

研 二五六

(別紙様式第3号)

## 論 文 要 旨

### 論 文 題 目

TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF SURVIVIN THROUGH THE NF- $\kappa$ B PATHWAY BY  
HUMAN T-CELL LEUKEMIA VIRUS TYPE I TAX

(ヒト T 細胞性白血病ウイルス I 型 Tax による NF- $\kappa$ B を介したサバイビン遺伝子転写活性化)

氏名 川上博哉



## 【目的】

ATL(成人 T 細胞性白血病)は予後不良のリンパ系悪性腫瘍であり、HTLV-1(ヒト T 細胞性白血病ウイルス 1 型)は ATL の原因ウイルスである。HTLV-1 の発癌機構に関して、ウイルスのコードする転写制御因子 Tax による T 細胞の不死化機構は重要であり、その過程にはアポトーシスの抑制が関与している。一方、細胞死抑制に関わる分子として知られている IAP (inhibitor of apoptosis protein)ファミリーの1つである survivin は ATL 細胞や HTLV-1 感染 T 細胞株で高発現しており、その発現を抑制すると細胞増殖が抑制されることを、我々は既に報告している。さらに survivin の発現は ATL の予後とも相関しているが、survivin 遺伝子の発現制御機構は未だ不明である。本研究では、Tax による T 細胞の不死化における survivin の関与と Tax による survivin 遺伝子の転写活性化機構について検討した。

## 【方法】

IL-2 依存性マウス T 細胞株、CTLL-2 に Tax を導入し、IL-2 非依存性増殖能の獲得を検討した。細

胞生存率およびアポトーシスの検討はそれぞれ WST-8 法と annexin V 染色を用いた。Tax および survivin の発現はウェスタンブロット法で検討した。Tax による survivin 遺伝子転写制御機構は、野生型 Tax や Tax 変異体および NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路に関与する種々の分子の優性抑制変異体とともに survivin 遺伝子 5'領域 6kb を含むレポータープラスミドや種々の 5'領域欠失変異体をヒト T 細胞株 Jurkat に導入し、Tax によるレポーター活性の誘導を指標として解析した。IL-2 による survivin 遺伝子転写制御機構は IL-2 依存性ヒト T 細胞株 Kit225 にレポーター遺伝子を導入し、IL-2 によるレポーター活性の誘導を指標として解析した。NF- $\kappa$ B の活性化はゲルシフトアッセイで検討した。

#### 【結果】

Tax および IL-2 は survivin 遺伝子の転写を活性化し、Tax 変異体や I $\kappa$ B 等の優性抑制変異体を用いた解析から、Tax や IL-2 による NF- $\kappa$ B 活性化が survivin 遺伝子の転写活性化に重要であった。Tax および IL-2 応答領域は -354/-345bp の NF- $\kappa$ B




結合配列であった。CTLL-2 に野生型 Tax を導入すると IL-2 除去によるアポトーシスが抑制されたが、NF- $\kappa$ B 経路の活性化能を失った Tax 変異体ではアポトーシスの抑制は誘導できなかった。さらに、アポトーシスの抑制と survivin の発現は相関していた。Tax 導入 CTLL-2 細胞を NF- $\kappa$ B 阻害剤により処理すると、NF- $\kappa$ B の活性化は減弱し、survivin の発現および細胞増殖が抑制された。

#### 【総括】

HTLV-1 Tax は NF- $\kappa$ B 活性化を介して、survivin 遺伝子の転写を活性化する。そして、IL-2 非依存性の細胞増殖能の獲得に survivin の発現誘導が関与していることが示唆された。さらに、NF- $\kappa$ B 阻害剤は survivin の発現を抑制することで、アポトーシスを誘導し、ATL の治療薬としての可能性を秘めていることが明らかとなった。

(別紙様式第7号)

## 論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 第 号 論文博	氏名	川上 博哉
論文審査委員	審査日	平成 17 年	1 月 25 日
	主査教授	高須 信行 	
	副査教授	吉見 直己 	
	副査教授	苅谷 研一 	
(論文題目)			
TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF SURVIVIN THROUGH THE NF- $\kappa$ B PATHWAY BY HUMAN T-CELL LEUKEMIA VIRUS TYPE I TAX			
(論文審査結果の要旨)			
上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準等につき慎重かつ公正に検討し、以下のような審査結果を得た。			
1. 研究の背景と目的			
ATL (成人 T 細胞性白血病) は予後不良のリンパ系悪性腫瘍であり、HTLV-1 (ヒト T 細胞性白血病ウイルス 1 型) は ATL の原因ウイルスである。HTLV-1 の発癌機構に関して、ウイルスのコードする転写制御因子 Tax による T 細胞の不死化機構は重要であり、その過程にはアポトーシスの抑制が関与している。一方、細胞死抑制に関わる分子として知られている IAP (inhibitor of apoptosis protein) ファミリーの 1 つである survivin は ATL 細胞や HTLV-1 感染 T 細胞株で高発現しており、その発現を抑制すると細胞増殖も抑制される。さらに survivin の発現は ATL の予後とも関連しているが、survivin 遺伝子の発現制御機構は未だ不明である。本研究は Tax による T 細胞の不死化における survivin の関与と Tax による survivin 遺伝子の転写活性化機構を明らかにすることを目的とした。			
2. 研究内容			
IL-2 依存性マウス T 細胞株 CTLL-2 に Tax を導入し、IL-2 非依存性増殖能の獲得を細胞生存率(WST-8 法)およびアポトーシス(annexin V 染色)にて検討し、Tax および survivin の発現はウェスタンブロット法で検討した。その結果、CTLL-2 に野生型 Tax			

を導入すると IL-2 除去によるアポトーシスが抑制されたが、NF- $\kappa$ B 経路の活性化能を失った Tax 変異体ではアポトーシスは抑制されず、アポトーシスの抑制と survivin の発現は相関していた。

Tax による survivin 遺伝子転写制御機構は、野生型 Tax や Tax 変異体および NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路に関与する種々の分子の優性抑制変異体とともに survivin 遺伝子 5' 領域 6kb を含むレポータープラスミドや種々の 5' 領域欠失変異体をヒト T 細胞株 Jurkat に導入し、Tax によるレポーター活性の誘導を指標として解析した。また、IL-2 による survivin 遺伝子転写制御機構は IL-2 依存性ヒト T 細胞株 Kit225 にレポーター遺伝子を導入し、IL-2 によるレポーター活性の誘導を指標として解析した。その結果、Tax および IL-2 は survivin 遺伝子の転写を活性化し、Tax 変異体や I $\kappa$ B 等の優性抑制変異体を用いた解析から、Tax や IL-2 による NF- $\kappa$ B 活性化が survivin 遺伝子の転写活性化に重要であり、Tax および IL-2 応答領域は survivin 遺伝子翻訳開始点上流-354/-345bp の NF- $\kappa$ B 結合配列であった。

さらに、NF- $\kappa$ B 阻害剤による NF- $\kappa$ B の活性化（ゲルシフトアッセイ）を検討した結果、Tax 導入 CTLL-2 細胞の NF- $\kappa$ B の活性化は減弱し、survivin の発現および細胞増殖が抑制され、アポトーシスが誘導された。

### 3. 研究成果の意義と学術的水準

HTLV-1Tax が survivin 遺伝子の転写を制御し、Tax による T 細胞の不死化に survivin が寄与していることを証明した研究は他に例がなく、独創性に富むものである。さらに、ATL 治療における NF- $\kappa$ B 阻害剤の有用性を示した点は、新たな化学療法のを切り拓き、国際的にも高く評価されるものであると判断された。

以上により、本論文は学位授与に十分値するものであると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
  - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
  - 3 \*印は記入しないこと。