

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860729

研究課題名(和文)HAM高発症型HTLV-1を用いたHAM指向性決定機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of determinant of HAM tropism using HAM tropic HTLV-1

## 研究代表者

上野 孝治 (UENO, TAKAHARU)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：80405167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病(ATL)とHTLV-1関連脊髄症(HAM)は共に代表的なHTLV-1関連疾患である。しかし、HTLV-1の疾患指向性が異なる原因はまだ未解明であるが、ウイルス株の違いが疾患指向性に関与する可能性があると考えられている。この可能性を調べるため、ATL指向性の日本型HTLV-1とHAM指向性のジャマイカ・イラン(J/I)型HTLV-1に関してウイルス性状の比較解析を行った。その結果、J/I型HTLV-1ではウイルス産生が多いことが明らかとなり、その制御にウイルス遺伝子の発現パターンの違いが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Adult T cell leukemia (ATL) and HTLV-1 related myelopathy (HAM) are major HTLV-1 related diseases. Though the determinant of the HTLV-1 disease tropism is still unknown, the difference of viral strain is considered to be involved in the tropism. To investigate this hypothesis, we compared the phenotype of ATL tropic Japanese HTLV-1 with that of HAM tropic Jamaican/Iranian (J/I) HTLV-1. The data showed the production of J/I HTLV-1 was more than that of Japanese HTLV-1 and suggested the different expression pattern of viral mRNA might be involved in it.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HTLV-1

## 1. 研究開始当初の背景

HTLV-1 感染により一部の感染者は HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) を発症する。HAM は両下肢痙性不全麻痺を特徴とし、両下肢の筋力低下と痙性による歩行困難や排尿障害の症状を呈する緩徐進行性の神経変性疾患である。根治的治療法は存在せずステロイドやインターフェロン投与等の対症療法のみであり、根治的治療法の開発が喫緊の課題となっている。HAM の発症メカニズムとして、HTLV-1 感染 CD4 細胞が脊髄に浸潤し、そこに抗 HTLV-1 CTL がリクルートされて炎症反応が起こる際に神経細胞が損傷を受けるという *by stander* 仮説が提唱されているが未解明のままである。

HAM 生涯発症率は感染する HTLV-1 サブタイプの違いにより異なることが報告されている。海外ではジャマイカやイラン北部に HAM 患者の集積が認められ、中でもジャマイカにおける HAM 発症率は日本の 7 倍以上と極めて高く、特に HAM 指向性の高い HTLV-1 であると考えられた。そこで pX 領域周辺のウイルスゲノムの比較解析が行われた。その結果、ジャマイカ・イラン北部の両地域に共通する特徴的な塩基配列が同定され、日本の HTLV-1 と比較して tax 遺伝子に 6 塩基・4 アミノ酸の違いがあり、rex 遺伝子はアミノ酸配列の変化はないが翻訳の終止コドンが Trp コドンに (TGA→TGG) 置換されるため、C 末端への 20 アミノ酸付加という大きな違いが生じる。(Sabouri et al JGV) Tax は LTR プロモーターの転写活性化、Rex はウイルス mRNA の核外輸送とそれぞれウイルス複製に主要な役割を果たすことから、このような両遺伝子の違いがウイルスの挙動および感染者個体内における免疫反応等を変化させ、最終的に HAM の発症率の違いに繋がると考えられる。

予備実験の結果から、単独発現ベクターを用いたレポーターアッセイではジャマイカ・イラン型 (J/I 型) と日本型の間に Rex と Tax の活性には差がないが、Rex・Tax を poly cistronic に産生する pXmRNA 発現ベクターで比較すると J/I 型は日本型よりも Rex の活性が高く、Tax の活性が低いことが明らかとなった。この結果はタンパクとしての活性は同等であるが、感染細胞内で HTLV-1 プロウイルスから転写される pXmRNA では活性に差が生じることを示している。

## 2. 研究の目的

HTLV-1 感染者および HTLV-1 関連疾患の患者が多い日本では、ATL の発症率は HAM より高いが、カリブ海諸国の感染者ではこの発症率が逆転している。また、イラン北部でも HAM 発症例が数多く報告されている。この

発症率の違いには HLA のタイプなどのホストの遺伝的要因だけでなく、ウイルス株の違いが原因である可能性が報告されており、ジャマイカとイランで検出される HTLV-1 に共通する特徴的な塩基配列が同定されている。また、HAM では感染者個体内でウイルス産生が認められる割合が高く、ATL 患者では HTLV-1 ウイルス遺伝子の変異やエピジェネティックな変化により、ウイルス産生が認められない割合が高いことが報告されており、ウイルス株の違いがこの個体内でのウイルスの挙動の違いに繋がる可能性が高いと考えられる。そこで本研究では HAM 指向性の高いジャマイカ・イラン (J/I) 型 HTLV-1 と ATL 指向性の高い日本型 HTLV-1 を用いてウイルス産生ならびにその制御メカニズムについて *in vitro* の手法を用いて詳細に解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) HTLV-1 産生量の比較

293T 細胞に日本型あるいはイラン・ジャマイカ型 HTLV-1 感染性クロンをトランスフェクションし、HTLV-1 産生量を HTLV-1 p19 ELISA kit を用いて測定した。

### (2) HTLV-1 感染細胞におけるウイルス mRNA 発現量の比較

両タイプの HTLV-1 を感染させた Jurkat 細胞株を樹立し、それぞれにおける full length mRNA および doubly-spliced pX mRNA の発現量を RT-PCR 法を用いて定量した。

### (3) Tax および Rex タンパクの安定性および doubly spliced pX mRNA からの発現量の比較

それぞれの単独発現ベクターを一過性にトランスフェクションし、シクロヘキシミドを用いて安定性を比較した。doubly-spliced pX mRNA 発現ベクターを構築し、これを 293T 細胞に一過性にトランスフェクションした後、Western blotting 法を用いて検出した。

## 4. 研究成果

感染性クロンを一過性に 293T 細胞にトランスフェクションし、p19 ELISA によりウイルス産生量を比較したところ、J/I 型は日本型よりも約 2 倍のウイルスを産生することが明らかになった。

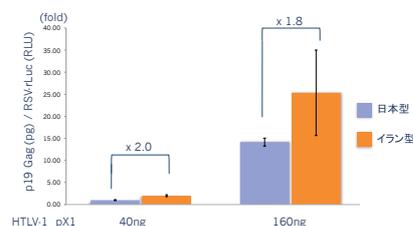


図1. HTLV-1 粒子産生量の比較

感染性クローンを 293T 細胞にトランスフェクションした後、Jurkat 細胞と共培養して HTLV-1 感染させ、限界希釈法により HTLV-1 感染 Jurkat 細胞を樹立した。この HTLV-1 感染 Jurkat 細胞におけるウイルス mRNA の発現量を RT-PCR 法を用いて定量した。その結果、J/I 型では full length viral mRNA /doubly-spliced pX mRNA の比率が顕著に高いことが示された。

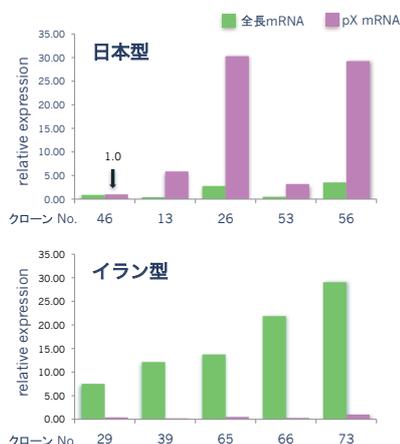


図2. HTLV-1 感染細胞におけるウイルス mRNA の発現量

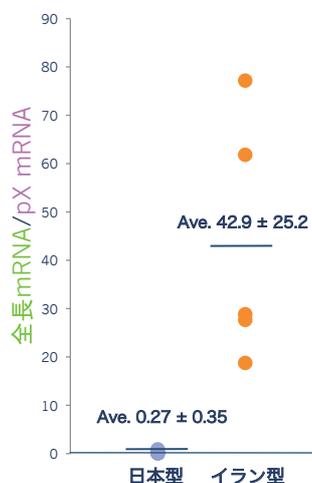


図3. ウイルス mRNA 発現パターン

この結果は J/I 型では、少ない Tax タンパク発現で効率的に HTLV-1 粒子を産生可能であることを示唆している。これにより感染者体内での HTLV-1 感染頻度が上昇すると同時に、宿主免疫の主な標的である Tax タンパクの発現が低いことで、感染細胞が宿主免疫から回避することができるために、プロウイルス量の増加に繋がるのではないかと考えられた。full length viral mRNA /doubly-spliced pX

mRNA の比率は、ウイルス mRNA の転写量およびスプライシングパターンにより制御されており、この制御に深く関わると考えられる Rex タンパクと Tax タンパクに関して検討を行った。これらの2つのタンパクを同時にコードする doubly-spliced pX mRNA からの発現に関しては、J/I 型では Rex は約9倍、Tax は約2倍の発現亢進が見られた。それぞれの単独発現ベクターおよびシクロヘキシミドを用いてこれらのタンパクの安定性を検討したが、違いは認められなかった。doubly-spliced pX mRNA からの発現量の違いは、タンパクの安定性ではなく産生量が異なることが原因であると考えられた。J/I 型と日本型では複数の塩基が異なっており、上記の発現量の違いの原因となる塩基を同定するために、点変異体を作製し検討を行った。7774 番目の塩基が日本型は C、J/I 型では T であり、Rex のアミノ酸がそれぞれ Ser、Phe と異なっていた。このアミノ酸の違いにより、抗 Rex 抗体の抗原認識性が大きく異なり、上記で認められた Rex タンパクの発現の違いは抗原認識性の違いによるものであることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

### (1) [雑誌論文] (計2件)

① An animal model of adult T-cell leukemia: humanized mice with HTLV-1-specific immunity.

Tezuka K, Xun R, Tei M, Ueno T, Tanaka M, Takenouchi N, Fujisawa J.

Blood. 2014 Jan 16;123(3):346-55.

DOI : 10.1182/blood-2013-06-508861. Epub 2013 Nov 6.

査読有

② Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATL model mice.

Ikebe E, Kawaguchi A, Tezuka K, Taguchi S, Hirose S, Matsumoto T, Mitsui T, Senba K, Nishizono A, Hori M, Hasegawa H, Yamada Y, Ueno T, Tanaka Y, Sawa H, Hall W, Minami Y, Jeang KT, Ogata M, Morishita K, Hasegawa H, Fujisawa J, Iha H.

Blood Cancer J. 2013 Aug 16;3:e132.

DOI: 10.1038/bcj.2013.30.

査読有

### (2) [学会発表] (計4件)

① Altered pattern in viral mRNA expression of Iranian type HTLV-1 leading to enhanced viral production

荀潤澤, 上野孝治, 齊藤峰輝, 手塚健太, 田

中勇悦、藤澤順一  
第 66 回日本細菌学会関西支部総会・学術講演会  
2013年11月16日  
大阪大学（大阪府吹田市）

② Altered pattern in viral mRNA expression of Iranian type HTLV-1 leading to enhanced viral expression  
Takaharu Ueno, Runze Xun, Mineki Saito, Kenta Tezuka, Yuetsu Tanaka and Jun-ichi Fujisawa  
16th International Conference on Human Retrovirology : HTLV and Related Viruses  
2013年6月29日  
モントリオール（カナダ）

③ Carrier model of HTLV-1 infection in humanized NOG mice  
Kenta Tezuka, Mami Tei, Takaharu Ueno, Runze Xun, Jun-ichi Fujisawa  
16th International Conference on Human Retrovirology : HTLV and Related Viruses  
2013年6月29日  
モントリオール（カナダ）

④ Inhibition of ATL development in humanized mouse model by AZT/INF treatment  
Kenta Tezuka, Mami Tei, Takaharu Ueno, Runze Xun, Hidekatsu Iha, Jun-ichi Fujisawa  
16th International Conference on Human Retrovirology : HTLV and Related Viruses  
2013年6月29日  
モントリオール（カナダ）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上野 孝治 (Ueno Takaharu)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：80405167