

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461580

研究課題名(和文) T細胞受容体再構成異常が基盤とした発がん機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of carcinogenesis based on TCR rearrangement system

研究代表者

高木 正稔 (Takagi, Masatoshi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：10406267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：毛細血管拡張性運動症におけるT細胞分化異常はT細胞分化に必要なT細胞レセプター(TCR)の再構成で、特に鎖の再構成異常があるためとされてきた。しかし我々のこれまでの研究でATM欠損マウスではDN期のDN2、DN3aからDN3aの移行にも大きな障害があることが示唆された。VDJ再構成の時RAG1/2依存によっておこるDNA2重鎖切断が修復される以前に細胞周期が進行してしまうため、TCR受容体遺伝子座内で染色体転座が起こり、また近傍の遺伝子増幅や欠失が起こり、TCRや免疫グロブリンエンハンサーやプロモーターが近傍のがん遺伝子を活性化することが腫瘍化につながるということが明らかとなった。

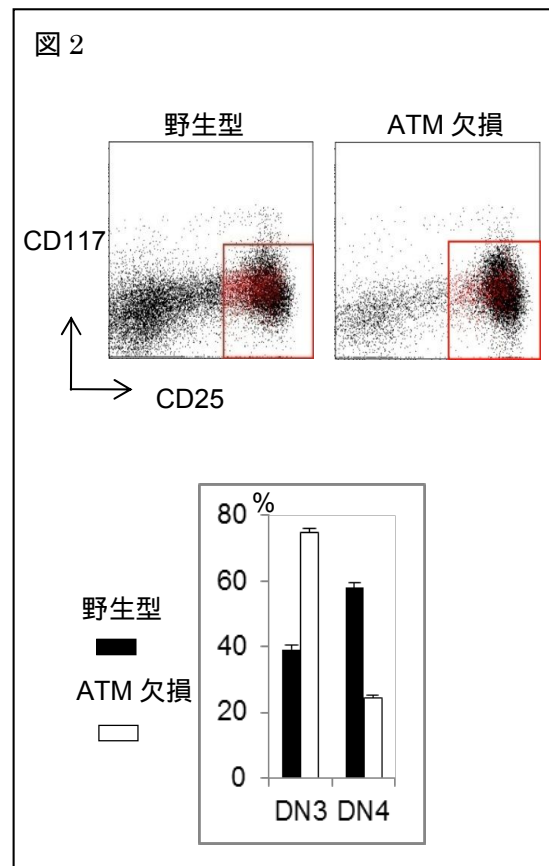
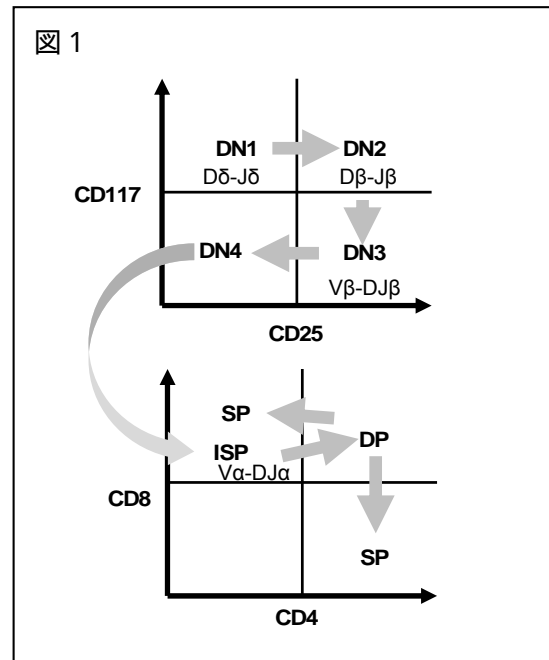
研究成果の概要(英文)：The ATM deficient mouse exhibits fewer CD4 and CD8 single positive T-cells due to a failure to develop from the CD4+CD8+ double positive phase to the SP phase. Although the occurrence of chromosome 14 translocations involving TCR alpha gene in ATM-deficient lymphomas suggest that these are early events in T-cell development, an thorough analysis focusing on early T-cell development has never been performed. We demonstrate that ATM deficient T cell are perturbed in passing through the beta or gamma/delta selection checkpoint, leading in part to the developmental failure of T-cells. Detailed karyotype analysis employing in vitro thymocyte development system revealed that RAG mediated TCR alpha/delta locus breaks occur and are left unrepaired during the troublesome beta or gamma/delta selection checkpoints. By getting through these selection checkpoints some of the clones with random or non-random chromosomal translocations involving TC Ralpha/delta locus are selected and accumulate.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：DNA損傷応答 T細胞受容体

1. 研究開始当初の背景

毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia (A-T) は小脳性失調、毛細血管拡張、免疫不全を主徴とし、早老症や耐糖能異常を示し、悪性腫瘍を高率に合併する疾患である。責任遺伝子 ATM によってコードされるタンパク質は DNA 損傷応答機構において中心的な役割を持ち、DNA2 重鎖切断などにより活性化され、p53 を始め、下流に位置するアポトーシスや細胞周期調節、DNA 修復に関連する数多くの因子を、そのリン酸化によって調節している。現在までの研究で A-T における免疫不全症はリンパ球減少を主体とした細胞性免疫不全、B 細胞分化障害を主体とした液性免疫不全の複合型と考えられ、そのリンパ球分化障害の原因は ATM の DNA 損傷におけるその機能から T 細胞受容体(TCR) や免疫グロブリンの V(D)J 再構成、クラススイッチの過程において RAG1/2 によって切断された DNA の DNA2 重鎖切断部位が非相同末端再結合(NHEJ)で再結合する過程での障害が推定されていた。ATM ノックアウト(欠損)マウスも同様に T 細胞分化不全を呈し、胸腺の解析から T 細胞分化が CD4/CD8 二重陽性(DP)細胞の段階で止まっていることが明らかにされている。T 細胞は胸腺内で CD4/CD8 二重陰性(DN)T 細胞から CD4/CD8 DP T 細胞へと成熟する。胸腺内 CD4/CD8 DN T 細胞は CD117、CD25 の発現により、その分化段階が DN1、DN2、DN3a、DN3b、DN4 に分類され、DN1-2 で T 細胞受容体(TCR) $\gamma\delta$ が DN3a で TCR β の再構成が始まり、再構成が成功すると DN3b、DN4 と分化が進み (β セレクション)、代替 α 鎖/TCR β からなるプレ TCR を介した刺激により CD4/CD8 の発現、TCR α の再構成が始まる (図 1)。



先に述べたように A-T の胸腺 T 細胞は CD4/CD8 DP 細胞の段階に集積することにより TCR α の再構成に問題があることが予想され、また過去のいくつかの論文で TCR α 再構成において cording joint の結合に障害があり、遠位 V α 領域の欠損が起こることにより、TCR α の発現が減少し、TCR β (low) CD4/CD8

DP 細胞までは正常に発達するが、その先成熟胸腺細胞に至る分化が障害されることが示されてきた。しかしこれまでは A-T において CD4/CD8 DN 期に注目した T 細胞の分化に関しては検討が行われていなかった。現在までの我々の研究で ATM 欠損マウスでは T 細胞分化が CD4/CD8 DP 細胞で停滞する一方、CD4/CD8 DN 期において DN2、DN3a から DN3b へ移行する段階で細胞分化が停滞することが明らかとなった(図 2)。A-T はこういった胸腺 T 細胞分化不全による免疫不全を示す一方で白血病・リンパ腫を 20-30% の患者で合併することが知られている。これらの白血病・リンパ腫では T 細胞受容体や免疫グロブリン遺伝子を含む転座が高率に認められる。また一方で A-T 患者の末梢血では TCR、免疫グロブリン遺伝子座を含む染色体転座を持つリンパ球が存在することが知られている。しかしながら具体的にどのような機序により胸腺 T 細胞分化不全が起こり、どのようなタイミングで転座を持つ細胞が出現し、そして腫瘍化とどのような関連があるかは、明らかとはなっていない。

2. 研究の目的

ATM によるリンパ球分化の調節機構の詳細を明らかにする。A-T に見られる免疫不全と白血病・リンパ腫を始めとした高発がん性をリンパ球分化不全、とくに T 細胞受容体、免疫グロブリン遺伝子再構成の観点から明らかにする。A-T による発がん和リンパ球分化不全の関連を明らかにすることにより、より一般的に観察される免疫グロブリンや T 細胞受容体領域の染色体転座を伴った白血病・リンパ腫の発症の病態にせまる。

3. 研究の方法

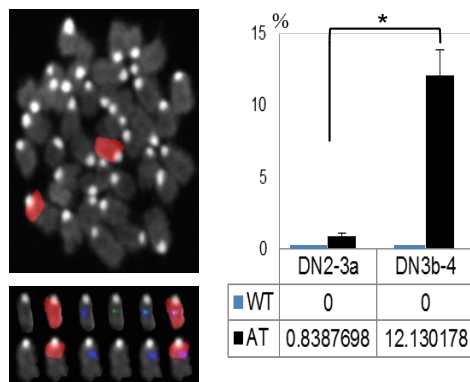
ATM によるリンパ球分化誘導調節機構を明らかにするため、野生型マウスおよび ATM ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の解析、およびその骨髄血液幹細胞を用いて *in vitro*

での細胞分化を行い、FISH 法を用いた染色体転座の解析、ゲノム変化による腫瘍化との関連を検討する。分化誘導障害が起こっている特定の細胞集団、とくに T 細胞における DN2 から DN3a ステージ細胞に注目し ATM 依存に分化誘導を調節している転写因子、または細胞の腫瘍化にかかわる因子を同定する。ヒト iPS 細胞を用いた造血細胞分化誘導系を確立し、マウスで得られた実験結果のヒトでの再現性を確認する。

4. 研究成果

DN 期でのなかで DN2 期で TCR $\gamma\delta$ が DN3a 期で TCR β の再構性が起こる。そこで DN 期の細胞をもちいて TCR 遺伝子領域の状態について FISH 法で観察した。興味深いことに ATM 欠損細胞では野生型に比較し DN2-3a 期では TCR α 鎖内 TCR δ 鎖領域で DNA 切断がより高頻度に認められることが分かった。TCR δ 鎖は TCR α 鎖内に位置している。このことから ATM 欠損細胞では DN2-3a 期で起こった TCR δ 内の遺伝子切断が修復できないため、リンパ球分化の停滞が起こることが明らかとなった。また興味深いことに ATM 欠損細胞では DN4 期に進んだ細胞で高率に 14 番染色体 TCR α 鎖を含んだ転座が起きることが明らかとなった(図 3)。

図 3



14 番染色体(赤)、TCR α 鎖セントロメア側(青)、TCR α 鎖テロメア側(緑)、右グラフは TCR α 鎖内での 14 番染色体の転座率

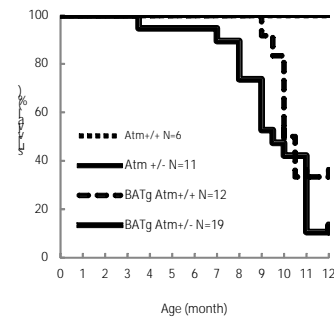
ATM は DNA2 重鎖切断を認識し、DNA2

重鎖切断が修復されるまで、TP53などを介し細胞周期を停止し、その間にDNA修復へと誘導するのに必要な分子である。しかしATMが欠損しているとTCR α/δ におけるVDJ再構成時のチェックポイントが機能せず、TCR α/δ 遺伝子座を含むDNA2重鎖切断端を起点とした染色体転座がTCR β 鎖、IGH鎖との間でおこり、またその近傍の遺伝子の欠失や増幅が起こることで、TCRや免疫グロブリンエンハンサーやプロモーターが近傍のがん遺伝子を活性化することが腫瘍化の原因と考えられた。

慢性骨髄性白血病は融合遺伝子p210BCR/ABLにより発症する造血器悪性腫瘍である。臨床的には、分化傾向を有する顆粒球系細胞が徐々に増加する慢性期を数年経過した後、不可避免的に幼弱芽球が急激に増加する急性白血病に似た病態に移行する(急性転化)。慢性骨髄性白血病を発症するp210BCR/ABLトランスジェニックマウスに、ATMの欠損マウスを掛け合わせるにより、慢性骨髄性白血病の発症や急性転化におけるATMの役割について検討した。p210BCR/ABLトランスジェニックATMヘテロ欠損マウスで急性転化までの期間が短縮されることが明らかとなった。この研究により疫学的に推測されている毛細血管拡張性運動失調症ATの保因者における高発がん性が、細胞生物学的にも立証できた。また同時に発がんチェックポイントとしてATMを起点としたDNA損傷応答機構が機能していることが明らかとなった。(図4)

妊娠中の母体のDNA損傷を起こす薬剤への暴露が、胎児の染色体転座に関連することが想定されている。この現象をマウスモデルを用いて検討し、正常のマウスと比較しATM欠損マウスでより高頻度に染色体転座が起こることを明らかにした。

図4



ATM欠損マウス、ATM欠損BCR/ABLトランスジェニックマウス、の生存曲線、カプランマイヤー解析

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) Takagi M, Sato M, Piao J, Miyamoto S, Isoda T, Kitagawa M, Honda H, Mizutani S. ATM-dependent DNA damage-response pathway as a determinant in Chronic Myelogenous Leukemia. *DNA Repair*. 査読有 2013;12 (7) 500-507. doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.022.

(2) Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe F, Morio T, Teraoka H, Mizutani S. Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. *Cancer Sci*. 査読有. 2013; 104(6):703-710. doi: 10.1111/cas.12144.

(3) Tamaichi H, Sato M, Porter AC, Shimizu T, Mizutani S, Takagi M. Ataxia telangiectasia mutated-dependent regulation of topoisomerase II alpha expression and sensitivity to topoisomerase II inhibitor. *Cancer science*. 査読有 2013; doi:10.1111/cas.12067

(4) Atsumi Y, Minakawa Y, Ono M, et al. ATM and SIRT6/SNF2H Mediate Transient H2AX Stabilization When DSBs Form by Blocking HUWE1 to Allow Efficient gammaH2AX Foci Formation. *Cell reports*. 査読有 2015; 13: 2728-40. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.054

(5) Nanya M, Sato M, Tanimoto K, Tozuka M, Mizutani S, Takagi M. Dysregulation of the DNA Damage Response and KMT2A Rearrangement in Fetal Liver Hematopoietic Cells. *PLoS one*. 査読有 2015; 10: e0144540. doi: 10.1371/journal.pone.0144540

〔学会発表〕(計 5件)

(1) Takagi M, Mizutani S, ATM-dependent DNA damage-response pathway as a determinant in Chronic Myelogenous Leukemia. ATW2013, Jul.28-31, 2013 Birmingham, UK.

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

高木 正稔 (TAKAGI, Masatoshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・講師

研究者番号：10406267

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：