

研究種目: 若手研究(B)

研究期間: 平成 19 年度 ~ 平成 22 年度

課題番号: 19790344

研究課題名(和文) 多段階発がん機構におけるジンクフィンガー-ホメオドメインタンパク質の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1/TCF8) gene in the multi-step leukemogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma

研究代表者

中畑 新吾 (NAKAHATA SINGO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 80437938

研究代表者の専門分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 基礎医学・ウイルス学

キーワード: 白血病

1. 研究計画の概要

成人 T 細胞白血病(ATL)は HTLV-1 ウイルス感染を基礎疾患として HTLV-1 キャリアの約 5% が発症する。発症までの長期期間の必要性、白血病細胞での Tax 発現消失等、ウイルス感染に加え、キャリア特質やゲノム変異などの影響が、白血病発症には大きく関連していると考えられる。そこで我々は ATL の統合的ゲノム解析を行い ATL 発症機構の解明を行った。

2. 研究の進捗状況

(1) SKY 法、CGH 法を用いて ATL 細胞の染色体異常を解析した。急性型 ATL61 症例を対象とした SKY 法の結果から、約 1/3 の症例で 10p11, 14q11, 14q32 に染色体切断点がみられた。アレイ CGH 法により 10p11 領域の解析を進めた結果、2 Mb の共通欠失領域を同定した。この欠失領域に存在する遺伝子群の発現解析を行った結果、TCF8 遺伝子の発現が ATL 細胞で低下していることを見出し、がん抑制遺伝子候補であることが示された。TCF8 欠損マウスの解析を行い、その結果主として CD4+CD8-SPT リンパ腫を、一部に CD4+CD8+DP 胸腺原発 T リンパ腫を形成した。

(2) ATL 細胞の白血病化機構の 1 つである TGF-beta1 抵抗性について、TCF8 が TGF-beta1 情報伝達を正に制御することが報告されているため、TCF8 発現低下との関連性を検討した。ATL 細胞株への TCF8 遺伝子強制発現は、TGF-beta1 による増殖抑制を回復させ、更に TCF8 発現 T リンパ性白血病細胞株 CTLL2 に shTCF8 を導入しその発現を抑制したところ、TGF-beta1 による増殖抑制能が低下した。一方、がん細胞における TGF-beta1 不能性の原因の 1 つとして抑制性 Smad(Smad6/7)の高発現が報告されているため、Smad6/7 の発現を

検討したところ、Smad7 が ATL 細胞で高発現していることが判り、更に ATL 細胞へ shSmad7 を導入したところ、TGF-beta1 による増殖抑制が回復したことから、ATL における TGF-beta1 の不能性は、Smad7 の高発現と TCF8 の発現低下が関与していることが考えられる。

(3) TGF-beta1 抵抗性の機序を更に解析するため、以下の実験を行った。肝細胞株 HepG2 に Smad7 を過剰発現させると、TGF-beta1 で誘導される 3TP-Lux の転写活性が抑制されるが、TCF8 を Smad7 と共に発現させると Smad7 による転写抑制が解除された。タンパク質間相互作用を検討したところ、293T 細胞に過剰発現させた Smad7 と TCF8 の結合が確認され、更に内在性タンパク質の相互作用も T 細胞白血病細胞株 MOLT4 を用いて確認した。細胞内局在を検討した結果、TCF8 と Smad7 の免疫蛍光は大部分が核内に存在した。HepG2 細胞に Smad3、Smad7 並びに TCF8 発現プラスミドと 3TP レポーターを導入し、クロマチン免疫沈降法によりプロモーターに対する結合能を解析した。Smad3 と Smad7 を共発現させた細胞では Smad7 がプロモーターに有意に結合したが、Smad-3/7 並びに TCF8 を過剰発現させた細胞では、これら 3 つのタンパク質が同プロモーター上に会合したことから、TCF8 は Smad7 存在下において Smad3 をプロモーターにリクルートし転写活性化に機能することを示唆した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

ATL のゲノム解析から染色体切断点集中領域 10p11.2 を同定、TCF8 遺伝子のがん抑制遺伝

子候補として単離し、ATL の発症要因の1つとして重要である TGF-beta1 不能性に TCF8 の不活化が関与していることを見出した。本研究で得られた知見は、ATL 発症機構を明らかにする基盤となることが期待される。

4. 今後の研究の推進方策

ATL 細胞の多くは TGF-beta1 を産生していることと、それに対して自己白血病細胞そのものは TGF-beta1 に不能性であることが知られている。TCF8 はこの不能性に関わり、ATL 細胞において TCF8 遺伝子を強制発現させると TGF-beta1 への反応性が回復し、細胞死に至ることを明らかにしている。そこで、この過程に関わる因子を同定するため TCF8 安定発現 ATL 細胞株を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、ATL における TCF8 の標的遺伝子を同定する。

5. 代表的な研究成果

(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1件)

Hidaka T*, Nakahata S*, Hatakeyama K*, Hamasaki M, Yamashita K, Kohno T, Arai Y, Taki T, Nishida K, Okayama A, Asada Y, Yamaguchi R, Tsubouchi H, Yokota J, Taniwaki M, Higashi Y, Morishita K. Down-regulation of TCF8 is involved in the leukemogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma. Blood. 2008;112:383-393. 査読有り

[学会発表] (計11件)

中畑新吾 ATLL における ZEB1 転写抑制は CCNG2 及び CDKN1A の転写抑制を介した細胞増殖をきたす。第2回 HTLV-1 研究会・合同斑会議 2009年8月30日 東京大学医科学研究所

中畑新吾 TCF8 は Smad7 を抑制し ATL の TGF-beta1 不能性を解除する。第70回日本血液学会総会 2008年10月12日 国立京都国際会館

中畑新吾 Downregulation of TCF8 is involved in ATLL development by the escape from TGF-beta1 during T cell differentiation. 第66回日本癌学会学術総会 2007年10月5日 パシフィコ横浜

[図書] (計2件)

中畑新吾、森下 和広 TCF8 遺伝子発現抑制による成人T細胞白血病・リンパ腫発症機構 医薬ジャーナル社 血液フロンティア 18巻 2008年 65-72頁