

審査の結果の要旨

氏名 塩之入 千恵子

本研究は、成人T細胞性白血病の発症機構の解明、特に不死化細胞から腫瘍細胞に至る過程を明らかにする目的で解析を行ってきた。共同研究者は、ATL腫瘍細胞を材料として不死化細胞を対照としてdifferential display法を行い、不死化細胞と腫瘍細胞を区別する現象として、ATL腫瘍細胞でのPKC β IIの過剰発現と構成的活性化を明らかにした。そこで、本研究では、ATL腫瘍細胞において、不死化細胞から腫瘍細胞へのプログレッションの過程において、PKC β IIの下流で β -catenin/TCFシグナル伝達系が活性化している可能性について検討を行った。

1. PKC β IIの活性化の下流においてGSK-3 β のリン酸化と β -cateninの蓄積を認めるか検討するために、PKC β II低発現のTax1Aに構成的活性型PKC β IIを導入したTax1A/ Δ PKC β IIを用いてウエスタンブロッティング法を施行した。その結果Tax1A/ Δ PKC β IIは、コントロールに比べて明らかに β -cateninの蓄積傾向とGSK-3 β のリン酸化傾向を認めた。

2. 内因性のPKC β IIの過剰発現を認める細胞におけるGSK-3 β のリン酸化および β -cateninの蓄積についてウエスタンブロッティング法にて検討した。PKC β IIの過剰発現のATL腫瘍細胞由来細胞株の一部およびATL患者検体の一部において、明らかにGSK-3 β のリン酸化と β -cateninの蓄積を認めた。一方、PKC β II低発現のTax不死化細胞株では、GSK-3 β は低リン酸化状態であり、 β -cateninの蓄積は認めなかった。

3. β -cateninが転写因子TCFのcofactorとして機能するには核内に蓄積する必要がある。そこで各種細胞における β -cateninの細胞内局在について共焦点レーザー顕微鏡にて検討した。PKC β IIの過剰発現のATL43TおよびATL48Tでは β -cateninの細胞質内および核内での蓄積を認めた。一方、PKC β II低発現の不死化細胞株MT-2では、 β -cateninの核内での蓄積は認めなかった。

4. β -catenin蛋白の核内への蓄積が、実際にTCFの転写の活性化につながっているか検討するために、TCF-CATアッセイを施行した。PKC β IIの過剰発現を認めるATL43TではCAT活性は高値であったが、PKC β II低発現のTax1AではCAT活性は低値であった。以上からPKC β IIの過剰発現を認める細胞では、PKC β IIの下流においてTCFの転写が活性化されていることが強く示唆された。

5. β -cateninの蓄積のないTax1Aに β -catenin遺伝子を導入しTax1Aの生物学的な変化について検討した。細胞増殖能について検討した結果、 β -catenin導入Tax1AはTax1A/mockに比べて統計学的に有意な細胞数の増加を示した。以上から、 β -catenin/TCFシグナル伝達系の活性化は、不死化細胞からATL腫瘍細胞への進展に寄与していることが強く示唆された。

6. さらに本研究ではDNAマイクロアレイ法が、不死化細胞から腫瘍細胞へ至るプログレッション機構の解明において有用であるかどうか検討するために、ATL関連細胞株の代表的なものを用いて予備的な解析を施行した。その結果、不死化細胞とATL腫瘍細胞由来細胞株では、全く別個のクラスターを形成した。つまり、不死化細胞とATL腫瘍細胞の遺伝子発現プロファイルには明確な差異があることを示しており、このことから不死化細胞に種々の遺伝子変化が加わり、不死化細胞とは別の性質のATL腫瘍細胞に至ったと考えられる。以上の結果から、DNAマイクロアレイ解析は、各細胞における遺伝子発現プロファイルの違いを明確に検出可能であり、不死化細胞から腫瘍細胞へのプログレッション機構の解明に大変有用であることを確認した。

以上、本論文は不死化細胞とATL腫瘍細胞を明確に区別する特徴であるPKC β IIの構成的活性化の下流において、ATL腫瘍細胞の一部において、 β -catenin/TCFシグナル伝達系が活性化していることを明らかにした。そして、 β -catenin遺伝子の不死化細胞への導入により細胞増殖能の亢進を認めたことから、 β -catenin/TCFシグナル伝達系の活性化は、不死化細胞からATL腫瘍細胞への進展に寄与していることが強く示唆された。本研究は、これまで明らかにされていなかった不死化細胞から腫瘍細胞に至る機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。