

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22904

研究課題名（和文）HTLV-1によるサイトカインシグナル経路攪乱を介した発がんメカニズムの解析

研究課題名（英文）The mechanisms for oncogenesis induced by HTLV-1-mediated modulation of cytokine signaling

研究代表者

樋口 悠介 (Higuchi, Yusuke)

熊本大学・病院・助教

研究者番号：80882141

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ATL症例で高頻度に見られるSTAT3 D661Y変異はHBZとの結合をより強固なものとすることが判明した。SIEコンセンサス配列やTREコンセンサス配列を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイより、HBZはSTAT3 D661Y変異体共存在下にJAK-STATシグナル経路のみならず、TGF-シグナル経路も活性化することを見出した。

一方、IL-10ノックアウトマウスを用いた解析よりHBZトランスジェニック/IL-10ノックアウトマウスは低体重、活動性の低下、毛並みの乱れなどの痛みや病気の徴候を示し、早期に死亡に至ることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

STAT3の変異はHTLV-1キャリアやATL症例に多く見られる変異の1つである。本研究ではSTAT3変異のHBZ病原性発現における意義を解析した。本研究で得られた知見は、HTLV-1病原性発現機構の解明に寄与できるものと考えられる。また、HBZ病原性発現にIL-10が与える影響について、生体を用いた研究を行った。これらのマウスの解析を進めることで、ATLの発症予測やATLに対する新規治療法の開発に繋がるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The STAT3 D661Y mutation is frequently found in ATL cases. It was found that the STAT3 D661Y mutation binds more tightly to HBZ than wild-type STAT3. Luciferase reporter assays using SIE consensus sequence and TRE consensus sequence showed that HBZ activates not only the JAK-STAT signaling pathway but also the TGF- signaling pathway under the coexpression of STAT3 D661Y mutant.

On the other hand, analysis of IL-10 knockout mice revealed that HBZ transgenic/IL-10 knockout mice show signs of pain and disease, such as low body weight, reduced activity, and disturbed fur, leading to early death.

研究分野：血液内科学

キーワード：HTLV-1 HBZ IL-10 STAT3

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病(ATL)は HTLV-1 感染後 40 ~ 50 年の経過を経て約 5%の患者に発症する予後不良の造血器腫瘍であり、その病態の解明及び新規治療薬の開発は急務である。HTLV-1 プロウイルスに存在する pX 領域にはプラス鎖に Tax がマイナス鎖には HTLV-1 bZIP factor (HBZ)がコードされる。当研究室では、HBZ が ATL 細胞内で恒常的に発現している唯一のウイルス遺伝子であること、ATL 細胞の増殖に必須であることなどを見出し、HTLV-1 関連疾患における HBZ の重要性を解明する研究を行っている。また、当研究室で樹立した CD4 陽性 T 細胞特異的に HBZ を発現するトランスジェニック(HBZ-Tg)マウスは皮膚炎などの炎症性疾患や T 細胞リンパ腫の発症、Foxp3 陽性 T 細胞の増加など、HTLV-1 感染者と類似の病態を示し、HBZ-Tg が HTLV-1 関連疾患の病態解明に極めて重要な動物モデルであることを報告した。

申請者は他の多くの癌腫において慢性炎症ががんを引き起こすことから、IL-6 の抑制が HBZ-Tg マウスにおける炎症、発がんを抑制すると予想した。しかし、予想に関して、HBZ-Tg マウスと IL-6 ノックアウトマウス(IL-6 KO)より作成した HBZ-Tg/IL-6 KO マウスでは、早期より重度の炎症を起こし、T 細胞リンパ腫の発症頻度も著増していることを見出した。さらに本マウスを用いた解析により HBZ が抑制性サイトカイン IL-10 の産生を促進すると共に、IL-10 の下流にある STAT 分子と核内で結合し、そのシグナル伝達経路を攪乱し、結果として IL-10 の刺激下に CD4 陽性 T 細胞の増殖を促進することを見出した(図 1)。一方、STAT3 は IL-6 や IL-10 のシグナル伝達経路である JAK-STAT シグナル伝達経路の下流分子の 1 つであり、IL-6 や IL-10 の刺激によって STAT3 が活性化することで、CD4 陽性 T 細胞が様々な免疫応答を調整していることが知られている。最近の研究において無症候性キャリアや ATL 症例で STAT3 の変異が検出されており、ATL の多段階発症に関与していることが報告されている。

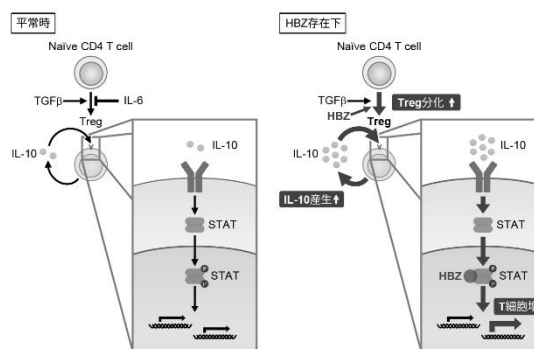


図 1 HBZ は IL-10 産生を促進、STAT と核内で結合し、T 細胞の増殖を促進する

2. 研究の目的

(1) HTLV-1 による ATL 発症における STAT3 変異の意義

無症候性キャリアや ATL 症例でみられる STAT3 変異のうち、最も高頻度に見られる D661Y 変異に着目し、この STAT3 変異が HBZ との結合やその下流のシグナル伝達経路に与える影響について検討を行う。

(2) HBZ による病原性発現における IL-10 の意義

IL-10 が欠損した IL-10 ノックアウト(IL-10 KO)マウスを用い、本研究室で作成した HBZ-Tg マウスと交配することで、HBZ 病原性発現における IL-10 の役割について、更なる解析を行う。

3. 研究の方法

(1) HTLV-1 による ATL 発症における STAT3 変異の意義

STAT3 野生型(STAT3 WT)配列を鋳型とし、overlap extension PCR により STAT3 D661Y 変異体を作成し、発現ベクターにクローニングを行った。STAT3 WT 及び STAT3 D661Y 変異体の発現ベクターを用いることで、以下の項目について解析し、HTLV-1 発症における STAT3 D661Y 変異の意義について検討する。

- ・ HBZ と STAT3 蛋白の結合に与える影響：共免疫沈降
- ・ HBZ 及び STAT3 蛋白の機能に与える影響：ルシフェラーゼレポーターアッセイ

(2) HBZ による病原性発現における IL-10 の意義

HBZ-Tg マウス及び IL-10 KO マウス、またそれらを交配し作成した HBZ-Tg/IL-10 KO マウス、また、WT マウスについて以下の項目について経時的に解析を行い、IL-10 が HBZ による病原性発現に与える影響について検討する。

- ・ 体重の推移
- ・ 痛みの徴候の発現率
- ・ 皮膚炎発症率
- ・ 生存期間

4. 研究成果

(1) HTLV-1 による ATL 発症における STAT3 変異の意義

STAT3 は無症候性キャリアや ATL 症例で高率に変異が検出される分子の 1 つであるが、今回、特に高頻度に見られる D661Y 変異を加えた STAT3 D661Y 変異体を発現するプラスミドを

STAT3 WT を鋳型として overlap extension PCR 法を用いて作成した。先行研究において、HBZ が STAT3 と結合することを報告しているが、D661Y 変異が HBZ と STAT3 の結合に与える影響を評価するため、HBZ 及び STAT3 WT あるいは STAT3 D661Y 変異体を HEK293T 細胞株に強制発現させたうえで共免疫沈降を用いてそれらの結合を評価した。その結果、STAT3 WT よりも STAT3 D661Y 変異体が HBZ と強固に結合することを見出した (図 1)。STAT3 D661Y 変異体が STAT3 WT よりも HBZ と強固に結合するという所見は、STAT3 への変異挿入が HBZ-STAT3 による発がん機序に大きな影響を及ぼす可能性を示唆している。今後、HBZ-STAT3 D661Y 変異体が宿主遺伝子の転写に与える影響を明らかにするため、特に IL-10 刺激下において、トランスクリプトーム解析や ChIP-seq などを用いた網羅的解析を行う予定である。

次に STAT3 D661Y 変異体及び HBZ の共発現が STAT3 のプロモーターに与える影響を確認するため、STAT3 WT あるいは STAT3 D661Y 変異体と HBZ を HEK293 細胞株に強制発現し、STAT3 のコンセンサス配列である sis-inducible element (SIE) を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。変異型 STAT3 は野生型 STAT3 に比べ、SIE プロモーター活性が高いことが分かった。また、HBZ はこの STAT3 D661Y のプロモーター活性を増強することが分かった (図 2)。

一方、HBZ は Smad3 や p300 に結合し TGF- β シグナル経路を活性化することを報告しているが、STAT3 は Smad3 と結合し、Smad4 と競合することで TGF- β シグナル経路を阻害することが知られている。HBZ 及び STAT3 D661Y が TGF- β シグナル経路への影響を確認するため、TPA response elements (TREs) を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、STAT3 は野生型、変異型ともに単独では TRE プロモーター活性に影響を与えなかったが、HBZ を加えることで TRE プロモーター活性は増強し、その変化は HBZ と D661Y 変異型 STAT3 の共存下で最大となった (図 3)。

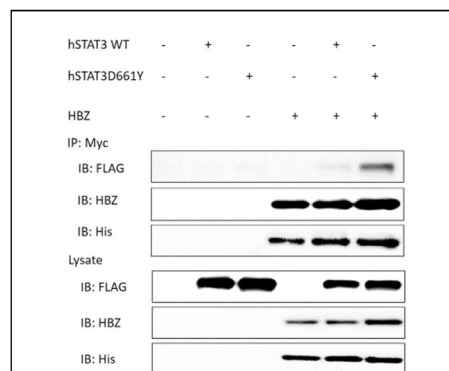


図 2 HBZ は STAT3 D661Y 変異体とより強固に結合する

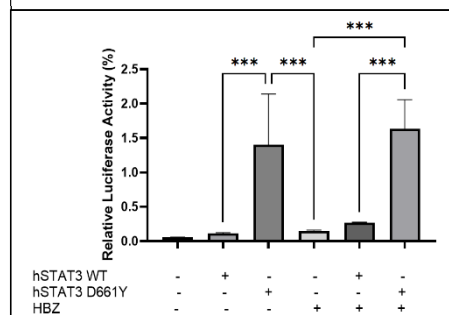


図 3 HBZ は STAT3 D661Y のプロモーター活性を増強する

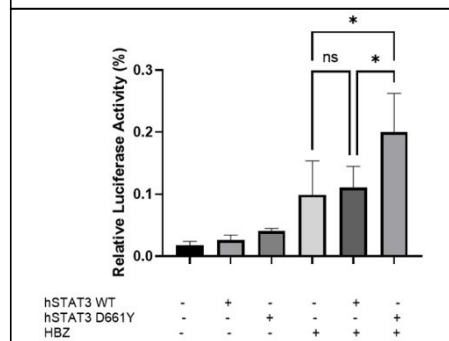


図 4 HBZ は STAT3 D661Y 共存下に TGF- β シグナル経路を活性化する

(2) HBZ による病原性発現における IL-10 の意義

HBZ の病原性発現における IL-10 の役割を評価するために HBZ トランスジェニック (HBZ-Tg) マウスに IL-10 ノックアウト (IL-10 KO) マウスを交配し、HBZ-Tg/IL-10 KO マウスを作成した。表現型の観察を行ったところ、IL-10 KO マウスや HBZ-Tg/IL-10 KO マウスは、他の遺伝子型と比較し、体重が少ない傾向にあり、中でも HBZ-Tg/IL-10 KO マウスは経時的に体重が減少していきることが分かった (図 5)。多くの HBZ-Tg/IL-10 KO マウスは 12 週前後までに痛みや病気の徴候を示し、その生存期間中央値は 51 日と他の遺伝子型のマウスと比較しても早期に死亡することが判明した。体重減少や死亡の原因としては高頻度で下痢が見られることから、腸炎の影響が示唆された。HBZ-Tg/IL-10 KO マウスにおいて皮膚炎の徴候は見られなかった。このことは IL-10 が HBZ による皮膚炎発現に重要な役割を担っていることが示唆される。HBZ-Tg/IL-10 KO マウスは短命であり、今回の解析では T 細胞リンパ腫の発症率や皮膚炎発症の詳細な分子機構についての解析は行っていない。より長期間の観察を行い、IL-10 による HBZ 病原性発現に与える影響について解析を行うためには、T 細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスの作成が有効であると考えられた。

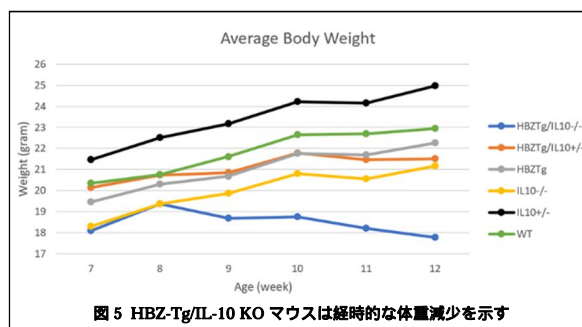


図 5 HBZ-Tg/IL-10 KO マウスは経時的な体重減少を示す

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Higuchi Yusuke, Yasunaga Jun-ichirou, Mitagami Yu, Tsukamoto Hirotake, Nakashima Kazutaka, Ohshima Koichi, Matsuoka Masao	4. 巻 117
2. 論文標題 HTLV-1 induces T cell malignancy and inflammation by viral antisense factor-mediated modulation of the cytokine signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 13740 ~ 13749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1922884117	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 Kinoshita Tomohiro, Hatake Kiyohiko, Yamamoto Kazuhito, Higuchi Yusuke, Murakami Satsuki, Terui Yasuhito, Yokoyama Masahiro, Maruyama Dai, Makita Shinichi, Hida Yukari, Saito Tomohisa, Tobinai Kensei	4. 巻 51
2. 論文標題 Safety and pharmacokinetics of polatuzumab vedotin in Japanese patients with relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 1 dose-escalation study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 70 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa169	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 Shichijo Takafumi, Nosaka Kisato, Tatetsu Hiro, Higuchi Yusuke, Endo Shinya, Inoue Yoshitaka, Toyoda Kosuke, Kikukawa Yoshitaka, Kawakita Toshiro, Yasunaga Jun ichirou, Matsuoka Masao	4. 巻 -
2. 論文標題 Beneficial impact of first line mogamulizumab containing chemotherapy in adult T cell leukaemia lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	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) 10.1111/bjh.18281	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 樋口 悠介, 安永 純一郎, 三田上 侑, 大島 孝一, 松岡 雅雄
2. 発表標題 HBZはSTAT1/3との結合を介して, IL-10/JAK/STATシグナル経路を変調させる
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田 麻美, 七條 敬文, 樋口 悠介, 安永 純一郎, 野坂 生郷, 松岡 雅雄, 中川 正法
2. 発表標題 HTLV-1関連疾患におけるプロウイルス構造と宿主免疫の違い
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020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

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