

次世代シーケンスを活用した レトロウイルス研究

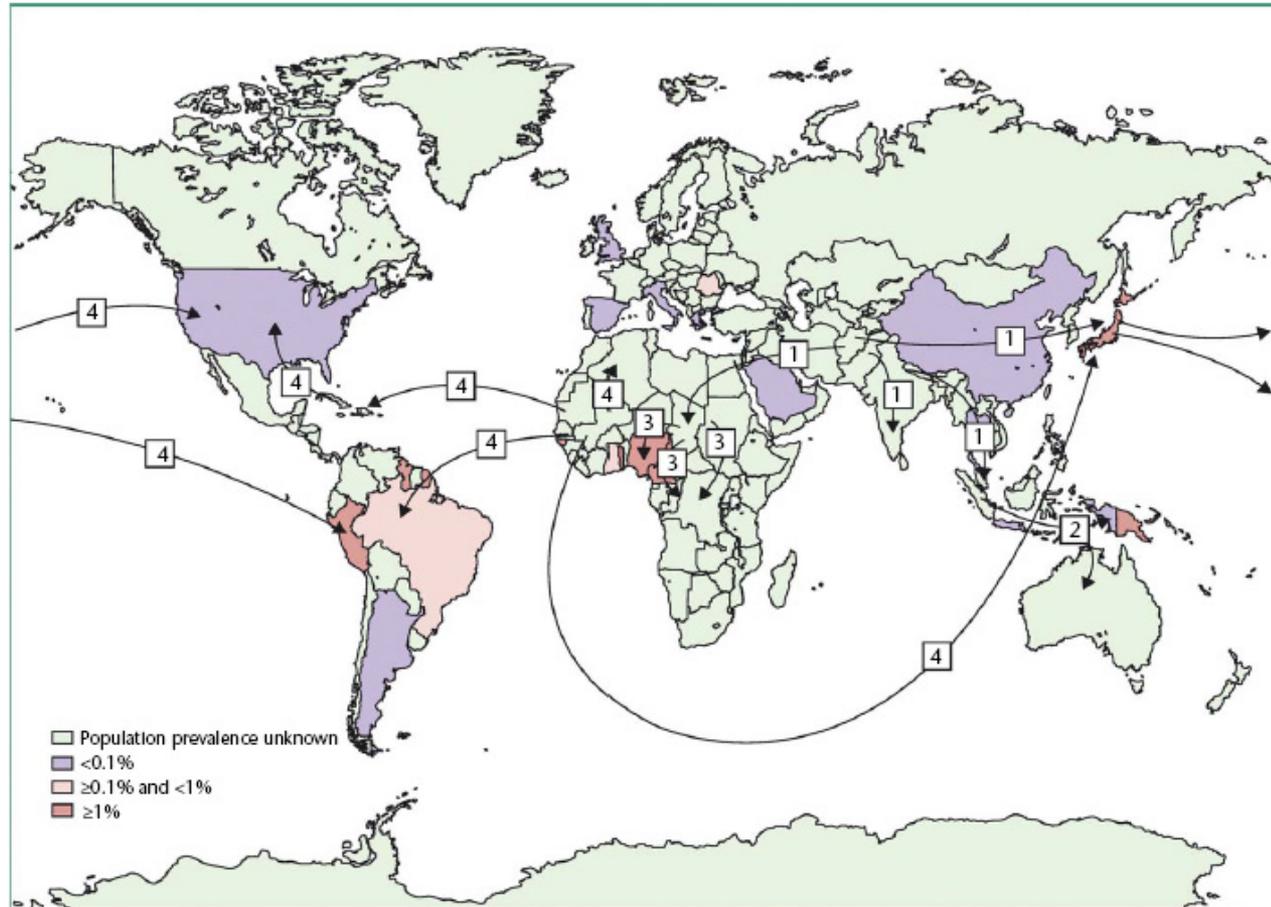
佐藤 賢文

International Research Center for Medical Sciences (IRCMS)

Center for AIDS Research, Kumamoto University, Japan

HTLV-1 (human T-cell leukemia virus type 1)

Origin, spread and prevalence of HTLV-1

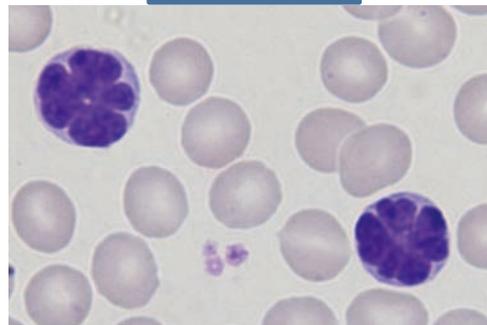


from Verdonck K. et al (2007): Lancet Infectious Diseases 7(4): 266.

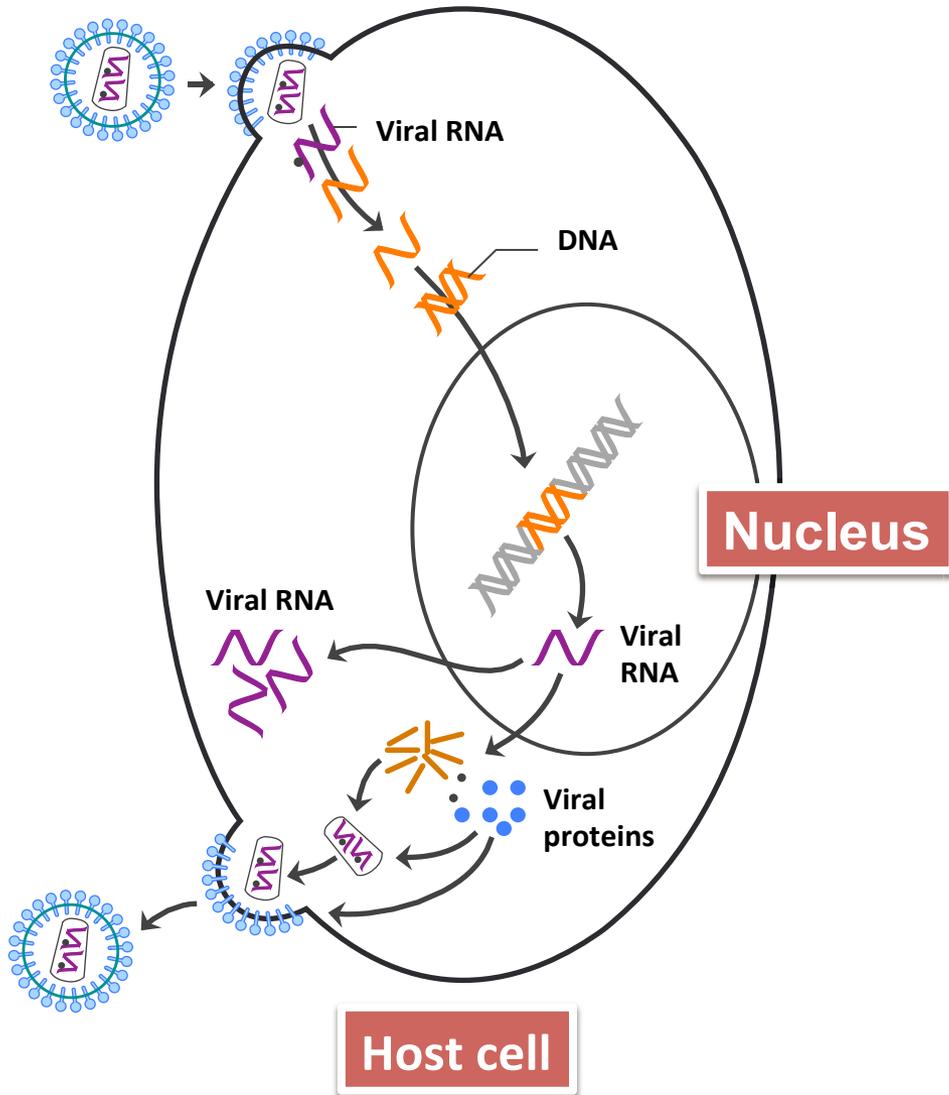
HTLV-1 (human T-cell leukemia virus type 1)

- **endemic retrovirus in tropical area including south-west Japan**
- **most of the carriers are asymptomatic**
- **about 5 % of the carriers develop leukemia of infected cells**
(adult T-cell leukemia; ATL)
- **Some carriers develop chronic inflammatory diseases,**
such as HTLV-1 associated myelopathy (HAM/TSP)

ATL cells



Life cycle of retrovirus



HIV-1



Virus production is very high

Induce cell apoptosis



AIDS

HTLV-1



Virus production very low

Induce cell expansion

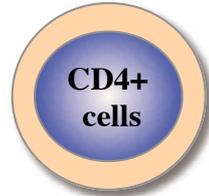


ATL

ヒトレトロウイルス感染症

HIV-1

Virus



抗ウイルス療法無し



Apoptosis



AIDS

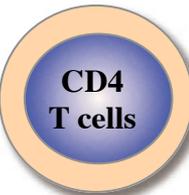


Latent/Persistent infection

抗ウイルス療法

HTLV-1

Virus



抗ウイルス療法無し



Latent/Persistent infection



Asymptomatic carrier

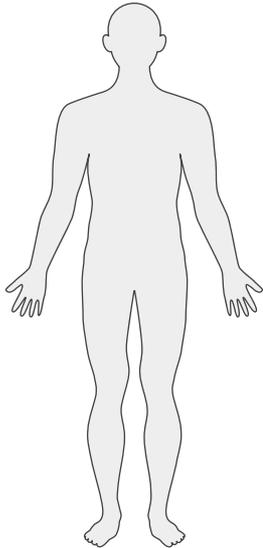
5%



Leukemia of CD4+ T cells (ATL)

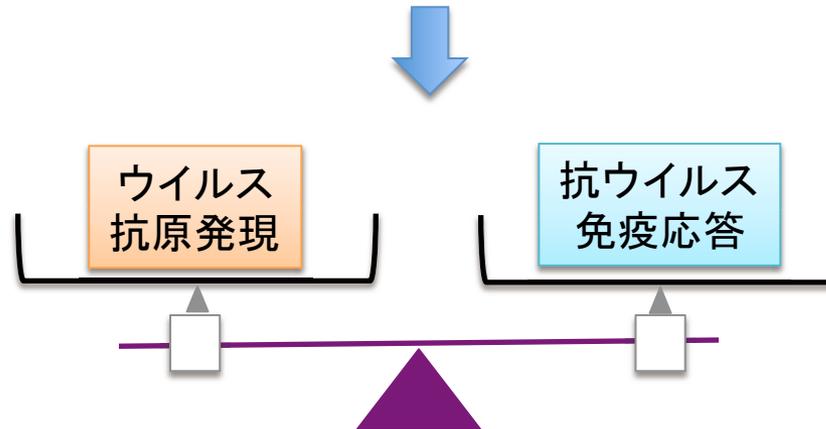
ウイルス抗原発現と抗ウイルス免疫のバランス

HTLV-1
carrier



血中のウイルスは検出されないが、感染細胞の割合は高い(1%)

抗ウイルス免疫応答が観察される (CTLや抗体)



感染者体内にある感染細胞クローンの中から、最も生存(増殖)に適したクローンが腫瘍細胞として出現する

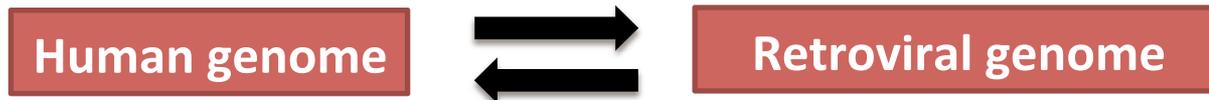
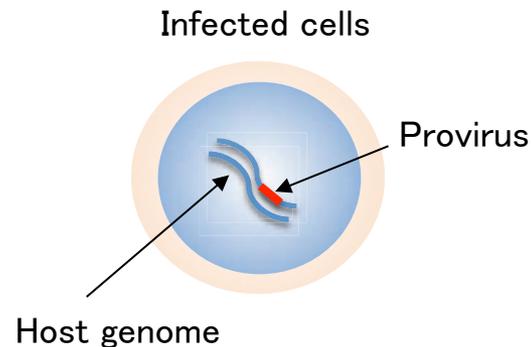
ウイルス抗原発現制御が、感染細胞の生き残りのキーとなるメカニズム

Interaction between the host and retroviral genome

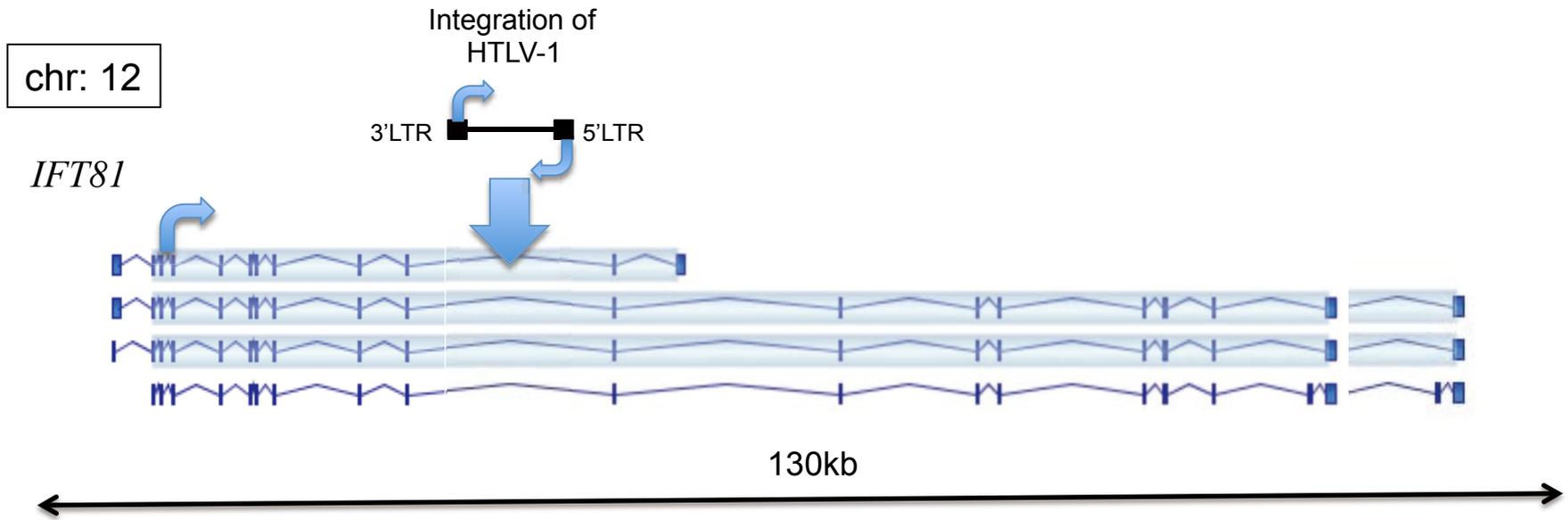
HTLV-1 replicates mainly via clonal expansion of infected cells



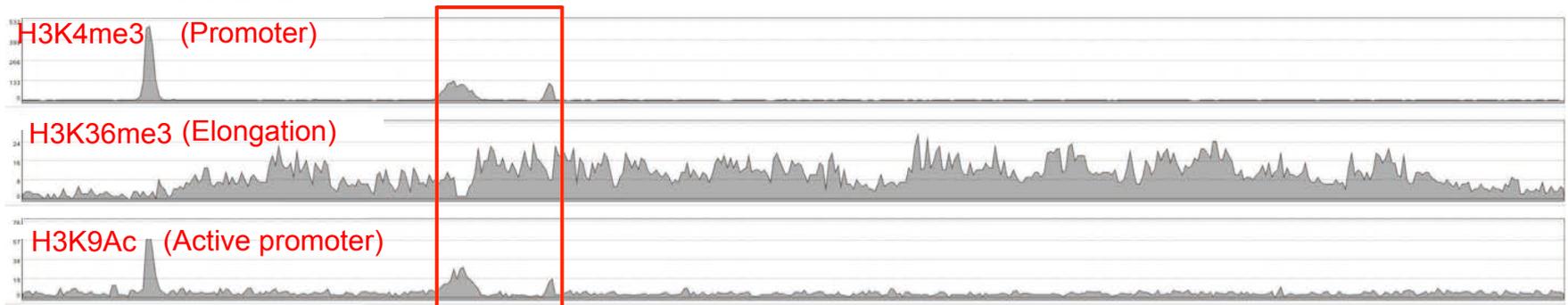
**Provirus transcription should be regulated
to evade host immunity**



HTLV-1 integration site in an ATL clone



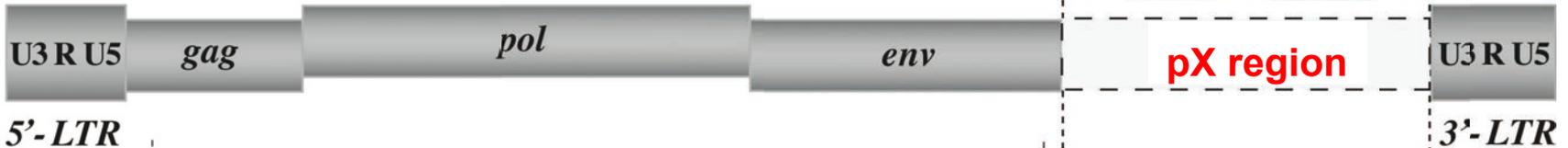
ChIP-seq (epigenetic marks)



Structure of HTLV-1

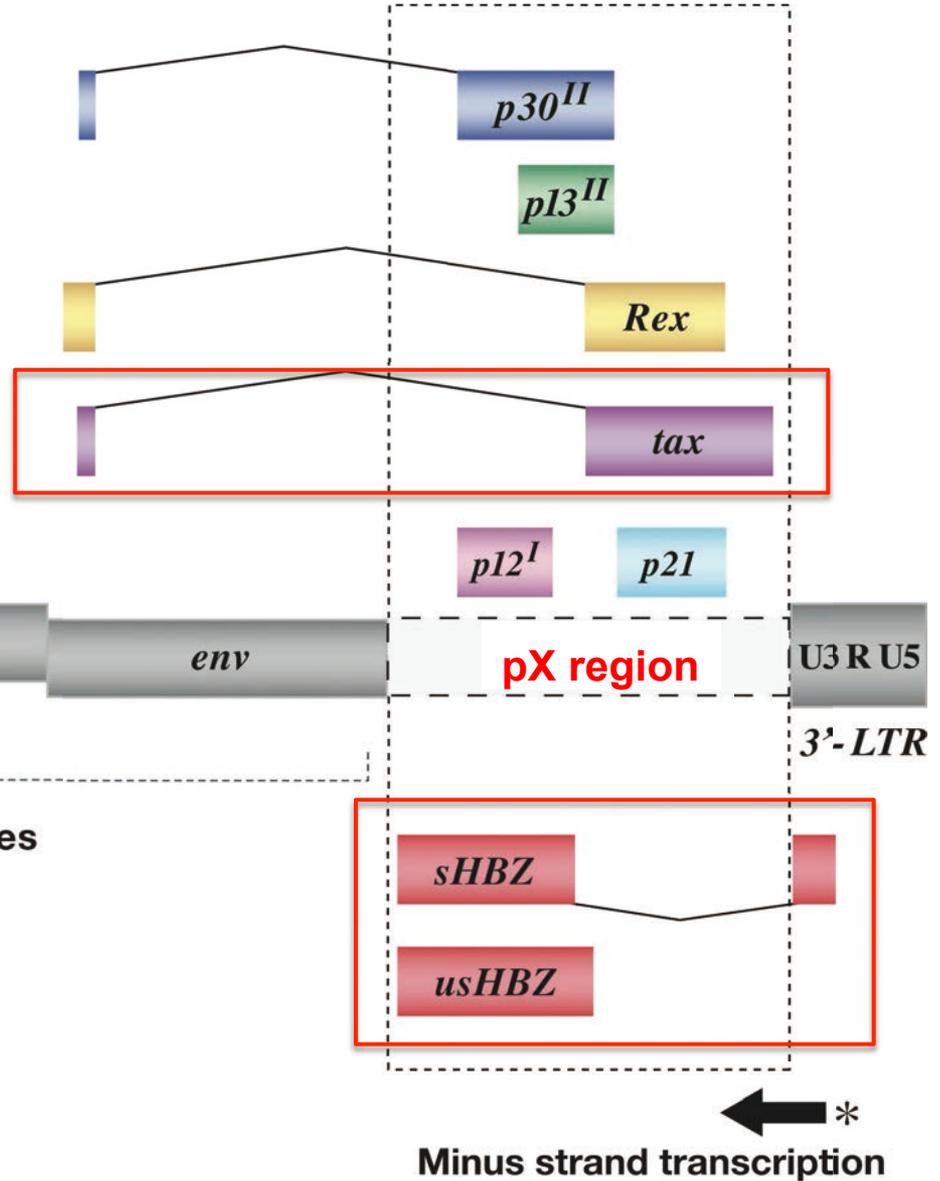
- small genome size (9kb)
- both plus and minus strand transcription

Plus strand transcription

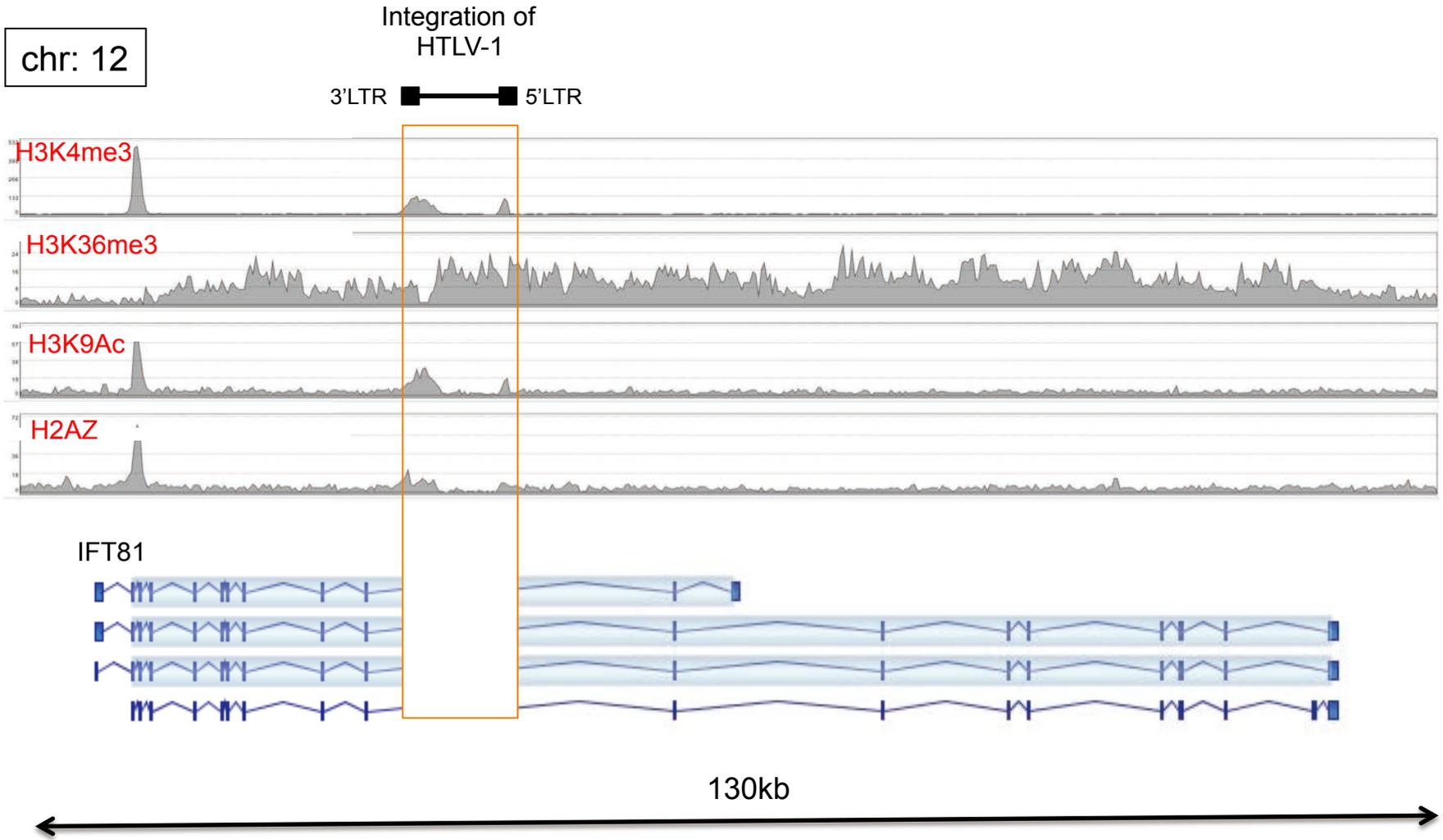


Structural genes

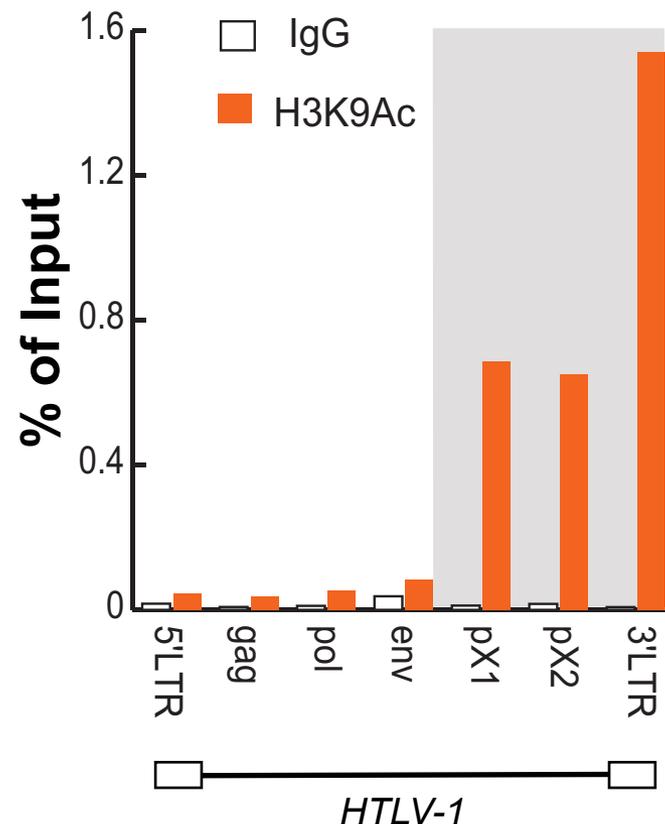
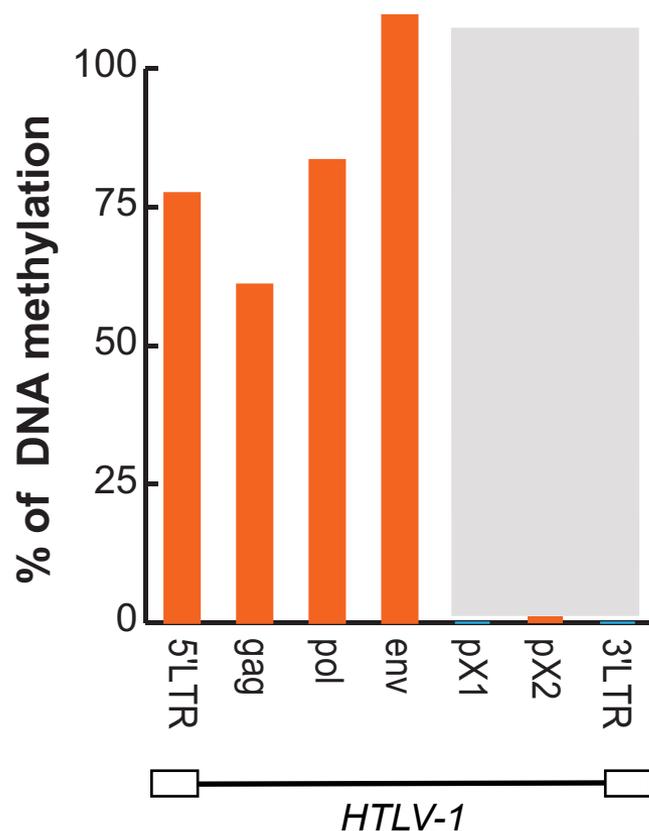
- Tax --- activator of 5'LTR
multiple oncogenic activity
- HBZ --- multiple oncogenic activity
expansion of infected cells



Example of integration of HTLV-1 into a host gene



Epigenome pattern of HTLV-1 provirus



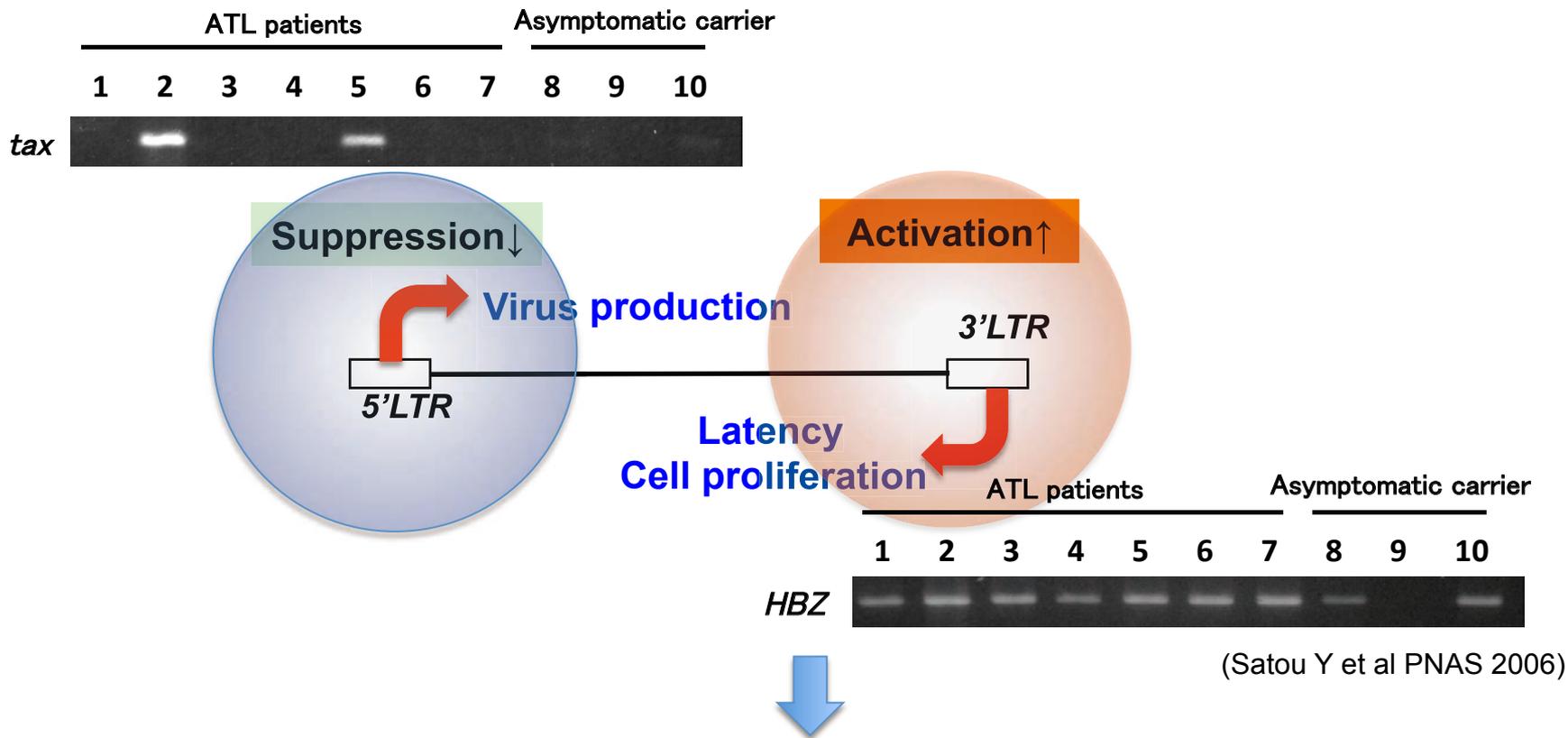
Koiwa et al, JV 2002

Takeda et al, Int J Cancer 2004

Taniguchi, Retrovirology, 2005

(an ATL cell line, ED)

Typical pattern of proviral transcription in ATL cells



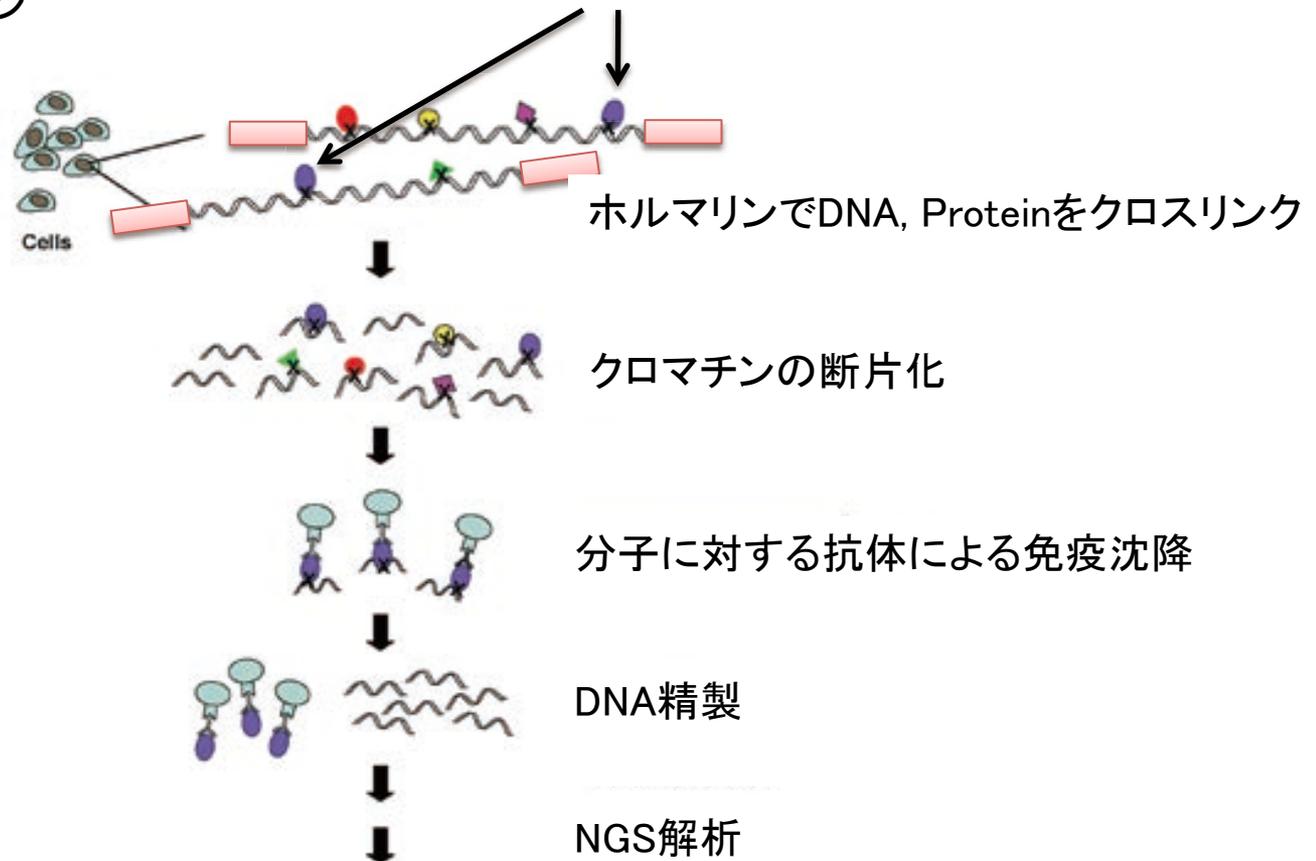
このプロウイルスの転写パターンが感染細胞の免疫からの回避を可能にし、細胞の生き残り(がん化)に関与する

この転写パターンを規定するのは？ インスレーター？

クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay, ChIP-seq)

ウイルス感染細胞
由来クロマチン

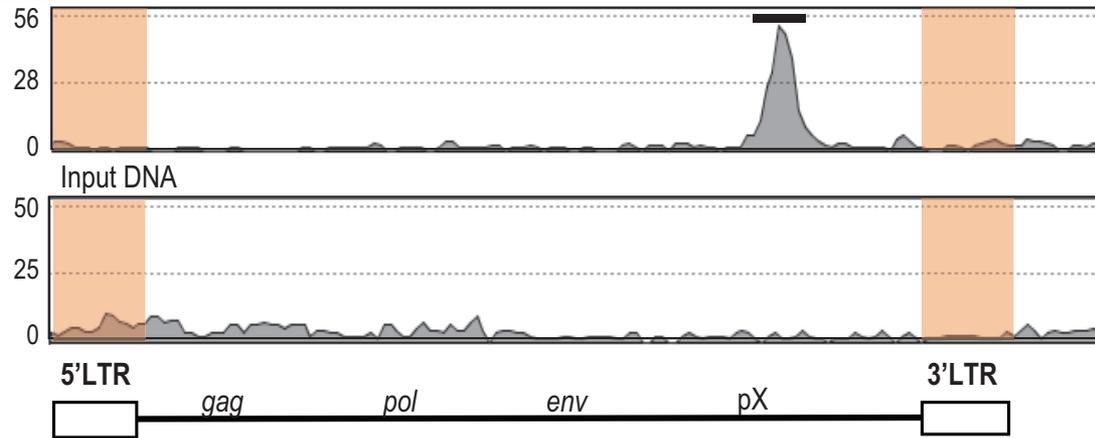
DNA結合蛋白 or ヒストン蛋白



HTLV-1へのマッピング

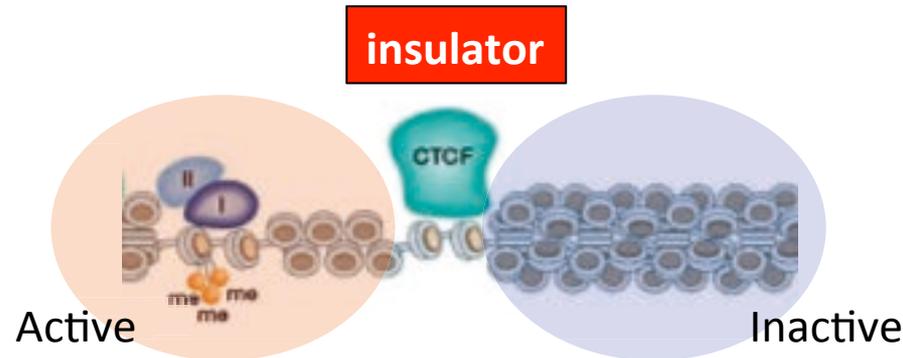
ChIP-seq analysis of an ATL cell line

CTCF



CTCF (CCCTC-binding factor)

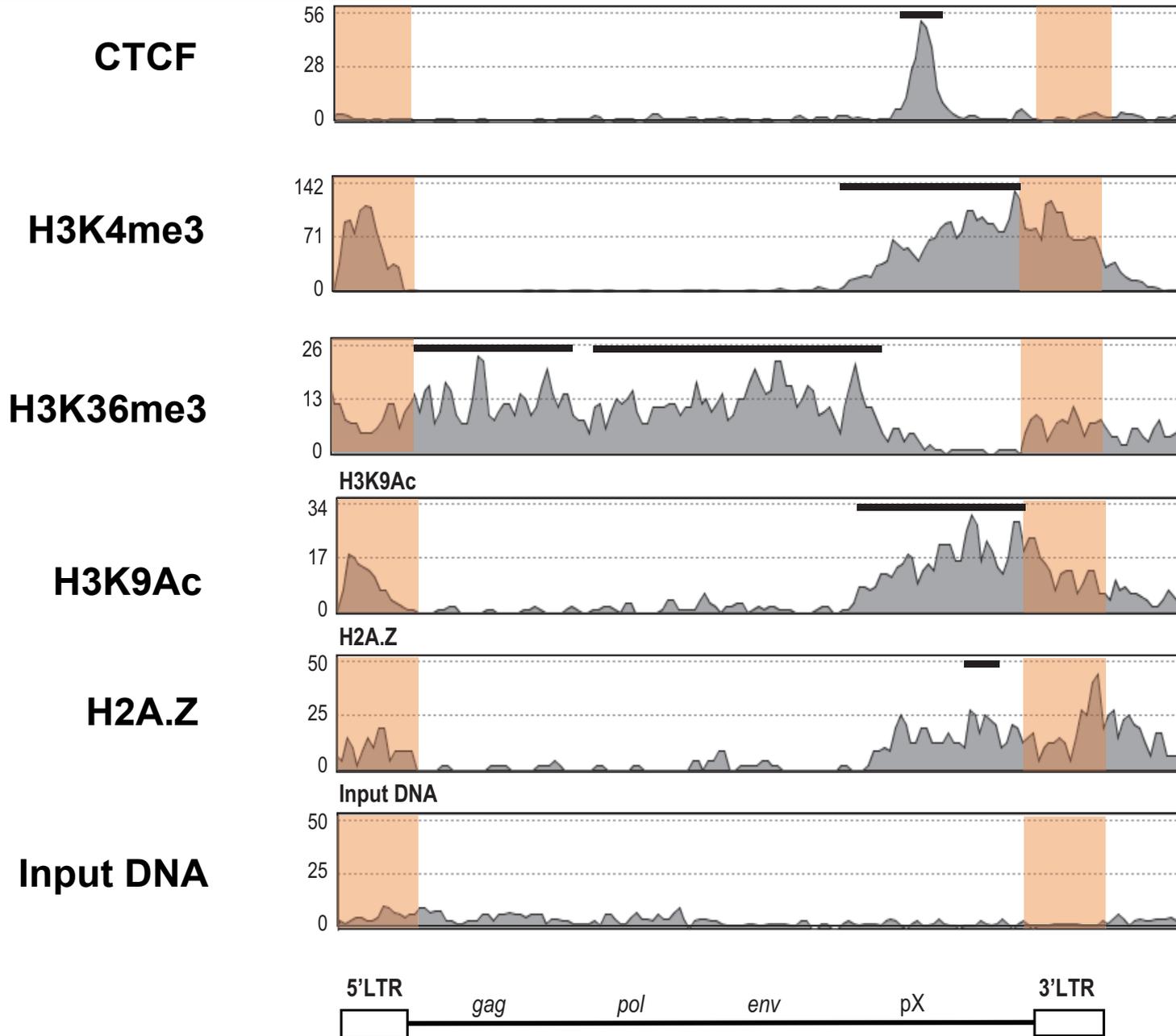
- A DNA-binding protein, critical organizer of higher-order chromatin structure



Chromatin looping

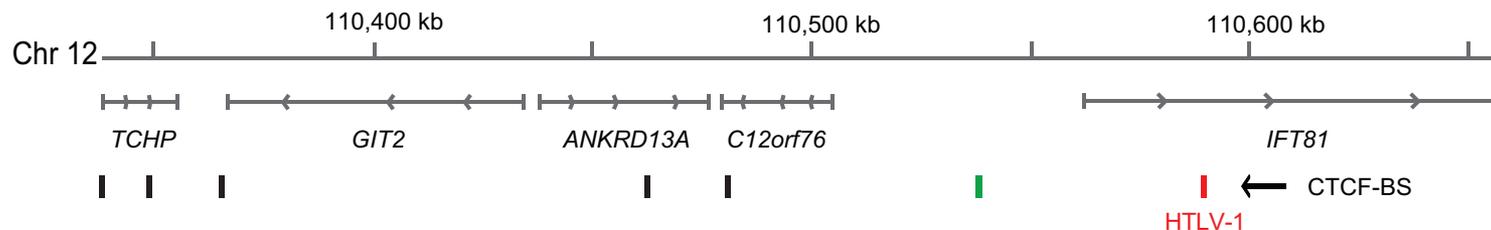
CTCF forms DNA looping and regulates intra- and inter-chromosomal interaction.

ChIP-seq analysis of an ATL cell line

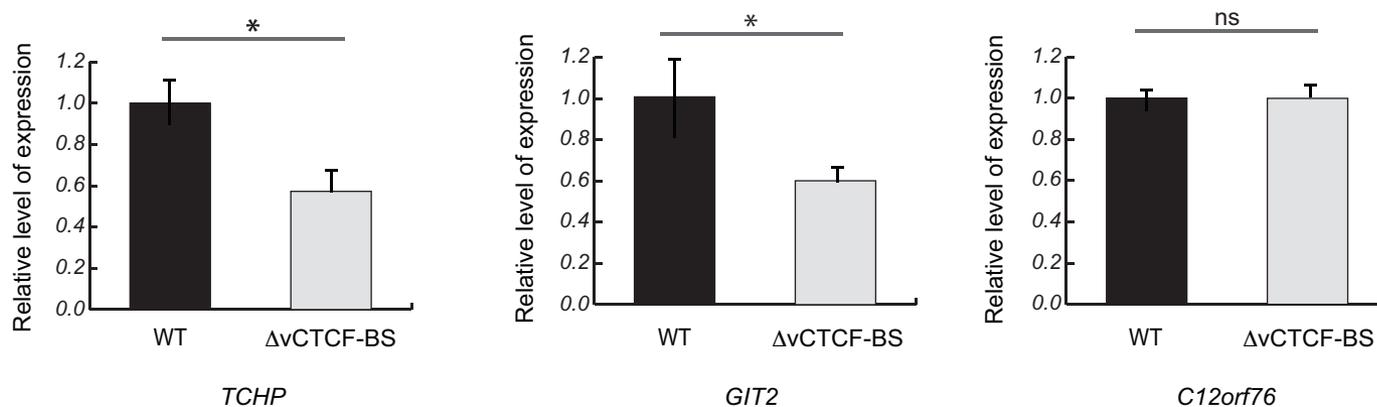


ウイルスへのCTCF結合が周囲の宿主遺伝子発現へ与える影響

C

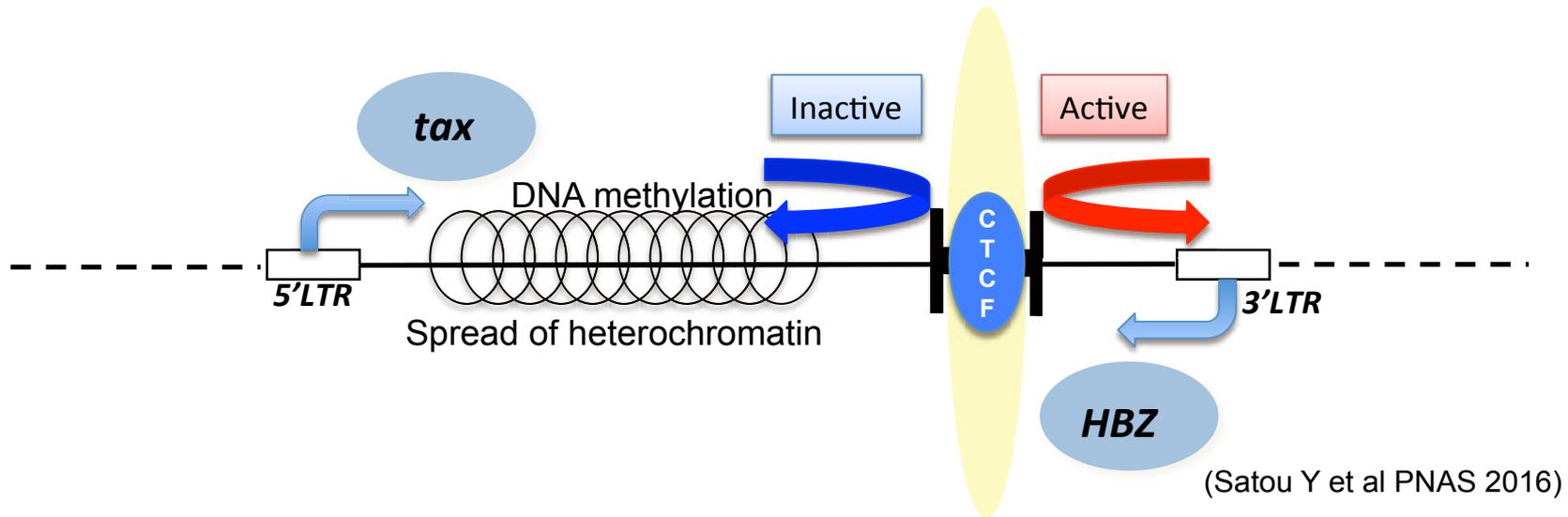


D



ウイルス挿入による異所性CTCF結合部位によって
周囲のヒト遺伝子発現レベルが変化する

Summary (1)



- ウイルスがCTCFという宿主因子を活用することでプロウイルスの転写制御を行っている
- 外来性レトロウイルスに存在するCTCF結合部位としては初めての例

なぜ5'側は抑制で、3'側は活性化なのか？

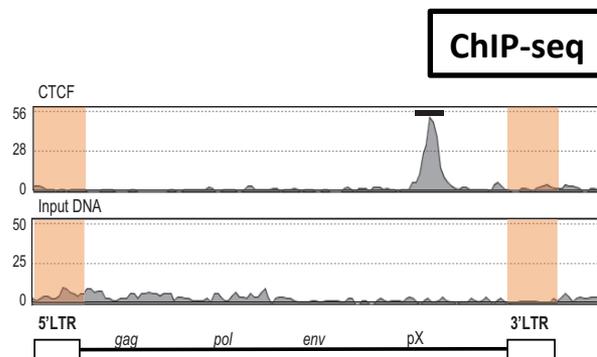
さらに隠された仕組みが存在するか？

プロウイルスを解析する際の問題点

total 80M reads in CTCF ChIP-seq



only 180 viral reads
(0.0002%)



- Genome size difference between virus and the host

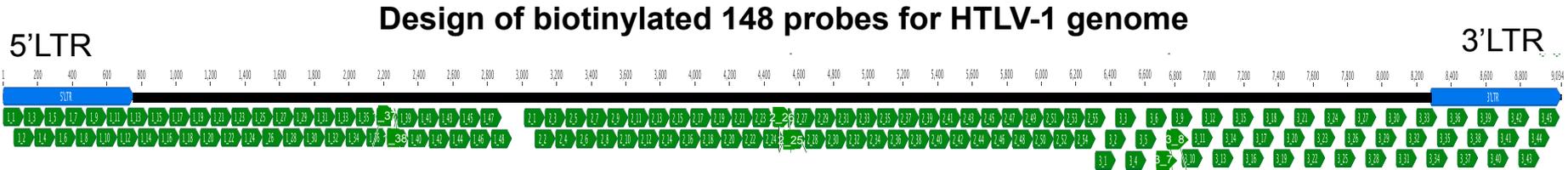
Human genome: 3.1 billion bp (350km)
HTLV-1 genome: 9 kb (1m)



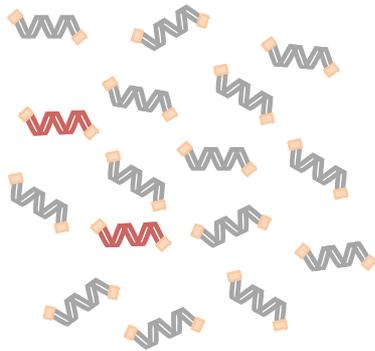
Frequency of HTLV-1 in human genome = 0.00015%



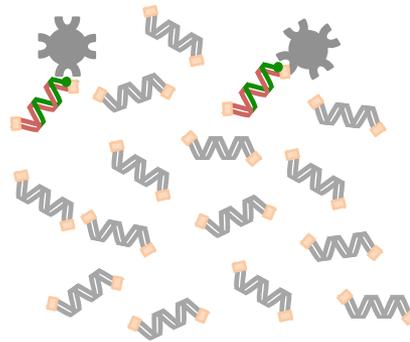
Enrichment of HTLV-1 sequence



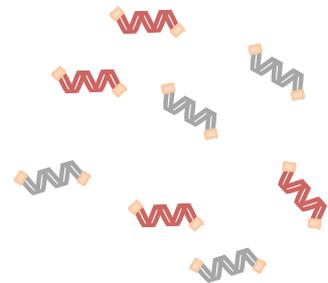
Library for NGS



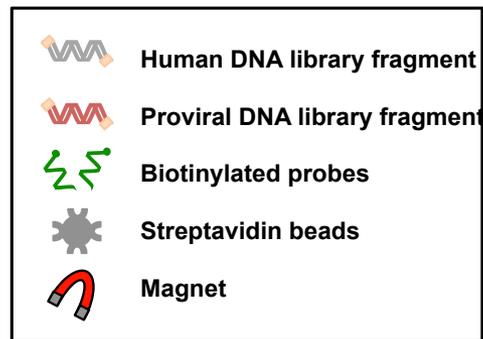
Hybridization & capture



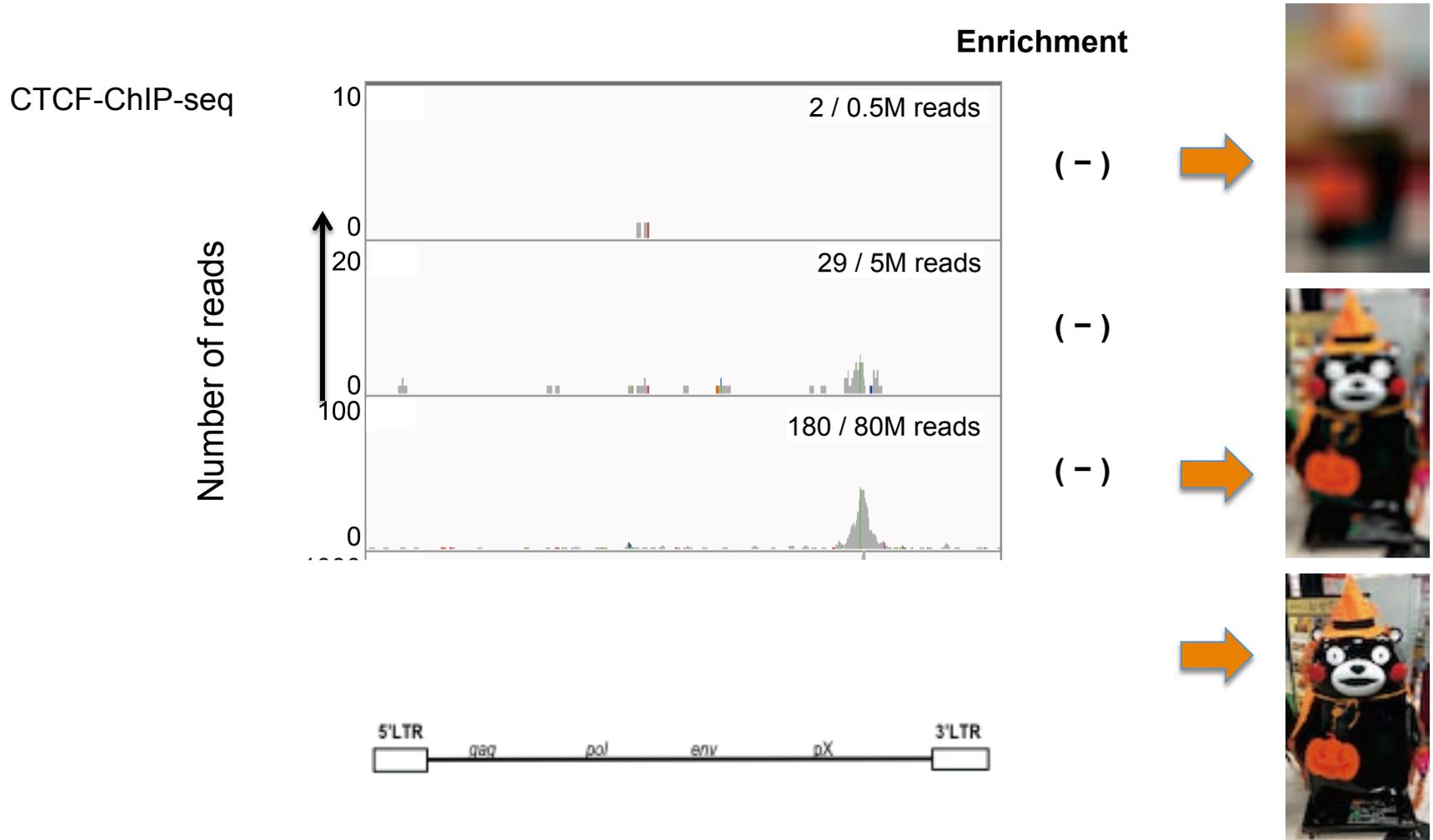
ENRICHED library



Post-enrichment
PCR



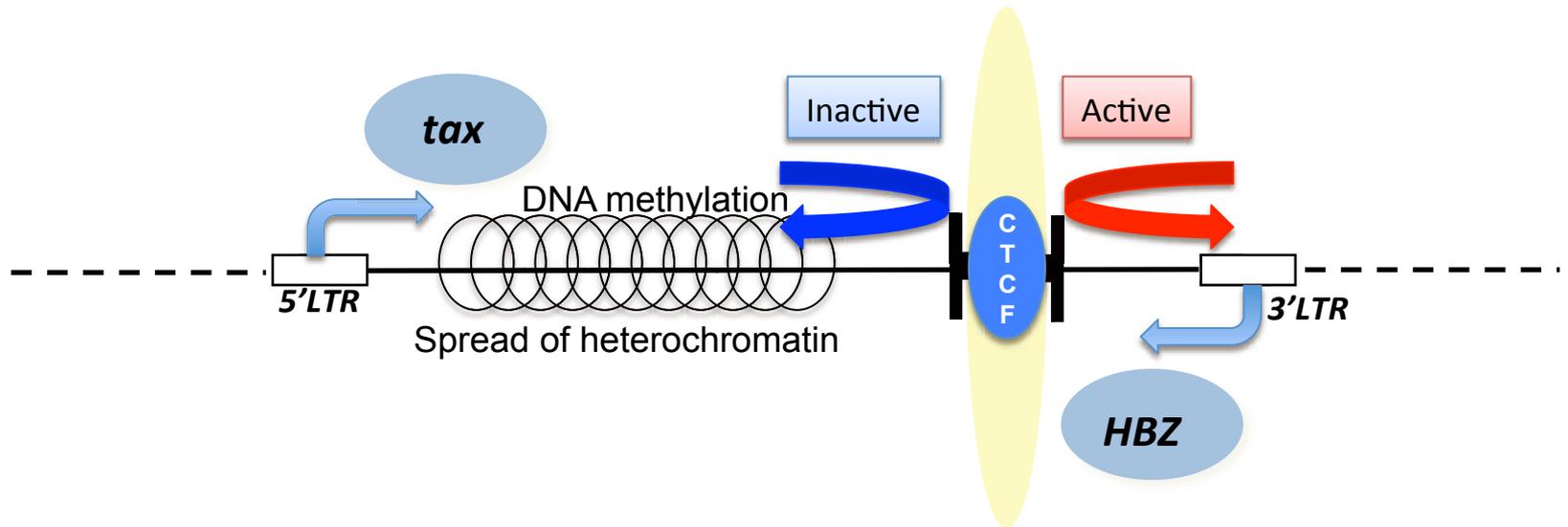
Efficiency of the enrichment for the provirus



高解像度かつ経済的なプロウイルス解析法

(Miyazato P et al, Sci Rep 2016)

Summary (1)



なぜ5'側は抑制で、3'側は活性化なのか？

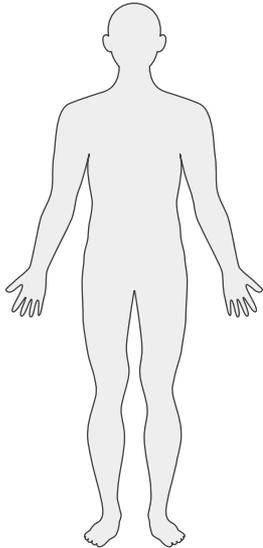
さらに隠された仕組みが存在するか？

高感度プロウイルス配列決定法を活用した解析

1. 高精細なHTLV-1ウイルストランスクリプトーム解析
2. 高精細なHTLV-1エピゲノム(転写因子結合)解析
3. HTLV-1プロウイルス近傍の高次クロマチン構造解析

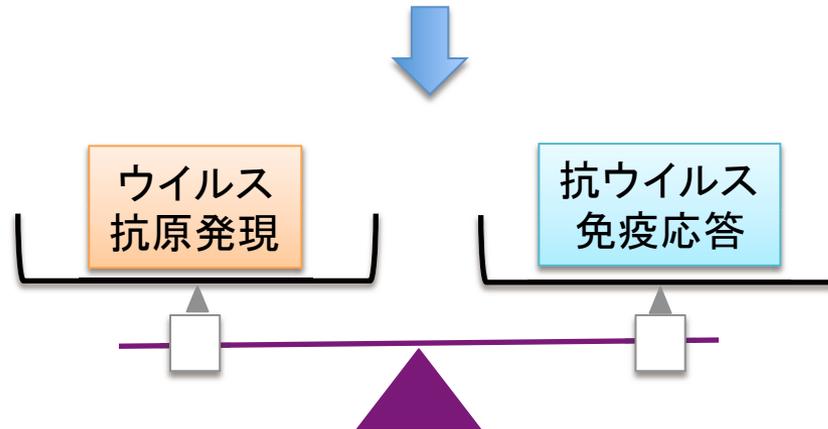
ウイルス抗原発現と抗ウイルス免疫のバランス

HTLV-1
carrier



血中のウイルスは検出されないが、感染細胞の割合は高い(1%)

抗ウイルス免疫応答が観察される (CTLや抗体)



感染者体内にある感染細胞クローンの中から、最も生存(増殖)に適したクローンが腫瘍細胞として出現する

ウイルス抗原発現制御が、感染細胞の生き残りのキーとなるメカニズム



- WELCOME
- RESEARCH
- MEMBERS
- PUBLICATIONS
- JOINT RESEARCH
- ACHIEVEMENTS
- GALLERY
- CONTACT

佐藤研究室ホームページへようこそ！

本研究室はヒトレトロウイルス感染症の克服を目指して研究を行っています。
ご興味のある方は、一度研究室見学にお越し下さい。

お知らせ

2017.05.30

[SRC開催のお知らせ]本研究室主催でSRC2017を開催します。

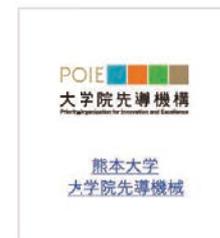
2017.05.22~23

東京で開催された第11回エピジェネティクス研究会年会にて研究発表を行いました。☞

2017.05.18~20

熊本で開催された第27回抗ウイルス療法学会学術集会にて研究発表を行いました。☞

リンク





Acknowledgments



Kumamoto University



熊本大学エイズ学研究センター佐藤研

Paola Miyazato, Misaki Matsuo

Michiyo Tokunaga , Asami Fukuda

Hiroo Katsuya, Benjy Tan Jek Yang

Islam Mohammad Saiful, Yuki Inada

Misaki Kakoki, Iwase Saori

熊本大学保健学科

Yoshikazu Uchiyama, Hiroyuki Hata

熊本大学発生医学研究所

Mitsuyoshi Nakao, Ko Ishihara, Shinjiro Hino

英国インペリアルカレッジロンドン

Charles RM Bangham

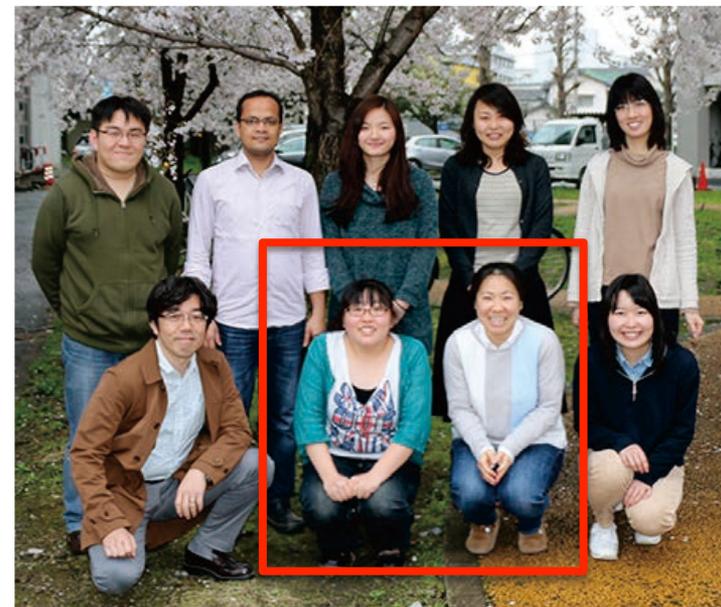
今村総合病院

Atae Utsunomiya

関西医科大学

Jun-ichi Fujisawa

Takaharu Ueno



JSPS JST CREST

AMED



ご静聴ありがとうございました。