

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830085

研究課題名(和文) インターフェロン調節因子IRF5による成人T細胞白血病・リンパ腫細胞の運命制御

研究課題名(英文) Constitutive expression of interferon regulatory factor, IRF5 in HTLV-1-infected T cells.

研究代表者

石川 千恵 (Ishikawa, Chie)

琉球大学・亜熱帯島嶼科学超域研究推進機構・助教

研究者番号：90542358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ATLL腫瘍細胞やHTLV-1感染T細胞株の核内にIRF5の恒常的な発現を認め、感染やウイルス病原因子TaxによってIRF5の発現が誘導された。感染T細胞株やTaxを発現誘導したT細胞株では、選択的スプライシングによるV1/V4とV3のmRNA発現を認め、TaxはV3プロモーターの転写を活性化した。網羅的解析の結果、IRF5によりT細胞株では、IFNではなくTNFファミリーの遺伝子発現が誘導されていた。特にTNF- α の発現には感染やTax並びにIRF5発現との相関が認められ、その発現はTaxにより誘導された。以上より、ATLL発症におけるTax/IRF5/TNF- α の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the mechanisms underlying the expression and regulation of IRF5 in HTLV-1-infected T-cells. IRF5 was constitutively transcribed into three distinct alternatively spliced isoforms (V1, V3 and V4) in HTLV-1-infected T-cell lines but not in uninfected T-cell lines. IRF5 protein was located in the nuclei of HTLV-1-infected T-cell lines and ATLL cells present in lymph nodes and skin lesions. IRF5 mRNA expression was induced following infection of T cells with HTLV-1, and specifically by viral oncoprotein Tax. Tax also activated IRF5-V3 promoter. Microarray analysis of IRF5-expressing uninfected T cells demonstrated that IRF5 induced the expression of TNF family cytokines but not the expression of IFN. Especially, TNF- α expression was correlated with infection of HTLV-1, and expression of Tax and IRF5 in T-cell lines. Tax also induced TNF- α expression. The results suggest that IRF5 is a Tax-regulated gene, and its expression may be associated with the pathogenesis of ATLL.

研究分野：ウイルス発がん

キーワード：成人T細胞白血病・リンパ腫(ATLL) HTLV-1 インターフェロン(IFN)調節因子(IRF)5 Tax TNF-

1. 研究開始当初の背景

成人T細胞白血病・リンパ腫 (ATLL) はレトロウイルスである、ヒトT細胞白血病ウイルス1型 (HTLV-1) 感染を原因とする最も難治性の白血病・リンパ腫である。HTLV-1の主要な感染細胞は、CD4陽性のT細胞であり、乳児期に母乳を介して感染する。感染T細胞は40年以上の潜伏期間を経て、白血病・リンパ腫細胞となりATLL発症に至る。ATLL発症機序についてはいまだ不明な点も多く、治療法確立のためにもその機序の解明は重要である。

ウイルス感染により抗ウイルス活性を有すサイトカインであるインターフェロン (IFN) が産生誘導される。IFN産生誘導には、IFN調節因子 (IRF) が重要である。ところで、IRFはIFN産生誘導以外にガン抑制分子もしくはガン促進分子としての役割も報告されている。IRF4に関してはATLL発症との関連が報告されているが、IRF5に関する研究は殆ど知られていなかった。

2. 研究の目的

申請者はこれまでウイルスタンパク質 Tax の働きを中心に ATLL 発症における NF- κ B や AP-1 などの細胞生存シグナルの研究を行ってきた。本研究では ATLL 腫瘍細胞や HTLV-1 感染 T 細胞における IRF5 の発現やその制御機構並びに機能を解析し、ATLL 発症・進展における IRF5 の関与を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HTLV-1 感染・非感染 T 細胞株における IRF5 の発現を RT-PCR 法及びウエスタンブロット法を用いて検討した。IRF5 の各 transcriptional variants の発現を特異的プライマーを用いた RT-PCR 法で検討した。また、細胞内における IRF5 の局在を共焦点レーザー顕微鏡及び細胞分画法で検討した。臨床検体 (リンパ節及び皮膚) における IRF5 の発現を免疫組織化学染色で検討した。

(2) HTLV-1 感染及び Tax による IRF5 の発現誘導を RT-PCR 法及びウエスタンブロット法で検討した。健康人末梢血単核球及び胸腺由来 T 細胞株 TY8-3 をマイトマイシン C で前処理した HTLV-1 感染 T 細胞株 MT-2 と共培養することで HTLV-1 を感染させた。また、カドミウム添加により Tax 発現が誘導される非感染 T 細胞株 Jurkat 由来 JPX-9 細胞株を用いて IRF5 発現を検討した。Jurkat 細胞株に Tax 発現プラスミド及び IRF5 プロモーターを含むルシフェラーゼ発現プラスミドを導入し、

レポーター解析を行った。

(3) Jurkat 細胞株に IRF5 発現プラスミドを導入し、マイクロアレイ解析や細胞増殖能の検討を行った。また、解析の結果、IRF5 によって誘導された遺伝子について、RT-PCR 法による発現確認と種々の T 細胞株における HTLV-1 感染、Tax 発現及び IRF5 発現との関連を検討した。

(4) HTLV-1 感染 T 細胞株である HUT-102 及び MT-1 において siRNA を用いて IRF5 発現を抑制し、IRF5 の細胞増殖能への影響を検討した。

(5) IFN と IRF5 の発現関連性を検討するため、T 細胞株における I 型及び II 型 IFN の発現を RT-PCR 法で検討した。また、Jurkat 細胞株に IFN- α を作用させ、IRF5 を含む IFN 応答遺伝子の発現誘導を RT-PCR 法で検討した。

4. 研究成果

(1) HTLV-1 感染 T 細胞株において、mRNA 及びタンパク質レベルで IRF5 の恒常的発現を認めた。一方で非感染 T 細胞株では発現を認めなかった。共焦点レーザー顕微鏡及び細胞分画のタンパク質抽出後のウエスタンブロット法による検討の結果、IRF5 は主に核に局在していた。IRF5 の各 transcriptional variants の発現を検討したところ V1/4 はすべての感染 T 細胞株に発現が認められ、V2 はいずれの T 細胞株にも発現を認めなかった。V3 は感染 T 細胞 8 株のうち 5 株で発現を認め、Tax 発現との関連が示唆された。皮膚及びリンパ節に浸潤した ATLL 細胞においても免疫組織化学染色で核に IRF5 発現を認めた。

(2) HTLV-1 感染やウイルス遺伝子発現による IRF5 発現誘導を検討した。試験管内 HTLV-1 感染モデルでは感染による T 細胞での IRF5 の発現誘導が確認された。JPX-9 細胞を用いた検討ではウイルス遺伝子 Tax により、IRF5 の発現が mRNA 及びタンパク質レベルで誘導された。Tax により誘導される IRF5 mRNA は V1/4 及び V3 であった。V3 のプロモーター領域を含むルシフェラーゼ発現ベクターを用いたレポーターアッセイでは、Tax 用量依存性の IRF5 プロモーターの転写活性の増強が確認できた。

(3) マイクロアレイ解析の結果では IRF5 による TNF- α (7.24 倍) や lymphotoxin (LT)- β (5.84 倍) といった TNF ファミリー遺伝子の発現誘導が確認された。一方、IFN の発現誘導はみられなかった。TNF- α と LT- β の IRF5 による発現誘導を RT-PCR 法でも確認した。TNF- α 発現について、HTLV-1 感染や Tax、IRF5 発現との関連を種々の T 細胞株で検討し

たところ、HTLV-1 感染や Tax 及び IRF5 発現との相関が認められた。さらに、JPX-9 細胞株による解析の結果、Tax により TNF- α の発現誘導が認められた。このように、TNF ファミリーの発現には Tax と IRF5 が協調的に関与している可能性が示唆された。

(4) HTLV-1 感染 T 細胞株において、IRF5 発現抑制による細胞増殖能への影響はみられなかった。また、Jurkat 細胞株に IRF5 を過剰発現させても細胞増殖能は影響を受けなかった。したがって、IRF-5 は直接に細胞増殖には作用しないと考えられたが、今回は一過性の IRF5 の発現抑制系や過剰発現系を用いた解析であることから、今後は恒常的な IRF5 発現の抑制系や過剰発現系を用いて、IRF5 の細胞増殖への影響を検討したい。

(5) IFN- α / β / γ は種々の T 細胞株において発現を認めたものの、HTLV-1 感染や Tax、IRF5 発現との関連性はなかった。また、Jurkat 細胞株に IFN- α を作用させると、IFN 応答遺伝子である MxA や 2-5 AS の発現誘導はみられたが、IRF5 発現は誘導されなかった。すなわち、HTLV-1 感染 T 細胞における IRF5 発現には IFN の関与はなく、IFN の発現にも IRF5 の関与はみられなかった。

これらの結果から、TNF ファミリー遺伝子の誘導等を介して、ATLL 発症に IRF5 が関わっていることが示され、HTLV-1 感染による疾患発症機構の解明につながることを期待された。本研究成果は国際的学術誌へ掲載された。

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 8 件)

① Chie Ishikawa, Masachika Senba, Naoki Mori. Efficiency of AU922 in mice with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncology Letters*. 印刷中. 査読有.

② Chie Ishikawa, Masachika Senba, Betsy J. Barnes, Naoki Mori. Constitutive expression of IRF-5 in HTLV-1-infected T cells. *International Journal of Oncology*, 2015; 47: 361-369. 査読有. doi: 10.3892/ijo.2015.3020.

③ Naoki Mori, Chie Ishikawa, Masachika Senba. Activation of PKC- δ in HTLV-1-infected T cells. *International Journal of Oncology*, 2015; 46: 1609-1618. 査読有. doi: 10.3892/ijo.2015.2848.

④ Chie Ishikawa, Junichi Tanaka, Harutaka Katano, Masachika Senba, Naoki Mori. Hippuristanol reduces the viability of primary effusion lymphoma cells both *in vitro* and *in vivo*. *Marine Drugs*, 2013; 11: 3410-3424. 査読有. doi: 10.3390/md11093410.

⑤ Naoki Mori N, Chie Ishikawa, Jun-Nosuke Uchihara, Takeshi Yasumoto. Protein phosphatase 2A as a potential target for treatment of adult T-cell leukemia. *Current Cancer Drug Targets*, 2013; 13: 829-842. 査読有. doi: 10.2174/156800961131300093

⑥ Takayoshi Rokkaku, Ryuichiro Kimura, Chie Ishikawa, Takeshi Yasumoto, Masachika Senba, Fuminori Kanaya, Naoki Mori. Anticancer effects of marine carotenoids, fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, on osteosarcoma. *International Journal of Oncology*, 2013; 43: 1176-1186. 査読有. doi: 10.3892/ijo.2013.2019.

⑦ Chie Ishikawa, Naoki Mori. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces CD69 expression through activation of nuclear factor- κ B. *International Journal of Oncology*, 2013; 42: 1786-1792. 査読有. doi: 10.3892/ijo.2013.1871.

⑧ Chie Ishikawa, Hirochika Kawakami, Jun-Nosuke Uchihara, Masachika Senba, Naoki Mori. CD69 overexpression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax transactivation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 2013; 1833: 1542-1552. 査読有. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.03.006.

[学会発表] (計 10 件)

① 石川千恵, 森直樹. フラボノイド類化合物ブテインの抗成人 T 細胞白血病効果. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10 日~12 日. パシフィコ横浜 (横浜市).

② 森直樹, 石川千恵. EB ウイルス LMP-1 タンパク質による NF- κ B 制御因子 I κ B- ζ の発現誘導. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10 日~12 日. パシフィコ横浜 (横浜市).

③ Naoki Mori, Chie Ishikawa. PKC- δ activation in HTLV-1-infected T cells. 第 76 回日本血液学会学術集会. 平成 26 年 10 月 31 日~11 月

2 日. 大阪国際会議場 (大阪市) .

④ Chie Ishikawa, Naoki Mori. Anti-adult T-cell leukemia effects of natural flavonoid, butein. 第 73 回日本癌学会学術総会. 平成 26 年 9 月 25 日～27 日. パシフィコ横浜 (横浜市) .

⑤ Naoki Mori, Chie Ishikawa. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1- and CD30-induced I κ B- ζ . 第 73 回日本癌学会学術総会. 平成 26 年 9 月 25 日～27 日. パシフィコ横浜 (横浜市) .

⑥ 森直樹, 石川千恵. フラボノイド類化合物ブテインの抗成人 T 細胞白血病効果. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 平成 26 年 8 月 22 日～24 日. 東京大学医科学研究所講堂 (東京都港区) .

⑦ 石川千恵, 森直樹. HTLV-1 感染 T 細胞株における恒常的 IRF5 発現. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 25 年 11 月 10 日～12 日. 神戸国際会議場 (神戸市) .

⑧ Naoki Mori, Chie Ishikawa. Protein phosphatase 2A as a potential target for treatment of adult T cell leukemia. 第 75 回日本血液学会学術集会. 平成 25 年 10 月 11 日～13 日. ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館 (札幌市) .

⑨ Chie Ishikawa, Naoki Mori. Constitutive expression of IRF-5 in HTLV-1-infected T-cell lines. 第 72 回日本癌学会学術総会. 平成 25 年 10 月 3 日～5 日. パシフィコ横浜 (横浜市) .

⑩ 森直樹, 石川千恵. PP2A は ATL の治療標的分子か? 第 6 回 HTLV-1 研究会. 平成 25 年 8 月 23 日～25 日. 東京大学医科学研究所講堂 (東京都港区) .

[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 :
出願年月日 :
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

石川 千恵 (ISHIKAWA, Chie)
琉球大学・亜熱帯島嶼科学超域研究推進
機構・助教

研究者番号 : 9 0 5 4 2 3 5 8

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :