

平成30年6月25日現在

機関番号：83904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14623

研究課題名(和文)成人T細胞白血病の発症後におけるHTLV-1のインパクト

研究課題名(英文)Role of HTLV-1 in the maintenance of malignant phenotype of ATL cells

研究代表者

駒野 淳(Komano, Atsushi)

独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・その他部局等・臨床検査科長

研究者番号：60356251

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文): HTLV-1はT細胞系腫瘍の一つである成人T細胞白血病(Adult T-cell Leukemia, ATL)の原因である。これまで感染細胞からHTLV-1プロウイルスゲノムを取り除く事はできなかった。従って、発症後のATL病態形成にHTLV-1がどのような関与を示しているか解明できなかった。申請者らはATL由来細胞に内在するHTLV-1のプロウイルスゲノムをゲノム編集技術で取り除くことに挑戦し、一部の細胞からプロウイルスが除去されたことを示す陽性反応が得られた。現在、この知見の詳細な解析を進めている。

研究成果の概要(英文): HTLV-1 is a causative agent of adult T-cell leukemia (ATL) in humans. The role of HTLV-1 in the maintenance of malignant phenotype of ATL cells has remained clarified. We employed evolving genome editing technologies to remove the proviral genome of HTLV-1 from ATL cells to address this issue. We were able to detect a PCR signal, suggesting the proviral removal was successful. We have been trying to reproduce this finding and will analyze the biological properties of provirus-deleted ATL cells.

研究分野: 分子細胞生物学、感染症学、ウイルス学

キーワード: HTLV-1 ATL provirus genome editing Protein transduction LENA

1. 研究開始当初の背景

がんは多段階の遺伝的変化の上に成立する。癌ウイルスはこの過程の一部を担う。EBVは primary Bリンパ球を不死化し、パーキットリンパ腫をはじめとするB細胞系腫瘍の原因となる。申請者らはEBVを潜伏感染細胞から取り除く方法を実用化し、これを利用して世界で初めてウイルス感染がパーキットリンパ腫の発症後にも病態形成に必要である事を科学的に実証した (Komano et al. J Virol 1998 ; Kennedy et al. PNAS 2003)。この成因はEBVゲノムが感染細胞に染色体外因子として維持されることにある。一方、HTLV-1はT細胞系腫瘍の一つである成人T細胞白血病 (Adult T-cell Leukemia, ATL)の原因である。HTLV-1はprimary Tリンパ球を不死化し、ウイルスのTaxやHBZ遺伝子産物に強い発癌活性があるため、発症までのプロセスへの関与が確実視される。レトロウイルスの一種であるため、HTLV-1が感染するとウイルスゲノムが宿主ゲノムに組み込まれる。これはプロウイルスと呼ばれる。方法論の欠如によって、これまで感染細胞からHTLV-1プロウイルスゲノムを取り除く事はできなかった。従って、発症後のATL病態形成にHTLV-1がどのような関与を示しているかは解明できなかった。つまり、HTLV-1において腫瘍学の古典的仮説「発がん過程におけるパッセンジャー説」は未だ結論されていない。

近年、ゲノム編集技術が急速に進歩している。申請者らは HTLV-1 のプロウイルスゲノムを特異的に認識する Zinc Finger Nuclease (ZFN) の作出に成功した (Tanaka et al. Leukemia 2013)。これは世界で初めてプロウイルスを標的としたATL治療法を概念検証した報告として高く評価されている。我々はこの人工酵素が HTLV-1 潜伏感染細胞からプロウイルスを除去する活性を持つ事に気付いた。これを利用すれば上記の歴史的課題に終止符を打てると着想した。

2. 研究の目的

ATL由来細胞株からHTLV-1プロウイルスが除去された細胞クローンを樹立する。それらの悪性形質を増殖因子要求性、マウスにおける造腫瘍性等により評価する。並行して細胞の遺伝子発現プロファイリングを行い、細胞の形質変化を司る責任因子を同定することでATL発症後にプロウイルスが持つ病態形成への貢献度を解明する。

3. 研究の方法

要約: HTLV-1プロウイルス陽性のATL由来細胞株 ED-および TL-0mI に我々の開発したZFN (Tanaka et al. Leukemia 2013)を導入し、プロウイルス脱落細胞クローンを樹立する。プロウイルス陽性細胞クローンを対照として、低血清存在下での細胞増殖能、増殖因子要求性、軟寒天培地におけるコロニー形成能、免疫不全マウスにおける造腫瘍能を評価する。また、プロウイルス脱落による遺伝子発現プロファイリングを実施する。

(1) ウイルスベクターの構築

ZFNは2つのサブユニットからなる。これらを順次発現させる系と一度に発現させる実験系を並行して検討する。これはベクターの物理的な安定性や細胞内における安定性が影響を受けて生物活性の発揮が十分影響を受けるリスクを避けるためである。レトロウイルス Tet発現誘導システムとしてクロンテック社の Retro-X Tet-On Advanced Inducible Expression Systemを用い、HTLV-1 LTRを標的とするZFNはTanaka A, et al. Leukemia 2013に記載されたZFN1/2ペアを用いる。それぞれの遺伝子は特異的primerをデザインし人工合成したものを使用して増幅する。まず、ZFN2遺伝子を増幅し、pCX-Blaベクターにクローニングする。次に、ZFN1を増幅し、NotIにてpRetroX-Tight-Purベクターへクローニング

を行う。pCX-ZFN2-Bla単独、あるいはpRetroX-Tight-ZFN1-Pur およびpRetroX-Tet-On Advanced Vectorを293T細胞にco-transfectionし、さらに後者にはドキシサイクリンを加え培養し、その翌日に細胞からタンパク質を回収しWB用のサンプルを調整する。一方、レンチウイルスベクタープラスミドpLVSI-CMV PurとレンチウイルスベクタープラスミドpCMMPにZFN1/2ペアをIRESを挟んでクローニングする。ZFN1/2にはFLAGタグが付加されていることを利用し、anti-FLAGタグ抗体にてWestern blotを行い、ZFNタンパク質の発現を検出する。ZFNの機能はTanaka A, et al. Leukemia 2013に記載されたHTLV-1 LTR-firefly luciferase reporterあるいはdeletion Renilla luciferase reporterプラスミドとZFN発現ベクターのco-transfectionによるレポーターアッセイにて評価を行う。

(2) ZFN発現レンチウイルスの調整と細胞への導入

MLVのgag/pol発現ベクター、VSV-G発現ベクターおよびpCX-ZFN2-Blaベクターを293T細胞にco-transfectionし、培養上清からZFN2導入用レンチウイルスを回収する。これをED-およびTL-0ml細胞に感染させBlasticidinにて選択培養を行う。次にMLVのgag/pol発現ベクター、VSV-G発現ベクターおよびpRetroX-Tet-On Advanced Vectorを293T細胞にco-transfectionし、培養上清からTet-On Advancedトランス活性化因子導入用レンチウイルスを回収する。また、pRetroX-Tight-ZFN1-purベクターを用いて同様の方法でZFN1導入用レンチウイルスを回収する。これら2種類の組換えレンチウイルスを順次ZFN2発現細胞に感染させてBlasticidin、G418およびpuromycinにて選択培養を行う。得られた薬剤耐性細胞クローンに対し、ドキシサイクリン非存在下でZFNが検出限界以下で、存在下でZFN1およびZFN2両方が発現すること

をWestern blotにて確認する。なお、良好に系が作動しない場合にはTet-Off系とestrogen誘導系を順次検討する。並行してIRES系のレンチウイルスまたはレンチウイルスを同様な手法で作製して対象細胞に感染させpuromycinにて選択培養を行う。得られた薬剤耐性細胞クローンにZFN1およびZFN2両方が発現することをWestern blotにて確認する。

(3) HTLV-1プロウイルス除去細胞クローンの樹立

実験2で樹立した細胞に対し、発現誘導系においてはドキシサイクリン処理を2日間行い、その後limiting dilution法にて細胞のクローニングを行う。IRES系においては4日間puromycin処理された細胞をlimiting dilution法にて細胞のクローニングを行う。得られたクローンからDNAを抽出し、LTR領域およびgag領域のPCRを行う。LTR領域ではDNAの増幅が確認されるが、gag領域では増幅が見られないクローンが樹立できるか検証する。クローンの樹立が困難である場合、ZFNの発現による細胞毒性が疑われるため、HTLV-1陰性のJurkat、MOLT-4細胞において細胞クローンの樹立が可能かを評価する。細胞毒性が顕著な場合、発現量を低下させるため、ベクターにstuffer sequenceを挿入する。また、発現誘導系においては薬剤処理濃度を低下させる。IRES系はトランスフェクションを用い、細胞導入を蛍光タンパク質でモニタリングする。蛍光シグナル陽性細胞を選択してクローニングに供する。それでもクローンが樹立できない場合、HTLV-1プロウイルスゲノムの存在が細胞増殖に必須であると仮定し、TaxとHBZのtrans complementationの状況下またはIL-2存在下で同様の実験を行う。これでクローンが樹立できた場合には悪精度検証ステップに移るが、樹立できなかった場合にはプロウイルスのコピー数が多いS1T細胞で同様の実験

を行い、プロウイルスコピー数が減少したクローンを樹立する。

(4) HTLV-1プロウイルスの細胞悪性形質への貢献度の評価

HTLV-1プロウイルスが除去されたED、TL-0ml細胞（それぞれED HTLV、TL HTLVと命名）を用い、HTLV-1プロウイルスが細胞の悪性化にどの程度寄与しているのか検討を行う。方法としては、血清要求性試験、軟寒天における細胞増殖性試験、マウスにおける造腫瘍性試験にて評価する。悪性度の高い細胞は低い血清濃度でもよく増殖する。具体的には、0.1-1%FBS含有RPMI1640にてEDあるいはED HTLV、またはTL-0mlあるいはTL HTLVを培養し、経時的に細胞数を数えて増殖曲線を測定する。0.6%軟寒天を含むRPMI1640を培養皿に注ぎ固まらせる。そこにEDあるいはED HTLV、またはTL-0mlあるいはTL HTLVを混ぜた0.4-6%軟寒天を含むRPMI1640を注ぎ固まらせる。1-2週間培養を続け、コロニー形成したクローン数を数える。EDやTL-0mlはSCIDマウスの皮下に移植することにより腫瘍を形成することがわかっている。ED HTLVやTL HTLVをEDやTL-0mlと同様に 1×10^6 個の細胞をSCIDマウスの皮下に移植し、造腫瘍形成能を比較する。これらの実験を陰性対照と並行して行い、HTLV-1プロウイルスが持つ悪性形質維持への貢献度を評価する。プロウイルス陰性細胞がIL-2存在下でのみえられた場合にはIL-2がプロウイルスの存在をcomplementationするものと考え、IL-2非存在下での細胞増殖kinetics、軟寒天培地におけるコロニー形成能、SCIDマウスにおける造腫瘍性を評価する。TaxやHBZによるtrans complementationがプロウイルス陰性細胞樹立に必要な場合はそれ自身が直接的に細胞の悪性形質維持にプロウイルスの必要性とその責任因子を示していると考え。また、プロウイルスコピー数が減少

したクローンを検討する際にはウイルス遺伝子の発現量を定量して、gene-dose effectがあることを検証したうえで上記評価に供する。

4. 研究成果

HTLV-1プロウイルス除去のため、ZFNをレトロ・レンチウイルスベクター系でATL由来細胞株TL-0mlに導入しプロウイルスが除去された細胞クローンの樹立を試みた。ZFNのもつゲノム毒性に対応する為に、テトラサイクリンを利用した発現制御系を応用して細胞毒性を回避したうえで一過性に同期的なZFNの発現を誘導できる系の樹立を目指した。ZFN遺伝子を組み込んで発現がオフのクローンを得たが、発現誘導をかけてもTanaka A, et al.

Leukemia 2013に記載されたような明らかな細胞傷害が観察されず、完全に発現が抑制されずに低い発現量があったために標的LTRの改変がすでにおこっていたか、ZFNの活性が消失したクローンが選択されてゲノム毒性がないクローンが選択された可能性が示唆された。ゲノム毒性は非特異的なZFNのゲノム傷害活性に依存するため、選択されてきたクローンはaberrantなZFNをもつと考えられる。レトロウイルスによる遺伝子導入はしばしば送達する遺伝子に変異を導入してしまう性質があることにも符号する。条件の最適化などいくつかの検討を加えたが、レトロウイルスを技術的背景とするアプローチに限界があると考え、新たな技術を採用する事にした。

新しいアプローチは我々が独自に開発したタンパク質導入系LENAを利用し、遺伝子編集酵素を一過性にATL由来細胞株へ導入するものである(Aoki T, et al. Gene Ther 2010, 2011; Miyauchi K, et al. Sci Rep 2012)。LENAはリンパ球系細胞に対して極めてタンパク質導入効率が高い事が実証されている。ZFNはLENAとの相性が不透明であったが、すでにLENA粒子への封入に実績のあるCRISPR/Cas9

系を遺伝子編集ツールとして採用することにした(第3回日本ゲノム編集学会)。標的とするLTR配列はZFNが標的としている部位を踏襲し、4種類の標的部位を認識するLENAを調整した(Tanaka A, et al. Leukemia 2013)。HTLV-1陽性と陰性のT細胞株にタンパク質導入系を試験したところ、全種のLENAにHTLV-1陽性細胞に対して陰性細胞より高い細胞傷害性が観察された。これはプロウイルスへの特異的なゲノム編集の効果を反映するものと思われる。LENAを暴露したTL-0ml細胞の暴露後3日目の細胞プールから得られたゲノムDNAを鋳型にプロウイルスが除去されたゲノムを特異的に検出するPCRを施行したところ陽性反応が得られた。アプローチ方法を急遽変更したものの、結果的にATL細胞からHTLV-1プロウイルスを世界で初めて除去できる可能性を捉えたと示唆される。現在、この知見の再現性、定量的な解析、細胞クローンが持つ基本的な性質の同定を進めている。

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 1件)

Komano J*. Establishment of a secure differentiation and de-differentiation-inducing method by protein transduction system LENA (Review). **Impact**. 2018, Mar;2018 (2):82-84. doi: 10.21820/23987073.2018.2.82

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

駒野 淳 (KOMANO, Atsushi)

独立行政法人国立病院機構 名古屋医療センター・臨床研究センター 臨床検査科長
研究者番号: 60356251

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

武田 哲 (TAKEDA, Satoshi)
国立感染症研究所 研究員

田中 淳 (TANAKA, Atsushi)
大阪大学微生物学研究所助教

星野 忠次 (HOSHINO, Tyuji)
千葉大学薬学部 准教授

岡田 誠治 (OKADA, Seiji)
熊本大学エイズ学センター 教授