

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)

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 小堺 貴司

---

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する。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-1 cDNA を増幅し、FLAG タグを付加した MAGI-1 cDNA (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-1 mRNA 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-1 mRNA 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 の不活性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

## 【別紙 2】

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の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。