

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16122

研究課題名（和文）HTLV-1とヒトゲノムのキメラトランスクリプトによるATL発症機序の解明

研究課題名（英文）Chimeric transcripts between HTLV-1 and host genome in patients with adult T-cell leukemia-lymphoma

研究代表者

勝屋 弘雄 (Katsuya, Hiroo)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：80632041

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：HTLV-1組み込み部位特異的なウイルスとヒトゲノムのキメラトランスクリプトが成人T細胞白血病・リンパ腫（ATL）クローンの選択性に關与していると仮説を立て研究を行った。30例のATL患者の末梢血でのRNA解析で、21例においてキメラトランスクリプト発現を確認した。キメラトランスクリプトの定量PCRでは、半数の検体でウイルスRNAであるHBZと同等か、それ以上の発現を認めた。in vitroの実験で限界希釈によるHTLV-1感染細胞のクローニングを施行し、最終的に10個の感染クローンを分離した。これらの細胞増殖解析では非感染クローンと比較して有意に細胞増殖が亢進しているクローンを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HTLV-1感染者のうち約5%のみで予後不良である成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)を発症する。わずか5%の感染者の体内で、どのようにATLクローンが選択されるかは、いまだに不明である。我々は組み込み部位特異的なキメラトランスクリプトが、多くのATLクローンで存在していることを確認した。またHTLV-1感染させたJurkat細胞株を用いたin vitroの研究でもキメラトランスクリプトの存在が確認され、感染クローン毎に増殖速度が異なっていることが確認された。ウイルスとホストのキメラトランスクリプトが新たなATLの発症機序の一つである可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that the integrated provirus generates virus-host chimeric transcripts (CT) may play a role in the clonal selection of the HTLV-1-infected cell. HTLV-1 RNA-capture-seq provided the presence of CTs in 21 out of 30 ATL patients. We next quantified the abundance of CTs by droplet digital PCR, and found that the levels of CTs were similar to those of viral RNAs containing splice junction of HBZ, although the expression levels varied among different ATL cases. Oxford Nanopore sequencing revealed that the HTLV-1 provirus generates various splicing CTs with the host genes in both viral sense and antisense orientations. To clarify the impact of viral integration on clonal expansion, we analyzed HTLV-1-infected Jurkat cells. The integration site analysis showed that some clones were remarkably expanded during the long-term cultivation and some of them harbored CTs with the host genes.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：成人T細胞白血病・リンパ腫 HTLV-1 キメラトランスクリプト

1. 研究開始当初の背景

レトロウイルスである **human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)** は、感染した細胞のヒトゲノムにウイルスゲノムが組み込まれて存在している。**HTLV-1** 感染者のうち約 **5%**のみで予後不良である成人 **T** 細胞白血病・リンパ腫(**ATL**)を発症する。これまでの研究から、**ATL** の発症にはウイルス側と宿主側因子の両方が重要であることがわかっている。ウイルス側因子として、**HTLV-1** にコードされるウイルス蛋白の一つである **Tax** は、ウイルス遺伝子の転写を活性化する因子として同定された。しかし、**ATL** を発症した症例では半数以上で **tax** 遺伝子が発現していないことが明らかになった。その後の研究で、マイナス鎖にコードされる **HBZ** 遺伝子が **ATL** 細胞でも恒常的に発現していることが確認され、さらに **T** リンパ球の増殖を促進することが明らかになった(**Satou Y, et al, PNAS 2006**)。宿主側因子では、**ATL** 患者検体における全エクソン解析、全ゲノム解析で、**T** 細胞受容体シグナルや **NF- κ B** シグナルなどの **T** 細胞の分化や増殖に関わる経路の遺伝子異常が確認された(**Kataoka K, et al, Nat Genet 2015**)。

このように、**Tax** や **HBZ** などのウイルス蛋白の **ATL** 発症への関与や **ATL** 細胞での宿主の遺伝子異常の蓄積が明らかにされてきた。しかし、**HTLV-1** キャリアのわずか **5%**に **ATL** が発症する理由や、一人の感染者に存在する **1** 万を超える感染クローンの中からどのように **ATL** クローンが選択されるかについてはいまだに不明である。

ヒトパピローマウイルスや **B** 型肝炎ウイルスなどの発がんウイルスは、ヒトゲノムに組み込まれ、その周囲のホスト **DNA** の構造や発現に影響を与え、発がんに関与する可能性が報告されている(**Cancer Genome Atlas Research Network, Nature, 2017; Lau CC, et al. Cancer Cell, 2014**)。同様にヒトゲノムに組み込まれた **HTLV-1** も、ホストの **DNA** 構造や遺伝子発現に影響を与え、感染細胞のホメオスタシスが破綻し腫瘍化に導く可能性が考えられている。しかしながら、一人の感染者には **10⁴~10⁶** 個の感染 **T** 細胞クローンが存在するため、どのように腫瘍化する感染クローンが選択されるかはいまだ不明である。そこで我々は、それぞれの感染クローン特有のウイルス組み込み部位が **ATL** クローンの選択性に関与していると仮説を立て研究を行っている。

2. 研究の目的

それぞれの **HTLV-1** 感染クローンは特有のウイルス組み込み部位を有している。プロウイルス遺伝子と組み込まれた部位の周囲遺伝子で形成される組み込み部位特異的なキメラトランスクリプトと **ATL** 発症機序との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 患者検体におけるキメラトランスクリプトの同定

DNA プローブを用いた **HTLV-1** プロウイルス濃縮法を併用した **RNA-seq** にて、**ATL** 患者との末梢血単核球検体を解析する。

2) キメラトランスクリプトの定量

ATL 発症におけるキメラトランスクリプトの重要性を評価する一つの指標として、キメラトランスクリプト発現の定量解析を行う。キメラトランスクリプト特異的なプライマーを設定し、デジタル **PCR** を用いて **HBZ** とキメラトランスクリプトの発現量を比較する。

3) キメラトランスクリプトの全長塩基配列の同定

キメラトランスクリプトの機能解析を行うために、全長の塩基配列を同定する必要がある。キメラトランスクリプトの長さは未知であり、また多くの検体を用いて解析を行う必要がある。そこでオックスフォード・ナノポア・テクノロジーのナノポアシーケンシングを用いて長いリードのシーケンシングを行う。これは通常用いられるイルミナ社のシーケンシングのように制限された特定のリード長のライブラリーを作成する必要がなく、**200Kb** を超えるリードまでシーケンシングが可能である。これを用いてキメラトランスクリプトの全長塩基配列を同定する。

4) **HTLV-1** 感染 **Jurkat** 細胞を用いた **in vitro** でのキメラトランスクリプトの機能解析

HTLV-1 を導入した **293T** 細胞に放射線照射をした後、**Jurkat** 細胞と共培養をした。ウイルス蛋白である **Tax** 陽性細胞をソーティングし、**16** 週間培養を行った。これらの **HTLV-1** 感染細胞から限界希釈による感染細胞のクローニングを行い、機能解析を施行する。

4. 研究成果

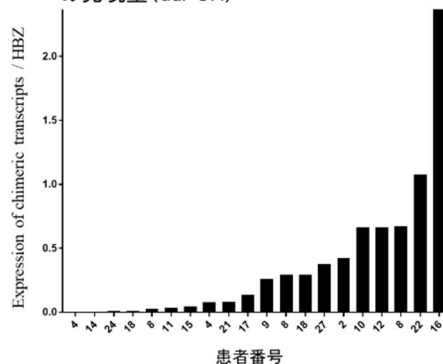
1) 患者検体におけるキメラトランスクリプトの同定

30 例の **ATL** 患者の末梢血単核球から抽出した **RNA** の解析で、**21** 例においてウイルスとホストのキメラトランスクリプトを発現していることを見出した。ウイルス組み込み部位はオープンクロマチン領域に多いが **hot spot** はなく、それぞれの **ATL** クローンで組み込み部位特有のキメラトランスクリプトを発現していた。また一つの **ATL** クローンから複数のキメラトランスクリプトが形成されていた。ウイルスのプラス鎖にコードされる **tax** のエクソン 1 を含む、またはマイナス鎖にコードされる **HBZ** のエクソン 1、エクソン 2 を含むキメラトランスクリプトなど、一つのクローンからも複数のものを認めた。

2) キメラトランスクリプトの定量

ATL 発症におけるキメラトランスクリプトの重要性を評価する一つの指標として、キメラトランスクリプト発現の定量解析を行った。キメラトランスクリプト特異的なプライマーを設定し、デジタル **PCR** を用いてウイルス遺伝子である **HBZ** の **mRNA** とキメラトランスクリプトの発現量を比較した(図1)。発現量は症例毎に多様であったが、を確認した。2例では **HBZ** よりも高値、3例では **HBZ** と同程度の発現を認めた。

図1 ATL患者検体におけるキメラトランスクリプトの発現量 (ddPCR)



3) キメラトランスクリプトの全長塩基配列の同定

ナノポアシーケンシングを用いて未知のキメラトランスクリプトの全長塩基配列を同定した(図2)。

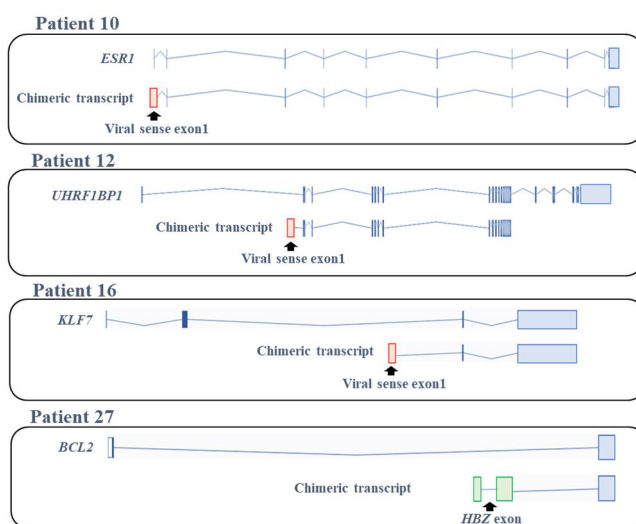
Patient10 は **HTLV-1** が **ESR1** 遺伝子内に組み込まれており **tax** のエクソン1と下流に位置する **ESR1** のエクソンと融合していた。

Patient12、**Patient16** は **UHRF1BP1**、**KLF7** 遺伝子内にウイルスが組み込まれており、**tax** のエクソン1とその下流に位置するエクソンと融合していた。

Patient27 は **BCL2** 遺伝子内に逆向きに **HTLV-1** が組み込まれており、**HBZ** のエクソン2と **BCL2** のエクソン3と融合していた。このように、それぞれの **ATL** クローンで組み込み部位特異的なキメラトランスクリプトが形成していることが明らかになった。タンパク質がどこにコードされているかを探索するため、**open reading frame** の検索を行った。

Patient10、**11** では **ESR1**、**UHRF1BP1** とほぼ同様の蛋白が作られることがわかった。**Patient16**、**27** では **KLF7** と **BCL2** の機能を持った蛋白は合成されることがわかった。このように、**HTLV-1** が組み込まれることにより本来のヒトゲノムにコードされる蛋白合成に影響を与えていることが明らかになった。

図2 4例のATL患者でのキメラトランスクリプトの構造



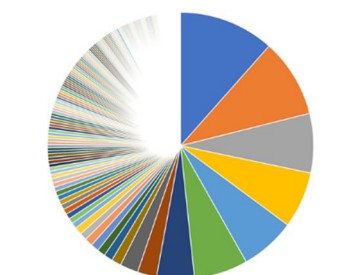
4) HTLV-1 感染 Jurkat 細胞を用いた in vitro でのキメラトランスクリプトの機能解析

HTLV-1 を導入した **293T** 細胞に放射線照射をした後、**Jurkat** 細胞と共培養し、多くの新たな **HTLV-1** 感染 **Jurkat** クローンを作成した。ウイルス蛋白である **Tax** 陽性細胞をソーティングし、**16** 週間培養を行った。これらの細胞から **DNA** を抽出し **HTLV-1** 組み込み部位を指標としたクローナリティー解析を実施した。図3に示すようにクローン性に増殖した **HTLV-1** 感染細胞が存在していた。**HTLV-1** プロウイルス濃縮法を併用した **RNA-seq** では、増殖した感染クローンで組み込み部位特異的なキメラトランスクリプトが検出された。

これらの **HTLV-1** 感染クローンの機能解析を行うため、限界希釈による **HTLV-1** 感染細胞のクローニングを施行した。最終的に **10** 個の **HTLV-1** 感染クローンを分離することが可能であった。これらの感染クローンで細胞増殖解析を行ったところ、非感染クローンと比較して有意に細胞増殖が亢進しているクローンを同定した。

今後、それぞれの感染クローンにおけるキメラトランスクリプトの全長配列を知るためにナノポアシーケンシングを実施する。同定した全長の塩基配列でプラスミドを作成し、**T** 細胞クローンに導入しキメラトランスクリプトの機能解析を行う予定である。

図3 組み込み部位情報を用いたHTLV-1感染細胞のクローナリティー解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Iwase Saori C., Miyazato Paola, Katsuya Hiroo, Islam Saiful, Yang Benjy Tan Jek, Ito Jumpei, Matsuo Misaki, Takeuchi Hiroaki, Ishida Takaomi, Matsuda Kouki, Maeda Kenji, Satou Yorifumi	4. 巻 9
2. 論文標題 HIV-1 DNA-capture-seq is a useful tool for the comprehensive characterization of HIV-1 provirus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48681-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katsuya Hiroo, Islam Saiful, Tan Benjy Jek Yang, Ito Jumpei, Miyazato Paola, Matsuo Misaki, Inada Yuki, Iwase Saori C., et al.	4. 巻 29
2. 論文標題 The Nature of the HTLV-1 Provirus in Naturally Infected Individuals Analyzed by the Viral DNA-Capture-Seq Approach	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 724 ~ 735.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.09.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyazato Paola, Matsuo Misaki, Tan Benjy J. Y., Tokunaga Michiyo, Katsuya Hiroo, Islam Saiful, Ito Jumpei, Murakawa Yasuhiro, Satou Yorifumi	4. 巻 16
2. 論文標題 HTLV-1 contains a high CG dinucleotide content and is susceptible to the host antiviral protein ZAP	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Retrovirology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12977-019-0500-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katsuya Hiroo, Cook Lucy B. M., Rowan Aileen G., Satou Yorifumi, Taylor Graham P., Bangham Charles R. M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Phosphatidylinositol 3-kinase- (PI3K-) is a potential therapeutic target in adult T-cell leukemia-lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomarker Research	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40364-018-0138-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Katsuya H, Miyazato P, Islam S, Tan BJY, Inada Y, Matsuo M, Ueno T, Tokunaga M, Hata H, Yamagishi M, Fujisawa J, Watanabe T, Uchimar K, Utsunomiya A, Kimura S, Satou Y.
2. 発表標題 The presence and possible role of virus-host chimeric transcripts in adult T-cell leukemia-lymphoma.
3. 学会等名 62nd Annual Meeting of American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝屋弘雄、イスラムサイフル、タンベンジー、伊東潤平、宮里バオラ、内山良一、畑裕之、佐藤和雄、八木下尚子、新谷奈津美、上野孝治、野坂生郷、徳永雅仁、山岸誠、渡邊俊樹、内丸薫、藤澤順一、宇都宮與、山野嘉久、佐藤賢文
2. 発表標題 ウイルスDNA カプチャーシーケンスはウイルス関連ヒト悪性腫瘍の病原性解明に有用である：HTLV-1 を例として
3. 学会等名 第17回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝屋弘雄、イスラムサイフル、タンベンジー、伊東潤平、宮里バオラ、内山良一、畑裕之、佐藤和雄、八木下尚子、新谷奈津美、上野孝治、野坂生郷、徳永雅仁、山岸誠、渡邊俊樹、内丸薫、藤澤順一、宇都宮與、山野嘉久、佐藤賢文
2. 発表標題 The nature of HTLV-1 provirus in naturally infected individuals analyzed by viral DNA-capture-seq approach.
3. 学会等名 第59回日本リンパ網内系学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝屋弘雄、宮里バオラ、イスラムサイフル、タンベンジー、稲田由紀、松尾美沙希、上野孝治、徳永雅仁、畑裕之、山岸誠、藤澤順一、渡邊俊樹、内丸薫、宇都宮與、木村晋也、佐藤賢文
2. 発表標題 The presence and possible role of virus-host chimeric transcripts in HTLV-1-infected cells.
3. 学会等名 第81回日本血液学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝屋弘雄、イスラム サイフル、宮里パオラ、タンベンジー・ジェック・ヤング、岩瀬早織、松尾美沙希、佐藤知雄、野坂生郷、徳永雅仁、宇都宮與、山岸誠、内丸薫、渡邊俊樹、山野嘉久、佐藤賢文
2. 発表標題 The nature of HTLV-1 provirus in infected individuals analyzed by HTLV-1 DNA capture sequencing
3. 学会等名 第5回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾美沙希、上野孝治、宮里パオラ、勝屋弘雄、徳永雅仁、野坂生郷、宇都宮與、藤澤順一、佐藤賢文
2. 発表標題 HTLV-1内に存在する新規エンハンサー領域の分子メカニズム解析
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Benjy Tan Jek Yang, Katsuya Hiroo, Miyazato Paola, Uchiyama Yoshikazu, Sakurai Yasushi, Satou Yorifumi
2. 発表標題 HTLV-1-infected Asymptomatic Carriers versus ATL PBMCs: A Single-Cell Transcriptional Profiling Approach
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Paola Miyazato, Benjy Tan Jek Yang, Michiyo Tokunaga, Hiroo Katsuya, Misaki Matsuo, Junpei Ito, Yasuhiro Murakawa, Yorifumi Satou
2. 発表標題 Possible role of ZC3HAV1 protein in the post-transcriptional regulation of HTLV-1
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学エイズ学研究センター 佐藤研究室WEBサイト
<http://www.caids.kumamoto-u.ac.jp/satou/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----