

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合研究戦略研究事業）
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)

研究代表・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、ATL 発症関連遺伝子候補として、CADM1/TSLC1、ZEB1(TCF8)、EPC1、NDRG2、BCL11B を同定した。NDRG2 は新規 PP2A・PTEN 結合タンパク質であり、PTEN・C 端脱リン酸化により、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ことを同定した。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/TAX、EZH2 活性化によりメチル化・発現低下を引き起こし、感染防御としての PI3K/AKT・NFκB 情報伝達系の抑制がかからず、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た。さらに HTLV-1 感染に伴うエピゲノム異常と TAX 非依存的エピゲノム異常の解析を、網羅的メチル化解析を行い、関連遺伝子群を同定した。さらにこれまでに同定した因子群の機能をさらに *in vivo* 実験により証明中である。

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ATL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、健常人 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。NDRG2 及び PTEN 結合タンパク質を網羅的に同定し、その遺伝子群の検討を進めた。また同定した遺伝子群の機能解析として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. 研究結果

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ている。NDRG2は新規PTEN結合タンパク質として新に同定し、PTENに結合しフォスファターゼPP2AをリクルートしPTEN・C端脱リン酸化調節に関わる因子であることを同定した。ATLにおいてNDRG2の発現低下はPTEN-C端の高頻度リン酸化をきたし、PTEN不活化はPI3K/AKT情報伝達系の恒常的活性化に繋がっていた(Nature Comm 2014)。このPTENリン酸化酵素について、候補遺伝子を特定し現在そのリン酸化機構を検討しており、PTENリン酸化を阻害する事による治療法の開発に繋がりたい。またこのPTENリン酸化は細胞膜BST2タンパク質に由来しており、BST2はバイオフィルム構造をとりHTLV-1のウイルス感染を防御する役割を持つ。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。このメチル化反応とHTLV-1感染の

関連性について検討したところ、TAX発現に依存した、EZH2遺伝子高発現、NDRG2プロモーターのヒストン脱アセチル化はメチル化亢進を引き起こすことが示唆される結果を得ている。NDRG2欠損マウスは多種類の癌の発症ばかりで無く、心筋梗塞や脂肪肝など生活習慣病も引き起こす事から、癌ばかりで無く生活習慣病モデルマウスとしての利用が考えられる。CADM1のATL細胞での高発現機構をプロモターアッセイにより検討したところNF- κ Bによる活性化、TAX依存性が分かった。このことからHTLV-1感染による遺伝子発現であるため、HTLV-1感染細胞を特異的に同定できる理由が確認できた。CADMITGマウスの解析並びにBCL11B TGマウスを樹立し、白血病化の解析を続けている。

D. 考察

同定した NDRG2 は元来の機能が感染等のストレス刺激による細胞内情報伝達系を負に制御し、細胞に恒常性をもたらず遺伝子として考えられる。HTLV-1 感染により TAX 発現に伴うメチル化異常はこの NDRG2 のメチル化を促し、低発現に繋がる事が示唆された。従って HTLV-1 感染はそのゲノムエピゲノム異常を引き起こす重要な引き金となっており、TAX や HBZ のゲノムエピゲノムに及ぼす影響を検討しつつ ATL の発症機構を検討することは重要な手がかりになると思われる。

E. 結論

新規に単離した NDRG2 に関連する PTEN リン酸化酵素は治療の標的になり得る可能性が有り、さらなる検討が必要である。また HTLV-1 感染以降のゲノム異常・エピゲノム異常は TAX/HBZ の機能に依存していることが示唆されるため、HTLV-1 ウイルス感染症による影響を検証しつつ ATL 発症を段階的に検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakahata S, Ichikawa T, Maneesaay P, Saito Y, Nagai K, Tamura T, Manachai N, Yamakawa N, Hamasaki M, Kitabayashi I, Arai Y, Kanai Y, Taki T, Abe T, Kiyonari H, Shimoda K, Ohshima K, Horii A, Shima H, Taniwaki M, Yamaguchi R, Morishita K.: Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers *Nature Comm.* 2014 5:3393.
- 2) Kai H, Akamatsu E, Torii E, Ko-dama H, Yukizaki C, Akagi I, Ino H, Sakakibara Y, Suiko M, Yamamoto I,

Okayama A, Mor-ishita K, Kataoka H, Matsuno K.: Identification of a bioactive compound against adult T-cell leukemia from bitter gourd Seeds. *Plants* 2014 3:18-26.

- 3) Yamamura A, Miura K, Karasawa H, Morishita K, Abe K, Mizuguchi Y, Saiki Y, Fukushige S, Kaneko N, Sase T, Nagase H, Sunamura M, Motoi F, Egawa S, Shibata C, Unno M, Sasaki I, Horii A.: Suppressed expression of NDRG2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 441:102-7.
 - 4) Ikebe E, Kawaguchi A, Tezuka K, Taguchi S, Hirose S, Matsumoto T, Mitsui T, Senba K, Nishizono A, Hori M, Hasegawa H, Yamada Y, Ueno T, Tanaka Y, Sawa H, Hall W, Minami Y, Jeang KT, Ogata M, Morishita K, Hasegawa H, Fujisawa J, Iha H.: Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATL model mice. *Blood Cancer J.* 2013 3:e132.
 - 5) Sugie S, Mukai S, Tsukino H, Toda Y, Yamauchi T, Nishikata I, Kuroda Y, Morishita K, Kamoto T.: Increased plasma caveolin-1 levels are associated with progression of prostate cancer among Japanese men. *Anticancer Res.* 2013 33:1893-7.
 - 6) Yamasaki M, Mine Y, Nishimura M, Fujita S, Sakakibara Y, Suiko M, Morishita K, Nishiyama K.: Genistein induces apoptotic cell death associated with inhibition of the NF- κ B pathway in adult T-cell leukemia cells. *Cell Biol Int.* 2013 37:742-7.
 - 7) 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.* 2013 27:1637-49.
- ##### 2. 学会発表
- 1) Kaneda K, Morishita K.: Integrin A6 as a special marker of refractory leukemia is important for maintaining of leukemia stem cells. The 11th Stem Cell Research Symposium. (第 11 回幹細胞シンポジウム) 文京区. 2013.5.17
 - 2) Nakahata S, Morishita K.: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. CANADA (Montreal). 2013.6.26-30
 - 3) 市川朝永、中畑新吾、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 による HTLV-1/Tax 誘導性 NF κ B 活性抑制機構の解析. 第 34 回日本炎症・再生医学学会. 京都. 2013.7.2
 - 4) 市川朝永、中畑新吾、藤井雅寛、伊波英克、森下和広：NDRG2 は PP2A リクルーターとして PTEN 及び NIK 活性調節に関わる. 第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム. 港区. 2013.8.25
 - 5) 中武彩子、小林行治、西片一朗、中畑新吾、岩

- 永正子、相良康子、北中明、天野正宏、前田宏一、末岡榮三朗、瀬戸口充、岡山昭彦、宇都宮與、下田和哉、渡邊俊樹、森下和広：血中可溶性 CADM1/TSCL1 測定による ATL 診断法の開発。第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム。港区。2013.8.25
- 6) 西片一朗、市川朝永、中畑新吾、藤井雅寛、伊波英克、白神俊幸、田中勇悦、森下和広：ATL 細胞における CADM1 高発現は HTLV-1 Tax を含む NF-κB 活性化に依存する。第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム。港区。2013.8.24-25 (ポスター)
- 7) 市川朝永、田村知丈、中畑新吾、迫田隅男、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 欠損マウスによる 4-NQO 誘導性口腔がん発症機構の解析。第 86 回日本生化学会大会。横浜。2013.9.11
- 8) 市川朝永、田村知丈、中畑新吾、迫田隅男、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 欠損マウスによる 4-NQO 誘導性口腔がん発症機構の解析。第 86 回日本生化学会大会。横浜。2013.9.11 (ポスター)
- 9) 兼田(中島)加珠子、井川香織、太田智美、岡本朝久、帖佐悦男、迫田隅男、森下和広：MEL1/PRDM16 による骨分化制御機構の解明。第 86 回日本生化学会大会。横浜。2013.9.12 (ポスター)
- 10) Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K : NDRG2 inactivation in cancer cells leads to activation of the P13K/AKT pathway via sustained phosphorylation of PTEN. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜。2013.10.3 (ポスター)
中畑新吾、市川朝永、齋藤祐介、新井康仁、滝智彦、谷脇雅史、森下和広：癌細胞における NDRG2 の不活性化は PTEN の恒常的なリン酸化を促し、P13/AKT 経路の活性化を引き起こす。第 72 回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.3 (ポスター)
- 11) Ichikawa T, Nakahata S, Tamura T, Sakoda S, Morishita K : Molecular mechanisms of 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO)-induced oral carcinogenesis in NDRG2-deficient mice. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜。2013.10.5
市川朝永、中畑新吾、田村知丈、迫田隅男、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 欠損マウスにおける 4-NQO 誘導性口腔がん発症機構の解析。第 72 回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.5
- 12) Nagai K, Nakahata S, Ichikawa T, Meda K, Utsunomiya A, Kanai Y, Sueoka E, Morishita K : DNA methylation profiles of various types of ATLL associated with development of ATLL. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜。2013.10.5 (ポスター)
長井健太郎、中畑新吾、市川朝永、前田宏一、宇都宮與、金井弥栄、末岡榮三朗、森下和広：ATLL の DNA メチル化は ATLL の発症に関連する。第 72 回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.5 (ポスター)
- 13) Kaneda K, Suekane A, Saito Y, Yamakawa N, Kurosawa J, Morishita K : Investigation of therapeutic efficacy of neutralizing antibody of integrin for AML. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜。2013.10.5 (ポスター)
- 兼田(中島)加珠子、末金彰、齋藤祐介、山川哲生、黒澤仁、森下和広：AML に対するインテグリン中和抗体の治療効果に関する検討。第 72 回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.5 (ポスター)
- 14) Yamamoto H, Yokoyama K, Lu J, Oba S, Kawamata T, Yoshimi A, Morishita K, Kurokawa M, Koutani A : Identification of miRNA targeting Evi 1. 第 75 回日本血液学会学術集会。札幌。2013.10. (ポスター)
- 15) Kaneda K, Suekane A, Yamakawa N, Saito Y, Morishita K : Survival and drug resistance of LS Cs Cell by integrin alpha 6 in EVI1^{high} AML. 第 75 回日本血液学会学術集会。札幌。2013.10. (ポスター)
- 16) Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K. : Down-regulation of NDRG2 induces activation of the P13K pathway through PTEN inactivation in ATL. 第 75 回日本血液学会学術集会。札幌。2013.10. (ポスター)
- 17) 兼田(中島)加珠子、末金彰、齋藤祐介、森下和広：GPR56 は白血病幹細胞の新規治療標的である。第 36 回日本分子生物学会年会。神戸。2013.12.3 (ポスター)
- 18) 兼田(中島)加珠子、井川加織、太田智美、黒木修司、岡本朝久、帖佐悦男、迫田隅男、森下和広：骨軟骨分化制御における MEL1/PRDM16 の機能解析。第 36 回日本分子生物学会年会。神戸。2013.12.3 (ポスター)
- 19) 伊波英克、池辺詠美、川口晶、手塚健太、田口慎也、廣瀬仁志、西園晃、堀光雄、長谷川寛雄、山田恭暉、上野孝治、田中勇悦、澤洋文、Hall William W、南康文、Jeang Kuan-Teh、緒方正雄、森下和広、長谷川秀樹、藤澤順一：Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATL model mice. 第 36 回日本分子生物学会年会。神戸。2013.12.5 (ポスター)

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願番号：特願 2011-508324

名称：PTEN のリン酸化抑制剤又は脱リン酸化剤

特許権者：宮崎大学、宮崎県産業振興機構

発明者 森下和広 中畑新吾

登録日 平成26年4月11日