

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26461428
研究課題名(和文)成人T細胞白血病の制御へ向けたHTLV-1プロウイルス解析

研究課題名(英文)HTLV-1 proviral research for the control of ATL

研究代表者

佐藤 賢文 (SATOU, YORIFUMI)

熊本大学・大学院先導機構・准教授

研究者番号：70402807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HTLV-1感染者およびATL患者検体を解析することで、以下の点を明らかにしてきた。ATL患者検体およびATL細胞株において、HTLV-1プロウイルスのエピジェネティックな解析を行ったところ、宿主細胞のDNA結合蛋白CTCFがHTLV-1プロウイルスに直接結合している事が明らかとなった(Satou et al PNAS 2017)。ウイルスの転写制御における重要な1つのメカニズムと考えられる。HTLV-1組み込み部位を用いたATL早期診断法確立へ向けた研究では、臨床検体収集を行った。今後研究を継続する予定。

研究成果の概要(英文)：I have analyzed epigenetic features of HTLV-1 provirus in ATL cell lines and PBMCs of ATL patients, and then identified a DNA-binding protein CTCF directly binds to HTLV-1 provirus (Satou et al, 2016). CTCF is known as a key molecule for epigenetic regulation of human genome. Our result suggests that CTCF should also play a role in regulation of HTLV-1 proviral transcription. In terms of integration site analysis, we have collected longitudinal clinical samples of ATL patients and HTLV-1 asymptomatic carriers. I am going to continue and extend this research.

研究分野：血液内科学

キーワード：ウイルス 白血病 HTLV-1 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

我が国には、九州沖縄地方を中心に約 100 万人の HTLV-1 感染者が存在している。感染者の大部分は無症候性キャリアであるが、一部の感染者が 50-60 年という長い潜伏期間を経て ATL を発症する。これまで、日本を中心として ATL の病態や治療に関する研究が進められてきた。ATL の発症にはウイルス側因子と細胞側因子のいずれも関与するとされているが、発がん過程については現在でも不明な点が多い。

また ATL の効果的な早期診断法はいまだに確立されておらず、一度 ATL を発症すると難治性であるなど、解決すべき問題点が多い。

従来の研究により、キャリアから ATL を発症するリスク因子として、ウイルス量が高い事 (4%以上) が報告されている。しかしながら、ウイルス量だけでは特異性や感度の面で充分とは言えず、より効果的な発症予測法の確立が求められている。

発がん過程について、ATL 細胞のゲノムに存在する HTLV-1 プロウイルスから、tax や HBZ 遺伝子などの細胞増殖、細胞生存に関わるウイルス遺伝子が発現する事が、感染細胞を腫瘍化へと導く重要なステップと考えられている。ATL 細胞におけるウイルス遺伝子発現パターンを調べると、tax などのプラス鎖のウイルス遺伝子発現が高頻度に抑制されているのに対し、マイナス鎖の HBZ 遺伝子発現は恒常的に認められる。しかし、そのような発現パターンがいかにして形成されるかは、いまだによく分かっていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、HTLV-1 感染者および ATL 患者検体を解析することで、以下の点を明らかにする目的で研究を行った。

1) 経時的なサンプルの HTLV-1 組み込み部位を指標として、ATL の発症過程を高感度に解析する。

2) ATL 患者の ATL 細胞における HTLV-1 プロウイルス近傍のゲノムおよびエピゲノム解析を行う。

HTLV-1 組み込み部位を用いた ATL 早期診断の可能性を検討する。可能である場合、どのような指標を考慮すべきかについて基礎データを取得することで、更に精度を高めるため

の研究へとつなげる。

3. 研究の方法

ATL 細胞および ATL 細胞株におけるプロウイルスのゲノムおよびエピゲノム解析を行った。エピゲノムの解析をクロマチン免疫沈降法と次世代シーケンスを組み合わせることで、精度高く進めた。ATL 細胞におけるウイルス遺伝子転写を見るために qRT-PCR, RNA-seq 解析を行った。

4. 研究成果

HTLV-1 はレトロウイルスであり、その特徴は、宿主細胞 DNA にウイルス DNA が組み込まれて一体化し、簡単には見分けが付かなくなることにある。そのため HTLV-1 プロウイルスは、ヒトの免疫や抗レトロウイルス薬から逃れる事が出来るようになり、感染者体内からのウイルス排除を目指した治療の大きな障壁となっている。本研究で、HTLV-1 の持続感染において、プロウイルスが維持されるための新たな仕組みの 1 つを解明した (Satou Y et al, PNAS, 2016)。細胞由来の DNA 結合タンパク質である CTCF がヒトの DNA と一体化した HTLV-1 プロウイルスに直接結合し、持続感染を促進するようにウイルス遺伝子の発現を調節している事が明らかとなった。もともと CTCF という分子は、ヒトの DNA を立体的に折りたたんで多くの遺伝子の働き方を決める機能があり、私たちの生命活動に欠かせないタンパク質であることが知られている。つまり HTLV-1 というウイルスは、宿主であるヒトの免疫監視機構から逃れる手段として、ヒトの DNA と一体化するだけでなく、細胞がもともと持っている「DNA を折りたたむ仕組み」も利用することで、感染者体内で巧妙に生き延びていると考えられる。

これまでの研究で ATL 細胞の HTLV-1 プロウイルス発現において、センス鎖は抑制、アンチセンス鎖は活性化というパターンをとっている事が明らかにされています。これは宿主免疫監視機構からの逃避の結果と考えられますが、どのような仕組みでその転写パターンが形成・維持されるかについては、不明な点が多く残されていた。本研究は、そのプロウイルス転写制御メカニズム、つまりは HTLV-1 の持続潜伏感染の新たな一側面を明

らかにするものと考えられる。

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 15 件)

1. Miyazato P, Matsuo M, Katsuya H, and Satou Y*. Transcriptional and Epigenetic Regulatory Mechanism of HTLV-1 provirus. *Viruses* 8(6), 171, 2016、査読有り、
オープンアクセス, DOI: 10.3390/v8060171.
2. Miyazato P, Katsuya H, Fukuda A, Uchiyama Y, Matsuo M, Tokunaga M, Hino S, Nakao M, and Satou Y*. Application of targeted enrichment to next-generation sequencing of retroviruses integrated into the host human genome. *Scientific Reports*, 6:28324, オープンアクセス 2016
DOI: 10.1038/srep28324.
3. Satou Y*, Miyazato P, Ishihara K, Yaguchi H, Melamed A, Miura M, Fukuda A, Nosaka K, Watanabe T, Rowan A, Nakao M, and Bangham CRM*. The retrovirus HTLV-1 inserts an ectopic CTCF-binding site into the human genome. *PNAS* 113: 3054-59, 2016
オープンアクセス,
DOI: 10.1073/pnas.1423199113.
4. Hashimoto M, Hesham N, Bhuyan F, Kuse N, Satou Y, Harada S, Yoshimura K, Sakuragi J, Monde K, Maeda Y, Welbourn S, Strebel K, Abd El-Wahab EW, Miyazaki M, Hattori S, Chutiwittonchai N, Hiyoshi M, Oka S, Takiguchi M*, Suzu S*. Fibrocytes differ from macrophages but can be infected with HIV-1. *J. Immunol*, 195:4341-50, 2015
オープンアクセスでない
DOI: 10.4049/jimmunol.1500955.
5. Development of T cell lymphoma in HTLV-1 bZIP factor and Tax double transgenic mice. Zhao T*, Satou Y, Matsuoka M. *Arch Virol*. 159:1849-56, 2014
オープンアクセスでない
DOI: 10.1007/s00705-014-2099-y.
[学会発表](計 15 件)
- 1 宮里パオラ「Targeted Enrichment: A Novel Approach to Analyze the Integrated HTLV-1 Provirus through Next-Generation

Sequencing」 第 18 回 国際 HTLV 会議, 東京, 2017/3/7-10

2 勝屋弘雄「Possible Involvement of YB-1 in the Abnormal Nuclear Shape of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma Cells」第 18 回 国際 HTLV 会議, 東京, 2017/3/7-10

3 松尾美沙希「Molecular Characterization of a New Enhancer in HTLV-1 Provirus」第 18 回 国際 HTLV 会議, 東京, 2017/3/7-10

4 宮里パオラ「Application of targeted enrichment to the next-generation sequencing of integrated HTLV-1 provirus」第 3 回 日本 HTLV-1 学会学術集会、鹿児島、2016/8/27-28

5 松尾美沙希「HTLV-1 プロウイルス内エンハンサーの分子メカニズム解析」第 3 回 日本 HTLV-1 学会学術集会、鹿児島、2016/8/27-28

6 松尾美沙希「HTLV-1 プロウイルス内エンハンサーの分子メカニズム解析」第 7 8 回 日本血液学会学術集会、横浜、2016/10/13-15

7 佐藤賢文 大阪大学蛋白質研究所セミナー「ヒトゲノムに組み込まれた外来性レトロウイルスの転写制御メカニズム」2016/12/21

8 Paola Miyazato, Ko Ishihara, Asami Fukuda, Mitsuyoshi Nakao, Charles Bangham, Yorifumi Satou. "The retrovirus human T-cell leukemia virus type-1 inserts an ectopic CTCF-binding site into the host human genome" 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 福岡, 2015/11-22-24

9 Paola Miyazato, Asami Fukuda, Mitsuyoshi Nakao, Yorifumi Satou. "Analysis of the epigenetic landscape of HTLV-1 provirus" 第 2 回日本 HTLV-1 学会学術集会 東京 2015/8/22-23.

10 松尾 美沙希、宮里 パオラ、宇都宮 與、佐藤 賢文. HTLV-1 プロウイルスにおける新規エンハンサー領域の解析. 第 77 回日本血液学会学術集会 2015 年 10 月 16 日 - 18 日. 石川県

11 松尾 美沙希、宮里 パオラ、宇都宮 與、野坂 生郷、佐藤 賢文. HTLV-1 プロウイルスにおける新規エンハンサー領域の解析. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会. 2015 年 11 月 22 日 - 24 日. 福岡国際会議場 (福岡県)

12 Yorifumi Satou " HTLV-1 Inserts an

Ectopic CTCF-binding Site into the Human Genome” 第 17 回 国際 HTLV 会議, マルティニーク, 2015/6/22

13 (招待講演) 佐藤賢文 “HTLV-1 inserts an ectopic CTCF-binding site into the host human genome” The Keystone Symposia meeting on "Viruses and Human Cancer" Mar 29 - Apr 3, 2015 in Big Sky, Montana, USA
14 佐藤賢文: クロマチン高次構造制御分子 CTCF による HTLV-1 プロウイルス制御機構: 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2014 年 8 月 23-24 日

15 佐藤賢文、クロマチン高次構造制御分子 CTCF による HTLV-1 プロウイルス制御機構: 日本血液学会、大阪、2014 年 10 月 31 日-11 月 2 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
ホームページで、積極的に研究の成果を公開している。
研究室のホームページ
<http://www.caidis.kumamoto-u.ac.jp/satou/index.html>
熊本大学のホームページ

<http://ewww.kumamoto-u.ac.jp/en/news/230/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
佐藤賢文 (SATOU, Yorifumi)
熊本大学・大学院先導機構・准教授
研究者番号: 70402807

(2) 研究分担者
なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号:

(4) 研究協力者

宮里パオラ (MIYAZATO Paola)
熊本大学・大学院先導機構・博士研究員
宇都宮與 (UTSUNOMIYA Atae)
今村病院分院・血液内科・医師
勝屋弘雄 (KATSUYA Hiroo)
熊本大学・エイズ学研究センター・博士研究員
松尾美沙希 (MATSUO Misaki)
熊本大学・医学生命科学研究科・大学院生
徳永美知代 (TOKUNAGA Michiyo)
熊本大学・エイズ学研究センター・技術補佐員