

## 論文の内容の要旨

論文題目 ATLにおけるCa<sup>2+</sup>関連分子異常によるシグナル伝達に関する研究

氏名 廣内 大成

### 【背景】

成人T細胞白血病リンパ腫 (Adult T-cell Leukemia-lymphoma : ATL) は、ヒトT細胞白血病ウイルス1型 (Human T-cell Leukemia Virus type 1 : HTLV-1) 感染が原因の難治性造血器腫瘍であり、感染から約50年を経て約5%の感染者がATLを発症する。非常に予後不良な悪性リンパ腫であり、有効な治療法を確立させるためにも、未だ明らかでないATLの発症に至る分子メカニズムの解明が大きな課題である。

近年、ATL患者の網羅的な遺伝子解析により、ATLにおける遺伝子異常は、T細胞受容体 (TCR) シグナル伝達経路に高度に集積していることが報告された。TCRシグナル伝達経路は細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化 (Ca<sup>2+</sup>シグナル) に依存して制御されているため、ATLにおいては、細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナル制御にも異常が生じている可能性が考えられる。しかし、ATLにおける細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルの実態やその制御機構は明らかにされていない。

### 【目的】

本研究では「ATLでは自身の生存に有利に働くCa<sup>2+</sup>関連分子の発現変化が生じている」という作業仮説のもと、「1. ATLにおけるCa<sup>2+</sup>チャネル分子の発現プロファイルを行い、Ca<sup>2+</sup>シグナルに影響を与える遺伝子を探索する」ことを第一の目的とし、その結果、「2. ATL患者で同定されたCa<sup>2+</sup>チャネル異常が細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルに与える影響を明らかにすることで、Ca<sup>2+</sup>シグナル異常という側面からATL病態の一端の理解を試みる」ことを第二の目的とした。

### 【方法と結果】

#### 1. ATL患者において異常型CACNA1H mRNAバリエントが高発現する

急性型ATL患者 (n=14) とHTLV-1キャリア (n=10) の感染細胞特異的RNA-seqデータを用いて「Calcium channel activity (GO:0005262)」とアノテーションされた210遺伝子について遺伝子発現プロファイルを行った結果、電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルであるCav3.2をコードする遺伝子CACNA1HがATL患者で高発現していることを見出した。さらに臨床検体RNA-seqデータを再解析した結果、CACNA1H遺伝子は発現する全ATL症例において、5'末端側領域を欠損したmRNAバリエント (ATL型CACNA1H) として発現していた。

## 2, ATL型CACNA1H mRNAバリエントはATL型Cav3.2分子として発現する

ATL型CACNA1H mRNAバリエントをHEK293FT細胞へ一過性過剰発現させ、ウェスタンブロットにより解析した結果、野生型CACNA1H が分子量約250 kDaのCav3.2分子を発現するのに対し、ATL型CACNA1H mRNAバリエントはN末端を欠損した分子量約150 kDaの異常型Cav3.2 (ATL型Cav3.2) 分子を発現した。

## 3, Cav3.2は細胞膜及び小胞体に発現する

ATL型Cav3.2を発現させた細胞の細胞膜表面分子をビオチン化し、ATL型Cav3.2の局在を調べた結果、ATL型Cav3.2と野生型Cav3.2は細胞膜表面に発現していた。さらにATL型Cav3.2を発現させたHeLa細胞の免疫染色を行った結果、野生型及びATL型Cav3.2は小胞体マーカー分子であるCalnexinと共局在する領域に発現した。

## 4, ATL型Cav3.2一過性過剰発現が細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルへ与える影響の評価

ATL型Cav3.2発現をHEK293FT細胞へ一過性過剰発現させ、共焦点顕微鏡とCa<sup>2+</sup>蛍光プローブを用いて1細胞Ca<sup>2+</sup>イメージングを行うことで、ATL型Cav3.2が細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルへ与える影響を下記の通り評価した。

### 4-1, ATL型Cav3.2は細胞外から細胞内へのCa<sup>2+</sup>流入を誘導できる

細胞外液のCa<sup>2+</sup>濃度を変化させた際の細胞内Ca<sup>2+</sup>レベル変化を測定した。その結果、ATL型Cav3.2は野生型に比べて程度は低いものの細胞外から細胞内へCa<sup>2+</sup>流入を誘導でき、Ca<sup>2+</sup>チャンネルとしての機能を維持していた。

### 4-2, ATL型Cav3.2は小胞体内Ca<sup>2+</sup>貯蔵量が減少させる

ATL型Cav3.2は小胞体に局在することから、ATL型Cav3.2が小胞体内Ca<sup>2+</sup>貯蔵量に与える影響を調べた結果、ATL型Cav3.2は小胞体Ca<sup>2+</sup>貯蔵量を減少させた。

### 4-3, ATL型Cav3.2は細胞内Ca<sup>2+</sup>レベルを上昇させる

細胞外液に生理的条件のCa<sup>2+</sup>が存在する条件下における静止状態の細胞内Ca<sup>2+</sup>レベルを測定した結果、ATL型Cav3.2発現細胞では細胞質Ca<sup>2+</sup>レベルが上昇した。

### 4-4, ATL型Cav3.2は小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出シグナル (ICR) と小胞体Ca<sup>2+</sup>ストア枯渇で生じる細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入シグナル (SOCE) を減弱させる

ATL型Cav3.2を過剰発現させたHEK293FT細胞に小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出シグナル (IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release, ICR) を惹起するATP刺激を与えた結果、ICRが抑制された。さらに、小胞体内のCa<sup>2+</sup>を漏出させるThapsigarginで、小胞体内Ca<sup>2+</sup>ストア枯渇で生じる細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入シグナル (Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, SOCE) を惹起した結果、

ATL型Cav3.2はSOCEを減弱した。

#### 5, ATL型Cav3.2安定発現Jurkat細胞では細胞質Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し、TCR刺激で惹起されるIICRとSOCEが減弱する

ATL型Cav3.2安定発現Jurkat細胞を樹立し、Ca<sup>2+</sup>シグナルに影響があるかフローサイトメトリーを用いたCa<sup>2+</sup>イメージングにより解析した。まず、細胞外液に生理的条件下のCa<sup>2+</sup>が存在する条件下における静止状態の細胞内Ca<sup>2+</sup>レベルを測定した結果、ATL型Cav3.2安定発現細胞では、細胞質Ca<sup>2+</sup>レベルが上昇した。さらに、TCRへの刺激を与えた際にATL型Cav3.2が細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルへ与える影響を評価した結果、抗CD3抗体でTCRを刺激することで惹起されるIICRとSOCEがATL型Cav3.2発現細胞ではともに減弱した。

#### 6, SOCEはATL細胞株やATL型CACNA1Hを発現するATL臨床検体においても抑制される

ATL型Cav3.2によって誘導された細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルの変化が、ATL臨床検体やATL細胞株においても観察されるか評価した。まず、RNA-seqデータよりATL型CACNA1Hの発現を確認した慢性型ATL患者1例の細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルを測定した結果、ATL型CACNA1Hの発現量が高い細胞集団では、低い集団に比べSOCEが抑制されていた。また、この検体において、非感染細胞に比べ、HTLV-1感染細胞でSOCEが大きく抑制される傾向が観察されたことから、ATL由来細胞株、HTLV-1感染細胞株、およびヒト急性リンパ芽球性白血病 (T-ALL) 由来細胞株を用いて、これらの細胞株におけるSOCEを測定した。その結果、ATL由来細胞株、およびHTLV-1感染細胞株では、T-ALL由来細胞株に比べてSOCEが抑制されていた。

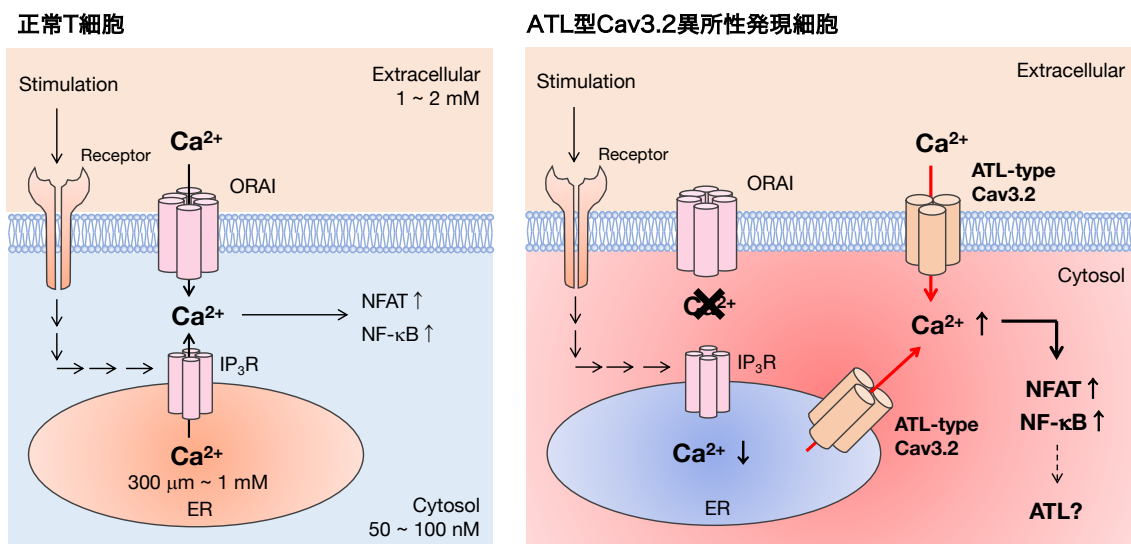
#### 7, ATL型Cav3.2は転写因子NFAT, NF-κBを活性化する

ATLにおいて遺伝子異常が高度に集積しているTCRシグナル伝達経路は、NFATやNF-κBなどの転写因子の活性化を導くことが知られている。そこで、最後にATL型Cav3.2の異所性発現によるNFAT、NF-κBの転写活性への影響を調べた。Luciferaseを用いたレポータージーンアッセイの結果、ATL型Cav3.2の発現は転写因子NFAT・NF-κBを活性化した。

#### **【考察】**

本研究により、HTLV-1感染細胞は、ATLへの進展過程においてN末端領域を欠損したATL型Cav3.2を異所性に高発現することを新たに見出した。ATL型Cav3.2分子は、野生型に比べて程度は低いものの細胞外から細胞内へのCa<sup>2+</sup>流入を誘導できる点でCa<sup>2+</sup>チャンネルとしての機能を維持しており、静止状態の細胞の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇さ

せ、さらに小胞体への局在により小胞体内  $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵量を減少させることで、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ 恒常性を攪乱し、TCR シグナル伝達経路によって制御される転写因子 NFAT 及び NF- $\kappa$ B を細胞が刺激を受容していない静止状態においても活性化させることが明らかとなった。また、細胞外からの刺激に対する応答性の変化として、ATL 型 Cav3.2 の異所性発現は、TCR への刺激で惹起される IICR および SOCE といった細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを減弱させ、ATL 型 Cav3.2 発現細胞では細胞外刺激に対する生理的応答が抑制される可能性が示された。特に、T 細胞機能に重要である SOCE シグナルは、臨床検体における ATL 細胞や ATL 細胞株においても抑制されていることを見出し、SOCE シグナルの抑制が ATL における  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの特徴であることが示唆された。静止状態における NFAT 及び NF- $\kappa$ B の活性化や SOCE シグナルの抑制が ATL 病態を導くメカニズムは未だ不明であるという大きな課題が残されているものの、本研究の成果は ATL 型 Cav3.2 の異所性発現によるこれらの異常が ATL 病態に寄与する可能性を示す新たな知見を与えるものである



図：本研究から示唆される ATL 型 Cav3.2 異所性発現細胞における  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル異常