

HTLV-1 関連脊髄症発症を決定する宿主-ウイルス因子解明 —疾患発症・重症化リスクを規定する動的ゲノム因子解明に向けて—

1. 研究の目的

ナノポア・ロングリードシーケンサー(ナノポア LRS)を用いたゲノム内のウイルス挿入配列のターゲット解析系の構築によるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(HTLV-1)感染者の末梢血単核細胞(PBMC)の解析

本研究では、宿主ゲノムのウイルス挿入部位、ウイルスゲノム全長配列、周辺のヒトゲノム配列と DNA メチル化を、1つの実験系・解析システムにより検出し、1人の人間の体内で動的に変化するウイルス・宿主ゲノムの違いに注目し、難病である HTLV-1 関連脊髄症(HAM)の発症に至る病態の解明を目指す。HTLV-1 は、ヒトに感染すると 95%は無症候性キャリア(AC)として生涯持続感染するが、5%では成人 T 細胞白血病(ATL)を、0.3%では HTLV-1 関連脊髄症(HAM)を発症する。しかし、なぜ同じウイルスの感染が異なる疾患発症へと運命づけられるのかは最大の謎である。HAM 患者の感染細胞では、ATL とはトランスクリプトームが異なり、HAM 特異的に免疫応答を引き起こす遺伝子が発現することが知られているが、なぜこれらの遺伝子発現の違いが生じるのか不明である。数十年にわたって感染が持続する間に、HTLV-1 プロウイルスのゲノム配列には欠失や点変異が見られる。しかし、長年にわたって引き起こされる HTLV-1 プロウイルスゲノムの動的な変化が、疾患発症にどう関わるのかについては不明である。ATL 細胞においては、感染 T 細胞はクローナルな増殖をきたすため、プロウイルスゲノム配列は同一であるが、HAM 患者のウイルス感染細胞はポリクローナルであることが知られており、プロウイルスゲノム配列が異なっている可能性がある。また、宿主ゲノム内に挿入されたプロウイルス内の機能性配列や宿主ゲノム構造の破壊により、宿主の遺伝子発現に関わるゲノム・エピゲノム機能を変化させる可能性があり、宿主ゲノムが動的に変化することも重要な因子と考えられる。このように、ウイルス・宿主のゲノム配列の変化が、疾患発症の上流となり、感染 T 細胞の機能的な変化の引き金となる可能性があるにもかかわらず、1つの感染細胞レベルにおいてのゲノム変化が細胞に与える影響は、これまで調べられていない。申請者らが、本邦で先駆けて医学研究への応用の道を開いてきた技術であるナノポア LRS は 1 分子シーケンシングであり、人工膜に埋め込まれたポアタンパク質を DNA 分子が通過する際に引き起こされる電流の変化から、ディープラーニングによって通過した配列を解析するものである。よって、5-メチルシトシン(5-mC)や 5-ヒドロキシメチルシトシン(5-hmC)等の DNA 分子のメチル化修飾も検出可能である。さらに従来のショートリード型の次世代シーケンサーではたった 150bp 程度を読むだけなのに対して、20kbp 以上もの長い DNA 分子を連続して読むことができる。本研究では、20kbp 以上もの長鎖 DNA を解読できるナノポア LRS を用いて 9kbp の長さのウイルスおよび周辺のヒトゲノム配列を読み、1細胞レベルで全長 HTLV-1 プロウイルスゲノム配列と、宿主への挿入部位を 1細胞レベルで解析することで、HAM 発症に至る原因を探る。ナノポア LRS は DNA 塩基の修飾を検出することが可能であり、エピゲノム変化としての DNA 修飾を検出し宿主ゲノム機能へ与える影響を明らかにする。希少疾患である HAM は多数の臨床検体を得ることが困難であるが、本研究は長年 HTLV-1 関連疾患患者の臨床研究に携わってきた医師・研究者との連携による患者レジストリに蓄積された 600 人以上の検体を利用可能である。これにより、宿主および HTLV-1 プロウイルスゲノム配列の動的な変化を細胞ごとに HTLV-1 の発症ハイリスク系統を明らかにし、HAM 疾患に至る過程を解明する。

2. 研究の計画

(1) ナノポア LRS 解析系の構築と感染細胞株における解析評価

- ① PromethION P2soloシーケンサーを設置し、GPUコンピューターを用いたシーケンシング解析系を構築する
- ② 最適なガイドRNA配列を決定し、HTLV-1感染細胞株である TL-0m1 及び MT2 を用いた Cas9 エンリッチメント実験の最適化を行う。

(2) ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(HTLV-1)感染者の末梢血単核細胞(PBMC)の解析

- ① HAM患者5例のPBMC由来DNAを用いたロングリードデータを取得し、ウイルス挿入部位の解析を行う
- ② HAM患者の感染細胞をFACSにより濃縮し、Cas9エンリッチメント解析を行う。

3. 研究の成果

(1) ナノポア LRS 解析系の構築と感染細胞株における解析評価

① HAM特異点機な一塩基多型を3種類、ATL特異点機な一塩基多型を5種類見出しており、これらを評価しながら、データベース内で多型の見られる箇所を含まないようにガイドRNAを作成し、Cas9の切断効率を比較し、最も効率の良いガイドRNA配列を決定した。配列は特許申請を行う予定である。P2solo PromethIONシークエンサーの設置を行い、感染細胞株による予備実験では十分なデータ量が取得できることを示した。特に、ナノポアLRSでは2023年にこれまでのR9.4タイプのシークエンスポアタンパク質からR10.4への完全移行が決定し、R9.4が販売中止となるため、R10.4でのCas9エンリッチメント実験を初めて構築することになったが、試薬や実験系の最適化を行うことで、遜色なくデータを取得することができることを示した（2024年8月22日のナノポアユーザーミーティングで発表予定）。

(2) ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染者の末梢血単核細胞 (PBMC) の解析

① HTLV-1プロウイルスゲノム配列の挿入部位同定のため、比較的感染細胞の多いHAM患者5例のPBMC由来DNAを用いたロングリードデータの解析を行った。プロウイルスゲノム内部の塩基配列はクローン間でよく保たれており、新規の変異はほとんど認めなかったにも関わらず、構造多型は多様性に富み、検出されたうちの26%がdefectiveなタイプであった。しかも、宿主ゲノムを巻き込む複雑な構造多形も見られ、これまでに考えられてきた以上に複雑なゲノム構造をとっていると考えられた。また、ターゲットサイト重複は従来6塩基と考えられてきたが、26%で6塩基以外であり、中には100塩基を超える重複や欠失も見られた。

②(1)で構築したターゲット手法によりHTLV-1プロウイルスゲノム配列の濃縮手法の構築を行なったところ、挿入部位におけるメチル化の違いや配列の違いを検出することが可能であった。ショートリードシークエンサーを用いたRAISING-NGS法により取得したデータとの比較を行い、セントロメア配列のような繰り返し配列へのウイルスゲノム挿入でも同定することが可能であることを示した。現在、検体を増やして解析を進めている。

4. 研究の反省・考察

(1) ナノポア LRS 解析系の構築と感染細胞株における解析評価

① 概ね計画通りに解析系の構築ができた。感染株では考えられていたよりも多様な構造多型がみられることがわかり、ヒトにおける感染について新たな知見が得られる可能性を示していると考えられた。

(2) ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染者の末梢血単核細胞 (PBMC) の解析

①患者細胞株の解析には感染細胞が必要であり、FACSによるソーティングを必要とした。長年にわたり、HTLV-1患者レポジトリに登録されている約600例のAC(200例)、HAM(300例)から感染細胞数の多いものを選定し解析を行っているが、すべての検体を解析するためにはエンリッチメントのさらなる効率化を目指す必要があると考えられた。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし
- (2) 口頭発表
なし
- (3) 出版物
なし