

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390193

研究課題名（和文） HTLV-1 bZIP factor による炎症・免疫異常機構と関連疾患

研究課題名（英文） Inflammation and immunological dysfunction by HTLV-1 bZIP factor in HTLV-1 associated diseases

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（和文）：HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子は HTLV-1 プロウイルスのマイナス鎖にコードされ、全ての ATL 症例、HTLV-1 感染者で発現している。HBZ トランスジェニックマウスでは、T リンパ腫に加えて、炎症性疾患が高率に合併する。この炎症の原因としてインターフェロンガンマの過剰産生を同定した。その原因は HBZ によって誘導される Foxp3 発現が不安定であり、Foxp3 陰性細胞へと変換することが示唆された。HTLV-1 感染者では、細胞性免疫障害が存在するが、その原因として HBZ が CD4 陽性 T リンパ球で NFAT, AP-1 経路を抑制し、インターフェロンガンマの産生を障害することを同定した。

研究成果の概要（英文）：HTLV-1 bZIP factor (HBZ) is encoded by the minus strand of HTLV-1 provirus, and expressed in all ATL cases and HTLV-1 carriers. HBZ transgenic mice develop not only T-cell lymphomas but also inflammatory diseases. We found that overproduction of interferon- γ (IFN- γ) caused these inflammation. As a mechanism, Foxp3 expression that is induced by HBZ is unstable, which converts Foxp3+ T cells to Foxp3- T cells with IFN- γ overproduction. HTLV-1 infected individuals have impaired cell-mediated immunity. As a mechanism of this immunodeficiency, we found that HBZ inhibited NFAT and AP-1, which leads to suppressed production of IFN- γ in CD4+ T cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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、炎症、HBZ、Tax

1. 研究開始当初の背景
HTLV-1 はヒトにおいて疾患を起こすことが明らかになった最初のレトロウイルスであり ATL だけでなく HAM, ぶどう膜炎、肺胞

症などの炎症性疾患も起こす。HTLV-1 がどのようにして ATL, HAM を引き起こすかは未だ不明な点が多く残されている。これまで HTLV-1 の病原性遺伝子としては tax に焦点

が当てられてきた。Tax はウイルス遺伝子の転写を誘導するだけでなく宿主因子と相互作用して NF- κ B、AP-1、CREB 経路の活性化、p53 の機能的抑制を起こす。これらの作用により Tax は感染細胞を増殖させ、がんや炎症性疾患を起こすと考えられてきた。しかし、約 60% の ATL 症例では Tax が発現していない。また HAM 患者でも tax 発現を認めない場合も多い。Tax 発現を抑制する機序を明らかにするために ATL 細胞における HTLV-1 プロウイルスを解析し、1) tax 遺伝子の変異・欠失、2) tax 遺伝子発現のプロモーターである 5'側 LTR の DNA メチル化、3) 5'側 LTR の欠失によって Tax 発現が阻止されることを明らかにしてきた (Matsuoka M and Jeang KT. Nat Rev Can, 2007) (図 1)。この解析を通じて 5'側 LTR はメチル化されておらず欠失も認めないことから 3'側 LTR をプロモーターとしてアンチセンス側から転写される HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子が重要であることが示唆された。我々は HBZ が全ての ATL 症例で発現しており、増殖を促進することを明らかにした (Satou Y, et al, PNAS, 2006)。HBZ を発現するトランスジェニックマウスを作製し解析を行ったところ高率に T リンパ腫の発症を認めた。また皮膚炎を高率に発症することが明らかとなり、皮膚・肺・大腸において CD3, 4 陽性 T リンパ球の浸潤を認めた。これは HTLV-1 キャリアで認められる所見と同様である。この HBZ トランスジェニックマウスでは Foxp3 陽性 T リンパ球が増加しており (図 2)、その増殖も亢進していた。このような制御性 T リンパ球の増加は HTLV-1 キャリアでも報告されている。HBZ トランスジェニックマウスでは CD4 陽性 T リンパ球の接着・遊走能が亢進し、サイトカインの産生異常も認められた。我々は HBZ 遺伝子の発現量は HAM の病勢と極めて良く相関していることを報告しており (Saito M, et al, Retrovirology, 2009)、HBZ が HTLV-1 関連炎症性疾患と密接に関連していることが示唆される。このような結果から HBZ トランスジェニックマウスの示す形質は HTLV-1 感染の病態と極めて類似しており、HBZ は発がん・炎症性疾患という HTLV-1 の病原性の中心的なウイルス遺伝子であると考えられる。

2. 研究の目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は成人 T 細胞白血病 (ATL) と炎症性疾患 (HTLV-1 脊髄症、ぶどう膜炎等) を惹起するが、その発症機構は未だ不明である。我々は HTLV-1 のアンチセンス転写産物である HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子が発がんのみならず炎症性疾患にも重要な働きをしていることを見出した。HBZ トランスジェニ

ックマウスでは高率に T 細胞リンパ腫を発症するが、その半数では Foxp3 の発現を認め制御性 T リンパ球由来である。HBZ トランスジェニックマウスでは制御性 T リンパ球が増加しており皮膚・肺へのリンパ球浸潤を認めサイトカインの産生異常も伴っている。その機序として HBZ は Foxp3 発現を誘導し制御性 T リンパ球を増殖させると同時に Foxp3、NFAT と相互作用し、その機能失調をもたらすことを見出した。本研究では HBZ による免疫攪乱の分子機構を解析し HTLV-1 関連免疫異常の病態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) Foxp3 誘導能

マウスナイーブ T リンパ球にレトロウイルスベクターを用いて HBZ を発現させ、Foxp3 発現を FACS で解析した。

(3) HBZ トランスジェニックマウスの単純ヘルペスウイルス 2 型に対する感受性

HBZ トランスジェニックマウス、コントロールマウスに HSV2 を感染させ、その感受性を解析した。

(4) 共焦点顕微鏡

His タグ HBZ と FLAG タグ Smad 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 による Foxp3 遺伝子の発現誘導

HBZ 発現レトロウイルスベクターにより、マウスナイーブ T リンパ球に HBZ を発現させると Foxp3 発現が誘導された。Foxp3 発現は TGF- β により誘導されることが報告されていたが、HBZ は TGF- β と協調的に Foxp3 発現を誘導した。この機序として HBZ が TGF- β /Smad 経路を強く活性化することを見出した。この活性化は p300 依存的であり、免疫沈降法により HBZ が Smad2/3, p300 と結合することによって、TGF- β /Smad 経路を活性化することを見出した。HBZ は、ヒト T リンパ球に導入しても FoxP3 発現を誘導することから、ヒトにおいても、この機構が存在することが示された。

(2) HBZ による免疫障害

HTLV-1 感染者では、細胞性免疫障害が存在することが知られていたが、その機序は不明であった。我々は HBZ が細胞性免疫を障害している可能性を考え、HBZ トランスジェニックマウスを用いて実験を行った。CD4 特異的プロモーター・エンハンサーによって HBZ 遺伝子を発現するトランスジェニックマウ

ス (HBZ-Tg) に病原体 (HSV-2, *Listeria monocytogenes*) を感染させ、生体防御反応を解析した。HBZ-Tg は non-Tg に比べて両病原体の感染に対する抵抗性が低下しており、その低下は感染後期(獲得免疫)に観察された。病原体に感染した HBZ-Tg では IFN- γ 産生が non-Tg に比べて著しく低下しており、抵抗性低下の主要な原因と考えられた。獲得免疫での IFN- γ 産生細胞として CD4 T 細胞が知られているため、次に病原体に感染した HBZ-Tg から CD4 T 細胞を回収し、病原体抗原で刺激し、サイトカイン産生を解析した。HBZ-Tg からの CD4 T 細胞は IFN- γ に加え、IL-2 や TNF- α の産生も同様に低下している事を確認した。HBZ による IFN- γ 産生低下の機序を解析するために IFN- γ プロモーターに対する HBZ の影響を解析し、クロマチン免疫沈降法で転写因子の結合を検討した。それら実験の結果から HBZ は NFAT(nuclear factor of activated T cells) と AP-1(activating protein 1)の IFN- γ プロモーター領域への結合を阻害する事で IFN- γ 転写を抑制することを明らかにした。また ATL 患者由来の CD4 陽性 T リンパ球でも IFN- γ 産生の低下が認められた。以上の結果から、HBZ は NFAT, AP-1 経路を抑制することにより IFN- γ を含む Th1 サイトカインの産生を障害し、細胞性免疫不全を引き起こしていることが明らかとなった。

(3) HBZ による炎症性サイトカイン産生誘導機構

HBZ トランスジェニックマウスでは血清中の IFN- γ が上昇していた。その産生細胞を解析したところ、FoxP3⁺T 細胞において IFN- γ の産生亢進が確認された。これまでの報告で FoxP3 陽性細胞が FoxP3 発現を失うと、IFN- γ を過剰に産生する炎症性細胞となることが報告されていた。我々は、HBZ トランスジェニックマウスから FoxP3 陽性細胞を分離し、FoxP3 発現安定性を解析した。HBZ トランスジェニックマウスから分離した制御性 T リンパ球の FoxP3 発現は不安定であり、多くの細胞が FoxP3 陰性となり、IFN- γ の過剰産生が確認された。以上の結果から、HBZ トランスジェニックマウスの炎症に関しては、Foxp3 発現の不安定性から、IFN- γ 産生細胞へと変換することが主な原因と考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Satou Y, Utsunomiya A, Tanabe J, Nakagawa M, Nosaka K, Matsuoka M. HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3⁺CD4⁺ T cells in HTLV-1 infected individuals.

Retrovirology9: 46, 2012.

査読有 doi.10.1186/1742-4690-9-46.

2. Zhao T, and Matsuoka M. HBZ and its roles in HTLV-1 oncogenesis. Front. Microbiol, 3: 247, 2012.
査読有 doi.10.3389/fmicb.2012.00247.
3. Sugata K, Satou Y, Yasunaga JI, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. Blood 119(2):434-444, 2011.
査読有 doi.10.1182/blood-2011-05-357459
4. Yasunaga J and Matsuoka M. Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis. Int. J. Hematol 94; 435-442, 2011.
査読有 doi.10.1007/s12185-011-0937-1
5. Zhao T, Satou Y, Sugata K, Miyazato P, Green PL, Imamura T, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- β signaling through p300 coactivator. Blood 118; 1865-1876, 2011.
査読有 doi.10.1182/blood-2010-12-326199
6. Hagiya K, Yasunaga JI, Satou Y, Ohshima K, Matsuoka M. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. Retrovirology 8; 19, 2011.
査読有 doi.10.1186/1742-4690-8-19
7. Satou Y, Yasunaga J, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, Shimizu K, Ohshima K, Green PL, Ohkura N, Yamaguchi T, Ono M, Sakaguchi S, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. PLoS Pathog 7:e1001274,2011.
査読有 doi: 10.1371/journal.ppat.1001274.
8. Matsuoka M and Jeang KT. Human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ, and therapy. Oncogene 30:1379-1389,2011.
査読有 doi.10.1038/onc.2010.537
9. Satou Y, Matsuoka M. HTLV-1 and the host immune system: How the virus disrupts immune regulation, leading to HTLV-1 associated diseases. J Clin Exp Hematop. 50:1-8, 2010.
査読有 URL.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jslrt/50/1/50_1_1/_article
10. Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor gene: its roles in HTLV-1 pathogenesis. Molecular Aspects of Medicine, 31: 359-66, 2010.
査読有 doi: 10.1016/j.mam.2010.06.002.

[学会発表] (計 30 件)

1. 佐藤賢文、宇都宮興、田邊順子、中川正法、野坂生郷、松岡雅雄 : HTLV-1 感染者における Fox3⁺CD4⁺T 細胞の異常 : 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪(大阪)、2012 年 11 月 13-15 日
2. Masao Matsuoka. Molecular pathogenesis by HTLV-1 bZIP factor: The 3rd international workshop on Viruses, Genes and Cancer 2012. Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti, Venice, Italy, October 25-27, 2012.
3. Masao Matsuoka. New insights into the HTLV-1 genome: The 4th Annual T-Cell Lymphoma Forum. Hotel Nikko, San Francisco, U.S.A. January 26-28, 2012.
4. Masao Matsuoka. Molecular mechanisms of pathogenesis by human T-cell leukemia virus type 1: 2011 ASBMB Special Symposia Series. Guangzhou, China. July 24-26, 2011.
5. Nanae Taguchi, Yorifumi Satou, Koichi ohshima, Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP factor induces systemic inflammations in vivo: 15th INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.
6. Kenji Sugata, Yorifumi Satou, Jun-ichirou Yasunaga, Kisato Nosaka, Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP factor perturbs immune response to the pathogens in vivo by inhibiting IFN-gamma production: 15th INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.
7. 松岡雅雄 : HTLV-1 アクセサリー遺伝子 HBZ の機能と意義 : 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日
8. 菅田謙治、佐藤賢文、松岡雅雄 : HBZ 発現は IFN- γ 産生を抑制し、HSV-2 感染に対する細胞性免疫を障害する : 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日
9. 田口奈々絵、佐藤賢文、Miyazato Paola、吉田美香、松岡雅雄 : HTLV-1 bZIP factor による慢性炎症惹起機構 : 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日
10. 佐藤賢文、安永純一朗、趙鉄軍、大島孝一、松岡雅雄 : HTLV-1 bZIP Factor transgenic mice induce chronic inflammations and T-cell lymphoma : 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22-24 日
11. 菅田謙治、佐藤賢文、原英樹、光山正雄、松岡雅雄 : HBZ gene expression in CD4⁺T cells impairs cell-mediated immunity against Listeria monocytogenes : 第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010 年 9 月 24-26 日

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

なし

(3) 連携研究者

なし