

令和元年6月15日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09500

研究課題名(和文) 血液細胞の免疫反応および造血器腫瘍における核酸センサー分子DHX29の役割

研究課題名(英文) The role of the nucleic acid sensor molecule DHX29 in hematopoietic cell immune responses and hematopoietic tumors

研究代表者

杉本 直志 (Sugimoto, Naoshi)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10447956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：DHX29は新鮮な末梢血由来各血球分画では発現が低く、分化した単球や活性化したB細胞、T細胞、NK細胞で発現上昇がみられた。造血器腫瘍細胞株では10株全て、造血器腫瘍患者由来検体では6例中4例でDHX29の発現亢進を認めた。DHX29のノックダウンは細胞増殖や免疫応答に明らかな影響を示さなかったが、DHX29と協調して働くeIF4E/eIF4Fに対する阻害剤4EGI-1は細胞株の増殖を有意に抑制し、がん遺伝子c-MYCの発現を抑制した。以上からDHX29は他の翻訳関連因子と協調して腫瘍細胞の増殖優位性をもたらし、造血器腫瘍の発生に寄与すると示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DExD/Hヘリカーゼ・ファミリー分子に属するDHX29やDDX41は、mRNAの翻訳や腫瘍細胞の生存・増殖、細胞質内のウィルス・核酸センサーとして働いている。DDX41は急性骨髄性白血病の病態発生に関与し、DHX29もeIF4E/eIF4Fと協調して癌細胞で働いていると報告されているが、今回の研究によりDHX29およびeIF4E/eIF4Fは造血器腫瘍の病態にも関与していることが示唆される結果が得られ、今後造血器悪性疾患の新たな治療標的となると見込まれる。

研究成果の概要(英文)：The expression of DHX29 was not observed in fresh peripheral blood subsets, but induced in differentiated monocytes and activated T, B and NK cells. DHX29 was highly expressed in all 10 of various hematopoietic cell lines and in 4 out of 6 blood samples of patients with hematological malignancies. Knockdown of DHX29 showed no apparent effect in cell proliferation and immune responses, but 4EGI-1, an inhibitor of eIF4E/eIF4F which cooperate with DHX29, significantly suppressed the proliferation and downregulated the expression of c-MYC. These results suggest that DHX29 contributes to tumorigenesis of hematological malignancies through cooperation with other translation relates proteins to endow tumor growth advantage.

研究分野：血液内科学

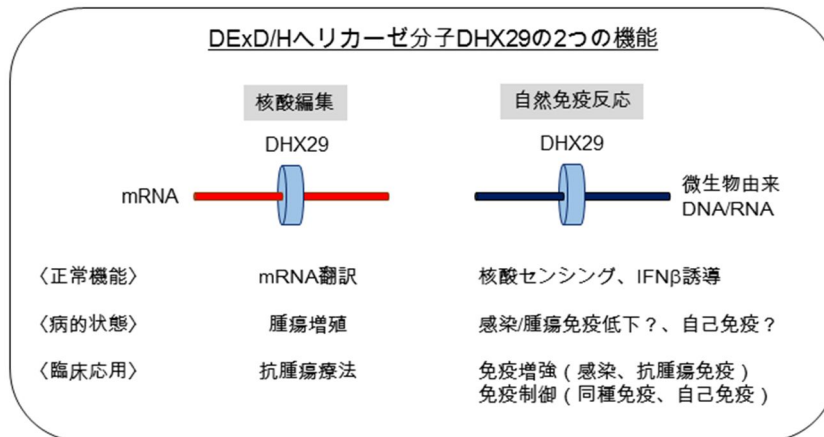
キーワード：DHX29 DDX41 造血器腫瘍 細胞内核酸センサー eIF4E eIF4G1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

DExD/Hヘリカーゼ・ファミリー分子は、DNAやRNAに結合して多様な核酸編集機能(複製・転写・翻訳、マイクロRNA生成など)を発揮する。更には翻訳に関わる複数のヘリカーゼ・ファミリー分子が腫瘍細胞では過剰発現して、腫瘍細胞の増殖・生存に関わっている。他方、RIG-Iなど10以上のDExD/Hヘリカーゼ・ファミリー分子が、細胞質内に侵入してきたウイルスなどの病原微生物由来の核酸に結合し、アダプター・タンパクとなるIPS-1またはSTINGを介して、I型インターフェロン・炎症性サイトカインの発現誘導経路や、インフラマソーム経路を活性化させることも明らかになってきている。例えばDDX41は、翻訳のみならず急性骨髄性白血病の病態発生に関与しており、単球系細胞においては細胞質内ウイルス・核酸センサーとして働いている。

ヒトDHX29分子についても、5'UTRに高次構造を持ったmRNAの翻訳に関わっているのみならず、種々の腫瘍細胞の増殖・生存にも寄与していることが報告されている(Proc Natl Acad Sci USA, 106(52); 22217, 2009)が、本研究代表者は、ヒトDHX29分子が、気道組織由来の上皮・線維芽細胞において、細胞質内のウイルス・核酸センサーとして働いていることを見出していた(Proc Natl Acad Sci USA, 111(21); 7747, 2014)。しかしながらヒト血液細胞ならびに造血器腫瘍におけるDHX29の役割は未解明であったが、申請者はDHX29がヒト血液細胞においても重要と示唆される所見が得ていた。



### 2. 研究の目的

本研究では、血液細胞の自然免疫反応と造血器腫瘍の増殖におけるDHX29分子の役割を解明し、将来的に、自然免疫を標的とした免疫増強(感染、抗腫瘍)・免疫制御(自己免疫、GVHD)の新規療法、ならびに核酸編集をターゲットにした抗腫瘍療法の開発の礎石とすることを目標とした。

### 3. 研究の方法

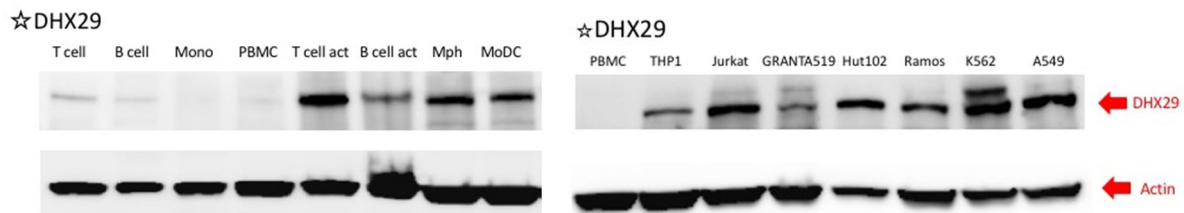
- 発現**：まず血液細胞におけるDHX29の発現パターンの解析を行う。解析対象は各種のヒト血液細胞分画について定常または刺激下の条件、そして多様な血液細胞由来腫瘍のセルラインと患者検体とする。mRNAはリアルタイムqPCR、タンパクはウェスタン・ブロット法にてそれぞれ発現を調べる。
- 機能**：発現が認められた血液細胞に対し、レンチウイルスベクターやプラスミド、siRNAによる強制発現やノックダウンを行い、各細胞分画に適した免疫刺激に対するサイトカイン産生などの免疫反応や、細胞の増殖・生存の状況を評価する。
- 機序**：機能評価によって効果が確認できた細胞について、共焦点顕微鏡や免疫沈降法によって共局在あるいは結合・相互作用する、免疫や腫瘍増殖・生存の重要分子を同

定し、また強制発現やノックダウンによって影響を受けるシグナリング経路をウェスタン・プロット法にて明らかにする。

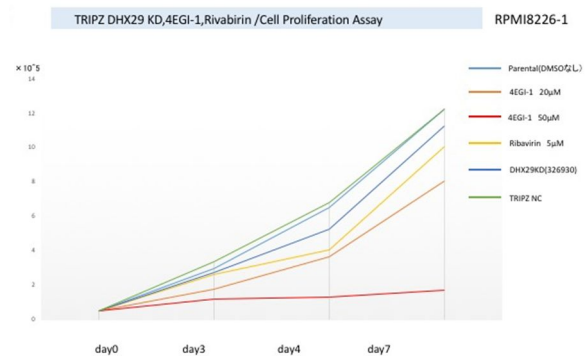
#### 4. 研究成果

qPCR とウェスタン・プロットの結果、DHX29 は健康人末梢血血球分画では新鮮な状態ではどの血球分画にも発現が認められなかったが、単球から分化させたマクロファージや樹状細胞および活性化した B 細胞、T 細胞、NK 細胞などのリンパ球では発現が見られた（下図左）。造血器悪性疾患に関しては、対象とした 10 細胞株の全てで発現亢進がみられ（下図右）患者検査では 6 例中 4 例で DHX29mRNA の発現亢進を認めた。

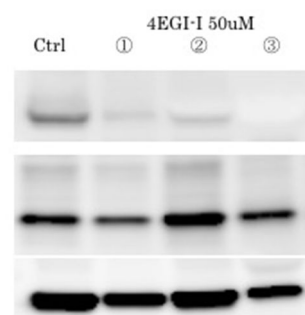
ヒト血液細胞分画の定常または刺激下でのDHX29のタンパク発現。多様な血液細胞由来腫瘍におけるDHX29のタンパク発現。



ついで、健康人の単球とリンパ球に関しドキシサイクリン誘導型のレンチウイルスベクターを用いた shRNA による DHX29 のノックダウンを行なったものの、単球由来マクロファージや樹状細胞の生存や LPS や細胞質内核酸刺激に対するサイトカイン反応、またリンパ球の増殖や IL-2 の産生に明らかな影響は見られなかった。造血器悪性疾患に関しても shRNA による DHX29 のノックダウンや強制発現を行なったが明らかな影響は見られなかった。そこで他の因子や経路が代替として働いてノックダウン効果を喪失させている可能性を考え、造血器細胞に関し同じ様な発現パターンを示していた DDX41 のノックダウンや強制発現も行なったが明らかな影響は見られなかった。一方で、DHX29 と協調して働く eIF4E/eIF4F に対する阻害剤 4EGI-1 は細胞株の増殖を有意に抑制することを突き止めた（右図の赤線）。



4EGI-1 が造血器悪性疾患由来細胞株の増殖を抑制するメカニズムについては、特定の造腫瘍性に関わる遺伝子の発現が変動している可能性を検証するために候補タンパクのウェスタン・プロットを行なった。その結果、4EGI-1 はがん遺伝子 c-MYC の発現を抑制することが判明した（右図）。



以上の結果から DHX29 は他の翻訳関連因子と協調して c-MYC の発現に関与して腫瘍細胞の増殖優位性をもたらし、造血器腫瘍の発生に寄与すると考えられる。その作用機序はまだ解明が不十分で有り、さらなる追究が必要である。本研究は DHX29 および eIF4E/eIF4F は造血器腫瘍の病態にも関与していることを強く示唆し、今後造血器悪性疾患の新たな治療標的となると見込まれる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

杉本直志、門脇則光、「造血器腫瘍と免疫療法」Thrombosis Medicine、査読無、2018年、Vol.8, No. 1, pp. 71-74, ISSN : 2186-0327

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：門脇 則光

ローマ字氏名：Kadowaki, Norimitsu

研究協力者氏名：河原 真大

ローマ字氏名：Kawahara Masahiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。