

HTLV-1 bZIP factor (HBZ) RNA とタンパク質 は T 細胞の増殖、生存に異なる影響を与える

水戸部 悠一

目次

	ページ
論文要旨	3
略語一覧	5
第一章 序論	6
1-1. ヒト T 細胞白血病ウイルスの概要	
1-2. HTLV-1 にコードされる遺伝子	
1-3. HTLV-1 bZIP Factor	
1-4. <i>HBZ</i> RNA	
第二章 結果	11
2-1. <i>HBZ</i> タンパク質と RNA は 細胞の生存率に対して相反する働きをもつ	
2-2. <i>HBZ</i> タンパク質と RNA は 細胞死に対して相反する機能をもつ	
2-3. <i>HBZ</i> タンパク質と RNA は共に細胞増殖を亢進する	
2-4. <i>HBZ</i> RNA コーディング領域の初めの 50 塩基が <i>HBZ</i> RNA の機能活性に必須である	
2-5. <i>usHBZ</i> RNA も <i>sHBZ</i> RNA と同様な機能をもつ	
2-6. <i>HBZ</i> RNA とタンパク質は それぞれ異なるパスウェイに関与する	
2-7. <i>HBZ</i> RNA は <i>survivin</i> を含む 標的遺伝子のプロモーター活性を亢進する	
2-8. YM155 は <i>HBZ</i> RNA 発現細胞に強力な毒性を持つ	
第三章 考察	31
第四章 実験材料と方法	34

- 4-1. マウスと細胞株
- 4-2. プラスミド
- 4-3. ウイルス感染
- 4-4. GFP competition assay
- 4-5. BrdU 取り込み実験
- 4-6. Annexin V/7-AAD 染色
- 4-7. マイクロアレイ解析
- 4-8. ルシフェーレースアッセイ
- 4-9. Immunoblotting 解析
- 4-10. RNA の発現解析
- 4-11. MTT アッセイ

参考文献 41

謝辞 49

論文要旨

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) および HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy: HAM) , HTLV-1 ぶどう膜炎 (HTLV-1 uveitis: HU) など慢性炎症性疾患の原因ウイルスである。現在まで HTLV-1 による発がん機構の研究ではプラス鎖にコードされる Tax が中心的な役割を担うと考えられてきた。Tax は E2F1 など様々な増殖因子を活性化し、細胞死に関わる経路を抑制する。また Tax を発現するマウスではリンパ腫を含め様々ながんを引き起こすことから強力ながん遺伝子として知られている。しかしながら約 60% の ATL 症例では *tax* の発現を認められないことから、HTLV-1 による ATL 発症機序には、*tax* 以外の遺伝子の関与が示唆されていた。

HTLV-1 bZIP Factor (HBZ) は HTLV-1 のマイナス鎖にコードされるウイルス遺伝子で 2002 年に発見された。他の HTLV-1 遺伝子と異なり、*HBZ* は全ての ATL 症例で発現していることから ATL の発症、維持に対して重要な役割を担っていることが示唆された。さらに *HBZ* はコードされるタンパク質としてだけでなく、RNA としても機能を有することが報告されているが、その詳細な機能、メカニズムは不明であった。本研究ではマウス初代培養 CD4 陽性 T 細胞を用いて *HBZ* RNA、タンパク質の細胞生存に対する影響の詳細な解明を試みた。

GFP competition assay やその他の実験の結果、*HBZ* タンパク質は細胞増殖を促進するものの細胞死を強く誘導するため細胞生存率を低下させた。*HBZ* RNA は増殖を促し、同時に細胞死を抑制することで生存率を上昇させることが明らかとなった。以上の結果から *HBZ* RNA とタンパク質は同じ遺伝子にコードされる因子にも関わらず、細胞の生存性に対し相反する機能を持っていることが示唆された。また変異体を用いた実験より *HBZ* RNA のコーディング領域の初めの 11 から 50 塩基が *HBZ* RNA の活性に必須であることが明らかとなった。

またマイクロアレイによる発現解析では *HBZ* RNA は細胞増殖、生存に関わる遺伝子である *survivin*、*mcm5*、*aurkb* などの発現を増強することが明らかとなった。またデータベースを用いたパスウェイ解析で *HBZ* RNA は細胞増殖、生存に関わる経路、またタンパク質は免疫に関わる経路にそれぞれ影響を与え

ており、*HBZ* RNA とタンパク質はそれぞれ異なる経路に関与していることが示唆された。*HBZ* RNA の標的遺伝子のプロモーターをクローニングし *HBZ* RNA の機能を調べたところ、*survivin*、*ccna2*、*top2a*、*bub1b*、*cenph*、*mcm5*、*ccnb2*、*rrm2*、*aurkb* のプロモーターからの転写を *HBZ* RNA が活性化することが判明した。さらに *survivin* の阻害剤である YM155 は、*HBZ* RNA によって亢進した細胞生存率の上昇を抑制し、また ATL 細胞株の増殖を強力に抑制した。この結果は *HBZ* RNA による *survivin* 発現の亢進が ATL の生存に重要であることを示している。

以上の結果より HTLV-1 は、その限られたウイルス遺伝子をタンパク質としてだけではなく、RNA としても効率的に利用することで巧妙に感染を維持していると考えられた。

略語一覽

ATL: adult T-cell leukemia

CDE/CHE: cell cycle dependent element/cell cycle homology region

HTLV-1: Human T-cell leukemia virus type-1

GEO: Gene Expression Omnibus

HAM: HTLV-I-associated myelopathy

HBZ: HTLV-1 bZIP factor

HSV-2: Herpes simplex virus type-2

IAP: inhibitor of apoptosis

IPA: Ingenuity Pathway Analysis

KSHV: Kaposi's sarcoma associated herpesvirus

lncRNA: long non coding RNA

LTR: long terminal repeat

SM: Silence mutant

URA: Upstream Regulator Analysis

第一章 序論

1-1. ヒト T 細胞白血病ウイルスの概要

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は 1980 年に Gallo らによって ヒト T 細胞株で同定されたレトロウイルスである (Poiesz et al., 1980)。1981 年に日沼らにより HTLV-1 は特有の核の形態をもつ白血病として知られる成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスであることが報告された (Hinuma et al., 1981)。また炎症性疾患である HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) や、HTLV-1 ぶどう膜炎の原因ウイルスであることが明らかとなっている (Gessain et al., 1985; Osame et al., 1986)。現在、世界では約 1,000~2,000 万人の HTLV-1 保有者(キャリア)がいると推定されており、日本、アフリカ、南アメリカなどで特に多い (Watanabe, 2011)。日本には約 108 万人の HTLV-1 キャリアがいると推定されており、九州、沖縄など西日本に多いことが知られているが、最近では東京、大阪などの都市部でも HTLV-1 キャリア数が増加していることが報告されている。

HTLV-1 はウイルス粒子による感染力が非常に弱く、主に感染細胞と非感染細胞が接触してウイルスが伝播する様式をとる (Igakura et al., 2003)。HTLV-1 は glucose transporter 1 (GLUT1) を受容体として細胞内に入りこみ、その後ウイルス RNA は逆転写酵素により DNA に変換され、宿主ゲノムに組み込まれプロウイルスとなり感染が確立する (Matsuoka and Jeang, 2007)。感染経路として授乳による母子感染のほか、性行為感染が知られている。HTLV-1 に感染した後、50~60 年の潜伏感染を経て、HTLV-1 キャリアの約 5% が ATL を発症すると推定されている。ATL 患者では核が花びらのような形をした花細胞(フラワーセル)が末梢血に出現することが多い。治療法としては化学療法、造血幹細胞移植などが行われるが、完治は困難なことが多い (図 1-1)。

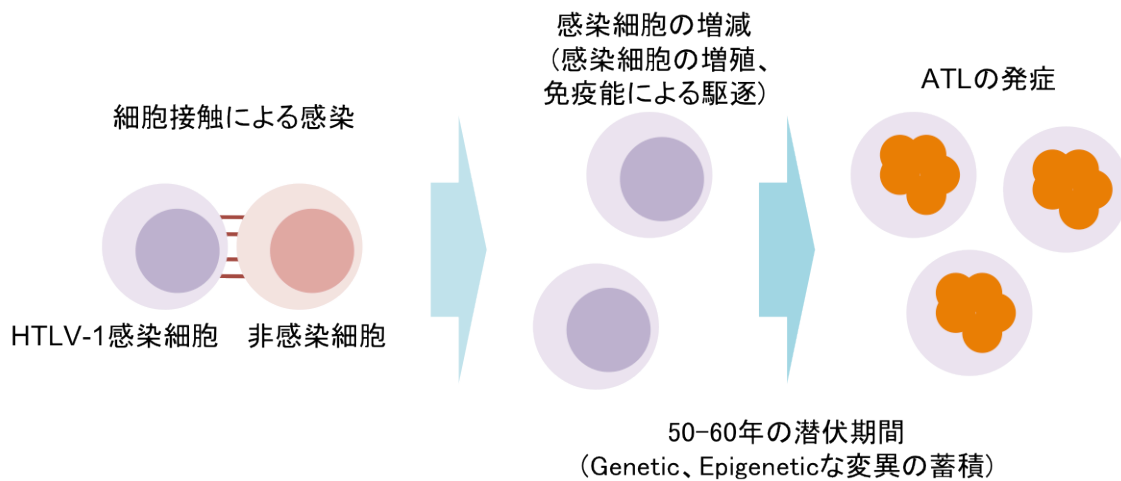


図 1-1. HTLV-1 感染から ATL 発症までの概略

1-2. HTLV-1 にコードされる遺伝子

HTLV-1 のプロウイルスの概要図を図 1-2 に示す。HTLV-1 プロウイルスゲノムは LTR(末端反復配列)を両端に持ち、レトロウイルスの基本的な構造遺伝子である *gag*, *pol*, *env* をコードしている。HTLV-1 プロウイルスは *env* と 3'側 LTR の間に pX とよばれる領域を有しており、この領域は HTLV-1 特有な調節・アクセサリ遺伝子である *tax*, *rex*, *p13*, *p12*, *p30* をコードしている。HTLV-1 発見当初から、HTLV-1 による発がんの機序に関しては主に *tax* が研究されてきた。実際に Tax は AP-1(Jeang et al., 1991), NF- κ B(Sun et al., 1994), E2F1(Lemasson et al., 1998)等のシグナルに関与し、また Tax を発現するトランスジェニックマウスでは白血病を含むがんを起こすなど強力な発がん作用があることが報告されている(Grossman et al., 1995)。しかし実際の ATL 症例では約 60%が Tax を発現していないことが明らかになった(Takeda et al., 2004)。Tax の発現抑制の主な機構として、*tax* 遺伝子の non-sense 変異、frame-shift、また *tax* のプロモーターである 5'LTR の欠失、高度のメチル化による不活化が知られている(Miyazaki et al., 2007; Takeda et al., 2004; Tamiya et al., 1996)。しかし、全ての ATL 症例で pX 領域から 3'側 LTR は保存されている。以上の知見は ATL 発症に関して Tax とは異なる重要な HTLV-1 遺伝子が存在する可能性を示唆していた。

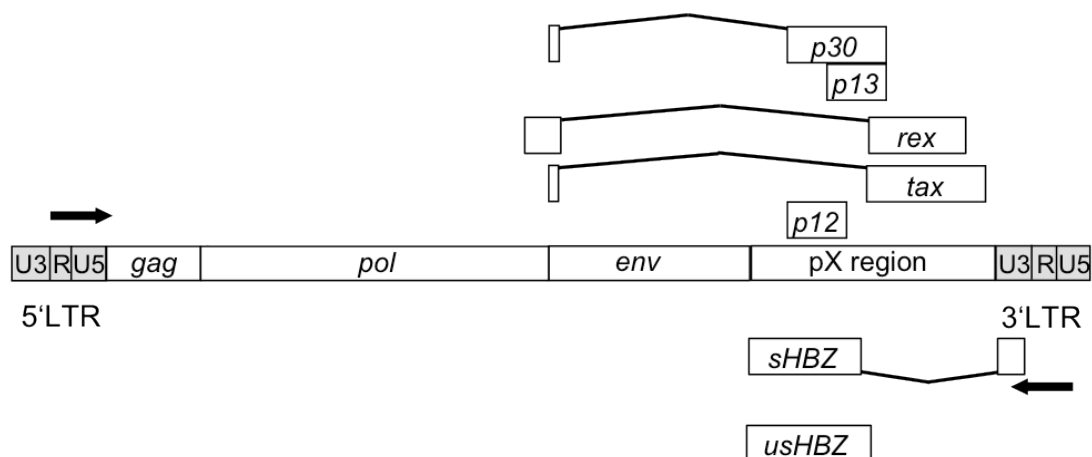


図 1-2. HTLV-1 プロウイルスゲノムの構造

1-3. HTLV-1 bZIP Factor

HBZ は 2002 年に同定された、HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる遺伝子である(Gaudray et al., 2002)。*HBZ* は *spliced form HBZ (sHBZ)* と *unspliced form HBZ (usHBZ)* の 2 種類の転写産物がある。また *usHBZ* は *sHBZ* に比べタンパク質の半減期が短いということが報告されている(Yoshida et al., 2008)。Tax と違い、*HBZ* RNA は全ての ATL 症例で発現していることが報告されており(Satou et al., 2006)、このことは *HBZ* が ATL 発症に重要な役割を担っていることを示唆している。現在までの研究から *HBZ* タンパク質は AP-1 ファミリーである c-Jun との結合を介した機能阻害(Basbous et al., 2003)、NF- κ B 経路に重要な転写因子である p65 の DNA 結合能の阻害、分解促進が報告されている(Zhao et al., 2009)。また最近、*HBZ* により microRNA-17、21 の発現上昇が起こり DNA 修復阻害が起こることが報告されている(Vernin et al., 2014)。また *HBZ* を CD4 陽性 T 細胞に発現する *HBZ* トランスジェニックマウスにおいて、CD4 陽性 T 細胞数の増加、増殖能の亢進、皮膚炎、リンパ腫の発症などの表現型を示したことから *HBZ* 遺伝子も発がんに関与していることが示されている(Satou et al., 2011)。

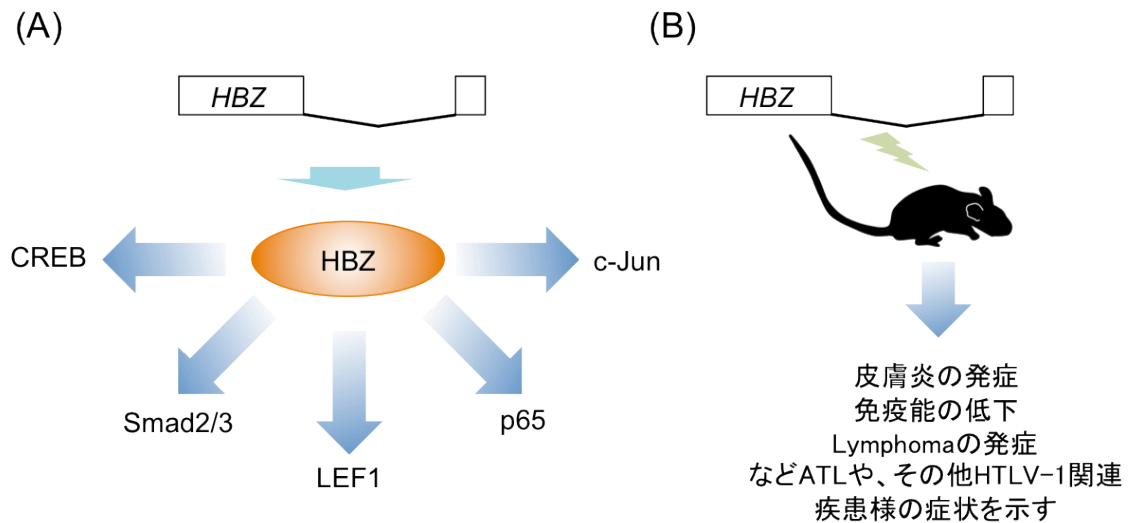


図 1-3. HBZ の概要

(A) HBZ タンパク質は c-Jun,p65 など様々な宿主因子に関与し脱制御する。(B) HBZ トランスジェニックマウスは ATL や、その他 HTLV-1 関連疾患用の症状を示す。

1.4 *HBZ* RNA

タンパク質をコードしない 100~200 塩基以上の長さの RNA (lncRNA) は以前まで機能がないジャンク RNA とされていたが、近年様々な機能、経路に関わっていることが明らかとなってきた (Geisler and Coller, 2013; Spizzo et al., 2012; Wang and Chang, 2011)。さらには様々なウイルス由来の RNA が宿主免疫からの逃避 (Ouellet and Provost, 2010)、増殖の亢進 (Iwakiri, 2014; Samanta et al., 2008) などに関わっていることも報告されている。先行研究で *HBZ* を Kit225 という IL-2 依存性の T 細胞株に発現させ、低濃度の IL-2 存在下で培養するとコントロールベクターを発現する細胞に比べ増殖能が亢進することが判明している。さらに Kit225 における *HBZ* の増殖亢進能がタンパク質、もしくは RNA のどちらに担われているかを調べるために、2 種類の変異体 (TTG, SM) が検討された。TTG 変異体は *HBZ* のコーディング領域のスタートコドンである ATG を TTG に置き換えて、タンパク翻訳ができなくなった変異体、SM はコーディング領域の全領域のコドンに silence 変異を導入し、RNA の配列、構造は野生型と異なるが、野生型 *HBZ* と同じタンパク質が翻訳される変異体である。これらふたつの変異体を用いたところ、Kit225 細胞株における *HBZ* 遺伝子の増殖亢進能は *HBZ* タンパク質 (SM) ではなく RNA (TTG) によって担われて

いることが明らかとなった(Satou et al., 2006)。しかしながら、この *HBZ* RNA による増殖亢進機能は Jurkat, CTLL-2 などの他の T 細胞株では確認できず、またその分子メカニズムは全く不明であった。そこで本研究では *HBZ* RNA とタンパク質の細胞増殖および生存性に対する正確な機能、また *HBZ* RNA の作用メカニズムを、初代培養マウス CD4 陽性 T 細胞を用いて明らかにすることを目的とした。

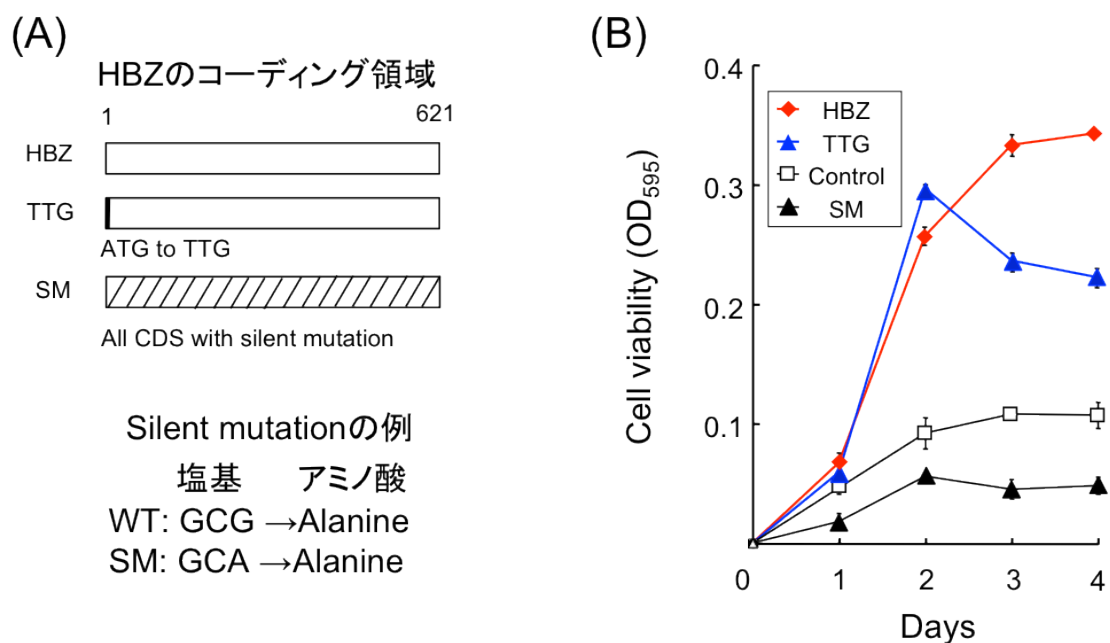


図 1-4. *HBZ* RNA は Kit225 細胞の増殖能を亢進する

(A) TTG, SM 変異体の説明。(B) *HBZ* RNA は Kit225 細胞の増殖を促進する。図は (Satou et al., 2006)より引用。

第二章 結果

2-1. HBZ タンパク質と RNA は T 細胞の生存率に対して相反する働きをもつ

まず初めに TTG、SM 変異体がそれぞれ目的とした変異体として発現しているか確認した。293FT 細胞にそれぞれの変異体を導入し、タンパク質または *HBZ* RNA の発現を検出したところ、HBZ タンパク質は HBZ、SM のみで検出され(図 2-1.A)、また野生型 RNA は HBZ、TTG のみで検出された(図 2-1.B)。以上の結果により TTG、SM がそれぞれ RNA、タンパク質として発現することが確認できた。

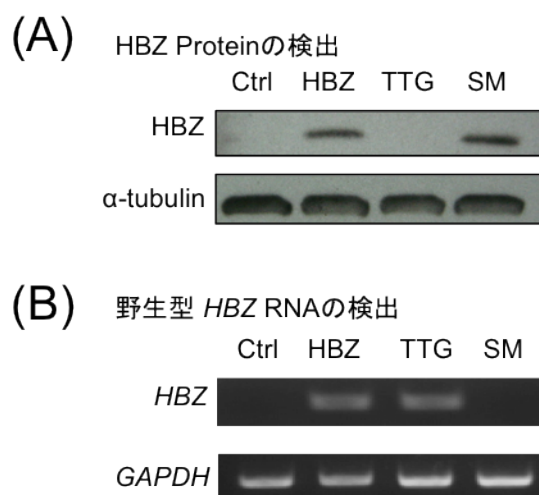


図 2-1. TTG、SM における野生型 *HBZ* RNA、タンパク質の検出

293FT 細胞株に HBZ(野生型)、TTG、SM 発現ベクター (バックボーンベクター: pMX-IG ベクター)を導入し 48 時間後に細胞を回収しサンプルとした。(A) 細胞溶解液を抽出 SDS-PAGE にてタンパク質を泳動し、PVDF 膜にブロット後、抗 HBZ 抗体、抗 α -tubulin 抗体を用いてそれぞれのタンパク質を検出した。(B) 抽出した RNA を鋳型に cDNA を合成し、各プライマーを用いて増幅し、発現を確認した。

次に HBZ タンパク質と RNA の細胞生存率に対する正確な影響を調べるために、GFP competition assay(Shi et al., 2013; Wolfe et al., 2014; Zuber et al., 2011)を行った。GFP competition assay の概要図を図 2-2 に示す。マウス CD4 陽性 T 細胞にレトロウイルスベクターを利用し HBZ、もしくはその変異体である TTG、SM を GFP と共に発現させ、ウイルス感染から 2 日後 (Day0)と、さらに 4 日間 IL-2 添加メディウムにて培養した後 (Day4)に GFP の陽性率を測定し比較した。発現させた目的遺伝子が細胞に対して毒性を持つ場合、培養している間に GFP 陽性細胞数は陰性細胞数に対して減少し、結果として Day0 に比べ Day4 では GFP 陽性率は低下する。一方目的遺伝子が細胞の生存率を上昇させる場合、GFP 陽性細胞は GFP 陰性細胞と比較し増加するため、GFP 陽性率は培養後に上昇する。

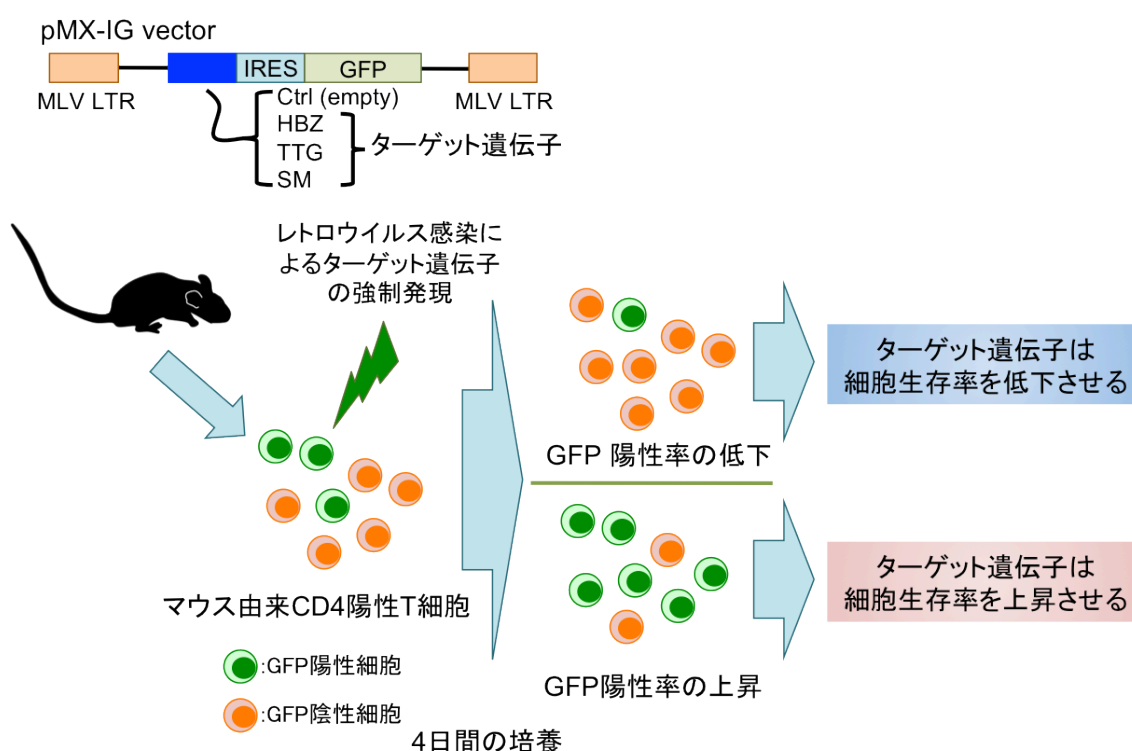


図 2-2. GFP competition assay の概略図

マウスから抽出した CD4 陽性 T 細胞にレトロウイルスを用いて HBZ、もしくはその変異体を導入し 48 時間後に GFP 陽性率を測定し、さらに IL-2 を含むメディウムで 4 日間培養後に GFP を再度測定、比較することでターゲット遺伝子が細胞の生存率にどのように影響を与えるか調べる方法である。

コントロールベクターを導入した細胞群では day0 と day4 で GFP 陽性率は変化しないことからウイルス感染は細胞の生存性に影響を与えないことを確認した。HBZ を発現させると GFP 陽性率は day0 に比べ day4 で若干低下していたことから、HBZ は細胞生存率を低下させることが明らかとなった。さらに TTG と SM においても同様の実験を行ったところ、TTG では GFP 陽性率は上昇し、SM で低下していた(図 2-3.A.B)。以上の結果より *HBZ* RNA とタンパク質は初代培養 CD4 陽性 T 細胞の細胞生存性に対し相反する効果を有していることが示された。

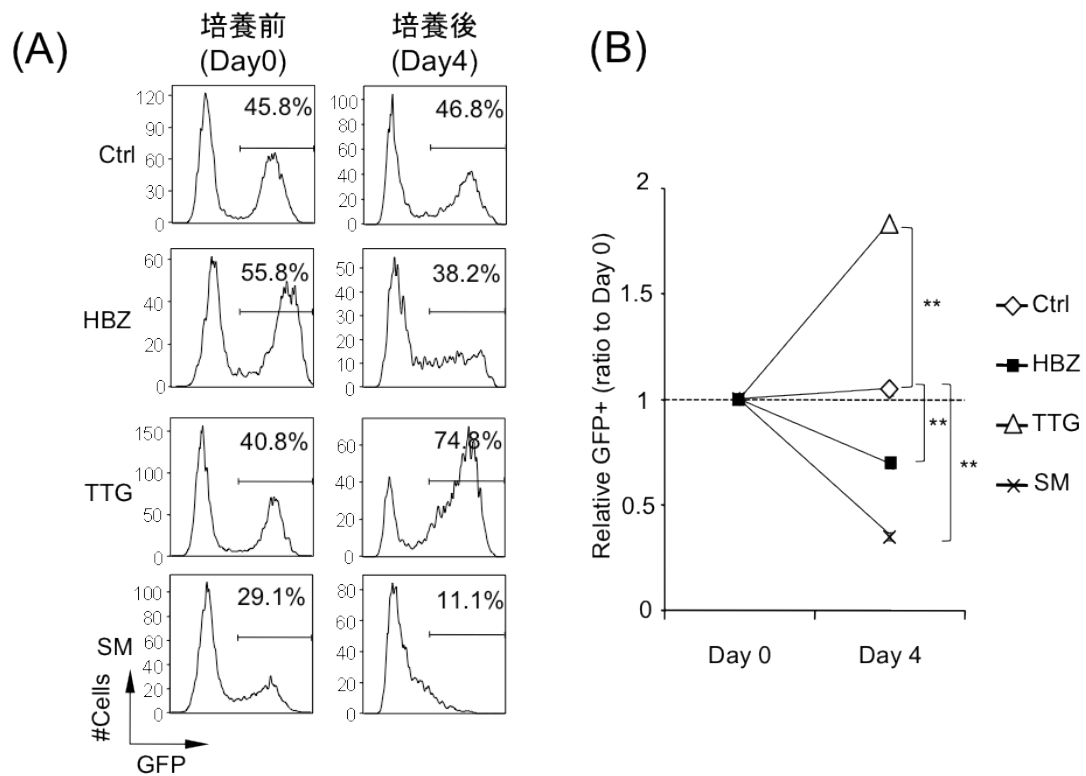


図 2-3. GFP competition assay の結果

(A) 各サンプルにおける培養前(Day0)と培養後(Day4)の GFP のヒストグラムを示す。
 (B) 各サンプルの Day0 の GFP 陽性率を 1 としたときの Day4 の GFP 陽性率の推移をまとめた。*: P<0.05, **: P<0.01

2-2. HBZ タンパク質と RNA は細胞死に対して相反する機能をもつ

次に *HBZ* RNA とタンパク質がどのようにして細胞生存に影響を与えているか明らかにするために細胞死に対する影響を Annexin V/7-AAD、また増殖能に対する影響を BrdU 取り込み能を用いて解析した。ウイルスによる遺伝子導入から 48 時間後、コントロールに比べ、HBZ、SM では死細胞の割合が有意に増加していたことから、HBZ タンパク質は細胞死を誘導すると考えられた(図 2-4.A.B)。TTG はウイルス感染から 48 時間後には細胞死に影響を与えないが、さらに 48 時間培養するとコントロールに比べ有意に細胞死を抑制した(図 2-4.C.D)。以上の結果より *HBZ* RNA とタンパク質は細胞死に対して反対に作用することが明らかとなった。

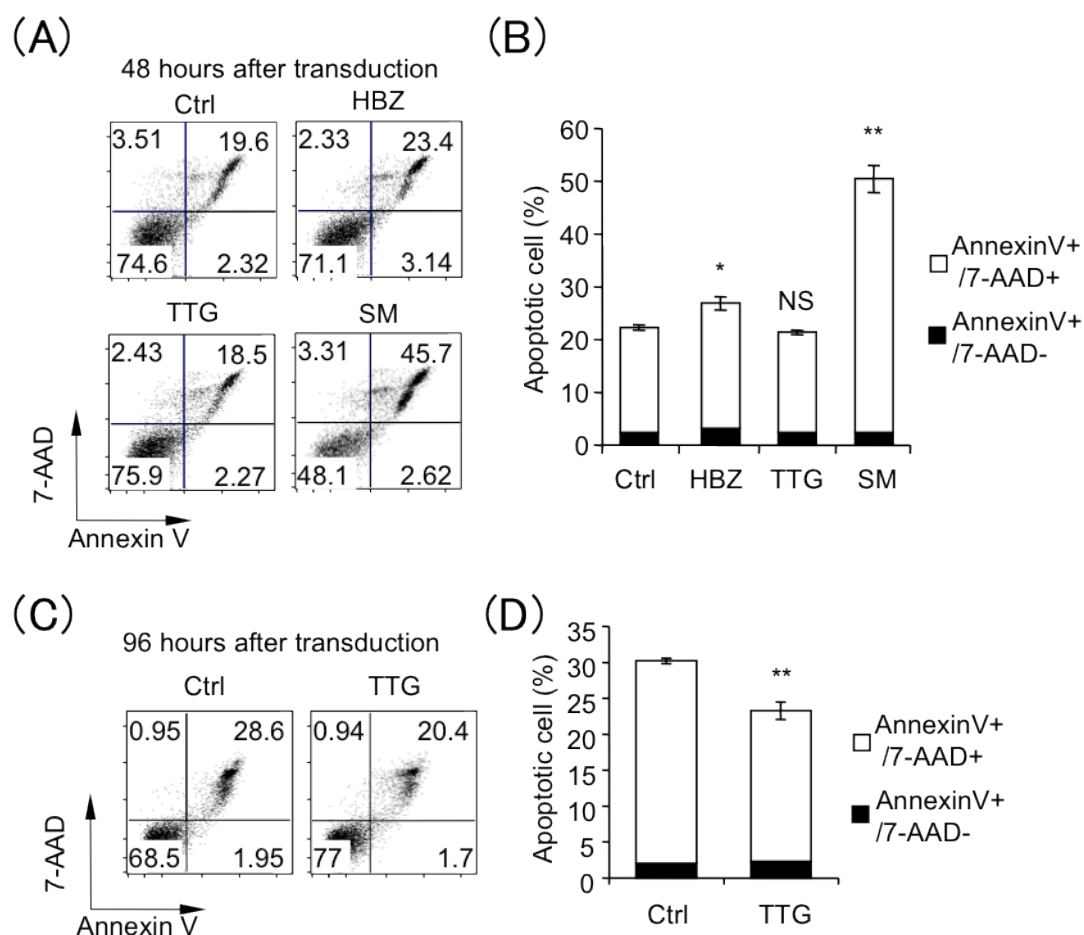


図 2-4 *HBZ* RNA、タンパク質の細胞死に対する影響

マウス由来 CD4 陽性 T 細胞にレトロウイルスを利用して HBZ、もしくはその変異体を

表面マーカーである NGFR と共に発現させ、48 時間後(A、B)、また 96 時間後(C、D) にそれぞれ CD4 陽性 NFGR 陽性細胞における死細胞を Annexin V/7-AAD 染色を用いて測定した。A,C にヒストグラム、B,D に結果をまとめたグラフを示す。** : $P<0.01$ 、* : $P<0.05$ 、NS : not significant

2-3. HBZ タンパク質と RNA は共に細胞増殖を亢進する

また図 2-5 に示す通り HBZ、TTG、SM 全てでコントロールに比べ BrdU の取り込み能が増加していることから、HBZ RNA、タンパク質は共に初代培養 CD4 陽性 T 細胞の増殖能を亢進すると考えられる。以上の結果より HBZ タンパク質は細胞増殖を亢進すると共に細胞死も誘導することで細胞の生存率を低下する一方、HBZ RNA は細胞増殖を亢進すると共に細胞死も抑制することで細胞の生存率が上昇していることが示唆された。

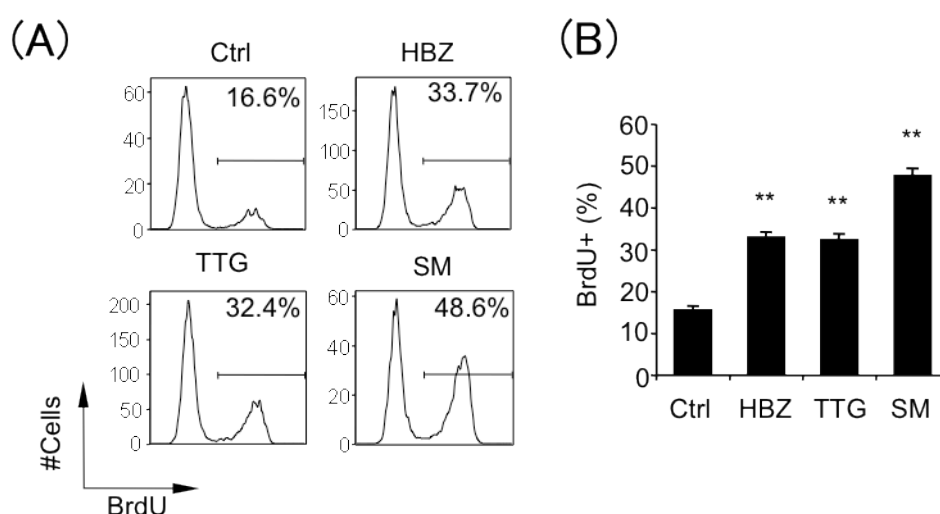


図 2-5. HBZ RNA とタンパク質の増殖能への影響

マウス由来 CD4 陽性 T 細胞にレトロウイルスを利用して HBZ、もしくはその変異体を表面マーカーである NGFR と共に発現させた。ウイルス感染より 48 時間後に CD4 陽性 NFGR 陽性細胞における S 期細胞群を BrdU 取り込みを用いて測定した。A はヒストグラム、B は結果をまとめたグラフを示す。** : $P<0.01$

2-4. *HBZ* RNA コーディング領域の初めの 50 塩基が *HBZ* RNA の機能活性に必須である

前項の結果より *HBZ* RNA はマウス CD4 陽性 T 細胞の細胞生存率を上昇させることが明らかとなったが、次に *HBZ* RNA のどの領域が活性を持っているか調べるために、TTG-SM 変異体を作成した。この変異体は SM のスタートコドンである ATG を TTG に変異させ、RNA として機能を持たないだけでなく、タンパク質の翻訳も起こらないようにした変異体である。実際に TTG-SM は GFP competition assay では細胞生存に影響を与えないことを確認した。次に TTG 変異体の各領域を SM に置換した変異体群(図 2-6.A)を用いて、細胞生存率に対する影響を測定したところ、TTG-SM1 変異体において細胞生存率の上昇が認められなかったことから、*HBZ* のコーディング領域の初めの 207 塩基が *HBZ* RNA の活性に重要であることが明らかとなった。さらに詳細に変異体群(図 2-6.B)を作成し、GFP competition assay によって活性を測定したところ、TTG-SM1.1 において細胞生存率の上昇が認められなかったことから、*HBZ* RNA のコーディング領域の 5'側 50 塩基が *HBZ* RNA の活性に重要であることが示された。

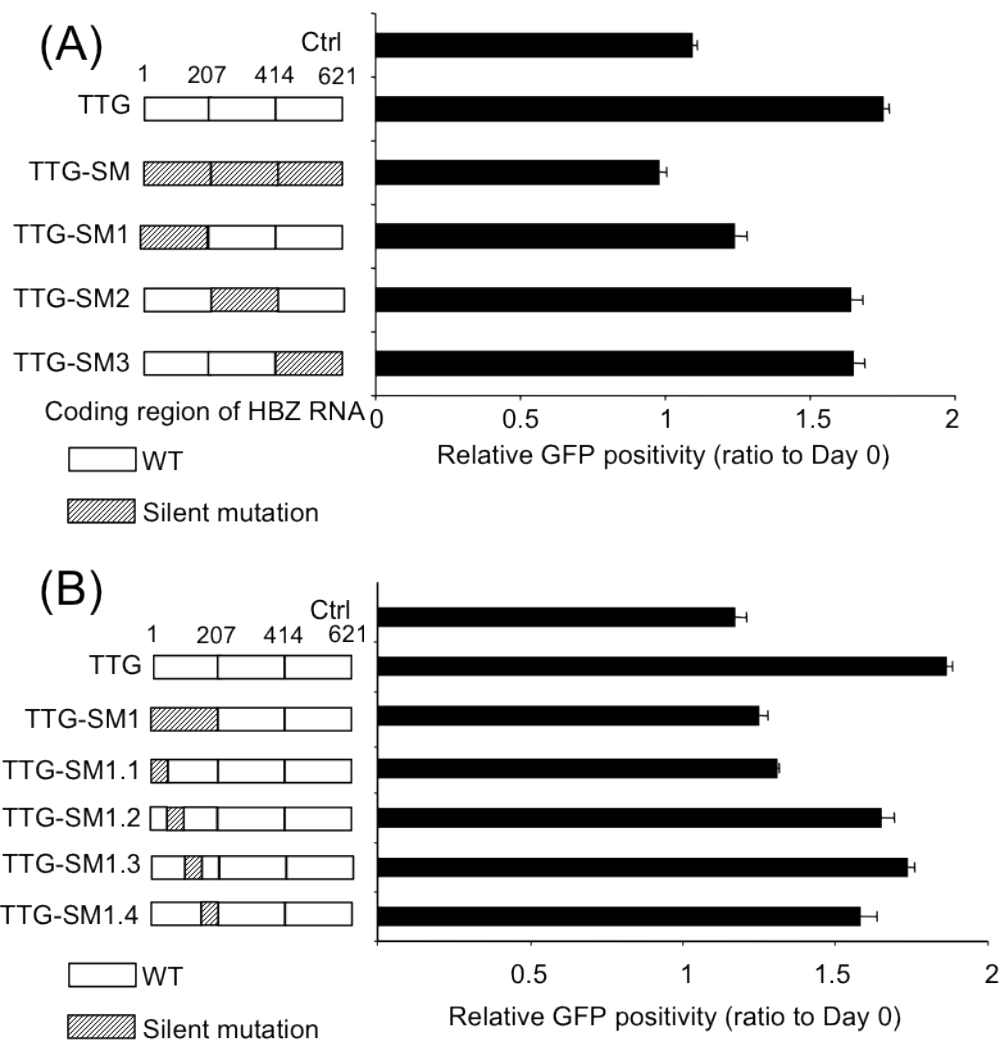


図 2-6. HBZ コーディング領域の初めの 50 塩基が *HBZ* RNA の機能に必要である
 (A) HBZ コーディング領域を 3 つにわけ、それぞれを Silent mutation に置き換えた変異体を用いて GFP competition assay の結果を示す。グラフのバーは Day0 の GFP 陽性率を 1 としたときの Day4 の GFP 陽性率の割合を示す。(B) HBZ コーディング領域の初めの 207 塩基の部分さらに 4 つにわけ、それぞれ Silent mutation に置き換えた変異体を用いて GFP competition assay の結果をしめす。グラフのバーは Day0 の GFP 陽性率を 1 としたときの Day4 の GFP 陽性率の割合を示す。

2-5. *usHBZ* RNA も *sHBZ* RNA と同様な機能をもつ

前項までの実験では spliced form HBZ (sHBZ)の機能を示してきたが、GFP competition assay の結果 *usHBZ* RNA も *sHBZ* RNA と同様に細胞の生存率を上昇させることが判明した。また *usHBZ* RNA 発現細胞はコントロールに比べ、Annexin V/ 7-AAD 陽性細胞数の低下、BrdU 取り込み能が増加していることから、*sHBZ* RNA と同様に細胞死を抑え、増殖能を亢進することが考えられた。

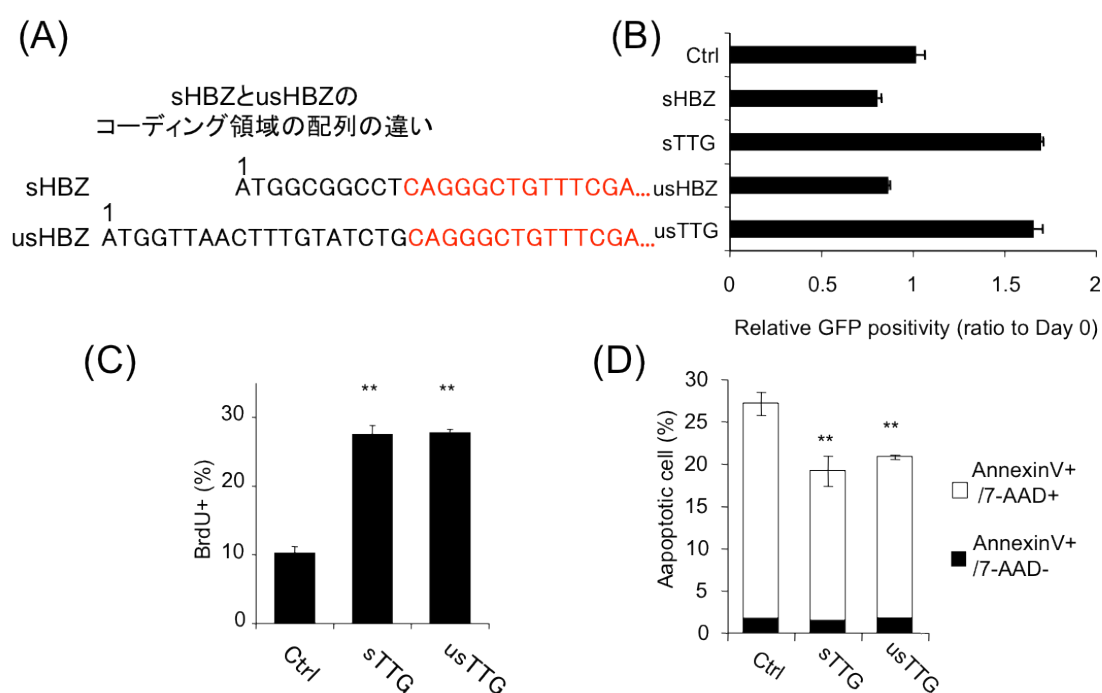


図 2-7. *usHBZ* RNA は細胞増殖を促進し、細胞死を抑制する

sHBZ と *usHBZ* の RNA 配列の相違点を示す。(B) *usHBZ*、*usTTG* を用いて GFP competition assay を行った結果を示す。グラフのバーは Day0 の GFP 陽性率を 1 としたときの Day4 の GFP 陽性率の割合を示す。(C、D) *usTTG* の細胞増殖(C)、細胞死(D)に対する影響を調べた結果を示す。**: P<0.01

2-6. *HBZ* RNA とタンパク質はそれぞれ異なるパスウェイに関与する

前項までの実験により *HBZ* RNA とタンパク質は細胞増殖、細胞死にそれぞれ影響を与え、細胞の生存率に相反する機能をもつことが明らかとなった。次に *HBZ* RNA とタンパク質がどのような遺伝子に影響を与えるかを明らかにするために、マイクロアレイを用い発現解析をおこなった。マウス由来 CD4 陽性 T 細胞に *HBZ*、もしくはその変異体をレトロウイルスベクターを利用して導入し 96 時間後にウイルス感染細胞をソーティングにより単離、RNA を回収し解析をおこなった。発現解析をおこなった結果、コントロールに比べ *HBZ* で 301 個、TTG で 326 個、SM で 104 個の遺伝子の発現が 2 倍以上に上昇し、*HBZ* で 266 個、TTG で 57 個、SM で 128 個の発現が半分以下に低下することが示された。これらの発現が変化した遺伝子の中で *HBZ*、TTG のみで変動があった遺伝子が *HBZ* タンパク質ではなく *HBZ* RNA により制御される遺伝子(上昇した遺伝子群 146 個、低下した遺伝子群 6 個、合計 152 遺伝子)と考えられた。

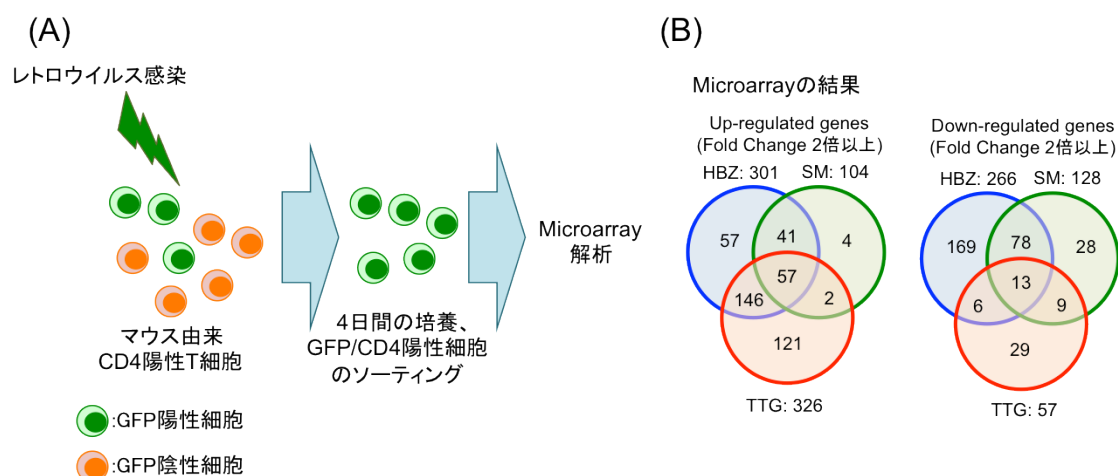


図 2-8. Microarray 解析

(A) Microarray 解析の概要を示す。マウス由来 CD4 陽性 T 細胞にレトロウイルスを利用して *HBZ*、もしくは *TTG*、*SM* を導入し 96 時間後に CD4 陽性、GFP 陽性細胞をソーティングし RNA を抽出、Microarray に用いた。(B) Microarray で得られた画像データを GeneSpring で解析し、各サンプルで Control に比べ発現が 2 倍以上変動した遺伝子群のまとめを示す。

上記の 152 個の遺伝子群から細胞死(*survivin*)、細胞増殖(*mcm5*、*cenph*、*aurkb*)に関わる遺伝子に注目し、*HBZ* RNA による発現上昇を定量的 PCR で確認した(図 2-9)。

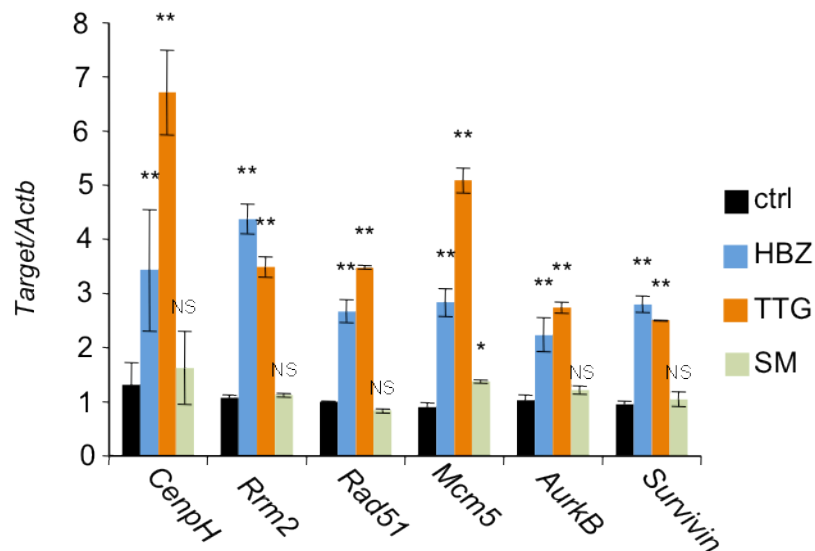


図 2-9 *HBZ* RNA 標的遺伝子の発現確認

HBZ RNA の標的遺伝子の発現を Real Time PCR 法で確認した結果を示す。

** : $P < 0.01$ 、* : $P < 0.05$ 、NS : not significant

以前に Kit225 細胞で *HBZ* RNA は細胞増殖を亢進することを明らかにしたが、今回マウス初代培養細胞を用いておこなったマイクロアレイより得られた *HBZ* RNA 標的遺伝子が Kit225 細胞を用いた実験系でも同様に *HBZ* RNA で上昇しているか確認した。その結果 Kit225-TTG でも Kit225-Ctrl に比べ同じ遺伝子の発現が上昇することが明らかとなり(図 2-10)、マウス初代細胞を用いた実験系で得られた知見が Kit225 細胞を用いた実験系でも確認することが出来た。

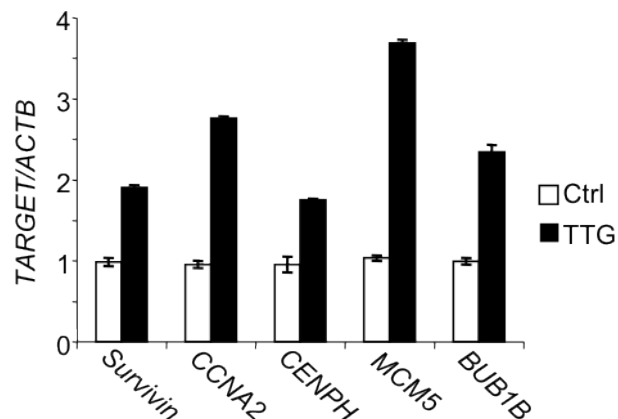


図 2-10. *HBZ* RNA 発現 Kit225 細胞におけるターゲット遺伝子の発現

Control ベクター、もしくは *HBZ* RNA を発現する Kit225 を IL-2(-)培地で 48 時間培養し RNA を抽出、cDNA を合成した。マウス細胞を用いた Microarray 解析で得られた *HBZ* RNA ターゲット遺伝子の発現を Real Time PCR 法を用いて確認した。

さらに *HBZ* RNA とタンパク質がどのようなシグナル伝達経路に関わっているか網羅的に調べるために、IPA を用いてパスウェイ解析を行った。それぞれのサンプル (*HBZ*, *TTG*, *SM*)でコントロールに比べ 2 倍以上変動があった遺伝子を解析対象として解析を行った。URA は、各サンプルで変動した遺伝子群がどのような上流因子(転写因子、サイトカイン、化学物質など)により制御されるか、その重複性をデータベースから調べる解析法である。Overlap p-value は解析対象遺伝子群が、データベース上にある上流因子の下流遺伝子とどれだけ重複しているかを示す値である。例えばある upstream regulator の overlap p-value の値が低い場合、*HBZ* とその因子は同じ下流遺伝子を制御することを示す。また同じ下流遺伝子を制御しているということは、*HBZ* がその上流因子の機能に何らかの影響を及ぼしている可能性を示唆する。Activation z-score は解析対象遺伝子と上流因子の下流遺伝子の相関の方向性を示す値である。例えばある上流因子が発現を上昇させる遺伝子群が *HBZ* でも上昇している場合は activation z-score は正の値、反対にある上流因子が発現を上昇させる遺伝子が *HBZ* によって低下する場合は activation z-score は負の値に傾く。すなわち activation z-score の値が正に傾けば、上流遺伝子と *HBZ* の下流遺伝子は正の相関、また負に傾けば負の相関をしていることを示している。また activation z-score が正の値で高ければ、*HBZ* はその上流因子の機能を増強しており、負の

値の場合機能を阻害している可能性が示唆される。

HBZ, TTG, SM でそれぞれ解析し overlap p-value の低い順に上流因子を並べた表を表 2-1 に示す。URA の結果、*HBZ* RNA は細胞増殖、細胞死に関わる上流因子、タンパク質は免疫に関わる転写因子である *Foxp3*、もしくはサイトカイン(IL-2, IL-4, IL-10, IL18)の機能に影響を与えていることが示された。また特に *HBZ* RNA は、Rb や p53 などの細胞の増殖を遅延させたり、細胞死を誘導する因子の機能を抑えている可能性が示唆された。以上の解析結果は *HBZ* RNA とタンパク質はそれぞれ別のシグナル伝達経路に影響を与えていることを示唆する。

HBZ top 10			TTG top 10			SM top 10		
Upstream Regulator	p-value of overlap	Activation z-score	Upstream Regulator	p-value of overlap	Activation z-score	Upstream Regulator	p-value of overlap	Activation z-score
dextran sulfate	3.77E-36	0.672	E2F4	7.35E-59	-	FOXP3	8.48E-11	-1.300
E2F4	8.27E-31	-	dextran sulfate	1.35E-49	0.152	IL2	9.95E-10	0.649
GM-CSF	9.99E-31	6.679	CDKN1A	1.94E-47	-3.256	IL4	1.33E-9	-0.438
CDKN1A	2.12E-28	-2.932	GM-CSF	9.36E-42	6.555	BTNL2	1.26E-8	-0.333
calcitriol	9.28E-25	-4.509	TP53	1.50E-38	-3.404	IL13	1.61E-7	-1.201
YY1	2.14E-24	-1.502	calcitriol	6.24E-38	-5.821	Cg	2.12E-7	-1.178
TP53	1.80E-19	-3.139	E2F1	7.23E-37	5.446	IGF1	3.74E-7	2.626
RB1	1.69E-17	-3.696	TBX2	2.32E-35	4.949	IL18	3.77E-7	1.050
IRGM	5.40E-17	-3.988	YY1	2.68E-33	-2.216	IL10	8.41E-7	-1.033
FOXM1	3.19E-16	3.380	RB1	3.26E-33	-4.511	Epigallocatechin-gallate	9.08E-7	-1.037

表 2-1 Upstream Regulator 解析の結果

2-7. *HBZ* RNA は *survivin* を含む標的遺伝子のプロモーター活性を亢進する

前項で *HBZ* RNA の標的遺伝子がマイクロアレイ解析で明らかとなったが、*HBZ* RNA がこれら標的遺伝子の転写を直接活性化するか検討するため、各遺伝子のプロモーターをクローニングし、U2OS 細胞にてプロモーターアッセイを行った。その結果 TTG 変異体は各種プロモーターの活性を上昇させることを明らかにした(図 2-11)。

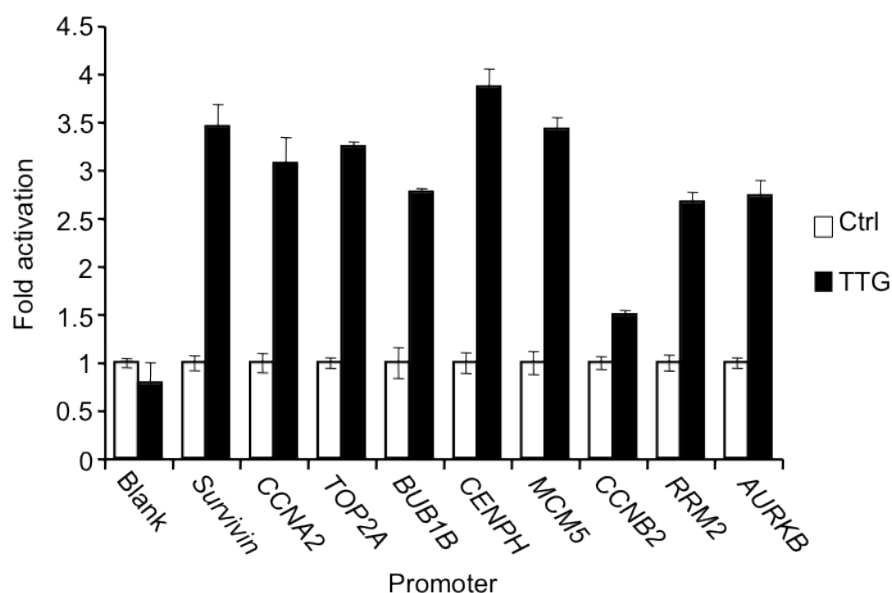


図 2-11. *HBZ* RNA はターゲット遺伝子のプロモーター活性を上昇させる

Microarray 解析で明らかとなった *HBZ* RNA ターゲット遺伝子のプロモーターをクローニングし *Firefly* Luciferase Vector に導入した。U2OS 細胞を 24well plate に 3×10^4 細胞/well ずつ播種し、24 時間後に作成した各 *Firefly* Luciferase ベクター、*HBZ* RNA 発現ベクター(バックボーンベクター: pMX-IG ベクター)、*Renilla* Luciferase ベクターを導入した。遺伝子導入より 24 時間後、細胞を回収し、各種 Luciferase 活性値を測定することで *HBZ* RNA の各プロモーターに対する影響を調べた。*Firefly* Luciferase 活性値を *Renilla* Luciferase 活性値で割った値を Luciferase 活性値とし、各 Control の Luciferase 活性値を 1 としたときの TTG の値を Fold activation として示す。

Survivin は IAP ファミリーのメンバーで caspase に直接結合することでその機能を抑え、細胞死を抑えることが明らかとなっている(Altieri, 2008)ことから、TTG がプロモーターを上昇される遺伝子群の中から *survivin* に着目した。既に ATL 症例では健常人に比べ、*survivin* の発現が上昇していることが報告されており(Che et al., 2006; Kamihira et al., 2001)、我々も ATL の発現データベース(GEO database, accession number: GSE33615)を用い ATL 症例では健常人に比べ *survivin* の発現が上昇していることを確認した。

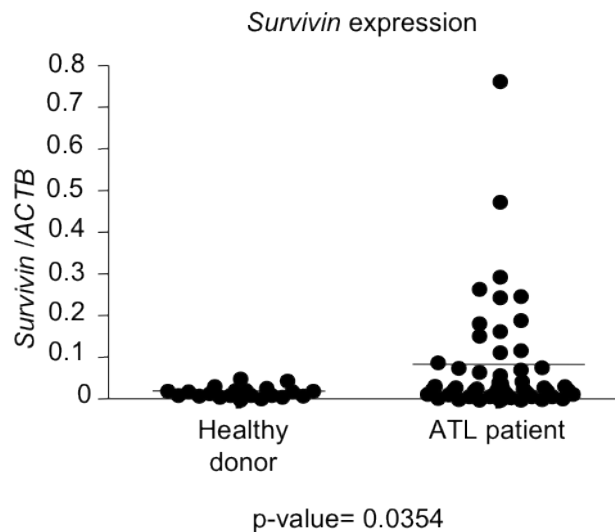


図 2-12. *survivin* の ATL 患者症例での発現

データベース(GSE33615)にある ATL 患者の Microarray 解析の結果より *survivin* の発現を調べた結果を示す。

ATL 症例で *survivin* の発現が亢進している機序として Tax による NF- κ B 経路活性化が報告されているが、先にも述べたように ATL 症例では Tax を発現していない症例もあるため、他のウイルス因子が *survivin* の発現上昇に寄与している可能性がある。

我々は次にクローニングした *survivin* プロモーター(-1957bp~+34bp)のうちどの領域が *HBZ* RNA による活性化に重要であるか解析するため、*survivin* プロモーターの長さを削ったコンストラクトを作成した(図 2-13)。それぞれの長さのプロモーターに対する *HBZ* RNA の影響を調べたところ、少なくとも-84bp から+34bp の部分に *HBZ* RNA に反応する領域があることが明らかとなった。

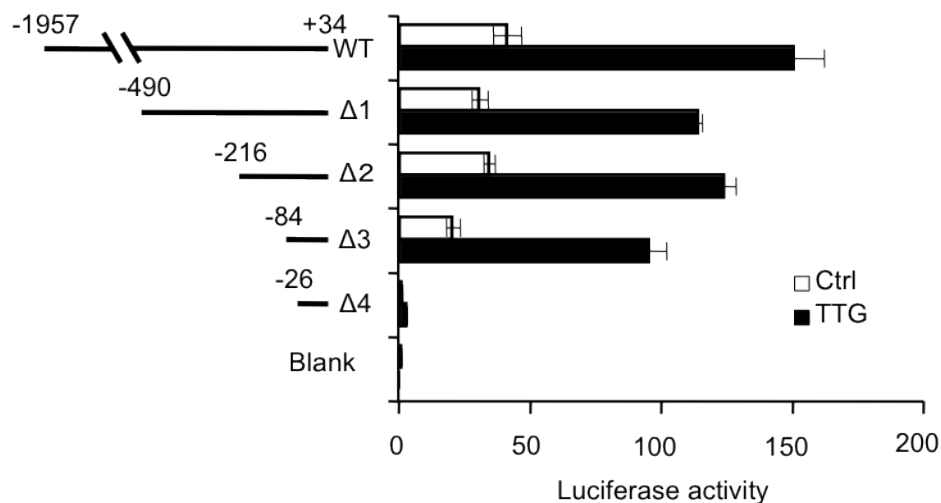


図 2-13. *survivin* プロモーターの各種欠失変異体に対する *HBZ* RNA の影響

クローニングした *survivin* プロモーターを鋳型に各長さのプロモーターを作成し *Firefly* Luciferase ベクターに導入した。U2OS 細胞を 24well plate に 3×10^4 細胞/well ずつ播種し、24 時間後に作成した各 *Firefly* Luciferase ベクター、*HBZ* RNA 発現ベクター (バックボーンベクター: pMX-IG ベクター)、*Renilla* Luciferase ベクターを導入した。遺伝子導入より 24 時間後、細胞を回収し、各種 Luciferase 活性値を測定することで *HBZ* RNA の各プロモーターに対する影響を調べた。*Firefly* Luciferase 活性値を *Renilla* Luciferase 活性値で割った値を Luciferase 活性値とした。

この領域には p53 結合配列(Hoffman et al., 2002), SP-1 結合配列(Li and Altieri, 1999), CDE/CHE (Li and Altieri, 1999)が存在することが報告されており、これらの配列を欠失したプロモーターを作成し、*HBZ* RNA の活性を調べたが *HBZ* RNA は以上の配列を欠失したプロモーターの活性も上昇させることから、これらの配列に非依存的に *survivin* プロモーターを活性化すると考えられた。

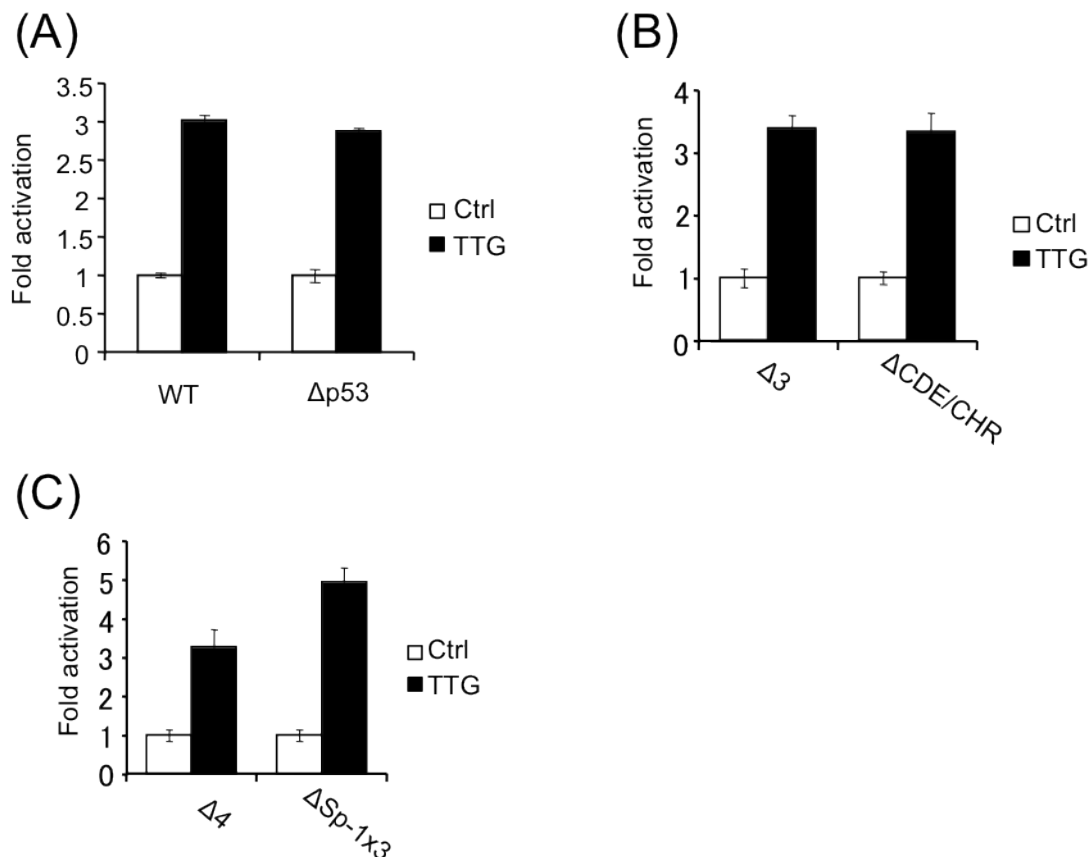


図 2-14. *survivin* プロモーターの各転写結合サイトの欠失変異体に対する HBZ RNA の作用

Survivin プロモーターから各転写因子結合サイトを欠失させたプロモーターを作成し Firefly Luciferase ベクターに導入した。U2OS 細胞を 24well plate に 3×10^4 細胞/well ずつ播種し、24 時間後に作成した各 Firefly Luciferase ベクター、HBZ RNA 発現ベクター(バックボーンベクター: pMX-IG ベクター)、Renilla Luciferase ベクターを導入した。遺伝子導入より 24 時間後、細胞を回収し、各種 Luciferase 活性値を測定することで HBZ RNA の各プロモーターに対する影響を調べた。Firefly Luciferase 活性値を Renilla Luciferase 活性値で割った値を Luciferase 活性値とし、各 Control の Luciferase 活性値を 1 としたときの TTG の値を Fold activation として示す。

また *survivin* の発現に RNA 結合タンパク質である ILF-3, p54nrb, TLS(Du et al., 2011; Yamauchi et al., 2012)が関与していることが報告されており、*HBZ* RNA がこれらのタンパク質の機能に影響を与えている可能性を検討するため、これらの因子のノックダウン条件下で *HBZ* RNA が *survivin* プロモーターを活性化するか調べた。siRNA によるノックダウン効率を確認し(図 2-15. A、C、E)、各条件下で *HBZ* RNA の *survivin* プロモーターに対する影響を調べたところ、negative control の siRNA 導入細胞と同様に目的遺伝子をノックダウンした細胞でも *HBZ* RNA は *survivin* プロモーター活性を上昇させたことからこれらの因子に非依存的に活性化すると考えられた(図 2-15. B、D、F)。

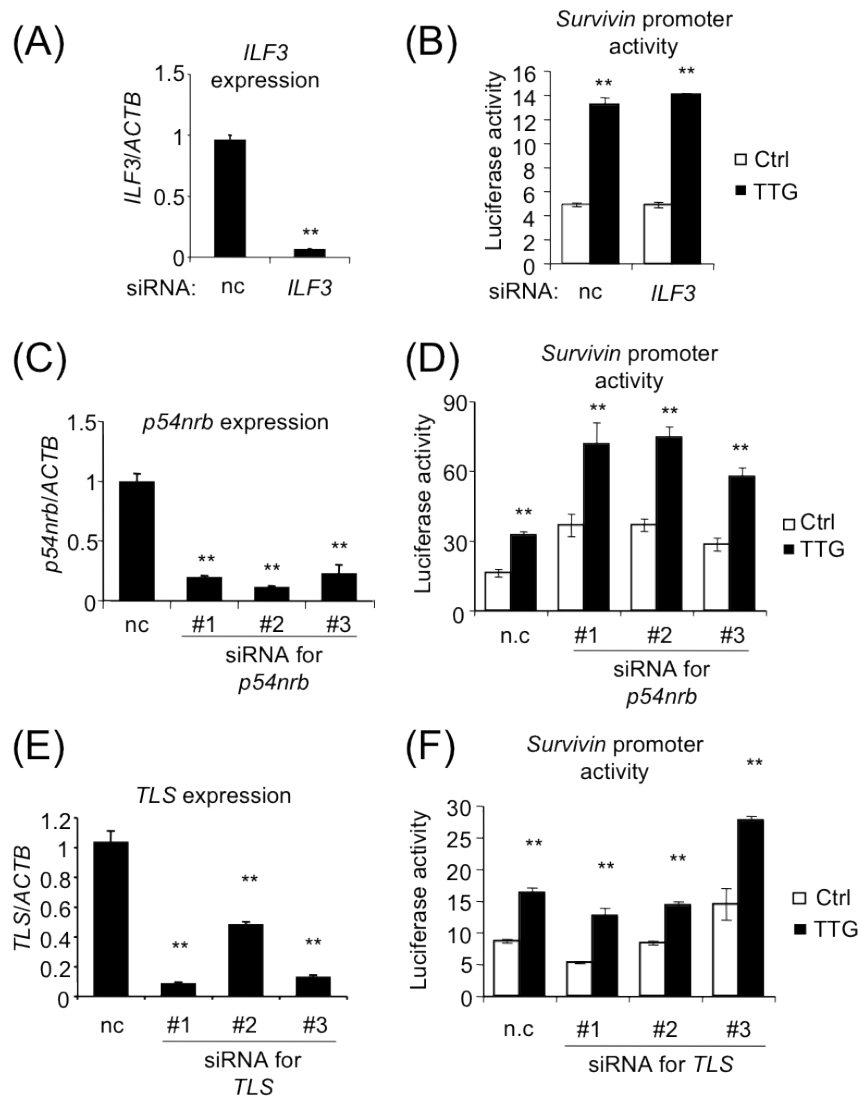


図 2-15. *HBZ* RNA は ILF3, p54nrb, TLS 非依存的に *survivin* プロモーター活性を上昇

させる。

U2OS 細胞を 24well plate に 3×10^4 細胞/well ずつ播種し、24 時間後に各 siRNA を導入した。さらに 24 時間後に *survivin* プロモーターベクター、*HBZ* RNA 発現ベクター (バックボーンベクター: pMX-IG ベクター)、*Renilla* Luciferase ベクターを導入し 24 時間後、細胞を回収し、各種 Luciferase 活性値を測定することで *HBZ* RNA の各 siRNA 存在下での *survivin* プロモーターに対する影響を調べた。Firefly Luciferase 活性値を *Renilla* Luciferase 活性値で割った値を Luciferase 活性値とした。** ; $P < 0.01$

2-8. YM155 は *HBZ* RNA 発現細胞に強力な毒性を持つ

YM155 は *survivin* のプロモーター活性を阻害する化合物である(Nakahara et al., 2007)。YM155 は *survivin* プロモーター活性を阻害することで *survivin* の転写を抑制し、細胞死を引き起こす(Cheng et al., 2014; Nakamura et al., 2012)。我々は以前の研究で HBZ、もしくは TTG を発現する Kit225 はコントロールベクターを発現する細胞に比べ増殖が亢進することことを示した。そこで YM155 の *HBZ* RNA による増殖亢進に及ぼす影響を解析し、HBZ 発現 Kit225 では 8nM, TTG 発現 Kit225 では 32nM で有意に増殖を抑えることが明らかとなった(図 2-16. A,B)。

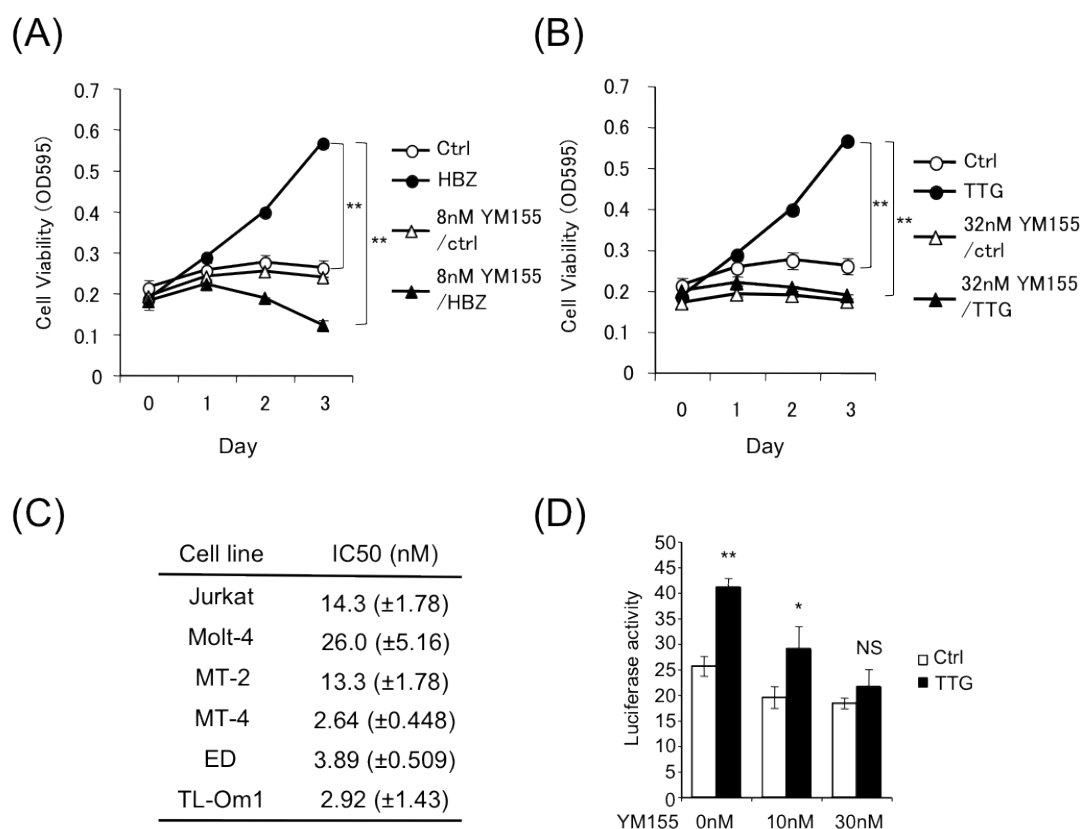


図 2-16. YM155 の *HBZ* RNA 発現細胞、ATL 細胞株への影響

(A,B) HBZ、もしくは TTG 発現 Kit225 細胞を IL-2(-)条件下で 48 時間培養した後、5unit/mL の IL-2、各濃度の YM155 存在下で培養し Cell Viability を MTT を用いて測定した。(B)各細胞株を 96well plate に 10^4 細胞/well で播種し各濃度の YM155 存在下で培養した。48 時間培養した後 MTT 活性を測定し、YM155 未添加に比べ生育を 50%抑制する YM155 の濃度を各細胞にて求めた。(C) U2OS 細胞を 24well plate に

3x10⁴ 細胞/well ずつ播種し、24 時間後に作成した *survivin* プロモーターベクター、*HBZ* RNA 発現ベクター(バックボーンベクター: pMX-IG ベクター)、*Renilla* Luciferase ベクターを導入した。遺伝子導入より 3 時間後に核終濃度になるよう YM155 を添加し、さらに 21 時間後細胞を回収し、各種 Luciferase 活性値を測定した。*Firefly* Luciferase 活性値を *Renilla* Luciferase 活性値で割った値を Luciferase 活性値とした。 ** : P<0.01、* : P<0.05、NS : not significant

また HTLV-1 感染 T 細胞株 (MT-2、MT-4、ED、TL-Om1) に対する YM155 の毒性を調べた所、非感染 T 細胞株 (Jurkat、Molt-4) に比べ、強力に感染細胞株の増殖を抑制することが示された。最後に YM155 は *HBZ* RNA によって活性化された *survivin* プロモーター活性を量依存的に低下させることが明らかとなり、以上の結果より YM155 が *HBZ* RNA 発現細胞、HTLV-1 感染 T 細胞に対し強力な抑制作用を有することが明らかとなった。

第三章 考察

本研究によって同じ遺伝子にコードされる *HBZ* RNA とタンパク質はそれぞれ細胞死、増殖に影響を与え、細胞の生存率に対しては相反する効果を持っていることが明らかとなった。これまでに様々なウイルス由来の *microRNA*, *long non coding RNA* がウイルスの増幅、病態形成に関わっていることが報告されている(Iwakiri, 2014; Ouellet and Provost, 2010; Samanta et al., 2008)。また少数ながら宿主由来のタンパク質をコードする mRNA が機能を有しているという報告も存在する(Candeias et al., 2008; Gajjar et al., 2012; Kumar et al., 2014; Masuda et al., 2008)。p53 タンパク質は Mdm2 によって分解が促進されるが、p53 mRNA は Mdm2 に結合しその機能を抑えることが知られている(Candeias et al., 2008; Gajjar et al., 2012)。また非小細胞性肺がんが発現が上昇している *Hmga2* は、コードされる mRNA が *microRNA* の let-7 と結合することで let-7 の他の標的である *Tgfbr3* mRNA の分解を阻害し、がんの進行を促進することが知られている(Kumar et al., 2014)。HTLV-1 のプロウイルスは約 9kB と宿主に比べかなり限られた genome サイズをもち、コードされる制御遺伝子、アクセサリ遺伝子のタンパク質だけでなく RNA も利用して巧みに病態形成に関わっていることが強く示唆された。

また *microarray* の発現解析をもとにしたパスウェイ解析では *HBZ* RNA とタンパク質がそれぞれ異なる経路に影響を与えていることが明らかとなった。*HBZ* RNA は細胞増殖や細胞死に関与する遺伝子群に影響を与える一方、*HBZ* タンパク質は *Foxp3* や *IL-4* などの免疫に関わる遺伝子群に影響を与えていることが示唆されたが、先行論文で *HBZ* タンパク質が *Foxp3* の発現に関わる *Smad 2/3* に結合し *Foxp3* の発現を亢進することが明らかとなっている(Zhao et al., 2011)。また *HBZ* タンパク質は *Foxp3* と結合しその機能を抑えていることも報告されており、*HBZ* タンパク質は複雑に *Foxp3* の発現、機能を制御していると考えられる。また *HBZ* トランスジェニックマウスでは Th-1 サイトカインの産出が抑えられ、リステリア菌や *HSV-2* の抵抗性が弱まっていることが報告されており(Sugata et al., 2012)、*HBZ* タンパク質が HTLV-1 による免疫能障害に強く寄与していることを示唆する。

また本研究では HBZ タンパク質が細胞増殖を促進すると共に細胞死を誘発するという結果をえた。HBZ が OncomiR として知られる microRNA-17 と microRNA-21 の発現を亢進することで、細胞増殖の亢進とともにゲノムの不安定性を引き起こすという報告があり(Vernin et al., 2014)、HBZ タンパク質が細胞死を誘導している可能性も示唆される。がん原遺伝子として知られる E2F1、c-Myc は細胞増殖を促す一方、DNA ダメージの誘発や、p53、p73 の活性、発現を亢進することで細胞死を誘導することが報告されており(Hoffman and Liebermann, 2008; Stanelle and Putzer, 2006)、これは異常ながん原遺伝子の活性化による発がんを防ぐ機構だと考えられている。以前の報告で他の HTLV-1 由来の RNA に比べ、HBZ RNA は核内にとどまりやすい性質を持っていることが明らかとなっており(Rende et al., 2011)、この現象は HBZ タンパク質への翻訳を一部阻害し、HBZ タンパク質による細胞毒性が出にくくなっている可能性を示唆する。

Survivin は細胞死を抑制する因子として知られており、肺がん、直腸がん、膵臓がんなどの様々ながんで発現が上昇していることが知られており(Hernandez et al., 2011; Kami et al., 2004; Kapellos et al., 2013; Ryan et al., 2006)、さまざまながんで重要性が報告されている。また HTLV-1 以外にも KSHV にコードされる遺伝子である Latency-associated nuclear antigen が *survivin* のプロモーター活性を亢進することで発現を上昇させることも報告されており(Lu et al., 2009)、*survivin* は HTLV-1 を含めたがんウイルスの標的遺伝子になっていることを示唆する。本研究では *survivin* 阻害剤として知られる YM155 が ATL 細胞株の増殖を強力に抑制することを明らかにした。本研究で用いた ED、TL-Om1 細胞は Tax を発現しない細胞株にも関わらず YM155 に対して強い感受性を持つことから HBZ RNA による *survivin* の発現亢進が ATL 発症に重要なひとつの因子であることが示唆され、また YM155 を含む *survivin* 阻害剤が新規の ATL に対する分子標的療法となりうる可能性を示している。

HBZ RNA が *survivin* プロモーター活性を上昇させることを明らかにしたが、本研究では HBZ RNA がどのようにして *survivin* プロモーター活性を上昇させるか、その詳細なメカニズムは解明するには至らなかった。*survivin* の発現にはいくつかの RNA 結合タンパク質(ILF-3, p54nrb, TLS)が関与していることが

報告されている(Du et al., 2011; Yamauchi et al., 2012)が、*HBZ* RNA はこれらのタンパク質のノックダウンした条件下でも *survivin* プロモーター活性を上昇させることから、これらの因子非依存的に働いていることが分かる。がん細胞における *survivin* の転写制御にはまだ不明な点が多くあると予想され、今後の研究が期待される。

第四章 実験材料と方法

4-1. マウスと細胞株

C57BL/6J マウスは CLEA Japan から購入した。U2OS 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS)を含む DMEM 培地で培養した。293FT 細胞は Life Technologies 社から購入し、10% FBS, G418 (終濃度 $500 \mu\text{g/mL}$)存在下で培養した。レトロウイルスパッケージング細胞である Platinum-E 細胞は 10% FBS, Blastcidin (終濃度 $10 \mu\text{g/mL}$), puromycin (終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$)存在下で培養した。T 細胞株である MT-2, MT-4, TL-Om1, ED, Jurkat, Molt4 細胞は 10% FBS を含む RPMI-1640 培地で培養した。Kit225 細胞株にコントロールベクター (pME18S neo)、もしくは HBZ, TTG 発現ベクターを定常発現させた株 (Kit225-ctrl, Kit225-HBZ, Kit225-TTG)は 10% FBS, G418 (終濃度 $500 \mu\text{g/mL}$), リコンビナント IL-2 (終濃度 50U/mL)を含む RPMI-1640 培地で培養した。全ての細胞は 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 存在下で培養した。

4-2. プラスミド

Survivin 他のプロモーターは表 4-1 に示したプライマーを用いて増幅、もしくは変異を導入し、Luciferease vector である pGL4.10 ベクターに導入した。TTG,SM (silent mutant), SM1, SM2, SM3 コンストラクトは以前の論文で使用されたものを用いた(Satou et al., 2006)。TTG-SM1-3 は SM もしくは SM1-3 コンストラクトのスタートコドンである ATG を TTG に置き換えた。TTG-SM1.1-1.4 は TTG のコーディング領域のそれぞれの部分(TTG-SM1.1: 1-50bp, 1.2: 51-100bp, 1.3: 101-150bp, 1.4: 151-207bp)を silent mutation に置き換えた変異体である。それぞれのコンストラクトはレトロウイルスベクターである pMX-IG、もしくは pGCsamIN ベクターに導入した。

4-3. ウイルス感染

Platinum-E 細胞に各レトロウイルスベクターを Lipofectamin LTX (Life Technologies)を用いて導入し、48 時間後にウイルスを含む上清を回収した。マウス CD4 陽性 T 細胞は CD4 enrichment kit (BD Pharmingen)を用いてマウス脾臓から単離した。また脾臓細胞から T 細胞を除き 20Gy の X 線で不活性化

した細胞を抗原提示細胞とし、抗 CD3 抗体(終濃度 $0.5 \mu\text{g/mL}$)と共に単離した CD4 陽性 T 細胞を培養した。24 時間培養した後、ウイルス液と polybrene (終濃度 4mg/mL)を加え、室温で 1 時間、 $1000g$ にて遠心操作を行った。

4-4. GFP competition assay

マウス CD4 陽性 T 細胞にウイルスを感染させ 48 時間後、細胞の一部を回収し生細胞中の GFP 陽性率を FACS Verse(BD Pharmingen)にて測定した(Day0)。残りの細胞を PBS(-)で洗浄し、IL-2 (終濃度 50U/mL)を含む RPMI-1640 培地で培養した。培養から 48 時間後に、半分の細胞を継代し更に 48 時間後に GFP 陽性率を測定した(Day4)。

4-5. BrdU 取り込み実験

マウス CD4 陽性 T 細胞に pGCsamIN ベクターを用いて産生させたウイルスを感染させ 48 時間後、細胞を回収し FITC BrdU Flow Kit (BD Pharmingen)を利用し、ウイルス感染細胞での BrdU 取り込み能を FACS Verse(BD Pharmingen)にて測定した。

4-6. Annexin V/7-AAD 染色

レトロウイルス感染から 48 時間後、細胞を回収しウイルス感染細胞中の死細胞を Annexin V (Biolengend)、7-AAD (BD Pharmingen)を用いて測定した。またウイルス感染から 48 時間後、細胞を PBS(-)で洗い、IL-2 を含む培地でさらに 48 時間培養し、死細胞の割合を同様の方法で測定した。

4-7. マイクロアレイ解析

レトロウイルス感染から 48 時間培養後、細胞を PBS(-)で洗浄し IL-2 を含む新しいメディウムでさらに 48 時間培養した。CD4 陽性 GFP 陽性細胞を FACS Aria2 (BD Pharmingen)にて単離し RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出した。Cy3 でラベルした cRNA の合成、チップへのハイブリダイゼーションは Low Input Quick Amp WT Labeling Kit (Agilent)のプロトコルを参照し行った。マイクロアレイ画像を取り込み、発現データを GeneSpring GX (Agilent Technologies)、パスウェイ解析を Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems)を用いて解析した。

4-8. ルシフェレースアッセイ

U2OS 細胞を 24well plate に 1 ウェルあたり 4000 細胞を播種し、24 時間後に各ウェルあたりに Firefly reporter vector を 100ng, 発現ベクターを 400ng, Renilla reporter vector を 10ng を Transit (Mirus Bio)を用いて導入した。各ベクター導入から 24 時間後、細胞を回収し、Passive Lysis Buffer を用いて溶解し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)の protocols に従い、Reporter 活性を測定した。Firefly luciferase の値を Renilla luciferase で補正した値を Luciferase activity とした。

4-9. Immunoblotting 解析

293FT 細胞に HBZ もしくはその変異体を発現する pMX-IG ベクターを Lipofectamin 2000 (Life Technologies)を用いて導入した。ベクター導入から 48 時間後、細胞を回収し RIPA Buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 1% Triton X-100, 100mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, protease inhibitor)にて細胞を溶解し、遠心分離し上清を回収した。上清をサンプルバッファーと共に Boil し 5%-20%プレキャストゲルでタンパク質を分離し、セミドライ法で PVDF メンブレンにタンパク質を転写した。

4-10. RNA の発現解析

Total RNA を Trizol (Life Technologies)、もしくは RNeasy mini kit (QIAGEN)を用いて付属プロトコルに従って抽出した。1 μ g の RNA を Rever Tra Ace (TOYOBO)を用いて逆転写し cDNA を合成した。定量性 PCR は FastStart Universal SYBR Green Master Mix (Roche)を用い、StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)にて RNA の発現量を定量した。使用したプライマーは表 4-2 に示す。

4-11. MTT アッセイ

細胞の生存性は 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-dephenyltetrazolium bromide (MTT)を用いて測定した。各細胞を 96 ウェルプレートの各ウェルに 2000 細胞 /200 μ L ずつ播種し、各濃度の YM155 を加えた。48 時間培養した後、20 μ L の MTT 溶解液を加え、37°Cインキュベーターで 2 時間インキュベートし、Lysis Buffer (4% Triton X-100, 0.14% HCl in 2-propanol)にて細胞を溶解した。

595nm での吸光度は TriSter LB 941 multimode microplate reader(BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG, Germany)にて測定した。IC₅₀ は YM155 未添加の細胞に比べ生存性が 50%になるような YM155 の濃度を示す。

表 4-1. プロモーターのクローニング、変異導入に用いたプライマー

Promoter cloning	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
<i>Survivin</i>	cgcaCTCGAGtggtgcgtccttggtctgtg	cgcaAGATCTgggccgcgattcaaatctg
<i>Survivin</i> Δ1	cgcaCTCGAGgagttttgctcttggcct	
<i>Survivin</i> Δ2	cgcaCTCGAGgcctgcacgcgttcttgaa	
<i>Survivin</i> Δ3	cgcaCTCGAGccccgcgcgccccgcctcta	
<i>Survivin</i> Δ4	cgcaCTCGAGcgtgcgtccccgacatgcc	
<i>TOP2A</i>	cgcaCTCGAGtatctcttgaggtggcctcg	cgcaAGATCTgacggctgtaaggggctca
<i>AURKB</i>	AGATCTaaagaaggaagtgtggcaggaagga	AGATCTccttagagagaagggggaggagag
<i>BUB1B</i>	AGATCTagccctgaatccactatccccagtg	AGATCTgtcctgctgcaggccttctctggg
<i>CCNA2</i>	gcagaaatagtgatgccatcttag	catgAGATCTcactgctccgggagtgga
<i>CCNB2</i>	AGATCTggtattaactgcattcttcgatg	AGATCTgagggacggggaaggcaagagtgcc
<i>RRM2</i>	catgCTCGAGtaacagccctgagcgcagct	catgAGATCTagtggaggcgcagcgaagca
<i>MCM5</i>	cgcaCTCGAGatgggcacctggaccaatc	cgcaAGATCTgacaagaacctccacgtca
<i>CENPH</i>	cgcaCTCGAGcactcactacagctaaga	cgcaAGATCTtgctggttgaggggaaaggc

mutagenesis in Survivin promoter	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
p53 del	gcctaagacgcggcgcgccattaacc	cgccgcgtcttagcggtccacccc
cde/chr del	ccattaaccgcgggaccagatctggc	tcccgcggttaatggcgcgccgcgg
sp1/del	gggggtgagagggcgtgcgctcccg	cgcctctcacccccgcggccttct
sp1/del-2	gggggtgagccccgacatgccccgcggc	tgctgggctcacccccgcggcctt

*Capital letters indicate restriction enzyme site

表 4-2. HBZ RNA の検出、Real Time PCR に用いたプライマー

HBZ RNA detection	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
<i>HBZ</i>	agggctgtttcgatgcttgc	ctgccgatcacgatgcgttt
<i>GAPDH</i>	ctggcgtcttcaccaccatgg	atcacgccacagttcccgg

Real time PCR in human samples	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
<i>Survivin</i>	tcaaggaccaccgcactctt	ccagctccttgaagcagaag
<i>CCNA2</i>	cgctggcgggtactgaagtc	gaggaacgggtgacatgctcat
<i>CENPH</i>	tggacagtatggaaaactcagag	catgtcaacattcttctcaagctg
<i>MCM5</i>	agcattcgtagcctgaagtcg	cggcactggatagagatgcg
<i>BUB1B</i>	aaatgacctctggatgtttgg	gcataaacgccctaatttaagcc
<i>ACTB</i>	ccaactgggacgacatggag	gaaggctcacaacatgatctg
<i>HBZ</i>	atggcggcctcagggtgtt	tggaggggccccgtcgag

Real time PCR in mouse samples	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
<i>Cenph</i>	ttgcacttcgggataacatgg	ctgacatcaagcagctttttctc
<i>Rrm2</i>	tggctgacaaggagaacacg	aggcgctttactttccagctc
<i>Rad51</i>	aagttttggccacagcctattt	cgggtgcataagcaacagcc
<i>Mcm5</i>	cagaggcgattcaaggagttc	cgatccagtattcaccaggt
<i>AurkB</i>	cagaaggagaacgcctaccc	gagagcaagcgcatgctc
<i>Survivin</i>	ctaccgagaacgagcctgatt	agccttccaattccttaagcag

表 4-3. 本研究に用いた siRNA

Supplementary Figure 5		Sense (5' to 3')	Antisense (5' to 3')
negative control		cggcugcaaucgauugauagc	aagccgacguuagcuaacuau
<i>ILF3</i>		gcggauccgacuaacaacuacg	cccgccuaggcugauguugau
<i>TLS</i>	#1	cggacauggccucaaacgauu	ucguuugaggccauguccgcg
	#2	uuccaaauccugaucacccaa	gggugaucaggaaauuggaagg
	#3	gacuauguaauuguaacuaua	uaguuacaauuacauaguccg

参考文献

Altieri, D.C. (2008). Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nature reviews Cancer* 8, 61-70.

Basbous, J., Arpin, C., Gaudray, G., Piechaczyk, M., Devaux, C., and Mesnard, J.M. (2003). The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry* 278, 43620-43627.

Candeias, M.M., Malbert-Colas, L., Powell, D.J., Daskalogianni, C., Maslon, M.M., Naski, N., Bourougaa, K., Calvo, F., and Fahraeus, R. (2008). P53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nature cell biology* 10, 1098-1105.

Che, X.F., Zheng, C.L., Owatari, S., Mutoh, M., Gotanda, T., Jeung, H.C., Furukawa, T., Ikeda, R., Yamamoto, M., Haraguchi, M., *et al.* (2006). Overexpression of survivin in primary ATL cells and sodium arsenite induces apoptosis by down-regulating survivin expression in ATL cell lines. *Blood* 107, 4880-4887.

Cheng, S.M., Chang, Y.C., Liu, C.Y., Lee, J.Y., Chan, H.H., Kuo, C.W., Lin, K.Y., Tsai, S.L., Chen, S.H., Li, C.F., *et al.* (2014). YM155 down-regulates survivin and XIAP, modulates autophagy and induces autophagy-dependent DNA damage in breast cancer cells. *British journal of pharmacology*.

Du, K., Arai, S., Kawamura, T., Matsushita, A., and Kurokawa, R. (2011). TLS and PRMT1 synergistically coactivate transcription at the survivin promoter through TLS arginine methylation. *Biochemical and biophysical research communications* 404, 991-996.

Gajjar, M., Candeias, M.M., Malbert-Colas, L., Mazars, A., Fujita, J., Olivares-Illana, V., and Fahraeus, R. (2012). The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls Mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following DNA damage. *Cancer cell* 21, 25-35.

Gaudray, G., Gachon, F., Basbous, J., Biard-Piechaczyk, M., Devaux, C., and Mesnard, J.M. (2002). The Complementary Strand of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 RNA Genome Encodes a bZIP Transcription Factor That Down-Regulates Viral Transcription. *Journal of virology* 76, 12813-12822.

Geisler, S., and Coller, J. (2013). RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 699-712.

Gessain, A., Barin, F., Vernant, J.C., Gout, O., Maurs, L., Calender, A., and de The, G. (1985). Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet (London, England)* 2, 407-410.

Grossman, W.J., Kimata, J.T., Wong, F.H., Zutter, M., Ley, T.J., and Ratner, L. (1995). Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 1057-1061.

Hernandez, J.M., Farma, J.M., Coppola, D., Hakam, A., Fulp, W.J., Chen, D.T., Siegel, E.M., Yeatman, T.J., and Shibata, D. (2011). Expression of the antiapoptotic protein survivin in colon cancer. *Clinical colorectal cancer* 10, 188-193.

Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M., Nakai, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K.I., Shirakawa, S., and Miyoshi, I. (1981). Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *78*, 6476-6480.

Hoffman, B., and Liebermann, D.A. (2008). Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* *27*, 6462-6472.

Hoffman, W.H., Biade, S., Zilfou, J.T., Chen, J., and Murphy, M. (2002). Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *The Journal of biological chemistry* *277*, 3247-3257.

Igakura, T., Stinchcombe, J.C., Goon, P.K., Taylor, G.P., Weber, J.N., Griffiths, G.M., Tanaka, Y., Osame, M., and Bangham, C.R. (2003). Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* *299*, 1713-1716.

Iwakiri, D. (2014). Epstein-Barr Virus-Encoded RNAs: Key Molecules in Viral Pathogenesis. *Cancers* *6*, 1615-1630.

Jeang, K.T., Chiu, R., Santos, E., and Kim, S.J. (1991). Induction of the HTLV-I LTR by Jun occurs through the Tax-responsive 21-bp elements. *Virology* *181*, 218-227.

Kami, K., Doi, R., Koizumi, M., Toyoda, E., Mori, T., Ito, D., Fujimoto, K., Wada, M., Miyatake, S., and Imamura, M. (2004). Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients. *Surgery* *136*, 443-448.

Kamihira, S., Yamada, Y., Hirakata, Y., Tomonaga, M., Sugahara, K., Hayashi, T., Dateki, N., Harasawa, H., and Nakayama, K. (2001). Aberrant expression of caspase cascade regulatory genes in adult T-cell leukaemia: survivin is an important determinant for prognosis. *British journal of haematology* *114*, 63-69.

Kapellos, G., Polonifi, K., Farmakis, D., Spartalis, E., Tomos, P., Aessopos, A.,

Polizos, A., and Mantzourani, M. (2013). Overexpression of survivin levels in circulation and tissue samples of lung cancer patients. *Anticancer research* 33, 3475-3480.

Kumar, M.S., Armenteros-Monterroso, E., East, P., Chakravorty, P., Matthews, N., Winslow, M.M., and Downward, J. (2014). HMGA2 functions as a competing endogenous RNA to promote lung cancer progression. *Nature* 505, 212-217.

Lemasson, I., Thebault, S., Sardet, C., Devaux, C., and Mesnard, J.M. (1998). Activation of E2F-mediated transcription by human T-cell leukemia virus type I Tax protein in a p16(INK4A)-negative T-cell line. *The Journal of biological chemistry* 273, 23598-23604.

Li, F., and Altieri, D.C. (1999). Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *The Biochemical journal* 344 Pt 2, 305-311.

Lu, J., Verma, S.C., Murakami, M., Cai, Q., Kumar, P., Xiao, B., and Robertson, E.S. (2009). Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) upregulates survivin expression in KSHV-Associated B-lymphoma cells and contributes to their proliferation. *Journal of virology* 83, 7129-7141.

Masuda, K., Teshima-Kondo, S., Mukaijo, M., Yamagishi, N., Nishikawa, Y., Nishida, K., Kawai, T., and Rokutan, K. (2008). A novel tumor-promoting function residing in the 5' non-coding region of vascular endothelial growth factor mRNA. *PLoS medicine* 5, e94.

Matsuoka, M., and Jeang, K.T. (2007). Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nature reviews Cancer* 7, 270-280.

Miyazaki, M., Yasunaga, J., Taniguchi, Y., Tamiya, S., Nakahata, T., and

Matsuoka, M. (2007). Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. *Journal of virology* *81*, 5714-5723.

Nakahara, T., Kita, A., Yamanaka, K., Mori, M., Amino, N., Takeuchi, M., Tominaga, F., Hatakeyama, S., Kinoyama, I., Matsuhisa, A., *et al.* (2007). YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer research* *67*, 8014-8021.

Nakamura, N., Yamauchi, T., Hiramoto, M., Yuri, M., Naito, M., Takeuchi, M., Yamanaka, K., Kita, A., Nakahara, T., Kinoyama, I., *et al.* (2012). Interleukin enhancer-binding factor 3/NF110 is a target of YM155, a suppressant of survivin. *Molecular & cellular proteomics : MCP* *11*, M111 013243.

Osame, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Igata, A., Matsumoto, M., and Tara, M. (1986). HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet (London, England)* *1*, 1031-1032.

Ouellet, D.L., and Provost, P. (2010). Current knowledge of MicroRNAs and noncoding RNAs in virus-infected cells. *Methods in molecular biology* *623*, 35-65.

Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., and Gallo, R.C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *77*, 7415-7419.

Rende, F., Cavallari, I., Corradin, A., Silic-Benussi, M., Toulza, F., Toffolo, G.M., Tanaka, Y., Jacobson, S., Taylor, G.P., D'Agostino, D.M., *et al.* (2011). Kinetics and intracellular compartmentalization of HTLV-1 gene expression:

nuclear retention of HBZ mRNAs. *Blood* 117, 4855-4859.

Ryan, B.M., Konecny, G.E., Kahlert, S., Wang, H.J., Untch, M., Meng, G., Pegram, M.D., Podratz, K.C., Crown, J., Slamon, D.J., *et al.* (2006). Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 17, 597-604.

Samanta, M., Iwakiri, D., and Takada, K. (2008). Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene* 27, 4150-4160.

Satou, Y., Yasunaga, J., Yoshida, M., and Matsuoka, M. (2006). HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 720-725.

Satou, Y., Yasunaga, J., Zhao, T., Yoshida, M., Miyazato, P., Takai, K., Shimizu, K., Ohshima, K., Green, P.L., Ohkura, N., *et al.* (2011). HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS pathogens* 7, e1001274.

Shi, J., Whyte, W.A., Zepeda-Mendoza, C.J., Milazzo, J.P., Shen, C., Roe, J.S., Minder, J.L., Mercan, F., Wang, E., Eckersley-Maslin, M.A., *et al.* (2013). Role of SWI/SNF in acute leukemia maintenance and enhancer-mediated Myc regulation. *Genes & development* 27, 2648-2662.

Spizzo, R., Almeida, M.I., Colombatti, A., and Calin, G.A. (2012). Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? *Oncogene* 31, 4577-4587.

Stanelle, J., and Putzer, B.M. (2006). E2F1-induced apoptosis: turning

killers into therapeutics. *Trends in molecular medicine* 12, 177-185.

Sugata, K., Satou, Y., Yasunaga, J., Hara, H., Ohshima, K., Utsunomiya, A., Mitsuyama, M., and Matsuoka, M. (2012). HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. *Blood* 119, 434-444.

Sun, S.C., Elwood, J., Beraud, C., and Greene, W.C. (1994). Human T-cell leukemia virus type I Tax activation of NF-kappa B/Rel involves phosphorylation and degradation of I kappa B alpha and RelA (p65)-mediated induction of the c-rel gene. *Molecular and cellular biology* 14, 7377-7384.

Takeda, S., Maeda, M., Morikawa, S., Taniguchi, Y., Yasunaga, J., Nosaka, K., Tanaka, Y., and Matsuoka, M. (2004). Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 109, 559-567.

Tamiya, S., Matsuoka, M., Etoh, K., Watanabe, T., Kamihira, S., Yamaguchi, K., and Takatsuki, K. (1996). Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* 88, 3065-3073.

Vernin, C., Thenoz, M., Pinatel, C., Gessain, A., Gout, O., Delfau-Larue, M.H., Nazaret, N., Legras-Lachuer, C., Wattel, E., and Mortreux, F. (2014). HTLV-1 bZIP factor HBZ promotes cell proliferation and genetic instability by activating OncomiRs. *Cancer research* 74, 6082-6093.

Wang, K.C., and Chang, H.Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular cell* 43, 904-914.

Watanabe, T. (2011). Current status of HTLV-1 infection. *International journal of hematology* 94, 430-434.

Wolfe, A.L., Singh, K., Zhong, Y., Drewe, P., Rajasekhar, V.K., Sanghvi, V.R., Mavrakis, K.J., Jiang, M., Roderick, J.E., Van der Meulen, J., *et al.* (2014). RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature* *513*, 65-70.

Yamauchi, T., Nakamura, N., Hiramoto, M., Yuri, M., Yokota, H., Naitou, M., Takeuchi, M., Yamanaka, K., Kita, A., Nakahara, T., *et al.* (2012). Sepantronium bromide (YM155) induces disruption of the ILF3/p54(nrb) complex, which is required for survivin expression. *Biochemical and biophysical research communications* *425*, 711-716.

Yoshida, M., Satou, Y., Yasunaga, J., Fujisawa, J., and Matsuoka, M. (2008). Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene. *Journal of virology* *82*, 9359-9368.

Zhao, T., Satou, Y., Sugata, K., Miyazato, P., Green, P.L., Imamura, T., and Matsuoka, M. (2011). HTLV-1 bZIP factor enhances TGF-beta signaling through p300 coactivator. *Blood* *118*, 1865-1876.

Zhao, T., Yasunaga, J., Satou, Y., Nakao, M., Takahashi, M., Fujii, M., and Matsuoka, M. (2009). Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-kappaB. *Blood* *113*, 2755-2764.

Zuber, J., Shi, J., Wang, E., Rappaport, A.R., Herrmann, H., Sison, E.A., Magoon, D., Qi, J., Blatt, K., Wunderlich, M., *et al.* (2011). RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* *478*, 524-528.

謝辞

本研究は、京都大学・ウイルス研究所・ウイルス制御研究領域の松岡雅雄教授のもとで行われました。心より深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり実験手法など丁寧にご指導いただきました京都大学・ウイルス研究所・ウイルス制御研究領域の安永純一郎講師に、また論文投稿にあたり実験の補助をして頂いた古田梨愛さんに深く感謝申し上げます。

また朝長啓造教授(京都大学生命科学研究科)には主指導教官、立花誠教授(徳島大学疾患酵素学研究センター)、米山光俊教授(千葉大学真菌医学研究センター)、土方誠准教授(京都大学ウイルス研究所)、加藤博己准教授(京都大学ウイルス研究所)には副指導教官として様々なご助言を頂きました。

最後に本研究が行われました京都大学ウイルス研究所、生命科学研究科で出会った先生方、先輩、学友、後輩に心から感謝申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yuichi Mitobe, Jun-ichirou Yasunaga, Rie Furuta, Masao Matsuoka

HTLV-1 bZIP Factor RNA and Protein Impart Distinct Functions on T-Cell Proliferation and Survival

Cancer Research. 2015 Oct 1;75(19):4143-52.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0942. Epub 2015 Sep 17.