

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 罇 陽介  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 674 号  
学位授与の日付 平成 28 年 3 月 23 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名 Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax1 oncoprotein but not HTLV-2 Tax2 induces the expression of OX40 ligand by interacting with p52/p100 and RelB. (HTLV-1 の Tax 蛋白は NF- $\kappa$ B2 を介して OX40 ligand の発現を誘導する)  
論文審査委員 主査 教授 松本 壮吉  
副査 教授 寺井 崇二  
副査 教授 山際 訓

博士論文の要旨

背景と目的：

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) は、成人 T 細胞白血病 (ATL) および HTLV-1 関連脊髄症の原因ウイルスである。一方で、HTLV-1 に類似した HTLV-2 は、HTLV-1 とは異なり、これらの発症には関与しない。HTLV-1 と HTLV-2 はそれぞれ Tax1 と Tax2 というトランスフォーミング蛋白をコードしている。Tax1 と Tax2 は多くの類似した機能を持つが、Tax1 と Tax2 には機能的違いがあり、これらの違いが HTLV-1 と HTLV-2 の病原性の違いに関与すると考えられている。これまでの研究から、Tax1 と Tax2 はいずれも転写因子 NF- $\kappa$ B1 (p105/p50) を活性化するが、Tax1 のみが NF- $\kappa$ B2 (p100/p52) を活性化することが報告されている。さらに、Tax1 の 225 番目から 232 番目のアミノ酸領域 (Tax1 (225-232)) が NF- $\kappa$ B2/p100 から p52 へのプロセッシングおよび NF- $\kappa$ B2 の活性化に必須であることが報告された。これらの結果は、Tax1 特異的な NF- $\kappa$ B2 の活性化が、HTLV-1 の病原性に寄与することを示唆する。

申請者は、Tax1 のみが NF- $\kappa$ B2 を介して OX40 ligand (OX40L) の発現を誘導することを発見し、この発現誘導が、HTLV-1 と HTLV-2 の病原性の違いに関与する可能性を持つことを報告する。

方法：

1, Tax による NF- $\kappa$ B2 (p100/p52) の活性化の定量： Tax1 の 225-232 のアミノ酸領域を Tax2B の配列に置換したキメラ遺伝子 Tax1/225-232 を作製した。Tax1、Tax1/225-232 および Tax2B 蛋白の C 末端に FLAG-tag を付加した Tax1-FLAG、Tax1/225-232-FLAG および Tax2B-FLAG を作製し、これらを発現するレンチウイルスを作製した。

2, Tax1 の p100 との結合部位の同定： Tax1 のどの部分が p100 と結合するかを調べるために、上記の Tax 蛋白をコードした組み換えレンチウイルスを Jurkat 細胞に感染させ、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降解析を行った。

3, Tax1 によって NF- $\kappa$ B2 経路を介して誘導される細胞遺伝子の同定： NF- $\kappa$ B2 経路を介して Tax1 によ

って誘導される細胞遺伝子を同定するために、Tax1 と Tax1/225-232 蛋白を Jurkat 細胞に発現し、これらの細胞から mRNA を調製し、遺伝子発現のマイクロアレイ解析を行なった。

4、定量的 RT-PCR 解析: Tax1、Tax1-FLAG、Tax1/225-232-FLAG あるいは Tax2B-FLAG を発現する Jurkat 細胞から RNA を調整し、OX40L 遺伝子の発現を定量的 RT-PCR により定量した。

5、Tax による OX40L 蛋白の発現誘導の定量:それぞれの Tax レンチウイルスを Jurkat 細胞に感染させ、OX40L 蛋白の発現を免疫染色により定量した。

結果:

Tax1、Tax1-FLAG、Tax1/225-232-FLAG および Tax2B-FLAG が NF- $\kappa$ B 関連遺伝子群(p100/p52、RelB)の発現を誘導するのかを調べるために、これらを発現するレンチウイルスを Jurkat に感染させ、ウェスタンブロット解析を行った。4つの Tax 蛋白はいずれも p100 の発現を同等に誘導した。一方で、Tax1 と Tax1-FLAG は p52 の発現(p100 から p52 へのプロセッシング)を誘導したが、この p52 の発現誘導量は、Tax1/225-232-FLAG あるいは Tax2B-FLAG よりも有意に高かった。これらの結果は、Tax1 が p100 から p52 へのプロセッシングを誘導すること、このプロセッシングに Tax1 (225-232) 領域が関与していることを示している。

Tax1 は p100 と結合することが報告されている。この結合に、Tax1 (225-232) 領域が関与するのかを調べるために、Tax1、Tax1-FLAG、Tax1/225-232-FLAG あるいは Tax2B-FLAG を発現するレンチウイルスをそれぞれ Jurkat に感染させ、細胞の抽出液を作製し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。Tax1-FLAG を FLAG 抗体で免疫沈降すると、p100 と p52 が特異的に検出され、Tax1-FLAG が p100 および p52 と結合することが明らかになった。さらに Tax1-FLAG はもう一つの NF- $\kappa$ B2 経路の転写因子 RelB とも結合した。一方で、Tax1/225-232-FLAG と Tax2B-FLAG は p100、p52 あるいは RelB とはほとんど結合しなかった。これらの結果は、Tax1 が、p100、p52 および RelB という 3つの NF- $\kappa$ B2 転写因子と結合すること、この結合に、Tax1 (225-232) 領域が必須の役割を果たすことを示している。

Tax1 と Tax1/225-232 との細胞遺伝子の発現誘導における違いを明らかにするために、Tax1 レンチウイルスおよび Tax1/225-232 レンチウイルスをそれぞれ Jurkat 細胞に感染し、それぞれから RNA を抽出した。これらの RNA を用いて遺伝子発現のマイクロアレイ解析を行った。Tax1 と Tax1/225-232 による発現誘導に違いがある細胞遺伝子として OX40 ligand (L) が同定された。マイクロアレイ解析の結果を確認するために、Tax1、Tax1-FLAG、Tax1/225-232-FLAG あるいは Tax2B-FLAG をそれぞれ発現する Jurkat 細胞から RNA を調整し、定量的リアルタイム RT-PCR を行った。Tax1 と Tax1-FLAG は OX40L の mRNA 発現をそれぞれ 450 倍と 100 倍誘導した。一方で、Tax1/225-232-FLAG と Tax2B-FLAG は 5 倍と 30 倍しか OX40L の mRNA 発現を誘導しなかった。それぞれの Tax レンチウイルスを Jurkat 細胞に感染させ、免疫染色を実施したところ、Tax1 と Tax1-FLAG は OX40L 蛋白の発現を誘導したが、Tax2B-FLAG と Tax1/225-232-FLAG は OX40L 蛋白の発現をほとんど誘導しなかった。これらの結果は、Tax1 が NF- $\kappa$ B2 経路を介して、OX40L の mRNA および蛋白の発現を誘導することを示している。

考察:

申請者は、Tax1 が NF- $\kappa$ B2 経路を介して OX40L 遺伝子の発現を誘導することを明らかにした。一方で Tax2 は OX40L 蛋白の発現を誘導しなかった。以上の結果は、Tax1 による OX40L の発現誘導が、HTLV-1 と HTLV-2 の病原性の違いに寄与することを示唆している。OX40L は、TNF スーパーファミリーに属する T 細胞共刺激分子であり、抗原提示細胞や活性化 T 細胞の細胞表面に発現している。一方、OX40 は、OX40L のレセプターであり、活性化 CD4 陽性ヘルパー T 細胞の細胞表面に発現している。OX40L/OX40 システムが、T 細胞の

Th2 細胞および Tfh 細胞への分化を誘導することにより、適応免疫の誘導に重要な役割を担うことが知られている。T細胞において、Tax1がOX40の発現を誘導することも分かっている。以上により本研究は、HTLV-1感染においては、Tax1によるOX40LとOX40の誘導が、T細胞の分化異常をもたらし、HTLV-1に対する適応免疫応答を変化させ、ひいてはHTLV-1の病原性に寄与することを示唆する。

#### 審査結果の要旨

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)は、成人T細胞白血病(ATL)およびHTLV-1関連脊髄症の原因ウイルスである。一方で、HTLV-1に類似したHTLV-2は、HTLV-1とは異なり、これらの発症には関与しない。HTLV-1とHTLV-2はそれぞれTax1とTax2というトランスフォーミング蛋白質をコードしており、その機能的な違いがHTLV-1とHTLV-2感染の差異に関わると考えられている。

そこで本研究では、Tax1とTax2の感染細胞における機能の違いを明らかにするため、Tax1とTax2、およびキメラ分子を、ヒトT細胞セルラインである、Jurkatに発現させ、特に癌化とも関連する転写因子、NF-κB関連分子群(p100/p52、RelB)に対する作用の検討を行った。

まず、Tax1がTax2と比較して有意に、p100からp52へのプロセッシングを誘導すること、この誘導には、Tax1が直接にp100、p52およびRelBという3つのNF-κB2転写因子と結合することが重要で、さらにTax1(225-232)領域が必須であることを明らかにした。

加えて細胞での機能性を評価するため、遺伝子発現のマイクロアレイ解析を行った。その結果、Tax1が225-232領域依存的に、OX40 ligand(L)の発現を誘導することを明らかにした。

OX40Lは、T細胞のTh2細胞およびTfh細胞への分化を誘導することにより、獲得免疫の誘導に重要な役割を担うことが知られている。またT細胞において、OX40LのレセプターであるOX40の発現が、Tax1によって誘導されることも判明している。したがってHTLV-1感染において、Tax1によるOX40LとOX40の誘導がT細胞の分化異常をもたらしたり、HTLV-1に対する獲得免疫応答を変化させると考えられた。このように本成果は、HTLV-1感染によるATLや脊髄症の成因解明につながるものであり、学位論文としての価値があると判定した。