

氏名	あいかわ あきよし 相川 晃慶		
学位の種類	博士（薬学）		
報告番号	乙第 1855 号		
学位授与の日付	令和 2 年 10 月 1 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当（論文博士）		
学位論文題目	ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型感染細胞における AMP 活性化プロテインキナーゼの発現と細胞死の誘導		
論文審査委員	(主 査) 福岡大学	教授	本田 伸一郎
	(副 査) 福岡大学	教授	右田 啓介
	福岡大学	准教授	佐野 和憲

内 容 の 要 旨

成人 T 細胞白血病 (ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス-1 (HTLV-1) の感染後、平均発症年齢 67 歳と長期潜伏期間を経て発症する予後不良の疾患である。ATL は臨床症状および病態により、くすぶり型、慢性型、急性型、リンパ腫型の 4 つに分類される。とくに、急性型 ATL は治療抵抗性を示すことが多く、極めて予後不良であるため、有効な治療法の確立が急務となっている。

AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) は細胞内エネルギー恒常性を司る最上位のキナーゼである。AMPK は、触媒ユニットの α サブユニットと 2 つの制御ユニットである β サブユニットおよび γ サブユニットで構成される。AMPK は細胞内のエネルギーストレス条件下において活性化され、ATP 産生の促進と ATP 消費の抑制を誘導する。近年、AMPK は腫瘍制御に関与していることが明らかとなっているが、ATL における役割は不明である。

本研究では、はじめに ATL 患者由来末梢血単核球 (PBMC) における AMPK の発現を確認し、既知の AMPK 活性化剤である A769662, AICAR および Metformin と AMPK 阻害剤である Dorsomorphin が HTLV-1 感染細胞の細胞死に及ぼす影響について検討を行った。

第一章 ATL 患者由来 PBMC における AMPK タンパク量の比較

急性型 ATL 患者、慢性型 ATL 患者、無症候性キャリア (AC) および健常者 (HD) 由来の PBMC における AMPK α の総タンパク量とリン酸化レベルをウエスタンブロット法によって調べた。AMPK α リン酸化レベルは活性化の指標となる T172 位がリン酸化された AMPK α タンパク量を AMPK α 総タンパク量で除したものである。AC や HD と比較して、急性型 ATL 患

者と慢性型 ATL 患者の総 AMPK α タンパク量は有意に多かった。一方、ATL 患者と HD の AMPK α リン酸化レベルに有意な差はなかった。これらの結果から、AMPK が ATL 細胞の生存に寄与することが示唆された。

第二章 A769662 による HTLV-1 感染細胞への影響

A769662 は AMPK に直接結合して活性化させることが報告されている。A769662 が HTLV-1 感染細胞株の細胞死に及ぼす影響について検討を行った。HTLV-1 感染細胞株である S1T 細胞、MT-1 細胞、MT-2 細胞および HTLV-1 非感染細胞株である Jurkat 細胞を A769662 で処理後、ウエスタンブロット法によってそれぞれのタンパクの変化を調べた。A769662 はすべての細胞株において AMPK α とその基質であるアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) のリン酸化を誘導した。一方、すべての細胞株においてアポトーシスの指標となる Caspase-3 の開裂とその基質であるポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) の切断は A769662 添加 72 時間後においても認められなかった。また、A769662 は S1T 細胞、MT-1 細胞、MT-2 細胞および Jurkat 細胞の細胞生存率をほとんど低下させなかった。これらの結果から、A769662 は HTLV-1 感染細胞株において AMPK を活性化するが、細胞死は誘導しないことが明らかになった。

第三章 AICAR による HTLV-1 感染細胞の細胞死の誘導

AICAR は細胞内でリン酸化を受けて ZMP に変換され、AMP 模倣体として AMPK を活性化させることが報告されている。AICAR が HTLV-1 感染細胞株の細胞死に及ぼす影響について検討を行った。S1T 細胞、MT-1 細胞、MT-2 細胞および Jurkat 細胞を AICAR で処理したところ、濃度依存的かつ時間依存的な細胞生存率の低下と細胞毒性の増加が認められた。細胞死の形態を確認したところ、AICAR は HTLV-1 感染細胞株においてアポトーシスを誘導することが示唆された。このアポトーシスの経路を明らかにするために細胞死受容体 DR5 の発現の変化を調べたところ、AICAR 処理によって S1T 細胞と MT-2 細胞において DR5 の発現とその下流の Caspase-8 の活性化が認められた。これらの結果から、AICAR は HTLV-1 感染細胞株において DR5 の発現を介してアポトーシスを誘導することが示唆された。

第四章 Metformin による HTLV-1 感染細胞の細胞死の誘導

2 型糖尿病治療薬である Metformin はミトコンドリアの呼吸鎖複合体 I を阻害することによって ATP 合成を阻害し、AMPK を活性化することが報告されている。Metformin が HTLV-1 感染細胞株の細胞死に及ぼす影響について検討を行った。S1T 細胞、MT-1 細胞および MT-

2 細胞を Metformin で処理したところ、濃度依存的かつ時間依存的に細胞生存率が低下した。また、細胞生存率の低下に伴い、オートファジーの指標となる LC3- I から LC3- II の変化がみられた。さらに、Metformin は mTOR の活性化を阻害した (図 4)。これらの結果から、Metformin は HTLV-1 感染細胞株において mTOR シグナル伝達を阻害することによってオートファジーを誘導することが示唆された。

第五章 Dorsomorphin による HTLV-1 感染細胞の細胞死の誘導

Dorsomorphin は Compound C とも呼ばれ、ATP 競合的に AMPK を阻害すると考えられている。Dorsomorphin が HTLV-1 感染細胞株の細胞死に及ぼす影響について検討を行った。Dorsomorphin は ATL 患者由来の PBMC と HTLV-1 感染細胞株においてアポトーシスを誘導した。また、Dorsomorphin は活性酸素種 (ROS) の産生を増加させて、DNA 損傷応答タンパクの ATM 活性化と p53 の蓄積を誘導した。さらに、A769662 と Dorsomorphin の併用実験において、HTLV-1 感染細胞の細胞生存率は改善されなかった。これらの結果から、Dorsomorphin は AMPK 非依存的に ROS 産生を介して DNA 損傷を引き起こし、アポトーシスを誘導することが示唆された。

総括

本研究において、AMPK α が ATL 患者由来の PBMC において高発現していたことから、AMPK が ATL の治療標的となり得ることが示された。また、HTLV-1 感染細胞株において A769662 は AMPK を活性化するだけで細胞死を誘導しないが、AICAR および Metformin は、それぞれ、DR5 の発現および mTOR シグナル伝達の阻害を介して細胞死を誘導した。さらに、AMPK の阻害剤として報告されている Dorsomorphin は、HTLV-1 感染細胞株において AMPK 非依存的にアポトーシスを誘導することが明らかになった。Dorsomorphin は強力なアポトーシスを誘導したが、様々なキナーゼを阻害しうることを踏まえると、患者に使用するには課題が多く残されている。一方、AICAR と Metformin は安全性が確認されており、ATL の治療薬の候補になり得ると考えられる。本研究が ATL の新規治療法の開発や患者の治療に貢献することを期待したい。

審査の結果の要旨

成人 T 細胞白血病 (ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス-1 (HTLV-1) の感染後、長期潜伏期間を経て発症する予後不良の疾患である。特に急性型 ATL は治療抵抗性を示すことが多く、極めて予後不良であるため、有効な治療法の確立が急務である。AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) は細胞内エネルギー恒常性を司る酵素である。近年、AMPK は腫瘍制御にも関与していることが報告されているが、ATL においてどのような役割を果たすかは不明のままである。

この研究では、AMPK 活性化剤と報告されている A769662, AICAR および Metformin と、AMPK 阻害剤と報告されている Dorsomorphin が HTLV-1 感染細胞株に及ぼす影響について検討を行っている。

①ATL 患者由来 PBMC における AMPK タンパク量の比較

急性型 ATL 患者、慢性型 ATL 患者、無症候性キャリア (AC) および健常者 (HD) の PBMC における AMPK α の総タンパク量とリン酸化レベルを調べた。AC や HD と比較して、急性型 ATL 患者と慢性型 ATL 患者の総 AMPK α タンパク量は有意に高かった。一方、ATL 患者と HD のリン酸化 AMPK α タンパク量に有意な差はなかった。これらの結果は、AMPK が ATL 細胞の生存に寄与することを示唆している。

②A769662 による HTLV-1 感染細胞株に及ぼす影響

AMPK に直接結合して活性化する A769662 が HTLV-1 感染細胞に及ぼす影響について検討した。HTLV-1 感染細胞株である S1T 細胞, MT-1 細胞, MT-2 細胞および HTLV-1 非感染細胞株である Jurkat 細胞を利用して A769662 の影響を調べた。A769662 はすべての細胞株において AMPK とその基質であるアセチル CoA カルボキシラーゼのリン酸化を誘導した。一方、アポトーシスの指標となる Caspase 3 の開裂などは、すべての細胞株で A769662 添加 72 時間後においても認められなかった。これらの結果から、A769662 は HTLV-1 感染細胞株において AMPK を活性化するが、細胞死は誘導しないことが明らかになった。

③AICAR による HTLV-1 感染細胞株の細胞死の誘導

AICAR は細胞内でリン酸化を受けて ZMP に変換され、AMP 模倣体として AMPK を活性化させる。AICAR が HTLV-1 感染細胞株に及ぼす影響について検討を行った。HTLV-1 感染細胞株および非感染細胞株を AICAR で処理したところ、濃度依存的かつ時間依存的な細胞生存率の低下と細胞毒性の増加が認められた。細胞死の形態を調べると、AICAR は HTLV-1 感染

細胞株ではアポトーシスを誘導することが示唆された。このアポトーシスの経路について細胞死受容体 DR5 の発現の変化を確認したところ、AICAR 処理によって S1T 細胞と MT-2 細胞において DR5 とその下流の Caspase8 の活性化を認めた。これらの結果から、AICAR は HTLV-1 感染細胞株において DR5 の発現を介してアポトーシスを誘導することが示唆された。

④Metformin による HTLV-1 感染細胞株の細胞死の誘導

Metformin が HTLV-1 感染細胞に及ぼす影響について検討を行った。HTLV-1 感染細胞株を Metformin で処理したところ、濃度依存的かつ時間依存的に細胞生存率が低下した。細胞生存率が低下に伴い LC3-II の増加がみられたことから、Metformin は HTLV-1 感染細胞のオートファジーを誘導することがわかった。さらに、Metformin は mTOR の活性化を阻害した。これらの結果から、Metformin は HTLV-1 感染細胞株において mTOR シグナル伝達を阻害することでオートファジーを誘導することが示唆された。

⑤Dorsomorphin による HTLV-1 感染細胞株の細胞死の誘導

Dorsomorphin は ATP 競合的に AMPK を阻害すると考えられている。Dorsomorphin は ATL 患者由来 PBMC と HTLV-1 感染細胞においてアポトーシスを誘導した。また、Dorsomorphin は活性酸素種の産生を増加させて、DNA ダメージ修復に関与する ATM を活性化し、p53 を介してアポトーシスを誘導すると考えられた。Dorsomorphin は AMPK 非依存的に ROS 産生を介して DNA ダメージを引き起こし、アポトーシスを誘導することが示唆された。

以上、本研究において、申請者は AMPK が ATL 患者の PBMC において高発現していたことから治療標的となり得ることを示し、ここから研究を進展させている。申請者は HTLV-1 感染細胞株において A769662 は AMPK を活性化するだけで細胞死を誘導しないこと、AICAR は DR5 を介して、Metformin は mTOR シグナル伝達の阻害を介して、それぞれ異なる細胞死を誘導することを示した。さらに、AMPK の阻害剤として報告されている Dorsomorphin は、HTLV-1 感染細胞株において AMPK 非依存的にアポトーシスを誘導することを示した。このように、HTLV-1 感染細胞に対する種々の AMPK 関連化合物の影響を解明したことは、高く評価できる。また、論文や学会発表などの業績、ならびに公聴会審査における質疑応答は、博士の学位を授与するに十分な能力を有すると判断した。結論として、本論文は学位論文として十分に評価できると考えられる。