

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659459

研究課題名(和文) ユビキチン化修飾酵素A20の血液腫瘍細胞生存促進作用の解明

研究課題名(英文) Studies on promotion of hematopoietic tumor cell survival by A20

研究代表者

山岡 昇司 (Yamaoka, Shoji)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：90263160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン修飾酵素A20は炎症と癌を制御する鍵となる分子である。本研究でA20がHTLV-1感染細胞をはじめとする多くの造血系悪性腫瘍細胞に強く発現していること、HTLV-1感染細胞中ではA20は強発現し細胞死を誘導するカスパーゼ8とタンパク質複合体を形成することがわかり、またFADDとの結合も検出された。RNA干渉法によりA20の発現を抑制すると、カスパーゼ8、3、7の活性化を誘導し、細胞増殖を著しく阻害することがわかった。今後、腫瘍細胞における細胞死抑制の分子メカニズムが明らかになり、新たな分子標的候補が見出されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：A20 is a ubiquitin-editing enzyme that regulates inflammation and cancer development. Our current studies revealed that A20 was abundantly expressed in several types of cancer cells such as HTLV-1 infected cells in contrast to lymphomas of B-cell lineage that harbor somatic mutation or deletion. In HTLV-1 infected cell lines, A20 was co-immunoprecipitated with caspase-8 or FADD independently of any death-ligand stimulation. RNA-interference mediated depletion of A20 induced activation of caspase-8 and its downstream effectors, caspase-3 and -7, and caused marked reduction in the cell viability. Taken together, these results suggest that A20 plays a pivotal role in the survival of HTLV-1-infected cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液腫瘍 細胞死 カスパーゼ A20

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病(ATL)、ホジキンリンパ腫をはじめとする造血系腫瘍疾患は極めて悪性度が高く、薬物治療が困難であることから、新たな治療標的分子の同定が強く求められている。腫瘍細胞の増殖をいかに効率的に抑えるかということが治療戦略上必要な要素であるが、有効な分子標的治療薬の開発には腫瘍細胞の生存機構を理解することが重要であり、本研究は腫瘍細胞の生存に必要なとされる新規因子の同定を目指して研究計画を立案した。

本研究で着目したユビキチン化修飾酵素 A20 は、標的とする分子の不活化や分解を通してシグナル伝達の抑制因子として機能する。A20 は転写因子 NF- κ B 活性化のシグナル伝達経路に対する抑制因子として最もよく知られ、NF- κ B 活性化依存的に発現誘導されサイトカイン刺激による NF- κ B 活性化に対する重要な制御因子として機能する(図 1)。

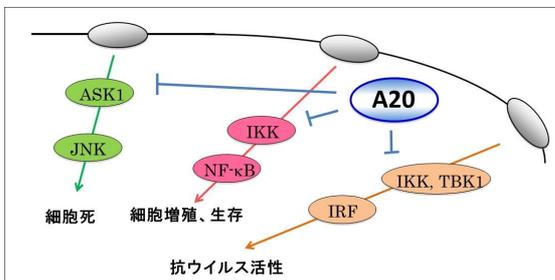


図 1. A20 は NF- κ B シグナル伝達経路の抑制因子である

多くの腫瘍細胞ではしばしばサイトカイン刺激に依存しない持続的な NF- κ B の活性化がみられ、腫瘍細胞の生存および悪性形質の発現に寄与することが示唆されている。実際に、近年我々は NF- κ B シグナル伝達経路の主要分子 I κ B kinase 2 に対する新規阻害物質 IMD-0354 が ATL 患者由来 HTLV-I 感染細胞の生存および重度免疫不全マウスにおける造腫瘍性を抑制することを報告している。一方、様々な B 細胞由来リンパ腫細胞において A20 の変異や欠損が相次いで報告され、この A20 の機能不全が持続的な NF- κ B 活性化と細胞生存の要因であると考えられている。しかしながら、以上の知見は B 細胞系リンパ腫の解析結果から得られたものであり、その他の腫瘍細胞における A20 の役割については不明な点が多く残されている。また、A20 の変異・欠損がみついている各種 B 細胞リンパ腫においても、約半数以上の症例で A20 遺伝子に変異が認められず、一方でその A20 の役割については報告されていない。本研究において、我々は ATL 細胞、A20 の発現が報告されているホジキンリンパ腫細胞株における A20 の発現とその役割について解析した。

2. 研究の目的

本研究は、“悪性腫瘍細胞の増殖をいかに効

率的かつ安全に抑えるか”という命題に基づき、腫瘍細胞に特徴的な生存機構を解明することで腫瘍細胞に特異的に作用し得る細胞内治療標的分子の特定を目的とするものである。成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞、ホジキンリンパ腫細胞を対象とした。我々の先行研究により、A20 を重要な候補分子と考え、治療標的分子としての評価を *in vitro* 実験系ならびにマウスを用いた *in vivo* 実験系によって行った。

3. 研究の方法

(1) 造血系腫瘍細胞として ATL 患者由来 HTLV-I 感染細胞株 (ED40515(-), TL-OmI, ATL-43Tb(-), ATL-55T(-), MT-1), HTLV-I 感染 Tax 陽性細胞株 (HTLV-I 感染に関連する皮膚 T 細胞リンパ腫; Hut102, *in vitro* で HTLV-I 感染により樹立; MT-2, MT-4, M8166)、B 細胞ならびに T 細胞由来のホジキンリンパ腫細胞株 (L428, L540) を用いた。これらの細胞から細胞質あるいは全タンパク質溶液を抽出し、ウエスタンブロッティングに用いた。また、これらの細胞株から total RNA を精製し、A20, NF- κ B inducing kinase (NIK) mRNA 量を定量 PCR 法により測定した。また、ATL 患者由来末梢血単核細胞 (PBMCs) についても同様な実験を行った。ATL 患者由来 PBMCs は HTLV-1 感染者疫学調査 (JSPFAD) の規定に則り、施設における倫理審査委員会による承認を得た上で、インフォームド Consent のもとで提供を受けた。

(2) A20 の発現を特異的に抑制し得る shRNA をレンチウイルスベクターによって各種腫瘍細胞株に導入し、A20 の悪性形質発現に対する役割を検討した。A20 の悪性形質発現に対する役割は、*in vitro* 細胞増殖試験、重度免疫不全マウス (NOD-SCID または NOG マウス) を用いた造腫瘍性試験によって評価した。A20 の NF- κ B 活性化に対する役割は、NF- κ B dual-luciferase assay によって評価した。

(3) 死細胞はフローサイトメトリーによる annexin V, 7-AAD 陽性細胞の検出、propidium iodide (PI) 染色による sub-G1 分画の検出によって測定した。また、Caspase の活性化は Caspase-Glo 8, Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega)、そしてウエスタンブロッティングによる活性化型 caspase の検出によって評価した。

4. 研究成果

(1) HTLV-I 感染細胞株において A20 の発現は正常である

ATL の原因ウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) のウイルスタンパク質 Tax は NF- κ B の活性化を誘導し悪性形質の発現を惹起すると考えられている。ATL の

発症段階ではTaxの発現は検出されないものの、強力な NF- κ B 活性化を特徴とする ATL 患者由来 HTLV-I 感染細胞において NF- κ B 活性化の主要分子である NF- κ B inducing kinase (NIK)の高発現がみられることを我々は過去に報告している。一方で、HTLV-I 感染細胞における NF- κ B 標的因子 A20 の発現とその役割については不明である。

本研究では、まず ATL 患者由来 PBMC における A20 mRNA の発現を定量 PCR 法によって測定した。ATL 患者由来 PBMC では、健康人由来 PBMC と比較して A20 mRNA の発現上昇が認められ、タンパク質溶液を抽出できた 2 検体についていずれも A20 タンパク質の発現が検出された。また、HTLV-I 感染細胞株においても A20 タンパク質の発現を認め、ホジキンリンパ腫細胞株、卵巣癌細胞株、卵巣癌細胞株、子宮頸癌細胞株、大腸癌細胞株においても A20 の発現が検出された。さらに、ATL 患者由来 PBMC を用いて A20 cDNA 配列を解析したところ、21 症例全てにおいて A20 遺伝子の変異は認められなかった。HTLV-I 感染細胞株 ED40515(-), TL-Oml, Hut102 においても同様に A20 cDNA に変異はみられなかった。以上の結果から、サイトカイン刺激に非依存的な持続的な NF- κ B 活性化を示す上記腫瘍細胞において、A20 は癌抑制因子とは異なる新たな役割をもつ可能性がある。

(2) A20 を発現する腫瘍細胞株において、A20 は細胞生存および造腫瘍性に寄与する

本研究では、まず HTLV-I 感染細胞株で発現する A20 の細胞生存に対する役割を調べるため、A20 の発現抑制を試みた。その結果、A20 の発現抑制により HTLV-I 感染細胞株の細胞増殖が著しく抑制されることが分かった。また、ホジキンリンパ腫細胞株、上皮系腫瘍細胞株においても同様の結果を得ている。以上の結果は、in vitro での培養環境に特異的な現象である可能性があるため、免疫不全マウスを用いた in vivo 造腫瘍性試験系によって A20 の腫瘍形成に対する役割を調べた。HTLV-I 感染細胞株である ED40515(-), Hut102 は免疫不全マウスの皮下に移植することで腫瘍を形成することが知られているが、A20 の発現を抑制した ED40515(-), Hut102 細胞株を NOD-SCID マウスあるいは NOG マウスの皮下移植したところ、形成される腫瘍の大きさが低下することがわかった。一方で、A20 の発現抑制によって HTLV-I 感染細胞株でみられる NF- κ B 活性化に変動はみられなかった。以上の結果は、A20 は NF- κ B 活性化の制御とは非依存的に腫瘍細胞の増殖および造腫瘍性に寄与することを示す。

(3) 腫瘍細胞株において A20 は細胞死の抑制因子として機能する

A20 の発現抑制により腫瘍細胞株の増殖が

抑制されたが、A20 は細胞周期制御に関与するのがあるいは細胞死の回避に関わるのかを調べるため、はじめに PI 染色法による核染色を用いた DNA 細胞周期解析を行った。HTLV-I 感染細胞株における A20 の発現抑制により、sub-G1 分画が上昇したため、A20 の発現抑制によりアポトーシスが誘導される可能性が示唆された。そのため、annexin V 染色によるアポトーシス細胞の検出を試みたところ、A20 の発現抑制により annexin V, 7-AAD 陽性細胞が検出された。以上の結果から、HTLV-I 感染細胞株および上皮系腫瘍細胞株において A20 はアポトーシス抑制因子として機能する可能性が考えられる。A20 はこれまでに、サイトカイン刺激誘導性の細胞死に抵抗性をもたらすことが報告されているが、腫瘍細胞の生存における抗細胞死作用については明らかにされていない。続いて我々は、A20 の発現抑制によるアポトーシスの重要な制御因子 caspase の活性化について検討した。その結果、HTLV-I 感染細胞株において A20 の発現抑制により caspase-8 およびその下流分子でありアポトーシスの実行因子として機能する caspase-3 の活性化が誘導された。さらに、HTLV-I 感染細胞株における A20 の発現抑制により活性化型 caspase-8, -3 が検出されることが明らかとなった。

(4) A20 は caspase-8 と相互作用しユビキチン化修飾活性非依存的に ATL 細胞株の増殖を支える

今回の研究成果により、A20 の機能不全によって腫瘍細胞の生存が支えられるという B 細胞リンパ腫細胞から得られた知見とは異なる A20 の役割が示唆されたが、その詳細な分子機構について知る必要がある。A20 は N 末端側に脱ユビキチン化活性、C 末端側に E3 ligase 活性をもつユビキチン化修飾酵素である。また、C 末端側の第 7 zinc finger 領域は直鎖型ユビキチン鎖の認識と結合に関与することが報告されている (図 2)。

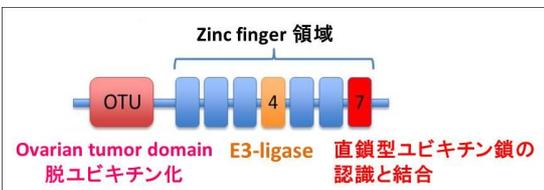


図 2. ユビキチン化修飾酵素 A20 の機能領域

近年、TRAIL 刺激後に A20 が caspase-8 と相互作用し、caspase-8 の脱ユビキチン化を介する TRAIL 誘導性の細胞死が抑制されることが報告された。そこで我々は、HTLV-I 感染細胞における A20 の caspase-8 との相互作用を免疫沈降法により検討した。その結果、HTLV-I 感染細胞において A20 は caspase-8, FADD と相互作用することが明らかとなった。

通常 Tumor necrosis factor (TNF)- α や

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 刺激後に Fas-associated death domain (FADD) を含む death-inducing signaling complex (DISC) が細胞膜下に形成され caspase-8 の活性化が誘導されるが、HTLV-I 感染細胞において A20 が刺激非依存的に caspase-8 と相互作用することは興味深い。さらに、E3-ligase 活性変異体、脱ユビキチン化活性変異体、zing finger 7 領域に変異を導入した A20 も caspase-8 と相互作用したことから、A20 の caspase-8 との相互作用にはユビキチン化修飾活性は必要とされない可能性がある。さらに、HTLV-I 感染細胞において A20 と FADD の相互作用が認められたが、一方で FADD と caspase-8 との相互作用を検出することはできなかった。FADD と caspase-8 の相互作用領域に A20 がそれぞれ結合する場合、A20 は物理的相互作用を介して FADD-caspase-8 を介する細胞死を抑制する可能性がある (図 3)。

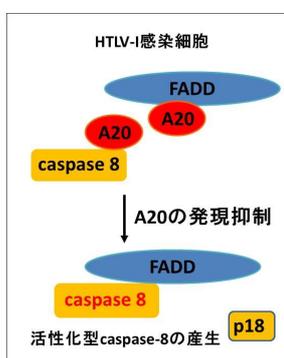


図 3 .HTLV-I 感染細胞株における A20 の発現抑制により caspase-8 の活性化が誘導される

今回の研究成果により、A20 は ATL 治療に対する有効な治療標的分子となる重要な可能性が示唆された。今後、上皮系腫瘍を含めた様々な腫瘍細胞を用いた解析へと応用する。多くの腫瘍細胞に対する新規治療戦略の確立に貢献するものと期待がもたれる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 9 件)

第 36 回日本分子生物学会年会

2013 年 12 月 3 日~12 月 6 日

会場：神戸ポートアイランド

「TNFAIP3/A20 は HTLV-I 感染細胞において caspase-8 活性化を制御する」

鶴山恵理、斉藤愛記、持田佳奈子、徳永文稔、山岡昇司

新学術領域研究「修飾シグナル病」

2013 年度修飾シグナル病若手ワークショップ

2013 年 10 月 21 日~10 月 23 日

会場：伊香保温泉 森秋旅館

「HTLV-I 感染細胞における A20 は

caspase-8 の活性化を抑制する」

斉藤愛記、鶴山恵理、掛谷綾香、持田佳奈子、深澤麻純、大迫美穂、宇野雅哉、徳永文稔、山岡昇司

第 72 回日本癌学会学術総会

72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association

2013 年 10 月 3 日(木)~5 日(土)

会場：パシフィコ横浜

「Ubiquitin-editing enzyme A20 interacts with and suppresses caspase 8 in HTLV-I-infected cells」

Yasunori Saitoh, Masaya Uno and Shoji Yamaoka

第 5 回 HTLV-I 研究会/シンポジウム

2013 年 8 月 23 日(金)~25 日(日)

会場：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 感染細胞の細胞死を抑制する」

鶴山恵理

新学術領域研究「修飾シグナル病」

第 3 回領域推進会議・第 4 回研究交流若手発表会

2013 年 7 月 5 日(金)~6 日(土)

会場：東京大学医科学研究所・講堂 & 白金ホール

「癌細胞における A20 の役割」

斉藤愛記、鶴山恵理、掛谷綾香、深澤麻純、持田佳奈子、大迫美穂、宇野雅哉、山岡昇司

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

会場：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」

斉藤愛記、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

第 71 回日本癌学会学術総会

2012 年 9 月 19~21 日

会場：ロイトン札幌、さっぽろ芸文館、札幌市教育文化会館

「ユビキチン修飾酵素 A20 は成人 T 細胞白血病(ATL)細胞の生存に必要である」

掛谷綾香、深澤麻純、宇野雅哉、宇都宮與、渡邊俊樹、斉藤愛記、山岡昇司

第 71 回日本癌学会学術総会

2012 年 9 月 19~21 日

会場：ロイトン札幌、さっぽろ芸文館、札幌市教育文化会館

「A20/TNFAIP3 は癌細胞株の増殖に寄与する」

深澤麻純、掛谷綾香、宇野雅哉、斉藤愛記、山岡昇司

第1回 ATL シンポジウム
2012年 8月 25日
会場；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

〔図書〕(計 0 件)

〔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

山岡昇司 (YAMAOKA, Shoji)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：90263160

(2) 研究分担者

齋藤愛記 (SAITOH, 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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：