

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 18 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830087

研究課題名(和文) 樹立細胞株パネルを用いたATL多段階発がん原因遺伝子のスクリーニング

研究課題名(英文) Identification of a responsible gene for multi step leukemogenesis of ATL by using the panel of ATL-derived cell lines.

研究代表者

井根 省二 (INE, SHOJI)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：80573683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病の発症過程に關する因子を同定するため、ATL患者由来の樹立細胞株から、免疫不全NOGマウスにおいて高い造腫瘍性を示す細胞集団を分画した。この細胞ではAKTシグナル及びNFkBシグナルの亢進が認められ造腫瘍性に關与していることが示唆された。NFkBシグナル亢進に關する因子のスクリーニングのため、レポーター細胞を用いたfunctional screening をい、RIPK2、IRAK1、TNFR1Aなど既知の遺伝子以外に、これまでNFkBシグナルとの關連が明らかではなかった遺伝子を複数同定した。

研究成果の概要(英文)：To identify critical factors for the onset of adult T cell leukemia (ATL), we fractionated the cell population showing high tumor-initiating ability in immune deficient NOG mice from ATL-derived cell lines. These cells also showed the up regulation of AKT and NF-kB signaling, which suggests the possible role of these signal transduction pathways in tumorigenicity of ATL cells. To reveal the responsible genes for up regulation of NF-kB signaling, we conducted functional screening using the NF-kB-reporter cell and could identify unreported genes which can modulate NF-kB signaling.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：成人T細胞白血病 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ATLの発症はレトロウイルスHTLV-1の感染に起因するが、感染から発症までは、ウイルス由来タンパク(Tax、HBZ等)による各種シグナル伝達系の活性化と、それに続く、不死化、悪性形質転換、というプロセスが、複数の genetic あるいは epigenetic な変異により進行すると考えられている。しかし発症の分子機序には未だ不明の点が多く、ATLの根治療法の開発が進まない一つの原因となっている(Front. Microbiol. 2012)。

申請者が共同研究を行ってきた研究協力者の菅村(宮城県立がんセンター研究所特任部長、東北大学 名誉教授)はHTLV-1発見当初よりATL関連細胞株を多数樹立してきた。樹立細胞には増殖にIL-2を必要とする株と必要としない株が存在する。また、NOGマウスを宿主とした場合の造腫瘍能も細胞株により異なる。このような細胞株間でのIL-2要求性や造腫瘍能の差異は、各細胞がATL発症プロセスの各ステップを、機能的に反映しているという可能性を示している。

さらに、サイトカイン依存性と造腫瘍能に関して、次の予備の結果を得ていた。

サイトカイン受容体下流のシグナル分子JAK3を、IL-3依存性のマウス proB 細胞株 Ba/F3 で発現させたところ、IL-3依存性が消失した。一方IL-2依存性ヒトATL細胞、ILT-Mat で発現させたところ、IL-2依存性は消失しなかったが、必要量が低減した。

ヒトATL由来細胞ST-1でAktシグナル阻害因子の発現を抑制したところ、造腫瘍能が上昇した。

これらの結果から、造腫瘍能が高い、あるいはIL-2非依存性のATL細胞株からcDNAライブラリーを作製し、これを造腫瘍能が低い、あるいはIL-2依存性のATL細胞株に導入し、形質の変化を指標とした機能スクリーニングを行うことでATL発症プロセスに関わる遺伝子を同定できると着想するに至った。

2. 研究の目的

ATL細胞の特徴である「IL-2非依存性増殖能」と「造腫瘍能」を規定する遺伝子を同定するため、in vitro 及び in vivo での機能性スクリーニング系を開発する。

同様に造腫瘍能を規定する遺伝子を同

定するため、高/低造腫瘍能それぞれの細胞株の発現プロファイルを作製し、発現に差がある遺伝子を同定する。また、それぞれの細胞株で、代表的なシグナル伝達系(NFkB、AKT)の活性化状態が異なるか、検討する。

3. 研究の方法

レトロウイルスベクター(pMXs、東大医科研、北村先生より供与を受けた)を用いた、cDNAライブラリーを作成し、これを細胞に導入し、「IL-2依存性」の解消、「NOG皮下での造腫瘍性」の獲得等を指標としたスクリーニングを行う。

4. 研究成果

「IL-2非依存性増殖能」および「NOG皮下での造腫瘍性」を示す2つのATL由来細胞株、TL-0m1とED40515(-)よりRNAを調製し、Clontech社のSmart cDNA合成システムを用いて、より完全長に近いcDNAを合成した。これをレトロウイルスベクターpMXsに挿入し、cDNA発現ライブラリーを得た。パッケージング細胞Plat-Aを用いてライブラリーウイルス粒子を調製し、これを「増殖がIL-2依存性」で「NOG皮下での造腫瘍性を持たない」、ILT-MatあるいはTCL-Kan細胞に感染させた。IL-2を含まない培地での培養あるいはNOG皮下への移植を行ったが、いずれでも細胞の増殖は確認できなかった。

ATLを含め白血病発症に関与していることが知られている遺伝子(Tax、HBZ、野生型/変異型JAK3、Ras、MSI2、hTERT、Notch ICN、変異型AKT)を単独あるいは組み合わせてILT-Mat、TCL-Kan細胞に導入し上記同様にスクリーニングを行ったが「IL-2非依存性増殖能」あるいは「NOG皮下での造腫瘍性」を示す細胞は得られなかった。

上記、よりcDNAの過剰発現による細胞の悪性形質転換は困難と判断し、random integrationによる遺伝子破壊を用いたスクリーニングを実施した。EGFPを発現するレトロウイルスベクターを同様にILT-Mat、TCL-Kan細胞に導入しスクリーニングを行ったが、「IL-2非依存性増殖能」あるいは「NOG皮下での造腫瘍性」を示す細胞は得られなかつ

た。

申請者の所属する研究室で分画された高造腫瘍性白血病細胞の解析から NFκB シグナル伝達系の異常亢進が高造腫瘍性に関与していることが示唆された。そこで、NFκB シグナル亢進に関与する遺伝子を同定するため、レポーター細胞 (Rat-1 B-β-EGF、Higuchi et al *Retrovirology*, 2005) を用いた functional screening を進めた。各種培養細胞より調製した cDNA ライブラリーをレポーター細胞に導入し、マーカーの発現 (blasticidin 耐性、EGFP) を指標にスクリーニングを行った。RIPK2、IRAK1、TNFR1A など既知の遺伝子以外に、これまで NFκB シグナルとの関連が明らかではなかった遺伝子 6 種が同定された。現在これら遺伝子のシグナル調節機構の解析を進めている。

上記高造腫瘍性細胞で発現変動を示す遺伝子をマイクロアレイにより検討したところ、発現上昇を示す遺伝子として、MLLT11、NPTX2、MITF、JMJD4 など、発現低下を示す遺伝子として、NKD2 などが同定された。このうち Wnt シグナルの抑制因子である NKD 2 に関して発現ベクターあるいは発現抑制のための sh ベクターを作成し、細胞に導入した。導入細胞では Wnt シグナルに加えて AKT シグナルの変動が観察され、両シグナル伝達系のクロストークの存在が示唆された。詳しい分子機構に関して現在解析を行っている。

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2件)

1) Yamaguchi K, Takanashi T, Nasu K, Tamai K, Mochizuki M, Satoh I, Ine S, Sasaki O, Satoh K, Tanaka N, Harigae H, Sugamura K.

Xenotransplantation elicits salient tumorigenicity of adult T-cell leukemia-derived cells via aberrant AKT activation.

Cancer Sci. 2016 Feb 29. doi: 10.1111/cas.12921.

2) Yamaki S, Ine S, Kawabe T, Okuyama Y, Suzuki N, Soroosh P, Mousavi SF, Nagashima H, Sun SL, So T, Sasaki T, Harigae H, Sugamura K, Kudo H, Wada M, Nio M, Ishii N.

OX40 and IL-7 play synergistic roles in the homeostatic proliferation of effector memory CD4⁺ T cells.

Eur J Immunol. 2014 Oct;44(10):3015-25. doi: 10.1002/eji.201444701.

[学会発表](計3件)

1) 勝岡優奈、横山寿行、猪股美津恵、井根省二、伊藤俊広、目黒邦昭：同種造血幹細胞移植後、自己造血回復を認めた症例。第38回日本造血細胞移植学会総会、名古屋、2016.03

2) 那須健太郎、山口壹範、玉井恵一、井根省二、佐々木治、佐藤賢一、田中伸幸、張替秀郎、菅村和夫：高造腫瘍能 ATL 細胞における炭酸脱水酵素 IX (CA9) 発現亢進の意義。第74回日本癌学会学術総会、名古屋、2015.10

3) 山口壹範、那須健太郎、玉井恵一、佐藤賢一、井根省二、佐々木治、張替秀郎、田中伸幸、菅村和夫：免疫不全 NOG マウスを用いた高造腫瘍性 ATL 細胞の単離。第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014.9

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.miyagi-pho.jp/mcc/kenkyu/hatugan-seigyoo.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井根 省二 (SHOJI INE)

地方独立行政法人宮城県立がんセンター(研究所) 発がん制御研究部
特任研究員

研究者番号：80573683

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし