

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号： 12601
 研究種目： 挑戦的萌芽研究
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23659484
 研究課題名（和文） HTLV-1 による T 細胞分化制御機構のハイジャック

研究課題名（英文） HTLV-1 hijacks T-cell differentiation/function by deregulating Helios gene expression

研究代表者

渡邊 俊樹 (Watanabe Toshiki)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号： 30182934

研究成果の概要（和文）：本研究で我々は、HTLV-1 の感染により発症する成人 T 細胞白血病 (ATL) 患者において、リンパ球の分化・増殖の制御に不可欠な Helios の発現の欠失、または異常なスプライシングバリエーションの発現を発見した。さらに ATL 型 Helios はドミナントネガティブに働くだけでなく、細胞増殖の促進やアポトーシス抵抗性の向上を引き起こすこと、それは細胞の運動能や増殖能を制御する SIP pathway を過剰に活性化することに起因する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Adult T-cell leukemia is a T-cell neoplasm caused by HTLV-1 infection. In the present study, we found drastic deregulation of Helios expression in ATL cells. Helios is an Ikaros-family transcription factor and a pivotal regulator of T-cell differentiation and activation. Detailed investigations in transcript variants of Helios in PBMCs from ATL patients clarified that the majority of ATL patients demonstrated abnormal splicing patterns of Helios mRNAs, while four cases did not express Helios mRNA at the detectable level. We identified ATL-specific short Helios transcripts and further confirmed that resultant isoforms not only functioned dominant-negatively, but also reduced apoptotic sensitivity and increased proliferation of the cells, probably through activation of SIP pathway, which is deeply implicated to cell-motility and proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：CD4 陽性 T 細胞, HTLV-1 Tax, Helios, スプライス変異, ドミナントネガティブ

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (ATL) はヒトレトロウイルス HTLV-1 の感染により発症する末梢性 T 細胞の腫瘍性疾患である。生涯発症率は感染者の 5%

ほどとされているが、現在まで効果的な治療法は確立されておらず、早期の発症予防法の開発が望まれている。しかし ATL は HTLV-1 の感染に端を発し、50 年以上の長期潜伏期間に様々

な遺伝子異常が蓄積し多段階的に発症に至ると考えられており、その発症分子メカニズムは未だ不明な点が多い。

ATL 患者の PBMC は、ほとんどが腫瘍化した CD4 陽性 T 細胞で占められることから、HTLV-1 は CD4 陽性 T 細胞に選択的に感染すると考えられてきた。しかし最近 HTLV-1 はさまざまな細胞種に広汎に存在する膜レセプター GLUT1 を介して感染することが明らかとなり、感染時の一般性と腫瘍化時の特異性に矛盾が生じることとなった。実際、*in vitro* では HTLV-1 が B 細胞や内皮細胞、上皮細胞など多彩な細胞株に感染することが分かっている。そこで我々は「感染時に標的細胞特異性は無く、感染後に HTLV-1 が未分化の T 細胞の分化機構をハイジャックすることにより偏った CD4 陽性 T 細胞への分化を誘導している」という仮説を立てた。

これまで我々の研究室では、ATL 患者の網羅的遺伝子発現プロファイリングを行い、ATL 細胞に蓄積された数々の異常を発見してきた。本研究では、その中でも特にリンパ球の分化や増殖の制御に重要な Ikaros 転写因子ファミリーに着目した。Ikaros, Helios, Aiolos からなる Ikaros 転写因子ファミリーは、がん抑制因子として知られており、ヒトの様々な白血病において、そのゲノムの欠失や発現異常が報告されている。私たちは、Ikaros ファミリーの中で、特に ATL 患者において最も多くの遺伝子異常の蓄積が観察された Helios に注目して、この異常が ATL 発症に及ぼす機能的意義を解析した。

2. 研究の目的

前述の背景で述べたとおり、HTLV-1 は多種多様な細胞に感染する能力を持つにも関わらず、腫瘍化した ATL 細胞は CD4 陽性 T 細胞で占められている。よって、HTLV-1 の感染が被感染細胞の分化や機能を脅かし、複数の遺伝子異常の蓄

積が細胞の腫瘍化のトリガーとなること、遺伝子異常の蓄積によって ATL 細胞では正常な分化が妨げられ、“CD4 陽性 T 細胞”の表現型を持った細胞集団に偏っている可能性が考えられる。本研究ではこの仮説を検証するため、我々の研究室で最近発見された ATL 細胞での Ikaros ファミリー転写因子の異常、特に Helios の発現異常に注目した。Ikaros ファミリーは Ikaros, Helios, Aiolos の 3 種類からなる。Helios は、主に Ikaros のパートナーとして造血幹細胞の自己増殖能やその後の血球系の分化の制御に関わっている。また制御性 T 細胞 (Treg) の機能に関与するとの報告もある。そこで ATL 細胞で見られる Helios の異常が、T 細胞の分化機構や細胞の機能にどのような影響を与えるのか明らかにすることを目的に実験を行なった。

3. 研究の方法

<H23 年度>

1. ATL 細胞での Helios mRNA 発現異常の実態の把握: 網羅的遺伝子発現解析の結果、Helios mRNA のレベルが ATL 細胞で有意に上昇しているという結果を得た。しかしマイクロアレイの結果からは、どのような transcript variants が発現しているかを把握することはできない。そこで我々はまず ATL 細胞から得た cDNA プールについて、Helios mRNA の全長の RT-PCR を行い、健康人 CD4 陽性 T 細胞に比べどのような Helios mRNA の発現パターンが見られるかを検討した。また、それぞれの Helios mRNA variant をシーケンスし、ATL 細胞では Helios mRNA にどのようなスプライシング異常が起こっているか調べた。

2. 異常 Helios が T 細胞分化機構に与える影響: Helios の正常な機能には、C 末の 2 量体化ドメインを介してホモまたは Ikaros とのヘテロ 2 量体を形成することが必要である。ATL 患者

PBMC では特に splicing 異常によって N 末の DNA 結合ドメインの多くを欠損した異常型 Helios が顕著に観察された。この異常型 Helios について、野生型 Helios や Ikaros との二量体形成能、転写因子としての機能を検討した。

<H24年度>

1. ATL型Helios(Hel-5)の細胞機能への影響: 一年目の研究により、ATL患者のPBMCにおいては野生型Helios mRNAがほとんど消失し、エクソンを複数欠損した短いtranscript variantが多数発現していることを発見した。その中でATL患者特異的に、かつ高頻度に発現しているHelios-5型variant (Hel-5)に注目し、そのコードするHel-5 isoformを過剰発現させたJurkat細胞の細胞増殖能やアポトーシス感受性を検討した。

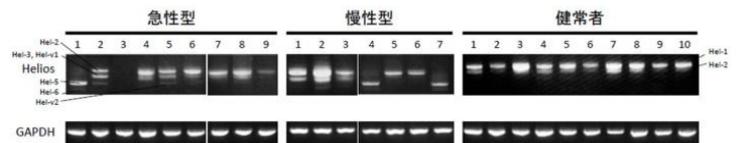
2. マイクロアレイ解析によるATL型 Helios の細胞への影響の検討: これまでの結果から、ATL型 Helios (Hel-5)はドミナントネガティブとして働くことにより、野生型 Helios や Ikaros の機能をも阻害していると考えられる。そこでその仮説を検証するため、Hel-5を過剰発現したJurkat細胞と、野生型 Helios または野生型 Ikaros をknockdownしたJurkat細胞において遺伝子発現マイクロアレイ解析を行い、それぞれの細胞集団の持つ異常を比較した。

4. 研究成果

<H23年度>

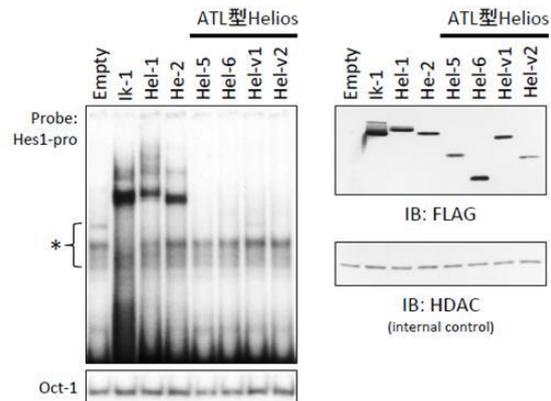
1. ATL細胞でのHelios mRNA発現異常の実態の把握: ATL細胞でのHelios mRNA RT-PCRおよびシーケンスにより、ATL患者では健常者で多く発現している野生型Heliosの発現量が減少、またはほとんど欠失し、exon 3の一部を欠損したHel-2の発現量が有意に上昇していた。さらに、健常者では検出されないHeliosの短いバリエーションが複数発現していることも分

かった。この中でも特にexon2, 3, 4を欠失したHel-5の発現が最も高頻度に見られた。



<図1>ATL患者と健常人での Helios mRNA の RT-PCR

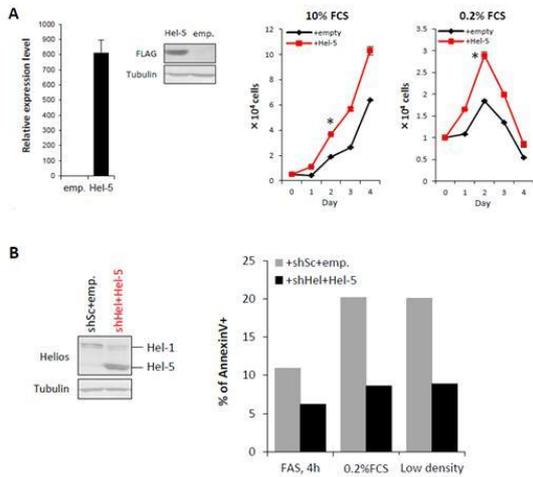
2. 異常 Helios が T 細胞分化機構に与える影響: Hel-5を始めとするATL特異的な異常Heliosは、野生型 Helios や Ikaros と結合するが、DNA結合能を失っており、転写因子としての機能を持たないことを見出した。つまりATL細胞で発現している異常 Helios は、機能を果たさないだけでなく、正常な Helios や Ikaros と結合することにより、それらの機能も阻害するドミナントネガティブな存在であると考えられる。



<図2>Hes1プロモーター配列に対するEMSA

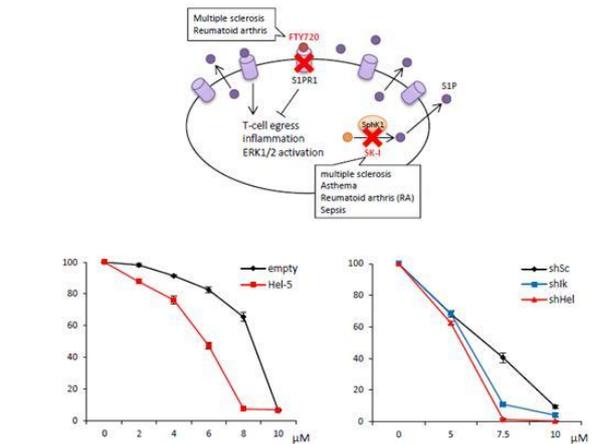
<H24年度>

1. ATL型Helios(Hel-5)の細胞機能への影響: Hel-5を安定的に過剰発現するJurkat細胞を樹立し、その細胞の細胞増殖速度やアポトーシス感受性をコントロール細胞と比較した結果、Hel-5を発現している細胞では細胞増殖能が増大し、アポトーシス感受性が低下していることが分かった。



<図3> Hel-5を過剰発現するJurkat細胞での細胞増殖アッセイ(A)およびAnnexinV(アポトーシス)陽性細胞の検出(B)

2. マイクロアレイ解析によるATL型Heliosの細胞への影響の検討: Hel-5の過剰発現、または野生型HeliosやIkarosをノックダウンしたJurkat細胞において、遺伝子発現マイクロアレイ解析を行った。その結果これらの細胞で共通してS1PR1およびS1PR3 mRNAの発現が上昇しており、pathway解析によっても、共通してS1P pathwayの異常が検出された。よってHel-5の過剰発現、あるいはHeliosやIkarosのノックダウンによりIkarosファミリーの機能を阻害すると、S1P経路を過剰に活性化させる、つまりHeliosとIkarosの機能が、S1P pathwayの制御に関わっている可能性が示唆された。S1Pは5つのGタンパク質共役受容体S1PR1~5を介して、細胞の増殖、生存、運動性の向上、ケモカインなどのサイトカインの産生などを引き起こす。Hel-5過剰発現または野生型HeliosノックダウンJurkat細胞を、S1P経路阻害剤FTY720存在下で培養すると、増殖が抑制され細胞死が誘導されやすくなることがわかった。これにより、ATL細胞での野生型Heliosの低下やHel-5の過剰発現によって引き起こされる細胞増殖能の増加や抗アポトーシス能が、S1P経路の過剰活性化に依存している可能性が示唆された。



<図4> S1P経路阻害剤 FTY720存在下でのcell viabilityアッセイ

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) 査読有

- 1) Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami K, Nakano K, Sato-Otsubo A, Muto S, Sanada M, Yamochi T, Kobayashi S, Utsunomiya A, Iwanaga M, Yamaguchi K, Uchimarui K, Ogawa S, Watanabe T. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promotes T-cell growth. **Cancer Sci** 104(5), 32pp, 2013, in press (doi: 10.1111/cas.12181)

[学会発表] (計5件)

- 1) Asanuma S, Nakano K, Yamagishi M, Ogawa S, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Watanabe T, "Aberrantly spliced Helios variants in ATL cells induce T cell proliferation", 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月20日(2012年10月19日—10月21日)
- 2) 浅沼里実, 川波克明, 山岸 誠, 中野和民, 山口一成, 宇都宮 與, 渡邊俊樹, 「新規ATL型 Helios は Ikaros 転写因子ファミリーの機能を阻害し、T細胞の増殖を促進する」、第34回日本分子生物学会年会、

パシフィコ横浜、2011年12月14日(2011年12月13日～16日)

- 3) 浅沼里実、川波克明、山岸誠、中野和民、山口一成、宇都宮與、渡邊俊樹、「新規ATL型 Helios は Ikaros 転写因子ファミリーの機能を阻害し、T 細胞の増殖を促進する。」、第70回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、2011年10月4日(2011年10月3日～5日)
- 4) Asanuma S, Kawanami K, Yamagishi M, Nakano K, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Watanabe T, “Novel Helios variants found in ATL cells hamper functions of Ikaros family proteins and induce T cell proliferation”, The XXV Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases, Yayoi Auditorium of Univ.Tokyo, Sep. 15-17, 2011
- 5) Asanuma S, Kawanami K, Nakano K, Yamagishi M, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Watanabe T, “Over-expression of dominant-negative Helios isoforms in adult T-cell leukemia (ATL) cells “, The 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, Lueven, Belgium, June 5-8, 2011

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 俊樹 (Watanabe Toshiki)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：30182934

(2)研究分担者

中野 和民 (Nakano Kazumi)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：60549591