

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591376

研究課題名(和文) ウイルス癌蛋白を標的とした成人T細胞白血病に対する治療薬の作用機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of arsenite therapy against adult T-cell leukemia

研究代表者

藤井 雅寛 (Fujii, Masahiro)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30183099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：HTLV-1は成人T細胞白血病(ATL)の原因ウイルスである。亜ヒ酸を含む多剤併用療法がATLに対して著効を示すことが報告されている。

1, HTLV-1の癌蛋白Taxに結合する宿主因子としてUSP10を同定した。USP10の発現を低下させたヒトT細胞株は亜ヒ酸によるアポトーシスが昂進した。即ち、USP10が白血病に対する亜ヒ酸治療の感受性を制御する細胞因子であることが示された。本研究は、USP10がATLを含む白血病に対する新たな治療薬の標的分子候補であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：HTLV-1 is a causative agent of adult T-cell leukemia (ATL). Combination therapy containing arsenite has been shown to be effective to ATL patients.

In this study, we identified that USP10 as a binding partner of HTLV-1 Tax oncoprotein. We established USP10 knockout mice and its knockout cells. USP10 mutants in USP10-knockout cells indicated that USP10 inhibits arsenite-induced apoptosis by reducing ROS production by forming stress granules. USP10 interacted with G3BP1 and the interaction is critical for inhibition of apoptosis induced by arsenite. USP10 knockdown in T-cells augmented apoptosis induced by arsenite. Arsenite induced more apoptosis in ATL cells than HTLV-1-uninfected T-cell lines. Tax augmented arsenite-induced apoptosis in cells, and the augmentation needs the interaction with USP10. These results indicated that USP10 is a cellular protein controlling sensitivity of leukemia T-cells to arsenite therapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：ATL 白血病 亜ヒ酸

1. 研究開始当初の背景

ATLは極めて悪性の白血病であり、有効な化学療法剤の開発には至っていない。2009年に亜ヒ酸、IFN と AZT (HTLV-1の逆転写酵素阻害剤)の併用療法が慢性型とくすぶり型ATLに対して著明な効果を示すことが報告された(Phase 2 study of the efficacy and safety of the combination of arsenic trioxide, interferon alpha, and zidovudine in newly diagnosed chronic adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). Blood. 2009.)。また、亜ヒ酸が患者のATL細胞にアポトーシスを誘導することが知られている。しかしながら、亜ヒ酸によるアポトーシス誘導並びにその感受性の分子機構については不明であり、その解明はATL治療薬剤の開発および改良の点から意義を持つ。

2. 研究の目的

HTLV-1の類縁ウイルスHTLV-2はATLを発症させない。申請者は、2つの間に病原性に関与しうる有意な違いを同定した。即ち、HTLV-1のTax1蛋白はT細胞株のIL-2依存性増殖をIL-2非依存性増殖に形質転換したが、この活性はHTLV-2のTax2よりも著しく高かった。また、この違いに関与するTax1固有の3つの機能を明らかにした。これらの解析の中で申請者らは、Tax1に特異的に結合する宿主因子としてUSP10を同定した。このUSP10を介して、Tax1が亜ヒ酸によるアポトーシスを増強することが示された。USP10欠損マウスおよび欠損細胞を樹立したところ、USP10欠損細胞では亜ヒ酸(酸化剤)による活性酸素の産生が昂進し、より強いアポトーシスが誘導された。従って、亜ヒ酸に対するATL細胞の高感受性に酸化ストレス応答の異常が関与すると考えた。本研究では、亜ヒ酸がATL細胞にアポトーシスを誘導する分子機構を、活性酸素の制御因子USP10を切り口として明らかにし、ATL治療薬としての亜ヒ酸の作用機構について下記の5点を明らかにする。

- (1) USP10欠損細胞では亜ヒ酸による活性酸素の産生昂進、ストレス顆粒の形成低下および強いアポトーシスが誘導された。これらの因果関係をUSP10欠損細胞にUSP10変異体を導入することによって明らかにする。
- (2) 抗酸化剤の存在下でTax1発現細胞、USP10欠損細胞、ATL由来細胞を亜ヒ酸で処理することによって、亜ヒ酸によるアポトーシス誘導における活性酸素の関与を確定する。
- (3) 亜ヒ酸は、急性型とリンパ腫型ATLに対してよりも慢性型とくすぶり型とATLに対してより高い効果を示した。その理由として、Tax1発現の有無が考えられる。そこで、Tax1を発現しているATL細胞と発現していないATL細胞の亜ヒ酸感受性を比較する。

- (4) USP10が複合体を形成して酸化ストレス応答を制御することが示唆された。そこで、USP10結合蛋白のノックダウン細胞を用いて、亜ヒ酸誘導性アポトーシスにおけるUSP10結合蛋白の役割を明らかにする。
- (5) USP10と結合できないTax1変異体を用いて、USP10が、Tax1による亜ヒ酸誘導性アポトーシスの昂進に関与するのかを明らかにする。Tax1がUSP10複合体の機能を抑制する分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) USP10による活性酸素の制御機構；USP10ノックアウトマウスの繊維芽細胞を不活化し、この細胞にUSP10変異体を導入し、亜硫酸で処理し、活性酸素産生能、ストレス顆粒形成能を定量した。
- (2) 亜硫酸によるHTLV-1感染細胞の細胞死における活性酸素の役割；HTLV-1感染T細胞株を抗酸化剤の存在・非存在下で亜硫酸で処理した後、細胞死をsubG1細胞(アポトーシス細胞)の定量により測定した。
- (3) ATL細胞株の亜硫酸感受性の定量；ATL細胞株を亜硫酸で処理した後、アポトーシスをsubG1法で定量した。
- (4) USP10結合蛋白の亜ヒ酸感受性における役割；USP10結合蛋白のノックダウン細胞を亜ヒ酸で処理した後、アポトーシスを定量した。
- (5) 亜硫酸感受性に対するTaxの機能；293T細胞にTaxあるいはTax変異体発現プラスミドを遺伝子導入した後に亜硫酸で処理し、アポトーシスとストレス顆粒形成を定量した。

4. 研究成果

- (1) HTLV-1の癌蛋白Taxに結合する宿主因子としてUSP10を同定し、USP10欠損マウスおよびUSP10欠損繊維芽細胞株(MEF)を樹立した。
- (2) MEFにおけるUSP10遺伝子の欠損は亜ヒ酸によるアポトーシスを増強し、このアポトーシスはROS依存性であった。
- (3) 亜ヒ酸は、MEFを含む様々な細胞においてストレス顆粒(stress granules; SG)の形成を誘導したが、この形成はUSP10の欠損により低下した。
- (4) USP10はSG形成因子であるG3BP1と結合し、この結合がSGの形成、ROSの低下およびアポトーシスの抑制に関与することが、USP10の変異体を用いた解析から示された。
- (5) USP10の発現を低下させたヒトT細胞株(Jurkat)は亜ヒ酸によるアポトーシスが昂進した。即ち、USP10がT細胞の亜ヒ酸感受性を抑制することが示された。
- (6) TaxはUSP10と結合することにより亜硫酸による細胞のアポトーシスを亢進した。
- (7) 亜ヒ酸はATL由来のT細胞株にアポトーシスを誘導し、このアポトーシスに対する感受性は、他のT細胞株(Jukat, MOLT4)より

も昂進していた。

- (8)Taxを発現していないATL細胞株でも亜硫酸に対する感受性が高い場合があることから、USP10の機能を阻害するTax以外のメカニズムが存在することが示唆された。以上より、USP10が白血病に対する亜硫酸治療の標的分子であることが示された。この結果は、USP10がATLを含む白血病に対する新たな治療薬の標的分子候補であることを示唆する。

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7件)

Takahashi M, Higuchi M, Makokha GN, Matsuki H, Yoshita M, Tanaka Y, Fujii M. HTLV-1 Tax oncoprotein stimulates ROS production and apoptosis in T-cells by interacting with USP10. *Blood*, 122(5):715-725, 2013. 査読有

Mizukoshi T, Komori H, Mizuguchi M, Abdelaziz H, Hara T, Higuchi M, Tanaka Y, Ohara Y, Funato N, Fujii M, Nakamura M. Failure in activation of the NF- κ B canonical pathway by human T-cell leukemia virus type 1 Tax in non-hematopoietic cell lines. *Virology*, 443(2):226-235, 2013. 査読有

Makokha GN, Takahashi M, Higuchi M, Saito S, Tanaka Y, Fujii M, Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein interacts with and mislocalizes the PDZ domain protein MAGI-1. *Cancer Science*, 104(3):313-320, 2013. 査読有

Takahashi M, Higuchi M, Matsuki H, Yoshita M, Ohsawa T, Oie M, Fujii M. Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production. *Mol. Cell Biol.* 33(4):815-829, 2013. 査読有

Matsuki H, Takahashi M, Higuchi M, Makokha GN, Oie M, Fujii M. Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes Cells*. 18(2):135-146, 2013. 査読有

Imai M, Higuchi M, Kawamura H, Yoshita M, Takahashi M, Oie M, Matsuki H, Tanaka T, Aoyagi Y, Fujii M. Human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax2 has a dominant activity over HTLV-1 Tax1 to immortalize human CD4+ T cells. *Virus Genes* 2013, 46(1):39-46, 2013. 査読有

Yoshita M, Higuchi M, Takahashi M,

Oie M, Tanaka Y, Fujii M. Activation of mTOR by human T-cell leukemia virus type 1 Tax is important for the transformation of mouse T cells to interleukin-2-independent growth. *Cancer Science* 103(2):369-374, 2012. 査読有

[学会発表](計21件)

藤井雅寛、高橋雅彦、樋口雅也、Naswa Makokha Grace PDZ 蛋白 MAGI-1 の不活化は HTLV-1 の Tax による T 細胞のトランスフォーメーションに關与する。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、2013.11.10-12、神戸

高橋雅彦、樋口雅也、藤井雅寛、HTLV-1 の Tax 蛋白は USP10 を介して ROS 産生と ROS 依存性アポトーシスを誘導する。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、2013.11.10-12、神戸

水口真理子、樋口雅也、藤井雅寛、中村正孝、HTLV-1 Tax による NF- κ B を介した増殖メカニズムの解析、第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2013.10.3-5、横浜

高橋雅彦、樋口雅也、藤井雅寛、HTLV-1 Tax は USP10 と結合することにより T 細胞における ROS 産生とアポトーシス誘導を活性化する。第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2013.10.3-5、横浜

Fujii M, Makokha GN, Higuchi M, Takahashi M, MAGI-1 の不活化は HTLV-1 Tax による T 細胞のトランスフォーメーションに關与する。第 6 回 HTLV-1 研究会、東京大学医科学研究所、2013 年 8 月 25 日、東京

Takahashi M, Higuchi M, Fujii M. Stress granules inhibit apoptosis by reducing ROS production, but this phenomenon is nullified by HTLV-1 Tax. 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, June 26-30 2013 Montreal, Canada

Makokha GN, Takahashi M, Higuchi M, Saito S, Tanaka Y, Fujii M, Downregulation of the multi-PDZ domain protein MAGI-1 is associated with transformation of T cells by HTLV-1 Tax1, 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市教育分化会館、2012.9.19-21、北海道

Higuchi M, Takahashi M, Fujii M, Human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax2 has a dominant activity over HTLV-1 Tax1 to immortalize human CD4+ T cells, 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市教育分化会館、2012.9.19-21、北海道

高橋雅彦、樋口雅也、藤井雅寛、ストレス顆粒は ROS 産生を抑制することにより

アポトーシスを阻害するが、これを HTLV-1 の Tax1 は解除する。第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市教育分工会館、2012.9.19-21、北海道

Matsuki H, Takahashi M, Higuchi M, Fujii M、Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation, 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市教育分工会館、2012.9.19-21:北海道

Mizuguchi M, Higuchi M, Fujii M, Nakamura M, HTLV-1 Tax induces cell death through the NF-kB pathway, 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市教育分工会館、2012.9.19-21:北海道

高橋雅彦、樋口雅也、藤井雅寛、USP10は亜ヒ酸によるHTLV-1感染細胞のアポトーシス感受性に関与する、第5回HTLV-1研究会、東京大学医科学研究所、2012年8月25日、東京

Fujii M、Distinct activities of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 Tax2 play key roles in pathogenesis 医歯学系 Frontiers of Retrovirology、Movenpick Hotel、2011年10月4日、Amsterdam、オランダ

樋口雅也、高橋雅彦、藤井雅寛、HTLV-1 Tax1 と HTLV-2 Tax2 の違いが病原性に寄与する。第 70 回日本癌学会学術総会、2011.10.3-10.5、名古屋

水口真理子、樋口雅也、藤井雅寛、中村正孝、HTLV-1 Tax induces both cell growth and death,第 70 回日本癌学会学術総会、2011.10.3-10.5、名古屋

由田真奈美、樋口雅也、藤井雅寛、Activation of mTOR by HTLV-1 Tax is crucial for IL-2 independent growth transformation of a mouse T-cell line, 第70回日本癌学会学術総会、2011.10.3-10.5、名古屋

水越てるみ、樋口雅也、藤井雅寛、中村正孝、HTLV-1 Tax does not activate the NF-kB canonical pathway in REF52 cells, 第70回日本癌学会学術総会、2011.10.3-10.5、名古屋

藤井雅寛、今井径卓、樋口雅也、HTLV-2 のTax2によるヒトT細胞の不死化活性はHTLV-1のTax1よりも強い、第4回HTLV-1研究会、東京大学弥生講堂、2011年9月19日、東京

Watanabe K, Fujii M、Epidemiological disease association of human parechovirus in Niigata, Japan、第 15 回国際ウイルス学会、札幌コンベンションセンター、2011年9月15日、札幌

Fujii M、Takahashi M, Higuchi M, A novel HTLV-1 Tax-binding protein USP10 inhibits an oxidative stress-induced ROS production and apoptosis、第 15 回国際ウイルス学会、札幌コンベンションセンター、2011年9月13日、札幌

②1 Higuchi M, Fujii M、HTLV-1 Tax1

represses the proapoptotic protein Bim, which is crucial for T-cell transformation. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. 2011.6.4-8, Leuven, Belgium

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 雅寛 (FUJII, Masahiro)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：30183099

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：