

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591392

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた成人T細胞白血病の網羅的な遺伝子解析

研究課題名(英文)Analysis of somatic mutation for adult T-cell leukemia using a next-generation sequencing

研究代表者

菱澤 方勝(Hishizawa, Masakatsu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90444455

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文):成人T細胞白血病(adult T-cell leukemia: ATL)におけるNF- κ B活性化の機序を解明するために、次世代シーケンサーにより遺伝子変異の解析をした。解析をした27症例のATLにA20, BCL11B, BCL10, MYD88, NIKに変異はなかったが、CARD11のcoiled-coil domainに二種類のnon-synonymousな変異(M360V, D401Y)が確認された。これら変異はluciferase reporter assayにてNF- κ Bを活性化し、ATLの恒常的な活性化の一因となっている可能性が示された。

研究成果の概要(英文):To elucidate the molecular mechanism of NF- κ B activation for adult T-cell leukemia (ATL), we examined somatic mutation of ATL cells using next-generation DNA sequencing. Among 27 ATL patients evaluated, there was no non-synonymous mutation for A20, BCL11B, CARD11, MYD88, or NIK. However, two patients with ATL had CARD11 mutation at coiled-coil domain (M360V, D401Y). These mutations showed NF- κ B activation by luciferase reporter assay. CARD11 could contribute a constitutive activation of NF- κ B for ATL.

研究分野：血液内科学

キーワード：成人T細胞白血病 NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病(Adult T-cell leukemia: ATL)は、human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)の感染後、およそ 60 年の潜伏期間を経て発症する成熟 T 細胞腫瘍である。ATL は、急性型、リンパ腫型、慢性型およびくすり型に分類されるが、このなかで急性型とリンパ腫型は極めて予後不良であり、通常の化学療法での平均生存期間は 1 年程度である。有効な新規治療の開発が望まれ、そのためには ATL に特異的な治療の標的を同定する必要がある。ATL の多くで NF- κ B が恒常的に活性化していることが知られている。その分子生物学的機序として、HTLV-1 にコードされる Tax や HBZ といった分子の影響が報告されているが、多くの ATL においてこれら蛋白の発現は低く、HTLV-1 が発症後の NF- κ B 活性化に関わる可能性は低い。一方、ATL では発症するまでに多数の体細変異が蓄積しており、このゲノム変異の中に NF- κ B の活性化に関わる異常が含まれていると推測される。

2. 研究の目的

次世代シーケンス技術を用いて、ATL における遺伝子の体細胞変異を網羅的に解析し、特異的治療の標的となる候補を探索する。NF- κ B の恒常的活性化に関わる遺伝子変異について重点的に解析をおこなう。ATL の分子病態を解明し、腫瘍特異的な分子標的薬の開発に貢献しうる基礎的な研究を目標とした。

3. 研究の方法

ATL の患者から文書による同意を得た後に、検体を採取し、抽出した DNA を、シーケンサー GS Junior Bench Top System (Roche Diagnostics)を用いて解析した。ATL において恒常的な活性化がみられる NF- κ B の制御に関わる遺伝子の変異を主に解析した。

Diffuse large B-cell など他のリンパ系腫瘍で変異の報告のある、A20, Bcl11B, MYD88, CARD11, Bcl10, NIK などの分子を含め、exon のシーケンスをおこなった。

検出された遺伝子変異の候補は、クローニングし、luciferase reporter assay による NF- κ B の活性化への関与、遺伝子導入や shRNA によるノックアウトにより、細胞増殖やアポトーシスへの影響について検討をおこなった。

4. 研究成果

症例

この研究は、京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院 医の倫理委員会の承認を得て実施した。

ATL 患者 急性型 23 例、慢性型 6 例、くすり型 3 例から文書による同意を得た後に末梢血もしくはリンパ節から抽出した DNA を解析した。

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)により、この 32 症例中 27 症例で NF- κ B の活性化を確認し、次世代シーケンサーの解析は活性化の認められた検体でおこなった。

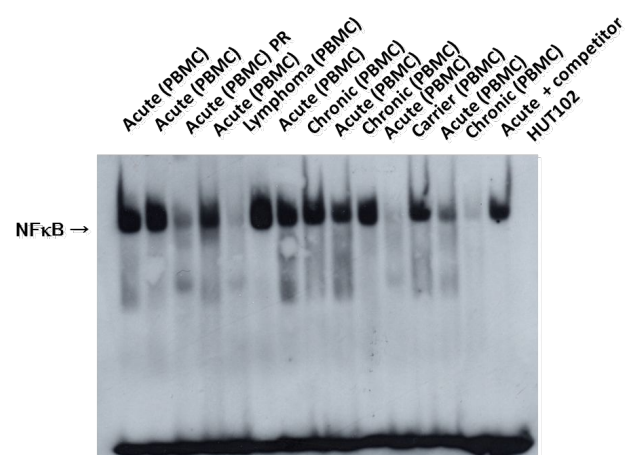


図 1 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)による ATL 症例での NF- κ B の活性化

次世代シーケンサーによる exome 解析

NF- κ B を制御する蛋白で、腫瘍との関連の報告されている A20, Bcl11B, MYD88, Bcl10, NIK, CARD11 などの exon のシーケンスをした。全例で、A20, Bcl11B, MYD88, Bcl10, NIK non-synonymous な変異は認められなかったが、CARD11 は coiled-coil domain に 2 種類の non-synonymous な変異が認められた。この変異は sanger 法でも確認した(図 2)。

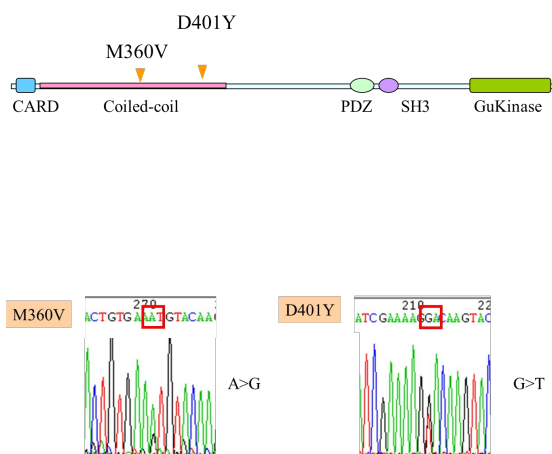


図 2 ATL における CARD11 変異

CARD11 変異による NF- κ B 活性化

同定された変異を導入した CARD11 は、Luciferase reporter assay により NF- κ B を活性化した(図 2)。

次に、CARD11 欠損 Jurkat 細胞株へ変異を持つ CARD11 遺伝子を導入し、MTT assay での細胞で細胞増殖や Annexin V 染色によるアポトーシスへの影響を検討した。しかし、いずれの解析でも wild type の CARD11 と比較して有意な変化は認められなかった。

さらに、shRNA 発現ベクター (pSINsi -hH1: Takara) を用いて、CARD11 のノックダウンをおこなったが、細胞増殖およびアポトーシスともに影響は認められなかった。

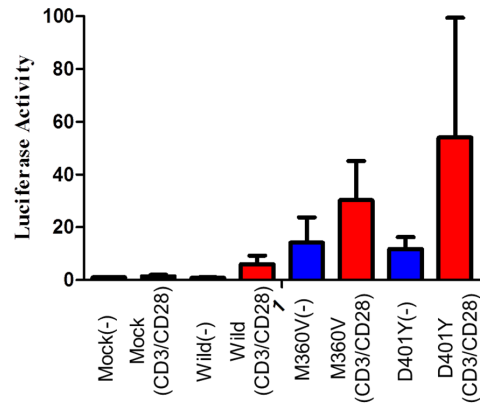


図 3 CARD11 変異による NF- κ B の活性化

ATL における CARD11 の発現亢進

ATL 細胞での CARD11 の RNA 量を、定量 RT-PCR 法を用いて定量した。変異の認めない患者を含めた ATL 患者で、CARD11 の発現亢進が、正常末梢血 CD4 陽性細胞と比較して、優位に亢進していた(図 4)。この分子が ATL における NF- κ B の活性化に寄与している可能性が示唆された。

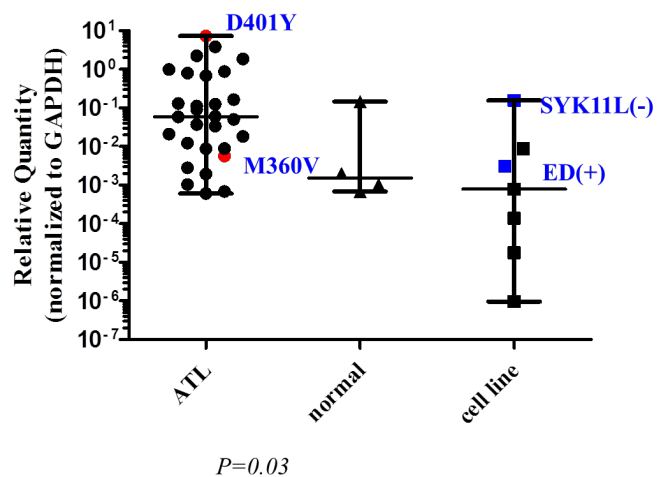


図 4 ATL における CARD11 の発現亢進

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0件)

[学会発表](計0件)

[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:

出願年月日:

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

菱澤 方勝 (Hishizawa Masakatsu)

京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科
学 助教

研究者番号: 90444455

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし