

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501258

研究課題名(和文)テロメア伸長酵素(hTERT)遺伝子の発現調節機構

研究課題名(英文)Regulation of hTERT gene expression

研究代表者

中村 正孝(Nakamura, Masataka)

東京医科歯科大学・医歯学研究支援センター・教授

研究者番号：30180392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞は、免疫反応で細胞分裂を繰り返しても細胞寿命を保つ。染色体末端のテロメアの伸長酵素(hTERT)の働きによる。本研究では、T細胞のhTERTの発現調節機構を解析した。増殖休止期のT細胞は、転写因子KLF2がhTERT遺伝子プロモーターに結合して発現を抑制しているが、増殖細胞ではKLF2結合が解かれhTERT遺伝子が発現する。正常T細胞では、hTERTプロモーターはDNAメチル化されていないが、白血病T細胞では同プロモーターがDNAメチル化されている。DNAメチル化はKLF2のプロモーターへの結合を阻害するため、白血病細胞ではhTERTが発現し続け腫瘍化維持をしている。

研究成果の概要(英文)：T lymphocytes are exceptional in that they express a telomerase elongation enzyme (hTERT), though they are normal. hTERT expression contributes to long-life memory T lymphocytes via senescence prevention. We examined molecular mechanism of hTERT gene expression in human T cells. The hTERT promoter contains a DNA element which regulates hTERT expression. The transcription factor KLF2 binds to the element, resulting in repression of hTERT expression in growth resting cells. In growing cells, KLF2 is not associated with the element. DNA methylation of the element is seen in T leukemic T cells. DNA methylated element can not bind to KLF2, constitutively expressing hTERT.

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：発がん

キーワード：HTAL-1 Tax hTERT KLF2

1. 研究開始当初の背景

(1) 成人T細胞白血病ウイルス1型 (HTLV-1) は成人T細胞白血病の原因となる。HTLV-1の産生する分子Tax1は、T細胞の増殖を促しアポトーシスを阻害して腫瘍化に重要な役割を果たしていることが知られている。細胞の腫瘍化に必要な細胞不死化にTax1がどのように関与するか調べるために、我々は以前の研究でTax1によるテロメア伸長酵素(hTERT)の発現に及ぼすTax1の作用を解析した。

(2) その結果、Tax1はhTERT遺伝子プロモーターを活性化することを見出した。これは、Tax1による細胞増殖進行に伴って生ずる現象であった。一連の実験で、細胞増殖休止期のT細胞では、hTERT遺伝子の転写を積極的に抑制するDNAエレメントがhTERT遺伝子プロモーター中にあることを見出した。本研究ではこの抑制性DNAエレメントの機能を中心に解析した。

2. 研究の目的

(1) T細胞は免疫刺激を受けると細胞増殖を繰り返す。通常、正常細胞が増殖のため細胞分裂を繰り返すと、主に染色体末端のテロメアの短縮を原因として、細胞分裂が停止する細胞老化状態になる。しかし、T細胞は正常細胞の中で例外細胞の一つである。これは免疫記憶としてT細胞が長期に機能する必要があるためと考えられている。一方、がん細胞は細胞老化に陥ることなく不死化能を獲得して増殖し続ける。T細胞もがん細胞もhTERTの発現がテロメアを一定長以上に保つために働いている。

(2) 正常T細胞は免疫反応時以外は増殖休止期で、その時はhTERTは発現していない。hTERTの不用意な発現は、細胞の不死化を通じてがん化への危険があるため、休止期のT細胞ではhTERTの発現は積極的に抑制されていると考えられていた。我々は以前の研究で、休止期のT細胞でhTERT遺伝子の発現抑制に関わるプロモーター・エレメントを見出した。本研究ではその抑制性DNAエレメントの機能を調べた。

3. 研究の方法

(1) 使用した細胞

ヒトT細胞白血病株Jurkat、Kit225を用いた。Kit225は増殖にT細胞増殖因子(IL-2)を必要とし、IL-2がない培養では増殖休止期に留まる。ヒト末梢T細胞を、東京医科歯科大学倫理委員会承認の下で使用した。

(2) プロモーター・エレメントの機能解析

hTERTプロモーターのDNAエレメントに結合する因子は、酵母ワンハイブリッド法で同定した。DNAエレメントへの因子の結合はゲルシフト法、クロマチン免疫沈降法で解析した。DNAエレメントの転写制御能はルシフェーゼ遺伝子発現を指標としたレポーター・アッセイ法で行った。

(3) KLF2の測定

KLF2の発現は蛍光抗体法、RT-PCR法、ウエスタン・ブロッティング法で調べた。KLF2の機能解析のためにsiRNAでKLF2の発現抑制を行った。

4. 研究成果

(1) DNAエレメントに結合する因子

hTERT遺伝子プロモーター中の抑制性DNAエレメントに結合する因子を、酵母のワンハイブリッド法で探索した。白血細胞由来のライブラリーを用いてスクリーニングしたところ、69クローンの産物で結合がみられ、その内に12クローンが転写因子Krüppel-like factor 2 (KLF2)で最も多い分子であった。

大腸菌で作製したKLF2とglutathion S-transferaseの融合分子(GST-KLF2)は、ゲルシフト法でDNAエレメントに結合した。KLF2を発現しているKit225細胞にDNAエレメントを含むプラスミドを導入し、細胞でもKLF2がDNAエレメントに結合することをクロマチン免疫沈降法で確かめた。ただしこの結合は培養からIL-2を除いた細胞が増殖休止期に認められ、増殖期の細胞ではKLF2のDNAエレメントへの結合はみられなかった。

(2) hTERTとKLF2のT細胞での発現

KLF2によるhTERT遺伝子発現調節機構を調べるために、正常T細胞でのKLF2とhTERTの発現をRT-PCR法とウエスタン・ブロッティング法で解析した。その結果、休止期の細胞でKLF2は発現していて、その蛋白は核に局在している。細胞の増殖がはじまるとKLF2の転写は止まり、蛋白は主に細胞質への分布に変わる。一方、hTERTは休止期の細胞では発現しておらず、細胞増殖とともにその転写が生じ、KLF2の発現とは逆の関係となる。これらの結果は、KLF2のDNAエレメントへの結合が、hTERT遺伝子転写抑制に関与していることを示唆している。

(3) KLF2によるhTERTの発現抑制

KLF2の発現を強制的に変動させることにより、KLF2のhTERT遺伝子転写への関与を調べた。増殖期のKLF2を発現していない正常T細胞にKLF2を強制発現させるとhTERT遺伝子の発現は抑制される。一方、休止期のKLF2を発現している正常T細胞にsiRNAを導入してKLF2の発現を抑制すると、hTERT遺伝子の発現が誘導される。これらの結果は休止期の細胞でKLF2がhTERT遺伝子プロモーターに結合して転写を抑制していて、細胞が増殖するとKLF2が解離してhTERT遺伝子の発現が誘導される機構を示している。

(4) DNAエレメントのメチル化とKLF2の結合

JurkatはKLF2を発現しておらず、hTERTを恒常的に発現している。hTERT遺伝子プロモーターをプラスミドでJurkatに導入すると、外来導入プロモーターは活性化される。

そこに KLF2 を強制発現させると、正常 T 細胞でみたように、外来導入 hTERT プロモーターの活性は抑制された。しかし Jurkat の内在性 hTERT の発現は KLF2 の発現で影響を受けなかった。このことはがん細胞では別な hTERT 遺伝子発現調節機構がある可能性がある。

一般にがん細胞では DNA が CpG でメチル化されていることが多い。DNA メチル化により遺伝子発現は多くの場合、抑制されることが知られている。hTERT 遺伝子プロモーターの抑制性 DNA エlement にも CpG 配列があり、Jurkat、Kit225 で DNA エlement のメチル化状態を調べた。いずれの細胞株でも DNA エlement の CpG はメチル化されていた。正常 T 細胞では同じ DNA 配列がメチル化されていない。

この CpG 配列のメチル化と KLF2 の結合能との関連を調べるために、hTERT 遺伝子プロモーターを含むプラスミドを人工的に DNA メチル化して Jurkat に導入すると、KLF2 の結合がみられないことがクロマチン免疫沈降法で明らかになった。このことは CpG のメチル化により、KLF2 の抑制性 DNA エlement への結合が阻害されることを示している。DNA メチル化阻害剤 (Zebularine) で KLF2 を発現している Kit225 を脱メチル化すると、hTERT 遺伝子の発現は抑制される。しかし KLF2 を発現していない Jurkat では DNA メチル化阻害剤の影響はなかった。

(5) まとめ

休止期の正常 T 細胞は、hTERT 遺伝子プロモーターの抑制性 DNA エlement に転写因子 KLF2 が結合していて、hTERT 遺伝子の転写は抑制されている。増殖期の T 細胞では、KLF2 の結合がはずれ hTERT 遺伝子が発現する。T 白血病細胞株の抑制性 DNA エlement は DNA メチル化されている。この DNA メチル化は KLF2 の DNA エlement への結合を阻害する。このことが白血病細胞では hTERT 遺伝子の恒常的発現を招き、細胞の不死化に貢献するものと考えられる。

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 10 件)

1. Takehara Y, Satoh T, Nishizawa A, Saeki K, Nakamura M, Matsuzawa M, Kaneda Y, Katayama I, Yokozeki H: Anti-tumor effects of inactivated Sendai virus particles with an IL-2 gene on angiosarcoma. Clin. Immunol. 149: 1-10, 2013. 査読有り doi 10.1016
2. Tsukahara T, Ohmine K, Yamamoto C, Uchibori R, Ido H, Teruya T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Nakamura M, Mineno J, Takesako K, Riviere I, Sadelain M, Brentjens

R, Ozawa K: CD19 target-engineered T-cells accumulate at tumor lesions in human B-cell lymphoma xenograft mouse models. Biophys. Biochem. Res. Commun. 438: 84-89, 2013. 査読有り doi 10.1016

3. Murata T, Aritake K, Tsubosaka Y, Maruyama T, Nakagawa T, Hori M, Hirai H, Nakamura M, Narumiya S, Urade Y, Ozaki H: Anti-inflammatory role of PGD₂ in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110: 5205-5210, 2013. 査読有り doi 10.1073

4. Taketomi Y, Ueno N, Kojima T, Sato H, Murse R, Yamamoto K, Tanaka S, Sakanaka M, Nakamura M, Hishito Y, Kawana M, Kambe N, Ikeda K, Taguchi R, Nakamizo S, Kabashima K, Gelb M H, Arita M, Yokomizo T, Nakamura M, Watanabe K, Hirai H, Nakamura M, Okayama Y, Ra C, Aritake K, Urade Y, Morimoto K, Sugimoto Y, Shimizu T, Narumiya S, Hara S, Murakami M: Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A₂-prostaglandin D₂-DP1 receptor paracrine axis. Nature Immunol. 14: 554-563, 2013. 査読有り doi 10.1038

5. Mizukoshi T, Komori H, Mizuguchi M, Abdelaziz H, Hara T, Higuchi M, Tanaka Y, Ohara Y, Funato N, Fujii M, Nakamura M: Failure in activation of the canonical NF-κB pathway by human T-cell leukemia virus type 1 Tax in non-hematopoietic cell lines. Virology. 443: 226-235, 2013. 査読有り doi 10.1016

6. Ishii M, Asano K, Namkoong H, Tasaka S, Mizoguchi K, Asami T, Kamata H, Kimizuka Y, Fujiwara H, Funatsu Y, Kagawa S, Miyata J, Ishii K, Nakamura M, Hirai H, Nagata K, Kunkel SL, Hasegawa N, Betsuyaku T: CRTH2 is a critical regulator of neutrophil

migration and resistance to polymicrobial sepsis. *J Immunol.* 188: 5655-5664, 2012. 査読有り doi 10.4049

7. Ito H, Yan X, Nagata N, Aritake K, Katsumata Y, Matsuhashi T, Nakamura M, Hirai H, Urade Y, Asano K, Kubo M, Utsunomiya Y, Hosoya Y, Fukuda K, Sano M: PGD2-CRTH-2 pathway promotes tubulointestinal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23: 1797-1809, 2012. 査読有り doi 10.1681

8. Matsushima Y, Satoh T, Yamamoto Y, Nakamura M, Yokozeki H: Distinct roles of prostaglandin D2 receptors in chronic skin inflammation. *Mol. Immunol.* 49: 304-310, 2011. 査読有り doi 10.1016

9. Yamamoto Y, Satoh T, Otan S, Aritake K, Urade Y, Narumiya S, Nakamura M, Yokozeki H: Dual functions of prostaglandin D in contact hypersensitivity through DP and CRTH2. *Amer. J. Pathol.* 179: 302-314, 2011. 査読有り doi 10.1016

10. Kogiso M, Nishiyama A, Shinohara T, Nakamura M, Mizoguchi E, Misawa Y, Guinet E, Nouri-Shirazi M, Dorey C.K, Henriksen R.A, Shibata Y: Chitin particles induce size-dependent but carbohydrate-independent innate eosinophilia. *J. Leukocyte Biol.* 90: 167-176, 2011. 査読有り doi 10.1189

〔学会発表〕(計 7件)

1. Hara T, Nakamura M. CpG methylation abrogates KLF2-mediated transcriptional repression of telomerase in human T cells. Annual Meeting 2013, Washington, USA. April 6-10, 2013.

2. Nakamura M. Prostaglandin D2 receptor CRTH2: Discovery to function. 2013 Shanghai symposium on polyunsaturated fatty acids and metabolism, Shanghai, China, June 3-4, 2013.

3. Nakamura M, Hara T. Regulation of hTERT transcription by the transcription factor KLF2 and DNA methylation in human T cells. 38th FEBS Congress, St.Petersburg, Russia, July 6-11, 2013.

4. Mizuguchi M, Higuchi M, Fujii M. Nakamura M. HTLV-1 Tax activated NF- κ B is involved in both cell growth and death. 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, Montreal, Canada, June 26-30, 2013.

5. Nakamura M. DNA methylation is associated with constitutive expression of human telomerase in T leukemia cells. IGBMC Chromatin: from Structure to Epigenetics Conference, Strasbourg, France. June 26-27, 2012.

6. Hara T, Nakamura M. Epigenetic modulation of hTERT expression in human T leukemia cell lines. ICC on Epigenetics in Lymphocyte Biology and Disease, Barcelona, Spain. September 13-14, 2012.

7. Nakamura M, Hara T. Epigenetic modulation of telomerase gene transcription in human T cell leukemia. The 39th Meeting of the ISOBM, Florence, Italy. October 15-19, 2011.

〔図書〕(計 1件)

1. Mizuguchi M, Hara T, Nakamura M. Roles of HTLV-1 Tax in leukemogenesis of human T-cells. T-cell leukemia, InTech Press, Croatia. 51-64, 2011.

〔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

中村 正孝 (Nakamura, Masataka)

東京医科歯科大学

医歯学研究支援センター・教授

研究者番号： 30180392