HAMにおけるクロマチン構造異常を介した炎症促進機序の解明と新規治療法の開発

中島　　誠
鈴木　　穣
内丸　　薫
山岸　　誠
山野　嘉久

臨床薬理の進歩 2026 別刷
公益財団法人臨床薬理研究振興財団

HAMにおけるクロマチン構造異常を介した炎症促進機序の解明と新規治療法の開発

Chromatin remodeling enhances MAP3K8 expression in HAM: a key pathogenesis for therapeutic intervention

中島　誠*1　鈴木　穣*2　内丸　薫*3　山岸　誠*4　山野　嘉久*5

Key words：HTLV-1 関連脊髄症、HTLV-1、クロマチンリモデリング、エンハンサー、MEK 阻害剤

要　　旨

目的　本研究では、「HTLV-1 関連脊髄症（HAM）において HTLV-1 感染細胞に特異的なクロマチン構造異常が生じ、炎症促進遺伝子の異常活性化を介して病態形成に寄与する」と仮説を立て、その仮説の検証と分子機序に基づく新規治療戦略の構築を目的とした。

方法　シングルセルレベルでのトランスクリプトーム解析およびクロマチンアクセシビリティ解析、ならびに HAM における疾患活動性バイオマーカーとの統合解析を実施した。

結果　HAM の炎症を促進する因子として MAP3K8 を同定した。その下流シグナルである MEK※ の特異的阻害剤は HTLV-1 感染細胞や HTLV-1 Tax 特異的 CTL の増殖および炎症性サイトカイン産生量を著しく抑制した

結論　HAM におけるウイルス－宿主相互作用に基づく新たな分子病態機構を提示するとともに、MAP3K8–MEK–ERK 軸が本疾患に対する有望な治療標的であることが明らかとなった。

※ Mitogen-activated protein kinase kinase：細胞の増殖、分代、生存に関わるシグナルを伝えるリン酸化酵素の一種

はじめに

ATP 依存性クロマチンリモデリングは、クロマチンの高次構造を改変することで転写因子のアクセシビリティを制御し、転写調節に決定的な役割を果たす[1,2]。ヒストン修飾、ヒストンバリアントの組み込み、ヌクレオソームの再配置といった機構を介してクロマチンリモデリングは、細胞運命制御や細胞分化に応じてオープンクロマチン領域（Open Chromatin Regions：OCR）の形成を動的に規定する。この制御機構の破綻は異常な遺伝子発現プログラムを惹起し、組織恒常性の破綻に直結しうることから、クロマチンダイナミクスは生体恒常性の維持に不可欠である[3]。

本研究では、疾患における異常なクロマチンリモデリングの研究モデルとして、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型（HTLV-1）関連脊髄症（HTLV-1-associated myelopathy：HAM）に着目した。HTLV-1 は世界で推定 500 万～ 1000 万人が感染しており、そのうち約 5% が成人 T 細胞白血病 / リンパ腫（ATL）を、0.3 ～ 3% が HAM を発症する[4]。HAM では感染細胞がヘルパー T 細胞 1 型（Th1）様の異常形質を獲得してポリクローナルに拡大する一方、ATL では制御性 T 細胞（Treg）様の表

*1 Nakashima Makoto　聖マリアンナ医科大学　難病治療研究センター
*2 Suzuki Yutaka　東京大学大学院　新領域創成科学研究科附属生命データサイエンスセンター
*3 Uchimaru Kaoru　東京大学大学院　新領域創成科学研究科　病態医療科学分野
*4 Yamagishi Makoto　東京大学大学院　新領域創成科学研究科　病態医療科学分野、東京大学大学院　新領域創成科学研究科　感染症ゲノム腫瘍学分野
*5 Yamano Yoshihisa　聖マリアンナ医科大学　難病治療研究センター、聖マリアンナ医科大学　脳神経内科学

現型を伴うモノクローナル増殖が顕著となる。単一のウイルス感染が、このような表現型の異なる2つの疾患像をもたらす分子機序は、依然として未解明である。

感染細胞の遺伝子発現プログラムの差異は、HAMとATLにおける異なる病態基盤を規定する主要因であると考えられる[5]。たとえば、HAMの感染細胞はATLと比較してウイルス遺伝子HTLV-1 Taxの発現が高く、その結果、IFN-γの過剰産生を伴うTh1様細胞へと転化し、Th1応答が優勢な慢性炎症環境を形成する[6]。脊髄組織では、IFN-γ高産生の感染細胞がアストロサイトを刺激してCXCL10産生を促し、感染細胞および炎症細胞のさらなる集積を誘導する[7]。この正のフィードフォワード・ループがHAMの病態基盤であり、異常分化した感染細胞は明確な治療標的と位置づけられる。しかしながら、感染細胞がこの異常表現型へ移行するエピジェネティック基盤は十分に解明されていない。

多くの悪性腫瘍において、クロマチンリモデリング因子の体細胞変異がクロマチン構造の異常を惹起し、腫瘍進展を促進させることが示されている[8]。一方、炎症性疾患におけるクロマチン構造異常の病態的意義は未だ限定的にしか理解されていない。われわれは以前、HTLV-1感染がクロマチン再構築とエピジェネティック破綻を誘導し、白血病化に寄与しうることを報告した[9]。この知見を踏まえ、HAMの感染細胞においても疾患特異的なクロマチン構造異常が生じ、炎症促進遺伝子の異常活性化を介して病態形成に寄与する、という仮説を立てた。

本研究では、この仮説を検証すべく、HAM患者検体に対して遺伝子発現とクロマチンアクセシビリティを同時に取得するシングルセルマルチオーム解析を実施し、HAMの疾患活動性バイオマーカーと統合して解析を行った。その結果、ウイルス－宿主相互作用が炎症病態を促進する新規エピジェネティック機構を明らかにし、同機序を標的とする治療戦略の可能性を見出した。

対象と方法

患者由来サンプル

HAM患者（n = 35）および無症候性キャリア（n = 3）の末梢血中単核細胞（PBMC）はPancoll（PANBiotech GmbH、Aidenbach、Germany）により回収された。HAM患者の脳脊髄液は腰椎穿刺により採取された。HAMの診断はWHOのガイドラインに基づいて執り行われた。この研究は、聖マリアンナ医科大学（承認番号 1646）および東京大学（承認番号 19-51、18-265）の研究倫理委員会の承認を得た上で、すべての研究参加者にインフォームドコンセントが行われ、実行された。

シングルセルマルチオーム解析

シングルセルマルチオームライブラリーは、Chromium Xと10x Genomics Chromium Next GEM Single Cell Multiome ATAC plus Gene Expression kit（共に10x Genomics社）を用いて生成された。ライブラリーはNovoSeq 6000 system（Illumina）によりシーケンスされ、Cell Ranger ARCv2.0.0（Cell Ranger ARC、10x Genomics）によりプロセッシングおよびマッピングされた。出力されたデータはSeurat（v4.3.0）およびSignac（v1.9.0）により解析された。Trajectory解析は、Monocle3（v1.3.7）を用いて解析された。

ChIP-seq

$4x10^6$個のHCT-4（HAM患者由来HTLV-1感染細胞株）を1/37倍に希釈されたホルマリン液に固定し（最終濃度1%）、SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit (#9003、Cell Signaling Technology)

を用いて、ChIP サンプルを用意した。抗 Fosl2 抗体（#19967、Cell Signaling Technology）、抗 Tax 抗体（LT-4, 田中勇悦先生より供与いただいた）、Mouse mAb IgG1 Isotype Control（#5415、Cell Signaling Technology）、Normal Rabbit IgG（#2729、Cell Signaling Technology）は免疫沈降のために使用された。ライブラリーの生成およびシーケンスは GENEWIZ 社に委託した。NovaSeq 6000 system により得られたデータは、Bowtie2（v2.5.2）によりアライメントされ、Samtools（v1.19）、MACS2（v2.2.7.1）および HOMER（v4.11）によりピークコールおよびモチーフ解析が実行された。

MEK 阻害剤

Binimetinib、cobimetinib、selumetinib、および trametinib（Cayman Chemical）は本研究における MEK 阻害剤として使用された。

統計的解析手法

2 群間の統計学的有意差は、両側 Student's t 検定および対応のある t 検定により適切に評価した。3 群以上については、両側 ANOVA 検定および Kruskal-Wallis 検定により評価した。2 群の相関係数は、Pearson's および Spearman's の両側検定により評価した。

結　果

HAM 特異的オープンクロマチン領域の探索

HAM 患者（N = 2）および無症候性キャリア（N = 3）の PBMC を用いて、シングルセルマルチオーム解析を実施し、49645 細胞のデータを取得した。UMAP（Uniform Manifold Approximatoin and Projection）による 2 次元圧縮によるクラスター分類の結果、HAM 患者由来の HTLV-1 感染細胞と無症候性キャリア由来の HTLV-1 感染細胞は、異なるクラスターに分類された（**図 1A**）。したがっ

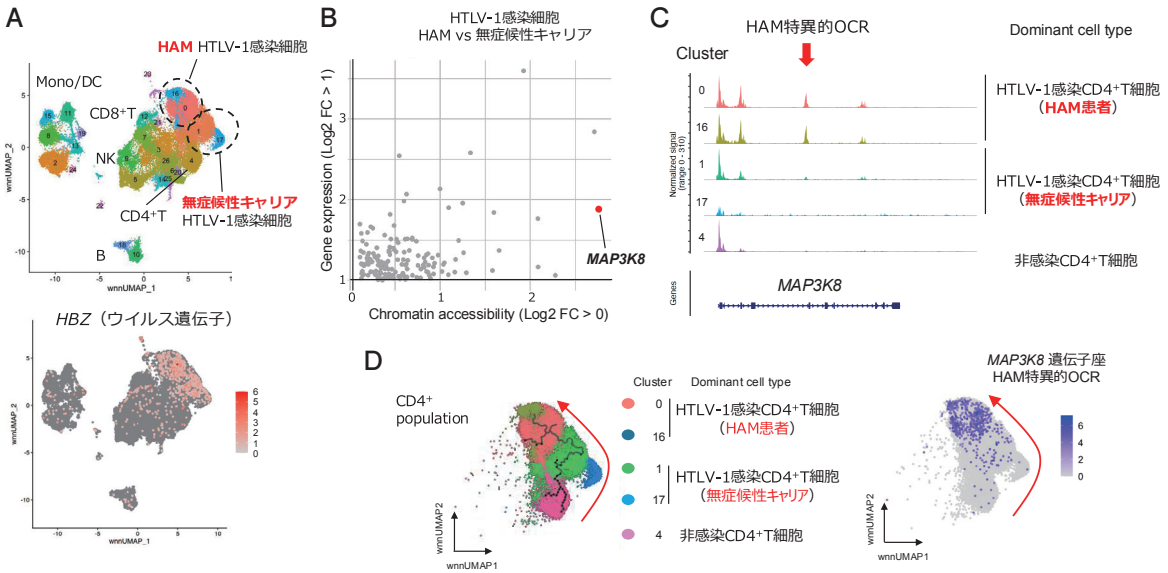


図 1　HAM 患者および無症候性キャリアの末梢血単核球を用いたシングルセルマルチオーム解析
A　UMAP によるクラスタリング（上）*HBZ* 遺伝子発現（下）　**B**　遺伝子発現とクロマチンアクセシビリティの比較解析
C　*MAP3K8* 遺伝子座における OCR
D　CD4$^+$細胞群におけるシュードタイム解析（左）、*MAP3K8* 遺伝子座における HAM 特異的 OCR のピーク値（右）
A、C、D　文献 10）より引用、改変。

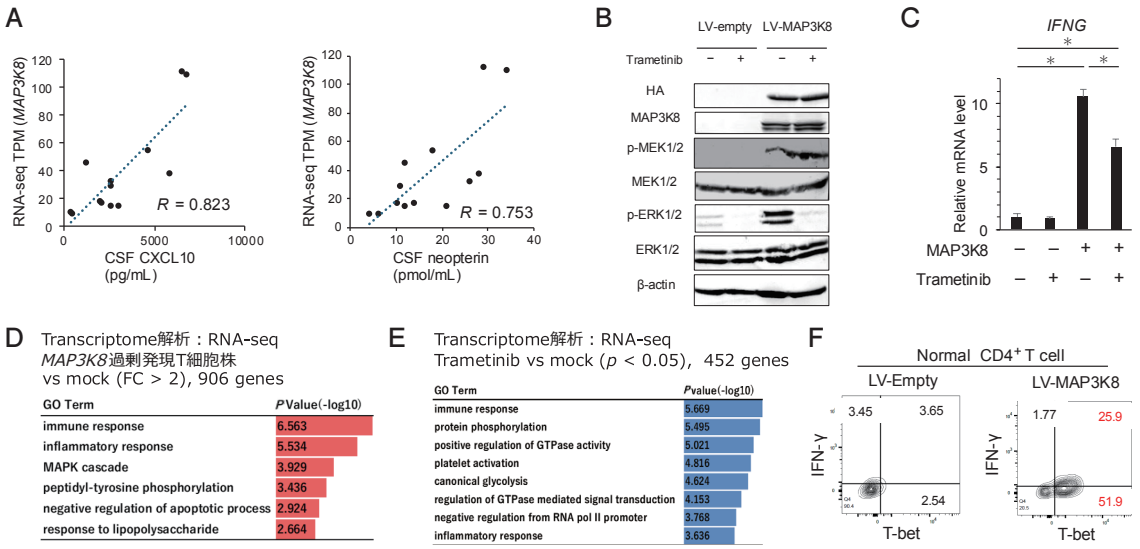


図 2　MAP3K8 による MEK-ERK 経路の活性化と Th1 分化誘導
A　Pearson correlation coefficient、n = 13.　**B**　MAP3K8 発現系における MEK-ERK 経路の評価
C　A two-sided paired *t*-test、n = 3 biologically independent experiments、means ± SD、* $p < 0.05$
D、**E**　GO analysis、a two-sided Fisher's exact test.　**F**　*MAP3K8* を発現誘導させた $CD4^+$ 細胞に対する Th1 誘導評価
文献 10）より引用、改変。

てこれらの細胞群は遺伝子発現およびクロマチンアクセシビリティのプロファイルが大きく異なることを意味する。両者を比較して、最もクロマチンアクセシビリティの変動が大きく、かつ過剰発現している遺伝子として、*MAP3K8* 遺伝子を同定した（**図 1B**）。*MAP3K8* 遺伝子座でのオープンクロマチン領域（Open Chromatin Region：OCR）をクラスターごとに比較すると、HAM の感染細胞で特異的な OCR の形成が確認された（**図 1C**）。シュードタイム解析を実施したところ、非感染細胞から無症候性キャリアの感染細胞、HAM 患者の感染細胞への推移に伴い、*MAP3K8* 遺伝子座に HAM 特異的な OCR が形成されていくことが予測された（**図 1D**）。

HAM 患者由来の感染細胞における *MAP3K8* 発現と疾患活動性の関連

HAM 患者の PBMC（n = 13）から $CD4^+CADM1^+CD7^+$ の感染細胞集団を分取し、RNA-seq により遺伝子発現プロファイルを取得した。HAM 患者の疾患活動性マーカーとして確立されている脳脊椎髄液中 CXCL10 濃度およびネオプテリン濃度と感染細胞における *MAP3K8* の発現量を比較すると、両者とも強い相関が認められた（**図 2A**）。この結果は、感染細胞の中で発現する MAP3K8 の機能が疾患活動性に関与している可能性を示唆する。そこで、T 細胞株である Jurkat 細胞にレンチウイルスベクターにより MAP3K8 を過剰発現させたところ、MEK-ERK 経路の恒常的活性化と *IFNG* 遺伝子の過剰発現が認められた（**図 2B、C**）。さらにトランスリプトームレベルで MAP3K8 の機能的意義を評価したところ、免疫反応および炎症反応遺伝子群の発現誘導が認められた（**図 2D**）。一方で、MEK 阻害剤である trametinib の投与により、ERK 経路の恒常的活性化がキャンセルされ、*IFNG* 発現の抑制、さらにトランスクリプトームレベルでの免疫反応および炎症反応遺伝子の抑制が認められた（**図 2B、C、E**）。

正常 $CD4^+$T 細胞に *MAP3K8* 遺伝子を導入すると、T-bet、IFN-γの誘導による Th1 への分化誘導が確認された（**図 2F**）。

HAM における *MAP3K8* の転写誘導因子の探索

HAM における *MAP3K8* の発現機序を検討するために、HAM 患者の PBMC から CD4/CADM1/CD7 を用いて HTLV-1 感染細胞をソーティングし、さらにシングルセルマルチオームの追加解析を実施した。31633 細胞からなる HAM 患者のシングルセル遺伝子発現およびクロマチンアクセシビリティデータを解析した結果、*MAP3K8* の発現量により感染細胞集団が 2 つの異なるクラスターに分類されることが明らかとなった（**図 3A**）。*MAP3K8* を高発現する感染細胞は *IFNG* および *TBX21* を含む炎症関連遺伝子の高発現を特徴としていた（**図 3B-C**）。これらの細胞集団間における転写因子の使い分けを評価するために、ゲノムアクセシビリティ解析を実施した。その結果、*MAP3K8* 発現の高い集団では、*MAP3K8* 発現の低い集団と比較して 14 個の転写因子がゲノムにアクセスしやすい状況であることが判明した（**図 3D**）。この中で最も *MAP3K8* の発現量と相関の高い転写因子として、*FOSL2* を同定した（**図 3E**）。したがって、*FOSL2* が *MAP3K8* の転写に寄与する可能性が考えられる。そこで実際に Fosl2（*FOSL2* タンパク質）が *MAP3K8* 遺伝子座のどこに結合しているか、Fosl2 抗体を用いて ChIP シークエンス（Fosl2 ChIP-seq）を行った。その結果、HAM 特異的な OCR に Fosl2 が強く結合していることが判明した（**図 4A**）。さらにウイルス因子である HTLV-1 Tax 自身はゲノムへの直接的な結合能はないが、この HAM 特異的 OCR に局在していることが明らかとなった（**図 4A**）。Fosl2 はヘテロダイマーを形成することで AP-1 として機能することが知られている。HAM 患者の感染細胞における Fosl2 のパートナー因子を推定するために、Fosl2 ChIP-seq データによりモチーフ解析を行ったところ、Fosl2 と共に最もアクセスしていた因子は c-Jun であった（**図 4B**）。そこで、Fosl2、c-Jun、HTLV-1 Tax が HAM 特異的 OCR への結合を介して *MAP3K8* の転写を増幅するか、ルシフェラーゼを用いたエンハンサー効果の検討を行った。*MAP3K8* プロモーターは転写開始点から－ 918 bp から +178 bp であることが報告されている。*MAP3K8* プロモーターの上流に HAM 特異的 OCR の塩基配列である 457 bp を挿入すると、著しい転写活性の増幅が確認された（**図 4C**）。エンハンサー領域の向きは、転写の増幅に影響しないことがエンハンサーの定義とされる。HAM 特異的 OCR を MAP3K8 プロモーターの上流に逆向きに挿入しても転写活性の増幅量は同様であった。興味深いことに、c-Jun と同じく AP-1 のパートナー分子である JunB、BATF、BATF3 を Fosl2 と共に導入しても、*MAP3K8* のエンハンサー活性は全く認められなかった。すなわち、Fosl2 と c-Jun の組み合わせが、この HAM 特異的 OCR を介した *MAP3K8* のエンハンサー活性に必須であることが明らかとなった。ここにさらに HTLV-1 Tax を導入すると、爆発的なエンハンサー活性の増幅が認められた（**図 4D**）。HTLV-1 Tax は、Fosl2 および c-Jun を誘導することが報告されていることから、HTLV-1 Tax が HAM 特異的 OCR のトリガー因子である可能性を考え、正常 $CD4^+$T 細胞にレンチウイルスベクターを用いて *MAP3K8* 遺伝子を導入して 1 週間の培養後、ATAC シークエンス（ATAC-seq）によりクロマチンアクセシビリティを評価した。その結果、Tax の導入により HAM 特異的 OCR が形成されることが明らかとなった（**図 4E**）。

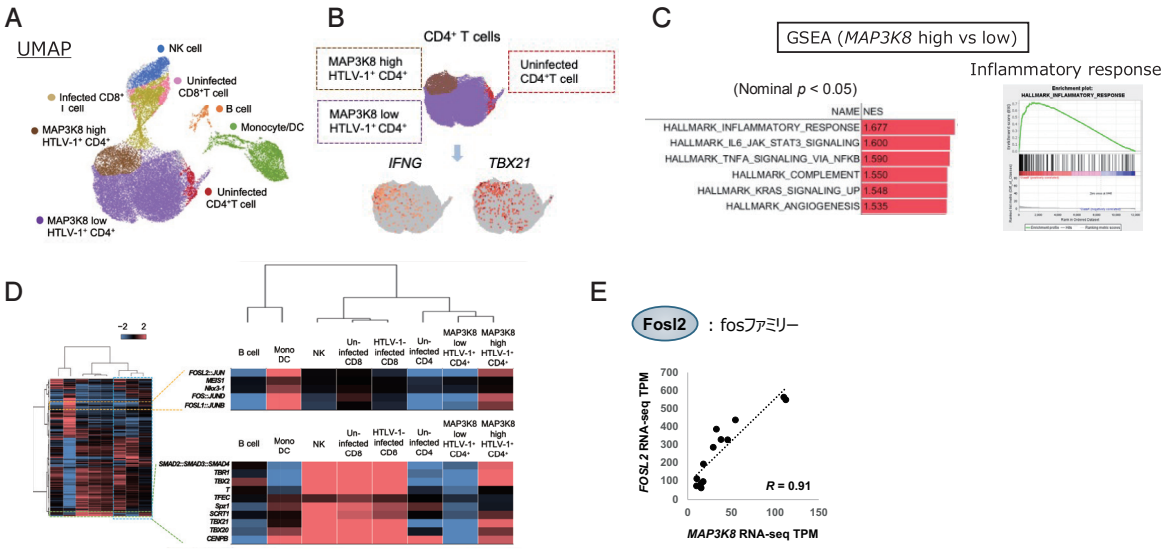


図 3　*MAP3K8* 遺伝子の発現誘導機序の探索

A　UMAP によるクラスタリング　**B**　$CD4^+$細胞における *MAP3K8* 発現
C　A one-sided permutation test (1,000 permutations)、GSEA algorithm に基づき実行された。
D　ゲノムアクセシビリティ解析　**E**　Pearson correlation coefficient、n = 13.
文献 10）より引用、改変。

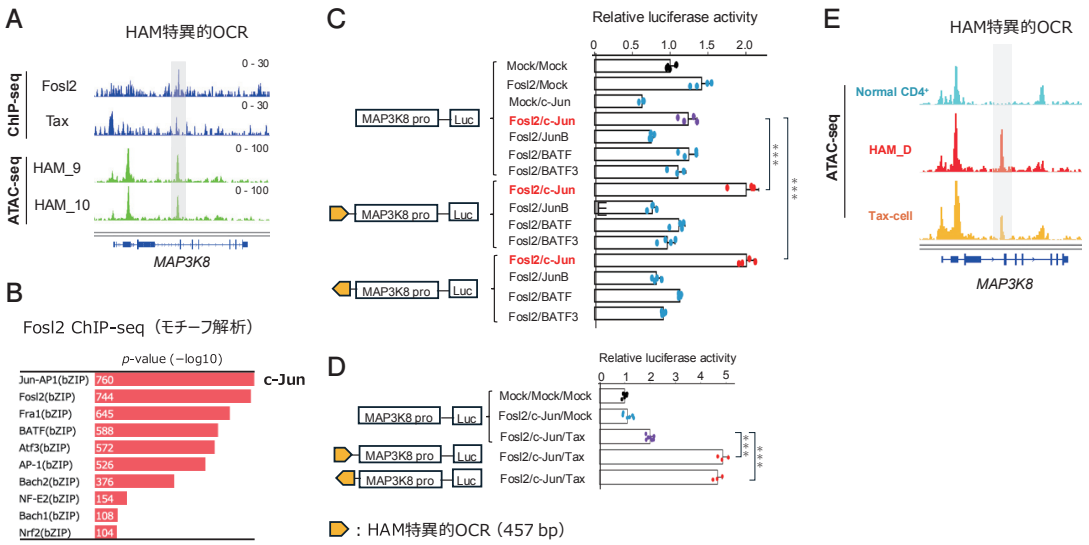


図 4　*MAP3K8* 遺伝子の発現誘導機序

A　Fosl2 ChIP-seq および Tax ChiP-seq　**B**　A one-sided hypergeometric test.
C、D　One-way ANOVA followed by two-sided Tukey's honestly significant difference (HSD) test、*** $p < 0.001$、n = 3, 4, or 5 biologically independent experiments.
E　*MAP3K8* 遺伝子座における OCR
文献 10）より引用、改変。

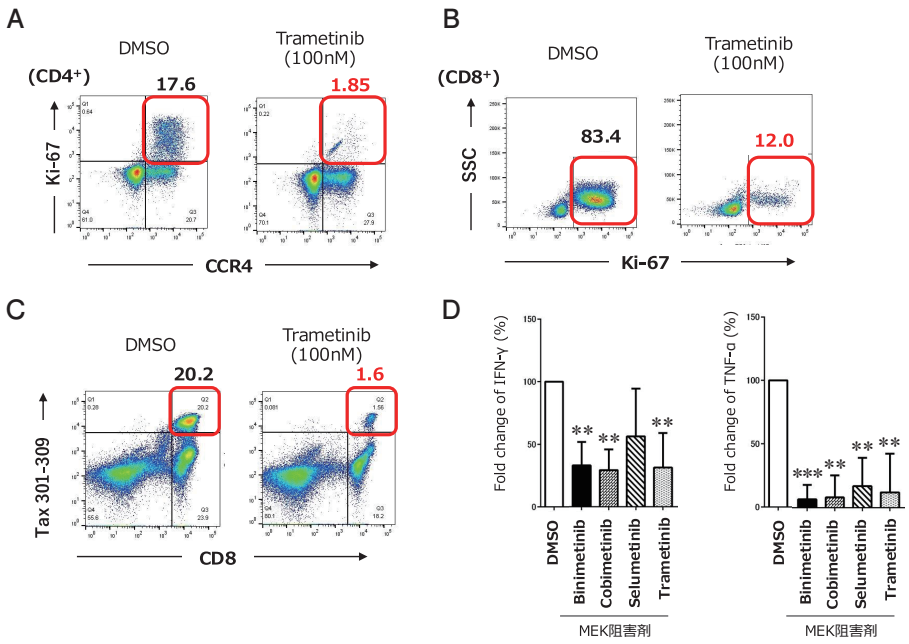


図 5　HAM に対する MEK 阻害剤の有効性の検討
A HTLV-1 感染 T 細胞の増殖作用に対する Trametinib の効果　**B** $CD8^+$細胞の増殖作用に対する Trametinib の効果
C Tax 特異的 CTL に対する Trametinib の効果　**D** 炎症サイトカイン産生に対する MEK 阻害剤の効果 n = 7、means ± SD、*** p< 0.001、** p< 0.01、Friedman's test.
文献 10）より引用、改変。

HAM 患者 PBMC を用いた *in vitro* 培養系炎症モデルによる MEK 阻害剤の効果の検討

HAM の炎症機序として MAP3K8-MEK-ERK 経路の重要性が明らかとなったため、この経路を特異的に抑制可能な MEK 阻害剤による抗炎症効果を検討した。HAM 患者の PBMC を無刺激条件で培養すると、HTLV-1 感染 T 細胞の活性化を起点として炎症性サイトカインが産生され、感染細胞だけでなく CD8 陽性細胞などの免疫細胞も自発的に細胞の増殖が起こる。この現象は HAM の病変部での炎症を模倣していると考えられている。このモデル系において、ヒトにおける最大血中濃度を超えない濃度で各種 MEK 阻害剤を添加したところ、HTLV-1 感染細胞の増殖抑制と同時に反応性の CTL の増殖抑制効果を示した（**図 5A、5B**）。ウイルスの活性化に反応して活性化する HTLV-1 Tax 特異的 CTL は、HLA-A*24:01 を持つ患者において、抗 HTLV-1 Tax 特異的 HLA テトラマーにより検出が可能である。HTLV-1 Tax 特異的 CTL の増殖も MEK 阻害剤により抑制可能であることが示された（**図 5C**）。また MEK 阻害剤は、炎症サイトカインである IFN-γ および TNF-α の産生量も著しく減少させた（**図 5D**）。

考　察

シングルセルレベルの遺伝子発現プロファイルとクロマチン構造プロファイルを HAM 患者と無症候性キャリアの HTLV-1 感染細胞で比較することにより、HAM の HTLV-1 感染細胞の特徴を規定する遺伝子として、*MAP3K8* を同定した。ま

た、HAM特異的なクロマチンリモデリング異常が*MAP3K8*遺伝子座のエンハンサー領域に生じ、この部位にFosl2、c-Jun、そしてHTLV-1 Taxが結合して*MAP3K8*発現を著しく上昇させることを明らかにした。さらに、HTLV-1 Taxがこの領域でクロマチンリモデリングを誘導することを実証した。加えて、MAP3K8の発現はMEK-ERK経路の恒常的な活性化を介して、HTLV-1感染細胞をTh1様細胞へと分化・増殖させることに寄与し、HAM患者の疾患活動性と密接に関連していることを示した。

HAM患者由来PBMCを用いた*in vitro*炎症応答モデルにおいて、MEK阻害剤、特にTrametinibは、HTLV-1感染細胞やTax特異的CTLを含む$CD8^+$T細胞の増殖を抑制した。TCR刺激による$CD8^+$T細胞の増殖にはMEK-ERK経路の活性化が必須であることから、MEK阻害剤はウイルス抗原によって過剰に活性化された$CD8^+$T細胞に対して有効である可能性が示唆される。さらに、MEK阻害剤は、HAM患者のHTLV-1感染細胞や炎症細胞から産生されるIFN-γの量を有意に抑制した。これらの結果から、MEK阻害剤はHAMにおける炎症病態の制御に有望な治療薬となり得ることが示唆された。HAMのような希少疾患において、新規治療薬剤を開発することは困難であることを踏まえると、MEK阻害剤のような既存薬をリポジショニングすることは、実用的かつ有望な治療戦略である。

本研究により、ウイルス因子と宿主因子の協調作用によって異常なクロマチンリモデリングを誘導する新規機序を発見した。これらの分子基盤に基づいた治療法の開発は、HAMにおける有望な治療薬開発に資するものと期待される。

追　記

本研究は*Nature Communications*誌に発表した[10]。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人臨床薬理研究振興財団に心より深謝申し上げます。また、本研究にご協力頂きました患者様に御礼申し上げます。

利益相反

本研究に関して、開示すべき利益相反はありません。

文　献

1) Knezetic JA, Luse DS. The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II *in vitro*. *Cell* 1986; **45**: 95-104.

2) Klemm SL, Shipony Z, Greenleaf WJ. Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. *Nat Rev Genet* 2019; **20**: 207-20.

3) Berson A, Nativio R, Berger SL, Bonini NM. Epigenetic regulation in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 2018; **41**: 587-98.

4) Einsiedel L, Woodman RJ, Flynn M, Wilson K, Cassar O, Gessain A. Human T-Lymphotropic Virus type 1 infection in an Indigenous Australian population: epidemiological insights from a hospital-based cohort study. *BMC Public Health* 2016; **16**: 787.

5) Yamagishi M, Fujikawa D, Watanabe T, Uchimaru K. HTLV-1-mediated epigenetic pathway to adult T-cell leukemia-lymphoma. *Front Microbiol* 2018; **9**: 1686.

6) Araya N, Sato T, Ando H, Tomaru U, Yoshida M, Coler-Reilly A, et al. HTLV-1 induces a Th1-like state in $CD4^{+}CCR4^{+}$ T cells. *J Clin Invest* 2014; **124**: 3431-42 .

7) Ando H, Sato T, Tomaru U, Yoshida M, Utsunomiya A, Yamauchi J, et al. Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. *Brain* 2013; **136**: 2876-87.

8) Kadoch C, Crabtree GR. Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer: Mechanistic insights gained from human genomics. *Sci Adv* 2015; **1(5)**: e1500447.

9) Mizuike J, Suzuki K, Tosaka S, Kuze Y, Kobayashi S, Nakashima M, et al. Rewired chromatin structure and epigenetic gene dysregulation during HTLV-1 infection to leukemogenesis. *Cancer Sci* 2025; **116(2)**: 513-23.

10) Nakashima M, Nagai K, Takao N, Araya N, Kuze Y, Mizuike J, et al. Chromatin remodeling enhances MAP3K8 expression in HAM: a key pathogenesis for therapeutic intervention. *Nature Communications* 2025; **16(1)**: 9874.