

氏名	おかもとかずお男
学位(専攻分野)	博士(生命科学)
学位記番号	生博第69号
学位授与の日付	平成18年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	生命科学研究所高次生命科学専攻
学位論文題目	HTLV-Iの発がん遺伝子産物 Tax は、NF- κ B の活性化を介した c-FLIP の発現増強により、Fas 誘導性アポトーシスを抑制する
論文調査委員	(主査) 教授 米原 伸 教授 西田 栄介 教授 垣塚 彰

論文内容の要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) は、成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因レトロウイルスであり、慢性脊髄症、ぶどう膜炎、関節リウマチ様慢性関節症などの多臓器に亘る多彩な自己免疫類似の病態をも誘発する。そのウイルス性がん遺伝子産物 Tax は、感染細胞のがん化・不死化に中心的な役割を担っていることが知られている。tax 遺伝子のトランスジェニックマウスの解析より、HTLV-I 感染に伴う ATL や自己免疫疾患の発症には、デスレセプターである Fas を介するアポトーシスの誘導による感染細胞の除去機構が Tax によって阻害されることと関係していることが示唆されてきた。本研究において申請者は、Tax による Fas を介するアポトーシスの抑制機構の分子機序について解析を行った。Tax を発現している HTLV-I 感染細胞は Fas 刺激に対して抵抗性を示すが、それらの細胞株において抗アポトーシス分子 c-FLIP が恒常的に発現していることを見出した。レンチウイルスベクターを用いた RNA 干渉法により、Tax 陽性 HTLV-I 感染細胞における内在性 c-FLIP の発現を低減させると、Tax 陽性 HTLV-I 感染細胞は Fas を介するアポトーシスに対して感受性化した。本研究において申請者が開発した、レンチウイルスベクターと Cre-loxP 組み換えを用いた遺伝子発現誘導システムを用いることにより、HTLV-I 陰性 T 細胞株 CEM-C7 において Tax を発現誘導させると、c-FLIP の発現増強にともなって、Fas を介するアポトーシスが阻害され、この阻害も RNA 干渉法による c-FLIP の発現抑制で解除された。また、CREB/ATF1 の転写活性化能を欠如した Tax 変異体 d3 は、野生型 Tax と同程度に c-FLIP の発現を増強でき、Fas を介するアポトーシスも抑制できた。一方、NF- κ B の転写活性化能を欠如した Tax 変異体 M22 は、c-FLIP の発現を十分に増強できず、Fas を介するアポトーシスも抑制できなかった。さらには、NF- κ B の優性阻害変異体、または NF- κ B の活性化を阻害する I κ B α の優性変異体を Tax と共発現させると、Tax による c-FLIP の発現上昇並びに Fas を介するアポトーシスの抑制が解除された。しかしながら、Tax を発現している T 細胞株において、NFAT や AP-1 の転写活性を阻害しても、c-FLIP の発現量に変化は認められなかった。以上の結果より、HTLV-I 感染 T 細胞において、Tax は c-FLIP の発現を増強させることにより、Fas を介するアポトーシスを抑制できること、さらに c-FLIP の発現増強には NF- κ B の転写活性が必須であることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) のキャリア人口は我が国で特に多く、成人 T 細胞白血病 (ATL) が予後不良な疾患でもあるため、その発症機序の解明や治療法の確立が急務となっている。また、HTLV-I 感染に伴う ATL や自己免疫疾患の発症には、細胞表層受容体 Fas を介するアポトーシスの誘導による感染細胞の除去機構が Tax によって阻害されることと関係していることが示唆されていた。このような背景のもと、Tax が Fas を介するアポトーシスを抑制する分子機序の解明を目的として本研究は実施された。ATL 患者由来の T 細胞株を含む HTLV-I 感染 T 細胞株を用いた解析から、Tax 陽性細胞株は Fas 刺激に対して抵抗性を示し、Fas 刺激による caspase-8 の切断が抑制されていることを認め、

さらなる解析によって、caspase-8 に対して拮抗的に機能する抗アポトーシス分子 c-FLIP が、Tax 陽性の HTLV-I 感染 T 細胞において高発現していることを見いだした。そして、HTLV-I 陰性 T 細胞株に Tax を強制発現させると c-FLIP の発現上昇並びに Fas 刺激に対する抵抗性が認められることを示している。また、RNA 干渉法を用いることによって c-FLIP の発現を低減させると、Tax 陽性細胞株が Fas 刺激に対して感受性化することを申請者は見いだした。Tax の強発現と c-FLIP 発現抑制という両側面からの解析を行い、c-FLIP の関与を証明したことは、高く評価できる。また、さらなる解析によって、Tax は NF- κ B の転写活性を介して c-FLIP の発現を増強させることにより Fas を介するアポトーシスを抑制することを明らかとし、c-FLIP 発現誘導の分子機構の解析も行い研究を進展させていることも評価できる。それに加えて本研究では、レンチウイルスベクターと Cre-*loxP* システムによる組み換えを用いた遺伝子発現誘導システムを新たに開発している。このシステムでは、estrogen receptor (ER) と組み換え酵素 Cre との融合タンパク質を用いることで、Cre の活性を ER の合成リガンドである 4-OHT によって調節可能としている。また、ウイルスベクター内に poly(A) 付加シグナルが存在すると、ウイルスベクターとして使用できないという根本的な問題点を解消するため、内部のプロモーター・目的遺伝子・poly(A) 付加シグナルから成る DNA 断片を、ウイルス RNA の転写方向とは逆方向に挿入するという新たな工夫を施すことにより、レンチウイルスベクターを利用することに成功している。さらに、誘導前に発現が漏れた細胞を puromycin 処理によって完全に除去できる点など、既存の発現誘導系で見られる重大な問題点がすべて改善されており、非常に有用な系を構築することに成功している。この開発も高く評価すべきと考えられる。このように本研究は適正な実験手法によって実行され、本研究で得られた知見は HTLV-I 感染に伴う ATL・自己免疫疾患発症の機構解明に大きく貢献するものと思われる。以上から、本論文を博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成18年1月23日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。