

【第57回 小島三郎記念文化賞】

ヒトT細胞白血病ウイルス1型の病原性発現機構の解明
Molecular pathogenesis of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)

まつ おか まさ お
松 岡 雅 雄
Masao MATSUOKA

はじめに

高月博士らによる成人T細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) の疾患概念の提唱を契機として、ヒトT細胞白血病ウイルス1型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) はヒトにおける最初のレトロウイルスとして発見された。この疾患概念の確立と原因ウイルスの発見には日本人研究者が大きな貢献をしており、世界に誇りうる成果である。HTLV-1 がコードする tax が発がんに重要だと考え

られてきたが、ATL では Tax は発現していないことも多く、発がん機構には大きな謎が残されていた。

I. ATL 細胞における Tax 発現

HTLV-1 は構造遺伝子 gag, pol, env 以外に複数の制御遺伝子、アクセサリ遺伝子をコードしている。殆どのウイルス遺伝子はプラス鎖にコードされるが、マイナス鎖は HTLV-1 bZIP factor (HBZ) をコードしている (図1)。ATL 発がんの原因ウイルス

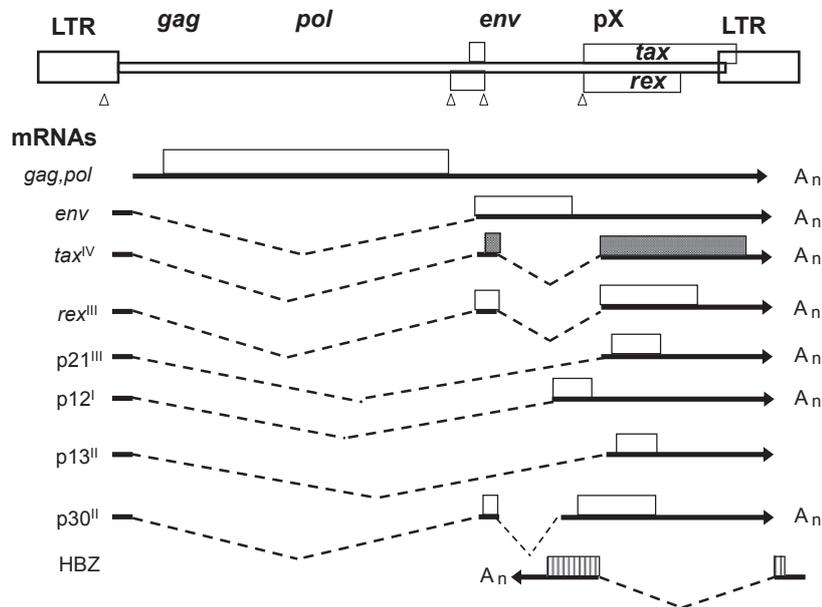


図1 HTLV-1 がコードする遺伝子

HTLV-1プロウイルスは両端に long terminal repeat (LTR) を有し内部に gag, pol, env という構造遺伝子と制御遺伝子 (tax, rex)、アクセサリ遺伝子 (p12, p13, p30, HBZ) をコードしている。HBZはマイナス鎖にコードされ3'側LTRから転写されるが、他のウイルス遺伝子はプラス鎖にコードされ5'側LTRから転写される。

遺伝子としては tax が注目されてきた。In vitro で Tax により Tリンパ球が不死化できることや、Tax を発現したトランスジェニックマウスで腫瘍の発症が確認できたことから、Tax が ATL 発がん機構においては重要であると考えられてきた。しかし、ATL 患者検体における Tax 発現は明らかではなく、in vitro のデータと大きく異なっていた。臨床検体解析こそウイルス発がん機構を明らかにするキーであると考え新鮮 ATL 細胞の解析を進め、約半数では Tax が発現できないことを明らかにした¹⁾。この Tax 発現不活化機構には3つのメカニズムが存在した。1) tax 遺伝子転写のプロモーター・エンハンサーである 5'側 long terminal repeat (LTR) の欠失²⁾、2) 5'側 LTR の DNA メチル化³⁾、3) tax 遺伝子のナンセンス変異・欠失・挿入である (図 2)⁴⁾。Tax が腫瘍化の初期には必要であるが、ATL となった時点では Tax が必要ではなく、そのために Tax 発現を抑制するようなプロウイルスの変化が起こっていると想定されていた。

1. Tax ナンセンス変異はウイルス感染時に生じる

Tax 遺伝子のナンセンス変異は約 10% の ATL 症例で認められた。HTLV-1 プロウイルスの塩基配列を解析してみると多くが G-to-A 変異であり、その配列に傾向があることを見出した。この配列は APOBEC3G の標的配列であった⁴⁾。APOBEC3G は細胞が有する抗レトロウイルス因子であり、レトロウイルスの逆転写反応の際にマイナス鎖一本鎖

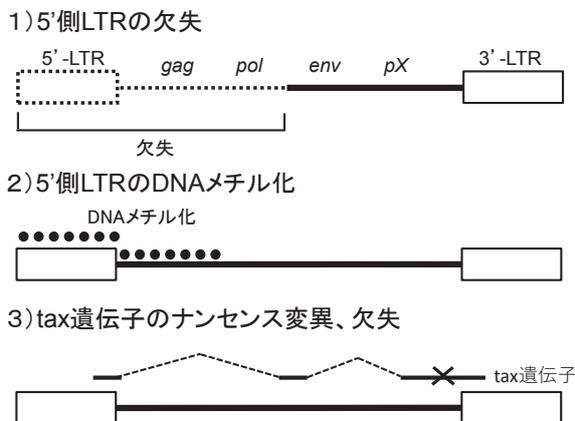


図 2 Tax 発現抑制機構

ATL細胞では3つの機構により約半数の症例ではTaxが発現できない。1) tax 遺伝子のプロモーター・エンハンサーである 5'側 LTR の欠失、2) 5'側 LTR の DNA メチル化、3) tax 遺伝子のナンセンス変異、欠失である。

DNA を標的として脱アミノ反応により C-to-T 変異を生じる。これがプラス鎖では G-to-A 変異となる。TGG が標的となり TGA, TAG というストップコドンが出来てウイルスタンパク質が出来なくなり、ウイルス複製が阻害される。tax 遺伝子のナンセンス変異を含む HTLV-1 プロウイルスの多くの変異は APOBEC3G によるものと考えられ、ウイルス感染時から存在したことが推測された。また、5'側 LTR の欠失のうち、約半数は、やはりウイルス感染時に形成されていることが明らかになった⁵⁾。これらの結果から、このようなプロウイルスを有する ATL 細胞ではウイルス感染時から Tax は存在しないことが示された。しかし、全ての ATL 細胞はプロウイルスを有しており、特に pX 領域と 3'側 LTR は保存されていた。この部分はマイナス鎖に存在する HBZ をコードする部分であり、3'側 LTR は HBZ のプロモーターであることに気付いた。この結果は HBZ こそが ATL に重要であることを示している。

II. HBZ の重要性

ATL における HBZ の重要性を検討するために ATL 症例での発現を解析したところ、全ての ATL 症例で発現していることが確認できた。この HBZ の ATL 細胞における意義を明らかにするために、HBZ 発現を short hairpin RNA で抑制したところ、ATL 細胞の増殖が抑制されることが明らかとなった⁶⁾。CD4 陽性 Tリンパ球に特異的に HBZ を発現するトランスジェニックマウスを作成したところ、Tリンパ腫と皮膚や肺での炎症性疾患の発症が認められた⁷⁾。このことから、HBZ が HTLV-1 によって引き起こされる腫瘍と炎症性疾患の両方に重要なウイルス遺伝子であることが示された。

1. HBZ による感染細胞免疫形質への影響

HTLV-1 は体内では CD4 陽性 Tリンパ球に感染しているが、その感染細胞は CD4, CD45RO, CD25, CCR4 陽性であることが明らかになっていた。これは制御性 Tリンパ球に類似した免疫形質であり、HTLV-1 が特殊な CD4 Tリンパ球に感染していることを示している。Foxp3 遺伝子は制御性 Tリンパ球のマスター遺伝子であり、制御性 Tリンパ球で発現している。ATL では高率に Foxp3 陽性であ

ることが報告されていた。HBZ トランスジェニックマウスでは CD4 陽性 T リンパ球が高率に Foxp3 を発現しており、T リンパ腫でも Foxp3 陽性であることが多かった⁷⁾。その機構として HBZ が Smad2/3, p300 と結合して TGF- β 経路を活性化して Foxp3 遺伝子の転写を促進することを明らかにした⁸⁾。HBZ は Foxp3 だけでなく、CCR4, TIGIT など制御性 T リンパ球に関連する分子の発現も誘導しており、HBZ により発現細胞が制御性 T リンパ球様に変換されることが示された^{9,10)}。このように HBZ は HTLV-1 感染細胞、ATL 細胞の免疫形質を決定している。この形質は制御性 T リンパ球に類似している。制御性 T リンパ球は様々な免疫抑制分子を発現して免疫を抑制する機能を有しており、生体の恒常性維持に重要なリンパ球である。このような免疫抑制機能は、感染細胞が宿主免疫から逃避する上で有利に作用すると推測される。また、制御性 T リンパ球は全身の臓器・組織に分布しており、感染細胞が様々な臓器へ浸潤し、特に精液・母乳に移行する上で重要となる特性を有している¹¹⁾。このように HTLV-1 が感染細胞を制御性 T リンパ球様細胞に変換することはウイルスの生き残り戦略から見ても極めて合目的であろう。

2. HBZ mRNA はタンパク質をコードするだけでなく RNA として機能する

HBZ は T リンパ球の増殖を促進するが、first codon の ATG を TTG に変換してタンパク質を産生できない HBZ RNA も増殖を促進する。一方、全てのコーディング領域を silent mutation に換えタンパク質は産生できるが RNA としては大きく異なる HBZ 変異体は増殖をむしろ抑制することが判明した(図 3)。このことから HBZ RNA が細胞増殖作用を有することが明らかとなり、HBZ mRNA はタンパク質をコードするだけでなく、RNA 自身も機能を有する bifunctional RNA であることが示された。

3. HBZ RNA の核局在機構

HBZ はタンパク質をコードするだけでなく、mRNA 自身が long non-coding RNA のように機能を発揮している。それでは HBZ mRNA の細胞内での局在はどのようにしているのだろうか？この疑問に答えるために HBZ mRNA を高感度に検出する FISH 法を用いて解析した。ATL 細胞株、患者由来 ATL 細胞で多くの HBZ mRNA は核に局在していた。この核局在の機構を明らかにするために HBZ

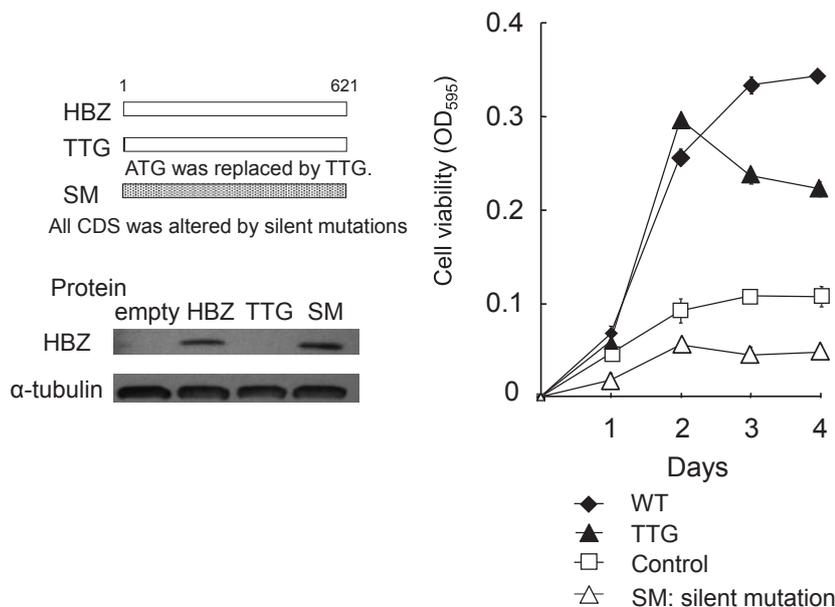


図 3 HBZ RNA が T 細胞株の増殖を促進する

ヒト T 細胞株である kit225 に野生型、変異型 HBZ を導入して増殖へ及ぼす影響を解析した。HBZ の開始コドンである ATG を TTG に換えタンパク質を産生できない変異体 (TTG) は野生型と同様に T 細胞株の増殖を亢進するが、HBZ コーディング領域に silent mutation を入れ同じタンパク質を産生するが RNA として配列が大きく変わった変異体 (SM) ではむしろ細胞増殖を抑制する。

mRNA のポリ A 鎖を解析したところ、HBZ mRNA のポリ A 鎖は短いことが明らかになった。転写活性の強いプロモーターを使って HBZ を発現させるとポリ A 鎖が長く、細胞質に局在し、本来のプロモーターである 3' 側 LTR を使うとポリ A 鎖が短く核に局在していた。このようにプロモーターが局在を決める因子であることが示された¹²⁾。核に局在する HBZ は T 細胞株の増殖を促進し、細胞質に存在する HBZ では、そのような活性が認められなかったことから HBZ mRNA の局在が機能と結びついていることも明らかになった。ヒトレトロウイルスであるヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) もアンチセンス鎖転写産物 ASP をコードしており、HBZ と同様に核に局在しポリ A 鎖が短いことも見出した。このように核局在と RNA としての機能はレトロウイルスに共通する機構であることが示唆される。

Ⅲ. Tax の一過性発現

HTLV-1 のプラス鎖にコードされる Tax は免疫原性が高く、細胞傷害性 T リンパ球の標的となっている。このため感染細胞、ATL 細胞は Tax を発現すると細胞傷害性 T リンパ球に認識され破壊される。最初に樹立された ATL 細胞株である MT-1 は一部の細胞がウイルス抗原を発現していることは古くから知られていた。われわれは Tax の発現を short-hairpin RNA で抑制すると徐々にではあるが全ての MT-1 細胞が死滅することを見出した。この結果から一部の細胞が一過性に Tax を発現している可能性を考え、Tax 応答性のプロモーターを使ったレポーターを作成した。このレポーターを導入した MT-1 細胞では Tax の発現は一過性 (約 17 時間) であることを明らかにした¹³⁾。さらに一過性の Tax 発現はトランスクリプトームの変化を引き起こし、NF κ B 反応性遺伝子群、抗アポトーシス遺伝子の発現が増加していた。この一過性の Tax 発現の影響は、特に抗アポトーシス遺伝子を高発現する細胞群で持続しており、細胞増殖の維持に重要であることが示された。Tax 発現は酸化ストレスなどで誘導された。Tax はセンス鎖のウイルス遺伝子の転写を著しく亢進し、ウイルス粒子の産生、新規感染を引き起こす。Tax は宿主免疫の標的となっているため、通常は発現せずにストレスが加わった状況で発現し、新規感

染を起こしていると考えられる。このような機構は宿主免疫からの攻撃を最小化する有効な手段と推定される。

Ⅳ. HTLV-1 は血液幹細胞に感染する

ニホンザルには HTLV-1 の近縁ウイルスであるサル T 細胞白血病ウイルス 1 型 (STLV-1) が存在する。STLV-1 感染ニホンザルを使って STLV-1 感染細胞の分布、ウイルス遺伝子発現を解析した。HBZ に相当する STLV-1 bZIP factor (SBZ) は様々な臓器・組織で発現していたが、tax は骨髄と末梢血でのみ発現していた¹⁴⁾。Tax の存在は新規感染の可能性を示唆するため、骨髄で新規感染が起こっており、血液幹細胞への感染が考えられた。この可能性を検討するために HAM 患者の末梢血から CD4 T リンパ球、CD8 T リンパ球、B リンパ球、単球、好中球を分離して次世代シーケンスを使って HTLV-1 プロウイルスの組み込み部位を解析したところ、異なる血球系で同一の組み込み部位を多数認められた¹⁴⁾。これは血液幹細胞への HTLV-1 感染を示唆している。さらに免疫染色で Tax を好中球で検出して、好中球の HTLV-1 感染を確認した。われわれがこの成果を報告して以降、この結果を支持する論文が発表された。ATL 患者にニボルマブを投与して急性増悪が起こった症例の T 細胞受容体遺伝子再構成と HTLV-1 プロウイルスの組み込み部位を調べたところ、3 例中 2 例では同じ HTLV-1 プロウイルス組み込み部位であるが異なる T 細胞受容体遺伝子再構成が見出された¹⁵⁾。これは T 細胞受容体再構成が起こる前の未熟な血液系細胞に HTLV-1 が感染して、その後、感染細胞が分化したことを示している。感染した血液幹細胞に由来する感染細胞が全体のどの位を占めるかという点に関しては明らかではないが、かなりの感染細胞が感染血液幹細胞に由来する可能性がある。このような幹細胞への感染はどのような意義があるのだろうか？新規感染の際には Tax の発現が必須であり、その際には細胞傷害性 T リンパ球から攻撃を受ける可能性が高い。骨髄は低酸素の状態であり細胞傷害性 T リンパ球が抑制されている。このため HTLV-1 にとっては Tax を発現しやすい環境と言えるであろう。感染した細胞は HBZ によって制御性 T リンパ球様の細胞へと分化していくこと

により末梢で Tax を発現する必要性を無くし宿主免疫機構から逃れることができるという利点がある。

V. 炎症と発がん

Infective dermatitis、糞線虫症を合併した HTLV-1 キャリアで ATL の発症が多いことが報告されており、炎症が ATL 発症と関連することが想定されていた。HBZ を CD4 陽性 T リンパ球で特異的に発現するトランスジェニックマウスでは T リンパ腫と炎症（皮膚炎・肺胞症）が起こる。このため HBZ は、炎症と発がんという HTLV-1 が引き起こす病態の両方に参与することが明らかになった。それでは炎症と発がんに関連はあるのであろうか？ HBZ トランスジェニックマウスではインターフェロンガンマが上昇していたことから、その関与を疑いインターフェロンガンマノックアウトマウスと HBZ トランスジェニックマウスの交配実験を行った。その結果、インターフェロンガンマを欠失する HBZ トランスジェニックマウスでは、炎症と発がんの両者が抑制されることが示された¹⁶⁾。このようにインターフェロンガンマが参与する炎症が発がん促進に作用していることが明らかになった。

炎症性サイトカインである IL-6 も HBZ トランスジェニックマウスで上昇しており、インターフェロンガンマと同様に炎症・発がんに関与することが想定された。しかし、驚くことに IL-6 ノックアウトマウスと HBZ トランスジェニックマウスの交配実験では、HBZ による炎症と発がんが著しく高頻度に起こることが明らかとなった¹⁷⁾。その機序として、HBZ が IL-6 受容体からのシグナルを伝達する STAT1,3 と結合してシグナルを変容させていることが示唆された。同時に IL-10 の産生が増加して、細胞増殖に作用していることも明らかになった。IL-10 は免疫抑制性サイトカインであり、免疫を抑制して感染細胞への攻撃を回避すると共に、HBZ は通常増殖には作用しない IL-10 からのシグナルを増殖促進へと変えている事が分かった。このように HBZ はサイトカインシグナルを変調させ感染細胞の増殖、病原性発現へと向かわせている。

VI. HBZ、tax と感染機構、病原性の関連

HBZ と tax というプロウイルスのマイナス鎖とプラス鎖にコードされるウイルス遺伝子は全く異なる役割を担っている（図 4）。感染細胞、ATL 細胞

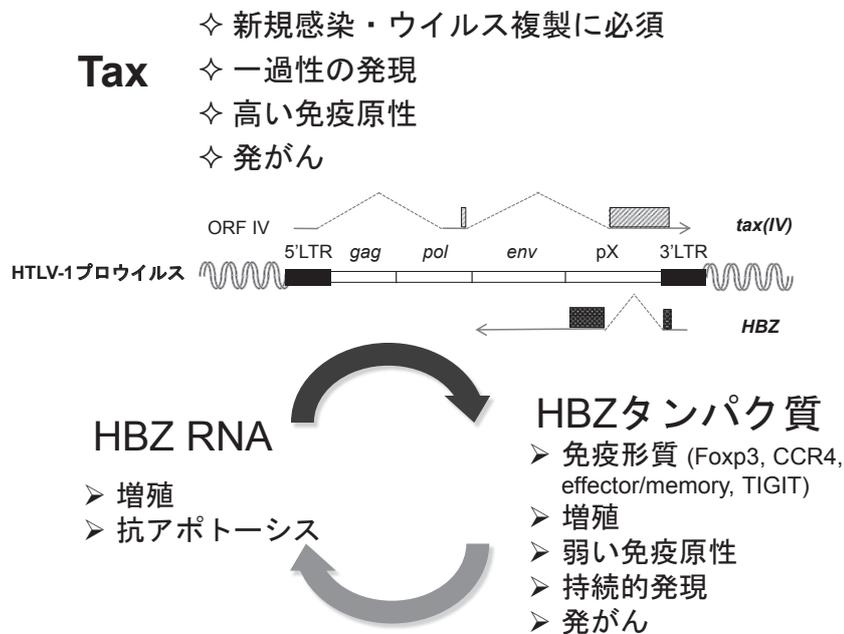


図 4 HBZ と Tax の作用

マイナス鎖にコードされる HBZ はタンパク質と RNA の両方が機能する。感染細胞、ATL 細胞の制御性 T リンパ球様の免疫形質は HBZ に依存しており、細胞増殖も促進する。HBZ タンパク質の免疫原性は弱く細胞傷害性 T リンパ球にも認識されにくい。プラス鎖にコードされる Tax は間歇的に発現し新規感染に必須である。免疫原性が高いために細胞傷害性 T リンパ球の標的となっている。

の免疫形質を決定しているのは HBZ であり、制御性 T リンパ球様の形質は宿主免疫から逃れる上で有利に作用する。さらに HBZ により増殖も維持される。HBZ タンパク質の免疫原性は低く細胞傷害性 T リンパ球に認識されにくい、HBZ RNA として機能することにより宿主免疫から逃れている。しかし、HBZ は新規感染を起こすことはできない。新規感染には Tax が必須であり、間歇的な発現により宿主免疫機構に曝される時間を最小化している。このように HTLV-1 は巧妙に生体内で生存しており、次の個体への感染機会を担保するような戦略を取っている。HTLV-1 の病原性は、このウイルスの戦略と密接に関連している。

おわりに

HTLV-1 が ATL の原因ウイルスであることが明らかとなってから 40 年が経過した。ウイルスがどのような機構で ATL、HAM を引き起こすのかが明らかになりつつあり、その解明はこの予後不良な疾患の新たな治療法開発に繋がることが期待される。今回、小島三郎記念文化賞という素晴らしい賞を受賞し、さらに HTLV-1 の病原性を明らかにして行きたいと決意を新たにしております。心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) Takeda S, Maeda M, Morikawa S, et al. Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer*. 2004; **109**: 559-567.
- 2) Tamiya S, Matsuoka M, Etoh K, et al. Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood*. 1996; **88**(8): 3065-3073.
- 3) Taniguchi Y, Nosaka K, Yasunaga J, et al. Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms. *Retrovirology*. 2005; **2**: 64.
- 4) Fan J, Ma G, Nosaka K, et al. APOBEC3G generates non-sense mutations in human T-cell leukemia virus type 1 proviral genomes in vivo. *J Virol*. 2010; **84**(14): 7278-7287.
- 5) Miyazaki M, Yasunaga J, Taniguchi Y, Tamiya S, Nakahata T, Matsuoka M. Preferential Selection of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Provirus Lacking the 5' Long Terminal Repeat during Oncogenesis. *J Virol*. 2007; **81**(11): 5714-5723.
- 6) Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, Matsuoka M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; **103**(3): 720-725.
- 7) Satou Y, Yasunaga J, Zhao T, et al. HTLV-1 bZIP Factor Induces T-Cell Lymphoma and Systemic Inflammation In Vivo. *PLoS Pathog*. 2011; **7**(2): e1001274.
- 8) Zhao T, Satou Y, Sugata K, et al. HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- β signaling through p300 coactivator. *Blood*. 2011; **118**(7): 1865-1876.
- 9) Sugata K, Yasunaga J, Kinoshita H, et al. HTLV-1 Viral Factor HBZ Induces CCR4 to Promote T-cell Migration and Proliferation. *Cancer Res*. 2016; **76**(17): 5068-5079.
- 10) Yasuma K, Yasunaga J, Takemoto K, et al. HTLV-1 bZIP Factor Impairs Anti-viral Immunity by Inducing Co-inhibitory Molecule, T Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT). *PLoS Pathog*. 2016; **12**(1): e1005372.
- 11) Matsuoka M, Yasunaga J. Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. *Curr Opin Virol*. 2013; **3**(6): 684-691.
- 12) Ma G, Yasunaga JI, Shimura K, et al. Human retroviral antisense mRNAs are retained in the nuclei of infected cells for viral persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021; **118**(17).
- 13) Mahgoub M, Yasunaga JI, Iwami S, et al. Sporadic on/off switching of HTLV-1 Tax expression is crucial to maintain the whole population of virus-induced leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; **115**(6): E1269-E1278.
- 14) Furuta R, Yasunaga JI, Miura M, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo. *PLoS Pathog*. 2017; **13**(11): e1006722.
- 15) Rauch DA, Conlon KC, Janakiram M, et al. Rapid progression of adult T-cell leukemia/lymphoma as tumor-infiltrating Tregs after PD-1 blockade. *Blood*. 2019; **134**(17): 1406-1414.
- 16) Mitagami Y, Yasunaga J, Kinoshita H, Ohshima K, Matsuoka M. Interferon-gamma Promotes Inflammation and Development of T-Cell Lymphoma in HTLV-1 bZIP Factor Transgenic Mice. *PLoS Pathog*. 2015; **11**(8): e1005120.
- 17) Higuchi Y, Yasunaga JI, Mitagami Y, et al. HTLV-1 induces T cell malignancy and inflammation by viral anti-sense factor-mediated modulation of the cytokine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020; **117**(24): 13740-13749.