

令和元年6月17日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14988

研究課題名(和文) DNA複製異常による成人T細胞白血病発症機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of aberrant DNA replication in adult T-cell leukemia/lymphoma

研究代表者

水口 真理子 (Mizuguchi, Mariko)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40581541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：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)の感染により引き起こされる極めて予後不良の血液悪性疾患である。白血病細胞に数多くの遺伝子変異が蓄積し、ATLを発症するが、その機序は未だ不明な点が多い。本研究ではHTLV-1がコードする発がんタンパクTax1がNF- $\kappa$ B/RelAを介してDNA複製および二重鎖損傷修復機構に關与する遺伝子群の発現を誘導することを明らかにした。HTLV-1感染細胞では、Tax1によるDNA複製の過剰な誘導や、DNA二重鎖損傷により遺伝子変異が生じる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATLは抗がん剤治療による寛解後でも高率に再発するため、新規治療薬の開発が求められている。ATLは多数の遺伝子変異が蓄積した結果、発症すると考えられており、HTLV-1感染細胞内で遺伝子変異が起こる分子メカニズムを明らかにすることは、それら分子を標的とした治療法の開発に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) is an aggressive T-cell malignancy caused by human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) infection. Although an accumulation of genetic mutation is seen in primary ATL cells, progression mechanisms remain unclear. From RNA sequencing analysis, we identified various genes involved in DNA replication and repair of DNA double-strand break through homologous recombination induced by oncogenic protein Tax1, and not by TaxM22, which lacks ability of NF- $\kappa$ B activation. Treatment of ATM and ATR inhibitors significantly increased apoptosis in Tax1-expressing cells. Our results suggest that Tax1-induced aberrant DNA replication and DNA double-strand break through NF- $\kappa$ B/RelA may be implicated in accumulation of genetic mutation in HTLV-1-infected cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：HTLV-1 ATL DNA複製

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 成人 T 細胞白血病 (ATL) は、CD4 陽性 T 細胞の腫瘍性増殖を特徴とする極めて悪性度の高い白血病であり、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の感染に起因する。日本の HTLV-1 キャリア数は約 80 万人とされており、そのうち約 5% が ATL を発症する。HTLV-1 は主に母乳を介して感染し、約 60 年という長い年月をかけて宿主細胞に数多くの遺伝子変異やエピジェネティックな変化を蓄積させ、がん化へ導くと考えられているが、その機序は未だ不明な点が多い。
- (2) HTLV-1 がコードするトランスフォーミングタンパク Tax1 は、転写因子 NF- $\kappa$ B、CREB および AP-1 を介して宿主細胞の様々な遺伝子発現を攪乱し、細胞のがん化に寄与する。申請者らはこれまでに、増殖期の T 細胞に Tax1 を発現させると NF- $\kappa$ B のコンポーネントである RelA を介して増殖抑制およびアポトーシスを誘導することを報告した。また、Tax1 により増殖抑制された細胞の細胞周期を解析すると、S 期に集積し、さらに染色体の異数性を示す細胞群が増加していた。これらのことより、Tax1 発現細胞では、DNA に損傷がある状態での複製を防ぐ「DNA 損傷チェックポイント機構」や、DNA が完全に複製される前に分配されるエラーを防ぐ「DNA 複製チェックポイント機構」が働き、細胞増殖の抑制またはアポトーシスが誘導されている可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

DNA 複製が過剰に誘導される、または途中で停止するなど異常が起こると細胞の増殖は停止する。さらにその過程で過剰な誤りが生じると、ゲノムに変異が集積する。ATL 細胞の場合も数多くの遺伝子変異が蓄積している。先行研究より、Tax1 発現細胞では、細胞周期が S 期に集積し、染色体の異数性を示す細胞が増加することから、DNA 複製が過剰に誘導されていると考えられる。本研究では、Tax1 により活性化された RelA 依存的な DNA 複製異常により、遺伝子変異が起こり得るのではないかという仮説のもと、Tax1 発現細胞における DNA 複製異常誘導機構を解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) DNA 損傷チェックポイント関連因子阻害物質によるアポトーシスの誘導

Tax1 発現細胞では細胞周期が S 期に集積し、染色体の異数性を示す細胞群が増加することから、細胞に複製異常や DNA 損傷が起こっていると考えられる。細胞がこれらの傷害を受けると DNA 損傷チェックポイント関連因子 Ataxia telangiectasia mutated (ATM)、ATM-and Rad 3-related (ATR) が細胞周期を停止させ、修復機構を活性化する。もし修復が不可能な場合はアポトーシスを誘導する。そこで Tax1 発現細胞に DNA 損傷チェックポイント関連因子に対する活性阻害剤で修復機構を抑制し、細胞の生存およびアポトーシスを解析した。

### (2) Tax1 により発現異常が誘導される遺伝子群の探索

増殖期または休止期の T 細胞株 Kit 225 に Tax1 を発現させ、それらから抽出した mRNA を用いて RNA シークエンスを行った。DNA 複製および DNA 二重鎖切断修復機構に関連する遺伝子群に着目し、Tax1 により発現異常が誘導される遺伝子を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) DNA 損傷チェックポイント関連因子阻害物質によるアポトーシスの誘導

増殖期の Tax1 発現細胞に ATM および ATR 活性阻害剤を作用させるとアポトーシスが著しく増大した。この結果より、Tax1 発現細胞では、DNA 損傷が起こっていることが明らかとなった。また、DNA の二重鎖切断修復は、相同組換え (HR) 修復機構または非相同末端結合 (NHEJ) 修復機構を介して行われる。DNA-PK 阻害剤は NHEJ 修復機構を抑制するが、Tax1 発現細胞に DNA-PK 阻害剤を作用させても細胞死に影響を与えなかった。したがって、Tax1 発現細胞では HR 修復機構を介して増殖が抑制されていることが示唆された。

##### (2) Tax1 により発現異常が誘導される遺伝子群の探索

Tax1 が DNA 複製に関わる遺伝子の発現に与える影響について解析したところ、PCNA、CHK1、MCM2-8 および CDC45 遺伝子の発現が上昇していた。次に HR 修復関連遺伝子群の発現について解析した。Tax1 により Nbs1、EXO1、RPA2、RPA3、BRCA1、BRCA2、Rad51、POLD1 などの遺伝子が発現誘導された。一方、Tax1 は NHEJ 修復関連遺伝子群の発現に影響を与えなかった。

以上の結果は、研究成果 (1) で行った DNA 損傷チェックポイント関連因子阻害物質を用いたアポトーシスの誘導実験の結果を支持するものであった。本研究より、Tax1 は DNA 複製時に DNA 二重鎖切断を引き起こし、遺伝子変異を誘導する可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 水口真理子, 中村正孝, 高橋良明, 田中礼子, 田中勇悦. HTLV-1 Tax による DNA 複製異常誘導機構の解析. 第 5 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2018 年 8 月 31 日-9 月 2 日. 一橋講堂 (東京都)
- ② 高橋良明, 清水衡, 宮城拓也, 水口真理子, 田中礼子, 田中勇悦. 抗体を介したマクロファージによる HTLV-1 感染制御. 第 5 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2018 年 8 月 31 日-9 月 2 日. 一橋講堂 (東京都)
- ③ 田中勇悦, 高橋良明, 水口真理子, 田中礼子, 福島卓也. ATL 白血病細胞の多くは Foxp3 抗原を発現する. 第 5 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2018 年 8 月 31 日-9 月 2 日. 一橋講堂 (東京都)
- ④ 田中礼子, 高橋良明, 水口真理子, 福島卓也, 立松健司, 黒田俊一, 田中勇悦. HTLV-1 感染防御ヒト単クローン抗体の作出の試み: 1 細胞単離ロボットの応用. 第 5 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2018 年 8 月 31 日-9 月 2 日. 一橋講堂 (東京都)
- ⑤ 水口真理子, 原敏文, 高橋真奈美, 田中勇悦, 福島卓也, 中村正孝. HTLV-1 感染細胞における hTERT 遺伝子の発現制御機構の解析. 第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2017 年 8 月 18-20 日. 関西医科大学 (大阪府)

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

研究代表者氏名：水口 真理子

ローマ字氏名：MIZUGUCHI, Mariko

所属研究機関名：琉球大学

部局名：医学系研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：40581541

※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。