

博士論文

ATL細胞におけるEVC1過剰発現の存在と意義

高橋 隆太郎

## 目次

1.	背景	p2
2.	実験材料と実験方法	p5
3.	結果	p11
4.	考察	p33
5.	結論	p36
6.	謝辞	p37
7.	参考文献	p38

## 1、背景

Adult T-cell leukemia (ATL)はヒトレトロウイルス Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1)によって引き起こされる予後不良性悪性腫瘍である(1,2,3)。ATLの原因ウイルスとなる HTLV-1 は主に母乳を介して CD4 陽性末梢血 T 細胞に感染し、乳幼児期の感染から 40-50 年の潜伏期間を経て ATL を発症する。ATL はその臨床症状に応じて悪性度の低い順に、くすぶり型、慢性型、リンパ腫型および急性型への分類がなされる。ATL を発症した患者のほとんどが治療抵抗性を示し、初回治療に反応が見られた場合にも、その後間もなく再発し、腫瘍の再増殖が始まる(4)。急性型 ATL 発症後の 50%生存期間は一年程度であり、有効な治療法は未だ確立されていない。

HTLV-1 のキャリアは日本の九州・沖縄地方を始め、カリブ海沿岸諸国、南米、アフリカ中央部などに多く存在し、世界全体で数千万人に及ぶと推定される。ウイルスキャリアの約 4%が ATL の発症に至るとの統計データがあり、日本でも今後約 5 万人が ATL を発症すると考えられている(5)。しかしながら、近年、従来からのウイルス認知度の低さに加え、都市圏への移住や移動網の整備による行動範囲の拡大により、全国に感染が拡大しているとの報告もある。その場合、男女間の水平感染が成立していると考えられ、母乳と併せて規制が難しく、HTLV-1 感染、および結果としての ATL は決して無くなることのない疾患であるとする研究者も少なくはない。

ATL の治療を困難にするものは、前述の治療抵抗性の他に、患者の発症年齢の高さと骨髄移植や化学療法といった従来のがん治療法の苛烈さが挙げられる。発症に長い潜伏期間を要する ATL では、患者の多くが高齢者であり、強力な化学療法に耐えうるだけの体力を持ち合わせておらず、長期にわたる免疫不全状態の結果、日和見感染により死に至ることも珍しくない。このような根本的な問題を解決するために、副作用の少ない分子標的治療薬の開発が求められるが、ATL の病態や ATL 発症にいたる具体的な分子機構が明らかになっていないことが、新薬誕生への大きな障壁となっている。ATL の発がんには少なくとも 5 つの遺伝子異常の蓄積が必要とされる多段階発がんモデルが提唱されているが(6)、HTLV-1 感染初期の Tax による感染細胞の増殖のステップ(7)および ATL

発症段階における恒常的な NFkB 経路活性化の影響(8)を除いては、その詳細は解明されていない。ATL の分子標的治療薬開発のために、ATL の病態および発がん機構の分子レベルでの解明が待たれている。

この問題に対し、当研究室ではこれまで、ATL 患者検体を用いた ATL 細胞における遺伝子発現プロファイル（マイクロアレイ）解析を行ない、ATL の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。当研究室は JSPFAD と呼ばれる、ATL コホート研究機関の本部となっており、全国各地から患者およびキャリアの血液検体が集められている。大量の検体を用いて得られたデータは信頼性が高く、これまで個別に報告されてきた *PTHrP* (9) や *IGSF4* (*TSLC1*) (10) などの過剰発現についても再現されている。また、マイクロアレイによる発現データは、測定法の観点からも信頼性が高く、細胞の特徴を把握する上での有用性が示唆されており(11)、その信頼性から臨床診断薬としての応用も図られている (12)。上述の過剰発現遺伝子はどちらも ATL の病態との強い関与が示されており、このことはアレイ解析によって得られた過剰発現情報が、がん細胞の性質を理解する上で非常に有用であることを裏付けている。

*Ellis Van Creveld syndrome 1* (*EVC1*) は *Ellis van Creveld Syndrome* (*EvC*) と呼ばれる軟骨外胚葉形成異常の原因遺伝子として同定され、N 端に推定膜貫通ドメインを持つ約 110kDa のタンパクをコードしている。*EVC1* には *EVC2* と呼ばれるファミリー遺伝子が存在し、*EVC2* と協調して、その機能を果たすことが報告されている(13)。*EvC* の原因となるのは、*EVC1* ゲノム領域での変異による *EVC1* の機能喪失によるものであることが示唆されており(14)、*EVC1* ノックアウトマウスでは、短縮した四肢や、歯の形成異常といった *EvC* 様の症状が観察される (15)。また、同ノックアウトマウスにおいては、一般に発生期の形態形成に大きく関与しているとされる *Hedgehog* (*Hh*) 経路のリガンドおよびその他の *Hh* 経路活性化刺激に対する不応答性が確認されており、*EVC1* が *Hh* シグナル伝達に関与し、*EvC* の病態は *Hh* 経路の不活化によって引き起こされると推察されている (16)。しかしながら、そのタンパク構造の難しさから、*EVC2* との共発現を除いては、*EVC1* がどのような分子メカニズムで *Hh* 経路内で機能しているのかは明らかにされておらず、その後も解析は進んでい

ない。

一方で *EVC1* の機能が報告される Hh 経路については、近年、様々な場において詳細な研究がなされている。Hh 経路は 90 年代の前半にショウジョウバエの胚性期に体の各部位のパターニングに関与する経路として研究がスタートした (17)。その後、経路の詳細な研究が進み、90 年代の後半には経路の異常が皮膚がんの一種 Basal cell carcinoma (BCC) の原因となっていることが示唆され (18)、これまでに、medulloblastoma、Breast cancer、Prostate cancer、Chronic myeloid leukemia (CML) など様々ながん種との関連が示唆されている (19)。最近の研究では、幹細胞およびがん幹細胞の生存維持に関与しているとの報告もなされ、研究領域として大きな広がりを見せている (20)。Hh 経路の直接的な転写因子には、zinc finger タンパクの GLI が知られ、GLI が経路活性化による機能発現を担っている。そのような GLI タンパクの機能から、GLI の活性化自体が Hh 経路の活性化とほぼ同等に扱われている。また、Hh 経路の特徴として、GLI の標的遺伝子に *GLI1* や *PTCH1* と言った同経路のシグナル伝達に関わる遺伝子が含まれていることが挙げられる (21)。上述の通り Hh 経路が腫瘍細胞増殖に正に作用しているという事実から同経路の阻害剤が、それらの腫瘍細胞の治療薬として臨床試験に入っているものもある (22,23)。

ATL における Hh 経路の状態を記載した報告はこれまでに無く、唯一、HTLV-1 細胞株の一つで *GLI2* がウイルス RNA の転写活性化に寄与している可能性が報告されているのみである (24)。

本研究では、まずマイクロアレイ解析および定量 PCR 法により ATL および HTLV-1 感染細胞の特徴として *EVC1* の過剰発現の存在を明らかにした。さらに *EVC1* の機能解析を通して、*EVC1* および Hh 経路依存的な ATL 細胞生存の可能性を提示した。本研究は ATL の病態把握、さらには臨床応用という点において *EVC1* および Hh 経路の潜在的な有用性を示すものである。

## 2、実験材料と実験方法

### 細胞培養

HTLV-1 感染 T 細胞株 (MT2、HUT102、MT1、TLom1、KOB、KK1) および HTLV-1 非感染細胞株 (Jurkat, Molt4, K562) は全て 10%Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO) 含有 RPMI1640 (GIBCO) 中で培養した。KOB および KK1 については上記培地に 10ng/ml で hIL2 (R&D systems) を加えて培養した。293T および HeLa 細胞は 10%FBS 含有 DMEM (NISSUI) 中で培養した。全ての細胞株は 37°C、CO<sub>2</sub>5%供給下で培養した。

### Plasmid 構築

*EVC1* 特異的な shRNA 発現ベクター作成に先立ち、効果的な shRNA 配列の予測を行なった。予測は Block-it RNAi Designer (Invitrogen ウェブサイト) に、*EVC1* のタンパクコーディング領域を指定して予測した。そのうち上位二つを候補として、それぞれの相補鎖とともに合成オリゴを外注した。*GLI1* および *GLI2* ノックダウンのための shRNA 配列はそれぞれ過去の論文を参考にした (25, 26)。アニーリングさせた各二本鎖オリゴは、CS-RfA-EVBsd ベクターに導入した。使用した合成オリゴ配列を以下に示す。Luciferase shRNA 発現ベクターおよびレンチウイルス構築用パッケージングプラスミド (pCAG-HIVgp, pCMV-VSV-G-RSV-Rev) は以前研究室で作製したものを使用した。(27) (以下に示す 6 つの合成オリゴは全て SIGMA 製である。)

LV-shGLI1-top:

5'-GATCCCCGCTTAGTTTGTGTGTGATTATACGTGTGCTGTCCGTATAAT  
TACACACAAGCTGAGCTTTTTGGA AAT-3'

LV-shGLI1-bottom:

5'-CTAGATTTCCAAAAAGCTCAGCTTGTGTGTAATTATACGGACAGCAC  
ACGT ATAATCACACACAAACTAAGCGGG-3'

LV-shGLI2-top:

5'-GATCCCCGATTTGGACGGGGATGGCTACGTGTGCTGTCCGTAGTCAT  
CCCTGTCCAGATCTTTTTGGAAAT-3'

LV-shGLI2-bottom:

5'-CTAGATTTCCAAAAAGATCTGGACAGGGATGACTACGGACAGCACAC

GTAGCCATCCCCGTCCAAATCGGG-3'

LV-shEVC1-top:

5'-GATCCCCGCGGGCGTATTATCAGCAGATACGTGTGCTGTCCGTATTT  
GCTGGTAATACGCCTGCTTTTTTGAAAT-3'

LV-shEVC1-bottom:

5'-CTAGATTTCCAAAAAGCAGGCGTATTACCAGCAAATACGGACAGCAC  
ACGTATCTGCTGATAATACGCCCGCGGG-3'

pME-FLAG-EVC1 発現プラスミド構築のため、*EVC1*[NM\_153717]発現領域を前半と後半の二つに分け、それぞれ以下のプライマーを用いて各フラグメントを PCR により増幅した。DNA polymerase には Platinum Taq HiFi (Invitrogen)を、鋳型には HeLa 細胞由来の cDNA を用いた。(以下に示す4つの合成オリゴは全て EXIGEN 製である。)

前半

Forward : 5'-gaattgccccgcccggggcgggctgcaa-3'

Reverse : 5'-gctgtcgggctttggagctggaacact-3'

後半

Forward : 5'-atgtgctccttgaccttcttc-3'

Reverse : 5'-tctagattcaggtcttgtcccaccga-3'

前半部は GC が豊富な領域を含むため最終濃度 3x の PCR enhancer (Invitrogen) を用いて以下の反応条件により PCR を行なった。94°C-30s (denature)、63°C-30s (anneal)、68°C-80s (extension)、40cycles。後半部の増幅には一般的な Platinum Taq の反応液組成に則り、以下の反応条件によって PCR を行なった。94°C-30s (denature)、58°C-30s (anneal)、68°C-150s (extension)、40cycles。各 PCR 産物は pGEM T-easy に挿入し、Cla I と Sal I で制限酵素処理した前半部をベクターとして、同酵素で処理した後半部のフラグメントを挿入し、全長とした。EcoR I と Xba I 処理により全長シーケンスを pME-FLAG ベクターに挿入し、目的の発現ベクターを構築した。

Hh レポータープラスミド 7xGLIBS/pGL4.10 の作製は過去の論文を参考にし

た(28)。以下に示す二種類の合成オリゴ (EXIGEN) をアニーリングさせ、末端を T4 Polynucleotide Kinase (TAKARA)によってリン酸化した。リン酸化フラグメントは Ligation Kit Solution I (TAKARA)を用いて 10 分間反応させ、目的の長さのフラグメントを得た (7xGLIBS)。Klenow 反応による末端平滑化の後、SV40 の basal promoter 領域を含む pGL4.10 (Promega) 骨格に導入し、配列自身およびその向きをシーケンスによって確認した。

### RNA 抽出と cDNA 合成

RNA は各細胞を PBS で洗浄後、ISOGEN (NIPPON GENE) によって回収した。回収後、TE に溶解し、DNase I (TAKARA) を 37° C で 50 分間処理して残存 DNA を分解した。DNase I 処理溶液に ISOGEN-LS (NIPPON GENE) を加え、DNase の失活と除去、および RNA の精製を行なった。得られた RNA 4 $\mu$ g を用いて、SuperScript II Reverse Transcriptase (SSII RT) (Invitrogen) により cDNA を合成した。cDNA 合成のプライマーには Random primer (Invitrogen) を使用した。cDNA は投入した RNA 換算で 40ng/ $\mu$ l に調製し PCR に使用した。

### Real-time PCR

定量 real-time PCR は Thermal cycler Dice Real Time System (TAKARA) および SYBR Premix Ex Taq (TAKARA) を用いて行なった。PCR 反応は、*EVC1* および  $\beta$ -actin を除いては、以下に示す二段階で行い、*EVC1* および  $\beta$ -actin についてはアニーリングと増幅とを分けた三段階の行程により行なった。cDNA は 25 $\mu$ l の反応系に 4 $\mu$ l ずつを加えた。鋳型 cDNA の持ち込み量の差は  $\beta$ -actin の値によって補正した。二段階：95°C-5s (denature)、60°C-30s (anneal & extension)、三段階：95°C-5s (denature)、56°C-10s (anneal)、72°C-20s (extension)、ともに 43cycles。

以下、各遺伝子増幅に使用したプライマー配列を示す。(以下に示す 14 個の合成オリゴは全て EXIGEN 製である。)

*EVC 1*[NM\_153717]

Forward : 5'- ccctgctccattttggta-3'

Reverse : 5'- tcccctccaaatccacatc-3'

*GLI1* [NM\_005269]

Forward : 5'-ggaggaaagcagactgactgt-3'

Reverse : 5'-ctggagaggtcttcagtgt-3'

*GLI2* [NM\_005270]

Forward : 5'-gtgttctccaccaagccaca-3'

Reverse : 5'-aacccttcccctttccac-3'

*PTCH1* [NM\_001083602]

Forward : 5'-cggtgtgagaggaggatt-3'

Reverse : 5'-caatctttggcctctttgcttc-3'

*PTHrP* [NM\_198965]

Forward : 5'-cggcgacgattcttcctt-3'

Reverse : 5'-gacgggggtggttctttgtg-3'

*SHH* [NM\_000193]

Forward : 5'-tgctgctagtctctcgtctcct-3'

Reverse : 5'-ttttggggtgcctcctctt-3'

*ACTB* [NM\_001101.3]

Forward : 5'-tggcaccagcacaatgaa-3'

Reverse : 5'-ctaagtcatagtcgcctaga-3'

## **GANT61 処理**

GANT61 は CALBIOCHEM から購入した。DMSO を溶媒にして 2.5mM のストック溶液を作製し、分注して-20°C で保存した。実験に使用された各濃度へは、DMSO を用いてそれぞれの 10 倍の濃度まで希釈し、それらを培地で 10 倍希釈したものを細胞に加えた (GANT61 の濃度に依らず、DMSO の最終濃度が培地の 1/500 になるように揃えた。)。wst-8 アッセイは、細胞株を用いた実験では 1%FBS-RPMI 中で GANT61 を 48 時間と 96 時間処理したものを評価した。健常人および ATL 患者検体を用いた実験では自己血清 1%の RPMI 培地中で

GANT61 を 72 時間処理したものを評価した。GANT61 処理時の RNA は 10%FBS 培地で 48 時間処理したものを回収した。

### セルブロック作製と免疫組織染色

EVC1 特異抗体の評価のために、293T 細胞を用いて細胞標本を作製した。前日に 20%confluent に撒いた 293T に lipofectamine LTX (Invitrogen) を用いて各 shRNA 発現ベクターをトランスフェクションした。12 時間後に細胞を 10%confluent で細胞を撒き直し、さらに 12 時間後にリン酸カルシウム法により各 shRNA 発現ベクターと EVC 発現ベクターをコトランスフェクションした。5 時間後に培地交換し、リン酸カルシウムトランスフェクションから 48 時間後に細胞を回収した。PBS に懸濁した細胞を 3000rpm で 3 分間の遠心分離操作後、上清部を除去し 20%中性緩衝ホルマリンで 24 時間静置固定を行った。ホルマリンを除去し Tissue-Tek VIP5Jr (サクラ) でアルコール脱水、パラフィン浸透操作を行った後、細胞塊をパラフィン包埋し、3 $\mu$ m の厚さで薄切、コーティングスライドガラス (武藤化学, New Silne III) にて組織切片を作製した。

上記セルブロックおよび患者検体のパラフィン切片は、脱パラフィン後、脱ペルオキシダーゼ処理 (3%過酸化水素水) し、ヒストファイン抗原賦活液 pH9 (ニチレイ ; 415211) を使用してマイクロウェーブ照射 20 分間抗原賦活処理を行った。抗 EVC 抗体 (Sigma ; HPA008703, 1:400) を反応させた後、二次抗体 (ENVISION Kit/HRP[DAB]ポリマー試薬, DAKO ; K5027) を反応、ENVISION Kit/HRP[DAB]DAB+基質キット (DAKO ; K3468) で発色を行った。ヘマトキシリンにて後染色し脱水後、透徹封入を行った。

### shRNA 安定発現細胞株の樹立

詳細は当研究室の先行研究を参考にした (27)。以下には簡潔に示す。GLI1、GLI2 および EVC1 をターゲットにした shRNA 産生配列を含むウイルスプラスミド (CS-RfA-EVBsd) をパッケージングプラスミド (pCAG-HIVga および pCMV-VSV-G-RSV-Rev) とともに 293FT 細胞に共発現させた。高ウイルス価のウイルス液を得るために遠心による濃縮を行い、Jurkat、Molt4、MT2 および TLoM1 細胞に感染させた。感染は spinoculation 法 (1,800 rpm 2hrs) により行い、感染細胞は 10%FBS RPMI1640 培地中で 7 日から 14 日程維持した。

培養後は、Venus 陽性集団を特定することで、感染の効率を確認した。

### Wst-8 アッセイ

指定の血清濃度に調製した培地を用いて、各細胞を  $5 \times 10^4$  個ずつ triplicate で 96 穴プレートに撒いた。薬剤を加える場合はこの時点で指定の薬剤を指定の濃度で加えた。細胞を撒いた時間を 0h とし、指定の時間で cell counting kit-8 (DOJINDO) 10 $\mu$ l を 3 時間処理し、Microplate Reader (BIORAD) により各 well の 450nm の吸光度を測定した (630nm の吸光度を対象とした)。細胞数への換算は各細胞毎に検量線を作製し評価した。GANT61 を処理したサンプルの細胞数を DMSO のそれで割った値を細胞生存率として評価した。

### ルシフェラーゼアッセイ (HH レポーターアッセイ)

細胞内の Hh 活性の測定は過去の報告を参照した(28)。7xGLIBS Hh レポータープラスミドと参照用の RSVpGL4.70 プラスミドを Lipofectmine 2000 (Invitrogen)によって細胞に共発現させた。24 時間後の Luciferase 活性を Dual Luciferase reporter assay system (Promega)によって発色させ、Luminometer によって測定した。

### アポトーシスアッセイ

アポトーシス細胞は PE Annexin V / 7-AAD (BD pharmingen) 染色に依って標識した。検出は FACS Calibur (Becton Dickinson)を用いて行った。shRNA 導入細胞を Venus 陽性集団として分離し (FL1)、PE Annexin V (FL2) および 7-AAD (FL3) 陽性集団の細胞数をアポトーシス細胞とした。健常人および ATL 患者由来の PBMC については、FSC および SSC さらには CD4 陽性集団 (anti-CD4-FITC, BD pharmingen) によって分画したサンプル中の上記アポトーシス細胞数を測定した。得られたデータは FlowJo (Tree Star) で解析した。

### 転写因子結合予測 (TFSEARCH)

EVC1 および EVC2 のゲノム領域 4070bp に結合配列を持つ転写因子は TFSEARCH(<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>)によって予測した。検出のスコア閾値は 85.0 に設定した。

### 3. 結果

#### がんの進行に並行した *EVC1* および *EVC2* の発現上昇

これまでに当研究室で行われた ATL 細胞の遺伝子発現アレイ解析の結果から、ATL 細胞が、健常人 CD4+T 細胞と比較して高い *EVC1* 遺伝子発現を示すことが示唆されていた。ここでは、ATL 細胞における *EVC1* の発現パターンを把握するため、同発現アレイ解析によって得られた *EVC1* の個々人の発現量を基に以下の点について評価した (図 1)。まずは、*EVC1* 過剰発現量と ATL の悪性度との関係を予測するため、ATL の臨床病型ごとの患者個々人の *EVC1* 発現レベルを比較した (図 1A)。ここでは、*EVC* ファミリー遺伝子である *EVC2* についても同様に検討を行った (図 1B)。図では、がんの進行に応じた *EVC1* および *EVC2* の発現レベルの上昇が見られた。Smoldering と健常人の中央値での発現量比は、*EVC1* で 4.65 倍、*EVC2* で 10.2 倍であった。慢性型と急性型の間には優位な差はみられなかったものの、中央値の比較では *EVC1*、*EVC2* ともに急性型で高い値を示すことがわかった。次に、*EVC1* と *EVC2* の発現量に相関が見られるかどうかを評価した (図 1D)。*EVC1*、*EVC2* が関与する細胞内シグナル伝達系としては Hh 経路が知られているが、同経路における機能の前提として両遺伝子の共発現の必要性が提唱されている (13)。過去の報告では *EVC1* と *EVC2* が head to head configuration という遺伝子配座を取る事がわかっており (図 1C)、そのような構造的特徴から双方向性プロモーターによる制御が示唆されている(29)。図 1D では、*EVC1* と *EVC2* の発現量の間強い正の相関 ( $R=0.667$ ) が見られ、ATL 細胞における *EVC1*、*EVC2* の共発現が確認された。

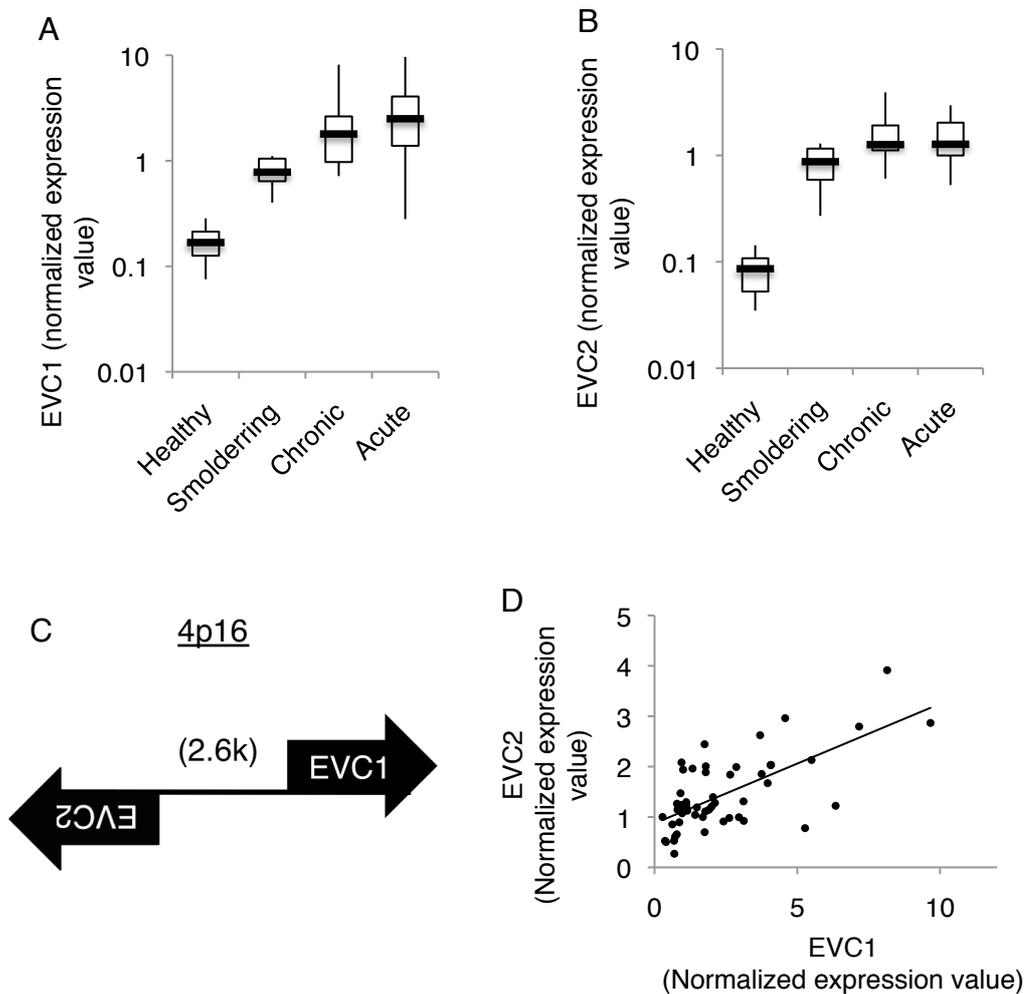


図1 がんの進行に並行した EVC1 および EVC2 の発現上昇

(A、B) 過去のアレイ解析の結果において得られた個々人の EVC1 (A) および EVC2 (B) の発現値を各々の臨床病型によってプロットし、箱ひげ図によって示す。EVC1、EVC2 ともに chronic と Acute を除く全ての組み合わせで統計的有意差が得られた ( $p < 0.01$ ) (Healthy;  $n=21$ , Smoldering;  $n=6$ , Chronic;  $n=19$ , Acute;  $n=24$ )。 (C) ゲノム上における EVC1 と EVC2 の配置の模式図。 (D) アレイで得られた ATL 患者における EVC1 および EVC2 の発現値の相関関係を示す ( $n=52$ )。直線は回帰直線を示し、両者の相関係数は 0.667 であった。

## HTLV-1 関連細胞株および患者由来 ATL 細胞における *EVC1* の過剰発現

これまで、*EVC1* の発現についてはマウスの細胞において、中でも発生段階の細胞を中心にその報告がなされている(30)。ヒト T 細胞および他の血液系細胞における発現情報はまだなく、種々の細胞株を用いて同発現レベルを調べるため、ここでは検出法として、定量 PCR (qPCR) を導入した。まずは患者由来 cDNA を用いて、qPCR でのアレイデータの再検証を行った (図 2A)。その結果、中央値の比較で、ATL 細胞において 90.9 倍の *EVC1* の過剰発現が確認され、定量 PCR によってもアレイデータを再現可能であることが明らかとなった。次に、同法により、HTLV-1 感染細胞株 MT2、HUT102、ATL 由来細胞株 TLom1、MT1、KOB、KK1 および他の白血病細胞株 Jurkat、Molt4、K562、HL60、BC1、BCBL1、BJAB における *EVC1* の発現レベルを評価した (図 2B)。PCR の結果、健常人 PBMC を含むその他の細胞群と比較して、今回用いた全ての HTLV-1 感染および ATL 由来細胞株において、*EVC1* の高発現が検出された。健常人 PBMC を含む他の細胞株群では、*EVC1* の発現量が検出限界以下のものが存在し、発現を確認できるものでも、その発現レベルは HTLV-1 関連細胞株のどの値にも及ばなかった。

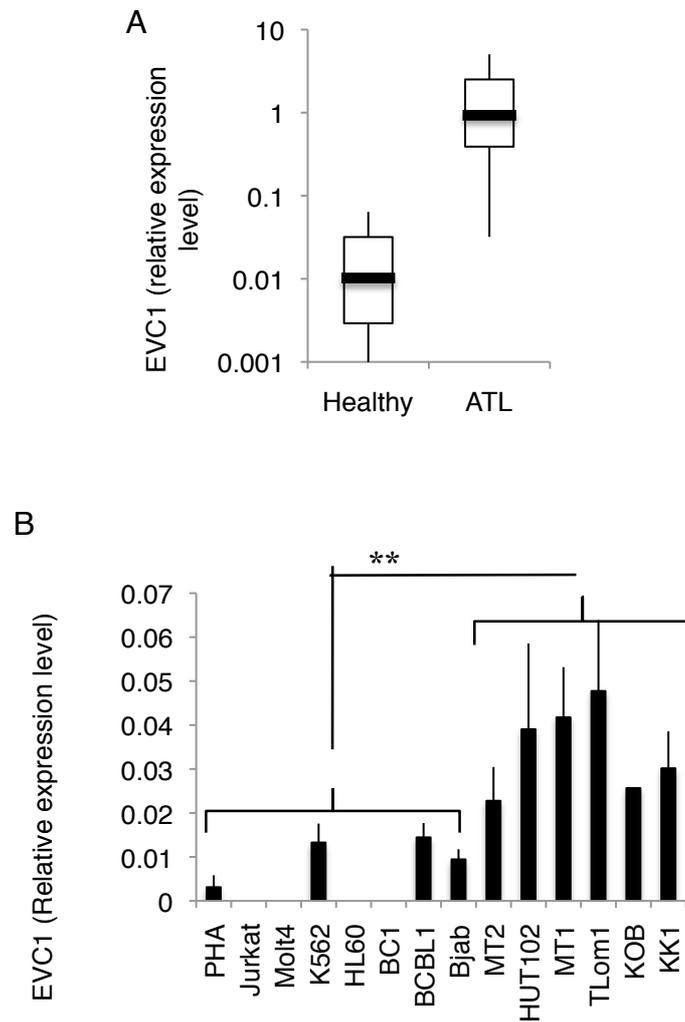


図2 HTLV-1 感染細胞株および ATL 由来細胞株における *EVC1* の過剰発現  
 (A) 定量 PCR による健康人 (Healthy) PBMC (n=6) および ATL 由来 PBMC (n=11) 中における *EVC1* 発現量を示す。各値は *β-actin* の値に依って補正され、各補正值のプロットを箱ひげ図で示す。(B) 定量 PCR による各細胞株における *EVC1* 発現量を示す。それぞれ、少なくとも二回の独立したサンプルを用意し、その平均と標準偏差を示す。\*\*, p<0.01.

## HTLV-1 Tax は *EVC1* の mRNA レベルを正に制御する

図 2 において ATL 由来細胞株だけでなく、HTLV-1 感染細胞株においても過剰発現が確認されたことから、*EVC1* mRNA レベルにおける HTLV-1 Tax の関与が疑われた。Tax は ATL 多段階発がんモデルの第一段階を担い、感染細胞の増幅のため、細胞内の様々な遺伝子産物との相互作用を介して、宿主遺伝子発現の脱制御を導くと考えられている(7,31)。また、遺伝子発現における Tax 関与の意味はそのような感染初期の段階のみならず、ATL 発症期における遺伝子発現という観点からも興味深い。なぜなら、感染初期において Tax により発現が誘導される遺伝子の多くが、Tax 発現のない ATL 発症期においても高い発現レベルで観察され、ATL の病態との深い関わりが示唆されるからである(32,33)。ここでは、Tax の *EVC1* 発現への影響を評価するため、まずはトランスフェクションが容易な 293T 過剰発現系を用いて、導入した Tax の影響を評価した(図 3 A)。その結果、10%FBS 存在下では Tax による mRNA レベルの変化は見られなかったものの、0.5%FBS 存在下では、Tax の濃度依存的な *EVC1* の発現レベルの上昇が見られた。さらに、Tax が宿主遺伝子発現を制御する主要経路の一つである NFκB 経路の関与についても検証するため、NFκB 活性化能の無い Tax M22 変異型を用いて(34)、*EVC1* 発現レベルを評価した。Tax M22 が NFκB 経路に影響を与えないことは、NFκB 標的遺伝子の一つである *PTHrP* の発現レベルが変化しないことによって確認された(35)(図 3 B)。*EVC1* に関しては M22 でも野生型 Tax と同等の発現上昇が確認され、Tax による *EVC1* 発現制御は NFκB 経路に非依存的であることが示唆された。

ここではさらに、Hh 活性化リガンドである *SHH* 発現における Tax および Tax 依存的な活性化 NFκB 経路の影響についても評価した(図 3 B)。過去の報告では、膵臓がん細胞において NFκB 依存的な *SHH* 発現上昇が自己分泌による Hh 経路の活性化を導き、そのことが膵臓がん細胞株の細胞生存に寄与することが示されている(36)。図 3 A で用いた 293T サンプルを qPCR により評価すると、Tax 野生型導入細胞では Tax 濃度依存的な *SHH* の発現上昇が確認されたが、Tax M22 導入細胞においては、同発現上昇傾向は観察されなかった。以上の結果から Tax は NFκB 経路を介して *SHH* 発現を制御していることが明らかとなった。(図 3 B)。

最後に、ここまで示した Tax の影響について T 細胞系での評価を行うため、重金属により Tax を発現誘導できる Jurkat 由来細胞株 JPX9 を用いてその影響

を評価した(37)。CdCl<sub>2</sub>による Tax タンパクの発現はウェスタンブロット法により確認した(図4A)。CdCl<sub>2</sub> 48時間で *EVC1* および *SHH* の発現レベルを評価すると、両遺伝子とも同条件下において Tax の量依存的な発現上昇を見せることがわかった(図4B)。しかしながら、*EVC1* については、Tax 誘導能のない Jurkat 細胞においても CdCl<sub>2</sub> 処理による発現レベルの上昇が見られたため(図4C)、Jurkat に Tax を強制発現させて、*EVC1* の発現レベルを評価した(図4D)。その結果、やはり Tax によって *EVC1* の発現が上昇することが明らかとなった。ここではさらに、CdCl<sub>2</sub> 処理 48 時間後の *SHH* 発現誘導 JPX9 細胞における Hh 活性化レベルを評価するため、Hh 標的遺伝子である *GLI1* の発現レベルを qPCR 法により評価した(図4B)。その結果、*SHH* 発現誘導の見られた 48 時間サンプルについて、*SHH* 発現レベルに相関した *GLI1* の発現上昇が観察された。*SHH* および *GLI1* の発現が CdCl<sub>2</sub> 自身の影響によらないことは、Jurkat 細胞を用いて確認された(図4C)。

ATL 細胞における *EVC1* 発現メカニズムについて検討するため、図1Cに示される *EVC1* と *EVC2* の間に存在するゲノム領域(さらに、*EVC1* および *EVC2* の第一エクソンおよび第一イントロンの途中までを含む)を、ブラウザでの結合転写因子予測サイト TFSEARCH によって解析した。図1では *EVC1* と *EVC2* の双方向性な制御が示唆されているため、双方向に制御する可能性がある転写因子についての解析結果を表1に示す。

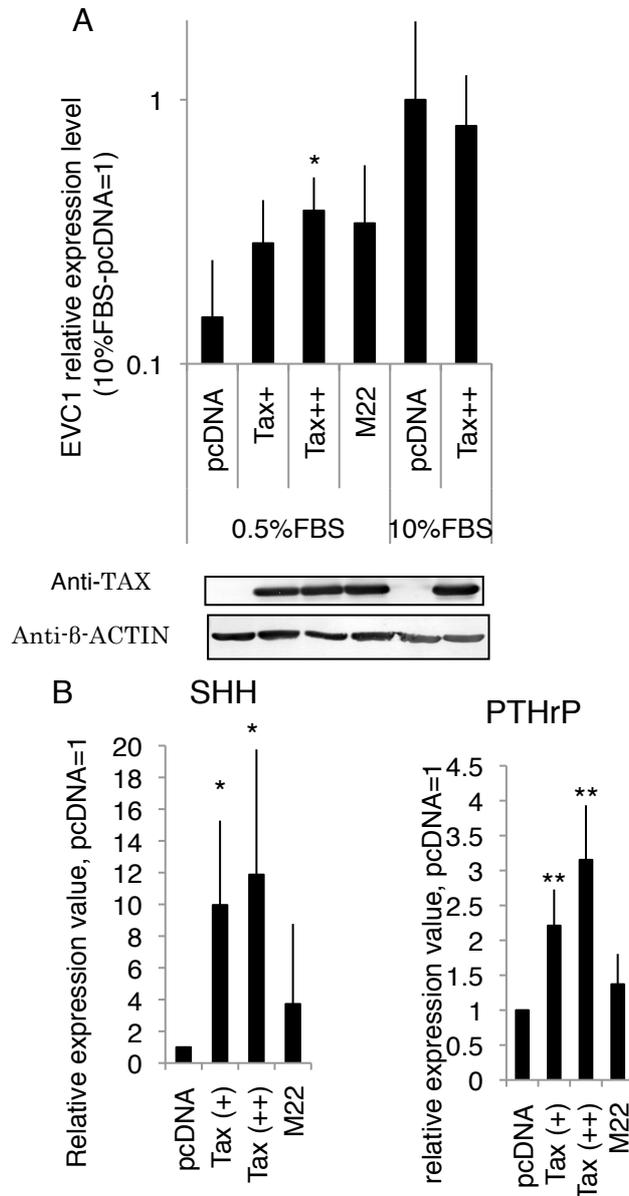


図3 HTLV-1 Taxは293T細胞における*EVC1*のmRNAレベルを正に制御する

(A) 横軸に示したプラスミドをトランスフェクションし0.5%または10%FBS条件下で60時間培養した293T細胞における*EVC1*の発現レベルを示す。++は+の四倍量のプラスミドを入れたことを示す。測定は定量PCR法により行い、*β-actin*の発現量で補正した各発現量を10%FBSを基準にして示す。有意差検定は各条件下のpcDNAのそれを対照に行った。ウェスタンブロット法によるTax(A中段)および*β-actin*(A下段)の発現レベルを示す。(B) Aで用いた0.5%サンプルについて*SHH*および*PTHrP*の発現量を定量PCRにより測定した。各発現量は*β-actin*のそれで補正し、pcDNAをその基準として示す。測定はqPCRにより行い、*β-actin*の発現量で補正した値を、pcDNAのそれを基準にして示す。\*\* ;  $p < 0.01$ 、\* ;  $p < 0.05$ 。

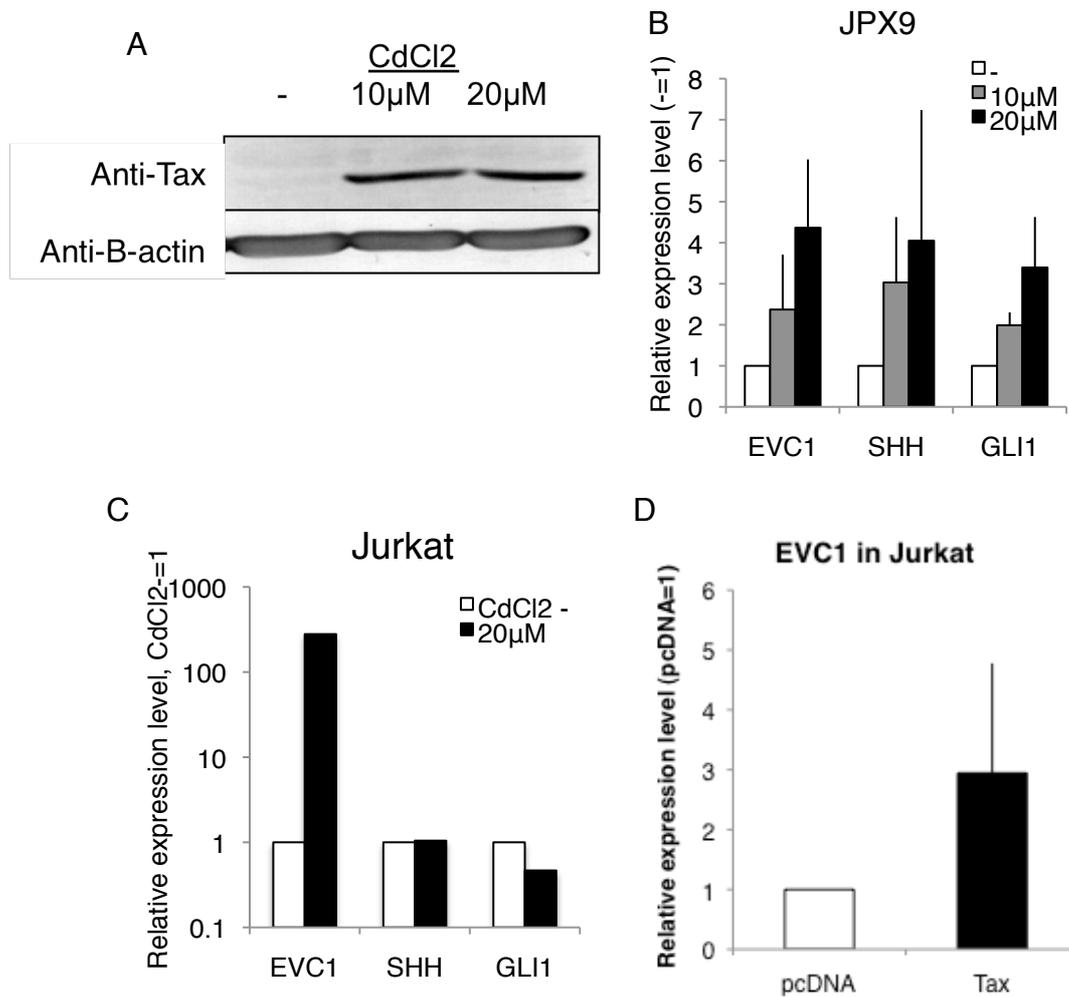


図4 HTLV-1 Tax は Jurkat 由来 T 細胞における *EVC1* の mRNA レベルを正に制御する

(A) CdCl<sub>2</sub> を記載した濃度で 48 時間処理した JPX9 細胞中の Tax および β-actin のタンパク量を示す。検出はウェスタンブロット法により行った。(B、C) A の条件下における JPX9 中 (B) および記載濃度の CdCl<sub>2</sub> を処理した Jurkat 細胞中 (C) の各遺伝子の発現量を示す。検出は qPCR により行い、β-actin の発現量で補正した値を CdCl<sub>2</sub> 未処理の発現値を基準にしてしめす。(D) Tax を強制発現させた Jurkat 細胞における *EVC1* の発現レベルをしめす。測定は qPCR により行い、β-actin の発現量で補正した値を、pcDNA のそれを基準にして示す。\*\* ; p<0.01、\* ; p<0.05。

Position	Transcriptio factor
129	NFkB
241	NMYC
1838	AP-1
2626	STATx

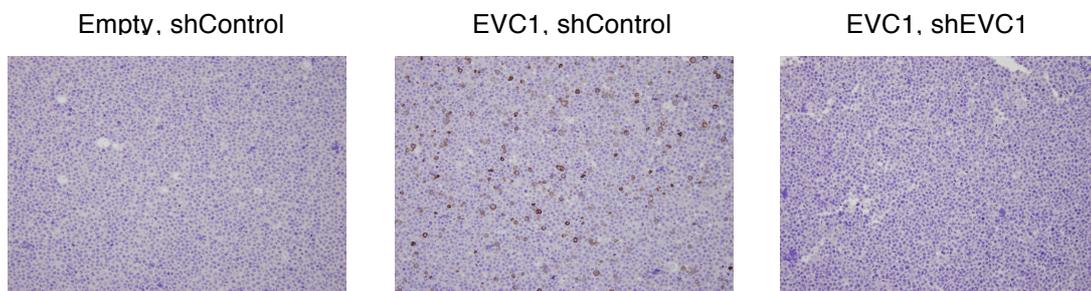
表1 双方向性プロモーターにより EVC1 および EVC2 両遺伝子の転写を制御する可能性のある転写因子群

EVC1 および EVC2 のそれぞれ第一イントロンを含むゲノム領域 4070bp を TFSEARCH によって解析した結果を示す。複数の転写因子の中から、配列的に双方向の可能性を持つもののみを選択して示す。Position は 1 を EVC2 のイントロン領域、4070 を EVC1 のイントロン領域に設定し、333 (332 側に進む。) および 2963 (2964 側に進む。) に EVC2 および EVC1 の転写開始点が存在する。

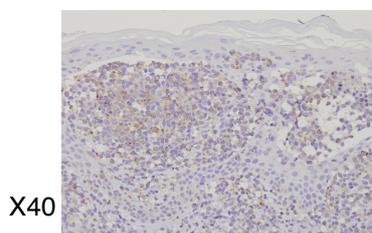
## ATL 細胞において EVC1 タンパクは免疫組織化学的に検出可能である

EVC1 機能探索の前提として、過剰発現 *EVC1* のタンパクレベルでの検出を試みた。ここでは、市販の抗 EVC1 抗体を用い、まずはその抗体の特異性を評価した。図 5 A では EVC1 発現プラスミドをトランスフェクションした 293T 細胞のパラフィン包埋切片を作製し、Immunohistochemistry (IHC) 法により、EVC1 の検出を試みた。その結果、EVC1 の強制発現により陽性像が検出されるようになり、EVC1 に対する shRNA を共発現させた細胞では EVC1 の陽性像が消失した。このことは導入した抗体が EVC1 を特異的に検出できていることを示している。この抗体を用いて ATL 細胞の臓器浸潤病理切片を染色すると、試料として用いた 7 症例全てにおいて EVC1 の陽性像が検出された (図 5 B、C)。特徴として全ての ATL 細胞で陽性が検出された訳ではないこと、いくつかの陽性パターンでドット状の陽性像が観察されたことが挙げられる。最後に ATL 細胞における EVC1 発現を確認するため、ATL 細胞を移植した ATL モデルマウスを作製し、それらの脾臓細胞を IHC により染色した (図 5 D、E)。その結果、ATL 細胞の浸潤が見られたマウスの症例においてのみ EVC1 の陽性像が検出され、ATL 細胞において確かに EVC1 が発現していることが確認された。

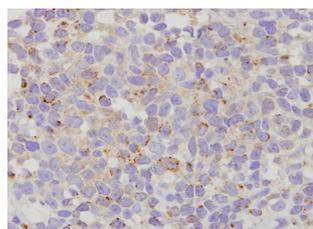
A



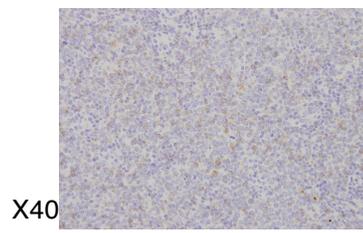
B skin



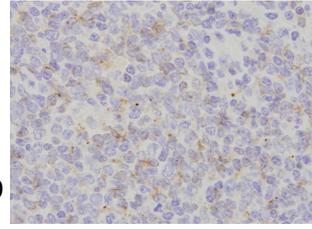
X100



C lymph node

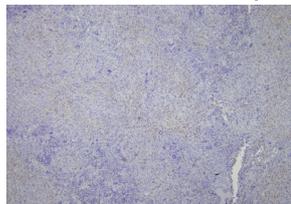


X100

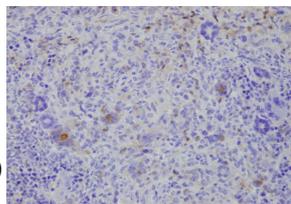


D ATL-invaded spleen

X40

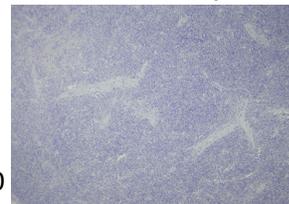


X100



E non-invaded spleen

X40



X100

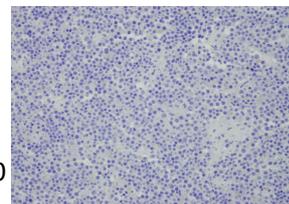


図5 ATL細胞においてEVC1は免疫組織化学的に検出可能である

(A-E) IHC法によるパラフィン包埋切片でのEVC1検出像を示す。:記載のプラスミドを共発現させた293Tサンプル(A)、ATL患者検体(B;皮膚病変、C;リンパ節病変(n=7)、代表例を示す)、ATL移植マウス脾臓切片(D;腫瘍浸潤あり(n=3)、代表例を示すE;腫瘍浸潤なし)。それぞれEVC1抗体とヘマトキシリンによって染色された。

## **EVC1** ノックダウンは **HTLV-1** 関連細胞株の **Hh** 経路活性の減弱を招く

*EVC1* は Ellis van creveled syndrome (EvC) の原因遺伝子として同定され、発生期の形態形成に深く関与していることが示唆されている (14)。*EVC1* がどのような分子間相互作用を経てそのような場に関与しているのかということについては不明な点が多いが、唯一具体的な働きの間を同定した報告によれば、*EVC1* が担うそれらの機能は **Hh** 経路に依って具現化されており、*EVC1* が **Hh** シグナル伝達に正に寄与しているということを示している (15)。一方で **Hh** 経路については、前述の通り発生初期の形態形成に大きな役割を担っていることが知られているが、近年は種々の幹細胞の生存にも重要であることが示されている (20)。さらには、その異常な活性化ががん細胞の生存や増殖に寄与しているとの報告もあり、制御を逸脱した **Hh** 経路の恒常的活性化が確認された種々のがん細胞においては、経路の阻害により細胞死が誘導されることが示されている (38)。これらの情報に基づき、私は **HTLV-1** 感染細胞では **Hh** 経路ががん細胞の生存や増殖に正に働き、過剰発現した *EVC1* もそのことに大きく関与しているとの仮説を立て、以下の検討を行った。

過剰発現した *EVC1* が T 細胞における **Hh** 経路内で働いているのか否かという疑問について検討するとともに、**HTLV-1** 感染細胞における **Hh** 経路の実態についても検証するため、*EVC1* ノックダウンおよび **Hh** 経路特異的な転写因子である *GLI1* および *GLI2* ノックダウン細胞株の樹立を行った (図 6 A)。*EVC1* ノックアウトマウスでは、**Hh** リガンドへの応答性が欠如することが示されており、もし、**HTLV-1** 感染細胞において **Hh** 経路の活性化が起これ、且つ、*EVC1* が同経路に関与しているとすれば、*EVC1* ノックダウン細胞では、**Hh** 経路の減弱が予想される (15)。一般に **Hh** 経路の活性化状態は経路の標的遺伝子の発現レベルによって評価されるため (39,40)、ここでもそれらの値を調べることで系の活性化状態の評価とした。図 6 B では、MT2 細胞株における各ノックダウンの効率と **Hh** 標的遺伝子である *GLI1* および *PTCH1* の発現量を評価した。その結果、各細胞におけるノックダウンと上記 **Hh** 標的遺伝子発現レベルの減少を観察した。

さらに、同ノックダウン細胞内の **Hh** 活性について、**Hh** 活性レポータープラスミドを用いてもその評価を行った (28) (図 7)。まずは、七つの *GLI* 結合配列を搭載したレポータープラスミドを作製し、同レポーターの **Hh** 経路活性への反応性を *GLI2* の恒常的活性化型変異体 *GLI2ΔN* を用いて確認した。(図 7 B)

続いて、MT2 および TLom1 の両細胞株における *GLI1*、*GLI2*、*EVC1* の各ノックダウンによる Hh 経路活性を評価したところ、TLom1 の *GLI2* ノックダウンを除いて、全てのノックダウン細胞でコントロールから平均 30%程度の Hh レポーター活性の減弱が観察された (図 7 C)。

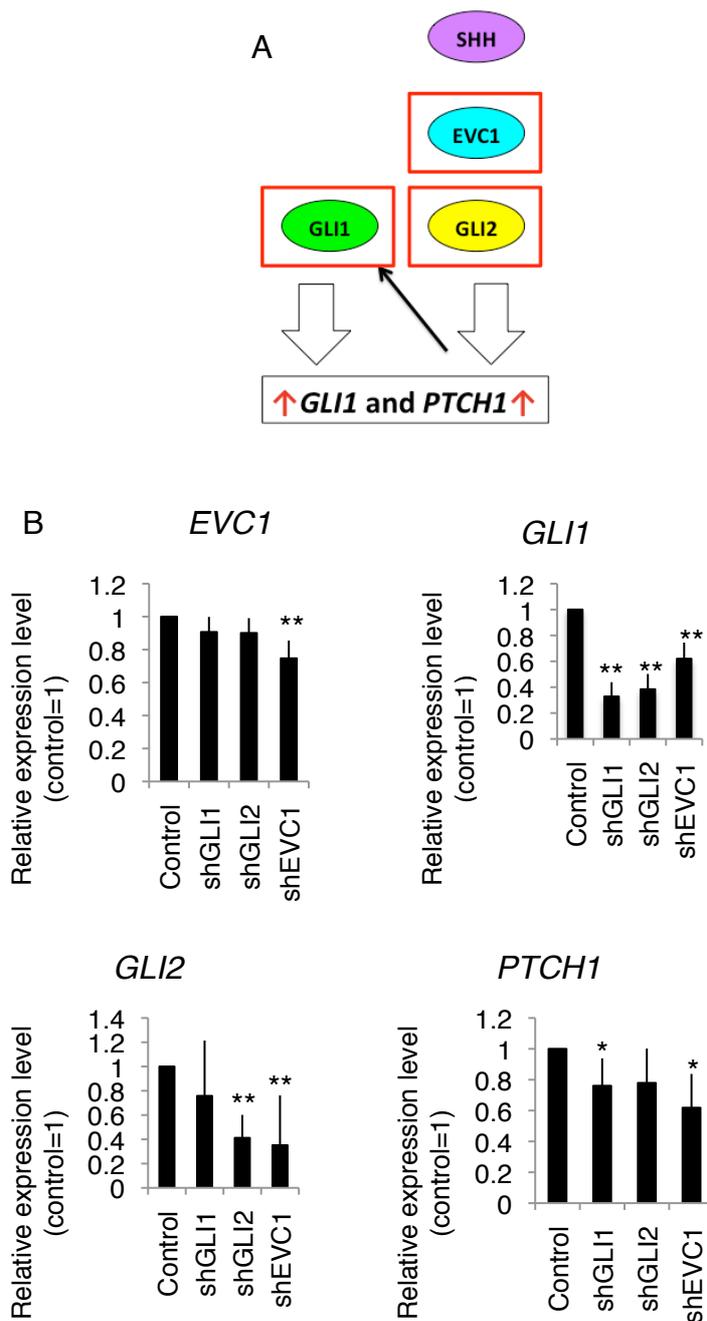


図6 HTLV-1 関連細胞株における *EVC1* ノックダウンは Hh 標的遺伝子の発現低下を導く

(A) Hh 経路の簡便な経路図を示す。赤枠で括ったものは今回のノックダウンの標的を、黒枠で囲われた *GLI1*, *PTCH1* は Hh 経路の標的遺伝子を示す。(B) MT2 由来の各ノックダウン細胞における各遺伝子の発現レベルを示す。各値は定量 PCR により測定され、*β-actin* のそれで補正された。それぞれ、少なくとも 4 回の独立した実験を行い、その平均と標準偏差を Control を基準にして示す。\*\* ;  $p < 0.01$ 、\* ;  $p < 0.05$ 。

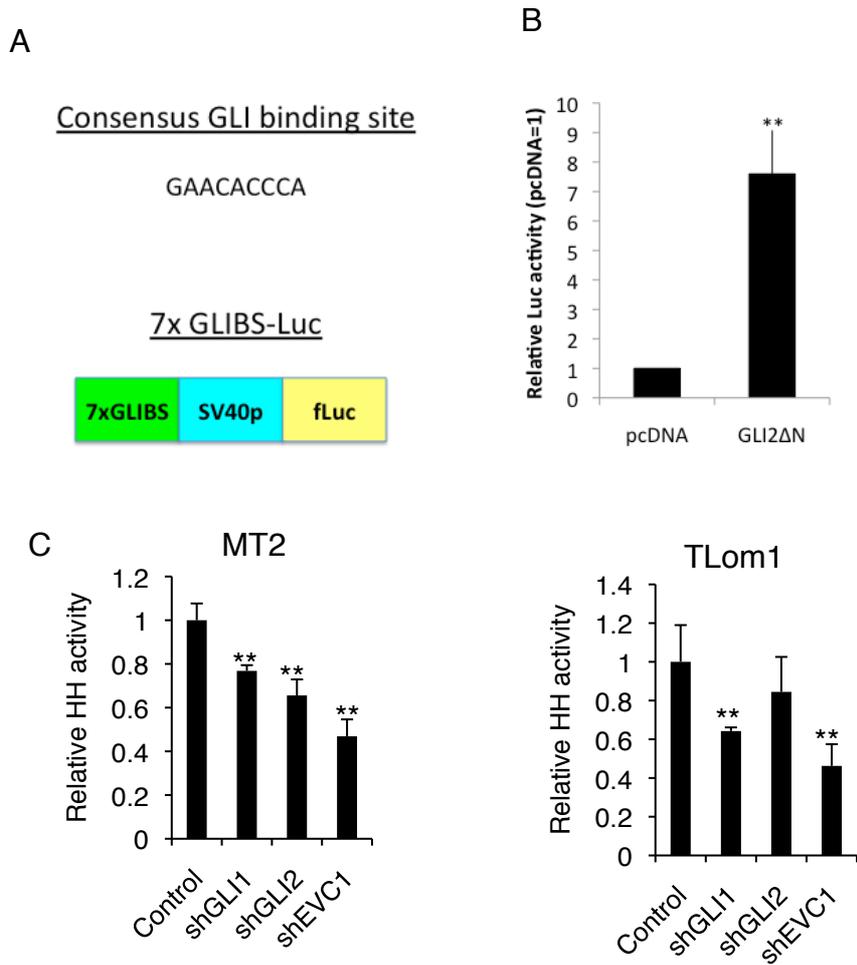
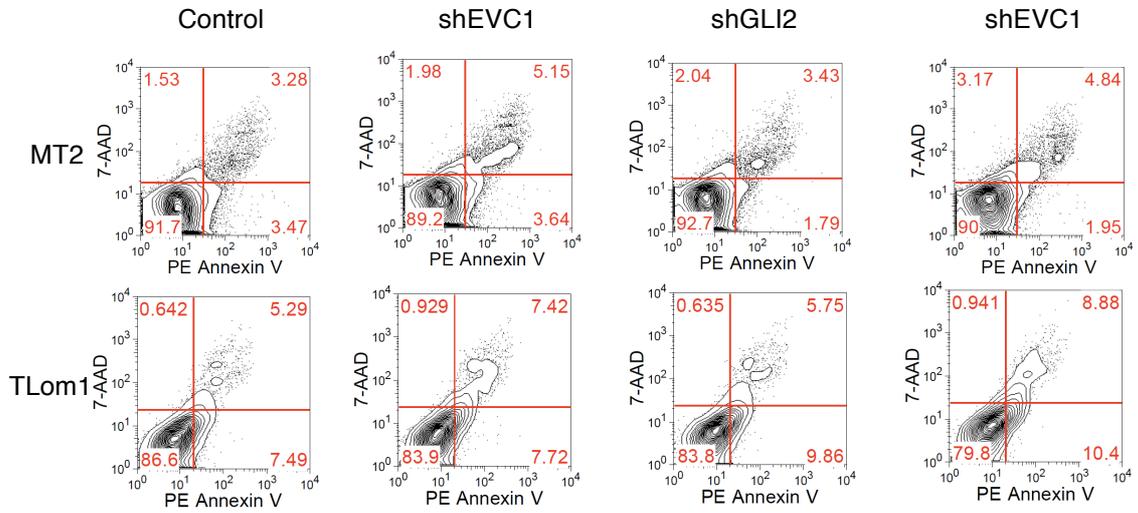


図7 *EVC1* ノックダウンは HTLV-1 関連細胞株における Hh 経路活性の減弱を招く  
 (A) GLI 結合配列とそれを七つ搭載した 7xGLIBS Hh 活性レポーターの図を示す。  
 SV40p; SV40 の basal プロモーター、fLuc; firefly luciferase。 (B) GLI2 の恒常的活性化  
 フォーム GLI2ΔN をトランスフェクションした 293T 細胞における 7xGLIBS レポーター  
 の値を、pcDNA のそれを基準にして示す。両サンプルのトランスフェクション量は参照  
 用の renilla Luc の値で補正された。 (C) MT2 および TLom1 由来の各ノックダウン細胞  
 における HH 活性を HH レポータープラスミドを用い、Luc アッセイによって測定した。  
 トランスフェクション効率は renilla の活性で補正した。 (B、C) 少なくとも 3 回の独立  
 した実験を行い、その平均と標準偏差を control を基準にして示す。 \*\* ; p<0.01、 \* ;  
 p<0.05。

### ***EVC1* ノックダウンは HTLV-1 関連細胞株にアポトーシスを誘導する**

近年、様々ながん細胞で Hh 経路異常とそれによる生存への寄与が報告されている(19)。ここでは、ATL 細胞における *EVC1* 過剰発現および Hh 経路の細胞生存への影響を評価するため、図 6 で樹立した *EVC1* ノックダウン細胞を用いて、アポトーシスアッセイを行った。しかしながら、10%FBS 存在下でのアッセイでは、Hh 阻害のコントロールとして用いた *GLI* ノックダウン細胞を含め、*EVC1* をノックダウンした MT2 および TLom1 両細胞株で、アポトーシスの誘導は観察されなかった (図 8 A)。通常の 10%FBS 条件下では、培地血清中の成長因子等の影響により、細胞自体の反応が検出できない可能性があり、過去の Hh 研究においても血清濃度の調整がなされていたため(41)、ここでは、1%FBS 条件下において、アポトーシス細胞の割合を評価した (図 8 B)。その結果、MT2 および TLom1 両細胞株において *EVC1* および *GLI1* ノックダウンによるアポトーシスの誘導が観察された。*GLI2* のノックダウンでは MT2 および TLom1 とともに、アポトーシスの誘導は観察されなかった。

A 10%FBS



B 1%FBS

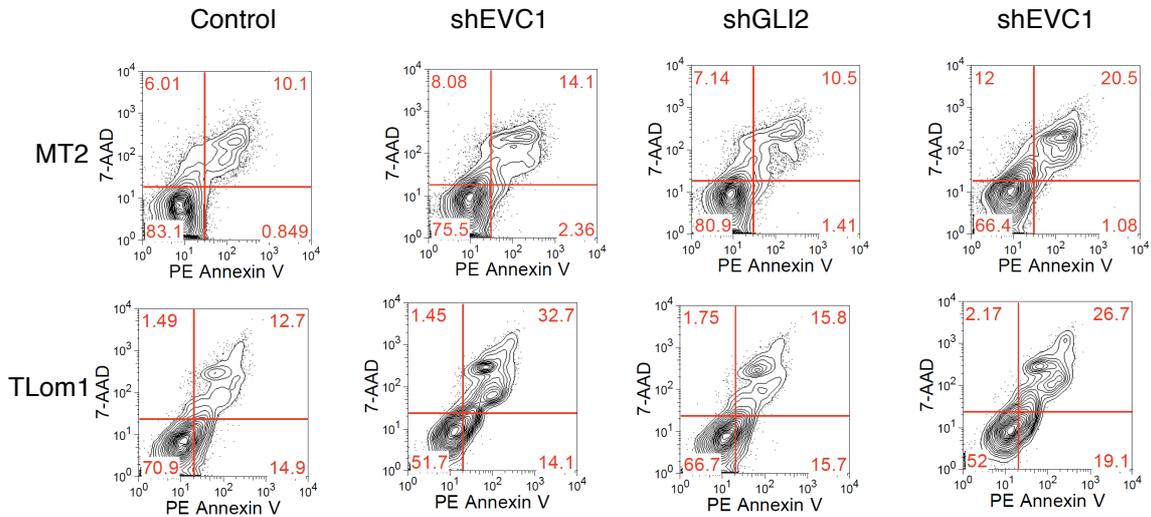


図8 *EVC1* ノックダウンは HTLV-1 関連細胞株にアポトーシスを誘導する

(A,B) MT2 (uppers) および TLom1 (lowers) の各ノックダウン細胞におけるアポトーシスを 10%FBS (A) および 1%FBS (B) 培地中で評価した。同条件下で 72 時間の培養の後、shRNA 安定発現細胞は Venus によって識別し、同細胞集団における Annexin V および 7-AAD の陽性細胞を FACS によって解析し、その割合を百分率で示す。図は独立に樹立した二回の細胞セットの内の代表例を示す。

## Hh 阻害剤 GANT61 は HTLV-1 関連細胞株の生存率の低下およびアポトーシスを誘導する

図 8 によって示された Hh 経路が HTLV-1 関連細胞株の細胞生存へ寄与している可能性について確認するため、ここでは Hh 特異的阻害剤 GANT61 (図 9 A) 用いて、MT2 および TLom1 細胞の細胞生存率およびアポトーシスについて評価を行った。GANT61 は Hh 経路転写因子 GLI ファミリーの DNA 結合を阻害する薬剤として同定され(39)、Hh 経路特異的阻害剤として広く Hh 研究に用いられている。まずは、GANT61 の Hh 経路阻害の実態を確認するため Hh 標的遺伝子である *GLI1* および *PTCH1* の発現レベルを評価した (図 9 B)。GANT61 を処理した MT2 細胞において両遺伝子の発現レベルを評価したところ、GANT61 処理による両標的遺伝子の発現抑制が観察された。続いて、GANT61 による細胞生存への影響を、GANT61 処理の時間依存および濃度依存の観点から検討を行った。ここでは、MT2 および TLom1 の他に、HTLV-1 非感染 T 細胞株 Jurkat および Molt4 細胞もアッセイに用いた。その結果、HTLV-1 関連細胞特異的に、GANT61 の時間依存的および濃度依存的な細胞生存率の低下が確認された (図 10 A、B)。続いて、これらの細胞についてアポトーシスの誘導を確認したところ、MT2 および TLom1 において GANT61 の濃度依存的なアポトーシスの誘導が検出された (図 10 C)。

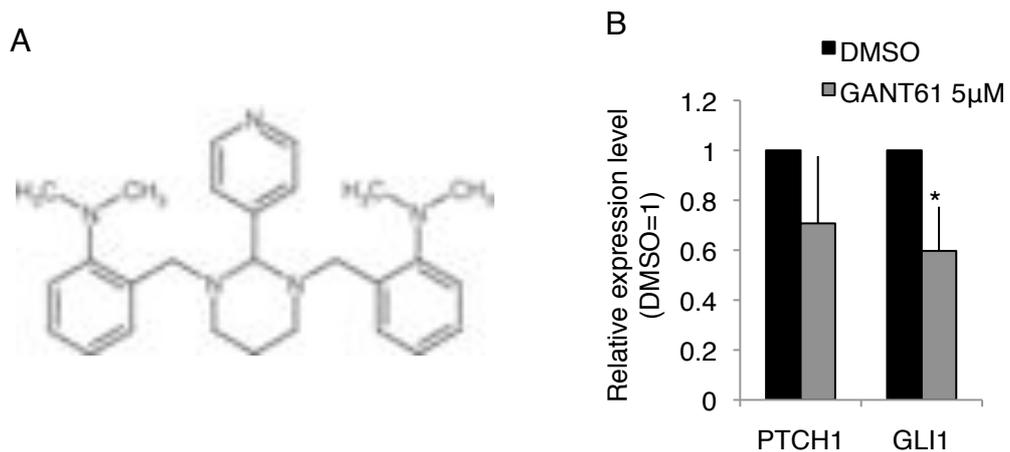


図9 Hh 経路阻害剤 GANT61 は MT2 細胞における Hh 表的遺伝子の発現量を低下させる

(A) GANT61 の化学構造式。(B) 5μM で 72 時間処理した MT2 細胞中の各遺伝子の発現レベル。測定は PCR により行い、β-actin の発現量で補正した各値を、DMSO のそれを基準にして示す。少なくとも 3 回の独立した実験を行い、その平均と標準偏差を示す。少なくとも、独立した 3 回の実験を行い、その平均と標準偏差を示す。\*\* ; p<0.01、\* ; p<0.05。

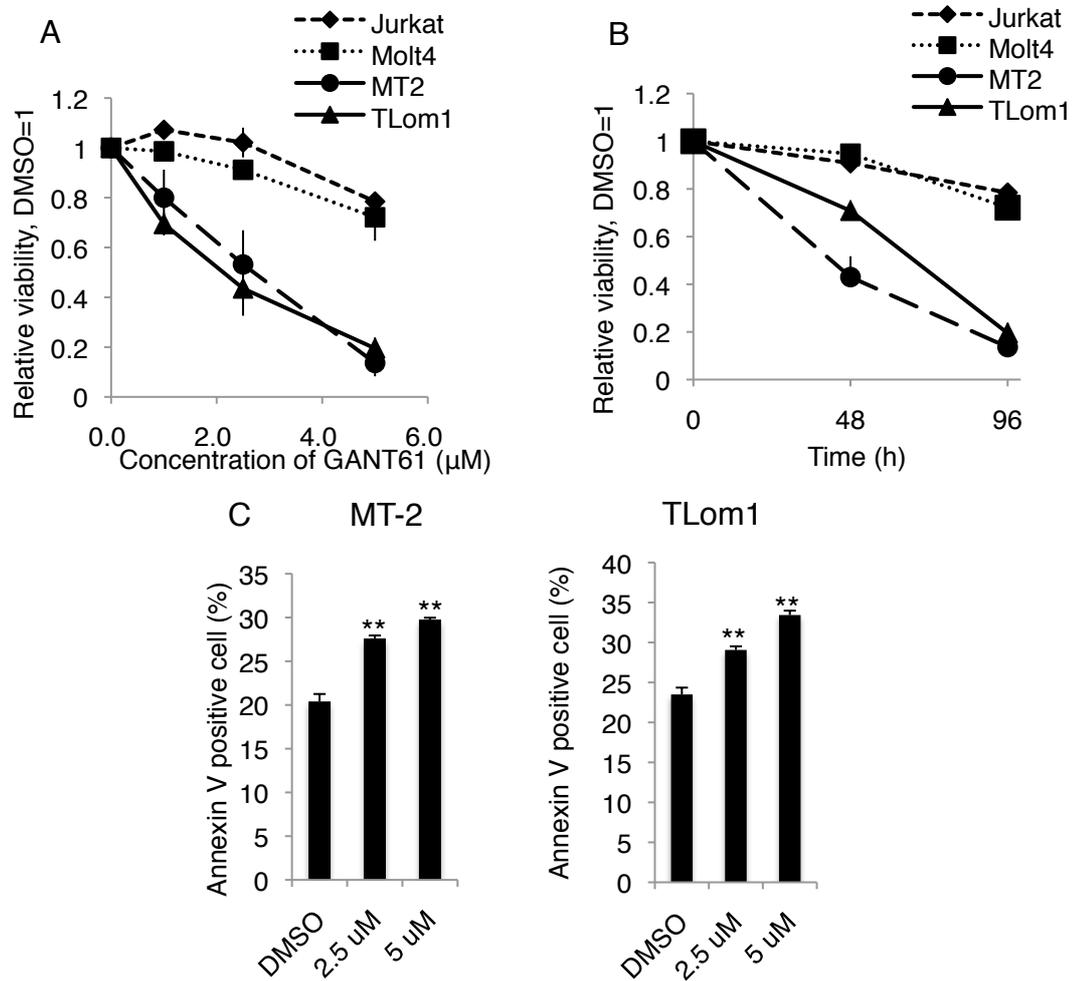


図10 Hh 経路阻害剤 GANT61 は HTLV-1 関連細胞株の細胞生存率の低下およびアポトーシスを誘導する

(A、B) 記載した4種の細胞株に対し、示した GANT61 濃度で 96 時間処理した場合 (A) と GANT61 5 $\mu$ M で示した時間だけ処理した場合 (B) の細胞生存率を示す。生細胞数は wst-8 法により評価し、どちらも同時間の DMSO 処理サンプルの値を基準にして細胞生存率を算出した。少なくとも3回の独立した実験を行い、その平均と標準偏差を示す。(D) 1%FBS 培地中で記載した濃度の GANT61 を 72 時間処理した MT2 および TLom1 細胞中の Annexin V 陽性細胞の割合を示す。Annexin V 陽性細胞の割合は FACS を用いて解析した。少なくとも、独立した3回の実験を行い、その平均と標準偏差を示す。\*\* ;  $p < 0.01$ 、\* ;  $p < 0.05$ 。

## **GANT61 は ATL 患者検体の細胞生存率の低下およびアポトーシスを誘導する**

最後に、ATL 患者由来の PBMC を用いて ATL 細胞における Hh 経路の影響を評価するため、細胞株と同様に生存率およびアポトーシスの評価を行った。HTLV-1 キャリア PBMC および健常人由来 PBMC においては、GANT61 処理による細胞生存率の低下は見られなかったものの、ATL 患者 PBMC ではそれらの二群と比較して有意な生存率の低下が確認された (図 1 1 A)。アポトーシスの誘導に関しても、GANT61 処理により GANT61 濃度依存的な ATL 細胞へのアポトーシス誘導が観察された (図 1 1 B)。過去に報告がある通り(42)、今回の結果でも GANT61 が正常血球細胞にはアポトーシスを誘導しないことが示された。

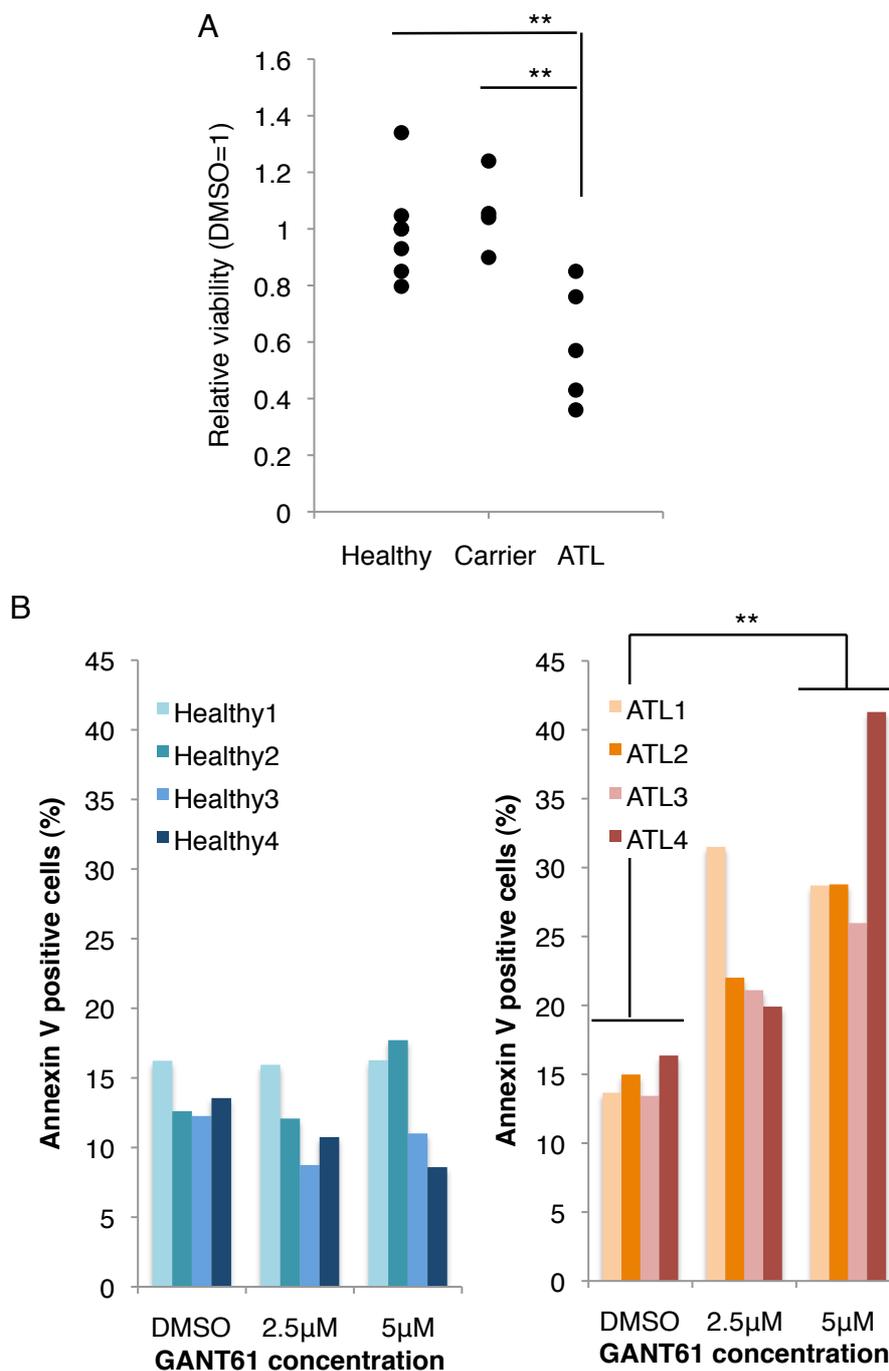


図 1 1 GANT61 は ATL 患者検体の細胞生存率の低下およびアポトーシスを誘導する  
 (A) 1%自己血清培地中で各 PBMC を GANT61 5μM で 72 時間処理した場合の細胞生存率を示す。生細胞数は wst-8 法により評価し、同時間における DMSO 処理サンプルの値を基準として各値をプロットした。Healthy; n=7, Carrier; n=4, ATL; n=5。 (B) 上と同一条件下における健常人 (青 ; n=4) および ATL (赤 ; n=4) 由来 PBMC 中での Annexin V 陽性細胞の割合を示す。Annexin V 陽性細胞の割合は FACS を用いて解析した。\*\* ; p<0.01。

## 4、考察

### HTLV-1 感染 T 細胞株および ATL 細胞での *EVC1* 過剰発現と ATL 細胞マーカーとしての可能性

本研究では ATL 細胞および HTLV-1 関連細胞株における *EVC1* の過剰発現の存在を明らかにした。このことは、*EVC1* の ATL 細胞マーカーとしての有用性を示唆している。細胞株の発現データより *EVC1* の過剰発現は HTLV-1 感染細胞に特徴的な現象であると判断されるが、ATL が感染細胞の異常増殖によって定義され、且つ本研究においても病型と *EVC1* 発現量の間に関与性が見られたことは (図 1 A、B)、*EVC1* のリスクファクターとしての可能性を示している。さらに、*EVC1* が膜近傍の cilia に局在するという過去の報告や(43)、今回 IHC によってタンパクレベルでの検出が可能であったことは、*EVC1* の診断マーカーとしての実現可能性を強く示唆している (図 4)。また、マーカーとしての可能性を議論する上では、今回 *EVC1* と同様に、ATL 細胞での過剰発現が示唆された *EVC2* についてもその可能性を議論すべきである。*EVC2* は構造的に細胞外ドメインを有することが報告されており(13)、そのことは臨床応用において非常に有利な点である。*EVC2* の過剰発現の確認およびマーカーとしての有用性については今後取り組むべき大きな課題の一つである。

### ATL 細胞における Hh 経路活性化とその機能的意義

本研究では過剰発現 *EVC1* の ATL 細胞内における機能的意義を追究する過程で、同細胞内における Hh 経路の活性化の可能性を明らかにし、それが、ATL 細胞生存に強く寄与していることを示した。これまで、各種がん細胞における異常 Hh 経路の表現系への影響としても、細胞増殖や生存へ寄与するとの報告がなされており(19,38)、それらのがん細胞と同様の影響が ATL 細胞においても示されたことになる。このことは、ATL の治療を考える上での Hh 経路の治療標的としての有用性を示唆しており、本研究内でも GANT61 によってその可能性が示された。他のがん治療において臨床応用が検討される Hh 阻害薬の ATL 治療薬としての応用を期待させる(22,23)。

### HTLV-1 関連細胞株における過剰発現 *EVC1* の機能的役割

本研究では、過剰発現 *EVC1* の ATL 細胞における機能的な役割として、同遺

伝子の Hh 経路への関与の可能性を示した。これまで EVC1 についてはノックアウトによって Hh 経路への影響が示されていたが(15)、本研究結果はノックダウンという量的な変化によって、Hh 経路活性を変化させることが出来ることを明らかにした。このことは EVC1 発現量と同経路活性との関係を強く示唆している。しかしながら、CdCl<sub>2</sub> 処理をした Jurkat 細胞での実験結果から判断すると、EVC1 の発現にも関わらず、Hh 活性化の指標となる GLI1 の発現低下が観察され、EVC1 単独での過剰発現によって同経路の活性化が導かれるのではないことが示唆されると同時に、ATL 細胞や HTLV-1 関連細胞株における EVC1 上流域に Hh 活性化因子の存在を示唆している。具体的に EVC1 が関与する Hh 経路ステップとしては、ノックダウンの実験より GLI1 と GLI2 の上流に位置することが示唆され、過去の報告から示唆されるステップでの役割を強く支持した。前述の通り、Hh 経路自体が ATL 細胞生存に正に寄与していることが明らかになったため、同経路因子として過剰発現が確認された EVC1 もその治療標的となり得る可能性が強く示唆された。

### EVC1 mRNA 発現メカニズムについて

本研究では、293T 細胞および JPX9 細胞において Tax タンパクにより EVC1 の mRNA レベルが上昇することを明らかにした。このことは、HTLV-1 感染細胞内の EVC1 過剰発現への Tax の関与を示唆するものであり、未だ明確な転写因子が明らかにされていない EVC1 の転写メカニズムにおける新規の情報となる。Tax の具体的な転写制御機構については、本研究では、Tax が担う転写脱制御の重要な一経路である NFκB 経路の EVC1 発現へはほぼ関与していないと推測されるデータを得た(図3)。Tax が検出されない ATL 細胞における EVC1 発現メカニズムについては、今回明らかになった双方向性プロモーターによる制御の可能性(図1)とコンピュータでの予測による EVC1 と EVC2 の転写開始点に挟まれた領域に結合配列を持つ転写因子群(表1)、さらには過去に ATL において脱制御が示された転写因子の情報を基に AP-1 にその転写制御の可能性があるのでないかと考えている(44)。このことについては、今後より詳細な研究により検討する必要がある。

Tax が EVC1 の mRNA 量を制御することは HTLV-1 のウイルス学を理解する上で重要な情報となるかもしれない。これまでに単発の報告で HTLV-1 感染細胞株の一つ HUT102 細胞において GLI2 の活性化フォームが HTLV-1 LTR

からの転写に関わっているとの報告があった(24)。今回 Tax が Hh コンポーネントとして EVC1 だけでなく、SHH の発現まで制御することが明らかになり、HTLV-1 ウイルスと Hh シグナルのより強い関係性が示唆された。今後は腫瘍化のみならず、ウイルスまでも含めた包括的な視点で Hh 研究を進めて行くことが、HTLV-1 感染に端を発する多段階発がんモデルが提唱される ATL の病態把握において重要であると考えている。

## 5、結論

本研究では、ATL 細胞での過剰発現が示唆されていた *EVC1* 遺伝子に着目し、がんの進行に応じて上昇する遺伝子発現パターンを明らかにするとともに、ATL 患者検体においてタンパクレベルでの検出が可能であることを明らかにした。*EVC1* の機能的意義を追究する過程で、ATL 細胞における Hh 経路活性化とその細胞生存への寄与の可能性を明らかにした。*EVC1* については、細胞株を用いた実験から、Hh シグナル伝達を正に制御し、少なくとも Hh 経路を介して ATL 細胞の生存へ寄与している可能性を示した。本研究により、ATL 細胞の新たな特性を示すとともに、ATL の細胞マーカーおよび治療標的としての *EVC1* および Hh 経路の可能性を提示することができた。

## 6、謝辞

本研究の機会を頂き、懇切なるご指導とご援助を賜りました、東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻の渡邊俊樹教授に謹んで深謝致します。

本研究を遂行するに際し貴重なご助言、ご協力をいただきました東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻の佐藤均准教授、中野和民助教、山岸誠博士、矢持忠徳博士に深謝致します。

本研究において、EVC1 の免疫組織染色を快諾し、貴重な病理標本を提供してくださった、昭和大学医学部第二病理学教室の矢持淑子講師並びに佐々木陽介技官に深謝致します。

本研究を遂行するに際し、貴重なご助言、ご協力、多くの励ましをいただきました東京大学新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻病態医療科学分野の皆様へ感謝致します。

最後に、終始援助し、励まし、支えてくれた家族に深く感謝致します。

## 6、参考文献

1. Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K., and Uchino, H. (1977) *Blood*. 50 (3), 481-492
2. Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D., and Gallo, R. C. (1980) *Proc Nat Acad Sci USA* 77 (12), 7415-7419
3. Yoshida, M., Miyoshi, I., and Hinuma, Y. (1982) *Proc Nat Acad Sci USA*. 79 (6), 2031-2035
4. Utsunomiya, A., Miyazaki, Y., Takatsuka Y. et al, (2001) *Bone Marrow Transplant*, 27, 15-20
5. Matsuoka, M., and Jeang, K. T. (2007) *Nat rev* 7 (4), 270-280
6. Okamoto T, Ohno Y, Tsugane S, Watanabe S, Shimoyama M, Tajima K, Miwa M, Shimotohno K. (1989) *Jpn J Cancer Res*. 80(3), 191-5.
7. Hall WW, Fujii M. (2005) *Oncogene*. 24(39), 5965-75
8. Horie R. NF-kappaB in pathogenesis and treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma. (2007) *Int Rev Immunol*. 26(5-6), 269-81.
9. Nosaka K, Miyamoto T, Sakai T, Mitsuya H, Suda T, Matsuoka M. (2002) *Blood*. 99(2), 634-40.
10. Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, Akamatsu E, Fukami T, Hidaka T, Kubuki Y, Okayama A, Hamada K, Okabe H, Murakami Y, Tsubouchi H, Morishita K. (2005) *Blood*. 105(3),1204-13.
11. Perou CM, Sørliie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. (2000) *Nature* 406, 747-752.
12. Bertucci F, Viens P, Tagett R, Nguyen C, Houlgatte R, Birnbaum D. (2003) *Lab Invest*. 83(3), 305-16.
13. Blair HJ, Tompson S, Liu YN, Campbell J, MacArthur K, Ponting CP, Ruiz-Perez VL, Goodship JA. (2011) *BMC Biol*. 9, 14
14. Tompson SW, Ruiz-Perez VL, Blair HJ, Barton S, Navarro V, Robson JL, Wright MJ, Goodship JA. (2007) *Hum Genet*. 120, 663-70.

15. Ruiz-Perez VL, Blair HJ, Rodriguez-Andres ME, Blanco MJ, Wilson A, Liu YN, Miles C, Peters H, Goodship JA. (2007) *Development*.134(16), 2903-12.
16. Ruiz-Perez VL, Goodship JA. (2009) *Am J Med Genet C Semin Med Genet*.15:151C(4):341-51.
17. Ingham PW. (1993) *Nature*. 366(6455), 560-2.
18. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH Jr, Scott MP. (1996) *Science*. 272(5268), 1668-71.
19. Low JA, de Sauvage FJ. (2010) *J Clin Oncol*. [Epub ahead of print]
20. Alison MR, Lim SM, Nicholson LJ. (2011) *J Pathol*. 223(2), 148-62.
21. Cohen MM Jr. (2010) *Am J Med Genet A*. 152A(8), 1875-914.
22. Jennifer A. Low and Frederic J. de Sauvage. (2010) *JCO*. 27, 9943
23. Merchant AA, Matsui W. (2010) *Clin Cancer Res*. 16(12),3130-40.
24. Tanimura A, Dan S, Yoshida M. (1998) *J Virol*. 72(5), 3958-64.
25. Jagani Z, Mora-Bianco EL, Sansam CG, McKenna ES, Wilson B, Chen D, Klekota J, Tamayo P, Nguyen PT, Tolstorukov M, Park PJ, Cho YJ, Hsiao K, Buonamici S, Pomery SL, Mesirov JP, Ruffner H, Bouwmeester T, Luchansky SJ, Murtie J, Kelleher JF, Warmuth M, Sellers WR, Roberts CW, Dorsch M. (2010) *Nat Med*. 16(12), 1429-33
26. Thiyagarajan S, Bhatia N, Reagan-Shaw S, Cozma D, Thomas-Tikhonenko A, Ahmad N, Spiegeiman VS. (2007) *Cancer Res*. 67(22), 10642-6.
27. Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi Y, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. (2012) *Cancer cell*. 21(1), 121-135.
28. Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. (1997) *Development*. 124(7), 1313-22.
29. Shen W, Han D, Zhang J, Zhao H, Feng H. (2011) *Am J Med Genet A*. 155A(9), 2131-6

30. Kristen Lipscomb Sund, Stephanie Roelker, Vijaya Ramachandran, Lisa Durbin and D. Woodrow Benson. (2009) *Human Molecular Genetics*. 18(10), 1813–1824.
31. Boxus M, Twizere JC, Legros S, Dewulf JF, Kettmann R, Willems L. (2008) *Retrovirology*. 5, 76
32. Mori N, Nunokawa Y, Yamada Y, Ikeda S, Tomonaga M, Yamamoto N. (1999) *Blood*. 94(8), 2862-70
33. Mori N, Sato H, Hayashibara T, Senba M, Hayashi T, Yamada Y, Kamihira S, Ikeda S, Yamasaki Y, Morikawa S, Tomonaga M, Geleziunas R, Yamamoto N. (2002) *Blood*. 99(4), 1341-9
34. Geleziunas R, Ferrell S, Lin X, Mu Y, Cunningham ET Jr, Grant M, Connelly MA, Hambor JE, Marcu KB, Greene WC. (1998) *Mol Cell Biol*. 18(9), 5157-65.
35. Nadella MV, Dirksen WP, Nadella KS, Shu S, Cheng AS, Morgenstern JA, Richard V, Fernandez SA, Huang TH, Guttridge D, Rosol TJ. (2007) *Leukemia*. 21(8), 1752-62
36. Nkashima H, Nakamura M, Yamaguchi H, Yamanaka N, Akiyoshi T, Koga K, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M, Tanaka M, Katano M. (2006) *Cancer Res*. 66(14), 7041-9.
37. Kamoi K, Yamamoto K, Misawa A, Miyake A, Ishida T, Tanaka Y, Mochizuki M, Watanabe T. (2006) *Retrovirology*. 3, 5.
38. Xie J. (2008) *Curr Oncol Rep*. 10(2), 107-13.
39. Lauth M, Bergström A, Shimokawa T, Toftgård R. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(20), 8455-60.
40. Shahi MH, Afzai M, Sinha S, Eberhart CG, Rey JA, Fan X, Castreasana JS. (2010) *BMC Cancer*. 10, 614.
41. Walter K, Omura N, Hong SM, Griffith M, Vincent A, Borges M, Goggins M. (2010) *Clin Cancer Res*. 16(6), 1781-9.
42. Desch P, Asslaber D, Kern D, Schnidar H, Mangelberger D, Alinger B, Stoecher M, Hofbauer SW, Neureiter D, Tinhofer I, Aberger F, Hartmann TN, Greil R. (2010) *Oncogene*. 29(35), 4885-95.

43. Pacheco M, Valencia M, Caparros-Martin JA, Muleto F, Goodship JA, Ruiz-Perez VL. (2012) *Bone*. 50(1), 28-41.

44. Mori N, Fujii M, Iwai K, Ikeda S, Yamasaki Y, Hara T, Yamada Y, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N. (2000) *Blood*. 95(12), 3915-21.