

研究経過報告書

研究課題名

ヒトT細胞白血病ウイルス1型感染者におけるウイルス抗原 HBZ に対する免疫応答解析

研究者 熊本大学大学院先端機構エイズ学研究センター

佐藤賢文

研究目的

HTLV-1 は九州沖縄地方を中心として我が国に 100 万人を超える感染者が存在することが知られている。HTLV-1 は一部の感染者に成人 T 細胞白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) など病気を引き起こす病原性を持ったレトロウイルスである。現在のところ HTLV-1 感染症に対する有効な薬剤が存在しないため、ATL は発症後の平均生存期間が約 1 年と極めて予後不良な疾患であり、新規治療法の開発が切望されている。

近年、子宮頸ガンの発症予防としてヒトパピローマウイルス (HPV) を抗原としたワクチンの有効性が示されているが、成人 T 細胞白血病もヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染というウイルス感染に関連した白血病である事を考慮すると、ATL の発症予防や治療においてもウイルス抗原を標的とした免疫療法の有効性が期待される。

申請者はこれまでに HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる HTLV-1 bZIP Factor (HBZ) 遺伝子が HTLV-1 感染細胞、ATL 細胞で恒常的な発現が認められるウイルス遺伝子であることを明らかにしてきた (Satou Y, et al. PNAS, 2006)。現在のところ恒常的な発現を認める HTLV-1 ウイルス遺伝子は HBZ をおいて他にはない。以上より、申請者は留学先で成人 T 細胞白血病に対するウイルス抗原 HBZ を標的とした免疫療法確立へ向けた基盤研究を行うことを本研究の目的とする。

研究方法

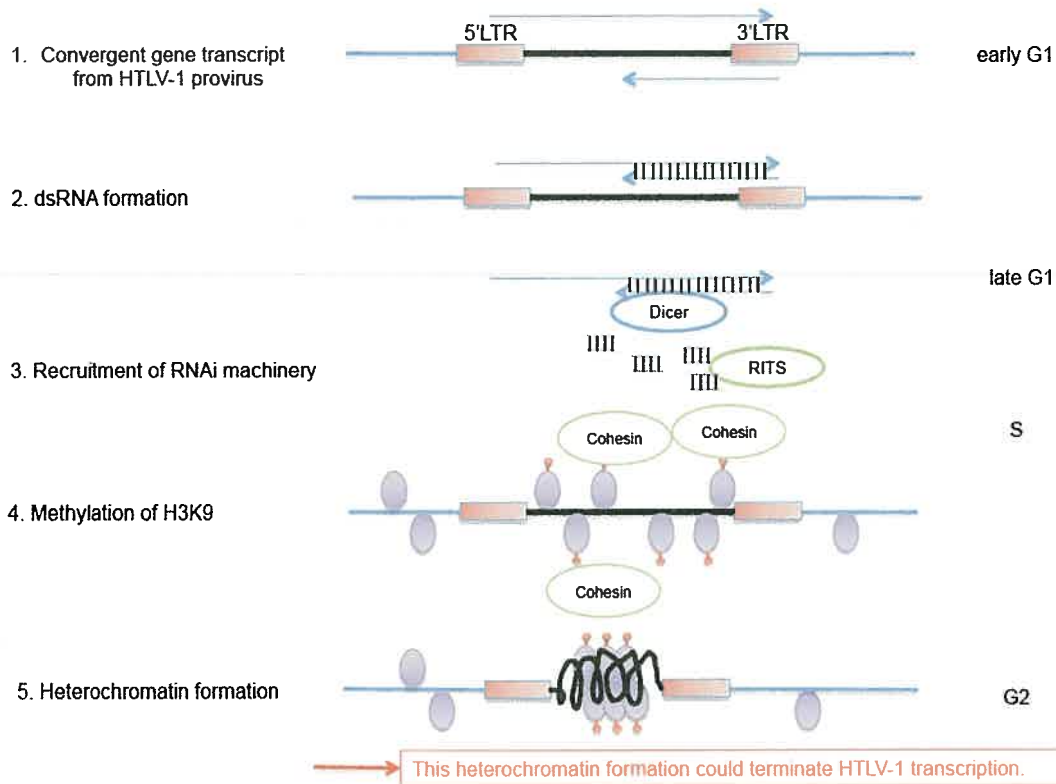
ウイルス潜伏感染のメカニズム解明

同じヒトレトロウイルスである HIV は感染者内でウイルス粒子の産生が持続的に起こっておりプロテアーゼ阻害剤、逆転写酵素阻害剤、インテグラーゼ阻害剤の使用によりウイルス量の低下が認められる。一方、HTLV-1 は生体内でのウイルス粒子の産生は極めて限られており、上記のようなウイルスのライフサイクルを標的にした薬剤の有効性は極めて限られているのが現状である。HTLV-1 はウイルス抗原の発現を最小限にとどめる事で、巧妙に潜伏感染を確立し、感染細胞の生体内での生存、増殖を誘導していると考えられる。そこで、HTLV-1 潜伏感染のメカニズムを明らかにして、ウイルス抗原の発現を誘導出来れば、宿主の抗ウイルス免疫応答を惹起し、感染細胞を減らす事が出来ると考えられる。

本研究では、はじめに HTLV-1 の潜伏感染の新たなメカニズムの解明を行うこととした。

モデル生物を用いた研究で双方向転写由来の 2 本鎖 RNA が RNAi 機構を誘導し、細胞周期依存性のヘテロクロマチン形成に関与する現象が報告されている (Monika et al, Cell, 132, 983-95, 2008)。HTLV-1 の転写はプラス鎖とマイナス鎖の双方向で起きているため、そこで形成される 2 本鎖 RNA が RNAi 機構を誘導し、さらにヘテロクロマチンを形成し HTLV-1 プロウイルスの epigenetic な遺伝子発現制御に寄与していることが示唆される。(次ページ仮説図参照)

A. 研究仮説



研究結果

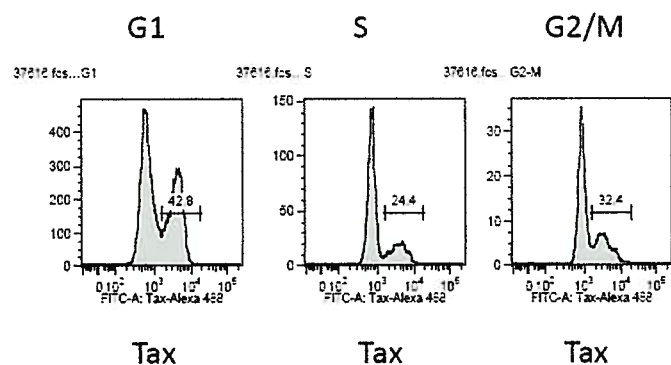
1. 細胞周期とウイルス抗原 Tax の発現の関連性

プラス鎖にコードされるウイルス抗原 Tax および DAPI (DNA content) stainingの後FACS解析を行い、各細胞周期におけるTax発現の割合を検出した。

細胞はHTLV-1感染者の末梢血単核球を段階希釈法により樹立したクローンの中からTaxの発現が陽性のクローンを使用し解析を行った (Figure 1)。

細胞周期それぞれのTax発現細胞の割合は G1 期 42.8%, S 期 24.4%, G2/M期32.4%とG1期で最も高く、S期で最も低かった。

Figure1. Tax expression in each phase of cell cycle



T-cell clone 5.61

2. プロウイルスにおけるヘテロクロマチン形成

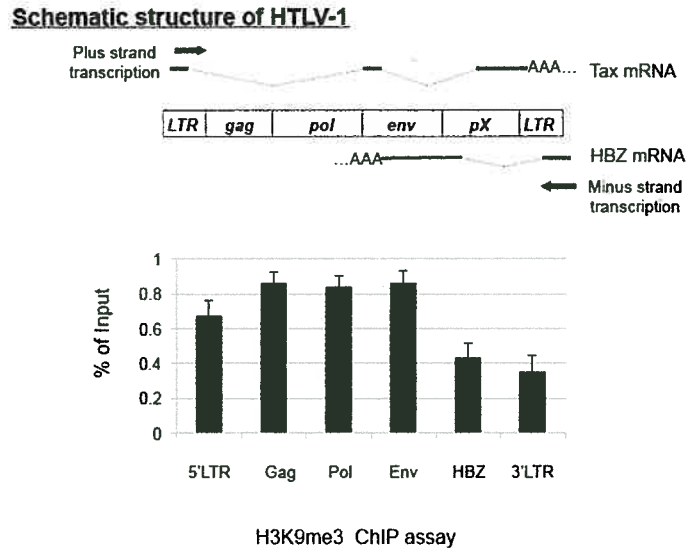
プロウイルス部位における細胞周期依存性のヘテロクロマチン形成の有無に関して検討する前段階として、細胞周期で区別しない状態でのヘテロクロマチン形成に関して検討を行った。Figure1で使用したTaxの発現が比較的高いT細胞クローンを使用し、ヘテロクロマチンの特徴的

なヒストン修飾であるH3K9me3のChIP assayを行った。

Figure2に示すようにHTLV-1のプロウイルスからはプラス鎖マイナス鎖の双方向の転写が起きる。

解析した細胞はTaxの発現が高いクローンであるにも関わらず、プロウイルス上にH3K9me3のシグナルが検出出来たため、プロウイルス上にヘテロクロマチンが形成されている事が示された。以上は研究仮説に矛盾しない結果と考えられた。

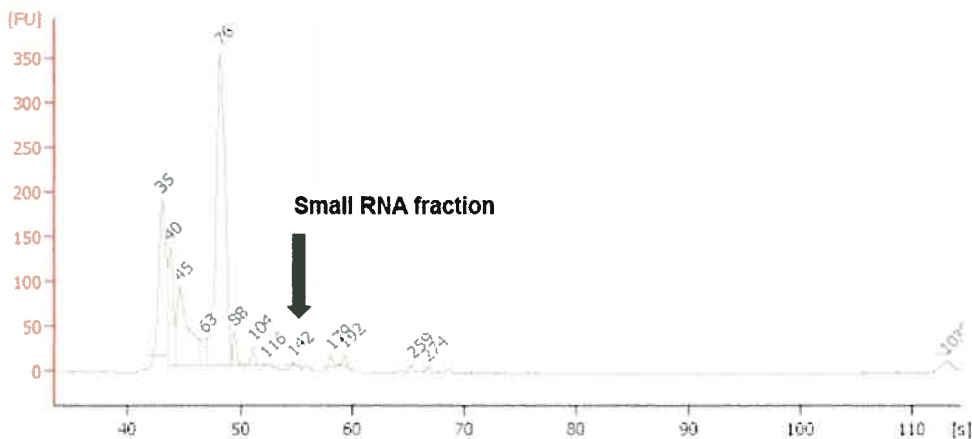
Figure2. H3K9me3 ChIP assay



3. HTLV-1から発現するdsRNAの検出

HTLV-1感染細胞からsmall RNAを回収した後、イルミナ社TruSeq small RNA Sample prep kit v2 を使用し、small RNA libraryの作製を行った。siRNAの両端にリンカーを付与し、cDNAを作製し、PCRにて増幅した増幅産物の確認をBioanalyzerにて行った (Figure3)。small RNAのサイズにピークを認めた事から、これをゲルで切り出しSmall RNA のcDNAのライブラリーとした。現在次世代シーケンサーにてdeep sequenceを行うべく、手配を進めている。

Figure3. Generation of small RNA library



考察

これまでのところ研究仮説に矛盾しない結果が得られている。最も重要なデータはHTLV-1由来のSmall RNAが得られるかどうかであるが、これに関しては次世代シーケンスの結果を待つだけという段階である。細胞周期とウイルス遺伝子の発現に関してTaxだけでなくHBZに関してもreal time RT-PCRにて検討を行う予定である。それぞれの細胞周期の細胞を分取する目的

でセルソーティングを行う予定である。最終的には HTLV-1 の潜伏感染のメカニズムを明らかにし、それを阻害する事で宿主免疫による感染細胞の排除を誘導し、ATL などの HTLV-1 関連疾患の発症予防法につなげて行きたい。

研究発表

A. 論文発表

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 virus-infected individuals. *Retrovirology*, 9:46, 2012.
2. Sugata K, **Satou Y**, Yasunaga J, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, and Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines, *Blood*, 119: 434-444, 2012.
3. **Satou Y**, Matsuoka M. Molecular and cellular mechanism of leukemogenesis of ATL; emergent evidence of significant role of HBZ in HTLV-1-induced pathogenesis, *Leukemia Research and Treatment*, 2012: 213653, 2012.
4. Shimizu-Kohno K, **Satou Y**, Arakawa F, Kiyasu J, Kimura Y, Niino D, Sugita Y, Ishikawa F, Matsuoka M, Ohshima K. Detection of human T-cell leukemia virus type 1 by means of HBZ in situ hybridization in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Cancer Sci*, 102: 1432-6, 2011.
5. Sato K, Misawa N, Nie C, **Satou Y**, Iwakiri D, Matsuoka M, Takahashi R, Kuzushima K, Ito M, Takada K, and Koyanagi Y. A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. *Blood*, 117:5663-73, 2011.
6. Hagiya K, Yasunaga J, **Satou Y**, Ohshima K and Matsuoka M. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology*, 8:19, 2011.
7. **Satou Y**, Yasunaga J, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, Shimizu K, Ohshima K, Green P, Ohkura N, Yamaguchi T, Ono M, Sakaguchi S, Matsuoka M, HTLV-1 bZIP Factor Induces T-cell Lymphoma and Systemic Inflammation In Vivo, *PLoS Pathogens*, 7: e1001274, 2011.

B. 学会発表

佐藤賢文、杉浦奨励賞受賞講演「**The pathogenesis of HTLV-1 induced by HTLV-1 bZIP factor**」
第 59 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2011 年 9 月 11 日～16 日