

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25年度 総括研究報告書

研究代表者 森下 和広

平成26(2014)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	----- 7
2 . HTLV-1/HBZに関する研究 安永純一郎	----- 10
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 13
IV . 研究成果の刊行物・別刷	----- 15

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）  
総括研究報告書

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、約 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。HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる 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と考えられる。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 PTEN 結合タンパク質として PP2A をリクルートし 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。CADM1 高発現機構は NFkB 情報伝達に依存し、HTLV-1 TAX による活性化が見られた。H25 年度は、網羅的発現解析により、HBZ-Tg 由来 T 細胞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を見出した。HBZ は TGF-β/Smad 経路を介して *Aicda* のプロモーターを活性化した。また、HBZ-Tg に発生した T リンパ腫由来の細胞株 Ht48 のエクソーム解析では、G-to-A および C-to-T 変異が他の変異に比較し高頻度に認められ、AID 発現亢進の関与が疑われる。これらの所見は HBZ による AID の異常発現が宿主遺伝子の点変異を誘導し、発がんに関与することを示唆している。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。

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

1)網羅的メチル化解析

前年度に引き続き、Illuminaメチル化アレイ解析を詳細に検討し、ATL発症に関わる遺伝子群を単離する。またパイロット研究として、急性型ATL検体をHTLV-1+/1分画し、それぞれ2検体をエクソームシーケンス、RNAシーケンスを行い、点突然変異の探索並びにスプライス異常・融合遺伝子等の検討を行う。

2)白血病関連遺伝子群のin vitro、in vivo実験

これまで単離した遺伝子群の機能を明らかにするため複合的な実験を行う。NDRG2・PTENに関しては質量分析計による網羅的結合タンパク質群の単離を行い、PTENキナーゼの同定並びにPTENリン酸化機構の解明を進める。CADM1に関してはプロモーターアッセイを中心にATL細胞における遺伝子発現機構の解明を目指す。BCL11Bにおいては発現様式の検討と、TGマウスの作製、過剰発現細胞株の樹立と遺伝子発現解析等を進める。またNDRG2のATLにおける低発

現機構の解明と、HTLV-1感染防御機構としての働きの検討を行う。

## 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 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を樹立した。さらには、野生型 C57BL/6 への生着、in vitro での培養・維持を試みた。

### 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

HBZ-Tg の T リンパ腫から樹立した細胞株を用いて、エクソーム解析を行った。具体的には Agilent 社の SureSelect XT Mouse All Exon キャプチャライブラリを使用し、サンプル中のエクソンを濃縮、ライブラリを作成した。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 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、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

(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)及び京都大学遺伝子組み換え実験委員会(承認番号: 100182)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: 承認番号: 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となった。そのNDRG2低下の原因としてメチル化はHTLV-1Taxに依存しており、HTLV-1感染初期からのメチル化が示唆された。そこ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以外での原因遺伝子単離を行っている。CADM1プロモーターアッセイによりNF-kB活性化が発現調節に関わっており、しかもHTLV-1Taxによる直接間接的な役割が示唆された。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、

アセチル化に關する EPC-1、脱メチル化に關する 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

本年度の解析から HBZ は *Aicda* の転写を誘導することが明らかとなり、Foxp3 の誘導機序と同様に、TGF- $\beta$ /Smad 経路の活性化に關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が判明した。これらの所見は HBZ 自身が遺伝子変異を誘導する機能を有していることを示唆しており、多段階発がん機構の一つである可能性がある。今後、HBZ-Tg から得られたゲノム情報と 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-Tg 由来 T 細胞では *Aicda* の発現が亢進していた。HBZ は TGF- $\beta$ /Smad 経路を介して *Aicda* のプロモーターを活性化することが判明した。HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞株 Ht48 では、G-to-A および C-to-T 変異が他の変異に比較し高頻度に認められたことから、HBZ による *Aicda* 転写亢進が宿主遺伝子の点変異を誘導し、発がんに關する可能性が示唆された。

。

#### 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, Morishita K, Kataoka H, Matsuno K.: Identification of a bioactive compound against adult T-cell leukemia from bitter melon 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- $\kappa$ 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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;

## 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 11<sup>th</sup> 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.: 16<sup>th</sup> 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 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
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、西片一郎、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/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
6. 西片一郎、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: MEL/1PRDM16 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)
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
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)
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)
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 LSCs Cell by integrin alpha 6 in EVI1<sup>high</sup> 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、関本朝久、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 Wiliam 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)
  20. Miura Michi, Junko Tanabe, Kenji Sugata, Tiejun Zhao, Guangyong Ma, Paola Miyazato, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: HTLV-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.
  21. 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.
  22. Guanyong 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.
  23. 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.
  24. 松岡雅雄、安永純一郎：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
  25. 安永純一郎：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
  26. 安永純一郎：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
  27. 田中梓、安永純一郎、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
  28. 田中梓、安永純一郎、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
  29. 三浦未知、趙鉄軍、馬広勇、安永純一郎、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
  30. Jun-ichiro Yasunaga, Guangyong Ma, Jun Fan, Shin-ichi Yanagawa, Masao Matsuoka: Perturbation of the Wnt pathway by HTLV-1 is important 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
  31. 菅田謙治、安永純一郎、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
  32. 園直希、馬広勇、萩屋啓太、安永純一郎、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
  33. 紀ノ定明香、安永純一郎、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

## 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



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-κB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-κB 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 11<sup>th</sup> 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.: 16<sup>th</sup> 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 NFκB 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/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
- 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<sup>high</sup> 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

## 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) は感染後、約 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。HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる 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。

H25 年度は、網羅的発現解析により、HBZ-Tg 由来 T 細胞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を見出した。HBZ は TGF- $\beta$ /Smad 経路を介して *Aicda* のプロモーターを活性化した。また、HBZ-Tg に発生した T リンパ腫由来の細胞株 Ht48 のエクソーム解析では、G-to-A および C-to-T 変異が他の変異に比較し高頻度に認められ、AID 発現亢進の関与が疑われる。これらの所見は HBZ による AID の異常発現が宿主遺伝子の点変異を誘導し、発がんに関与することを示唆している。

**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 の発がんにも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

1) HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞株の樹立  
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を樹立した。さらには、野生型 C57BL/6 への生着、in vitro での培養・維持を試みた。

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

HBZ-Tg の T リンパ腫から樹立した細胞株を用いて、エクソーム解析を行った。具体的には

Agilent 社の SureSelect XT Mouse All Exon キャプチャライブラリを使用し、サンプル中のエクソソームを濃縮、ライブラリーを作成した。ディープシーケンシングはイルミナ社 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。

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、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

**(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:D13-01、D13-02)。

## 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

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 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のは 1 種類のみであり、本細胞株を 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)。

2. HBZ による発現プロファイル変化の解析

マイクロアレイの結果、HBZ-Tg 由来の CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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,  $p=0.0173$ )。さらにルシフェラスアッセイにて HBZ は TGF- $\beta$ /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。

## D. 考察

本年度の解析から HBZ は *Aicda* の転写を誘導することが明らかとなり、Foxp3 の誘導機序と同様に、TGF- $\beta$ /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が判明した。これらの所見は HBZ 自身が遺伝子変異を誘導する機能を有していることを示唆しており、多段階発がん機構の一つである可能性がある。今後、HBZ-Tg から得られたゲノム情報と 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-Tg 由来 T 細胞では *Aicda* の発現が亢進していた。HBZ は TGF- $\beta$ /Smad 経路を介して *Aicda* のプロモーターを活性化することが判明した。HBZ-Tg 由来 T リンパ腫細胞株 Ht48 では、G-to-A および C-to-T 変異が他の変異に比較し高頻度に認められたことから、HBZ による *Aicda* 転写亢進が宿主遺伝子の点変異を誘導し、発がんに関与する可能性が示唆された。

## 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.

### 2. 学会発表

1. 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.
2. 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.
3. Guanyong 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.
  4. 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.
  5. 松岡雅雄、安永純一郎：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
  6. 安永純一郎：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
  7. 安永純一郎：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
  8. 田中梓、安永純一郎、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
  9. 田中梓、安永純一郎、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(神奈川県) 2013 年 10 月 3-5 日
  10. 三浦未知、趙鉄軍、馬広勇、安永純一郎、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（神奈川県）2013 年 10 月 3-5 日
  11. Jun-ichiro Yasunaga, Guanyong Ma, Jun Fan, Shin-ichi Yanagawa, Masao Matsuoka: Perturbation of the Wnt pathway by HTLV-1 is important 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
  12. 菅田謙治、安永純一郎、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
  13. 園直希、馬広勇、萩屋啓太、安永純一郎、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
  14. 紀ノ定明香、安永純一郎、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

## 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

## 研究成果の刊行に関する一覧表

研究代表者 宮崎大学医学部 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
Matsuoka M, <b>Yasunaga J.</b>	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
Miura M, <b>Yasunaga J.</b> , 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
Tanaka-Nakanishi A, <b>Yasunaga J.</b> , 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
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, <b>Morishita K.</b>	Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers.	<i>Nature Comm.</i>	5	3393	2014
Kai H, Akamatsu E, Torii E, Kodama H, Yukizaki C, Akagi I, Ino H, Sakakibara Y, Suiko M, Yamamoto I, Okayama A, <b>Morishita K.</b> , Kataoka H, Matsuno K	Identification of a bioactive compound against adult T-cell leukemia from bitter gourd Seeds.	<i>Plants</i>	3	18-26	2014
Yamamura A, Miura K, Karasawa H, <b>Morishita K.</b> , 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.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	441	102-107	2013

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, <b><u>Morishita K.</u></b> 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.	<i>Blood Cancer J.</i>	3	e132	2013
Sugie S, Mukai S, Tsukino H, Toda Y, Yamauchi T, Nishikata I, Kuroda Y, <b><u>Morishita K.</u></b> Kamoto T.	Increased plasma caveolin-1 levels are associated with progression of prostate cancer among Japanese men.	<i>Anticancer Res.</i>	33	1893-1897	2013
Yamasaki M, Mine Y, Nishimura M, Fujita S, Sakakibara Y, Suiko M, <b><u>Morishita K.</u></b> Nishiyama K.	Genistein induces apoptotic cell death associated with inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in adult T-cell leukemia cells.	<i>Cell Biol Int.</i>	37	742-747	2013
Saito Y, Kaneda K, Suekane A, Ichihara E, Nakahata S, Yamakawa N, Nagai K, Mizuno N, Kogawa K, Miura I, Itoh H, <b><u>Morishita K.</u></b>	Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1-regulated GPR56.	<i>Leukemia</i>	27	1637-1649	2013