

201220049A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ヒトATL及びHBZトランスジェニックATL発症マウスを用いた
比較ゲノム解析によるATL発症機構の解析

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 森下 和広

平成25(2013)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
ヒトATL及びHBZトランスジェニックATL発症マウスを用いた 比較ゲノム解析によるATL発症機構の解析 森下和広	----- 1
II. 分担研究報告	
1. ヒトATLに関する研究 森下和広	----- 6
2. HTLV-1/HBZに関する研究 安永純一郎	----- 9
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 12
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 14

ヒトATL及びHBZトランスジェニックATL発症マウスを用いた比較ゲノム解析による
ATL発症機構の解析

研究代表者：森下 和広 宮崎大学・医学部 教授

研究要旨

成人T細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) はヒトT細胞白血病ウイルス1型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) 感染後長期の潜伏期の後、宿主側のゲノム・エピゲノム異常の蓄積により発症する。このHTLV-1・HBZはATL細胞の維持増殖に必須であり、HBZ・TGはTリンパ腫および全身性の炎症を発症する。本研究ではATLの統合的ゲノム解析およびHBZ・TGマウスのリンパ腫のゲノム・エピゲノム異常を比較検討し、HTLV-1感染からATL発症機構を明らかにする。ATLの原因遺伝子群ZEB1(TCF8)、EPC1、NDRG2、BCL11B、TSLC1/CADM1を同定した。NDRG2は生体防御ストレス応答遺伝子でありPI3K/AKT情報伝達をPTENリン酸化により不活化する活性を持つ。ATLにおいて転写低下しておりPI3K/AKT情報伝達系の恒常的活性化があり、これはATL発症初期より見られHTLV-1感染防御の破綻が示唆された。また一方HBZ・TGマウスリンパ腫の解析は発現プロファイル比較解析を行い、アポトーシス誘導性遺伝子である*Bim*と*FasL*の発現低下を確認した。その分子機序として、HBZが*Bim*および*FasL*の発現に重要な転写因子である*FoxO3a*の機能を阻害し、またATL細胞では*Bim*プロモーターがメチル化され発現低下しており、HBZによるアポトーシス抑制効果はHTLV-1による炎症とがんの発症に深く関与すると示唆される。*Bim*遺伝子はATL細胞のメチル化解析において高メチル化低発現遺伝子群としても同定されており、HBZによる抑制はさらにエピゲノム異常の表定期遺伝子の一つになっており、HTLV-1ウイルス感染症からATL発症において重要な役割を有することが示唆される。さらなる両者のゲノム解析から共通した異常を同定し、ATLの段階的発症機構を明らかにする。

研究分担者

京都大学ウイルス研究所 講師 安永純一郎

A. 研究目的

成人T細胞白血病(ATL)はHTLV-1感染より数十年を経て白血病化する難治性白血病であるが、ゲノム異常の蓄積が著しく、固形癌に近い複雑核型を示す。このためATLにおける白血病発症にはHTLV-1感染後に多くのゲノム異常、エピゲノム異常が蓄積し多因子による発症が考えられる。さらにHTLV-1ウイルスのHTLV-1 bZIP factor (HBZ) は全てのATL細胞で発現し、ATL細胞におけるHBZのノックダウンは細胞増殖を抑制する。さらにはHBZトランスジェニックマウスがT細胞リンパ腫を発症することからHBZはATLの発がんには必須であると考えられる。本研究ではそこで我々はATL細胞およびHBZトランスジェニックマウスを用いて全ゲノム、エピゲノム解析を行い、発症の分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

1. ATLにおけるゲノム異常の探索と発症関連遺伝子群の機能解析

ATLのゲノム解析のため、急性型ATL60症例を用いて、Spectral karyotyping (SKY)法を行い、染色多切断点集中領域を同定した。その領域を中心に、高密度SNPアレイ解析を用いて、ゲノム欠失増幅領域を同定し、cDNAオリゴヌクレオチドアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析との組み合わせで、ATL発症関連因子群を同定した。さらにこれら因子群に対して機能解析、遺伝子改変マウスの作成を行いそれぞれのマウスにおけるがん発症機構について、病理学的分子生物学的解析を行う。さらに新規診断治療法開発に向けて特異的抗体の開発並びに、その抗体機能について検討する。

2. HBZ-TGに発症するTリンパ腫におけるゲノム異常の探索

現在、複数のHBZ-TG由来Tリンパ腫細胞株を樹立中である。複数のTリンパ腫株をNSGマウスの生体内で継代・維持すると同時に、次世代遺伝子解析装置を用いて全エクソンシーケンシング (エクソーム解析) を行い、発がんに関わると考えられる遺伝子変異の同定を試みる。さらに同定した遺伝子の野生型を腫瘍細胞株に導入

後にマウスに接種し腫瘍形成能を評価する、機能相補実験を行う予定である。

3. HBZ 発現によるエピゲノム変化の解析

本研究ではHBZ-TG由来のTリンパ球におけるヒストンアセチル化の変化を、次世代遺伝子解析装置によるChIPシーケンスの手法を用いて包括的に比較解析する。具体的には、以下のサンプルを用いてヒストンアセチル化レベルを検討する予定である。

- 1) HBZ-TG 由来 Tリンパ球
- 2) 野生型マウス由来 Tリンパ球

さらに、HBZ-TGに発症したTリンパ腫細胞におけるヒストン修飾変化とTIP60およびEPC-1の役割について解析を行う。具体的にはHBZの存在下でTIP60およびEPC-1の機能評価を行い、DNA損傷やアポトーシスに対する影響を検証する。

(倫理面への配慮)

患者検体の使用に関しては、宮崎大学医学部医の倫理審査会の承認(承認番号784)をうけ、同意(インフォームドコンセント)の上に使用を行っている。組み換えDNA実験を行うにあたり、宮崎大学(承認番号:268)及び京都大学遺伝子組み換え実験委員会(承認番号:2100182)の承認を受けて実施している。実験動物に関しては宮崎大学動物実験委員会の承認(2010-509-3、510-3、525-5、534-3、505-3)及び京都大学動物実験委員会の承認(承認番号:D11-19、D11-20)を受け使用を行っている。利益相反に関しては、宮崎大学及び京都大学利益相反委員会が設置され適切に処理されている。

C. 研究結果

1. ATLにおけるゲノム異常の探索と発症関連遺伝子群の機能解析

急性型ATLに対する統合的ゲノム解析により、ATL発症関連遺伝子群として、ZEB1/TCF8、NDRG2、BCL11B、TSLC1、EPC1/AXSL2融合遺伝子を同定した。今回NDRG2の機能解析を行い、NDRG2をPTEN結合タンパク質として同定した。NDRG2はPP2A phosphataseをリクルートし、PTEN脱リン酸化状態に保ちPTENの有するphosphatase活性を活性化状態にする働きを同定した。ATLにおいてはNDRG2は発現低下状態にあり、そのためPTENは恒常的にリン酸化状態を保ちPI3K/AKT情報伝達系が活性化状態を保っている。さらに

NDRG2欠損マウスは高率にTリンパ腫を含む多種類の固形癌が発症する。全身の臓器でのAKTリン酸化が見られるため、全身の臓器で発がんを促進しているため、かつATLを超えた多数の癌においてNDRG2は癌抑制遺伝子として考えられている。一方でゲノムワイドメチル化アレイ解析を行い網羅的遺伝子発現解析との統合解析によりPTHLHを含む脱メチル化高発現遺伝子群38、NDRG2を含む高メチル化低発現遺伝子群36を同定した。NDRG2はくすぶり型、慢性型ATLにおいてもプロモーターメチル化が認められ遺伝子発現の低下があるため、HTLV-1感染からATL発症初期段階においてすでに発現低下することが示唆される。このNDRG2は感染防御に関わるストレス応答因子であり、持続的なHTLV-1感染によりNDRG2はメチル化され感染防御の破綻がATL発症への道筋の一つである事が示唆された。TSLC1 TGマウス、BCL11BTGマウスにおいてもTリンパ腫が認められてきたのでさらなる検討を進めている。

2. HBZ-TGに発症するTリンパ腫におけるゲノム異常の探索

HBZ-TG由来のTリンパ腫細胞をNSGマウスに移植し、腫瘍の生着および継代を行った。継代を繰り返す間に、生着までの期間が短縮し、さらには野生型マウスにおいても腫瘍を形成することが可能となった。本細胞株はin vitroでも維持培養が可能であった。

3. HBZによる発現プロファイル変化の解析

HBZ発現細胞ではアポトーシス誘導遺伝子であるBimとFasLの発現が低下していることを見出した。BimおよびFasLの発現には転写因子FoxO3aが重要な役割を果たすことが知られている。我々はHBZがFoxO3aと結合し、細胞内局在を変えること、またDNA結合能を阻害することを見出した。これらの作用により、HBZはFoxO3aの転写活性を阻害し、BimおよびFasLの発現を抑制すると考えられた。さらに、ATL細胞株の一部、Jurkat-HBZにはBimプロモーターにおけるH3の脱アセチル化が認められ、HBZのエピゲノム異常への関与も示唆された。

一方、酵母ツーハイブリッドにてHBZがヒストン修飾酵素と結合することが示唆された。その中で、アセチル化に関与するEPC-1、脱メチル化に

関与する FBXL11 に関しては、免疫沈降にて HBZ との結合を確認した。

D. 考察

ATL のゲノム解析により単離した遺伝子の機能解析から、ATL 発症に感染防御破綻が介在していることがわかってきた。その HTLV-1 持続感染に関わる HTLV-1/HBZ は転写因子 FoxO3a との結合を介してアポトーシス誘導遺伝子の発現を抑制することを見出した。その遺伝子である Bim は ATL において高率にメチル化されており HBZ による炎症反応の継続が発がんに関わる一因になり得る結果が得られた。HBZ-TG 由来 T リンパ腫細胞株を樹立した。本細胞を用いてゲノム解析を進めている。

E. 結論

ATL のゲノム解析により癌抑制遺伝子として単離した NDRG2 は感染防御に関わるストレス応答因子であり、PTEN リン酸化修飾による活性調節に関わっていた。HTLV-1 の持続感染は NDRG2 を含む多くの遺伝子のメチル化を促進し、発現低下をもたらしており、NDRG2 の発現低下はこの感染防御機構の破綻に繋がり ATL 発症への一ステップをなすものと示唆される。また HBZ が転写因子 FoxO3a との結合を介してアポトーシス誘導遺伝子の発現を抑制することを見出した。HBZ による炎症とがんの誘導の一因と考えられる。従って ATL のゲノム・エピゲノム解析と HTLV-1/HBZ の機能解析から、HTLV-1 による持続感染、慢性炎症、それに引き続く白血病発症の関連性の一端が見えてきた。さらにこの両者の関連性を見出すことで、HTLV-1 感染から白血病発症の段階的発がんを明らかにしたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamakawa N, Kaneda K, Saito Y, Ichihara E, Morishita K. : The Increased Expression of Integrin $\alpha 6$ (ITGA6) Enhances Drug Resistance in EVI1 Leukemia. PLoS One. 7(1): e30706, 2012.

2) Kondo Y, Nagai K, Nakahata S, Saito Y, Ichikawa T, Suekane A, Taki T, Iwakawa R, Enari M, Taniwaki M, Yokota J, Sakoda S, Morishita K. : Overexpression of the DNA sensor proteins, absent in melanoma 2 and interferon-inducible 16, contributes to tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma with p53 inactivation.

Cancer Sci. 103(4): 782-790, 2012.

3) Nakahata S, Saito Y, Marutsuka K, Hidaka T, Maeda K, Hatakeyama K, Shiraga T, Goto A, Takamatsu N, Asada Y, Utsunomiya A, Okayama A, Kubuki Y, Shimoda K, Ukai Y, Kurosawa G, Morishita K. : Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma. Leukemia 26, 1238-1246, 2012.

4) Nakahata S, Morishita K. CADM1/TSLC1 is a novel cell surface marker for adult T-cell leukemia/lymphoma. J Clin Exp Hematop. 52, 17-22. 2012

5) Saito Y, Kaneda K, Suekane A, Ichihara E, Nakahata S, Yamakawa N, Nagai K, Mizuno N, Kogawa K, Miura I, Itoh H, Morishita K, Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1- regulated GPR56, Leukemia accepted article preview 12 March 2013;

6) Ma G, Yasunaga J, Fan J, Yanagawa S, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor dysregulates the Wnt pathways to support proliferation and migration of adult T-cell leukemia cells. **Oncogene**, in press.

7) Zane L, Yasunaga J, Mitagami Y, Yedavalli V, Tang SW, Chen CY, Ratner L, Lu X, Jeang KT. Wip1 and p53 contribute to HTLV-1 Tax-induced tumorigenesis. **Retrovirology**, 9; 114, 2012.

2. 学会発表

1) 中畑新吾, 市川朝永, 斎藤祐介, 新井康仁, 滝智彦, 谷脇雅史, 森下和広: NDRG2 は成人 T 細胞白血病リンパ腫においてがん抑制遺伝子として働く. 平成 24 年度日本生化学会九州支部例会

2) Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, Mizuno N, Itho H, Morishita K. : Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by GPR56 signaling in bone marrow stromal cell niches. 第 10 回 幹細胞シンポジウム.

3) 市川朝永, 中畑新吾, 森下和広: 癌抑制遺伝子 NDRG2 は炎症反応によって発現が調節される. 第 33 回日本炎症・再生医学会.

4) Morishita K, Inactivation of NDRG2, a novel regulator for PTEN, contributes to development of Adult-T cell leukemia/lymphoma 第 5 回 HTLV-1 研究会 / シンポジウム: 第 1 部 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム

5) 中畑新吾 森下和広. ATLL における NDRG2 発現低下は PTEN 不活性化に伴う恒常的な PI3K 情報伝達系活性化を導く. 第 5 回 HTLV-1 研究会 / シンポジウム: 一般演題口演 III ATL (2) (病態)

6) 市川朝永 森下和広. がん抑制遺伝子 NDRG2 による HTLV-1/Tax 誘導性 NFkappaB 活性抑制機構の解析. 第 5 回

- HTLV-1 研究会／シンポジウム
- 7) 市川朝永 森下和広. がん抑制遺伝子 NDRG2 による HTLV-1/Tax 誘導性 NFkappaB 活性抑制機構の解析. 第 23 回 宮崎造血因子研究会.
 - 8) Iha H, Ikebe E, Tezuka K, Fujisawa J, Tanaka Y, Sueoka E, Morishita K, Hori M : Lectin array profiling on the glycans expressed in ATL cells. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Sapporo. レクチナレイを用いた ATL 細胞に発現するグリカンのプロファイリング. 伊波英克, 池辺詠美, 手塚健太, 藤澤順一, 田中勇悦, 末岡榮三朗, 森下和広, 堀光雄. 第 71 回日本癌学会学術総会.
 - 9) Ichikawa T, Nakahata S, Morishita K : Chronic inflammation induces DNA promoter methylation of tumor suppressor gene NDRG2. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 慢性炎症ががん抑制遺伝子 NDRG2 の DNA プロモーターメチル化を誘導する. 市川朝永, 中畑新吾, 森下和広. 第 71 回日本癌学会学術総会.
 - 10) Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K : NDRG2, a novel regulator of phosphorylation of PTEN at S380/T383, works as a tumor suppressor. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. NDRG2 は PTEN のリン酸化を負に制御し、がん抑制遺伝子として機能する. 中畑新吾, 市川朝永, 齋藤雄介, 新井泰仁, 滝智彦, 谷脇雅史, 森下和広. 第 71 回日本癌学会学術総会.
 - 11) Saito Y, Kaneda K, Ichikawa E, Nakahata S, Yamakawa N, Suekane A, Mizuno N, Kogawa K, Miura I, Itoh H, Morishita K : Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1-regulated GPR56. 第 74 回日本血液学会学術集会 The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology.
 - 12) Jun Lu, Oba S, Yoshimi A, Ando K, Morishita K, Kurokawa M, Kotani A : Identification of microRNAs targeting Evi-1. 第 74 回日本血液学会学術集会 The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology.
 - 13) Kaneda K, Yamakawa N, Ichihara E, Saito Y, Morishita K : Cell adhesion dependent drug-resistance by high ITGA6/ITGB4 expression in EVI1^{high} AML. 第 74 回日本血液学会学術集会 The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology.
 - 14) Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K : NDRG2, a novel regulator of phosphorylation of PTEN at S380/T382/T383, works as a tumor suppressor. 第 74 回日本血液学会学術集会 The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology.
 - 15) Kanade K, Igawa K, Ichikawa T, Kurogi S, Sekimoto T, Chosa E, Sakota S, Morishita K : Mechanisms of bone differentiation regulated by MEL1/PRDM16. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. MEL1/PRDM16 による骨分化制御機構の解明. 兼田(中島)加珠子, 井川加織, 市川朝永, 黒木修司, 関本朝久, 帖佐悦男, 迫田澄男, 森下和広. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡市博多区. 2012.12.11.
 - 16) Nakahata S, Ichikawa T, Sato Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K : Down-regulation of NDRG2 expression induces the constitutive activation of the PI3K pathway through the inactivation of PTEN in ATL. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. ATL における NDRG2 発現低下は PTEN 不活性化に伴う恒常的な PI3K 情報伝達系活性化を導く. 中畑新吾, 市川朝永, 齋藤雄介, 新井泰仁, 滝智彦, 谷脇雅史, 森下和広. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡市博多区. 2012.12.14.
 - 17) 市川朝永, 中畑新吾, 森下和広 : HTLV-1/Tax によるがん抑制遺伝子 NDRG2 発現低下機構の解析. 第 85 回日本生化学会大会.
 - 18) 中畑新吾 森下和広. ATL における NDRG2 発現低下は PTEN 不活性化に伴う恒常的な PI3K 情報伝達系活性化を導く. 第 17 回造血器腫瘍研究会 (兼、がん研究開発費「がん幹細胞に対する新規分子標的治療薬の開発を目指した基盤研究」班会議. 宮崎市 2013.2.1.
 - 19) 安永純一郎、馬広勇、范瑠、柳川伸一、松岡雅雄 : HTLV-1 bZIP factor による non-canonical Wnt 活性化機構とその意義 : 第 5 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所 (東京)、2012 年 8 月 25 日
 - 20) 三浦未知、田邊順子、菅田謙治、趙鉄軍、安永純一郎、松岡雅雄 : HTLV-1 感染動物モデルとしてのサル T 細胞白血病ウイルス 1 型感染ニホンザルの解析: 第 5 回 HTLV-1 研究会、東京大学医科学研究所 (東京)、2012 年 8 月 26 日
 - 21) 安永純一郎、柳川伸一、松岡雅雄 : Dysregulation of the Wnt pathways by HTLV-1 bZIP factor is involved in

leukemogenesis of adult T-cell leukemia: 第 71 回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌 (札幌)、2012 年 9 月 19-21 日

- 22) 園直希、萩屋啓太、安永純一朗、松岡雅雄 : F-box and leucine-rich repeat protein 11 enhances the activity of two HTLV-1 proteins, HBZ and Tax: 第 71 回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌 (札幌)、2012 年 9 月 19-21 日
- 23) 水戸部悠一、安永純一朗、佐藤賢文、中西梓、松岡雅雄 : 5'UTR of HTLV-1 bZIP factor gene is important for increased CD4+ T-cells in vivo: 第 71 回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌 (札幌)、2012 年 9 月 19-21 日
- 24) Jun-ichiro Yasunaga, Azusa Tanaka-Nakanishi, Ken Takai and Masao Matsuoka: HTLV -1 bZIP factor downregulates proapoptotic genes through perturbation of FoxO3a function. 第 74 回日本血液学会学術集会、国立京都国際会館 (京都)、2012 年 10 月 19-21 日
- 25) 三浦未知、田邊順子、菅田謙治、Zhao Tiejun、齊藤暁、安永純一朗、明里宏文、松岡雅雄 : サル T 細胞白血病ウイルス 1 型のウイルス学的解析と病原性: 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪 (大阪)、2012 年 11 月 13-15 日
- 26) 三田上侑生、安永純一朗、松岡雅雄 : ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型感染細胞の増殖とウイルス複製機構における脱ユビキチン化酵素 USP20 の役割: 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪 (大阪)、2012 年 11 月 13-15 日
- 27) Junichiro Yasunaga, Guangyong Ma, Jun Fan, Shin-ichi Yanagawa and Masao Matsuoka. Noncanonical Wnt5a is induced by HTLV-1 bZIP factor, and supports proliferation and migration of adult T-cell leukemia cells :54th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition, Georgia World Congress Center, Atlanta, U.S.A, December 7-11, 2012.
- 28) 川月章弘、安永純一朗、松岡雅雄 : HTLV-1 bZIP Factor(HBZ) Interacts with Enhancer of Polycomb Homolog1(EPC1), and Suppresses

c-fos Transcription : 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡)、2012 年 12 月 11-14 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

ヒトATL及びHBZトランスジェニックATL発症マウスを用いた比較ゲノム解析による
ATL発症機構の解析
(ヒトATLに関する研究)

研究分担者：森下 和広 宮崎大学医学部 教授

研究要旨

成人 T 細胞白血病(ATL)の発症機構を解明するため、統合的ゲノム解析を行い、白血病関連遺伝子候補として、ZEB1(TCF8)、EPC1、NDRG2、BCL11Bを同定した。またメチル化アレイと網羅的遺伝子発現解析の統合解析により PTHLHを含む脱メチル化高発現遺伝子群 38、NDRG2を含む高メチル化低発現遺伝子群 36を同定した。NDRG2はPP2A・PTEN結合タンパク質であり、ストレス感染等によるPI3K/AKT情報伝達系を負に制御する役割を有する。ATLでのNDRG2欠失はPTENの恒常的リン酸化による不活化をもたらすPI3K/AKTの恒常的活性化に繋がっていた。NDRG2はHTLV-1感染によりメチル化・発現低下を引き起こし、感染によるPI3K/AKT・NFκB情報伝達系の抑制がかわらず、その後のゲノムエピゲノム異常の蓄積を促進することが示唆されるため、さらにHTLV-1感染に伴うエピゲノム異常とNDRG2遺伝子発現の関連を検討し、HTLV-1感染からATLへの段階的な白血病発症機構を明らかにする。

A. 研究目的

成人T細胞白血病(ATL)はHTLV-1感染より数十年を経て白血病化する難治性白血病であるが、ゲノム異常の蓄積が著しく、固形癌に近い複雑核型を示す。このためATLにおける白血病発症にはHTLV-1感染後に多くのゲノム異常、エピゲノム異常が蓄積し多因子による発症が考えられる。そこで我々は難治性急性骨髄性白血病に対する統合的ゲノム解析を行い、染色体転座集中領域の同定、並びに高密度SNPアレイを用いたゲノム欠失増幅領域の同定、並びに網羅的遺伝子発現解析を通じてATL発症関連遺伝子を複数個単離してきた。さらにくすぶり型、慢性型ATLを含むATLのゲノム解析とエピゲノム解析を行い、これらの遺伝子群の機能異常を明らかにし、HTLV-1感染からATL多段階発がんの解明、ATL病態に即した新規診断法や治療法の開発につなげる。

B. 研究方法

ATLのゲノム解析のため、くすぶり型、慢性型、急性型ATL症例合計74症例の高密度SNPアレイ解析を用いて、ゲノム欠失増幅領域を同定し、cDNAオリゴヌクレオチドアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析との組み合わせで、ATL発症関連因子群を同定した。同様にHumanMethylation 450 beadschip (Illumina)を用い各種ATL検体31症例、健康人DNA5症例、Tax不死化リンパ球3症例、HTLV-1感染細胞株5株、ATL細胞株6株のwhole genomeメチル化解析を行った。同定した遺伝子群の機能解析をin vitro並びに遺伝子改変マウスを用いた白血病発症機構について検討、さらに特異的抗体の開発並びに、その抗体機能について検討する。

(倫理面への配慮)

患者検体の使用に関しては、宮崎大学医学部医の倫理審査会の承認(承認番号 784)をうけ、同意(インフォームドコンセント)の上で使用を行っている。組み換えDNA実験を行うにあたり、宮崎大学(承認番号: 268)の承認を受けて実施している。実験動物に関しては宮崎大学動物実験委員会の承認(2010-509-3、510-3、525-5、534-3、505-3)を受け使用を行っている。利益相反に関しては、宮崎大学利益相反委員会が設置され適切に処理されている。

C. 研究成果

急性型ATLの統合的ゲノム解析からZEB1/TCF8、EPC1/AXSL2融合遺伝子、NDRG2、BCL11B、TSLC1を白血病関連遺伝子群として同定した。今回この中でNDRG2機能解析の一環として結合タンパク質を網羅的に同定し新規PTEN結合タンパク質である事を同定した。NDRG2はストレス応答遺伝子であり、PTENに結合しフォスファターゼPP2AをリクルートしPTENC端脱リン酸化調節に関わる因子であることが分かった。ATLにおいてPTEN-C端は高頻度にリン酸化されておりそのためPTENは不活化しPI3K/AKT情報伝達系の恒常的活性化に繋がっていた。NDRG2の低発現によりPP2Aのリクルートが出来ずPI3K/AKT情報伝達系の恒常的活性化に繋がっていた。さらにwhole genomeメチル化解析によりNDRG2はくすぶり型、慢性型ATLでも高率にメチル化されており発症初期よりNDRG2は低発現していることが分かった。またNDRG2欠損マウスにおいて多種類のがんとリンパ腫を発症し、NDRG2は肺がんや脳腫瘍、口腔癌など多数の癌で癌抑制遺伝子として知られており、

従ってPTENリン酸化調節によるPI3K/AKT活性調節は白血病細胞独自ではなく癌一般に見られる現象である事が示唆される。網羅的メチル化アレイ解析により脱メチル化高発現遺伝子群38、高メチル化低発現遺伝子群36を同定した。脱メチル化高発現遺伝子群には、高Ca血症との関連性が言われているPTHLHや臓器浸潤性に関連するTIAM2等、ATL細胞の特徴を示す遺伝子群を同定した。また高メチル化低発現遺伝子群にはNDRG2、BCL11B(BIM1)、TCF7等癌抑制に関わる遺伝子群が含まれておりこれからの機能解析に繋げる。

D. 考察

NDRG2 機能解析により、HTLV-1 感染による細胞内防御機構として NDRG2 が働いていること、さらにその防御機構としての NDRG2 が感染症に伴いプロモーターメチル化を受け発現低下、PI3K/AKT 情報伝達系の恒常的活性化を生じることがわかってきた。すなわち HTLV-1 による持続感染は生体防御機構を破ることにより、よりウイルス感染細胞の生存を促進する方向に働き、その積み重ねが白血病発症に繋がる可能性がある。メチル化により転写異常を起こす遺伝子群を多数同定した中にもこれまで ATL 細胞の特徴を説明できる遺伝子が多数含まれており、さらなる機能解析から全体の発症過程の

E. 結論

急性型 ATL 発症関連因子群の機能解析から、HTLV-1 感染症から ATL への発症の道筋の一端が感染防御機構という点から明らかになってきた。さらなる機能解析

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamakawa N, Kaneda K, Saito Y, Ichihara E, Morishita K. : The Increased Expression of Integrin $\alpha 6$ (ITGA6) Enhances Drug Resistance in EVI1 Leukemia. PLoS One. 7(1): e30706, 2012.

2) Kondo Y, Nagai K, Nakahata S, Saito Y, Ichikawa T, Suekane A, Taki T, Iwakawa R, Enari M, Taniwaki M, Yokota J, Sakoda S, Morishita K. : Overexpression of the DNA sensor proteins, absent in melanoma 2 and interferon-inducible 16, contributes to tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma with p53 inactivation. Cancer Sci. 103(4): 782-790, 2012.

3) Nakahata S, Saito Y, Marutsuka K, Hidaka T, Maeda K, Hatakeyama K, Shiraga T, Goto A, Takamatsu N, Asada Y, Utsunomiya A, Okayama A, Kubuki Y, Shimoda K, Ukai Y, Kurosawa G, Morishita K. : Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma. Leukemia 26, 1238-1246, 2012.

4) Nakahata S, Morishita K. CADM1/TSLC1 is a novel cell surface marker for adult T-cell leukemia/lymphoma. J Clin Exp Hematop. 52, 17-22, 2012

5) Saito Y, Kaneda K, Suekane A, Ichihara E, Nakahata S, Yamakawa N, Nagai K, Mizuno N, Kogawa K, Miura I, Itoh H, Morishita K. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1- regulated GPR56, Leukemia accepted article preview 12 March 2013;

2. 学会発表

1) 中畑新吾, 市川朝永, 斎藤祐介, 新井康仁, 滝智彦, 谷脇雅史, 森下和広 : NDRG2 は成人 T 細胞白血病リンパ腫においてがん抑制遺伝子として働く. 平成 24 年度日本生化学会九州支部例会

2) Saito Y, Kaneda K, Ishihara E, Mizuno N, Itho H, Morishita K. : Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by GPR56 signaling in bone marrow stromal cell niches. 第 10 回 幹細胞シンポジウム.

3) 市川朝永, 中畑新吾, 森下和広 : 癌抑制遺伝子 NDRG2 は炎症反応によって発現が調節される. 第 33 回日本炎症・再生医学会.

4) Morishita K. Inactivation of NDRG2, a novel regulator for PTEN, contributes to development of Adult-T cell leukemia/lymphoma 第 5 回 HTLV-1 研究会 / シンポジウム : 第 1 部 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム

5) 中畑新吾 森下和広. ATLL における NDRG2 発現低下は PTEN 不活性化に伴う恒常的な PI3K 情報伝達系活性化を導く. 第 5 回 HTLV-1 研究会 / シンポジウム : 一般演題口演 III ATL (2) (病態)

6) 市川朝永 森下和広. がん抑制遺伝子 NDRG2 による HTLV-1/Tax 誘導性 NFkappaB 活性抑制機構の解析. 第 5 回 HTLV-1 研究会 / シンポジウム

7) 市川朝永 森下和広. がん抑制遺伝子 NDRG2 による HTLV-1/Tax 誘導性 NFkappaB 活性抑制機構の解析. 第 23 回宮崎造血因子研究会.

8) Iha H, Ikebe E, Tezuka K, Fujisawa J, Tanaka Y, Sueoka E, Morishita K. Hori M : Lectin array profiling on the glycans expressed in ATL cells. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Sapporo. レクチナレイを用いた ATL 細胞に発現するグリカンのプロファイリング. 伊波英克, 池辺詠美, 手塚健太, 藤澤順一, 田中勇悦, 末岡榮三朗, 森下和広, 堀光雄. 第 71 回日本癌学会学術総会.

9) Ichikawa T, Nakahata S, Morishita K. : Chronic inflammation induces DNA promoter

methylation of tumor suppressor gene NDRG2. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 慢性炎症ががん抑制遺伝子 NDRG2 の NDA プロモーターメチル化を誘導する. 市川朝永, 中畑新吾, 森下和広. 第 71 回日本癌学会学術総会.

- 10) Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K: NDRG2, a novel regulator of phosphorylation of PTEN at S380/T383, works as a tumor suppressor. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. NDRG2 は PTEN のリン酸化を負に制御し、がん抑制遺伝子として機能する. 中畑新吾, 市川朝永, 齋藤雄介, 新井泰仁, 滝智彦, 谷脇雅史, 森下和広. 第 71 回日本癌学会学術総会.
- 11) Saito Y, Kaneda K, Ichikawa E, Nakahata S, Yamakawa N, Suekane A, Mizuno N, Kogawa K, Miura I, Itoh H, Morishita K: Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1-regulated GPR56. 第 74 回日本血液学会学術集会 The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology.
- 12) Jun Lu, Oba S, Yoshimi A, Ando K, Morishita K, Kurokawa M, Kotani A: Identification of microRNAs targeting Evi-1. 第 74 回日本血液学会学術集会 The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology.
- 13) Kaneda K, Yamakawa N, Ichihara E, Saito Y, Morishita K: Cell adhesion dependent drug-resistance by high ITGA6/ITGB4 expression in EVI1^{high} AML. 第 74 回日本血液学会学術集会 The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology.
- 14) Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K: NDRG2, a novel regulator of phosphorylation of PTEN at S380/T382/T383, works as a tumor suppressor. 第 74 回日本血液学会学術集会 The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology.
- 15) Kanade K, Igawa K, Ichikawa T, Kurogi S, Sekimoto T, Chosa E, Sakota S, Morishita K: Mechanisms of bone differentiation regulated by MEL1/PRDM16. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. MEL1/PRDM16 による骨分化制御機構の解明. 兼田(中島)加珠子, 井川加織, 市川朝永, 黒木修司, 関本朝久, 帖佐悦男, 迫田澄男, 森下和広. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡市博多区. 2012.12.11.
- 16) Nakahata S, Ichikawa T, Sato Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K: Down-regulation of NDRG2 expression induces the constitutive activation of the P13K pathway through the inactivation of PTEN in ATL. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of

Japan. ATL における NDRG2 発現低下は PTEN 不活性化に伴う恒常的な P13K 情報伝達系活性化を導く. 中畑新吾, 市川朝永, 齋藤雄介, 新井泰仁, 滝智彦, 谷脇雅史, 森下和広. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡市博多区. 2012.12.14.

- 17) 市川朝永, 中畑新吾, 森下和広: HTLV-1/Tax によるがん抑制遺伝子 NDRG2 発現低下機構の解析. 第 85 回日本生化学会大会.
- 18) 中畑新吾 森下和広. ATL における NDRG2 発現低下は PTEN 不活性化に伴う恒常的な P13K 情報伝達系活性化を導く. 第 17 回造血器腫瘍研究会 (兼、がん研究開発費「がん幹細胞に対する新規分子標的治療薬の開発を目指した基盤研究」班会議. 宮崎市 2013.2.1.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

ヒトATL及びHBZトランスジェニックATL発症マウスを用いた比較ゲノム解析によるATL発症機構の解析

（HTLV-1 / HBZに関する研究）

研究分担者：安永 純一郎 京都大学ウイルス研究所 講師

研究要旨

ヒトT細胞白血病ウイルス1型（human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1）は感染後50-60年という長い潜伏期間の後に、一部のキャリアに成人T細胞白血病（adult T-cell leukemia: ATL）を引き起こす。このことは、ATLが宿主側のゲノム異常やエピゲノム異常の蓄積による多段階発がん機構に基づき発症することを示唆している。一方、HTLV-1のマイナス鎖にコードされるHBZは全てのATL細胞で発現しており、ATL細胞の増殖に必須であると考えられる。さらにHBZトランスジェニックマウス（HBZ-Tg）がTリンパ腫および全身性の炎症を発症することから、HTLV-1の病原性に重要かつ不可欠な役割を果たしていると考えられる。本課題ではHBZによる病原性発現機序について解析している。

H24年度はマイクロアレイを用いて発現プロファイルの比較解析を行い、HBZ発現細胞ではアポトーシス誘導性遺伝子である*Bim*と*FasL*の発現が低下していることを確認した。その分子機序として、HBZが*Bim*および*FasL*の発現に重要な転写因子である*FoxO3a*の機能を阻害し、また*Bim*プロモーターのエピゲノム異常を誘導することを見出した。HBZによるアポトーシス抑制効果はHTLV-1による炎症とがんの発症に深く関与すると示唆される。

A. 研究目的

HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は全てのATL細胞で発現し、ATL細胞におけるHBZのノックダウンは細胞増殖を抑制する。さらにはHBZトランスジェニックマウスがT細胞リンパ腫を発症することからHBZはATLの発がんには必須であると考えられる。本研究ではATL細胞およびHBZトランスジェニックマウスを用いて遺伝子の包括的解析を行い、発症の分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

1. HBZ-TGに発症するTリンパ腫におけるゲノム異常の探索

HBZ-TG由来Tリンパ腫細胞を免疫不全マウスであるNOD-SCID/IL2Rgamma KOマウス（NSGマウス）に移植し、生体内で継代・維持することが可能な細胞株の樹立を試みた。さらに同細胞の*in vitro*での維持培養法を検討した。

2. HBZによる発現プロファイル変化の解析

HBZによる宿主細胞での発現プロファイルの変化を、マイクロアレイを用いて包括的に比較解析した。具体的には、以下のサンプルを用いた。

1) HBZ-TG由来Tリンパ球 vs 野生型マウスTリンパ球

2) HBZ安定発現Jurkat細胞 vs 対照Jurkat細胞
上記解析結果により、*Bim*遺伝子に着目し、HBZによる発現抑制機序、プロモーター領域のエピジェネティックな変化の有無、さらに、HBZ発現細胞のアポトーシスに対する感受性を検証した。

（倫理面への配慮）

組み換えDNA実験を行うにあたり、京都大学遺伝子組み換え実験委員会の承認を受けて実施した（承認番号：100182）。また、動物実験を行うにあたり、京都大学動物実験委員会の承認の下に行った（承認番号：D12-15、D12-16）。

C. 研究結果

1. HBZ-TGに発症するTリンパ腫におけるゲノム異常の探索

HBZ-TG由来のTリンパ腫細胞をNSGマウスに移植し、腫瘍の生着および継代を行った。継代を繰り返す間に、生着までの期間が短縮し、さらには野生型マウスにおいても腫瘍を形成することが可能となった。本細胞株は*in vitro*でも維持培養が可能であった。

2. HBZ による発現プロファイル変化の解析

HBZ 発現細胞ではアポトーシス誘導遺伝子である *Bim* と *FasL* の発現が低下していることを見出した。*Bim* および *FasL* の発現には転写因子 FoxO3a が重要な役割を果たすことが知られている。我々は HBZ が FoxO3a と結合し、細胞内局在を変えること、また DNA 結合能を阻害することを見出した。これらの作用により、HBZ は FoxO3a の転写活性を阻害し、*Bim* および *FasL* の発現を抑制すると考えられた。さらに、ATL 細胞株の一部、Jurkat-HBZ には *Bim* プロモーターにおける H3 の脱アセチル化が認められ、HBZ のエピゲノム異常への関与も示唆された。一方、酵母ツーハイブリッドにて HBZ がヒストン修飾酵素と結合することが示唆された。その中で、アセチル化に関与する EPC-1、脱メチル化に関与する FBXL11 に関しては、免疫沈降にて HBZ との結合を確認した。

D. 考察

培養可能な HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞株を樹立した。本細胞株は HBZ による発がんメカニズムに関与するゲノム異常、エピゲノム異常の解析に有用である。網羅的遺伝子発現解析により、HBZ がアポトーシス誘導性遺伝子 *Bim* と *FasL* の転写を抑制することが明らかとなった。アポトーシスの経路は intrinsic 経路と extrinsic 経路に大別され、*Bim* は前者、*FasL* は後者で機能するため、HBZ は両経路を抑制すると考えられる。実際に HBZ は T 細胞にアポトーシス抵抗性を付与することから、炎症とがんの発症に深く関与すると示唆される。

E. 結論

HBZ が転写因子 FoxO3a との結合を介してアポトーシス誘導遺伝子の発現を抑制することを見出した。HBZ による炎症とがんの誘導の一因と考えられる。HBZ-TG 由来 T リンパ腫細胞株のを樹立した。本細胞を用いてゲノム解析を進めている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ma G, Yasunaga J, Fan J, Yanagawa S, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor dysregulates the Wnt pathways to support proliferation and migration of

adult T-cell leukemia cells. **Oncogene**, in press.

2. Zane L, Yasunaga J, Mitagami Y, Yedavalli V, Tang SW, Chen CY, Ratner L, Lu X, Jeang KT. Wip1 and p53 contribute to HTLV-1 Tax-induced tumorigenesis. **Retrovirology**, 9; 114, 2012.

2. 学会発表

1. 安永純一郎、馬広勇、范珺、柳川伸一、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor による non-canonical Wnt 活性化機構とその意義：第 5 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所（東京）、2012 年 8 月 25 日
2. 三浦未知、田邊順子、菅田謙治、趙鉄軍、安永純一郎、松岡雅雄：HTLV-1 感染動物モデルとしてのサル T 細胞白血病ウイルス 1 型感染ニホンザルの解析：第 5 回 HTLV-1 研究会、東京大学医科学研究所（東京）、2012 年 8 月 26 日
3. 安永純一郎、柳川伸一、松岡雅雄：Dysregulation of the Wnt pathways by HTLV-1 bZIP factor is involved in leukemogenesis of adult T-cell leukemia：第 71 回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌（札幌）、2012 年 9 月 19-21 日
4. 園直希、萩屋啓太、安永純一郎、松岡雅雄：F-box and leucine-rich repeat protein 11 enhances the activity of two HTLV-1 proteins, HBZ and Tax：第 71 回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌（札幌）、2012 年 9 月 19-21 日
5. 水戸部悠一、安永純一郎、佐藤賢文、中西梓、松岡雅雄：5'UTR of HTLV-1 bZIP factor gene is important for increased CD4+ T-cells in vivo：第 71 回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌（札幌）、2012 年 9 月 19-21 日
6. Jun-ichiro Yasunaga, Azusa Tanaka-Nakanishi, Ken Takai and Masao Matsuoka: HTLV-1 bZIP factor downregulates proapoptotic genes through perturbation of FoxO3a function. 第 74 回日本血液学会学術集会、国立京都国際会館（京都）、2012 年 10 月 19-21 日
7. 三浦未知、田邊順子、菅田謙治、Zhao Tiejun、齊藤暁、安永純一郎、明里宏文、松岡雅雄：サル T 細胞白血病ウイルス 1 型のウイルス学的解析と病原性：第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪（大阪）、2012 年 11 月 13-15 日
8. 三田上侑生、安永純一郎、松岡雅雄：ヒト T 細

胞白血病ウイルス 1 型感染細胞の増殖とウイルス複製機構における脱ユビキチン化酵素 USP20 の役割：第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪（大阪）、2012 年 11 月 13-15 日

9. Junichiro Yasunaga, Guangyong Ma, Jun Fan, Shin-ichi Yanagawa and Masao Matsuoka. Noncanonical Wnt5a is induced by HTLV-1 bZIP factor, and supports proliferation and migration of adult T-cell leukemia cells :54th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition, Georgia World Congress Center, Atlanta, U.S.A, December 7-11, 2012.
10. 川月章弘、安永純一朗、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP Factor(HBZ) Interacts with Enhancer of Polycomb Homolog1(EPC1), and Suppresses c-fos Transcription：第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡（福岡）、2012 年 12 月 11-14 日

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究代表者 宮崎大学 教授 森下 和広
 研究分担者 京都大学ウイルス研究所 講師 安永 純一郎

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
Yamakawa N, Kaneda K, Saito Y, Ichihara E, Morishita K.	The Increased Expression of Integrin $\alpha 6$ (ITGA6) Enhances Drug Resistance in EVI1 Leukemia	PLoS One	7(1)	e30706	2012
Kondo Y, Nagai K, Nakahata S, Saito Y, Ichikawa T, Suekane A, Taniki T, Iwakawa R, Enari M, Taniwaki M, Yokota J, Sakoda S, Morishita K.	Overexpression of the p53 DNA sensor proteins, absent in melanoma 2 and interferon-inducible protein 16, contributes to tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma with p53 inactivation.	Cancer Sci	103	782-790	2012
Nakahata S, Saito Y, Marutsuka K, Hidaka T, Maeda K, Hatakeyama K, Shiraga T, Goto A, Takamatsu N, Asada Y, Utsunomiya A, Okayama A, Kubuki Y, Shimoda K, Ukai Y, Kurosawa	Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma.	Leukemia	26	1238-1246	2012
Nakahata S, Morishita K.	CADM1/TSLC1 is a novel cell surface marker for adult T-cell leukemia/lymphoma.	J Clin Exp Hematop	52	17-22.	2012

Y Saito, K Kane da, A Suekane, E Ichihara, S Naka hata, N Yamakaw a, K Nagai, N M izuno, K Kogawa, I Miura, H Itoh, K Morishita,	Maintenance of the he matopoietic stem cell p ool in bone marrow ni ches by EVI1- regulate d GPR56	Leukemia			accepted
Ma G, <u>Yasunag a J</u> , Fan J, Yan agawa S, Matsu oka M.	HTLV-1 bZIP factor dysregulates the Wnt pathways to support proliferation and mi gration of adult T-cel l leukemia cells.	Oncogene	In press		
Zane L, <u>Yasuna ga J</u> , Mitagami Y, Yedavalli V, Tang SW, Chen CY, Ratn er L, Lu X, Je ang KT.	Wip1 and p53 contri bute to HTLV-1 Tax -induced tumorigenesi s.	Retrovirology	9	114	2012

The Increased Expression of Integrin $\alpha 6$ (ITGA6) Enhances Drug Resistance in EVI1^{high} Leukemia

Norio Yamakawa¹, Kazuko Kaneda¹, Yusuke Saito, Emi Ichihara, Kazuhiro Morishita*

Division of Tumor and Cellular Biochemistry, Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan

Abstract

Ecotropic viral integration site-1 (EVI1) is one of the candidate oncogenes for human acute myeloid leukemia (AML) with chromosomal alterations at 3q26. High EVI1 expression (EVI1^{high}) is a risk factor for AML with poor outcome. Using DNA microarray analysis, we previously identified that integrin $\alpha 6$ (ITGA6) was upregulated over 10-fold in EVI1^{high} leukemia cells. In this study, we determined whether the increased expression of ITGA6 is associated with drug-resistance and increased cell adhesion, resulting in poor prognosis. To this end, we first confirmed the expression pattern of a series of integrin genes using semi-quantitative PCR and fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis and determined the cell adhesion ability in EVI1^{high} leukemia cells. We found that the adhesion ability of EVI1^{high} leukemia cells to laminin increased with the increased expression of ITGA6 and integrin $\beta 4$ (ITGB4). The introduction of small-hairpin RNA against EVI1 (shEVI1) into EVI1^{high} leukemia cells reduced the cell adhesion ability and downregulated the expression of ITGA6 and ITGB4. In addition, the overexpression of EVI1 in EVI1^{low} leukemia cells enhanced their cell adhesion ability and increased the expression of ITGA6 and ITGB4. In a subsequent experiment, the introduction of shRNA against ITGA6 or ITGB4 into EVI1^{high} AML cells downregulated their cell adhesion ability; however, the EVI1^{high} AML cells transfected with shRNA against ITGA6 could not be maintained in culture. Moreover, treating EVI1^{high} leukemia cells with neutralizing antibodies against ITGA6 or ITGB4 resulted in an enhanced responsiveness to anti-cancer drugs and a reduction of their cell adhesion ability. The expression of ITGA6 is significantly elevated in cells from relapsed and EVI1^{high} AML cases; therefore, ITGA6 might represent an important therapeutic target for both refractory and EVI1^{high} AML.

Citation: Yamakawa N, Kaneda K, Saito Y, Ichihara E, Morishita K (2012) The Increased Expression of Integrin $\alpha 6$ (ITGA6) Enhances Drug Resistance in EVI1^{high} Leukemia. PLoS ONE 7(1): e30706. doi:10.1371/journal.pone.0030706

Editor: Masaru Katoh, National Cancer Center, Japan

Received: August 1, 2011; **Accepted:** December 28, 2011; **Published:** January 25, 2012

Copyright: © 2012 Yamakawa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research in Priority Areas from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology in Japan. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: kmorishi@medmiyazaki-u.ac.jp

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Ecotropic viral integration site-1 (EVI1) is an oncogenic transcription factor for murine and human myeloid leukemia [1,2]. Human EVI1 is localized on chromosome 3q26 [3]. Although only approximately 1 to 3% of acute myeloid leukemia (AML) cases result from a translocation in 3q26, the elevated expression of EVI1 has been detected in 5% to 10% of AML cases in the absence of chromosomal abnormalities at 3q26 [4]. AML with EVI1 high expression (EVI1^{high}) is a poor prognosis subtype of AML that does not respond to currently available treatments [5].

EVI1 is a nuclear transcription factor with a DNA-binding zinc finger, an acidic amino acid cluster region and C-terminal binding protein (CtBP) motifs [6,7]. Although EVI1 has been reported to transcriptionally repress or suppress TGF β signaling by recruiting Smad3 and the co-repressor CtBP [8–10], we showed that EVI1 is directly associated with the GATA-2 promoter and upregulates GATA-2 transcription to maintain hematopoietic stem cells (HSCs) and AML with EVI1^{high} expression [11,12] in EVI1-deficient mice. In addition to the observed reduction in GATA-2 expression, other important factors for HSC maintenance, including Angiopoietin-1 and Tie-2, were also de-regulated in

EVI1-deficient mice [11]. These results suggest that murine Evil might de-regulate transcription factors or other signal transduction molecules necessary for HSC maintenance [11]. However, we do not know precisely how Evil is involved in the maintenance of HSCs.

Recently, there has been increased interest in understanding the regulatory interactions between osteoblasts and HSCs in the bone marrow microenvironment. Individual HSCs are typically anchored to the stroma via a network of adhesion molecules [13,14]. Recent studies have indicated the importance of these adhesion molecules (integrins and cadherins) in hematopoietic stem cell development and have shown that they function as key elements for the detection and translation of the extrinsic cues provided by the hematopoietic microenvironmental niche [15,16]. The integrins are heterodimeric complexes composed of two noncovalently associated transmembrane glycoprotein subunits: one from sixteen different alpha (a) subunits and the other from eight different beta (b) subunits [17,18]. $\alpha V\beta 4$ (VLA4), a $\alpha 4/\beta 1$ integrin heterodimer, participates in both cell-cell and cell-matrix interactions with vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1) and fibronectin (FN). In adult mice, VLA4/VCAM1 interactions are key elements in the mobilization and homing of hematopoietic stem cells to bone marrow [19]. Moreover,

treatment with anti-VLA4 antibodies mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells from the bone marrow to the peripheral blood [20]. Studies addressing the role of VLA4 in AML cell lines have described the drug resistance induced by the interaction of tumor cells with stromal cells or the extracellular matrix (ECM) as cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) [21,22]. In an analysis of 175 adult AML patients, however, VLA4 expression was not significantly associated with the response to anti-cancer drugs or with relapse-free or overall survival rates [23]. Thus, other adhesion molecules may also be important in the maintenance of HSC and leukemia stem cells.

In this study, we observed that the cell adhesion ability of the EVI1^{high} AML cells was higher than that of the EVI1^{low} cells. The increased adhesion of EVI1^{high} AML cells was dependent on the expression of the integrins $\alpha 6$ (ITGA6) and $\beta 4$ (ITGB4) in complex with laminin, particularly laminin-332. Because the increased adhesion ability of the AML cells increased their resistance to chemotherapy, and the expression of ITGA6 was significantly higher in AML cases in relapse, ITGA6 might be a novel molecular target in EVI1^{high} leukemia cells.

Results

Overexpression of ITGA6 enhances the ability of EVI1^{high} leukemia cell lines to adhere to matrigel and laminin

To search for novel molecular targets in refractory myeloid leukemia with high EVI1 expression, we previously analyzed the gene expression profiles of 12 human myeloid cell lines using an oligonucleotide microarray (Human Genome U133 Plus 2.0 Array; Affymetrix) containing 38,500 genes [24]. We identified ITGA6 in 26 selected genes that were upregulated over ten-fold in EVI1^{high} leukemia cells ($p < 0.01$). To confirm the results of the microarray analysis, the expression levels of a series of integrin genes were determined in three EVI1^{low} and EVI1^{high} cell lines using semi-quantitative RT-PCR. We determined the levels of the eight different β integrin genes (1 through 8), fifteen different α integrin genes (1 through 10, E, L, M, V, and X) and two cadherin molecules (N and VE). As shown in **Fig. S1A**, ITGB1, ITGB3, ITGA4, and ITGA5 were expressed in five of the six leukemia cell lines, and ITGB4 and ITGA6 were specifically expressed in the three EVI1^{high} leukemia cell lines. To confirm the results of the expression patterns of the integrin genes, we used the six cell lines and two primary leukemia cell lines from patients with the inv(3) (q21q26) subtype (PT9 and PT11) [24] to determine the expression of ITGB1, ITGB4, ITGA4, and ITGA6. ITGB1 and ITGA4 were expressed as very late antigen-4 (VLA-4) in most of the cell lines, but ITGB4 and ITGA6 were expressed in all three leukemia cell lines and in the two primary EVI1^{high} leukemia cell lines (**Fig. 1A**).

Because a number of integrin genes are involved in binding to fibronectin, laminin and matrigel [15,16], we compared the cell adhesion ability of EVI1^{high} and EVI1^{low} leukemia cell lines. The three human EVI1^{low} myeloid cell lines (HL60, U937, and K562) showed a reduced binding affinity to laminin and matrigel but an increased binding affinity to fibronectin. In contrast, the three EVI1^{high} cell lines (UCSD/AML1, MOLM1, and HNT34) exhibited an increased affinity for laminin, matrigel and fibronectin, with significant differences (**Fig. 1B**). Because the primary component of the matrigel used in this experiment is the laminin complex, the enhanced cell adhesion ability of EVI1^{high} leukemia cells might depend on binding to the laminin complex.

We also investigated the ability of various leukemia cells to adhere to the murine bone marrow stromal/osteoblastic cell line MC3T3-E1. As shown in **Fig. 1D**, a higher percentage of cells in

the three EVI1^{high} leukemia cell lines (UCSD/AML1, MOLM1 and HNT34) were attached to the MC3T3-E1 cells compared with the three EVI1^{low} leukemia cell lines (HL60, K562 and U937), and this difference was statistically significant ($p < 0.01$). Because the EVI1^{high} leukemia cell lines exhibited an enhanced ability to adhere to the laminin complex (**Fig. 1C**), we propose that the laminin complex might be one of the main molecular targets of this increased adhesion to the MC3T3-E1 cells.

The expression of ITGA6 and ITGB4 is dependent on the expression of EVI1

To determine which of the integrin genes were dependent on EVI1 expression, small hairpin RNA against EVI1 (shEVI1) were introduced into UCSD/AML1 cells with EVI1^{high}. Three UCSD/AML1 cell lines expressing shEVI1 (AML1/shEVI1-1 to -3), and a control cell line expressing an shRNA for firefly luciferase (shLuc) (AML1/shLuc) were established. Because the EVI1 expression was significantly downregulated in the AML1/shEVI1-1 to 3 cell lines (**Fig. 2A**), we determined the expression of a series of integrin genes using semi-quantitative RT-PCR (**Fig. S1B and Fig. 2A**). The results showed that the expression of ITGB3, ITGB4, ITGA6, ITGA9, and VE-cadherin was downregulated along with EVI1 in the AML1/shEVI1-1 to 3 cell lines. The high expression of ITGB3, ITGB4 and ITGA6 in the UCSD/AML1 cells and the downregulation of ITGA6, ITGB4 and ITGB3 in the AML1/shEVI1-1 cells were confirmed through immunofluorescence staining and FACS analysis (**Fig. 2B**). Moreover, ITGB4, ITGA6, ITGA9, and VE-cadherin were also downregulated in the HNT34 cell line, and PT9 and PT11 primary AML cell lines upon shEVI1 transfection, which was associated with a reduction in matrigel cell adhesion (**Figs. S1C to F**). Taken together, the results demonstrated that ITGB4, ITGA6, ITGA9, and VE-cadherin are the candidate integrin genes with increased adhesion ability in EVI1^{high} leukemia cells. Moreover, we determined the cell adhesion ability of the AML1/shEVI1 cell lines and found that the adhesion of AML1/shEVI1-1 to 3 cells to matrigel was significantly reduced compared with that of the parental UCSD/AML1 and AML1/shLuc cells (**Fig. 2C**). The cell adhesion of the AML1/shEVI1-1 cells to laminin, but not to fibronectin, was also significantly reduced compared with that of the AML1/shLuc cells (**Fig. 2D and E**).

In a subsequent experiment, we transiently introduced EVI1 and GFP expression vectors into the EVI1^{low} U937 cells and determined the resulting levels of expression of the various integrin genes. The adhesion of U937/EVI1 cells to matrigel was increased three-fold, and the expression of ITGB3, ITGB4 and ITGA6 was also increased in U937/EVI1 cells relative to their adhesion ability and expression in the U937/parental and U937/GFP cells (**Fig. 2F and Fig. S1G**). Because ITGB4 and ITGA6 form a heterodimer that binds to the laminin receptor and treatment with a neutralizing antibody to ITGB3 did not suppress the cell adhesion ability of EVI1^{high} leukemia cells (**Fig. 3G**), we further characterized the relationship between the expression of ITGA6/ITGB4 and the increased adhesion ability of the EVI1^{high} leukemia cells.

The adhesion ability of leukemia cells with EVI1^{high} expression is specifically dependent on the expression of ITGA6 and ITGB4

To evaluate whether the adhesion ability of the EVI1^{high} leukemia cells was specifically dependent on the expression of ITGA6 or ITGB4, shRNA against ITGA6 or ITGB4 was introduced into UCSD/AML1 cells using an Amaxa Nucleofector,

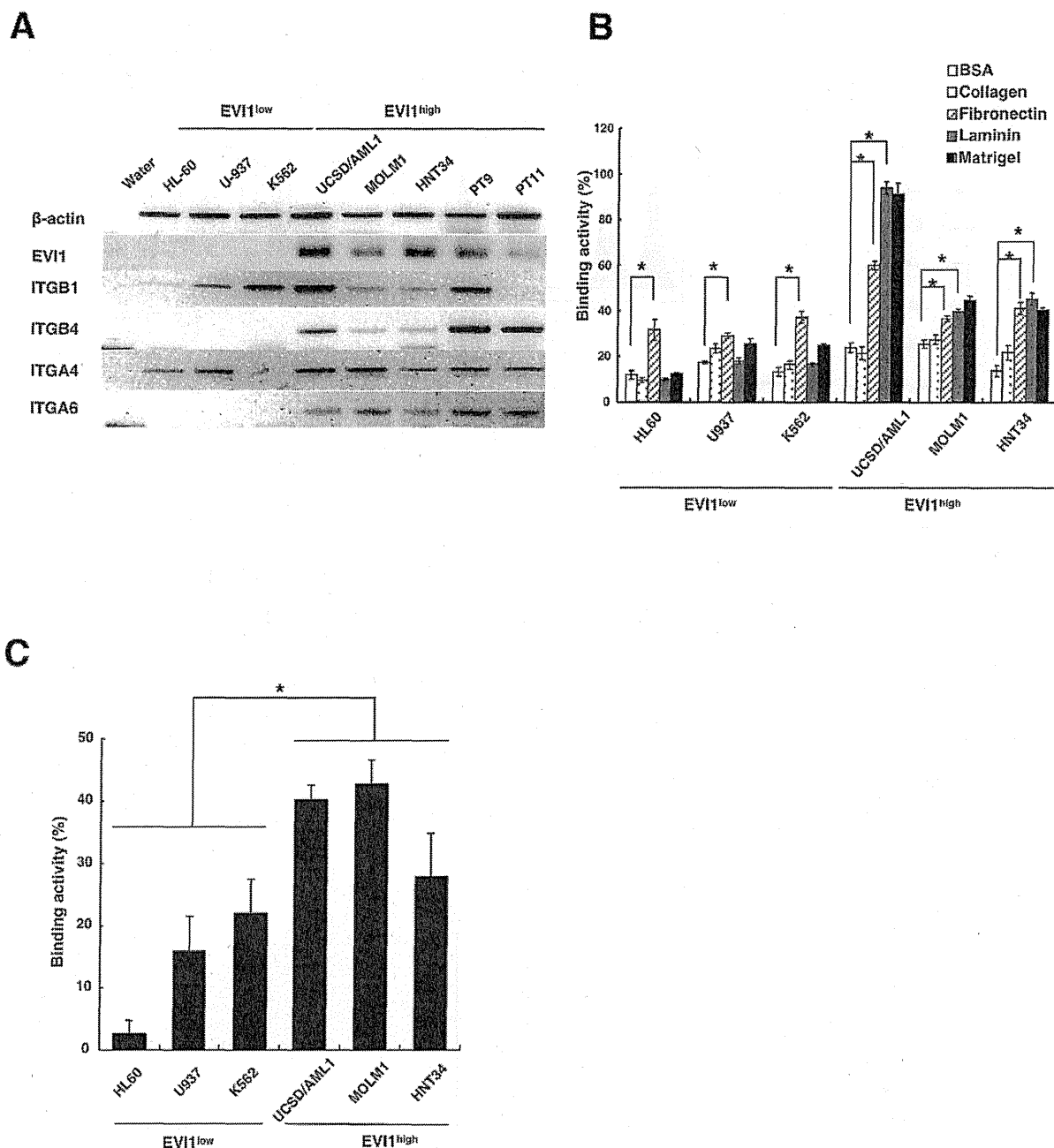


Figure 1. Higher cell adhesion ability in AML cell lines with EVI1^{high} expression. **A.** The expression of four integrin genes (ITGB1, ITGB4, ITGA4 and ITGA6), EVI1 and b-actin as a control was determined by semiquantitative RT-PCR in three different EVI1^{low} and EVI1^{high} AML cell lines and two primary AML cell lines with high EVI1 expression (PT9 and PT11). **B.** Six AML cell lines with low or high EVI1 expression, as indicated in the figure, were incubated in culture medium on BSA, collagen, fibronectin, laminin or matrigel-coated plates; the percentage of the total number of incubated cells that adhered to the plates was designated as the binding activity (%). Each experiment was performed in triplicate, and the experiments were independently repeated at least three times. The data are given as the mean \pm standard error (S.E). The statistical analysis was performed using the Student's *t*-test ($*p < 0.05$, vs. BSA-coated plate). **C.** Six AML cell lines were incubated with the murine osteoblastic cell line MC3T3-E1, and the percentage of cells that bound to MC3T3-E1 cells was determined. Each experiment was performed in triplicate, and the experiments were independently repeated at least three times. The statistical analysis was performed using the Student's *t*-test ($*p < 0.05$, vs. EVI1^{low} cell lines). doi:10.1371/journal.pone.0030706.g001

and the cell adhesion ability to matrigel was determined. The expression of ITGA6 and the cell adhesion ability were significantly reduced in UCSD/AML1 cells transfected with shITGA6 (AML1/

shITGA6) (Fig. 3A and D). Similar results were obtained in UCSD/AML1 cells transfected with shITGB4 (AML1/shITGB4) (Fig. 3B and E). The growth rate of the AML1/shITGA6 cells was

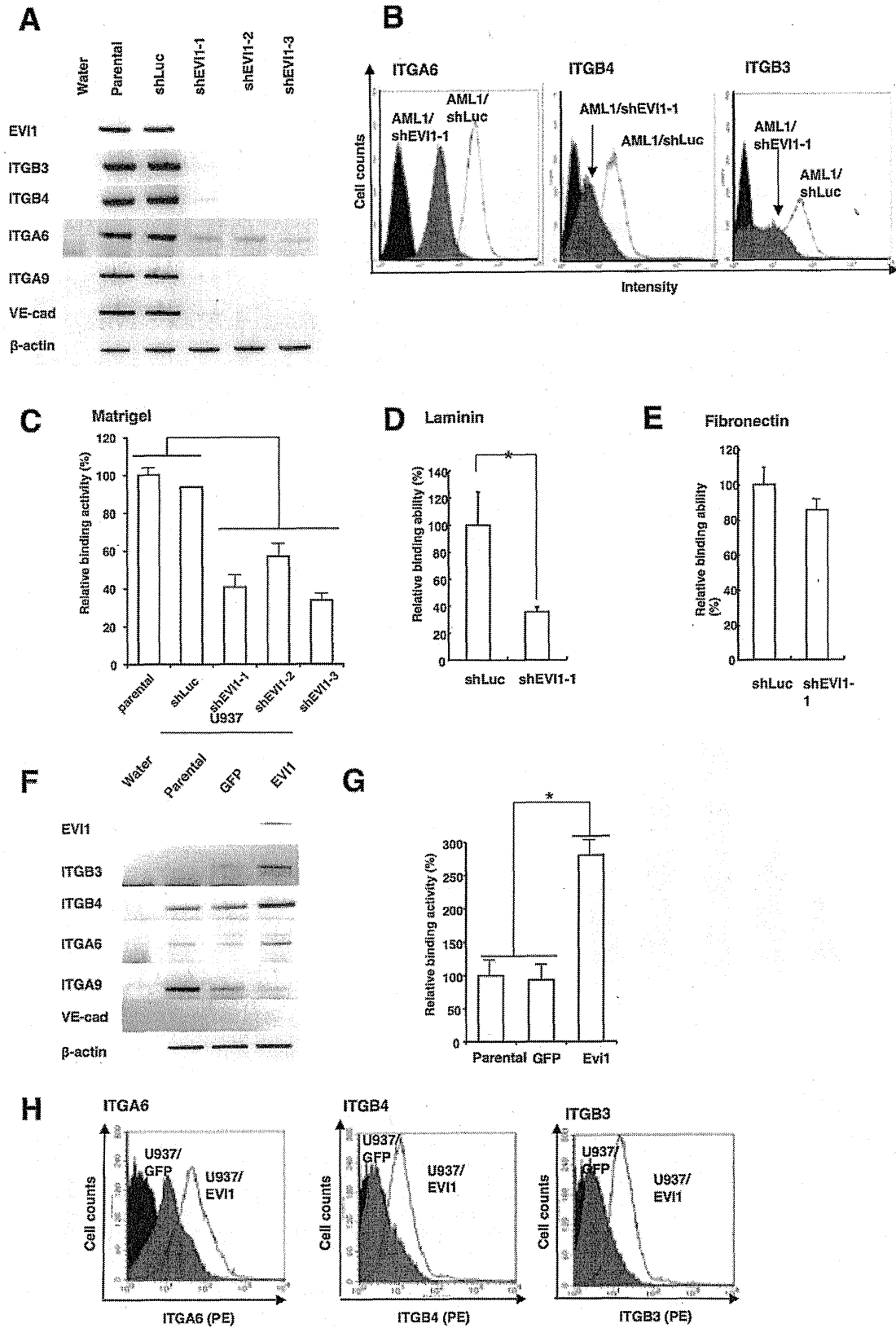


Figure 2. The expression of ITGA6 and ITGB4 is specifically dependent on the expression of EVI1. **A.** The pattern of expression of EVI1 and five integrin genes (ITGB3, ITGB4, ITGA6, ITGA9 and VE-cadherin) in various UCSD/AML1 cell lines. Three cell lines with small hairpin RNA (shRNA) against EVI1 (shEVI1-1, -2 and -3) and the parental and UCSD/AML1 cell lines harboring an expression vector for shRNA against firefly luciferase were used to determine the levels of expression of five integrin (ITGB3, ITGB4, ITGA6, ITGA9 and VE-cadherin) and control (EVI1 and b-actin) genes using RT-PCR. **B.** The expression of ITGA6, ITGB4 and ITGB3 in AML1/shLuc and AML1/shEVI1-1 was determined using FACS analysis after staining the cells with PE-conjugated antibodies to specific integrins. **C.** The same cell lines described in (2a) were assessed for their ability to adhere to the matrigel. The relative binding activity was calculated by comparison to the basal binding activity of the parental UCSD/AML1 cell line. **D and E.** The binding activity of AML1/shLuc and AML1/EVI1-1 cells to laminin (D) and fibronectin (E) was compared. Both cell lines were cultured on laminin or fibronectin-coated plates. **F and G.** After the EVI1 expression vector was introduced into the U937 cell line, the expression of five integrin genes (ITGB3, ITGB4, ITGA6, ITGA9, VE-cadherin) and EVI1 was determined using RT-PCR. b-actin was used as a control (F). The cell adhesion ability of the U937/EVI1, U937/parental and U937/GFP cell lines was determined (G). **H.** The expression of ITGA6, ITGB4 and ITGB3 in U937/GFP and U937/EVI1 was determined using FACS analysis after staining the cells with PE-conjugated antibodies to specific integrins. Each experiment shown in Figure 2C, 2D, 2E, and 2G was performed in triplicate, and the experiments were independently repeated at least three times. The data are given as the mean \pm S.E. The statistical analysis was performed using the Student's *t*-test (** $p < 0.05$, vs. each control). doi:10.1371/journal.pone.0030706.g002

reduced, and these cells could not be maintained in culture, whereas the AML1/shITGB4 grew at rate similar to the parental UCSD/AML1 control cells, suggesting that the signal transduction of ITGA6 is essential for the maintenance of leukemia cells. Because ITGA6 forms a heterodimer with ITGB4 or ITGB1, shITGB1 was introduced into UCSD/AML1 cells, and their adhesion to matrigel was measured. The adhesion of UCSD/AML1 cells to matrigel did not change significantly upon transfection with shITGB1 (Fig. 3C and F). These results suggest that the ITGA6 and ITGB4 heterocomplex is the primary cell adhesion molecule on EVI1^{high} leukemia cells.

To confirm the ITGA6 dependence of the increased cell adhesion of EVI1^{high} leukemia cells, we used a series of neutralizing antibodies. Two leukemia (UCSD/AML1 and MOLM1) and two primary human AML (PT9 and PT11) cell lines were cultured on matrigel and treated with or without anti-ITGA6, ITGB2, ITGB3, or ITGB4 antibodies. Two days after treatment, the binding activity of all four cell lines was significantly reduced by the treatment with anti-ITGA6 or anti-ITGB4 antibodies; however, isotype IgG, anti-ITGB2 or anti-ITGB3 antibodies did not inhibit the binding of EVI1^{high} leukemia cells to matrigel (Fig. 3G).

Because the EVI1^{high} leukemia cells exhibited an increased adherence to the murine osteoblastic cell line MC3T3-E1 (Fig. 1D) we examined whether this adhesion was dependent on ITGA6 or ITGB4 expression by treating with a neutralizing antibody. Two EVI1^{low} (K562 and U937) and three EVI1^{high} (UCSD/AML1, PT9 and PT11) leukemia cell lines were co-cultured with MC3T3-E1 cells, and the mixed cultures were subsequently treated with anti-ITGA6 or anti-ITGB4 antibody or the control isotype anti-rabbit IgG. The ability of the three EVI1^{high} leukemia cells to bind to MC3T3-E1 cells was significantly reduced upon treatment with anti-ITGA6 or anti-ITGB4 antibody, whereas the binding ability of the two EVI1^{low} leukemia cells did not change (Fig. 3H). To confirm this result, we examined the adhesion of U937/parental and U937/EVI1 cells to matrigel upon treatment with anti-ITGA6 antibody. The anti-ITGA6 antibody significantly inhibited the cellular adhesion of U937/EVI1 cells to matrigel, but did not inhibit the cell adhesion of the parental U937 cells (Fig. 3I). Therefore, the expression of ITGA6 and ITGB4 was EVI1 dependent, and the increased expression of ITGA6 and ITGB4 in EVI1^{high} leukemia cells increased their ability to adhere to the osteoblastic MC3T3-E1 cell line.

The downregulation of laminin-332 in osteoblastic MC3T3-E1 cells partially inhibits binding to EVI1^{high} leukemia cells

The ITGA6/ITGB4 heterocomplex has a clear specificity for laminin-332 (a3b3g2) or laminin-511 (a5b1g1) [25]. Therefore, we measured the expression of a series of laminin a, b, and g chains in

MC3T3-E1 cells; the expression of each laminin chain was clearly detected in these cells (Fig. S2). We subsequently introduced shRNA against the a3 chain of laminin-332 (shLN332) into MC3T3-E1 cells and measured the ability of the MC3T3-E1 cells to adhere to various types of myeloid leukemia cells. After the introduction of shLN332 or shLuc into MC3T3-E1 cells (MC3T3-E1/shLN332 or MC3T3-E1/shLuc, respectively), the expression of the a3 chain of laminin-332 was significantly reduced (Fig. 4A), but the expression of the g3 chain of laminin-332 and b-actin were not changed. Compared to the MC3T3-E1/shLuc cells, the MC3T3-E1/shLN332 cells displayed significantly reduced adhesion to the EVI1^{high} cell lines UCSD/AML1, MOLM1 and HNT34. However, their adhesion to the leukemia cell lines with EVI1^{low} expression, such as HL60, K562, and U937, did not change (Fig. 4B). Moreover, the UCSD/AML1/shEVI1 cells displayed reduced adhesion to the MC3T3-E1/shLuc cells compared with that of the UCSD/AML1 cells, whereas the adhesion of the UCSD/AML1/shEVI1 cells to the MC3T3-E1/shLuc and MC3T3-E1/shLN332 cells did not change. These data suggest that the increased adhesion of the leukemia cell lines with EVI1^{high} expression is mainly dependent on the laminin complex, particularly laminin-332.

EVI1^{high} leukemia cells treated with ITGA6 or ITGB4-neutralizing antibodies or small hairpin RNA against EVI1 or ITGB4 recover drug sensitivity

We next determined whether treating EVI1^{high} leukemia cells with a neutralizing antibody against integrin improves the drug sensitivity of the cells in the adhered state. Two EVI1^{high} leukemia cell lines, UCSD/AML1 and MOLM1, and two primary leukemia cell lines, PT9 and PT11, were used in this experiment; the IC50 of Ara-C for these cells cultured on the matrigel coated plates was approximately 10^{-6} M (Fig. S3). The four cell lines were seeded on matrigel-coated culture plates with or without anti-ITGA6 or anti-ITGB4 antibodies in the presence of 10^{-6} M Ara-C. After four days of culture, the percentage of surviving cells in the cultures treated with anti-ITGA6 or anti-ITGB4 antibodies were significantly reduced in the two EVI1 and primary AML cell lines compared with the control cells (Figs. 5A to D). Because similar results were also obtained using the anti-cancer drug, VP-16 (Fig. S4), the treatment with anti-ITGA6 or anti-ITGB4 antibodies or anti-cancer drugs might recover the drug-sensitivity of EVI1^{high} leukemia cells.

To determine whether the effect of Ara-C was dependent on the cell adhesion ability, AML1/shITGB4, AML1/shEVI1 and control AML1/shLuc cells were cultured on matrigel-coated or control BSA-coated plates and treated with Ara-C for three days; we could not use AML1/shITGA6 cells in this experiment. After three days of culture, the number of viable AML1/shLuc cells was