

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09848

研究課題名(和文)成人T細胞白血病(ATL)におけるDNA修復機構異常の解明

研究課題名(英文)Analysis of the defect of DNA damage response in adult T-cell leukemia

研究代表者

小林 正行(Kobayashi, Masayuki)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：90513820

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)：我々は以前より成人T細胞白血病におけるDNA修復異常に焦点を当てて研究を行ってきた。今回の研究期間において以下の3点について研究を進め知見を得た。1、HTLV-1ウイルス蛋白HBZにより転写因子NRF-1の転写が阻害され、その結果DNA修復遺伝子TDP1の発現が抑制される。2、HBZによるゲノム不安定性の誘導 3、ATLにおける修復異常に基づいた新規抗がん剤の組み合わせ(Abacavir + MPA)の有効性 以上の知見は学術雑誌や学会にて報告された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人T細胞白血病(ATL)は、最も予後の悪い白血病の一つである。ATLの発症は世界的にみて日本の西南部(九州、沖縄)に多く、日本で初めて提唱された疾患である。そのためATLの基礎研究、治療開発は日本にとって非常に重要な意義があると考えられる。今回我々はウイルス蛋白HBZがマイクロサテライト不安定性を誘導することを見出した。高頻度マイクロサテライト不安定性をもつ固形癌において抗PD-1抗体薬の効果が強く認められることが分かっており、今回の我々の発見はATLに対する新規治療法の開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that the DNA damage response is impaired in Adult T-cell leukemia. Especially we showed following three points. 1, A transcription factor NRF-1 is a positive transcriptional regulator of DNA repair gene TDP1 expression. HTLV-1 bZIP factor (HBZ) suppresses TDP1 expression by inhibiting NRF-1 function in ATL cells. 2, HBZ induces microsatellite instability which is the condition of genetic hypermutability that results from impaired DNA mismatch repair. 3, We recently reported that abacavir (ABC), an anti-HIV-1 drug, selectively kills ATL cells. This effect was attributed to the reduced expression of TDP1. We demonstrate that Mycophenolic acid enhances the cytotoxicity of ABC in ATL cells.

研究分野：血液腫瘍内科

キーワード：成人T細胞白血病 DNA修復異常 マイクロサテライト不安定性

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

## 1. 研究開始当初の背景

成人T細胞白血病(ATL)は、ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)によって惹き起こされる、極めて予後不良の血液悪性疾患である。通常の化学療法による長期生存率は極めて低く、3年生存率が約24%にとどまる(Br J Haematol 113:375,2001, J Clin Oncol 25:5458,2007)。唯一根治を期待できる治療法として、造血幹細胞移植術が存在するが、患者年齢やドナーソース等の観点から多くの患者はその恩恵を享受できない(Blood 116:1369,2010)。本邦には約108万人のHTLV-1感染者が存在し、そのうち年間約1200人が発症することからも、新規治療法の開発が急務である。また最近ATL患者から得られた腫瘍細網の網羅的解析によりATLでの多数の遺伝子異常の全体像の解明が報告されたが(Nature Genetics 2015 advance online)なぜATLにおいてそのような変異が入りやすいかはいまだ不明である。

我々は抗HIV-1逆転写酵素阻害薬であるアバカビル(ABC)が極めて強力な抗ATL細胞効果を有すること、さらにその作用機序として1本鎖DNA断裂修復酵素 tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1)がATLでは低下し、複製の際DNAに取り込まれたABCを切り取ることができないために殺細胞効果を示すことを報告した(Tada Science Advances 1(3):e1400203 2015)。

この研究過程においてATL細胞では前述の修復遺伝子TDP1の発現低下による修復機構異常の他にもDNA修復経路に異常があり、特にミスマッチ修復過程の異常に注目した。DNAミスマッチ修復(MMR)はDNA複製時に生じる核酸塩基のミスマッチを校正するDNA修復システムの一つである。MMRの機能低下により様々な遺伝子の異常が積み重なり、細胞ががん化されていくことが大腸がんなどで報告されている。MMRが機能しているかを予測する検査としてマイクロサテライト不安定性(MSI)検査があるが、以前よりAdult T cell leukemia(ATL)ではMSIが認められるとの報告がされている。ミスマッチ修復過程の異常はゲノムの不安定性をもたらし遺伝子変異の蓄積を生み出し細胞のがん化を引き起こすことが知られている。

## 2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究経過をもとに、ATLの修復機構の異常に焦点を当て解析し、修復過程の異常からもたらされるゲノム不安定性の解析によりATLの発症機序の解明、それらの異常に基づいた新規多剤併用療法の開発を目指すことを目的とした。具体的に以下の3点を明らかにすることを目的とした。

ATL細胞におけるTDP1蛋白発現低下の機序の解析

DNA修復異常がもたらすゲノム不安定性の解析

ATLにおける修復異常に基づいた新規抗がん剤の組み合わせの検討

## 3. 研究の方法

ATL細胞におけるTDP1蛋白発現低下の機序の解析

TDP1のプロモーター解析により、プロモーター活性部位を同定し、この部分に結合する転写因子を同定する。転写因子同定後はその転写因子がATL細胞においてどういった機序で抑制されているかを詳細に検討する。

DNA修復異常がもたらすゲノム不安定性の解析

ATL細胞や各種ウイルス蛋白発現株を用いてマイクロサテライト不安定性の検討やシーケンスによる網羅的解析により変異の蓄積やゲノム不安定性を解析する。

ATLにおける修復異常に基づいた新規抗がん剤の組み合わせの検討

各修復機構の破綻をターゲットとした抗がん剤から、上記解析によって得られたATLにおける修復異常に適した新規組み合わせを検討し、各ATL細胞株やATLモデルマウスでその効果を検討する。

## 4. 研究成果

ATL細胞におけるTDP1蛋白発現低下の機序の解析

我々は修復遺伝子TDP-1がATLで著明に低下していることを以前報告したが、ATL細胞におけるTDP1発現制御機構および、TDP1発現が低下する機序については未解明であった。そこでTDP1プロモーターのクローニングを行い、転写活性に重要な部位をルシフェラーゼアッセイにより検討したところ、TDP1の転写開始点近傍に位置するコアプロモーター部位に転写活性部位が存在し、その配列内に転写因子 nuclear respiratory factor-1(NRF-1)結合配列が認められた。NRF-1導入によりTDP1プロモーター活性は上昇しTDP1の転写は促進されるが、ドミナントネガティブ変異体導入によりTDP1プロモーター活性は低下した。ABC非感受性であるJurkat T細胞株におけるNRF-1のノックダウンは、TDP-1の蛋白レベルの発現抑制を誘導し、その結果、ATL細胞同様ABCに対する感受性を獲得することが認められた。以上より、NRF-1はTDP1の正の制御因子であると考えられた。この結果を踏まえ、ATL細胞におけるTDP1発現低下の理由として、NRF-1によるTDP1発現が阻害されている可能性が示唆された。HTLV-1ウイルス蛋白であるTaxやHTLV-1 bZIP factor(HBZ)は様々な転写因子に結合しその機能を亢進または阻害することが知られているため、これらウイルス蛋白がNRF-1を介したTDP1発現に及ぼす影響につ

いて検討した。Jurkat Tax Tet-on 細胞では Tax 誘導により TDP1 発現量の変化は見られなかったが、HBZ 導入 Jurkat T 細胞では TDP1 発現は低下していた。さらに、HBZ の導入により TDP1 プロモーター活性が低下することを認め、さらにゲルシフトアッセイと ChIP アッセイを用いて、HBZ 導入 Jurkat T 細胞では NRF-1 の TDP1 プロモーターへの結合が阻害されていることを確認した。CoIP アッセイおよび in vitro binding assay の結果からは、HBZ と NRF-1 とのダイレク トな結合が証明された。この知見は Scientific Reports において論文掲載がなされた (Sci Rep. 2017 Oct 9;7(1):12849. )

#### DNA 修復異常がもたらすゲノム不安定性の解析

まず HTLV-1 感染細胞を用いて数種類の抗癌剤感受性を調べたところ、procarbazine、6-thioguanine、cisplatin に抵抗性を示し、lomustine、mitomycin C に高感受性を示した。この結果は MMR deficient cell を用いた薬剤感受性のプロファイルと一致しており、このことから HTLV-1 感染細胞では何らかの MMR 異常があることが推察された。そこで、我々はウイルスタンパクである HTLV-1 bZIP factor (HBZ) に注目し、HTLV-1 ウイルス蛋白 HBZ 発現細胞株においてマイクロサテライト解析を行ったところ、HBZ によりマイクロサテライト不安定性が誘導される知見を得た。このマイクロサテライト不安定性は HBZ トランスジェニックマウスから抽出した脾細胞においても認められ、HBZ は単独でプライマリー細胞、細胞株にマイクロサテライト不安定性を誘導することが分かった。ウイルス蛋白単独での上記所見は他のオンコウイルスでは報告がなく非常に重要な発見であったと考えられる。

#### ATL における修復異常に基づいた新規抗がん剤の組み合わせの検討

ABC は GTP 類似体であり、ATL 細胞の DNA に取り込まれることにより、DNA 二本鎖切断を生じさせ細胞死を誘導する。MMF はプリン合成の阻害薬であり、T および B リンパ球の GTP 産生を選択的かつ可逆的に抑制することにより細胞の増殖を停止させる。それゆえ、MMF による細胞内 GTP 濃度を低下が GTP 類似体である ABC の取り込み量を増加させ、抗腫瘍効果を増強させると考えその併用効果を検討した。MPA は単剤において ATL 細胞株の増殖を著明に抑制し、特に p53 が欠失した ATL 細胞株には ABC との併用効果を認めた。p53 の発現がみられる ATL 細胞株は MPA により G1 期が増加するのに対して、p53 欠失 ATL 細胞株では S 期の増加が認められた。前者の G1 停止期の増加は p53 阻害薬により減少し、p53 欠失細胞と同様に S 期が増加した。実際に MPA は p53 の活性化を経時的に誘導しており、興味深いことに、それは Chk1 阻害剤で完全に抑制された。つまり、MPA により活性化された Chk1 が p53 のリン酸化を誘導し、これにより ATL 細胞は G1 期に停止すると考えられた。P53 欠失 ATL 細胞ではこの機序が働かないために、MPA で処理しても S 期に進行しその結果 ABC の取り込みが増強し、併用効果が発揮されると考えられた。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Takiuchi Y, Kobayashi M, Tada K, Iwai F, Sakurada M, Hirabayashi S, Nagata K, Shirakawa K, Shindo K, Yasunaga JI, Murakawa Y, Rajapakse V, Pommier Y, Matsuoka M, Takaori-Kondo A.,

HTLV-1 bZIP factor suppresses TDP1 expression through inhibition of NRF-1 in adult T-cell leukemia. Sci Rep. 、査読あり

2017 Oct 9;7(1):12849. doi: 10.1038/s41598-017-12924-0.

Kawata T, Tada K, Kobayashi M, Sakamoto T, Takiuchi Y, Iwai F, Sakurada M, Hishizawa M, Shirakawa K, Shindo K, Sato H, Takaori-Kondo A

Dual inhibition of the mTORC1 and mTORC2 signaling pathways is a promising therapeutic target for adult T-cell leukemia. Cancer Sci. 査読あり

2018 Jan;109(1):103-111. doi: 10.1111/cas.13431. Epub 2017 Nov 22

〔学会発表〕(計 6 件)

18th International Conference on Human Retrovirology  
The Function of NRF-1 in Regulation of TDP1 is Impaired by HTLV-1 bZIP Factor in Adult T cell Leukemia  
Yoko Takiuchi 2017/3/7-3-10 Tokyo

18th International Conference on Human Retrovirology  
HTLV-1 bZIP factor (HBZ) induces microsatellite instability  
Maki Sakurada 2017/3/7-3-10 Tokyo

18th International Conference on Human Retrovirology  
MPA enhances anti-ATL effect of abacavir  
Fumie Iwai 2017/3/7-3-10 Tokyo

第4回 HTLV-1 学会学術集会  
HBZ はマイクロサテライト不安定性を誘導する  
小林正行 2017/8/18-8/20

第77回日本癌学会学術集会  
成人T細胞白血病に対するアバカビルの抗腫瘍効果はミコフェノール酸により増強する  
岩井文絵 2018/9/27-9/29

第5回日本 HTLV-1 学会学術集会  
成人T細胞白血病に対するアバカビルの抗腫瘍効果はミコフェノール酸により増強する  
小林正行 2018/8/31-9/2

〔図書〕(計0件)

## 6. 研究組織

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：瀧内 曜子  
ローマ字氏名：(TAKIUCHI yoko)

研究協力者氏名：岩井 文絵  
ローマ字氏名：(IWAI fumie)

研究協力者氏名：櫻田 麻希  
ローマ字氏名：(SAKURADA maki)

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。