

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

相川 晃慶

福岡大学薬学部生化学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

Expression of AMP-activated protein kinase and induction of cell death in human T-cell leukemia virus type 1-infected cells

Akiyoshi Aikawa

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) is an aggressive T-cell neoplasm with poor prognosis that develops after chronic infection with human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1). Although AMP-activated protein kinase (AMPK) is a critical cellular energy sensor, it has recently become clear that AMPK can act as a tumor regulator.

The following results were obtained: (1) AMPK expression in acute and chronic ATL patients was significantly higher than in asymptomatic HTLV-1 carriers and healthy donors. (2) A769662, a direct activator of AMPK, did not induce cell death although increased phosphorylation of AMPK. (3) AICAR, an adenosine analogue, induces apoptosis via death receptor 5 expression and ER stress in HTLV-1-infected T-cell lines. (4) Metformin, an indirect AMPK activator, induced cell death with autophagy via inhibition of mTOR signaling. (5) Dorsomorphin, a reversible AMPK inhibitor induces apoptosis via ROS-mediated DNA damage in HTLV-1-infected T-cell lines. These data suggest that AMPK could be a candidate therapeutic target for ATL and that AICAR, metformin and dorsomorphin could be a therapeutic agent for ATL.

keywords : adult T-cell leukemia/lymphoma, AMP-activated protein kinase, human T-cell leukemia virus type 1, cell death

【緒言/目的】

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[1]。ATLは臨床症状や病態によって、くすぶり型、慢性型、急性型およびリンパ腫型の4つに分類される[2]。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[3]。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[4]。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。

【実験方法】

末梢血単核球の分取

全血 20 mL を採血管に移し、3000 rpm で5分間遠心した。血清を除去し、予め Ficoll-Paque 3 mL を入れて、3000 rpm で1分間遠心した LEUCO SEP に、スポイトで血球を移した。滅菌 PBS で採血管を共洗いして LEUCO SEP に移し、1600 rpm で25分間遠心した。上清を 1 mL 程度になるまで除去し、白血球を 2%FBS/RPMI 5 mL 入り 15 mL tube にスポイトで移して洗い、1600 rpm で10分間遠心分離した。遠心上清を除去し、2%FBS/RPMI 5 mL で懸濁し、cell strainer を通し、50 mL tube に移した。2%FBS/RPMI 5 mL で15 mL tube を共洗いし、cell strainer を通し、先ほどの 50 mL tube に移し、1600 rpm で5分間遠心分離した。上清を除去し、セルバンカーで 5×10^6 cells/mL/tube に調製し、クライオチューブにて凍結保存した。

細胞培養

HTLV-1 感染細胞株の MT-1, MT-2, MT-4 および S1T と Jurkat 細胞は RPMI-1640 に 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin, 2 mM L-Glutamine となるように調整した培地を用いて、37°C, 5% CO₂ に設定したインキュベーターにて培養した。HTLV-1 感染細胞株の MT-3 は上記の培地に MEM 非必須アミノ酸溶液を 1% となるように添加した培地を用いた。実験に用いる際は細胞濃度が 2×10^5 cells/mL となるように調製した。

ウェスタンブロット法

分離ゲル (8%) および濃縮ゲルからなるスラブゲルに、調製した sample を各レーンに総タンパク量 5 µg ずつ apply しゲル 1 枚当たり、40 mA にて SDS-PAGE を行った。泳動槽および電源装置は ATTO 社製を使用した。泳動バッファーは NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (Thermo Fisher Scientific) を使用した。泳動後のゲルを取り出し、Cathode Buffer に15分間浸漬した。PVDF膜はメタノールで湿潤後、精製水で洗浄し、Anode Buffer 2 に20分間浸漬した。転写装置の陽極側から、Anode Buffer 1 (300 mM Tris-base, 10% MeOH) に浸漬したろ紙2枚、Anode Buffer 2 (25 mM Tris-base, 10% MeOH) に浸漬したろ紙1枚、PVDF膜、ゲル、Cathode Buffer (25 mM Tris-base, 40 mM 6-Aminocaproic acid, 10% MeOH) に浸漬したろ紙3枚を順に重ね、2 mA/cm² で60分間セミドライプロットングを行った。転写後の膜は Blocking One (ナカライテスク) に15分間浸漬してブロッキングを行った。ブロッキング後の PVDF膜を Tween-PBS にて洗浄後、Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 1 (東洋紡) 1 mL あたり、一次抗体 1 µL を希釈した液中で一晩インキュベートした。PVDF膜を Tween-PBS にて洗浄後、Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 2 (東洋紡) 10 mL あたり、PEROXIDASE 標識二次抗体 1 µL を希釈した液中で60分間インキュベートした。PVDF膜を Tween-PBS にて洗浄後、Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク) を用いて化学発色させ、ChemiDocXRS (BIO-RAD) を用い、撮影および画像解析を行った。検出像のデンストメトリーは Quantity One (BIO-RAD) を用いて数値化した。

【結果】

1. 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（Fig. 1）。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。

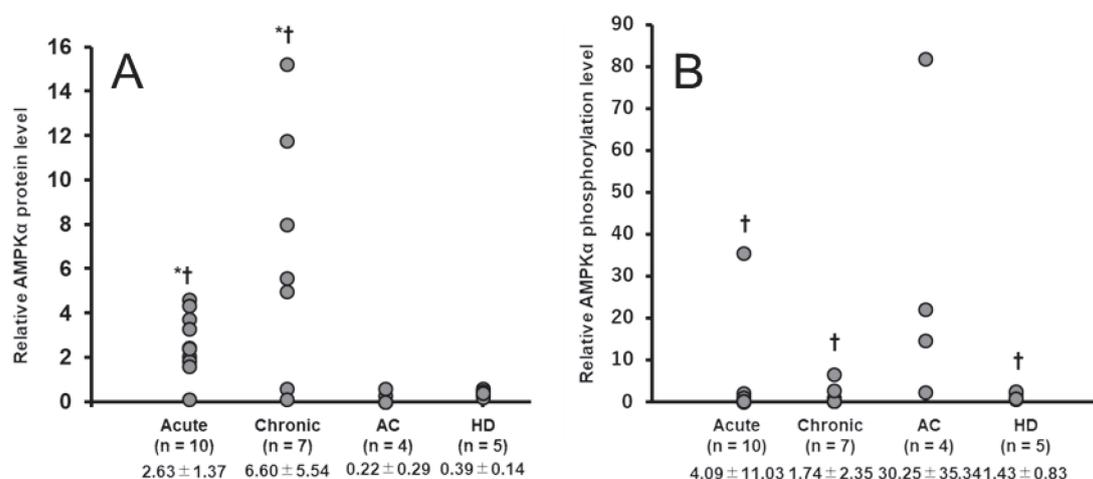


Fig.1 Expression and phosphorylation of AMPK α in ATL patients. (A) AMPK α protein levels were analyzed relative to β -actin as a control (acute type ATL, $n = 10$; chronic type ATL, $n = 7$; AC, $n = 4$; HD, $n = 5$). (B) AMPK α phosphorylation levels were expressed as the phospho-AMPK α /total AMPK α ratio (acute type ATL, $n = 10$; chronic type ATL, $n = 7$; AC, $n = 4$; HD, $n = 5$). Data are representative of three independent experiments for each subject. Lower numbers represent means \pm standard deviations for the indicated group. Mann-Whitney U test; * $P < 0.05$ vs. HD, $\dagger P < 0.05$ vs. AC.

2. 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[5]。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（Fig. 2）。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。

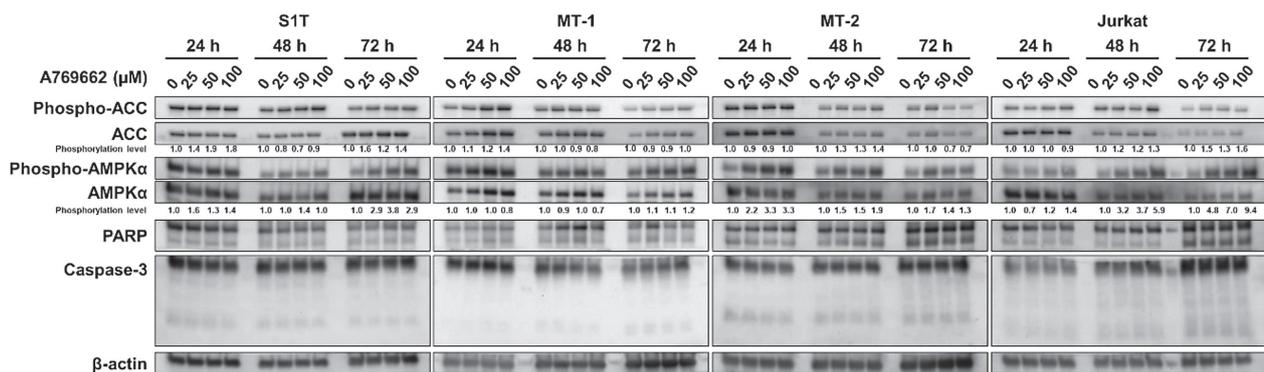


Fig.2 Effects of A769662 on AMPK and apoptotic protein in HTLV-1-infected T-cell lines. Cell lines were incubated in the presence of various concentrations of A769662 for 24, 48 and 72 h.

3. 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[6]。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 (Fig. 3)。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。

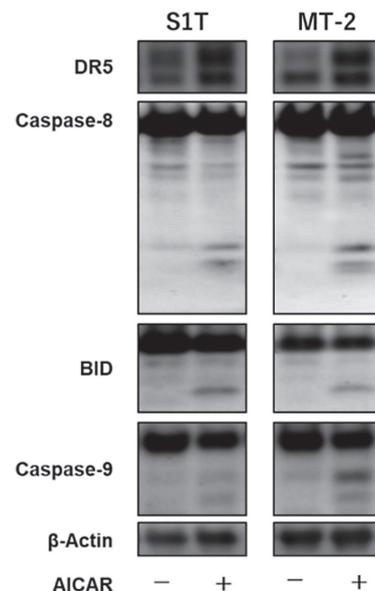


Fig.3 Effects of AICAR on DR5 in HTLV-1-infected T-cell lines. Cell lines were incubated in the presence of AICAR (500 μM) for 48 h.

4. 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[7][8]。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 (Fig. 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。

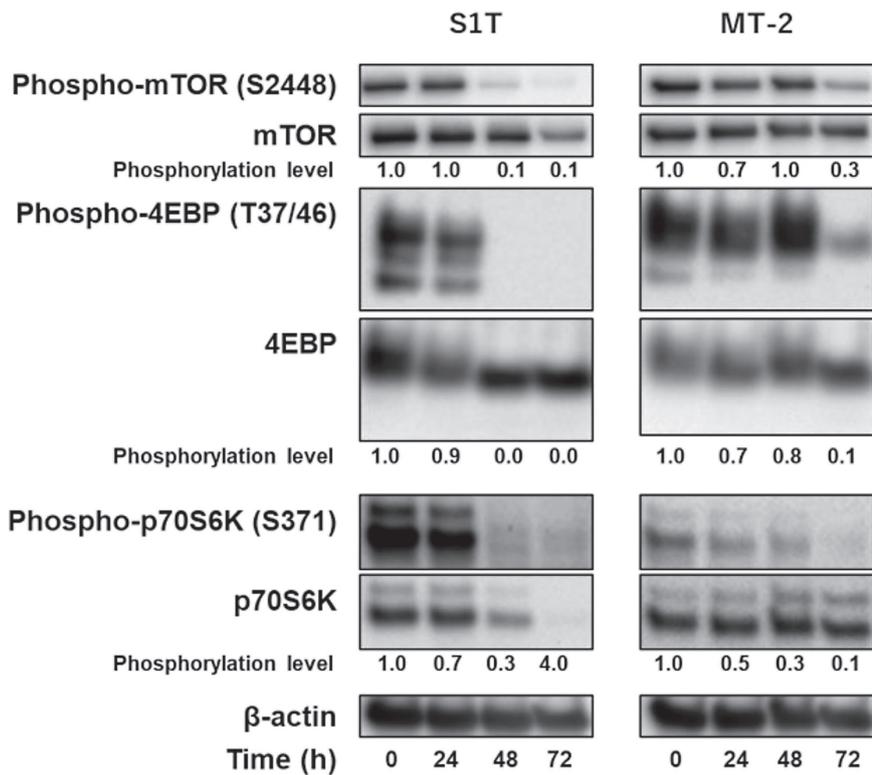


Fig.4 Effects of metformin on mTOR signaling in HTLV-1-infected T-cell lines. Cell lines were incubated in the presence of metformin (10 mM) for 0, 24, 48 and 72 h.

5. 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 [9]。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 (Fig. 5)。

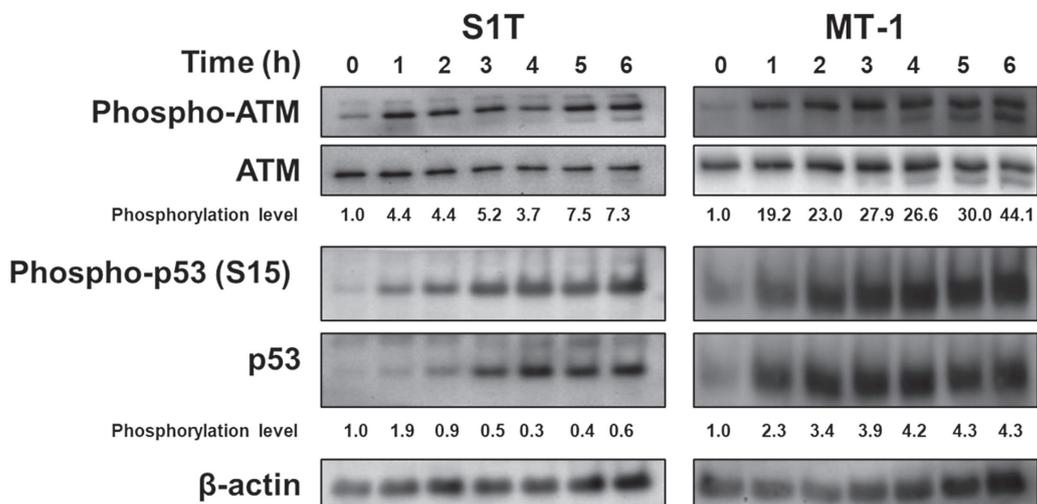


Fig.5 Induction of DNA damage by dorsomorphin in HTLV-1-infected T-cell lines. Cell lines were treated with dorsomorphin (25 μM) for the indicated times.

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。

【考察】

本研究において、ATL患者由来のPBMCでのAMPK α が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 (Fig. 6)。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。

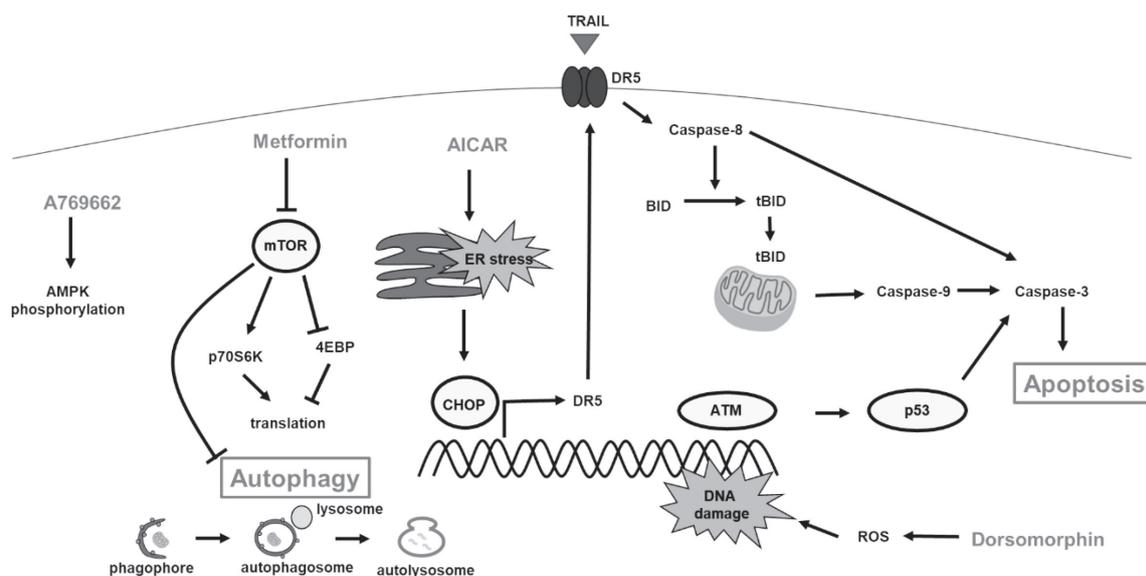


Fig.6 Schematic representation of AICAR-, metformin- and dorsomorphin-induced cell death pathways in HTLV-1-infected cell lines

【参考文献】

1. Watanabe, T. (2017) Adult T-cell leukemia: molecular basis for clonal expansion and transformation of HTLV-1-infected T cells, *Blood*. **129**, 1071 - 1081 .
2. Shimoyama, M. (1991) Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87), *British journal of haematology*. **79**, 428-37.

3. Steinberg, G. R. & Kemp, B. E. (2009) AMPK in Health and Disease, *Physiol Rev.* **89**, 1025-78.
4. Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T. & Neumann, D. (2006) Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase, *The Journal of biological chemistry.* **281**, 32207-16.
5. Göransson, O., McBride, A., Hawley, S. A., Ross, F. A., Shpiro, N., Foretz, M., Viollet, B., Hardie, D. G. & Sakamoto, K. (2007) Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase, *The Journal of biological chemistry.* **282**, 32549-60.
6. Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A. & Hardie, D. G. (1995) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?, *Eur J Biochem.* **229**, 558-65.
7. Owen, M. R., Doran, E. & Halestrap, A. P. (2000) Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain, *The Biochemical journal.* **348 Pt 3**, 607-14.
8. El-Mir, M. Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M. & Leverve, X. (2000) Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I, *The Journal of biological chemistry.* **275**, 223-8.
9. Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J. & Moller, D. E. (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action, *The Journal of clinical investigation.* **108**, 1167-74.