

平成 23 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791103

研究課題名 (和文) 皮膚 T 細胞リンパ腫での Fra-2 と c-Myb の発癌における役割の解明

研究課題名 (英文) The role of Fra-2 and c-Myb in the oncogenesis of cutaneous T-cell lymphomas

研究代表者

中山 隆志 (NAKAYAMA TAKASHI)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60319663

研究成果の概要 (和文)：本研究において研究代表者は、Fra-2 と c-Myb が皮膚 T 細胞リンパ腫に普遍的に発現し、細胞増殖に関与することを見出した。また、c-Myb は Fra-2 の直接的な標的遺伝子であることが示された。さらに細胞増殖に関わる c-Myb の下流標的遺伝子として Ras 活性化因子である RASGRP2 を同定した。Fra-2-c-Myb 経路は発癌遺伝子カスケードとして機能し、細胞増殖に寄与することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we showed that Fra-2 and c-Myb were consistently co-expressed in cutaneous T-cell lymphomas (CTCLs), and contributed to cell proliferation. Furthermore, we showed that c-Myb was a direct target gene of Fra-2 in CTCLs. In addition, we identified that RASGRP2 was a c-Myb target gene and contributed to cell proliferation in CTCLs. Taken together, our findings support the notion that the Fra-2-c-Myb oncogenic pathway plays a major role in the oncogenesis of CTCLs.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：癌、皮膚 T 細胞リンパ腫、Fra-2、AP-1、c-Myb

## 1. 研究開始当初の背景

ケモカインは免疫担当細胞の細胞遊走を誘導するサイトカインの一群であり、炎症反応や免疫応答において重要な役割を担っている。申請者らは、Th2細胞、制御性T細胞、皮膚指向性T細胞に選択的に発現するケモカイン受容体CCR4が、成人T細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) で高頻度かつ高レベルで発現することを明らかにし、ATLLの起源となるT細胞サブセットや皮膚浸潤機構を示

胞、皮膚指向性T細胞に選択的に発現するケモカイン受容体CCR4が、成人T細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) で高頻度かつ高レベルで発現することを明らかにし、ATLLの起源となるT細胞サブセットや皮膚浸潤機構を示

してきた (Yoshie et al., Blood, 2002, Nagakubo et al., Int J Cancer, 2007, Hieshima et al., J Immunol, 2008)。最近、申請者は、CCR4のプロモーター解析から、AP-1ファミリーメンバーの一つFra-2がATLL細胞で構成的に発現しており、CCR4発現を誘導することを明らかにした。さらに、Fra-2はATLLの細胞増殖にも関与すること、またsiRNAによりFra-2発現を抑制したATLL細胞株のマイクロアレイ解析により、Fra-2の下流標的遺伝子として原癌遺伝子であるc-Myb、MDM2とBcl-6を同定した (Nakayama et al., Oncogene, 2008)。この仕事はこれまで知られていなかったATLLでのFra-2の異所性発現と初めてFra-2のヒト腫瘍での発癌作用を示したものであり、我々のオリジナリティーと貢献度は国際的にも極めて高い。

皮膚T細胞リンパ腫 (CTCL) は、皮膚指向性の成熟T細胞由来の腫瘍グループであり、ATLLとはHTLV-1非感染であることを除けばCCR4高発現も含めて類似するところが多い。さらに、CTCLではAP-1が恒常的に活性化されていること (Mao et al., Br J Dermatol, 2007)、また、c-Mybが高発現することが報告されている (Qin et al., Blood, 2001)。c-Mybは、未分化段階のリンパ球腫瘍、大腸癌および乳癌などの発癌において重要な役割を果たすことが多数報告されているが、CTCLにおけるその役割についてはまだ十分解明されていない。さらに、CTCLにおけるFra-2の発現やその発癌における役割も報告されていない。

申請者は、CTCLがATLLと同様にCCR4を高頻度で発現することから、ATLLでのCCR4の発現に関わるFra-2はCTCLでも発現しているのではないかと考えた。そこで予備実験としてCTCL細胞株でのFra-2の発現を検討した。その結果、CTCL細胞株は共通してFra-2を強く発現していた。さらに、siRNAによりFra-2の発現を抑制すると細胞増殖も抑制されること、また同時にCCR4やc-Mybの発現も抑制されることを確認した。さらにsiRNAによるc-Mybの発現抑制でも細胞増殖を抑制することを確認した。これは、CTCLでc-Mybが実際に細胞増殖に関わっていることを示した初めての実験である。これらの予備実験の結果は、ATLLと同様にCTCLでもFra-2が強く発現し、それによってc-Mybの発現が誘導され、そしてCTCLの発癌過程にはこれらの原癌遺伝子が密接に関与することを強く示唆するものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、CTCLでのFra-2の発現解析、Fra-2によるc-Myb発現誘導機構の解析、およびc-Mybの細胞増殖に関わる分子機構の解析を行う。それによって、Fra-2とc-MybのCTCL発癌における役割を解明することが本研究の目的である。そのために、先ず広くCTCLの臨床検体を用いてFra-2とc-Mybの発現を解析する。さらに、CTCL細胞株を用いて、Fra-2によるc-Myb発現誘導の分子機構をプロモーター解析により明らかにする。次に、Fra-2とc-MybのsiRNAを用いた発現抑制系を用いて、これらの原癌遺伝子のT細胞増殖に対する影響を検討する。さらに、siRNAによりc-Myb発現を抑制したCTCL細胞株のマイクロアレイ解析を行い、CTCLにおけるc-Mybの下流標的遺伝子を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) CTCL患者皮膚組織標本におけるFra-2とc-Mybの発現と相関の解析

CTCL患者皮膚組織標本についてFra-2とc-Mybの免疫染色を行う。また切片からRNAを調整し、Fra-2 mRNAとc-Myb mRNAの発現をreal-time PCR解析により調べる。

### (2) CTCL細胞株を用いたc-Mybの発現制御解析

c-Myb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用いて転写エレメントを同定する。Fra-2発現プラスミドを用いて、c-Mybプロモーター活性に与える影響を検討する。さらに、CTCL細胞株の核抽出物を用いたChIP解析により、c-Mybプロモーターの発現エレメントへのFra-2の結合を解析する。

### (3) Fra-2とc-Mybの細胞増殖に与える影響の検討

Fra-2とc-Myb siRNAを用いた発現抑制系を用いて細胞増殖に与える影響について検討を行う。

### (4) マイクロアレイを用いたCTCL細胞株におけるc-Myb標的遺伝子の同定

コントロールsiRNAとc-Myb siRNAを処理したCTCL細胞株のRNAを経時的に調整し、マイクロアレイ解析を行う。比較解析によりc-Mybの発現減少と一致して発現が変化する遺伝子をc-Myb標的遺伝子の候補として同定する。c-Myb標的遺伝子の候補として同定された遺伝子について、複数のCTCL細胞株を用いてc-Myb siRNAによる発現抑制をreal-time PCRにより確認する。

### (5) CTCLにおけるc-Myb標的遺伝子の発現解析および細胞増殖に与える影響の検討

CTCL 細胞株から RNA を調整し、c-Myb 標的遺伝子の mRNA 発現を PCR 解析により調べる。また、siRNA を用いた発現抑制系を用いて c-Myb 標的遺伝子の CTCL 細胞株の細胞増殖に与える影響について検討を行う。

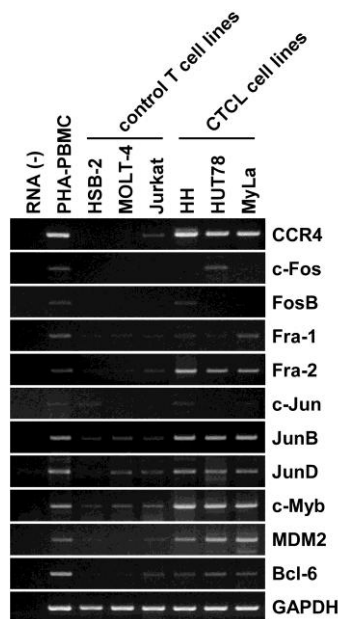
#### 4. 研究成果

研究代表者はこれまでに、AP-1ファミリーのFra-2が成人T細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) に構成的に発現し、ケモカイン受容体CCR4発現を誘導することを明らかにした。さらに、Fra-2は原癌遺伝子であるc-Myb、MDM2とBcl-6の発現誘導を介してATLLの細胞増殖にも関与することを報告した。皮膚T細胞リンパ腫 (CTCL) は、皮膚指向性の成熟T細胞由来の腫瘍グループであり、ATLLとはHTLV-1非感染であることを除けばCCR4およびc-Mybの高発現も含めて類似するところが多い。そこで、今回、研究代表者はCTCLの発癌機構におけるFra-2-c-Myb経路の役割を検討した。

(1) Fra-2 と c-Myb の CTCL 細胞株における恒常的発現

##### ① CTCL 細胞株の RT-PCR 解析

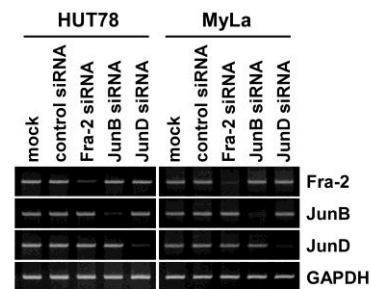
CTCL 細胞株では、CCR4に加え、Fra-2の発現が強く増強されていた。また、JunBとJunDは正常T細胞でも発現が認められるが、CTCL細胞株でも恒常的に発現していた。さらにATLL細胞でFra-2の下流標的遺伝子として同定された原癌遺伝子c-Myb、MDM2とBcl-6の恒常的な発現も認められた。



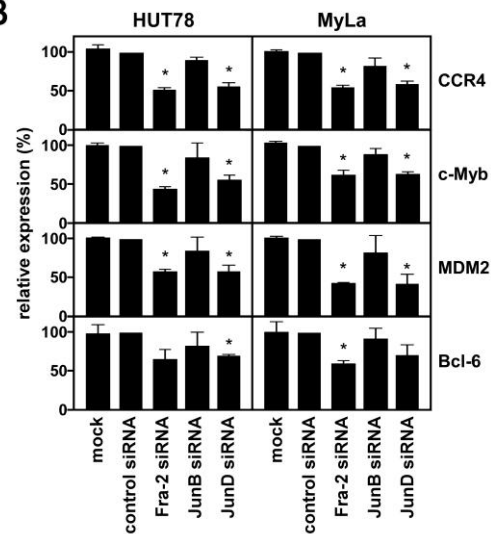
② CCR4、c-Myb、MDM2とBcl-6発現におけるFra-2、JunBとJunD siRNAの効果

Fra-2、JunBとJunDのCCR4およびこれらの原癌遺伝子発現における役割を検討するために、Fra-2、JunBとJunD siRNAを用いた発現抑制実験を行った。(A)で示すように、Fra-2、JunBとJunD siRNAがHUT78とMyLaにおいてそれぞれに対応するmRNA発現を特異的に抑制することが確認された。これらの条件下において、CCR4、c-Myb、MDM2とBcl-6の発現レベルをreal-time PCRにより解析した。Fra-2とJunD siRNAは、これらの遺伝子すべての発現を有意に抑制したが、JunB siRNAではそのような効果は認められなかった (B)。

##### A

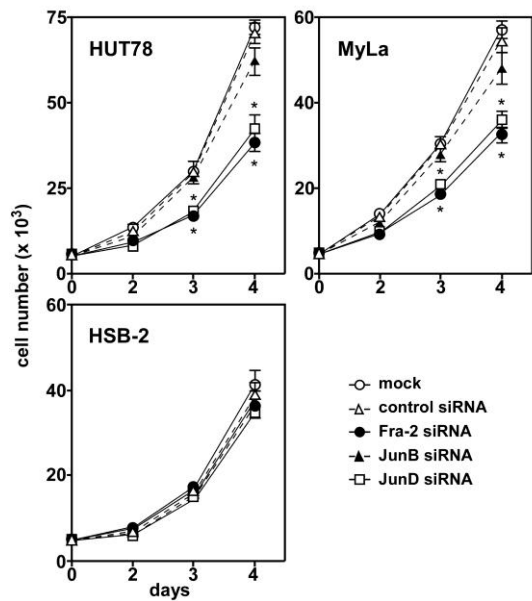


##### B



(2) Fra-2とJunDはCTCL細胞株の細胞増殖を促進する

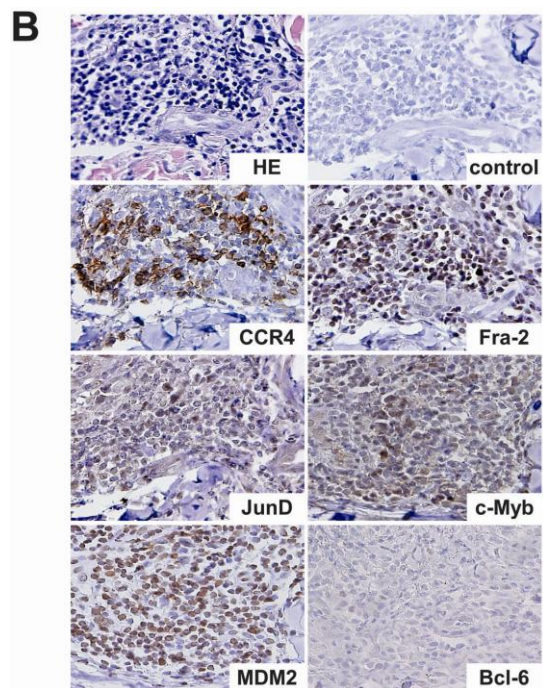
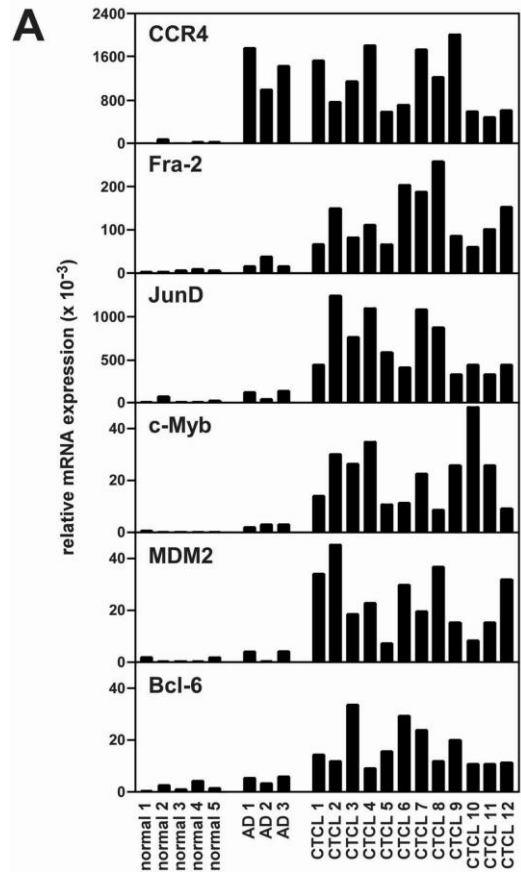
CTCL細胞株の細胞増殖におけるFra-2、JunBとJunDの役割を検討するために、siRNAの発現抑制系を用いて解析を行った。Fra-2とJunD siRNAは、CTCL細胞株の細胞増殖を有意に抑制したが、JunB siRNAではそのような効果は認められなかった。これらの結果はATLLと同様にCTCLでもFra-2が発癌メカニズムに関与することを強く示唆する。



(3) Fra-2 と c-Myb は CTCL 患者皮膚組織において共発現する

CTCL 患者の皮膚組織における CCR4、Fra-2、JunD、c-Myb、MDM2 と Bcl-6 の発現を検討するため、先ず最初に CTCL 患者皮膚組織 (n=12)、コントロールとして健常人 (n=5) およびアトピー性皮膚炎患者 (n=3) の皮膚組織を用いて real-time PCR 解析を行った。実際に CTCL 患者皮膚組織は、CCR4、Fra-2、JunD、c-Myb、MDM2 と Bcl-6 mRNA を高レベルで発現していた。一方、健常人の皮膚組織ではこれらの発現は殆ど認められなかった。アトピー性皮膚炎の皮膚組織では CCR4 陽性 Th2 細胞の浸潤が知られており、CCR4 の高レベル発現は確認されたが、他の遺伝子の発現は非常に低レベルであった (A)。

次に免疫組織染色により CTCL 患者 (n=7) の皮膚組織における CCR4、Fra-2、JunD、c-Myb、MDM2 と Bcl-6 のタンパクレベルでの発現を検討した。その結果、CTCL 患者皮膚組織の腫瘍細胞において、CCR4、Fra-2、JunD、c-Myb と MDM2 の強いシグナルが検出された (B)。しかしながら、Bcl-6 のシグナルは非常に弱いか、または検出されなかったため、CTCL における Bcl-6 のタンパク発現は非常に弱いかもしれない。



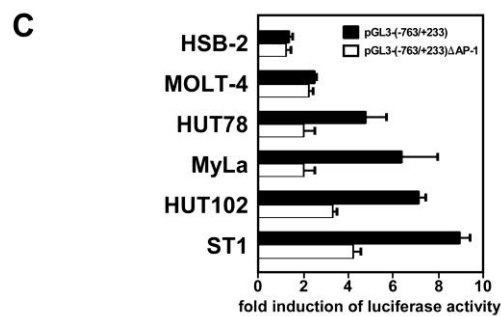
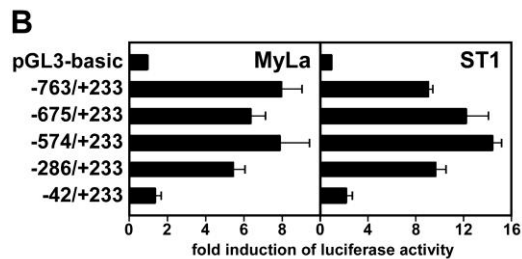
(4) CTCL および ATLL 細胞において c-Myb は Fra-2 の直接的な標的遺伝子である

これまでの結果より、ATLL と同様に CTCL でも Fra-2 が発癌過程の主要因子であることが強く示唆され、さらに c-Myb が Fra-2 の下流標的遺伝子であることが示された。そこで次に c-Myb プロモーターを用いて、CTCL および ATLL 細胞株での Fra-2 による c-Myb 発現誘導機構を解析した。TFSEARCH program (<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) を用い、c-Myb プロモーター (-763~+233) に存在する転写因子結合部位の予測検索を行った。その結果を (A) に示す。



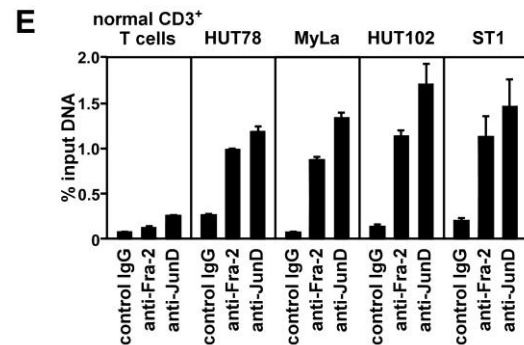
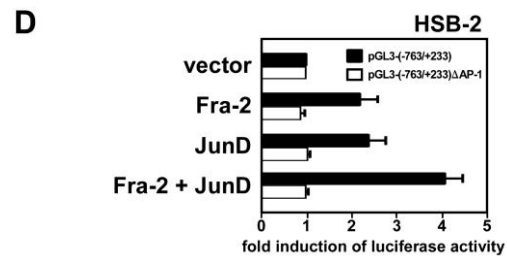
CTCL および ATLL 細胞株での c-Myb 発現に必要な領域を同定するため、c-Myb プロモーターの欠失コンストラクトを作製し、ルシフェレゼレポーター解析を行った。その結果、両方の細胞株において c-Myb の発現には、プロモーターの -286~-42 の領域が必須であることが明らかとなった (B)。

c-Myb プロモーターの -286~-42 の領域には AP-1 の予想結合部位が存在し、AP-1 結合部位に点変異を導入したレポーターコンストラクトを用いた解析から、c-Myb 発現における AP-1 結合部位の重要性が確認された (C)。



次に HSB-2 細胞を用いた再構築系により、Fra-2 の c-Myb プロモーター活性化に与える影響を検討した。c-Myb プロモーターは、Fra-2 発現により活性化され、JunD とのヘテロダイマーよりさらに強く活性化されることが示された。

さらにクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析により、Fra-2 と JunD が in vivo においてもこの AP-1 結合部位に特異的に結合することが確認され、c-Myb が Fra-2 の直接の標的遺伝子の一つであることが証明された。



(5) c-Myb は CTCL および ATLL 細胞株の細胞増殖を促進する

c-Myb は、未分化段階のリンパ球腫瘍、大腸癌および乳癌などの発癌に重要な役割を果たすことが報告されているが、CTCL や ATLL における役割についてはまだ知られていない。そこで CTCL と ATLL 細胞株で c-Myb 発現を siRNA により抑制し、細胞増殖への影響を検討した。(A) に示すように、c-Myb siRNA は両方の細胞株における c-Myb 発現を特異的に抑制することが確認された。

さらにこのような条件下において、CTCL および ATLL 細胞株の細胞増殖も有意に抑制された (B)。一方で、コントロールの T-ALL 細胞株 (HSB-2) では有意な効果は認められなかった。これらの結果は、CTCL および ATLL における Fra-2 の細胞増殖促進効果の一部は c-Myb の発現誘導によるとことを示唆した。

(6) c-Myb 下流標的遺伝子 RASGRP2 は CTCL および ATLL 細胞の細胞増殖に関与する

c-Myb の腫瘍形成に関わる標的遺伝子として c-Myc と Bcl-2 が知られているが、CTCL や ATLL ではこれらの恒常的な発現や、また、c-Myb との発現相関も認められなかったため (C)、これらの細胞にはより主要な c-Myb 標的遺伝子が存在すると推察された。

そこで、siRNA により c-Myb 発現を抑制した ATLL 細胞株のマイクロアレイ解析により、c-Myb の下流標的遺伝子の探索を行った。その結果、細胞増殖に関わる標的候補遺伝子のひとつとして Ras の活性化因子である RASGRP2 が同定された (A、B)。RASGRP2 は、CTCL および ATLL 細胞株において Fra-2 や c-Myb と共に恒常的に発現していた (C)。さらに、RASGRP2 は、N-Ras と K-Ras を活性化することが報告されているが、CTCL および ATLL 細胞株では、N-Ras のみが恒常的に発現していることが明らかとなった。このことから、RASGRP2 は、N-Ras を活性化することにより、Raf/MEK/ERK カスケードを活性化し、最終的には Fra-2 の活性化に寄与する可能性が考えられた。

(まとめ)

本研究において研究代表者は、ATLL と同様に Fra-2 が CTCL に恒常的に発現し、JunD とヘテロダイマーを形成することにより、CTCL の発癌過程に関わることを明らかにした。また、c-Myb が Fra-2 の直接的な標的遺伝子であることを明らかにした。c-Myb は、新規下流標的遺伝子である RASGRP2 の発現誘導を介して細胞増殖に関わることが示唆された。これらの結果から、CTCL および ATLL において Fra-2 とその標的遺伝子 c-Myb は発癌遺伝子カスケードとして普遍的な役割を果たすことが示唆された。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

### ① 中山隆志

CCR4 発現 T 細胞リンパ腫における新規発癌遺伝子 Fra-2

第 75 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 (シンポジウム)

2010 年 6 月 25 日

北九州市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 隆志 (NAKAYAMA TAKASHI)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60319663

