

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06806

研究課題名(和文) ヒトT細胞白血病ウイルス感染症モデルマウスにおけるDokファミリー分子の発現解析

研究課題名(英文) Expression analysis of Dok-1, Dok-2 and Dok-3 genes in mice expressing Tax, a human T-cell leukemia virus type 1 oncoprotein

研究代表者

大杉 剛生 (Ohsugi, Takeo)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：00211102

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)：最近、がん抑制遺伝子と考えられているDokファミリー分子、Dok-1、Dok-2およびDok-3の発現が成人T細胞白血病(ATL)に關与しているか検索した。ATL細胞株ではDok-2およびDok-3の発現低下が顕著であり、ATLのモデル動物(HTLV-1 Tax発現マウス)でも同様の結果を得た。本研究から、ATL発症には少なくともDok-2およびDok-3が關与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) can cause adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). The Tax protein encoded by HTLV-1 appears to be a key element in the early stage of ATL development. We examined the expression of the downstream of tyrosine kinase (Dok) family members Dok-1, Dok-2 and Dok-3, recently reported to be tumor suppressors, in HTLV-1-infected T cells and transgenic mice expressing the tax gene. Dok-2 and Dok-3 expression was significantly reduced in HTLV-1-infected T cells compared with their expression in uninfected T cells, and the expression of Dok-3 was reduced by the induction of Tax expression in T cells. The transgenic mice showed low expression of Dok-1, Dok-2 and Dok-3 in mice with T cell leukemia. Mice showed low Dok-2 expression at 5-6 months of age before disease onset. These results suggest that downregulation of Dok-2 and Dok-3 by the expression of the viral tax gene is the first step in the development of ATL.

研究分野：実験動物学

キーワード：HTLV-1 Tax 成人T細胞白血病 Dok-1 Dok-2 Dok-3

1. 研究開始当初の背景

ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-1)は、約60年もの長い潜伏期間の後、感染キャリアのおおよそ5%に腫瘍性疾患である成人T細胞白血病(Adult T-cell leukemia: ATL)、0.3%に炎症性疾患であるHTLV-1関連脊髄症/熱帯瘧疾性麻痺(HAM/TSP)を引き起こす。その他、ぶどう膜炎、リウマチ様関節炎、シェーグレン症候群、多発性筋炎、気管支肺症などの自己免疫性疾患との関連も疑われている。

このウイルスは、*pX*と呼ばれる特異な領域をもち、*Tax* 遺伝子をコードする。多くの *in vitro* の研究から、この遺伝子産物 *Tax* がこれら疾患の発症に重要な役割を果たしていることが示唆されてきた。我々は、*Tax* を成熟T細胞に発現する *Tax* トランスジェニック(Tg)マウスを作製し、*Tax* が成熟T細胞白血病を引き起こすことを証明した(Ohsugi et al., Nat Med, 2007)。また、マウスの繁殖コロニー拡大中に、炎症性の関節炎など多様な疾患を認め、ヒトのHTLV-1感染症と類似していることを明らかにしてきた(Ohsugi & Kumasaka, PLoS One, 2009; Ohsugi et al., Oncol Res, 2013,)。

ヒトにおいてHTLV-1の感染から主要な疾患であるATL発症に至るまでには、推計学的に4~5つのイベントが必要とされる。平成24-26年度の科研費で実施した白血病を発症したマウスと同腹の未発症マウスの網羅的遺伝子解析によって、チロシンキナーゼの共通基質であるDokファミリー分子(Dok-1、Dok-2、Dok-3)の発現低下を認めた。

Dokファミリー分子は、現在Dok-1~7まで同定されており、そのうちDok-1、Dok-2およびDok-3は、血球系細胞に主に発現し、がん抑制遺伝子と考えられている(Berger et al., Nat Genet, 2010)。この遺伝子群の低下が白血病化によって発現が低下しているのか、発現低下により白血病化が進むのか検討する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

Dokファミリー分子のうちDok-1~3までは血球系細胞に主に発現し、Ras-Erk経路を抑制することにより、がん抑制遺伝子として働くと考えられている。Dokファミリー分子は、がん抑制遺伝子として注目されつつあるが、HTLV-1感染症に関しては報告がない。我々は、*Tax* 発現Tgマウス由来白血病細胞およびHTLV-1感染細胞株において網羅的遺伝子解析によって予備的にはあるが観察していた。

そこで本研究においてはHTLV-1がコードする*Tax* タンパクがDokファミリー分子の発現に影響を与えるのかどうか、ヒトHTLV-1細胞株および*Tax* 発現Tgマウスを用いて詳細に解析した。

3. 研究の方法

1) HTLV-1細胞株におけるDok遺伝子の発現

①HTLV-1細胞株でのDok-1, 2, 3の発現
代表的HTLV-1細胞株3株を用いた。2株はウイルスを発現している試験管内でトランスフォームされたMT-2およびHUT-102で、1株は患者由来でATL患者同様ウイルスを発現していないTL-0m1である。対照としてHTLV-1に感染していないT細胞株、Jurkatを用いた。

Isospin(Nippon ジーン)でRNAを抽出、cDNA合成(TOYOBO)後、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(TOYOBO)を用いてLightCycler480(Roche)でDok遺伝子の発現を定量した。

②HTLV-1TaxのDok発現に与える影響

Dok遺伝子の発現にHTLV-1の*pX*領域から発現する*Tax*が関与しているのか検討するため、metallothioneinプロモーター下流に*Tax*遺伝子をつないだコンストラクトをJurkat細胞に導入したJPK-9細胞を用いて解析した。培養液に30μM/L以上のCdCl₂を添加することにより*Tax*遺伝子を発現する。JPK-9細胞にCdCl₂を0から100μM/Lになるように添加し、上記したreal-time PCRによりDok遺伝子の発

現を定量した。

2) Tax 発現 Tg マウスにおける解析

①Tax 発現 Tg マウスにおける *Dok* 遺伝子発現
我々が作製した LcK-distal プロモーター下流に HTLV-1 *Tax* 遺伝子をつないだコンストラクトを導入したマウスは、成熟 T 細胞に *Tax* 遺伝子を発現し、12 か月齢以上において約 20% のマウスに T 細胞白血病を引き起こす (Ohsugi et al., Nat Med, 2007)。このマウスの解析から 12 か月齢前に p53 の機能低下が起こり、12 か月齢をすぎると NF- κ B の活性化が起こる (Ohsugi et al., Carcinogenesis, 2013)。このマウスを用いて、白血病発症マウス、HAM 様症状をしめす組織球肉腫 Ohsugi et al., Oncol Res, 2013) について解析した。

Dok 遺伝子の定量は、HTLV-1 細胞株での real-time PCR と同様に実施した。

②*Dok* 遺伝子発現の遺伝的背景の違いによる差

上記 Tax 発現 Tg マウスの遺伝的背景は、C57BL/6 マウスであった。我々は、BALB/c マウスにバッククロスした Tax 発現 Tg マウスを作製していたので、このマウスについても同様に解析した。

4. 研究成果

1) HTLV-1 細胞株における *Dok* 遺伝子の発現

①HTLV-1 細胞株での *Dok-1, 2, 3* の発現

各細胞株の *Tax*、*Dok-1*、*2* および *3* の発現を解析した (図 1)。 *Tax* の発現は従来の報告と同様であり、患者由来の細胞株 TL-Om1 では *Tax* の発現はみられなかった。次に、HTLV-1 に感染していない T 細胞株、Jurkat での発現を 1 としたときの各細胞株の *Dok* 遺伝子の発現を調べた。 *Dok-1* では各細胞株に差は認められなかった。一方、*Dok-2* と *Dok-3* では HTLV-1 感染細胞株で有意な低下が観察された。

②HTLV-1 Tax の *Dok* 発現に与える影響

HTLV-1 Tax が *Dok* 遺伝子を低下させるのか、CdCl₂ 存在下で Tax を発現する JPX9 細胞を用いて検討した。 Jurkat 細胞および JPX9 細胞の CdCl₂ 非添加では各 *Dok* 遺伝子発現に差は

見られなかった。 T、B 細胞、骨髄球で *Dok* 遺伝子発現には差がみられ、 T 細胞には *Dok-1* および *Dok-2* が発現し、 *Dok-3* 発現はみられないと報告されているが、 T 細胞の標準株と考えられている Jurkat 細胞では *Dok-3* の発現が他のものと同等に発現していた。

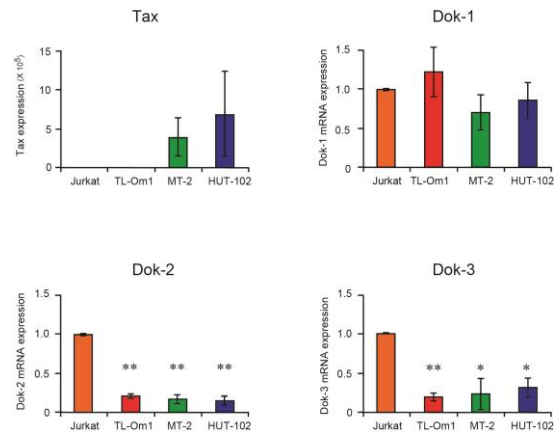


図 1. HTLV-1 細胞株における *Dok* 遺伝子の発現

次に、CdCl₂ を各濃度添加し、48 時間後に *Dok* 遺伝子発現を定量した (図 2)。 *Tax* は 30 μ M/L 以上で発現が上昇した。 *Dok-1* は *Tax* 遺伝子の発現にかかわらずほぼ一定であり、 *Dok-2* も逆に高い傾向があるものの有意差は認められなかった。一方、 *Dok-3* は *Tax* の発現とともに減少し、30 および 50 μ M/L の添加では有意差がみとめられた。

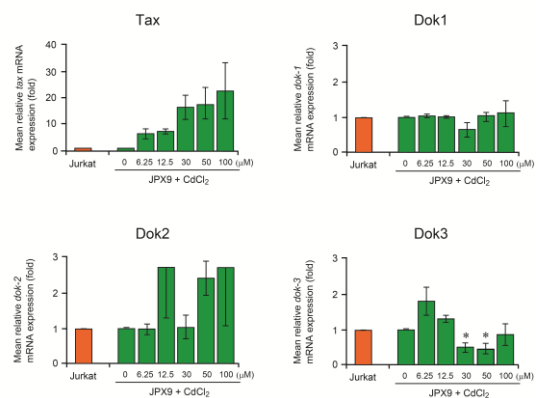


図 2. Tax 誘導による *Dok* 遺伝子発現抑制

以上のことから細胞株を用いた実験では、HTLV-1 感染細胞株は 2 および 3 が低下しており、 *Dok* 遺伝子の低下が ATL 発症に関与していることが示唆された。

また、白血病発症に重要と考えられている HTLV-1 *Tax* 遺伝子は *Dok-3* 遺伝子を低下させることが明らかとなった。

2) *Tax* 発現 Tg マウスにおける解析

① *Tax* 発現 Tg マウスにおける *Dok* 遺伝子発現細胞株での実験を踏まえ、*Tax* 発現 Tg マウスでの *Dok* 遺伝子の動態を観察した。白血病、組織球肉腫および同腹の非発症マウス (*Tax*(+))、ほぼ同じ月齢の *Tax*(-) マウスを対照とした。*Tax* の発現は、非発症マウスが高く、組織球肉腫を発症したマウスでは 20% 以下であった (図 3、a)。脾臓のリンパ球のサブセットを FACS で解析したところ、白血病細胞は T 細胞系、組織球肉腫は非リンパ球系であった (図 3、b)。各マウスの *Dok* 遺伝子発現をみたところ、白血病、組織球肉腫での *Dok* 遺伝子の低下が顕著であった (図 3、c)。また、発症前のマウスでは *Dok-2* のみ低下していた (図 3、c)。

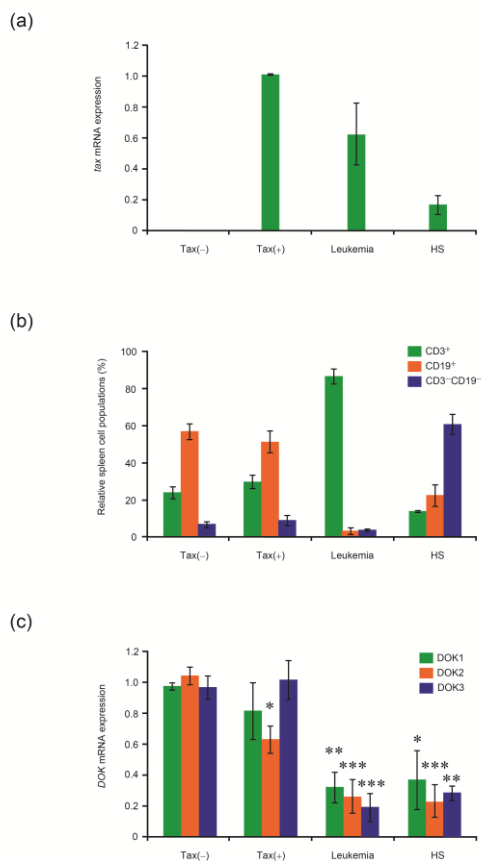


図 3. 白血病、組織球肉腫を引き起こした *Tax* 発現マウスにおける *Dok* 遺伝子発現の低下

Dok-1, *2* および *3* をノックアウトしたマウスは組織球肉腫を発症することが知られており (Mashima, et al., Lab Invest, 2010)、*Tax* 発現 Tg マウスの組織球肉腫の発症に *Dok* 遺伝子の発現低下は、なんらかの関係があるのかもしれない。また、*Dok* 遺伝子は肺癌との関連も指摘され、とくに *Dok-2* が重要であることが示唆されている (Berger, et al., Nat Genet, 2010)。

白血病発症前に有意に低下している *Dok* 遺伝子があるか検討するため、非発症マウスの 5-6 か月齢、8-10 か月齢および 12-13 か月齢の 3 群のマウスについて *Dok* 遺伝子の発現を検索した。対照としては、同月齢の *Tax*(-) マウスを用いた (図 4)。 *Dok-1*, *2* および *3* ともに対照マウスと比べて、低下の傾向はあるものの、*Dok-1* および *Dok-3* では有意差は認められなかった。一方、*Dok-2* では、5-6 か月齢ですでに有意に低下しており、各月齢で有意に低下していた (図 4、b)。

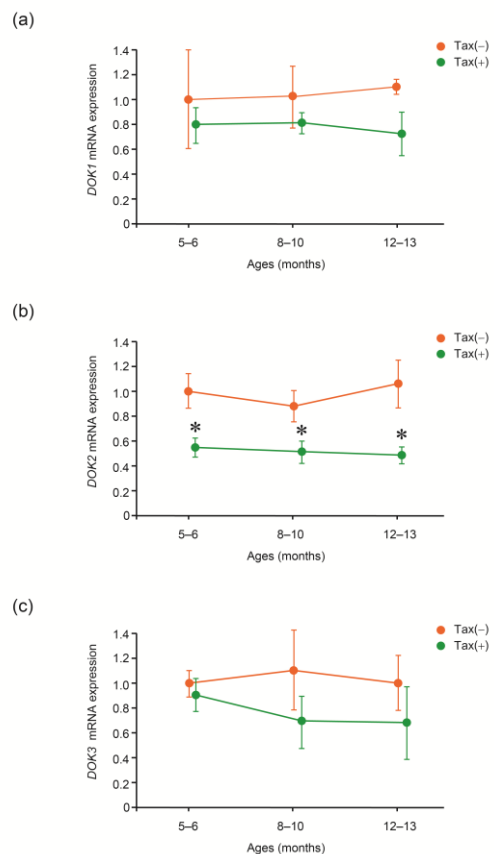


図 4. *Tax* 発現 Tg マウスにおける各 *Dok* 遺伝子の加齢による推移

② *Dok* 遺伝子発現の遺伝的背景の違いによる差

遺伝的背景が BALB/c マウスである Tax 発現マウスの *Dok* 遺伝子について 9-12 か月齢のマウスで調べたところ *Dok-2* の低下はみられず、*Dok-3* の有意な低下を認めた。BALB/c マウス自体の *Dok* の発現をみたところ、*Dok-2* が他のマウス系統に比し、5 倍程度高い傾向がみられ、各マウス系統において系統差があることが明らかとなった。

結論

- ① HTLV-1 感染細胞株ではチロシンキナーゼの共通基質である *Dok* ファミリー分子 (*Dok-1*、*Dok-2*、*Dok-3*) の発現低下を認めた。
- ② Tax をヒト T 細胞株に発現させると *Dok-3* の低下が観察された。
- ③ HTLV-1 Tax を発現するマウスで白血病および組織球肉腫を発症したマウスでは *Dok-1*、*Dok-2*、*Dok-3* の発現低下が顕著であった。
- ④ Tax 発現 Tg マウスは、12 か月齢以降に白血病を発症するが、発症前の 5 か月齢ですでに *Dok-2* の発現低下を認めた。
- ⑤ Tax 発現マウスでは遺伝的背景の違いによって異なった *Dok* 遺伝子の低下が明らかになり、今後マウス系統についても検討する必要があると思われる。
- ⑥ 以上、HTLV-1 が関与する白血病発症に *Dok* 遺伝子が関与することが明らかになった。

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 5 件)

- ① Ohsugi, T. : Effects of expressing human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) oncoprotein Tax on DOK1, DOK2 and DOK3 gene expression in mice. J. Vet. Med. Sci., 79:935-938, 2017.
- ② Makoto Yamagishi, Makoto Hori, Dai Fujikawa, Daisuke Honma, Nobuaki Adachi, Takeo Ohsugi, Kazumi Nakano,

Makoto Nakashima, Seiichiro Kobayashi, Masako Iwanaga, Atae Utsunomiya, Seiji Okada, Kunihiro Tsukasaki, Kensei Tobinai, Kazushi Araki, Toshiki Watanabe and Kaoru Uchimaru : Development and Molecular Analysis of Synthetic Lethality By Targeting EZH1 and EZH2 in Non-Hodgkin Lymphomas. Blood. 128: 462, 2016.

- ③ Ohsugi, T., Wakamiya, M., Morikawa, S. and Fujita, M. : Expression of DOK1, 2, and 3 genes in HTLV-1-infected T cells. Acta Virol., 60: 211-213, 2016.
- ④ Higuchi, S., Yamada, R., Hashimoto, A., Miyoshi, K., Yamashita, K. and Ohsugi, T. : Evaluation of a combination of alfaxalone with medetomidine and butorphanol for inducing surgical anesthesia in laboratory mice. Jpn. J. Vet. Res., 64: 131-139, 2016.
- ⑤ 大杉剛生 : 成人 T 細胞白血病 (ATL) 治療の最前線—抗 CCR4 抗体の憂鬱—. 日本ウイルス学会北海道支部報, 46: 2-6, 2015.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 塚本依子、山田典英、三好健二郎、山下和人、大杉剛生 : アルファキサロンを用いた新規混合麻酔薬の各マウス系統での評価。第 65 回日本実験動物学会総会 平成 30 年 (2018 年) 5 月 16-18 日富山市、富山県民会館
- ② 大杉剛生、長野佑祐、田中 雄三、小塚友喜、西井里衣、山岸 誠、渡邊俊樹 : タモキシフェンによる HTLV-1 感染細胞増殖抑制。第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017 年 10 月 24~26 大阪
- ③ 山岸 誠、堀 真琴、藤川 大、本間 大輔、安達 宣明、大杉 剛生、中野 和民、中島 誠、小林 誠一郎、岩永 正子、宇都宮 與、岡田 誠治、塚崎 邦弘、飛内 賢正、荒木 一司、渡邊 俊樹、内丸 薫 : EZH1/2 阻害による悪性リンパ腫のエピゲノム制御 第 79 回日本血液学学術集会 2017 年 10 月 20 日~22 日 東京国際フォーラム、東京
- ④ 長野佑祐、西井里衣、小塚友樹、田中雄三、大杉剛生 : 成人 T 細胞白血病 (ATL) モデルマウスにおけるタモキシフェンの

- 効果。第 14 回北海道実験動物研究会・学術集会 2017 年 7 月 8 日 網走市
- ⑤ 山田典英、塚本依子、山田 陸、三好健二郎、山下和人、大杉剛生：アルファキサロン、メデトミジン、ブトルファノール三種混合麻酔薬の実験用マウスにおける性差および系統差。第 64 回日本実験動物学会総会 2017 年 5 月 25-27 日 福島
- ⑥ Yamagishi, M., Hori, M., Fujiwara, D., Honma, D., Adachi, N., Ohsugi, T., Nakano, K., Nakashima, M., Kobayashi, S., Iwanaga, M., Utsunomiya, A., Tanaka, Y., Okada, S., Tsukasaki, K., Toninai, K., Araki, K., Watanabe, T. and Uchimaru, K. 2017. Development and molecular analysis of synthetic lethality by targeting EZH1/2 in ATL and HTLV-1-infected cells. 18th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, March 7-10, Tokyo, Japan.
- ⑦ Tanaka, Y., Kozuka, T., Yamagishi, M., Hirose, T., Nagano, Y., Nishii, R., Kitamura, H., Takehana, K., Watanabe, T. and Ohsugi, T. 2017. Tamoxifen inhibits the infiltration of human T-cell leukemia virus type 1-infected cells into organs in a mouse model of adult T-cell leukemia. 18th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, March 7-10, Tokyo, Japan.
- ⑧ Makoto Yamagishi, Makoto Hori, Dai Fujikawa, Daisuke Honma, Nobuaki Adachi, Takeo Ohsugi, Kazumi Nakano, Makoto Nakashima, Seiichiro Kobayashi, Masako Iwanaga, Atae Utsunomiya, Seiji Okada, Kunihiro Tsukasaki, Kensei Tobinai, Kazushi Araki, Toshiki Watanabe, Kaoru Uchimaru : Development and Molecular Analysis of Synthetic Lethality By Targeting EZH1 and EZH2 in Non-Hodgkin Lymphomas 58th American Society of Hematology, December 3-6, 2016 San Diego, CA, USA.
- ⑨ 山岸 誠、藤川 大、大杉 剛生、本間 大輔、安達 宣明、堀 真琴、中川 翔太、中野 和民、小林 誠一郎、田中 勇悦、岩永 正子、宇都宮 與、塚崎 邦弘、荒木 一司、内丸 薫、渡邊 俊樹： Epigenetic landscape in adult T cell leukemia-lymphoma (ATL); proof of concept for targeting EZH1/2 第 78 回日本血液学学術集会 10 月 13 日～15 日、パシフィコ横浜、横浜 2016
- ⑩ 山田 陸、樋口翔太、橋本麻美、三好健二郎、山下和人、大杉剛生：アルファキサロン、メデトミジン、ブトルファノール三種混合麻酔薬のマウスへの応用 第 63 回日本実験動物学会総会、5. 18-20、川崎、2016 年
- ⑪ 大杉剛生：成人 T 細胞白血病のモデルマウスの進展。第 12 回北海道実験動物研究会 2015 年 7 月 11 日北海道大学医学部講義棟
6. 研究組織
(1) 研究代表者
大杉 剛生 (OHSUGI, Takeo)
酪農学園大学・獣医学群・教授
研究者番号：00211102