

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	小堺 貴司
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 801 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	MAGI-1 expression is decreased in several types of human T-cell leukemia cell lines, including adult T-cell leukemia (成人 T 細胞白血病を含むヒト T 細胞白血病細胞株における MAGI-1 蛋白の発現低下)
論文審査委員	主査 教授 小松 雅明 副査 教授 味岡 洋一 副査 教授 曾根 博仁

博士論文の要旨

【背景と目的】

Membrane-associated guanylate kinase with inverted orientation protein 1 (MAGI-1)は、多くの種類の細胞において細胞質内のシグナル伝達に関与する。T細胞においてMAGI-1は、T細胞増殖因子IL-2のシグナル伝達に関与する。正常なT細胞をIL-2で刺激すると、PI3K/Akt経路とRas/Raf/MEK経路の2つの増殖促進経路が活性化される。IL-2はPI3Kを活性化し、phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3)の産生を誘導し、このPIP3がAktキナーゼを細胞膜に移行させ、細胞増殖促進シグナルを下流へ伝達する。一方で、IL-2はRas/Raf/ERK/MEK経路を活性化し、MEK1をリン酸化(pMEK1)し、活性化する。活性化型のpMEK1はMAGI-1とPTENとの複合体に結合し、pMEK1/MAGI-1/PTEN複合体は細胞膜に移行する。PTENは脱リン酸化酵素であり、細胞膜上のPIP3を脱リン酸化し、Akt経路を不活化する。このように、MAGI-1はIL-2による増殖シグナルのネガティブフィードバックを制御する。

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)は成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)の原因ウイルスである。申請者が所属する研究室では、HTLV-1の癌蛋白であるTaxがMAGI-1に結合し、MAGI-1の機能を抑制し、HTLV-1感染細胞の細胞増殖を促進することを報告した(Cancer Science, 2013)。今回申請者らは、MAGI-1がT細胞白血病細胞株の細胞増殖に関与するのかを調べることを目的として、ATLを含む15種類のヒトT細胞白血病細胞株におけるMAGI-1の発現レベルを調べた。さらに、MAGI-1を過剰発現したATL細胞株およびMAGI-1をノックダウンしたATL細胞株を樹立し、細胞増殖へのMAGI-1の作用を調べた。

【方法】

15種類のヒトT細胞白血病由来の細胞株を用いた。内訳は、7種類のATL細胞株(4種類のIL-2非依存性細胞株と3種類のIL-2依存性細胞株)、1種類のT細胞性慢性リンパ性白血病細胞(T-CLL)株および7種類のT細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)細胞株である。これらの細胞株から細胞抽出液を作製し、白血病細胞株におけるMAGI-1蛋白の発現をウェスタンブロット法で評価した。さらに、これらの細胞株からRNAを抽出し、MAGI-1 mRNAをリアルタイムRT-PCR法で

定量した。次に、ヒトリンパ球から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA ライブラリーを作成した。MAGI-1 に特異的なプライマーを用いて、MAGI-1cDNA を増幅し、FLAG タグを付加した MAGI-1cDNA (FLAG-MAGI-1) を構築した。FLAG-MAGI-1 をレンチウイルスベクターに導入し、このレンチウイルスを MAGI-1 の発現が低い細胞株に感染させ、MAGI-1 過剰発現細胞株を樹立した。MAGI-1shRNA を発現するレンチウイルスを用いて MAGI-1 をノックダウンした ATL 細胞株を樹立した。

【結果】

7 株のうち 3 株の ATL 細胞株 (2 株の IL-2 依存性細胞株と 1 株の IL-2 非依存性細胞株) および 1 株の T-CLL 細胞株 (1/1) において MAGI-1 蛋白質の発現低下を認めた。mRNA レベルを評価したところ、MAGI-1 蛋白質の発現量は MAGI-1mRNA 量に高い相関を示し、これらの白血病細胞株における MAGI-1 蛋白質の発現低下は、主として MAGI-1mRNA の発現低下によることが示された。同様に、7 株の T-ALL 細胞株のうちの 5 株で MAGI-1 蛋白質の発現低下が検出された。上記の実験で MAGI-1 の発現が低下していた IL-2 依存性 ATL 細胞株 ST-1 に MAGI-1 レンチウイルスを感染させ、MAGI-1 を過剰発現させた。MAGI-1 の過剰発現により ST-1 の細胞増殖が強く抑制された。MAGI-1 の過剰発現細胞では、リン酸化型 pMEK と pAkt の発現抑制が観察されたが、pERK 量は変化しなかった。以上より、MAGI-1 は ATL 細胞株の細胞増殖を抑制すること、この抑制に pMEK と pAkt の発現低下が関与することが示唆された。次に、MAGI-1 を発現していた IL-2 依存性 ATL 細胞株 KOB に MAGI-1shRNA 発現レンチウイルスを感染させ、MAGI-1 のノックダウン (MAGI-1-KD) 細胞を樹立した。IL-2 存在下の MAGI-1-KD 細胞では pAkt の発現が亢進していた。一方で、IL-2 非存在下の MAGI-1-KD 細胞では、pMEK1/2 の発現が亢進していた。MAGI-1-KD 細胞を高濃度 (500pM) IL-2 存在下で 3 日間培養したところ、MAGI-1-KD 細胞の方が親株よりも細胞増殖が有意に低下した。この抑制は、MAGI-1 の過剰発現による細胞増殖の抑制よりも弱い効果であった。この細胞増殖の抑制活性は、低濃度 (167pM, 50pM, 17pM) IL-2 あるいは IL-2 非存在下では観察されなかった。これらの結果は、MAGI-1 が、ATL 細胞株の細胞増殖を抑制する活性に加えて、増殖を促進する活性を併せ持つことを示唆した。

【考察】

大腸癌などの上皮系腫瘍において MAGI-1 の発現低下が報告され、MAGI-1 が大腸癌の癌抑制遺伝子であることが示唆されている。申請者は、15 株のうち 9 株の T 細胞白血病細胞株において MAGI-1 の発現低下を同定した。この発現低下は主として mRNA レベルであった。HTLV-1 の Tax が MAGI-1 の発現を低下させることが報告されているが、MAGI-1 の発現低下は Tax が発現していない細胞でも認められ、Tax とは異なる機序で MAGI-1 の発現が抑制されていることが示唆された。さらに、MAGI-1 を過剰発現させると ATL 細胞株の細胞増殖が強く抑制された。これらの結果は、MAGI-1 がヒト T 細胞白血病において癌抑制遺伝子として機能することを示唆した。MAGI-1 による細胞増殖の抑制には、pMEK1/2 と pAkt の発現低下、即ち、MEK1/2 と Akt の不活化が関与することが示唆された。MAGI-1 は、IL-2 によって活性化された Akt を抑制する。従って、T 細胞白血病細胞株における MAGI-1 の発現低下は、この MAGI-1 のネガティブフィードバックを解除し、細胞増殖を促進することが示唆された。興味深いことに、MAGI-1 の発現をノックダウンしても、ATL 細胞株の細胞増殖が若干であるが抑制された。MAGI-1 の増殖促進活性は、高濃度の IL-2 で 3 日間培養した時のみに観察された。これらの結果は、ある種の条件下では MAGI-1 が T 細胞の細胞増殖を促進することを示唆した。

今後、ATLを含むT細胞白血病の臨床検体においてもMAGI-1の発現が低下しているのかを調べる
ことが重要な課題である。また、MAGI-1の発現が低下した白血病とMAGI-1の発現が低下してい
ない白血病との間に、悪性度あるいは治療薬に対する感受性が異なるのかを調べることも重要で
ある。

審査結果の要旨

【背景と目的】 T細胞においてMAGI-1は、T細胞増殖因子IL-2のシグナル伝達に関与する。正
常なT細胞をIL-2で刺激すると、PI3K/Akt経路とRas/Raf/MEK経路が活性化される。活性化型のリン
酸化MEK1はMAGI-1およびPTENと複合体を形成、細胞膜に移行する。その結果、PTENはAkt経路
を不活化する。本研究では、T細胞白血病(ATL)細胞株、T細胞性慢性リンパ性白血病(T-CLL)細胞
株、T細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)細胞株の細胞増殖におけるMAGI-1の影響を生化学、細胞
生物学的に調べることを目的とした。

【結果】 7株のうち3株のATL細胞株(2株のIL-2依存性細胞株と1株のIL-2非依存性細胞株)お
よび1株のT-CLL細胞株(1/1)においてMAGI-1タンパク質の発現低下を認めた。このMAGI-1タンパ
ク質の発現低下は、MAGI-1mRNAの発現低下と相関していた。7株のT-ALL細胞株のうちの5株でも
MAGI-1タンパク質の発現低下が検出された。MAGI-1の発現が低下していたIL-2依存性ATL細胞株ST-1
にMAGI-1を過剰発現させたところ、細胞増殖が著しく抑制された。MAGI-1の過剰発現によりリン酸
化MEKとAktの発現は抑制される一方、リン酸化ERKは変化しなかった。次に、MAGI-1を発現してい
たIL-2依存性ATL細胞株KOBのMAGI-1のノックダウン(MAGI-1-KD)細胞を樹立した。MAGI-1-KD細胞
ではIL-2存在下においてリン酸化Aktの発現が高かったが、IL-2非存在下ではリン酸化MEK1/2の発現
が亢進していた。MAGI-1-KD細胞を高濃度のIL-2存在下で培養したところ、MAGI-1-KD細胞の方が親
株よりも細胞増殖が有意に低下した。この抑制は、MAGI-1の過剰発現による細胞増殖の抑制よりも弱
い効果であった。この細胞増殖の抑制活性は、低濃度のIL-2あるいはIL-2非存在下では観察されな
かった。

【考察】 申請者は、15株のうち9株のT細胞白血病細胞株においてMAGI-1の発現低下を同定した。
この発現低下はmRNAレベルの発現低下と相関した。HTLV-1のTaxがMAGI-1の発現を低下させること
が報告されているが、MAGI-1の発現低下はTaxが発現していない細胞でも認められ、Taxとは異なる
機序でMAGI-1の発現が抑制されていることが示唆された。さらに、MAGI-1を過剰発現させるとATL
細胞株の細胞増殖が強く抑制された。これらの結果は、MAGI-1がヒトT細胞白血病においてがん抑制
遺伝子として機能することを意味する。MAGI-1による細胞増殖の抑制には、リン酸化MEK1/2とリン
酸化Aktの発現低下、即ち、MEK1/2とAktの不活化が関与することが示唆された。MAGI-1は、IL-2
によって活性化されたAktを抑制する。従って、T細胞白血病細胞株におけるMAGI-1の発現低下は、
このMAGI-1のネガティブフィードバックを解除し、細胞増殖を促進することが示唆された。興味深い
ことに、MAGI-1の発現をノックダウンしても、ATL細胞株の細胞増殖が若干であるが抑制された。
MAGI-1の増殖促進活性は、高濃度のIL-2で培養した時のみに観察されたことから、ある種の条件下
ではMAGI-1がT細胞の細胞増殖を促進することを示唆した。今後、ATLを含むT細胞白血病の臨床検
体においてもMAGI-1の発現が低下しているのかを調べるということが重要な課題であると考えられる。ま
た、MAGI-1の発現が低下した白血病とMAGI-1の発現が低下していない白血病との間に、悪性度ある
いは治療薬に対する感受性が異なるのかを調べることも重要である。

【学位論文としての価値の有無】 上述の新規性を鑑みて、学位論文としての価値を有すると判断した。