

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07175

研究課題名(和文)核内輸送蛋白質インポーチンに着眼した成人T細胞白血病の発症機構の解明と治療戦略

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenesis and development of therapeutic strategy of adult T-cell leukemia with a focus on nuclear transport protein importin

研究代表者

石川 千恵 (Ishikawa, Chie)

琉球大学・亜熱帯島嶼科学超域研究推進機構・助教

研究者番号：90542358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子NF- κ B/AP-1の核内輸送にはインポーチン(IPO)蛋白質が重要である。HTLV-1感染が原因の成人T細胞白血病(ATL)の治療標的としてIPOを検証した。感染T細胞でIPO-1の発現が亢進し、IPO-1のノックダウンやIPO-1阻害剤インポータゾル、IPO-1阻害剤イベルメクチンは感染T細胞株の増殖や生存を抑制した。両阻害剤はNF- κ B/AP-1の核内移行を遮断し、両転写因子制御下の細胞周期関連蛋白質やアポトーシス阻害蛋白質の発現を抑制した結果、G1期での細胞周期停止とカスパーゼ依存性アポトーシスを誘導した。さらに、ATLマウスモデルでイベルメクチンは抗腫瘍効果を発揮した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATLは完治困難であり、その発症・進展にNF- κ B/AP-1の活性化は重要であるが、両転写因子を直接の標的とした治療法の臨床応用には成功していない。本研究では、転写因子の輸送機序に着目し、核内輸送蛋白質IPO-1の発現が、ウイルス感染で誘導され、NF- κ B/AP-1の核内移行にIPO-1が重要な役割を果たしていることを証明した。さらに、IPO-1の阻害剤は感染T細胞株でのNF- κ B/AP-1の標的蛋白質の発現を抑制し、細胞周期停止やアポトーシスを誘導した。マウスでの抗腫瘍効果の検証は、臨床応用への期待が高まる。本研究成果は、難治性の白血病の新規治療戦略を示しており、学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：There is no cure for ATL associated with HTLV-1, and novel targeted strategies are needed. NF- κ B/AP-1 are crucial for ATL, and both are transported to nucleus by an importin (IPO) / complex to activate target genes. We aimed to elucidate the function of IPO in ATL. IPO-1 was upregulated in HTLV-1-infected T-cell lines, and viral infection can induce IPO-1 expression in PBMCs. Further, IPO-1 knockdown or IPO-1 inhibitor importazole and IPO-1 inhibitor ivermectin reduced HTLV-1-infected T-cell proliferation. Inhibitors suppressed NF- κ B/AP-1 nuclear transport and DNA binding, resulting in induction of G1 cell cycle arrest and caspase-3/8/9-dependent apoptosis. Moreover, the expression of NF- κ B/AP-1-target proteins involved in cell cycle and apoptosis was reduced. In vivo, ivermectin decreased ATL tumor burden. IPO-1 mediated NF- κ B/AP-1 translocation into ATL cell nuclei, thereby regulating cell growth and survival, which provides new insights for targeted ATL therapies.

研究分野：ウイルス発がん

キーワード：成人T細胞白血病 HTLV-1 インポーチン インポータゾル イベルメクチン NF- κ B AP-1 原発性体腔液性リンパ腫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 核輸送因子と核膜孔構成因子

核細胞質間の高分子の移動は、核膜孔複合体 (nuclear pore complex: NPC) を通して行われる。NPC は約 30 種類の核膜孔構成因子 (ヌクレオポリン) と呼ばれる蛋白質からできている。核局在信号 (nuclear localization signal: NLS) をその分子内に保有する核蛋白質は、インポーチン (importin: IPO) と呼ばれる輸送受容体によって認識され、核内へと運ばれる。IPO は 2 つのサブユニット、 α と β から構成されている。IPO ファミリーは、ヒトでは 20 種類あり、細胞質から核への輸送を担う核内輸送因子、核から細胞質への輸送を担う核外輸送因子エクスポート (exportin: XPO) 、そして両方向性輸送因子に分類される。一方、ヒトでは 7 種類が知られている IPO は核蛋白質の NLS に結合し、核内輸送に働くが、核蛋白質 IPO 複合体だけではヌクレオポリンへ結合できない。IPO は IPO と協調し、三者で核膜孔ターゲティング複合体 (PTAC) を形成し、ヌクレオポリンに結合することで、初めて NPC を通過できる。核内に移行した PTAC は、GTP 結合型の低分子量 GTPase Ran (RanGTP) に結合後に解離し、核蛋白質が核内に遊離され、一連の核内輸送が終結する。IPO / β は RanGTP に依存して細胞質へと逆輸送され再利用される (図 1)。IPO β には基質特異性があり、IPO β 3 や 4 は NF- κ B の構成因子 p50/RelA を特異的に輸送する。なお、IPO β と結合する核蛋白質も存在し、AP-1 は IPO β のみで核内輸送される。蛋白質輸送因子の発現量や機能の異常による輸送基質の局在の混乱は疾患の原因になると予想される。IMP / β の過剰発現は固形がんや骨髄腫で報告されており、その発現量と悪性度に相関がある。

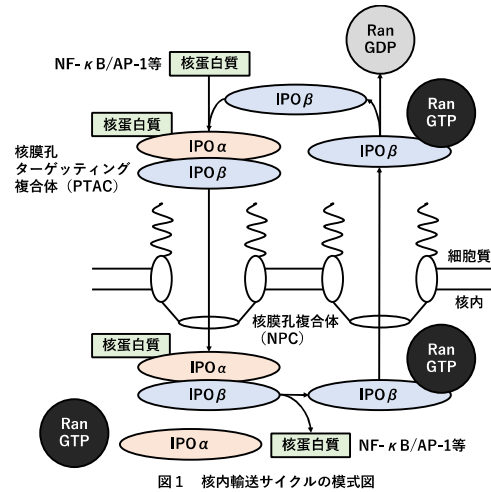


図1 核内輸送サイクルの模式図

(2) ATLにおける転写因子の活性化

HTLV-1 感染 T 細胞株や ATL 白血病細胞では NF- κ B/AP-1 が核内に局在し、活性化している。これらの転写因子は細胞増殖・生存・浸潤に関わる遺伝子の転写を制御しているため、治療の標的分子となりうる。HTLV-1 のトランスフォーミング蛋白質 Tax は T 細胞の不死化に必須であり、NF- κ B/AP-1 の活性化に関わる。また、Tax とヌクレオポリンの p62 との直接の結合が Tax の核内移行に重要であるが、IPO との関連は不明である。また、Tax は細胞傷害性 T 細胞の主要標的抗原であるため、HTLV-1 は生き残り戦略として、Tax の発現を消す。したがって、ATL 細胞や ATL 由来細胞株は Tax を発現していないが、前述のように NF- κ B/AP-1 は核内に局在し、活性化している。

2. 研究の目的

本研究では、転写因子の輸送機序に着目し、ATL の発症・進展における IPO ファミリーの関与を解明し、ATL の治療薬や診断法の開発に向けた臨床応用につなげる。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養: HTLV-1 不死化 T 細胞株 (MT-2、MT-4、C5/MJ、SLB-1、HUT-102)、ATL 由来 T 細胞株 (MT-1、TL-0ml、ED-40515(-))、非感染 T 細胞株 (Jurkat)、健康人末梢血単核球 (PBMC)、PHA 刺激 PBMC (PHA-PBMC) を用いた。培養は 10% 牛胎児血清とペニシリン/ストレプトマイシンを添加した RPMI-1640 培地で行った。健康人 PBMC への HTLV-1 の感染は MT-2 との共培養により行った。遺伝子ノックダウンは siRNA を用いた。

(2) 遺伝子発現や蛋白質の発現: 細胞から RNA を抽出後に RT-PCR 法にて遺伝子の発現を検討し、抽出した蛋白質の発現や切断、リン酸化はウェスタンブロット法にて解析した。

(3) 各種アッセイ: 細胞増殖/生存活性は、WST-8 法を用い、細胞周期はヨウ化プロピジウムによる核染色後、フローサイトメトリーで解析した。アポトーシスは Hoechst33342 染色後、共焦点レーザー顕微鏡による観察で、あるいは APO2.7 染色後、フローサイトメトリーで解析した。また、転写因子の DNA 結合の解析はゲルシフトアッセイを用いた。カスパーゼ活性は、特異的な基質の加水分解の結果、生じる発色団の検出で解析した。

(4) マウスでの抗腫瘍効果: 5 週齢の SCID マウスの皮下に HUT-102 細胞を移植後、翌日より IPO / β 1 阻害剤イベルメクチン (4 mg/kg) を週 5 日、28 日間、経口投与した。効果の検証のため、感染 T 細胞が分泌する可溶性 IL-2R (sIL-2R) や可溶性 CD30 (sCD30) のマウス血清レベルを ELISA で測定した。

4. 研究成果

(1) HTLV-1 感染による IPO β 1 の発現誘導: 全ての HTLV-1 不死化 T 細胞株と ATL 由来 T 細胞株

で、健康人 PBMC と比べて増強した IPO 1 蛋白質の発現が認められた。PHA で刺激すると PBMC にも IPO 1 の発現が誘導された (図 2a)。さらに、PBMC に HTLV-1 を感染後 7 日から 21 日まで IPO 1 mRNA の発現誘導が観察された (図 2b)。

(2) IPO 1 の機能解析: MT-2 細胞の IPO 1 の発現をノックダウンすると細胞増殖が有意に抑制されたことから、IPO 1 は細胞増殖に関与すると考えられた (図 2c-e)。次に、IPO 1 阻害剤インポータゾールと IPO 1 阻害剤イベルメクチンの効果を検討した。両阻害剤は、HTLV-1 感染 T 細胞株の増殖/生存を濃度依存性に阻害したが、健康人 PBMC や非感染 T 細胞株に対する作用は軽微であった。両阻害剤は、HTLV-1 感染 T 細胞株に G1 期での細胞周期停止とカスパーゼ 3/8/9 依存性のアポトーシスを濃度依存性に誘導した。MT-2 及び HUT-102 細胞では、ゲルシフトアッセイで NF- κ B/AP-1 の恒常的な DNA 結合活性が見られ、NF- κ B の構成蛋白質は p50/RelA/c-Rel/RelB であり、AP-1 の構成蛋白質は JunB/JunD であった。そこで、両阻害剤を MT-2 及び HUT-102 細胞に作用させて、細胞核内の RelA、JunB、JunD の発現を検討したところ、いずれの転写因子の発現も両阻害剤存在下で減弱し、DNA 結合も抑制されていた。すなわち、IPO 1 は HTLV-1 感染 T 細胞における NF- κ B/AP-1 の核内移行に関与することが示唆された。NF- κ B/AP-1 は、細胞周期やアポトーシスに関連する遺伝子の発現を制御しているので、両阻害剤添加後の細胞周期やアポトーシス関連蛋白質の発現の変化を検討した。G1 期から S 期の移行に重要な cyclin D1/D2/E、CDK2/4/6、c-Myc の発現が濃度依存性に抑制された。また、アポトーシス阻害蛋白質である IAP ファミリー蛋白質 (survivin、c-IAP1/2、XIAP) と Bcl-2 ファミリー蛋白質 (Bcl-xL) の発現抑制も認められた。

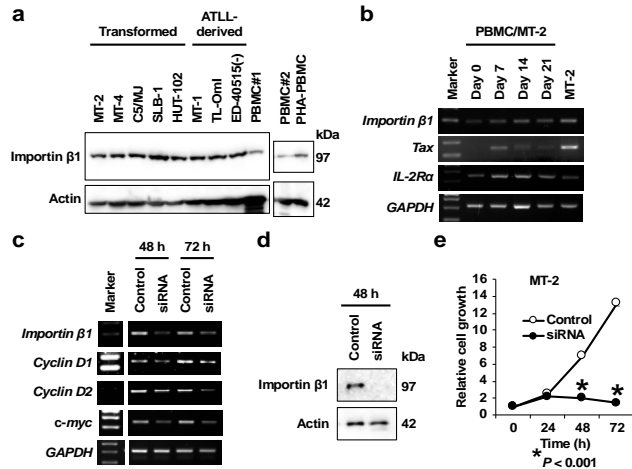


図2 IPO 1の発現と機能

(3) マウスにおけるイベルメクチンの抗腫瘍効果: イベルメクチンの経口投与群は、対照群と比べて、腫瘍の容積が縮小し (図 3a)、腫瘍の重量も減少していた (図 3c)。また、有意差は見られなかったが、サロゲートマーカーである血清 sIL-2R や sCD30 も治療群では減少傾向が見られた。腫瘍組織の H&E 染色や TUNEL 染色にて、治療群の腫瘍にアポトーシスの誘導が観察された (図 3d)。なお、マウスの体重に両群間で差はなく (図 3b)、副作用も見られなかった。イベルメクチンは HTLV-1 感染者や ATL 患者に合併する糞線虫症の治療薬でもあり、今後は、イベルメクチン投与後の患者や感染者のウイルス量の変化を調べることで、感染 T 細胞の増殖に及ぼす効果が推測されると考えられる。

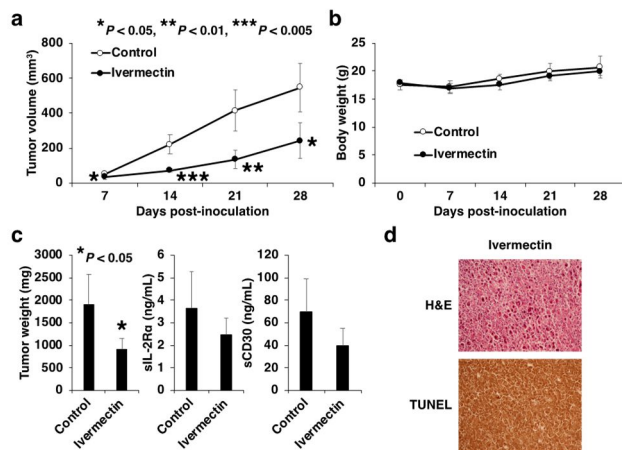


図3 イベルメクチンの抗腫瘍効果

(4) さらなる展開: 原発性体腔液性リンパ腫 (PEL) は、明らかな腫瘍形成を認めず、胸腔や腹腔、心嚢腔などの浸出液内でリンパ腫細胞が浮遊しながら増殖する稀な悪性リンパ種である。カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) 感染を原因とし、難治性である。KSHV は感染細胞内で潜伏感染と溶解感染の 2 つの感染様式で存在する。ウイルスの潜伏感染関連遺伝子の働きにより、NF- κ B/AP-1 は活性化している。また、溶解感染はウイルス粒子を産生、放出する。KSHV 感染 PEL 由来細胞株 (BCBL-1、TY-1) を用いて、上記と同様の実験を行ったところ、HTLV-1 感染 T 細胞株で得られた知見が PEL 細胞株でも確認された。NF- κ B 阻害剤は溶解感染を誘導するという報告があるが、IPO 1 の阻害剤はウイルスの溶解感染関連遺伝子の発現を増強しなかった。また、イベルメクチンの投与は PEL マウスモデルにおいて、腹水の貯留を抑制し、抗腫瘍効果を認めた。このように、IPO 1 阻害剤は、ウイルスを放出することなく、細胞増殖やアポトーシスを誘導する理想的な PEL の治療薬として期待される。また、IPO 1 ファミリーの 1 つ、XP01 の阻害剤 KPT-330 の HTLV-1 感染 T 細胞や PEL 細胞に及ぼす影響も検討しており、G1 期での細胞周期停止とアポトーシスの誘導が観察された。XP01 は、腫瘍抑制蛋白質を核内から核外に輸送することで、腫瘍抑制蛋白質の機能を阻害し、腫瘍の発生に関与することが知られている。現在、ATL や PEL における XP01 の発現レベルや XP01 の標的蛋白質を検討しているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chie Ishikawa, Masachika Senba, Naoki Mori	4. 巻 53
2. 論文標題 Mitotic kinase PBK/TOPK as a therapeutic target for adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 801-814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chie Ishikawa, Masachika Senba, Naoki Mori	4. 巻 53
2. 論文標題 Anti-adult T-cell leukemia/lymphoma activity of cerdulatinib, a dual SYK/JAK kinase inhibitor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1681-1690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4513	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chie Ishikawa, Masachika Senba, Naoki Mori	4. 巻 15
2. 論文標題 Effects of NVP-BEZ235, a dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor, on HTLV-1-infected T-cell lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 5311-5317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.7979	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chie Ishikawa, Masachika Senba, Naoki Mori	4. 巻 51
2. 論文標題 Butein inhibits NF- κ B, AP-1 and Akt activation in adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 633-643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2017.4026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chie Ishikawa, Naoki Mori	4. 巻 38
2. 論文標題 In vitro and in vivo anti-primary effusion lymphoma activities of fucoidan extracted from Cladosiphon okamuranus Tokida	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 3197-3204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2017.5978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chie Ishikawa, Masachika Senba, Tadashi Hashimoto, Atsushi Imaizumi, Naoki Mori	4. 巻 99
2. 論文標題 Expression and significance of Pim-3 kinase in adult T-cell leukemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 European Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 495-504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejh.12940	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森直樹, 石川千恵
2. 発表標題 成人T細胞白血病の新規治療標的MALT1
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Mori, Chie Ishikawa
2. 発表標題 MALT1 as a novel therapeutic target for adult T-cell leukemia
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Mori, Chie Ishikawa
2. 発表標題 CUDC-907, a new dual PI3K and HDAC inhibitor, blocks multiple signaling pathways in primary effusion lymphoma
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Mori, Chie Ishikawa
2. 発表標題 Importin 1 regulates cell growth and survival of KSHV-infected primary effusion lymphoma
3. 学会等名 The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森直樹, 石川千恵
2. 発表標題 成人T細胞白血病の治療候補薬アルテスナイト
3. 学会等名 第5回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chie Ishikawa, Naoki Mori
2. 発表標題 Evaluation of artesunate for the treatment of primary effusion lymphoma
3. 学会等名 The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoki Mori, Chie Ishikawa
2. 発表標題 CUDC-907, a new dual PI3K and HDAC inhibitor, as ATL therapeutics
3. 学会等名 The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoki Mori, Chie Ishikawa
2. 発表標題 Evaluation of artesunate for the treatment of adult T-cell leukemia
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chie Ishikawa, Naoki Mori
2. 発表標題 SENP1, a new molecular target for ATL therapy
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森直樹, 石川千恵
2. 発表標題 インポーチンを標的としたATL治療戦略
3. 学会等名 第4回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naoki Mori, Chie Ishikawa
2. 発表標題 PBK, a serin-threonin kinase, as a therapeutic target for Hodgkin's Lymphoma
3. 学会等名 The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chie Ishikawa, Naoki Mori
2. 発表標題 Importin as a therapeutic target for ATL
3. 学会等名 The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naoki Mori, Chie Ishikawa
2. 発表標題 Targeting importins for therapy in adult T-cell leukemia
3. 学会等名 The 79th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naoki Mori, Chie Ishikawa
2. 発表標題 Anti-ATL activity of dual PI3K and HDAC inhibitor CUDC-907
3. 学会等名 The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chie Ishikawa, Naoki Mori
2. 発表標題 PBK is a therapeutic target for KSHV-related primary effusion lymphoma
3. 学会等名 The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----