

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22117004

研究課題名（和文）持続的NF-kappaB活性化メカニズムの解明と疾患

研究課題名（英文）Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation and related diseases

研究代表者

山岡 昇司（Shoji, Yamaoka）

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） 102,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、悪性腫瘍や炎症性疾患に深く関わる転写因子NF-kappaBの活性が代表的翻訳後修飾であるユビキチン化とリン酸化によって制御される事実にもとづき、成人T細胞白血病や卵巣癌などの悪性腫瘍細胞においてリン酸化酵素NIKの過剰発現が恒常的なNF-kappaBの活性化をもたらすこと、NF-kappaBの標的遺伝子であるユビキチン修飾酵素A20が腫瘍細胞の生存と増殖に不可欠な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Based on the fact that ubiquitination and phosphorylation, two well-known post-translational modifications, regulate the transcription factor NF-kappaB which is deeply involved in the development of neoplastic and/or inflammatory diseases, we have demonstrated that overexpression of NF-kappaB inducing kinase causes constitutive NF-kappaB activation in adult T-cell leukemia and ovarian cancer cells and that one of the NF-kappaB targets A20, a ubiquitin-editing enzyme, plays an essential role in the survival and proliferation of those cancer cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：翻訳後修飾 癌 NF-kappaB 分化

1. 研究開始当初の背景

NF-kappaB は器官形成、炎症、免疫、腫瘍などの基本的生命現象、疾患病理に深く関与する転写因子であり、その重要性ゆえに生体内では刺激誘導性あるいは持続的な転写活性が厳密に制御されている。その破綻は免疫不全あるいは自己免疫性疾患、動脈硬化症、骨形成異常、悪性腫瘍など重篤な疾患の原因となる。サイトカインによる NF-kappaB 活性化が多くの場合一過性であるのに対して、慢性炎症、悪性腫瘍では持続的な NF-kappaB の活性化が見られ、病態進行、悪性形質の発現・維持等に重要な役割を果たしている。これまで刺激誘導型一過性 NF-kappaB 活性化の分子機構については詳細な解析がなされてきたが、さまざまな生命現象に伴う持続的 NF-kappaB 活性化についての理解と対策が不足しており、そのメカニズムと機能的意義を理解するためにはシグナル伝達を担うリン酸化あるいはユビキチン化制御酵素やそれらの基質と相互作用する分子全体を対象として解析する必要があった。NF-kappaB シグナル伝達経路として、シグナル分子 NEMO に依存する定型的経路と NIK に依存する非定型的経路の2つの主要な経路が報告されている。これまでの研究で非定型的活性化経路は定型的経路と連動して活性化すると考えられるが、持続的活性化における両者の関係は腫瘍細胞では発現する修飾分子によって異なると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、悪性腫瘍をはじめとする難治性疾患における持続的 NF-kappaB 活性化の分子機構とその機能的意義を解明することによって、関連疾患の診断および治療法開発に貢献することにある。本研究では持続的 NF-kappaB 活性化の分子メカニズムとその意義に焦点を絞り、

- (1) 非ウイルス性悪性腫瘍における NF-kappaB 活性化制御の破綻原因
- (2) マクロファージ等の炎症性細胞における持続的 NF-kappaB 活性化
- (3) 持続的 NF-kappaB 活性化と A20 発現の機能的意義

について、NIK、A20 の発現状況と関連分子の翻訳後修飾状態とシグナルの関係を解明し、遺伝子改変疾患モデルマウスの樹立と新規制御システムの開発することをめざした。

3. 研究の方法

(1) 非ウイルス性悪性腫瘍における NF-kappaB 活性化制御の破綻原因の解明

肺癌、卵巣癌等について、細胞株および臨床検体から蛋白質を抽出し、NIK、A20 など NF-kappaB 関連分子の発現を western blotting で解析、発現異常がある場合は蛋白質をコードする mRNA 量をリアルタイム定量 PCR 法によって測定する。

(2) マクロファージ等の炎症性細胞にお

ける持続的 NF-kappaB 活性化

マクロファージ分化モデル(THP1 細胞株など)におけるシグナル修飾分子の動態を解明し、ホルボールエステルで誘導される分化により持続的 NF-kappaB 活性化がもたらされる分子機構とその意義を解明する。この系では持続的 NF-kappaB 活性が再現よく誘導されるので、同一細胞における変化を追跡できる点が腫瘍細胞と異なる。

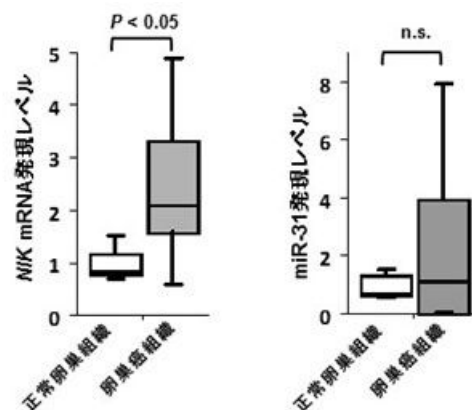
(3) 持続的 NF-kappaB 活性化と A20 発現の機能的意義

癌細胞、マクロファージ分化における A20 発現の機能的意義を分子レベルで解析する。腫瘍細胞の mRNA 量はリアルタイム RT-PCR 法で測定し、タンパク質レベルは western blotting 等で解析する。A20 の発現を抑制するために、A20 遺伝子特異的 short hairpin RNA (shRNA) もしくはリン酸化を受けない I-kappaBalpha の変異体 super-repressor (SR) を安定発現させた細胞株を樹立する。

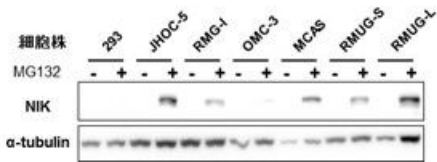
4. 研究成果

(1) 非ウイルス性悪性腫瘍における NF-kappaB 活性化制御の破綻原因の解明

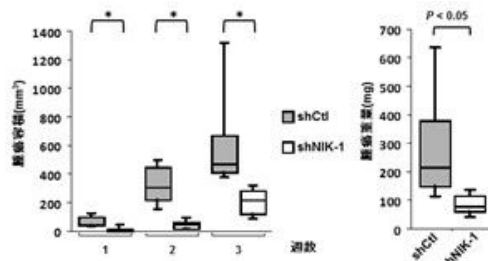
成人 T 細胞白血病(ATL)リンパ腫、肺癌などにおけるリン酸化酵素 NF-kappaB inducing kinase (NIK)の高発現が恒常的 NF-kappaB 活性化と悪性形質に寄与するという研究結果を踏まえ、予後が悪く有効な治療法開発が望まれている卵巣癌について、臨床検体および細胞株を用いて NF-kappaB 活性化状況と NIK の発現を調べ、NIK 発現の機能的意義を明らかにした。正常卵巣組織5検体に比して卵巣癌組織12検体では NIK mRNA 量が著しく増加しており、細胞増殖、浸潤性に関わる遺伝子発現が増大していた。



一方で epigenetic に NIK 発現抑制に関わるとされる miR31 マイクロ RNA の発現に有意差はなく、卵巣癌では NIK mRNA 高発現に miR31 とは別の原因があると想定された。正常卵巣由来細胞株 HOSE1C と比較して、調べた全細胞株 28 種類で NIK mRNA が高発現していた。また、卵巣癌細胞株 6 種類では NF-kappaB 特異的 DNA 結合能が上昇し、高い NIK タンパク質の発現を認めた。



卵巣癌細胞株で shRNA 発現により NIK 発現を抑制すると NF-kappaB 依存性転写活性、単層培養での細胞増殖と軟寒天培地での足場依存性増殖が低下し、ヌードマウスに移植した際に形成される腫瘍の容積、重量ともに減少した。



以上の結果から、NIK は卵巣癌細胞において恒常的 NF-kappaB 活性化と悪性形質発現に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、NIK が卵巣癌の有望な治療標的分子となりうることを示唆された。

倫理面への配慮

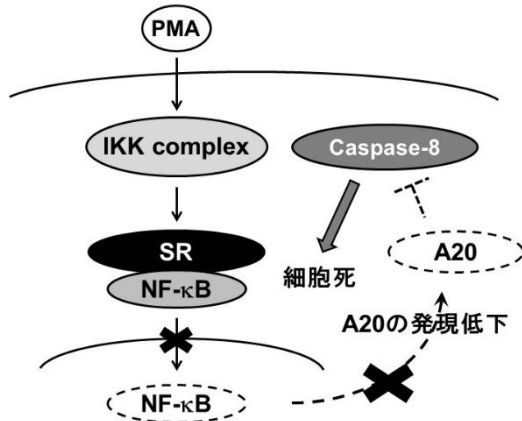
卵巣癌臨床検体を用いた実験は東京医科歯科大学倫理審査委員会の承認のもと実施され、動物実験は同動物実験委員会の承認のもとに実施された。

(2) マクロファージ等の炎症性細胞における持続的 NF-kappaB 活性化

マクロファージ分化モデルとしてヒト単核性白血病細胞株 THP1 をホルボールエステル (PMA) で刺激して分化誘導する実験系を用いて、持続的 NF-kappaB 活性化のメカニズムと意義を解析した。分化に伴って細胞は分裂を停止し、培養皿底面に接着進展してマクロファージ様の外観を呈するようになる。NF-kappaB 活性化を細胞遺伝子にレンチウイルスベクターを用いて組み込んだレポーター遺伝子の発現を指標に解析すると、PMA 刺激後 1 2 時間以内に強い NF-kappaB 活性化が起こり、その後軽度低下しつつ少なくとも 3 日間は持続的な活性化が起こることがわかった。NF-kappaB 活性化に伴って、A20 タンパク質の発現が強く誘導され、その発現は 3 日間持続した。分化誘導前に特異的に NF-kappaB 活性化を阻止するタンパク質である super repressor Ikbalpha (SR) を発現させておくと、PMA 刺激によって細胞は一旦培養皿底面に接着するも進展することなく細胞死を起こす。その際に、caspase-8、caspase-3/7 の活性化が起こり、細胞死のマーカーである Annexin V 陽性細胞、Annexin V と 7-ADD 両者が陽性の細胞が増加した。興味深いことに、A20 と SR を共発現させておくと、

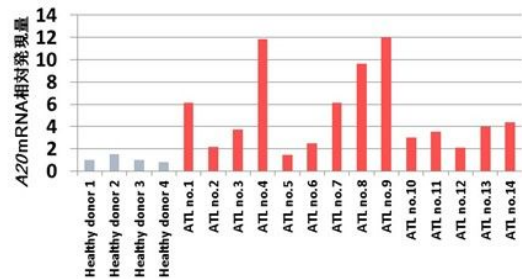
PMA によって NF-kappaB 活性化が起こらないにもかかわらず細胞死の誘導が強く抑制されることがわかった。SR の発現によって PMA

単球系細胞株における NF-kappaB 活性化抑制と細胞死誘導の概念図



による NF-kappaB 依存性遺伝子発現誘導が遮断されても A20 が発現していれば細胞死を抑制できることから、A20 はこの分化誘導実験系では NF-kappaB 依存的に細胞死を防ぐ重要な役割をはたしていることが示唆された。

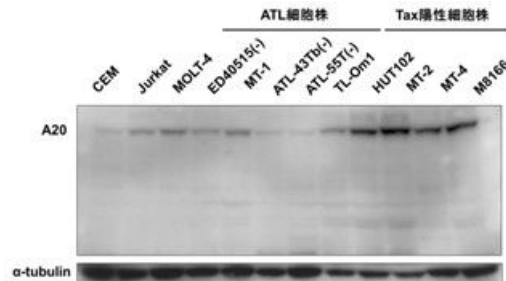
この A20 の抗細胞死作用は、A20 のカルボキシル末端側に存在する Zinc finger 領域を必要とし、A20 の脱ユビキチン化酵素活性、ユビキチン結合酵素活性、直鎖ユビキチン鎖結合活性のいずれをも必要としないことが、



A20 変異体を用いた解析から明らかとなった。

(3) 持続的 NF-kappaB 活性化と A20 発現の機能的意義

ATL 患者末梢血由来単核球細胞では、A20 の mRNA が過剰発現していた。

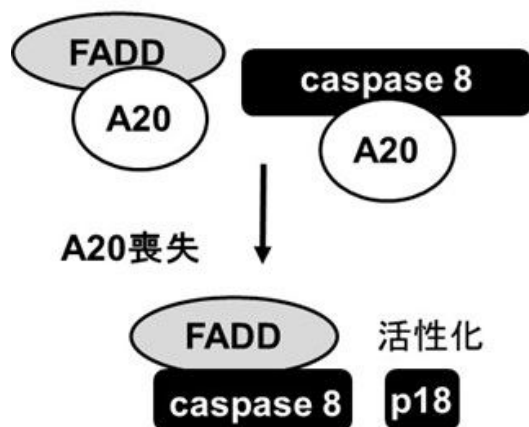


HTLV-I 感染細胞株における A20 タンパク質の発現は、特に NF-kappaB を強力に活性化する Tax を発現する細胞株で顕著に増加していることがウェスタンブロットの結果明らかとなった。

ATL患者末梢血由来単核球細胞(7検体)およびHTLV-1感染細胞株(細胞株名)からA20 cDNAを合成しタンパク質コード領域の塩基配列を解析したところ、全検体でアミノ酸変異をもたらすような変異、欠損等は認められなかった。このことは、しばしばA20遺伝子に変異が見られるB細胞系悪性リンパ腫細胞と大きく異なる点である。腫瘍細胞におけるA20の役割を解析する目的で、3種類のHTLV-1非感染T細胞株、9種類のHTLV-1感染T細胞株でA20の発現をノックダウンして細胞増殖への影響を解析したところ、調べたすべての細胞株で明確な増殖抑制が観察された。このことは、HTLV-1感染細胞だけでなく、広い範囲のT細胞起源の白血病細胞でもA20はその増殖に重要であることを示唆している。

そこで、細胞増殖抑制の背景に細胞死の誘導があるのではないかと予想して、アポトーシスのトリガー因子、実行因子であるcaspase-8およびcaspase-3/7の活性化を調べたところ、A20ノックダウンに伴って両者の活性化フォームが出現しその酵素活性が上昇したことを見出した。細胞表面マーカーであるAnnexin Vと細胞膜破綻マーカーである7-ADDを指標としてFACS解析を行った。その結果、A20の発現減少によって、Annexin V陽性細胞、Annexin Vと7-ADD両者が陽性の細胞が明らかに増加した。この分子メカニズムとして、HTLV-1感染細胞内でA20がcaspase-8と恒常的に結合していること、その結合はA20のカルボ

成人T細胞白血病細胞



キシル末端側のZnフィンガー領域に依存しており、この領域が細胞死の抑制を担っていること、A20の発現をノックダウンすることによってcaspase-8がFADDと結合することになること、などを明らかにした。

興味深いことに、HTLV-1感染細胞における内因性A20減少による増殖抑制と細胞死は、アミノ末端側に存在する脱ユビキチン化酵素活性を失ったA20変異体、第4 Znフィンガー領域に存在するE3ユビキチンリガーゼ活性を失ったA20変異体、第7 Znフィンガー領域に存在する直鎖ユビキチン結合活性を失ったA20変異体によっても、問題なく阻止された。このこと

は、HTLV-1感染細胞におけるA20による細胞死抑制は、その酵素活性あるいは直鎖ユビキチン鎖への結合に依存しない未知のメカニズムによるものであることを示唆している。

倫理面への配慮

本研究は東京大学医科学研究所渡邊俊樹教授との共同研究であり、成人T細胞白血病患者由来末梢血を用いた実験は東京大学倫理審査委員会の承認のもと実施され、動物実験は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認のもとに実施された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計16件)

¹ Uno, M., Saitoh, Y., Mochida, K., Tsuruyama, E., Kiyono, T., Imoto, I., Inazawa, J., Yuasa, Y., Kubota, T., and Yamaoka, S. NF- κ B Inducing Kinase, a Central Signaling Component of the Non-Canonical Pathway of NF- κ B, Contributes to Ovarian Cancer Progression. *PLoS One*, 9(2):e88347 (2014).

doi: 10.1371/journal.pone.0088347 査読有

² Lee, H., Komano J., Saitoh, Y., Yamaoka, S., Kozaki, T., Misawa, T., Takahama, M., Satoh, T., Takeuchi, O., Yamamoto, N., Matsuura, Y., Saitoh, T., and *Akira, S. Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110, 12379-12384 (2013). doi: 10.1073/pnas.1310604110. 査読有

³ Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T., Iwasaki, H., Omori, H., Yamaoka, S., Yamamoto, N., and *Akira, S.: Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe.*, 12, 109-116 (2012). doi: 10.1016/j.chom.2012.05.015. 査読有

⁴ Uota, S., Zahidunnabi Dewan, M., Saitoh, Y., Muto, S., Itai, A., Utsunomiya, A., Watanabe, T., Yamamoto, N., and Yamaoka, S. An I κ B kinase 2 inhibitor IMD-0354 suppresses the survival of adult T-cell leukemia cells. *Cancer Sci.* 103, 100-106 (2012). doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02110.x. 査読有

〔学会発表〕(計22件)

¹ 山口遼, 大迫美穂, 齋藤愛記, 持田佳奈子, 山岡昇司. ヒト単球系細胞株 THP-1 分化モデルを用いたTNFIP3/A20の抗アポトーシス機能の解析. 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月26日 横浜パシフィコ

² 鶴山恵理, 齋藤愛記, 山岡昇司. A20はそのユビキチン修飾活性に依存せずTNF- α によるcaspase-3活性化を抑制する. 第73回癌学会総会 2014年9月25日 横浜パシフィコ

³ 齋藤愛記, 持田佳奈子, 鶴山恵理, 徳永文

稔、山岡昇司 HTLV-I 感染細胞における A20 はユビキチン化修飾酵素活性非依存的に細胞生存を支える 2014年8月23日 東京大学医科学研究所講堂

⁴ 齋藤愛記、宇野雅哉、山岡昇司 ユビキチン修飾酵素 A20 は HTLV-I 感染細胞において caspase 8 と相互作用しその活性を抑制する 2013年10月3日 横浜パシフィコ

⁵ 宇野雅哉、齋藤愛記、井本逸勢、稲澤謙治、久保田俊郎、山岡昇司 卵巣癌細胞における NF-κB inducing kinase 異常発現は恒常的 NF-κB 活性化と腫瘍形成能に寄与する 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月12日 福岡国際会議場

⁶ 大迫美穂、齋藤愛記、宇野雅哉、掛谷綾香、深澤麻純、山岡昇司 ヒト単球系細胞株 THP-1 の分化誘導における持続的 NF-κB 活性化動態と A20 複合体の発現制御 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月12日 福岡国際会議場

〔図書〕(計1件)

¹ Yamaoka, S. NF-κB signaling and lymphoid malignancies. In Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. Edited by Inoue, J. and Takekawa, M. Springer, in press.

〔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

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：