

平成 21年 5月 14日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591099
 研究課題名 (和文) 成人T細胞白血病における NF- κ B2 活性化の意義
 研究課題名 (英文) Activation of NF- κ B2 in adult T-cell leukemia

研究代表者
 藤井 雅寛 (FUJII MASAHIRO)
 新潟大学・医歯学系・教授
 研究者番号：30183099

研究成果の概要：成人 T 細胞白血病(ATL)は極めて悪性の白血病であり、有効な抗がん剤も開発されていない。ATL の発症に転写因子 NF- κ B の異常活性化が関与することが知られているが、その分子機構は不明である。ATL 細胞から染色体転座に伴う活性化型 NF- κ B2 遺伝子(NF- κ B2/p58)を単離した。正常な NF- κ B2 とは異なり、NF- κ B2/p58 は恒常的に遺伝子発現を誘導することが示された。以上の結果は、NF- κ B2 の遺伝子異常が一部の ATL 発症に関与する可能性を示している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学
 科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学
 キーワード：HTLV-1, ATL, NF- κ B, CD4

1. 研究開始当初の背景
 成人 T 細胞白血病(ATL)は極めて悪性な白血病であり、ヒト T 細胞白血病ウイルス1型 (HTLV-1)に感染した CD4 陽性 Tリンパ球のクローナルな増殖によって引き起こされる。約5%の感染者が平均60年の潜伏期間を経てATLを発症することから、ウイルス感染細胞中に生じた複数の宿主遺伝子異常が発症に関与している。ATL における宿主遺伝子異常については未だ解明されていないが、転写因子 NF- κ B の異常活性化が発症に深く関与していると考えられている。即ち、全てのATL患者の白血病細胞において NF- κ B は恒常的に活性化し、NF- κ B の阻

害剤は ATL 細胞にアポトーシスを誘導する。また、ATL における NF- κ B の活性化は単一の遺伝子異常によって起こるのではなく、多様なメカニズムによることが示唆されている。

2. 研究の目的
 ATL 細胞において NF- κ B 活性化に関与する細胞因子を同定し、その構造並びに機能を正常遺伝子と比較し、その活性化機構を明らかにする。

3. 研究の方法
 (1) nested polymerase chain reaction 法を

用いて、ATL 由来細胞株 (TL-OmI) の cDNA ライブラリーから NF- κ B2 遺伝子領域を増幅し、その塩基配列をシークエンス法により決定した。

(2) HA (hemagglutinin) エピトープと NF- κ B2/p58 あるいは NF- κ B2/p100 との融合遺伝子を作製し、発現ベクターに組み込んだ。これらを 293T 細胞に遺伝子導入し、HA 抗体を用いた免疫染色にて、NF- κ B2/p58 あるいは NF- κ B2/p100 の細胞内での局在を検討した。

(3) CTLL-2 はマウスの IL-2 依存性 T 細胞株である。同細胞にレンチウイルスベクターを用いて NF- κ B2/p58、NF- κ B2/p52 を各々遺伝子導入し、恒常的発現細胞株を樹立した。樹立した細胞株を IL-2 非存在下で 4 日間培養し、IL-2 非依存性増殖能を検討した。

(4) NF- κ B2/p58 または NF- κ B2/p52 発現ベクターと NF- κ B によって制御されたルシフェラーゼ発現プラスミドをヒト T 細胞株 Jurkat に共導入し、ルシフェラーゼの蛍光強度により転写活性を定量した。

4. 研究成果

(1) TL-OmI 細胞株から NF- κ B2 の変異遺伝子 (NF- κ B2/p58) を分離した。NF- κ B2/p58 は 540 個のアミノ酸からなり、DNA 結合領域である Rel homology domain は残存していたが、抑制領域であるアンキリン領域をすべて欠損していた。アンキリン領域は WNK lysine deficient protein kinase 1 遺伝子と置換しており、各々をコードしている 10 番染色体と 12 番染色体との転座をゲノム解析により確認した (図 1、図 2)。

免疫染色にて野生型 NF- κ B2/p100 は細胞質内に局在しているのに対して NF- κ B2/p58 は核内に局在していることが示された。免疫沈降により NF- κ B2/p58 は NF- κ B/p65 または NF- κ B/RelB と複合体を形成していることが示された。NF- κ B2/p58 はこれらの NF- κ B サブユニットと複合体を形成して核内に局在していることが示唆された。

NF- κ B2/p58 を恒常的に発現させた CTLL-2 において、NF- κ B2 標的遺伝子の 1 つである NF- κ B2 自身の発現量の増加が観察された。NF- κ B2 活性化が CTLL-2 の IL-2 非依存性形質転換に関与することが示されているが、CTLL-2 に NF- κ B2/p58 を発現させても、IL-2 非存在下での増殖能は亢進しなかった。

一過性に発現した NF- κ B2/p58 は NF- κ B によって制御されたレポーターを活性化したが、ごくわずかであり、野生型 NF- κ B2/p52 (NF- κ B2/p100 の生理的切断により産生される) の活性より劣っていた。

NF- κ B2/p100 は NF- κ B/p65 による転写活性を著名に抑制したが、NF- κ B2/p58 は抑制活性を示さなかった。

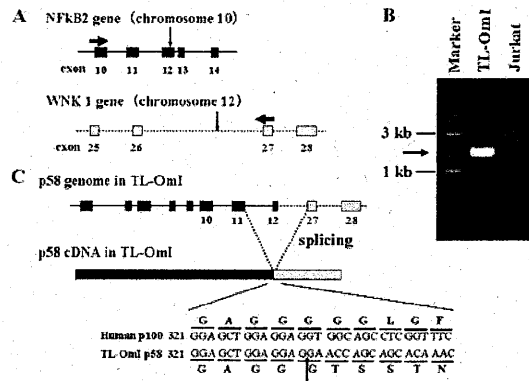


図 1 分離された NF- κ B2/p58 の遺伝子構造

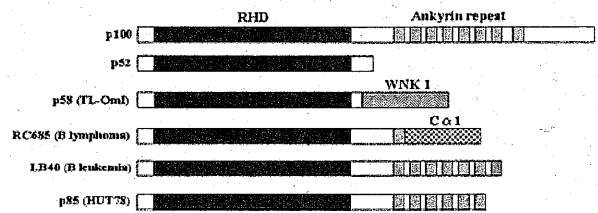


図 2 リンパ腫あるいは白血病から分離された変異型 NF- κ B2 の構造

(2) NF- κ B2 の遺伝子異常が一部の白血病あるいはリンパ腫の発症に関与することが報告されている。本研究において、この異常が ATL の発症に関与することが明らかになった。ATL は極めて悪性の白血病であるが、今後 NF- κ B2 を標的とした ATL 治療薬について検討する必要があると考えられる。

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 6 件)

- ① Zhao T, Yasunaga JI, Satou Y, Nakao M, Takahashi M, Fujii M, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. Blood. 113(12):2755-2764. 2009. 査読有
- ② Okajima M, Takahashi M, Masaya Higuchi, Ohsawa T, Yoshida S, Yoshida Y, Oie M, Tanaka Y, Gejyo F, Fujii M, Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induces an aberrant clustering of the tumor suppressor Scribble through the PDZ domain binding motif dependent and independent

interaction. Virus Genes, 37(2):231-240, 2008. 査読有

- ③ Yoshida S, Higuchi M, Shoji T, Yoshita M, Ishioka K, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Uchiyama M, Fujii M. Knockdown of synapse-associated protein Dlg1 reduces syncytium formation induced by human T-cell leukemia virus type 1. Virus Genes, 37(1):9-15, 2008. 査読有
- ④ Isogawa M, Higuchi M, Takahashi M, Oie M, Mori N, Tanaka Y, Aoyagi Y, Fujii M. Rearranged NF-kappa B2 gene in an adult T-cell leukemia cell line. Cancer Science, 99(4):792-798, 2008. 査読有
- ⑤ Nakayama T, Hieshima K, Arao T, Jin Z, Nagakubo D, Shirakawa AK, Yamada Y, Fujii M, Oiso N, Kawada A, Nishio K, Yoshie O. Aberrant expression of Fra-2 promotes CCR4 expression and cell proliferation in adult T-cell leukemia. Oncogene. 27(23):3221-3232, 2008. 査読有
- ⑥ Higuchi M, Tsubata C, Kondo R, Yoshida S, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Mahieux R, Matsuoka M, Fujii M. Cooperation of NF-kB2/p100 activation and the PDZ domain binding motif signal in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV) Tax1 but not HTLV-2 Tax2 is crucial for interleukin-2 independent growth transformation of a T cell line. J Virol., 81(21):11900-11907, 2007. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 樋口雅也、Identification of a critical region of HTLV-1 Tax1 for NF-kB2/p100 activation. 第67回日本癌学会学術総会, 平成20年10月29日, 名古屋.
- ② 藤井雅寛、Activation of PI3k/Akt substitutes a function of PDZ domain binding motif of HTLV-1 Tax in its T-cell transformation. 第67回日本癌学会学術総会, 平成20年10月29日, 名古屋.
- ③ 藤井雅寛、HTLV-1Tax1とHTLV-2Tax2によるIL-2非依存性細胞増殖誘導能の違い. 第56回日本ウイルス学会学術集会, 平成20年10月26日, 岡山.
- ④ 藤井雅寛、Distinct T-cell transformation mechanisms of HTLV-1 Tax1 and HTLV-2 Tax2. 第66回日本癌学会学術総会, 平成19年10月4日, 横浜.
- ⑤ Tiejun Zhao、HTLV-1 b ZIP factor suppresses canonical pathway of NF-kB by physical interaction with the p65. 第66回日本癌学会学術総会, 平成19年10月4日,

横浜.

- ⑥ 樋口雅也、Isolation of a rearranged NF-kB2 gene from an adult T cell leukemia cell line. 第66回日本癌学会学術総会, 平成19年10月4日, 横浜.
- ⑦ Takashi Nakayama, Heterodimer formation of Fra-2 and JunD promotes CCR4 expression and proliferation in adult T-cell leukemia. 第66回日本癌学会学術総会, 平成19年10月4日, 横浜.
- ⑧ 樋口雅也、HTLV-1 感染伝播へのPDZドメイン蛋白 Dlg1 の関与, 第55回日本ウイルス学会学術集会, 平成19年10月22日, 横浜.
- ⑨ Masaya Higuchi, Activation of NF-kB2/p100 by human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax1 but not HTLV-2 Tax2 is crucial for interleukin-2 independent growth transformation of a T-cell line. 13th international conference of human retrovirology HTLV and related viruses. 平成19年5月22日, 箱根.

[図書] (計 2 件)

- ① 藤井雅寛、医薬ジャーナル社、ヒトT細胞白血病ウイルス、2007, 24-28.
- ② 藤井雅寛、文光堂、HTLV-1 と疾患、2007, 208-210.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
藤井 雅寛 (FUJII MASAHIRO)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：30183099

(2) 研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号：