

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07541

研究課題名(和文)モデル動物と患者検体の比較解析によるHAMの病因・病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) A comparative analysis of HAM/TSP using novel animal model and patients samples for understanding pathogenesis and identifying potential targets for future therapy.

研究代表者

齊藤 峰輝 (Saito, Mineki)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：40398285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：HTLV-1関連脊髄症(HAM)では、末梢血中に多種の自己抗体が高頻度に検出され、自己免疫疾患を含む他の炎症性疾患の合併例も多い。本研究では、先行研究で作製したHAM類似の下肢対麻痺を自然発症する、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)特異的CD4陽性T細胞にHTLV-1の転写制御因子TaxまたはHBZを発現するトランスジェニックマウス(HAMマウス)とHAM患者検体を材料に、病態を反映する宿主細胞因子の探索を行った。その結果、TaxまたはHBZの標的遺伝子を含む複数の宿主細胞因子を同定した。これらの因子は、HAMの病態を反映する新規バイオマーカー・治療標的候補となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HTLV-1はマウスに感染しないため、従来HAMの小動物モデルは存在しなかった。我々が先行研究で独自に開発したHAM病態モデルマウスの病理学的・免疫学的解析結果は、HAM患者の特徴とよく一致しており、本マウスと患者検体との統合的な比較解析を通して新規治療標的や治療薬候補を探索することは、病態解析、発症予防・治療法の開発において極めて重要であり、学術的・社会的意義が大きい。今回の研究で、両者の病態に共通して関与する宿主細胞因子を同定できたことから、今後さらなる解析を通じて、HAMにおける慢性炎症形成の分子機構解明と新規発症予防法・治療法の開発に資する成果が得られる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In HTLV-1 associated myelopathy (HAM), various autoantibodies are frequently detected in peripheral blood, and there are many cases of complications with other inflammatory diseases including autoimmune diseases. In this study, we generated double transgenic (Tg) mice by crossing the myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T-cell receptor-Tg mouse with mice expressing one of the two HTLV-1 viral regulatory genes (i.e., tax or HBZ) under control of a murine CD4-specific promoter/enhancer/silencer (2D2-Tax-Tg or 2D2-HBZ-Tg mouse). These mice spontaneously develop HAM-like lower limb paraplegia (HAM mice). Using both HAM mice and HAM patient specimens, we searched for host cell factors that reflect the pathophysiology. As a result, multiple host cell factors containing tax or HBZ target genes were identified. These factors can be new biomarkers and therapeutic target candidates that reflect the pathophysiology of HAM.

研究分野：ウイルス学、脳神経内科学

キーワード：HTLV-1 HAM/TSP 動物モデル T細胞受容体 自己抗原特異的T細胞

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 (Human T cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は世界ではじめて発見されたヒトレトロウイルスであり、HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: HAM) および成人T細胞白血病 (Adult T cell leukemia: ATL) の原因ウイルスである。HAM はHTLV-1 感染者の一部に発症する、臓器特異的自己免疫疾患に類似した病態を示す慢性炎症性疾患であるが、発症機序の詳細は未だ不明であり、根治的治療法も確立されていない。HAM の病態解明には小動物モデルの樹立が重要であるものの、HTLV-1 はマウスの細胞に感染しないため、これまで適切なモデルが得られていなかった。申請者らは先行研究で、神経抗原であるミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (myelin oligodendrocyte glycoprotein: MOG) 特異的T細胞受容体 (TCR) を発現するトランスジェニック (Tg) マウス (2D2-Tg) とHTLV-1 の転写制御因子であるTaxあるいはHBZをCD4陽性T細胞に発現するTgマウス (Tax-Tg or HBZ-Tg) とを交配してダブルTgマウスを作製し、約30%の個体に7~11週齢でHAM類似の下肢対麻痺を自然発症することを見出した (HAMマウス)。HAMマウスの病理学的・免疫学的解析結果はHAM患者の特徴とよく一致しており、HAMの動物モデルとして有用であると考えられた (未発表)。そこで本研究では、HAMマウスとHAM患者検体を材料に統合的な比較解析を行うことで、HAMの病態を反映する新規バイオマーカー・治療標的候補となりうる宿主細胞因子の探索を試みた。

2. 研究の目的

HAMでは、末梢血中に多種の自己抗体が高頻度に検出され、自己免疫疾患を含む他の炎症性疾患の合併例も多い。本研究では、先行研究で作製した「HAMマウス」と「患者検体」を材料に、疾患群と対照群で詳細な比較解析を行い、HAMの新規診断法・治療法開発のための新規創薬シーズ・バイオマーカーの発見と、将来の臨床応用に向けた研究基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) HAMモデルマウス

中枢神経系で髄鞘を形成するMOGに特異的なT細胞受容体 (TCR) のトランスジェニック (Tg) マウスとHTLV-1の転写制御因子TaxまたはHBZをCD4陽性T細胞に発現するTgマウスを交配させ、神経抗原特異的CD4陽性T細胞にHTLV-1の転写制御因子TaxまたはHBZを発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。

(2) TaxまたはHBZの標的遺伝子群の同定

リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (rtTA) は、ドキシサイクリン (Dox) 存在下でテトラサイクリン応答因子プロモーターに結合して目的遺伝子の発現を活性化する。そこで、rtTAを安定的に発現するヒトCD4陽性T細胞株 (Jurkat Tet-On細胞株) に、テトラサイクリン応答プロモーターの下流に全長のTaxまたはHBZ遺伝子を組み込んだコンストラクトを遺伝子導入した。発現誘導前後の細胞からRNAを抽出し、マイクロアレイによる網羅的スクリーニングを行った。

(3) HTLV-1 関連疾患の病態に関連する Tax および HBZ 標的遺伝子の同定

Tax または HBZ の標的遺伝子群から、炎症性サイトカイン・ケモカイン遺伝子、免疫応答・抑制に関与する遺伝子等、HAM の発症病態への関与が想定される疾患関連候補遺伝子を抽出した。それら標的遺伝子の HTLV-1 感染、非感染ヒト T 細胞株および HAM 患者 Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) における発現を解析してマイクロアレイの結果と対比することで、バイオマーカーとしての意義を検証した。

(4) HAM 特異的自己抗体の同定

各 5 例の HAM 患者、無症候性キャリアー、非感染健常人コントロールの血清から IgG を調整し、混合した。これをヒトプロテオームの約 87%を網羅する CDI Laboratories 社の HuProt™ Human Proteome Microarray v3.1 に反応させ、HAM 患者血清中に検出されるが無症候性キャリアーや非感染正常コントロール血清では検出されない、HAM 特異的自己抗体を網羅的に検索した。

4 . 研究成果

(1) HAM モデルマウス

中枢神経系で髄鞘を形成するミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)特異的な TCR の Tg マウス (2D2-TCR-Tg マウス) と、HTLV-1 の転写制御因子 Tax または HBZ を CD4 陽性 T 細胞に発現する Tg マウスを交配させたダブル Tg マウス (2D2-Tax-Tg または 2D2-HBZ-Tg) を作製した。いずれの系統 (2D2-Tax-Tg および 2D2-HBZ-Tg) においても、約 30%の個体に 7~11 週齢で HAM 類似の下肢対麻痺を自然発症することを見出した。発症マウス脊髄の病理学的解析では、上部胸髄から仙髄にかけて、くも膜下腔から脊髄実質にわたる異型リンパ球のほぼ左右対称性の浸潤を認めた。脾臓内のリンパ球を抗 CD44、CD62L 抗体で免疫染色したところ、発症マウスのリンパ球は未発症マウスと比較して、炎症を惹起する能力が高いと考えられるエフェクター細胞 (CD44^{low}CD62L^{low}) が有意に増加していた。また、PMA およびカルシウムイオノフォアで刺激したところ、発症マウスのリンパ球は未発症マウスと比較して TNF- α の産生能が有意に高い一方で、IL-2 の産生能が有意に低いことが明らかになった。さらに、発症マウスは未発症マウスと比較して、血漿中 CXCL10 濃度の有意な上昇を認めた。HTLV-1 の転写制御因子による神経抗原特異的 T 細胞の持続的な刺激によって、サイトカインカスケードの上位に位置する TNF- α の制御機構の破綻が起こり、持続的かつ過剰な産生が起こることが本マウスの脊髄障害と下肢対麻痺の原因となった可能性がある。本研究で見出した所見はいずれも HAM 患者の特徴と一致しており、本 Tg マウスは HAM の動物モデルとして有用であると考えられた。

(2) Tax または HBZ の標的遺伝子群の同定

テトラサイクリン応答プロモーターの下流に全長の Tax または HBZ 遺伝子を組み込んだコンストラクトを CD4 陽性 T 細胞株である Jurkat Tet-ON 細胞に導入し、Tax または HBZ の発現誘導前後で変動する遺伝子群をマイクロアレイで網羅的に解析した結果、多くの新規標的遺伝子を網羅的に同定した。既報の遺伝子についても、HAM 発症への関与が報告されている CXCL10 を含め、多数の Tax 標的遺伝子の強力な発現誘導を確認できた。一方、HBZ により強力に発現誘導される標的遺伝子として、多種多様な non-coding RNA (ncRNA) を同定した。ncRNA は 20bp から 200bp 程度の小分子 ncRNA と、全長が数百 bp から数十万 bp の長鎖 ncRNA に大別される。代表的な小分子 ncRNA であるマイクロ RNA (miRNA) は、標的となる mRNA の 3' 非翻訳領域と相補的に結合して、その分解促進と翻訳抑制を引き起こすことが知られている。HIV-1 感染においては、

ウイルス RNA の抑制と潜伏化誘導との関連が報告されており、近年 HTLV-1 感染においても、miRNA-31 の発現がすべての ATL 患者で著しく減少しており、これが細胞増殖や細胞死抵抗性に重大な影響を持つ NF- κ B 経路の異常活性化とがん化に關与することが報告されている。よって、本研究により同定した HBZ の標的 ncRNA の中に HAM 発症に關与する疾患關連遺伝子が含まれる可能性は高い。

(3) HTLV-1 關連疾患の病態に關連する Tax および HBZ 標的遺伝子の同定

HBZ により強力に発現誘導される標的遺伝子として、多種多様な non-coding RNA を同定した。その中でも、ヒトゲノム中に 1 万種類以上存在するとされる長鎖非コード RNA (lncRNA) は、様々な RNA 結合タンパク質と結合して多様な生理機能を発揮することが知られているが、その大半は機能が明らかでない。しかしながら近年、一部の lncRNA が転写因子・クロマチン修飾因子の誘導やマイクロ RNA (microRNA: miRNA) との相互作用による遺伝子の転写・翻訳の調節を通じて腫瘍形成に關与することが報告された。そこで、HBZ により発現制御される標的 ncRNA の中から 10 種類の長鎖ノンコーディング RNA (long noncoding RNA: lncRNA) に着目し、HTLV-1 感染者 (HAM 患者、ATL 患者、無症候性キャリアー) と非感染健常人コントロールから調整した cDNA を用いて Real-Time qRT-PCR によるバリデーションを行った。その結果、RNA 塩基の脱メチル化を制御することで、がんの有望な分子標的となることが推測されている ALKBH3 ファミリー遺伝子關連の lncRNA である ALKBH3-AS1 が、Jurkat Tet-On 細胞株では HBZ 依存的に誘導されるものの、急性型 ATL 患者検体においてはその発現が有意に抑制されていることが明らかになった。これは、HTLV-1 が HBZ 非依存的な ALKBH3-AS1 制御機構を有する可能性が示唆しており、ALKBH3-AS1 の発現が複数の経路により制御されていた場合、HTLV-1 の複製過程に ALKBH3-AS1 が何らかの影響を与えている可能性が推察される。一方、HAM 患者および無症候性キャリアーでは非感染健常人コントロールと比較して発現量に有意差を認めなかった。

(4) HAM 特異的自己抗体の同定

ヒトプロテオームの約 87% を網羅する CDI Laboratories 社の HuProt™ Human Proteome Microarray v3.1 を用いて、HAM 患者血清中に検出されるが無症候性キャリアーや非感染正常コントロール血清では検出されない、HAM 特異的自己抗体を網羅的に検索した。その結果、DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) モチーフをもつ ATP 依存性 RNA ヘリカーゼ (DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼ) である DDX42 に対する自己抗体が、HAM 患者血清特異的に検出されることを明らかにした。DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼは真正細菌、古細菌、真核生物のすべてで大きなファミリーを形成し、ATP 加水分解のエネルギーを用いて二本鎖 RNA や RNA タンパク質複合体の解体や形成を行う重要な酵素であり、転写、スプライシング、RNA の核外輸送や分解、翻訳、リボソームの生合成など、さまざまな場面で重要な役割をはたすことから、HAM 病態との関連に興味を持たれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Penova M, Kawaguchi S, Yasunaga JI, Kawaguchi T, Sato T, Takahashi M, Shimizu M, Saito M, Tsukasaki K, Nakagawa M, Takenouchi N, Hara H, Matsuura E, Nozuma S, Takashima H, Izumo S, Watanabe T, Uchimar K, Iwanaga M, Utsunomiya A, Tabara Y, Paul R, Yamano Y, Matsuoka M, Matsuda F.	4. 巻 118
2. 論文標題 Genome wide association study of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in the Japanese population	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2004199118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2004199118	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 Kodama D, Tanaka M, Matsuzaki T, Izumo K, Nakano N, Matsuura E, Saito M, Nagai M, Horiuchi M, Utsunomiya A, Takashima H, Kubota R, Izumo S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Inhibition of ABL1 tyrosine kinase reduces HTLV-1 proviral loads in peripheral blood mononuclear cells from patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0008361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pntd.0008361	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 Naito T, Ushirogawa H, Fukushima T, Tanaka Y, Saito M.	4. 巻 16
2. 論文標題 E0S, an Ikaros family zinc finger transcription factor, interacts with the HTLV-1 oncoprotein Tax and is downregulated in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-1-infected individuals, irrespective of clinical statuses.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology Journal	6. 最初と最後の頁 160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12985-019-1270-1.	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 Saito M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Association between HTLV-1 genotypes and risk of HAM/TSP.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.01101.	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 Tanaka Y, Takahashi Y, Tanaka R, Miyagi T, Saito M, Fukushima T.	4. 巻 109
2. 論文標題 Association of high levels of plasma OX40 with acute adult T-cell leukemia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 319-327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-02580-z.	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 Nomura H, Umekita K, Hashikura Y, Umeki K, Yamamoto I, Aratake Y, Saito M, Hasegawa H, Yanagihara K, Okayama A.	4. 巻 32
2. 論文標題 Diversity of cell phenotypes among MT-2 cell lines affects the growth of U937 cells and cytokine production.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 185-192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-018-00231-3.	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 Naito T, Yasunaga J, Mitobe Y, Sejima H, Ushirogawa H, Tanaka Y, Nakamura T, Fujii M, Matsuoka M, Saito M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Distinct gene expression signatures induced by viral transactivators of different HTLV-1 subgroups that confer a different risk of HAM/TSP.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Retrovirology	6. 最初と最後の頁 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12977-018-0454-x.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齊藤峰輝, 後川 潤, 内藤忠相
2. 発表標題 HTLV-1サブグループによるHAM感受性の違い
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬島寛恵, 内藤忠相, 齊藤峰輝
2. 発表標題 免疫老化を制御するMenin-Bach2経路にHTLV-1が及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第5回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学微生物学教室ホームページ http://www.kawasaki-m.ac.jp/microbiology/

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------