

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430126

研究課題名(和文) HTLV-1感染ヒト化マウスを用いた腫瘍発生過程における遺伝子変異蓄積機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the gene variation accumulation mechanism in the tumor developmental process using HTLV-1 humanized mouse

研究代表者

田中 正和 (TANAKA, Masakazu)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：20454613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：HTLV-1感染ヒト化マウスではATL様病態発症過程が既に認められており、その中で発現誘導が確認されているAPOBEC3B遺伝子の誘導機構を明らかにすることを目的とした。

ヒト化マウスへの初期感染時ではTax発現と共にAPOBEC3Bの発現上昇が観察されたのに対し、腫瘍形成過程での持続感染時ではAPOBEC3Bの発現誘導はTax発現とは関係なく、Tax以外のウイルス産物の関与が考えられた。またHAM患者検体と健常人との比較結果よりAPOBEC3B発現が抑制されていたことから、抗HTLV-1感染応答等の誘導によりAPOBEC3Bの発現誘導が認められ、宿主遺伝子の変異が蓄積されると示唆された。

研究成果の概要(英文)：An ATL-like condition of a patient onset process had been already accepted with the HTLV-1 infection humanized mouse and was intended that I clarified the instruction mechanism of the APOBEC3B gene that an expression instruction was confirmed in that.

As for the expression instruction of APOBEC3B, the participation of the virus product except Tax was thought about regardless of onset of Tax at the continuation infection in the neoplasia process whereas a rise in expression of APOBEC3B was observed with Tax expression at the initial infection to a humanized mouse. In addition, because APOBEC3B expression was controlled than a comparison between HAM patient specimen and physically unimpaired person result, an expression instruction of APOBEC3B was recognized by the instructions such as anti-HTLV-1 infection replies, and it was suggested that the variation of the host gene was accumulated.

研究分野：腫瘍ウイルス学

キーワード：HTLV-1 ヒト化マウス Tax APOBEC

## 1. 研究開始当初の背景

HTLV-1 感染が原因で発症する成人 T 細胞白血病 (ATL) は、発病までに感染後数十年の潜伏期間を有し、さらに生涯発症率は HTLV-1 感染者の数%にとどまる。しかしながら、ひとたび発症すると、有効な治療法はいまだ確立されておらず、平均余命 1 年以内の悪性の白血病であることから、治療法のみならず発症予防の取り組みは重要な課題である。乳幼児期における HTLV-1 感染から ATL 発症に至る数十年に及ぶ長い潜伏期の間には、感染細胞における段階的なゲノム変異が蓄積し、これがクローナルな腫瘍細胞の増殖へとつながると考えられている。従って、これら変異の実態を明らかにすることは、高危険度群の把握および発症予防やリスク診断、早期診断に不可欠である。しかしながら、感染ヒト個体を対象とした経時的な解析は、倫理的にも時間的にも困難であり、従前より感染動物モデルの開発が求められていた。研究代表者は、ヒト血球系を持つヒト化マウスに HTLV-1 を感染させることで、感染 1~2 ヶ月で感染 CD4 T 細胞のポリクローナルな異常増殖を、感染 3~4 ヶ月においてはオリゴクローナルな CD25 陽性 CD4 T 細胞の腫瘍性増殖を観察し、感染 4 ヶ月以降には花弁様分葉核を持つリンパ球の出現を確認する等、ATL 様病態の再現に成功した経緯がある。

近年、全ゲノム塩基配列決定技術の飛躍的な進展に伴い、種々の固形腫瘍の発症過程におけるゲノム変異の特徴が明らかとなり、そのなかで APOBEC3B をはじめとするシチジンデアミナーゼの遺伝子変異導入への関与が強く示唆されていた。そこで、HTLV-1 感染ヒト化マウス内の感染 T 細胞におけるこれら DNA シチジンデアミナーゼの発現を解析したところ、HTLV-1 感染により APOBEC3B および AID の遺伝子発現上昇が観察された。従って、HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いることで、長い潜伏期を有する ATL 発症過程で想定されているゲノム変異の蓄積における *in vivo* での APOBEC3B および AID の関与を、経時的に検証できると考えられた。

## 2. 研究の目的

HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける ATL 様病態発症過程で発現誘導が確認された APOBEC3B 遺伝子の誘導機構とその宿主遺伝子の変異蓄積への影響を明らかにすることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト化マウスの作製と HTLV-1 感染

ヒト化マウスは、ヒト臍帯血から磁気ビー

ズ法にて精製した CD133 陽性造血幹細胞 ( $5 \times 10^4$  個) を NOD-SCID/IL2R $\gamma$ -chain knock-out (NOG-SCID) マウス骨髄内に移植することで作製した。移植 4~5 ヶ月後、線照射 (10Gy) HTLV-1 感染 Jurkat 細胞 (JEX28;  $2 \times 10^5$  個) を腹腔内に注入し HTLV-1 を感染させた。感染数週間で感染細胞の異常増殖が観察されることから、感染 1 ヶ月毎に感染マウスより経時的に脾臓を摘出し、抗体磁気ビーズを用いて分離した。その後フェノール法にてゲノム DNA を、TRIzol 試薬 (Invitrogen) にて RNA を精製し、cDNA を合成した後に、リアルタイム PCR にて APOBEC3B、AID、および HTLV-1 tax mRNA の発現量を定量化した。同時に、ゲノム DNA を用いて HTLV-1 プロウイルス量 (プロウイルスロード) を計測し、各感染段階における感染細胞あたりの APOBEC3B および tax 遺伝子の発現量を算出し、比較検討をした。

### (2) HTLV-1 感染における APOBEC3B 発現誘導

Jurkat T 細胞に空ベクター (pCG-BL)、Tax 発現プラスミド (pCG-Tax) および HTLV-1 infectious clone DNA (pX-1) を遺伝子導入した。48 時間後に細胞回収し、RNA を精製し、cDNA を合成した後にリアルタイム PCR にて APOBEC3B および HTLV-1 tax mRNA の発現量を定量化した。

### (3) HTLV-1 感染 CD25(-) と CD25(+) CD4 T 細胞における APOBEC 遺伝子の発現

感染数ヶ月のヒト化マウスより脾臓を摘出し、セルソーターを用い、CD25(-) CD4(+) CD3(+) T 細胞画分と CD25(+) CD4(+) CD3(+) T 細胞画分に分離精製し、上記 (1) と同様の操作で各細胞画分における感染細胞あたりの APOBEC3B および tax 遺伝子の発現量を算出、比較した。

### (4) 臍帯血を用いたサイトカインシグナルを介した APOBEC3B 発現誘導

ヒト臍帯血から磁気ビーズ法にて精製した CD133 陰性造血幹細胞を用いて、APOBEC3B ならびに IFN $\alpha$  レスポンス遺伝子 (STAT1・OAS1・MTX) の発現をリアルタイム PCR にて発現量を定量化した。なお添加した IFN は 3000U で、細胞回収は 24 時間後に行なった。

### (5) HAM 患者検体を用いた Tax ならびに APOBEC3B を含めた APOBEC ファミリーの発現誘導の検討

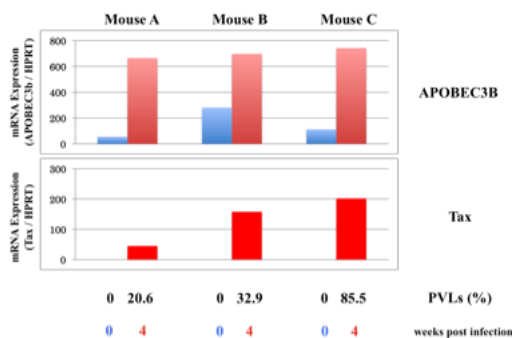
HAM 患者末梢血ならびに健常人よりリンパ球分離を行ない、APOBEC ファミリー遺伝子ならびに Tax 発現について、リアルタイム PCR 法を用いて定量化した。さらに同サンプルを

用いて 37 培養を 24 時間 ex vivo 培養を行なった後に細胞回収し、同様に定量化をした。

#### 4. 研究成果

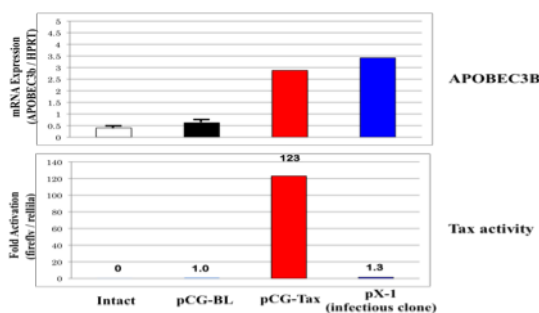
##### (1) Tax 発現に伴う APOBEC3B 発現活性化

HTLV-1 感染細胞での発現上昇が、宿主ゲノムあるいはウイルスゲノムへの突然変異導入に關与することが想定された。よって感染前後のヒト化マウス末梢血における APOBEC3B の発現と Tax の発現を解析した。HTLV-1 の感染に伴い Tax の発現が認められると共に APOBEC3B の発現上昇が観察されたため、Tax による APOBEC3B 遺伝子の活性化を示唆された。



##### (2) HTLV-1 感染における APOBEC3B 発現誘導の検討

Jurkat 細胞に Tax 発現プラスミドおよび HTLV-1 infectious clone DNA を一過的に遺伝子導入したところ、何れの場合も APOBEC3B mRNA の発現誘導が観察された。しかし HTLV-1 infectious clone DNA 導入細胞においては、Tax 発現が検出レベル以下であったにもかかわらず APOBEC3B の発現が認められた事実から、HBZ をはじめとする Tax 以外のウイルス遺伝子産物の関与あるいは発現 RNA を介した APOBEC3B 発現誘導の可能性が強く示唆された。

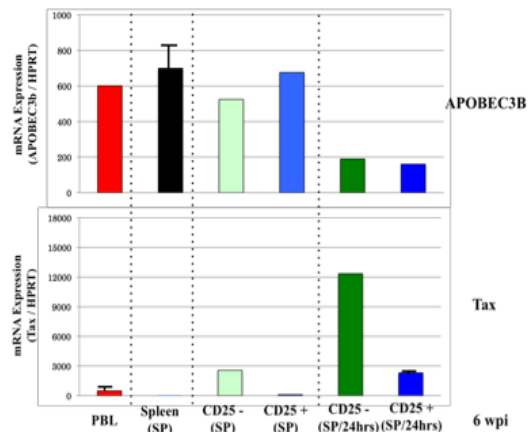


##### (3) CD25 陰性および CD25 陽性感染 CD4T 細胞の HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける Tax ならびに APOBEC3B 発現

HTLV-1 感染ヒト化マウス脾臓内の CD25 陽

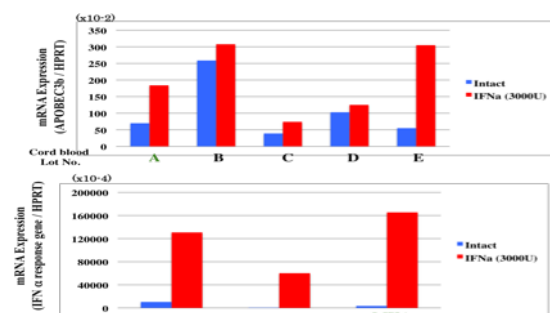
性細胞において CD25 陰性細胞と比較したところ、Tax mRNA の発現が有意に抑制されていた。その時の APOBEC3B mRNA の発現は同等あるいは逆に上昇した。

更にこれらの細胞を Ex vivo で培養しますと Tax の発現は数十倍に再活性化されていたが、その際 APOBEC3B の発現は逆に抑制されていた。これらの事実は、HTLV-1 感染 T 細胞における APOBEC3B の発現誘導は、直接 Tax の作用によるものではないことを強く示唆する結果となった。



##### (4) 臍帯血を用いたサイトカインシグナルを介した APOBEC3B 発現誘導の検討

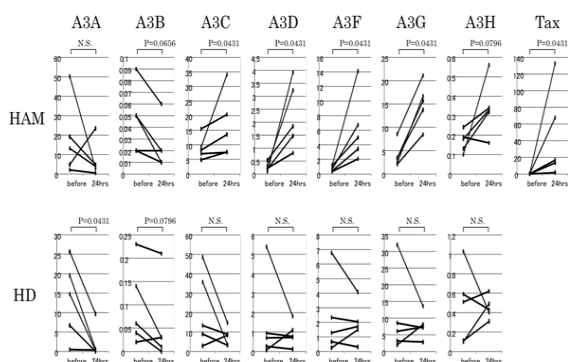
B 型肝炎患者の幹細胞では APOBEC3B の発現上昇があり、IFN $\alpha$  を投与することでさらに活性化されるという報告例がある。そこで我々は臍帯血 (CD133 陰性細胞) を用いて IFN $\alpha$  添加 24 時間後において APOBEC3B ならびに IFN $\alpha$  レスポンス遺伝子 (STAT1 · OAS1 · MXA) の発現を確認したところ、共に上昇が認められた。



##### (5) HAM 患者検体を用いた Tax ならびに APOBEC3B を含めた APOBEC ファミリーの発現誘導の検討

そこで研究代表者は、HTLV-1 患者でありながら腫瘍化されていない HAM 患者検体と健常人において 7 種類の APOBEC ファミリーの発現を確認し、有意な差は認められなかった。

続いて Ex vivo 培養し、Tax を再活性化したところ、APOBEC3B 発現のみ抑制され、その他の APOBEC ファミリー遺伝子の発現は上昇していることが分かった。



以上の結果より、初期感染時では Tax の発現と共に APOBEC3B の発現上昇が観察され、また腫瘍形成過程では APOBEC3B の発現誘導は Tax 発現とは関係なく、Tax 以外のウイルス産物の関与が考えられた。今回 HAM 患者検体を用いた結果より健常人と比較して APOBEC3B 発現が抑制されていたことから、抗 HTLV-1 感染応答等の誘導により APOBEC3B の発現誘導が認められ、宿主遺伝子の変異が蓄積されると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

M. Tanaka, J. Yao, S.I. Lee, Y. Ren, N. Takenouchi, J.I. Fujisawa. Induction of APOBEC3B cytidine deaminase gene in HTLV-1 infected T-cells of ATL mouse model. *Retrovirology* 無. 12. 2016. P11. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-12-S1-P11>.

J.I. Fujisawa, S.I. Lee, J. Yao, Y. Ren, M. Tanaka. Tax peptide vaccine suppressed the leukemia in humanized mouse. *Retrovirology* 無. 12. 2016. 043. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-12-S1-043>.

S. Yamashita, M. Tanaka, T. Sato, C. Ida, N. Ohta, T. Hamada, T. Uetsuki, Y. Nishi, J. Moss, M. Miwa. Effect of mild temperature shift on poly(ADP-ribose) and H2AX levels in cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 有. 476. 2016. 594-599. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.001>.

M. Miwa, C. Ida, S. Yamashita, M. Tanaka, J.I. Fujisawa. Poly(ADP-ribose): Structure, Physicochemical Properties and Quantification in vivo. *Current Protein & Peptide Science.* 有. 17. 2016. 683-692. <https://doi.org/10.2174/13892037666160419145246>.

AF. Mu, M. Li, M. Tanaka, Y. Adachi, TT. Tai, PH. Liem, S. Izawa, K. Furuyama, S. Taketani. Enhancements of the production of bilirubin and the expression of  $\gamma$ -globin by carbon monoxide during erythroid differentiation. *FEBS letters.* 有. 590. 2016. 1447-1454. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12178>.

C. Ida, S. Yamashita, M. Tsukada, T. Eguchi, M. Tanaka, S. Ogata, T. Fujii, Y. Nishi, S. Ikegami, J. Moss, M. Miwa. An enzyme-linked immunosorbent assay-based system for determining the physiological level of poly(ADP-ribose) in cultured cells. *Anal. Biochem.* 有. 494. 2016. 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.10.014>.

K. Tezuka, R. Xun, M. Tei, T. Ueno, M. Tanaka, N. Takenouchi, J.I. Fujisawa. An animal model of adult T-cell leukemia: humanized mice with HTLV-1-specific immunity. *Blood.* 有. 123. 2014. 346-355. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-508861>.

[学会発表](計 17 件)

M. Tanaka, Y. Ren, J. Yao, S.I. Lee, N. Takenouchi, J.I. Fujisawa. Effect of adjuvant in the tax vaccination of humanized mouse to prevent HTLV-1 infection. 18<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. 2017/3/7-10. ホテルグランドアーク 半蔵門 (東京都・千代田区)

A. Joseph, T. Ueno, Y. Ren, J. Yao, S.I. Lee, M. Tanaka, J.I. Fujisawa. Both HBZ protein and mRNA are required for leukemic growth of HTLV-1-infected T-cells in humanized mouse model. 18<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV and

Related Viruses.2017/3/7-10. ホテル  
グランドアーク半蔵門（東京都・千代  
田区）

N. Takenouchi, M. Tanaka, JI. Fujisawa.  
Establishment of an in vitro HTLV-1  
infection model via dendritic cells.  
18<sup>th</sup>International Conference on  
Human Retrovirology: HTLV and  
Related Viruses.2017/3/7-10. ホテル  
グランドアーク半蔵門（東京都・千代  
田区）

田中正和, 任翊華, 竹之内徳博, 姚錦  
春, 李成一, 藤澤順一. HTLV-1 感染ヒ  
ト化マウスを用いた感染予防ワクチン  
におけるアジュバント効果の検討. 第 3  
回日本 HTLV-1 学会学術集会.2016/8/26  
-28. 鹿児島県市町村自治会館（鹿児島  
県・鹿児島市）.

M. Miwa, M. Tanaka, C. Ida, S.  
Yamashita, J. Takahashi, T. Eguchi,  
N. Ohta, M. Tsukada, T. Sato, M.  
Mushiake, Y. Nishi, JI. Fujisawa.  
Interaction of poly(ADP-ribose)  
pathway and Akt pathway in CHO-K1 cells  
for regulation of cell  
proliferation, centrosome  
amplification and chromosome number  
abnormality. The PARP Family &  
ADP-ribosylation.2016/4/13-16. New  
York (U.S.A.)

田中正和, 石崎(井田)智恵利, 山下幸子,  
佐藤輝明, 佐々木由香, 益谷 美都子,  
三輪正直. 生体内におけるポリ ADP リボ  
シル化 (PARP) 反応とその意義 -細胞増  
殖に及ぼす影響について. 第 5 回リン化  
化合物討論会(第 32 回 C-P 化合物研究会).  
2015/11/25. 京都大学芝蘭会館(京都府・  
京都市)

M. Tanaka, N. Wada, S. Hasegawa, M.  
Tei, I. Hashimoto, N. Takenouchi,  
H. Tsuda, M. Miwa, JI. Fujisawa.  
Anti-tumor effects on lymphoma  
cells expressing HTLV-1 Tax and  
inhibition of HTLV-1 cell-to-cell  
spread by bovine lactoferrin. 12<sup>th</sup>  
International Conference on  
Lactoferrin, Structure, Function  
and Applications.2015/11/2-6. ウエ  
スチンナゴヤキャッスルホテル(愛  
知県・名古屋市)

田中正和, 姚錦春, 李成一, 任翊華, 竹  
之内徳博, 藤澤順一. HTLV-1 感染ヒト

化マウスにおける APOBEC3B の誘導につ  
いて. 第 74 回日本癌学会学術総会.  
2015/10/8-10. 名古屋国際会議場(愛知  
県・名古屋市)

田中正和, 姚錦春, 李成一, 任翊華, 竹  
之内徳博, 藤澤順一. HTLV-1 感染ヒト化  
マウスモデルにおけるシチジンデアミナ  
ーゼ APOBEC3B 遺伝子の活性化. 第 2 回  
日本 HTLV-1 学会学術集会.2015/10/8-10.  
東京大学医科学研究所講堂(東京都・港  
区)

田中正和, 虫明正敏, 高橋淳, 佐々木由  
香, 石崎(井田)智恵利, 益谷美都子,  
三輪正直. 生体内におけるポリ ADP リボ  
シル化反応と細胞増殖との関連について.  
第 62 回日本生化学会近畿支部例会.  
2015/5/16. 立命館大学びわこ・くさつキ  
ャンパス(滋賀県・草津市)

田中正和, 李成一, 荀潤澤, 姚錦春, 藤  
澤順一. Tax ペプチドワクチンのヒト  
化マウス鼻腔投与による HTLV-1 感染抑  
制. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会.  
2014/11/10-12. パシフィコ横浜会議セン  
ター(神奈川県・横浜市)

三輪正直, 井田智恵利, 田中正和. 生  
体内ポリ ADP-リボシル化量と細胞増殖  
との関連. 第 87 回日本生化学会大  
会.2014/10/15-18. 国立京都国際会館・  
グランドプリンスホテル京都(京都府・  
京都市)

竹之内徳博, 上野孝治, 荀潤澤, 田中  
正和, 藤澤順一. 樹状細胞を介した  
HTLV-1 感染モデルの構築と薬剤スクリ  
ーニングへの応用. 第 19 回日本神経感  
染症学会総会学術集会第 26 回日本神経  
免疫学会学術集会合同学術集会.  
2014/9/4-6. 金沢歌劇座(石川県・金沢  
市)

田中正和, 李成一, 荀潤澤, 姚錦春,  
藤澤順一. Long peptides vaccine to Tax  
suppressed the overgrowth of  
HTLV-1-infected lymphocytes in  
humanized mouse model. 第 73 回日本癌  
学会学術総会. 2014/9/25-27. パシフィ  
コ横浜(神奈川県・横浜市)

藤澤順一, 田中正和, 上野孝治, 荀潤  
澤, 姚錦春, 李成一. Mouse model of  
ATL. 第 73 回日本癌学会学術総会.  
2014/9/25-27. パシフィコ横浜(神奈川  
県・横浜市)

田中正和，李成一，荀潤澤，姚錦春，藤澤順一．ヒト化マウスを用いた HTLV-1 感染防御ワクチンの開発．第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会．2014/8/22-24. 東京大学医科学研究所講堂(東京都・港区)

竹之内徳博，上野孝治，手塚健太，田中正和，藤澤順一．樹状細胞を介した HTLV-1 感染モデルの構築．第 55 回日本神経学会学術大会.2014/5/21-24. 福岡国際会議場・福岡サンパレス・福岡国際センター(福岡県・福岡市)．

〔その他〕

ホームページ等

[http://www3.kmu.ac.jp/microbiol/KMU\\_Microbiology/Top.html](http://www3.kmu.ac.jp/microbiol/KMU_Microbiology/Top.html)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

田中 正和 (TANAKA Masakazu)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：2 0 4 5 4 6 1 3

### (2)研究分担者

竹之内 徳博 (TAKENOUCHI Norihiro )

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：2 0 5 3 3 2 3 5

藤澤 順一 (FUJISAWA Jun-ichi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：4 0 1 8 1 3 4 1

### (4)研究協力者

姚 錦春 (Yao Jinchun)