

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390263  
 研究課題名 (和文) ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型がコードする HBZ 遺伝子の病態における役割  
 研究課題名 (英文) The role of HTLV-1 encoded HBZ gene in the pathogenesis

研究代表者  
 松岡 雅雄 (MATSUOKA MASAO)  
 京都大学・ウイルス研究所・教授  
 研究者番号：10244138

研究成果の概要：HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子は HTLV-1 プロウイルスマイナス鎖にコードされ、ATL、HTLV-1 感染細胞で普遍的に発現している。HBZ のプロモーター領域の解析から Sp1 が転写因子として重要であることを明らかにした。HBZ は p65 と結合し NF- $\kappa$ B classical pathway を選択的に抑制する。HBZ は p65 の DNA 結合阻害と p65 の E3 ubiquitin ligase である PDLIM2 発現上昇という異なる機序で classical pathway を抑制していた。HBZ トランスジェニックマウスでは、高率に皮膚炎・肺炎が存在することが明らかとなり、その機序として接着能・遊走能の亢進があることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：HTLV-1、ATL、レトロウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (human T-cell leukemia virus type I: HTLV-I) は成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) の原因ウイルスであるだけでなく HTLV-I 関連脊髄症 (HAM/TSP)、HTLV-I ぶどう膜炎、関節症、T リンパ球性肺炎などの炎症性疾患をも惹起する。HTLV-I の発見から四半世紀が経過したが発症機構には依然として多くの不明な点が残されている。HTLV-I 感染の大きな特徴として遊離ウイルスではなく感染細胞から細胞へという感染様式を取る事が挙

げられる。HTLV-I は pX 領域にコードされる調節遺伝子により感染細胞を増やすことによって感染機会を増大させている。調節遺伝子の中でも tax 遺伝子は、その細胞増殖作用・発がん促進作用により中心的な役割を担うものと考えられ、精力的に研究が進められてきた。我々は従来、発がんに重要であると考えられてきた tax 遺伝子が ATL では、しばしば発現していないことを明らかにしてきた (Takeda S et al., Int J Cancer, 2004; Matsuoka M et al., Cancer Res, 2005)。ATL 細胞において tax 遺伝子の発現を障害する機

序として以下の3つの機構を明らかにしてきた。1) ウイルス遺伝子のプロモーター・エンハンサーである5'側 long terminal repeat (LTR)の欠失 (Tamiya et al., Blood, 1996)、2) 5'側 LTRのDNAメチル化 (Taniguchi Y, et al., Retrovirology, 2005)、3) tax 遺伝子の変異・欠失 (Takeda S, et al., Int J Cancer, 2004) である。ATL 症例の解析から約半数の症例では、このようなメカニズムにより Tax タンパク質が発現できないようになってきている。Tax は細胞傷害性 T リンパ球の主な標的となっているために Tax 発現を失った ATL 細胞が腫瘍化の過程で選択されてきたものと考えられている。しかし、3'側 LTR は全ての ATL 症例で保存されておりメチル化もされていないことから3'側 LTR が発がんにとって重要であることが示唆された。HTLV-I は3'側 LTR をプロモーターとしてマイナス鎖に HTLV-I bZIP factor (HBZ) 遺伝子をコードしている。我々は HBZ 遺伝子こそが ATL の発がんに重要ではないかと考えた。その発現を解析したところ、全ての ATL 細胞で HBZ 遺伝子が発現しており増殖を促進することを見出した (Satou et al. PNAS, 2006)。HBZ 遺伝子は RNA 分子として ATL の増殖を促進していた。HBZ タンパク質は、RNA とは異なる細胞側遺伝子の転写を制御していることも見出している。CD4 特異的プロモーター・エンハンサーで HBZ 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスでは CD4 陽性細胞特異的に HBZ 遺伝子が発現しており、CD4 陽性 T リンパ球の増加を認めた。この結果、HBZ 遺伝子が生体内でも CD4 陽性 T リンパ球を増殖させることが明らかとなった。このトランスジェニックマウスでは皮膚炎が認められ CD4 陽性 T リンパ球が皮膚・肺へ浸潤している。これはキャリアに認められる病態と極めて類似しており、ヒトにおける HTLV-I 感染症の病態を解析する上で有用なモデルになることが期待される。HTLV-I 研究は、これまで tax 遺伝子を中心に進められてきたが、我々の解析から HBZ 遺伝子が、ATL のみならず関連疾患においても重要な役割を担っていることが明らかになりつつあり、HBZ 遺伝子の研究は HTLV-I 関連病態に新たな展開をもたらすものと期待される。このような ATL 及び関連疾患における HBZ 遺伝子の研究は、我々のオリジナルなものである。

## 2. 研究の目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (human T-cell leukemia virus type I: HTLV-I) は成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) の原因ウイルスであるだけでなく HTLV-I 関連脊髄症 (HAM/TSP)、HTLV-I ぶどう膜炎、関節症、T リンパ球性肺胞症などの炎症性疾患

をも惹起する。これらの疾患の発症機構には依然として多くの不明な点が残されている。我々は従来、発がんに重要であると考えられてきた tax 遺伝子が ATL では、しばしば発現していないことを明らかにしてきた。我々は全ての ATL 細胞で HTLV-I bZIP factor (HBZ) 遺伝子が発現しており増殖を促進することを見出した。HBZ 遺伝子は RNA 分子として ATL の増殖を促進していた。HBZ タンパク質は、RNA とは異なる細胞側遺伝子の転写を制御していることも見出している。本研究では HBZ 遺伝子が HTLV-I 感染、関連疾患の病態において果たす役割を解析し、その意義を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) Luc アッセイ

Jurkat 細胞にレポーターと発現ベクターを TransFectin を用いてトランスフェクトし、Luc 活性を測定した。

### (2) 増殖能測定

Kit225 に sHBZ, usHBZ 発現ベクターをトランスフェクトしハイグロマイシンで選択することによって発現細胞株を得た。IL-2 除去後に細胞増殖を MTT 法で測定した。

### (3) HBZ と p65 結合部位の解析

HBZ と p65 の欠失体を用いて免疫沈降法で結合部位を解析した。

### (4) 共焦点顕微鏡

His タグ HBZ と FLAG タグ p65 を用いて Hela 細胞へ発現させ、その局在を共焦点顕微鏡 (Leica TCS SP2) で解析した。

## 4. 研究成果

### (1) HBZ 遺伝子プロモーター領域の解析

HBZ 遺伝子には spliced, unspliced HBZ という2種類の転写産物があるが、そのプロモーター領域を解析するために5' RACE 法により転写開始点を決定した。両者ともに転写開始点は広く分布していた。これは TATA-less プロモーターの特性と一致していた。レポーターアッセイにより3'側 LTR (300bp) に最も強いプロモーター活性が認められた。この領域の転写因子結合部位を推定し、変異体を作製した。その解析により Sp1 結合部位が転写活性化に必須であることが示唆された。この部位への Sp1 の結合はクロマチン免疫沈降法により確認された。次に spliced HBZ, unspliced HBZ 由来タンパク質の産生量をウェスタン法で確認した。Spliced HBZ 由来タンパク質は unspliced HBZ 由来タンパク質よりも多く検出された。シクロヘキシミド処理により半減期を測定したところ、sHBZ 由来タンパク質の方が長い半減期を示した。これと一致して Tax responsive element に対する抑制効果を検討したが、sHBZ の方が unspliced HBZ よりも抑制効果が強かった。

この結果は sHBZ 由来タンパク質が unspliced HBZ 由来タンパク質よりも半減期が長く安定であり、その生物活性も高いことを示している。

以前に我々は sHBZ RNA が増殖促進効果を有することを報告しているが、sHBZ, usHBZ の比較を行った。発現ベクターを kit225 にトランスフェクトし発現細胞株を得た。IL-2 を除去後、少量の IL-2 存在下で増殖を解析すると sHBZ を発現している細胞株では増殖促進が認められた。しかし usHBZ を発現している kit225 では全く増殖促進効果を認めなかった。両者の違いは第一エクソンの存在であるが、この部分は LTR 内の Rex responsive element (RxRE) と一致している。RxRE は強いステムループ構造を取り Rex が結合し、ゲノム RNA の核外輸送を促進することが知られている。sHBZ の第一エクソンは RxRE のアンチセンス鎖であり全く異なる 2 次構造を取る。この部分が sHBZ の増殖促進効果に重要であることから、この RNA 部分に細胞因子が結合し、E2F1 の発現増強をもたらしている可能性が示唆された。このような結果から sHBZ はタンパク質としても安定であり、RNA を介する増殖促進効果もあり、HTLV-1 感染症で極めて重要な働きをしていると考えられた。

(2)HBZ による NF- $\kappa$ B 古典的経路の抑制  
転写経路のレポーターを用いて HBZ による作用を解析したところ、NF- $\kappa$ B 経路を抑制することが示された。NF- $\kappa$ B には classical pathway と alternative pathway が存在するが、HBZ は p65 による classical pathway のみを抑制し、alternative pathway には影響を与えなかった。この抑制には activation domain と bZIP domain が重要であることが欠失体を使用した実験から明らかになった。HBZ は p65 の標的配列への結合を阻害した。また、共焦点顕微鏡による解析で HBZ と p65 が共局在することが示された。HBZ の発現により p65 タンパク質が減少することが観察された。この減少は p65 とユビキチン化と関連していた。そのため p65 の E3 ユビキチンリガーゼの発現を解析したところ、HBZ 発現細胞で PDLIM2 の発現増加が認められた。HBZ 発現細胞で PDLIM2 ノックダウンにより p65 タンパク質量の回復が認められたことにより HBZ が PDLIM2 の発現を増加させることにより p65 のユビキチン化、分解亢進を起していることが示された。HBZ は p65 の DNA 結合阻害と分解亢進という 2 つの異なる機序で NF- $\kappa$ B 古典的経路の選択的抑制を起していた。HBZ トランスジェニックマウスで NF- $\kappa$ B 古典的経路の標的遺伝子の発現を解析すると IFN- $\gamma$ , VEGF, VCAM1 などの発現が低下していたことから in vivo においても HBZ による NF- $\kappa$ B 古典的経路の抑制が示唆された。

### (3)HBZ による接着能・遊走能亢進

HBZ トランスジェニックマウスでは高率に皮膚炎・肺炎を起す。組織では CD3, 4 陽性 T リンパ球の浸潤が認められる。HBZ トランスジェニックマウスから CD4 陽性 T リンパ球を分離し、接着能、遊走能を解析したところ、両者とも亢進しており、これが組織浸潤の一因であると考えられた。

### 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 21 件)

①Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A, Saburi Y, Masuda M, Tomonaga M, Eto T, Hidaka M, Harada M, Choi I, Yamanaka T, Kannagi M, Matsuoka M, and Okamura J. Adult T-cell leukemia/lymphoma; Hematopoietic stem cell transplantation; allogeneic; reducedintensity transplantation; anti-thymocyte globulin; graft-versus-ATLL effect. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14: 702-708, 2008. 査読有り

②Takai K, Sakamoto S, Sakai T, Yasunaga J-I, Komatsu K and Matsuoka M. A Potential link between alternative splicing of the NBS1 gene and the DNA damage/environmental stress. *Radiation Res*, 170:33-40, 2008. 査読有り

③Yoshida M, Satou Y, Yasunaga J-I, Fujisawa JI, Matsuoka M. Transcriptional control of spliced and unspliced HTLV-1 bZIP factor gene. *J Virol*, 82: 9359-9368, 2008. 査読有り

④Yeung ML, Yasunaga J-I, Bennasser Y, Dusetti N, Harris D, Ahmad N, Matsuoka M, Jeang K-T. Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and TP53INP1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by HTLV-1. *Cancer Res*, 68: 8976-8985, 2008. 査読有り

⑤Mitchell MS, Bodine ET, Hill S, Princler G, Lloyd P, Mitsuya H, Matsuoka M, Derse D. Phenotypic and genotypic comparison of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcriptase from infected T-cell lines and patient samples. *J Virol*, 81: 4422-4428, 2007. 査読有り

⑥Miyazaki M, Yasunaga JI, Taniguchi Y, Tamiya S, Nakahata T, and Matsuoka M.

Preferential Selection of HTLV-1 Provirus Lacking the 5' LTR during Oncogenesis. J Virol, 81: 5714-5723, 2007. 査読有り

⑦ Yasunaga JI, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms. Cancer Control, 14: 133-140, 2007. 査読有り

⑧ Tamaki H, Taniguchi Y, Kikuchi A, Yamagami T, Soma T and Matsuoka M. Development of adult T-cell leukemia in donor-derived human T-cell leukemia virus type I-infected T cells after allogeneic bone marrow transplantation. Leukemia, 21(7): 1594-1596, 2007. 査読有り

⑨ Matsuoka M and Kuan-Teh Jeang. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. Nat Rev Can 7: 270-280, 2007. 査読有り

⑩ Satou Y, Matsuoka M. Implication of the HTLV-I bZIP Factor Gene in the Leukemogenesis of Adult T-Cell Leukemia. International Journal of hematology, 86(2): 107-112, 2007. 査読有り

⑪ Yasunaga JI, Matsuoka M. Leukaemogenic mechanism of human T-cell leukaemia virus type I. Rev Med Virol, 17(5):301-311, 2007. 査読有り

⑫ Higuchi M, Tsubata C, Kondo R, Yoshida S, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Mahieux R, Matsuoka M, Fujii M. Cooperation of NF-KB2/p100 activation and the PDZ domain binding motif signal in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV) Tax1 but not HTLV-2 Tax2 is crucial for interleukin-2 independent growth transformation of a T cell line. J Virol, 81(21):119000-11907, 2007. 査読有り

[学会発表] (計 33 件)

① 松岡雅雄 : ヒトT細胞白血病ウイルスによる病原性発現機構 : 第 11 回白馬シンポジウム、長崎、2008 年 12 月 5-6 日

② 松岡雅雄 : ヒトT細胞白血病ウイルスの病原性発現機構 : 第 67 回日本癌学会総会、名古屋、2008 年 10 月 28-30 日

③ 田邊順子、宇都宮興、田野崎隆二、鵜池直邦、佐藤賢文、岡村純、松岡雅雄 : 造血幹細胞移植療法で治療されたATL患者における

HTLV-1 プロウイルスの解析 : 第 67 回日本癌学会総会、名古屋、2008 年 10 月 28-30 日

④ 松岡雅雄 : ATL, HTLV-1 研究の進歩 : 第 70 回日本血液学会総会、京都、2008 年 10 月 10-12 日

⑤ 趙鉄軍、安永純一郎、中尾光善、藤井雅寛、松岡雅雄 : HTLV-I bZIP factor 遺伝子による定型的NF-kB経路の選択的抑制 : 第 70 回日本血液学会総会、京都、2008 年 10 月 10-12 日

⑥ 吉田美香、佐藤賢文、安永純一郎、藤澤順一、松岡雅雄 : HTLV-1 bZIP factor 遺伝子プロモーター領域の同定と解析 : 第 1 回HTLV-1 研究会、東京、2008 年 8 月 23-24 日

⑦ 趙鉄軍、安永純一郎、中尾光善、藤井雅寛、松岡雅雄 : HTLV-1 bZIP factor selectively suppresses classical NF-kB pathway : 第 1 回HTLV-1 研究会、東京、2008 年 8 月 23-24 日

⑧ 松岡雅雄 : ヒトT細胞白血病ウイルス 1 型の病原性発現機構 : 第 48 回日本リンパ網内系学会総会、札幌、2008 年 6 月 13-14 日

⑨ Matsuoka M. Molecular pathogenesis and host immune response. IID 2008 Satellite Workshop "Virus-associated Lymphomas". Kyoto, Japan, May 13, 2008.

⑩ Matsuoka M, Sakurai Y, Komatsu K. Lentivirus integration and DNA repair. Ataxia-Telangiectasia Workshop 2008. Otsu, Japan, Apr 22-26, 2008.

⑪ 安永純一郎 : HTLV-I bZIP fctor (HBZ) による T 細胞増殖促進の分子機構 : 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007 年 12 月 11 日-15 日

⑫ 松岡雅雄 : Molecular mechanism of pathogenesis by human T-cell leukemia virus type I : 第 12 回慶應医学賞記念シンポジウム、東京、2007 年 12 月 5 日

⑬ 佐藤賢文、片桐晃子、ミヤザトパオラ、木梨達雄、松岡雅雄 : HTLV-I bZIP factor 遺伝子のトランスジェニックマウスはHTLV-I 関連皮膚疾患、肺疾患に類似した病態を示す : 第 37 回日本免疫学会総会、東京、2007 年 11 月 20-22 日

⑭ 佐藤賢文、ミヤザトパオラ、松岡雅雄 : HTLV-I 病原性におけるHBZ遺伝子の機能解

析：第 55 回日本ウイルス学会総会、札幌、  
2007 年 10 月 21-23 日

⑮安永純一郎：欠損型プロウイルスの解析からみた発がんにおける HTLV-I bZIP factor の重要性：69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会、横浜、2007 年 10 月 11 日-13 日

⑯松岡雅雄：Leukemogenesis associated with HTLV-I bZIP factor gene in ATL：第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月 3-5 日

⑰Matsuoka M. HTLV-I bZIP Facotr Gene and Oncogenesis by HTLV-I. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.

⑱ Satou Y, Yasunaga JI, Ohshima K, Miyazato P, Yoshida M, Takai K, Zhao T and Matsuoka M. HBZ transgenic mice mimic skin and lung diseases associated with HTLV-I. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.

⑲Yoshida M, Matsuoka M. Characterization of the promoter region for HBZ gene and functional analyses of spliced and unspliced HBZ genes. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松岡 雅雄 (MATSUOKA MASAO)  
京都大学・ウイルス研究所・教授  
研究者番号：10244138

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者