

論文の内容の要旨

論文題目 成人 T 細胞白血病における転写因子 Helios の 発現異常とその機能的意義

氏 名 浅沼 里実

【背景】

成人T細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) はヒトT 細胞白血病ウイルスI 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) に感染して発症する末梢性T 細胞の腫瘍性疾患である。感染から約50年の長期潜伏期間を経て、ゲノムや遺伝子の発現パターンに様々な異常が蓄積し、最終的にCD4陽性T細胞のモノクローナルな増殖が起こり発症に至る。ATLは、急性型・慢性型・リンパ腫型・くすぶり型の4種類の病型に分類される。未だ有効な標準的治療法がなく、特に急性・リンパ腫型は非常に予後不良である。ATL発症に至る詳細な分子メカニズムの解明とそれに基づいた新規治療法の確立や発症高危険群の同定と発症予防法の確立が強く求められている。

本研究で注目した転写因子Helios は、血球系の特にリンパ球系特異的なIkaros転写因子ファミリー (Ikaros, Helios, Aiolos) に属す。Heliosは特にTリンパ球系で高発現し、分化や増殖の制御を担う。トランスジェニックマウスを用いた研究から、Ikaros転写因子ファミリーはがん抑制因子として働くことが報告されている。また近年ヒトの様々な白血病において、Ikarosの発現異常やゲノムの欠失が多数検出され、予後不良への関与が示唆された。Heliosについても、T細胞性白血病の一部で発現異常が報告されているが、その機能的意義については不明なままである。本研究では、当研究室先行研究の発現アレイ解析やゲノムのコピーナンバー解析から、ATLにおけるIkaros転写因子ファミリーに着目した。

【目的】

1. ATLにおけるIkarosファミリー (Ikaros, Helios, Aiolos) の発現量・発現パターンの詳細を解析し、その異常を明らかにする。
2. Heliosの発現異常がT細胞に与える影響、ATL発症における機能的意義を明らかにする。

【方法と結果】

【発現解析結果】 ATLではHeliosの様々な発現異常がある。

Ikarosファミリーは選択的スプライシングにより1つの遺伝子から複数のバリエーションを生じる。全長を検出するプライマーを用いてRT-PCRを行い、ATL検体におけるIkaros転写因子ファミリーの発現量・発現パターンを解析した。健常者と比較すると、IkarosとAiolosは発現量が低下していた。一方Heliosは、健常者では見られない複数の短いバリエーション（4種類のATL型Helios）が検出された。特異的なプライマーを用いて発現の有無を調べたところ、ATL検体の大部分（急性型・慢性型・くすぶり型ATL検体の33/37例）でATL型Heliosの発現を確認した。無症候の感染キャリア検体でもATL型Heliosは既に発現しており、キャリアの中でも特に発症高危険群（数年後にATL発症を確認済み）で高発現していた。また、健常者でメインに発現しているHel-1の発現量が低下し、Hel-2の発現量が上昇していた。

【機能解析結果】

- 1) ATL型Heliosはドミナントネガティブに機能する。

ATL型HeliosはN末端側のDNA結合ドメインを含む複数のexonを欠失している。そこで、発現ベクターを構築してそれぞれの転写因子としての機能を解析した。免疫共沈実験と免疫染色の結果から、ATL型Heliosは全て正常なIkarosやHeliosと相互作用できることがわかった。次に、ゲルシフトアッセイとレポーターアッセイの結果から、ATL型Heliosは全てDNAに結合できず、転写制御能を示さないことがわかった。また、正常なIkarosやHeliosとATL型Heliosを共発現させると、ATL型Heliosの発現量依存的に正常なIkarosやHeliosのDNA結合能と転写制御能が阻害された。

- 2) Heliosの核局在にはexon 6が重要である。

免疫染色の結果から、exon 6を欠失しているHel-6とHel-v2のみ、核ではなく細胞質局在を示した。これらを正常なIkarosやHeliosと共発現させると、細胞質で共局在した。

- 3) Hel-2はHel-1よりも転写制御能が弱い。

Hel-2はHel-1と比較してexon 3をもたないisoformである。Hel-2はHel-1と同様にDNAに結合できるが、下流の遺伝子の転写制御能はほとんど示さなかった。

- 4) ATL型Heliosの発現はT cellの増殖を促進し、アポトーシス抵抗性に寄与する。

ATL検体で最も高頻度の高発現していたHel-5を、非ATL由来T細胞株であるJurkatに安定的に発現させたところ、細胞増殖が有意に促進した。Jurkatで高発現している正常なIkarosやHeliosをノックダウンしても同様の結果が得られ、Hel-5の発現によるドミナントネガティブな効果であると考えられる。また、Hel-5の発現かつ正常なHeliosのノックダウンにより、増殖の促進に加えてアポトーシス抵抗性が増すことがわかった。

- 5) Heliosの発現異常の下流にあるターゲット遺伝子やシグナル伝達系

Hel-5の発現、IkarosまたはHeliosのノックダウンJurkat細胞株の3群を用いて、mRNAの発現

アレイ解析を行い、下流のターゲット遺伝子を網羅的に調べた。3群全てで発現量の上昇していた280の遺伝子を同定した。さらに発現量が増加していた遺伝子群を用いてパスウェイ解析を行い、活性の変化が示唆された6つのシグナル伝達系を同定した。その中には、T細胞の増殖や生存、細胞周期やアポトーシスの制御に関与するものが多く含まれた。特にS1Pパスウェイの異常とATLについて新たな知見と可能性を示唆した。

【考察】

1) ATLにおける転写因子Heliosの重要性

- ① 発現解析の結果、Heliosの発現の欠失やスプライシング異常による発現異常がほぼ全てのATL検体で見られ、ATLにおける新たな特徴としてHeliosの発現異常を同定した。ATLは発症までの長期潜伏期間に様々な異常が蓄積して多段階的に発がんに至ると考えられており、これまでにATLにおけるmRNAやmiRNAの発現異常・エピジェネティックな制御異常・ゲノムのコピーナンバー異常などが報告されてきたが、新たにスプライシングの異常の可能性を示唆した。
- ② スプライシング異常により様々なHeliosのバリエーションが検出された。Hel-1に代わりATLでメインに発現しているHel-2はexon 3を欠失しており、転写制御能のない（弱い）アイソフォームである可能性がある。またexon 6を欠失したアイソフォームも細胞質局在となり、転写因子としての機能をもたないと考えられる。ATL検体ではこれらのバリエーションが、健常者と比較して高発現していた。ATL型Heliosは、全て自身の機能がなく、さらに正常型に対してドミナントネガティブに働く。これらをまとめると、ATLでみられるHeliosの発現異常は総じて、Heliosの機能欠失、さらにIkarosの機能抑制を引き起こすことがわかった。Heliosの発現異常は発症前のキャリアの段階から検出されており、Heliosの機能低下がATL発症に寄与していると考えられる。実際にHel-5の過剰発現によりT細胞の増殖が促進され、HeliosはATL発症においてがん抑制因子として重要な役割を担っている可能性がある。

2) 転写因子Heliosの機能について

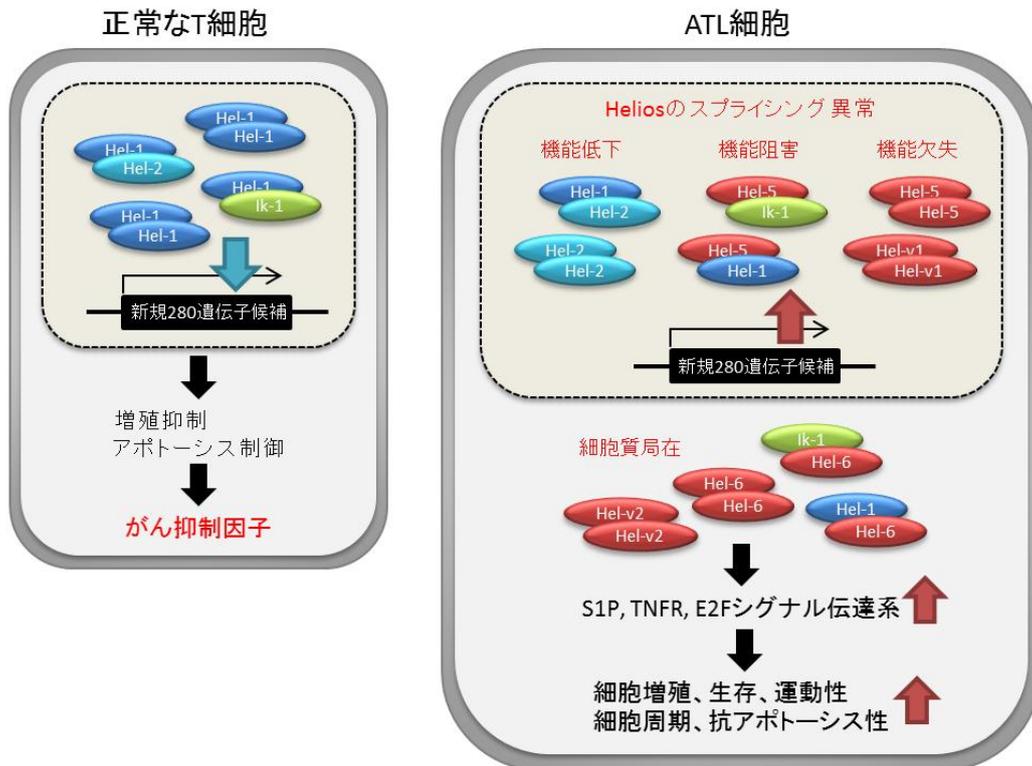
- ① Hel-2の機能解析の結果から、exon 3がDNA結合後の転写抑制に重要であることが示唆された。Ikaros転写因子ファミリーはDNAに結合後、NuRDやSWI/SNF複合体のようなクロマチン構造変換因子をリクルートすることで転写を制御すると考えられており、exon 3がこの機能に関わっている可能性がある。またexon 6には核局在シグナルはなかった。よってexon 6の有無によるタンパク構造の変化や、相互作用する他の因子の存在などが、Heliosの正常な核局在に重要であるのかもしれない。
- ② Ikaros転写因子ファミリーには共通のコンセンサス結合配列は報告されているが、Heliosの転写制御の分子メカニズムについてはほとんどわかっていない。今回、Hel-5の発現、IkarosまたはHeliosのノックダウン細胞株を用いて網羅的な発現アレイ解析を行い、それぞれで重複している遺伝子群と独立している遺伝子群を検出した。これらの結果は、ATLにおけるHeliosの発現異常の下流を探索するだけでなく、Heliosの下流のターゲット遺伝子を解析する上でも有用であると考えられる。

3) Heliosの選択的スプライシング異常について

スプライシングで飛びやすいexonには傾向があった。ATL検体で高頻度に検出されたHel-5,6ではexon 2から4までが大きく欠失するが、認識されなくなるexon 2の5'スプライスサイトは、直前に90kbp以上の長大なintronがあり、配列からも認識の弱いスプライスサイトであることが示唆された。

【結論】

本研究により ATL の新たな特徴として Helios のスプライシング異常・発現異常の詳細を明らかにした。これらの異常が Helios の機能低下と Ikaros の機能阻害につながり、S1P パスウェイを含めた様々なシグナル伝達系に影響を与え、細胞の増殖や生存を促進することで ATL 発症に寄与すると考えられる。



図：本研究から考察される ATL における Helios の発現異常とその機能的意義