

7 ヒト・レトロウイルスによる宿主細胞癌化機構

藤井 雅寛・平田 明・新沼亜希子

津畑千佳子・石岡孝二郎・徐 利恵

高橋 雅彦・大家 正泰・樋口 雅也

新潟大学大学院医歯学総合研究科 国際感染医学講座

ウイルス学分野

Oncogenesis by a Human Retrovirus

Masahiro FUJII, Akira HIRATA, Akiko NIINUMA,

Chikako TSUBATA, Koujirou ISHIOKA, Rie JO,

Masahiko TAKAHASHI, Masayasu OIE and Masaya HIGUCHI

*Division of Virology,**Department of Infectious Disease Control and International Medicine,**Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences*

Abstract

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is an etiologic agent of adult T-cell leukemia (ATL). Around 5% HTLV-1-infected individuals develop ATL averagely 50-60 years after the infection. Thus, in addition to HTLV-1, multiple host factors are involved in the development of ATL. Unlike to HTLV-1, an allied virus HTLV-2 is not associated with ATL or similar leukemia. HTLV-1 and HTLV-2 immortalizes human T-cells in vitro, and their efficiencies are equivalent. These results suggest that HTLV-1 has additional activities to host T-cells resulting in ATL development. We will discuss the roles of HTLV-1 tax1 and HTLV-2 tax2 genes in the distinct pathogenic activities between two viruses.

はじめに

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) の原因ウイルスである。加えて、HTLV-1はHTLV-1関連脊髄症 (HAM) あるいはHTLV-1関連葡萄膜炎にも関与している (図1, 図2)。ATLはCD4陽性の極

めて悪性の白血病で、発症者の多くが数年以内に死亡する。また、効果的治療法も開発されていない。日本のHTLV-1感染者は100~200万人、感染者は沖縄および九州に集中している。世界の感染者は1000~2000万人と推定されている。ATLの発症にはHTLV-1感染に加えて複数の宿主因子が関与している。即ち、HTLV-1は主として母

Reprint requests to: Masahiro FUJII
Division of Virology
Department of Infectious Disease
Control and International Medicine
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通り1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学講座
ウイルス学分野 藤井 雅寛

- 成人T細胞白血病
- 慢性炎症性疾患
 - HTLV-1関連脊髄症 (HAM/TSP)
 - HTLV-1関連葡萄膜炎
 - 関節炎
 - 感染性皮膚炎
 - その他
- 免疫不全 (日和見感染)

図1 HTLV-1 関連疾患

- ATLの原因ウイルスはHTLV-1
- ATLはCD4+T細胞の白血病
- ATLは極めて悪性
 - 多くは発症後1年以内に死亡
- 100-150万人の日本人がHTLV-1に感染しており、その内約5%がATLを発症する。
 - 日本は世界で最もATL患者が多い国である
- 世界では約2千万人がHTLV-1に感染している。

図2 成人T細胞白血病の特徴

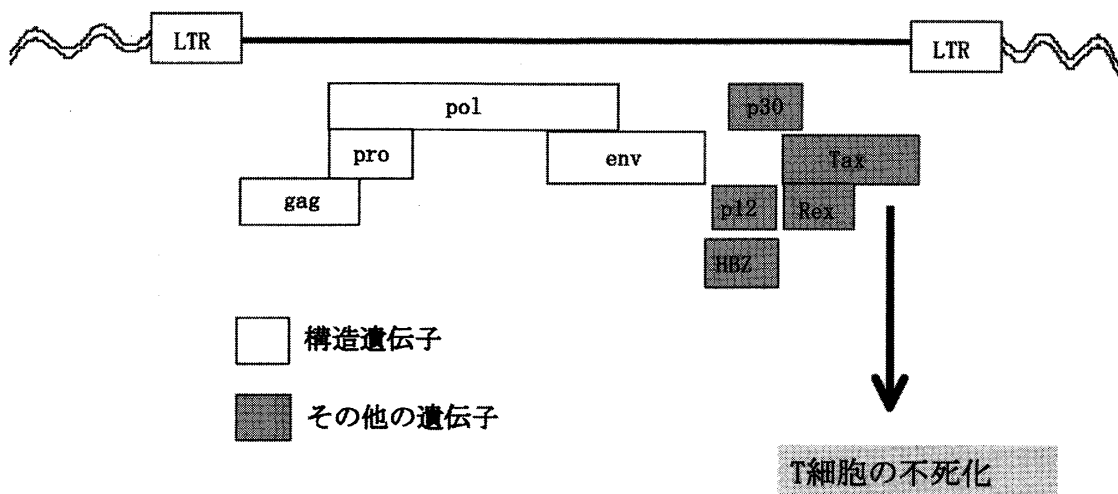


図3 HTLV-1ゲノムとコード遺伝子

乳を介して母から子に感染するが、平均発症年齢は60～70歳である。また、発症率は感染者の約5%である。HTLV-1は試験管内でヒトCD4細胞を不死化することができることから、生体内で不死化したウイルス感染細胞にgeneticおよびepigenetic異常が蓄積すること並びに宿主免疫応答の低下がATL発症に関与すると考えられている。ATL発ガンに関与するウイルス因子および宿主因子について、我々の研究を中心に紹介する。

HTLV-1 遺伝子

HTLV-1はレトロウイルスであり、宿主細胞ゲノム内にウイルス遺伝子を組み込んで潜伏感染している(図3)。HTLV-1は9個のウイルス遺伝子をコードしているが、生体内の潜伏感染は少数

のウイルス遺伝子のみを発現している。その1つ、tax1遺伝子は単独でヒトCD4 T細胞を不死化することから、潜伏感染およびATL発症へ必須の役割を果たしている。Tax1は様々な機能を有しているが、それらの中でも転写因子NF- κ Bを介した細胞遺伝子の発現誘導がCD4細胞の不死化に深く関与することが示されている。

HTLV-1とHTLV-2の病原性の違い

HTLV-2はHTLV-1と極めて類似したウイルスであるが、ATLを含む白血病の発症には関与しない(図4)。HTLV-1とHTLV-2が共に試験管内でヒトT細胞を不死化することから、不死化以降のステップにおいてHTLV-1とHTLV-2には違いがあると考えられる。また、HTLV-1が選択

的に CD4 細胞を不死化するのに対して, HTLV-2 は CD8 を選択的に不死化する. このことも, ATL が CD4 の白血病である点から興味深い. 我々は, Tax が HTLV-1 と HTLV-2 の病原性の違いにも関与するのではと仮説を立て, Tax1 と Tax2 のトランスフォーム活性を比較検討した. Tax2 を発現した繊維芽細胞株 (Rat-1) は軟寒天中でコロニーを形成したが, その大きさ並びに

| | HTLV-1 | HTLV-2 |
|-------------|--------|--------|
| 成人T細胞白血病 | 3-5% | — |
| HAM/TSP | 1-3% | 1% (?) |
| ヒトT細胞の不死化活性 | 有り | 有り |

図4 HTLV-1 と HTLV-2 の特徴

数は Tax1 発現細胞株よりも著明に低下していた (図5)¹⁾. Tax1 と Tax2 のキメラ遺伝子を用いて解析したところ, このトランスフォーム活性の違いは Tax1C 末端の PDZ ドメイン蛋白結合配列 (4 アミノ酸) によって決められており, Tax2 の C 末端にはこの配列は存在しなかった¹⁾. この配列を介して, Tax1 は PDZ ドメイン蛋白 Dlg と結合したが, Tax2 は結合しなかった (図6)²⁾. Dlg は癌抑制遺伝子産物であり, Tax1 による Dlg 機能の抑制がトランスフォーム能の違いに関与する事が推定された. 調べた限り全ての HTLV-1 由来の tax 遺伝子がこの PDZ ドメイン結合配列を持ち, 一方で, 全ての HTLV-2 由来の tax 遺伝子がこの配列を持たなかった (図7). HTLV-1 と HTLV-2 はそれぞれサル STLV-1 (simian T-cell leukemia virus type 1) と STLV-2 に由来するが, STLV-1 の Tax は PDZ ドメイン結合配列を持つが, STLV-2 の Tax はこの配列を持たな

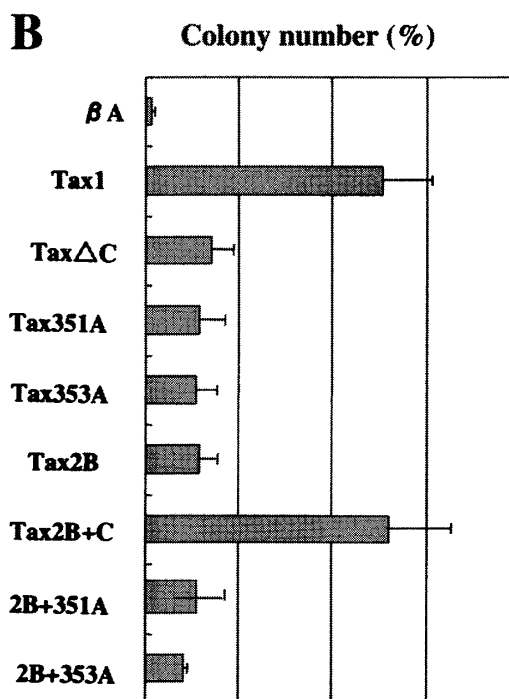
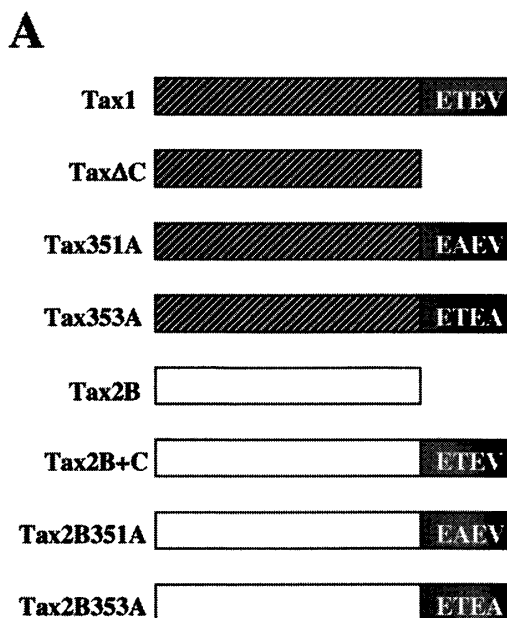


図5 PDZ ドメイン結合配列は Tax1 のトランスフォーム能に関与する

(文献2より改変) A. Tax1, Tax2 とその変異蛋白の構造. B. Tax1, Tax2 とその変異蛋白のトランスフォーム活性. Tax1, Tax2 とその変異遺伝子を繊維芽細胞株 Rat-1 に遺伝子導入し, 安定発現細胞株を樹立した. 樹立した細胞株を軟寒天中に蒔き, 出来たコロニー数を定量した.

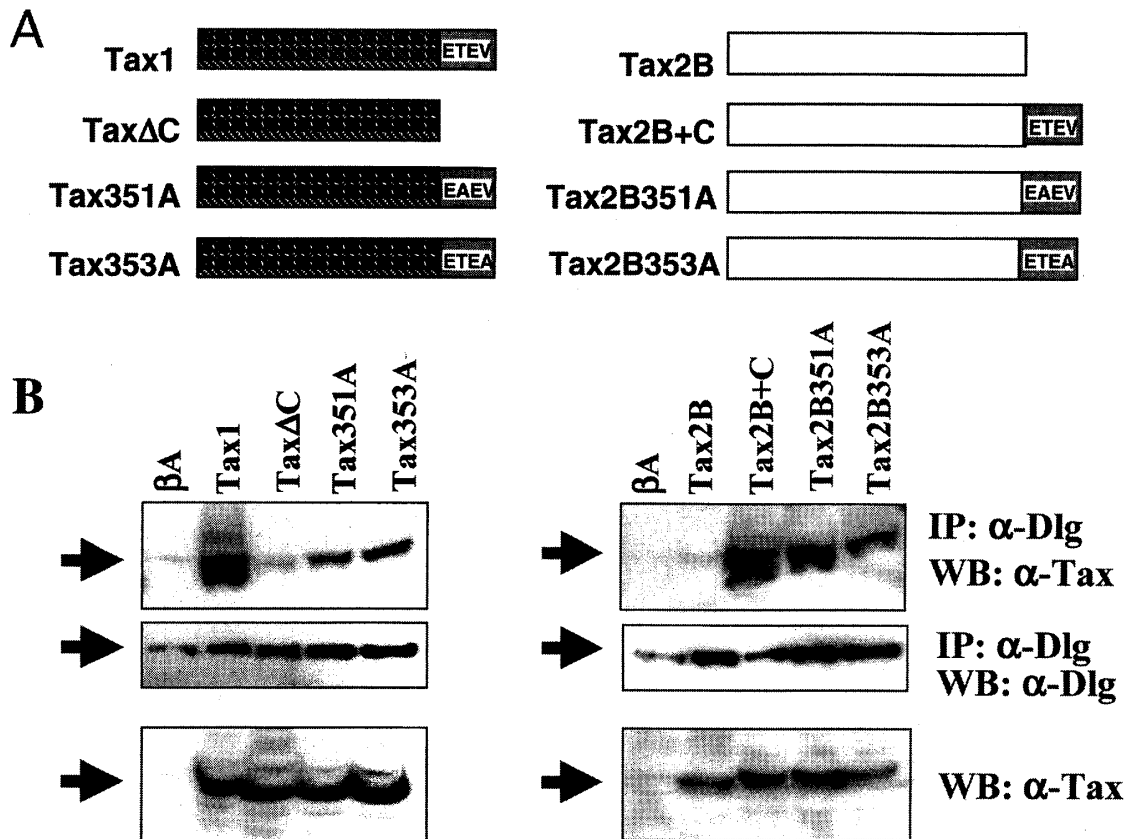


図6 Tax1はDlgと結合する

(文献2より改変) A. Tax1, Tax2とその変異蛋白の構造. B. Tax1, Tax2とその変異蛋白とDlgとの結合活性. Tax1, Tax2とその変異遺伝子およびDlgの発現プラスミドを293T細胞株に遺伝子導入した. それらの細胞抽出液を作製し, Dlgに対する抗体で免疫沈降し, 免疫沈降物をSDS-PAGEで分画した. 分画された免疫沈降物をTax1(上段, 左), Tax2(上段右)あるいはDlg(中段)に対する抗体でウエスタン解析した. 免疫沈降無しに, SDS-PAGEで分画したサンプルを直接Tax1(下段左)あるいはTax2(下段右)に対する抗体でウエスタン解析した.

い. 興味深いことに, STLV-1感染サルからはリンパ腫・白血病の報告が複数あるが, STLV-2感染サルからは報告がない. これらの結果は, PDZドメイン結合配列がHTLV-1とHTLV-2の病原性の違いに関与すること, HTLV-1とHTLV-2の病原性がすでにSTLV-1とSTLV-2の時点で決められていたことを示唆する. PDZドメイン結合配列とガンの悪性化としてもう1つの例が知られている. ヒトパピローマウイルス(HPV)は子宮頸癌の原因ウイルスであり, トランスフォーミング遺伝子としてE6をコードしている. 高発ガ

性のHPV E6はPDZドメイン結合配列を持つが, 低発ガン性のE6は持たない. 即ち, PDZドメイン結合配列は高発ガン型ウイルスの共通のモチーフと言える.

これらの結果を基に, 我々はHTLV-1とHTLV-2の病原性の違いを以下のように想定している. HTLV-2感染細胞と比べて, HTLV-1感染細胞はIL-2が少ない条件下でも死滅せずに生き延び, geneticあるいはepigeneticな異常をより多く蓄積する. 実際に, 生体内のHTLV-1感染細胞が長期間クローナルに増殖している事, 一方でHTLV-2

PDZ domain protein binding motif: S/TXV

| | |
|-------------|---|
| HTLV-1 Tax1 | SFHSLHLLFEEYTNIPISLLFNEKEADDNDHEPQISPGGLEPPSEKHFRE <u>TEV</u> |
| HTLV-2 | Tax2B ---N-----D-----V-I---KE-----GDQ-PEPAAQG-SSTQ-VRPSHTNNK |
| | Tax2D ---N ---D-----V-I---KE-----GDQ-PGPAAQD-SSA |
| | Tax2A ---N-----D-----V-I---KE-----GD |
| STLV-1 Tax1 | ---N-----V-----N-T-----A----- |
| STLV-2 tax2 | ---N-----V-F-Y-----S-SD-GP-NL-AAQGE SSA |



図7 Tax1のみがPDZドメイン結合モチーフを持つ
(文献2より改変) STLV-1とSTLV-2はそれぞれサル白血病ウイルス1型と2型 (simian T-cell leukemia virus type 1とtype 2).

感染細胞の長期的なクローナル増殖が少ないことが報告されている。

それでは、PDZドメイン結合配列はTax1のどのような機能に関与するのだろうか？Tax1によるNF- κ Bの活性化が軟寒天コロニー形成誘導能に必須であることが知られている。Tax1あるいはTax Δ とリポーター遺伝子を用いた一過性の遺伝子導入実験によると、NF- κ Bおよびウイルスエンハンサーの活性化能において両者の違いは観察されなかった³⁾。PDZドメイン配列の機能として次の2つのことが明らかになった。PDZドメイン結合配列を失ったTax1変異体は細胞内での蛋白の安定性が低下した²⁾。しかしながら、発現量を揃えても、軟寒天コロニー形成能の違いは観察された。また、DlgとTax1を共発現するとDlgとTax1の細胞内局在が変化することが観察された²⁾³⁾。即ち、Dlgは単独では主として細胞質に瀰漫性に局在するが、Tax1と共発現すると、細胞質に斑状に局在した。また、このTax1とDlgの局在部位はデタージェント不溶画分であった。また、Tax1も単独では核内に発現するが、Dlgと共発現すると細胞質に観察された。Tax1はHTLV-1感染細胞の核と細胞質の両方に局在することから、Dlg (その他のPDZ蛋白)がTax1の細胞質への局在に関与することが示唆された。PDZドメイン配列が様々なTax1の機能に関与することが明らか

かになってきたが、これらがTax1を介した発ガンにどの様に関与するのかについては、依然として不明である。

ATL発症に関する宿主因子

約5%の感染者が平均60~70年の潜伏期間を経てATLを発症する。統計学的な解析は、少なくとも5つの宿主因子異常がATL発症に関与していることを示している。我々はこれまでにNF- κ Bの恒常的な活性化が、全てのATL患者の新鮮な末梢血白血病細胞において観察され、この活性化がATL発症に関与する宿主因子異常の1つとして報告している⁴⁾。生体内のATL細胞はTaxをほとんど発現していないことから、この活性化はTaxに依存せず、宿主因子異常によって起こっていると考えられる。新鮮なATL患者の末梢血細胞をNF- κ B阻害剤の存在下で培養すると、アポトーシスを起こして死滅した⁵⁾。従って、活性化したNF- κ BはATL細胞のアポトーシスを抑制している。NF- κ Bの活性化はATLに至る宿主因子異常の1つであると考えられる。

全てのATL患者において転写因子AP-1も著明に活性化していた⁶⁾。AP-1は多くの癌で活性化されており、また、細胞増殖を正に制御することから、ATL活性化がATL発症に関わる事が推

定できるが、その意義については現在の所不明である。このATLのAP-1複合体はJunD蛋白を含んでいたが、c-Fos, Fra-1, Fra-2蛋白は含まれていなかった。一般的にJunDのホモ2量体は結合活性が低く、ヘテロ複合体を形成している可能性が高いが、対応する分子は同定されていない。

ま と め

HTLV-1とHTLV-2の病原性の違いは、これまでほとんど解析が為されていない分野である。これらの研究がHTLV-1の発ガン機構並びに他の癌研究の進展に繋がることを期待したい。

5%のHTLV-1感染者がATLを発症することから、ATL治療法の確立およびATL発症ハイリスクグループの同定法の確立は重要な課題である。NF- κ B阻害剤はATL治療薬として有望である。また、NF- κ Bの活性化に関わる遺伝子の同定はハイリスクグループの診断法に通じる可能性がある。

文 献

- 1) Endo K, Hirata A, Iwai K, Sakurai M, Fukushima M, Oie M, Higuchi M, Hall WW, Gejyo F and Fujii M: Human T-cell Leukemia Virus (HTLV) Type 2 Tax Protein Transforms a Rat Fibroblast Cell Line but Less Efficiently than HTLV-1 Tax. *J Virol* 76: 2648-2653, 2002.
- 2) Hirata A, Higuchi M, Niinuma A, Ohashi M, Fukushima M, Oie M, Akiyama T, Tanaka Y, Gejyo F and Fujii M: PDZ Domain - Binding Motif of Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Tax Oncoprotein Augments the Transforming Activity in a Rat Fibroblast Cell Line. *Virology* 318: 327-336, 2004.
- 3) Ohashi M, Sakurai M, Higuchi M, Mori N, Fukushima M, Oie M, Coffey RJ, Yoshiura K, Tanaka Y, Uchiyama M, Hatanaka M and Fujii M: Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Tax Oncoprotein Induces and Interacts with a Multi-PDZ Domain Protein, MAGI-3. *Virology* 320: 52-62, 2004.
- 4) Mori N, Fujii M, Ikeda S, Yamada Y, Tomonaga M, Ballard D and Yamamoto N: Constitutive activation of NF- κ B in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 93: 2360-2368, 1999.
- 5) Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N and Fujii M: Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF- κ B and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 100: 1828-1834, 2002.
- 6) Mori N, Fujii M, Iwai K, Ikeda S, Yamasaki Y, Hata T, Yamada Y, Tanaka Y, Tomonaga M and Yamamoto N: Constitutive activation of transcription factor AP-1 in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 95: 3915-3921, 2000.