

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18414

研究課題名(和文) LIMホメオドメイン転写因子ISL-1のATL発症・進展への関与

研究課題名(英文) The role of LIM homeodomain transcription factor ISL-1 in leukemogenesis in ATL

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)：成人T細胞白血病(ATL)の発症・進展におけるLIMホメオドメイン転写因子ISL-1の役割を検討した。HTLV-1感染T細胞株では非感染T細胞株と比較してISL-1が高頻度に発現していた。HTLV-1感染やウイルスタンパク質TaxによってISL-1の発現が誘導された。非感染T細胞株にISL-1を過剰発現させると、細胞増殖能が有意に増加し、ISL-1の標的遺伝子であるc-mycの発現が増強された。以上より、ATL発症・進展においてISL-1の過剰発現の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：HTLV-1 is the etiological agent of adult T-cell leukemia (ATL). Although the viral protein Tax plays crucial roles for the development of ATL, the underlying mechanisms remain obscure. ISL-1, LIM homeodomain transcription factor, is specifically expressed in certain tissue types only. Recently, ISL-1 is suggested to play an oncogenic role. The expression of ISL-1 was assessed in 8 HTLV-1-infected T-cell lines and 3 uninfected T-cell lines. RT-PCR results demonstrated a marked highly expression of ISL-1 mRNA in 5 HTLV-1-infected T-cell lines. The expression levels of ISL-1 mRNA were associated with those of Tax mRNA. ISL-1 protein was also detected in 3 Tax-positive HTLV-1-infected T-cell lines. HTLV-1 infection and Tax overexpression induced the expression of ISL-1 in T cells. Notably, ISL-1 overexpression promoted T-cell proliferation. Furthermore, ISL-1 activated the expression of c-myc. Our results provide insights into the new relationships between ISL-1 and HTLV-1 oncogenesis.

研究分野：ウイルス発がん

キーワード：成人T細胞白血病(ATL) HTLV-1 ISL-1 Tax c-myc

## 1. 研究開始当初の背景

成人T細胞白血病(ATL)は、レトロウイルスであるHTLV-1により引き起こされる難治性のT細胞性白血病・リンパ腫である。HTLV-1は乳児期に主に母乳を介して感染し、50年以上の潜伏期間を経て感染細胞を腫瘍化する。感染初期はウイルスタンパク質Taxが宿主細胞のシグナル伝達経路の活性化に関わるが、その後腫瘍細胞はTax非依存性となる。細胞生存シグナルの活性化はATL発症機構において重要であるが、いまだその詳細は解明されていない。

Insulin enhancer binding protein-1 (ISL-1)は、LIMドメインやホメオドメインを持つ転写因子で、インスリン遺伝子の発現調節に関わる。最近、腫瘍の発生にも関与するという報告が行われているが、ATLにおける検討はまだ行われていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、HTLV-1感染やATLにおける転写因子ISL-1の発現・活性化機構を解析し、ISL-1のATL発症・進展への関与を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) HTLV-1感染T細胞株におけるISL-1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。

(2) HTLV-1感染及びウイルスタンパク質TaxによるISL-1の発現誘導をRT-PCR法で検討した。健常人末梢血単核球(PBMC)をマイトマイシンCで前処理したHTLV-1感染細胞株MT-2と共培養することでPBMCに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JPX-9細胞株を用いて、T細胞株におけるTax誘導性発現を検討した。

(3) 非感染T細胞株であるJurkatにISL-1を過剰発現させ、細胞増殖能に及ぼす影響や誘導される遺伝子に関して、WST-8法及びRT-PCR法で検討した。遺伝子導入はエレクトロポレーション法を用いて行った。

(4) HTLV-1感染T細胞株や非感染T細胞株の核抽出液を用いてゲルシフトアッセイを行い、ISL-1遺伝子プロモーター領域への転写因子結合能の解析を行った。また、ISL-1による発現誘導が見られた遺伝子(c-myc)に関して遺伝子プロモーター領域におけるISL-1の結合能の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) HTLV-1感染T細胞株においてISL-1発現を検討した。検討した8株中、蛋白質レベル

では3株、mRNAレベルでは6株でISL-1の恒常的発現が認められた。特にウイルス遺伝子Tax発現細胞株でISL-1の強い発現を認めた。一方、非感染T細胞株3株では発現はみられなかった。これらのことから、HTLV-1感染T細胞株、特にTax発現細胞株においてISL-1が過剰に発現していることがわかった。(2) 健常人PBMCにHTLV-1を感染させると、7日後にTaxやIL-2受容体鎖の発現とともにISL-1 mRNAの発現を認めた。Taxを発現させたJPX-9細胞を用いて経時的に検討したところ、IL-2受容体鎖の発現より24時間遅れてISL-1の発現が確認できた。ISL-1発現はHTLV-1感染やTaxにより誘導されることがわかった。

(3) Jurkat細胞にISL-1を過剰発現させたところ有意な増殖能の増加を認め、ISL-1の標的遺伝子c-mycの発現が増強していた。ゲルシフトアッセイでc-myc遺伝子プロモーター領域へのISL-1の結合能を検討したところ、確認できなかった。

(4) ISL-1の遺伝子発現制御機構の解析のため、ISL-1遺伝子プロモーター領域へのSTAT及びAP-1ファミリータンパク質の結合能を検討した。幾つかの感染T細胞株の中に転写因子結合バンドが検出されており、現在結合しているタンパク質の同定を行うとともに、ISL-1遺伝子プロモーターのレポーターアッセイを予定している。

以上のことから、Taxにより発現誘導されたISL-1がc-mycの発現誘導を介して、細胞増殖を制御していることが明らかになった。ATL発症・進展へのISL-1の過剰発現の関与が示唆された。

## 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7件)

Chie Ishikawa, Masachika Senba, Naoki Mori. Butein inhibits NF- $\kappa$ B, AP-1 and Akt activation in adult T-cell leukemia/lymphoma. International Journal of Oncology. 印刷中. 査読有.

Chie Ishikawa, Masachika Senba, Naoki Mori. Effects of NVP-BEZ235, a dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor, on HTLV-1-infected T-cell lines. Oncology Letters. 印刷中. 査読有.

Chie Ishikawa, Takahiro Jomori, Junichi Tanaka, Masachika Senba, Naoki Mori. Peridinin, a carotenoid, inhibits proliferation and survival of HTLV-1-infected T-cell lines. *International Journal of Oncology*. 2016; 49: 1713-1721. 査読有. DOI: 10.3892/ijo.2016.3648.

Chie Ishikawa, Masachika Senba, Naoki Mori. Efficiency of AU922 in mice with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncology Letters*. 2016; 12: 387-392. 査読有. DOI: 10.3892/ol.2016.4624.

Chie Ishikawa, Masachika Senba, Naoki Mori. Induction of  $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$  by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 and CD30. *International Journal of Oncology*. 2015; 47: 2197-2207. 査読有. DOI: 10.3892/ijo.2015.3218.

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.

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

[学会発表](計12件)

Chie Ishikawa, Naoki Mori. Effects of fucoidan against KSHV-related primary effusion lymphoma both in vitro and in vivo. The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 平成28年10月23日～25日. 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

Naoki Mori, Chie Ishikawa. Anti-ATL activity of cerdulatinib, a novel dual SYK/JAK kinase inhibitor. The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 平成28年10月23日～25日. 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

Naoki Mori, Chie Ishikawa. Targeting

mitotic kinase PBK/TOPK decreases growth and survival of HTLV-1-infected T-cell lines. The 78<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 平成28年10月13日～15日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

Chie Ishikawa, Naoki Mori. Activity of the novel dual SYK/JAK kinase inhibitor cerdulatinib against ATL. The 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 平成28年10月6日～8日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

Naoki Mori, Chie Ishikawa. Mitotic kinase PBK/TOPK as a therapeutic target for ATL. The 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 平成28年10月6日～8日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

森直樹, 石川千恵. ATLの新規治療標的分子PBK/TPOK. 第3回日本HTLV-1学会学術集会. 平成28年8月26日～28日. 鹿児島県市町村自治会館(鹿児島県・鹿児島市).

Naoki Mori, Chie Ishikawa, Junichi Tanaka. Inhibition of proliferation and survival of HTLV-1 infected T-cell lines by peridinin. The 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 平成27年11月22日～24日. 福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

Chie Ishikawa, Naoki Mori. Activity of the novel dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 against ATL. The 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 平成27年11月22日～24日. 福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

Naoki Mori, Chie Ishikawa. Pim-3 kinase as a therapeutic target for ATL. The 77<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 平成27年10月16日～18日. 石川県立音楽堂(石川県・金沢市).

Chie Ishikawa, Naoki Mori. Activity of the novel dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 against ATL. The 74<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 平成27年10月8日～10日. 名古屋国際会議場(愛知

県・名古屋市).

Naoki Mori, Chie Ishikawa. Pim-3 kinase as a therapeutic target for ATL. The 74<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 平成 27 年 10 月 8 日～10 日. 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

森直樹, 石川千恵. ATL に選択的に発現している Pim-3 を分子標的とした新たな治療法の開発. 第 2 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 平成 27 年 8 月 21 日～23 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：  
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：90542358

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
なし ( )