

論文内容の要旨

論文題目

ATL 細胞における EVC1 過剰発現の存在と意義

氏名 高橋隆太郎

<背景>

Adult T-cell leukemia (ATL)はHuman T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)感染によって引き起こされる予後不良疾患である。ATLの発症には少なくとも五つの遺伝子異常の蓄積が必要であるとする多段階発ガンモデルが提唱されているが、HTLV-1感染初期のHTLV-1 Taxによる様々なシグナル伝達経路の脱制御を除いては、未だ明らかになっていない。ATL 特効薬の開発のためにもATL 腫瘍化機構の解明が待たれている。

これまでに、当研究室ではATL 細胞の遺伝子発現プロファイル（マイクロアレイ）解析を行い、ATLの発症および病態に強く関与すると考えられるATL 細胞に特異的に過剰発現する遺伝子群を同定してきた。その中で、健常人T細胞と比較して最も大きな発現量の変化が見られた遺伝子の一つにEllis van Creveld syndrome 1 (EVC1)がある。

EVC1はHedgehog (HH)経路の一端を担い、形態形成や骨の再構成に関与する遺伝子であることが明らかにされている。しかしながら、EVC1の具体的な働きについては未だ不明な点が多く、ATL細胞における発現や機能についてもこれまでの報告は無い。一方、EVC1が関与するとされるHedgehog経路については、近年、Basal cell carcinoma、慢性リンパ性白血病および肺や前立腺などの様々ながん細胞において、経路の異常な活性化が細胞の生存や増殖に寄与しているとの報告がなされている。しかしながら、EVC1と同様に、HH経路に関してもATL細胞における報告はこれまでになされていない。本研究ではATL細胞におけるEVC1の過剰発現およびその発現パターンを明らかにするとともに、過剰発現したEVC1が細胞に与える影響について究明し、ATLの病態に関するEVC1およびHedgehog経路の新たな知見を獲得することを目的とした。

<結果>

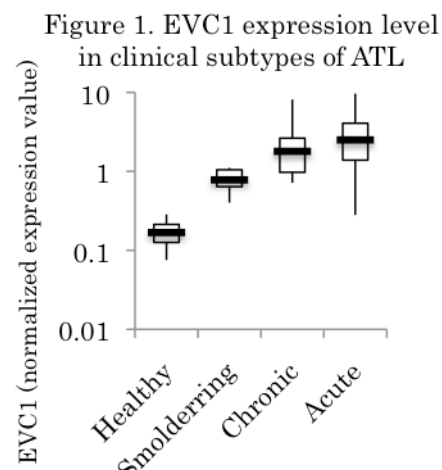
1、がんの進行と関連した EVC1 の発現上昇

EVC1 と ATL との関連を端的に理解するため、過剰発現を明らかにしたマイクロアレイの個々人の発

現値を用いて、各臨床病型に応じた EVC1 発現量を比較した (Figure 1)。ここでは、EVC1 と同様に ATL における過剰発現が示唆され、さらに、EVC1 とともに HH 経路に寄与することが知られている EVC2 についても同様の評価を行った。その結果、EVC1、EVC2 ともにがんの悪性度に応じた発現の上昇が確認された。このことは、EVC1 および EVC2 のがん化機構への関与の可能性を示唆している。

2、HTLV-1 感染細胞特異的な EVC1 過剰発現

細胞株を用いて EVC1 発現の特異性を評価するため、定量 real-time PCR (qPCR)法を導入した。ここではまず、アレイデータの再現を得るため、患者検体を用いて qPCR を行い、健常人サンプルとの比較を行った。その結果、ATL 患者サンプルにおいて中央値の比較で約 80 倍の発現上昇が確認され、アレイデータを再現する事が出来た。続いて、HTLV-1 感染細胞株および ATL 由来細胞株を用いて他の白血病細胞株との比較を行ったところ、HTLV-1 が感染した細胞株特異的に EVC1 の有意な発現上昇が見られた。ATL 由来細胞株だけでなく HTLV-1 感染細胞株でも EVC1 の過剰発現が確認されたことから、EVC1 発現と HTLV-1 感染初期に発現が見られる HTLV-1 の転写因子である Tax との関連を調べるべく、293T 細胞および T 細胞白血病株 CEM を用いて Tax による EVC1 発現誘導の有無を qPCR により観察した。その結果、どちらの細胞でも Tax 導入により二倍程度の EVC1 の発現レベルの上昇が確認された。



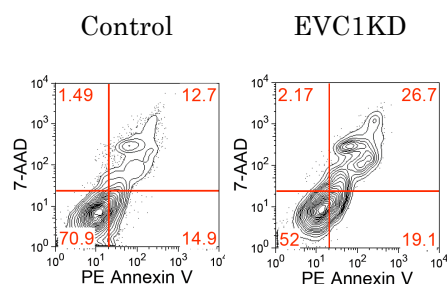
3、ATL 細胞における EVC1 タンパク発現

過剰発現した EVC1 機能評価の前提として、RNA レベルで過剰発現した EVC1 のタンパクレベルでの検出を試みた。抗 EVC1 抗体を用いて ATL の病理切片の免疫組織染色を行うと、若干のムラがあるものの、組織に浸潤した腫瘍細胞特異的に EVC1 の陽性像が観察され、RNA レベルで過剰発現した EVC1 をタンパクレベルでも検出することができた。

4、EVC1 ノックダウンによる細胞死の誘導

過剰発現した EVC1 の細胞への影響を調べるため、HTLV-1 感染 MT2 および ATL 由来 TLom1 細胞株を用いて EVC1 ノックダウン (KD) 細胞を樹立した。ここでは、過去の報告に従って EVC1KD による HH 経路への影響を評価した。まずは EVC1KD 細胞における HH 標的遺伝子の発現レベルを qPCR により評価したところ、HH 経路阻害のコントロールとして HH 経路転写因子 GLI1 および GLI2 を抑制した細胞と同様に、EVC1KD 細胞において HH の標的遺伝子 PTCH1 および GLI1 の発現低下

Figure 2. Apoptotic cell population in TLom1 cells

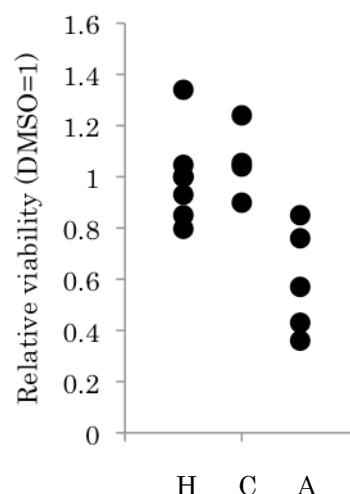


が観察された。EVC1KD 細胞における HH 経路減弱傾向は GLI 結合サイトを積んだ Luciferase レポーターアッセイによっても確認された。次に、表現系への影響として、アポトーシスアッセイを行った結果、GLI1KD、EVC1KD とともに MT2 および TLom1 細胞にアポトーシスを誘導することが明らかになった (Figure 2)。コントロールとして用いた EVC1 低発現株の Jurkat および Molt4 細胞株では、EVC1KD によるアポトーシスの誘導は確認されなかった。

5、HH 阻害剤 GANT61 によって誘導される ATL 細胞の生存率低下

上で示唆された HTLV-1 感染細胞株における HH 経路の影響を確認するため、HH 経路特異的阻害剤 GANT61 を用いて細胞株の生存レベルを評価した。まずは、MT2 細胞において GANT61 処理により HH 標的遺伝子 GLI1 の発現が減少する事を確認した。次に、細胞生存率および細胞死誘導の評価を行ったところ、GANT61 の濃度依存的に、MT2 および TLom1 の生存率の低下が観察され、さらにはアポトーシスによる細胞死が確認された。これらの結果に基づき、ATL 患者検体を用いて生存率の評価を行ったところ、健常人 (H) および無症候性 HTLV-1 キャリア (C) と比較して、ATL サンプル (A) においてのみ有意な細胞生存率の低下が観察された (Figure 3)。

Figure 3. cell viability of GANT61-treated ATL cells



<考察>

1、ATL 細胞における EVC1 過剰発現と細胞マーカーとしての有用性

本研究により ATL 細胞および HTLV-1 感染細胞株において EVC1 遺伝子が、健常人 PBMC および HTLV-1 非感染細胞株と比較して有意に過剰発現していることを明らかにすることができた。EVC1 については、ゲノム異常に関する報告は多数存在するが、発現に関する情報は、軟骨や心臓での情報を除けばこれまでに報告が無い。本研究は ATL という血球細胞での EVC1 発現を確認した初の報告となり、HTLV-1 感染細胞株は、機能面での情報に乏しい EVC1 に関しての適当な研究材料となるかもしれない。

EVC1 発現の感染細胞の特異性については、上記の比較の他に、今回 Tax による発現レベルの制御が見られたことから強く示唆されている。このような EVC1 の特徴的な過剰発現は、EVC1 が感染細胞の細胞マーカーとして有用である可能性を示唆している。今回の研究によって得られた、過剰発現した EVC1 を免疫組織学的に染め分けることができるという事実は、その可能性を強く支持するものである。

2、EVC1 の生存への関与

今回 EVC1KD 細胞の樹立により、過剰発現した EVC1 が HTLV-1 感染細胞の生存に寄与している事

実を示す事ができた。EVC1 低発現株では EVC1KD の効果が見られなかった事実からも、生存への影響に関して EVC1 過剰発現の重要性を示す事ができた。EVC1KD による細胞死の誘導はこれまでに例が無く、本研究が初の報告となるとともに、ATL の新規治療標的として、過剰発現 EVC1 の存在を暗示している。過剰発現した EVC1 が関与する具体的な経路については、EVC1KD 細胞における HH 標的遺伝子の低下と HH レポーターの減弱という観察結果から、これまでにマウスの繊維芽細胞で報告がある通り、ヒト T 細胞においてもやはり HH 経路に関与していることが示された。さらに EVC1KD と同様に GLI1KD によってもアポトーシスが誘導された事から HH 経路が HTLV-1 感染細胞の生存に寄与していることと、EVC1 過剰発現による生存への寄与が少なくとも HH 経路を介して行われていることが示唆された。以上のことから、ATL 新規治療標的として、EVC1 および HH 経路を新たに提示することができたと考えている。

3、HH 経路阻害剤の ATL 新規治療薬としての可能性

本研究では上で述べた HH 経路の HTLV-1 感染細胞の生存への寄与について、HH 特異的阻害剤 GANT61 を用いてその結果を再現することに成功した。細胞株のみならず、実際の ATL 患者検体を用いて細胞生存率の低下を導く事が出来たことは、GANT61 を始めとする HH 阻害剤の治療への有用性を強く示唆している。これまでの報告においても、GANT61 は正常リンパ球に影響を与えないことが示されている通り、今回の結果からも GANT61 処理が健常人および HTLV-1 キャリアの生存率にほぼ影響を与えないことが明らかとなった。これらのことから、GANT61 は ATL 細胞への特異性が高く、正常リンパ球への副作用が少ない薬剤だと考えられる。HH 経路の異常は多くのがん細胞に報告があり、治療薬として、すでに臨床試験に入っている HH 阻害薬も存在する事から、今後それらの薬剤の ATL への早急な応用が期待される。

< 結論 >

本研究では、ATL および HTLV-1 感染細胞の特徴として EVC1 過剰発現の存在を明らかにし、過剰発現した EVC1 が HH 経路を介して ATL 細胞の生存に強く関与しているという実験的事実を示した。これらのことは、ATL 細胞における EVC1 および HH 経路の重要性を示唆するとともに、それらが ATL 新規治療標的として有用である可能性を示している。