

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09822

研究課題名(和文) 血液細胞特異的な新規RasGAPによるRasシグナルの制御機構

研究課題名(英文) Regulation mechanism of Ras signal by novel RasGAP specific to blood cells

研究代表者

齋藤 孔良 (Kousuke, Saito)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30460356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、新規RasGAPとしてRASAL3を世界に先駆けて同定した。ヒトB細胞系および骨髄系腫瘍細胞株では、RASAL3の強制発現により細胞運動に重要なFアクチンの進展が抑制された。7-9ヶ月齢の老齢RASAL3欠損マウスでは、B細胞系および骨髄系細胞が野生型マウスに比べ異常に増殖していた。また、RASAL3欠損マウスでは脾腫が頻りに観察された。RASAL3欠損マウスのリンパ組織における病理解析を行うと、骨髄、脾臓および肝臓では骨髄系腫瘍細胞の異常増殖および浸潤を示唆する病理像が観察された。以上の結果から、RASAL3がヒト血液腫瘍細胞増殖および細胞運動を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

主にB細胞および骨髄系の免疫細胞においてRASAL3が血球細胞特異的な腫瘍抑制因子であることを明らかにした。この発見により、RASAL3の発現定量により将来の血液腫瘍の発症リスクを予測できるかもしれない。血液腫瘍においてRASAL3発現を回復させる薬剤が開発されれば、血液腫瘍の治療につながる可能性がある。RASAL3の機能の解明が更に進めば、B細胞および骨髄系細胞の発生、分化および増殖機構が更に明らかになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Applicants pioneered RASAL3 as a new RasGAP in the world. In human B cell lines and myeloid tumor cell lines, forced expression of RASAL3 suppressed the development of F-actin, which is important for cell motility. B-cell and myeloid cells were abnormally proliferated in 7-9-month-old aged RASAL3-deficient mice compared with wild-type mice. Splenomegaly was frequently observed in mice lacking RASAL3. Pathological analysis of lymphoid tissue of RASAL3-deficient mice revealed pathological images suggesting abnormal proliferation and infiltration of myeloid tumor cells in bone marrow, spleen and liver. These results suggest that RASAL3 suppresses human hematological tumor cell proliferation and cell motility.

研究分野：免疫学

キーワード：RASAL3 血液腫瘍 B細胞 骨髄系細胞 腫瘍抑制因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Ras 経路は様々な細胞系列において細胞増殖を正に制御し、その異常は多くの癌の発症に関与する。RasGAP は増殖シグナルによって活性化された Ras を不活化する Ras の抑制因子である。申請者は、新規の RasGAP として RASAL3 を世界に先駆けて同定した。RASAL3 は血液細胞および血球系組織に特異的に発現し、B および NKT 細胞において RasGAP として機能した。また、RASAL3 の欠損マウスでは、B 細胞および骨髄球が増加し、脾腫を発症した。

2. 研究の目的

本研究では、血液細胞における Ras 経路の機能と活性制御機構を、RASAL3 を用いて明らかにする。さらに、B 細胞系腫瘍および骨髄球系腫瘍への RASAL3 の関与とその分子機構を明らかにした。

3. 研究の方法

RASAL3 が関与する B 細胞系列の分化段階を調べる。RASAL3 欠損マウスおよび野生型マウスの骨髄、脾臓、肝臓、リンパ節および末梢血由来の B 細胞を、各分化段階に特異的な抗体で染色し、FACS により、各分化段階の細胞数を定量する。

RASAL3 が B 細胞の増殖および免疫応答に関与するかを明らかにする。

T 細胞において、RASAL3 と協調的に機能する RasGAP を同定する。

Tax による Ras 経路の活性化における RASAL3 の役割を明らかにする。

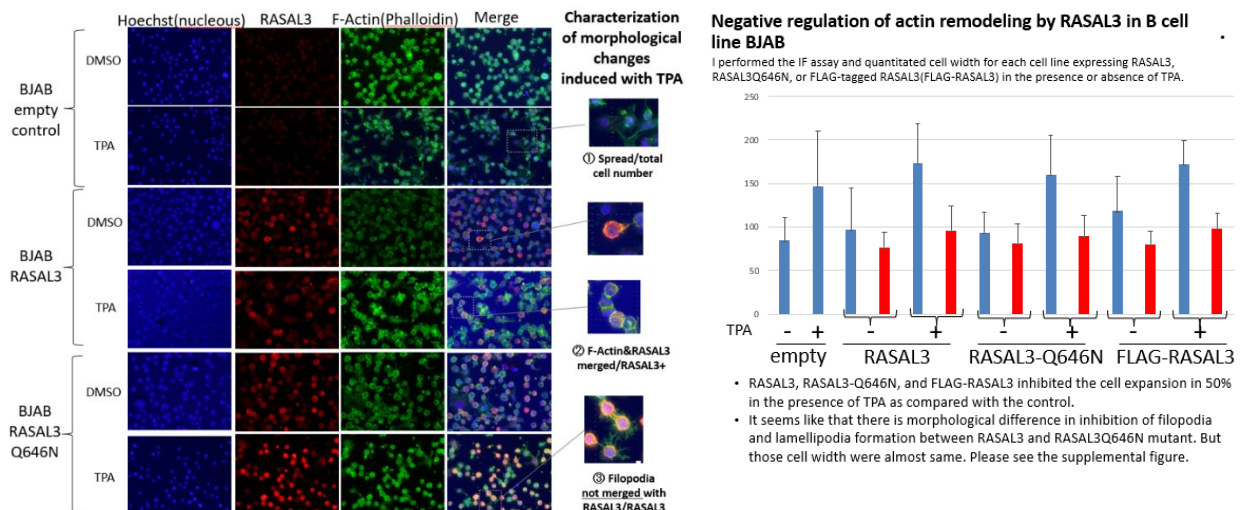
4. 研究成果

(RASAL3 の遺伝子発現調節機能に関する成果)

RASAL3 を HTLV-1 の癌蛋白 Tax1 に結合する分子として同定した。Tax1 は NFAT 配列を介して転写を活性化する。そこで、RASAL3 が Tax1 と HTLV-2 の Tax2 による NFAT 配列を介した活性化に関与するのかを検討した。HTLV-2 の Tax2 の方が HTLV-1 の Tax1 よりも NFAT に対する活性化能が強かったので、Tax2 をヒト T 細胞株 Jurkat に遺伝子導入し、NFAT 活性を定量した。Tax2 は NFAT リポーターを強く活性化したが、この活性化は RASAL3 によって容量依存的に抑制された。NFAT は Ras によって活性化されることから、RASAL3 は、Ras 経路を抑制し、NFAT を抑制することが示唆された。また、Tax1 と Tax2 は RASAL3 に結合することから、Tax1 と Tax2 による RASAL3 の抑制が NFAT の活性化に関与することが示唆された。RASAL3 の遺伝子発現への影響を明らかにするために、網羅的遺伝子発現解析を実施した。RASAL3 ノックアウトマウスから調製した脾臓では、ストレスによって誘導される複数の遺伝子発現が昂進していた。例えば、チトクローム P450 遺伝子群、グルタチオン S トランスフェラーゼ遺伝子群、および脂質代謝に関する遺伝子群であった。従って、RASAL3 はストレス誘導性遺伝子群の発現を抑制することが示唆された。RASAL3 ノックアウトマウスでは、NKT 細胞の数および機能が低下していることから、NKT 細胞が脾臓におけるストレス応答遺伝子群の制御に関与する可能性もある。

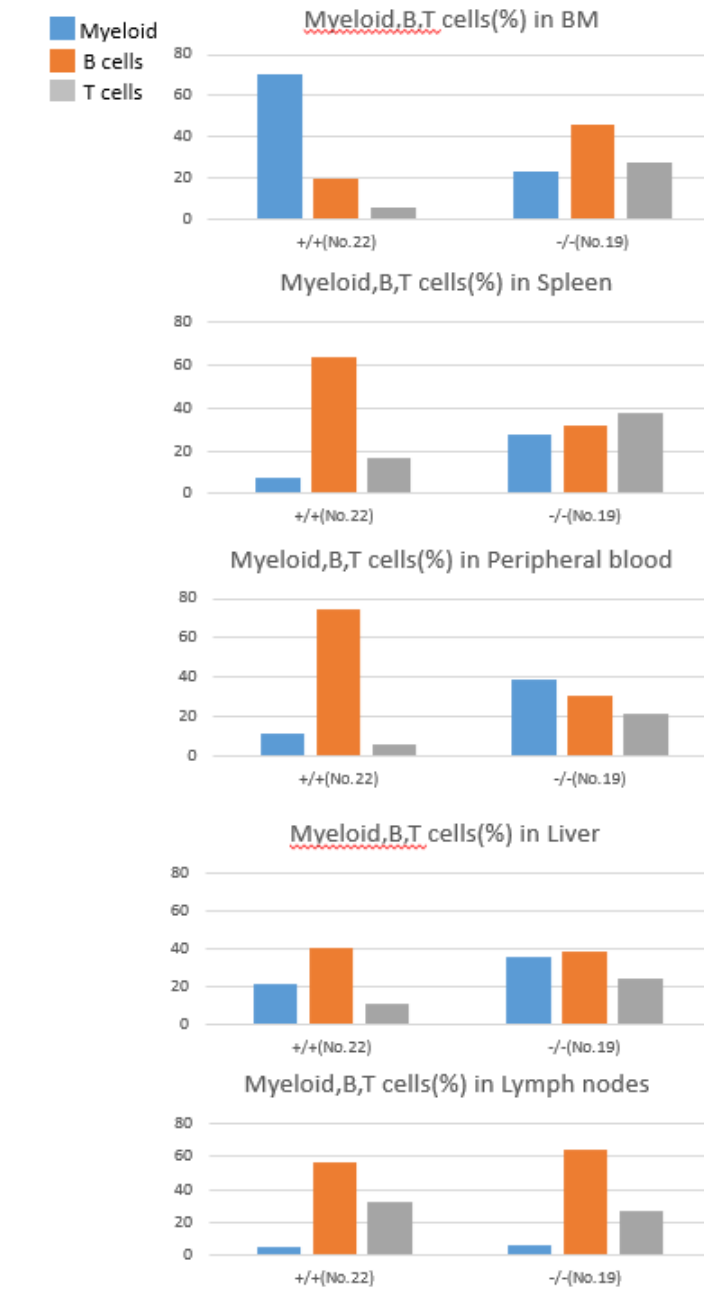
(RASAL3 の細胞機能に関する成果)

新規 RasGAP の発現が低下したヒト B 細胞系腫瘍株に新規 RasGAP を強制発現すると、腫瘍細胞の増殖効率が低下した。また、ヒト B 細胞系および骨髄系腫瘍細胞株では、新規 RasGAP の強制発現により細胞運動に重要な F アクチンの進展が抑制された。以上の結果から、新規 RasGAP がヒト血液腫瘍細胞の増殖および細胞運動を抑制することが示唆された。ヒト T 細胞株 Jurkat を用いて RASAL3 の発現を低下させた細胞株 (RASAL3-KD 細胞) を樹立した。RASAL3-KD 細胞では細胞増殖の昂進が認められた。この結果は、T 細胞白血病においても、RASAL3 が細胞増殖を抑制的に制御していることを示唆する。



(マウス免疫系における RASAL3 の機能に関する成果)

7ヶ月から9ヶ月齢の老齢の新規 RasGAP 欠損マウスの血球細胞およびリンパ組織の解析を行った。新規 RasGAP 欠損マウスの T 細胞系 [CD3 および CD45 マーカー陽性]、B 細胞系 [CD19、B220 および CD45 マーカー陽性] および骨髄系細胞 [Mac-1、Gr-1 および CD45 マーカー陽性] をフローサイトメーターで解析すると、B 細胞系および骨髄系細胞が野生型マウスに比べ異常に増殖していた。



また、新規 RasGAP 欠損マウスでは脾腫が頻繁に観察された。

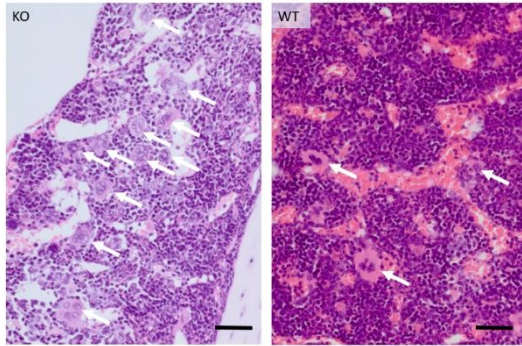
Spleen macro



+/+ -/-

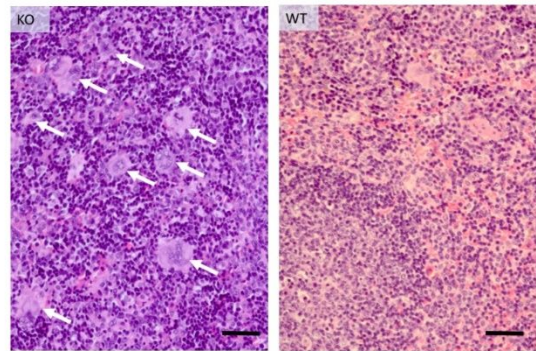
新規 RasGAP 欠損マウスのリンパ組織における病理解析を行うと、骨髄、脾臓および肝臓では骨髄系腫瘍細胞の異常増殖および浸潤を示唆する病理像が観察された。また、新規 RasGAP 欠損マウスの骨髄および脾臓では巨核球系細胞が異常に増殖していた。また、新規 RasGAP がマウス生体内において主に骨髄系腫瘍細胞の増殖を抑制している可能性が示唆された。

骨髄



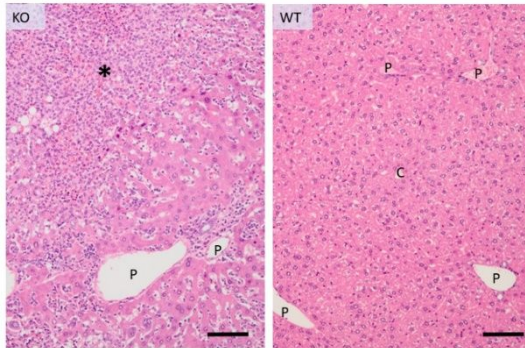
白矢印の大型細胞は巨核球。KOでは巨核球が増加している。bar:50 μ m

脾臓



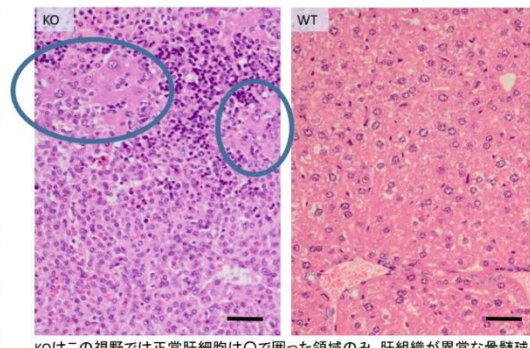
白矢印の大型細胞は巨核球。KOでは巨核球が増加している。一見するとまるで骨髄のようである。髓外造血か、腫瘍の浸潤かは鑑別困難。bar:50 μ m

肝臓



KOは肝組織が異常な骨髄球系造血細胞ないしは腫瘍細胞の増殖によって占められている (*). C: 中心静脈, P: 門脈, bar:100 μ m

肝臓



KOはこの視野では正常肝細胞は○で囲った領域のみ。肝組織が異常な骨髄球系造血細胞ないしは腫瘍細胞の増殖によって占められている。bar:50 μ m

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Sarkar Bidhan, Nishikata Ichiro, Nakahata Shingo, Ichikawa Tomonaga, Shiraga Toshiyuki, Saha Hasi Rani, Fujii Masahiro, Tanaka Yuetsu, Shimoda Kazuya, Morishita Kazuhiro | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Degradation of p47 by autophagy contributes to CADM1 overexpression in ATLL cells through the activation of NF- B | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 3941 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39424-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Takahashi M, Kitaura H, Kakita A, Kakihana T, Katsuragi Y, Nameta M, Zhang L, Iwakura Y, Nawa H, Higuchi M, Komatsu M, Fujii M. | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 USP10 Is a Driver of Ubiquitinated Protein Aggregation and Aggresome Formation to Inhibit Apoptosis. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 433-450 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2018.11.006 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Naito T, Yasunaga JI, Mitobe Y, Shirai K, Sejima H, Ushirogawa H, Tanaka Y, Nakamura T, Hanada K, Fujii M, Matsuoka M, Saito M. | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Distinct gene expression signatures induced by viral transactivators of different HTLV-1 subgroups that confer a different risk of HAM/TSP. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Retrovirology | 6. 最初と最後の頁 72 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12977-018-0454-x | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kozakai T, Takahashi M, Higuchi M, Hara T, Saito K, Tanaka Y, Masuko M, Takizawa J, Sone H, Fujii M. | 4. 巻 107 |
| 2. 論文標題 MAGI-1 expression is decreased in several types of human T-cell leukemia cell lines, including adult T-cell leukemia. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Hematology | 6. 最初と最後の頁 337-344 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-017-2359-1 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤井雅寛 |
| 2. 発表標題 Role of ROS in pathogenesis of HTLV-1-associated diseases. |
| 3. 学会等名 Frontiers in Retrovirology Conference 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|---|-------------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 藤井 雅寛 (Fujii Masahiro) (30183099) | 新潟大学・医歯学系・教授 (13101) | |