

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07512

研究課題名(和文) HTLV-1持続感染における腫瘍と炎症をわける免疫環境因子

研究課題名(英文) Host innate immune mechanisms separating inflammatory or lymphoproliferative diseases in HTLV-1 infection

研究代表者

神奈木 真理 (KANNAGI, Mari)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：80202034

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)：ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-1)は成人T細胞白血病(ATL)とHTLV-1関連脊髄症(HAM)を起こす。同じウイルスが腫瘍と炎症を主徴とする異なる疾患をおこす機序には宿主の要因が関与すると考えられる。以前の我々の研究からIL-10-STAT3経路がその候補として挙げられた。本研究ではATLとHAMを分ける機序の解明を目的として、IL-10-STAT3経路の調節因子の検討を行なった。プローブとして用いた薬剤のうち、ATLの治療薬であるLenalidomideがHTLV-1感染細胞のSTAT3経路を抑制した。さらに、これにヒストンのメチル化因子であるEZH2の減少が伴うことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Lenalidomideは再発・難治ATLの治療薬としてすでに承認されているがその機序には不明点が多い。ATLに一定の効果を示すLenalidomideがSTAT3経路を抑制したことは、STAT3経路がHTLV-1感染からATLへの進展に重要であることを裏付けている。さらに、このSTAT3経路の調節にEZH2が関与している可能性が示唆された。また、Lenalidomideは多発性骨髄腫にも汎用される薬剤であるが、EZH2を負に制御しエピジェネティックな作用を持つことは今回初めて明らかになった知見であり、Lenalidomideのような免疫調節薬の多彩な作用を説明する新たな機序と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) causes adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in separate groups of HTLV-1-infected individuals. In our previous study, we suggested that the IL-10-STAT3 pathway could be a candidate of host factors that separate malignant tumor and inflammation. In this study, we aimed to find factors regulating IL-10-STAT3 pathway in HTLV-1-infected cells. Among the reagents used as a probe, Lenalidomide suppressed IL-10-STAT3 pathway in HTLV-1-infected cells. Unexpectedly, Lenalidomide also suppressed EZH2, an epigenetic regulator known to promote oncogenesis. Lenalidomide is an immunomodulatory drug that has been used to treat multiple myeloma and recently been approved for relapsed /recurrent ATL. Our results not only indicate the importance of IL-10-STAT3 pathway in tumor development in HTLV-1 infection, but also discovered a new link between Lenalidomide and epigenetic regulation.

研究分野：腫瘍免疫・感染免疫

キーワード：HTLV-1 自然免疫 腫瘍 炎症 ATL EZH2 Lenalidomide STAT3

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) は終生持続感染し、多くの感染者は無症候であるが、一部の感染者に成人 T 細胞白血病 (ATL) を、また別の一部に HTLV-1 随伴脊髄症/熱帯性瘧疾性対麻痺 (HAM/TSP) を起こす。ATL は悪性リンパ腫/白血病、HAM/TSP は脊髄の慢性炎症と脱髄による神経難病である。なぜ同一のウイルスが、感染者によって腫瘍と炎症を主徴とする全く異なる疾患をおこすのかは不明である。HTLV-1 由来の調節蛋白 Tax や HBZ が発癌に関与することが実験的に示されているが、生体内でのこれらの蛋白レベルでの発現量は極めて低い。両蛋白の機能には疾患間で違いが無く、疾患特異的なウイルス株も見つかっていないことから、HTLV-1 感染による疾患発現の違いにはウイルス側の要因だけではなく宿主側の要因が関与すると考えられる。HTLV-1 特異的 CTL は抗ウイルス/抗腫瘍免疫を担う重要な獲得免疫であるが、ATL 患者ではこの CTL 活性が減弱しており、HAM/TSP 患者ではむしろ亢進している。これは、両疾患を分ける要因の一つと考えられるが、何故このような違いが生じるのかは分かっていない。

我々は HTLV-1 感染における腫瘍と炎症を分ける別の宿主因子候補として自然免疫を想定した。その理由は、HTLV-1 感染細胞内で自然免疫応答が恒常的に働いていることが、これまでの我々の研究から明らかになってきたからである (文献 1)。我々はまた、外から加えた IL-10 が STAT3 を介して感染細胞の性格決定に大きく影響することを見出し報告した (文献 2)。IL-10-STAT3 経路は、炎症を抑制し獲得免疫に対しても抑制的に働くことから、HTLV-1 感染における炎症や HTLV-1 特異的 CTL 応答の疾患による違いにも関与する可能性がある。

2. 研究の目的

現在、種々の検出方法により HTLV-1 感染を診断することはできるが、疾患発症リスクを予知する方法も発症予防方法も確立されていない。これらを開発するためには、HTLV-1 感染による腫瘍性または炎症性疾患の発症メカニズムを理解することは重要である。本研究では、HTLV-1 持続感染における腫瘍性疾患と炎症性疾患を分ける宿主因子の解明を目的として、HTLV-1 感染細胞における IL-10-STAT3 経路の調節メカニズムの解析を行なった。

3. 研究の方法

ATL や HAM/TSP を忠実に模倣する動物モデルは存在しないため、これらの疾患における生体内の感染細胞やその周辺の状況を把握する手段は無いに等しい。そこで、これまで HTLV-1 感染疾患に対して使われたことがある薬剤をプローブとして感染細胞の IL-10-STAT3 経路に対する影響を調べた。細胞の表面抗原やウイルス抗原の発現はフローサイトメトリーで、STAT3 活性や種々のシグナル解析はレポーターアッセイ、ウエスタンブロットで、サイトカイン産生は ELISA を用いて測定した。

4. 研究成果

HTLV-1 感染疾患に対して使われたことがある薬剤のうち、ウイルス発現や免疫応答に影響する可能性のある薬剤として、初年度はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤について、2 年目以降は Lenalidomide 等の免疫調節薬 (immunomodulatory drug, IMiD) について検討した。

① ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤に関する検討

HDAC 阻害剤のうち valproate については、以前ヨーロッパのグループが HTLV-1 関連神経疾患である HAM/TSP 患者に対して臨床試験を行った報告がある (文献 3)。これは、Tax 抗原発現増強による免疫刺激を介して治療効果を期待した試験であったが HAM/TSP の病勢に関しては無効に終わっている。

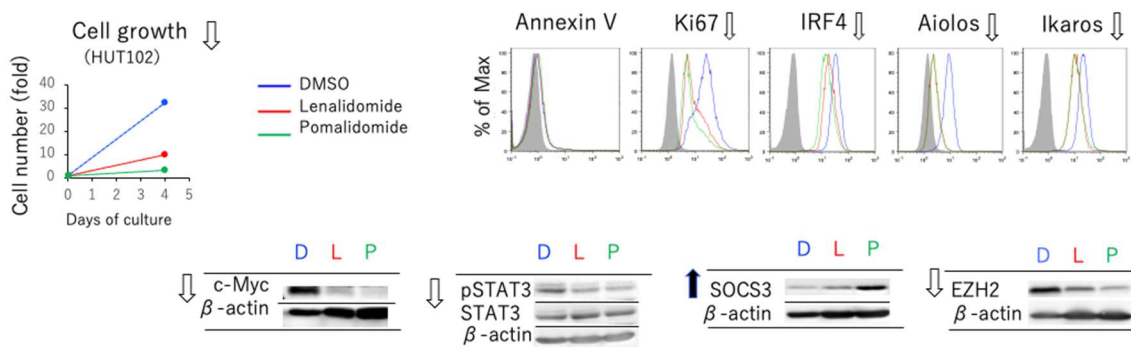
我々は、まず、抗原提示細胞と HTLV-1 感染細胞株の共培養系を作成し、HTLV-1 感染細胞に対する抗原提示細胞の免疫応答を調べた。その結果は、共培養に用いた HTLV-1 感染細胞株の性状によって異なっており、ある HTLV-1 感染細胞株を用いた場合には抗原提示細胞から IFN γ 、IL-12 産生が有意に誘導されたが、IL-10 を高産生する別の HTLV-1 細胞株を用いた場合にはこれらのサイトカイン産生誘導は著しく低かった。しかし、この際、感染細胞を HDAC 阻害剤により前処理しておく、感染細胞のウイルス抗原発現が増加し、共培養した抗原提示細胞からの IFN γ 、IL-12 産生の増加、ならびに抗原提示能の増加が認められた。IFN γ 、IL-12 産生を伴う抗原提示は、抗原特異的 CTL 応答を惹起する条件であることから、その増強は抗 ATL 免疫の強化につながることが示唆された。これらの研究結果を論文にまとめ国際誌に発表した(文献 4)。ただし、この系では、HDAC 阻害剤の HTLV-1 感染細胞に対する毒性が強く IL-10 産生に対する直接効果は明らかではなかった。

② 免疫調節薬 (IMiD) Lenalidomide に関する検討

次に、Lenalidomide 等の免疫調節薬 (IMiD) の影響を解析した。Lenalidomide は多発性骨髄腫の治療薬として既に広く使われており、最近、再発・難治 ATL の治療薬として承認された(文献 5)。Lenalidomide は Cereblon と結合し、転写因子 Ikaros, Aiolos を減少させ cMyc, IRF4 を抑制することが知られており、HTLV-1 感染細胞においても同様の報告がされている(文献 6)。しかし、Lenalidomide の抗 ATL 効果の機序には未解明の部分が残されている。

我々は当初、項目①で述べた HTLV-1 感染細胞と抗原提示細胞の共培養系を用いて Lenalidomide の影響を調べた。しかし、Lenalidomide で感染細胞を前処理しても、共培養した抗原提示細胞からのサイトカイン産生には大きな変化が無く、抗原提示の増大も認められなかった。

そこで、いくつかの HTLV-1 感染細胞株に IMiD (Lenalidomide または Pomalidomide) を加え直接的な影響を調べたところ、緩徐な細胞増殖抑制効果が認められた。これはアポトーシスを伴わず増殖抑制の程度は細胞株によってまちまちであった。最も感受性の高かった HUT102 細胞に関して IMiD の効果を詳細に解析した結果、これまでの報告通り Ikaros, Aiolos, cMyc, IRF4 の抑制が認められた。さらに IMiD で処理した HUT102 細胞ではリン酸化 STAT3 が減少しており、レポーターアッセイにおいても STAT3 活性の抑制が認められた。これらと同時に、STAT3 を負に制御する因子である SOCS3 の増加が認められたため、その上流にさらにこれらを制御する因子があることが予想された。



そこで、SOCS3 を負に制御することが報告されている enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) に着目した(文献 7)。EZH2 はヒストンメチルトランスフェラーゼ活性をもち、様々な癌で過剰発現していることから、エピジェネティックな遺伝子発現抑制により腫瘍化に関与す

ると考えられている（文献 8）。そこで、IMiD 処理した HUT102 細胞で EZH2 ならびに EZH2 が触媒する histone 3 Lys27 のトリメチル化（H3K27me3）を調べたところ、EZH2、H3K27me3 レベルとも低下していた。従って、IMiD は HUT102 細胞の EZH2 を減少させ H3K27me3 の低下によりその遺伝子発現抑制効果を軽減すると考えられた。

次に、この現象が HTLV-1 感染に特有のものかどうかを調べるため、Lenalidomide 感受性の多発性骨髄腫細胞株 KMS-27 を用いて検討した。その結果、KMS-27 細胞に対しても IMiD は EZH2 を抑制し SOCS3 を増加させた。ただし、KMS-27 細胞では元々 STAT3 リン酸化レベルが低く IMiD の添加による STAT3 活性の変化は認められなかった。

HTLV-1 感染細胞や多発性骨髄腫細胞に対する IMiD の種々の効果に EZH2 がどの程度関与しているのか調べるため、EZH2 阻害剤 GSK343 の効果を調べた。その結果、GSK343 で処理した HUT102 細胞においては STAT3 抑制、SOCS3 増加、cMyc、IRF4 の低下、KMS-27 細胞においても SOCS3 増加、cMyc、IRF4 の低下等の IMiD の効果が再現された。以上から、IMiD の効果には EZH2 阻害が関与すると考えられた。これら一連の研究結果を論文にまとめ国際誌に発表した（文献 9）。

本研究において、ATL に一定の効果を示す Lenalidomide が STAT3 経路を抑制したことは、STAT3 経路が HTLV-1 感染から ATL への進展に重要であることを裏付けている。HTLV-1 感染細胞では Lenalidomide により EZH2 が減少し、これが STAT3 経路の制御に関与する可能性が示唆された。

また、Lenalidomide のような IMiD が EZH2 を負に制御することはこれまでに知られていなかった新知見であり、今回の発見は、IMiD の多岐にわたる作用機序にエピジェネティック制御が関与する可能性を示すものである。

<引用文献>

1. M. Kannagi, et al, Impact of host immunity on HTLV-1 pathogenesis: potential of Tax-targeted immunotherapy against ATL. *Retrovirology*, 16(1):23, 2019.
2. L. Sawada, et al., IL-10-mediated signals act as a switch for lymphoproliferation in Human T-cell leukemia virus type-1 infection by activating the STAT3 and IRF4 pathways, *PLoS Pathogens*, 13: e1006597, 2017.
3. S. Olindo, et al., Safety of long-term treatment of HAM/TSP patients with valproic acid, *Blood*, 118 (24): 6306–6309, 2011.
4. M. Ishizawa, et al., Short-term cultured autologous PBMCs as a potential immunogen to activate Tax-specific CTL response in adult T-cell leukemia patients, *Cancer Sci.*, 112: 1161–1172, 2021.
5. T. Ishida, et al., Multicenter phase II study of lenalidomide in relapsed or recurrent adult T-cell leukemia/lymphoma: ATLL- 002, *J. Clin. Oncol.*, 34: 4086e4093, 2016.
6. D.A. Rauch, et al., Interferon regulatory factor 4 as a therapeutic target in adult T-cell leukemia lymphoma, *Retrovirology*, 17: 27, 2020.
7. X. Zhang, et al., Macrophage/microglial Ezh2 facilitates autoimmune inflammation through inhibition of Socs3, *J. Exp. Med.*, 215: 1365e1382, 2018.
8. R. Cao, et al., Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing, *Science*, 298:1039e1043, 2002.
9. N. Kondo, et al., Involvement of EZH2 inhibition in lenalidomide and pomalidomide-mediated growth suppression in HTLV-1-infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 574: 104-109, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Hasegawa A, Murata M, Fujikawa T, Katagiri K, Nagano Y, Masuda T, Kuramitsu M, Nakajima S, Fujisawa J, Okuma K, Grover P, Kidiga M, Akari H, Kannagi M.	4. 巻 19
2. 論文標題 Vaccination with short-term-cultured autologous PBMCs efficiently activated STLV-1-specific CTLs in naturally STLV-1-infected Japanese monkeys with impaired CTL responses.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1011104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1011104	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 Kondo Nobuyo, Nagano Yoshiko, Hasegawa Atsuhiko, Ishizawa Miku, Katagiri Kuniko, Yoneda Takeru, Masuda Takao, Kannagi Mari	4. 巻 574
2. 論文標題 Involvement of EZH2 inhibition in lenalidomide and pomalidomide-mediated growth suppression in HTLV-1-infected cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 104-109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.08.051	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 Ishizawa Miku, Ganbaatar Undrakh, Hasegawa Atsuhiko, Takatsuka Natsuko, Kondo Nobuyo, Yoneda Takeru, Katagiri Kuniko, Masuda Takao, Utsunomiya Atee, Kannagi Mari	4. 巻 112
2. 論文標題 Short term cultured autologous peripheral blood mononuclear cells as a potential immunogen to activate Tax specific CTL response in adult T cell leukemia patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1161~1172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14800	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 神奈木真理、末廣陽子、長谷川温彦	4. 巻 50
2. 論文標題 HTLV-1感染に対するワクチン開発の展望	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 1707-1712
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kannagi M, Hasegawa A, Utsunomiya A, Akari H
2. 発表標題 Potential anti-ATL therapeutic vaccine using short-term cultured autologous peripheral blood mononuclear cells: preclinical evidence in vitro and in vivo
3. 学会等名 20th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kannagi M, Kondo N, Nagano Y, Masuda T, Hasegawa A
2. 発表標題 IMiDs (lenalidomide and pomalidomide) suppress HTLV-1-infected cell growth through EZH2 inhibition.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神奈木 真理、長谷川 温彦、村田 めぐみ、中嶋 伸介、藤澤 順一、大隈 和、明里 宏文
2. 発表標題 STLV-1特異的CTLの低応答性を示すSTLV-1自然感染ニホンザルに対する自家末梢血単核球の免疫接種によるCTL応答の回復
3. 学会等名 第69回ウイルス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石澤 未来、長谷川 温彦、高塚 奈津子、近藤 伸世、米田 建、片桐 邦子、増田 貴夫、宇都宮 與、神奈木 真理.
2. 発表標題 HDAC阻害剤はATL細胞の免疫原性を増大し抗腫瘍Tax特異的CTL応答を活性化させる.
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤伸世、永野佳子、長谷川温彦、石澤未来、片桐邦子、米田 建、増田貴夫、神奈木真理
2. 発表標題 免疫調節薬LenalidomideによるHTLV-1感染細胞の増殖抑制にはEZH2阻害が関与する.
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神奈木 真理, 石澤 未来, Undrakh Ganbaata, 長谷川 温彦, 高塚 奈津子, 近藤 伸世, 米田 建, 片桐 邦子, 増田 貴夫, 宇都宮 與.
2. 発表標題 成人T細胞白血病患者の自家PBMCを免疫原とした抗腫瘍Tax特異的CTL応答の惹起.
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神奈木 真理
2. 発表標題 成人T細胞白血病の免疫学的疾患機序の解明ならびにワクチン療法の開発
3. 学会等名 第80回日本癌学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hasegawa, A., Murata, M., Fujikawa, T., Nagano, Y., Akari, H., Kannagi, M
2. 発表標題 Restoration of impaired STLV-1-specific CTL response in STLV-1-infected Japanese macaques by a CTL-based vaccine.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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