

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08843

研究課題名（和文）ATLにおける制御性T細胞の選択的な増殖機構：OX40L/OX40に着目して

研究課題名（英文）Roles of OX40/OX40L in ATL

研究代表者

水口 真理子（Mizuguchi, Mariko）

琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：40581541

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：成人T細胞白血病（ATL）患者では、転写因子FOXP3を発現する制御性T細胞（Treg）の異常増殖が見られる。本研究では、Treg細胞が増殖するメカニズムを明らかにするために、ATL細胞における細胞表面分子OX40LおよびOX40の役割を解析した。その結果、FOXP3+細胞ではOX40が発現し、FOXP3-細胞ではOX40Lが発現していること、また、OX40シグナルの活性化は、HTLV-1感染細胞の増殖に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果より、HTLV-1感染者体内に存在するFOXP3- OX40L+細胞とFOXP3+ OX40+ ATL細胞がお互いに接触反応することにより、FOXP3+ ATL細胞の増殖が促進される可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) is an aggressive malignant disease of mature T-cells caused by human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) infection. ATL cells express the transcription factor FOXP3, which is primarily expressed in regulatory T-cells (Tregs). Normal Treg cells differentiate and expand through the activation of OX40 signaling. To elucidate the mechanisms underlying the expansion of FOXP3+ HTLV-1-infected cells, the expression of OX40 and its ligand OX40L on ATL cells were examined. Flow cytometric analysis showed that FOXP3+ cells expressed OX40, while FOXP3- cells expressed OX40L. OX40 signaling was found to be involved in the expression of genes related to anti-apoptosis and cell growth. Furthermore, the deprivation of OX40 and OX40L resulted in inhibited cell growth in HTLV-1-infected cells. These findings suggest that the interaction between FOXP3- OX40L+ cells and FOXP3+ OX40+ ATL cells stimulates the proliferation of FOXP3+ ATL cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：HTLV-1 ATL OX40 OX40L FOXP3

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (ATL) は、CD4 陽性 T 細胞の腫瘍性増殖を特徴とする極めて悪性度の高い白血病である。疫学的病因は、主に母乳を介して感染するヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) であり、感染者の約 5% が ATL を発症する。ATL 患者の末梢血中では、CD4⁺ T 細胞サブセットのうち、転写因子 forkhead box protein P3 (FOXP3) 陽性の制御性 T 細胞 (Treg) が選択的に増加しており、このことが ATL の発症に寄与していると考えられている。しかしながら、HTLV-1 がどのようにして FOXP3⁺ Treg 細胞を腫瘍化するのか詳細は明らかになっていない。

TNF 受容体ファミリーに属する OX40 は主に活性化 T 細胞に発現し、抗原提示細胞が発現するリガンド (OX40L) が結合すると、その下流シグナルが T 細胞の活性化および細胞増殖に関わる遺伝子の発現を誘導する。患者 ATL 細胞では OX40 の発現が上昇し、また HTLV-1 形質転換細胞上にはそのリガンドである OX40L も同時に発現することから、HTLV-1 感染者においては OX40 のオートクラインあるいはパラクライン刺激が惹起されると推測される。近年、マウスの CD4⁺ CD25⁺ T 細胞を可溶性 OX40L で刺激すると、選択的に foxp3⁺ Treg 細胞の増殖を誘導することが報告された (Kumar et al., Sci Rep, 2017)。患者 ATL 細胞は、インターロイキン 2 (IL-2) の受容体である CD25 の発現が上昇している。これらの背景から、HTLV-1 感染者では、OX40L/OX40 系の活性化を介して選択的に FOXP3⁺ 細胞が増殖することが予想された。

2. 研究の目的

患者 ATL 細胞では OX40 の発現が上昇し、また HTLV-1 形質転換細胞上にはそのリガンドである OX40L も同時に発現する。HTLV-1 感染細胞に発現する OX40L が OX40 を刺激することで、選択的に FOXP3⁺ Treg 細胞が増殖することが予想される。本研究では、患者 ATL 細胞を用いて、FOXP3⁺ 細胞における OX40L および OX40 の発現と、OX40 シグナルが細胞増殖関連遺伝子の発現に与える影響を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 沖縄県の急性型 ATL 患者における FOXP3 高発現例の頻度および OX40 の発現解析
琉球大学が運営する ATL バイオバンクに登録された急性型 ATL 患者から、末梢血単核球 (PBMC) を単離し、FOXP3 および CD25 の発現をフローサイトメトリーで解析した。CD25 は ATL 細胞のバイオマーカーとして用いた。患者 ATL 細胞のうち、20%以上が FOXP3 を発現している症例を FOXP3 高発現例とした。

(2) 急性型患者 ATL 細胞における FOXP3、OX40 および OX40L の発現解析
HTLV-1 抗原を発現させるために、急性型 ATL 患者から単離した PBMC を 1 日培養した。1 日培養した PBMC を用いて、ATL 細胞における FOXP3、OX40 および OX40L の発現をフローサイトメトリーで解析した。

(3) FOXP3 が OX40L および OX40 の発現に与える影響の解析
FOXP3 を発現する HTLV-1 感染細胞株 YT#1 (健常人 PBMC より Treg を単離し、HTLV-1 感染細胞株と共培養することにより HTLV-1 を感染させ、樹立した細胞株) を用いて、RNA 干渉法により FOXP3 の発現を抑制した。48 時間培養後、FOXP3、OX40、OX40L および Tax の発現をフローサイトメトリーで解析した。

(4) OX40 シグナルが細胞増殖に与える影響の解析
① OX40 および OX40L に対する siRNA を YT#1 細胞へ導入し、48 時間培養後に細胞を回収した。それらの細胞から RNA を抽出し、抗アポトーシスおよび細胞周期関連遺伝子の発現を半定量 RT-PCR で解析した。② YT#1 細胞へ OX40 および OX40L に対する siRNA を導入後、0、24、48、72 時間で回収した細胞を用いて、MTT アッセイを行った。

4. 研究成果

(1) 沖縄県の急性型 ATL 患者における FOXP3 高発現例の頻度および OX40 の発現解析

これまでに、約6割のATL患者がFOXP3を高発現していることが報告されている (Satou et al., *Retrovirology*, 2012)。今回解析した急性型ATL患者のうち、14例中9例(64%)がFOXP3を高発現しており(図1)、過去の報告と一致した。また、FOXP3高発現検体とFOXP3陰性検体におけるOX40の発現を比較したところ、リンパ球分画におけるOX40発現細胞の割合はそれぞれ平均25.5%および9%であり、FOXP3を発現しないATL細胞では、OX40の発現が低かった。これらの結果は、FOXP3とOX40の発現に正の相関があることを示している。

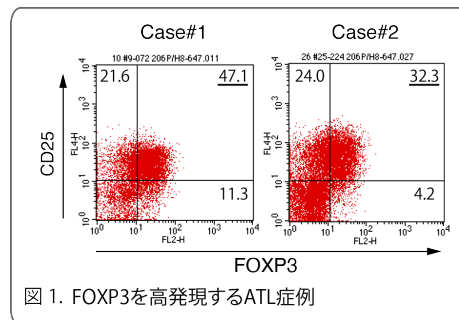


図1. FOXP3を高発現するATL症例

(2) 急性型患者ATL細胞におけるFOXP3、OX40およびOX40Lの発現解析

1日培養した患者ATL細胞を用いてFOXP3、OX40およびOX40Lの発現を解析すると、FOXP3⁺細胞でOX40が発現し、またFOXP3⁻細胞でOX40Lが発現した(図2)。この結果より、患者ATL細胞において、FOXP3⁺細胞群はOX40を発現し、OX40Lを発現しないことを明らかにした。

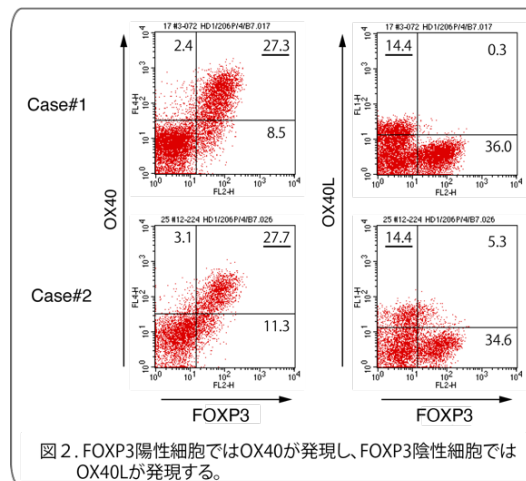


図2. FOXP3陽性細胞ではOX40が発現し、FOXP3陰性細胞ではOX40Lが発現する。

(3) FOXP3がOX40LおよびOX40の発現に与える影響

結果(2)より、FOXP3⁺細胞群はOX40Lを発現していなかった。そこでFOXP3⁺ HTLV-1感染細胞株であるYT#1細胞を用いて、FOXP3の発現を抑制し、FOXP3がOX40およびOX40Lの発現に与える影響を解析したところ、OX40Lの発現が上昇した。一方、OX40の発現には影響を与えなかった。このことより、FOXP3はOX40Lの発現を抑制していることが明らかとなった(図3)。

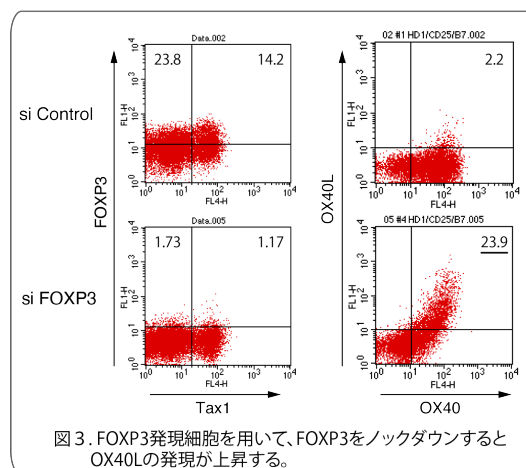


図3. FOXP3発現細胞を用いて、FOXP3をノックダウンするとOX40Lの発現が上昇する。

(4) OX40シグナルが細胞増殖に与える影響

OX40シグナルが細胞増殖に関与するかどうか明らかにするために、YT#1細胞へOX40およびOX40Lに対するsiRNAを導入し、抗アポトーシスおよび細胞周期関連遺伝子の発現を解析した。その結果、どちらのノックダウンでも抗アポトーシス分子や細胞周期関連遺伝子の発現は低下した(図4A)。次に、MTTアッセイを用いて、細胞増殖を解析すると、OX40およびOX40Lのノックダウンにより、細胞増殖は抑制された(図4B)。これらの結果より、YT#1細胞においてOX40シグナルは細胞増殖に関与することを明らかにした。

本研究よりATL細胞とHTLV-1感染細胞において、FOXP3はOX40Lの発現を抑制していること、またOX40シグナルはHTLV-1感染細胞の増殖に関与することが明らかとなった。HTLV-1感染者体内では、共存するFOXP3⁻OX40L⁺細胞とFOXP3⁺OX40⁺ATL細胞がお互いに接触反応することによりFOXP3⁺ATL細胞の増殖が促進される可能性が示唆された。

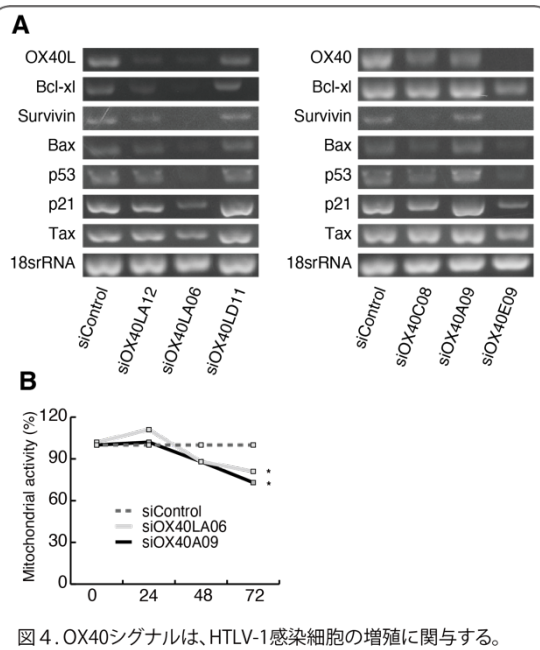


図4. OX40シグナルは、HTLV-1感染細胞の増殖に関与する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yuetsu Tanaka, Reiko Tanaka, Naoki Imaizumi, Mariko Mizuguchi, Yoshiaki Takahashi, Masaki Hayashi, Takashi Miyagi, Junnosuke Uchihara, Kazuiku Ohshiro, Hiroaki Masuzaki, Takuya Fukushima	4. 巻 13
2. 論文標題 A protective role of HTLV-1 gp46-specific neutralizing and antibody-dependent cellular cytotoxicity-inducing antibodies in progression to adult T-cell leukemia (ATL)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	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) 10.3389/fimmu.2022.921606	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 Megumi Kato, Naoki Imaizumi, Reiko Tanaka, Mariko Mizuguchi, Masaki Hayashi, Takashi Miyagi, Junnosuke Uchihara, Kazuiku Ohshiro, Junpei Todoroki, Kennosuke Karube, Hiroaki Masuzaki, Yuetsu Tanaka, Takuya Fukushima	4. 巻 14
2. 論文標題 Elevation of the plasma levels of TNF receptor 2 in association with those of CD25, OX40, and IL-10 and HTLV-1 proviral load in acute adult T-cell leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 751 ~ 751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14040751	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 Mariko Mizuguchi, Mitsuyoshi Takatori, Shugo Sakihama, Manami Yoshita-Takahashi, Naoki Imaizumi, Yoshiaki Takahashi, Hiroo Hasegawa, Kennosuke Karube, Takuya Fukushima, Masataka Nakamura, Yuetsu Tanaka	4. 巻 29
2. 論文標題 Acute type adult T-cell leukemia cells proliferate in the lymph nodes rather than in peripheral blood	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 1570 ~ 1577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41417-022-00475-0	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 Mariko Mizuguchi, Toshifumi Hara, Manami Yoshita-Takahashi, Takashi Kohda, Yuetsu Tanaka, Masataka Nakamura	4. 巻 26
2. 論文標題 Promoter CpG methylation inhibits Kruppel-like factor 2 (KLF2)-mediated repression of hTERT gene expression in human T-cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100984 ~ 100984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.100984	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 Mariko Mizuguchi, Yoshiaki Takahashi, Reiko Tanaka, Takuya Fukushima, Yuetsu Tanaka.	4. 巻 9
2. 論文標題 Conservation of a neutralization epitope of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) among currently endemic clinical isolates in Okinawa, Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens9020082	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 Hironori Kato, Kohki Okabe, Masato Miyake, Kazuki Hattori, Tomohiro Fukaya, Kousuke Tanimoto, Shi Beini, Mariko Mizuguchi, Satoru Torii, Satoko Arakawa, Masaya Ono, Yusuke Saito, Takashi Sugiyama, Takashi Funatsu, Katsuaki Sato, Shigeomi Shimizu, Seiichi Oyadomari, Hidenori Ichijo, Hisae Kadowaki, Hideki Nishitoh.	4. 巻 3
2. 論文標題 ER-resident sensor PERK is essential for mitochondrial thermogenesis in brown adipose tissue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900576	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 -

〔学会発表〕 計12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 水口真理子, 高橋良明, 田中礼子, 今泉直樹, 山下暁朗, 福島卓也, 田中勇悦
2. 発表標題 ATLにおけるOX40/OX40Lの役割.
3. 学会等名 第8回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中勇悦, 田中礼子, 今泉直樹, 水口真理子, 高橋良明, 福島卓也
2. 発表標題 ATL感染病態進行に対する抗HTLV-1 gp46中和およびADCC抗体の制御的役割.
3. 学会等名 第8回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水口真理子, 高鳥光徳, 崎浜秀悟, 高橋真奈美, 今泉直樹, 高橋良明, 長谷川寛雄, 加留部謙之輔, 福島卓也, 中村正孝, 田中勇悦
2. 発表標題 急性型ATL患者の末梢ATL細胞は増殖しない.
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋良明, 志田壽利, 宮城拓也, 田中礼子, 水口真理子, 田中勇悦
2. 発表標題 新規HTLV-1中和モノクローナル抗体の作製.
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中勇悦, 田中礼子, 水口真理子, 高橋良明, 浦野恵美子, 保富康宏, 福島卓也
2. 発表標題 拡大培養NK細胞とヒト化HTLV-1中和単クローン抗体を介したADCCによる自家HTLV-1産生細胞の駆逐.
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤愛美, 田中礼子, 水口真理子, 今泉直樹, 田中勇悦, 福島卓也
2. 発表標題 ATLバイオマーカーとしての可溶性TNF受容体2型抗原: 可溶性CD25・OX40量との相関性と自然免疫系からの放出.
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水口真理子, 高橋良明, 田中礼子, 福島卓也, 田中勇悦
2. 発表標題 ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 臨床分離株における広域中和エピトープの保存
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中勇悦, 田中礼子, 水口真理子, 高橋良明
2. 発表標題 HTLV-1感染後のPBMCにおける抗HTLV-1中和単クロン抗体による感染制御
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋良明, 志田壽利, 田中礼子, 水口真理子, 田中勇悦
2. 発表標題 新規HTLV-1エンベロープ高発現型組換え弱毒ワクシニアウイルスによるHTLV-1中和抗体の誘導
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中礼子, 水口真理子, 高橋良明, 田中勇悦
2. 発表標題 ウサギ胸腺細胞の顕著なHTLV-1感染感受性: ウサギ化マウスの作出に向けて
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水口真理子, 原敏文, 高橋真奈美, 幸田尚, 田中勇悦, 福島卓也, 中村正孝
2. 発表標題 HTLV-1感染細胞におけるKruppel-like factor 2 (KLF2) を介したhTERT遺伝子の発現制御機構
3. 学会等名 第72回日本細菌学会九州支部総会 第56回日本ウイルス学会九州支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中礼子, 水口真理子, 高橋良明, 田中勇悦
2. 発表標題 HTLV-1母子感染予防ワクチン開発への挑戦
3. 学会等名 第72回日本細菌学会九州支部総会 第56回日本ウイルス学会九州支部総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	田中 勇悦 (Tanaka Yuetsu) (30163588)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (18001)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------