

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501273

研究課題名(和文)成熟T細胞腫瘍で強く発現するケモカイン受容体CCR7の発現制御機構の解明

研究課題名(英文)Transcriptional regulation of CCR7 expression in mature T-cell malignancies

研究代表者

義江 修(YOSHIE, Osamu)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：10166910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)でのCCR4発現に関わる転写因子としてAP-1ファミリーのFRA-2を同定し、FRA-2はJUNDと共同してATLの増殖を促進するとともにc-Myb、SOX4などの原癌遺伝子の発現を誘導することを明らかにした。本研究では、ATLおよび皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)でのCCR7発現に関与する転写因子を検討し、新規DNA結合配列GAGGAGを同定し、その部位にはZFVE19が結合することを明らかにした。本研究から、ATLやCTCLでの新たな発がん遺伝子カスケードの存在が示唆され、これらの成熟型T細胞性腫瘍の診断や治療に有用な情報が提供された。

研究成果の概要(英文)：Previously, we have examined the transcriptional regulation of CCR4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and demonstrated that an AP-1 family member FRA-2 is aberrantly expressed in ATL and in association with JUND promotes CCR4 expression and cell growth together with upregulation of various proto-oncogenes such as c-Myb and SOX4 in ATL. In the present study, we have extended our analysis to CCR7, which is highly expressed in ATL and cutaneous T cell lymphomas (CTCLs), and found a novel DNA-binding element GAGGAG in the CCR7 promoter and binding of ZFYVE19 to this element. Our study suggests an existence of another oncogenic cascade in ATL and CTCLs, providing useful information on the diagnosis and treatment of mature T cell malignancies.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学、腫瘍生物学

キーワード：CCR7 ケモカイン 転写因子 成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL) 皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)

## 1. 研究開始当初の背景

成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)はHTLV-1感染後、長い潜伏期を経て発症する予後不良の成熟T細胞腫瘍であり、HTLV-1キャリアーが多数存在する我が国では特に発生率が高い。ATLは皮膚、リンパ節、肝臓、脾臓、などの様々な臓器へ高頻度で浸潤する。T細胞の生理的なホーミングや組織浸潤にはケモカイン系が重要な役割を果たしており、成熟T細胞は機能的分化に伴って特定のケモカイン受容体を発現する(Yoshie et al, Adv. Immunol. 78:54, 2001)。我々の研究グループはこれまでにATLでのケモカイン受容体発現とその役割について研究を行い、多数の論文を発表してきた。すなわち、(1)ATL細胞でのCCR7高レベル発現はリンパ節浸潤と相関する(Hasegawa et al, Blood 95:30, 2000)、(2)ATLは高頻度でCCR4を発現し、それはATLの起源となるT細胞(Th2細胞、制御性T細胞、皮膚指向性メモリーT細胞、など)を示唆するとともに、高頻度皮膚浸潤も説明する(Yoshie et al, Blood 99:1505, 2002)、(3)ATLはCCR4とともにやはり皮膚ホーミングに関与するCCR10もしばしば発現し、CCR10の発現は皮膚浸潤と相関する(Harasawa et al, Leukemia & Lymphoma 47:2163, 2006)、(4)Tax陽性ATLはCCR9を発現し、CCR9はATLの腸管浸潤に関与する(Nagakubo et al, Int. J. Cancer 120:1591, 2007)、(5)ATLは同じくTax発現にともないCXCR7を発現し、CXCR7はATLの増殖と細胞死抑制を促進する(Jin et al, Int. J. Cancer 125:2229, 2009)などである。さらにATLでのCCR4発現の転写制御機構の解析から、(6)ATLではAP-1ファミリーのFRA-2が異常発現をしており、FRA-2はATLの増殖を促進し、下流標的遺伝子としてCCR4に加えて、c-Myb、MDM2、SOX4などの原がん遺伝子の発現を誘導することを明らかにした(Nakayama et al, Oncogene 27:3221, 2008)。すなわち、ATLでのCCR4発現には非生理的な転写因子が関わっており、CCR4はATLの腫瘍マーカーの一種と捉えることができる。さらに我々は、(7)ATLと同様に高頻度でCCR4を発現する皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)でもFRA-2が発がん遺伝子として機能していることを明らかにした(若手(B):課題番号21791103/代表者:中山 隆志)。

ATLやCTCLではCCR4とともに、CCR7もほとんど例外なく高レベルで発現している。CCR7は正常T細胞ではナイーブT細胞やセントラルメモリーT細胞などで発現している。しかしながら、CCR4を発現するエフェクター/メモリーT細胞では通常はCCR7の発現が低下していることから、ATLやCTCLにおけるCCR7の高レベル発現は、CCR4発現におけるFRA-2と同様に、腫瘍特異的な転写因子が発現に関与している可能性がある。そして、CCR7発現に関与する転写因子はATLおよびCTCLの発がん関連遺伝子の転写制御にも関

与することが推測される。

## 2. 研究の目的

本研究では、ATLやCTCLでのCCR7発現に関わる転写因子を同定し、そのATLやCTCL発癌における役割を解明することを目的とする。特に、同定された転写因子の下流標的遺伝子を明らかにすることにより、それらのATLおよびCTCLにおける役割を示すとともにこれらの腫瘍の治療戦略や診断に有用な因子を見出すことを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1)CCR7プロモーターの活性化エレメントの同定

ATLの臨床検体を用いてCCR7の転写開始点を5'RACE法で同定した。また、CCR7プロモーター領域の様々なレポーターコンストラクトを作製し、ATLおよびCTCL細胞株を用いてルシフェラーゼ解析を行い、転写活性化に必須のエレメントを同定した。

(2)CCR7プロモーターの活性化エレメントに結合する転写因子の探索

同定したCCR7プロモーターの活性化エレメントに作用する転写因子候補群の発現プラスミドを作製し、CCR7プロモーター活性に与える影響をルシフェラーゼ解析により検討した。また、ATLおよびCTCL細胞株の核抽出物を用いてDNA pull-down解析とMALDI-TOF質量分析システムにより、CCR7プロモーターの活性化エレメントへ結合する転写因子を同定した。

(3)同定された転写因子の発現解析

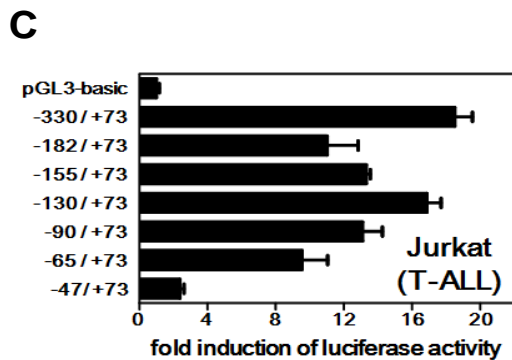
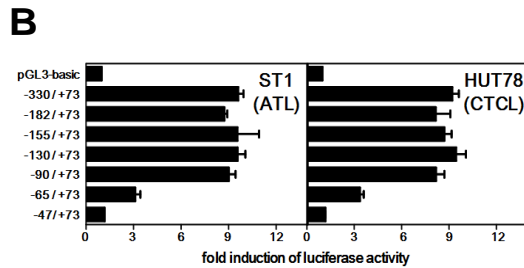
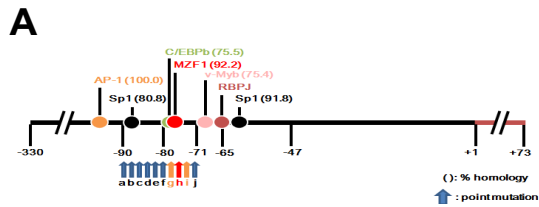
ATLやCTCL細胞株での同定された転写因子の発現をRT-PCRで検討した。

## 4. 研究成果

(1)CCR7プロモーターの活性化エレメントの同定

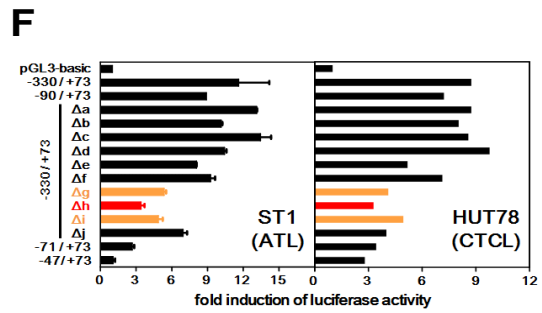
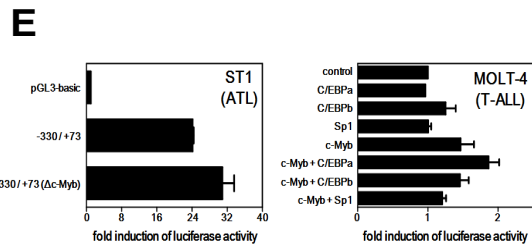
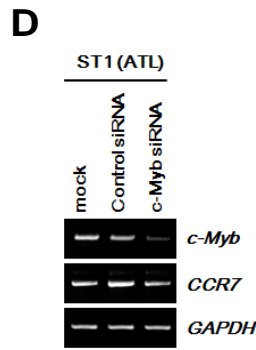
ATLの臨床検体を用いて5'RACE法によるCCR7の転写開始点を同定した結果、主なCCR7転写開始点は1カ所であった。また、TFSEARCH program (<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)による転写因子結合部位の予測検索を行った結果、その転写開始点の上流にはAP-1、Sp1、MZF1、c-Mybなどの転写因子結合部位が存在することが明らかとなった(A)。ATLおよびCTCL細胞株でのCCR7発現に必要な領域を同定するため、CCR7プロモーターの欠失コンストラクトを作製し、ルシフェラーゼ解析を行った。その結果、ATLおよびCTCL細胞株においてCCR7の発現には、CCR7プロモーターの-90~-65の領域が必須であることが明らかとなった(B)。また、ATLとは異なるT細胞急性リンパ性白血病(T-ALL)細胞株Jurkatではこの-90~-65の領域よりさらに下流までプロモーター活性

がみられることから (C)、同定した CCR7 プロモーターの活性化エレメントは ATL および CTCL において特異的であることも明らかとなった。



(2) CCR7 プロモーターの活性化エレメントに結合する転写因子の探索

これまでに我々は ATL 細胞株において c-Myb の発現抑制によって CCR7 の発現が低下することを確認していたことから (D)、c-Myb 結合予測部位の点変異コンストラクトを用いたレポーター解析と CCR7 非発現細胞株における c-Myb 再構築解析を行った。その結果、CCR7 プロモーターの -90 ~ -65 の領域において c-Myb は十分なプロモーター活性を示さなかった (E)。そこで ATL および CTCL 細胞株において c-Myb 結合予測部位上流 -90 ~ -71 の領域の点変異コンストラクト (A) を用いたレポーター解析を行った結果、新規 DNA 結合配列 GAGGAG が CCR7 プロモーター活性化に必須であることが明らかとなった (F)。この GAGGAG 配列に結合する転写因子を同定するために DNA pull-down 解析と MALDI-TOF による質量分析を行った結果、zinc-finger protein を含む数種類の転写因子が得られた (G)。



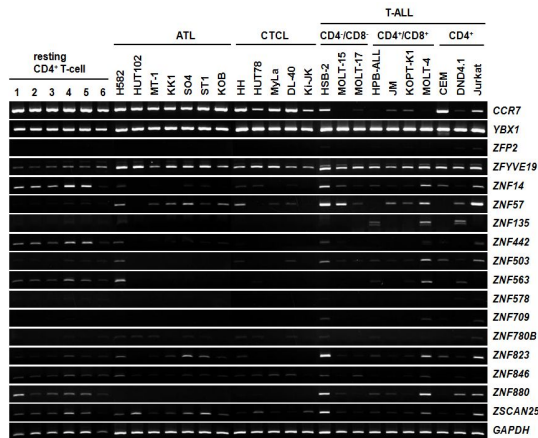
**G**

gene symbol	name
YBX1	Y box binding protein 1
ZFP2	zinc finger protein 2
ZFYVE19	zinc finger, FYVE domain containing 19
ZNF14	zinc finger protein 14
ZNF57	zinc finger protein 57
ZNF135	zinc finger protein 135
ZNF442	zinc finger protein 442
ZNF503	zinc finger protein 503
ZNF563	zinc finger protein 563
ZNF578	zinc finger protein 578
ZNF709	zinc finger protein 709
ZNF780B	zinc finger protein 780
ZNF823	zinc finger protein 823
ZNF846	zinc finger protein 846
ZNF880	zinc finger protein 880
ZSCAN25	zinc finger and SCAN domain containing 25

(3) 同定された転写因子の発現解析

GAGGAG 配列に作用する転写因子群の ATL および CTCL における発現解析を行った。その結果、ATL および CTCL 細胞株では共通して ZFYVE19 が発現することを明らかにした。しかしながら、CCR7 が発現していない T-ALL 細胞株でも ZFYVE19 の発現が確認されたことから、ZFYVE19 はさらに他の転写因子などと共同して ATL および CTCL での CCR7 発現を誘導することが示唆された (H)。

## H



### (まとめ)

現在までに T-ALL における CCR7 発現調節因子として Notch-1 が関与していることは報告されているが、ATL および CTCL における CCR7 発現制御機構はいまだ不明である。今回我々は、ATL および CTCL における CCR7 プロモーター活性化には新規 DNA 結合配列 GAGGAG が必須であり、その部位には ZFYVE19 が結合することを明らかにした。このことは T-ALL とは異なる CCR7 発現制御であることを示し、ATL および CTCL における特異的な発がん機構が存在することを示唆している。これまでに我々は、ATL や CTCL において CCR4 発現に関わる転写因子 FRA-2 の下流遺伝子として SOX4 を同定し、さらに SOX4 が抗腫瘍薬の標的として近年注目されている HDAC ファミリーのひとつ HDAC8 の発現を誘導することを明らかにした (Higuchi et al, Blood 2013)。本研究で見出した ZFYVE19 とそれと共同する未知の転写因子は、FRA-2/SOX4 と同様に ATL および CTCL における新たな発がん遺伝子カスケードを形成する可能性があり、本研究はこれらの成熟型 T 細胞性腫瘍の診断・治療に有用な情報を提供する契機になると考えられる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計 14 件)

Masahata K, Umemoto E, Kayama H, Kotani M, Nakamura S, Kurakawa T, Kikuta J, Gotoh K, Motooka D, Sato S, Higuchi T, Baba Y, Kurosaki T, Kinoshita M, Shimada Y, Kimura T, Okumura R, Takeda A, Tajima M, Yoshie O, Fukuzawa M, Kiyono H, Fagarasan S, Iida T, Ishii M, Takeda K. Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. Nat Commun. 査読有, 2014 Apr 10;5:3704 (Accepted 21 March 2014). doi: 10.1038/ncomms4704.

Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt

AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, Mantovani A, Matsushima K, Murphy PM, Nibbs R, Nomiya H, Power CA, Proudfoot AE, Rosenkilde MM, Rot A, Sozzani S, Thelen M, Yoshie O, Zlotnik A. International Union of Pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. Pharmacol Rev. 査読有, 2013 Nov 11;66(1):1-79. doi: 10.1124/pr.113.007724.

Zhao L1, Yasumoto K, Kawashima A, Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Matsumoto K, Yonekura K, Yoshie O, Yano S. Paracrine activation of MET promotes peritoneal carcinomatosis in scirrhous gastric cancer. Cancer Sci. 査読有, 2013 Dec;104(12):1640-6. doi: 10.1111/cas.12301.

Shibata K, Nomiya H, Yoshie O, Tanase S. Genome diversification mechanism of rodent and Lagomorpha chemokine genes. Biomed Res Int. 査読有, 2013;2013:856265. doi: 10.1155/2013/856265.

Higuchi T, Nakayama T, Arai T, Nishio K, Yoshie O. SOX4 is a direct target gene of FRA-2 and induces expression of HDAC8 in adult T-cell leukemia/lymphoma. Blood. 査読有, 2013 May 2;121(18):3640-9. doi: 10.1182/blood-2012-07-441022.

Moriguchi K1, Miyamoto K, Tanaka N, Yoshie O, Kusunoki S. The importance of CCR4 and CCR6 in experimental autoimmune encephalomyelitis. Neuroimmunol. 査読有, 2013 Apr 15;257(1-2):53-8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.02.002.

Kee JY, Ito A, Hojo S, Hashimoto I, Igarashi Y, Tsukada K, Irimura T, Shibahara N, Nakayama T, Yoshie O, Sakurai H, Saiki I, Koizumi K. Chemokine CXCL16 suppresses liver metastasis of colorectal cancer via augmentation of tumor-infiltrating natural killer T cells in a murine model. Oncol Rep. 査読有, 2013 Mar;29(3):975-82. doi: 10.3892/or.2012.2185.

Nomiya H1, Osada N, Yoshie O.

Systematic classification of vertebrate chemokines based on conserved synteny and evolutionary history. *Genes Cells*. 査読有, 2013 Jan;18(1):1-16. doi: 10.1111/gtc.12013.

Zlotnik A1, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. 査読有, 2012 May 25;36(5):705-16. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.008.

Nakayama T, Higuchi T, Oiso N, Kawada A, Yoshie O. Expression and function of FRA2/JUND in cutaneous T-cell lymphomas. *Anticancer Res*. 査読有, 2012 Apr;32(4):1367-73.

Kaminuma O, Ohtomo T, Mori A, Nagakubo D, Hieshima K, Ohmachi Y, Noda Y, Katayama K, Suzuki K, Motoi Y, Kitamura N, Saeki M, Nishimura T, Yoshie O, Hiroi T. Selective down-regulation of Th2 cell-mediated airway inflammation in mice by pharmacological intervention of CCR4. *Clin Exp Allergy*. 査読有, 2012 Feb;42(2):315-25. doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03847.x.

Ohtani H, Nakayama T, Yoshie O. In situ expression of the CCL20-CCR6 axis in lymphocyte-rich gastric cancer and its potential role in the formation of lymphoid stroma. *Pathol Int*. 査読有, 2011 Nov;61(11):645-51. doi: 10.1111/j.1440-1827.2011.02717.x.

Nomiyama H, Osada N, Yoshie O. A family tree of vertebrate chemokine receptors for a unified nomenclature. *Dev Comp Immunol*. 査読有, 2011 Jul;35(7):705-15. doi: 10.1016/j.dci.2011.01.019.

Hieshima K, Nagakubo D, Shigeta A, Tanaka Y, Hoshino H, Tsukasaki K, Yamada Y, Yoshie O. c-Maf suppresses human T-cell leukemia virus type 1 Tax by competing for CREB-binding protein. *Cancer Sci*. 査読有, 2011 Apr;102(4):890-4. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01873.x.

[学会発表](計 5 件)

Park AM, Yoshie O, Watanabe A, Higuchi T, Honda E, Munakata H. Attenuation of bleomycin-induced mice pulmonary fibrosis by in vivo treatment of HSP27 siRNA. SFRR12014, 2014 年 3 月 23-26

日 京都国際会議場(京都府京都市)

Higuchi T, Nakayama T, Yoshie O. Fra-2-SOX4 oncogenic cascade plays a critical role in cell growth of adult T-cell leukemia/lymphoma. 第 72 回日本癌学会学術集会, 2013 年 10 月 3-5 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Higuchi T, Hieshima K, Nakayama T, Yoshie O. Induction of FosB by Tax induces CCL22 in HTLV-1-infected T cells, leading to HTLV-1. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日 ロイトン札幌(北海道札幌市)

Higuchi T, Nakayama T, Shigeta A, Yoshie O. Fra-2-SOX4 oncogenic cascade plays a critical role in cell growth of CCR4+ mature T-cell malignancies. JSICR-MMCB2011, 2011 年 5 月 25 日 ANA ゲートタワーホテル大阪(大阪府泉佐野市)

Nakayama T, Higuchi T, Shigeta A, Yoshie O. CCL26/eotaxin-3 attracts killer lymphocytes by interacting with CX3CR1. JSICR-MMCB2011, 2011 年 5 月 25 日 ANA ゲートタワーホテル大阪(大阪府泉佐野市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

義江 修 (YOSHIE, Osamu)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号: 10166910

(2) 研究分担者

中山 隆志 (NAKAYAMA, Takashi)  
近畿大学・薬学部・教授  
研究者番号: 60319663

樋口 智紀 (HIGUCHI, Tomonori)  
近畿大学・医学部・助教  
研究者番号: 00448771