

201313038B (1/2)

別紙1

総合研究報告書表紙

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発症機構の解析に関する研究

平成23年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 森下 和広

平成26(2014)年 5月

総合研究報告書目次

目 次

I. 総合研究報告		
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発症機構の解析に関する研究	森下和広	1
(資料) 分担研究 (森下和広)		
(資料) 分担研究 (安永純一郎)		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表		21
III. 研究成果の刊行物・別刷		25

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) 感染者の約 5% が長い潜伏期間を経て成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) を発症する。他のがん種と同様に、ATL 細胞でも細胞遺伝子の変異やエピゲノム異常の蓄積が認められ、このことは ATL の発症機序において、ウイルス感染に加えて宿主遺伝子異常の蓄積による多段階発がん機構が関与することを示唆している。ウイルス感染において HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は全ての ATL 細胞で発現し、ATL 細胞の増殖に必須である。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 の病原性に重要な役割を果たしていると考えられる。本課題の一つの方向として、本 HBZ-Tg マウスモデルを用いて、HBZ がゲノム異常、エピゲノム異常を誘導する機序について検討し、HBZ による発がん機構における役割を解析した。また一方でヒト ATL 検体を用い統合的ゲノム解析として、高密度 SNP アレイ解析、DNA マイクロアレイ遺伝子発現解析、RNA シークエンス、エクソームシークエンス、網羅的メチル化アレイ解析等を行い、複数の ATL 発症関連遺伝子群 (TCF8/ZEB1, NDRG2, BCL11B, EPC1/AXSL2, CADM1 等) を単離してきた。その結果として、ウイルス感染が、エピゲノム・ゲノム異常の方向性を導く細胞内異常を引き起こし、その結果として、ATL 発症因子群の異常を引き起こす事が示唆された。これらの情報を元にさらなる ATL の段階的発症機構を明らかにする予定である。

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 HTLV-1 bZIP factor (HBZ) に注目し HBZ Tg マウスに発症する T 細胞リンパ腫をモデルとして包括的ゲノム・トランスクリプトーム解析手法を用い、ATL 発がんの分子機構を明らかにする。また一方でヒト ATL 細胞に対して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 発症関連遺伝子を単離し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

1. SNP アレイ解析・網羅的遺伝子発現解析

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。

2. 網羅的メチル化アレイ解析

Human Methylation 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。

3. in vitro 機能解析

NDRG2 と PTEN は ATL 細胞を用いて質量分析計により網羅的な結合タンパク質の同定を行った。各免疫沈降バンド約 30 本を中心に同定を行い、serine/threonine kinase を中心に解析を進めた。CADM1 に関してはプロモーターアッセイを行い、ATL で特異的に活性化できる領域を同定、その活性化機構の解明を行った。BCL11B に関しては、ATL での特異的発現異常、

転写調節、タンパク質局在等と共に、in vivo TG マウス作製による白血病発症機構の検討を行った。

3. HBZ 発現細胞における網羅的遺伝子発現解析: HBZ が惹起する遺伝子発現プロファイルの変化を、Affymetrix 社の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。

・HBZ-TG 由来 CD4+T リンパ球 vs 野生型マウス CD4+T リンパ球

・HBZ-TG 由来制御性 T リンパ球 vs 野生型マウス制御性 T リンパ球

・HBZ 安定発現 Jurkat 細胞 vs 対照 Jurkat 細胞
データ解析には GeneSpringGX を用いた。

4. 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 リンパ腫細胞におけるエクソーム解析を試みた。HBZ-Tg の T リンパ腫から樹立した細胞株 Ht48 を用いて、エクソーム解析を行った。エクソームキャプチャーには、Agilent 社の SureSelect XT Mouse All Exon キャプチャライブラリを使用し、ディープシーケンシスはイルミナ社 MiSeq を用いて実施した。データ解析に関しては、BWA でゲノムにマッピングし、PicardTools で重複リードを除去、Samtools mpileup で SNP コール、アノテーションは ANNOVAR を利用した。さらに、non-synonymous SNPs を抽出し、変異のインパクトを推定するために PROVEAN を使って予測した。

5. HBZ が惹起するエピゲノム異常の分子機構
HBZ が結合するヒストン修飾酵素に注目し、これらの結合が遺伝子発現に及ぼす変化について解析した。

(倫理面への配慮)

患者検体の使用に関しては、宮崎大学医学部医倫理審査会の承認(承認番号 784)を受け、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)並びに京都大学の承認(承認番号: 100182)をうけ、的確に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、並びに京都大学動物実験委員会の承認(承認番号: D11-19, D11-20, D12-15, D12-16, D13-01, D13-02)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

1. 高密度 SNP アレイ解析・網羅的遺伝子発現解析

これまでに、染色体転座集中領域として 10p11、14q11、14q32 領域を同定しており、これらの領域を中心としてゲノム解析を進めた。10p11 領域より TCF8/ZEB1 をその原因遺伝子候補として単離し (Blood 2008)、EPC1/AXSL2 融合遺伝子を単離し報告した(J of Viol 2009)今回 NDRG2 を 14q11 領域より同定し癌抑制遺伝子候補として報告した(BBRC 2010、Nature Comm 2014)。さらに 14q32 領域より BCL11B を同定し、現在その機能解析を進めている。また網羅的遺伝子発現解析により同定した CADMI について、その機能解析と共に、診断系としても有用で有り、ATL 細胞、HTLV-1 感染細胞が末梢血中に 1% 以上の存在下で FACS 解析で同定できることを証明した。(Leukemia 2012)。

p21(CDKN1A)は、元来 HTLV-1 感染により高発現することが知られていたが、遺伝子発現解析から ATL 細胞では逆に低発現することを同定した。HTLV-1 感染による Tax は p21 を高発現させるが、ATL 細胞にいたり Tax 発現低下とプロモーターメチル化により p21 の低発現が出現することが分かった (J of Viol 2010)。また ATL における TGFbeta 不応性は TCF8 低発現に加えて SMAD7 高発現に依存していることも同定した(Oncogene 2010)

2. 網羅的メチル化アレイ解析

メチル化アレイにより網羅的にメチル化異常の検討を行い、遺伝子発現アレイとデータを組み合わせることで、ATL 細胞で有意に高メチル化され、遺伝子発現低下を示す遺伝子群として 33 遺伝子群を、また有意に低メチル化され高発現する遺伝子群を 32 遺伝子同定した。高メチル化低発現遺伝子群には、NDRG2、BCL2L1 等が含まれ、低メチル化高発現遺伝子群として、PTHLH 等が含まれていた。NDRG2 のメチル化を ATL 病型により検討したところ、くすぶり型においてもメチル化が認められたため、ATL 発症初期からのメチル化が示唆された。

3. in vitro 機能解析

NDRG2 の機能解析として、網羅的タンパク質結合解析を行い、30 以上の結合タンパク質を同定した。その中に PTEN が含まれており NDRG2 は新規 PTEN 結合タンパク質であることが分かった。ATL では AKT 活性化が高頻度で起きているが、PTEN の発現は保たれゲノム変位も見つからず、C 端高リン酸化状態による不活化が示唆された。結果として NDRG2 は PTEN = PP2A をリクルートすることで PTEN

脱リン酸化状態を保持し活性調節を行っているが、NDRG2 低発現により ATL では PTEN リン酸化状態と成り AKT 活性化に繋がっていた (Nature omm2014)。この NDRG2 の低発現、高メチル化機構を検討したところ、HTLV-1 Tax により EZH2 の高発現を引き起こし、DMT3 との関連しメチル化されていることが分かってきた。またくすぶり型、慢性型、急性型と進行するにつれてメチル化状態が進行し、発現も低くなることが分かった (未発表) 一方 CADM1 高発現機構の解析をプロモーター解析により進め、NF-KB 情報伝達系の活性化が重要であることを突き止めた。さらに TAX がこの活性化に関わっており、HTLV-1 感染細胞特異的に高発現する理由が明らかとなってきた (未発表)。このように感染初期からの HTLV-1 の影響が遺伝子発現に重要な影響を与えており、異常の始まりが見えていて、それが最終的に進行し、白血病発症の基盤になっていることが示唆される。

4. In vivo 実験

ATL 発症機構を明らかにするために単離した遺伝子群の遺伝子改変マウスを作成しその性状を検討している。ZEB1/TCF8、NDRG2、CADM1、BCL11B とそれぞれに遺伝子改変マウスを作成しており、ZEB1 は 80% 以上に T リンパ腫を、NDRG2 は haploinsufficiency によりヘテロマウスにおいても多種類の固形がんを含み T リンパ腫 (CD4+) を発症した。CADM1 TG マウスにおいても皮膚炎症症状と T リンパ腫が出現し、検討を続けている。

5. HBZ 発現細胞における網羅的遺伝子発現解析

1) Pro-apoptotic genes, *Bim* and *FasL*

HBZ-Tg 由来 CD4+ T 細胞および HBZ 発現 Jurkat 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。HBZ 発現 Jurkat は、phorbol myristate acetate (PMA) および ionomycin (Io) 刺激にて誘導される activation-induced cell death が対照 Jurkat に比較して抑制されており、アポトーシスに対して抵抗性であると考えられた。HBZ が *Bim* および *FasL* の発現を抑制する機序として、HBZ が転写因子 FoxO3a と結合し、その機能を阻害することを見出した。HBZ は FoxO3a の細胞内局在異常および DNA 結合能阻害により、*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、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 がヒス

トン修飾に影響を与えることが示唆された。

2) Activation-induced cytidine deaminase gene, *Aicda*

HBZ-Tg 由来の CD4+ T 細胞および制御性 T リンパ球ではシトシン脱アミノ化酵素 Activation-induced cytidine deaminase (AID) をコードする遺伝子 *Aicda* の発現が亢進していることが示唆された。複数の HBZ-Tg から CD4+ T-cell を分離し *Aicda* の発現を realtime PCR にて確認したところ、HBZ-Tg 群にて有意に *Aicda* の転写が亢進していた (WT vs HBZ-Tg, $p=0.0173$)。さらにルシフェレースアッセイにて HBZ は TGF- β /Smad 経路を介して *Aicda* のプロモーターを活性化することが明らかとなった。

6. HBZ-Tg に発症する T リンパ腫におけるゲノム異常の探索

1) HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞株の樹立

HBZ-TG 由来の T リンパ腫細胞を免疫不全マウス (NOD-SCID/IL2Rgamma KO マウス : NSG マウス) に移植し、腫瘍の生着および継代を行った。継代が可能であった 1 種類の細胞株を樹立し、Ht48 と命名した。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。Ht48 は in vitro でも維持培養が可能であった。

2) HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞における遺伝子変異の網羅的探索

Ht48 から genomic DNA を抽出し、エクソーム解析を行った。マウスゲノム配列 mm10 との比較の結果、Ht48 では 6361 種類の遺伝子変異が検出された。変異の内訳に関しては、G-to-A 変異 (1334 箇所)、C-to-T 変異 (1319 箇所) と他の変異に比較して頻度が高かった (G-to-T: 236 箇所、G-to-C: 223 箇所、C-to-G: 216 箇所、C-to-A: 233 箇所、T-to-C: 967 箇所、T-to-G: 229 箇所、T-to-A: 164 箇所、A-to-T: 197 箇所、A-to-C: 238 箇所、A-to-G: 1005 箇所)。

7. HBZ が惹起するエピゲノム異常の分子機構

HBZ によるエピゲノム異常と発がん機構に関して、HBZ がヒストン修飾関連分子 CBP/p300、EPC-1、TIP60、FBXL11 等と結合することを見出した。HBZ は EPC-1 と共に AP-1 転写因子の一つである *c-Fos* の転写を抑制した。

D. 考察

この3年間の研究で、HBZ 自身がゲノム変異、エピゲノム異常を誘導する機能を有することが示唆された。ゲノム変異を惹起するメカニズ

ムにHBZによる*Aicda*発現誘導が関与している可能性がある。HBZは様々なヒストン修飾関連蛋白と結合することから、エピゲノム異常を誘導する機能を有すると示唆される。今後、HBZ-Tgから得られたゲノム・エピゲノム情報とATL患者の情報を比較することにより、発がんにより重要なゲノム異常の特定が期待できる。ATL患者のゲノム解析によりATL発症機構の一部として多くの発症関連因子が同定されその一部が解明された。これらのATL発症関連因子の多くは、その遺伝子発現異常はHTLV-1感染、特にTaxに依存が明らかとなり、感染初期からの特にエピゲノム異常が重要であることが分かった。またゲノム異常の一部、EPC1のゲノム異常に関しては、まさにHTLV1/HBZと結合するヒストン修飾酵素であり、ATL発症の糸口を示す機能として意義がある。

E. 結論

HBZ自身がゲノム変異、エピゲノム異常を誘導する機能を有することが示唆された。HBZはTIP60、p300、EPC-1、FBXL11など様々なヒストン修飾酵素と結合することが判明し、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関与することが示唆された。一方、HBZはシトシン脱アミノ化酵素 Activation-induced cytidine deaminase (AID)をコードする遺伝子*Aicda*の転写を誘導し、遺伝子変異の誘導に関与することが示唆された。これらの所見はHBZ自体が細胞側のゲノム異常、エピゲノム異常を誘導する機能を有すること示唆している。

ATL発症に関連する遺伝子群としてZEB1/TCF8、SMAD7、CDKN1A、NDRG2、EPC1/AXSL2、CADM1/TSLC1、BCL11Bを同定した。それぞれの異常はATL細胞の性状を説明できる重要な発症因子である。TGFbeta情報伝達不能性にZEB1低発現、SMAD7高発現が、PI3K/AKT情報伝達系活性化にNDRG2低発現が、エピゲノム異常にEPC1/AXSL2が、細胞周期異常にCDKN1Aが、臓器浸潤性や悪性度に関してCADM1高発現が関わっていた。これらの遺伝子群の特徴を生かして、ATLの診断治療法の開発につなげる予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, Ueno S, Umekita K, Kamihira S, Morishita K, Okayama A.: Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. **Int J Cancer**. 128(6): 1335-1343, 2011
2. Saito Y, Nakahata S, Yamakawa N, Kaneda K, Ichihara E, Suekane A, Morishita K. : CD52 as a molecular target for immunotherapy to treat acute myeloid leukemia with high EVI1 expression. **Leukemia** 25: 921-931, 2011.
3. Nishikata I, Nakahata S, Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, Yamakawa N, Morishita K.: Sumoylation of MEL1S at lysine 568 and its interaction with CtBP facilitates its repressor activity and the blockade of G-CSF-induced myeloid differentiation. **Oncogene** 30, 4194-4207, 2011.
4. Ichihara E, Kaneda K, Saito Y, Yamakawa N, Morishita K : Angiopoietin1 contributes to the maintenance of cell quiescence in EVI1^{high} leukemia cells. **Biochem Biophys Res Commun** 416: 239-245, 2011.
5. Yamakawa N, Kaneda K, Saito Y, Ichihara E, Morishita K.: The increased expression of integrin $\alpha 6$ (ITGA6) enhances drug resistance in EVI1^{high} leukemia. **PLoS One**. 7(1): e30706, 2012.
6. 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.
7. 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.
8. Nakahata S, Morishita K.: CADM1/TSLC1 is a novel cell surface marker for adult T-cell leukemia/lymphoma. **J Clin Exp Hematopathol**. 52: 17-22. 2012.
9. Ueno S, Umeki K, Takajo I, Nagatomo Y, Kusumoto N, Umekita K, Morishita K, Okayama A.: Proviral loads of human T-lymphotropic virus Type 1 in asymptomatic carriers with different infection routes. **Int J Cancer**. 130: 2318-2326 2012.
10. 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* 27: 1637-1649 2013.
11. Yamasaki M, Miné 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.* 37:742-747. 2013
 12. 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.* 33: 1893-1897 2013
 13. 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.* 3: e132. 2013
 14. 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.* 441:102-107 2013
 15. Kai H, Akamatsu E, Torii E, Kodama H, Yukizaki C, Akagi I, Ino H, Sakakibara Y, Suiko M, Yamamoto I, Okayama A, Morishita K, Kataoka H, Matsuno K: Identification of a bioactive compound against adult T-cell leukemia from bitter melon seeds. *Plants*, 3(1), 18-26 2014
 16. Nakahata S, Ichikawa T, Maneesay 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.* 5:3393 2014
 17. Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J, Takai K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP Factor Suppresses Apoptosis by Attenuating the Function of FoxO3a and Altering Its Localization. *Cancer Res*, 74; 188-200, 2014.
 18. Miura M, Yasunaga J, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, Akari H, Matsuoka M. Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. *Retrovirology*, 10; 118, 2013.
 19. Matsuoka M and Yasunaga J. Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. *Curr Opin Virol*, 3; 684-691, 2013.
 20. 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.
 21. 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*, 32; 4222-4230, 2013.
 22. Sugata K, Satou Y, Yasunaga JI, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. *Blood*, 119; 434-444, 2012.
 23. Yasunaga J and Matsuoka M. Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis. *Int. J. Hematol*, 94; 435-442, 2011.
 24. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. Ubiquitin-specific peptidase 20 (USP20) targets TRAF6 and HTLV-1 Tax to negatively regulate NF- κ B signaling. *J Virol*, 85; 6212-6219, 2011.
 25. Hagiya K, Yasunaga JI, Satou Y, Ohshima K, Matsuoka M. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology*; 8; 19, 2011.
2. 学会発表
1. 市川朝永、中畑新吾、近藤雄大、長井健太郎、迫田隅男、森下和広：癌抑制遺伝子 NDRG2 による炎症抑制作用。第 32 回日本炎症・再生医学会。京都市左京区。2011.6.3
 2. Morishita K : Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma Leukemia. The 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses. Belgium (Leuven) 2011. June.5-8
 3. 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：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。第 4 回 HT LV-1

- 研究会. 東京都文京区. 2011.9.19
4. 大隈和, 館山誠司, 森下和広, 広瀬国孝, 山本直樹, 山口一成, 浜口功: 腫瘍溶解性ウイルス VSV を用いた ATL にたいする TSLC1 分子標的療法の開発. 第 4 回 HTLV-1 研究会. 東京都文京区. 2011.9.19
 5. 市川朝永, 中畑新吾, 山口良二, 西片一朗, 森下和広: T 細胞特異的 TSLC1 Tg マウスは ATL 様病態を示す. 第 4 回 HTLV-1 研究会. 東京都文京区. 2011.9.19
 6. 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: 成人 T 細胞白血病におけるがん抑制遺伝子候補 NDRG2 の同定. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋市. 2011.10.3
 7. 市川朝永, 中畑新吾, 近藤雄大, 長井健太郎, 迫田隅男, 森下和広: 癌抑制遺伝子 NDRG2 の炎症反応制御機構. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋市. 2011.10.3
 8. Ichihara E, Kaneda K, Saito Y, and Morishita K.: Autocrine angiopoietin-1/Tie2 signaling promotes cell quiescence in EVI1^{high} leukemia cells. 第 73 回日本血液学会学術集会. 名古屋市熱田区. 2011.10.15
 9. 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: 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. 福岡市城南区. 2012.5.27
 10. 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. 福岡市博多区. 2012.7.6
 11. 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 東京医科学研究所 2012.8.25
 12. 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 5 回 HTLV-1 研究会 / シンポジウム: 一般演題口演 III ATL (2) (病態) 東京医科学研究所 2012.8.26
 13. 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: ポスターディスカッション 東京医科学研究所 2012.8.26
 14. 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. 宮崎市. 2012.9.14
 15. Iha H, Ikebe E, Tezuka K, Fujisawa J, Tanaka Y, Sueoka E, Morishita K., Horii M: Lectin array profiling on the glycans expressed in ATL cells. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Sapporo. 2012.9.19.
 16. 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. Sapporo. 2012.9.19.
 17. 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. Sapporo. 2012.9.19.
 18. 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. 京都市左京区. 2012.10.19. (
 19. 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. 第 74 回日本血液学会学術集会 The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 京都市左京区. 2012.10.19.
 20. 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. 福岡市博多区. 2012.12.14
 21. 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. 福岡市博多区. 2012.12.15.
 22. 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.
 23. 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
24. Nakahata S, Morishita K : 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. CANADA (Montreal). 2013.6.26-30
 25. 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 NFκB 活性抑制機構の解析. 第 34 回日本炎症・再生医学会. 京都. 2013.7.2
 26. 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
 27. 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、宇都宮興、下田和哉、渡邊俊樹、森下和広 : 血中可溶性 CADM1/TSLC1 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
 28. 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
 29. 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)
 30. 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
 31. 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
 32. 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
 33. 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.
 34. 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
 35. Sugata K, Satou Y, Yasunaga J, Nosaka K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor perturbs immune response to the pathogens in vivo by inhibiting IFN-gamma production: 15th INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. 4-8 June, 2011
 36. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. HTLV-1 Tax-induced NF-κB activation is negatively regulated by Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20): 15th INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. 4-8 June, 2011
 37. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20) suppresses NF-κB pathway by targeting TRAF6 and HTLV-1 Tax: 2011 ASBMB Special Symposia Series. Guangzhou Baiyun International Convention Center, China. July 24-26, 2011
 38. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. UBIQUITIN-SPECIFIC PEPTIDASE 20 TARGETS HTLV-1 TAX AND NEGATIVELY REGULATES NF-κB PATHWAY: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo Convention Center, Japan. September 11-16, 2011
 39. 安永純一朗 : Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20) suppresses NF-κB pathway by targeting TRAF6 and HTLV-1 Tax: 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 3-5 日
 40. Yasunaga J, Tiejun Zhao, Miyazato Paola, Satou Y, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor (HBZ) induces functionally impaired regulatory T-cells in vivo: 第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋、2011 年 10 月 14-16 日
 41. 安永純一朗、馬広勇、范瑤、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
42. 三浦未知、田邊順子、菅田謙治、趙鉄軍、安永純一朗、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
43. 安永純一朗、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
44. 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
45. 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
46. 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
47. 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
48. 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
49. 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, Geogia World Congress Center, Atlanta, U.S.A, December 7-11, 2012.
50. 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
51. Miura Michi, Junko Tanabe, Kenji Sugata, Tiejun Zhao, Guangyong Ma, Paola Miyazato, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: STLV-1 infected Japanese macaque as a model of HTLV-1 infection: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
52. Azusa Tanaka-Nakanishi, Jun-ichiro Yasunaga, Ken Takai, Masao Matsuoka: Molecular mechanisms of apoptosis suppression by HTLV-1 bZIP factor in HTLV-1 infected cells: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
53. Guangyong Ma, Jun-ichiro Yasunaga, Jun fan, Shin-ichi Yanagawa, Masao Matsuoka: HTLV-1 mediated dysregulation of the Wnt pathways: Roles of Tax and HBZ: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
54. Akihiro Kawatsuki, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: HTLV-1 bZIP factor suppresses c-Fos transcription and impairs T cell activation: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
55. 松岡雅雄、安永純一朗: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による発がん: Tax と HBZ の拮抗と協調: 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場 (兵庫県)、2013 年 11 月 10-12 日
56. 安永純一朗: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による病原性発現メカニズム: 第 4 回ナノバイオ創薬研究シンポジウム、京都大学杉浦ホール、2013 年 3 月 9 日
57. 安永純一朗: HTLV-1 がコードする二つのがん遺伝子 tax と HTLV-1 bZIP: 第 15 回白馬

シンポジウム in 名古屋、(独) 国立病院機構
名古屋医療センター (愛知)、2013 年 7 月
19-20 日

58. 田中梓、安永純一朗、高井健、松岡雅雄：
HTLV-1 bZIP factor(HBZ)は転写因子 FoxO3a
の機能を阻害することによりアポトーシス
を抑制する：第 6 回 HTLV-1 研究会・シン
ポジウム (東京医科学研究所講堂)、2013 年
8 月 25-26 日
59. 田中梓、安永純一朗、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP
factor suppresses intrinsic and extrinsic
apoptotic pathways by targeting FoxO3a:第 72
回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神
奈川)、2013 年 10 月 3-5 日
60. 三浦未知、趙鉄軍、馬広勇、安永純一朗、
松岡雅雄：Simian T-cell leukemia virus type
1-infected Japanese Macaques as a model for
HTLV-1 research: 第 72 回日本癌学会学術総
会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2013 年 10
月 3-5 日
61. Jun-Ichiro Yasunaga, Guangyong Ma, Jun Fan,
Shin-Ichi Yanagawa, Masao Matsuoka:
Perturbation of the Wnt pathway by HTLV-1 is
importanted in viral replication and cell
proliferation: 第 75 回日本血液学会学術集会、
ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教
育文化会館 (北海道)、2013 年 10 月 11-13
日
62. 菅田謙治、安永純一朗、三浦未知、明里宏
文、小柳義夫、小原道法、松岡雅雄：組換
えウイルスを用いた抗 HTLV-1 ワクチンの
作製と Macaque 属での応用：第 61 回日本ウ
イルス学会学術集会、神戸国際会議場 (兵
庫県)、2013 年 11 月 10-12 日
63. 園直希、馬広勇、萩屋啓太、安永純一朗、
松岡雅雄：FBXL11 は HTLV-1 bZIP factor と
Tax の機能を共に増強し ATL 細胞の増殖を
促進する：第 61 回日本ウイルス学会学術集
会、神戸国際会議場 (兵庫県)、2013 年 11
月 10-12 日
64. 紀ノ定明香、安永純一朗、伊豫田智典、稲
葉カヨ、松岡雅雄：HBZ による CD4 陽性 T
細胞増殖促進の免疫学的機序：第 61 回日本
ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場 (兵
庫県)、2013 年 11 月 10-12 日

65.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願番号：特願 2011-508324

名称：PTEN のリン酸化抑制剤又は脱りん酸
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

2. 実用新案登録

3. その他

1) 特願 2011-193331

TSLC1 抗体のイムノクロマトキット

森下和広、福田健太、小林行治、中武彩子、

谷口喬子

20110818

宮崎大学、

宮崎県産業支援財団、アドテック

2) PCT/JP2012/061676

抗 Tfr 抗体

森下和広、黒澤良和、張黎臨、黒澤仁、見供

克之、須藤幸夫、野村富美子、鶴飼由範

20120507

宮崎大学、ペルセウスプロテオミクス

3) PCT/JP2010/055378

PTEN→PI3K/AKT 情報伝達系を標的とした

癌治療

森下和広、中畑新吾、濱崎誠

20100326

宮崎大学、宮崎県産業支援財団

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）
（総合）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

研究代表者：森下 和広 宮崎大学医学部 教授

研究分担者：森下 和広 宮崎大学医学部 教授

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) 感染者の約 5% が長い潜伏期間を経て成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) を発症する。他のがん種と同様に、ATL 細胞でも細胞遺伝子の変異やエピゲノム異常の蓄積が認められ、このことは ATL の発症機序において、ウイルス感染に加えて宿主遺伝子異常の蓄積による多段階発がん機構が関与することを示唆している。我々はヒト ATL 検体を用い統合的ゲノム解析として、高密度 SNP アレイ解析、DNA マイクロアレイ遺伝子発現解析、RNA シークエンス、エクソームシークエンス、網羅的メチル化アレイ解析等を行い、複数の ATL 発症関連遺伝子群 (TCF8/ZEB1、NDRG2、BCL11B、EPC1/AXSL2、CADM1 等) を単離してきた。これらの遺伝子群の特徴は ATL の病態解明に繋がる重要なマイルストーンで有り、診断系や治療系への応用をすることで基礎から臨床研究の発展に寄与する。

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

1. SNP アレイ解析・網羅的遺伝子発現解析
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。

2. 網羅的メチル化アレイ解析

Human Methylation 450 beadschip (Illumina) を用い各種 ATL 検体 31 症例、健常人 DNA 5 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。

3. in vitro 機能解析

NDRG2 と PTEN は ATL 細胞を用いて質量分析計により網羅的な結合タンパク質の同定を行った。各免疫沈降バンド約 30 本を中心に同定を行い、serine/threonine kinase を中心に解析を進めた。CADM1 に関してはプロモーターアッセイを行い、ATL で特異的に活性化できる領域を同定、その活性化機構の解明を行った。BCL11B に関しては、ATL での特異的発現異常、転写調節、タンパク質局在等と共に、in vivo TG マウス作製による白血病発症機構の検討を行った。

(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) 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

1. 高密度 SNP アレイ解析・網羅的遺伝子発現解析

これまでに、染色体転座集中領域として 10p11、14q11、14q32 領域を同定しており、これらの領域を中心としてゲノム解析を進めた。10p11 領域より TCF8/ZEB1 をその原因電子候補として単離し (Blood 2008)、EPC1/AXSL2 融合遺伝子を単離し報告した (J of Virol 2009) 今回 NDRG2 を 14q11 領域より同定し癌抑制遺伝子候補として報告した (BBRC 2010、Nature Comm 2014)。さらに 14q32 領域より BCL11B を同定し、現在その機能解析を進めている。また網羅的遺伝子発現解析により同定した CADM1 について、その機能解析と共に、診断系としても有用であり、ATL 細胞、HTLV-1 感染細胞が末梢血中に 1% 以上の存在下で FACS 解析で同定できることを証明した。(Leukemia 2012)。

p21(CDKN1A)は、元来 HTLV-1 感染により高発現することが知られていたが、遺伝子発現解析から ATL 細胞では逆に低発現することを同定した。HTLV-1 感染による Tax は p21 を高発現させるが、ATL 細胞にいたり Tax 発現低下とプロモーターメチル化により p21 の低発現が出現することが分かった (J of Virol 2010)。また ATL における TGFbeta 不応性は TCF8 低発現に加えて SMAD7 高発現に依存していることも同定した (Oncogene 2010)

2. 網羅的メチル化アレイ解析

メチル化アレイにより網羅的にメチル化異常の検討を行い、遺伝子発現アレイとデータを組み合わせることで、ATL 細胞で有意に高メチル化され、遺伝子発現低下を示す遺伝子群として 33 遺伝子群を、また有意に低メチル化され高発現する遺伝子群を 32 遺伝子同定した。高メチル化低発現遺伝子群には、NDRG2、BCL2L11 等が含まれ、低メチル化高発現遺伝子群として、PTHLH 等が含まれていた。NDRG2 のメチル化を ATL 病型により検討したところ、くすぶり型においてもメチル化が認められたため、ATL 発症初期からのメチル化が示唆された。

3. in vitro 機能解析

NDRG2 の機能解析として、網羅的タンパク

質結合解析を行い、30 以上の結合タンパク質を同定した。その中に PTEN が含まれており NDRG2 は新規 PTEN 結合タンパク質であることが分かった。ATL では AKT 活性化が高頻度で起きているが、PTEN の発現は保たれゲノム変位も見つからず、C 端高リン酸化状態による不活化が示唆された。結果として NDRG2 は PTEN = PP2A をリクルートすることで PTEN 脱リン酸化状態を保持し活性調節を行っているが、NDRG2 低発現により ATL では PTEN リン酸化状態と成り AKT 活性化に繋がっていた (Nature omm2014)。この NDRG2 の低発現、高メチル化機構を検討したところ、HTLV-1 Tax により EZH2 の高発現を引き起こし、DMT3 との関連しメチル化されていることが分かってきた。またくすぶり型、慢性型、急性型と進行するにつれてメチル化状態が進行し、発現も低くなることが分かった (未発表) 一方 CADM1 高発現機構の解析をプロモーター解析により進め、NF-KB 情報伝達系の活性化が重要であることを突き止めた。さらに TAX がこの活性化に関わっており、HTLV-1 感染細胞特異的に高発現する理由が明らかとなってきた (未発表)。このように感染初期からの HTLV-1 の影響が遺伝子発現に重要な影響を与えており、異常の始まりが見えていて、それが最終的に進行し、白血病発症の基盤になっていることが示唆される。

4. In vivo 実験

ATL 発症機構を明らかにするために単離した遺伝子群の遺伝子改変マウスを作成しその性状を検討している。ZEB1/TCF8、NDRG2、CADM1、BCL11B とそれぞれに遺伝子改変マウスを作成しており、ZEB1 は 80% 以上に T リンパ腫を、NDRG2 は haploinsufficiency によりヘテロマウスにおいても多種類の固形がんを含み T リンパ腫 (CD4+) を発症した。CADMITG マウスにおいても皮膚炎症症状と T リンパ腫が出現し、検討を続けている。

D. 考察

本研究により ATL 発症機構の一部が解明された。これらの ATL 発症関連因子の多くは、その遺伝子発現異常は HTLV-1 感染、特に Tax に依存が明らかとなり、感染初期からの特にエピゲノム異常が重要であることが分かった。またゲノム異常の一部、EPC1 のゲノム異常に関しては、まさに HTLV1/HBZ と結合するヒストン修飾酵素であり、ATL 発症の糸口を示す機能として意義がある。

E. 結論

この3年間の研究で、ATL 発症に関連する遺伝子群として ZEB1/TCF8、SMAD7、CDKN1A、NDRG2、EPC1/AXSL2、CADM1/TSLC1、BCL11B を同定した。それぞれの異常は ATL 細胞の性状を説明できる重要な発症因子である。TGFbeta 情報伝達不能性に ZEB1 低発現、SMAD7 高発現が、PI3K/AKT 情報伝達系活性化に NDRG2 低発現が、エピゲノム異常に EPC1/AXSL2 が、細胞周期異常に CDKN1A が、臓器浸潤性や悪性度に関して CADM1 高発現が関わっていた。これらの遺伝子群の特徴を生かして、ATL の診断治療法の開発につなげる予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, Ueno S, Umekita K, Kamihira S, Morishita K, Okayama A.: Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. *Int J Cancer*. 128(6): 1335-1343, 2011 (2011 Mar 15)
2. Saito Y, Nakahata S, Yamakawa N, Kaneda K, Ichihara E, Suekane A, Morishita K.: CD52 as a molecular target for immunotherapy to treat acute myeloid leukemia with high EVI1 expression. *Leukemia* 25: 921-931, 2011.
3. Nishikata I, Nakahata S, Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, Yamakawa N, Morishita K.: Sumoylation of MEL18 at lysine 568 and its interaction with CtBP facilitates its repressor activity and the blockade of G-CSF-induced myeloid differentiation. *Oncogene* 30, 4194-4207, 2011.
4. Ichihara E, Kaneda K, Saito Y, Yamakawa N, Morishita K.: Angiopoietin1 contributes to the maintenance of cell quiescence in EVI1^{high} leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 416: 239-245, 2011.
5. Yamakawa N, Kaneda K, Saito Y, Ichihara E, Morishita K.: The increased expression of integrin $\alpha 6$ (ITGA6) enhances drug resistance in EVI1^{high} leukemia. *PLoS One*. 7(1): e30706, 2012.
6. 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.
7. 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.
8. Nakahata S, Morishita K.: CADM1/TSLC1 is a novel cell surface marker for adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Clin Exp Hematopathol*. 52: 17-22, 2012.
9. Ueno S, Umeki K, Takajo I, Nagatomo Y, Kusumoto N, Umekita K, Morishita K, Okayama A.: Proviral loads of human T-lymphotropic virus Type 1 in asymptomatic carriers with different infection routes. *Int J Cancer*. 130: 2318-2326 2012.
10. 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* 27: 1637-1649 2013.
11. 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*. 37:742-747. 2013
12. 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*. 33: 1893-1897 2013
13. 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*. 3: e132. 2013
14. 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*. 441:102-107 2013
15. Kai H, Akamatsu E, Torii E, Kodama H, Yukizaki C, Akagi I, Ino H, Sakakibara Y, Suiko M, Yamamoto I, Okayama A, Morishita K, Kataoka H, Matsuno K: Identification of a bioactive compound against adult T-cell leukemia from bitter melon seeds. *Plants*, 3(1),

- 18-26 2014
16. 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.* 5:3393 2014
 17. and HTLV-1 Tax to negatively regulate NF- κ B signaling. *J Virol*, 85; 6212-6219, 2011.
 18. Hagiya K, Yasunaga JI, Satou Y, Oshima K, Matsuoka M. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology*, 8; 19, 2011.
2. 学会発表
1. 市川朝永、中畑新吾、近藤雄大、長井健太郎、迫田隅男、森下和広：癌抑制遺伝子 NDRG2 による炎症抑制作用。第 32 回日本炎症・再生医学会。京都市左京区。2011.6.3
 2. Morishita K : Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma Leukemia. The 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses. Belgium (Leuven) 2011 June 5-8
 3. 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：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。第 4 回 HTLV-1 研究会。東京都文京区。2011.9.19
 4. 大隈和、館山誠司、森下和広、広瀬国孝、山本直樹、山口一成、浜口功：腫瘍溶解性ウイルス VSV を用いた ATL にたいする TSLC1 分子標的療法の開発。第 4 回 HTLV-1 研究会。東京都文京区。2011.9.19
 5. 市川朝永、中畑新吾、山口良二、西片一朗、森下和広：T 細胞特異的 TSLC1 Tg マウスは ATL 様病態を示す。第 4 回 HTLV-1 研究会。東京都文京区。2011.9.19
 6. 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：成人 T 細胞白血病におけるがん抑制遺伝子候補 NDRG2 の同定。第 70 回日本癌学会学術総会。名古屋市。2011.10.3
 7. 市川朝永、中畑新吾、近藤雄大、長井健太郎、迫田隅男、森下和広：癌抑制遺伝子 NDRG2 の炎症反応制御機構。第 70 回日本癌学会学術総会。名古屋市。2011.10.3
 8. Ichihara E, Kaneda K, Saito Y, and Morishita K : Autocrine angiopoietin-1/Tie2 signaling promotes cell quiescence in EVI1^{high} leukemia cells. 第 73 回日本血液学会学術集会。名古屋市熱田区。2011.10.15
 9. 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：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。福岡市城南区。2012.5.27
 10. 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。福岡市博多区。2012.7.6
 11. 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 東京医科学研究所 2012.8.25
 12. 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 5 回 HTLV-1 研究会／シンポジウム：一般演題口演 III ATL (2) (病態) 東京医科学研究所 2012.8.26
 13. 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：ポスターディスカッション 東京医科学研究所 2012.8.26
 14. 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。宮崎市。2012.9.14
 15. 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. 2012.9.19.
 16. 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. Sapporo. 2012.9.19. (ポスター発表)
 17. 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. Sapporo. 2012.9.19.
 18. 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. 京都市左京区. 2012.10.19.
19. 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. 第74回日本血液学会学術集会 The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 京都市左京区. 2012.10.19.
 20. 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. 福岡市博多区. 2012.12.14.
 21. 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. 福岡市博多区. 2012.12.15.
 22. 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.
 23. 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
 24. Nakahata S, Morishita K : 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. CANADA (Montreal). 2013.6.26-30
 25. 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 NFκB 活性抑制機構の解析. 第34回日本炎症・再生医学会. 京都. 2013.7.2
 26. 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
 27. 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, 宇都宮典, 下田和哉, 渡邊俊樹, 森下和広 : 血中可溶型 CADM1/TSLC1 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
 28. 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)
 29. 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
 30. 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
 31. 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
 32. 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 (
 33. 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.
 34. 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 出願番号 : 特願 2011-508324
 名称 : PTEN のリン酸化抑制剤又は脱りん酸化剤
 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

2. 実用新案登録

3. その他

1) 特願 2011-193331

TSLC1 抗体のイムノクロマトキット
森下和広、 福田健太、小林行治、中武彩子、
谷口喬子
20110818
宮崎大学、
宮崎県産業支援財団、アドテック

2) PCT/JP2012/061676

抗 Tfr 抗体
森下和広、黒澤良和、張黎臨、黒澤仁、見供
克之、須藤幸夫、野村富美子、鵜飼由範
20120507
宮崎大学、ペルセウスプロテオミクス

3) PCT/JP2010/055378

PTEN→PI3K/AKT 情報伝達系を標的とした
癌治療
森下和広、中畑新吾、濱崎誠
20100326
宮崎大学、宮崎県産業支援財団

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) 感染者の約 5% が長い潜伏期間を経て成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) を発症する。他のがん種と同様に、ATL 細胞でも細胞遺伝子の変異やエピゲノム異常の蓄積が認められ、このことは ATL の発症機序において、ウイルス感染に加えて宿主遺伝子異常の蓄積による多段階発がん機構が関与することを示唆している。HTLV-1 bZIP factor (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。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 の病原性に重要な役割を果たしていると考えられる。本課題では本 HBZ-Tg マウスモデルを用いて、HBZ がゲノム異常、エピゲノム異常を誘導する機序について検討し、HBZ による発がん機構における役割を解析した。

A. 研究目的

HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は全ての ATL 症例で発現し、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 の発がんにも必須であると考えられる。しかしながら、HBZ による発がん機序は明らかとなっていない。本研究では HBZ トランスジェニックマウスおよび包括的ゲノム・トランスクリプトーム解析手法を用いて、ATL 発がんの分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. HBZ 発現細胞における網羅的遺伝子発現解析

HBZ が惹起する遺伝子発現プロファイルの変化を、Affymetrix 社の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。

- ・HBZ-TG 由来 CD4+T リンパ球 vs 野生型マウス CD4+T リンパ球
 - ・HBZ-TG 由来制御性 T リンパ球 vs 野生型マウス制御性 T リンパ球
 - ・HBZ 安定発現 Jurkat 細胞 vs 対照 Jurkat 細胞
- データ解析には GeneSpringGX を用いた。

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 T リンパ腫細胞におけるエクソーム解析を試みた。

HBZ-Tg の T リンパ腫から樹立した細胞株 Ht48 を用いて、エクソーム解析を行った。エクソンキャプチャーには、Agilent 社の SureSelect XT Mouse All Exon キャプチャライブラリを使用し、ディープシーケンシスはイルミナ社 MiSeq を用いて実施した。データ解析に関しては、BWA でゲノムにマッピングし、PicardTools で重複リードを除去、Samtools mpileup で SNP コール、アノテーションは ANNOVAR を利用した。さらに、non-synonymous SNPs を抽出し、変異のインパクトを推定するために PROVEAN を使って予測した。

3. HBZ が惹起するエピゲノム異常の分子機構

HBZ が結合するヒストン修飾酵素に注目し、これらの結合が遺伝子発現に及ぼす変化について解析した。

(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: D11-19、D11-20、D12-15、D12-16、D13-01、D13-02)。

C. 研究結果

1. HBZ 発現細胞における網羅的遺伝子発現解析

1) Pro-apoptotic genes, *Bim* and *FasL*

HBZ-Tg 由来 CD4+ T 細胞および HBZ 発現 Jurkat 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。HBZ 発現 Jurkat は、phorbol myristate acetate (PMA) および ionomycin (Io) 刺激にて誘導される activation-induced cell death が対照 Jurkat に比較して抑制されており、アポトーシスに対して抵抗性であると考えられた。HBZ が *Bim* および *FasL* の発現を抑制する機序として、HBZ が転写因子 FoxO3a と結合し、その機能を阻害することを見出した。HBZ は FoxO3a の細胞内局在異常および DNA 結合能阻害により、*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、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 がヒストン修飾に影響を与えることが示唆された。

2) Activation-induced cytidine deaminase gene, *Aicda*

HBZ-Tg 由来の CD4+ T 細胞および制御性 T リンパ球ではシトシン脱アミノ化酵素 Activation-induced cytidine deaminase (AID) をコードする遺伝子 *Aicda* の発現が亢進していることが示唆された。複数の HBZ-Tg から CD4+ T-cell を分離し *Aicda* の発現を realtime PCR にて確認したところ、HBZ-Tg 群にて有意に *Aicda* の転写が亢進していた (WT vs HBZ-Tg, $p=0.0173$)。さらにルシフェレウスアッセイにて HBZ は TGF- β /Smad 経路を介して *Aicda* のプロモーターを活性化することが明らかとなった。

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

1) HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞株の樹立

HBZ-TG 由来の T リンパ腫細胞を免疫不全マウス (NOD-SCID/IL2Rgamma KO マウス: NSG マウス) に移植し、腫瘍の生着および継代を行った。継代が可能であった 1 種類の細胞株を樹立し、Ht48 と命名した。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。Ht48 は in vitro でも維持培養が可能であった。

2) HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞における遺伝子変異の網羅的探索

Ht48 から genomic DNA を抽出し、エクソーム

解析を行った。マウスゲノム配列 mm10 との比較の結果、Ht48 では 6361 種類の遺伝子変異が検出された。変異の内訳に関しては、G-to-A 変異 (1334 箇所)、C-to-T 変異 (1319 箇所) と他の変異に比較して頻度が高かった (G-to-T: 236 箇所、G-to-C: 223 箇所、C-to-G: 216 箇所、C-to-A: 233 箇所、T-to-C: 967 箇所、T-to-G: 229 箇所、T-to-A: 164 箇所、A-to-T: 197 箇所、A-to-C: 238 箇所、A-to-G: 1005 箇所)。

3. HBZ が惹起するエピゲノム異常の分子機構

HBZ によるエピゲノム異常と発がん機構に関して、HBZ がヒストン修飾関連分子 CBP/p300、EPC-1、TIP60、FBXL11 等と結合することを見出した。HBZ は EPC-1 と共に AP-1 転写因子の一つである *c-Fos* の転写を抑制した。

D. 考察

本研究により HBZ 自身がゲノム変異、エピゲノム異常を誘導する機能を有することが示唆された。ゲノム変異を惹起するメカニズムに HBZ による *Aicda* 発現誘導が関与している可能性がある。HBZ による *Aicda* の転写活性化は、Foxp3 の誘導機序と同様に、TGF- β /Smad 経路の活性化に関連していることが示唆された。AID は様々な悪性腫瘍にて発現上昇することが報告されており、G-to-A 変異、C-to-T 変異導入の原因となることが知られている。HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞株 Ht48 によるエクソーム解析にて、これらの変異が高頻度に生じていることから、HBZ による AID 活性化の発がんへの関与が疑われる。一方、HBZ は Pro-apoptotic gene である *Bim* と *FasL* の発現を抑制し、アポトーシスに阻害的に作用することが判明した。その発現制御の機序として HBZ が FoxO3a の機能を抑制することを見出したが、*Bim* プロモーターのヒストン脱アセチル化も関与していた。HBZ は様々なヒストン修飾関連蛋白と結合することから、エピゲノム異常を誘導する機能を有すると示唆される。今後、HBZ-Tg から得られたゲノム・エピゲノム情報と ATL 患者の情報を比較することにより、発がんにより重要なゲノム異常の特定が期待できる。

E. 結論

HBZ は TIP60、p300、EPC-1、FBXL11 など様々なヒストン修飾酵素と結合することが判明し、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関与することが示唆された。実際、HBZ は proapoptotic gene である *Bim* および *FasL* の発現

に重要な転写因子である FoxO3a の機能を阻害するのに加え、Bim プロモーターのエピゲノム異常を誘導し、Bim の発現抑制に関与していた。一方、HBZ はシトシン脱アミノ化酵素 Activation-induced cytidine deaminase (AID) をコードする遺伝子 *Aicda* の転写を誘導し、遺伝子変異の誘導に関与することが示唆された。これらの所見は HBZ 自体が細胞側のゲノム異常、エピゲノム異常を誘導する機能を有すること示唆している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J, Takai K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP Factor Suppresses Apoptosis by Attenuating the Function of FoxO3a and Altering Its Localization. **Cancer Res**, 74; 188-200, 2014.
2. Miura M, Yasunaga J, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, Akari H, Matsuoka M. Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. **Retrovirology**, 10; 118, 2013.
3. Matsuoka M and Yasunaga J. Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. **Curr Opin Virol**, 3; 684-691, 2013.
4. 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.
5. 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**, 32; 4222-4230, 2013.
6. Sugata K, Satou Y, Yasunaga J, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. **Blood**, 119; 434-444, 2012.
7. Yasunaga J and Matsuoka M. Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and

pathogenesis. **Int. J. Hematol**, 94; 435-442, 2011.

8. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. Ubiquitin-specific peptidase 20 (USP20) targets TRAF6 and HTLV-1 Tax to negatively regulate NF- κ B signaling. **J Virol**, 85; 6212-6219, 2011.
9. Hagiya K, Yasunaga J, Satou Y, Oshima K, Matsuoka M. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. **Retrovirology**, 8; 19, 2011.

2. 学会発表

1. Sugata K, Satou Y, Yasunaga J, Nosaka K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor perturbs immune response to the pathogens in vivo by inhibiting IFN-gamma production: 15th INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. 4-8 June, 2011
2. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. HTLV-1 Tax-induced NF-kB activation is negatively regulated by Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20): 15th INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. 4-8 June, 2011
3. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20) suppresses NF-kB pathway by targeting TRAF6 and HTLV-1 Tax: 2011 ASBMB Special Symposia Series. Guangzhou Baiyun International Convention Center, China. July 24-26, 2011
4. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. UBIQUITIN-SPECIFIC PEPTIDASE 20 TARGETS HTLV-1 TAX AND NEGATIVELY REGULATES NF-kB PATHWAY: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo Convention Center, Japan. September 11-16, 2011
5. 安永純一朗 : Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20) suppresses NF-kB pathway by targeting TRAF6 and HTLV-1 Tax: 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3-5日
6. Yasunaga J, Tiejun Zhao, Miyazato Paola,