

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07573

研究課題名(和文) HTLV-1ウイルスによる感染細胞内外の微小環境支配と感染細胞運命への影響

研究課題名(英文) Influences of the HTLV-1 viral activities in the determination of the infected cell-fate via hijacking the micro-environment of infected cells

研究代表者

中野 和民 (Kazumi, Nakano)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：60549591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：HTLV-1はヒトT細胞に感染し数十年を経てATLを発症するoncovirusである。しかしATL発症率はキャリアの5%程度で、多くの感染細胞はdisease-freeな潜伏感染細胞を数十年に渡って維持する。我々はこのような感染細胞の構築のメカニズム解明を目指した。特にウイルスタンパク質の中で最も未知な領域の多いRexの役割に注目した。その結果RexはウイルスmRNA輸送機能以外に、様々なタンパク質との相互作用を介して遺伝子発現制御、免疫応答、シグナル経路などに影響を与えていること、Rex、Tax、Hbzなどのウイルスタンパク質の相互作用によりHTLV-1感染細胞が形作られることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATLは感染細胞の腫瘍化により発症する。しかしほとんどのキャリア体内でHTLV-1感染細胞はdisease-freeな潜伏感染状態を維持する。よってATLは本来のウイルスのプログラムを逸脱した状態と言える。本研究ではHTLV-1感染実験系やRex、Tax、Hbzの単独または共発現系を駆使し、現実的なHTLV-1感染の場での解析を目指した。その結果1ウイルスタンパク質群の働きによる感染細胞の構築メカニズムの一端が明らかにした。このようにHTLV-1の本来のdisease-freeな潜伏感染細胞構築メカニズムを解明することにより、感染細胞の腫瘍化(ATL発症)メカニズムの理解が深まると期待される。

研究成果の概要(英文)：HTLV-1 is an oncovirus that infects human T cells and causes ATL after several decades. However, only about 5% of carriers develop ATL, and many infected cells remain disease-free latently infected cells for several decades. We aimed to elucidate the mechanism of the establishment of such infected cells. In particular, we focused on the role of Rex, which is one of the most unknown viral proteins. We found that Rex affects gene expression regulation, immune responses, and signaling pathways through interactions with various proteins in addition to its function in viral mRNA transport, and that HTLV-1-infected cells are formed through the interaction of Rex, Tax, Hbz, and other viral proteins.

研究分野：ウイルス腫瘍学

キーワード：HTLV-1 Rex Tax Hbz 潜伏感染細胞 ウイルス発がん 感染細胞微小環境 T細胞

1. 研究開始当初の背景

Human T-cell Leukemia Virus Type-I (以下 HTLV-1) は極めて悪性度の高い末梢血 T 細胞腫瘍 Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (以下 ATL) を引き起こす onco-Retrovirus である。世界的に HTLV-1 流行地域の一つである我が国では、2010 年以降 HTLV-1 感染者対策や ATL 治療法開発の重要性が改めて再認識され、特に 2016 年に母子感染のみならず水平性感染の割合が予想以上に多いことが報告されて以来 (Satake *et al.*, 2016, Lancet, 16: 1246-1254.)、HTLV-1 の感染機構や病原性発現機構が改めて注目され始めた。将来的に ATL を発症する感染は主に乳幼児体内で起こり、感染細胞の腫瘍化は 50 ~ 60 年の時間をかけて起こるため、HTLV-1 感染の実態や一部の感染細胞のみが腫瘍化するメカニズムを解明することが難しい。我々は、HTLV-1 感染細胞の多くはキャリアの一生にわたって無害な潜伏感染状態を維持することに注目し、初期の HTLV-1 感染細胞で、ウイルス複製に有利な環境整備と、その後の安定した潜伏感染維持を可能にする準備が行われていると予想している。感染細胞の腫瘍化は、HTLV-1 本来のプログラムを逸脱した状態と考えることができる。そのため、HTLV-1 感染時に Tax、Rex、Hbz などのウイルス機能タンパク質がどのように感染細胞に作用し、感染細胞内外の環境を整えているのかを明らかにすることが、腫瘍化を含めた感染細胞の運命を決める要因を明らかにするために必須である。我々の研究室では、腫瘍化感染細胞 (ATL 細胞) 内の様々な分子異常に関するデータを蓄積している。しかし、感染初期の細胞で何が起きているのかについては不明な部分が多く、ATL 細胞内の異常の根源を探索するのが難しい。特に、*in vitro* での HTLV-1 感染の再現や、複数のウイルスタンパク質どうしの相互作用を解析した研究の不足により、HTLV-1 感染直後から潜伏に移行するまでに T 細胞内で何が起きているかは、分かっていない点が多い。

2. 研究の目的

HTLV-1 感染細胞は本来 disease-free な潜伏状態を安定して維持する性質をもっており、感染細胞の腫瘍化(ATL の発症)は、HTLV-1 にとっての異常事態でもあると考えられる。我々は、異常事態が起こるメカニズムを解明するためには、まず本来の HTLV-1 感染細胞がどのように形成されるかを明らかにする必要があると考えた。そこで本研究では、「HTLV-1 は感染初期に感染細胞内外の微小環境を整備し、そのウイルス活動が感染細胞の運命に関係する」のではないかとという仮説のもとに、未だ多くの領域が明らかになっていない、「感染初期のウイルスタンパク質群によるウイルス複製と潜伏の制御」を明らかにすることを目的とした。特に研究の余地が最も広く残されている HTLV-1 Rex の新規機能解明を中心に研究を行った。Rex の主要な機能は、HTLV-1 mRNA の 3'UTR に存在する RxRE (Rex Responsive Element) に特異的に結合し、不完全スプライス型 (*Env* mRNA) と非スプライス型 (*Gag/Pro/Pol* mRNA) ウイルス mRNA を核外へ輸送することである。しかし転写と同時に起こるスプライシングを Rex がどのように回避し、非スプライス型 mRNA を維持したまま核外輸送しているのか不明である。また、以前我々は、細胞質において Rex が NMD を抑制することにより、これらのウイルス mRNA の安定化を図っていることを報告したが、その分子メカニズムについては明らかになっていない。Rex はウイルス mRNA の核外輸送効率を介して、ウイルス複製効率や潜伏への移行を制御していると考えられている。Rex がヒト T 細胞の中でこのような機能を果たすためには、まだ知られていないメカニズムがあると予想され、このメカニズムを解明することが、HTLV-1 感染細胞で起こる事象の広い部分を明

らかにすると期待される。また本研究では、Rex、Tax、Hbz などのウイルス機能タンパク質相互作用に注目し、HTLV-1 感染細胞構築とウイルスタンパク質の協調的な働きを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) Rex の新規機能的側面の解析

本研究期間では、Rex を過剰発現させた CEM 細胞 (ヒト ALL 由来 T 細胞株) においてエクソン・マイクロアレイ解析を行い、Rex が宿主細胞の mRNA スプライシング・パターンに与える影響を明らかにした。同様に Rex 過剰発現 CEM 細胞で行った遺伝子発現マイクロアレイ解析 (transcriptome) と、293FT 細胞 (ヒト胎児腎臓由来細胞株) で行った Rex と相互作用する細胞内タンパク質解析 (interactome) の結果と合わせて統合解析し、Rex がヒト細胞内でどのように作用し影響を及ぼしているか網羅的に解析した。また、Rex の様々な変異体と NMD 抑制活性の関係を解析し、NMD 抑制に重要な Rex のドメインを同定するとともに、Rex と NMD 複合体タンパク質群との相互作用を詳細に解析し、Rex による NMD 抑制メカニズムの一端を明らかにした。

(2) Rex, Tax, Hbz の相互作用と HTLV-1 感染細胞の構築

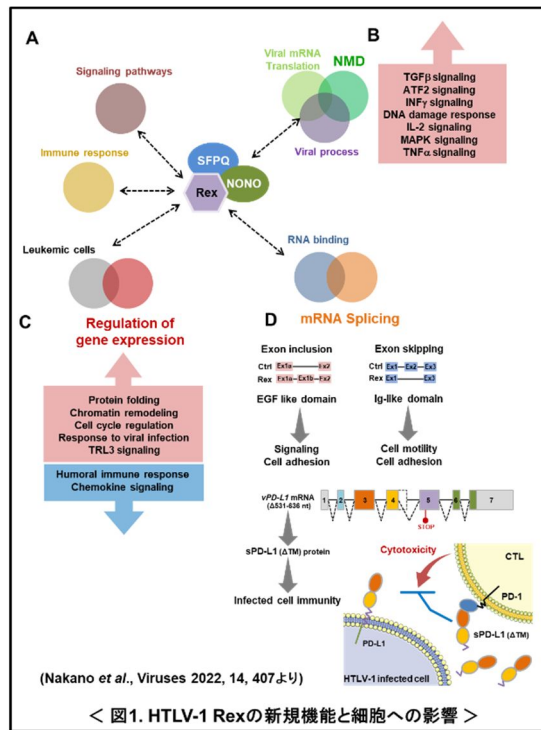
292FT 細胞に HTLV-1 感染クローン (pX1-MT-M) を導入して作成した HTLV-1 ウイルス粒子を LTR-EGFP 導入 CEM 細胞に高効率に cell-free 感染させる系を確立し、EGFP(+) 細胞を分取して HTLV-1 感染 CEM 細胞を得た。また CEM 細胞にレトロウイルス発現系とレンチウイルス発現系を組み合わせて、Rex、Tax、Hbz を単独または共発現させた細胞を樹立した。以上の HTLV-1 感染 CEM 細胞およびウイルスタンパク質発現 CEM 細胞において遺伝子発現マイクロアレイ解析を行った。これらの結果を統合比較解析し、Rex、Tax、Hbz の相互作用により、どのように HTLV-1 感染細胞内の環境に近づいていくか検討した。

4. 研究成果

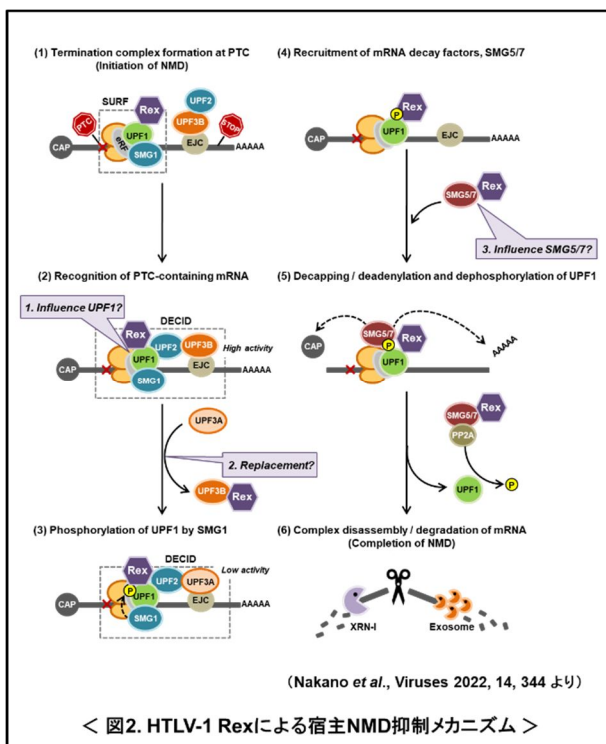
(1) Rex の新規機能的側面の解析

Rex と相互作用するヒト細胞 (293FT) 内タンパク質を同定した結果、Rex が遺伝子発現から翻訳までの細胞内経路に関わる多くタンパク質と相互作用し、影響を与えていることが分かった (図 1A)。特に Rex は多くのリボソームタンパク質と相互作用しており、タンパク質翻訳の場に介入している可能性が示された。また Rex は、immune response や各種 signaling pathway に関与するタンパク質群と相互作用し、これらの細胞内経路に影響を与えている可能性が示唆された (図 1A)。Rex は NMD を抑制し、ウイルスゲノム RNA の安定化を図っている (Nakano *et al.*, 2013, *Microbes Infect.* 15: 491-505.)。Rex 発現 CEM 細胞では、Rex による NMD 抑制により、本来 NMD 標的となるべき mRNA (TGF β , ATF2, INF γ , DNA damage response, IL-2, MAPK, TNF α などの signaling 経路に関わる) の細胞内濃度が有意上昇しており、これらの経路の活性に影響を与えている可能性が示された (図 1B)。次に Rex 過剰発現 CEM 細胞の遺伝子発現解析により、遺伝子発現経路、細胞周期制御、TRL3 経路を含むウイルス感染応答に関わる遺伝子発現が有意に上昇しており、液性免疫応答やケモカイン・シグナル経路に関わる遺伝子発現が減少していた (図 1C)。また、Rex 発現 CEM 細胞での Exon microarray の結果、多くの mRNA スプライシング・パ

ターンも変化しており、特に EGF like domain をコードする mRNA において exon inclusion が蓄積し、Ig-like domain を持つ mRNA において exon skipping が蓄積していた(図 1D)。これらの splice variants からは本来とは異なる機能・活性を持つ変異体タンパク質が翻訳され、各種シグナル経路や細胞接着、細胞運動能などに影響する可能性が示唆された。例えば Rex 発現 CEM 細胞では、エクソン 4 の一部を欠損した *vPD-L1* mRNA が過剰発現していた。この *vPD-L1* mRNA は細胞内ドメインを持たない分泌型 PD-L1 変異体(sPD-L1)をコードする。sPD-L1 は cell-to-cell contact を介さず CTL 上の PD-1 と結合するため、Rex を発現する感染細胞周辺の広い範囲で CTL 活性が抑制されている可能性がある。このように、Rex はウイルス mRNA の核外輸送のみならず、転写から翻訳までの宿主細胞内の遺伝子発現制御の各ステップに関わり、多くの細胞内経路の活性に影響を与えている新しい側面が見えてきた。以上の結果は、Viruses (Nakano *et al.*, 2022, 14, 407.) に報告した。



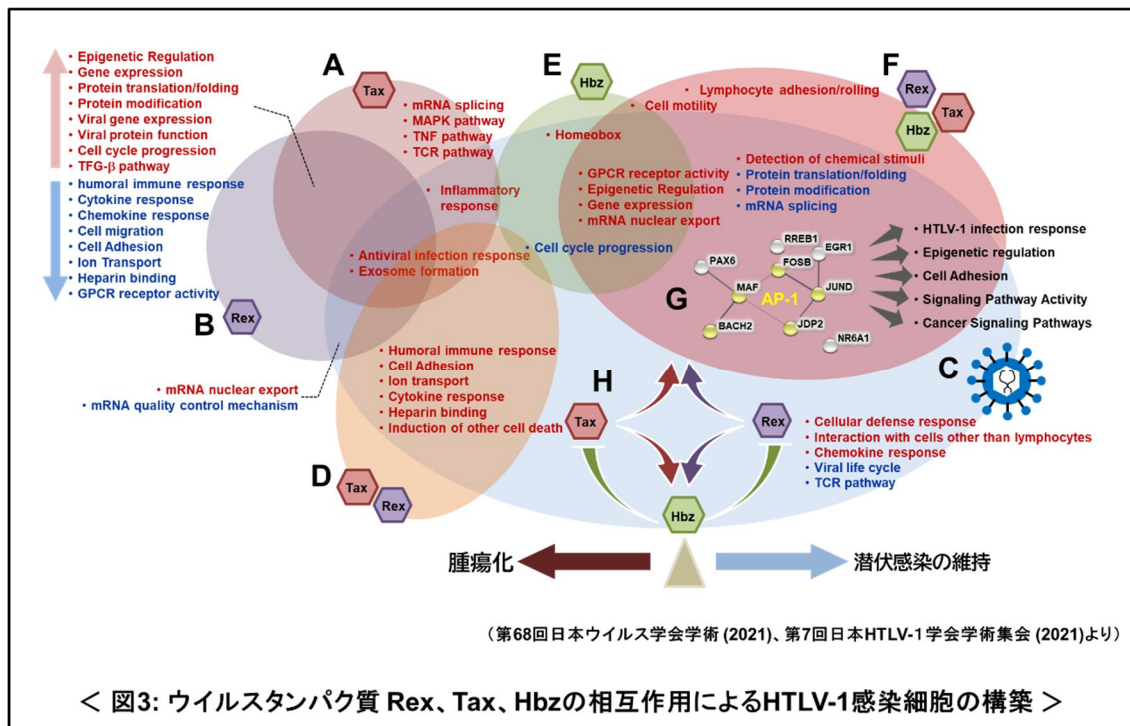
本研究ではさらに Rex の分子生物学的解析により、Rex の N 末の ARM 領域とこれまで機能未知だった X 領域が NMD 抑制機能において重要な働きをすることを見出した。また、Rex は NMD の開始に必須の UPF1、UPF1 の脱リン酸化と NMD の完了に必須な SMG5 および SMG7 とも相互作用しており、NMD の開始から終了まで NMD 複合体に介入して NMD 活性に影響を与えている可能性が示唆された(図 2)。特に Rex は、NMD 複合体内の UPF3B を、より活性の低い isoform である UPF3A と入れ替え、NMD 活性自体を抑制していることを示した(図 2 Step-2)。以上の結果は、Viruses (Nakano *et al.*, 2022, 14, 344.)に報告した。



(2) Rex, Tax, Hbz の相互作用と HTLV-1 感染細胞の構築

Tax または Rex 単独発現 CEM 細胞では、遺伝子発現や細胞周期進行が活性化され、Hbz 単独発現細胞では抑制されていた(図 3A, B, E)。HTLV-1 を人工的に感染させた CEM 細胞 (HTLV-1 感染細胞) では、遺伝子発現制御、mRNA のスプライシング・輸送・NMD、Cap 依存的タンパク質翻訳とプロセッシングなどの経路が抑制され、炎症応答、サイトカイン活性、GPCR 経路、非リンパ球細胞との相互作用など、感染細胞外の微小環境や他の免疫細胞への応答が活性化している傾向が見られた(図 3C)。次に Tax/Rex 共発現細胞では、個別

に発現させた細胞よりも、より HTLV-1 感染細胞に近い遺伝子発現プロファイルが見られるようになり (図 3D)、Tax+Rex+Hbz 共発現細胞では、全体として遺伝子転写・翻訳・タンパク質修飾が抑制され、細胞遊走・接着、感染防御機構など、GPCR を介したシグナル伝達が活性化しており、より HTLV-1 感染細胞に近い特徴を示した (図 3F)。また、Tax、Rex、Hbz はいずれも AP-1 ファミリー転写因子の発現量を調整し、AP-1 経路の活性制御を介して HTLV-1 感染細胞で起こる多くの遺伝子発現変動に関わっていることが示された (図 3G)。以上の結果から、Tax、Rex、Hbz は共存することで、単独とは全く異なる細胞内変化を生じ、HTLV-1 感染細胞の構築に向かって作用することが分かった。つまり、HTLV-1 感染細胞の構築には、個々のウイルスタンパク質機能では不十分で、互いの協調・制御により、それぞれが正しく機能することで、本来の HTLV-1 感染細胞を形作っていると考えられる。我々は、このようなウイルスタンパク質間のパワーバランスが感染細胞形質に影響し、将来的な感染細胞の運命に深く関わっていると予想し (図 3H)、引き続き複数のウイルスタンパク質が共存する現実的な場での研究を進めている。以上の結果は、第 68 回日本ウイルス学会学術集会(2021 年 11 月)と、第 7 回日本 HTLV-1 学会学術集会(2021 年 11 月)において発表した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakano K., Chihara Y., Kobayashi S., Iwanaga M., Utsunomiya A., Watanabe T., and Uchimaru K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Overexpression of aberrant Wnt5a and its effect on acquisition of malignant phenotypes in adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83613-2	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 Kazumi Nakano(corresponding author), Koichi Yokoyama, Shuichi Shin, Koki Uchida, Kazuki Tsuji, Marie Tanaka, Kaoru Uchimaru, and Toshiki Watanabe	4. 巻 14
2. 論文標題 Exploring New Functional Aspects of HTLV-1 RNA-Binding Protein Rex: How Does Rex Control Viral Replication?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 article# 407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v14020407	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 Kazumi Nakano (corresponding author), Nobuaki Karasawa, Masaaki Hashizume, Yuetsu Tanaka, Takeo Ohsugi, Kaoru Uchimaru, and Toshiki Watanabe	4. 巻 14
2. 論文標題 Elucidation of the Mechanism of Host NMD Suppression by HTLV-1 Rex: Dissection of Rex to Identify the NMD Inhibitory Domain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 article# 344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v14020344	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Marie Tanaka, Koki Uchida, Toshiki Watanabe, Kaoru Uchimaru, and Kazumi Nakano
2. 発表標題 Exploring the biological impact of HTLV-1 Rex on dysregulation of the host T-cell splicing machinery
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiro Nasu, Aki Tanabe, Toshiki Watanabe, Kaoru Uchimaru, and Kazumi Nakano
2. 発表標題 Examination of effects and the mode-of-action of a new drug candidate, Darinaparsin, on adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野 和民、宇都宮 與、渡邊 俊樹、内丸 薫
2. 発表標題 HTLV-1感染および腫瘍化と関連するエクソソーム表面抗原マーカー同定の試み
3. 学会等名 第6回 日本HTLV-1学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田 弘毅、渡邊 俊樹、内丸 薫、中野 和民
2. 発表標題 HTLV-1 Rexの宿主スプライシング機構制御における新規機能の探索
3. 学会等名 第6回 日本HTLV-1学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野 和民、田中 稀瑛、内田 弘毅、渡邊 俊樹、内丸 薫
2. 発表標題 HTLV-1機能タンパク質群のインタラクティブな働きとHTLV-1感染の成立
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野 和民、田中 稀瑛、内田 弘毅、渡邊 俊樹、内丸 薫
2. 発表標題 HTLV-1感染の場におけるウイルスタンパク質の相互制御機構と相乗的機能の解析
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗CADM1抗体	発明者 中野和民、高橋良明、田部亜季、渡邊俊樹、津本浩平	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-080133	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

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