

2. HTLV-1 感染症と miRNA

山岸 誠, 渡邊 俊樹

東京大学大学院新領域創成科学研究科
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野

HTLV-1 はウイルス遺伝子産物によって感染 T 細胞を不死化, 腫瘍化に導くが, 成人 T 細胞白血病 (ATL) を発症するまでの長い潜伏期間の背景にある分子機構は不明な点が多い。感染細胞及び ATL 細胞において様々な遺伝子発現異常が各々の特徴に寄与しているが, 一方でそれらを制御する上流のイベントは不明な点が多かった。miRNA による遺伝子発現調節という新たな概念が提唱されて以来, HTLV-1/ATL の領域においても複数の研究報告があり, 分子レベルでの理解が深まったと言える。特に, ATL の多数の臨床検体を用いた網羅的解析の結果から, 腫瘍細胞の特徴の 1 つである NF- κ B の恒常的活性化の分子メカニズムが明らかとなった。miRNA を介したエピジェネティック制御と NF- κ B 経路のクロストークも明らかとなり, miRNA 研究から新たな分子機構も提唱された。一方で HTLV-1 の生活環と miRNA の関わりや miRNA 発現異常の原因解明など, 今後の課題は多い。miRNA は多機能性であり, これらの分子基盤の創設が HTLV-1 研究の今後の発展に寄与すると考えられる。

序論

microRNA (miRNA) は 19 – 24mer の非コード RNA で, 標的遺伝子の 3' UTR に結合し, RNA の分解と翻訳阻害を誘導する。標的遺伝子の認識には揺らぎがあるため, 一つの miRNA が複数の遺伝子発現に対して抑制的に働くことができる^{1,2,3)}。進化的にも保存性が高く, 発生や分化, 各細胞の機能において不可欠であることは十分に証明されている^{4,5)}。また疾患研究の成果から, miRNA の存在量のバランスが細胞の運命を支配していることも明らかである^{6,7,8)}。ウイルス学においても miRNA 研究は盛んに進められており, 新たなパラダイムを提供している。それは, 外来種で

あるウイルスは, 宿主細胞の miRNA パターンに影響され, また逆にそのパターンに影響を与えるということである。つまり宿主側はウイルスに対する防御機構として miRNA を利用するし, 一方でウイルスによる宿主 miRNA 発現への影響は, ウイルスによる病原性の本質の一つであることも示唆されている⁷⁾。さらに, 主にヘルペスウイルスにおいて, ウイルス自身がゲノム上に miRNA をコードし, 自身の生活環の維持と宿主に与える病原性に貢献することも報告されている^{7,9,10)}。短い RNA がウイルスと宿主の両者に与えるインパクトは, 発見当初の予想を遥かに超えるものであったと言えるであろう。

HTLV-1 研究領域における miRNA 研究は, 未だ発展途上であり, 十分に理解が進んでいないのが現状である。それは, HTLV-1 がウイルス学的手法によって感染実験を進めることが極めて困難であり, HTLV-1 と miRNA の直接的な因果関係を証明することが容易でないことに起因する。しかし, HTLV-1 感染によって樹立された細胞株や感染細胞の終末像である成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞の詳細な解析が行われ, HTLV-1 に関連する miRNA の全体像はクリアになりつつある。本総説では, HTLV-1/ATL 研究領域の成果をまとめ, ウイルスと miRNA の関係, 及び miRNA 異常による分子病態を概説し, miRNA 研究の

連絡先

〒108-8639
東京都港区白金台 4-6-1
東京大学大学院新領域創成科学研究科
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野
TEL: 03-5449-5298
FAX: 03-5449-5418
E-mail: myamagishi@mgs.k.u-tokyo.ac.jp
tnabe@ims.u-tokyo.ac.jp

今後の発展と課題について議論する。

HTLV-1 由来 miRNA の存在について

現在までに、EBV や KSHV などのヘルペスウイルス属を中心に、200 を超える多くのウイルス由来 miRNA が発見されている⁷⁾。これらの DNA ウイルスは、宿主 miRNA と同様にウイルス由来 miRNA を転写から Drosha - Dicer - RISC を経る miRNA の成熟過程をそのまま利用できる。また、ウイルス由来 miRNA は他のウイルスタンパク質と異なり短い RNA であるため免疫原性がなく、ウイルスの複製と潜伏化に適した環境を誘導することができる。さらに少しの変異が及ぼす影響が大きく、二本鎖 DNA の両方を効率よく利用できるという利点も、DNA ウイルスが miRNA をコードする理由であると考えられている。同様の事実はレトロウイルス属にも当てはまることであり、HIV-1 を中心に多くの研究者によって探索が行われている^{10,11,12,13)}。HTLV-1 についてもウイルス由来 miRNA の存在が期待された。Li らはステムループ構造を予測するアルゴリズムを利用して HTLV-1 のセンス鎖に 3 つ、アンチセンス鎖に 8 つの miRNA を予測している¹⁴⁾。一方 Lin らは HTLV-1 感染細胞株 MT-2 細胞の 18-24 塩基の RNA から cDNA ライブラリを作成し、698 クローンのシークエンスを行ったが、HTLV-1 由来 miRNA は発見されなかったと報告している¹³⁾。Ruggero らは総説中でさらに詳細に解析したと言及しているが、やはり非常に限定的な検出しかされなかったと述べている¹⁵⁾。総合すると、HTLV-1 由来 miRNA は存在したとしても、限定された環境下でしかも非常に低レベルであることが想定される。ウイルス由来 miRNA は相補鎖のウイルス RNA に perfect match であり、ウイルスの複製効率とウイルス遺伝子による病原性に強く影響を与える。また多くの宿主遺伝子に対しても影響を及ぼすと考えられる。HTLV-1 が固有の miRNA を発現するか、またそれがどのような機能をもつのかという点は、生理的条件下における詳細な解析により、今後結論が出されるであろう。

HTLV-1 と宿主 miRNA の関係

他のウイルスと同様に、HTLV-1 も RNA として転写される際には複雑な 3' UTR 構造を持ち、宿主及びウイルス由来 miRNA の標的となる条件を満たしている。HIV-1 に関しては複数の研究グループによって宿主 miRNA によるウイルス RNA の抑制と潜伏化誘導が報告されている^{16,17,18)}。この時、HIV-1 RNA は APOBEC3G とともに、P-body に存在することが示されている¹⁸⁾。一方 HTLV-1 については、アルゴリズムを用いた標的予測では複数の宿主 miRNA が HTLV-1 RNA に結合できることが予測されているが^{15,19)}、実験的な検証は行われていない。今後、これらの miRNA 群の発現量とウイルスの複製レベルの関係を調べることに

より明らかになるであろう。また、後述する網羅的な miRNA 発現解析の結果と統合することにより、有益な情報が得られると期待される。

一方、HTLV-1 が miRNA の合成経路に対して与える影響については少しずつ理解が進んでいる。Lin らは、宿主の持つ siRNA による標的遺伝子のノックダウン機構に対して、HTLV-1 Tax は大きな影響を与えなかったことから、Tax は RNAi の機構とはリンクしないとしている¹³⁾。一方 Abe らは、HTLV-1 Rex が Dicer と結合し、shRNA から siRNA への成熟過程に影響を与えることを報告している²⁰⁾。またつい最近、Rahman らは Jurkat 細胞に Tax を導入した際の miRNA の発現パターンを網羅的に解析した²¹⁾。Tax を導入した細胞では 2 倍以上変化した 41 種の miRNA のうち、35 種の miRNA が減少していた。Tax が miRNA 合成経路に対してどのような分子機構で影響を与えるのか興味深い。また HTLV-1 は主に Tax を介して感染細胞のシグナル伝達系を攪乱することにより^{22,23)}、miRNA の発現パターンにも大きく影響を与えられ、miRNA の個別の機能が少しずつ明らかとなってきており、改めて HTLV-1 が宿主 miRNA に与える影響の解析が求められている。

HTLV-1 感染細胞における遺伝子発現異常と miRNA

標的遺伝子発現の恒常性の維持が miRNA の本来の機能の一つと言えるが、HTLV-1 感染細胞や ATL 腫瘍細胞では、その恒常性の破綻が明らかに証明されている。Cyclin-CDK 経路、p53 経路、JAK-STAT 経路などの異常の他に、特に NF- κ B シグナルの著しい活性化が特徴的である^{22,24)}。HTLV-1 感染細胞においてはウイルス遺伝子産物である Tax が NF- κ B の定型的 (canonical) 及び非定型的 (noncanonical) 経路を強烈に活性化し、その結果、感染細胞はアポトーシス抵抗性を獲得する^{22,23,25,26)}。一方で、ATL 細胞においては Tax の発現は非常に限定的であり、代わりに NF- κ B の非定型的経路の上流に位置する NF- κ B inducing kinase (NIK) が ATL 細胞において過剰に発現し、恒常的な NF- κ B 経路の活性化を誘導する²⁷⁾。現在までに様々な NF- κ B 経路の阻害剤が開発され、いずれも感染細胞や ATL 細胞に対して強力なアポトーシスを誘導することから、感染細胞及び ATL 細胞は NF- κ B 経路に "addict" した状態であると考えられる^{28,29,30,31,32,33,34,35)}。また興味深い事に、HTLV-1 感染キャリアから分離した末梢血単核球 (PBMC) からは、通常 Tax の発現が認められないが、やはり NF- κ B 経路が活性化しているデータが示された²⁸⁾。このことから NF- κ B 経路の活性化は HTLV-1 感染症に対する重要な分子標的であると言える。NIK は ATL だけでなく、多発性骨髄腫やびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) などの造血系腫瘍や、乳がんなどの固形がんにおいても重要な分子標的である^{36,37,38,39)}。NIK の発現レベルは正常

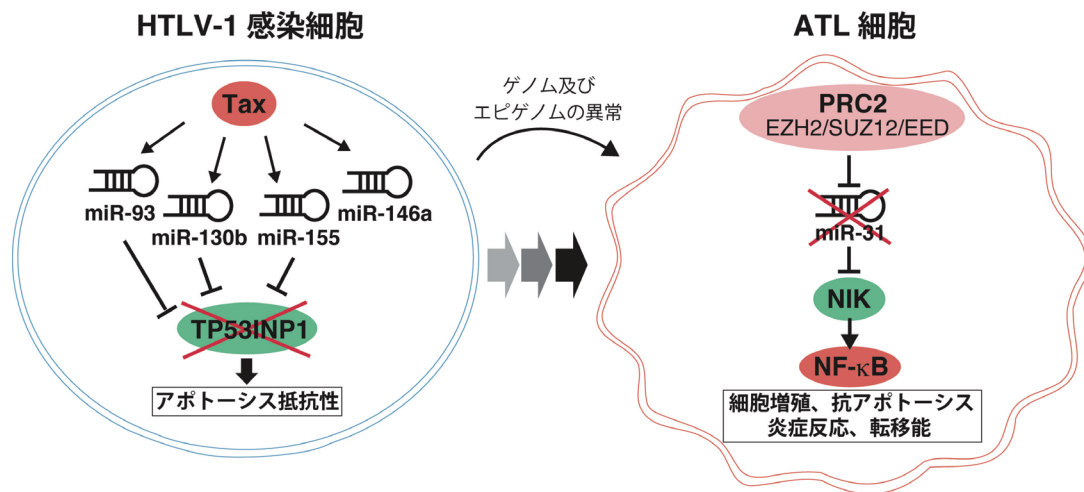


図1 HTLV-1 感染細胞と ATL 細胞における miRNA の異常

感染細胞では Tax によって複数の miRNA が発現誘導され、共通の標的遺伝子である TP53INP1 の発現が減少し、その結果アポトーシス抵抗性が獲得される。一方で ATL 細胞では、ゲノム及びエピゲノム異常の蓄積によって miR-31 の発現が例外なく欠損し、NIK の発現を介した NF- κ B 経路の恒常的活性化が誘導される。

細胞では主にタンパク質レベルで制御されているが⁴⁰⁾、ATL 細胞における NIK mRNA の上昇や、他のがんにおける NIK 依存的な NF- κ B 経路の活性化メカニズムは明らかにになっていなかった。

HTLV-1 の感染が宿主の miRNA パターンに与える直接的な影響は、正確に評価する実験系に高いハードルがある。HIV-1 のように簡便で正確な感染実験系を構築するのが困難であり、また HTLV-1 感染個体からリンパ球のごく一部に相当する感染細胞集団を濃縮する系も確立されていない。従って HTLV-1 感染によって樹立された細胞株による評価が行われている。

Pichler らは、ATL 及び HAM/TSP (HTLV-1 関連脊髄症) 患者由来細胞株、HTLV-1 や Tax によってトランスフォームされた細胞株を用いて miRNA の発現レベルを検討した⁴¹⁾。検討した miRNA は ATL 細胞の起源とされている制御性 T 細胞において重要な miRNA 群⁴²⁾、及び当時明らかにされていたがん関連 miRNA 群に限定している。その結果、HTLV-1 関連細胞株で miR-21, miR-24, miR-146a, miR-155 が発現上昇し、miR-223 が発現減少していることを明らかにした。またそのうち miR-146a の過剰発現は Tax による NF- κ B 経路の活性化が原因であることも明らかにしている。miR-146a は EBV の LMP1 による NF- κ B 経路の活性化によっても誘導されることが報告されている^{43,44)}。

Yeung らは、7 種類の HTLV-1 関連細胞株と 4 例の急性型 ATL 細胞を用いて 327 種の miRNA の網羅的解析を行った⁴⁵⁾。対照群には正常の PBMC を用いている。彼らはさらに PMA によって PBMC を活性化させた際に上昇する miRNA 群で絞り込みを行い、HTLV-1 感染と T 細胞の活性化によって上昇する miRNA として miR-18a, miR-93,

miR-130b を報告している。そのうち、miR-93 と miR-130b の共通する標的遺伝子として TP53INP1 を見だし、HTLV-1 感染細胞において、miR-93 及び miR-130b の過剰発現が TP53INP1 の発現を低下させることにより、細胞生存の獲得に寄与していることを明らかにした。Pichler らが報告した miR-155 は Yeung らの ATL 細胞における過剰発現 miRNA のリストにも含まれているが、実はその一年前に miR-155 が同じく TP53INP1 を標的とすることが膀胱がんの研究から報告されている⁴⁶⁾。TP53INP1 は様々な固形がんでは癌抑制因子として注目されている^{47,48,49,50)}。また KSHV が発現する miR-K12-11 が miR-155 と高いホモロジーを持ち、miR-155 の過剰発現と同様に B 細胞の増殖をミミックするという興味深い報告もある⁵¹⁾。HTLV-1 感染細胞においては、複数の miRNA で制御される TP53INP1 の発現低下が重要な役割を持つものと考えられる (図 1)。miR-155 の発現は B 細胞株においては LPS によって、前駆脂肪細胞においては TNF- α によって、それぞれ NF- κ B 依存的に発現が誘導されることが報告されている^{52,53)}。また miR-130b のプロモーターにも NF- κ B 結合配列があり、上記の miR-146a と同様に、Tax によって miR-130b の発現が誘導される⁴⁵⁾。

ATL における miRNA 異常

Yeung らは 4 例の臨床検体を用いることで ATL 腫瘍細胞における miRNA についても検討している⁴⁵⁾。また 2010 年に Bellon らは、同様に 7 例の ATL 検体について 3 例の正常 PBMC もしくは CD4+ T 細胞と比較を行っている⁵⁴⁾。その結果 ATL では miR-150, miR-155, miR-223, miR-142-3p, miR-142-5p が上昇し、miR-181a, miR-132,

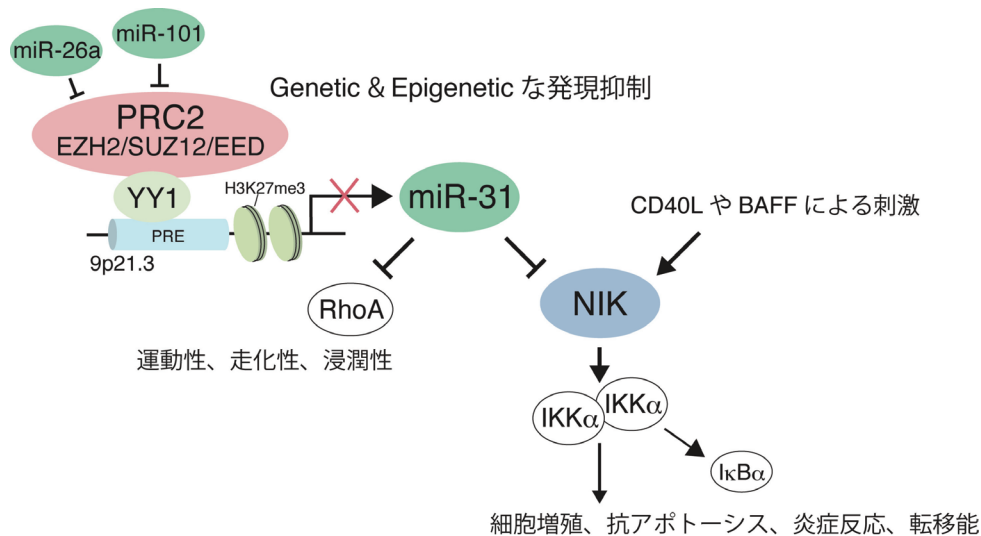


図2 ATL細胞におけるmiR-31を取り巻く分子メカニズム

Polycomb 依存的な miR-31 の発現低下は NIK などの標的遺伝子を介して細胞の表現型に影響する。この分子間の関係は様々な細胞種で保存されており、各因子の存在量のバランスによって均衡が保たれている。バランスを崩した細胞は悪性化をたどると考えられる。

miR-125a, miR-146b が減少していると報告している。miR-155 の発現上昇は Pichler ら, Yeung らの報告と一致している。また興味深いことに, Yeung らと Bellon らはそれぞれ, 患者由来 ATL 細胞と HTLV-1 によって樹立された細胞株は異なる miRNA 発現パターンを示すと言及している。

上記の3つの報告^{41,45,54}では異常を示す miRNA パターンが多様であり, 統一したデータが得られていない。その原因は, 解析する症例数が少なく, 異常を示す miRNA の絞り込みが甘いことが原因であると考えられる。また最近の知見から, リンパ球の各サブセットで miRNA の発現パターンが大きく異なることもわかっており^{55,56}, ATL 細胞に対する正確な比較対象 (=CD4+ T 細胞) を用意することが, ATL 細胞の異常を正確につかむことにつながると考えられる。また臨床検体については, 腫瘍細胞集団と正常細胞の割合も結果に大きく影響するポイントである。

最近我々は, 以上の問題に対して回答を得た。我々は HTLV-1 感染者コホート共同研究班 JSPFAD (<http://www.htlv1.org/>) の全面的協力を得て, 世界で初めて ATL 患者由来腫瘍細胞の DNA, mRNA, miRNA の大規模な統合解析を完了した⁵⁷。miRNA 解析のサンプルにはプロウイルス量の多い (=腫瘍細胞の割合が高い) 40 例の ATL 患者由来細胞を用い, さらにコントロール群には ATL 群と年齢を一致させた健康人 CD4+ T 細胞 22 例を用いた。アジレント社の 723 種のヒト miRNA と 76 種のウイルス由来 miRNA を網羅した microarray を用い, 非常に厳しい検定をかけて異常 miRNA を割り出した結果, そ

れまでに報告されていた上記の miRNA パターンと異なり, ATL では 61 種の異常 miRNA のうち 59 種の miRNA が正常 T 細胞に比べて著しく低値を示すことがわかった。これは, 腫瘍細胞は miRNA の発現が低下傾向にあるという他のがん研究の結果と一致している^{58,59}。減少している miRNA リストには, すでに癌抑制性 miRNA として報告されている Let-7 ファミリー⁶⁰ や miR-101⁶¹ など含まれていた。これらの 61 種の miRNA は ATL 細胞の新たな分子マーカーであり, また一つひとつが機能的に腫瘍細胞の特徴に寄与していると考えられる。我々のデータにおいても, 上記の先の3つのグループによって報告されている miR-155 の発現上昇が示されていたが, 厳しい統計的有意差 ($p < 0.00001$) は見られなかったため, リストから除外している (筆者ら, unpublished data)。

miR-31 の機能と発現欠損の分子メカニズム

ATL 細胞で見つかった 61 種の発現異常 miRNA のうち, miR-31 が例外なくすべての ATL 患者で減少し, 且つ減少のレベルが著しいことに気がついた (0.00403 倍, $p = 2.85 \times 10^{-25}$)。miR-31 の発現減少は, 乳がんにおける転移, 浸潤過程において重要であることが報告されている^{62,63}。我々は, miR-31 の著しい減少が ATL 細胞の特徴を反映していると考え, ATL 細胞の mRNA 発現プロファイルの結果と統合し, さらに *in vitro* の複数の実験を経て, miR-31 の新規標的遺伝子として, ATL 細胞における NF- κ B 活性化の原因遺伝子である NIK を見いだした。実験の結果, 正常 T 細胞では miR-31 の発現が比較的高く NIK の発現

miRNA	標的遺伝子	参考文献
HTLV-1 感染細胞株		
上昇		
miR-155	TP53INP1	41,54
減少		
miR-150		45,54
miR-223		41,45,54
ATL 細胞		
上昇		
miR-150		45,54
miR-155	TP53INP1	45,54
減少		
miR-31	NIK, RhoA	45,57
miR-125a		54,57
miR-126		45,57
miR-130a		45,57
miR-146b		54,57
miR-181a		54,57
miR-355		45,57

図 3 HTLV-1/ATL における miRNA 発現異常

HTLV-1 及び ATL 関連領域の研究のうち、複数の論文で報告されているものを示した。掲載した標的遺伝子は、それらの報告の中で実験的に検証されている遺伝子のみを示している。

を抑制しているが、miR-31 の異常な発現低下が NIK の発現誘導とそれに伴う NF- κ B 経路の恒常的活性化を誘発することがわかった (図 1)。さらに ATL 細胞株及び新鮮 ATL 細胞に対して miR-31 を再導入すると細胞死が誘導された⁵⁷⁾。このことは、miR-31 の細胞内レベルが腫瘍細胞の表現型に直接影響していることを意味し、新しい分子標的としての有用性が示された。

ATL 臨床検体を詳細に解析した結果、miR-31 の発現欠失はゲノムの欠損と Polycomb ファミリー依存的なエピジェネティックな異常によって、すべての ATL 患者で起こっていることがわかった。さらに、Polycomb ファミリーが miR-31 を抑制することによって NIK - NF- κ B 経路を活性化する分子機構は、ATL だけでなく乳がん細胞や B 細胞における免疫応答反応においても保存されていることを明らかにした^{57,64)}。Polycomb ファミリー、NF- κ B 経路、miR-31 はそれぞれが単独で多彩な機能を有しており^{65,66,67,68,69,70,71,72,73)}、細胞の恒常性や分化などの様々な機能に必須であると同時に、さらにクロストークを形成することによって、より複雑な遺伝子発現制御ネットワークに昇華させていると考えられる (図 2)。我々の実験結果は、ATL 細胞はこの分子ネットワークに依存していることを示しており、エピジェネティックの制御、もしくは miR-31 の補充による新たな治療法の開発につながると期待される。

今後の展望

複数の研究グループによって詳細に解析され^{41,45,54,57)}、HTLV-1 感染細胞及び ATL 腫瘍細胞の miRNA 発現パターンはほぼ明らかになった (図 3)。しかし、実際に異常 miRNA の機能とその影響を詳しく解析されているのは miR-93, miR-130b, miR-155 及び miR-31 だけである。標的遺伝子として明らかになった TP53INP1 や NIK にとどまらず、個々の miRNA とその標的遺伝子が感染細胞や腫瘍細胞に対してどのような役割を持つかが、今後の研究課題である。miRNA の標的遺伝子は複数のアルゴリズムによって予測可能であるが、物理的な抑制効果の検証と、標的遺伝子側の機能や挙動も重要な指標となり、従って多角的な実験的検証が必須となることを特筆しておく。

一方で、HTLV-1 と miRNA の研究はまだ始まったばかりである。残っている疑問点は以下に挙げられる。① HTLV-1 が宿主 miRNA システムに与える影響について、感染によって樹立された細胞株からの情報だけでなく、感染というイベントが宿主 miRNA に与えるインパクトについて詳細に検討する必要がある。特に Tax, Rex, HBZ などのウイルス因子が miRNA の合成経路に対してどのような影響を与えるのかは今後の課題である。Rahman らが報告した Tax による宿主 miRNA に対する全体的な抑制効果

は²¹⁾、我々が明らかにした ATL における miRNA の全体的な減少⁵⁷⁾ とリンクするのか、今後の展開が待たれる。② HTLV-1 RNA が宿主もしくは HTLV-1 由来 miRNA の標的となるのか、実験的検証が必要である。近年になって HTLV-1 の伝播様式やレセプターが少しずつ明らかとなっており^{74,75,76,77)}、また HTLV-1 や Tax による病原性が in vivo においても様々なステージにおいて証明され始めている^{78,79,80)}。様々な環境下における HTLV-1 の生活環に対して miRNA がどのような影響を与えるのか、重要な研究課題である。③ HTLV-1 由来 miRNA の存在について、上述したように、ヘルペスウイルスのような高発現 miRNA は HTLV-1 には存在しないと考えられるが、次世代シーケンサ等の技術導入により明らかにされると期待される。④ HTLV-1 感染細胞から ATL 細胞の miRNA パターンの変遷について、感染細胞は Tax による NF- κ B 経路の活性化が良く反映されている一方⁴⁵⁾、終末像である ATL の miRNA の発現異常は非常に特徴的であり、ゲノム及びエピゲノムの異常によって誘導される miRNA パターンに addict していると考えられる⁵⁷⁾。どのような分子機構で ATL 細胞が形成されていくか、エピジェネティックや miRNA 合成経路の詳細な解析が必要である。⑤ HTLV-1 に関連する他の疾患と miRNA について、HAM/TSP や HTLV-1 関連ぶどう膜炎 (HU) などの疾患については miRNA の検討は行われていない。各疾患の分子病態を理解する上で miRNA の網羅的な検討は必須である。また感染キャリアにおける miRNA パターンを把握することで、発症の分子メカニズムの一端が明らかにされるであろう。

おわりに

1993 年に線虫で初めて miRNA が発見されて以来^{81,82)}、急速に研究が進展し、miRNA に関する知識も深まってきた。miRNA は遺伝子発現全体を制御する上流の分子群であり、ウイルス感染症を考える上でも欠かす事のできない因子として位置づけられている。ウイルス学のように生理学的意義を検討する学問においては、予測や他の報告だけに頼らず、実験的検証が正しい情報発信に重要である。HTLV-1 感染症の分子レベルの理解と治療法の開発を目指す上で、miRNA 研究の推進は急務であると考えられる。

参考文献

- 1) Bartel DP: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233, 2009.
- 2) Cullen BR: Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol. Cell* 16: 861-865, 2004.
- 3) Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP: Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19: 92-105, 2009.
- 4) Xiao C, Rajewsky K: MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 136: 26-36, 2009.
- 5) Gangaraju VK, Lin H: MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 116-125, 2009.
- 6) Ventura A, Jacks T: MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell* 136: 586-591, 2009.
- 7) Skalsky RL, Cullen BR: Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 64: 123-141, 2010.
- 8) Lujambio A, Lowe SW: The microcosmos of cancer. *Nature* 482: 347-355, 2012.
- 9) Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T: Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304: 734-736, 2004.
- 10) Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grässer FA, van Dyk LF, Ho CK, Shuman S, Chien M, Russo JJ, Ju J, Randall G, Lindenbach BD, Rice CM, Simon V, Ho DD, Zavolan M, Tuschl T: Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods* 2: 269-276, 2005.
- 11) Omoto S, Ito M, Tsutsumi Y, Ichikawa Y, Okuyama H, Brisibe EA, Saksena NK, Fujii YR: HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA. *Retrovirology* 1: 44, 2004.
- 12) Bennasser Y, Le SY, Benkirane M, Jeang KT: Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity* 22: 607-619, 2005.
- 13) Lin J, Cullen BR: Analysis of the interaction of primate retroviruses with the human RNA interference machinery. *J. Virol.* 81: 12218-12226, 2007.
- 14) Li SC, Shiau CK, Lin WC: Vir-Mir db: prediction of viral microRNA candidate hairpins. *Nucleic Acids Res.* 36: D184-D189, 2008.
- 15) Ruggero K, Corradin A, Zanollo P, Amadori A, Bronte V, Ciminale V, D'Agostino DM: Role of microRNAs in HTLV-1 infection and transformation. *Mol. Aspects Med.* 31: 367-382, 2010.
- 16) Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, Huang W, Squires K, Verlinghieri G, Zhang H: Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat. Med.* 13: 1241-1247, 2007.
- 17) Wang X, Ye L, Hou W, Zhou Y, Wang YJ, Metzger DS, Ho WZ: Cellular microRNA expression correlates with susceptibility of monocytes/macrophages to HIV-1 infection. *Blood* 113: 671-674, 2009.
- 18) Nathans R, Chu CY, Serquina AK, Lu CC, Cao H, Rana TM: Cellular microRNA and P bodies modulate host-HIV-1 interactions. *Mol. Cell* 34: 696-709, 2009.
- 19) Hakim ST, Alsayari M, McLean DC, Saleem S, Addanki KC, Aggarwal M, Mahalingam K, Bagasra O: A large number of the human microRNAs target lentiviruses, retroviruses, and endogenous retroviruses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369: 357-362, 2008.
- 20) Abe M, Suzuki H, Nishitsuji H, Shida H, Takaku H: Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Rex protein with Dicer suppresses RNAi silencing. *FEBS Lett.* 584: 4313-4318, 2010.
- 21) Rahman S, Quann K, Pandya D, Singh S, Khan ZK, Jain P: HTLV-1 Tax Mediated Downregulation of miR-

- NAs Associated with Chromatin Remodeling Factors in T Cells with Stably Integrated Viral Promoter. *PLoS One* 7: e34490, 2012.
- 22) Hall WW, Fujii M.: Deregulation of cell-signaling pathways in HTLV-1 infection. *Oncogene* 24: 5965–5975, 2005.
 - 23) Boxus M, Twizere JC, Legros S, Dewulf JF, Kettmann R, Willems L.: The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* 5: 76, 2008.
 - 24) Matsuoka M, Jeang KT.: Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat. Rev. Cancer* 7: 270–280, 2007.
 - 25) Ruben S, Poteat H, Tan TH, Kawakami K, Roeder R, Haseltine W, Rosen CA.: Cellular transcription factors and regulation of IL-2 receptor gene expression by HTLV-I tax gene product. *Science* 241: 89–92, 1988.
 - 26) Yoshida M.: Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 475–496, 2001.
 - 27) Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, Sugimoto H, Martinez Bruyn VJ, Iwasaki Y, Matsubara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I, Inazawa J, Utsunomiya A, Watanabe T, Masuda T, Yamamoto N, Yamaoka S.: Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood* 111: 5118–5129, 2008.
 - 28) Watanabe M, Ohsugi T, Shoda M, Ishida T, Aizawa S, Maruyama-Nagai M, Utsunomiya A, Koga S, Yamada Y, Kamihira S, Okayama A, Kikuchi H, Uozumi K, Yamaguchi K, Higashihara M, Umezawa K, Watanabe T, Horie R.: Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF-kappaB, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood* 106: 2462–2471, 2005.
 - 29) Dewan MZ, Terashima K, Taruishi M, Hasegawa H, Ito M, Tanaka Y, Mori N, Sata T, Koyanagi Y, Maeda M, Kubuki Y, Okayama A, Fujii M, Yamamoto N.: Rapid tumor formation of human T-cell leukemia virus type 1-infected cell lines in novel NOD-SCID/gammac(null) mice: suppression by an inhibitor against NF-kappaB. *J. Virol.* 77: 5286–5294, 2003.
 - 30) Satou Y, Nosaka K, Koya Y, Yasunaga JI, Toyokuni S, Matsuoka M.: Proteasome inhibitor, bortezomib, potently inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells both in vivo and in vitro. *Leukemia* 18: 1357–1363, 2004.
 - 31) Ohsugi T, Kumasaka T, Ishida A, Ishida T, Horie R, Watanabe T, Umezawa K, Yamaguchi K.: In vitro and in vivo antitumor activity of the NF-kappaB inhibitor DHMEQ in the human T-cell leukemia virus type I-infected cell line, HUT-102. *Leuk. Res.* 30: 90–97, 2006.
 - 32) Horie R, Watanabe T, Umezawa K.: Blocking NF-kappaB as a potential strategy to treat adult T-cell leukemia/lymphoma. *Drug News Perspect.* 19: 201–209, 2006.
 - 33) Sanda T, Asamitsu K, Ogura H, Iida S, Utsunomiya A, Ueda R, Okamoto T.: Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel IkappaB kinase inhibitor. *Leukemia* 20: 590–598, 2006.
 - 34) Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Koeffler HP, Taguchi H.: Fludarabine induces apoptosis of human T-cell leukemia virus type 1-infected T cells via inhibition of the nuclear factor-kappaB signal pathway. *Leukemia* 21: 1044–1049, 2007.
 - 35) Uota S, Zahidunnabi Dewan M, Saitoh Y, Muto S, Itai A, Utsunomiya A, Watanabe T, Yamamoto N, Yamaoka S.: An I kappa B kinase 2 inhibitor IMD-0354 suppresses the survival of adult T-cell leukemia cells. *Cancer Sci.* 103: 100–106, 2012.
 - 36) Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, Lenz G, Hanamura I, Wright G, Xiao W, Dave S, Hurt EM, Tan B, Zhao H, Stephens O, Santra M, Williams DR, Dang L, Barlogie B, Shaughnessy Kuehl WM, Staudt LM.: Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12: 115–130, 2007.
 - 37) Pham LV, Fu L, Tamayo AT, Bueso-Ramos C, Drakos E, Vega F, Medeiros LJ, Ford RJ.: Constitutive BR3 receptor signaling in diffuse, large B-cell lymphomas stabilizes nuclear factor- kappaB-inducing kinase while activating both canonical and alternative nuclear factor- kappaB pathways. *Blood* 117: 200–210, 2011.
 - 38) Yamamoto M, Ito T, Shimizu T, Ishida T, Semba K, Watanabe S, Yamaguchi N, Inoue JI.: Epigenetic alteration of the NF-kappaB-inducing kinase (NIK) gene is involved in enhanced NIK expression in basal-like breast cancer. *Cancer Sci.* 101: 2391–2397, 2010.
 - 39) Thu YM, Su Y, Yang J, Splittgerber R, Na S, Boyd A, Mosse C, Simons C, Richmond A.: NF- kappaB inducing kinase (NIK) modulates melanoma tumorigenesis by regulating expression of pro-survival factors through the beta-catenin pathway. *Oncogene: advance online publication*, 2011.
 - 40) Sun SC.: Non-canonical NF- kappaB signaling pathway. *Cell Res.* 21: 71–85, 2011.
 - 41) Pichler K, Schneider G, Grassmann R.: MicroRNA miR-146a and further oncogenesis-related cellular microRNAs are dysregulated in HTLV-1-transformed T lymphocytes. *Retrovirology* 5: 100, 2008.
 - 42) Cobb BS, Hertweck A, Smith J, O'Connor E, Graf D, Cook T, Smale ST, Sakaguchi S, Livesey FJ, Fisher AG, Merkenschlager M.: A role for Dicer in immune regulation. *J. Exp. Med.* 203: 2519–2527, 2006.
 - 43) Motsch N, Pfuhl T, Mrazek J, Barth S, Grässer FA.: Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol.* 4: 131–137, 2007.
 - 44) Cameron JE, Yin Q, Fewell C, Lacey M, McBride J, Wang X, Lin Z, Schaefer BC, Flemington EK.: Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *J. Virol.* 82: 1946–1958, 2008.
 - 45) Yeung ML, Yasunaga J, Bennisser Y, Dusetti N, Harris D, Ahmad N, Matsuoka M, Jeang KT.: Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein

- 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1. *Cancer Res.* 68: 8976–8985, 2008.
- 46) Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, Garcia S, Nowak J, Yeung ML, Jeang KT, Chaix A, Fazli L, Motoo Y, Wang Q, Rocchi P, Russo A, Gleave M, Dagorn JC, Iovanna JL, Carrier A, Pébusque MJ, Dusetti NJ.: Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104: 16170–16175, 2007.
- 47) Gommeaux J, Cano C, Garcia S, Gironella M, Pietri S, Culcasi M, Pébusque MJ, Malissen B, Dusetti N, Iovanna J, Carrier A.: Colitis and colitis-associated cancer are exacerbated in mice deficient for tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Mol. Cell. Biol.* 27: 2215–2228, 2007.
- 48) Ito Y, Motoo Y, Yoshida H, Iovanna JL, Takamura Y, Miya A, Kuma K, Miyauchi A.: Decreased expression of tumor protein p53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) in breast carcinoma. *Anticancer Res.* 26: 4391–4395, 2006.
- 49) Jiang PH, Motoo Y, Garcia S, Iovanna JL, Pebusque MJ, Sawabu N.: Down-expression of tumor protein p53-induced nuclear protein 1 in human gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 12: 691–696, 2006.
- 50) Bonazzi VF, Irwin D, Hayward NK.: Identification of candidate tumor suppressor genes inactivated by promoter methylation in melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 48: 10–21, 2009.
- 51) Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, Frenzel C, Majoros WH, Chi JT, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Ohler U, Cullen BR.: A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* 450: 1096–1099, 2007.
- 52) Thompson RC, Herscovitch M, Zhao I, Ford TJ, Gilmore TD.: NF-kappaB down-regulates expression of the B-lymphoma marker CD10 through a miR-155/PU.1 pathway. *J. Biol. Chem.* 286: 1675–1682, 2011.
- 53) Liu S, Yang Y, Wu J.: TNF α -induced up-regulation of miR-155 inhibits adipogenesis by down-regulating early adipogenic transcription factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414: 618–624, 2011.
- 54) Bellon M, Lepelletier Y, Hermine O, Nicot C.: Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood* 113: 4914–4917, 2009.
- 55) Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP.: MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303: 83–86, 2004.
- 56) Lu LF, Liston A.: MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology* 127: 291–298, 2009.
- 57) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T.: Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-Dependent NF- κ B Pathway in Adult T Cell Leukemia and Other Cancers. *Cancer Cell* 21: 121–135, 2012.
- 58) Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR.: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834–838, 2005.
- 59) Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA.: Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 67: 2456–2468, 2007.
- 60) Roush S, Slack FJ.: The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol.* 18: 505–516, 2008.
- 61) Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, Laxman B, Cao X, Jing X, Ramnarayanan K, Brenner JC, Yu J, Kim JH, Han B, Tan P, Kumar-Sinha C, Lonigro RJ, Palanisamy N, Maher CA, Chinnaiyan AM.: Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 322: 1695–1699, 2008.
- 62) Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szász AM, Wang ZC, Brock JE, Richardson AL, Weinberg RA.: A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 137: 1032–1046, 2009.
- 63) Valastyan S, Benaich N, Chang A, Reinhardt F, Weinberg RA.: Concomitant suppression of three target genes can explain the impact of a microRNA on metastasis. *Genes Dev.* 23: 2592–2597, 2009.
- 64) Uribealago I, Ballare C, Croce LD.: Polycomb Regulates NF- κ B Signaling in Cancer through miRNA. *Cancer Cell* 21: 5–7, 2012.
- 65) Sparmann A, van Lohuizen M.: Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6: 846–856, 2006.
- 66) Simon JA, Kingston RE.: Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 697–708, 2009.
- 67) Rouas R, Fayyad-Kazan H, El Zein N, Lewalle P, Rothé F, Simion A, Akl H, Mourtada M, El Rifai M, Burny A, Romero P, Martiat P, Badran B.: Human natural Treg microRNA signature: role of microRNA-31 and microRNA-21 in FOXP3 expression. *Eur. J. Immunol.* 39: 1608–1618, 2009.
- 68) Liu CJ, Tsai MM, Hung PS, Kao SY, Liu TY, Wu KJ, Chiou SH, Lin SC, Chang KW.: miR-31 Ablates Expression of the HIF Regulatory Factor FIH to Activate the HIF Pathway in Head and Neck Carcinoma. *Cancer Res.* 70: 1635–1644, 2010.
- 69) Creighton CJ, Fountain MD, Yu Z, Nagaraja AK, Zhu H, Khan M, Olokpa E, Zariff A, Gunaratne PH, Matzuk MM, Anderson ML.: Molecular Profiling Uncovers a p53-Associated Role for MicroRNA-31 in Inhibiting the Proliferation of Serous Ovarian Carcinomas and Other Cancers. *Cancer Res.* 70: 1906–1915, 2010.
- 70) Valastyan S, Weinberg RA.: miR-31: A crucial overseer of tumor metastasis and other emerging roles. *Cell Cycle* 9: 2124–2129, 2010.
- 71) Hayden MS, Ghosh S.: Signaling to NF-kappaB. *Genes*

- Dev. 18: 2195–2224, 2004.
- 72) Bonizzi G, Karin M.: The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25: 280–288, 2004.
 - 73) Hayden MS, Ghosh S.: Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132: 344–362, 2008.
 - 74) Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL.: The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* 115: 449–459, 2003.
 - 75) Ghez D, Lepelletier Y, Jones KS, Pique C, Hermine O.: Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. *Retrovirology* 7: 99, 2010.
 - 76) Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Bangham CR.: Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 299: 1713–1716, 2003.
 - 77) Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A, Gout O, Alcover A, Thoulouze MI.: Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat. Med.* 16: 83–89, 2010.
 - 78) Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katanoh H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW.: Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat. Med.* 12: 466–472, 2006.
 - 79) Ohsugi T, Kumasaka T, Okada S, Urano T.: The Tax protein of HTLV-1 promotes oncogenesis in not only immature T cells but also mature T cells. *Nat. Med.* 13: 527–528, 2007.
 - 80) Banerjee P, Tripp A, Lairmore MD, Crawford L, Sieburg M, Ramos JC, Harrington W Jr, Beilke MA, Feuer G.: Adult T-cell leukemia/lymphoma development in HTLV-1-infected humanized SCID mice. *Blood* 115: 2640–2648, 2010.
 - 81) Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854, 1993.
 - 82) Wightman B, Ha I, Ruvkun G.: Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855–862, 1993.

miRNA in HTLV-1 related Disease

Makoto Yamagishi, Toshiki Watanabe

Laboratory of Tumor Cell Biology, Department of Medical Genome Sciences,
Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo,
4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo, 108-8639, Japan

Although human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) is undoubtedly involved in the immortalization and leukemogenesis of infected cells, mechanistic underpinnings of its molecular pathophysiology in long latent period of Adult T-cell leukemia (ATL) remain to be elucidated. One of the most significant recent advances in biomedical research has been the discovery of small noncoding RNAs designated microRNA (miRNA), which affect the field of virology including HTLV-1 research. Mounting evidence indicates that viruses use these miRNAs to manipulate both cellular and viral gene expression. Viral infection also can exert a profound impact on the cellular miRNA expression profile. Some studies have demonstrated that some deregulations of miRNA are involved in the pathogenesis of HTLV-1. Furthermore, global analyses of ATL patient samples have provided a conceptual progress that Polycomb family induces miR-31 silencing, resulting in overexpression of NF- κ B inducing kinase (NIK) following NF- κ B activation. Given that miRNAs act as pleiotropic molecules essential in all cellular events, deregulation of miRNA signature caused by HTLV-1 infection strongly involves the imbalance of molecular network of lymphocytes. Recognition and understanding of the widespread molecular applicability of miRNAs will increasingly have much effect on the development of novel strategies to treat the HTLV-1-associated diseases. Here we discuss our current knowledge of viral miRNAs and virally influenced cellular miRNAs and their relationship to ATL.