

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17013029
 研究課題名（和文） ウイルス発癌とNF-kappaB

研究課題名（英文） Viral oncogenesis and NF-kappaB

研究代表者

山岡 昇司 (YAMAOKA SYOJI)
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
 研究者番号：90263160

研究成果の概要（和文）：ウイルスが感染した細胞で NF-kappaB が恒常的に活性化される分子メカニズムを解明することで、癌化のしくみを理解するとともに治療標的分子候補を見出すことをめざした。成人 T 細胞白血病細胞では NF-kappaB を活性化する細胞リン酸化酵素 NIK が翻訳前段階で過剰発現し活性化していること、同様な現象が固形癌である肺癌細胞においても見られること、NIK が有効な治療標的となりうることを報告した。

研究成果の概要（英文）：This research has aimed at understanding the mechanism of carcinogenesis and identifying molecular targets for therapy through elucidating molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in virus-infected cells. I reported that NF-kappaB inducing kinase (NIK) is over-expressed and constitutively activated at the pre-translational level in adult T-cell leukemia cells as well as in lung cancer cells, and thus could be an attractive molecular target for therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	9,400,000	0	9,400,000
2006 年度	9,400,000	0	9,400,000
2007 年度	9,400,000	0	9,400,000
2008 年度	9,400,000	0	9,400,000
2009 年度	9,400,000	0	9,400,000
総計	47,000,000	0	47,000,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) は ATL の原因ウイルスであり、その発症にウイルス遺伝子 Tax が重要な役割を演じると考えられているが、ATL 末梢血中の腫瘍細胞およびそれに由来する細胞株では Tax を含むウイルス遺伝子はほとんど発現していない。

HTLV-I 感染細胞で例外なく高い NF-kappa B、API 依存性転写活性がみられることは早くから注目、報告されてきたが、そのほとんどは Tax の作用に着目したもので、ウイルス蛋白質の発現がほとんど見られない ATL 腫瘍細胞における高い転写因子活性の原因はいまだに解明されていない。研究代表者の研究によ

って、転写因子 NF-kappa B が ATL 細胞の生存に必須であること、ATL 細胞では NF-kappa B 活性化のかなめである I-kappa B kinase (IKK) と呼ばれる細胞質内リン酸化酵素が Tax による場合とは異なる様式で恒常的に活性化されていることが初めて明らかとなった。今日まで、HTLV-I 感染 T 細胞の異常増殖は Tax の作用を中心に研究されてきていると言っても過言ではない。たしかに Tax には強力な転写活性化能があり、その解析は細胞機能の理解に大きく貢献してきた。しかし、そこからは Tax の発現が認められない ATL 細胞の腫瘍化メカニズムは解明できない。比較的単純な系である細胞膜受容体刺激による一過性 NF-kappa B 活性化に比べて、持続的 NF-kappa B 活性化の研究は生体内での生理的・病理的重要性にもかかわらず大きく立ち後れているのが現状である。本研究は HTLV-I Tax による形質転換から始まっており、研究代表者の研究はこれまで、Tax や Epstein-Barr ウイルス LMP1 などのウイルス蛋白質による持続的 NF-kappa B 活性化の分野で常に世界をリードしてきた。ウイルス性発癌蛋白質の標的ともなっている細胞因子の脱制御が非ウイルス性腫瘍発生の原因となりうるということが知られており、本研究は持続的 NF-kappa B 活性化の原因となる細胞遺伝子変化追究の最先端に位置している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、治療困難なウイルス性および非ウイルス性悪性腫瘍発症の分子メカニズムを解明することによって、根本的治療法開発の基盤を築くことにある。本研究は、ウイルス性悪性腫瘍の発症過程における細胞側遺伝子変化、特に腫瘍細胞の生存に必須なことが証明された転写因子活性化機構の研究であり、当該領域が目的としている癌の分子レベルでの理解の一端を担うものである。しかも、ウイルス感染を前提条件としながら、最終的には宿主因子の変化が悪性腫瘍発生をもたらすという視点に基づく研究であり、NF-kappa B が重要な役割をはたすことが報告されている他の非ウイルス性悪性腫瘍の理解にも貢献することをめざす。そのような宿主因子の同定は、IKK 活性制御機構の理解にも大きな貢献をすることが期待され、それを基盤として他の高い NF-kappa B 活性を示す疾患（急性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫などの造血系悪性腫瘍、乳癌、前立腺癌、慢性炎症性疾患など）の治療法開発に役立つ可能性がある。

本研究計画の目標は、以下の3点である。

(1) ヒト癌ウイルスによる発癌過程で重要な役割をはたすウイルス由来調節蛋白質に焦点を絞り、それらに共通する細胞転写因子 NF-kappaB の恒常的活性化機構を明らかにす

る。

(2) ウイルス発癌における NF-kappaB 活性化機構を腫瘍細胞側から検証し、非ウイルス性悪性腫瘍にもしばしば見られる恒常的 NF-kappaB 活性化の意義とメカニズムの解明をめざす。

(3) 特定の腫瘍細胞における恒常的 NF-kappaB 活性化機構を解明し、生存に必須な NF-kappaB 活性を腫瘍特異的に低下させる治療標的を定める。

3. 研究の方法

(1) ATL における Tax に依存しない恒常的 IKK 活性化の原因解明に取り組む。まず IKK 活性化の原因となりうる細胞性セリンスレオニンキナーゼ NIK の ATL 細胞における発現状況とその活性化について、定量 PCR 法、western blotting 法によって解析する。また、NIK の活性化による細胞トランスフォーメーションにおける NF-kappaB の役割を、ラット線維芽細胞株をもちいた軟寒天培地での培養により明らかにする。その結果は、ATL 細胞や Hodgkin Reed-Sternberg 細胞での解析結果と照合する。さらに NIK に対する siRNA を非定型的 NF-kappaB 活性化が見られる腫瘍細胞に発現させて、内因性 NIK の機能的意義を検証する。以上の実験における外来性遺伝子導入および発現は、通常のレトロウイルスまたはレンチウイルスベクターの感染によって行う。

(2) Statin 系薬剤の抗腫瘍効果の詳細を、末梢血由来 ATL 細胞株および HTLV-I 感染細胞株で解析する。その作用メカニズムをメバロン酸経路の阻害剤および中間代謝産物を用い、アポトーシス誘導は Hoechst 33258 染色で、NF-kappaB 活性評価はレポーターアッセイ、western blotting により解析する。

(3) 新規 IKK 阻害剤 IMD-0354 の抗腫瘍作用を、ATL 患者由来細胞、HTLV-I 感染細胞株、ヒト固形癌由来細胞株などを用いて、細胞増殖への影響は MTT アッセイで、NF-kappaB 関連蛋白質の動向は western blotting で、NF-kappaB 転写活性はレンチウイルスベクターで細胞ゲノムに組み込んだレポーター遺伝子発現で、細胞表面マーカーの変化はフローサイトメトリーにより解析する。

(4) 肺癌などの非ウイルス性悪性腫瘍における恒常的 NF-kappaB 活性化のメカニズムを、NIK 活性化と非定型的 NF-kappaB 活性化経路に注目して明らかにする。NF-kappaB 関連蛋白質の動向を western blotting で、NF-kappaB 転写活性はレンチウイルスベクターで細胞ゲノムに組み込んだレポーター遺伝子発現とゲルシフト法で、足場非依存性増殖能は軟寒天培地培養で評価する。

症治療薬であるスタチンの抗腫瘍作用に注目してその作用機序を明らかにした。スタチンは、NF-kappaB への作用は特に認められず、代謝中間産物、酵素阻害剤を用いた結果から、低分子量 GTPase の膜アンカー機能などに必要とされる蛋白ゲラニル化の阻害を介して ATL 細胞のアポトーシスを誘導していることがわかった(2)。

以上の研究結果から、恒常的な NF-kappaB 活性化がその生存に必要と考えられる ATL 細胞において、その主要原因が NIK の異常発現にある可能性が示された。NIK がリン酸化酵素であることからこれを分子標的とすることはじゅうぶん考えられるが、NIK は B リンパ球の成熟に重要であるとの知見がノックアウトマウスの実験結果から示されており、治療に際して免疫系に影響が出る恐れがある。NIK は、ATL、肺癌などで調べたかぎりでは多発性骨髄腫のような遺伝子増幅、転座がおこっておらず、その mRNA 異常発現メカニズムは不明のままである。蛋白レベルでの制御解析も今後の課題である。ATL を含めた悪性腫瘍細胞でなぜ NIK が過剰発現しているのか、という根本原因をつきとめれば、より腫瘍特異性の高い治療方法の開発に貢献できるのではないかと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件) 研究代表者が責任著者である論文に限って掲載。

1. Saitoh, Y., Martínez Bruyn, V.J., Uota, S., Hasegawa, A., Yamamoto, N., Imoto, I., Inazawa, J. and *Yamaoka, S.: Overexpression of NF- κ B Inducing Kinase Underlies Constitutive NF- κ B Activation in Lung Cancer Cells. *Lung Cancer*, in press.
2. Nonaka M, Uota S, Saitoh Y, Takahashi M, Sugimoto H, Arai T, Arai A, Miura O, Yamamoto N, *Yamaoka S. Role for protein geranylgeranylation in adult T-cell leukemia cell survival. *Exp Cell Res.* 315, 141-50, 2009.
3. Ochiai T, Saito Y, Saitoh T, Dewan MZ, Shioya A, Kobayashi M, Kawachi H, Muto S, Itai A, Uota S, Eishi Y, Yamamoto N, Tanaka S, Arai S, *Yamaoka S.: Inhibition of IkappaB kinase beta restrains oncogenic proliferation of pancreatic cancer cells. *J Med Dent Sci.*, 55, 49-59, 2008.
4. Saitoh, Y., N. Yamamoto, M. Z. Dewan, H. Sugimoto, V. J. Martinez Bruyn, Y. Iwasaki, K. Matsubara, X. Qi, T. Saitoh, I. Imoto, J. Inazawa, A. Utsunomiya, T. Watanabe, T. Masuda and *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.

5. Qi, X., Y. Koya, T. Saitoh, Y. Saitoh, S. Shimizu, K. Ohba, N. Yamamoto and *Yamaoka S.: Efficient induction of HIV-1 replication in latently infected cells through contact with CD4+ T cells: involvement of NF-kappaB activation. *Virology.* 361:325-334, 2007.
6. Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, Akira S, Yamamoto N, Lu KP, *Yamaoka S.: Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol.* 7, 598-605, 2006.
7. Saitoh, H. and *Yamaoka S.: A20. AfCS-Nature Molecule Pages (doi:10.1038/mp.a000159.01), 2006.
8. Sun S-C and *Yamaoka S. Activation of NF-kB and implications for transformation. *Oncogene* 24, 5952-5964, 2006.
9. Miura H, Maeda M, Yamamoto N, and *Yamaoka S.: Distinct IkappaB kinase regulation in adult T cell leukemia and HTLV-I-transformed cells. *Exp Cell Res.*, 308, 29-40, 2005.
10. Nonaka, M., Hohrie, R., Itoh, K., Watanabe, T., Yamamoto, N. and *Yamaoka S.: Aberrant NF-kB2/p52 expression in Hodgkin/Reed-Sternberg cells and CD30-transformed rat fibroblasts. *Oncogene*, 24, 3976-3986, 2005.
11. Saitoh, T., Yamamoto, M., Miyagishi, M., Taira, K., Nakanishi, M., Fujita, T., Akira, S., Yamamoto, N. and *Yamaoka S.: A20 Is a Negative Regulator of Interferon Regulatory Factor 3 Signaling. *J. Immunol.*, 174, 1507-12, 2005.

[学会発表] (計 15 件)

1. 齊藤 愛記、他:EBV膜タンパク質LMP1は、NF-kB inducing kinase プロモーターの活性化を誘導する 第57回ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
2. 魚田 慎、他:スタチンは成人T細胞白血病由来細胞株の蛋白質プレニル化を抑制し、その生育を阻害する 第57回ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
3. 山岡昇司、他:HTLV-1 Taxによるp100プロセッシングに機能的 NIK は必要でない 第68回日本癌学会学術総会、横浜、2009年10月
4. 山岡昇司、他:TaxによるNF- κ B inducing kinase プロモーターの活性化 第1回

- HTLV-1 研究会・合同班会議、東京、2008年8月
5. 山岡昇司、他：NF- κ B による NIK プロモーター活性化 第31回日本分子生物学会年会、名古屋、2008年12月
 6. 斉藤愛記、他：成人 T 細胞白血病(ATL)細胞における NF- κ B inducing kinase (NIK)の発現上昇機構 第1回 HTLV-1 研究会・合同班会議、東京、2008年8月
 7. 山岡昇司：恒常的 NF-kappaB 活性化と悪性腫瘍。BMB 2007 ワークショップ、横浜、2007年11月
 8. 宮森久幸、他：HTLV-1 tax による NIK 遺伝子転写制御機構 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月
 9. 斉藤愛記、他：ATL 細胞株における NIK の過剰発現は恒常的 NF- κ B 活性化およびマウスにおける腫瘍形成に關与する 第55回ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月
 10. 魚田 慎、他：IKK 阻害剤IMD-0354 は EBV 感染不死化B 細胞 (LCL) の増殖を抑制する 第55回ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月
 11. 堀内三吉、他：HTLV-I 感染細胞における STAT3 の発現抑制に伴う細胞増殖抑制 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌 2006年11月
 12. 魚田 慎、他：転写因子 NF- κ B の新規阻害剤IMD-0354 は ATL 細胞の増殖を抑制し細胞死を誘導 第54回日本ウイルス学会集会、名古屋、2006年11月
 13. 野中瑞穂、他：IKK 阻害剤 IMD-0354 の ATL 細胞増殖抑制効果。第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月
 14. 山岡昇司、他：Statin 系薬剤は Adult T cell leukemia (ATL) 細胞株の増殖を抑制する。第64回日本癌学会学術総会、札幌、2005年9月

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/med/mmb/Home.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 昇司 (YAMAOKA SYOJI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90263160

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし