

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 ~ 2010

課題番号：19790344

研究課題名(和文)多段階発がん機構におけるジンクフィンガー-ホメオドメインタンパク質の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1/TCF8) gene in the multi-step leukemogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma

研究代表者

中畑 新吾 (NAKAHATA SHINGO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80437938

研究成果の概要(和文): 成人T細胞白血病・リンパ腫(ATLL)に対するゲノム解析を行い、10p11.2領域に染色体切断点集中領域を同定、TCF8遺伝子をATLLのがん抑制遺伝子候補として単離した。TCF8欠損マウスを解析したところ、CD4陽性リンパ腫・白血病を高頻度で発症し、高臓器浸潤性を示した。TCF8はTGF-beta1の情報伝達を促進する事が報告されているため、ATLL細胞へのTCF8過剰発現はTGF-beta1への反応性の回復、細胞死に至ることがわかり、ATLL治療の標的になる可能性が示された。

研究成果の概要(英文): We identified that TCF8 at 10q11.2 is a candidate tumor-suppressor gene in acute-type adult-T cell leukemia/lymphoma (ATLL). The down-regulation of TCF8 expression by genetic and epigenetic abnormalities in ATLL was associated with resistance to TGF-beta1 treatment, which is one of well-known characteristics of ATL cells. The enforced expression of TCF8 partially restored the responsiveness of ATLL cells to TGF-beta1. Furthermore, TCF8 deficient mice frequently developed invasive CD4⁺ T-cell lymphomas in thymus or in ascitic fluids. These findings suggest that TCF8 may become a new therapeutic target for ATLL.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,200,000	720,000	3,920,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：白血病

1. 研究開始当初の背景

成人T細胞白血病・リンパ腫(ATLL)はヒトレトロウイルス HTLV-1 を原因ウイルスとする疾患で九州を中心とした西南日本に多発

する難治性白血病である。これまでは Human T-lymphotropic virus type-1 (HTLV-1)が持つ遺伝子が白血病の発症に重要な役割をもつと考えられ、HTLV-1に関する研究が盛んに

行われてきた。しかし発症まで数十年という期間が必要なこと、ATLL 細胞の多くでは HTLV-1 タンパク質の発現が欠損しており不活化していることなどから、HTLV-1 感染以降の付加的なゲノム異常が白血病発症に重要な役割を果たしていることが示唆されるようになってきた。そこで我々は ATLL 発症機構を解明するため、急性型 ATLL に対する統合的ゲノム解析を行った。

2. 研究の目的

ATLL は 1977 年に Uchiyama らによって最初に報告された疾患である。患者は九州を中心とした西南日本に集中しており、50 歳以上の成人に多くみられる。発症原因として HTLV-1 が同定され、その感染は主として母子感染により起こることが知られている。西日本を中心に約 120 万人が存在する HTLV-1 キャリアの生涯 ATLL 発症率は 5-10% であり、その白血病細胞は特有の核分葉を呈している。臨床的には高カルシウム血症、臓器浸潤性を示す症例が多く認められる。主として化学療法により治療されているが、現在のところ ATLL の有効な治療法はなく、発症後の予後は極めて不良である。ATLL の発症機構としてこれまでは HTLV-1 ウィルスタンパク質 Tax が直接白血病化する機構が考えられていたが、1) 発症するまでに感染から約 60 年の歳月が必要とされること、2) HTLV-1 キャリアの約 5% だけが ATLL を発症すること、3) 多くの ATL 細胞では DNA メチル化やゲノム欠失により Tax の発現が消失していることなどから、発症にはキャリア特質やゲノム突然変異などの影響が白血病の発症に関係していると考えられる。1989 年に Okamoto らは多段階発がん説を主張しており、ウィルス感染に加え 5 つ以上のイベントの積み重ねにより ATLL が発症すると提案している。多段階にわたって生じる遺伝子変異や染色体異常などのゲノム異常や遺伝子発現の異常が ATLL 発症の原因であると考えられており、これまでに G-banding や Comparative genomic hybridization (CGH) などの方法で ATLL のゲノム解析が行われてきたが、ATLL のゲノム異常そのものが複雑で多くの異常があり、定まった染色体異常が同定されず原因遺伝子の単離は未だなされていない。我々は、Spectral Karyotyping (SKY), Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), SNP array-CGH を組み合わせたゲノム解析によって染色体異常集中領域を同定し、DNA マイクロアレイ遺伝子発現解析で得られた遺伝子発現の異常と比較して、ATLL 発症関連遺伝子候補の単離を試みている。本研究は、これらの統合的なゲノム解析によるがん関連遺伝子の同定、及びその機能解析を行い、ATLL 発症機構を分子レベルで明らかにすることを

目標にしている。

3. 研究の方法

(1) 健常人由来 CD4 陽性 T 細胞及び患者検体

健常人、もしくは ATL 患者へパリン加末梢血を Histopaque (SIGMA ALDRICH) による比重遠心法を用いて単核球を遠心分離した。急性型 ATL 患者では、末梢血 ATL 分画が 90% 以上の検体を解析に用いた。また健常人の CD4 陽性細胞は CD4+ T cell アイソレーションキット II (Miltenyi Biotec) により CD4+ T 細胞以外の細胞を CD8、CD14、CD16、CD19、CD36、CD56、CD123、TCR g/d、Glycophorin A に対するビオチン標識抗体カクテルにより Auto MACS (Miltenyi Biotec) を用いて分離した。患者検体は国立都城病院及び宮崎大学付属病院第 2 内科よりインフォームドコンセントをとり、供与された。

(2) 細胞株及び培養法

実験に用いた細胞株は次の通りである。HTLV-1 非感染 T 細胞リンパ性白血病 (T-ALL) 細胞株として Jurkat、MOLT4、MKB-1、KAWAI、HTLV-1 感染細胞株として HUT102、MT2、IL2 非依存性 ATL 細胞株 ED-40515(-)、Su9T-01、S1T、IL2 依存性 ATL 細胞株 KOB、KK1、S04 を、それぞれ IL2 (50 U/ml) 添加もしくは無添加の fetal bovine serum (FBS) を 10% 添加した RPMI1640 培養液で 37 度、5% 二酸化炭素下で培養した。

(3) 多蛍光染色体分析 (Spectral karyotyping SKY) と DAPI 結合解析

染色体異常の解析には Kakazu らの発表に基づき多蛍光染色体分析 (spectral karyotyping SKY) とジアミドフェニルインドールジハイドロクロライド (4,6-diaminido-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI) 染色を組み合わせで解析した。細胞より染色体固定されたスライドガラス上で変性後 SKY 用プローブ (Applied Spectral Imaging Inc) を 37 度・2 日間ハイブリダイゼーションさせた。SKY シグナル検出は Applied Spectral Imaging Inc 社のプロトコルに従った。染色体染色は DAPI と抗フェード溶液 (Vectaschield; Vector Laboratories) の組み合わせで対比染色した。画像は、SKY-1 光学フィルター (Chroma Technology) 付き Olympus BX50-RF (Olympus) 搭載 SD200 Spectracube (Applied Spectral Imaging) を用いて取得した。それぞれ 10 から 20 の分裂中期染色体像を解析し、核型の記載は ISCN1995 に従った。

(4) 高密度 SNP アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (アレイ CGH) 解析

全ゲノム DNA は制限酵素 XbaI により切断、アダプター連結後単一プライマーを用いて PCR 増幅した。DNaseI 処理後、PCR 産物 40 mg を

ビオチン標識し、アレイにハイブリダイゼーションさせた。SNPはGTYPE 4.1 software (Affymetrix)によりスコア化した。染色体コピー数とLOH(Loss of heterozygosity)はACUE 2.1 (Mitsui Knowledge Industry, Tokyo, <http://bio.mki.co.jp/en/product/acue2/index.html>)とCNAG2.0 によって算出した。正常検体6例を基準としてデータの標準化を行った。またアレイ上のプローブのゲノム位置はNCBI genome map build 35.1による。

(5) DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

DNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析は、アフィメトリックス社のHuman Genome U133 plus 2 array GeneChip (54675 遺伝子)を用い、方法は同社プロトコルに従って行った(Affymetrix, Santa Clara, CA)。GeneChip® Expression 3'-Amplification Two-cycle cDNA synthesis kit(Affymetrix)を用いて、細胞より抽出した100ngのtotal RNAから二本鎖cDNAを合成、さらにcDNAを鋳型にビオチン化cRNAプローブを合成した。cRNAは熱処理及び加水分解により断片化させ、Human Genome U133 plus 2 array GeneChip (54,675 遺伝子断片)(Affymetrix)とアレイハイブリダイゼーションを行なった。マイクロアレイの洗浄及び染色はGeneChip® fluidics station 450(Affymetrix)により行った。特異吸着を増強するために抗ヤギIgG抗体処理により非特異吸着を軽減し、さらに抗ストレプトアビジンビオチン化抗体でマイクロアレイを処理し蛍光強度の増幅を行い、蛍光強度はGeneChip® scanner 3000(Affymetrix)により検出した。またGeneSpring GX 7.3 (Silicon Genetics, Redwood City, CA)ソフトウェアを用いてデータ解析を行った。さらに全プローブセットより10p11領域にコードされるプローブセットを選択し、これらの遺伝子群について健常人CD4陽性リンパ球分画5症例と急性型ATL白血球細胞分画8症例につき、10p11領域における遺伝子発現の比較を行った。また遺伝子群のゲノムの位置はNetAffx Analysis Center (<http://www.affymetrix.com>)より入手した。遺伝子発現は、蛍光強度100を目安とし、遺伝子発現あり(+)を100以上、なしを100以下(-)と判定し、以下の実験に用いた。

4. 研究成果

Spectral Karyotyping(SKY)法を用いて、急性型ATLL61症例を調べた結果、605個の染色体切断点を同定し、DAPI-bandingでマッピングしたところ、平均して10個の転座がみられた。ほとんどは不均衡転座で、再発的な相互転座は同定されなかったが、10p11 (35%)、

14q11 (31%)、14q32 (29%)における切断が多いことがわかった。最も多い10p11に着目し、Fluorescence in situ hybridization (FISH)やSNP array-CGH法で欠失領域を調べたところ共通欠失領域として1Mb、さらにその近傍にホモ欠失領域を同定した。DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った結果、共通欠失領域に存在するTCF8遺伝子の発現がATLL細胞で著しく低下していることが明らかになった。さらにエピジェネティック異常を細胞株により検討したところ、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤TrichostatinAやDNAメチル化阻害剤5-aza-dCの投与により、ほとんどのATLL細胞株においてTCF8遺伝子の発現が回復した。さらにATLL患者35症例とATLL細胞株10例のDNA検体を用いて点突然変異の解析したところ、健常人日本人95例には認められなかった2種類のアミノ酸置換を伴うミスセンス変異(N78T、C105R)を約10%の症例で同定した。この結果からTCF8遺伝子が10p11領域における癌抑制遺伝子候補と考えられた。

これまでのTCF8遺伝子欠損マウスの解析から、神経、筋、リンパ球の発生に關与する重要な転写因子であることが明らかにされている。そこで東博士(大阪大学)との共同研究によりTCF8欠損マウスを用いた腫瘍発生実験を行った。TCF8ホモ欠損マウスは胎児致死であり、C端zinc finger領域を欠損した部分欠損マウスを用いて解析を行った。生存可能なマウスの80%以上において腹水を伴う末梢性Tリンパ腫(CD4⁺CD8⁻SP)一部に胸腺由来Tリンパ腫(CD4⁺CD8⁺DP)を発症し、約1年でその半数が死亡した。さらに、これらのCD4⁺Tリンパ腫瘍細胞は肺、脾臓、腎臓、肝臓など、さまざまな臓器へ浸潤しており、ATLL患者のもつ特徴に近い表現型がTCF8欠損マウスで得られた。

ATLL細胞の一つの特徴としてTGF-beta1を産生し、TGF-beta1に不能性であることが知られている。またTCF8はSmadタンパク質に結合し、TGF-beta1情報伝達系を正に制御することが報告されているため、ATLL細胞におけるTGF-beta1不能性への関与を想定し、以下の実験を行った。TGF-beta1感受性マウスIL2依存性白血病細胞株CTLL2にTCF8siRNAを導入しTCF8mRNAをノックダウンしたところ、TGF-beta1に対する増殖抑制性が有意に弱まった。また、TGF-beta1不能性HTLV-1感染細胞株MT2にTCF8遺伝子を強制発現させたところ、TGF-beta1による増殖抑制が出現した。Tリンパ球の胸腺内分化過程では、TGF-beta1がCD4⁺Tリンパ球のnegative selectionに寄与していることが知られており、TGF-beta1欠損マウスはCD4⁺Tリンパ球が増加する。TCF8欠損マウスがCD4⁺Tリンパ

腫を発生させる機構の一部にこの TGF-beta1 不能性が関わることを示唆される。従って、胸腺内 T 細胞の分化選択性に関わる TGF-beta1 シグナル伝達に対して TCF8 遺伝子発現は CD4⁺リンパ球の選択性に関わる可能性も示唆される。

がん細胞における TGF-beta1 不能性の原因の 1 つとして抑制性 Smad(Smad6/7)の高発現が報告されている。ATL 細胞における Smad6/7 の発現を検討したところ、Smad7 が ATL 細胞で高発現していることが判り、更に ATL 細胞へ shSmad7 を導入したところ、TGF-beta1 による増殖抑制が回復したことから、ATL における TGF-beta1 の不能性は、Smad7 の高発現と TCF8 の発現低下が関与していることが考えられた。TGF-beta1 抵抗性の機序を更に解析するため、以下の実験を行った。肝細胞株 HepG2 に Smad7 を過剰発現させると、TGF-beta1 で誘導される 3TP-Lux の転写活性が抑制されるが、TCF8 を Smad7 と共に発現させると Smad7 による転写抑制が解除された。タンパク質間相互作用を検討したところ、293T 細胞に過剰発現させた Smad7 と TCF8 の結合が確認され、更に内在性タンパク質の相互作用も T 細胞白血病細胞株 MOLT4 を用いて確認した。細胞内局在を検討した結果、TCF8 と Smad7 の免疫蛍光は大部分が核内に存在した。HepG2 細胞に Smad3、Smad7 並びに TCF8 発現プラスミドと 3TP レポーターを導入し、クロマチン免疫沈降法によりプロモーターに対する結合能を解析した。Smad3 と Smad7 を共発現させた細胞では Smad7 がプロモーターに有意に結合したが、Smad-3/7 並びに TCF8 を過剰発現させた細胞では、これら 3 つのタンパク質が同プロモーター上に会合したことから、TCF8 は Smad7 存在下において Smad3 をプロモーターにリクルートし転写活性化に機能することを示唆した。

さらに、ATLL 細胞における TCF8 の標的遺伝子を同定するため TCF8 安定発現 ATLL 細胞株を樹立し遺伝子発現解析を行った。その結果、TCF8 安定発現 ATLL 細胞株は増殖抑制性を示し、CCNG2、CDKN1A(p21/WAF1)等の細胞周期調節遺伝子群の転写活性化が認められた。CDKN1A は癌抑制遺伝子として知られ、多くの白血病・癌において CDKN1A 遺伝子の不活性化が報告されている。そこで TCF8 による p21 転写制御機構について詳細に解析した。CDKN1A 遺伝子の転写開始点上流 2.4kb 領域内には TCF8 結合配列である Ebox 様配列が 5 カ所に存在する。TCF8 はこのうちの 3 カ所の Ebox 様配列に結合し、CDKN1A の転写を活性化することが明らかになった。さらに CDKN1A プロモーターの活性化には p300 ヒストンアセチル化酵素との相互作用が必要であり、コリプレッサー CtBP 結合部位近傍のリジン残基が p300 によりアセチル化されることが必

須であることが明らかになった。さらに転写活性に関わる新規結合タンパク質を同定した。従って ATLL におけるゲノム異常に伴う ZEB1 遺伝子発現抑制は、CCNG2 や CDKN1A 遺伝子転写抑制をもたらす ATLL 細胞の増殖能を亢進させる事が示唆された。

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2件)

1. Nakahata S, Yamazaki S, Nakauchi H, Morishita K. Downregulation of ZEB1 and overexpression of Smad7 contribute to resistance to TGF-beta1-mediated growth suppression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncogene*. 2010;29:4157-69. 査読有り

2. Hidaka T*, Nakahata S*, Hatakeyama K*, Hamasaki M, Yamashita K, Kohno T, Arai Y, Taki T, Nishida K, Okayama A, Asada Y, Yamaguchi R, Tsubouchi H, Yokota J, Taniwaki M, Higashi Y, Morishita K. Down-regulation of TCF8 is involved in the leukemogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2008;112:383-39

3. 査読有り

[学会発表](計15件)

1. 中畑新吾 成人T細胞白血病細胞における CDKN1A 遺伝子の転写はプロモーターのメチル化と ZEB1 発現低下により抑制される。第 73 回日本血液学会学術総会 2010 年 9 月 25 日 パシフィコ横浜

2. 中畑新吾 ATLL における ZEB1 転写抑制は CCNG2 及び CDKN1A の転写抑制を介した細胞増殖をきたす。第 2 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2009 年 8 月 30 日 東京大学医科学研究所

3. 中畑新吾 TCF8 は Smad7 を抑制し ATL の TGF-beta1 不能性を解除する。第 70 回日本血液学会総会 2008 年 10 月 12 日 国立京都国際会館

4. 中畑新吾 Downregulation of TCF8 is involved in ATLL development by the escape from TGF-beta1 during T cell differentiation. 第 66 回日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 5 日 パシフィコ横浜

[図書](計2件)

1. 中畑新吾, 森下 和広 ATL の発症機構 中外医学社 Annual Review 血液 2010 年 132-138 頁

2. 中畑新吾, 森下 和広 TCF8 遺伝子発

現抑制による成人T細胞白血病・リンパ腫発
症機構 医薬ジャーナル社 血液フロンティ
ア18巻 2008年 65-72頁

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中畑 新吾 (NAKAHATA SHINGO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80437938

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

研究者番号：