

Tomonaga M, and LSG Group: VCAP-AMP-VECP versus biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study, JCOG9801. *J Clin Oncol*, 25:5458-5464,2007

5. Kuramitsu M, Hamaguchi I, Mizukami T, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mochizuki M, Naito S, Yamaguchi K.: Deficient RPS19 protein production induces cell cycle arrest in erythroid progenitor cells. *Brit J Haematol* 140:348-359, 2008

6. Naito S, Maeyama J, Mizukami T, Takahashi M, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of an adjuvant. *Vaccine* 25,8762-8770, 2007

7. Hamaguchi I, Imai J, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Mochizuki M, Ochiai M, Yamamoto A, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K.: Agp and Hpx are useful for pertussis vaccine safety control as vaccine toxicity-related genes. *Vaccine* 25,3355-3364,2007

## 2. 学会発表

1. Toshiki Watanabe, Shigemi Aizawa, Keiyu Yamamoto, Sakura Aoki, Masae Maruyama-Nagai, Kazunari Yamaguchi, Shimeru Kamihira, Akihiko Okayama, Atae Utsunomiya, Hiroshi Kikuchi, and collaborators of JSPFAD

Nationwide cohort study of HTLV-1 carriers in Japan: Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development (JSPFAD)

13th International Conference on Human Retrovirology:HTLV and Related Viruses. Hakone, May 22-25. 2007

2. Satsuki Muto, Go Yamamoto, Yasuhito Nannya, Masashi Sanada, Nazanin Dabaghmanesh, Takaomi Ishida, Atae Utsunomiya, Yasuaki Yamada, Kazunari Yamaguchi, Seishi Ogawa, Toshiki Watanabe. Molecular allele-karyotyping of adult T-cell leukemia using high SNP genotyping microarrays.

13th International Conference on Human Retrovirology:HTLV and Related Viruses. Hakone, May 22-25. 2007

3. Muto S, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Dabaghmanesh N, Ishida T, Utsunomiya

A, Yamada Y, Kamihira S, Yamaguchi Y, Watanabe T, Ogawa S. Molecular Allelo-Karyotyping of Adult T-Cell Leukemia Using High SNP Genotyping Microarray. (The American Society of Hematology49th Annual Meeting and Exposition.)

4. 武藤早紀, 山本豪, 加藤元博, 真田昌, 南谷泰仁, 石田尚臣, 宇都宮與, 山田恭暉, 上平憲, 山口一成, 渡邊俊樹, 小川誠司. 高密度SNPマイクロアレイを用いた成人T細胞白血病のアレル核型分析. *臨床血液* (0485-1439). Vol. 48; 2007:931.

5. 武藤早紀, 山本豪, 南谷泰仁, 真田昌, DabaghmaneshNazanin, 石田尚臣, 宇都宮與, 山田恭暉, 上平憲, 山口一成, 小川誠司, 渡邊俊樹. 高密度 SNP マイクロアレイを用いた成人 T 細胞白血病のアレル核型分析 (Molecular allele-karyotyping of adult T-cell leukemia using high SNP genotyping microarrays). *日本癌学会総会記事*(1347-9032). Vol. 66 回; 2007:233.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## ATL モデルマウスを用いた腫瘍浸潤とケモカインの解析

分担研究者 長谷川秀樹 国立感染症研究所 感染病理部  
研究協力者：川口 晶（国立感染症研究所感染病理部・  
北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター）

### 研究要旨

我々の研究室では近年 HTLV-I の調節遺伝子である Tax を lck proximal promoter を用いて発達段階にある胸腺細胞にのみに発現させたトランスジェニックマウスを完成した。本マウスは白血病の発症をおこし、ヒトの ATLL に特徴的である血管周囲性の著しい浸潤を多くの組織において示した。本研究では、このマウスを用いたがん細胞の多臓器への浸潤のメカニズムの解明を試みた。細胞走化アッセイによりマウス由来腫瘍細胞が *in vitro* においてケモカイン CXCL12/SDF-1 $\alpha$  に対し強い応答を示し同時に ERK1/2 のリン酸化が見られる事が分かった。マウス ATL 細胞で SDF-1 $\alpha$  の刺激により MEK-ERK 経路が働いている事が分かった。また SDF-1 $\alpha$  に対する走化性も MEK の阻害剤により抑制された。MEK の阻害剤が ATL の治療においてよい候補となりうる事が示唆された。

### A. 研究目的

ATL マウスモデルを用いてその増殖浸潤におけるケモカイン及びそのレセプターとその情報伝達系の関与を明らかにすることにより新規治療ターゲットとしてのケモカイン及びそのレセプター、またそれらの情報伝達分子の効果を *in vivo* で調べる事を目的とする。

### B. 研究方法

#### 材料と方法：

##### 動物実験

すべての動物実験は国立感染症研究所実験動物委員会の承認の元に行われた。C57BL/6 マウス（オリエンタル酵母）を用いてトランスジェニックマウスを作製した。

##### 細胞とその刺激

実験に用いた細胞は Tax transgenic mice 由来のリンパ腫細胞を RPMI に懸濁し、 $1 \times 10^6$  個を SCID マウスの腹腔内に接種し、約 28 日後マウスが白血病を発症した時点で腹水及び脾臓を回収した。再びこれを SCID マウスに腹腔内接種で植え継ぎ、これを繰り返す事で腫瘍細胞のみの集団にした。更に lymphoprep

(AYIS-SHIELD) を用いて腫瘍細胞を分離し、この集団を mouse ATL leukemic cell (mATL cell) として用いた。mATL cell の培養は RPMI medium (10% Fetal Bovine Serum,  $\beta$ -mercapt ethanol) で行なった。

B6 T cell は B6 マウスの脾臓より分離、溶血後 PanT cell isolation kit (Miltenyl Biotec) を用いて回収した。培養には RPMI (10% Fetal Bovine Serum) を用いた。

mATL cell  $1 \times 10^7$  cells を 1ml の RPMI (no FCS) に懸濁し直し、37°C で 2hr 培養した。その後 100ng/ml の CXCL12/SDF-1 $\alpha$  で刺激を加え経時的に解析した。またシグナル経路の阻害を行なう際は CXCL12/SDF-1 $\alpha$  を添加する 30min 前に MEK 阻害剤または NF- $\kappa$ B 阻害剤、コントロールとして DMSO を加え 37°C で共培養した。

##### 定量的 RT-PCR

ATL モデルマウスの細胞及び組織から total RNA を Trizol (GIBCO BRL) にて抽出した。1 $\mu$ g の RNA に対し DNase Amplification Grade1 を用いて DNase 処理を行い、Oligo(dT) primer、RNase inhibitor (Promega)、RT Omniscript RT

Kit(Qiagen)を用いてcDNAを作成した。

PCRはQuantitative PCR Probe (QIAGEN)を用いて行なった。スタンダードにはそれぞれの遺伝子のcDNAを含んだプラスミドを段階希釈した物を用いた。 $\beta$ -actinをインタナルコントロールとし、mRNAの定量的な評価は $\beta$ -actinのコピー数との比較により行なった。ABI Prism 7000を用い、サイクル条件は50°C 2 min, 95°C 15 min, (94°C 15 sec, 60°C 1 min) × 45 cycleで行なった。

#### ・ウエスタンブロッティング法

細胞をLysis Buffer (150mM NaCl, 2mM EDTA, 100mM NaF, 400  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% NP-40, complete)で溶解し、氷上に15分以上置いた。その後1000×g, 10min, 4°Cで遠心後上清を回収しサンプルとした。2×Sample Bufferと混合し、95°Cで5分間ボイルしたサンプルを10%SDS-PAGEにて分離したタンパクをPDVF membrane (Bio Rad)へ転写後 $\alpha$ -リン酸化ERK1/2 antibodyと反応させた。 $\alpha$ -rabbitIgG抗体を二次抗体として用いた。更にECL-plus detection system (Amersham Biosciences)とFujifilmルミノイメージアナライザー LAS-1000plusを用いてプロトコールに従って検出した。

#### ・走化性アッセイ

24wellプレートと3  $\mu$ m pore size ケモタキスチャンバー (kurabo)を用いて行なった。細胞を2.5×10<sup>7</sup> cells/mlの濃度でRPMI (0.5% bovine albumin, sodium Bicarbonae, Glutamin)に懸濁した。細胞を200  $\mu$ l 上部チャンバーに乗せ、各濃度のケモカインを含む培地500  $\mu$ lを下部チャンバーに入れた。37°C 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで2時間培養を行い、下部の培地中に移動した細胞の数のカウントを行なった。阻害剤による阻害の効果は、阻害剤と細胞の30minの共培養後に同様の走化性アッセイを行なう事で評価した。この時のCXCL12/SDF-1 $\alpha$ の濃度は100  $\mu$ g/mlである。

#### ・アポトーシスの検出

1×10<sup>6</sup> cells/mlの細胞懸濁液中にMEK阻害剤(U0126) 20  $\mu$ M、NF-kB阻害剤(BAY11-7086) 10  $\mu$ M、コントロールとしてDMSO 2  $\mu$ lを添加した。24時間または48時間37°C 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、アポトーシスの誘導

の有無を検討した。アポトーシスの検出にはTUNEL染色と染色体DNAのラダーの検出を行なった。

TUNEL染色:細胞を4%パラフォルムアルデヒドと1対1で混ぜて固定後スライドガラス上で風乾し、In Situ Cell Death Detection Kit POD (BOEHRINGER MANNHEIM)を用いてプロトコールに従って染色を行なった後、蛍光顕微鏡にて観察した。

DNA ladder detection: apoptotic DNA ladder detection Kit (Roche)を用いてプロトコールに従いDNAを溶出した後2%アガロースゲルにて電気泳動を行いラダーの検出を行なった。

## C. 研究結果

### 1、マウス ATL 細胞のケモカインに対する走化性

ヒトATL細胞はTARC、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ などのケモカインに対して走化性を示す。各臓器の組織への腫瘍細胞浸潤において”migration”は非常に重要な役割を果たすことが知られる。マウスのモデルを用いて浸潤と走化の関係を調べた。Tax-transgenic mouse (ATLモデルマウス)由来の腫瘍細胞を回収し(mATL cell)種々のケモカインCCL17/TARC、CCL20/LARC、CCL5/RANTES、CCL21/SLC、CCL27/CTACK、CXCL12/SDF-1 $\alpha$ に対するin vitroでの走化性を調べた。(Fig 2a)その結果mATL cellはSDF-1 $\alpha$ に対して濃度依存的に非常に強い応答を示した。また、この応答はコントロールであるB6マウス由来のT cellと比較して非常に強かった。(図1)

### 2、SDF-1 $\alpha$ によるMAPキナーゼの活性化

マウスATL細胞で発現しているCXCR4が機能的であるかを調べるため、SDF-1 $\alpha$ の刺激時に働く主要なシグナル経路の解析を行なった。MEK-ERK経路がガンの浸潤において腫瘍細胞のmigration時に活性化される事が報告されている。そこでリン酸化ERK1/2の検出をウエスタンブロット法により行なった。(図2)

マウスATL細胞では恒常的にERK1/2の活性化が認められ、これは正常T cellに比較し強かった。また100ng/mlのSDF-1 $\alpha$ で刺激を添加し、各時間経過後のリン酸化を見ると著しい亢進が認められた。これらのことからマウスATL細胞では機能的なCXCR4が発現してお

り SDF-1 $\alpha$ に対する感受性が高まっている事がわかった。

### 3、MEK-ERK 経路及び NF-kB 経路の阻害による SDF-1 $\alpha$ への走化性の抑制

マウス ATL 細胞の ERK1/2 活性化のメカニズムを明らかにするため MEK 阻害剤 (U0126) を用い ERK1/2 のリン酸化に与える影響を調べた。U0126 と共に培養 (37 $^{\circ}$ C 30min) 後に同様に SDF-1 $\alpha$  を 100ng/ml で加えリン酸化 ERK を検出した。すると SDF-1 $\alpha$  により入る ERK1/2 のリン酸化は抑えられた。(図 2a)この事から SDF-1 $\alpha$  による ERK1/2 のリン酸化の上流には MEK が関与し、マウス ATL 細胞内においても MEK-ERK 経路が働いている事が示唆された。

また、U0126 での処理後の走化性の変化を調べた。U0126 と腫瘍細胞との 30 分間の共培養後に細胞走化性アッセイを行った。すると 100  $\mu$ M で 40%まで走化性を抑制した。(図 2b)

### D. 考察

我々は、マウス ATL 腫瘍細胞がケモカイン CXCL12/SDF-1 $\alpha$  に対して強い走化性を示すことを示した。定量的 RT-PCR によるとマウス ATL 細胞表面上での CXCR4 の発現上昇は認められなかった。HTLV-1 で形質転換された細胞の内 HUT102 と TL-su は SDF-1 $\alpha$  を発現するが CXCR4 の発現は HTLV-1 非感染細胞に比べて下がっている事が知られる。その一方で CXCL12/SDF-1 $\alpha$  に対する応答が高まっていることから細胞内でのシグナル異常が起きている事が考えられ、実際にリン酸化 ERK1/2 を検出するウェスタンブロット法により恒常的な ERK1/2 のリン酸化の亢進が確かめられた。SDF-1 $\alpha$  による刺激を加えることでこのリン酸化が強くなり亢進することから CXCR4 が機能的に働いている事も言えた。この結果からも CXCL12/SDF-1 $\alpha$  へ対する感受性が亢進していることが確かめられた。また MEK の阻害剤を用いることで CXCL12/SDF-1 $\alpha$  による ERK1/2 活性化の上流因子として MEK が働いていることも確かめられた。このことから腫瘍細胞内で MEK-ERK 経路の恒常的な活性化が起きていることがわかった。

また本腫瘍細胞では NF-kB 経路の恒常的な活性化も知られている。これらの経路を阻害剤を用いてそれぞれ阻害することで腫瘍細胞

が持つ CXCL12/SDF-1 $\alpha$  に対する走化性は抑制された。2 つの経路のシグナル異常が CXCL12/SDF-1 $\alpha$  に対する強い感受性に関与すると考えられる。また、以前の研究から MEK-ERK 経路の活性化が細胞の移動に関与すると言う報告がある。例えば T リンパ球の CXCR4 を介した走化性には ERK が関与する事が知られる。この事と今回の結果は矛盾しない。

### E. 結論

ATL モデルマウスを用い、腫瘍細胞の浸潤に関連した走化性を調べた。腫瘍細胞は SDF-1 に強い走化性を示し ERK 阻害剤でその活性は消えた。本モデルマウスを用いた病態解析はモデル動物として悪性腫瘍発症時の増殖浸潤の予防法開発のためモデル動物となると考えられる。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H\*. Prophylactic effects of chitin microparticles (CMP) on highly pathogenic H5N1 influenza virus. J Med Virol. 2007 Jun;79(6):811-819
2. Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T and Hasegawa H\*. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. Microbes and Infection 2007 Sep;9(11):1333-40.

#### 2. 学会発表

1. Iha H, Taguchi S, kawaguchi A, Kawashima T, Tanaka Y, Sawa H, Nishizono A, Sata T, Hall WW, Jeang, KT, Hasegawa H: A water-soluble Hsp90 inhibitor 17-DMAG suppresses Tax-mediated oncogenic signaling both in

vitro and in vivo. The 13th International Conference on Human Retrovirology HTLV and related Viruses, 2007, Hakone, Japan

2. Kawaguchi A, Orba Y, Sawa H, Sata T, Hall WW, Hasegawa H, Adult T cell leukemia/lymphoma(ATLL): Exploitation of transgenic mouse model to understand disease pathogenesis and for the development of rational therapeutics. 13<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology 21<sup>th</sup>-25<sup>th</sup> May 2008 Hakone

3. 長谷川秀樹、一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅 2005/2006 シーズナルインフルエンザワクチンの経鼻接種による高病原性鳥インフル

エンザウイルス(H5N1)感染の交叉防御効果の検討 第11回日本ワクチン学会学術集会(2007年11月横浜)

4. 伊波 英克、川口 晶、田口 慎也、川嶋太郎、廣瀬 仁志、池辺 詠美、村上 真弓、田中 勇悦、澤 洋文、佐多 徹太郎、後藤和代、西園 晃、Jeang Kuan-Teh、Hall William、長谷川 秀樹：水溶性ゲルダマイシン 17-DMAG による Tax 誘導性ガン化シグナルの遮断。第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年、札幌

G. 知的財産権の出願、登録状況  
なし

## ATLL モデルマウスから単離された腫瘍細胞の浸潤機構

分担研究者 澤 洋文 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター

### 研究要旨

我々はリンパ球特異的に転写を活性化する lck promoter の下流に、HTLV-I の転写活性化因子である Tax 遺伝子を code した construct を作製し、リンパ球特異的に HTLV-I Tax を発現するトランスジェニックマウス [ATLL (Adult T cell leukemia/lymphoma)モデルマウス]を作成した。本モデルは ATL と同様に、末梢血液中に分葉状の核を有する異型細胞が増殖しており、リンパ節を含む脾臓、肝臓、肺等の多臓器に浸潤していた。本研究では ATL の腫瘍細胞の浸潤機構を解明するために、ATLL モデルマウスから単離した腫瘍細胞 [mouse ATLL-like Cells (mATLL cell)]を用いて、ケモカインに対する腫瘍細胞の走化性に着眼し、解析することを目的とした。その結果 ATLL モデルマウス由来の腫瘍細胞の走化性には SDF-1  $\alpha$ -CXCR4 と MEK-ERK シグナル経路が重要であることが明らかになった。

### A. 研究目的

我々はリンパ球特異的に転写を活性化する lck promoter の下流に、HTLV-I の転写活性化因子である Tax 遺伝子を code した construct を作製し、リンパ球特異的に HTLV-I Tax を発現するトランスジェニックマウス [ATLL (Adult T cell leukemia/lymphoma)モデルマウス]を作成した。本モデルは ATL と同様に、末梢血液中に分葉状の核を有する異型細胞が増殖しており、リンパ節を含む脾臓、肝臓、肺等の多臓器に浸潤していた。本研究では ATL の腫瘍細胞の浸潤機構を解明するために、ATLL モデルマウスから単離した腫瘍細胞 [mouse ATLL-like Cells (mATLL cell)]を用いて、ケモカインに対する腫瘍細胞の走化性に着眼し、解析することを目的とした。

### B. 研究方法

#### [細胞の調整]

本実験に用いた細胞は ATLL モデルマウス由来の腫瘍細胞を RPMI に懸濁した後、 $1 \times 10^6$  個を SCID マウスの腹腔内に接種し、約 28 日後、マウスが白血病を発症した時点で腹水及び脾臓を回収した。再びこれを SCID マウスに腹腔内接種によって植え継ぎ、これを繰り返して腫瘍細胞以外の細胞を除くことを試みた。

更に lymphoprep (Ayxis-Shield, Norway) を用いて腫瘍細胞を分離し、この集団を mouse ATLL-like cell (mATLL cell)として用いた。mATLL cell の培養は RPMI medium [10% Fetal Bovine Serum (FBS),  $\beta$ -mercaptethanol]で行なった。

B6 T cell は B6 マウスの脾臓より分離、溶血後 Pan T cell isolation kit (Miltenyl Biotec, Auburn, CA)を用いて回収した。培養には RPMI (10% FBS)を用いた。

#### [走化性アッセイ]

24 well プレートと 3  $\mu$ m pore size ケモタキスチャンバー (Kurabo, Osaka) を用いて行った。細胞を  $2.5 \times 10^7$  cells/ml の濃度で RPMI (0.5% bovine albumin, sodium Bicarbonae, Glutamin) に懸濁した。200  $\mu$ l の細胞溶液を上部チャンバーに入れ、各濃度のケモカインを含む培地 500  $\mu$ l を下部チャンバーに入れた。37°C 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 2 時間培養を行い、下部の培地中に移動した細胞数をカウントした。

#### [細胞の刺激]

mATLL cell ( $1 \times 10^7$ )を 1 ml の血清を含まない RPMI 培地に懸濁し、37°C で 2 時間培養した。その後 100 ng/ml の CXCL12/ SDF-1  $\alpha$  で刺激を加え経時的に解析した。

#### [immunoblotting]

細胞を Lysis Buffer (150mM NaCl, 2 mM EDTA, 100 mM NaF, 400  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% NP-40, complete)で溶解し、氷上に 15 分以上置いた。その後 1,000 $\times$ g、10 分、4 $^{\circ}$ Cで遠心後上清を回収しサンプルとした。2 $\times$ Sample Buffer と混合し、95 $^{\circ}$ Cで 5 分間ボイルしたサンプルを 10% SDS-PAGE にて分離しタンパクを PVDF membrane (Bio Rad, CA)へ転写後抗リン酸化 ERK1/2 抗体と反応させた。次に抗 rabbit IgG 抗体を二次抗体として用いた。更に ECL-plus detection system (Amersham Biosciences, NJ)と Fujifilm ルミノイメージアナライザー LAS-1000 plus (Tokyo)を用いてプロトコールに従って検出した。

[Flowcytometry による解析]

腫瘍細胞の CXCR4 受容体の細胞表面での発現を調べるために、mATLL cell 抗 mouse-CD184/CXCR4 monoclonal antibody (BD Pharmingen, CA)もしくは陰性対照として PE-anti-Rat IgG2b (Beckman Coulter, CA) を isotype control として用いて染色した。解析は FACS Canto (BD Biosciences, CA)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究計画は北海道大学遺伝子組換え実験等安全委員会にて承認されている[承認番号17(12)]。また実験動物に対する動物愛護上の配慮を行い、北海道大学大学院医学研究科動物実験委員会において承認されている(実験番号S0704)。

### C. 研究結果

1) 種々のケモカインに対する走化性の検討の結果、マウス由来腫瘍細胞は SDF-1  $\alpha$ に反応して、強い走化性を示す事が明らかになった。また腫瘍細胞は SDF-1  $\alpha$  のレセプターである CXCR4 を表面に発現している事、CXCR4 は SDF-1  $\alpha$ 刺激により downregulation することが明らかになった(図 1)。

2) SDF-1  $\alpha$ -CXCR4 を介したシグナル伝達系の解析を行い、マウス由来腫瘍細胞では CXCR4 の下流に位置する ERK1/2 の恒常的なリン酸化が認められ、SDF-1  $\alpha$  の刺激によりリン酸化が増強することを見出した(図 2)。さらに Rho が active form になることも判明した。

以上の結果から、マウス由来腫瘍細胞の走

化性は SDF-1  $\alpha$ -CXCR4 と MEK-ERK シグナル経路が関与することが示された。SDF-1  $\alpha$ を介したシグナル伝達の抑制が ATL の新しい治療法の開発につながる可能性が示唆された。

### D. 考察

#### 1) 達成度について

平成 19 年度の本計画では目的に沿って ATLL モデルマウスから単離した腫瘍細胞 [mATLL cell]を用いて、ケモカインに対する腫瘍細胞の走化性に着眼し、解析を行い、SDF-1  $\alpha$ -CXCR4 と MEK-ERK が重要であることを見出した。

以上から達成度は良いと考えられる。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

現在未だ詳細が判明していない HTLV-1 による ATL の腫瘍細胞浸潤機構について新たなメカニズムを見出した。今後、本結果に基づいて実際の治療に応用できる薬剤等の screening を行い、薬剤を決定することが出来れば、学術的・国際的・社会的意義は大きいことが予想される。

#### 3) 今後の展望について

今回我々は腫瘍細胞の走化性に SDF-1  $\alpha$ -CXCR4 と MEK-ERK が深く関与していることを明らかにした。今後それらの細胞内伝達シグナル系を抑制する薬剤を見出すことを試みる。

### E. 結論

ATLL モデルマウス由来の腫瘍細胞の走化性には SDF-1  $\alpha$ -CXCR4 と MEK-ERK シグナル経路が重要であることが明らかになった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Tsuji T, Sheehy N, Gautier VW, Hayakawa H, Sawa H, Hall WW: The nuclear import of the human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) Tax protein is carrier and energy independent. J Biol Chem 282: 13875-13883, 2007

#### 2. 学会発表

1) 川口 晶、一戸 猛、澤 洋文、岡田 義昭、千葉 丈、倉田 毅、佐多 徹太郎、Hall William、長谷川 秀樹：成人 T 細胞・白血病リンパ腫 (ATLL) モデルマウスにおけるケモカインの発現とその機能解析。第 54 回日本ウ

イルス学会学術集会 2006年、名古屋  
 2) Kawaguchi A, Orba Y, Sawa H, Sata T, Hall  
 WW, Hasegawa H: Adult T cell  
 leukemia/lymphoma (ATLL): Exploitation of  
 transgenic mouse model to understand disease  
 pathogenesis  
 and for the  
 development of  
 rational  
 therapeutics.  
 The 13th  
 International

Conference on Human Retrovirology HTLV and  
 related Viruses, 2007, Hakone, Japan

G. 知的財産権の出願・登録状況  
 (予定を含む)

なし

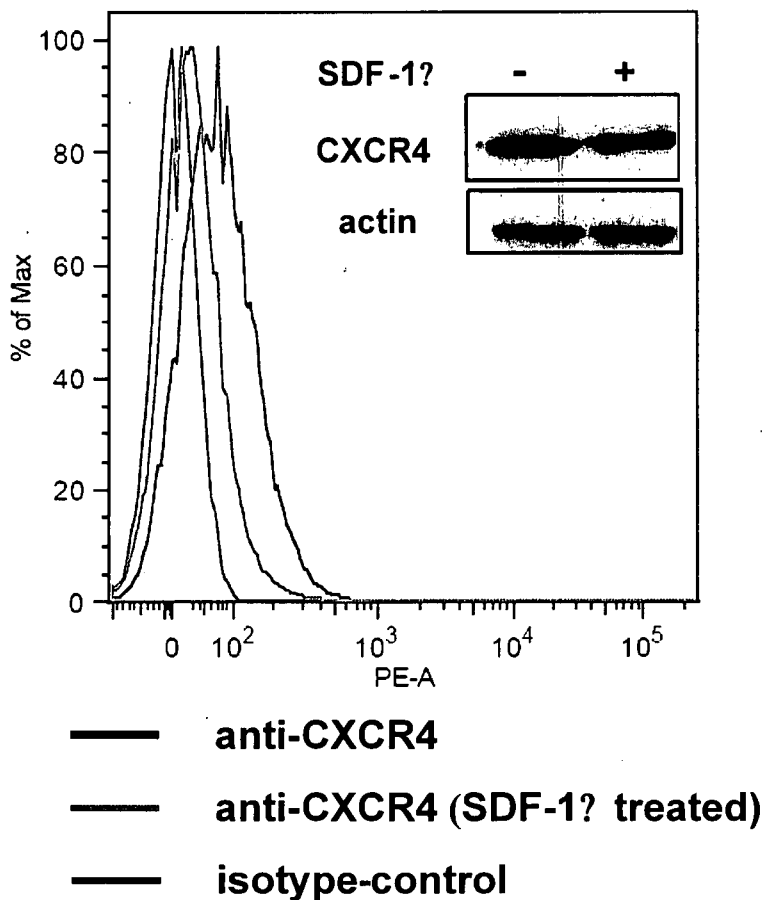
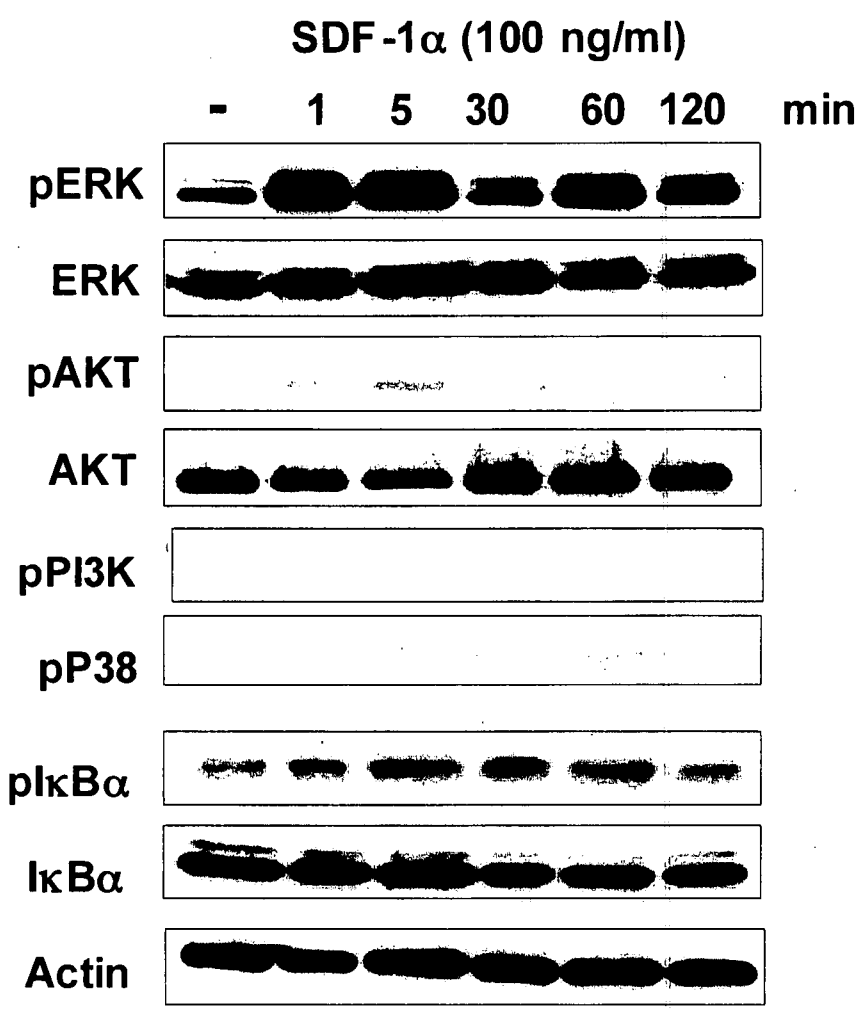


図1 : Flowcytometry を用いた腫瘍細胞表面の CXCR4 の発現の解析。SDF-1  $\alpha$  処理により、細胞表面の CXCR4 の発現は低下するが、immunoblotting では細胞内の SDF-1  $\alpha$  の発現量は同じであることから、SDF-1  $\alpha$  処理により、細胞表面の CXCR4 の発現が downregulation することが示唆される。





☒

2

Immunoblotting を用いた腫瘍細胞の各因子のリン酸化の解析。SDF-1  $\alpha$  処理により、腫瘍細胞の ERK のリン酸化は亢進する。Actin の発現はほぼ同一であることから、各 lane 中のタンパク質の量は同等であることが示唆される。

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saitohら	Overexpressed NF- $\kappa$ B inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells.	Blood	-	-	2008
Watanabeら	I $\kappa$ B $\alpha$ -independent induction of NF- $\kappa$ B and its inhibition by DHMEQ in Hodgkin-Reed-Sternberg cells.	Lab Invest	87	372-382	2007
Horieら	TRAF activation of C/EBP $\beta$ (NF-IL6) via p38MAPK induces HIV-1 gene expression in monocytes/macrophages	Micobes Infect	9	721-728	2007
Ohsugira	Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) therapy reduces tumor formation in mice inoculated with Tax-deficient adult T-cell leukemia-derived cell lines.	Cancer Let	257	206-215	2007
Katanoら	Integration of HIV-1 caused STAT3-associated B cell lymphoma in an AIDS patient.	Micobes Infect	9	1581-1589	2007
Franchinaら	The CD30 gene promoter microsatellite binds transcription factor Yin Yang 1 (YY1) and shows genetic instability in anaplastic large cell lymphoma.	J Pathol	214	65-74	2008
Hanら	ERK MAP kinase regulates actin organization 1 and cell motility 2 by phosphorylating the actin cross-linking protein EPLIN.	Mol Cell Biol	27	8190-8200	2007
Watanabeら	Hypomethylation of CD30 CpG islands with aberrant JunB expression drives CD30 induction in Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma.	Lab Invest	88	48-57	2008
Matsuokaら	Meeting report on the 13th International Conference on Human Retrovirology: Human T-cell leukemia virus research-30 years after Adult T-cell leukemia.	Cancer Res	67	10638-10641	2007
Suzukiら	Whole-genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single-nucleotide polymorphism genotyping microarrays.	Cancer Sci	99	564-570	2008

Lehmann 5	Molecular allelo-karyotyping of early-stage, untreated chronic lymphocytic leukemia	Cancer	112	1296-1305	2008
Kawamata 5	Molecular allelo-karyotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray.	Blood	111	776-784	2008
Yamamoto 5	Highly sensitive method for genome-wide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays.	Am J Hum Genet.	81	114-126	2007
Sanada 5	Unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10) defines a unique clinicopathological subgroup of myeloid neoplasms.	Leukemia	21	992-997	2007
Nannya 5	Evaluation of genome-wide power of genetic association studies based on empirical data from the HapMap project.	Hum Mol Genet	16	3494-3505	2007
Lips 5	Single nucleotide polymorphism array analysis of chromosomal instability patterns discriminates rectal adenomas from carcinomas.	J Pathol	212	269-277	2007
Kawazu	Expression profiling of immature thymocytes revealed a novel homeobox gene that regulates double-negative thymocyte development.	J Immunol	179	5335-5345	2007
Jacobs	Genome-wide, high-resolution detection of copy number, loss of heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays	Cancer Res	67	2544-2551	2007
Mizukami 5	Identification of transcripts commonly expressed in both hematopoietic and germ-line stem cells.	Stem Cells Dev	17	67-80	2008
Mizukami	Application of complementary DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety.	Vaccine	25	8762-8770	2007
Tsukasaki	VCAP-AMP- VECF versus biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study, JCOG9801.	J Clin Oncol	25	5458-5464	2007
Kuramitsu 5	Deficient RPS19 protein production induces cell cycle arrest in erythroid progenitor cells.	Brit J Haematol	140	348-359	2008

Naitoら	Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of an adjuvant.	Vaccine	25	8762-8770	2007
Hamaguchiら	Agp and Hpx are useful for pertussis vaccine safety control as vaccine toxicity-related genes.	Vaccine	25	3355-3364	2007
Ichinohe	Prophylactic effects of chitin microparticles (CMP) on highly pathogenic H5N1 influenza virus.	J Med Virol	79	811-819	2007
Ichinohe	Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge.	Microb Infect	9	1333-1340	2007
Tsujiら	The nuclear import of the human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) Tax protein is carrier and energy independent.	J Biol Chem	282	13875-13883	2007

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷り

## **Overexpressed NF- $\kappa$ B inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells**

Short title; Role for NIK in NF- $\kappa$ B activation in cancer cells

YASUNORI SAITOH,<sup>1</sup> NORIO YAMAMOTO,<sup>1</sup> MD. ZAHIDUNNABI DEWAN,<sup>1</sup> HARUYO SUGIMOTO,<sup>1</sup> VICENTE J. MARTINEZ B,<sup>1</sup> YUKI IWASAKI,<sup>1</sup> KATSUYOSHI MATSUBARA,<sup>1</sup> XIAOHUA QI,<sup>1</sup> TATSUYA SAITOH,<sup>2</sup> ISSEI IMOTO,<sup>3</sup> JOHJI INAZAWA,<sup>3</sup> ATAE UTSUNOMIYA,<sup>4</sup> TOSHIKI WATANABE,<sup>5</sup> TAKAO MASUDA,<sup>6</sup> NAOKI YAMAMOTO,<sup>1,7</sup> and SHOJI YAMAOKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Virology, Graduate School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; <sup>2</sup>Department of host Defense, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita, Japan; <sup>3</sup>Department of Molecular Cytogenetics, Medical Research Institute and School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; <sup>4</sup>Department of Hematology, Imamura Bun-in Hospital, Kagoshima, Japan; <sup>5</sup>Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; <sup>6</sup>Department of Immunotherapeutics, Graduate School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; <sup>7</sup>AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

Corresponding author: Shoji Yamaoka, Department of Molecular Virology, Graduate School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8510, Japan. Tel: 81-3-5803-5181, Fax: 81-3-5803-0124, e-mail: shojmmb@tmd.ac.jp

## **Abstract**

The NF- $\kappa$ B transcription factors play important roles in cancer development by preventing apoptosis and facilitating the tumor cell growth. However, the precise mechanisms by which NF- $\kappa$ B is constitutively activated in specific cancer cells remain largely unknown. In our current study, we now report that NF- $\kappa$ B inducing kinase (NIK) is overexpressed at the pre-translational level in adult T-cell leukemia (ATL) and Hodgkin Reed-Sternberg cells (H-RS) that do not express viral regulatory proteins. The overexpression of NIK causes cell transformation in rat fibroblasts, which is abolished by a super-repressor form of I $\kappa$ B $\alpha$ . Notably, depletion of NIK in ATL cells by RNA interference reduces the DNA-binding activity of NF- $\kappa$ B and NF- $\kappa$ B-dependent transcriptional activity, and efficiently suppresses tumor growth in NOD/SCID/ $\gamma$ <sup>null</sup> mice. These results indicate that the deregulated expression of NIK plays a critical role in constitutive NF- $\kappa$ B activation in ATL and H-RS cells, and suggest also that NIK is an attractive molecular target for cancer therapy.

## Introduction

The NF- $\kappa$ B transcription factors are known to regulate the expression of a wide range of genes involved in development, immune responses, apoptosis and carcinogenesis as dimers of the REL family members, RelA, RelB, c-Rel, p50 and p52.<sup>1</sup> The p50 and p52 proteins are generated by proteasome-mediated processing of their precursors, p105 and p100, respectively. In resting cells, Rel proteins are sequestered in the cytoplasm through their interactions with the ankyrin repeats of the inhibitory proteins I $\kappa$ B $\alpha$ , - $\beta$  and - $\epsilon$ , as well as the precursor proteins p105 and p100. Upon stimulation, signals converge at the multi-protein I $\kappa$ B kinase (IKK) complex, which is composed of two catalytic subunits, IKK1/ $\alpha$  and IKK2/ $\beta$ , and the scaffolding proteins, NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO, also known as IKK $\gamma$ ) and ELKS.<sup>2</sup> Phosphorylation by the IKK complex of specific serine residues on the I $\kappa$ B or precursor proteins results in their poly-ubiquitination and proteasome-dependent degradation or processing.<sup>2</sup> Released NF- $\kappa$ B then translocates to the nucleus and regulates expression of target genes.

NF- $\kappa$ B signaling pathways are largely classified as either canonical or non-canonical based on the stimuli and targets of the IKK complex.<sup>2</sup> Canonical activation is induced by stimuli such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$ , and involves NEMO- and IKK2/ $\beta$ -dependent phosphorylation and the subsequent degradation of I $\kappa$ B proteins. Non-canonical NF- $\kappa$ B pathways are activated following the stimulation of a range of TNF receptor family members, such as B cell activating factor belonging to the TNF family (BAFF) receptor, lymphotoxin- $\beta$



receptor, Fn14 and CD40, and direct NF- $\kappa$ B inducing kinase (NIK)- and IKK1/ $\alpha$ -dependent phosphorylation and subsequent processing of p100, leading to activation of NF- $\kappa$ B complexes containing RelB.<sup>2,3</sup> Of note in this context, the non-canonical pathways operate in a delayed fashion and are sensitive to protein synthesis inhibition.<sup>4,5</sup>

Compared with the mechanisms underlying the transduction of ligand-induced signaling to NF- $\kappa$ B activation, much less is known about how NF- $\kappa$ B is constitutively activated in a variety of cancer cells.<sup>6</sup> Constitutively high NF- $\kappa$ B activity has typically been demonstrated in human hematopoietic cancer cells, including adult T-cell leukemia (ATL), Hodgkin lymphoma and multiple myeloma cells.<sup>7,8</sup> We have previously reported the aberrant expression of p52 in adult T-cell leukemia (ATL) and Hodgkin Reed-Sternberg (H-RS) cells that do not express viral regulatory proteins such as Tax of the human T-cell leukemia virus or latent membrane protein 1 (LMP1) of the Epstein-Barr virus (EBV).<sup>9,10</sup> In addition, IKK activation in ATL and H-RS cells was found to be sensitive to protein synthesis inhibition.<sup>10,11</sup> These results indicate that the non-canonical pathways of NF- $\kappa$ B activation operate in these cancer cells. Aberrant p52 expression has also been reported in other types of cancer cells, including breast,<sup>12</sup> prostate,<sup>13</sup> pancreas,<sup>14</sup> and colon.<sup>15</sup> However, the actual triggers of non-canonical NF- $\kappa$ B activation in these cancer cells remain largely unknown except for certain multiple myeloma cells that have mutations in the *nik*, *traf3* and related genes.<sup>16,17</sup>

NIK is a serine-threonine kinase that is an essential participant in the induction of

the IKK1-dependent processing of p100 as well as I $\kappa$ B degradation in response to stimuli such as CD70, CD40 ligand and BAFF.<sup>18</sup> It has also been reported previously that the IKK complex is recruited to CD27 in a manner dependent upon NIK function. However, the mechanism by which NIK activity is regulated thereafter was unknown until it was recently demonstrated that these stimuli protect basally translated endogenous NIK protein from proteasome-mediated degradation.<sup>19,20</sup> Liao et al. reported that the interaction of NIK with TNF receptor-associated factor 3 (TRAF3) is responsible for the rapid degradation of NIK, and that non-canonical NF- $\kappa$ B stimuli induce the degradation of TRAF3 and the elevation of NIK expression.<sup>19</sup> In a separate study, Qing et al. have demonstrated that non-canonical NF- $\kappa$ B stimuli stabilize the NIK protein, but do not modify its RNA expression or protein translation.<sup>20</sup> The findings of these studies explain the delay in triggering the non-canonical pathway and its high sensitivity to protein synthesis inhibition.

Since NIK is a central regulator of the non-canonical pathway of NF- $\kappa$ B activation, we have investigated in our current study how this kinase is regulated in hematopoietic cancer cells, in which IKK is constitutively activated in the absence of viral regulators.

## **Materials and Methods**

### **Cell culture**

ED40515(-),<sup>21</sup> ATL-43Tb(-)<sup>22</sup> and TL-Om1<sup>23</sup> are human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-I)-infected T-cell lines established from the leukemic cells of ATL patients. The

H-RS cell lines, HDLM-2, L428, and L540 were purchased from the German Collection of Micro-organisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). CEM<sup>24</sup> and Jurkat<sup>25</sup> are HTLV-I-free human T-lymphoblastic leukemia cell lines. A human B-cell line, Romas RG69,<sup>20</sup> was a kind gift from Dr. Gutian Xiao (The State University of New Jersey, NJ). Primary leukemia cells derived from ATL patients were obtained under informed consent at Imamura Bun-in Hospital and supplied through the Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development (JSPFAD). The patients were diagnosed with ATL on the basis of clinical and hematologic features and the presence of antibodies to ATL-associated antigens in serum and of the HTLV-I proviral genome in the leukemia cells. Use of peripheral blood lymphocytes from ATL patients for the research purposes was approved by the institutional review board of each institute. PBMCs derived from healthy donors were also obtained under informed consent. PBMCs were isolated from both ATL patients and healthy donors by density gradient separation with Ficoll-Plaque<sup>TM</sup> PLUS (Amersham Pharmacia Biotech). Cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin G, and 100 µg/ml streptomycin sulfate. 5R is a NEMO-deficient subline of the Rat-1 cell line and has been described previously.<sup>26</sup> B5 and h12 are sublines of Rat-1 and 5R, respectively, express the blasticidin deaminase gene under the control of an NF-κB-dependent promoter, and have also been described previously.<sup>26,27</sup> Plat-E packaging cells were described previously.<sup>28</sup> B5, h12, Plat-E, 293T cells and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin G, and 100

$\mu\text{g/ml}$  streptomycin sulfate. Anchorage-independent cell growth was examined essentially as described previously.<sup>29</sup> Images were captured using an inverted microscope (IX70, Olympus, Tokyo, Japan) and processed with Openlab 3.0.2 software (Improvision, MA, USA). Cells used in this study were all maintained at 37°C in air containing 5% CO<sub>2</sub>.

### **Virus infection and transfection**

Plat-E cells were transfected with pMRX-HA-NIK-ires-puro, pMRX-HA-kd-NIK-ires-puro or pMRX-HA-ires-puro (EV1) (described in Supplemental Materials and Methods) using the calcium phosphate precipitation method. Culture supernatants were collected 48 hours after transfection and filtered. B5 and h12 cells were infected for 2 hours in the presence of 10  $\mu\text{g/ml}$  of polybrene. Infected cells were then cultured in medium containing 2  $\mu\text{g/ml}$  of puromycin and cell clones were isolated. Rat fibroblasts expressing SR- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  or its empty control vector (EV2) were established essentially as described previously.<sup>10</sup> For production of lentiviruses, 293T cells were co-transfected with pCS-puro-Ctrl, pCS-puro-NIKi-1 or pCS-puro-NIKi-2 (described in Supplemental Materials and Methods) together with the pCMV $\Delta$ R8.2 packaging construct and pHCMV-VSV-G (kind gifts from Dr. I.S.Y. Chen) using FuGENE 6 (Roche Applied Science). Culture supernatants were collected 48 hours after transfection and filtered. ED40515(-) and ATL-43Tb(-) cells were infected once or twice with 24 hours interval with these lentiviruses for 6 hours in the presence of 10  $\mu\text{g/ml}$  of polybrene. At 48 hours after the infection, cells were cultured in medium containing 2