

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461428

研究課題名(和文) NF- $\kappa$ B制御因子 I $\kappa$ B- のATL発症・進展機構への関与研究課題名(英文) I $\kappa$ B-zeta, a regulator of NF- $\kappa$ B, contributes to the pathogenesis of ATL

研究代表者

森 直樹 (MORI, Naoki)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10220013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：NF- $\kappa$ B活性化は、ATLやバーキットリンパ腫(BL)、ホジキンリンパ腫(HL)の発症に必須である。ATLの原因ウイルスHTLV-1のTaxやBL及びHLの原因ウイルスEBVのLMP-1並びにHLで高発現するCD30はNF- $\kappa$ Bを活性化するが、過剰なNF- $\kappa$ B活性化は細胞死や老化を誘導する。NF- $\kappa$ B制御因子 I $\kappa$ B- が、ATLやBL、HLで高発現していた。Tax、LMP-1、CD30は I $\kappa$ B- の転写を活性化した。I $\kappa$ B- はNF- $\kappa$ B/IFN制御遺伝子の発現を誘導したが、Tax、LMP-1、CD30依存性NF- $\kappa$ B活性を阻害した。I $\kappa$ B- はNF- $\kappa$ Bを正と負に制御し、発がんに関与する。

研究成果の概要(英文)：NF- $\kappa$ B activation is important in the transformation and development process in ATL, Burkitt's lymphoma (BL) and Hodgkin's lymphoma (HL). HTLV-1 Tax, EB virus (EBV) LMP-1 and ligand-independent signaling by over-expressed CD30 are known to cause permanent activation of NF- $\kappa$ B in lymphomas. However, hyper-activation of NF- $\kappa$ B triggers cellular senescence and apoptosis. I $\kappa$ B-, an inducible regulator of NF- $\kappa$ B, was constitutively expressed in the nuclei of ATL, BL and HL cells. Expression of Tax, LMP-1 and CD30 trans-activated the I $\kappa$ B- gene through NIK/IKK/NF- $\kappa$ B pathway. I $\kappa$ B- induced the expression of NF- $\kappa$ B- and IFN-regulatory genes in T cells. I $\kappa$ B- enhanced Tax-induced transactivation of Bcl-3 and iNOS. Interestingly, I $\kappa$ B- inhibited NF- $\kappa$ B activation by Tax, LMP-1 and CD30, and HTLV-1 transcription. NF- $\kappa$ B-induced I $\kappa$ B- modulates NF- $\kappa$ B activation, resulting in a fine balance that ultimately endows a net evolutionary benefit to the survival of lymphoma cells.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：HTLV-1 成人T細胞白血病 NF- $\kappa$ B I $\kappa$ B- Tax LMP-1 CD30 EBウイルス

1. 研究開始当初の背景

転写因子 NF-κB は、Rel ドメインと呼ばれる領域を持つ5つの蛋白質 (RelA、c-Rel、RelB、p105/p50、p100/p52) から構成される。これらは二量体を形成し、無刺激の細胞では、細胞質に存在する阻害蛋白質である IκB-α/β/ε (典型的 IκB) と Rel ドメインを介して結合している。刺激を受けた細胞では、IκB-α/β/ε がリン酸化を引き金として分解される結果、NF-κB が核へ移行し、細胞死や細胞増殖、転移など、がんの発症・進展や急性及び慢性の炎症反応に関与する遺伝子の転写を誘導する。IκB-ζ は核内 IκB ファミリーに属し、C 末端領域には、NF-κB と結合するアンキリンリピートがある (図1)。IκB-ζ はマクロファージを LPS で刺激した際に発現誘導される分子として同定され、NF-κB 等との相互作用を介して、ある一群の遺伝子 (IL-6 等) の転写の亢進に必須である。一方、別の遺伝子群 (TNF-α 等) の転写に対しては抑制的に機能する。

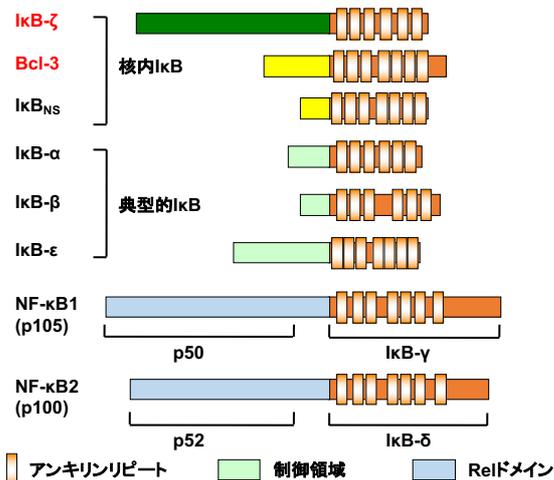


図1 IκB ファミリー蛋白質の構造

HTLV-1 は CD4<sup>+</sup>T 細胞に感染するレトロウイルスであり、予後不良の成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスである。ATL の発症や進展に NF-κB の活性化は重要であり、ウイルスのトランスフォーミング蛋白質 Tax による NF-κB の活性化は、T 細胞の不死化に必須である。しかしながら、Tax を過剰に発現させると、NF-κB の活性化を介して、細胞にアポトーシスや老化を誘導することから、Tax や NF-κB は諸刃の剣のような存在でもある。さらに、Tax は細胞傷害性 T 細胞の標的となることから、ATL 患者の末梢血では、その発現が抑制されている。しかしながら、Tax の発現の見られない ATL 細胞でも NF-κB 制御下の遺伝子の発現は亢進している。このように、患者個体内で Tax や NF-κB は、絶妙な発現バランスを成立させることで、60 年の潜伏期間を経て、5% の感染者が ATL を発症すると考えられる。

ATL 以外のバーキットリンパ腫 (BL) やホ

ジキンリンパ腫 (HL) でも NF-κB の活性化が発症・進展に重要なことは知られており、BL や HL の原因ウイルスである EBV の LMP-1 や HL で高発現している TNF 受容体ファミリー-CD30 が NF-κB の活性化に関与している。

2. 研究の目的

合理的な NF-κB の活性化が ATL の発症・進展に不可欠であると考えられており、この制御に IκB-ζ が関与しているのではないかと予想した。本研究では、ATL における IκB-ζ の発現を検討し、その発現制御機構や役割を解析した。さらに、その発症・進展に NF-κB の活性化が重要なことが知られている BL や HL においても IκB-ζ の発現や機能について同様に検討した。

3. 研究の方法

(1) IκB-ζ の発現制御機構の解析: HTLV-1 感染 T 細胞株、非感染 T 細胞株、EBV 感染 BL 細胞株、非感染 BL 細胞株、HL 細胞株、健常人及び ATL 患者末梢血単核球 (PBMC) の IκB-ζ の発現は RT-PCR 法やウェスタンブロット法で解析した。ATL、HL、BL のリンパ節における IκB-ζ の発現を免疫染色で検討した。Tax や LMP-1、CD30 による IκB-ζ の発現誘導を RT-PCR 法で検討し、その発現制御機構を種々の発現プラスミドを用いたレポーターアッセイにより解析した。さらにゲルシフトアッセイにより IκB-ζ の転写に重要な因子を同定するとともに、シグナル伝達阻害剤を用いて、転写に重要なシグナル伝達経路を明らかにした。

(2) IκB-ζ の機能解析: 非感染 T 細胞株 Jurkat に IκB-ζ 発現プラスミドを導入し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。RT-PCR 法により、IκB-ζ 制御遺伝子の発現を確認するとともに、IκB-ζ による遺伝子発現制御機構をレポーターアッセイで解析した。IκB-ζ の変異体を用いて、遺伝子発現制御に関わる領域を同定するとともに、IκB-ζ 遺伝子のノックダウンによる影響も検討した。さらに IκB-ζ と Tax の相互作用についても解析した。

4. 研究成果

(1) IκB-ζ の発現: HTLV-1 感染 T 細胞株、EBV 感染 BL 細胞株、CD30 陽性 HL 細胞株で IκB-ζ の高発現を認めた。一方、非感染 T 細胞株や非感染 BL 細胞株では IκB-ζ の発現は見られなかった。T 細胞株では Tax の発現と IκB-ζ の発現は相関しており、BL 細胞株では LMP-1 の発現と IκB-ζ の発現が相関していた。PBMC の解析では、健常人に比べて ATL 患者で IκB-ζ の発現は増強しており、免疫染色で ATL、BL、HL のリンパ節の腫瘍細胞の核内に IκB-ζ の発現を認め、T 細胞株でも核内に IκB-ζ の発現を認めた。

(2) Tax, LMP-1, CD30 による I $\kappa$ B- $\zeta$  の発現誘導機構: Tax や LMP-1, CD30 は I $\kappa$ B- $\zeta$  の発現を転写レベルで誘導した。一方, HTLV-1 の発がん機構に重要な HBZ は I $\kappa$ B- $\zeta$  の発現を誘導しなかった。Tax の変異体を用いた解析から, NF- $\kappa$ B 活性化と CREB 活性化が I $\kappa$ B- $\zeta$  の発現誘導に必要なことがわかった。また, LMP-1 や CD30 の変異体による解析では, 細胞内に局在する C 末端の TRAF 結合領域が重要であった。優性抑制変異体を用いた解析から Tax, LMP-1, CD30 による NIK-IKK-NF- $\kappa$ B 経路の活性化が I $\kappa$ B- $\zeta$  の転写制御に重要であり, LMP-1 や CD30 は TRF2 の活性化も必要であった。I $\kappa$ B- $\zeta$  のプロモーター解析からは, 2つの NF- $\kappa$ B 結合配列 ( $\kappa$ B1 及び  $\kappa$ B2) への NF- $\kappa$ B ファミリー蛋白質の結合の誘導が必須であり,  $\kappa$ B2 配列の方がより重要であった。NF- $\kappa$ B 阻害剤は, HTLV-1 感染 T 細胞株の I $\kappa$ B- $\zeta$  発現を阻害した。

(3) T 細胞における I $\kappa$ B- $\zeta$  制御遺伝子の同定: Jurkat に I $\kappa$ B- $\zeta$  発現プラスミドを導入したマイクロアレイ解析では, 予想された NF- $\kappa$ B 制御遺伝子 Bcl-3 に加えて, IFN 応答遺伝子 (STAT-1, GBP-1, -2, -5, IFIT3, IFI44L, IFI27 等) の発現誘導を認めた。レポーターアッセイによる解析から, I $\kappa$ B- $\zeta$  は Bcl-3 エンハンサー領域に存在する NF- $\kappa$ B 結合配列を介して, Bcl-3 遺伝子の転写を活性化した。I $\kappa$ B- $\zeta$  の変異体を用いた解析から, Bcl-3 の発現誘導には, I $\kappa$ B- $\zeta$  の NF- $\kappa$ B 結合領域, 核移行シグナル, 転写活性化ドメインが重要であった。また, I $\kappa$ B- $\zeta$  は STAT-1 遺伝子や IFN 応答配列 (ISRE) 依存性に GBP-1 遺伝子の転写を活性化した。HTLV-1 感染 T 細胞株を用いて, I $\kappa$ B- $\zeta$  遺伝子ノックダウンを行うと Bcl-3 や GBP-1 の発現が抑制されたことから, これらの遺伝子発現への I $\kappa$ B- $\zeta$  の関与が確認された。なお, Tax も STAT-1 や GBP-1 遺伝子の転写を活性化した。

(4) I $\kappa$ B- $\zeta$  の二面性功能: Bcl-3 や iNOS 遺伝子の転写は Tax によっても活性化され, I $\kappa$ B- $\zeta$  は Tax や RelA 依存性の Bcl-3 遺伝子や Tax 依存性の iNOS 遺伝子の転写活性化を増強した。しかしながら, I $\kappa$ B- $\zeta$  は Tax による自身の遺伝子転写活性化を抑制した。さらに Tax 依存性の IL-8 遺伝子の転写活性化も I $\kappa$ B- $\zeta$  は抑制した。また, Tax や RelA 依存性の NF- $\kappa$ B 活性化や Tax 依存性の AP-1 活性化並びに HTLV-1 のプロモーター活性化も抑制した。LMP-1 や CD30, RelA 依存性の IL-6, IL-8 遺伝子の転写活性化も I $\kappa$ B- $\zeta$  は抑制した。さらに, LMP-1, CD30, RelA 依存性の I $\kappa$ B- $\zeta$  遺伝子活性化や NF- $\kappa$ B 活性化も I $\kappa$ B- $\zeta$  は抑制した。なお, I $\kappa$ B- $\zeta$  と Tax の会合に関して, 293T 細胞に I $\kappa$ B- $\zeta$  発現プラスミドと Tax 発現プラスミドを導入し, 免疫沈降法にて会合を認めた。さらに HTLV-1 感染 T 細胞株でも両蛋白質の会合を確認した。

変異体を用いた解析から会合には I $\kappa$ B- $\zeta$  の 188-456 アミノ酸が必須であった。

ウイルス遺伝子 (Tax, LMP-1) や TNF 受容体ファミリー (CD30) により NF- $\kappa$ B 依存性に発現が誘導される I $\kappa$ B- $\zeta$  は, NF- $\kappa$ B や他の因子との相互作用を介して NF- $\kappa$ B 制御遺伝子 (Bcl-3 や iNOS) や IFN 制御遺伝子 (STAT-1 や GBP-1) の転写を亢進する。一方, I $\kappa$ B- $\zeta$  は Tax, LMP-1, CD30 依存性の IL-8 や IL-6 遺伝子の転写を抑制する。さらに, 自身の遺伝子転写活性も I $\kappa$ B- $\zeta$  は抑制する。また, I $\kappa$ B- $\zeta$  は Tax, LMP-1, CD30 依存性の NF- $\kappa$ B 活性化や HTLV-1 プロモーター活性化も抑制することから, 過剰な NF- $\kappa$ B 活性化やウイルス遺伝子の発現を減弱し, 巧妙にフィードバックを行いながら, 発がんを制御していると考えられる。ATL においては, Tax の発現が見られない状況下で, I $\kappa$ B- $\zeta$  が代替的に iNOS, Bcl-3, GBP-1, STAT-1 等の発現を制御している可能性も示唆される (図 2)。

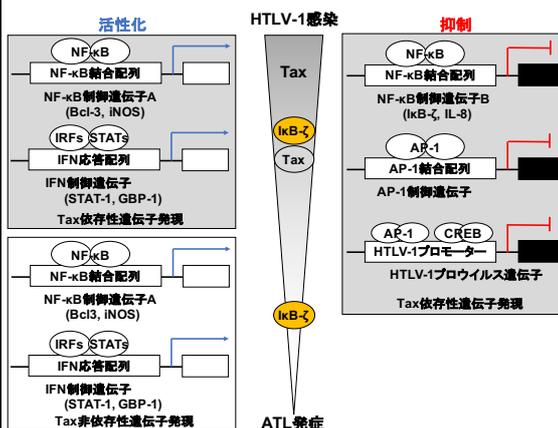


図 2 ATL 発症・進展における I $\kappa$ B- $\zeta$  の役割

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Ishikawa C, Senba M, Mori N. Efficiency of AUY922 in mice with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncol Lett*. 査読有. In press.
- ② Ishikawa C, Senba M, Mori N. Induction of I $\kappa$ B- $\zeta$  by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 and CD30. *Int J Oncol*. 査読有. 2015;47:2197-2207. DOI:10.3892/ijo.2015.3218
- ③ Ishikawa C, Senba M, Barnes BJ, Mori N. Constitutive expression of IRF-5 in HTLV-1-infected T cells. *Int J Oncol*. 査読有. 2015;47:361-369. DOI:10.3892/ijo.2015.3020

- ④ Mori N, Ishikawa C, Senba M. Activation of PKC- $\delta$  in HTLV-1-infected T cells. *Int J Oncol*. 査読有. 2015;46:1609-1618. DOI: 10.3892/ijo.2015.2848
- ⑤ Kimura R, Mori N. Abundant expression of HMGB1 in human T-cell lymphotropic virus type I-infected T-cell lines and high plasma levels of HMGB1 in patients with adult T-cell leukemia. *Oncol Lett*. 査読有. 2014;7:1239-1242. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3961453/>
- ⑥ Kimura R, Senba M, Cutler SJ, Ralph SJ, Xiao G, Mori N. Human T cell leukemia virus type I Tax-induced I $\kappa$ B- $\zeta$  modulates Tax-dependent and Tax-independent gene expression in T cells. *Neoplasia*. 査読有. 2013;15:1110-1124. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3769889/>
- ⑦ Mori N, Ishikawa C, Uchihara JN, Yasumoto T. Protein phosphatase 2A as a potential target for treatment of adult T cell leukemia. *Curr Cancer Drug Targets*. 査読有. 2013;13:829-842. <http://www.eurekaselect.com/115065/article>
- ⑧ Ishikawa C, Mori N. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces CD69 expression through activation of nuclear factor- $\kappa$ B. *Int J Oncol*. 査読有. 2013;42:1786-1792. DOI: 10.3892/ijo.2013.1871
- ⑨ Ishikawa C, Kawakami H, Uchihara JN, Senba M, Mori N. CD69 overexpression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax transactivation. *Biochim Biophys Acta*. 査読有. 2013;1833:1542-1552. DOI:10.1016/j.bbamcr.2013.03.006

[学会発表] (計19件)

- ① Mori N, Ishikawa C. Inhibition of proliferation and survival of HTLV-1-infected T-cell lines by peridin. 第63回日本ウイルス学会学術集会、2015年11月22日~24日、福岡国際会議場 (福岡市)
- ② Ishikawa C, Mori N. Activity of the novel dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 against ATL. 第63回日本ウイルス学会学術集会、2015年11月22日~24日、福岡国際会議場 (福岡市)
- ③ Mori N, Ishikawa C. Pim-3 kinase as a therapeutic target for ATL. 第77回日本血液学会学術集会、2015年10月16日~18日、石川県立音楽堂、他 (金沢市)
- ④ Mori N, Ishikawa C. Pim-3 kinase as a therapeutic target for ATL. 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日~10日、名古屋国際会議場 (名古屋市)
- ⑤ Ishikawa C, Mori N. Activity of the novel dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 against ATL. 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日~10日、名古屋国際会議場 (名古屋市)
- ⑥ 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、2015年8月21日~23日、東京大学医科学研究所講堂 (東京都港区)
- ⑦ 森直樹、石川 千恵、EB ウイルス LMP-1 タンパク質による NF- $\kappa$ B 制御因子 I $\kappa$ B- $\zeta$  の発現誘導、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日~12日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑧ 石川 千恵、森直樹、フラボノイド類化合物ブテインの抗成人 T 細胞白血病効果、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日~12日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑨ Mori N, Ishikawa C. PKC- $\delta$  activation in HTLV-1-infected T cells. 第76回日本血液学会学術集会、2014年10月31日~11月2日、大阪国際会議場 (大阪市)
- ⑩ Mori N, Ishikawa C. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1- and CD30-induced I $\kappa$ B- $\zeta$ . 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日~27日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑪ Ishikawa C, Mori N. Anti-adult T-cell leukemia effects of natural flavonoid, butein. 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日~27日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑫ 森直樹、石川 千恵、フラボノイド類化合物ブテインの抗成人 T 細胞白血病効果、第1回日本 HTLV-1 学会学術集会、2014年8月22日~24日、東京大学医科

学研究所講堂（東京都港区）

- ⑬ 石川 千恵、森 直樹、HTLV-1 感染 T 細胞株における恒常的 IRF5 発現、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸国際会議場（神戸市）
- ⑭ Mori N, Ishikawa C. Protein phosphatase 2A as a potential target for treatment of adult T cell leukemia. 第 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 11 日～13 日、ロイトン札幌、他（札幌市）
- ⑮ Ishikawa C, Mori N. Constitutive expression of IRF-5 in HTLV-1-infected T-cell lines. 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日～5 日、パシフィコ横浜（横浜市）

〔図書〕（計 2 件）

- ① Senba M, Mori N. Mechanisms of cancer formation under interplay between host immunity and human papillomavirus (HPV) infection. In Watanabe HS, editor. Horizons in Cancer Research. Vol. 61. New York: Nova Science Publishers, 2016: 19-70.

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：抗ウイルス剤

発明者：森直樹、只野昌之、玉城和美、仲間真司

権利者：株式会社武蔵野免疫研究所、国立大学法人琉球大学

種類：特許

番号：特許第 5610131 号

取得年月日：平成 26 年 9 月 12 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3.u-ryukyu.ac.jp/virology/Home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 直樹 (MORI, Naoki)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10220013