

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09345

研究課題名(和文) HTLV-1の炎症原因遺伝子HBZによるHAM発症機構の解明とその制御

研究課題名(英文) Investigation on molecular mechanisms of HAM/TSP pathogenesis mediated by the interactions between HBZ and its target host factors.

研究代表者

齊藤 峰輝 (Saito, Mineki)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：40398285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：HTLV-1の転写制御因子HBZの塩基配列には2つの型が存在し、A型を持つ感染者はB型を持つ感染者よりHAM発症リスクが約2倍高いことが知られている。本研究では、ウイルス型特異的HBZの標的遺伝子構成の差を明らかにすることでHAMの病態解明と新規治療薬開発につながる研究シーズの発掘を試みた。テトラサイクリン遺伝子発現調節システムを構築して、ヒトCD4陽性T細胞中でウイルス型特異的HBZにより発現誘導される遺伝子を網羅的にスクリーニングした結果、HAMの新規バイオマーカー・治療標的候補となりうる炎症関連遺伝子、免疫老化関連遺伝子、non-coding RNA等の多種多様な候補遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Among HTLV-1-infected individuals, there is an association between HTLV-1 subgroups (subgroup-A or -B) and the risk of HAM/TSP in the Japanese population. To investigate the role of HTLV-1 subgroups in viral pathogenesis, we studied the functional difference in the subgroup-specific viral transcriptional regulator HBZ by microarray analysis followed by validation using clinical samples derived from HTLV-1 infected individuals. Transcriptional changes in Jurkat Tet-On human T-cells that express each subgroup of HBZ protein under the control of an inducible promoter showed different target gene profiles. Interestingly, HBZ induced the expression of different classes of non-coding RNAs (ncRNAs), as well as genes related to inflammation and CD4 T-cell senescence. These newly identified HBZ target genes may constitute candidates for novel biomarker and therapeutic target of HAM/TSP.

研究分野：ウイルス学・神経内科学

キーワード：HTLV-1 HBZ 慢性炎症 免疫老化

1. 研究開始当初の背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス (Human T cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は世界ではじめて発見されたヒトレトロウイルスであり、HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: HAM) および成人 T 細胞白血病 (Adult T cell leukemia: ATL) の原因ウイルスである。HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる転写制御因子 HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) は、宿主因子との相互作用を介してウイルスならびに細胞性遺伝子を制御することで HTLV-1 感染細胞の活性化や細胞増殖に関与するとされている。我々は過去に、HBZ 遺伝子の発現量が HAM 患者末梢血単核球 (PBMC) 中の HTLV-1 プロウイルス量 (PVL) および運動障害度・髄液中炎症マーカー濃度と有意な正の相関を示すことを報告した (Saito M et al. Retrovirology 2009)。また、HTLV-1 の感染標的である CD4 陽性 T 細胞に HBZ を強発現させたトランスジェニックマウスでは、CD4 陽性ヘルパー T 細胞の皮膚・肺への浸潤とサイトカイン産生異常、抑制機能が障害された誘導性 inducible Treg (iTreg) の増加、Foxp3 陰性 IFN- γ 産生 T 細胞に変化した iTreg による炎症増強等、様々な免疫学的異常所見が報告されている。すなわち、HBZ は HTLV-1 感染による慢性持続性炎症形成の原因遺伝子と考えられる。一方、興味深いことに、HBZ の塩基配列には 2 つの遺伝子型が存在し、サブグループ A 型を持つ感染者は B 型を持つ感染者より HAM 発症リスクが約 2 倍高いことが知られている。そこで我々は、HBZ のウイルス型が HAM 発症感受性を規定する分子メカニズムを解析することを通じて HAM の発症病態を解明し、新規治療法・発症予防法の開発に資する研究シーズを発掘することを目的に本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ウイルス型特異的 HBZ の生物学的機能の差が標的遺伝子の発現誘導に及ぼす影響を解析することで HAM 発症に関連する細胞性因子を同定し、さらにそれら標的細胞性因子の HTLV-1 感染者生体内における発現動態を解析して臨床病態と詳細に比較検討することで、HAM 発症機序の解明と新規治療法・発症予防法の開発に資する研究シーズを探索・発見することである。そのため、以下の 4 つの研究を並行して行う。ヒト CD4 陽性 T 細胞株を用いたテトラサイクリン発現誘導システムによる HBZ-A/-B 誘導系の構築。マイクロアレイ解析による各ウイルス型に共通あるいは特異的な HBZ 標的遺伝子の同定。HBZ により発現制御される HAM 発症関連候補遺伝子の解析。HTLV-1 感染者 PBMC を用いた HBZ およびその標的遺伝子の感染者生体内における発現動態と臨床病態との比較解析。

3. 研究の方法

(1) ヒト CD4 陽性 T 細胞株を用いたテトラサイクリン発現誘導システムによる HBZ-A/-B 誘導系の構築

テトラサイクリン応答プロモーターの下流に全長の HBZ 遺伝子を組み込んだコンストラクトを構築する。これをヒト CD4 陽性 T 細胞株 (Jurkat Tet-ON 細胞) に導入して、テトラサイクリン添加によりウイルス型特異的 HBZ が発現誘導されることを確認する。

(2) マイクロアレイ解析による各ウイルス型に共通あるいは特異的な HBZ 標的遺伝子の同定

ウイルス型特異的 HBZ の発現誘導前後で変動する遺伝子群をマイクロアレイで網羅的にスクリーニングする。データマイニングにより、各ウイルス型 HBZ によって共通あるいは特異的に発現制御される標的遺伝子群を同定する。

(3) HBZ により発現制御される HAM 発症関連候補遺伝子の解析

HBZ の発現誘導に伴いサブタイプ特異的または共通して変動が認められた標的遺伝子群から、炎症性サイトカイン・ケモカイン遺伝子、免疫応答・抑制に関与する遺伝子等、HAM の発症病態への関与が想定される疾患関連候補遺伝子を抽出する。それらの HTLV-1 感染、非感染ヒト T 細胞株における発現を解析し、マイクロアレイの結果と比較する。さらに、遺伝子型特異的 HBZ が標的遺伝子の発現に及ぼす機能的意義について *in vitro* 実験系で解析する。

(4) HTLV-1 感染者 PBMC を用いた HBZ およびその標的遺伝子の感染者生体内における発現動態と臨床病態との比較解析

自家製抗 HBZ 単クローン抗体を用いて作製したサンドイッチ ELISA を用いて、HTLV-1 感染・非感染ヒト T 細胞株および ATL、HAM 患者、無症候性キャリアー (asymptomatic carrier: HCs) PBMC 抽出液中の HBZ 蛋白質を定量する。リコンビナント HBZ を用いた ELISA で、血清中抗 HBZ 抗体を定量する。PBMC 中の HBZ mRNA および PVL を Real-Time qPCR で定量する。HBZ の発現誘導に伴いサブタイプ特異的または共通して変動が認められた宿主因子のうち、HAM の病態に関連があると考えられる発症関連候補遺伝子を抽出し、HTLV-1 感染者 (HAM、ATL、HCs) PBMC における発現動態と臨床病態との関連を解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト CD4 陽性 T 細胞株を用いたテトラサイクリン発現誘導システムによる HBZ-A/-B 誘導系の構築

リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (rtTA) は、ドキシサイクリン (Dox) 存在下でテトラサイクリン応答因子プロモーターに結合して目的遺伝子の発現を活性化する。そこで、rtTA を安定的に発現するヒト T 細胞株 (Jurkat Tet-On 細胞株)

に、テトラサイクリン応答プロモーターの下流に全長の HBZ 遺伝子を組み込んだコンストラクトを遺伝子導入した。導入後、Dox 添加により各ウイルス型特異的 HBZ が発現誘導されることをウエスタンブロットで確認した。

(2) マイクロアレイ解析による各ウイルス型に共通あるいは特異的な HBZ 標的遺伝子の同定

構築した実験系を用いて各ウイルス型特異的 HBZ を発現誘導させた。発現誘導前後の細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的スクリーニングを行った。データマイニングにより、各ウイルス型特異的 HBZ によって共通あるいは特異的に発現制御される標的遺伝子群を同定した結果、HBZ による標的遺伝子の誘導効率にはウイルス型で明らかな差があること、HBZ が多種多様な non-coding RNA (ncRNA) を強力に発現誘導することを見出した(図 1)。ウイルス型特異的 HBZ により発現誘導・抑制される多数の標的遺伝子のうち、HAM 発症への関与が考えられる感染制御・炎症・免疫応答に関わる遺伝子群には、ウイルス感染の初期段階に関与する遺伝子群、特に Toll 様受容体 (TLR) およびインターフェロン調節因子 (IRF)、炎症性サイトカイン・ケモカイン遺伝子群、免疫応答に関与する遺伝子群が含まれており、HAM 発症関連候補遺伝子と考えられた。レポーターアッセイでは、HBZ の活性に遺伝子型による有意差を認めなかった。

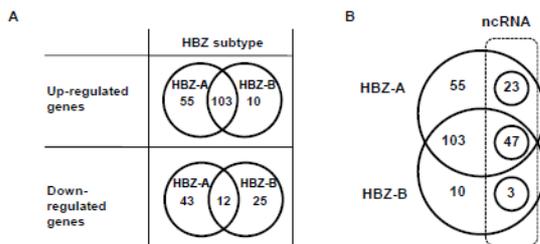


図 1: ウイルス型特異的 HBZ により発現誘導される遺伝子の網羅的解析結果 A: ベン図解析 B: HBZ 標的遺伝子に占める non-coding RNA の数

(3) HBZ により発現抑制される HAM 発症関連候補遺伝子の解析

HBZ により発現抑制される標的遺伝子のうち 10 遺伝子について Real-Time qRT-PCR によるバリデーションを行い、マイクロアレイの結果と相関することを確認した。

HBZ 標的遺伝子のうち、HBZ の発現誘導に伴って発現抑制される Bach2 を HAM 発症関連候補遺伝子として着目した。Bach 2 は腫瘍抑制因子である Menin によって発現誘導される転写因子であるが、近年、CD4 陽性ヘルパー T 細胞の老化に伴って Menin の機能が弱まり bach2 を発現誘導できなくなると、老化した

T 細胞から様々な炎症性因子が高発現する「SASP (Senescence-associated secretory phenotype)」という状態を引き起こすこと、HBZ が menin と結合してその機能を抑制することが相次いで報告されたからである。

まず、各種ヒト T 細胞株における Menin および Bach2 の発現を検討したところ、検討したすべての T 細胞株で Menin の発現を認めたが、Bach2 については発現している細胞株としていない細胞株があった。また、HTLV-1 感染 T 細胞株で Menin 遺伝子をノックダウンしたところ、Bach2 の発現低下が確認された細胞株と確認されない細胞株があった。Menin 阻害剤を用いて Menin-Bach2 経路が感染細胞の増殖・機能に与える影響を検証したところ、HTLV-1 感染 T 細胞株のうち、Menin のノックダウンによる Bach2 の発現低下が確認された細胞株でのみ、Menin 阻害剤による細胞増殖阻害効果が認められた。さらに、免疫沈降法による検討の結果、HBZ は Menin および Bach2 の双方と細胞内で結合することを見出した(図 2)。HTLV-1 感染細胞株では、HBZ 遺伝子の発現をノックダウンしても Bach2 遺伝子の発現量に変化を認めなかった。

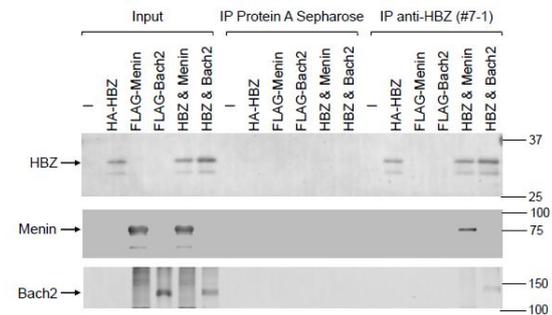


図 2: HTLV-1 の転写制御因子 HBZ は Menin および Bach2 の双方と結合する。

(4) HTLV-1 感染者 PBMC を用いた HBZ およびその標的遺伝子の感染者生体内における発現動態と臨床病態との比較解析

HTLV-1 感染者の臨床検体を用いて HBZ およびその標的遺伝子の動態を検討したところ、PBMC 中の HBZ 蛋白発現量に検体間で大きな差があること、全ての HAM 患者および無症候性キャリアーで抗 HBZ 抗体が検出されるが、検出頻度は約 10 - 16% と他の HTLV-1 関連ウイルス蛋白質 (90%以上) に比較して著しく低いこと、PBMC 中の HBZ mRNA 発現量と HBZ 蛋白発現量、血漿中の抗 HBZ 抗体価との間に有意な相関が認められないことが明らかになった。また、HTLV-1 感染者 PBMC 中の menin および bach2 遺伝子の発現と PVL との関連を Real Time qPCR で解析したところ、menin 遺伝子の発現が PVL と逆相関することを見出した(図 3)。

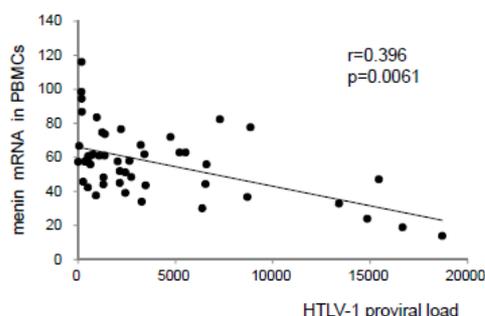


図3：HTLV-1感染者PBMC中のmenin遺伝子量はPVLと逆相関する。

考察

網羅的遺伝子発現解析の結果、HBZによる標的遺伝子の誘導効率にはHTLV-1ウイルス型により有意差があること、HBZがncRNAを含む多種多様な遺伝子群を発現誘導することが明らかになった。標的遺伝子には、各ウイルス型のHBZによる発現誘導レベルが同等の遺伝子と異なる遺伝子の双方が存在した。

ncRNAは、20bpから200bp程度の小分子ncRNAと、全長が数百bpから数十万bpの長鎖ncRNAに大別される。代表的な小分子ncRNAであるマイクロRNA(miRNA)は、標的となるmRNAの3'非翻訳領域と相補的に結合して、その分解促進と翻訳抑制を引き起こすことが知られている。HIV-1感染においては、ウイルスRNAの抑制と潜伏化誘導との関連が報告されており、近年HTLV-1感染においても、miRNA-31の発現がすべてのATL患者で著しく減少しており、これが細胞増殖や細胞死抵抗性に重大な影響を持つNF- κ B経路の異常活性化とがん化に関与することが報告されている。長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)は、様々なRNA結合蛋白質と結合して多様な生理機能を発揮することが知られているが、最近になって、細胞質に局在してNF- κ B非依存的な炎症性サイトカインの発現制御に関与することで炎症形成に重要な役割を果たすことが報告されている。よって、本研究により同定したHBZの標的ncRNAの中にHAM発症に関与する疾患関連遺伝子が含まれる可能性は高く、今後詳細な解析が必要である。

近年、がん抑制遺伝子men1の転写産物Meninが、免疫老化に伴うアレルギー疾患や自己免疫疾患の発症にかかわる転写抑制因子であるBach2を標的として制御することが相次いで報告された。HAMおよびATLがいずれも主に高齢者に発症することからも、HAMの病態形成にウイルス感染Tリンパ球によって引き起こされる宿主免疫系の老化が重要である可能性は高い。そこで、「HTLV-1がCD4陽性T細胞に感染してMenin-Bach2経路を抑制することでT細胞機能異常をもたらし、HTLV-1関連疾患(ATL、HAM)発症に関与する」という仮説を立て検証を行った。その結果、Bach2がHBZの発現誘導に伴って発現抑制されること、HTLV-1感

染者PBMC中のmenin遺伝子の発現がPVLと逆相関することが明らかになった。HTLV-1感染T細胞株を用いたMeninのノックダウン実験では、Bach2の発現低下が確認された株でのみMenin阻害剤による細胞増殖阻害効果が認められたことから、HTLV-1が複数のメカニズムでMenin-Bach2経路を介するCD4陽性T細胞の機能制御に関与している可能性が考えられる。また、HTLV-1感染T細胞に対してMeninを治療標的として異常細胞増殖を抑制できる可能性が示唆された。

ncRNAやMenin-Bach経路の構成因子以外にも、本研究で同定したHBZ標的細胞性因子の中にHAMの新規バイオマーカーや治療標的が含まれる可能性は高い。今後とも解析を続け、HAMの慢性持続性炎症形成メカニズムにおけるHBZの病因的意義の解明を目指したい。

結論

ヒトCD4陽性T細胞株を用いてテトラサイクリン添加による発現誘導系を構築し、HTLV-1ウイルス型特異的HBZの発現誘導前後で変動する標的遺伝子群を網羅的に同定した。各ウイルス型のHBZによって発現誘導される遺伝子には、誘導レベルが同等の遺伝子と異なる遺伝子の双方が含まれていた。これら新規HBZ標的遺伝子には、多種多様なncRNAやCD4T細胞の老化とサイトカイン恒常性の制御に重要な役割を果たすMenin-Bach2経路の構成分子等、多くのHAM発症関連候補遺伝子が含まれていた。引き続き解析を進め、HAMの病態を反映する新規バイオマーカーや創薬シーズの探索を続けたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. **Saito M.**, Sejima H, Naito T, Ushirogawa H, Matsuzaki T, Matsuura E, Tanaka Y, Nakamura T, Takashima H. The CC chemokine ligand (CCL) 1, upregulated by the viral transactivator Tax, can be downregulated by minocycline: possible implications for long-term treatment of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Virology Journal*. 2017 14(1):234. doi: 10.1186/s12985-017-0902-6. 査読あり
2. Shiohama Y, Naito T, Matsuzaki T, Tanaka R, Tomoyose T, Takashima H, Fukushima T, Tanaka Y, **Saito M.** Prevalence of plasma autoantibody against cancer testis antigen NY-ESO-1 in HTLV-1 infected individuals with different clinical status. *Virology Journal*. 2017 Jul 17;14(1):130. doi:

- 10.1186/s12985-017-0802-9. 査読あり
3. Sakihama S, **Saito M**, Kuba-Miyara M, Tomoyose T, Taira N, Miyagi T, Hayashi M, Kinjo S, Nakachi S, Tedokon I, Nishi Y, Tamaki K, Morichika K, Uchihara JN, Morishima S, Karube KN, Tanaka Y, Masuzaki H, Fukushima T.
Human T-cell leukemia virus type I Tax genotype analysis in Okinawa, the southernmost and remotest islands of Japan: Different distributions compared with mainland Japan and the potential value for the prognosis of aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma.
Leukemia Research. 2017 Aug 18;61:18-24. doi: 10.1016/j.leukres.2017.08.006. 査読あり
 4. Shiohama Y, Naito T, Matsuzaki T, Tanaka R, Tomoyose T, Takashima H, Fukushima T, Tanaka Y, **Saito M**.
Absolute quantification of HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) protein and its plasma antibody in HTLV-1 infected individuals with different clinical status.
Retrovirology. 2016 Apr 27;13:29. doi: 10.1186/s12977-016-0263-z. 査読あり
 5. Yasuma K, Matsuzaki T, Yamano Y, Takashima H, Matsuoka M, **Saito M**.
HTLV-1 subgroups associated with the risk of HAM/TSP are related to viral and host gene expression in peripheral blood mononuclear cells, independent of the transactivation functions of the viral factors.
Journal of Neurovirology. 2016 Aug;22(4):416-30. doi: 10.1007/s13365-015-0407-2. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 後川 潤、有島志保、安永純一郎、久保田龍二、大島孝一、出雲周二、松岡雅雄、**齊藤峰輝**: 遺伝子改変マウスを用いたHAM病態モデル動物の作製
第4回日本HTLV-1学会学術集会
2017年8月20日, 枚方市
2. 内藤忠相、**齊藤峰輝**: HAM 発症リスクに関連する HTLV-1 遺伝子型特異的な宿主遺伝子の発現制御メカニズムの解析
第4回日本HTLV-1学会学術集会
2017年8月19日, 枚方市

3. Hiroshi Ushirogawa, Shiho Arishima, Jun-ichirou Yasunaga, Ryuji Kubota, Koichi Ohshima, Shuji Izumo, Masao Matsuoka, **Mineki Saito**: Establishment of a novel small animal model for HAM/TSP.
The 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. 2017.3.10. Tokyo, Japan.
4. Hiroe Sejima, Toshio Matsuzaki, Eiji Matsuura, Hiroshi Takashima, **Mineki Saito**. : The role of CC chemokine ligand (CCL) 1 targeted by Tax in HAM/TSP.
The 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. 2017.3.8. Tokyo, Japan.
5. **齊藤峰輝**、塩浜康雄、内藤忠相、松崎敏男、友寄毅昭、高嶋 博、福島卓也、田中勇悦: HTLV-1 感染症における抗 NY-ESO-1 自己抗体の臨床的意義
第3回日本HTLV-1学会学術集会
2016年8月28日, 鹿児島市

〔図書〕(計 1 件)

1. **Saito M**. HTLV-1
Reference Module in Life Sciences 2nd Edition. (Online Encyclopedia)
Stanley Maloy, Kelly Hughes ed.
Elsevier, Oxford, UK. 2017.
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06550-X>.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
該当なし。

取得状況(計 0 件)
該当なし。

〔その他〕

ホームページ:
<http://www.kawasaki-m.ac.jp/microbiology/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
齊藤 峰輝 (SAITO MINEKI)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40398285
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし
- (4) 研究協力者
なし