

## 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25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790905

研究課題名（和文） 成人T細胞白血病細胞における恒常的NF- $\kappa$ B活性化機構の解明と治療標的分子の同定研究課題名（英文） Investigation of the molecular mechanisms of constitutive NF- $\kappa$ B activation for the identification of therapeutic targets of adult T-cell leukemia cells

研究代表者

齊藤 愛記 (SAITO YASUNORI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00516312

研究成果の概要（和文）：NF- $\kappa$ B抑制因子A20がATL細胞の生存と悪性形質発現に重要な働きを担うことをつきとめた。様々なB細胞リンパ腫においてA20の変異が報告されており、A20はこれらの細胞では癌抑制因子と考えられている。しかしながら申請者は、ATL細胞株およびATLの原因ウイルスであるHTLV-I感染細胞株においてA20の発現を検出し、さらにATL患者由来末梢血単核細胞においてA20 mRNAの発現上昇が認められた。意外なことに、A20の発現抑制によりATL細胞株の増殖が著しく抑制され、ATL細胞株の免疫不全マウスにおける造腫瘍能が低下することを明らかにした。A20の発現抑制により細胞死関連分子であるcaspase-8活性が上昇し、annexin-V陽性細胞が誘導されることがわかった。また、興味深いことにA20とcaspase-8の相互作用が検出されたことから、A20はcaspase-8を標的として細胞死を抑制する可能性が示唆された。以上の結果は、A20はATL細胞の生存と悪性形質の発現に重要な役割を担うことを示すものであり、ATLの有効な治療標的分子となる可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：Adult T-cell leukemia (ATL) is a T-cell neoplasm caused by Human T-cell leukemia virus type I infection. Previous reports described that the ubiquitin-editing enzyme A20 protects cytokine- or NK-induced cell death of endothelial cells via inhibiting caspase-8 activation. I found that the A20 protein and mRNA expressions were detectable in ATL cells in contrast to some of B-cell lymphoma cell lines with a somatic mutation and/or deletion of A20. Interestingly, quantitative RT-PCR analysis revealed that the A20 mRNA expression was frequently up-regulated in PBMCs derived from ATL patients. And A20 was found to be required for the growth of ATL-derived and HTLV-I-transformed cells. RNA-interference mediated knock-down of A20 induced the activation of apoptosis initiator caspase-8 concomitant with the activation of downstream effector caspase-3/7. In addition, I found that A20 physically interacts with caspase-8. Importantly, depletion of A20 suppressed the growth of ATL cells and increased the annexin V-positive population. These results suggest that A20 contributes to the survival of ATL cells and implicates A20 as a therapeutic molecular target for ATL therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学分科 血液内科学

キーワード：血液腫瘍学

### 1. 研究開始当初の背景

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)感染に起因する成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia; ATL)は極めて悪性度の高い血液疾患であり、今なお新たな治療戦略の提示が求められている。ATL 細胞では持続的な転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化みられ、腫瘍細胞の悪性形質の発現と細胞生存を支える要因であることが知られている。持続的な NF- $\kappa$ B 活性化の抑制が ATL 治療において有効であると考えられている一方で、その分子機構については不明な点が多く残されており、安全かつ有効な治療標的分子は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、腫瘍細胞の生存を支える持続的な NF- $\kappa$ B 活性化機構の解明を試みた。さらに、同定した分子が腫瘍細胞の生存と悪性形質の発現に重要であるかどうかを *in vitro* assay 系およびマウスを用いた assay 系で評価した。

### 3. 研究の方法

*In vitro* assay 系では、主に ATL 患者由来細胞株を用いて実験を行った。これらの細胞株における NF- $\kappa$ B 活性化を、ウエスタンブロッティング、レポーターアッセイによって評価した。NF- $\kappa$ B 活性化に関わる候補分子の発現を抑制し得る shRNA をレンチウイルスベクターによって導入し、細胞生存、細胞死の誘導をウエスタンブロッティング、flow cytometry によって解析した。また、候補分子の発現を抑制した ATL 細胞株を免疫不全マウス(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic マウス; NOG マウス)の皮下に注射し、候補分子の造腫瘍能に対する役割を調べた。ATL 患者由来末梢血単核細胞は、HTLV-1 感染者疫学調査 (JSPFAD) の協力の下、既に匿名化された上で得た RNA サンプルを用い、定量 PCR 法によって候補分子の発現を調べた。

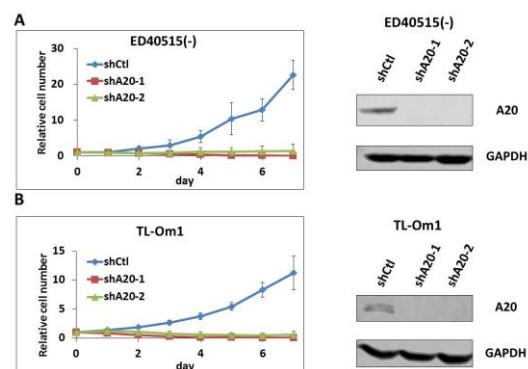
### 4. 研究成果

#### (1) A20 の発現抑制により ED40515(-)および TL-Om1 細胞の増殖が抑制される

B 細胞由来リンパ腫細胞において、A20 の変異や欠損が報告されているが、当研究室で所有する 6 種類全ての ATL 患者由来細胞株で A20 タンパク質の発現が検出されることがわかった。また、ATL 患者由来末梢血単核細胞では、A20 mRNA の発現が亢進している

ことが明らかとなった。

次に、ATL 細胞株における A20 の細胞増殖に対する役割を調べるため、A20 を標的とする shRNA を ATL 細胞株である ED40515(-) および TL-Om1 細胞にレンチウイルスベクターを用いて導入したところ、意外なことに増殖が著しく抑制されることが分かった。これらの結果から A20 は ATL 細胞株の増殖に



必要な因子であることが示唆された (図 1 A, B)。

図 1 A, B

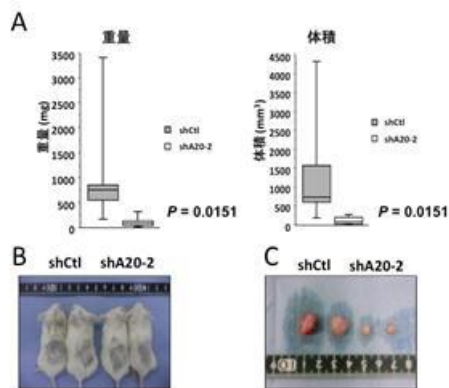
#### (2) A20 は ATL 細胞株の生存に重要である

次に、A20 の ATL 細胞株の生存に対する役割について調べるため、propidium iodide (PI) 染色し、フローサイトメトリーを用いて細胞周期を解析した。A20 の発現抑制により ATL 細胞株において sub-G1 分画が増加と S 期の減少が見られた。また、Annexin V/7AAD で染色し、フローサイトメトリーを用いて解析したところ、A20 の発現抑制により 7-AAD/Annexin V 陽性分画が増加する傾向がみられた。以上の結果は、A20 は ATL 細胞株の生存に寄与することを示唆するものである。

#### (3) A20 の発現抑制により ATL 細胞株の造腫瘍能が低下する

A20 は *in vitro* の細胞培養系における増殖に重要であることが明確になったが、続いて ATL 細胞株のマウスにおける造腫瘍能に対する A20 の役割を検討するため、shA20 を導入した ATL 細胞株 ED40515(-)細胞株を NOG マウスの皮下に接種し、腫瘍形成能を調べた。3 週間後に腫瘍を摘出し、腫瘍の体積および重量を測定したところ、コントロール shRNA を導入した細胞に比べ shA20 を導入した細胞は、形成する腫瘍の体積および重

量に有意な減少がみられた。別の ATL 細胞株である HUT102 を SCID マウスの皮下に注射することでも同様な結果を得ている。以上の結果から、A20 は ATL 細胞株のマウスにおける造腫瘍能に重要であることが明らか

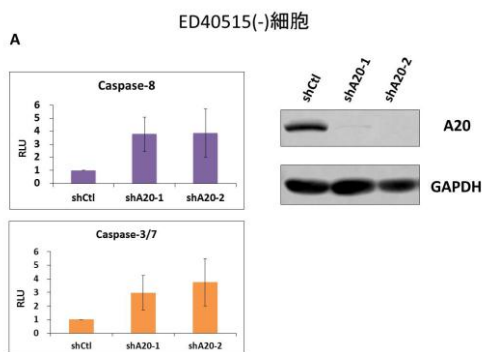


かとなった (図 2)。

図 2

**(4) A20 の発現抑制により ED40515(-)およびTL-Om1細胞株の caspase-8 および-3/7 活性が増加する**

A20 発現抑制後におけるアポトーシスの実行分子 caspase-3/7 およびその上流に位置する分子 caspase-8 の活性を測定した。A20 の発現抑制は ATL 細胞株において、caspase-8 および caspase-3/7 活性を増加させた (図 3A, B)。これらの結果から、A20 の発現抑制は caspase を介した細胞死を誘導することが示唆された。Apo2L/TRAIL 刺激下において、raft/cytoskeleton 分画における caspase-8 のポリユビキチン化が A20 によって抑制されることが報告されているが、2% SDS を含む buffer で抽出した whole-cell lysate を用いて活性化型 caspase の検出を試みた。その結果、A20 の発現抑制により活性化型 caspase-3, -8 の産生が誘導されること



が分かった。

図 3A

TL-Om1細胞

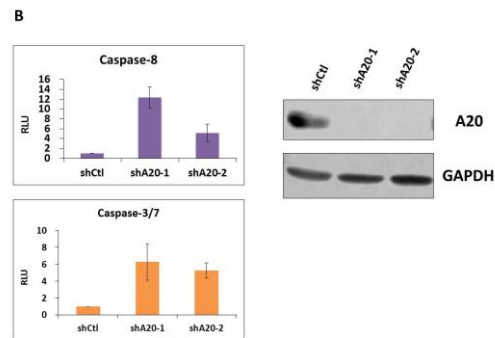
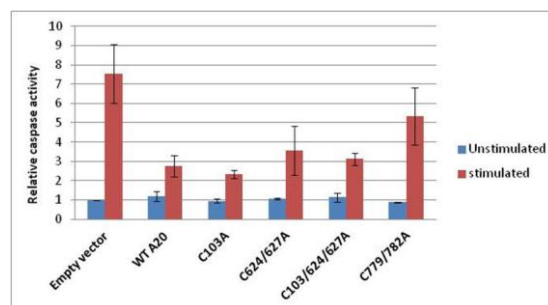


図 3B

**(5) A20 の発現抑制は ATL 細胞株における NF-κB 依存性転写活性を増強しない**

A20 は古典的 NF-κB 活性化経路の抑制因子であることが知られており、A20 の発現抑制により ATL 細胞株における持続的な NF-κB 活性化が増強される可能性がある。しかしながら、A20 の発現抑制により、ATL 細胞株において NF-κB 依存性転写活性の有意な増加はみられなかった。持続的 NF-κB 活性化および A20 の発現がみられる ATL 細胞株においては、腫瘍細胞の生存、悪性形質の発現に寄与する持続的な NF-κB 活性化を抑制せずに A20 が細胞生存を支える機構が存在する可能性がある。

**(6) A20 は zinc finger 7 領域を介して caspase-8 の活性化を抑制する可能性がある**  
免疫沈降法により、ATL 細胞株 HUT102 において A20 は caspase-8 と相互作用することがわかった。また、A20 の K48 ユビキチン化活性変異体(C103A)、K63 脱ユビキチン化活性変異体(C624/627A)、また直鎖型ユビキチン鎖との結合に寄与する zinc finger 7 領域変異体(C779/782A)を構築し、A20 KO MEF に高発現させ TNFαによる細胞死に対する A20 の役割を調べたところ、A20 zinc finger



7 領域変異体のみが caspase-8 の活性化を抑制できないことが明らかとなった (図 4)。

図 4

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 3 件)

- ① Overexpression of NF- $\kappa$ B inducing kinase underlies constitutive NF- $\kappa$ B activation in lung cancer cells. Saitoh Y, Martínez Bruyn VJ, Uota S, Hasegawa A, Yamamoto N, Imoto I, Inazawa J, Yamaoka S. Lung Cancer. 70:263-270, 2010. 査読有
- ② Uota S, Zahidunnabi Dewan M, Saitoh Y, Muto S, Itai A, Utsunomiya A, Watanabe T, Yamamoto N, Yamaoka S. An I $\kappa$ B kinase 2 inhibitor IMD-0354 suppresses the survival of adult T-cell leukemia cells. Cancer Sci. 103:100-106, 2012. 査読有
- ③ Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Uehata T, Iwasaki H, Omori H, Yamaoka S, Yamamoto N, Akira S. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. Cell Host Microbe. 12:109-116, 2012. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 新学術領域研究「修飾シグナル病」2012 年度修飾シグナル病若手ワークショップ。2012 年 10 月 3 日～10 月 5 日。湯河原温泉「ホテルあかね」。「HTLV-I 感染細胞における A20 は細胞生存と造腫瘍能に寄与する」齋藤愛記、掛谷綾香、深澤麻純、大迫美穂、宇野雅哉、宇都宮與、渡邊俊樹、山岡昇司
- ② 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会・合同大会。2010 年 12 月 8 日 (ポスター発表)、12 月 9 日 (口演発表)。A20 は NIK による NF- $\kappa$ B 活性化を増強する。齋藤愛記
- ③ 第 1 回 ATL シンポジウム。2012 年 8 月 25 日。東京大学医科学研究所 講堂。「ユビキチン化修飾酵素 A20 は HTLV-I

感染細胞の生存に寄与する」齋藤愛記

- ④ 第 4 回 HTLV-1 研究会／合同班会議。2011 年 9 月 18 日～19 日。東京大学弥生講堂。ユビキチン化修飾タンパク質 A20 は HTLV-1 感染細胞株の増殖に重要である。掛谷綾香、深澤麻純、魚田慎、藤井雅寛、齋藤愛記、山岡昇司
- ⑤ Cincinnati Cancer Symposium Series: 2011 Symposium on NF- $\kappa$ B, Cancer, Obesity, and Inflammation. 2011 年 5 月 2-4 日。米国オハイオ州シンシナティ Deregulated expression of NF- $\kappa$ B inducing kinase contributes to constitutive NF- $\kappa$ B activation and growth properties of ovarian cancer cells. Masaya Uno, Yasunori Saitoh, Shin Uota, Toshiro Kubota, Shoji Yamaoka. ○; 発表演者
- ⑥ 文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究「修飾シグナル病」第一回公開シンポジウム。東京大学医科学研究所 1 号館 1F 講堂。2011 年 1 月 29 日。ユビキチン化修飾酵素 A20 は NF- $\kappa$ B inducing kinase による NF- $\kappa$ B 活性化を増強する。齋藤愛記
- ⑦ 第一回公開シンポジウム「修飾シグナル病」学術領域の創出 2011 年 1 月 29 日。東京大学医科学研究所講堂。ユビキチン化修飾酵素 A20 は NF- $\kappa$ B inducing kinase による NF- $\kappa$ B 活性化を増強する。齋藤愛記

[図書] (計 1 件)

- ① 齋藤愛記、山岡昇司。「ウイルス発がんと NF- $\kappa$ B シグナル伝達の制御異常」実験医学増刊 (羊土社) 30:783-788, 2012.

[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  
<http://molv.org/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

斉藤 愛記 (SAITOH YASUNORI)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・ウ  
イルス制御学・助教  
研究者番号：00516312

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：