

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461417

研究課題名(和文) 活性酸素制御異常による成人T細胞白血病発症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenic mechanism of adult T-cell leukemia induced by abnormal ROS regulation

研究代表者

高橋 雅彦 (Takahashi, Masahiko)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80377192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病(ATL)はヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)の感染に起因する極めて予後不良の白血病であり、治療薬の開発は急務である。亜ヒ酸あるいはプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブはHTLV-1感染T細胞に細胞死を誘導することから、ATLに対する抗腫瘍効果が期待できる。本研究では、ubiquitin-specific protease 10 (USP10)がHTLV-1感染T細胞に亜ヒ酸あるいはボルテゾミブ抵抗性を付与することを見出した。この結果を踏まえ、現在USP10が関与する細胞防御機構の同定を試みている。

研究成果の概要(英文)：Adult T-cell leukemia (ATL) is an aggressive hematologic malignancy of poor prognosis caused by human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1), and it is imperative to develop therapeutic drugs for chemotherapy against ATL. As arsenite or proteasome inhibitor bortezomib induce cell death in HTLV-1-infected T-cells, antitumor effect on ATL can be expected by using these drugs. In this study, we identified that ubiquitin-specific protease 10 (USP10) confers drug resistance phenotype to HTLV-1-infected T-cells. Based on this result, we are currently attempting to identify cellular defense mechanism against drug treatment that USP10 is involved.

研究分野：ストレス応答、ウイルス学

キーワード：ATL HTLV-1 USP10

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (ATL) は CD4 陽性 T 細胞の白血病・リンパ腫であり、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の感染に起因する。日本の HTLV-1 感染者数はおよそ 110 万人と推定され、約 5% の感染者が ATL を発症する。ATL は合併症の併発や抗がん剤耐性の獲得による再発率の高さなどから、現在のところ極めて予後不良である。従って、予後の改善に貢献できる治療薬の開発は急務である。

亜ヒ酸あるいはプロテアゾーム阻害剤ボルテゾミブは HTLV-1 感染 T 細胞にそれぞれ単独でアポトーシスを誘導する。これらを踏まえて、ATL に対する亜ヒ酸あるいはボルテゾミブの臨床治験が開始された。従って、亜ヒ酸あるいはボルテゾミブ感受性を決定する制御機構を同定できれば、より効果的な治療薬開発の一助になる。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、HTLV-1 の癌蛋白 Tax に結合する新規因子として Ubiquitin-specific protease 10 (USP10) を同定し、USP10 ノックアウトマウス由来線維芽細胞を用いた解析により以下の結果を得た。

- (1) ストレス顆粒は、亜ヒ酸処理後に細胞にストレス耐性を付与する RNA/タンパク凝集体である。USP10 はストレス顆粒マーカーである G3BP1 と結合してストレス顆粒に局在した。
- (2) ストレス顆粒の形成は、亜ヒ酸による活性酸素の産生を阻害した。
- (3) USP10 は亜ヒ酸による活性酸素の産生を抑制し、活性酸素依存的な細胞死を抑制した。

これらの結果は、USP10 がストレス顆粒の形成を介して細胞の亜ヒ酸感受性を低下させる抗ストレス因子であることを示している。そこで本研究では、USP10 が HTLV-1 感染 T 細胞においても亜ヒ酸感受性を低下させるのか調べた。同様に細胞にストレス顆粒の形成を誘導するボルテゾミブについても、HTLV-1 感染 T 細胞に対する感受性を調べた。

3. 研究の方法

- (1) USP10 ノックダウン細胞の樹立：USP10 に対する shRNA (*USP10-1*, *USP10-3*) およびコントロール shRNA (*NT*) を発現するレンチウイルスを 293T 細胞において産生させた。ウイルスを濃縮後、標的細胞 (Jurkat, MT-4 および MT-1) に感染させ、薬剤選択により USP10 ノックダウン細胞のみを増殖させた。
- (2) ストレス顆粒の検出：細胞を亜ヒ酸処理後に固定し、USP10 および G3BP1 を免疫蛍光染色により検出した。ストレス顆粒は蛍光顕微鏡下において検出・定量した。
- (3) 細胞死の検出：細胞を亜ヒ酸処理後に固定し、Propidium Iodide により細胞死を

引き起こした細胞を染色した。FACS Calibur により検出・定量した。

4. 研究成果

- (1) はじめに、HTLV-1 感染細胞株の亜ヒ酸感受性を調べた。HTLV-1 感染 T 細胞株 (SLB-1 および MT-4) では亜ヒ酸による細胞死の誘導が非感染 T 細胞株 (Jurkat および MOLT-4) よりも亢進した。さらに、非感染細胞株では亜ヒ酸処理によって多くのストレス顆粒の形成が認められたが、HTLV-1 感染 T 細胞株ではストレス顆粒形成能が低下していた。つまり、HTLV-1 感染 T 細胞株ではストレス顆粒形成能の低下とともに細胞死の亢進が認められた (図 1A)。また、HTLV-1 感染 T 細胞株に誘導される細胞死は抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) の添加により強く阻害されることから (図 1B) 活性酸素の蓄積が HTLV-1 感染 T 細胞の亜ヒ酸感受性の亢進に関与することが確かめられた。

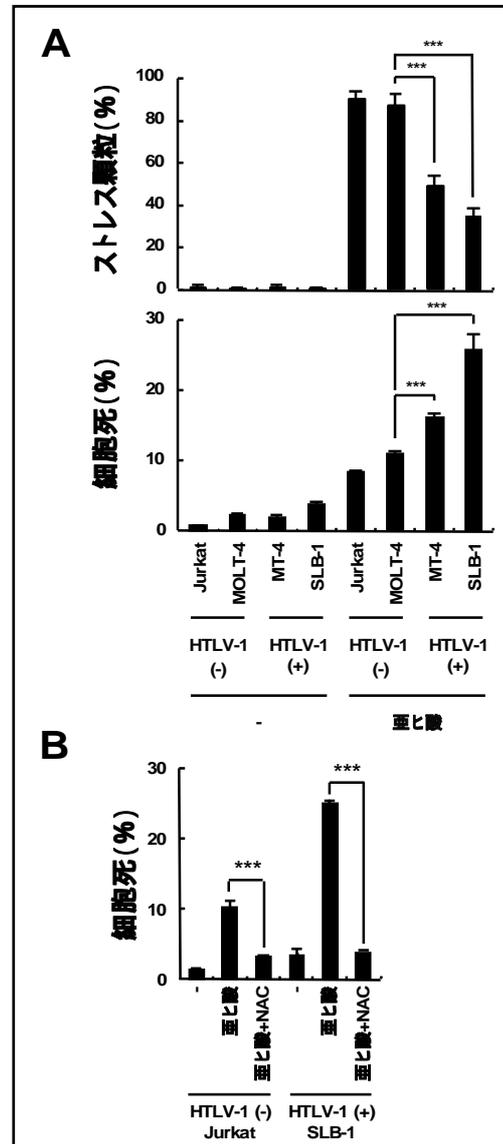


図 1 HTLV-1 感染 T 細胞における亜ヒ酸感受性の亢進：

- A) HTLV-1 非感染 T 細胞株 (Jurkat および MOLT-4) および HTLV-1 感染 T 細胞株 (MT-4 および SLB-1) を亜ヒ酸処理下において培養後、ストレス顆粒陽性細胞および死細胞を検出した。
- B) Jurkat または SLB-1 を亜ヒ酸のみ、または亜ヒ酸および N-アセチルシステイン (NAC) 処理下において培養後、死細胞を検出した。Student's t-test; ***P < 0.001.

(2) 次に、HTLV-1 感染 T 細胞における亜ヒ酸感受性に USP10 が関与するのかを調べた。(1) で用いた HTLV-1 感染 T 細胞株のうち、比較的亜ヒ酸感受性の低い MT-4 から USP10 ノックダウン細胞を樹立した (図 2A)。USP10 ノックダウン MT-4 細胞では、コントロール細胞よりも亜ヒ酸処理による細胞死の誘導が亢進するとともに (図 2B)、ストレス顆粒形成能が低下した (図 2C)。よって、USP10 は HTLV-1 感染 T 細胞に亜ヒ酸抵抗性を付与することが確かめられた。

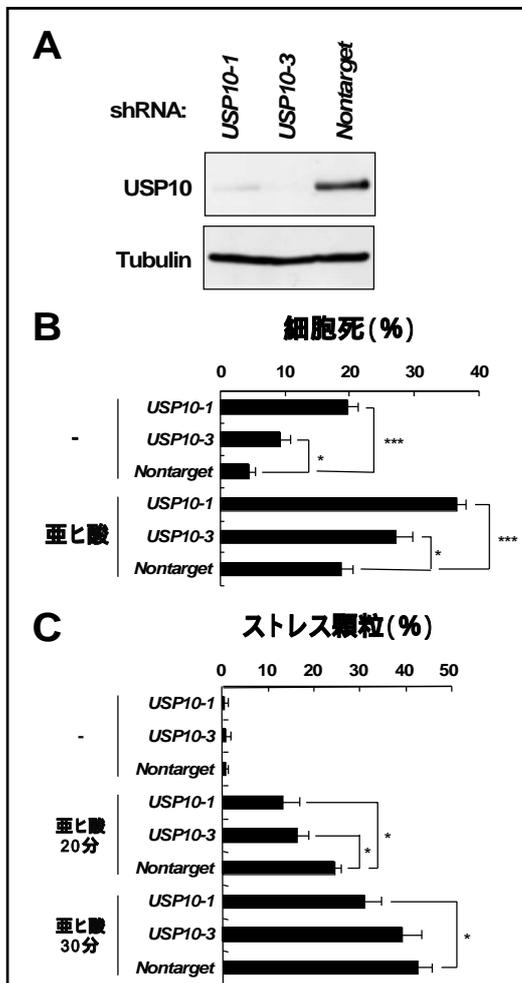


図 2 USP10 は HTLV-1 感染 T 細胞に亜ヒ酸抵抗性を付与する :

- A) HTLV-1 感染 T 細胞株 MT-4 から USP10 ノックダウン細胞 (USP10-1, USP10-3) およびコントロール細胞 (Nontarget) を樹立した。

- B) USP10 ノックダウン細胞およびコントロール細胞を亜ヒ酸処理下において培養後、死細胞を検出した。
- C) USP10 ノックダウン細胞およびコントロール細胞を亜ヒ酸処理下において培養後、ストレス顆粒陽性細胞を検出した。Student's t-test; *P < 0.05, ***P < 0.001.

(3) さらに、HTLV-1 感染 T 細胞株のボルテゾミブ感受性に USP10 が関与するのかを調べた。非感染 T 細胞株 Jurkat および HTLV-1 感染 T 細胞株 MT-1 から USP10 ノックダウン細胞を樹立した (図 3A)。作製した USP10 ノックダウン細胞では、コントロール細胞よりもボルテゾミブ感受性が亢進した (図 3B)。よって、USP10 が HTLV-1 感染 T 細胞にボルテゾミブ抵抗性を付与することが確かめられた。

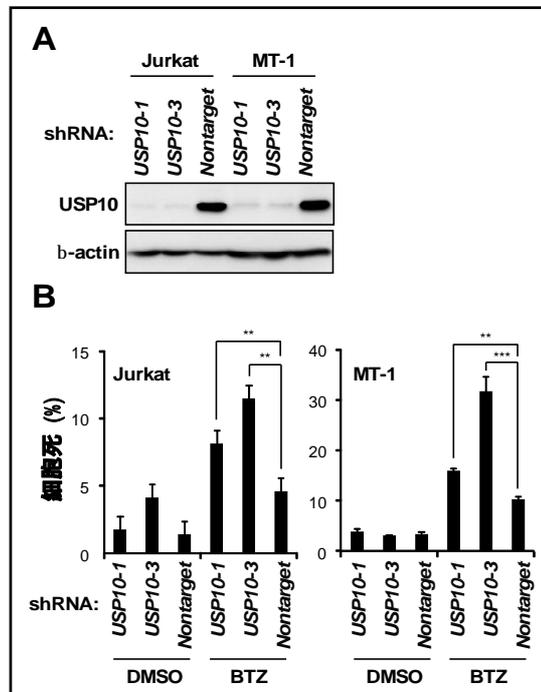


図 3 USP10 は HTLV-1 感染 T 細胞にボルテゾミブ抵抗性を付与する :

- A) Jurkat と MT-1 はそれぞれ非感染 T 細胞株と HTLV-1 感染 T 細胞である。これらの細胞から USP10 ノックダウン細胞 (USP10-1, USP10-3) およびコントロール細胞 (Nontarget) を樹立した。
- B) USP10 ノックダウン細胞およびコントロール細胞をボルテゾミブ (Bortezomib; BTZ) 処理下において培養後、死細胞を検出した。Student's t-test; **P < 0.01, ***P < 0.001.

(4) 以上の結果より、USP10 が HTLV-1 感染 T 細胞に亜ヒ酸ならびにボルテゾミブ抵抗性を付与することが示された。現在 USP10 が関与する細胞防御機構の同定を試みており、USP10 を標的とした治療法開発の一助になると期待する。

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5件)

- (1) Higuchi M, Kawamura H, Matsuki H, Hara T, Takahashi M, Saito S, Saito K, Jiang S, Naito M, Kiyonari H, Fujii M; USP10 Is an Essential Deubiquitinase for Hematopoiesis and Inhibits Apoptosis of Long-Term Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 7(6), 1116-1129, 2016. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.11.003. 査読有
- (2) Motai Y, Takahashi M, Takachi T, Higuchi M, Hara T, Mizuguchi M, Aoyagi Y, Terai S, Tanaka Y, Fujii M; Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax1 oncoprotein but not HTLV-2 Tax2 induces the expression of OX40 ligand by interacting with p52/p100 and RelB. *Virus Genes*, 52(1), 4-13, 2016. doi: 10.1007/s11262-015-1277-7. 査読有
- (3) Saito S, Kawamura T, Higuchi M, Kobayashi T, Yoshita-Takahashi M, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Kanda Y, Kawamura H, Jiang S, Naito M, Yoshizaki T, Takahashi M, Fujii M; RASAL3, a novel hematopoietic RasGAP protein, regulates the number and functions of NKT cells. *Eur. J. Immunol.*, 45(5):1512-1523, 2015. doi: 10.1002/eji.201444977. 査読有
- (4) Takachi T, Takahashi M, Takahashi-Yoshita M, Higuchi M, Obata M, Mishima Y, Okuda S, Tanaka Y, Matsuoka M, Saitoh A, Green PL, Fujii M; Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein represses the expression of the BCL11B tumor suppressor in T-cells. *Cancer Sci.*, 106(4):461-465, 2015. doi: 10.1111/cas.12618. 査読有
- (5) Higuchi M, Takahashi M, Tanaka Y, Fujii M. Downregulation of proapoptotic Bim augments IL-2-independent T-cell transformation by human T-cell leukemia virus type-1 Tax. *Cancer Med.*, 3(6):1605-1614, 2014. doi: 10.1002/cam4.329. 査読有

〔学会発表〕(計0件)

〔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://www.med.niigata-u.ac.jp/vir/welcome.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 雅彦 (TAKAHASHI, Masahiko)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：80377192

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし