

16. HTLV-1 : 成人 T 細胞白血病における多段階発ガンの分子機構

藤井 雅寛¹, 樋口 雅也¹, 遠藤 啓一¹, 高橋 利幸¹, 大橋 美奈子¹,
手塚 貴文¹, 篠原 博彦¹, 平田 明¹, 森 直樹²

(1) はじめに

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1 : HTLV-1) は, 成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia : ATL) の原因ウイルスである¹⁻³⁾. HTLV-1 は ATL 以外に, HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy, Tropical spastic paraparesis), HTLV-1 関連葡萄膜炎の発症に関与する. また, 関節炎, 肺臓炎などへの関与も示唆されている. さらに, 免疫抑制を引き起こし, 他の感染症を悪化させる. 例えば, エイズ, C 型肝炎などの病状進行を加速する事が知られている.

ATL は CD4 陽性 T 細胞に由来した, きわめて悪性度の高い白血病である^{1,2)}. ATL は既存の抗癌剤に対して抵抗性で, 一旦発症すると, 患者は平均 1 年程で死亡する. HTLV-1 は主として母乳を介して母から子へ感染し, 一旦感染が成立すると, 終生潜伏感染する. その中から, 5% の感染者が 50-70 年の潜伏期間を経て ATL を発症する. 従って, 複数の宿主因子の異常が発症に関与すると考えられている. 統計学的な解析は, 5 つの因子が発症へ関与することを示した⁴⁾. ここでは, ATL 研究について, 以下の 4 点, 1, HTLV-1 の潜伏感染, 2, HTLV-1 による T 細胞不死化, 3, HTLV-2 の低病原性, 4, ATL 発症に

関与する宿主因子, について紹介する.

(2) HTLV-1 の潜伏感染の分子機構

HTLV-1 はレトロウイルスであり, 構造遺伝子に加えて, 数個の遺伝子をコードしている (図 1). その中でも, Tax と Rex はウイルスの潜伏感染において極めて重要な役割を果たしている⁵⁾. Tax はウイルス遺伝子の転写活性化因子である. 一方で, Rex は転写後の RNA レベルでの調節因子である. Tax と Rex は同一の RNA の異なるフレームからコードされている. この *tax* と *rex* の RNA は 2 回スプライシングを受けている. ウイルスが細胞に感染すると, この *tax* と *rex* の RNA が選択的に発現する. 発現した Tax は, ウイルス遺伝子の発現を転写レベルでさらに増強する. その後 Rex が十分に蓄積すると, Rex は 2 回スプライシングを受けた *tax* と *rex* の RNA を抑制し, スプライシングを 1 回受けた RNA (*env*) とスプライシングを受けない RNA (*gag, pro, pol*) を増加させる. この反応によって, ウイルス構造遺伝子が発現し, ウイルスが放出される. 潜伏感染時の感染細胞は, 少量の Tax と Rex を発現し, ウイルスをほとんど産生していない. この状態はウイルスにとっては極めて都合の良い状態である. Tax は HTLV-1 のトランスフォーミング蛋白であり, 感染 T 細胞を単独で不死化する事ができる. 少量のウイルス蛋白のみを発現する事は, 宿主免疫から逃れることができる点において有利である. ただし, Tax は細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の主要な標的分子であり, この状態さえ, ウイルス感染細胞は, CTL によって破壊されている⁶⁾. この破壊を回避して生き延びた感染細胞の中から, 最終的に ATL が発症する事になる.

(3) HTLV-1 による T 細胞不死化の分子機構

HTLV-1 は試験管内で, ヒト CD4 陽性 T 細胞を不死化する事ができる⁷⁾. このことは, 感染細胞の不死化を介して HTLV-1 の終生の潜伏感染が維持されていることを

¹新潟大学大学院医歯学総合研究科・ウイルス学分野
(〒951-8510 新潟市旭町通り 1-757)

²琉球大学・ウイルス学講座

HTLV-1 : Multistep leukemogenesis of adult T-cell leukemia

Masahiro Fujii¹, Masaya Higuchi¹, Keiichi Endo¹, Toshiyuki Takahashi¹, Minako Ohhashi¹, Takafumi Tezuka¹, Hirohiko Shinohara¹, Akira Hirata¹, Naoki Mori²

¹Division of Virology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, ²Department of Virology, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

¹TEL : 025-227-2115, FAX : 025-227-0763

¹E-mail : fujiiimas@med.niigata-u.ac.jp

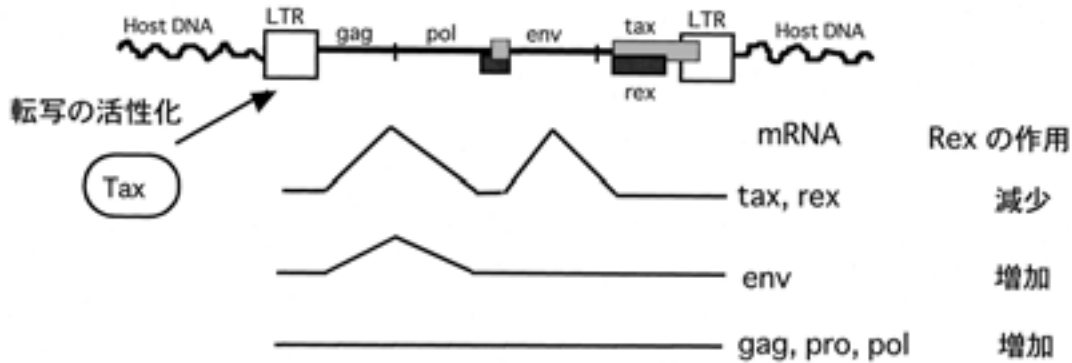


図1 HTLV-1の遺伝子発現制御機構
 生体内の潜伏感染時には少量の *tax*, *rex* のみを発現し, TaxでT細胞をIL-2依存性に不死化し, ウイルスはほとんど産生していない。

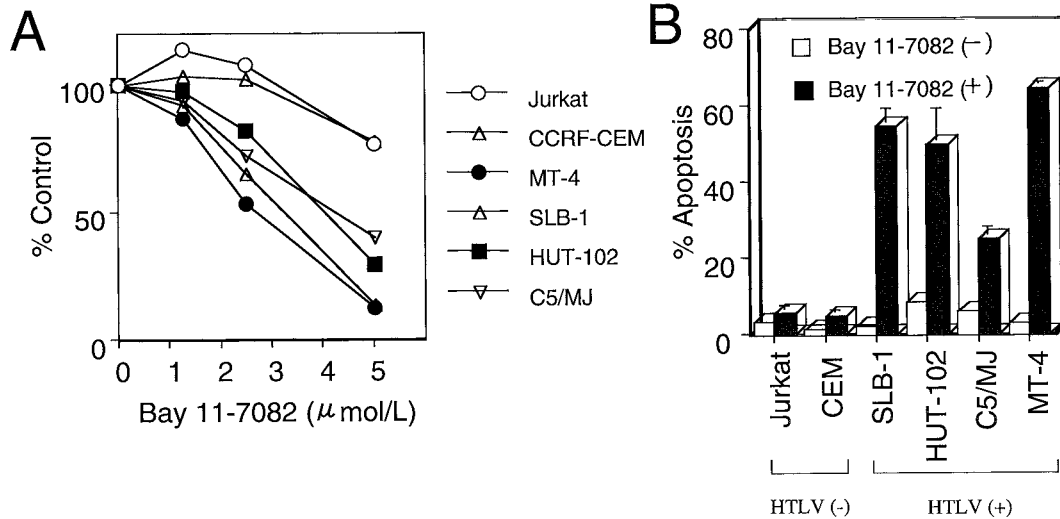


図2 抗NF-κB薬はHTLV-1感染細胞にアポトーシスを誘導する。

示している。その際、前述のTaxが極めて重要な役割を果たしている。何故ならば、Taxは、単独でヒトCD4陽性T細胞をIL-2依存性に不死化するからである⁷⁾。Taxはウイルス遺伝子の転写活性化因子として同定されたが、その後の解析から、様々な機能を持つことが明かにされた。Taxは細胞増殖に関与する様々な細胞遺伝子の発現を誘導する。例えば、IL-2受容体⁸⁾、細胞接着因子(ICAM-1など)、癌遺伝子(*c-fos*, *c-jun*, *fra-1*, *c-rel*など)^{9,10)}などである。さらに、Taxは細胞周期抑制因子p16INKあるいは癌抑制因子p53の機能を不活化することが知られている^{11,12)}。これらを含めた複数の機能が統合されて、ヒトT細胞を不死化し、生体内における終生の潜伏感染を維持すると考えられる。ここでは、Taxによる転写因子NF-κBの活性化について紹介する。

HTLV-1感染細胞株においては、恒常的なNF-κBの活性化が観察され、NF-κBを介して様々な細胞遺伝子の

発現が誘導されている¹³⁾。また、この活性化はTaxに依存している。4種類のHTLV-1感染細胞株をNF-κB阻害剤(Bay11-7082)の存在下で培養すると、全ての細胞株にアポトーシスが誘導された(図2)¹⁴⁾。この薬剤は、NF-κB活性化が観察されない2種類のHTLV-1非感染細胞株の増殖に対しては、あまり影響を与えない。この薬は、HTLV-1感染細胞株におけるNF-κBの活性を著明に抑制した。これらの結果は、NF-κBの活性化が、HTLV-1感染細胞株のアポトーシスを抑制していること、NF-κBの活性化がHTLV-1によるT細胞のトランスフォーメーションに必須であることを示している。

NF-κBがHTLV-1感染T細胞の細胞増殖にも関与することが示唆されている。CTLL-2はマウスのIL-2依存性T細胞株である。IL-2無しで培養すると、このT細胞株はアポトーシスを起こして死滅する。また、細胞周期もストップする。CTLL-2に*tax*遺伝子を導入し、高発現細胞

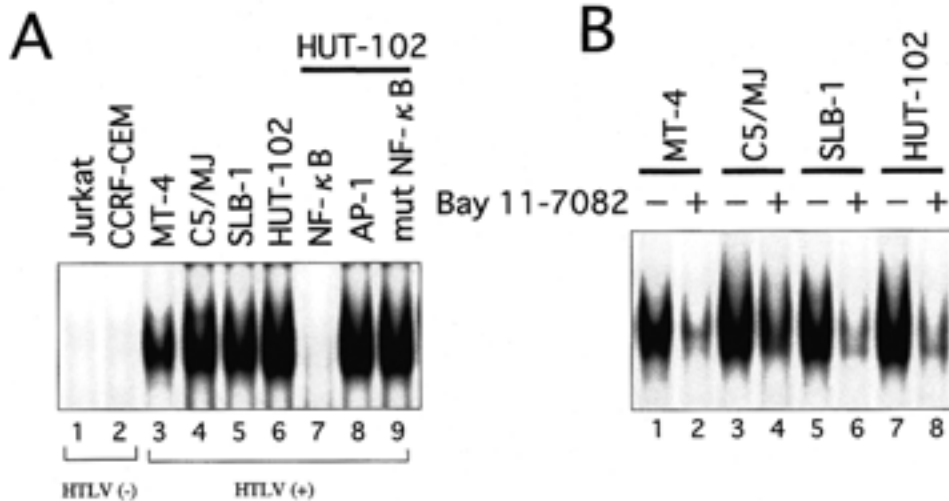


図3 HTLV-1 感染細胞株における NF-κB 活性の抗 NF-κB 薬による抑制

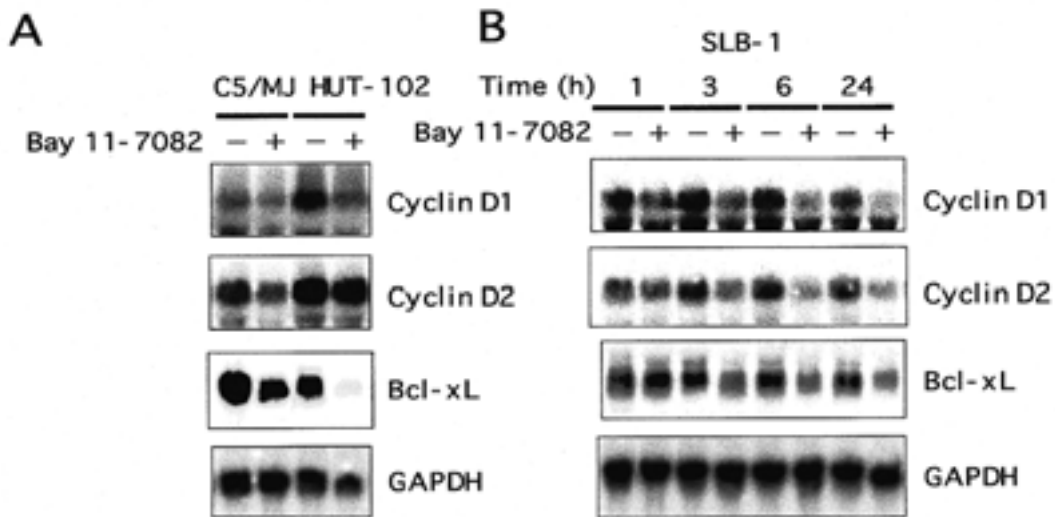


図4 抗 NF-κB 薬による細胞遺伝子の発現抑制

細胞株を樹立すると、いずれの細胞株も IL-2 非依存性に増殖できるようになる¹⁵⁾。Tax の変異体を用いた解析は、この IL-2 に依存しない細胞増殖に Tax による NF-κB の活性化が関与することを示唆した。CTLL-2 細胞株において、Tax はアポトーシス抑制因子 bcl-xl の発現を誘導し、この発現誘導が、アポトーシスの抑制と相関していた¹⁶⁾。一方で、Tax による cyclin D 1 および cyclin D 2 の発現誘導が IL-2 に依存しない細胞周期の進行に相関していた¹⁷⁾。実際に、NF-κB 阻害剤は、HTLV-1 感染細胞株において、これら 3 種類の細胞遺伝子の発現を抑制した (図 4)。これらの遺伝子群のプロモーターを解析したところ、Tax による NF-κB 活性化が発現誘導に必須であることが示された。ただ、これらの遺伝子のみでは、IL-2 非依存性増殖は説明できず、今後さらなる解析が必要である。同

様に、北島らは、NF-κB のコンポーネントである p65 のアンチセンスオリゴヌクレオチドが HTLV-1 感染細胞株 (MT-2) の細胞増殖を抑制することを報告している¹⁸⁾。以上のことも踏まえて、HTLV-1 感染細胞の生体内における増殖様式として以下のことが推定できる。CTLL-2 では、多量の Tax を発現しており、この結果、IL-2 非依存性に増殖できる。しかしながら、生体内の HTLV-1 感染細胞は少量の Tax しか発現しておらず、IL-2 非依存性に増殖しているとは考え難い。従って、HTLV-1 感染細胞は、少量の IL-2 存在下で IL-2 依存性に不死化していることが推定できる¹⁹⁾。しかし、この IL-2 依存性 HTLV-1 感染細胞は、アポトーシスに関しては抑制が掛かっている。また、少量の IL-2 存在下で、若干増殖しているのではないだろうか。

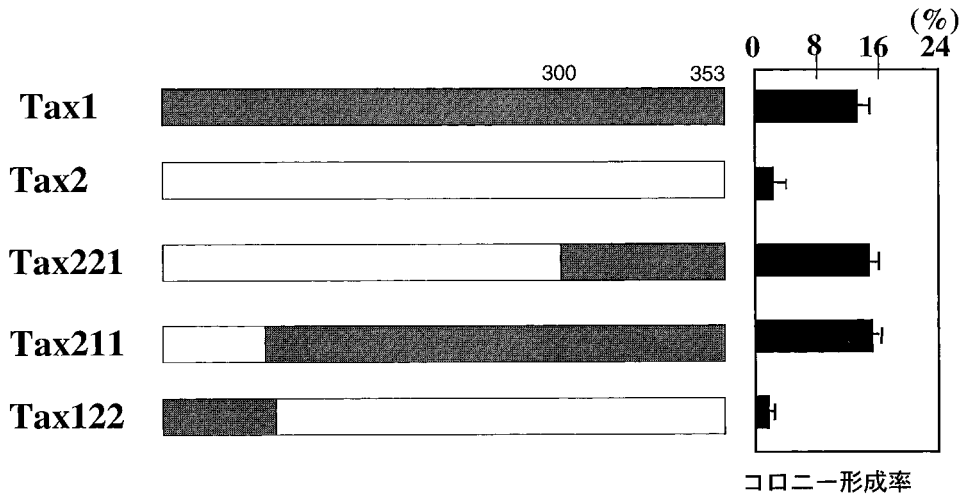


図5 Tax1のC端がトランスフォーム活性の亢進に関与している。

(4) HTLV-2の低病原性の分子機構

HTLV-2は、ヘアリー細胞白血病(hairy cell leukemia)のT細胞性亜型から分離されたレトロウイルスである。HTLV-2は、HTLV-1と核酸レベルで70%ほどの類似性を持ち、HTLV-1と同様に効率良く、ヒトT細胞をトランスフォームする。しかしながら、HTLV-2感染者の中から、ATLあるいは悪性白血病の報告は、皆無である。従って、HTLV-2とHTLV-1とは、感染細胞を悪性化する能力の違いが想定できる。我々は、繊維芽細胞株(Rat-1)の軟寒天中でのコロニー形成能を指標として、HTLV-1のTax1とHTLV-2のTax2のトランスフォーム活性を比較検討し、両者に大きな違いがあることを見出した(図5)²⁰⁾。Tax2もRat-1細胞株をトランスフォームしたが、そのコロニーの大きさ並びにコロニーの数は、Tax1の1/3から1/4であった。Tax1とTax2のキメラ蛋白を作製し、どの部分にトランスフォーム能の違いが規定されているのかについて検討したところ、C端の53アミノ酸によって、決められていた。Tax1とTax2はアミノ酸レベルで、70%以上の類似性を示す。しかしながら、この53アミノ酸領域のC端20アミノ酸は大きく異なっている。また、C末端にはPDZドメイン蛋白結合配列がTax1のみに存在していた。この結果は、PDZドメイン結合配列とその結合蛋白がHTLV-1とHTLV-2の病原性の違いに関与していることを示唆している。PDZドメインは、蛋白結合モチーフであり、PSD95、Dlg、ZO-1蛋白の頭文字に由来する。発ガンの観点から、最も有名なPDZドメイン蛋白は癌抑制遺伝子Dlg-1である。また、実際にTaxがDlgと結合することが報告されている²¹⁾。今後、Dlg-1を含む、PDZドメイン蛋白が、HTLV-1感染細胞の悪性化にどのように関与するのか興味深い。

(5) ATL発症に関与する宿主因子

ATL研究において、HTLV-1の役割については、かなりの成果が得られているが、ATL発症に関与する宿主因子異常については、不明な点が多い。前述したように、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。ここでは、その1つであると推定されているウイルス蛋白に依存しないNF- κ Bの活性化について紹介する。

ATL患者の新鮮な末梢白血球細胞において、NF- κ Bの恒常的な活性化が観察される²²⁾。この白血病細胞は、Taxをほとんど発現していないことから、この活性化は、Taxに依存しない、宿主因子異常によって起こっている^{22,13)}。同様な現象は、ATL患者の末梢血から分離された細胞株にも当てはまる。これらの細胞株におけるTaxの発現量はウエスタン法では検出感度以下であり、RT-PCR法でのみ検出できる。さらには、RT-PCR法でさえtaxを検出できない細胞株もある。しかしながら、いずれの細胞株においても、著明なNF- κ Bの活性化が観察される。ゲルシフト法を用いて、NF- κ Bの構成成分を調べてみると、ATL由来の細胞株のNF- κ Bがp65/p50のヘテロダイマーが主たる構成成分であるのに対して、非ATL細胞由来のHTLV-1感染細胞株のNF- κ Bはc-Rel/p50のヘテロダイマーである。さらに、ATL患者の末梢白血球細胞のNF- κ Bも、ATL細胞由来の細胞株と同様に、p65/p50のヘテロダイマーから構成されている。このことはATL細胞におけるNF- κ B活性化は、Tax非依存性であることを支持している。それでは、このNF- κ B活性化はATL細胞の悪性増殖に関与しているのであろうか？前述のNF- κ Bの阻害剤の存在下で培養すると、ATL患者の末梢血細胞は、アポトーシスを起こして死滅するが、一方で正常な末梢血細胞は若干影響を受けるものの、ATL細胞のような

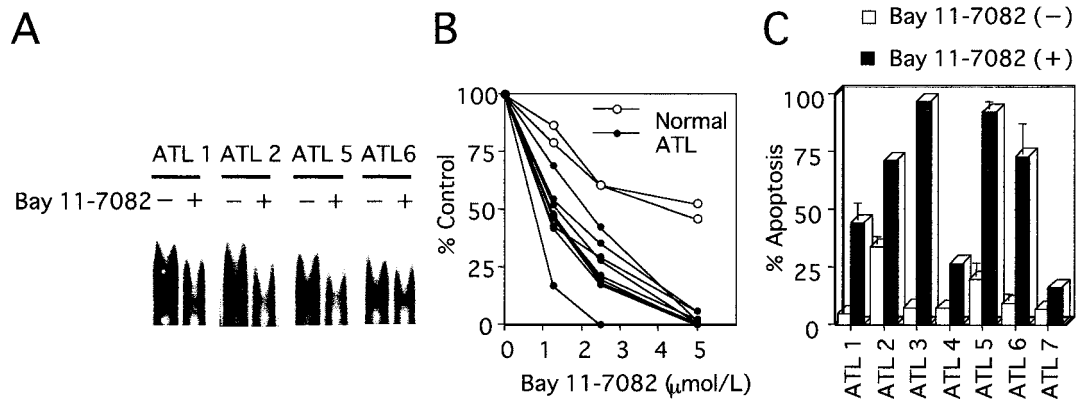


図6 抗NF-κB薬はATL細胞にアポトーシスを誘導する。

細胞死は観察されなかった(図6)¹⁴⁾。この結果は、NF-κBがATL細胞のアポトーシスを抑制していることを示している。また、NF-κB阻害剤がATLの治療薬として有効であることを示唆している。それでは、NF-κBの下流で、アポトーシスを抑制している分子はなんだろうか？我々は、HTLV-1感染細胞において活性化されていたアポトーシス抑制遺伝子 *bcl-xl* の発現をATL患者の末梢血を用いて検討した。前述のように、すべてのATL細胞において、NF-κBが活性化しているので、*bcl-xl* の発現は昂進していることを予想したが、予想に反して、*bcl-xl* を過剰発現していたのは、一部のATL患者のみで、多くは正常の末梢血と大差はなかった²³⁾。この結果は、*bcl-xl* 以外の分子がATL細胞においてアポトーシスを抑制していることを示唆している。ヒトの *bcl-xl* プロモーターには、NF-κB配列とCREB様配列が存在し、いずれの配列もTaxによる活性化に必須であることが示された。従って、ATLではCREB関連転写因子が活性化していないために、*bcl-xl* の発現が誘導されていないことが推定できる。一方で、Nicotらのグループは*bcl-xl* の発現がすべてのATL患者の末梢血で亢進していることを報告している²⁴⁾。

(6) 多段階発ガンとATL

我々は、ATLが一般的な多段階発ガン機構の解明においても、極めて有用なモデルであると考えている。多段階発ガンについては、家族性大腸癌(Familial adenomatosis, FAP)の研究が進んでいる。この場合、APC(adenomatous polyposis coli) 遺伝子の片方のアレルに遺伝的に欠損が見られる。その後、両方のアレルに異常が起こると、発ガンがスタートする。その後、この不死化した大腸細胞に、推定7つ以上の遺伝子異常が蓄積し、大腸癌に進展する。FAPを含めた数種の癌を除いて、発ガンの最初のヒットが明白な癌は稀である。一方で、ATLの場合、APC遺伝子の両アレルの異常に対応するのが、HTLV-1感染であり、感染と同時に生後1年以内に発ガンがスタートすると

考えることができる。その後、推定5つ以上の遺伝子異常を経て、5%の感染者がATLを発症する。もう一つ、ATL研究の有利な点は、発ガンの最初の段階を試験管内で簡単に再現できる点であろう。このような特徴は、なにもATLに限られる訳ではなく、全てのウイルス発ガンに言えることである。今後HTLV-1を含めたウイルス発ガンの分子機構の解析が、より一般的な多段階発現機構の解明にも繋がることを期待したい。このような観点からも、ATL発症に関与する宿主因子異常の同定が最も重要な課題の一つであると考え、研究を進めている。

文 献

- 1) Sugamura K., Hinuma Y. Human retroviruses: HTLV-I and HTLV-II. The retroviridae, edited by Jay A. Levy. Plenum Press, 2, 399-435 (1993)
- 2) Uchiyama T., Yodoi J., Sagawa K., Takatsuki K., Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. Blood, 50, 481-492 (1977)
- 3) Hinuma Y., Nagata K., Hanaoka M., Nakai M., Matsumoto T., Kinoshita K. I., Shirakawa S., Miyoshi I. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 78, 6476-6480 (1981)
- 4) Okamoto T., Ohno Y., Tsugane S., Watanabe S., Shimoyama M., Tajima K., Miwa M., Shimotohno K. Multi-step carcinogenesis model for adult T-cell leukemia. Jpn. J. Cancer Res., 80, 191-195 (1989)
- 5) Inoue J., Yoshida M., Seiki M. Transcriptional (p40x) and post-transcriptional (p27x-III) regulators are required for the expression and replication of human T-cell leukemia virus type I genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84, 3653-3657 (1987)
- 6) Kannagi M., Harada S., Maruyama I., Inoko H., Igarashi H., Kuwashima G., Sato S., Morita M., Kidokoro M., Sugimoto M., et al. Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene products by human CD8+ cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells. Int. Immunol., 3, 761-767 (1991)

- 7) Akagi T., Shimotohno K. Proliferative response of Tax 1-transduced primary human T cells to anti-CD 3 antibody stimulation by an interleukin-2-independent pathway. *J. Virol.*, **67**, 1211-1217 (1993)
- 8) Maruyama M., Shibuya H., Harada H., Hatakeyama M., Seiki M., Fujita T., Inoue J., Yoshida M., Taniguchi T. Evidence for aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop by HTLV-I-encoded p40x and T 3/Ti complex triggering. *Cell*, **48**, 343-350 (1987)
- 9) Fujii M., Tsuchiya H., Chuhjo T., Akizawa T., Seiki M. Interaction of HTLV-1 Tax 1 with p67SRF causes the aberrant induction of cellular immediate early genes through CArG boxes. *Genes Dev.*, **6**, 2066-2076 (1992)
- 10) Fujii M., Niki T., Mori T., Matsuda T., Matsui M., Nomura N., Seiki M. HTLV-1 Tax induces expression of various immediate early serum responsive genes. *Oncogene*, **6**, 1023-1029 (1991)
- 11) Suzuki T., Kitao S., Matsushime H., Yoshida M. HTLV-1 Tax protein interacts with cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK 4 A and counteracts its inhibitory activity towards CDK 4. *EMBO J.*, **15**, 1607-1614 (1996)
- 12) Akagi T., Ono H., Tsuchida N., Shimotohno K. Aberrant expression and function of p53 in T-cells immortalized by HTLV-I Tax 1. *FEBS Lett.*, **406**, 263-266 (1997)
- 13) Mori N., Fujii M. Aberrant transcription through NF- κ B/Rel and AP-1 in adult T-cell leukemia. *Gann Monograph*, in press (2002)
- 14) Mori N., Yamada Y., Ikeda S., Yamasaki Y., Tsukasaki K., Tanaka Y., Tomonaga M., Yamamoto N., Fujii M. An inhibitor of transcription factor NF- κ B induces apoptosis in HTLV-I infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood*, in press
- 15) Iwanaga Y., Tsukahara T., Ohashi T., Tanaka Y., Arai M., Nakamura M., Ohtani K., Koya Y., Kannagi M., Yamamoto N., Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein abrogates interleukin 2 dependence in a mouse T-cell line. *J. Virol.*, **73**, 1271-1277 (1999)
- 16) Tsukahara T., Kannagi M., Ohashi T., Kato H., Arai M., Nunez G., Iwanaga Y., Yamamoto N., Ohtani K., Nakamura M., Fujii M. Induction of Bcl-x (L) expression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through NF- κ B in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. *J. Virol.*, **73**, 7981-7987 (1999)
- 17) Mori N., Fujii M., Hinz M., Nakayama K., Yamada Y., Ikeda S., Yamasaki Y., Tanaka Y., Tomonaga M., Kashanchi F., Yamamoto N. Activation of cyclin D 1 and D 2 promoters by human T-cell leukemia virus type I Tax protein is associated with interleukin-2 independent growth in T cells. *Int. J. Cancer*, **99**, 378-385 (2002)
- 18) Kitajima I., Shinohara T., Bilakovics J., Brown D. A., Xu X., Nerenberg M. Ablation of transplanted HTLV-I Tax-transformed tumors in mice by antisense inhibition of NF- κ B [published erratum appears in *Science* 1993 Mar 12 ; 259 (5101) : 1523]. *Science*, **258**, 1792-1795 (1992)
- 19) Moro H., Iwai K., Mori N., Watanabe M., Fukushi M., Oie M., Arai M., Tanaka Y., Miyawaki T., Gejyo F., Arakawa M., Fujii M. Interleukin-2-dependent but not independent T-cell lines infected with human T-cell leukemia virus type 1 selectively express CD45 RO, a marker for persistent infection *in vivo*. *Virus Genes*, **23**, 263-71 (2001)
- 20) Endo K., Hirata A., Iwai K., Sakurai M., Fukushi M., Oie M., Higuchi M., Hall W. W., Gejyo F., 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)
- 21) Suzuki T., Ohsugi Y., Uchida-Toita M., Akiyama T., Yoshida M. Tax oncoprotein of HTLV-1 binds to the human homologue of Drosophila discs large tumor suppressor protein, hDLG, and perturbs its function in cell growth control. *Oncogene*, **18**, 5967-5972 (1999)
- 22) Mori N., Fujii M., Ikeda S., Yamada Y., Tomonaga M., Ballard D. W., Yamamoto N. Constitutive activation of NF- κ B in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood*, **93**, 2360-2368 (1999)
- 23) Mori N., Fujii M., Cheng G., Ikeda S., Yamasaki Y., Yamada Y., Tomonaga M., Yamamoto N. Human T-cell leukemia virus type I tax protein induces the expression of anti-apoptotic gene Bcl-xL in human T-cells through nuclear factor- κ B and c-AMP responsive element binding protein pathways. *Virus Genes*, **22**, 279-287 (2001)
- 24) Nicot C., Mahieux R., Takemoto S., Franchini G. Bcl-X (L) is up-regulated by HTLV-I and HTLV-II *in vitro* and in ex vivo ATLL samples. *Blood*, **96**, 275-281 (2000)