

氏 名	しょうじ かわ た さ なえ 小路(川田) 早苗
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2641 号
学位授与の日付	平成 15 年 7 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	医学研究科病理系専攻
学位論文題目	p21 ^{Waf1/Cip1/Sdi1} functions to prevent apoptosis as well as stimulate growth in cells transformed or immortalized by human T-cell leukemia virus type 1-encoded Tax (p21 ^{Waf1/Cip1/Sdi1} は、成人 T 細胞白血病ウイルスがコードする Tax によってトランスフォームまたは不死化した細胞の増殖を促進し、かつアポトーシスを抑制する)
論文調査委員	(主 査) 教授 松 岡 雅 雄 教授 内 山 卓 教授 下 遠 野 邦 忠

論 文 内 容 の 要 旨

成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 感染は成人 T 細胞白血病 (ATL) や神経疾患 (HAM/TSP) などの発症の原因である。HTLV-1 がコードするタンパク質 Tax はウイルス遺伝子の転写を活性化すると同時に宿主細胞側の種々の遺伝子の発現制御に関与している。さらに、Tax は健康人由来のリンパ球を不死化する作用や齧歯類の線維芽細胞をトランスフォームする働きを持つ。これまでの研究から HTLV-1 が感染し不死化した細胞は、種々のアポトーシス誘導刺激に対して、もとの細胞とは異なる感受性を示すようになる事が知られている。一方、HTLV-1 に感染し不死化した細胞及び Tax を発現している細胞の多くでは、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 阻害因子の 1 つである p21 (Waf1/Cip1/Sdi1) の発現量が増加している。p21 はがん抑制遺伝子 p53 により誘導され細胞周期の停止に働くばかりでなく、種々の因子によっても発現制御を受ける。また、細胞の分化や老化によっても発現が亢進することが知られている。しかしながら、HTLV-1 感染細胞や Tax 発現細胞における p21 過剰発現の役割は明らかでない。そこで我々は、Tax の転写活性化能、及びトランスフォーム活性などに p21 がどのような影響を及ぼすか明らかにする事を試みた。

まず、Tax の転写活性化能に対する p21 の影響について、NF- κ B 結合配列を含むプロモーターと HTLV-1 LTR プロモーターの下流に各々ルシフェラーゼ遺伝子を配置したレポータープラスミドを用いて調べた。これらレポータープラスミドを Tax 及び p21 を発現するプラスミドと共にラット線維芽細胞株 Rat-1 に導入して、Tax の転写活性化能を解析したところ、p21 の共発現により Tax のこれらプロモーターに対する転写活性能が増強されることを見出した。次に、Tax のトランスフォーム活性に対する p21 の影響を調べた。これまでの研究から、Tax を発現する Rat-1 細胞は足場非依存的な増殖性を獲得することが知られている。このような Tax 発現 Rat-1 細胞に p21 を強制発現させると、足場非依存的に増殖する細胞の数が増加することが明らかとなった。

Tax は細胞をトランスフォームし細胞増殖の亢進に働く一方、対照的な現象であるアポトーシスの誘導においても関与することが報告されている。これまでに、Tax を発現させた Rat-1 細胞では血清飢餓状態においてもアポトーシスを誘導する事が知られている。Tax の発現によりアポトーシス感受性を示した Rat-1 細胞の増殖に、p21 が影響を及ぼすか調べるためこの細胞に p21 を共発現させ血清飢餓状態にしたところ、p21 がこのアポトーシスに対して抑制的に働く事が観察された。この抑制効果は、アンチセンスオリゴヌクレオチド処理で p21 の発現を低下させると減少したことから、p21 の発現量に依存すると考えられた。このことから、HTLV-1 に感染し不死化したヒトリンパ球で高発現している p21 が、アポトーシスの制御に関与している可能性が考えられた。そこで、HTLV-1 感染細胞株、HUT-102 及び MT-2、を p21 mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド存在下及び非存在下において、アクチノマイシン D もしくはシスプラチン処理によってアポトーシスを誘導したところ、アンチセンスオリゴヌクレオチドによって p21 の発現量が低下した細胞は、アポトーシス

誘導に高い感受性を示した。

以上の結果より、Taxは細胞増殖を亢進させると同時に、アポトーシスの誘導に働くという対照的な作用をもつが、Taxはp21の発現量を増加させることで、アポトーシス誘導を抑制し細胞増殖をさらに増強している可能性が示唆された。これらの研究成果はHTLV-1感染によるATL発症の機序解明及び予防に関する研究に役立つと期待される。

論文審査の結果の要旨

成人T細胞白血病ウイルス（HTLV-1）に感染し不死化した細胞では、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）阻害因子のひとつp21^{Waf1/Cip1/Sd1}の発現量が増加している。p21はHTLV-1にコードされるタンパク質Taxによって発現誘導されるが、HTLV-1感染細胞における生理的役割は明らかでない。本研究ではp21がTaxの機能およびHTLV-1感染で不死化した細胞にどのような影響を及ぼすか検討を行った。

まず、NF- κ B結合配列を含むプロモーターとHTLV-1 LTRプロモーターに対するTaxの転写活性化能に、p21が及ぼす影響を調べた。その結果、p21の共発現によりこれらプロモーターに対するTaxの転写活性化能が増強される事が分かった。次に、Taxのトランスフォーム活性に対するp21の影響を調べた。Tax発現Rat-1細胞にp21を強制発現させると、足場非依存的に増殖する細胞の数が増加することが分かった。

Taxを発現させたRat-1細胞は血清飢餓状態においてアポトーシスを誘導することが知られている。しかし、この細胞にp21を発現させて血清飢餓状態にしたところ、アポトーシスの抑制が観察された。HTLV-1感染細胞株をp21のmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理し、p21タンパク質量が低下した細胞では、アポトーシス誘導に対して高い感受性を示した。

以上より、Taxはその転写活性化能によって細胞増進を亢進させる一方、p21の発現量を増加させることで、アポトーシス誘導を抑制しかつTaxのもつ転写活性化能をより活性化して細胞増殖を増強している可能性が示唆された。

以上の研究はHTLV-1感染によるATL発症機序の解明に貢献しATL発症の予防に寄与するところが多い。したがって本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成15年6月26日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。