

令和元年6月18日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07120

研究課題名(和文)成人T細胞白血病(ATL)における低酸素ストレス応答機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of hypoxia stress response in adult t-cell leukemia (ATL)

研究代表者

中畑 新吾 (Nakahata, Shingo)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：80437938

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)：低酸素応答としてNDRG2によるリン酸化シグナル調節ががん細胞の増殖に重要な役割を果たすことが示唆された。NDRG2は、PI3K/AKTやNF- κ B経路等、様々なリン酸化シグナルを制御する。NDRG2は造血幹細胞の機能に関わり、骨髄ニッチの低酸素応答の制御への関与が示唆された。さらにATLにおいてオートファジー分解経路によるp47発現低下が、NF- κ B活性化の要因の一つとなっていることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
癌抑制遺伝子として同定したNDRG2が癌の低酸素適応・抵抗性の機構解明の鍵となる分子であることを示唆した。またNDRG2は、低酸素幹細胞ニッチでの機能にも役割を果たす可能性が示され、がん幹細胞を含めた更なるその制御機構の解明により、新規分子標的薬の開発につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study suggested that, as a response to hypoxia, the regulation of phosphorylation of cellular signaling molecules by NDRG2 plays an important role in the growth of cancer cells. NDRG2 regulates various signaling pathways including PI3K/AKT and NF- κ B. This study also suggested NDRG2 is involved in the function of hematopoietic stem cells (HSCs) and may play a role in the regulation of hypoxia response of HSCs in the bone marrow niche. In addition, the downregulation of p47 expression via the autophagy-lysosome pathway contributes to the activation of NF- κ B in ATL.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：低酸素 NDRG2 ATL

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

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

成人 T 細胞白血病(ATL)は、HTLV-1 ウイルス感染以降、数十年を経て発症する難治性疾患である。国内の約 108 万人の HTLV-1 保持者のうち、約 5%が ATL を発症し、長期の潜伏期の間、感染リンパ球ではゲノム異常が蓄積し、そのクローナルな増殖の結果、ATL が引き起こされる。我々は、ATL の統合的なゲノム解析を行い、染色体切断点集中領域 14q11 を同定し、その中から ATL 全例で発現損失している遺伝子として、NDRG2 (N-Myc downstream-regulated gene 2) を同定した(Blood 2008, Nature Comm 2014)。さらに我々は NDRG2 が新規 PTEN 結合タンパク質として、そのリン酸化調節による活性調節に関わることを明らかにした。NDRG2 は多くの癌で発現低下し、癌細胞の増殖に関わる癌抑制遺伝子として注目されており、低酸素などの細胞ストレス時に誘導されることから、細胞ストレス制御異常が NDRG2 の発癌に関しての真の機能であることを示唆する(Cell Signal 2015)。

PIP3 が関わる PI3K/AKT シグナル経路は、癌で高活性化され、増殖、血管新生等を制御することが明らかになってきており、その活性化要因として、PIP3 のホスファターゼ PTEN 等の点突然変異が一部に有り、また PTEN の活性調節機構については、そのリン酸化修飾が関わること等、示されてきているが、PI3K/AKT の負のフィードバック制御機構は、未だ明らかでない。我々は、NDRG2 が PTEN に結合することを同定し、NDRG2 はセリントレオニンホスファターゼである PP2A ホスファターゼを PTEN にリクルートし、PTEN のそのリン酸化修飾 (Ser380/Thr382/Thr383, STT) の脱リン酸化を誘導し、PI3K/AKT の活性化を抑制することを同定した(Nature Comm 2014)。ATL 細胞の NDRG2 発現低下は、PTEN-STT リン酸化を亢進し、PI3K/AKT の活性化を導いていることが明らかとなった。

さらに、NDRG2 による PTEN リン酸化調節機構として、PI3K 下流のキナーゼ SGK1 (serum and glucocorticoid-inducible kinase 1) が NDRG2 の Ser332 残基をリン酸化し、NDRG2 と PP2A の結合を安定化させ、PTEN 脱リン酸化の誘導を果たしており、NDRG2 に依存した負のフィードバック機構が明らかとなった。SGK1 もまた、低酸素などの細胞ストレスに応答する遺伝子として知られ、このフィードバック経路が、PTEN リン酸化調節を介して、低酸素によるシグナル応答の制御に重要な役割を果たしていることも明らかにした(論文準備中)。

2. 研究の目的

NDRG2 は新規 PTEN 結合タンパク質であり、PP2A をリクルートし PTEN の脱リン酸化を促進することで、PI3K/AKT 経路活性化を負に制御する。ATL や他の癌における NDRG2 発現低下は PTEN リン酸化を亢進、PI3K/AKT の恒常的活性化に繋がる。また、NDRG2 発現低下は低酸素下の増殖抑制に抵抗性を付与する。本研究は、ATL 発症機構・分子病態における NDRG2 発現低下と低酸素ストレス応答の生理的役割を解明することを目的として、1. 低酸素ストレスによる NDRG2 リン酸化制御機構の解明、2. 低酸素ニッチの造血幹細胞における NDRG2 の機能、3. ATL におけるオートファジーの活性化について解析を行った。

3. 研究の方法

細胞株・培養方法

本研究では、HTLV-1 感染 T 細胞株 (HUT102, MT2, MT4, SLB1) ATL 細胞株 (KOB, KK1, S1T) および HTLV-1 陰性 T 細胞株として、急性 T リンパ球性白血病細胞株、Jurkat および MOLT4 を用い、正常細胞由来細胞株として、ヒト胎児腎臓由来 293T 細胞株を使用した。HTLV-1 感染 T 細胞株、ATL 細胞株、HTLV-1 陰性 T 細胞株は 10%FBS および Penicillin-Streptomycin を含む RPMI1640 培地を使用し、IL2 依存性の細胞株に対しては 500IU/ml の濃度のヒトリコンビナント IL2 (Peprotec) 添加した。293T 細胞は 10%FBS、Penicillin-Streptomycin 添加 DMEM 培地を使用した。細胞培養は、5%CO₂、37 °C のインキュベーター内で行い、低酸素処理は、低酸素インキュベーターを用いて 5%CO₂、1%O₂ により行った。

遺伝子導入法

細胞株へのトランスフェクションは、Hilymax 試薬 (Dojindo) または Amaxa nucleofector (Lonza) またはヌクレオフェクションを使用した。

コロニー形成アッセイ

野生型または NDRG2 欠損マウスから骨髓を単離し、LSK 分画を JSAN セルソーターを用いて分取した。LSK 細胞は Methocult M3434 (Stem Cell Technologies) 培地に播種し、2 週間、5%CO₂、37 °C のインキュベーターで培養した。コロニーの形態的観察により、各系統のコロニーを評価した。

蛍光免疫染色

細胞を 4%パラホルムアルデヒドで室温、10 分間固定し、0.2% Triton X-100 により透過処理した。0.1 M グリシンを含む TBS で洗浄後、1% BSA で室温、1 時間ブロッキングを行った。そ

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

の後、一次抗体を添加し4°Cでオーバーナイト反応させた。0.1% Tween 20を含むTBSで洗浄後、2次抗体を室温、2時間反応させ、0.1% Tween 20-TBSで洗浄し、antifade reagent (Invitrogen)を用いてマウントした。観察は、confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems)を用いた。

4. 研究成果

4-1. 低酸素ストレスとNDRG2リン酸化制御機構

NDRG2はPP2Aに結合し、PTENへのリクルートメントを介し、PTEN-S380/T382/T383 (STT)の脱リン酸化を促進する。一方、NDRG2はPI3KのフィードバックとしてSGK1によりS332残基のリン酸化修飾を受け、このS332リン酸化はNDRG2とPP2Aとの結合を促進する。SGK1はNDRG2リン酸化制御を介し、ATLを含むがん細胞の低酸素応答またはその適応に重要な役割を持つ可能性があるため、ATLにおけるSGK1によるNDRG2リン酸化制御機構の解明を行った。

SGK1はSGKファミリーに属し、3種類のアイソフォーム(SGK1, SGK2, SGK3)が存在する。そこで、ATLにおけるこれらのアイソフォームの発現を調べた所、ATL細胞株及びATL患者由来白血病細胞において、SGK1が安定に発現していることを確認した。次に、ATL細胞におけるSGK1の活性化状態を調べた所、ATL細胞株の多くでそのリン酸化が亢進しており、活性化されていることがわかった。さらに、SGK1阻害剤をATL細胞株に処理した所、細胞増殖の抑制を認めた。

また、SGK1が直接、NDRG2に相互作用しそのリン酸化を促進することを確かめるために、NDRG2を強制発現させたNDRG2発現ATL細胞株を用いて、NDRG2とSGK1の免疫共沈降実験を行った。その結果、ATL細胞株に導入したNDRG2はSGK1と結合して存在することがわかった。さらに、免疫蛍光染色により細胞内局在を調べた所、NDRG2とSGK1は細胞質で一部共局在することを確認した。これらの結果から、SGK1は直接NDRG2のリン酸化を制御していることが示唆された。

低酸素誘導性因子(HIF-1)は、低酸素応答シグナルのマスター因子であり、我々の研究も含め、NDRG2のプロモーターに結合し転写活性化に働くことが明らかにされている(Cell signal, 2015)。そこで、低酸素ストレス下における低酸素誘導性因子(HIF-1)とNDRG2の発現の関係を検討した。ATL細胞株において、低酸素刺激によりHIF-1の発現誘導が認められたが、NDRG2の発現は低いままで、AKT及びSGK1の活性状態も高く保たれていた。一方、正常細胞由来の293T細胞では、低酸素によりHIF-1が誘導され、NDRG2の発現上昇とAKT、SGK1のリン酸化の低下が確認された。

以上の結果から、ATL細胞の細胞ストレスへの適応・抵抗性にNDRG2発現低下ならびにSGK1の活性化が関与している可能性が推測された。

4-2. 生体内でのNDRG2の低酸素シグナル制御の役割

近年、ニッチの低酸素環境は、造血幹細胞(HSCs)で、HIF-1を介した活性酸素種の産生能の低下を導き、HSCsの老化を回避することが報告され(Cell Stem Cell 2013)、さらに、HSCsのPTEN欠損あるいは活性型AKTの過剰発現が、HSCsの枯渇をまねくことが明らかとなっている(Cell Stem Cell 2010, Blood 2010)。

これまでの結果から、NDRG2は低酸素下でPI3K/AKT経路を含むシグナル情報伝達系の制御に重要な役割を担っていることが示唆されたため、生体内でのNDRG2の低酸素シグナル制御の役割として、骨髓ニッチのHSCsの維持機構に関わる可能性を検討した。正常マウス由来骨髓のHSCs分画においてNDRG2の発現が上昇していることがわかった。

我々は、NDRG2欠損マウスにおいて、様々な組織においてPI3K/AKT経路が恒常的に活性化しており、Tリンパ腫を含む様々な癌を発症することを見出している(Nature Commun. 2014)。このマウスにおいては、未分化なLSK分画のHSCsの割合が顕著に低下しており、特にc-kit陽性の細胞集団が減少していることを見出した。そこで、NDRG2欠損マウスのHSCsの分化能について解析した所、骨髓系前駆細胞、赤芽球系前駆細胞等においてコロニー形成能が損なわれていることが明らかとなった。

以上より、NDRG2欠損がHSCの維持や機能に影響を与えることが示唆され、今後は、このHSCにおけるNDRG2の役割について、in vivoモデルや、白血病モデルにより解析を進め、HSCにおけるPI3K/AKT経路の制御とNDRG2発現との関連を明らかにする予定である。

4-3. ATLにおけるオートファジーの役割

近年、オートファジーががんで異常活性化し、がんの発達や進展に関与することが明らかにされている。オートファジーはまた低酸素やウイルス感染により活性化されること、オートファジーの活性化は、NF- κ B経路の活性化によって促進されることも報告されている。

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

我々は、ATL細胞においてオートファジー活性化の指標となるLC3のプロセッシングが亢進しており、これがNF- κ B制御分子p47のタンパク質分解を促進していることを同定した(図1)。ATL細胞株に対して、ATG5の発現抑制によりオートファジーを阻害した所、p47の発現が回復し、NF- κ Bの活性化が抑制され、ATLの表面マーカーである細胞接着分子CADM1の発現低下を誘導した(図2)。また、ATL細胞株においてp47の発現を回復させた所、NF- κ B経路の活性化の抑制と細胞増殖能の低下が認められることから、つまり、オートファジーとNF- κ B経路は相互に活性化し、ATL細胞の増殖、生存を促進することが示唆された。一方、我々はこれまでに、NDRG2発現はNIKのリン酸化調節を介して、NF- κ B経路を負に制御し、ATL細胞におけるNDRG2の発現はNF- κ Bの活性化を抑制することを報告している(Sci Rep. 2015)。

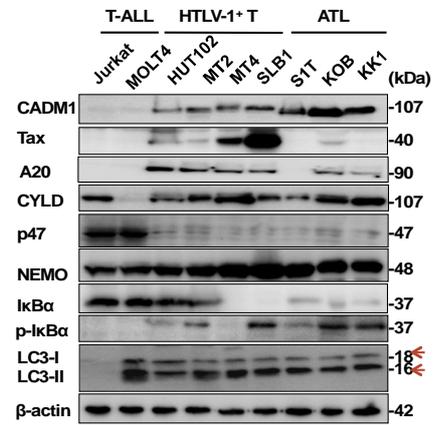


図1) ATLにおけるNF- κ Bおよびオートファジー関連タンパク質の発現解析 Sarker et al. Sci. Rep. 2019

上述のように、ATLにおけるNDRG2発現低下は、PI3K/AKTの活性化を介して低酸素下でのATL細胞増殖抑制に抵抗性を付与することから、従って、NDRG2発現低下は、低酸素ストレス環境下においてPI3K/AKT経路とNF- κ B経路の活性化を介してオートファジー活性化を促進し、ストレス下でのATL細胞の生存や増殖を促進している可能性が推測された。

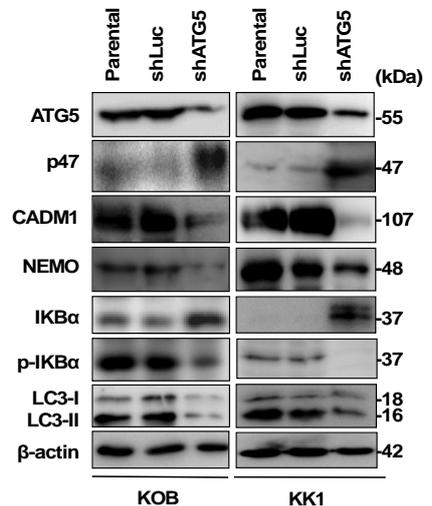


図2) ATL細胞株におけるオートファジー・リソソーム分解経路の阻害によるp47発現回復とNF- κ B活性化の抑制 Sarker et al. Sci. Rep. 2019

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Sarker B, Nishikata I, Nakahata S, Ichikawa T, Shiraga T, Saha HR, Fujii M, Tanaka Y, Shimoda K, Morishita K. Degradation of p47 by autophagy contributes to CADM1 overexpression in ATLL cells through the activation of NF- κ B. Sci Rep. 2019 Mar 5;9(1):3491. 査読有り

[学会発表](計4件)

中畑新吾, Bidhan Sarker, 西片一郎, 市川朝永, 藤井雅寛, 井上純一郎, 伊波英克, 下田和哉, 森下和広 ATLにおけるオートファジーによるNF- κ B負の制御因子p47の不活化は、NF- κ Bシグナルを増強しCADM1高発現をもたらす 第91回日本生化学会大会 2018年9月24日-26日

中畑新吾, 市川朝永, 齋藤祐介, 滝智彦, 谷脇雅史, 森下和広 ATLにおけるNDRG2発現低下は細胞ストレス応答異常に関与する 第4回日本HTLV-1学会 2017年8月19日-20日

Shingo Nakahata, Tomonaga Ichikawa, Yusuke Saito, Tomohiko Taki, Masafumi Taniwaki, Kazuhiro Morishita. NDRG2 regulates the cell growth response to hypoxia via control of the PI3K/AKT pathway. The 5th JCA-AACR Special Joint Conference. 2016.7.13-15

中畑新吾, 市川朝永, 齋藤祐介, 滝智彦, 谷脇雅史, 森下和広 NDRG2 down-regulation induces hypoxic resistance via activation of PI3K/AKT signaling in ATLL. 第78回日本血液学会学術集会 2016年10月13日

[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.med.miyazaki-u.ac.jp/home/biochem1/>

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

6. 研究組織

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。