

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 Tax 蛋白による T 細胞の IL-2 非依存性細胞増殖誘導機構

新潟大学医学部ウイルス学教室

藤 井 雅 寛

Molecular Mechanism of T-Cell Transformation by
Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Protein

Masahiro FUJII

*Department of Virology
Niigata University School of Medicine*

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is the etiologic agent of adult T-cell leukemia. Tax, the viral protein, is thought to be crucial in the development of the disease, since it is transforming in vitro and induces tumors in transgenic animals. We examined the effect of Tax activity on the growth of an interleukin (IL)-2-dependent T-cell line, CTLL-2. A stable expression of Tax in CTLL-2 converted cell growth from being IL-2-dependent to IL-2-independent. Tax stimulated the transcription through NF-kB and cAMP responsive element like sequence (CRE) in HTLV-1 promoter. Tax mutants segregating these two pathways suggested that the NF-kB pathway was essential for IL-2-independent growth of CTLL-2, while that of CRE was unnecessary. The level of Tax expression in five IL-2-dependent HTLV-1-transformed T-cell lines positively correlated with their survival length in the absence of IL-2. Three IL-2-independent cell lines expressed more Tax protein than most of IL-2-dependent ones. However, one IL-2-dependent cell lines expressed Tax equivalently to that of IL-2-independent ones, and it was still IL-2-dependent. These results sug-

Reprint requests to: Masahiro FUJII,
M. D., Ph. D.
Department of Virology Niigata University
School of Medicine 1-757 Asahimachi-Dori,
Niigata 951-8510 JAPAN.

別刷請求先：
〒951-8510 新潟市旭町通1番町757番地
新潟大学医学部ウイルス学講座 藤井雅寛
E-mail: fujiimas@med.niigata-u.ac.jp

gested that Tax in enough amount is required but not sufficient for long-term IL-2-independent proliferation of virus-infected T-cell lines.

Key words: Tax, HTLV-1, IL-2, NF- κ B

成人 T 細胞白血病, ヒト T 細胞白血病ウイルス

序

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) は成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia; ATL) の原因ウイルスである。すべてのウイルス感染者ではなく、約 5% が ATL を発症する。また、このウイルスは主として母親から子どもに垂直感染するが、40-50 年の潜伏期を経て発症する。従って、ウイルス感染細胞中の複数の遺伝子異常が ATL の発症に関与すると考えられる。しかしながら、ATL 発症に至る悪性化の機構については、ほとんど解析が進んでいない。

HTLV-1 は試験管内で正常 T 細胞をトランスフォームする。このトランスフォーメーションにウイルス蛋白 Tax が重要な役割を果たしている。即ち、Tax を単独で遺伝子導入することによって、正常 T 細胞を T 細胞増殖因子 (IL-2) 依存性にトランスフォームすることができる。興味深いことにウイルスで正常 T 細胞をトランスフォームすると、IL-2 依存性細胞株のみならず、IL-2 非依存性細胞株が樹立される。また、ウイルスでトランスフォームした IL-2 依存性細胞株は長期培養により、IL-2 非依存性に変換することも知られている。従って、このウイルス感染細胞の IL-2 依存性から IL-2 非依存性への変換は、ATL 発症に至る悪性化の 1 ステップに対応する可能性もあり、そのメカニズムの解析が精力的に進められている。

本稿において、この IL-2 依存性細胞株から非依存性細胞株への変換に Tax が関与すること、その際、Tax の発現量がこの変換に関与していることを紹介する¹⁾。

1. HTLV-1 Tax による IL-2 依存性細胞株の非依存性へのトランスフォーメーション

CTLL-2 はマウスの IL-2 依存性 T 細胞株である。この細胞株から IL-2 を除去すると、アポトーシスが誘導され、48 時間以内に全ての細胞が死滅する。この細胞を用いて、T 細胞の IL-2 非依存性増殖における Tax の役割について解析した。まず CTLL-2 に tax 遺伝子を電気穿孔法により導入し、薬剤耐性 (G 418) を指標に、Tax 蛋白を高発現した 3 種類の細胞株 (CTLL-

2/Tax) を樹立した。これらの細胞株を IL-2 非存在下で培養したところ、Tax を発現している 3 種類の細胞株はすべて IL-2 非依存性に増殖した。一方で、ベクタープラスミドを導入した細胞株 (CTLL-2/Vec) は親株と同様に IL-2 非存在下ではすみやかに死滅した。

2. Tax 変異体による CTLL-2 の IL-2 非依存性細胞増殖

Tax 蛋白は転写活性化因子であり、ウイルス遺伝子および様々な細胞遺伝子の発現を誘導する。また、これらの活性が、細胞のトランスフォーメーションに関与すると考えられている。Tax が活性化するエンハンサー配列として、kB 配列および CRE 配列が知られている。CTLL-2 細胞株における Tax の転写活性化能を測定するために、kB あるいは CRE を転写調節領域にもつルシフェラーゼ発現プラスミドを、Tax 発現プラスミドあるいはその変異体 (Tax 703, TaxM22) とともに CTLL-2 に一過性に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。野性型 Tax は kB 配列および CRE をともに活性化した。Tax 703 は kB 配列のみを、TaxM22 は CRE のみを選択的に活性化し、kB 配列に対してむしろ抑制的に働いた。これらの Tax 変異体 (Tax 703, TaxM22) を用いて、IL-2 非依存性細胞増殖に関与する Tax の機能について解析するために、これらの Tax 変異蛋白を発現する CTLL-2 細胞株 (CTLL-2/Tax 703, TaxM22) を野生型 Tax と同様の方法で樹立した。Tax 703 を発現した 3 種類の細胞株はすべて CTLL-2/Tax 同様、IL-2 非依存性に増殖した (図 1)。一方で、TaxM22 を発現する細胞株は 3 種類とも CTLL-2/Vec よりも早く死滅した。これらの結果は、CTLL-2 の IL-2 非依存性細胞増殖には Tax による kB の活性化が関与することを示唆する。

3. CTLL-2/Tax の NF- κ B 活性

次に、Tax を発現した CTLL-2 クローンの kB 配列に対する細胞因子の結合活性 (NF- κ B 活性) を EMSA (Electro-Mobility-Shift-Assay) 法によつ

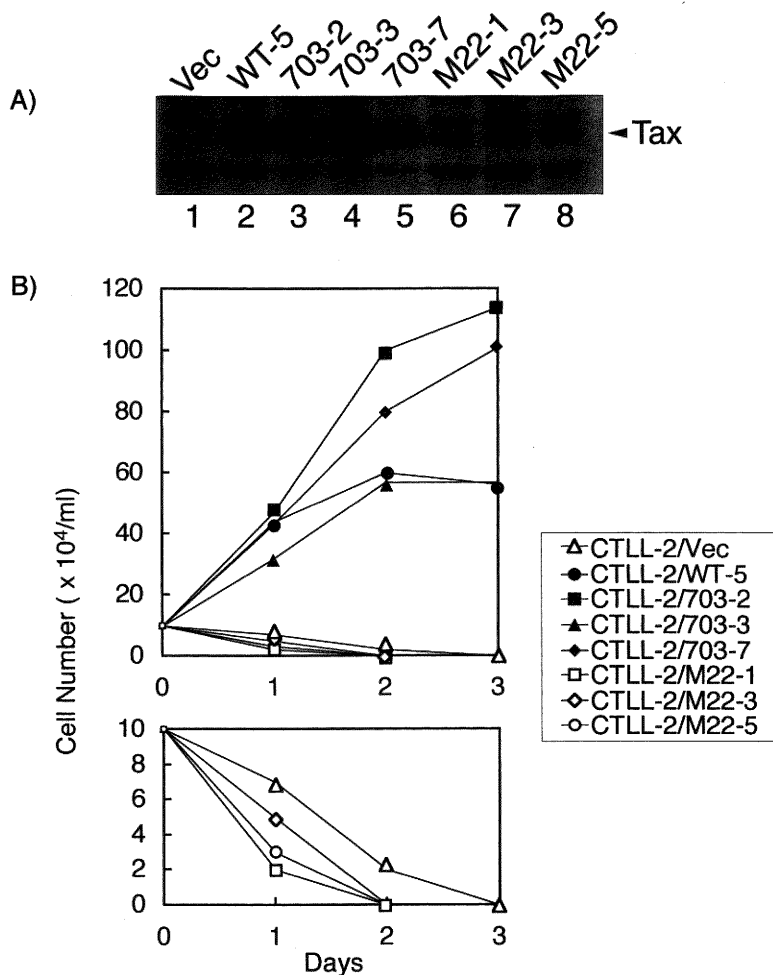


図 1

で測定した。CTLL-2/Tax および CTLL-2/Tax 703 から核抽出液を作製し、NF- κ B 活性を測定したところ、CTLL-2/Tax は、CTLL-2/Vec と比べて非常に高い活性を示した。この活性は IL-2 非存在下でも維持されていた。この NF- κ B 複合体は、ラベルしていない過剰量の kB 配列のオリゴヌクレオチドによって阻害されたが、コントロールとして用いた無関係のオリゴヌクレオチド (TRE 配列) によっては阻害されず、kB 配列特異的であることが証明された。一方、CTLL-2/TaxM22 は CTLL-2/Vec よりも低い NF- κ B 活性を示した。この TaxM22 は CTLL-2 のアポトーシスを促進することから、NF- κ B 活性が IL-2 によるアポトーシス抑制に関与する可能性を示唆している。ま

た、CTLL-2/Vec において、IL-2 を除去することによって、NF- κ B 活性の低下が観察された。この事は正常 T 細胞の IL-2 依存性増殖においても、NF- κ B がアポトーシスの抑制に関与する可能性を示唆している。

HTLV-1 トランスフォーム T 細胞株の IL-2 非存在性細胞増殖と Tax 発現量との相関

HTLV-1 でトランスフォームした IL-2 依存性および IL-2 非依存性 T 細胞株について、Tax の発現量と細胞増殖との関係について検討した。5 種類の IL-2 依存性細胞株の中で、IL-2 非存在下における細胞増殖と Tax の発現量との間に正の相関が観察された。Tax の発現量が最も少ない ILT-Mat は IL-2 非存在下で

は3日以内に死滅した。一方で、最も多く Tax を発現していた ILT-Koy 細胞株は IL-2 非存在下で約1週間増殖した。他の細胞株についても、Tax の発現量と短期間の IL-2 非存在下での増殖の間には相関が得られた。しかしながら、いずれの細胞も長期的には IL-2 依存性であった。この結果は Tax の発現量が短期の IL-2 非依存性細胞増殖に関与すること、一方で、長期の IL-2 非依存性細胞増殖には Tax のみでは不十分であることを示唆している。実際に、IL-2 非依存性細胞株は IL-2 依存性細胞株よりも Tax の発現量が高かった。しかしながら、IL-2 依存性の ILT-Koy の Tax の発現量は IL-2 非依存性細胞株の中では Tax の発現量が低い TL-Su と同レベルであった。

考 察

今回我々は、HTLV-1 による IL-2 非依存性 T 細胞トランスフォーメーションに Tax が関与すること、また IL-2 非依存性細胞増殖活性には IL-2 依存性トランスフォーメーション活性よりも多くの Tax が必要であることを示した。しかしながら、Tax の発現量だけでは長期の IL-2 非依存性増殖には不十分であることが示され、ウイルス感染細胞における Tax 以外の因子の関与が推定される。

少なくとも2つの活性が CTLL-2 の IL-2 依存性細胞増殖に関与すると考えられている。1つはアポトーシスを抑制すること、もう1つは細胞周期の促進である。従って、Tax はこれら2つの活性を CTLL-2 において代用している。Tax 変異体を用いた解析は、NF- κ B が Tax による IL-2 非依存性細胞増殖誘導活性に関与していることを示唆した。最近、NF- κ B がさまざまな種類のアポトーシスを抑制することが報告されている。従って、NF- κ B が IL-2 を除去した際に誘導されるアポトーシスを抑制している可能性がある。一方、細胞周期の促進は NF- κ B の活性化よりもむしろ cyclin-

dependent kinases (CDKs) の活性化による可能性が高い。CDKs は細胞周期の促進を調節する重要な因子であり、Tax が CDKs の阻害分子である P16 INK4 と結合することによって、CDKs を活性化することが報告されている。実際に用いた Tax 703 が CDK の活性化作用を有することを示唆する結果を得ている（未発表）。以上の結果を併せて、Tax による NF- κ B と CDKs の活性化が CTLL-2 の IL-2 非依存性増殖に関すると推定される。しかしながら、Tax はこれら以外にもさまざまな活性が報告されており、今後どの活性が IL-2 非依存性細胞増殖に関与しているのかを決定することが重要な課題である。

HTLV-1 は ATL 発症の初期過程に関与していると考えられている。ウイルスによって不死化された T 細胞にどのような異常が起き、最終的に白血病が発症しているのかについてはほとんど解析が進んでいない。その1つのステップとしても IL-2 非依存性増殖に関与する Tax 以外の因子の解明が重要な課題の1つである。

謝 辞

本研究は東京医科歯科大学の免疫治療学教室において行われた。同教室の教授である神奈木真理先生をはじめ共同研究者の皆様に深く感謝致します。

文 献

- 1) Iwanaga, Y., Tsukahara, T., Ohashi, T., Tanaka, Y., Arai, M., Nakamura, M., Ohtani, K., Koya, Y., Kannagi, M., Yamamoto, N., and Fujii, M.: Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein adrogates interleukin 2 dependence in mouse T-cell line. *J. Virol.*, 73: 1271~1277, 1999.