

HTLV-1 bZIP factor は抑制性免疫補助受容体の
機能を阻害し T 細胞の増殖を促進する

紀ノ定 明香

目次

要旨	3
略語一覧	4
第一章 序論	6
1-1. 成人 T 細胞白血病	
1-2. ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型とその転写産物	
1-3. 免疫補助受容体	
第二章 実験材料と方法	10
2-1. マウス	
2-2. 細胞	
2-3. 臨床サンプル	
2-4. 細胞刺激用ビーズ作製	
2-5. レトロウイルス感染	
2-6. 細胞増殖評価	
2-7. THEMIS ノックダウン	
2-8. リアルタイム PCR	
2-9. フローサイトメトリー	
2-10. 免疫沈降	
2-11. ウェスタンブロッティング	
2-12. 免疫蛍光染色	
2-13. 統計処理	
2-14. オリゴヌクレオチド配列	
第三章 結果	17
3-1. HBZ は CD4 陽性 T 細胞の増殖を促進する	
3-2. ATL 細胞では抑制性免疫補助受容体の発現が変動している	

- 3-3. HBZ は抑制性免疫補助受容体の発現を変動させる
- 3-4. HBZ は抑制性免疫補助受容体の機能を阻害する
- 3-5. HBZ は SHP-2 と PD-1 の結合を阻害する
- 3-6. HBZ は SHP-2 の活性を抑制する
- 3-7. HBZ は THEMIS と結合し、SHP-2/Grb2/THEMIS の複合体形成を抑制する
- 3-8. THEMIS により HBZ は核から細胞質に局在を変える
- 3-9. まとめ

第四章 考察	35
--------------	----

謝辞	37
----------	----

引用文献	38
------------	----

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) の原因ウイルスである。HTLV-1 は生体内では主に CD4 陽性 T 細胞に感染しており、その増殖を促進し、発がんへと導く。ATL 細胞の増殖促進には、HTLV-1 転写産物のうち全ての ATL 症例で発現する *HTLV-1 bZIP factor (HBZ)* が必須であると報告されてきた。しかし、HBZ が T 細胞特異的に増殖を促進し、発がんを誘導する機構は明らかになっていない。

これまでの研究で、HBZ により抑制性免疫補助受容体 TIGIT、PD-1 の発現が誘導されることが明らかになっている。本研究では、HBZ が抑制性免疫補助受容体 TIGIT、PD-1 の機能に与える影響について解析を行った。HBZ を強制発現した野生型マウスの CD4 陽性 T 細胞に、抗 CD3 抗体及び TIGIT または PD-1 のリガンド刺激を導入し、T 細胞の増殖をフローサイトメトリーで解析した。HBZ を導入した CD4 陽性 T 細胞は、TIGIT、PD-1 による増殖抑制機能が阻害されていた。

TIGIT と PD-1 は細胞内に共通して、チロシンフォスファターゼである SHP-2 が結合するモチーフ (ITIM、ITSM) を持つ。通常、これらのモチーフに結合した SHP-2 はリン酸化を受け活性化し、ZAP-70 や CD3 ζ を脱リン酸化し T 細胞の活性を抑制することが知られている。しかし、HBZ 存在下では ITIM、ITSM モチーフと SHP-2 の結合が阻害され、SHP-2 の活性は抑制されていることを見出した。さらに、HBZ を発現する Jurkat 細胞株において ZAP-70、CD3 ζ の脱リン酸化が抑制されていることを明らかにした。

SHP-2 は Grb2 や THEMIS と複合体を形成し、TIGIT や PD-1 と結合する。これらの分子と HBZ との相互作用を免疫沈降法で評価したところ、HBZ と THEMIS が結合することが明らかとなった。さらに、HBZ 存在下で THEMIS と Grb2 の結合が抑制されることも明らかとなり、HBZ による SHP-2 の複合体形成異常により、SHP-2 と ITIM、ITSM モチーフとの結合が阻害されることが示唆された。HBZ と THEMIS は単独の場合、それぞれ核と細胞質に発現する。しかし、HBZ と THEMIS が共発現する細胞では、THEMIS と HBZ が細胞質で共局在することが免疫蛍光染色法により明らかとなった。

以上の結果から、HBZ は細胞質で THEMIS と結合することで SHP-2 と TIGIT、PD-1 との結合を抑制し、これらの増殖抑制機能を阻害することを明らかにした。さらに、THEMIS は T 細胞特異的に発現する分子として知られており、HBZ と THEMIS との相互作用は、HBZ が T 細胞特異的に増殖を促進する機構の一つであると考えられた。

略語一覽

ATL : Adult T-cell leukemia

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

LTR : Long terminal repeat

ORF : Open reading frame

FBS : Fetal bovine serum

HBZ : HTLV-1 bZIP factor

TCR : T cell receptor

TIGIT : T cell immunoglobulin and ITIM domain

PD-1 : Programmed cell death 1

BTLA : B- and T-lymphocyte attenuator

LAIR-1 : Leukocyte-associated Ig-like receptor 1

ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

ITSM : Immunoreceptor tyrosine-based switch motif

SHP-2 : SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2

Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2

THEMIS : Thymocyte selection associated

mTOR : Mammalian target of rapamycin

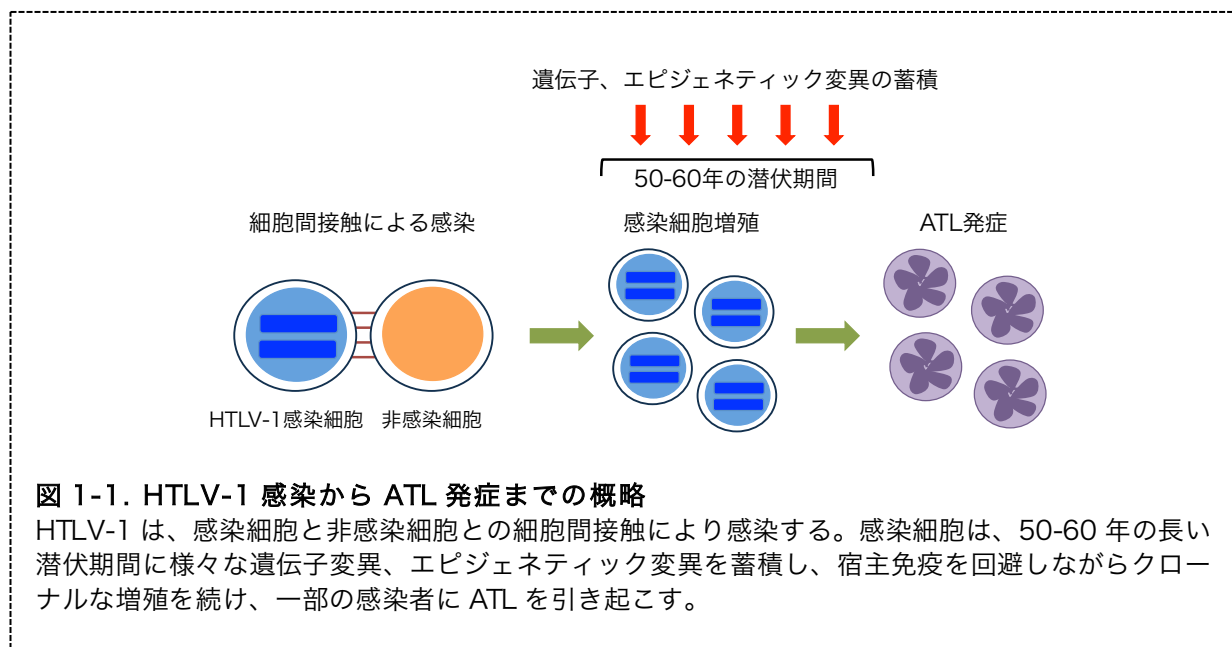
MFI : Mean fluorescence intensity

UTR : Untranslated region

第一章 序論

1-1. 成人 T 細胞白血病

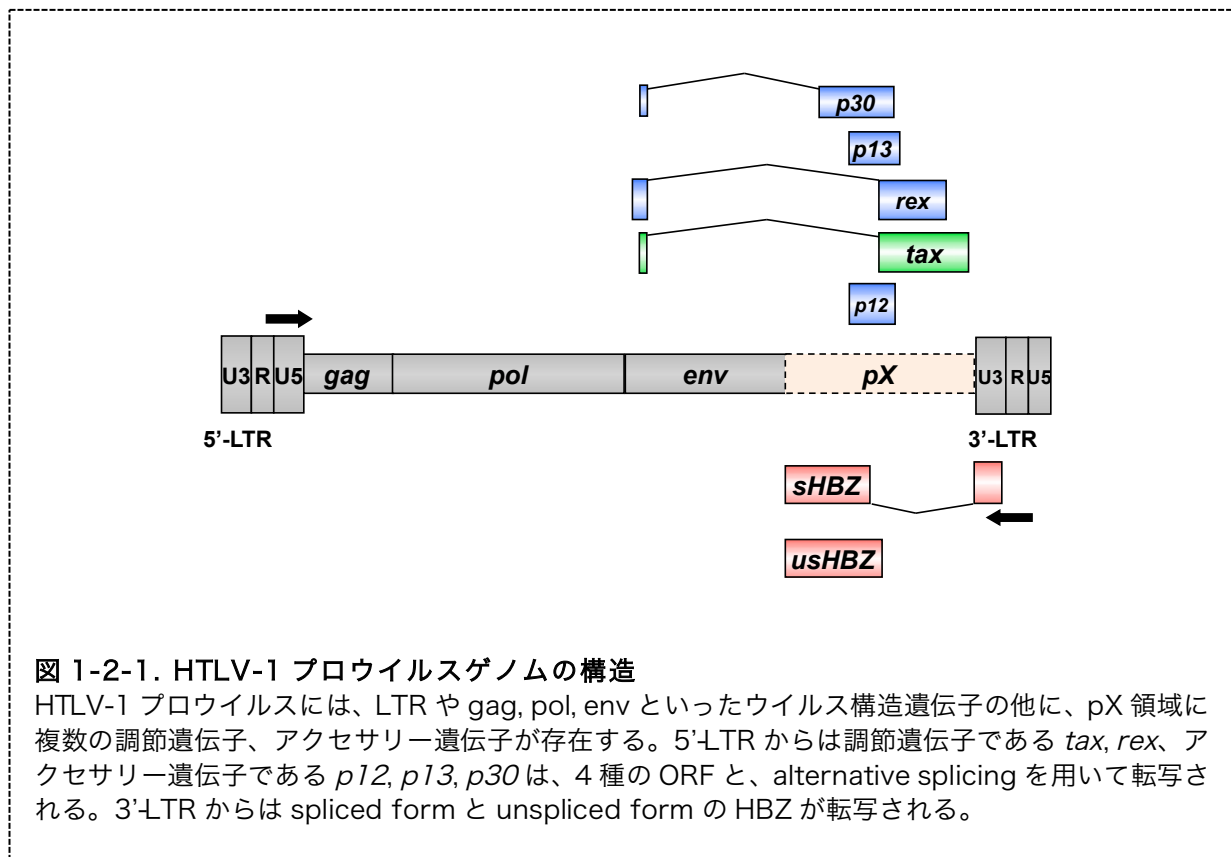
成人 T 細胞白血病（ATL）は、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型（HTLV-1）感染により引き起こされる悪性腫瘍で¹⁾、造血器腫瘍の中でも極めて予後不良の疾患である。現在、全世界に約 1,000 万人の HTLV-1 感染者が存在し、日本南西部、カリブ海沿岸地域、アフリカ中央部、南アメリカ、ソロモン諸島などに多い。本邦には約 80 万人の感染者がいてと推定され、以前から感染者の多い西南日本地域に加え、大都市圏でもその数は増加している。感染者の約 5% は、長い潜伏期間の後に ATL を発症する²⁾（図 1-1）。



1-2. ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型とその転写産物

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型（HTLV-1）は、レトロウイルス科のデルタレトロウイルス属に分類される。HTLV-1 プロウイルスは全長約 9 kb で LTR や、*gag*, *pol*, *env* といったウイルス構造遺伝子の他に、*pX* 領域に複数の調節遺伝子、アクセサリ遺伝子をコードする。*pX* 領域のプラス鎖にコードされる調節遺伝子である *tax*, *rex*、およびアクセサリ遺伝子である *p12*, *p13*, *p30* は、4 種の ORF と、*alternative splicing* を用いてコードされる。*pX* 領域のマイナス鎖には *HTLV-1 bZIP factor*

(HBZ)がコードされ、spliced form と unspliced form のHBZ が転写される (図 1-2-1)。



従来、HTLV-1 転写産物のうち、*tax* が ATL 発症に重要な役割を担うと報告されてきた³⁻⁹⁾。しかし、実際の ATL 細胞では約 60% の症例で Tax が発現していないことが明らかとなり¹⁰⁻¹⁵⁾、ATL の発がんには必ずしも Tax が重要でないことが示された。一方、HBZ は全ての症例で発現することが明らかとなった¹⁶⁾。さらに、ATL 細胞株における HBZ のノックダウンは細胞増殖を抑制することから¹⁶⁾、ATL 細胞の増殖促進に HBZ が必須であることが明らかとなった。また、CD4 陽性 T 細胞特異的に HBZ を発現するトランスジェニックマウス (HBZ-Tg) では、CD4 陽性 T 細胞の増加、皮膚炎や肺炎など全身の炎症、T リンパ腫の発症などの表現型がみられることから、HBZ が発がん重要な役割を担うことが示された¹⁷⁾ (図 1-2-2)。

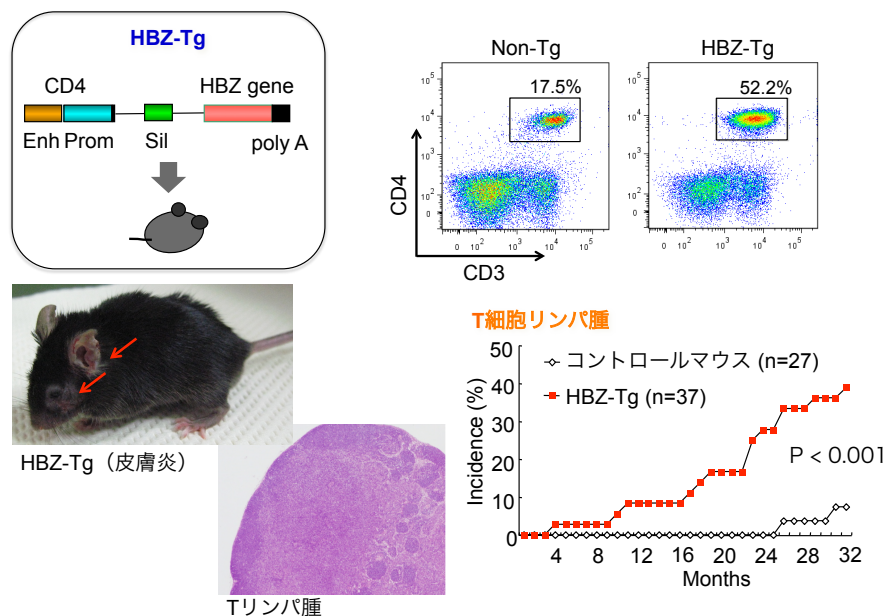


図 1-2-2. HBZ-Tg の表現型

HBZ-Tg は CD4 陽性 T 細胞特異的に HBZ を発現する。生体内で CD4 陽性 T 細胞がコントロールマウス (non-Tg) と比べて増加している。皮膚炎や肺炎など全身の炎症を発症し、長期間の潜伏期間の後、約 4 割のマウスに T リンパ腫を引き起こす (引用文献 17 より抜粋)。

1-3. 免疫補助受容体

T 細胞受容体 (TCR) からのシグナルは、T 細胞に発現する刺激性免疫補助受容体および抑制性免疫補助受容体シグナルによって調節されている^{18,19)} (図 1-3)。ATL 細胞や HTLV-1 感染細胞では、TIGIT, PD-1 などの抑制性免疫補助受容体が高発現することが報告されている²⁰⁻²²⁾。また、これらの抑制性免疫補助受容体発現は HBZ により誘導されることが明らかとなっている。さらに、HBZ を発現する CD4 陽性 T 細胞上の抑制性免疫補助受容体と樹状細胞などの抗原提示細胞上のリガンドとの結合は、リバーシブルシグナルを介して抗原提示細胞からの抑制性サイトカイン産生を誘導すると報告されている²²⁾。以上のことから、ATL 細胞や HTLV-1 感染細胞における TIGIT, PD-1 の発現上昇は、宿主からの免疫回避を目的とするものであると考えられる。

一方、抑制性免疫補助受容体とそのリガンドとの結合は、T 細胞の増殖・活性化を抑制するが、なぜ、ATL 細胞や HTLV-1 感染細胞は TIGIT, PD-1 を高発現するにも関わらず高い増殖能を有するのかは不明であった。本研究では、HBZ が TIGIT, PD-1 の機能に与える影響、T 細胞特異的に増殖を促進させる機序を明らかにした。

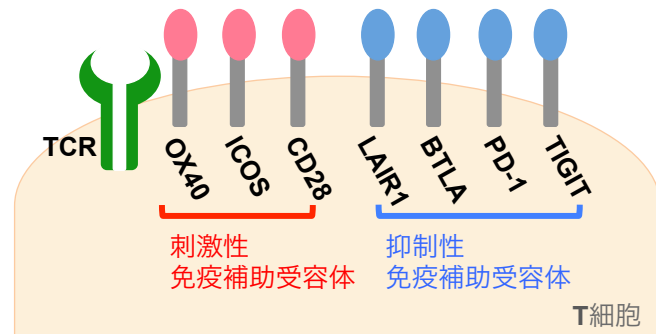


図 1-3. T 細胞に発現する免疫補助受容体

T 細胞は、刺激性または抑制性免疫補助受容体シグナルによって活性を制御している。T 細胞に TCR 刺激が導入されると、刺激性免疫補助受容体を介した補助的な T 細胞活性化シグナルが伝達される。T 細胞に十分な刺激が導入されると、抑制性免疫補助受容体シグナルにより、T 細胞の活性は抑制される。

第二章 実験材料と方法

2-1. マウス

C57BL/6J (CLEA, Japan)から購入した野生型マウス (non-Tg) の雌と当研究室で樹立した、CD4 陽性 T 細胞特異的に HBZ を発現するトランスジェニックマウス (HBZ-Tg) の雄を交配し、HBZ-Tg を継代した。tax を CD4 陽性 T 細胞特異的に発現するトランスジェニックマウス (tax-Tg) も同様にして継代した。CD4 陽性 T 細胞の増殖評価には、9-14 週齢のマウスを用いた。表面抗原の発現評価には、9-11 週齢のマウスを用いた。

2-2. 細胞

マウス初代培養細胞 (CD4 陽性 T 細胞、樹状細胞) は、50 μ M β -mercaptoethanol (GIBCO, USA)を含む RPMI 1640 培地で培養した。HBZ を定常発現する Jurkat 細胞株とそのコントロール (Jurkat-HBZ、Jurkat-mock) は、1 mg/mL G418 (Nacalai Tesque, Japan)を含む RPMI 1640 培地で培養した。293T 細胞株 (ATCC, USA) は DMEM 培地で、293FT 細胞株 (Life Technologies, USA) は 0.5 mg/mL G418 を含む DMEM 培地で培養した。Platinum-E 細胞 (東京大学、北村俊雄先生より譲与) は 10 μ g/mL blasticidin、1 μ g/mL puromycin を含む DMEM 培地で培養した。

全ての細胞は 10% FBS、penicillin 及び streptomycin を添加した培地を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

2-3. 臨床サンプル

ATL 症例および健常者の PBMC は、Ficoll-PLUS (GE Healthcare, UK)を用いて回収した。健常者の CD4 陽性 T 細胞は、Human CD4⁺ T Cell Enrichment Cocktail (STEMCELL Technologies, Canada)を用いて分離した。分離した CD4 陽性 T 細胞を 10 μ g/mL phytohemagglutinin (PHA) (Sigma-Aldrich, USA)で 3 日間刺激し、活性化 CD4 陽性 T 細胞を得た。

2-4. 細胞刺激用ビーズ作製

抗 CD3 抗体 (145-2X11, R&D systems, USA) および各受容体刺激用 Fc 融合タン

パク質 (recombinant mouse CD155.Fc, PD-L1.Fc, HVEM.Fc, control.Fc) を、Dynabeads M450 Tosylactivated (Invitrogen, Thermo Fisher, USA) に結合させた。10⁷ ビーズあたり、1 µg 抗 CD3 抗体 (全タンパク質量の 20%) および 4 µg Fc 融合タンパク質 (全タンパク質量の 80%) を結合させた。

2-5. レトロウイルス感染

Platinum-E 細胞に Lipofectamin LTX (Life Technologies) を用いてレトロウイルスベクター (pMX-IG, pMX-HBZ-IG または pMX-BTLA-IG) を導入し、48 時間後にウイルスを含む培養上清を回収した。Non-Tg の脾臓から CD4 T Lymphocyte Enrichment Set (BD Biosciences, USA) を用いて CD4 陽性 T 細胞を分離し、1 µg/mL 抗 CD3 抗体で 24 時間刺激後、ウイルス液および 4 µg/mL polybrene を添加し、3,000 rpm で 60 分間遠心操作を行った。

pMX-IG は、東京大学の北村俊雄先生より譲与を受けた。BTLA は C57B7/6J の野生型マウス由来 CD4 陽性 T 細胞から作製した cDNA を用いて増幅し、pMX-IG に挿入した。

2-6. 細胞増殖評価

HBZ-Tg の CD4 陽性 T 細胞における増殖評価では、non-Tg, tax-Tg, HBZ-Tg の脾臓から CD4 T Lymphocyte Enrichment Set を用いて CD4 陽性 T 細胞を、non-Tg の脾臓から Dendritic Cell Enrichment Set (BD Biosciences) を用いて樹状細胞を分離し、96 ウェル丸底プレートにそれぞれ 2×10⁵ 細胞/well、1×10⁴ 細胞/well ずつ播種し、30 ng/mL soluble 抗 CD3 抗体刺激下で 3 日間共培養した。CD4 陽性 T 細胞はあらかじめ 5 µM 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, USA) でラベルした。

抑制性シグナル導入下における CD4 陽性 T 細胞の増殖評価では、レトロウイルスベクターで HBZ を導入した non-Tg の CD4 陽性 T 細胞を 5 µM CellTrace Violet (Invitrogen) でラベルし、抗 CD3 抗体および受容体刺激用 Fc 融合タンパク質を結合した Dynabeads で 3 日間刺激した。96 ウェル丸底プレートで、細胞とビーズが 1:1 の割合になるよう調整した。

CD4 陽性 T 細胞の増殖は、蛍光色素の衰退からフローサイトメトリーで評価した。

2-7. THEMIS ノックダウン

THEMIS または luciferase に対する shRNA を含む PiggyBac-based shRNA 発現ベクター (pB-CMV-GreenPuro-H1-THEMIS or -luciferase (System Biosciences, USA)) を Jurkat 細胞株に Neon Transfection System (Invitrogen) を用いて導入した。各 shRNA 配列は、表 1 に示した。

2-8. リアルタイム PCR

Total RNA は Trizol Reagent (Invitrogen) を用いて抽出し、DNase I 処理により genomic DNA を除去した。cDNA は、1 µg RNA から random primer および SuperScript III または IV (Invitrogen) を用いて合成した。mRNA の発現量は、FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Diagnostics, Switzerland) を用いて評価した。測定は、StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA) を使用した。用いたプライマーは表 1 に示した。

2-9. フローサイトメトリー

細胞は下記の抗体で染色した。リン酸化タンパク質の検出には、Phosflow perm buffer II (BD Biosciences) を用いた。測定は、フローサイトメーター (FACSVerse, BD Biosciences) を用い、解析は FACSuite software (BD Biosciences) および FlowJo (TreeStar, USA) で行った。

【BioLegend (USA)】

Anti-mCD4 (GK1.5), mTIGIT (IG9), mCD28 (E18), mICOS (C398.4A), mOX40 (OX-86), hCD4 (RPA-T4), hPD-1 (29F.1A12), hBTLA (MIH26), hLAIR-1 (NKTA255), hCD28 (CD28.2), hICOS (C398.4A), hOX40 (Ber-ACT35), mouse IgG1, mouse IgG2b, rat IgG1

【eBioscience (USA)】

Anti-mBTLA (6F7), mLAIR-1 (113), hTIGIT (MBSA43), Armenian hamster IgG

【BD Pharmingen (BD Biosciences)】

Anti-mPD-1 (J43), mouse IgG2a

【Cell Signaling Technology (USA)】

Anti-phospho-SHP-2 (Tyr580)

2-10. 免疫沈降

HBZ 存在下における SHP-2 と PD-1 の結合評価では、Lipofectamine LTX (Invitrogen)を用いて pSP65SRa-SHP2-Flag (東京大学、畠山昌則先生より譲与) および pMX-HBZ-IRES-mCD28/hPD1 またはそのコントロール (pMX-IRES-mCD28/hPD1) を 293FT 細胞株に導入した。プラスミド導入 48 時間後に、0.1 mM pervanadate (過酸化水素とバナジン酸の混合物) で 5 分間細胞を刺激した。タンパク質抽出液と 5 µg 抗 mCD28 抗体 (37.51) (eBioscience) を 4°C で 60 分間インキュベートし、さらに Protein G-Sepharose (GE Healthcare) と 4°C で 60 分間インキュベートした。pMX-HBZ-IRES-mCD28/hPD1 は、pMX-HBZ-IG の GFP 配列を mCD28 と hPD-1 のキメラ分子配列と組み替えた。mCD28 は細胞外および膜貫通領域(bases 9-617, NM_007642)を野生型マウス CD4 陽性 T 細胞由来の cDNA から増幅し、hPD-1 は細胞内領域 (bases 645-935, NM_005018) を PHA で刺激したヒト PBMC 由来の cDNA から増幅した³⁶⁾。

HBZ と THEMIS, Grb2, SHP-2 との結合評価では、上記の方法で 293FT 細胞株に pcDNA3.1 HBZ-mycHis, pCAGGS-PA-THEMIS, pCMV-HA-Grb2, pSP65SRa-SHP2-Flag を導入した。プラスミド導入 48 時間後に、H₂O₂ で 5 分間細胞を刺激した。タンパク質抽出液と各免疫沈降用抗体 (20 µg 抗 PA 抗体 (NZ-1) (WAKO, Japan) または 5 µg 抗 HA 抗体 (HA-7) (Sigma-Aldrich) または抗 Flag 抗体 (M2) (Sigma-Aldrich)) を 4°C で 60 分間インキュベートした。コントロールとして、normal mouse IgG または normal rat IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA) を使用した。THEMIS と Grb2 は、Jurkat 細胞株またはヒト PBMC 由来の cDNA から増幅した。

2-11. ウェスタンブロッティング

タンパク質は下記の抗体で検出した。Mouse 抗 HBZ モノクローナル抗体は、keyhole limpet hemocyanin (KLH)-conjugated HBZ peptide 97-133 (CKQIAEYLKRKEEEKARRRRRAEKKAADVARRKQEEQE) で免疫した C57BL/6 から作製した。

【Cell Signaling Technology】

Anti-phospho-SHP-2 (Tyr580), phospho-ZAP-70 (Tyr319, Tyr493), ZAP-70 (99F2), phospho-PKCθ, PKCθ (E1I7Y)

【Abcam (UK)】

Anti-phospho-CD3 ζ (Tyr83), CD3 ζ , THEMIS (EPR7353)

【Wako】

Anti-PA (NZ-1)

【Sigma-Aldrich】

Anti-Flag-HRP (M2), HA-HRP (HA7), Myc (9E10), tubulin (DM1A)

【GE Healthcare】

Rabbit IgG-HRP, rat IgG-HRP

2-12. 免疫蛍光染色

PD-1 と SHP-2, THEMIS または TCR β の検出では、Jurkat-mock または Jurkat-HBZ を 0.2 mM pervanadate (37°C、2 分間) で処理した。THEMIS をノックダウンした Jurkat 細胞株またはそのコントロール Jurkat 細胞株には、Neon Transfection System を用いて pcDNA 3.1 HBZ-mycHis を導入した。これらの細胞は PBS で洗浄後、MAS-coated glass slides (Matsunami Glass, Japan) に接着させた。THEMIS 存在下における HBZ の局在評価では、293T 細胞株を type I collagen (Cellmatrix, Nitta Gelatin, Japan)-coated coverslips に播種し、pcDNA 3.1 HBZ-mycHis, pCAGGS-PA-THEMIS を導入した。

細胞は 4% paraformaldehyde で 15 分間固定後、0.2% Triton X-100 で 15 分間透過処理を行った。5% ロバ血清 (Jackson ImmunoResearch, USA) で 60 分間ブロッキングした後、一次抗体を 60 分間、二次抗体を 30 分間反応させた。染色した細胞は、ProLong Gold Antifade Reagent または ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) で封入した。画像は共焦点顕微鏡 FV1000 (Olympus, Japan) または Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) で取得し、ImageJ で解析した。

タンパク質は下記の抗体で検出した。

Mouse 抗 HBZ モノクローナル抗体

【Santa Cruz Biotechnology】

Anti-SHP-2 (C-18), PD-1 (V-15), TCR β (G-11)

【Abcam】

Anti-THEMIS (EPR7353), Nuclear Pore Complex Proteins (Mab414)

【Sigma-Aldrich】

Anti-Myc (9E10)

【Wako】

Anti-PA (NZ-1)

【Invitrogen】

Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat IgG, Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rat IgG, Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-mouse IgG, Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-rat IgG, Alexa Fluor 647-conjugated donkey anti-mouse IgG, Alexa Fluor 647-conjugated donkey anti-rabbit IgG

【Jackson ImmunoResearch】

DyLight 405-conjugated donkey anti-mouse IgG

2-13. 統計処理

結果 3-1、3-3、3-7 は two-tailed unpaired Student's t-test を用いて、結果 3-2、3-5 は one-way ANOVA with Turkey's post hoc test (GraphPad Prism, GraphPad Software, La Jolla, USA)を用いて統計処理を行った。アスタリスクは有意差* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; n.s., not significant を示した。

2-14. オリゴヌクレオチド配列

リアルタイム PCR および THEMIS ノックダウンに用いたオリゴヌクレオチド配列は、表 1 に示した。

表 1. 本研究に用いたオリゴヌクレオチド配列

リアルタイム PCR 用プライマー (ヒト)

	Forward	Reverse
<i>TIGIT</i>	CAGGTTCCAGATTCCATTGCTT	ACGATGACTGCTGTGCAGATG
<i>PD-1</i>	GGATTTCCAGTGGCGAGAGA	GAAAGACAATGGTGGCATACTCC
<i>BTLA</i>	GAAGAAAACAAACCAGGCATTGT	TTACATTCTTGCCAGTCTTGAGTTC
<i>LAIR-1</i>	CACAGTCAATGGACTTCCTGAGAA	ATACGTCACCTCCTGGGAATC
<i>CD28</i>	GCGGTCAACCTTAGCTGGAA	CACCCAAAAGGGCTTAGAAGG
<i>ICOS</i>	GCCTTTGTTGTAGTCTGCATTTTG	GTCTAGATTTTTTGGCTGTGTTCACT
<i>OX40</i>	AACGACGTGGTCAGTCCAA	GCCGTGCACAGCTGCTT
<i>r18S</i>	CGGCGTTATTCCCATGAC	GTGCCCTTCCGTCAATTC

リアルタイム PCR 用プライマー（マウス）

	Forward	Reverse
<i>Tigit</i>	TCCTGGTGGGATTTACAAGG	AAGCAAATGAGTCCCAGCAC
<i>Pd-1</i>	CCGCCTTCTGTAATGGTTTGA	GGGCAGCTGTATGATCTGGAA
<i>Btla</i>	GTGATAATGGGTCGTATAGCTGTTC	GGTCCTGAGGCATTGGTGGCATC
<i>Lair-1</i>	GTGATTTTCCTCCTTTGTCTTTCC	GCCTCTGCTGCTGTCTTTTGT
<i>Cd28</i>	TCGGGAATGGGAATTTACCT	CCCCGTCGCAGTTGAACT
<i>Icos</i>	CAAGAAAGGAACCTTAGTGAGGAT	ACGGGTAGCCAGAGCTTCAG
<i>Ox40</i>	GAGACCCAGCGCCCTACA	AGAAGTCCTGGGCCAGACTGT
<i>β-actin</i>	CTACAATGAGCTGCGTGTGGCCCCTGA	GAGAGCATAGCCCTCGTAGATGGGCAC

RT-PCR 用プライマー（マウス）

	Forward	Reverse
<i>tax</i>	ATGGCCCACTTCCCAGGGTT	CCGAACATAGTCCCCCAGAG
<i>HBZ</i>	ATGGCGGCCTCAGG	GCTTTCTCCCCTGGAGGGCC
<i>β-actin</i>	CTACAATGAGCTGCGTGTGGCCCCTGA	GAGAGCATAGCCCTCGTAGATGGGCAC

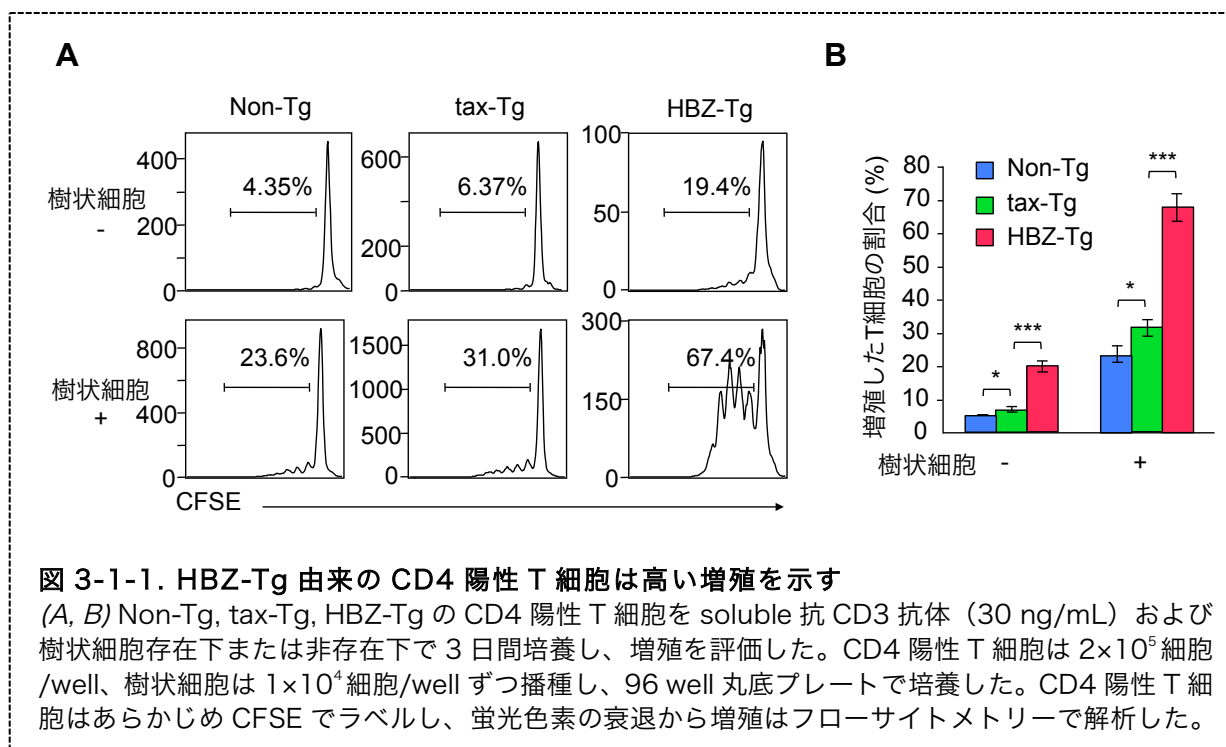
shRNA 配列

THEMIS	GAGATCACTGAAGAGCAATAT-CTCGAG-ATATTGCTCTTCAGTGATCTC-TTTTT
luciferase (control)	CGCTGAGTACTTCGAAATGTC-CTCGAG-GACATTTTGAAGTACTCAGCG-TTTTT

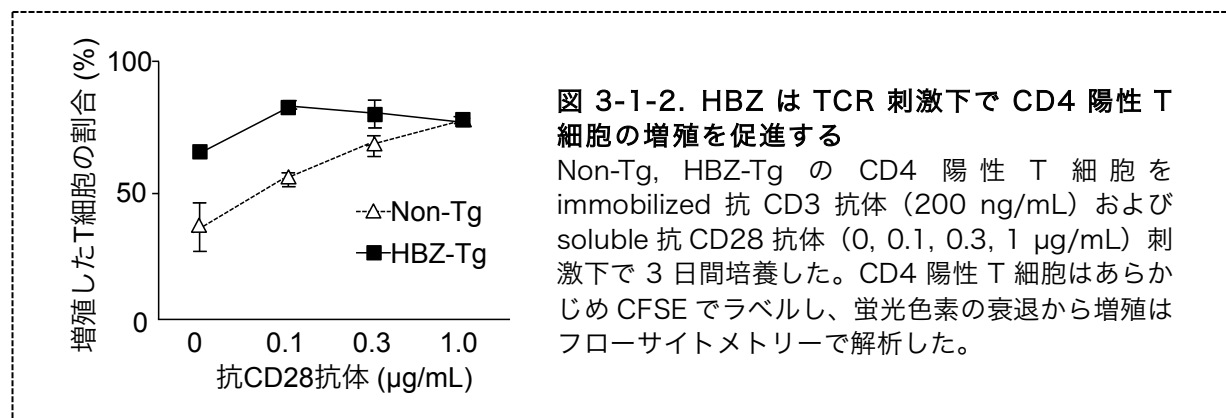
第三章 結果

3-1. HBZ は CD4 陽性 T 細胞の増殖を促進する

Non-Tg, tax-Tg, HBZ-Tg の CD4 陽性 T 細胞を抗 CD3 抗体刺激下で培養し増殖を評価した。HBZ-Tg 由来の CD4 陽性 T 細胞は、non-Tg, tax-Tg と比較して抗 CD3 抗体刺激により高い増殖活性を示した。CD4 陽性 T 細胞を樹状細胞と共培養したところ、HBZ-Tg 由来の CD4 陽性 T 細胞の増殖はさらに促進された (図 3-1-1)。



一方、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体刺激下における non-Tg, HBZ-Tg 由来の CD4 陽性 T 細胞の増殖には差が認められないことから (図 3-1-2)、HBZ-Tg 由来の CD4 陽性 T 細胞は、TCR/CD3 複合体を介するシグナル感受性が高いと考えられた。



3-2. ATL 細胞では抑制性免疫補助受容体の発現が変動している

近年、がん細胞における免疫補助受容体の発現異常が多く報告されている³⁵⁾。そこで、ATL 細胞における刺激性免疫補助受容体 (CD28, ICOS, OX40) および抑制性免疫補助受容体 (TIGIT, PD-1, BTLA, LAIR-1) の発現を、mRNA とタンパク質レベルで評価した。ATL 細胞では mRNA およびタンパク質レベルにおいて健常者の CD4 陽性 T 細胞と比べて、抑制性免疫補助受容体である TIGIT の発現が顕著に増加していた。また、PD-1 も一部の ATL 細胞で高発現していた (図 3-2-1)。BTLA, LAIR-1 はタンパク質レベルにおいて発現抑制が認められた (図 3-2-1. B, C)。

抑制性免疫補助受容体

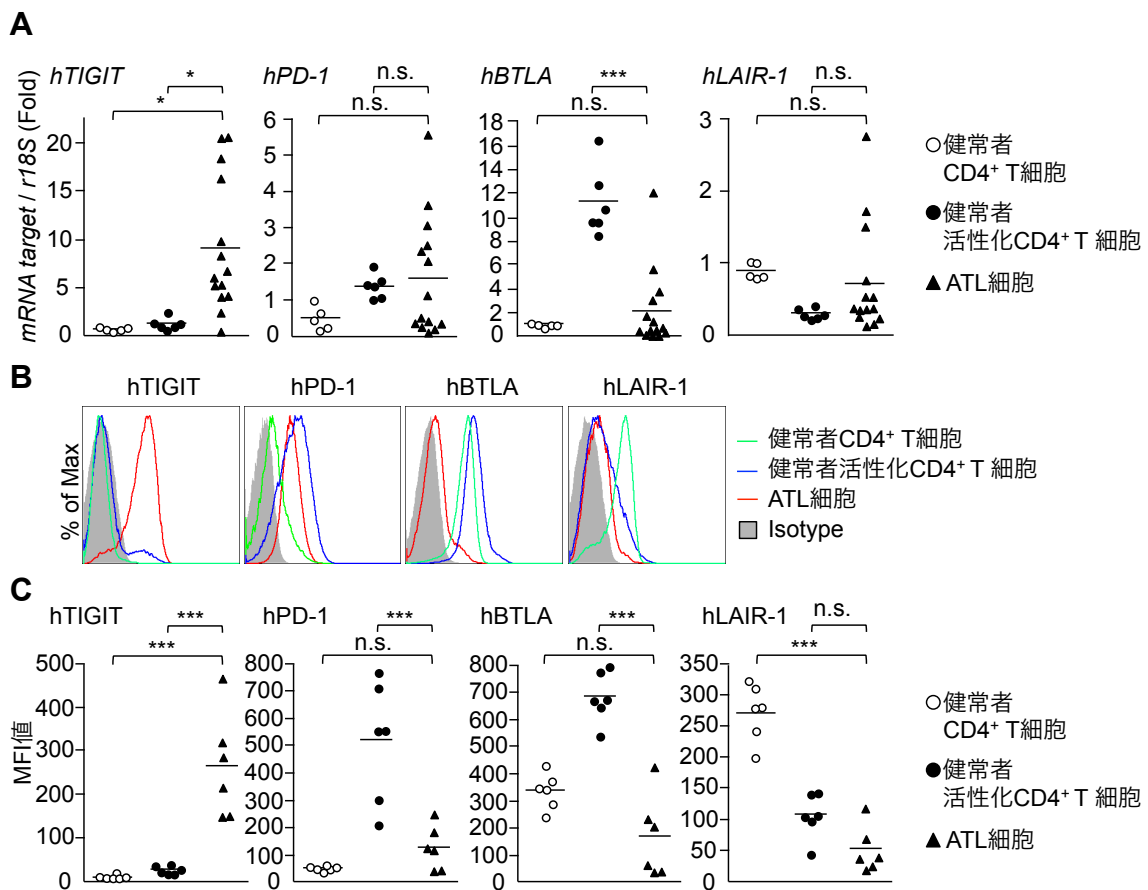


図 3-2-1. ATL 細胞における抑制性免疫補助受容体発現

(A) 健常者の CD4 陽性 T 細胞 (n=6)、PHA で刺激した活性化 CD4 陽性 T 細胞 (n=6)、ATL 細胞 (n=14) における抑制性免疫補助受容体 (TIGIT, PD-1, BTLA, LAIR-1) の mRNA 発現量を定量した。(B) 同グループの細胞における各タンパク質発現量を、抗 CD4 抗体、抗 TIGIT 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 BTLA 抗体、抗 LAIR-1 抗体を用いて測定した。(C) (B) で測定したタンパク質発現量を MFI で比較した。

一方、刺激性免疫補助受容体である CD28, ICOS, OX40 の発現は健常者の活性化 CD4 陽性 T 細胞と比べて抑制されていた (図 3-2-2)。

刺激性免疫補助受容体

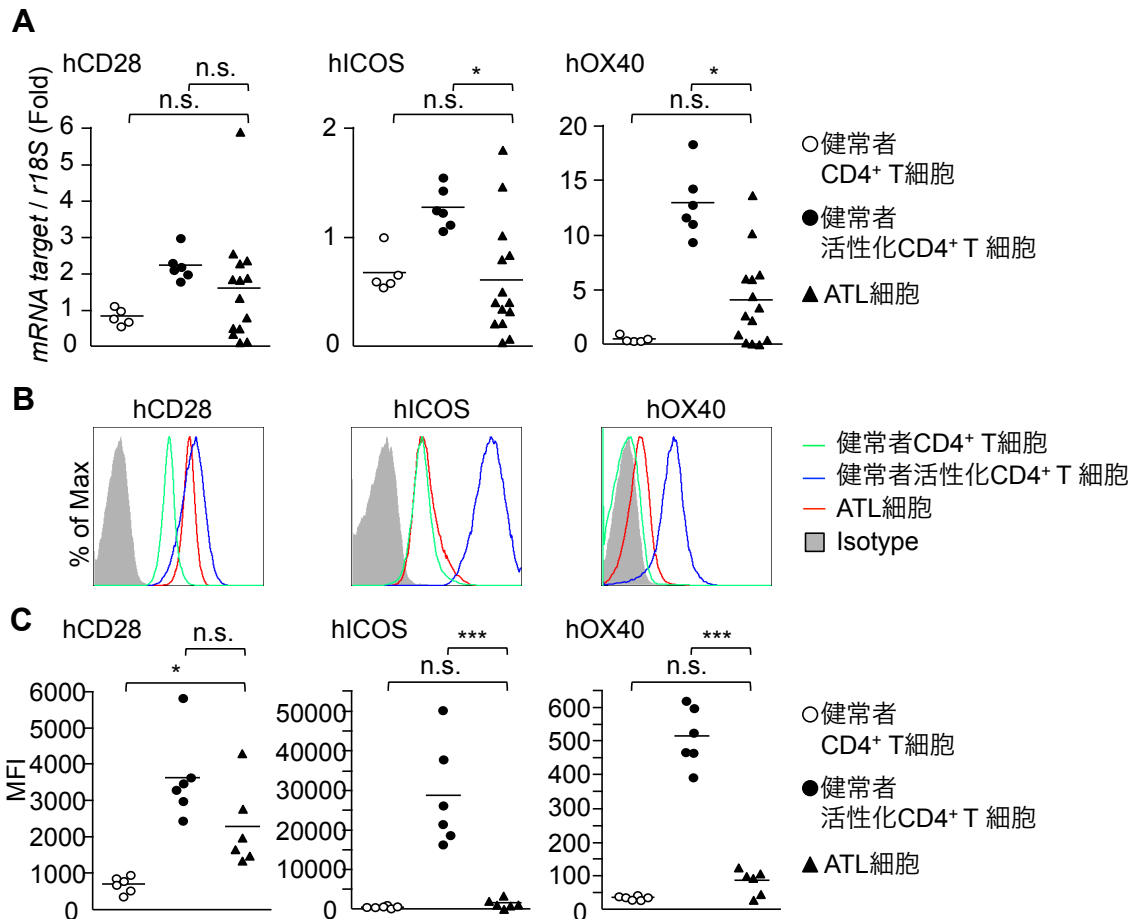


図 3-2-2. ATL 細胞における刺激性免疫補助受容体発現

(A) 健常者の CD4 陽性 T 細胞 (n=6)、PHA で刺激した活性化 CD4 陽性 T 細胞 (n=6)、ATL 細胞 (n=14) における刺激性免疫補助受容体 (CD28, ICOS, OX40) の mRNA 発現量を定量した。(B) 同グループの細胞における各タンパク質発現量を、抗 CD4 抗体、抗 CD28 抗体、抗 ICOS 抗体、抗 OX40 抗体を用いて測定した。(C) (B) で測定したタンパク質発現量を MFI で比較した。

本実験に用いた ATL 細胞における *HBZ* と *tax* の発現を定量し、全ての ATL 細胞で *HBZ* が発現していること、一部の ATL 細胞で *tax* が発現していることを確認した (図 3-2-3)。

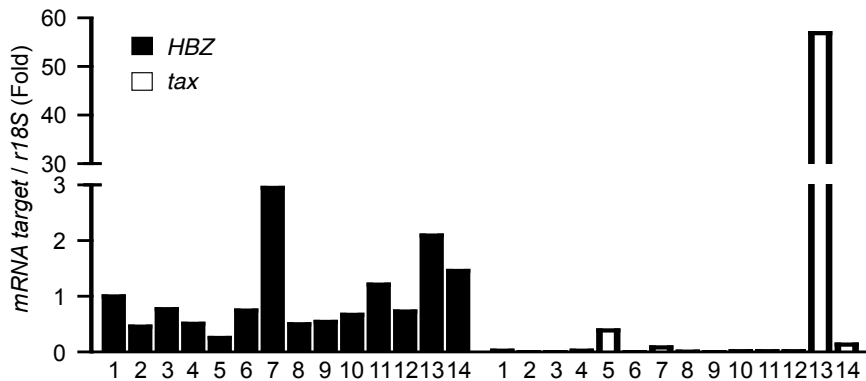


図 3-2-3. ATL 細胞における *HBZ* および *tax* 発現量

本実験で用いた ATL 細胞 (n=14) における *HBZ* および *tax* の発現量を定量した。mRNA 発現量はリアルタイム PCR で定量し、内在性コントロールには *18S ribosomal RNA* を使用した。

3-3. *HBZ* は抑制性免疫補助受容体の発現を変動させる

ATL 細胞において免疫補助受容体発現が変動していることが明らかとなったが、HTLV-1 転写産物のうち、*HBZ* が T 細胞に発現する免疫補助受容体の発現変動に関与するかを検討した。

レトロウイルスベクターを用いて *HBZ* を導入したマウスの CD4 陽性 T 細胞から作製した cDNA を用いて、抑制性免疫補助受容体 (*Tigit*, *Pd-1*, *Btla*, *Lair-1*) の発現を定量した。*HBZ* 存在下で、*Tigit*, *Pd-1* は発現が上昇しており、*Btla*, *Lair-1* の発現は抑制された (図 3-3-1. A)。*HBZ*-Tg の CD4 陽性 T 細胞における各受容体のタンパク質発現を評価したところ、同様に *TIGIT*, *PD-1* の発現は上昇し、*BTLA*, *LAIR-1* の発現は抑制された (図 3-3-1. B, C)。

抑制性免疫補助受容体

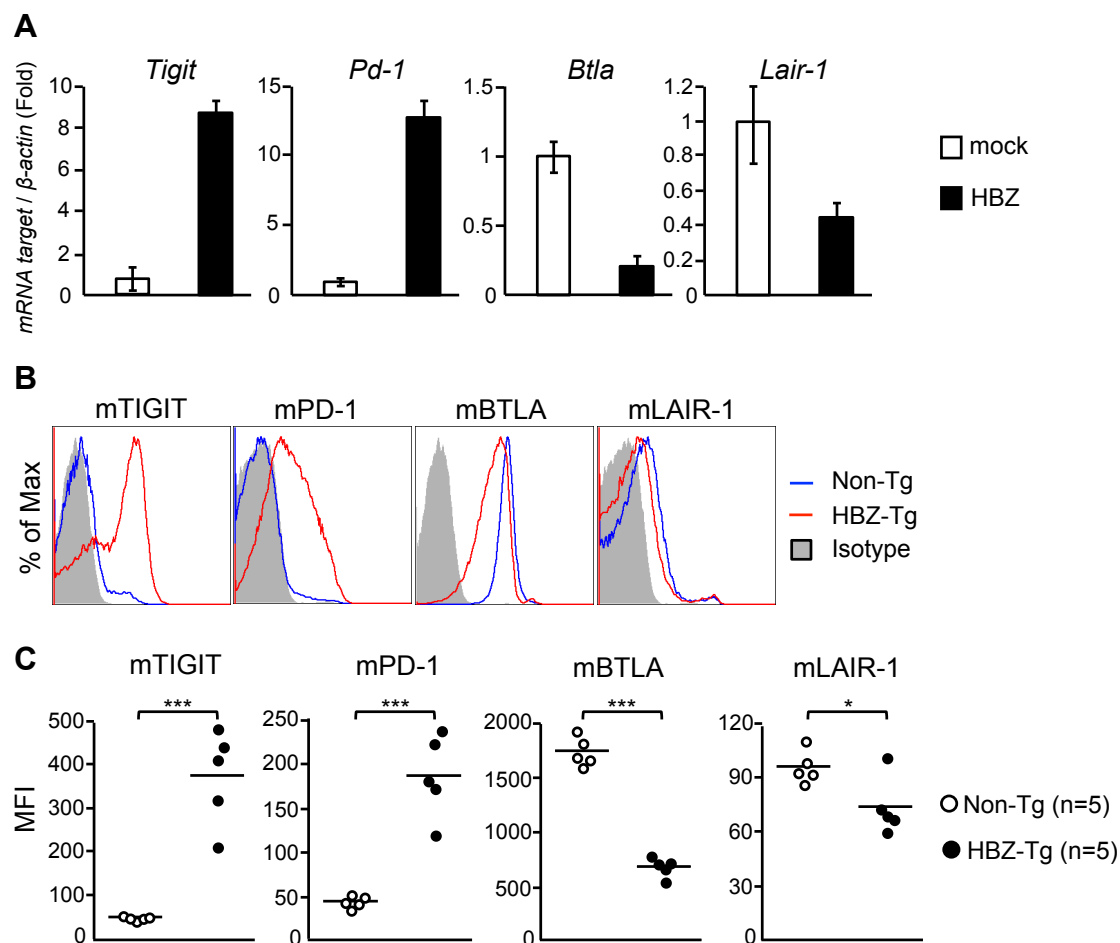


図 3-3-1. Non-Tg, HBZ-Tg の CD4 陽性細胞における抑制性免疫補助受容体発現

(A) HBZ を導入したマウスの CD4 陽性 T 細胞における抑制性免疫補助受容体 (*Tigit*, *Pd-1*, *Btla*, *Lair-1*) の mRNA 発現量を定量した。(B) Non-Tg, HBZ-Tg の CD4 陽性 T 細胞における抑制性免疫補助受容体 (TIGIT, PD-1, BTLA, LAIR-1) のタンパク質発現量を、抗 CD4 抗体、抗 TIGIT 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 BTLA 抗体、抗 LAIR-1 抗体を用いて測定した。(C) (B) で測定したタンパク質発現量を MFI で比較した。mRNA 発現量はリアルタイム PCR で定量し、内在性コントロールには β -actin を使用した。用いたプライマー配列は表 1 に示した。タンパク質発現量はフローサイトメトリーで測定した。

次に、レトロウイルスベクターを用いて HBZ を導入した CD4 陽性 T 細胞の cDNA を用いて、刺激性免疫補助受容体 (*Cd28*, *Icos*, *Ox40*) の発現を定量した。*Cd28*, *Icos* の発現は抑制され、*Ox40* の発現には影響を与えなかった (図 3-3-2. A)。HBZ-Tg の CD4 陽性 T 細胞における各受容体のタンパク質の発現を評価したところ、いずれも non-Tg と比べて少し抑制されるか、ほとんど影響は認められなかった (図 3-3-2. B, C)。

刺激性免疫補助受容体

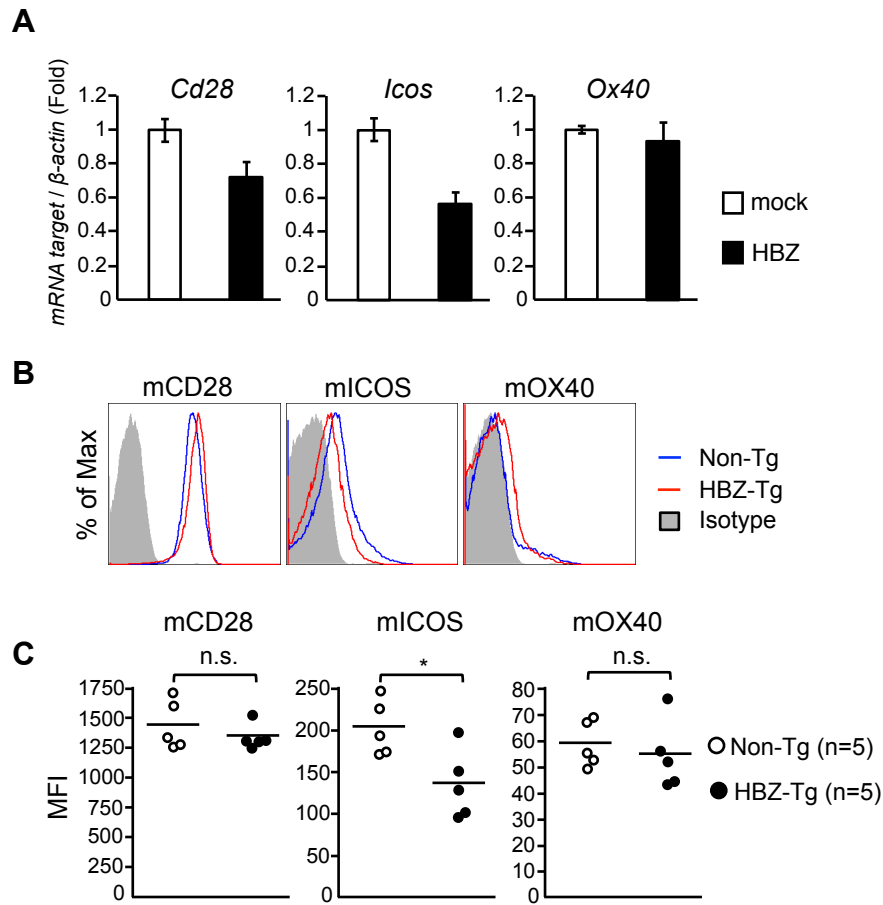


図 3-3-2. Non-Tg, HBZ-Tg の CD4 陽性細胞における刺激性免疫補助受容体発現

(A) HBZ を導入したマウスの CD4 陽性 T 細胞における抑制性免疫補助受容体 (*Cd28*, *Icos*, *Ox40*) の mRNA 発現量を定量した。(B) Non-Tg, HBZ-Tg の CD4 陽性 T 細胞における抑制性免疫補助受容体 (CD28, ICOS, OX40) のタンパク質発現量を、抗 CD4 抗体、抗 CD28 抗体、抗 ICOS 抗体、抗 OX40 抗体を用いて測定した。(C) (B) で測定したタンパク質発現量を MFI で比較した。

mRNA 発現はリアルタイム PCR で定量し、内在性コントロールには β -actin を使用した。用いたプライマー配列は表 1 に示した。タンパク質発現量はフローサイトメトリーで測定した。

tax-Tg の CD4 陽性 T 細胞においては、いずれの抑制性免疫補助受容体発現も non-Tg と比べて変動は認められないことから (図 3-3-3)、TIGIT, PD-1 の発現上昇および BTLA, LAIR-1 の発現抑制は HBZ に起因することが明らかとなった。

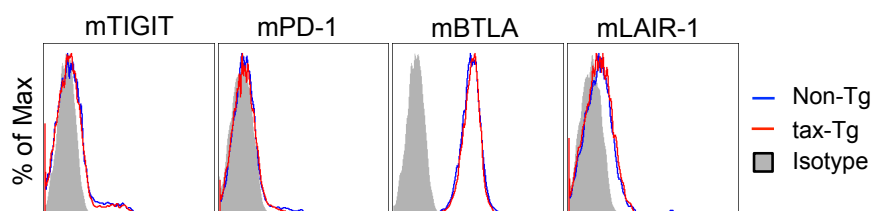


図 3-3-3. tax-Tg の CD4 陽性細胞における抑制性免疫補助受容体発現

tax-Tg の CD4 陽性 T 細胞における抑制性免疫補助受容体のタンパク質発現量を、抗 CD4 抗体、抗 TIGIT 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 BTLA 抗体、抗 LAIR-1 抗体を用いてフローサイトメトリーで測定した。

Non-Tg, tax-Tg, HBZ-Tg の CD4 陽性 T 細胞において tax-Tg では *tax* が発現していることを、HBZ-Tg では *HBZ* が発現していることを確認した (図 3-3-4)。

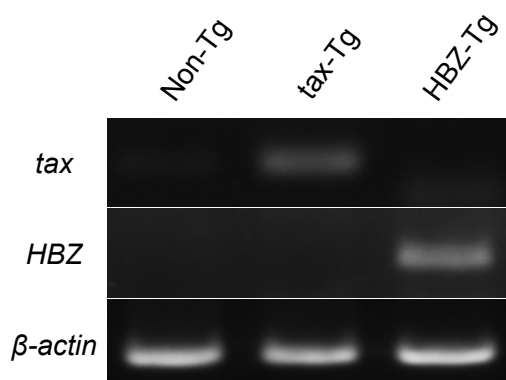


図 3-3-4. Non-Tg, tax-Tg, HBZ-Tg の CD4 陽性 T 細胞における *HBZ*, *tax* 発現

Non-Tg, tax-Tg, HBZ-Tg の CD4 陽性 T 細胞における各遺伝子発現を RT-PCR で検出した。mRNA 発現は RT-PCR で定量し、内在性コントロールには β -actin を使用した。用いたプライマー配列は表 1 に示した。

3-4. HBZ は抑制性免疫補助受容体の機能を阻害する

上記の結果から、HBZ は T 細胞の増殖を促進させる (図 3-1) 一方で、抑制性免疫補助受容体 TIGIT, PD-1 の発現を上昇させることが明らかとなった (図 3-2-1, 3-3-1)。次に、HBZ 存在下における TIGIT, PD-1 の T 細胞増殖抑制機能を評価した。HBZ を導入した CD4 陽性 T 細胞を抗 CD3 抗体および TIGIT または PD-1 のリガンド刺激下で培養し、増殖を評価した。リガンド刺激の導入により CD4 陽性 T 細胞の増殖は抑制されるのに対し、HBZ 存在下では CD4 陽性 T 細胞の増殖は阻害されなかった (図 3-4-1)。以上の結果から、HBZ は TIGIT および PD-1 の抑制機能を阻害することが明らかとなった。

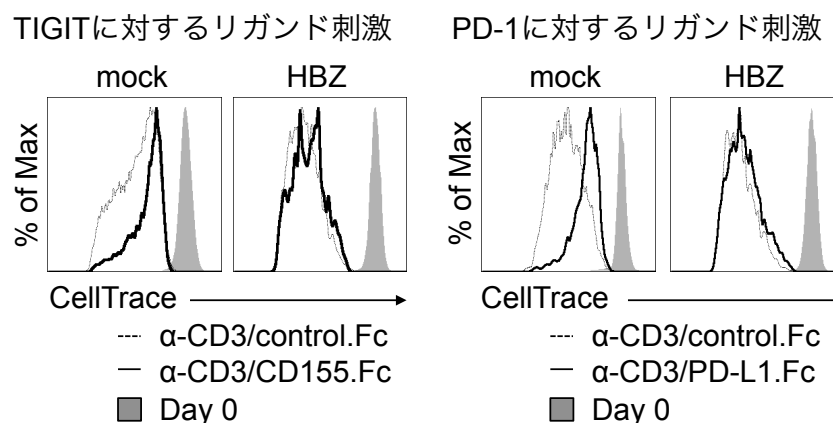


図 3-4-1. HBZ は TIGIT, PD-1 の機能を阻害する

レトロウイルスベクター (pMX-IG または pMX-HBZ-IG) を用いて HBZ を導入したマウスの CD4 陽性 T 細胞を、抗 CD3 抗体および TIGIT または PD-1 のリガンド Fc 融合タンパク質 (CD155 または PD-L1) を結合させた Dynabeads を用いて、3 日間刺激した。CD4 陽性 T 細胞はあらかじめ CellTrace Violet でラベルし蛍光色素の衰退から、GFP 陽性分画における CD4 陽性 T 細胞の増殖をフローサイトメトリーで解析した。96 well 丸底プレートを用いて、CD4 陽性 T 細胞 2×10^5 細胞/well を、抗 CD3 抗体および Fc 融合タンパク質を結合した Dynabeads 存在下で培養した。

他の抑制性免疫補助受容体である BTLA においても同様の実験を行ったところ、HBZ は BTLA のリガンド刺激による抑制機能も阻害することが明らかとなり (図 3-4-2)、HBZ は BTLA の発現抑制だけでなく抑制機能も阻害することで、T 細胞の増殖を促進させることが示唆された。

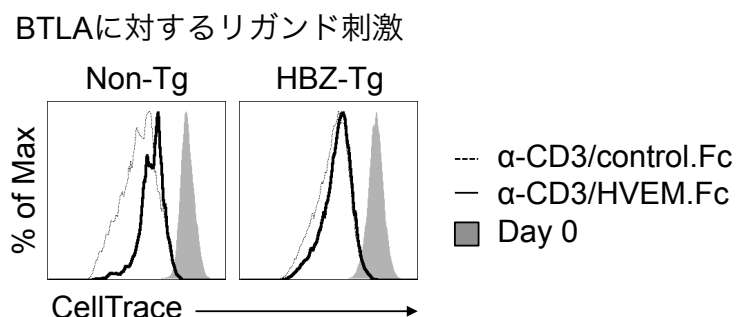


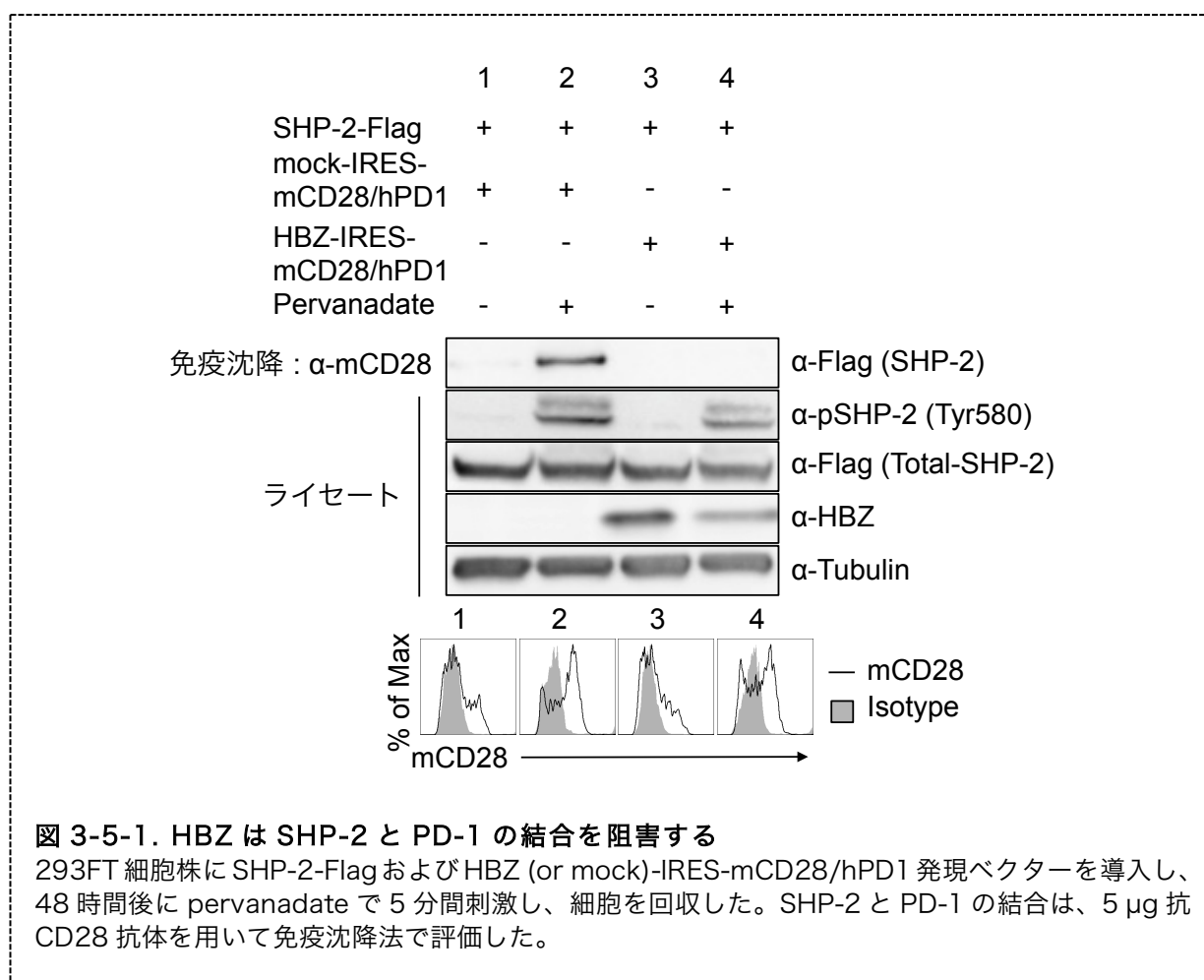
図 3-4-2. HBZ は BTLA の機能を阻害する

レトロウイルスベクター (pMX-BTLA-IG) を用いて BTLA を導入した non-Tg または HBZ-Tg の CD4 陽性 T 細胞を、抗 CD3 抗体および BTLA のリガンド Fc 融合タンパク質 (HVEM) を結合させた Dynabeads を用いて、3 日間刺激した。CD4 陽性 T 細胞はあらかじめ CellTrace Violet でラベルし蛍光色素の衰退から、GFP 陽性分画における CD4 陽性 T 細胞の増殖をフローサイトメトリーで解析した。96 well 丸底プレートを用いて、CD4 陽性 T 細胞 2×10^5 細胞/well を、抗 CD3 抗体および Fc 融合タンパク質を結合した Dynabeads 存在下で培養した。

3-5. HBZ は SHP-2 と PD-1 の結合を阻害する

TIGIT, PD-1, BTLA は共通してチロシンフォスファターゼである SHP-2 と結合するモチーフ (ITIM または ITSM) を持つ¹⁸⁾。SHP-2 は通常、ITIM, ITSM モチーフと結合後リン酸化を受けて活性化すると、TCR シグナル下流分子 (ZAP-70, CD3 ζ) を脱リン酸化し、T細胞の活性を抑制する^{18,37-40)}。HBZ 存在下における PD-1 と SHP-2 の結合を免疫沈降法および免疫蛍光染色法で評価した。

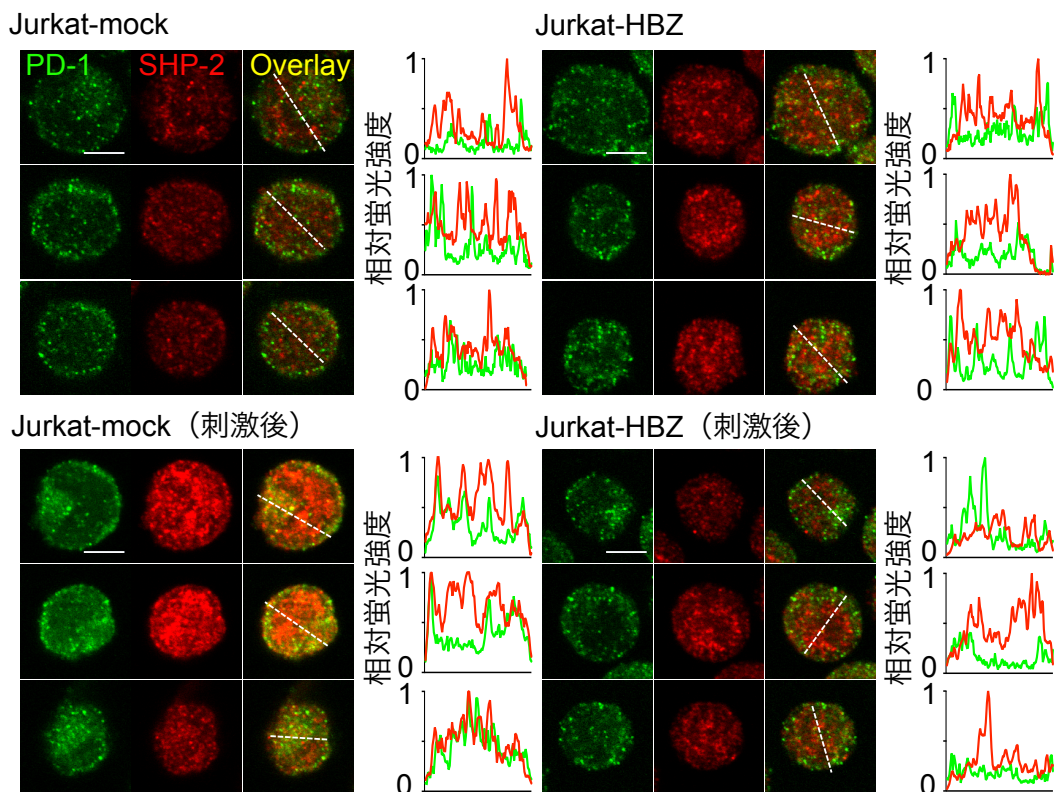
まず始めに、PD-1, SHP-2 および HBZ またはそのコントロール発現ベクター導入細胞を pervanadate で処理して SHP-2 のリン酸化を誘導後、PD-1 と SHP-2 の結合を免疫沈降法で評価した。HBZ 非存在下では PD-1 と SHP-2 の結合が認められた一方、HBZ 存在下ではこれらの結合は阻害されていた (図 3-5-1)。



次に、HBZ を定常発現する Jurkat 細胞株を用いて、内在性 PD-1 と SHP-2 の局在を免疫蛍光染色法で評価した。HBZ 非発現 Jurkat 細胞株 (Jurkat-mock) では pervanadate 処理後 PD-1 と SHP-2 が共局在している一方、HBZ 発現 Jurkat 細胞株 (Jurkat-HBZ) では、pervanadate 処理の有無に関わらず PD-1 と SHP-2 が共局在する割合は Jurkat-mock と比べて低下していた (図 3-5-2)。

以上の結果から HBZ は PD-1 と SHP-2 の結合を抑制することが明らかとなった。

A



B

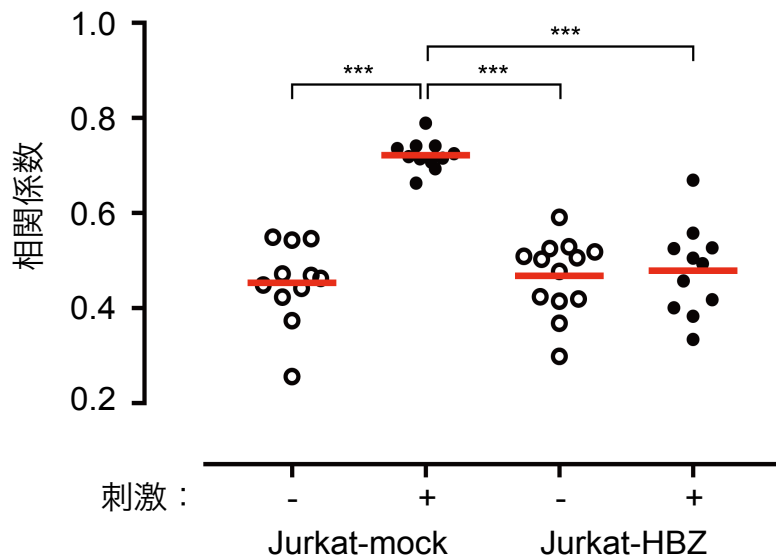


図 3-5-2. HBZ は SHP-2 と PD-1 の共局在を抑制する
(A) Jurkat-mock または Jurkat-HBZ を pervanadate (37°C、2 分間) で刺激し、内在性 PD-1 (緑色)、SHP-2 (赤色) の局在を免疫蛍光染色法および相対蛍光強度で評価した (スケールバー: 5 μm)。
(B) PD-1 と SHP-2 の局在をピアソン相関係数で評価した。

PD-1/PD-L1 の結合により PD-1 シグナルが活性化すると、PD-1 と TCR がマイクロクラスターを形成することが知られている⁴²⁾。本実験で用いた pervanadate 刺激が PD-1 と TCR のマイクロクラスター形成を誘導することを、免疫蛍光染色法で確認した (図 3-5-3)。

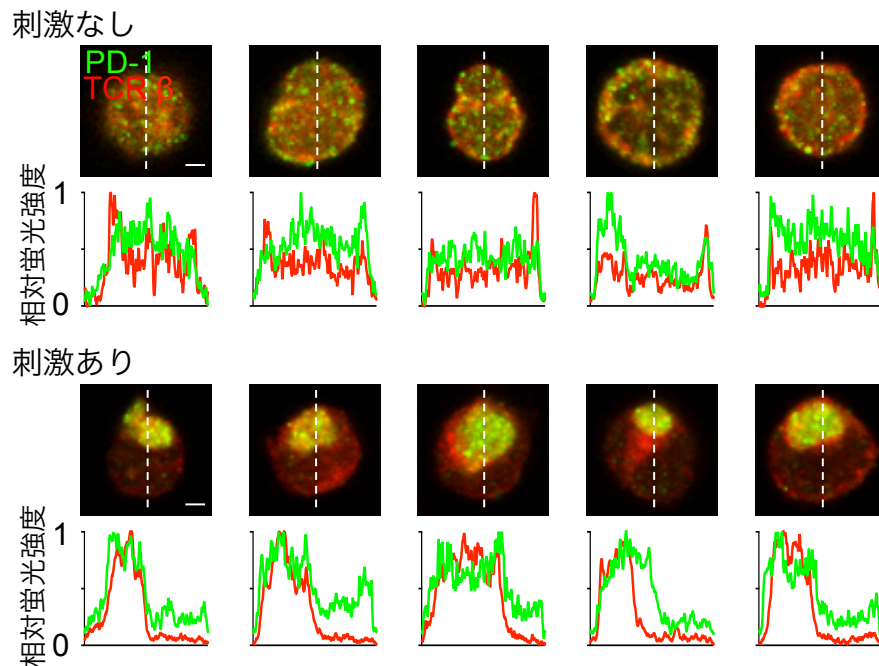


図 3-5-3. Pervanadate 刺激は TCR と PD-1 のマイクロクラスター形成を誘導する
Jurkat-mock を pervanadate (37°C、2 分間) で刺激し、内在性 PD-1 (緑色)、TCR β (赤色) の局在を免疫蛍光染色法および相対蛍光強度で評価した (スケールバー：2 μ m)。

3-6. HBZ は SHP-2 の活性を抑制する

SHP-2 は PD-1 と結合し、リン酸化を受け活性化すると知られている^{18,37,38)}。そこで、HBZ-Tg の CD4 陽性 T 細胞およびレトロウイルスベクターで HBZ を導入した CD4 陽性 T 細胞における SHP-2 のリン酸化レベルをフローサイトメトリーで評価した。両細胞において、コントロールと比べて SHP-2 のリン酸化、すなわち SHP-2 の活性は抑制されていた (図 3-6-1)。

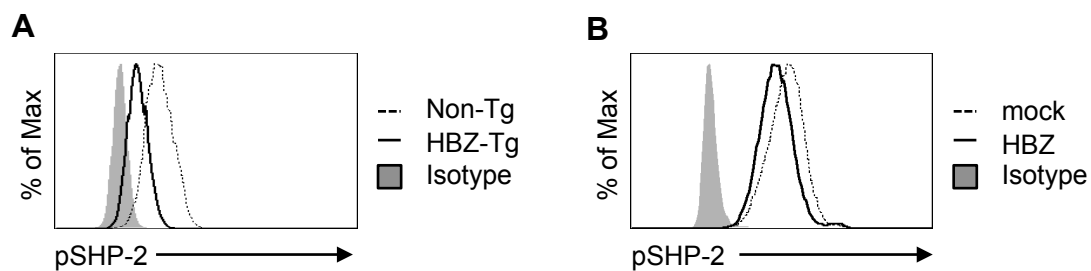


図 3-6-1. HBZ は SHP-2 のリン酸化を抑制する

(A) Non-Tg, HBZ-Tg の CD4 陽性 T 細胞における SHP-2 のリン酸化を評価した。(B) レトロウイルスベクターを用いて HBZ を導入したマウスの CD4 陽性 T 細胞における SHP-2 のリン酸化を評価した。リン酸化は、細胞に HBZ 導入後、抗 CD3 抗体および PD-L1Fc 結合 Dynabeads (細胞とビーズは 1:1 の割合) で 6 時間刺激後に測定した。リン酸化はフローサイトメトリーで評価した。

さらに SHP-2 の活性を評価するため、通常、リン酸化を受け活性化した SHP-2 が脱リン酸化を誘導する TCR シグナル下流分子 (ZAP-70, CD3 ζ) のリン酸化レベルを、HBZ を定常発現する Jurkat 細胞株を用いてウエスタンブロッティング法で解析した。H₂O₂ または pervanadate 処理後、Jurkat-mock では ZAP-70, CD3 ζ における SHP-2 のリン酸化レベルが経時的に衰退したが、Jurkat-HBZ では脱リン酸化が遅延することが明らかとなった (図 3-6-2. A, B)。

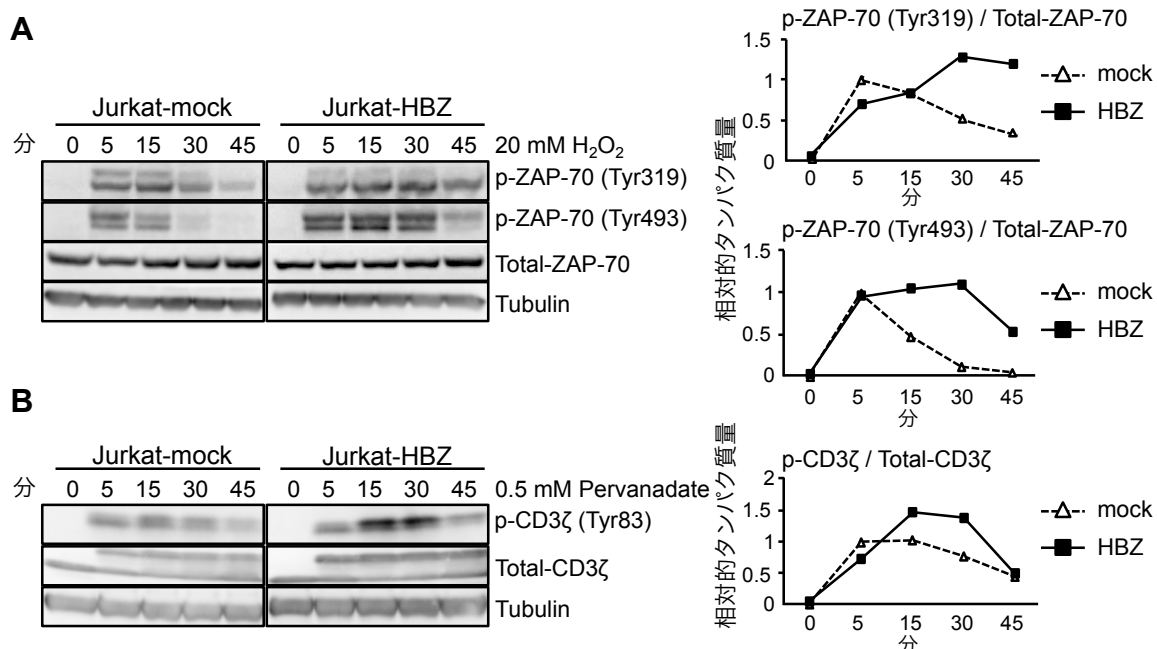


図 3-6-2. HBZ は ZAP-70, CD3 ζ の脱リン酸化を遅延させる

(A, B) ZAP-70, CD3 ζ の脱リン酸化をウエスタンブロッティング法で評価した。Jurkat-mock および Jurkat-HBZ は、20 mM H₂O₂ または 0.5 mM pervanadate で 0, 5, 15, 30, 45 分間刺激し、時間毎のリン酸化レベルを検出した。タンパク質量は densitometry も用いて評価した。各リン酸化レベルを全タンパク質量と比較して算出した。

一方、PD-1 は SHP-2 非依存的に PKC θ のリン酸化を抑制することが知られている⁴³⁾が、HBZ は PKC θ の脱リン酸化に影響は与えなかった (図 3-6-3)。

以上の結果から、HBZ は SHP-2 の活性を抑制することで TCR シグナル経路の活性を維持することが示唆された。

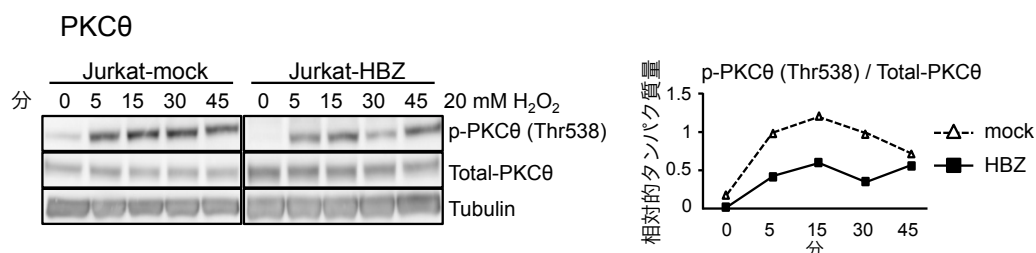


図 3-6-3. HBZ は PKC θ の脱リン酸化に影響を与えない

PKC θ の脱リン酸化をウエスタンブロッティング法で評価した。Jurkat-mock および Jurkat-HBZ は 20 mM H₂O₂ で 0, 5, 15, 30, 45 分間刺激し、時間毎のリン酸化レベルを検出した。タンパク質量は densitometry も用いて評価した。各リン酸化レベルを全タンパク質量と比較して算出した。

3-7. HBZ は THEMIS と結合し、SHP-2/Grb2/THEMIS の複合体形成を抑制する

通常 SHP-2 は Grb2, THEMIS と複合体を形成し、PD-1 と結合する²⁵⁾。HBZ 存在下で SHP-2 と PD-1 の結合は阻害されるが、HBZ が SHP-2/Grb2/THEMIS 複合体のどこと相互作用するか検討した。293FT 細胞株に THEMIS, SHP-2, Grb2, HBZ 発現ベクターを導入し、免疫沈降法で HBZ と各分子の結合を評価した。HBZ は THEMIS とのみ結合することが明らかとなった (図 3-7-1)。

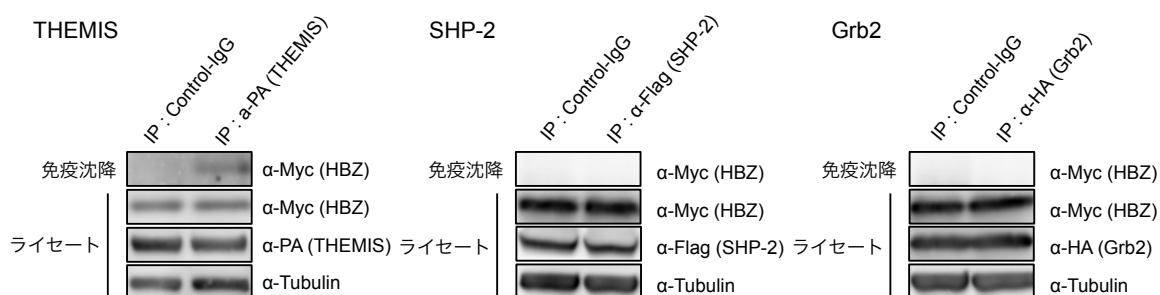
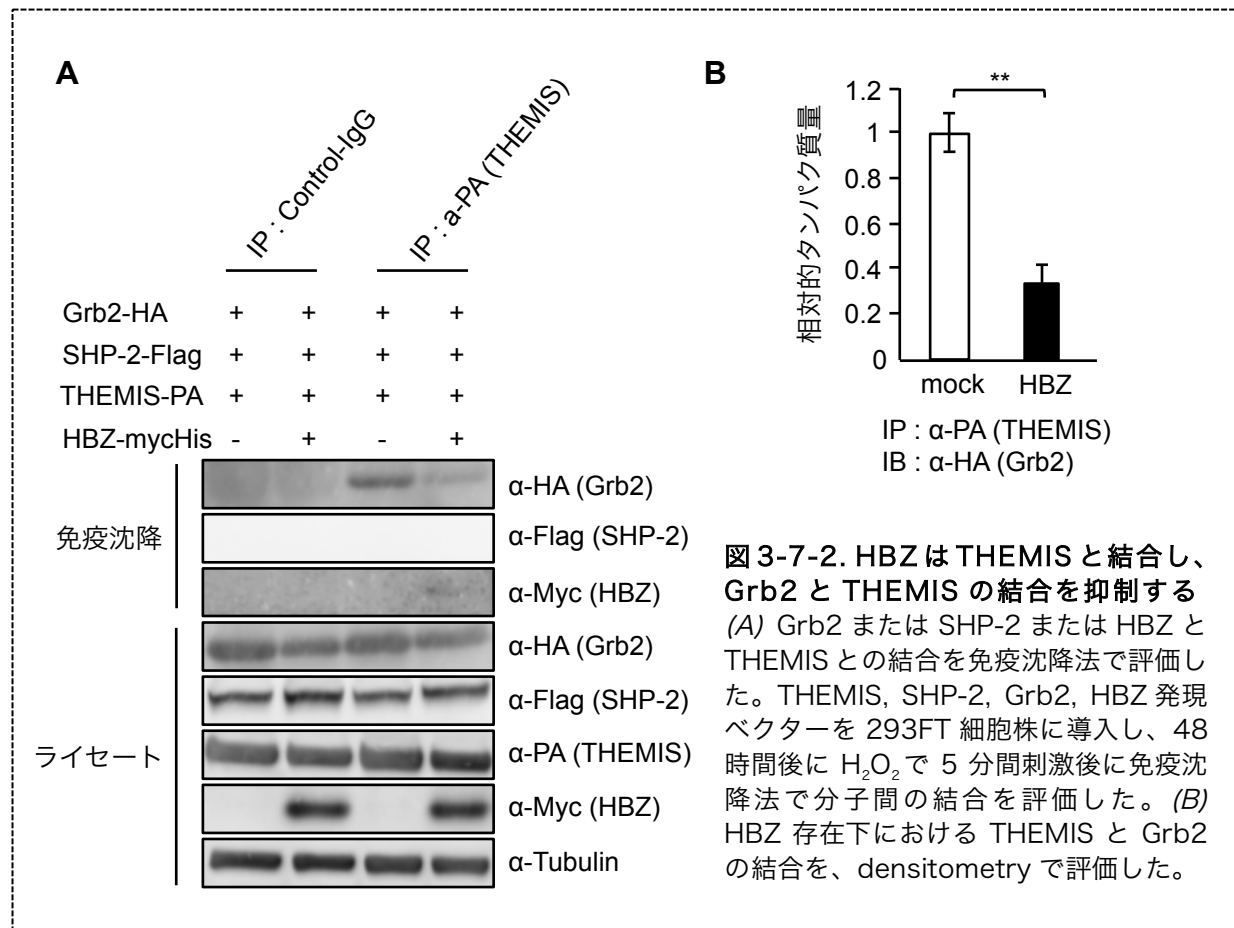


図 3-7-1. HBZ は THEMIS と結合する

THEMIS または SHP-2 または Grb2 と HBZ との結合を免疫沈降法で評価した。THEMIS, SHP-2, Grb2, HBZ 発現ベクターを 293FT 細胞株に導入し、48 時間後に H₂O₂ で 5 分間刺激後に免疫沈降法で分子間の結合を評価した。

さらに、293FT 細胞株に THEMIS, SHP-2, Grb2, HBZ を導入し、免疫沈降法で各分子間の結合を評価したところ、HBZ 存在下で Grb2 と THEMIS の結合が抑制された (図 3-7-2)。

以上の結果から、HBZ は THEMIS と結合することで SHP-2/Grb2/THEMIS の複合体形成を抑制し、SHP-2 の ITIM, ITSM モチーフとの結合を阻害することが示唆された。



HBZ 存在下における PD-1 と SHP-2/Grb2/THEMIS 複合体の局在は、抗 PD-1 抗体および抗 THEMIS 抗体でも評価した。Jurkat-mock では pervanadate 処理後 PD-1 と THEMIS が共局在している一方、Jurkat-HBZ では pervanadate 処理の有無に関わらず PD-1 と THEMIS が共局在する割合は Jurkat-mock と比べて低下していた (図 3-7-3)。

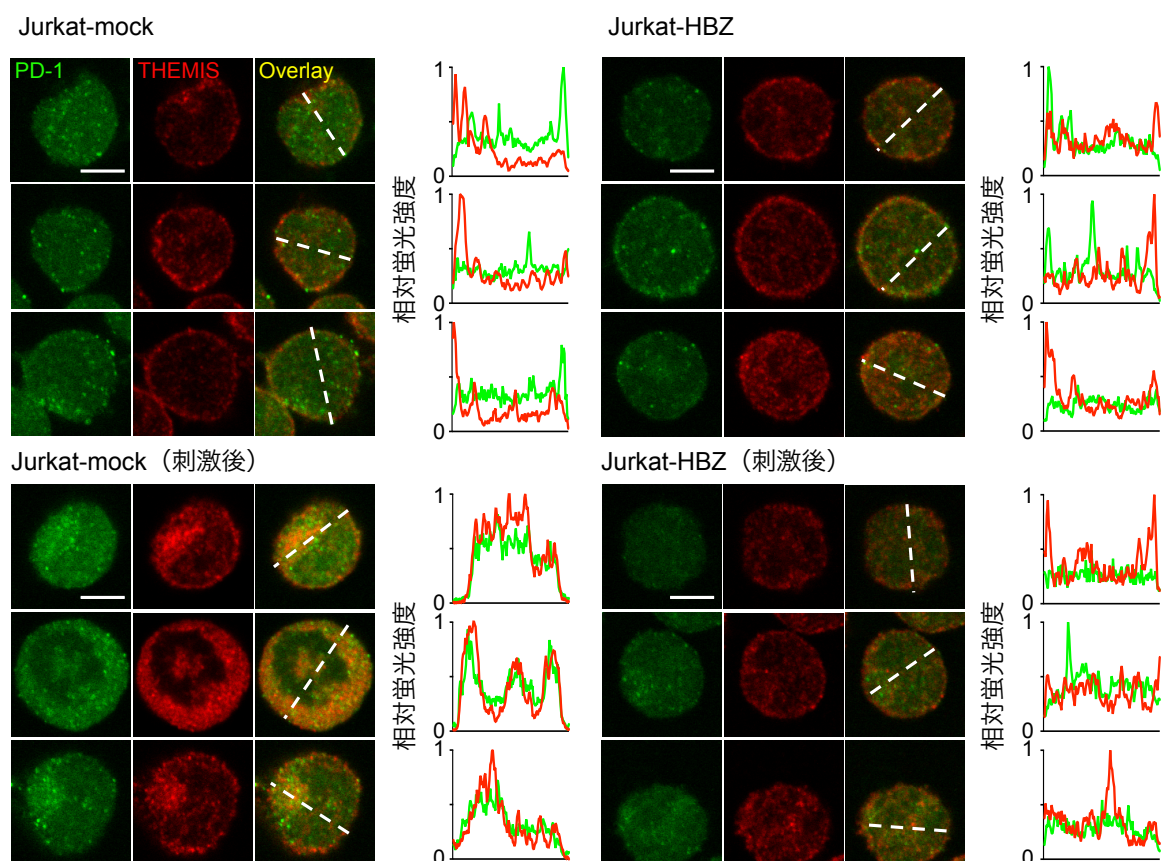


図 3-7-3. HBZ は PD-1 と THEMIS の共局在を抑制する

Jurkat-mock または Jurkat-HBZ を pervanadate (37°C、2 分間) で刺激し、内在性 PD-1 (緑色)、THEMIS (赤色) の局在を免疫蛍光染色法および相対蛍光強度で評価した (スケールバー: 5 μ m)。

3-8. THEMIS により HBZ は核から細胞質に局在を変える

HBZ は単独で主に核に存在し、THEMIS は細胞質に存在すると報告されてきた²⁹⁾。293T 細胞株に HBZ または THEMIS 発現ベクターを導入し、局在を免疫蛍光染色法で評価したところ、以前の報告通り、HBZ は主に核に局在し (67/74 細胞: 90.5%)、THEMIS は細胞質に局在していた (50/50 細胞: 100%) (図 3-8-1. A)。一方、HBZ と THEMIS を共発現させると、一部の HBZ は THEMIS と細胞質で共局在していた (28/79 細胞: 35.4%) (図 3-8-1. B)。すなわち、293T 細胞株に導入した THEMIS が HBZ の局在を核から細胞質に移動させたと考えられる。

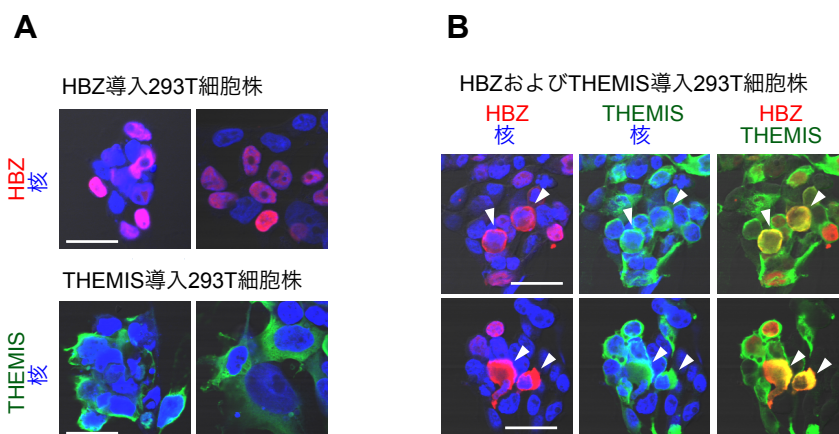


図 3-8-1. THEMIS は HBZ の局在を核から細胞質に変える

(A) 293T 細胞株に HBZ または THEMIS を単独導入した。(B) 293T 細胞株に HBZ および THEMIS を共導入した。HBZ と THEMIS の共局在は矢印で示した。(A, B) HBZ (赤色) および THEMIS (緑色) の局在を免疫蛍光染色法で評価した (スケールバー: 30 μ m)。核は DAPI (青色) で染色した。

一方、HBZ を発現する Jurkat 細胞株では、HBZ は核と細胞質の両方に局在した (図 3-8-2)。

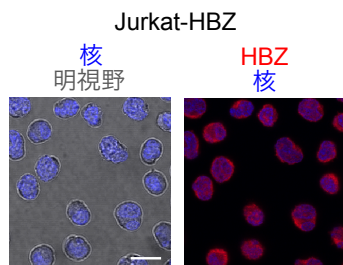


図 3-8-2. Jurkat-HBZ において HBZ は核と細胞質の両方に局在する

Jurkat-HBZ における HBZ (赤色) の局在を、抗 HBZ 抗体を用いて免疫蛍光染色法で評価した (スケールバー: 10 μ m)。核は DAPI (青色) で染色した。

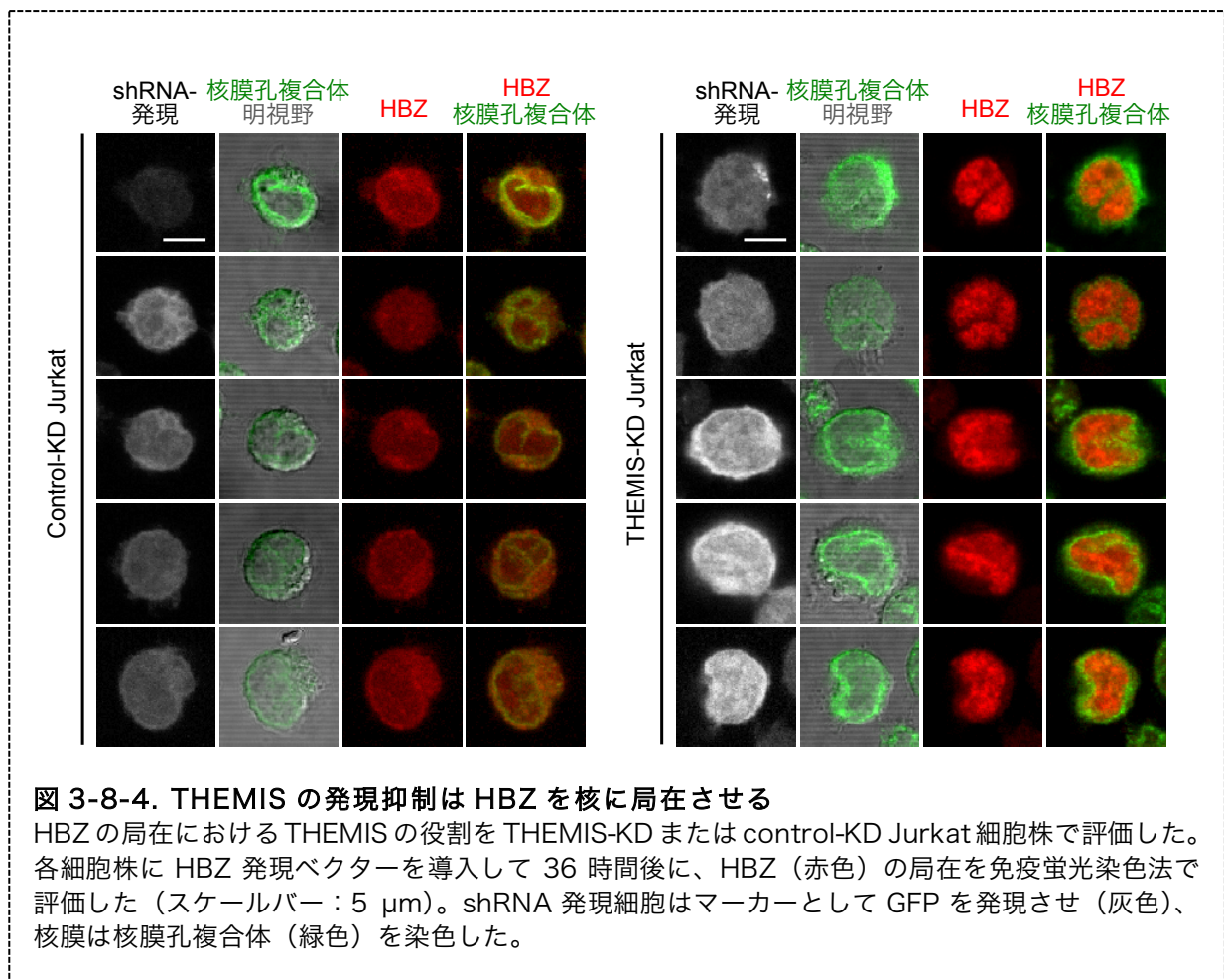
次に、293T 細胞株および Jurkat 細胞株における THEMIS の発現をウエスタンブロットリング法で評価したところ、THEMIS は Jurkat 細胞株でのみ発現することが明らかとなり (図 3-8-3)、HBZ の細胞質内局在は THEMIS の発現に依存することが示唆された。



図 3-8-3. THEMIS は HBZ の局在を核から細胞質に変える

293T 細胞株および Jurkat 細胞株における THEMIS の発現をウエスタンブロットリング法で評価した。

さらに、THEMIS をノックダウンした Jurkat 細胞株 (THEMIS-KD Jurkat) における HBZ の局在を免疫蛍光染色法で評価した。コントロール Jurkat 細胞株 (control-KD Jurkat) では HBZ は核と細胞質の両方に局在しているのに対し、THEMIS-KD Jurkat では、HBZ が核に存在していた (図 3-8-4)。HBZ の核から細胞質への局在移動は THEMIS に依存することが明らかとなった。



3-9. まとめ

以上の結果から、細胞質に移動した HBZ は THEMIS と結合することで SHP-2/Grb2/THEMIS の複合体形成を抑制し、SHP-2 の抑制性免疫補助受容体との結合を阻害することが明らかとなった。さらに、SHP-2 の抑制性免疫補助受容体との結合抑制により、SHP-2 の活性抑制および TCR シグナル下流分子 (ZAP-70, CD3 ζ) の脱リン酸化が遅延され、T 細胞の増殖は促進されることが明らかとなった (図 3-9)。

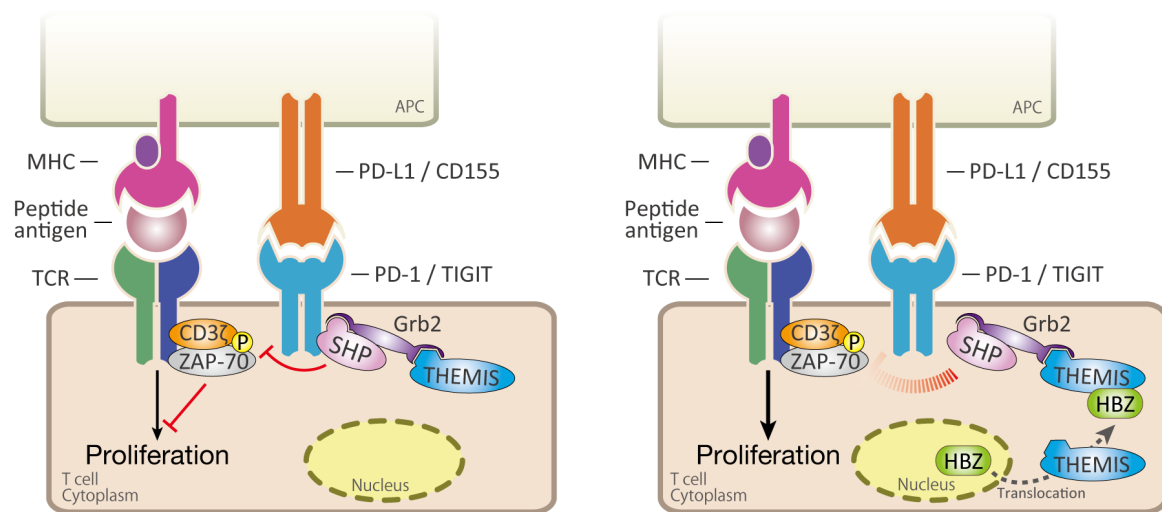


図 3-9. まとめ

本研究で明らかにした、HBZ が抑制性免疫補助受容体の機能を阻害し T 細胞の増殖を促進させる機構を図で示した。

第四章 考察

HTLV-1 は様々な細胞に感染できるが、感染者の体内では主に CD4 陽性 T 細胞に感染していることが知られている^{16,28,45)}。HTLV-1 が T 細胞を特異的に増殖させる機構が存在することが推定されていたが、その機構は不明であった。本研究では、HBZ が複数の抑制性免疫補助受容体シグナルを 2 種類の機構で抑制することにより、TCR シグナルの感受性を高め、T 細胞の増殖を促進させることを明らかにした。一つ目は、抑制性免疫補助受容体である BTLA と LAIR-1 の発現を HBZ が抑制することにより、T 細胞の増殖を促進させる機構である。二つ目は、HBZ が TIGIT, PD-1 の発現を亢進させるがその抑制機能は阻害し、T 細胞の増殖を促進させる機構である。

T 細胞上の PD-1 は、樹状細胞上の PD-L1, -L2 との結合により、T 細胞に抑制シグナルを伝達するだけでなく、リバーシブルシグナルを介して樹状細胞の成熟抑制および抑制性サイトカイン産生を亢進し、免疫回避に寄与すると報告されている²²⁻²⁴⁾。これらの報告から、HBZ が宿主の免疫機構を巧みに利用し、宿主免疫から回避していることが示された。さらに、本研究により、HBZ が T 細胞において SHP-2 を介した抑制性シグナルを阻害することで、HTLV-1 感染細胞の増殖を促進させることが明らかとなった。すなわち、HBZ は HTLV-1 が宿主免疫から逃れながら感染細胞を増殖させるために、抑制性免疫補助受容体の発現を亢進させ、同時にその機能を変換していると考えられる。

近年、RNA シーケンスにより 57 例の ATL におけるトランスクリプトーム解析が行われた。その結果、約 7% の症例で CTLA-CD28 または ICOS-CD28 融合遺伝子が認められ、本来 ATL 細胞に導入される抑制性シグナルが活性化シグナルに変換される可能性が示唆された。さらに、CD28 遺伝子の増幅が高頻度で同定され、刺激性免疫補助受容体である CD28 が ATL における遺伝子異常の主な標的であることが明らかとなった⁴¹⁾。感染細胞および変異のない ATL 細胞においては、HBZ による抑制性免疫補助受容体の抑制機能阻害により増殖が亢進しているが、TCR を介するシグナル系に変異が生じると、その活性化が強化され発がんにつながることを推測される。

さらに、最近の報告で、ATL をはじめとする様々な種類のがん細胞において、PD-L1 遺伝子の 3' UTR に欠失や逆位、転座などの異常が認められ、これらの構造異常が PD-L1 遺伝子の発現を亢進することが明らかとなった³⁵⁾。通常がん細胞における PD-L1 の過剰発現は、PD-1 を発現する CD8 陽性 T 細胞に抑制シグナルを導入し、宿主免疫の回避に寄与する。ATL 細胞では PD-L1 だけでなく PD-1 も発現

するため、PD-1/PD-L1 相互作用により ATL 細胞の増殖抑制が予想される。しかしながら、本研究によって HBZ が PD-1 からの抑制シグナルを阻害することが明らかとなり、ATL 細胞と CD8 陽性 T 細胞との PD-1/PD-L1 相互作用による ATL 細胞の増殖抑制作用は阻害されることが示された。HTLV-1 感染細胞および ATL 細胞は、刺激性免疫補助受容体と抑制性免疫補助受容体の両方の発現や機能に異常をもたらすことで増殖を促進させ、免疫機能を錯乱することで宿主の攻撃から巧みに逃れることが明らかとなった。

本研究で HBZ と結合し PD-1 と SHP-2 との結合を阻害することが明らかとなった THEMIS は、T 細胞でのみ発現することが知られている^{25,26)}。HTLV-1 のレセプターは glucose transporter として知られる GLUT-1 であり²⁷⁾、*in vivo* では T 細胞だけでなく B 細胞、単球など様々な細胞に感染できる²⁸⁾。しかし、なぜ *in vivo* で T 細胞のみが増殖するのかは、これまで不明であった。本研究によって、HBZ が T 細胞特異的に発現する THEMIS と結合することで、T 細胞における増殖抑制機能を阻害することが明らかになり、T 細胞特異的な HBZ の増殖促進機序を解明したと考えられる。

これまで HBZ は主に核に局在し²⁹⁾、p65 や Smad3, c-Jun などの転写因子や p300 などの宿主因子と相互作用することが報告されてきた³⁰⁻³³⁾が、近年、HBZ が、mTOR シグナルを活性化させる GADD34 と細胞質で結合することが報告されている³⁴⁾。本研究では、THEMIS が HBZ と結合して、その局在を核から細胞質に変化させることで、HBZ が細胞質において抑制性免疫補助受容体の機能を阻害することを示した。THEMIS の発現抑制により、HBZ が主に核に局在するようになったことから、THEMIS が T 細胞において HBZ の局在を変化させている責任分子であることが明らかになった。

本研究によって得られた知見は、ATL に対する有効な治療薬開発に貢献できるものと考えられる。特に、HTLV-1 感染細胞および ATL 細胞の増殖促進に関わるシグナル経路、シグナル分子が明らかとなり、SHP-2/Grb2/THEMIS 複合体または免疫補助受容体分子の ITIM, ITSM モチーフは治療薬開発において有効な分子標的となり得ると期待される。

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、絶え間ない御指導と御鞭撻を賜りました、京都大学 松岡雅雄先生、安永純一郎先生、志村和也先生に心より感謝申し上げます。

また、京都大学 朝長啓造先生には主指導教員として、京都大学 土方誠先生、加藤博己先生には副指導教員として多くの御指導、御助言を頂きました。さらに、京都大学 稲葉カヨ先生、伊豫田智典先生、Paola Miyazato さん、大西知帆さんには共著者としてご協力を頂きました。

最後に、諸事に渡り御指導、御協力を頂きました本研究室スタッフならびに大学院生の諸兄諸姉に深く感謝申し上げます。

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。

Haruka Kinosada, Jun-ichirou Yasunaga, Kazuya Shimura, Paola Miyazato, Chiho Onishi, Tomonori Iyoda, Kayo Inaba, and Masao Matsuoka.

HTLV-1 bZIP Factor Enhances T-cell Proliferation by Impeding the Suppressive Signaling of Co-inhibitory Receptors

PLoS Pathogens, 13, e1006120, 2017

引用文献

- 1) Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. Hinuma Y, Nagata K, Haneoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita K.I, Shirakawa S, and Miyoshi I: *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6476-6480, 1981.
- 2) Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan. Arisawa K, Soda M, Endo S, Kurokawa K, Katamine S, Shimokawa I, Koba T, Takahashi T, Saito H, Doi H, and Shirahama S: *Int J Cancer* **85**, 319-324, 2000.
- 3) Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein. Peloponese JM Jr, and Jeang KT: *J Biol Chem* **281**, 8927-8938, 2006.
- 4) Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. Xiao G, Cvijic ME, Fong A, Harhaj EW, Uhlik MT, Waterfield M, and Sun SC: *EMBO J* **20**, 6805-6815, 2001.
- 5) Functional inactivation of p53 by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein: mechanisms and clinical implications. Tabakin-Fix Y, Azran I, Schavinsky-Khrapunsky Y, Levy O, and Aboud M: *Carcinogenesis* **27**, 673-681, 2006.
- 6) Transcriptional up-regulation of the cyclin D2 gene and acquisition of new cyclin-dependent kinase partners in human T-cell leukemia virus type 1-infected cells. Santiago F, Cleark E, Chong S, Molina C, Mozafari F, Mahieux R, Fujii M, Azimi N, and Kashanchi F: *J Virol* **73**, 9917-9927, 1999.
- 7) Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. Yoshida M: *Annu Rev Immunol* **19**, 475-496, 2001.
- 8) Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. Grossman WJ, Kimata JT, Wong FH, Zutter M, Ley TJ, and

Ratner L: *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1057-1061, 1995.

9) Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, and Hall WW: *Nat Med* **12**, 466-472, 2006.

10) Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms. Taniguchi Y, Nosaka K, Yasunaga J, Maeda M, Muller N, Okayama A, and Matsuoka M: *Retrovirology* **2**, 64, 2005.

11) Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. Takeda S, Maeda M, Morikawa S, Taniguchi Y, Yasunaga J, Nosaka K, Tanaka Y, and Matsuoka M: *Int J Cancer* **109**, 559-567, 2004.

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

13) Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. Furukawa Y, Kubota R, Tara M, Izumo S, and Osame M: *Blood* **97**, 987-993, 2001.

14) 5'-long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vitro and in vivo. Koiwa T, Hamano-Usami A, Ishida T, Okayama A, Yamaguchi K, Kamihara S, and Watanabe T: *J Virol* **76**, 9389-9397, 2002.

15) Human T-cell leukemia virus type 1(HTLV-1) infectivity and cellular transformation. Matsuoka M, and Jeang KT: *Nat Rev Cancer* **7**, 270-280, 2007.

16) HTLV-1 basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, and Matsuoka M: *Proc Natl*

Acad Sci U S A **103**, 720-725, 2006.

17) HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. Satou Y, Yasunaga J, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, Shimizu K, Ohshima K, Green PL, Ohkura N, Yamaguchi T, Ono M, Sakaguchi S, and Matsuoka M: *PLoS Pathog* **7**, e1001274, 2011.

18) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. Chen L, and Flies DB: *Nat Rev Immunol* **13**, 227-242, 2013.

19) Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease. Attanasio J, and Wherry EJ: *Immunity* **44**, 1052-1068, 2016.

20) Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4+ T-cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. Shimauchi T, Kabashima K, Nakashima D, Sugita K, Yamada Y, Hino R, and Tokura Y: *Int J Cancer* **121**, 2585-2590, 2007.

21) PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. Kozako T, Yoshimitsu M, Fujiwara H, Masamoto I, Horai S, White Y, Akimoto M, Suzuki S, Matsushita K, Uozumi K, Tei C, and Arima N: *Leukemia* **23**, 375-382, 2009.

22) HTLV-1 bZIP Factor Impairs Anti-viral Immunity by Inducing Co-inhibitory Molecule, T Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT). Yasuma K, Yasunaga J, Takemoto K, Sugata K, Mitobe Y, Takenouchi N, Nakagawa M, Suzuki Y, and Matsuoka M: *PLoS Pathog* **12**, e1005372, 2016.

23) Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4+ T cell activation. Kuipers H, Muskens F, Willart M, Hijdra D, van Assema FB, Coyle AJ, Hoogsteden HC, and Lambrecht BN: *Eur J Immunol* **36**, 2472-2482, 2006.

24) Interaction between dendritic cells and T cells during peripheral virus

infections: a role for antigen presentation beyond lymphoid organs? Bedoui S, and Gebhardt T: *Curr Opin Immunol* **23**, 124-130, 2011.

25) A THEMIS: SHP1 complex promotes T-cell survival. Paster W, Bruger AM, Katsch K, Gregoire C, Roncagalli R, Fu G, Gascoigne NR, Nika K, Cohnen A, Feller SM, Simister PC, Molder KC, Cordoba SP, Dushek O, Malissen B, and Acuto O: *EMBO J* **34**, 393-409, 2015.

26) THEMIS, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. Lesoume R, Uehara S, Lee J, Song KD, Li L, Pinkhasov J, Zhang Y, Weng NP, Wildt KF, Wang L, Bosselut R, and Love PE: *Nat Immunol* **10**, 840-847, 2009.

27) The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, and Battini JL: *Cell* **115**, 449-459, 2003.

28) In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira J, Iwamasa T, Goto I, and Yamamoto N: *Virology* **196**, 25-33, 1993.

29) Nuclear localization of HTLV-1 bZIP factor (HBZ) is mediated by three distinct motifs. Hivin P, Frederic M, Arpin-Andre C, Basbous J, Gay B, Thebault S, and Mesnard JM: *J Cell Sci* **118**, 1355-1362, 2005.

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

31) An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ. Clerc I, Polakowski N, Andre-Arpin C, Cook P, Barbeau B, Mesnard JM, and Lemasson I: *J Biol Chem* **283**, 23903-23913, 2008.

- 32) Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-kappaB. Zhao T, Yasunaga J, Satou Y, Nakao M, Takahashi M, Fujii M, and Matsuoka M: *Blood* **113**, 2755-2764, 2009.
- 33) HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- β signaling through p300 coactivator. Zhao T, Satou Y, Sugata K, Miyazato P, Green PL, Imamura T, and Matsuoka M: *Blood* **118**, 1865-1876, 2011.
- 34) HTLV-1 HBZ positively regulates the mTOR signaling pathway via inhibition of GADD34 activity in the cytoplasm. Mukai R, and Ohshima T: *Oncogene* **33**, 2317-2328, 2014.
- 35) Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. Kataoka K, Shiraishi Y, Takeda Y, Sakata S, Matsumoto M, Nagano S, Maeda T, Nagata Y, Kitanaka A, Mizuno S, Tanaka H, Chiba K, Ito S, Watatani Y, Kakiuchi N, Suzuki H, Yoshizato T, Toshida K, Sanada M, Itonaga H, Imaizumi Y, Totoki Y, Munakata W, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Masuda K, Minato N, Kashiwase K, Izutsu K, Takaori-Kondo A, Miyazaki Y, Takahashi S, Shibata T, Kawamoto H, Akatsuka Y, Shimoda K, Takeuchi K, Seya T, Miyano S, and Ogawa S: *Nature* **534**, 402-406, 2016.
- 36) SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* **173**, 945-954, 2004.
- 37) Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. Liu S, Zhang H, Li M, Hu D, Li C, Ge B, Jin B, and Fan Z: *Cell Death Differ* **20**, 456-464, 2013.
- 38) TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in melanoma patients. Chauvin JM, Pagliano O, Fourcade J, Sun Z, Wang H, Sander C, Kirkwood JM, Chen TH, Maurer M, Korman AJ, and Zarour HM: *J Clin Invest* **125**, 2046-2058, 2015.

- 39) A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, and Honjo T: *Nat Immunol* **14**, 1212-1218, 2013.
- 40) Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. Nirschl CJ, and Drake CG: *Clin Cancer Res* **19**, 4917-4924, 2013.
- 41) Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Shiraishi Y, Shimamura T, Yasunaga J, Totoki Y, Chiba K, Sato-Otsubo A, Nagae G, Ishii R, Muto S, Kotani S, Watatani Y, Takeda J, Sanada M, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Yoshida K, Makishima H, Iwanaga M, Ma G, Nosaka K, Hishizawa M, Itonaga H, Imaizumi Y, Munakata W, Ogasawara H, Sato T, Sasaki K, Muramoto K, Penova M, Kawaguchi T, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Nakamaki T, Ishiyama K, Miyawaki S, Yoon SS, Tobinai K, Miyazaki Y, Takaori-Kondo A, Matsuda F, Takeuchi K, Nureki O, Aburatani H, Watanabe T, Shibata T, Matsuoka M, Miyano S, Shimoda K, and Ogawa S: *Nat Genet* **47**, 1304-1315, 2015.
- 42) Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, and Saito T: *J Exp Med* **209**, 1201-1217, 2012.
- 43) PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ . Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, Qiu Y, Jussif JM, Carter LL, Wood CR, and Chaudhary D: *FEBS Lett* **574**, 37-41, 2004.
- 44) HTLV-1 bZIP Factor RNA and Protein Impart Distinct Functions on T-cell Proliferation and Survival. Mitobe Y, Yasunaga J, Furuta R, and Matsuoka M: *Cancer Res* **75**, 4143-4152, 2015.

