

令和元年6月26日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06848

研究課題名(和文) ATLの造腫瘍性をコントロールするAKTシグナル：活性化と不均一性の新規制御機構

研究課題名(英文) AKT signaling in control of ATL tumorigenicity; unveiled mechanism for its heterogenous activation among ATL cell populations

研究代表者

山口 壹範 (Yamaguchi, Kazunori)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・発がん制御研究部・上席主任研究員

研究者番号：80373215

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)：難治性の血液腫瘍であるATLは、HTLV-1感染により発症するが、感染後のシグナル伝達機構異常などの実態は充分には明らかにされていない。申請者はこれまで、ATL由来の細胞株、TL-0m1とST1から、造腫瘍能が高い細胞集団を分画し、この集団でAKTシグナルが活性化していることを見出した。本研究では、高造腫瘍性ATL細胞におけるAKT活性化の機構解明に取り組み、AKTシグナルの抑制因子、PIK3IP1とINPP5Dが不活性化されていることを見出した。また、AKTシグナルの活性化を担うAKTリン酸化酵素がこれまで報告されていない酵素である可能性を示唆するデータを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HTLV-1ウイルス感染者は西日本を中心に数十万から百万人程度で、この内の5%程度がATLを発症すると推定されている。発症後の治療法として骨髄移植と抗CCR4抗体治療が知られているが適用の年齢制限や抵抗性などの問題があり、新たな治療法の開発が望まれている。本研究はATL悪性化の一因としてAKTシグナル伝達系の活性化に着目し、その分子機構の解明を試みたもので、その成果は新たな治療戦略への寄与が期待される。

研究成果の概要(英文)：Human retrovirus HTLV-1 is an etiological agent for Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL), but additional cellular events such as aberrant modulation of signal transduction taking place for several decades after the initial HTLV-1 infection are totally unveiled. Previously we obtained highly tumorigenic populations of ATL-derived ST1 and TL-0m1 cells and found these cell populations exhibited an activated AKT signaling pathway, which may contribute to the malignancy observed in the ATL-derived cells. In this study we analyzed molecular mechanism underlying upregulation of AKT signaling in the highly tumorigenic ATL cells and found that PIK3IP1 and INPP5D, negative regulators for AKT signaling, are both inactivated in these cells. In addition, our observations suggest that activating phosphorylation of AKT might be accomplished by atypical kinase(s) in ATL cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：成人T細胞白血病 AKTシグナル

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

1. 研究開始当初の背景

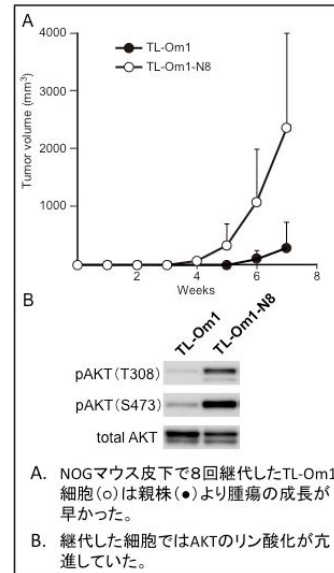
(1) 難治性の血液腫瘍である ATL は、ウイルス HTLV-1 の感染から数十年の潜伏期間を経て発症に至る。発症までには、ウイルス由来のがん遺伝子 (Tax, HBZ) 以外に宿主側のゲノム、エピゲノム異常の蓄積が必要と考えられているが、その実態は充分には明らかにされておらず、このため有望な治療標的としては唯一 CCR4 が知られているのみである。

(2) 申請者は、ATL 由来の細胞株、TL-Om1 および ST1 から、2つの手法 免疫不全 NOG マウス皮下で継代移植を繰り返す、表面抗原 (CADM1、CA9) の発現で細胞をソーティングする により、4種の極めて造腫瘍能 (NOG マウス皮下での腫瘍形成能) が高い sub population を分画することに成功し、その解析から、以下の知見を得ていた。

4種の sub population すべてにおいて、AKT のリン酸化が亢進していた (図参照)。

AKT 活性化変異体の導入により造腫瘍能が亢進した。逆に AKT シグナル阻害剤の投与で腫瘍形成が抑制された。

AKT シグナルの抑制因子、PIK3IP1 (PI3 キナーゼ (PI3K) の活性サブユニットと結合) と INPP5D (イノシトール三リン酸 (PIP3) の脱リン酸化酵素) の発現が、sub population で低下していた。さらに ATL 細胞でこれらの発現を siRNA により抑制すると AKT のリン酸化が亢進した。これらから、PIK3IP1 と INPP5D が AKT シグナルの制御に関与していると考えられた。



以上から ATL 細胞の造腫瘍性に AKT シグナルの活性化が重要な役割を果たすこと、細胞集団のうち、一部の高造腫瘍性細胞集団でシグナルが活性化されていること、PIK3IP1 と INPP5D がその制御を担っていること、が示唆された。

2. 研究の目的

ATL の発症・悪性転化の分子機構解明のため、ATL の造腫瘍能を規定している AKT シグナルの活性化機構を解明し、その臨床上的意義と治療応用への可能性を検討することを目的とした。具体的には高造腫瘍性 ATL 細胞において AKT シグナル制御への関与が示された PIK3IP1 と INPP5D 遺伝子の発現制御機構の解析と、AKT シグナル活性化に重要な AKT のリン酸化を担うリン酸化酵素 (キナーゼ) の同定、を進めた。

3. 研究の方法

メチル化阻害剤 (zebularine) 処理や bisulfite sequence 法により、PIK3IP1、INPP5D 各遺伝子発現に DNA メチル化が関与しているか検討する。

各種阻害剤の投与により AKT シグナル活性化に重要な AKT の T308、S473 のリン酸化が変化しないか、ウェスタンブロットで検討し、活性化に関与するシグナル分子を同定する。

4. 研究成果

メチル化阻害剤処理で PIK3IP1 の発現が上昇したことから、高造腫瘍細胞における本遺伝子の発現抑制が DNA メチル化によることが示唆された。INPP5D 遺伝子に関しては阻害剤処理でも発現に変化が見られず、さらに bisulfite 法でプロモーター部位のメチル化状態を検討したが、遺伝子発現状態と相関するメチル化部位は同定できなかった。以上から AKT シグナル活性化に関与するこれら遺伝子の発現制御において、DNA メチル化が関与するものと関与しないもの、複数の経路の存在することが示唆された。

INPP5D、PIK3IP1 以外に、PTEN、Wnt シグナル抑制因子である NKD2、Notch シグナルが ATL 細胞における AKT シグナル制御に関与していることが示唆された。

AKT 阻害剤で AKT リン酸化が低下したことから、AKT が自身をリン酸化する可能性が示された。一方 AKT シグナル活性化に関与することが報告されているキナーゼ (mTORC、ILK) や各種シグナル伝達系に関与するキナーゼの阻害剤を投与したが、AKT リン酸化への影響は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

Nasu, K., Yamaguchi, K., Takanashi, T., Tamai, K., Sato, I., Ine, S., Sasaki, O., Satoh, K., Tanaka, N., Tanaka, Y., Fukushima, T., Harigae, H., and Sugamura, K.: Crucial role of carbonic anhydrase IX in tumorigenicity of xenotransplanted adult T-cell leukemia-derived cells. *Cancer Sci*, 108, 435-443, 2017

Yamaguchi K., Takanashi T., Nasu K., Tamai K., Mochizuki M., Satoh I., Ine S., Sasaki O., Satoh K., Tanaka N., Harigae H., and Sugamura K.: Xenotransplantation elicits salient tumorigenicity of adult T-cell leukemia-derived cells via aberrant AKT activation. *Cancer Sci.* 107, 638-643, 2016.

Kuramitsu, M., Okuma, K., Yamagishi, M., Yamochi, T., Sanaz, F., Momose, H., Mizukami, T., Takizawa, K., Araki, K., Sugamura, K., Yamaguchi, K., Watanabe, T., and Hamaguchi, I. : Identification of TL-Om1, an ATL cell line, as a reference material for human T-lymphotropic virus 1 quantitative polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 53, 587-596, 2015.

〔学会発表〕(計 10 件)

Yamaguchi, K., Takanashi, T., Mochizuki, M., Sasaki, O., and Sugamura, K.: Serial xenotransplantation elicits a highly tumorigenic potential in adult T-cell leukemia-derived cells. HTLV2017, Tokyo, 2017.3

那須健太郎, 山口壹範, 玉井恵一, 井根省二, 佐々木治, 佐藤賢一, 田中伸幸, 張替秀郎, 菅村和夫: 高造腫瘍能 ATL 細胞における炭酸脱水酵素 IX (CA9) 発現亢進の意義. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2015.10

〔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

<https://www.miyagi-pho.jp/mcc/kenkyu/katsudou/hatugan-seigyo/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 菅村和夫

ローマ字氏名 : Kazuo Sugamura

研究協力者氏名 : 那須健太郎

ローマ字氏名 : Kentaro Nasu

研究協力者氏名 : 高梨友香

ローマ字氏名 : Tomoka Takanashi

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。