

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08506

研究課題名(和文) HTLV-1感染ヒト化マウスを用いた未発症感染キャリア成立要因の解析

研究課題名(英文) Analysis of factors involved in the establishment of asymptomatic carrier state in HTLV-1 infected humanized mice

研究代表者

藤澤 順一 (FUJISAWA, Jun-ichi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：40181341

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感染ヒト化マウスの個体レベルでの感染過程において、感染4週以内ではTax高発現の感染クローンが優先的に増殖するものの、感染4週以降、抗Tax CTLの発現誘導に伴い、Tax高発現クローンの減少が観察された。一方、感染8週以降の後期課程では、脾臓で発現が見られる宿主遺伝子のイントロン内に、転写方向と逆方向にプロウイルスが挿入されたことに起因すると考えられるHBZ優位に発現する感染クローンが選択的に増殖していた。これらの結果は、感染後期におけるTax発現クローンの排除とHBZ発現細胞の選択が、緩徐な腫瘍増殖およびキャリア状態成立の主要な要因となっていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In the course of HTLV-1 infection in humanized mouse, highly-Tax-expressing infected-T-cell clones expanded preferentially in the first four weeks of infection but subsequently were reduced provably due to the induction of cytotoxic T-lymphocytes against Tax in the later period. Instead, after eight weeks post infection, infected clones were composed of T-cells expressing larger amount of HBZ most likely because of reverse orientation of the provirus integration to the direction of host gene transcription in the introns. Thus, the elimination of Tax-expressing clones and the selective growth of HBZ expressing clones are suggested to be a major factor to sustain the slow growth of infected cells to establish the asymptomatic carrier state of infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HTLV-1 ATL ヒト化マウス Tax HBZ

1. 研究開始当初の背景

(1)重症免疫不全 NOG-SCID マウス骨髄内への臍帯血由来造血幹細胞の移植により作製したヒト化マウスに HTLV-1 を感染させることにより、感染数ヶ月で、肝・脾腫を伴う白血病様病態の再現に成功した。

(2) 感染中期の HTLV-1 感染 T 細胞では Tax mRNA の有意な発現が観察されたものの、感染後期で腫瘍性増殖の遅延を示す HTLV-1 感染 CD25(+)T 細胞内では抑制されており、感染過程における Tax 発現抑制の重要性が示唆された。

(3) HTLV-1 感染ヒト化マウス脾臓内に抗 TaxCTL の発現が確認されることから、腫瘍細胞選択過程および感染キャリア成立過程における抗 TaxCTL の関与が想定された。

2. 研究の目的

ヒト造血系を再構築したヒト化マウスに HTLV-1 を感染させると感染細胞の腫瘍性増殖を伴う ATL 様の病態が再現されるが、一部の感染個体では、長期間感染が維持される未発症キャリア様病態が成立する。この長期感染が成立する機序を、HTLV-1 の調節遺伝子 Tax および HBZ の発現調節と関連付けて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 重症免疫不全 NOG-SCID マウス骨髄内への臍帯血由来造血幹細胞の移植により作製したヒト化マウスに HTLV-1 を感染させ、末梢血細胞における CD45、CD3、CD4、CD8、CD25 の発現を感染 2.5~3 週毎にセルソーターを用いて経時的に測定した。

(2)Tax 蛋白の全長にわたり、5~8 アミノ酸の重複を持った連続した 12 種類の 40~42 アミノ酸長のペプチドを合成し、TLR7 ligand R848 とともに、隔週で 3 回ヒト化マウス皮下にワクチン投与した後に HTLV-1 を感染させ、末梢血における感染細胞の動態を観察した。

(3)HTLV-1 感染 1~18 週のヒト化マウス脾臓内リンパ球からゲノム DNA および RNA を調整し、定量的 PCR 法でプロウイルス量(PVL)を計測すると共に Tax mRNA および HBZ mRNA の発現量を定量した。

(4)制限酵素 PstI で切断、T4-ligase で自己環状化した HTLV-1 感染ヒト化マウスリンパ球ゲノム DNA を鋳型として、HTLV-1 Tax 遺伝子領域および LTR-R5 領域のプライマーDNA を用いて inverse-long-PCR を行い、Tax 遺伝子領域内の制限酵素で切断後、プラスミドにサブクローニングし、得られたプロウイルス組み込みゲノム領域の塩基配列を決定した。

(5)組み込みゲノム領域の塩基配列情報をもとに、NCBI Blast を検索することで、当該ゲノム領域の遺伝子を同定した。

(6)組み込み部位のゲノム塩基配列と LTR-U5 領域およびプロウイルス pX 領域を用いた定量的 PCR を行い、その比率から感染マウス脾臓における当該感染細胞の占有率を算出した。

4. 研究成果

(1)感染後期における細胞内 Tax の発現抑制

ヒト化マウスへの HTLV-1 感染細胞株の腹腔内投与後、感染 4 週以内に末梢血感染細胞の急激な増加を伴い白血病死する個体群と感染 4 週以上生存する個体群に分かれた(図 1)。

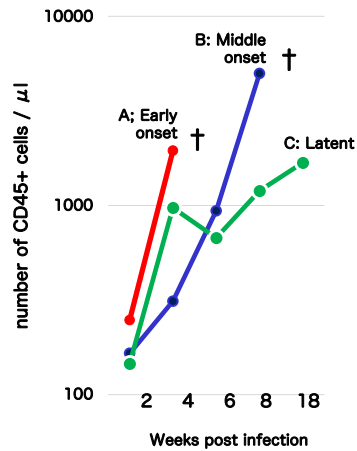


図 1. HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける感染細胞の 3 種類の増殖様式

そこで、ゲノムに組み込まれたプロウイルス DNA とヒトβグロビンゲノム DNA の比から産出したウイルス感染率で補正した感染細胞あたりの Tax mRNA の発現を比較したところ、感染 4 週以降の感染細胞では、感染 4 週以内の細胞と比較して Tax mRNA の発現は抑制されていた(図 2 a)。

HTLV-1 感染者末梢血内では Tax mRNA をはじめとするウイルス遺伝子の発現が抑制されているが、これを体外(ex vivo)で培養すると発現が再開することが知られている。そこで、HTLV-1 感染ヒト化マウスの脾臓細胞を ex vivo で培養したところ、感染時期にかかわらず Tax mRNA の発現は 10~100 倍増加したが、増加後の発現量は感染後期の感染細胞において低い傾向が見られた(図 2 b)。この事実はゲノムレベルでの遺伝子発現の抑制が Tax 遺伝子の発現抑制に影響を及ぼしている可能性を示唆している。

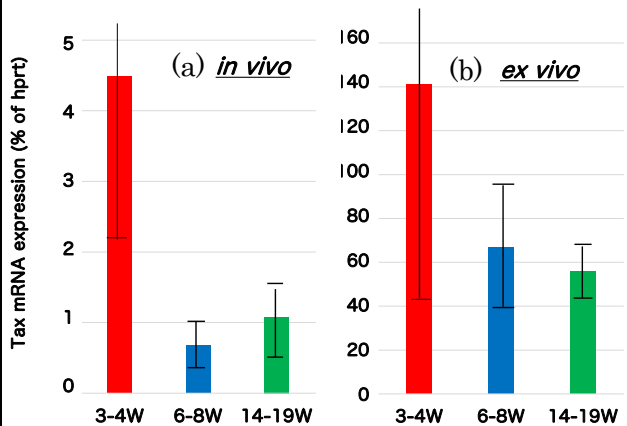


図 2. HTLV-1 感染細胞あたりの Tax mRNA 発現量の経時変化 (a)脾臓内 (b)ex vivo 培養 24 時間後

## (2) Tax ワクチンによる腫瘍性増殖抑制

感染中期以降における宿主免疫による Tax 発現細胞の排除が想定されたため、Tax CTL による感染細胞の増殖抑制を検証する目的で、ヒト化マウスに Tax ペプチドワクチンを投与したところ、HTLV-1 感染細胞の腫瘍性増殖が抑制された (図 3)。また、Tax ペプチドワクチン投与後のヒト化マウス脾臓内で Tax テトラマー陽性 CD8T 細胞の増加が観察された。これらの事実は感染細胞の腫瘍性増殖抑制に抗 Tax CTL が関与していることを示唆している。

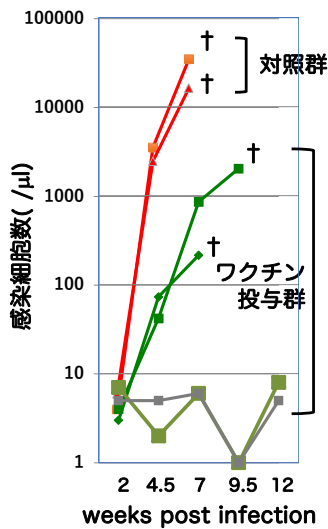


図 3. Tax ペプチドワクチン投与による HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける感染細胞の増殖抑制

## (3) 感染後期における HBZ の発現上昇

HBZ は HTLV-1 プロウイルスの Tax 遺伝子の相補鎖にコードされ、機能的にも Tax と相反する転写調節活性を持つことが知られるが、ともにトランスジェニックマウスではリンパ腫を誘導することから、感染過程における発現調節に興味を持たれる。そこで、感染 3 週～18 週のヒト化マウス脾臓細胞における HBZ mRNA の発現を測定したところ、Tax mRNA と相反する発現を示し、感染後期に最大となることが明らかとなった (図 4)。

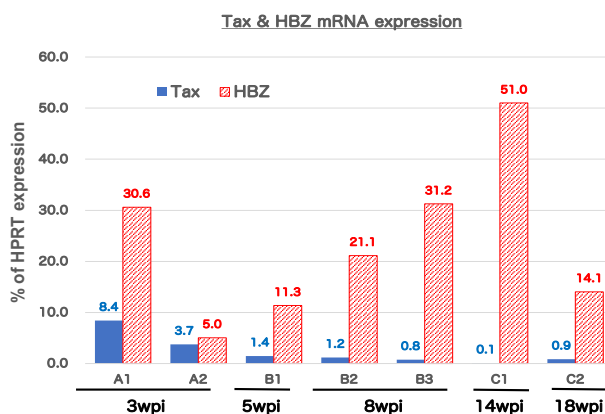


図 4. HTLV-1 感染細胞あたりの Tax および HBZ mRNA 発現量の経時変化

## (4) プロウイルス挿入部位のウイルス遺伝子発現への影響

感染 3～18 週のヒト化マウス脾臓細胞のゲノム DNA を用いた inverse-long-PCR により、プロウイルスの挿入ゲノム DNA 断片をクローニングし、NCBI Blast でその遺伝子を検索したところ、それぞれの感染マウスにおいて多く存在すると考えられる感染クローンは、そのほとんどが脾臓で一定の発現がある遺伝子のイントロン内に存在することが示された (図 5)。

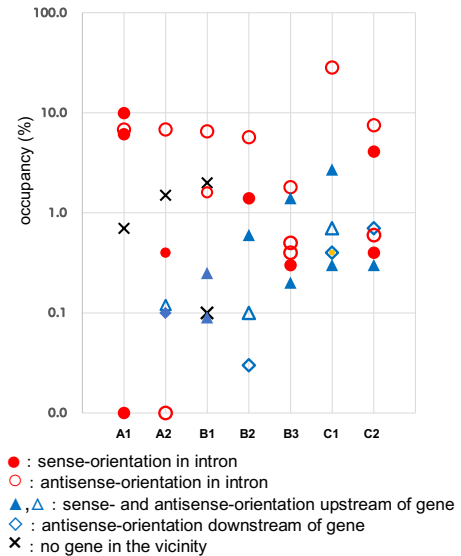


図 5. HTLV-1 感染ヒト化マウス脾臓細胞でのプロウイルス挿入ゲノム部位と感染マウス脾臓における感染クローンの占有率

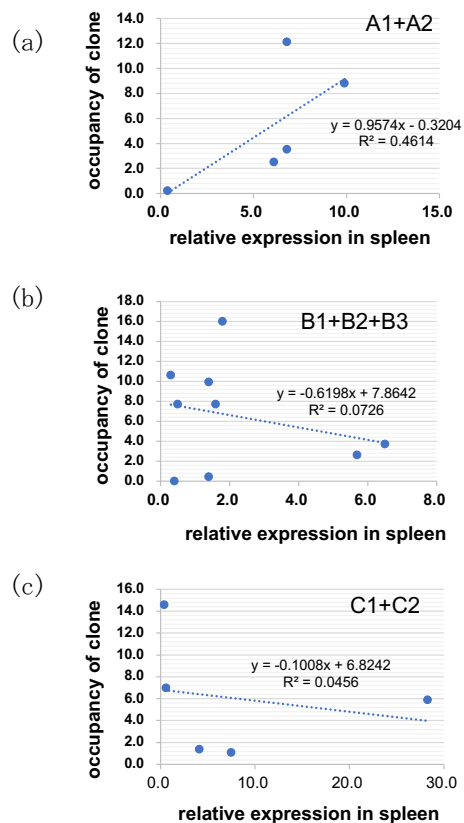


図 6. 感染クローンの脾臓内での占有率と挿入部位遺伝子の脾臓内での発現との相関

さらに、感染初期においては、感染クローンのクローン占有率と挿入したゲノム遺伝子の脾臓内での発現率との関連は正の相関を示し、ウイルス遺伝子の発現が感染クローンの増殖に関与したことを示唆した(図6 a)。一方、感染中・後期においては、クローン占有率と挿入遺伝子の脾臓内での発現率は負の相関を示す傾向が得られ(図6 b, c)、宿主免疫誘導後の感染中・後期では、ウイルス遺伝子の発現が低い感染クローンが選択された可能性が示唆された。

#### (5) ウイルス遺伝子発現へのプロウイルス挿入方向の影響

感染経過に従った感染細胞レベルでの Tax mRNA の発現抑制と同期した HBZ mRNA の発現上昇の原因の可能性として、宿主遺伝子へのプロウイルスの挿入方向を解析したところ、Tax mRNA の高い発現が観察された感染初期の細胞で高い占有率を示す感染クローンでは、宿主遺伝子の発現方向と同一の方向にプロウイルスが挿入されていたが、Tax mRNA が減少し HBZ mRNA の発現が上昇した感染中・後期の細胞では、ほとんどが宿主遺伝子の発現方向と逆方向にプロウイルスの挿入が検出された(図5)。この結果は、挿入された遺伝子の転写の方向が、同一プロウイルスゲノム上の Tax あるいは HBZ の転写量に影響を及ぼし、その結果、感染初期では Tax 発現が高い感染クローンが優位に増殖するのに対し、感染後期においては HBZ 発現が高い感染クローンが選択的に増加した可能性を強く示唆している。

以上の結果から、HTLV-1 感染ヒト化マウスの個体レベルでの感染過程において、感染初期には Tax 高発現のクローンが優先的に増殖するものの、感染中期以降、抗 Tax CTL の発現誘導に伴い、Tax 高発現クローンの選択的除去が起こる一方、プロウイルスの挿入方向に起因して HBZ 優位に発現する感染クローンが選択される結果、HBZ の活性が感染後期課程における緩徐な腫瘍増殖およびキャリア状態成立の主要な要因となっていると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Rie Furuta, Jun-ichiro Yasunaga, Michi Miura, Kenji Sugata, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari, Takaharu Ueno, Norihiro Takenouchi, Jun-ichi Fujisawa, Masakazu Shimizu, Fumihiko Matsuda, Anat Melamed, Charles R Bangham, Masao Matsuoka. Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo. PLOS Pathogens, 査読有、vol.13、No.11、2017、e1006722  
DOI: 10.1371/journal.ppat.1006722
- ② M.Miwa, C. Ida, S. Yamashita, M. Tanaka, J. Fujisawa. Poly(ADP-ribose): Structure, Physicochemical Properties and Quantification In Vivo. Curr. Protein Pept. Sci., 査読有、vol.117、2016、683-692,  
DOI: 10.1371/journal.ppat.1006722

- ③ Taka-aki Takeda, Machiko Sasai, Yuka Adachi, Keiko Ohnishi, Jun-ichi Fujisawa, Shingolzawa, Shigeru Taketani. Biochem. Potential role of heme metabolism in the inducible expression of heme oxygenase-1. Biochem. Biophys. Acta, 査読有、vol.1861、No.7、2017、1813-24  
DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.03.018

- ④ Jun-ichi Fujisawa, Sung-il Lee, Jinchun Yao, Yihua Ren, Masakazu Tanaka: Tax peptide vaccine suppressed the leukemia in humanized mouse. Retrovirology、査読無、12(Suppl1)、2015、O43

DOI: 10.1186/1742-4690-12-S1-O43

- ⑤ Masakazu Tanaka, Jinchun Yao, Sung-il Lee, Yihua Ren, Norihiro Takenouchi, Jun-ichi Fujisawa. Induction of APOBEC3B cytidine deaminase gene in HTLV-1 infected T-cells of ATL model mouse. Retrovirology、査読無、12(Suppl 1)、2015、P11

DOI: 10.1186/1742-4690-12-S1-P11

[学会発表] (計 18 件)

- ① Takaharu Ueno, Ancy Joseph, Yuihua Ren, Jinchun Yao, Sung-il Lee, Masakazu Tanaka and Jun-ichi Fujisawa. Analysis of HBZ gene product function in HTLV-1 infected mouse model. 第65回日本ウイルス学会学術集会 2017.10.24-26、大阪国際会議場(大阪)
- ② Masakazu Tanaka, Takataro Fukuhara, Sung-il Lee, Yihua Ren, Jinchun Yao, Norihiro Takenouchi, Yoshihiro Ueda, Tatsuo Kinashi, Jun-ichi Fujisawa. Effects of Tax vaccine adjuvants in HTLV-1 humanized mice. 第76回日本癌学会学術集会、2017.9.28-30、パシフィコ横浜(横浜)
- ③ 田中正和、福原貴太郎、竹之内徳博、任翊华、姚錦春、李成一、植田祥啓、木梨達雄、藤澤順一、ヒト化マウスを用いたHTLV-1感染予防ワクチンにおけるアジュバント効果の組織病理学的検討第4回日本HTLV-1学会学術集会、2017.8.18-20、関西医科大学(枚方)
- ④ 大村裕樹、西川瑞希、Ancy Joseph、上野孝治、藤澤順一、標的細胞との細胞接着による感染細胞プロウイルスの活性化、第4回日本HTLV-1学会学術集会、2017.8.18-20、関西医科大学(枚方)
- ⑤ 西川瑞希、大村裕樹、上野孝治、田中勇悦、藤澤順一、抗HTLV-1抗体によるHTLV-1感染の活性化、第4回日本HTLV-1学会学術集会、2017.8.18-20、関西医科大学(枚方)
- ⑥ Ancy Joseph, Takaharu Ueno, Yihua Ren, Jinchun Yao, Sung-il Lee, Masakazu Tanaka, Jun-ichi Fujisawa. Both HBZ Protein and mRNA are Required for Leukemic Growth of HTLV-1-infected T cells in Humanized Mouse Model、18th International Conference on Human Retrovirology、2017.3.7-10、ホテルグランドアーク半蔵門(東京)
- ⑦ Masakazu Tanaka, Yihua Ren, Jinchun Yao, Sung-il Lee, Norihiro Takenouchi, Jun-ichi Fujisawa. Effect of Adjuvant in the Tax Vaccination of Humanized Mouse to Prevent HTLV-1 Infection、18th International Conference

on Human Retrovirology, 2017.3.7-10、ホテル  
グランドアーク半蔵門(東京)

⑧Masakazu Tanaka, Yihua Ren, Jinchun Yao,  
Sung-il Lee, Norihiro Takenouchi, Jun-ichi  
Fujisawa, Effect of Adjuvant in the Tax  
Vaccination of Humanized Mouse to Prevent  
HTLV-1 Infection, 18th International Conference  
on Human Retrovirology, 2017.3.7-10、ホテル  
グランドアーク半蔵門(東京)

⑨Norihiro Takenouchi, Masakazu Tanaka, Jun-  
ichi Fujisawa, Establishment of an in vitro  
HTLV-1 Infection Model Via Dendritic Cells,  
18th International Conference on Human  
Retrovirology, 2017.3.7-10、ホテルグランド  
アーク半蔵門(東京)

⑩Rie Furuta, Jun-ichirou Yasunaga, Michi  
Miura, Kenji Sugata, Akatsuki Saito, Hirofumi  
Akari, Takaharu Ueno, Norihiro Takenouchi, Jun-  
ichi Fujisawa, Ki-Ryang Koh, Masakazu Shimizu,  
Fumihiko Matsuda, Anat Melamed, Charles R  
Bangham, Masao Matsuoka, HTLV-1 Infection in  
Multiple lineages of Hematopoietic Cells, 18th  
International Conference on Human  
Retrovirology, 2017.3.7-10、ホテルグランド  
アーク半蔵門(東京)

⑪任 翊華、田中正和、姚 錦春、李 成  
一、藤澤順一、ATL 発症過程における感染  
細胞内Tax 遺伝子発現の変動、第3回日本  
HTLV学会学術集会、2016.8.26-28、鹿児島

⑫Ancy Joseph、Takaharu Ueno, Jun-ichi  
Fujisawa, Establishment of HTLV-1 infected  
Jurkat cell lines with mutated Tax and HBZ  
genes, 第3回日本HTLV学会学術集会、  
2016.8.26-28、鹿児島県市町村自治会館(鹿  
児島)

⑬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  
学会学術集会、2016.8.26-28、鹿児島県市  
町村自治会館(鹿児島)

⑭古田梨愛、安永純一郎、三浦未知、菅田謙  
治、齋藤暁、明里宏文、上野孝治、竹之内徳  
博、藤澤順一、清水正和、松田文彦、Melamed  
Anat、Charles Bangham、松岡雅雄、血液系細  
胞における HTLV-1 感染とその意義、第3回  
日本 HTLV 学会学術集会、2016.8.26-28、鹿児  
島県市町村自治会館(鹿児島)

⑮ Masakazu Tanaka, Jinchun Yao, Sung-il Lee,  
Yihua Ren, Norihiro Takenouchi and Jun-  
ichi Fujisawa. Induction of APOBEC3B cytidine  
deaminase gene in HTLV-1 infected T-cells of  
ATL model mouse. 第74回日本癌学会学術総  
会、2015.10.8-10、名古屋国際会議場(名古屋)

⑯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、2015.8.21-23、東京大学医科学研究所(東  
京)

⑰Jun-ichi Fujisawa, Sung-il Lee, Jinchun Yao,  
Yihua Ren and Masakazu Tanaka: Tax peptide  
vaccine suppressed the leukemia in humanized  
mouse. 17th Conference on Human Retroviruses:  
HTLV and Related Viruses, 2015.6.18-21, Trois  
Ilets, Martinique

⑱ Masakazu Tanaka, Jinchun Yao, Sung-il Lee,  
Yihua Ren, Norihiro Takenouchi and Jun-  
ichi Fujisawa. Induction of APOBEC3B cytidine  
deaminase gene in HTLV-1 infected T-cells of  
ATL model mouse. 17th Conference on Human  
Retroviruses: HTLV and Related Viruses,  
2015.6.18-21, Trois Ilets, Martinique

[図書] (計 1 件)

Jun-ichi Fujisawa, Springer Japan KK, Chapter 2.  
Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-  
1), Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (eds. T.  
Watanabe and T. Fukushima), 2017, p.3-31 in  
p.1- 169

[その他]

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/microbiol/>

[http://www.kmu.ac.jp/graduate\\_school/2671t80000008f16.html](http://www.kmu.ac.jp/graduate_school/2671t80000008f16.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤澤 順一 (FUJISAWA, Jun-ichi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：40181341

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし