

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21500390  
 研究課題名（和文） ヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV-1）感染症モデルマウスの p53 機能解析  
 研究課題名（英文） Analysis of p53 function in HTLV-1 Tax transgenic mice  
 研究代表者  
 大杉 剛生（OHSUGI TAKEO）  
 熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授  
 研究者番号：00211102

研究成果の概要（和文）：HTLV-1 Tax を発現するトランスジェニック (Tg) マウスの疾患発症前のがん抑制遺伝子 p53 の機能を DNA 損傷時に誘導される p53 関連遺伝子の発現を指標に解析した。疾患発症前にすでに p53 機能低下が、Tax 発現臓器に観察された。このことから白血病発症早期に p53 機能低下は重要であることが示唆された。この機能不全は、正常マウスでは DNA 損傷時に誘導される p53 が、安定的に誘導されないことが原因であった。

研究成果の概要（英文）：The status of p53 function before the onset of leukemia in Tax-expressing transgenic (Tg) mice was investigated. The decreased p53 transcriptional activity in Tax-Tg mice was a tissue-specific phenomenon related to Tax expression. The decline in p53 function resulted from decreased p53 accumulation after DNA damage. These results suggest that the functional inactivation of p53 by Tax may be critical for the initial onset of leukemia associated with Tax.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：疾患モデル・成人 T 細胞白血病・HTLV-1・p53・遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス (Human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は、成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell leukemia: ATL) の原因ウイルスである。HTLV-1 がコードする Tax が ATL 発症に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、Tax を発現するマウスを作製しても白血病を引き起こすことが、長年できなかった。我々は、Tax を T 細胞特異的に発現させることにより、はじめ

て T 細胞白血病を引き起こすことに成功した。我々の作製した Tax-Tg マウスは、8 か月齢くらいより T 細胞白血病・リンパ腫を発症しはじめ、20 か月齢くらいより急激に発症率が増加する。この時期は最近の報告から、p53 機能が若齢マウスの半分程度になる時期にあたる。ATL 患者の白血病細胞の解析では、p53 機能の低下が観察される。さらに ATL の発症年齢は平均 60 歳であり、p53 機能低下との関連が示唆される。しかし、他のがんでは高率

にみられる p53 の変異が低率であることから、この機能低下は白血病化に伴う付随したものであろうとも考えられてきた。付随する反応であるなら、白血病発症前の p53 機能は正常であるはずである。我々は、疾患発症前の 6 か月齢 Tax-Tg マウスの p53 機能を解析したところ、この時期のマウスにおいてすでに p53 機能が低下していることを見出した (Ohsugi et al., 2008, )。このことから、このマウスの発がんにおける p53 の不活化は、がん化に伴う付随的なものではなく、がん化に非常に重要な役割を担っていることが示唆された。

## 2. 研究の目的

従来、ATL 患者の白血病細胞は、採取時には Tax が低発現でも *in vitro* の培養によって急激に Tax が発現し、*in vivo* での Tax と p53 の関連解析は困難であり、また ATL を発症していない HTLV-1 キャリアの p53 機能検索はほとんどなされていない。

そこで本研究においては、Tax を発現し、ATL 様疾患を引き起こす Tax-Tg マウスの白血病発症前の p53 の機能を解析することにより、Tax の白血病発症へのかかわりについて検討する。また、p53 機能を解析する新たなツールとしてのモデルマウスの確立を目指すこととした。

- 1) 従来、*in vitro* でしか解析できなかった Tax の p53 機能へ与える影響について、我々が開発した Tax-Tg マウスを使用し、*in vivo* 解析する。
- 2) *in vitro* での実験において、Tax による p53 機能抑制の機構については 2 つの仮説がある。Tax が p53 の誘導を抑制するか、あるいは誘導後に抑制するかである。そこでガンマ線照射後の状態について検討する。
- 3) Tax と p53 の関係を明らかにし、p53 の状態 (mRNA 発現レベル等) が白血病発症のマーカーとなるか、また p53 機能低下によるがん化の *in vivo* 解析可能な実験動物の確立をめざす。

## 3. 研究の方法

まず、Tax を発現するマウスが、生後何か月齢くらいで p53 機能を低下させるのか、基本的な情報を検索し、ついで Tax と p53 のクロストークについて解析することとした。

1) ATL モデルマウスにおける p53 機能  
Tax-Tg マウスの 6 から 25 か月齢までの白血病未発症マウスの同腹の Tg および non-Tg マウスを用いた。p53 機能は、標的遺伝子 mRNA の発現誘導によって測定した。同月齢のマウスを同腹内でガンマ線照射群、無照射群の 2 つのグループに分け、照射群には 5Gy のガンマ線を照射後、6 時間目に適切な麻酔後、各

臓器を採取した。常法に従い RNA を抽出し、残りの試料は、タンパク抽出まで  $-80^{\circ}\text{C}$  に凍結保存しておいた。p53 標的遺伝子 4 つ (p21, MDM2, Bax および PHLDA3) について mRNA の発現を real-time PCR によって測定し、無照射群と発現量を比較した。

### 2) Tax と p53 とのクロストーク

上記実験の各臓器採取において凍結しておいた試料より、常法に従い、タンパク質を抽出し、標的遺伝子に対する抗体を用いて、ウエスタンブロット法によりタンパク量を定量した。さらに、p53 リン酸化抗体およびアセチル化抗体を用いて p53 の状態について解析した。

#### ① p53 リン酸化および誘導の検索

正常マウスでは、ガンマ線照射後すみやかに p53 が安定、活性化する。最初に ATL モデルマウスの状態についてウエスタンブロット法により、リン酸化の有無等も含め解析した。

正常のマウスでは、DNA 損傷がおきると、Ataxia-telangiectasia Mutated (ATM) キナーゼが誘導、Chk2 を活性化し、p53 がリン酸化され、抑制因子である MDM2 から遊離安定し活性を示す (図 1)。

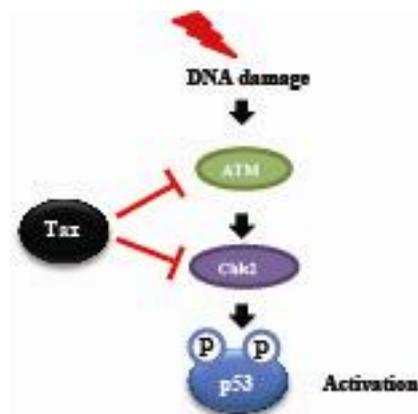


図 1. ガンマ線照射による p53 の誘導

この過程で p53 のリン酸化および誘導がみられたならば、p53 リン酸化の下流に原因があることになる。

#### ② p53 リン酸化後の経路

図 2 に示すように p53 リン酸化後は、転写因子 CBP と会合し、アポトーシス、細胞周期に関与する。Tax は、CBP と競合的会合することにより p53 機能を抑制する。ガンマ線照射により、p53 のリン酸化および誘導について検索し、Tax と CBP の競合的会合について検討を加えた。

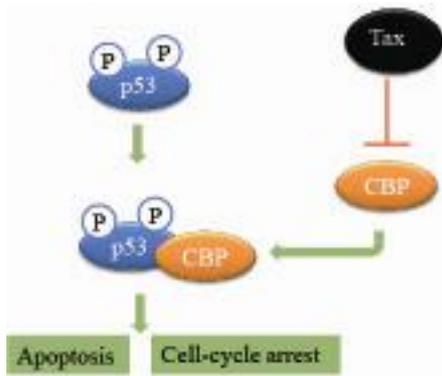


図2. p53リン酸化後の経路

3) p53 の mRNA レベルと白血病発症の関係  
 最近になり、抗 p53 抗体が食道がん、大腸がん、乳がんにおいて腫瘍マーカーとして承認された。通常、p53 遺伝子は血中で短時間に分解する。仮に p53 が変異をきたすと血中に分泌されても分解されず組織内で蓄積し、体内に p53 に対する自己抗体が産生される。HTLV-1 感染症においては p53 の変異が低率であるため、p53 の自己抗体の産生はあまり期待できない。一方、我々は、発症前の p53 の mRNA レベルが、同腹の non-Tg マウスの 2 倍、発症マウスでは 5 ないし 10 倍の上昇を認めている (Ohsugi et al., 2008)。p53 機能および白血病発症とこの mRNA レベルとの相関について系統、雌雄差、および各月齢でのデータを蓄積する。また、蓄積されたデータから、p53 機能解析のための新たな動物モデルとなり得るか検討を加える。

#### 4. 研究成果

##### 1) Tax-Tg マウスにおける p53 機能の低下

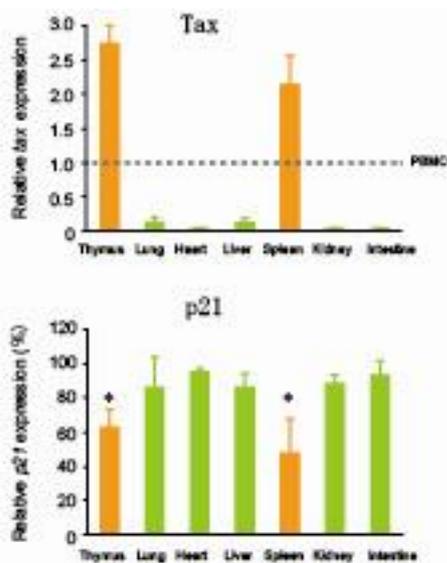


図3. Tax-Tg マウス各臓器におけるγ線照射後の p53 標的遺伝子の発現

Tax 強い発現臓器と p53 機能との関係を調べた。以下、図3に示すように Tax 発現を示す臓器 (胸腺と脾臓) においては、p53 遺伝子標的遺伝子 p21、Mdm2 および Bax の明らかな低下がみられた。

図4は、Tax-Tg マウスと non-Tg マウスの各 p53 標的遺伝子の非照射対照マウスとの発現倍数の比較をし、より詳細に検討した。p21、Mdm2、Bax さらの新たに発見された p53 の標的遺伝子 PHLDA3 とともに Tax-Tg マウスでは有意に低下しており、Tax 発現が p53 機能を制御していることが示唆された。

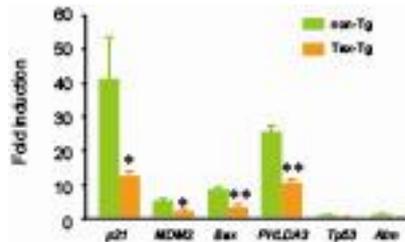


図4. Tax-Tg マウス脾臓におけるγ線照射後の各 p53 標的遺伝子の発現

##### 2) Tax の p53 経路への影響

材料および方法の項目で示したように p53 の状態を検索することによって、p53 経路のどの過程に Tax が影響するのか推定できる。ウェスタンブロットの結果を図5に示す。non-Tg マウスがガンマ線照射後、明らかに p53 の誘導がみられるのに対して、Tax-Tg マウスでは誘導がみられないことが明らかとなった。このことから、Tax-Tg マウスの p53 機能低下は p53 経路の下流 (図2) ではなく、ATM-Chk2 経路等の上流側 (図1) に問題があることが明らかとなった。

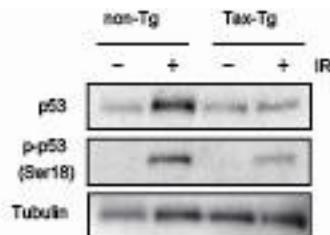


図5. Tax-Tg マウスではγ線照射後の p53 のリン酸化、誘導が低い

##### 3) Tax-Tg マウスにおける ATM-Chk2 経路

材料および方法の項目で示したように (図1)、Tax は ATM あるいは Chk2 を抑制するという報告がある。そこで ATM 発現、リン酸化

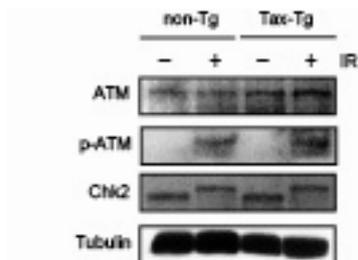


図6. Tax-Tg マウスにおける ATM-Chk2 経路

および Chk2 の発現についてウェスタンブロットにより解析した。結果から明らかなように ATM の発現およびリン酸化さらには Chk2 の発現に Tax-Tg マウスおよび non-Tg マウス間で差は見られなかった。以上のことから ATM-Chk2 経路を Tax が制御している証拠は得られなかった。今後なぜ、Tax-Tg マウスにおいて p53 の誘導が抑制されているのか、さらに検討が必要である。

4) Tax-Tg マウスにおける p53 と白血病発症  
p53 機能不全は 10 か月齢までのマウスで 70%に観察され、一方 NF-κB の活性化は観察されなかった。11-25 か月齢では、p53 機能不全は同じく 70%程度に観察され、NF-κB の活性化は、37.5%にみられた。このことから、Tax-Tg マウスではまず、p53 機能不全が NF-κB の活性化に先行しておき、白血病発症の早期に重要であることが示唆された。

白血病発症のマウスにおいては *Tp53* 遺伝子の高い発現がみられる。Tax-Tg マウスにおいては、non-Tg マウスのほぼ 2 倍の発現であった (図 7)。一方、白血病との関連では、現在までのところ *Tp53* 遺伝子発現の程度と白血病発症には相関は認められなかった。今後さらに例数を増やし、検討予定である。

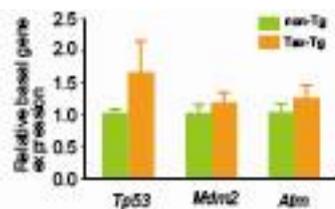


図7. Tax-Tg マウスにおける Tp53 遺伝子の発現

まとめ

1. Tax-Tg マウスは生後 4 か月齢ですでに p53 機能低下が観察された。
2. この機能低下は DNA 損傷時における p53 タンパクの誘導、蓄積がないことによる。
3. ATM-Chk2 経路は機能していると考えられる。
4. p53 機能不全は NF-κB 活性化よりも先に観察され、白血病発症の早期に重要な役割を果たしていると考えられる。

## 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 5 件)

- ① Ohsugi, T. and Kumasaka, T.: Low CD4/CD8 T-cell ratio associated with inflammatory arthropathy in human T-cell leukemia virus type 1 Tax transgenic mice. PLoS ONE 6: e18518, 2011. 査読有
- ② Ohsugi, T. and Kumasaka, T.: Altered CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-cell ratio in splenocytes of human T-cell leukemia virus type I Tax transgenic mice with inflammatory arthropathy. Retrovirology, 8(Suppl 1):A2 (6 June 2011), 2011. 査読無
- ③ Ohsugi, T.: Increased production of viral proteins by a 3'-LTR-deleted infectious clone of human T-cell leukemia virus type 1. Virology Journal, 6: 229, 2009. 査読有
- ④ Ohsugi, T. and M. Jerald Mahesh Kumar: Development of Mouse Models of Adult T-Cell Leukemia for Evaluation of New Anticancer Agents. Current Topics in Biochemical Research 11:57-63, 2009. 査読有
- ⑤ Takahashi-Makise N., Suzu, S., Hiyoshi, M., Ohsugi, T., Katano, H., Umezawa, K. and Okada, S.: Biscoclaurine alkaloid cepharanthine inhibits the growth of primary effusion lymphoma in vitro and in vivo and induces apoptosis via suppression of the NF-kappaB pathway. Int J Cancer, 125: 1464-1472, 2009. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① 大杉剛生、島崎達也、岡田誠治、石田尚臣、熊坂利夫：Tax 遺伝子導入マウスにみられる多様な疾患。第 4 回 HTLV-1 研究会、9.18-19、東京大学(東京)、2011.
- ② Takeo Ohsugi, Toshio Kumasaka: Altered CD4+/CD8+ T-cell ratio in splenocytes of human T-cell leukemia virus type 1 Tax transgenic mice with inflammatory arthropathy. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses, June 5 to June 8, 2011 Pieter De Somer Aula (Leuven) Belgium.
- ③ 大杉剛生、熊坂利夫：ヒト T 細胞白血病ウイルス(HTLV-1) tax トランスジェニックマウスにおける関節炎の解析。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、11.7-9、あわぎんホール(徳島)、2010.
- ④ 大杉剛生、島崎 也、熊坂 夫：HTLV-1 tax 遺伝子導入マウスにおける関節炎と HAM/TSP との類似性。第 3 回 HTLV-1 研究会・合同班会議、8.27-29、東京大学(東京)、2010.
- ⑤ Jerald Mahesh Kumar、大杉剛生：エストロゲン依存性乳がんマウスモデルの樹立。第 57 回日本実験動物学会総会、5.12-14、京都テルサ(京都)、2010.
- ⑥ 大杉剛生、岡田誠治、熊坂利夫：HTLV-1 Tax による p53 機能抑制機序の解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、10.25-27、都市センターホテル(東京)、2009.
- ⑦ Jerald M. Kumar, Masami Otsuka, Ken-ichi Yamamura, Yoichiro Isohama, and Takeo Ohsugi: Molecular analysis of estrogen dependent breast cancer in animal model and cell line. Asian

Federation for Pharmaceutical Sciences 2009, Kyusyu University (Fukuoka), October 15-18, 2009.

- ⑧ 大杉剛生、鈴木 操、島崎達也、岡田誠治、浦野 徹、熊坂利夫：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(HTLV-1)感染症モデルマウスの p53 機能解析。第 56 回日本実験動物学会総会、5.14-16、大宮ソニックホール(大宮)、2009.

〔図書〕(計 5 件)

- ① 大杉剛生、山口一成：第 2 章 がん、第 5 節 造血系、遺伝子改変モデル、HTLV-1 『モデル動物利用マニュアル』中村卓郎編、(株)エル・アイ・シー、発行年未定(印刷中)。
- ② T. Ohsugi, and A. Koito: Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) and Antiviral Enzyme APOBEC3. Andrew P. Gatto and Benjamin S. Leon (eds), Encyclopedia of Virology Research, NOVA Scientific publishers, 2012 in press.
- ③ M. Jerald Mahesh Kumar and Takeo Ohsugi.: Molecular analysis of estrogen dependent breast cancer in animal model and cell lines. JSPS RONPAKU (Dissertation Ph. D.) program abstracts of dissertation for FY 2009, pp 14-15, 2011.
- ④ 大杉剛生：九州で多発する白血病 一成人 T 細胞白血病－『熊薬ものがたり 熊本大学薬学部の研究と教育』pp193-196 熊本日日新聞社 2010.
- ⑤ Ohsugi, T. and Koito, A. : Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) and Antiviral Enzyme APOBEC3. pp85-121, Viral Genomes: Diversity, Properties and Parameters, Zhi Feng and Ming Long

(eds), NOVA Scientific publishers,  
2009.

[その他]

講演・セミナー

- ① 大杉剛生：遺伝子改変マウスを用いた HTLV-1 感染症の解析. 九州がんプロフェッショナル養成プラン(鹿児島大学)、3.17、鹿児島市、2011.
- ② Takeo Ohsugi: Transgenic mice expressing the HTLV-1 tax gene develop neoplastic and inflammatory diseases. CCMB seminar (Hyderabad, India) 5.21, 2009.
- ③ Takeo Ohsugi: 「 Microbiological monitoring in laboratory Animals」 Animal House seminar (Hyderabad, India) 5.19, 2009.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大杉 剛生 (OHSUGI TAKEO)

熊本大学・生命資源研究支援センター・准教授

研究者番号：00211102