

1. HTLV-1 感染細胞クローン選択における ウイルス組み込み部位の意義 ～レトロウイルス HTLV-1 とヒトゲノムの相互作用に関する最近の話題～

松尾 美沙希, 宮里 パオラ, 佐藤 賢文

熊本大学

ヒトレトロウイルス学共同研究センター
ゲノミクス・トランスクリプトミクス講座

レトロウイルスがウイルスゲノムを宿主細胞ゲノムに組み込むことで形成されるプロウイルス DNA はウイルスの持続感染状態, 病原性発現機序を考える上で極めて重要なポイントとなる。実際に, HTLV-1 感染症の臨床における ATL の診断で, プロウイルスによるクローン性増殖評価検査が行われている。近年, DNA 解析手法の中心がサザンブロット法から PCR 法へ移り, さらには DNA シークエンス技術の発達によって, ウイルスの組み込み部位の解析精度が年々向上し, 感染細胞の動態をより正確に把握することが可能になってきている。

一方でヒトゲノム研究も次世代シーケンス技術の登場により飛躍的進歩をみせており, ヒトゲノム情報が A, T, G, C といった塩基配列の 1 次元的情報から, ヒストン修飾やクロマチン構造など 2 次元的な構成へと理解が進み, さらに高次クロマチン構造や核内構造といった 3 次元的な構成レベルでヒトゲノムを捉えることが可能になってきた。それに従い, ウイルス組み込み部位と宿主ゲノムとの関わり方も, 塩基配列上の 1 次元的な位置情報に留まらず, 2 次元的, 3 次元的視点でその関係性が明らかになりつつある。

はじめに

1980 年にヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) が最初のヒトレトロウイルスとして同定された¹⁾。成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) は, 1970 年代にその臨床像, 血液学的所見から独立した疾患として提唱され²⁾, HTLV-1 関連脊髄

症 (HTLV-1 associated myelopathy (HAM)/Tropical spastic paraparesis (TSP)) は 1980 年代に HTLV-1 感染によって引き起こされる炎症性疾患として報告がなされた^{3,4)}。

1. HTLV-1 の慢性持続感染様式

HTLV-1 の増殖様式の大きな特徴は, ウイルス粒子をほとんど産生せず, 細胞から細胞へと感染を拡げていくことであり, 遊離ウイルスによる感染効率は極めて悪い。対照的に, 同じヒトレトロウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus; HIV) は, ウイルス粒子産生性が高く, 遊離ウイルスを介して新規感染を行うことで知られる。HTLV-1 はひとたび感染が成立すると慢性持続感染状態となるが, 感染者の大部分は無症候性感染者として, 関連疾患を発症すること無くその生涯を過ごす。

その一方で, 無症候性感染者でも, 末梢血中には 1% から数% といった比較的高い割合で感染細胞が存在するとともに, 細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) や抗体などの抗ウイルス免疫応答が検出される。つ

連絡先

〒 860-0811
熊本市中央区本荘 2-2-1 IRCMS 303
熊本大学
ヒトレトロウイルス学共同研究センター
ゲノミクス・トランスクリプトミクス講座
TEL: 096-373-6830
FAX: 096-373-6837
E-mail: y-satou@kumamoto-u.ac.jp

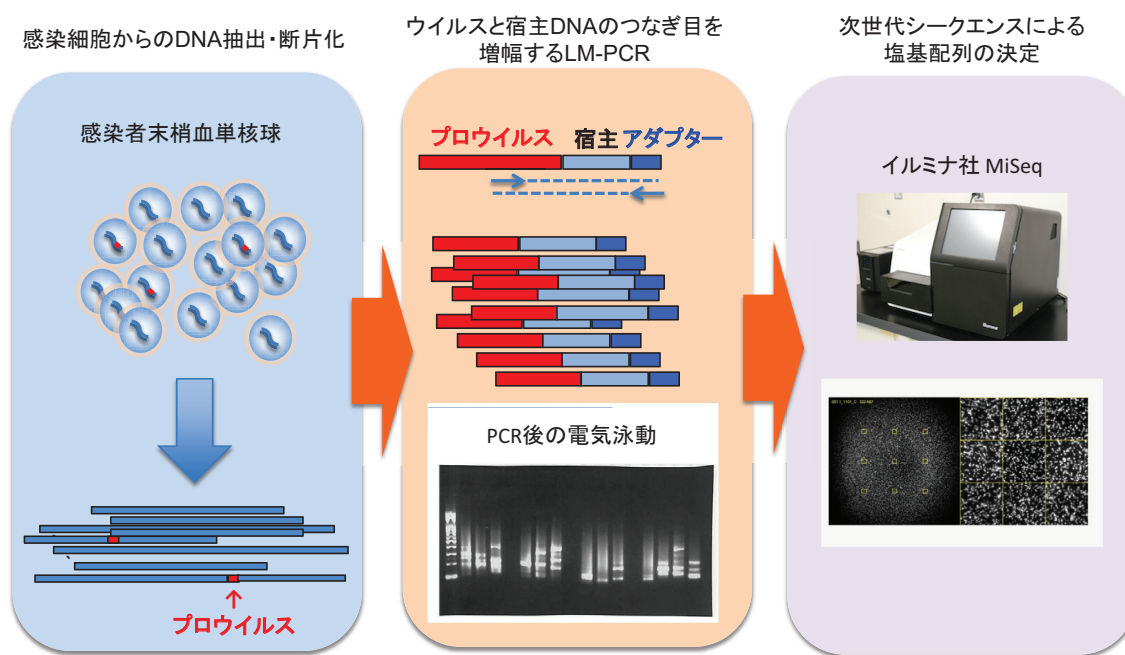


図1 ウイルス組み込み部位解析の流れ

まり、HTLV-1 感染者末梢血ではウイルスの産生は極めて低く維持されているものの、体内のいずれかの解剖学的局所にて少量あるいは間欠的にウイルス抗原を発現している状況と考えられる。つまり、感染者体内においては、感染細胞とそれに対する免疫応答の平衡状態が維持される形で、ウイルス持続感染が成立している。そのような状況下で感染細胞が生き残るためには、宿主の免疫から逃れるためにウイルス抗原の発現が巧妙に制御されていると考えられる。

2. ウイルス組み込み部位による個々の感染クローン識別

レトロウイルス感染時には感染イベント毎に宿主ゲノムの様々な場所にウイルスゲノムの組み込みが生じる。数理的解析によると1感染個体には数万種類の多種多様な感染クローンが存在すると推定されている⁵⁾。それぞれの感染クローンは、ウイルスが組み込まれている場所が異なる。そして、各々のウイルス組み込み部位情報が感染クローンを識別するIDとして用いられる。HTLV-1 感染症の臨床においても、HTLV-1 の宿主ゲノムへのモノクローナルな組み込みをサザンブロットで検出することが、現在のATL 診断で行われている。ウイルスのヒトゲノムへの組み込みを調べる方法として最初に確立されたサザンブロット法であるが、本法は感染細胞のクローン性増殖評価は可能であるが、ウイルス組み込み部位情報を得ることが出来ない。次に登場してきたのが、PCR を活用したウイルス組み込み部位解析であり、サンガー法によるDNA配列解析と組み合わせることによって、ウイルス組み込み

部位情報が取得可能になった⁶⁾。ウイルスと宿主ゲノムのつなぎ目をPCR増幅で増幅する事により、サザンブロット法に比べ検出感度が飛躍的に向上した一方で、PCR増幅バイアス(短い断片は長い断片に比べ、より効率高く増幅される)のため、クローン性増殖の定量的評価には一定の限界がある。本法を活用した研究で、ATL やHAM患者におけるウイルス組み込み部位の特徴が徐々に明らかになってきた。ATL では転写開始点に多く組み込まれ無症候性感染者では宿主ゲノムの繰り返し配列に入っていることが多いこと⁷⁾、HAM患者では転写がアクティブな遺伝子内にウイルスが挿入されているものが多いことが報告されている⁸⁾。

3. 次世代シーケンスによるウイルス組み込み部位及び感染クローン増殖性解析

更に大きなブレークスルー的研究として、次世代シーケンスを活用したウイルスの組み込み部位解析法の開発があげられる⁹⁾。アダプターライゲーションを介したPCRでウイルス3'末端のLTR配列とアダプターに設計したプライマーでPCR反応(ligation-mediated PCR: LM-PCR)を行い、指数関数的にウイルスとヒトゲノムのつなぎ目を増幅する(図1)。そのことで、ヒトゲノム中にわずかしが存在しないプロウイルス領域を効率良く増幅する事が可能となる。増幅した産物を次世代シーケンサーで解析を行い、プロウイルスに近接する領域のDNA配列を取得し、その配列がヒトゲノムのどこに由来するか検索することで、組み込み部位が決定される。従来型のサンガーシーク

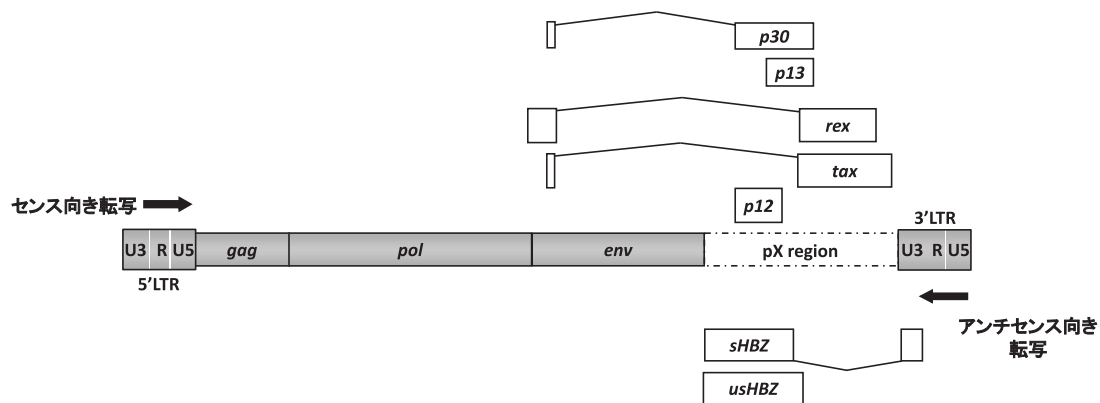


図2 HTLV-1 ウイルスゲノムの構造

エンスとくらべ、短期間により多くのウイルス組み込み部位情報が取得可能となった。

LM-PCR の更なる利点は、個々の感染クローンを識別する組み込み部位情報に加え、各クローンのクローン性増殖の情報が得られることである。この利点を活用して、これまで感染者検体解析がなされ、クローン性増殖の様子が明らかにされてきた^{9,10)}。

4. HTLV-1 プロウイルスの構造と転写制御メカニズム

gag, *pol*, *env* といったウイルス粒子産生に必須のウイルス構造遺伝子は HTLV-1 プロウイルスのプラス鎖にコードされている (図2)。またウイルスの構造遺伝子の他にもウイルス遺伝子発現や感染細胞増殖を調節する働きをもった調節遺伝子群がコードされている (図2)。調節遺伝子群の中でも Tax はウイルス遺伝子のプロモーター・エンハンサーである 5'側 long terminal repeat (LTR) に作用してウイルス遺伝子の転写を亢進するだけでなく細胞側因子との相互作用により様々な作用を発揮して、感染細胞の増殖や生存に寄与している¹¹⁾。一方、HTLV-1 のアンチセンス向きにコードされる HBZ は HTLV-1 のセンス向きのウイルス遺伝子発現を抑制することで、ウイルスの潜伏感染に関わるとされる¹²⁾。HBZ は感染細胞や ATL 細胞の増殖に関与すること、さらには HBZ トランスジェニックマウスが T 細胞リンパ腫を高率に発症する事から ATL の病態への関与が示唆されている^{13,14)}。

HTLV-1 プロウイルスでは 5'LTR がセンス向きの転写、3'LTR がアンチセンス向きの転写のプロモーターとして作用することが知られている¹⁵⁾。HTLV-1 感染細胞が腫瘍化した ATL 細胞ではセンス向きの転写はしばしば抑制されているか、あるいは間欠的な一過性の発現に留まるのに対し^{16,17)}、アンチセンス向きの転写は恒常的に認められる。HBZ はコードしているタンパクの抗原性が極めて低いことから、感染細胞が HBZ を発現しても免疫細胞に見つかりにくいと考えられる。一方で、Tax は免疫原性が高く、

その発現細胞は免疫監視機構の排除の対象となり、Tax を発現しない細胞は生体内での増殖優位性を有すると考えられている。

しかしながら、そのような 5'側が抑制、3'側は活性化という対照的な転写パターンが、およそ 9,000 塩基という極めて小さいウイルスゲノムのなかで如何に制御されているのが疑問として残っていた。最近、我々は、HTLV-1 のウイルスゲノム内にインスレーター結合タンパクである CTCF という宿主細胞タンパク分子が結合して、プロウイルスの内部にインスレーター領域を形成している事を見出した (図3)¹⁸⁾。そのことが、HTLV-1 という小さなゲノム内で、5'側と 3'側の対称的な転写活性領域を維持することを可能にしている仕組みの 1 つと考えられる。

興味深いことに、インスレーター領域は前述したウイルスタンパク HBZ のコード領域に存在している。HTLV-1 はゲノムにウイルスタンパクをコードするだけでなく、持続感染成立に必要な転写制御に関する様々な仕組みを取り込んでいることになる。すなわち、HTLV-1 はおよそ 9,000 塩基という小さいゲノムを最大限活用するべく、ウイルスゲノム DNA のセンス向きだけでなくアンチセンス向きにもウイルスタンパク産生のために遺伝子コードを書き込んでいる。それに加え、ウイルス遺伝子転写制御のために、エピゲノム制御に関わる宿主タンパク分子をウイルスゲノム DNA にリクルートして、実に巧妙に感染宿主個体内で慢性持続感染を獲得しているわけである。

5. HTLV-1 の組み込みが宿主ゲノム高次クロマチン構造や遺伝子転写へ与える影響

上記研究でウイルスゲノムへの CTCF の結合が明らかとなったことにより、外来性レトロウイルスの挿入による、新たな宿主細胞ゲノム異常誘導メカニズムが起きている可能性が考えられる。細胞側因子である CTCF はヒトのゲノムに数万カ所の結合部位が存在することが知られており、ゲノムの境界領域を形成すると共に、高次クロマチン

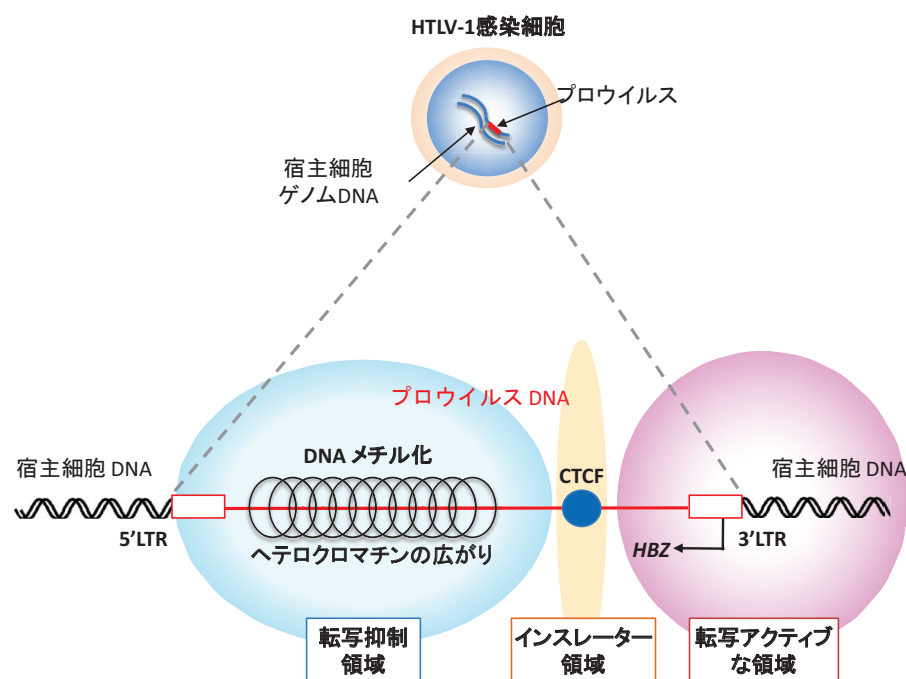


図3 HTLV-1の細胞DNAへの組み込みを示す模式図

構造を制御することが知られている。つまり HTLV-1 のゲノムへの挿入は、同時に我々ヒトの細胞ゲノムへの新規 CTCF 結合部位挿入を意味する。HTLV-1 の組み込みによる異所性 CTCF 結合部位の創出が、宿主ゲノム高次構造の変容を誘導する可能性がある。最近の報告では、実際にウイルス挿入によって、宿主のゲノム高次構造が変化し、クロマチンルーピングによって塩基配列上では離れたゲノム領域であっても、空間的距離として近接し、細胞側遺伝子発現の異常を引き起こす事が報告されている¹⁹⁾。

おわりに

興味深い事に、最近の研究で、HIV-1 感染者体内でも感染細胞のクローン性増殖が観察され、そのような細胞ではウイルスがガン関連遺伝子近傍に組み込まれることが多いと報告されている^{20,21)}。ウイルスと宿主細胞ゲノムの相互作用は HTLV-1 のみならず、他のレトロウイルスでも共通した持続感染維持メカニズムと考えられる。今後も、ゲノム解析技術革新と共にウイルスとヒトとの関わり方の理解がより進み、ウイルスの病原性解明が加速されることが期待される。

* 本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Poiesz, B.J., et al., *Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(12): p. 7415-9.
- 2) Uchiyama, T., et al., *Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases*. Blood, 1977. **50**(3): p. 481-92.
- 3) Gessain, A., et al., *Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis*. Lancet, 1985. **2**(8452): p. 407-10.
- 4) Osame, M., et al., *HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity*. Lancet, 1986. **1**(8488): p. 1031-2.
- 5) Laydon, D.J., et al., *Quantification of HTLV-1 clonality and TCR diversity*. PLoS Comput Biol, 2014. **10**(6): p. e1003646.
- 6) Takemoto, S., et al., *A novel diagnostic method of adult T-cell leukemia: monoclonal integration of human T-cell lymphotropic virus type I provirus DNA detected by inverse polymerase chain reaction*. Blood, 1994. **84**(9): p. 3080-5.
- 7) Doi, K., et al., *Preferential selection of human T-cell leukemia virus type I provirus integration sites in leukemic versus carrier states*. Blood, 2005. **106**(3): p. 1048-53.
- 8) Meekings, K.N., et al., *HTLV-1 integration into transcriptionally active genomic regions is associated with proviral expression and with HAM/TSP*. PLoS Pathog, 2008. **4**(3): p. e1000027.
- 9) Gillet, N.A., et al., *The host genomic environment of*

- the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones.* Blood, 2011. **117**(11): p. 3113-22.
- 10) Cook, L.B., et al., *The role of HTLV-1 clonality, proviral structure, and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma.* Blood, 2014. **123**(25): p. 3925-31.
 - 11) Giam, C.Z. and K.T. Jeang, *HTLV-1 Tax and adult T-cell leukemia.* Front Biosci, 2007. **12**: p. 1496-507.
 - 12) Gaudray, G., et al., *The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription.* J Virol, 2002. **76**(24): p. 12813-22.
 - 13) Satou, Y., et al., *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): p. 720-5.
 - 14) Satou, Y., et al., *HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo.* PLoS Pathog, 2011. **7**(2): p. e1001274.
 - 15) Yoshida, M., et al., *Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene.* J Virol, 2008. **82**(19): p. 9359-68.
 - 16) Billman, M.R., D. Rueda, and C.R.M. Bangham, *Single-cell heterogeneity and cell-cycle-related viral gene bursts in the human leukaemia virus HTLV-1.* Wellcome Open Res, 2017. **2**: p. 87.
 - 17) Mahgoub, M., 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): p. E1269-E1278.
 - 18) Satou, Y., et al., *The retrovirus HTLV-1 inserts an ectopic CTCF-binding site into the human genome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(11): p. 3054-9.
 - 19) Melamed, A., et al., *The human leukemia virus HTLV-1 alters the structure and transcription of host chromatin in cis.* Elife, 2018. **7**.
 - 20) Maldarelli, F., et al., *HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells.* Science, 2014. **345**(6193): p. 179-83.
 - 21) Wagner, T.A., et al., *HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection.* Science, 2014. **345**(6196): p. 570-3.

The role of HTLV-1 provirus in clonal selection of the infected cells

Misaki MATSUO, Paola MIYAZATO, Yorifumi SATOU

Division of Genomics and Transcriptomics
Joint Research Center for Human Retrovirus Infection
Kumamoto University

HTLV-1 inserts its viral genome into the host cellular DNA in the form of a provirus. The proviral DNA is a key to understand the persistence and pathogenesis of HTLV-1 infection. There has been a significant progress in proviral research due to technological advances on DNA sequencing. Next generation sequencing technology revolutionized our understanding of the human genome, showing how it is organized and regulated, not only by the nucleotide sequence itself but also by epigenetic features and higher-order chromatin structure. We will review recent findings regarding the role of HTLV-1 provirus in HTLV-1 infection.