England Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 529 ~ 538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1056/NEJMoa1704827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasunaga Jun-Ichirou, Matsuoka Masao	4. 巻 109
2. 論文標題 Oncogenic spiral by infectious pathogens: Cooperation of multiple factors in cancer development	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 24 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13443	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takiuchi Yoko, Kobayashi Masayuki, Tada Kohei, Iwai Fumie, Sakurada Maki, Hirabayashi Shigeki, Nagata Kayoko, Shirakawa Kotaro, Shindo Keisuke, Yasunaga Jun-ichirou, Murakawa Yasuhiro, Rajapakse Vinodh, Pommier Yves, Matsuoka Masao, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 7
2. 論文標題 HTLV-1 bZIP factor suppresses TDP1 expression through inhibition of NRF-1 in adult T-cell leukemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-12924-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Bangham Charles R. M., Matsuoka Masao	4. 巻 372
2. 論文標題 Human T-cell leukaemia virus type 1: parasitism and pathogenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 20160272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rstb.2016.0272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Matsuoka, M
2. 発表標題 Strategy and pathogenesis of human T-cell leukemia virus type 1.
3. 学会等名 20th Annual International Meeting of the Institute of Human Virology, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡雅雄、安永純一郎
2. 発表標題 ヒトT細胞白血病ウイルス1型の免疫逃避機構と治療戦略
3. 学会等名 第5回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安永純一郎、菅田謙治、三浦未知、明里宏文、松岡雅雄
2. 発表標題 HTLV-1 bZIP factorを抗原としたワクチンの開発と霊長類モデルによる効果の検証
3. 学会等名 第27回抗ウイルス療法学会学術集会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松岡雅雄
2. 発表標題 ヒトT細胞白血病ウイルス1型の病原性発現機構
3. 学会等名 第27回抗ウイルス療法学会学術集会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松岡雅雄
2. 発表標題 ヒトT細胞白血病ウイルス1型感染細胞の特性・体内動態に基づいた治療戦略
3. 学会等名 第4回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安永純一朗
2. 発表標題 HTLV-1がコードする2つのがん遺伝子taxとHTLV-1 bZIP factor の相反する機能と役割
3. 学会等名 第4回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ma, G., Yasunaga, JI., Miura, M., Matsumoto, T., Matsuoka, M.
2. 発表標題 HBZ downregulates miR-455, a tumor suppressor microRNA in ATL
3. 学会等名 第4回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mahgoub, M., Yasunaga, JI., Iwami, S., and Matsuoka, M.
2. 発表標題 Transient expression of HTLV-1 Tax is critical event for persistence of adult T-cell leukemia cells.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasunaga, JI., and Matsuoka, M.
2. 発表標題 HTLV-1 bZIP factor downregulates miR-455, a tumor suppressor microRNA in ATL.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Higuchi, Y., Yasunaga, J., Mitagami, Y., Ohshima, K., and Matsuoka, M.
2. 発表標題 Loss of IL-6 accelerates inflammation and lymphomagenesis in HTLV-1 bZIP factor transgenic mice lymphomagenesis in HTLV-1 bZIP factor transgenic mice.
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	安永 純一郎 (Yasunaga Jun-ichirou) (40362404)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・講師 (14301)	