

令和元年6月7日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08665

研究課題名(和文)成人T細胞白血病のプロテオーム解析による病態と臨床標的分子の解明

研究課題名(英文) Analyzing molecular basis and molecular targets for therapeutic application of adult T-cell leukemia / lymphoma by using proteomics

研究代表者

本間 圭一郎 (Honma, Keiichiro)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20505945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞株ATN-1で発現亢進が見られたリン酸化蛋白質3種のうち、臨床検体での検討からATL急性型で特異的にHMGB1の高発現が見られた。急性型ではSTAT3およびHMGB1に遺伝子変異が認められ、STAT3変異体のみHMGB1遺伝子プロモーター領域への結合が認められた。HTLV-1感染T細胞に変異STAT3と変異HMGB1を遺伝子導入し、ヌードマウスでの造腫瘍性が確認された。このことからSTAT3とHMGB1遺伝子変異が成人T細胞白血病の造腫瘍性に重要と考えられた。HMGB1の機能を阻害するDHMEQにより造腫瘍性は抑制され、HMGB1が治療のターゲットとして有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人T細胞白血病・リンパ腫は世界的には極めて稀で、日本南西部をはじめカリブ海諸島、中央アフリカのごく一部の地域において特異的に多く見られる高悪性度の悪性リンパ腫である。とりわけ急性型は有効な治療法が確立されておらず近年になっても治療成績の改善が得られていない。全世界的な研究対象となりにくいことから、疾患発生にレトロウイルスHTLV-1が関与することが知られている以外、本疾患の腫瘍形成における基礎研究の知見集積に乏しい。このため治療につながる分子基盤の一部を解明した今回の研究成果は、とりわけ本疾患の好発地域である我が国において、非常に意義深いものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We identified three proteins(ERK1/2, DUSP3, HMGB1) which up-regulated phosphorylation and expression in adult T-cell lymphoma (ATL) cell-line comparing with HTLV-1 immortalized human T-cells (MT-2) by proteomics. A correlation between expression level of ATL acute type clinical samples by immunohistochemistry and proteomics data in cell-line was found only for the HMGB1. Recurrent somatic mutation of STAT3 and HMGB1 was found in 32% and 24% of ATL acute type clinical samples, respectively. We hypothesized that STAT3 mutations may induce histone modifications, such as H3K9me3 and H3K9Ac, and may expedite STAT3 binding to the HMGB1 promoter in MT2. The reduction of H3K9me and elevation of H3K9Ac histone modification in the STAT3 binding sites on the promoter of HMGB1 was observed only in the STAT3 mutant. Tumor formation was observed in nude mice injected in MT-2 expressing STAT3 mutant and HMGB1 mutant. Furthermore, administration of HMGB1 inhibitor DHMEQ prevents tumor formation.

研究分野：悪性リンパ腫

キーワード：成人T細胞白血病・リンパ腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) は世界的に極めて稀で、日本南西部をはじめカリブ海諸島、中央アフリカの一部地域において特異的に多く見られ、human T-lymphocytic virus I (HTLV-I) が腫瘍細胞中に検出される高悪性度の悪性リンパ腫である。このため腫瘍形成における全世界的な基礎研究の進捗による知見集積に乏しい。また、HTLV-I キャリアからの発症までの潜伏期間は数十年であり、高齢発症が多いことから治療強度の高い造血幹細胞移植などは治療関連死のリスクが高く困難なことが多い。以上から、ATLL、なかでも急速な臨床経過をとる急性型では有効な治療法の開発が遅れており、長年治療成績の改善が得られていない。近年、抗 CCR4 抗体 Mogamurizumab は皮膚病変には一定の効果は得られているが、リンパ節病変への効果に乏しく高悪性度のリンパ腫型や急性型の臨床予後の改善には不十分である。このため本疾患の分子基盤の解明は、とりわけ HTLV-I キャリアの多い我が国においては、研究者に課せられた喫緊の課題の一つである。我々は、悪性リンパ腫において脱コピキチン化酵素 A20 が高頻度に欠失を認めることを明らかにした (Honma K et al. Genes Chromosomes Cancer 2008)。また A20 の遺伝子変異による、脱コピキチン化を介した NF- κ B 制御機構の異常がリンパ腫形成に関与することも明らかにした (Honma K, et al. Blood 2009)。これらの研究は、リンパ腫における翻訳後修飾機構の異常による腫瘍形成機構の一端を解明したと考えられる。ATLL においても、腫瘍形成に翻訳後修飾の制御異常が重要な役割を果たしていると考えられる知見が報告されている (Richard Sae et al. 2007)。現状低分子化合物による分子標的療法においては、リン酸化キナーゼが現実的かつ有効な標的分子となる。しかしながら従来の CGH ゲノム解析、RNA シークエンス解析や発現解析だけではその分子基盤は明らかにできておらず、有効な治療標的も明らかにできていない。我々は以上の観点から ATLL の治療標的の同定に翻訳後修飾の中でもリン酸化にターゲットを絞ったプロテオミクス解析が重要と考えた。

2. 研究の目的

本研究の全体構想は、成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) 形成に関わる分子を、iTRAQ 解析を用いた網羅的プロテオーム解析によって明らかにすることで、治療の標的となる分子基盤を同定することを目的とした。具体的には以下の内容を明らかにすることを目的とした。

- (1) iTRAQ による ATLL 細胞株および HTLV-I 感染ヒト T 細胞の比較で、ATLL においてリン酸化が亢進している蛋白質を同定する。
- (2) 同定された蛋白質の ATLL における臨床的意義について検討する。
- (3) 同定された蛋白質の ATLL における造腫瘍性、治療標的としての可能性を細胞株やマウスを用いて解析する。

3. 研究の方法

- (1) iTRAQ による、ATLL 細胞株で発現変動しているリン酸化タンパクの同定

ATLL 急性型の細胞株 ATN-1 と HTLV-I により不死化したヒト臍帯血由来 T 細胞株 MT-2 のタンパク質試料から、リン酸化タンパクを IMAC による精製 (コスモバイオ社 PhosphoCruz を使用) 後、lysis buffer で変性・還元・アルキル化、消化する。多検体間の比較定量が可能な iTRAQ 法を用い、異なる試料から得られた試料を異なる iTRAQ® 試薬でラベル後、iTRAQ® 修飾ペプチドを MS/MS 解析に供し、網羅的タンパク質発現解析を行うことで、MT-2 と ATN-1 細胞株において発現が亢進しているリン酸化タンパクを同定する。同定された蛋白質はリン酸化抗体による免疫沈降ウエスタンブロッティングにより確認する。

- (2) 同定されたタンパクの、臨床検体における意義を検討

細胞株のプロテオミクス解析で同定されたリン酸化蛋白質をパラフィン包埋ホルマリン固定の臨床検体を用いて、免疫染色により ATLL の臨床検体での相関を確認する。可能であれば、急性型、リンパ腫型といった治療抵抗性で臨床問題となる疾患亜型との相関についても検討する。免疫染色で確認できた蛋白質はコンパニオン診断薬としての標的分子の候補と考えられ、重点的に解析する。また次世代シークエンス解析を行い、同定されたリン酸化蛋白と相関する遺伝子異常について検討する。

- (3) 機能解析

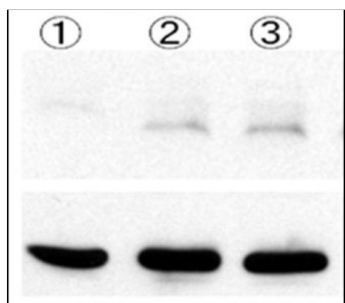
同定された蛋白質の機能解析を両者の相互作用を ChIP-seq などのトランスクリプトームの側面からの解析や、発現の相関について検討する。また細胞株およびマウスを用いた造腫瘍性に関する解析を行う。造腫瘍性については HTLV-I との協調作用を明らかにするために、健康ドナーからのヒト CD4 陽性 T 細胞、HTLV-I 不死化 CD4 陽性 T 細胞にそれぞれ遺伝子導入し、ヌードマウスに接種し造腫瘍性を比較検討する。いできしまた阻害剤が入手可能であれば、その腫瘍抑制効果についても検討する。

4. 研究成果

- (1) iTRAQ による、ATLL 細胞株で発現変動しているリン酸化タンパクの同定

ATLL 急性型細胞株 ATN-1 とヒト不死化 HTLV-I 感染 T 細胞 MT-2 から抽出した蛋白質をリン酸化アフィニティーカラムで精製し、iTRAQ により ATN-1 で発現亢進が見られた蛋白質を 3 種類 (ERK1/2, DUSP3, HMGB1) 同定した。これらはリン酸化抗体を用いた免疫沈降ウエスタンブロットでも確認した。

免疫沈降 WBA による各リン酸化蛋白質の発現
pERK1/2 pDUSP3 pHMGB1



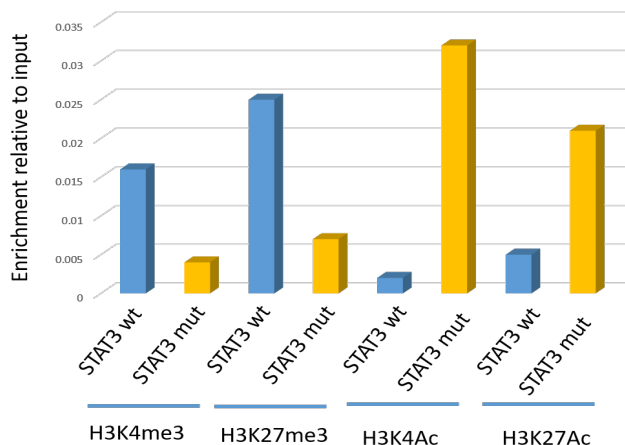
(2) 同定されたタンパクの、臨床検体における意義を検討

ERK1/2, DUSP3, HMGB1 それぞれのリン酸化抗体を用いて、ATLL の臨床検体 43 例 (急性型 32 例、リンパ腫型 9 例) のパラフィン包埋ホルマリン検体で免疫染色による検討を行い、HMGB1 が臨床検体でも急性型において高率に発現の亢進が認められた (急性型 30/32 例陽性 93.8%, リンパ腫型 1/9 例 11.1%)。HMGB1 を含む遺伝子異常解析を次世代シーケンスによるエクソンシーケンスで検討した。43 例中 40 例で解析可能であり、12 例に STAT3 の遺伝子変異 (p.D427H, E616G, p.E616K, p.E696K) および 8 例に HMGB1 の遺伝子変異が認められた。STAT3 は既報の変異以外に新規遺伝子変異は認められなかった。STAT3 変異例は HMGB1 の免疫染色での高発現と相関した。

(3) 同定された蛋白質の機能解析

STAT3 変異例と HMGB1 の発現がよく相関したので、仮説として STAT3 変異例は HMGB1 のプロモーターのヒストン修飾に影響して HMGB1 の高発現に関わるのではないかと考えた。この仮説の検証に、STAT3 pD427H 変異、STAT3 wild type をそれぞれ遺伝子導入した MT-2 を用いて、CHIP seq 解析でヒストン H3K9me3, H3K27me3, H3K9Ac の免疫沈降を行い、STAT3 binding site を定量 PCR で増幅した。STAT3 変異は MT-2 の HMGB1 プロモーター領域の STAT3 binding site のヒストン修飾を H3K9me3, H3K27me3 を減弱、H3K9Ac, H3K27Ac を増加させることを明らかにした。

HMGB1 promotor STAT3 binding



また STAT3 変異を MT-2 に遺伝子導入することで、STAT3 wild type を導入した場合に比し、HMGB1 mRNA の発現を亢進した。次にこれらの変異の造腫瘍性について MT-2 に STAT3 変異、STAT3 wild type、HMGB1 変異、HMGB1 wild type の組み合わせで導入し、ヌードマウスの皮下に注射することで造腫瘍性について検討した。HMGB1 wild type と STAT3 wild type の組み合わせ、HMGB1 変異と STAT3 wild type の組み合わせ、HMGB1 wild type と STAT3 変異の組み合わせはいずれも対照と同様に造腫瘍性が見られなかった。HMGB1 変異と STAT3 変異の組み合わせは注射した全例で腫瘍形成が認められた。またこの腫瘍形成は HMGB1 の阻害剤である DHMEQ を投与することで抑制された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Fukuda Y, Asaoka T, Eguchi H, Honma K, Morii E, Iwagami Y, Akita H, Noda T, Gotoh K, Kobayashi S, Mori M, Doki Y. Laparoscopy-assisted extended right hepatectomy for giant hemorrhagic hepatic cyst mimicking biliary cystadenocarcinoma: a case report. Surg Case Rep. 査読有、2019 Apr 11; 5(1):58. doi: 10.1186/s40792-019-0621-x.

2. Nagai K, Hayashi Y, Honma K, Sakatani A, Yoshii S, Fujinaga T, Maekawa A, Tsujii Y, Hiyama S, Shinzaki S, Watabe K, Iijima H, Tsujii M, Mizushima T, Morii E, Takehara T. Adenoma of colorectal laterally spreading tumor nongranular type with biological phenotypic features similar to cancer. J Gastroenterol Hepatol. 査読有、2018 Nov;33(11):1853-1863. doi: 10.1111/jgh.14284. Epub 2018 Jun 6.
3. Kida T, Tanimura A, Ono A, Matsui T, Honma K, Fujita J, Maeda T, Shibayama H, Oritani K, Morii E, Kanakura Y. Lymphoplasmacytic lymphoma accompanied by transformed diffuse large B-cell lymphoma with the MYD88L265P mutation. Rinsho Ketsueki. 査読有、2017;58(2):155-160. doi: 10.11406/rinketsu.58.155. Japanese.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。