

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500363

研究課題名(和文) T細胞リンパ腫および関節炎を発症する HTLV-I tax 遺伝子導入マウスの解析

研究課題名(英文) Analysis of T cell leukemia/lymphoma in a human T-cell leukemia virus type I tax gene transgenic mouse model

研究代表者

大杉 剛生(OHSUGI TAKEO)

熊本大学・生命資源研究支援センター・准教授

研究者番号：00211102

研究成果の概要：

ヒト T 細胞白血病ウイルス tax 遺伝子を T 細胞特異的に発現するマウスを作出したところ、T 細胞リンパ腫と関節炎を発症した。tax 遺伝子発現およびサイトカイン発現の違いから、両疾患に關与する細胞のフェノタイプは各々異なるものと考えられた。がん抑制遺伝子 p53 に、多くのがんて観察される変異はみられなかったが、その機能は、疾患発症月齢に到達する以前に有意に低下しており、疾患発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物

キーワード：HTLV-1、成人 T 細胞白血病、関節炎、tax 遺伝子、ATL、マウス、遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病(adult T-cell leukemia: ATL)は、1977 年に高月らによって発見された新しいタイプの白血病である。ATL は、成人平均年齢 55 歳で発病がピークとなり、主に CD4 陽性 T 細胞が癌化、独特の花びら状の核をもつ白血病細胞の出現を特徴とする。また、地域特異性があり、南西日本とくに九州で多発している。この疾患は、ヒト T 細胞白血病ウイルス(Human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1)によって引き起こされることが、

1981 年に日沼らによって明らかにされた。その後、HTLV-1 は、HTLV-1 関連脊髄症(HAM/TSP)、ぶどう膜炎、関節炎、皮膚炎等多様な疾患を引き起こすことが明らかとなった。

このウイルスは、他の多くの動物レトロウイルスが保有する宿主遺伝子に相同な、いわゆるがん遺伝子を保有していない。一方で pX と呼ばれる特異な領域をもつ。この領域は tax 遺伝子を保有し、その遺伝子産物 Tax がウイルスの転写および細胞のがん化に關与していることが試験管レベルでは、わかって

いる。このことから Tax を産生するトランスジェニック (Tg) マウスを作成すれば ATL に類似の疾患を引き起こすことが当然考えられる。しかし、いままで腫瘍は作るがヒトと同じように T 細胞の腫瘍化を起こしたマウスの報告はなかった。

Hasegawa らは、tax 遺伝子を T 細胞特異的に発現させるため、Lck proximal プロモーターを使用したマウスを開発し、T 細胞白血病・リンパ種を引き起こすことに成功した (Hasegawa et al., 2006)。しかし、このマウスで使用した、Lck proximal プロモーターは、未熟胸腺細胞に発現するものであり、このがん化した細胞は、CD4⁺CD8⁻ の T 細胞であり、主に成熟 T 細胞 (CD4⁺) が、がん化する ATL の病態とは明らかに異なるものであった。我々は、成熟胸腺および末梢 T 細胞に発現する Lck distal プロモーターを用いた、マウスを作出した (平成 12-14 年度科学研究費補助金)。8 ヶ月齢くらいより、T 細胞白血病・リンパ種を発症するマウスが観察され、それら腫瘍細胞は、成熟 T 細胞 (CD4⁺あるいは CD8⁺) であり、クローナルな増殖であった (Ohsugi et al., 2007)。さらに、腫瘍細胞の NF- κ B は、活性化しており、ATL と同様の病態を示した。このように Tax には、単独で未熟 T 細胞のみならず、成熟 T 細胞をもがん化させる能力があることが明らかとなった。

一方、T 細胞白血病・リンパ種を発症しないマウスなのに Iwakura らが報告した関節炎 (Iwakura et al., 1991) と同様の炎症性疾患である関節炎を示すマウスが観察された (平成 15-17 年度科学研究費補助金)。病理学的には骨破壊像が顕著である。以上のことから、このマウスの病態解析を進めることにより、ATL の病態における Tax の役割を詳細に検討でき、Tax による腫瘍性疾患および炎症性疾患の機序を研究するツールとして有用であると考えられる。

文献

Hasegawa H., et al., *Nat. Med.* 12: 466-72, 2006.

Ohsugi, T., et al., *Nat. Med.* 13: 527-528, 2007.

Iwakura Y., et al., *Science* 253: 1026-1028, 1991.

2. 研究の目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) は、腫瘍性疾患 (成人 T 細胞白血病; ATL) および炎症性疾患 (HTLV-1 関連脊髄症; HAM/TSP、ぶどう膜炎、関節炎等) を引き起こす。なぜ、この単一のウイルスが全く異なった疾患を引き起こすのかは明らかではない。我々は、HTLV-1 の tax 遺伝子を成熟胸腺および末梢 T 細胞に発現するトランスジェニック (Tg) マ

ウスを作製、解析したところ、T 細胞白血病・リンパ腫および関節炎を発症することを見出した。これはヒトで腫瘍性、炎症性と異なった疾患を引き起こすのと類似している。そのため、このマウスを解析することにより、なぜ HTLV-1 が、異なった疾患を引き起こすのか、解明できる可能性がある。現在までの解析では、両疾患を同時に発症する個体はみられない。また、同腹マウスで、この異なる 2 つの疾患を個別に発症するので遺伝学的背景の関与は少ないと考えられる。そこで、以下項目について検討する。

- (1) Tax - Tg マウスの詳細な発症率および発症月齢について検索する。
- (2) 各疾患における tax 遺伝子発現量の比較
- (3) 各疾患に関与する細胞のサイトカイン発現
- (4) Tax 発現によるがん抑制遺伝子 p53 の動態

3. 研究の方法

- (1) HTLV-1 tax 遺伝子導入マウスの疾患発症率

Lck-distal-tax Tg マウスは、T 細胞白血病・リンパ腫および関節炎を発症することが明らかとなっている。しかし、長期にわたって観察していないので、24 カ月間疾患の発症率および発症月齢の観察を行った。

- (2) HTLV-1 tax 遺伝子導入マウスの tax 遺伝子発現量と病態との関連

同腹であっても、雌雄、個体で tax 遺伝子発現が異なることがわかっているので、tax 遺伝子の末梢血リンパ球における発現量と 2 つの疾患の関係について検討した。Lck-distal-tax Tg マウスの末梢血リンパ球を分離し、real-time PCR により tax 遺伝子発現量を定量し、T 細胞リンパ腫および関節炎の発症との関連を検討した。

- (3) 病態に関与している細胞のサイトカイン

T 細胞白血病および関節炎で病変部細胞のサイトカイン発現について検討を加えた。T 細胞白血病マウスの脾臓およびリンパ節、関節炎の病変部より RNA を抽出し、 β -actin を内部コントロールとした、半定量 RT-PCR により、炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, MIF, TNF- α) の発現を比較した。また、血清中のサイトカインを ELISA により定量した。

(4)がん抑制遺伝子 p53 の機能解析

加齢によって p53 の機能が低下する報告がマウスを用いた実験によりなされ、Tax-Tg マウスについても検討を加えた。p53 の mRNA は、同腹の non-Tg マウスに比べて、平均 1.8 倍増加しており、p53 の変異も観察されなかった。そこで p53 の機能を確認するため、線照射により p53 を誘導し、その標的遺伝子を定量した。すなわち、マウスに 5Gy の線照射後、6 時間目に臓器を取り出し、RNA を抽出した。抽出後、p53 の標的遺伝子である、p21、MDM2 および Bax について、real time RT-PCR によって定量し、無照射群と比較し、転写活性を測定した。

4 . 研究成果

(1) HTLV-1 tax 遺伝子導入マウスの疾患発症率

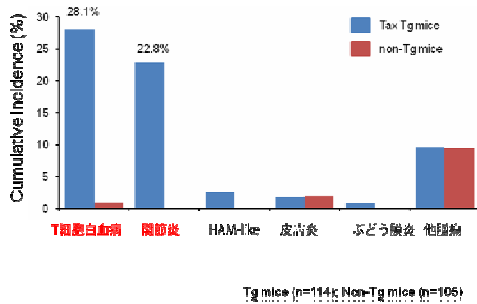


図1 . Tax-Tg マウスにおける各種疾患の発生

Tax-Tg マウスを 24 カ月にわたって、Tg マウス 114 匹、同腹の non-Tg マウス 105 匹を観察した成績を図 1 に示している。T 細胞白血病の発症率は、28.1%、関節炎の発症率は、22.8%であり、同腹の non-Tg マウスの発症はほとんどなかった。Tax-Tg マウスにおいて HAM/TSP 様の疾患が少数例みられたが、腫瘍の脊髄への転移が原因であり、炎症性疾患である HAM/TSP とは病態的に異なっていた。また、皮膚炎およびぶどう膜炎も観察されたが、Tax の発現とは関連しなかった。肝臓がん、B リンパ球白血病等を含む他腫瘍は、non-Tg マウスでも同率観察され、さらに Tax の発現が確認されなかった。以上のことから、このマウスの主要な疾患は、T 細胞白血病と関節炎であることが明らかとなった。

(2) T 細胞白血病および関節炎の発症月齢

両疾患ともに、発症までには長期間を要する。T 細胞白血病の発症には最低でも 8 カ月、関節炎の発症には 9 カ月を必要とし、以降、

漸次発症率は上昇し、20 カ月齢を過ぎたあたりで急に発症率が上昇した。これら事実は、多段階発がんの状態に類似しており、Tax 発現のファーストアタックの後、加齢に伴う変化などが関与しているものと考えられた。

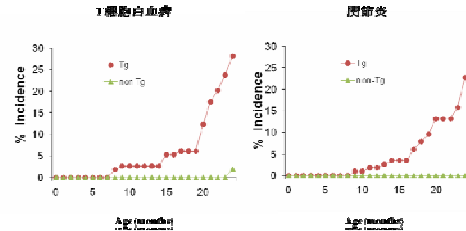


図2 . Tax-Tg マウスにおける疾患の発症月齢

(3) 両疾患における tax 遺伝子発現

T 細胞白血病を発症したマウス群と関節炎を発症したマウス群の病変部位での tax 遺伝子の発現をみたのが図 3 である。

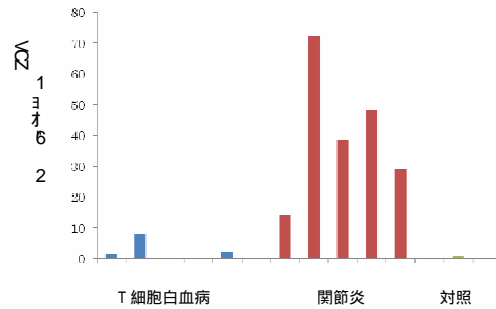


図3 . 両疾患における tax 遺伝子発現

白血病マウスでは、対照マウスに比し、0.3-8 倍の発現量であったのに対し、関節炎を発症したマウスでは、14.4-72.5 倍と明らかに高かった。

(4) 両疾患におけるサイトカイン発現

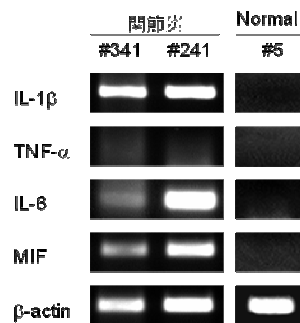


図4 . 関節炎における炎症性サイトカイン mRNA 発現

炎症性サイトカイン (IL-1β, IL-6, MIF, TNF-α) の発現量を半定量 PCR で測定したところ、関節炎マウスでは TNF-α を除いて高い発

現が確認された。一方、白血病マウスでは少数のマウスが IL-6 を発現していたが、多くは確認されなかった。また、血清中のサイトカインを ELISA によって測定したところ、IL-6 のみ高い値を示した。

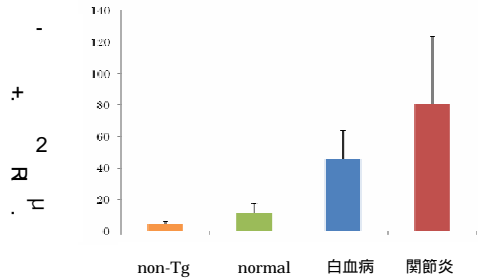


図5. 両疾患における血清中 IL-6 量

(5) Tax-Tg マウスの p53 機能

両疾患の tax 遺伝子発現量および炎症性サイトカイン等の検索から、由来する細胞が異なることが示唆された。また、最近加齢による p53 機能の低下がマウスで証明され、そこでこの機能低下と両疾患の関連性を検討した。発症前マウス(6カ月齢)では、p53 mRNA レベルは同腹の non-Tg マウスの 1.8 倍と有意に上昇していた。一方、その機能が正常か、線を照射、p53 を誘導し、その標的遺伝子の発現をみたのが図6である。

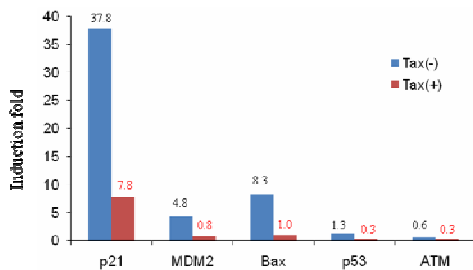


図6. 疾患発症前 Tax-Tg マウスにおける p53 機能

すでに Tax-Tg マウスでは、発症前 6 カ月齢で、すでに p53 機能が有意に低下していることが明らかとなった。これらマウスの p53 の変異を exon5-8 について検索したが変異はみられなかった。また、白血病を発症した 5 例についても検討したが、変異は全くみられなかった。このことは、p53 の mRNA の発現の上昇はみられるものの、変異はなく、機能低下が認められる ATL 患者と類似している。また、発症前マウスに p53 機能低下がすでにみられることから、p53 が発症になんらかの役割を果たしていることが示唆された。

(6)まとめ

Tax - Tg マウスは、T 細胞白血病および関節炎を引き起こす。

両疾患の発症には、長期間を要する。

両疾患の病変部位に観察されるリンパ球は、由来が異なるものと考えられる。

Tax - Tg マウスは、発症前(6カ月齢)の時点ですでに p53 機能が低下しており、p53 が疾患発症に重要な役割を果たしていることが示唆される。

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 6 件)

Ikeda, T., Ohsugi, T., Kimura, T., Matsushita, S., Maeda, Y., Harada, S., and Koito, A.: The anti-retroviral potency of APOBEC1 deaminase from small animal species. *Nucleic Acids Res.*, 36: 6859-6871, 2008. 査読有

Ohsugi, T. and Koito, A.: Invited review: Current topics in prevention of Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection: NF- κ B inhibitors and APOBEC3. *International Reviews of Immunology* 27:177-205, 2008. 査読有

Ohsugi, T., Kumasaka, T., Okada, S., Ishida, T., Yamaguchi, K., Horie, R., Watanabe, T. and Umezawa, K.: Dehydroxymethylepoxyquinomicin

(DHMEQ) therapy reduces tumor formation in mice inoculated with Tax-deficient adult T-cell leukemia-derived cell lines. *Cancer letters*, 257: 206-215, 2007. 査読有

Ohsugi, T., Kumasaka, T., Okada, S. and Urano, T.: Development T cell leukemia/lymphoma and arthropathy in transgenic mice carrying human T cell leukemia virus type I tax gene. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 23: 583 (0-14), 2007. 査読無

Ohsugi, T., Kumasaka, T., Okada, S. and Urano, T.: The Tax protein of HTLV-1 promotes oncogenesis in not only immature T cells but also mature T cells. *Nature Medicine*, 13:527-528, 2007. 査読有

Ohsugi, T. and Koito, A. Human T cell leukemia virus type I is resistant to the antiviral effects of APOBEC3. *J. Virol. Methods*, 139:93-96, 2007. 査読有

〔学会発表〕(計 10件)

大杉剛生: ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型(HTLV-1) *tax* 遺伝子導入マウスにおける p53 機能の解析。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、10.26-28、2008、岡山

大杉剛生: ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型(HTLV-1)*tax* 遺伝子導入マウスにみられた成熟 T 細胞白血病・リンパ腫の解析。日本実験動物科学技術 5.15-17、2008、仙台

Takeo Ohsugi: Transgenic Mice Expressing the HTLV-1 Tax Gene Develop Two Distinct Diseases: Leukemia and Arthropathy. 99th AACR Annual Meeting, April 12-16, 2008 San Diego, USA.

Terumasa Ikeda: The Anti-HIV-1 Potency of APOBEC1 Cytidine Deaminase from Small Animal Species The 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 3-6, 2008, Boston, USA.

池田輝政: 哺乳類 APOBEC1 による HIV 制御機構の解析。The anti-HIV potency of APOBEC1 cytidine deaminase from mammalian species 第 30 回日本分子生物学学会年会 12.11-15、2007、横浜

大杉剛生: ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型(HTLV-1)*Tax* 遺伝子導入マウスの病態解析 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 10.21-23、2007、札幌

池田輝政: 哺乳類 APOBEC1 分子による HIV 複製の阻害 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 10.21-23、2007、札幌

吉住正等美: マウスからの蟻虫駆除とその後の経過について。第 41 回日本実験動物技術者協会総会 7.6、2007、名古屋

Takeo Ohsugi: Development T cell leukemia/lymphoma and arthropathy in transgenic mice carrying human T cell leukemia virus type I tax gene. 13th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, May 22-25, 2007, Hakone, Japan.

坂本哲志: X 線生体撮像システムを用いたマウス関節炎の解析。第 30 回日本実験動物技術者協会九州支部総会、第 26 回日本実験動物技術者協会九州支部研究発表会 4.7-8 2007、鹿児島

〔図書〕(計 2件)

Ohsugi, T. and Koito, A.: Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) and Antiviral Enzyme APOBEC3. Viral Genomes: Diversity, Properties and Parameters, Zhi Feng and Ming Long

(eds), NOVA Scientific publishers (in press).

大杉剛生: ATL、HTLV-1 の動物モデル。pp84-93、『HTLV-1 と疾患』渡邊俊樹、上平 憲、山口一成編、文光堂 2007 年

〔その他〕シンポジウム(計 2件)

Irie T, Hirata S, Maruyama T, Saito H, Kitamura K, Nishikawa T, Hokimoto S, Katsuki H, Morioka H, Ohsugi T, Ikeda T, Ishizuka T, Nakagawa K. Leading Project for Personalized Medicine at the Center for Clinical Pharmaceutical Sciences(CCPs). The 6th Kumamoto University Forum in Surabaya, Nov. 5-6, 2008, Surabaya Indonesia.

Takeo Ohsugi: Tax transgenic mice provide new clues about Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) disorder (invited speaker). "Advancel Diagnosis and Therapy of Refractory Diseases Caused by Viral Infection" Kagoshima University International Symposium, 3.27, 2008, Kagoshima, Japan.

6. 研究組織

(1)研究代表者

大杉 剛生(OHSUGI TAKEO)

熊本大学・生命資源研究支援センター・
准教授

研究者番号: 00211102

(2)研究分担者

(3)連携研究者