

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	高地 貴行
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 656 号
学位授与の日付	平成 27 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein represses the expression of the BCL11B tumor suppressor in T-cells (ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の癌蛋白 Tax は癌抑制遺伝子 BCL11B の発現を抑制する)
論文審査委員	主査 教授 西條 康夫 副査 教授 齋藤 昭彦 副査 教授 小松 雅明

### 博士論文の要旨

#### 背景と目的

成人 T 細胞白血病 (ATL) は悪性の T 細胞性白血病であり、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の感染に起因する。HTLV-1 は宿主 T 細胞に感染すると、ウイルス蛋白 Tax と HBZ を発現し、Tax と HBZ が協調して白血病の発症に関与する。Tax は、細胞周期の促進、アポトーシスの抑制、ゲノム不安定性の誘導および DNA 修復の抑制などを介して、宿主 T 細胞を不死化し、不死化細胞に遺伝子異常を蓄積し、癌化を促進する。HBZ は T 細胞の不死化には必須ではないが、HTLV-1 の潜伏感染の維持および白血病細胞の増殖に関与すると考えられている。

BCL11B は T 細胞分化に必須の転写因子である。一方で、BCL11B は T 細胞性急性リンパ芽球性白血病 (T-ALL) の発症に関わるがん抑制遺伝子である。例えば、複数の T-ALL 疾患において BCL11B の遺伝子変異あるいは発現抑制が報告されている。興味深いことに、染色体転座に伴う BCL11B キメラ遺伝子は ATL でも報告された。さらに、BCL11B mRNA および蛋白の発現量が HTLV-1 感染細胞および ATL 細胞において低下していることが報告された。本研究において申請者は、HTLV-1 感染細胞における BCL11B の発現低下に、Tax あるいは HBZ が関与するのかを検討した。

#### 方法

5 つの Tax 変異体を使用した。Tax  $\Delta$ C は Tax の PDZ ドメイン結合配列 (PBM) を欠損した変異体である。TaxM22 は NF- $\kappa$ B 経路を介した転写活性化能を欠損している。Tax703 は CREB 経路を介した転写活性化能が低下している。Tax/225-232 は NF- $\kappa$ B2 を介した転写活性化能を欠損している。Tax (TTG) は Tax 遺伝子の開始コドンに点変異を導入しており、Tax 蛋白を発現しない。HTLV-2 は HTLV-1 と類似したレトロウイルスであるが、病原性を持たない。Tax2 は HTLV-2 がコードする、HTLV-1 Tax と類似した遺伝子である。Tax、Tax 変異体、Tax2 および HBZ 遺伝子をレンチウイルス発現ベクターに組み込んだ。これらのベクターを 293T

細胞に遺伝子導入し、それぞれのレンチウイルスを作成した。作製したレンチウイルスを Jurkat 細胞 (HTLV-1 非感染細胞株) に感染し、感染細胞から RNA、細胞抽出液および核抽出液を調製した。BCL11B mRNA の発現量はリアルタイム RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) で定量した。コントロールとして GAPDH mRNA を検出した。BCL11B、Tax および HBZ 蛋白量はそれぞれに対する特異抗体を用いたウエスタンブロット法で測定した。Tax 変異体による、NF- $\kappa$ B 経路あるいは CREB 経路を介した転写活性化能はルシフェラーゼアッセイ法で定量した。統計学的解析にはスチューデントの t 検定を用いた。

#### 結果

4つの HTLV-1 感染細胞株 (SLB-1, HUT-102, MT-2, MT-4)、3つの ATL 由来細胞株 (TL-0mI, KOB, KK-1) および2つの HTLV-1 非感染 T 細胞株 (Jurkat, MOLT4) について、BCL11B mRNA と蛋白量をそれぞれリアルタイム RT-PCR とウエスタンブロット法で定量した。HTLV-1 感染細胞株および ATL 細胞株の BCL11B 蛋白は HTLV-1 非感染細胞よりも有意に低下していた。また、この BCL11B 蛋白の発現低下は mRNA レベルでも起こっていることがリアルタイム RT-PCR 法で示された。BCL11B 発現抑制への Tax と HBZ の関与を検討するために、Tax および HBZ 発現レンチウイルスを Jurkat 細胞に感染させ、感染細胞における BCL11B の発現量を評価した。Tax 単独あるいは Tax と HBZ をともに Jurkat に発現すると、BCL11B mRNA および蛋白の発現が低下した。それに対して、HBZ を単独で発現した細胞では BCL11B の発現変化は認めなかった。以上のことから、Tax がヒト T 細胞において BCL11B 遺伝子の発現を抑制することが示された。

Tax による BCL11B 遺伝子の発現制御機構を探るために、Tax 変異体遺伝子を Jurkat に導入し、Tax 変異体を一過性に強制発現させた。4つの Tax 変異体 (Tax $\Delta$ C, TaxM22, Tax703, Tax/225-232) はいずれも BCL11B の蛋白量を低下させ、その発現低下は野生型 Tax と同等あるいは若干低いレベルであった。一方で、Tax 蛋白を発現できない Tax (TTG) は BCL11B の発現を低下させなかった。Tax に加えて、HTLV-2 の Tax2 も BCL11B の発現を低下させた。Tax 変異体による NF- $\kappa$ B および CREB 経路の転写活性化能をルシフェラーゼ法で定量した。Tax による NF- $\kappa$ B および CREB 経路の転写活性化能は Tax による BCL11B の発現低下と相関を示さなかった。

#### 考察と結論

Tax が T 細胞において BCL11B 遺伝子の発現を抑制することを証明した。この Tax による BCL11B の発現抑制は主に転写レベルで起こっていた。BCL11B は T 細胞の分化に必須であり、T-ALL において癌抑制遺伝子として働く。従って、Tax による BCL11B の発現抑制は、HTLV-1 感染による T 細胞特異的な不死化および T 細胞白血病の発症に寄与していることが示唆された。

HTLV-1 の Tax に加えて、HTLV-2 の Tax2 も BCL11B の発現を T 細胞において低下させた。Tax2 も T 細胞特異的に細胞を不死化することから、Tax2 による BCL11B の発現低下も HTLV-2 による T 細胞特異的な細胞不死化に寄与することが示唆された。

BCL11B は、CD4 陽性 T 細胞を含む T 細胞系列に特異的に発現する。そのために BCL11B 遺伝子は T 細胞系列特異的な発現を制御する組織特異的転写調節領域を持つ。Li らは、BCL11B の転写開始点を含むプロモーター領域および BCL11B 遺伝子の 850kb 下流にある 1.9kb 領域が T 細胞系列特異的発現に必須であることを報告した。これらの領域にはさまざまな転写因子が結合することが示唆されている。Tax 変異体を用いた解析は、Tax による NF- $\kappa$ B および CREB 経路を介した転写活性化ならびに PBM を介したシグナルは BCL11B の発現低下に関与しないことを示した。従って、Tax による BCL11B の発現低下機構についてはさらなる解析が必要とされる。

3つの ATL 細胞株において BCL11B の発現低下が観察された。一方で、これらの中2つでは Tax の発現は検出されず、残り1つの Tax 発現も HTLV-1 感染細胞株と比較すると低値であった。従って、ATL における

BCL11B の発現低下は多くの場合 Tax 非依存性と考えられる。ATL 細胞の BCL11B 遺伝子領域には顕著な DNA メチル化を認めなかったということが報告されている。ATL における BCL11B 発現低下の機序については不明である。

#### 審査結果の要旨

本研究において、HTLV-1 感染細胞における BCL11B の発現低下に、Tax あるいは HBZ が関与するのかを検討した。HTLV-1 感染細胞株および ATL 細胞株の BCL11B 蛋白は HTLV-1 非感染細胞よりも有意に低下していた。5 つの Tax 変異体をレンチウイルスに組み込んで Jurkat 細胞に感染させた。Tax 単独あるいは Tax と HBZ をともに Jurkat に発現すると、BCL11B mRNA および蛋白の発現が低下した。それに対して、HBZ を単独で発現した細胞では BCL11B の発現変化は認めなかった。4 つの Tax 変異体 (Tax $\Delta$ C, TaxM22, Tax703, Tax/225-232) はいずれも BCL11B の蛋白量を低下させ、その発現低下は野生型 Tax とほぼ同等であった。Tax 蛋白を発現できない Tax (TTG) は BCL11B の発現を低下させなかった。Tax による BCL11B の発現抑制は、HTLV-1 感染による T 細胞特異的な不死化および T 細胞白血病の発症に寄与していることが示唆された。本論文は、HTLV-1 感染による BCL11B の発現低下に Tax が関与することを初めて示した論文であり、学位論文に値する。