

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 581 号	学位申請者	内田 友一朗
審査委員	主査	河野 嘉文	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	池田 正徳	副査 久保田 龍二
	副査	岡本 康裕	副査 藤井 一恭

主査および副査の5名は、令和2年12月21日、学位申請者 内田友一朗君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) RLTPR はアクチン脱キャッピングタンパク質として細胞骨格調節に関与すると説明していたが、NF- $\kappa$ B の活性化と細胞骨格調節機能に関係があるのか。

(回答) RLTPR は、ピメンチン中間径フィラメントと共局在し、細胞骨格調節に関与する。一方で、T 細胞が T 細胞受容体経路を介して NF- $\kappa$ B を活性化する際に、T 細胞受容体とシグナル伝達タンパク質の集合体である T 細胞受容体マイクロクラスターが形成されるが、その中で RLTPR は CD28 と CARD11 の連結に関与していることが知られている。

質問 2) ATL 患者細胞を刺激した場合、RLTPR 変異の有無によって NF- $\kappa$ B のリン酸化の程度や IL-2 mRNA レベルに差が出ると考えられるか。

(回答) 今回 RLTPR Q575E 変異を持つ ATL 患者細胞を刺激する検討は細胞数が限られていたため検討できていない。ATL 患者細胞を外因性 IL-2 などで刺激した場合、強力な IL-2 mRNA の発現誘導が起きることが知られている。今回行った変異 RLTPR の発現実験では IL-2 mRNA の発現は誘導されるものの、その程度は限定的であった。そのため ATL 患者細胞を刺激した場合に RLTPR 変異の有無によって NF- $\kappa$ B 活性化や IL-2 mRNA レベルに差を見出すことは困難であると考えられる。ただし RLTPR の野生型と Q575E 変異を Jurkat 細胞にそれぞれ強制過剰発現させ刺激し、RNA 発現量を比較した報告では 96 の遺伝子が有意に発現し、その発現の上位 4 つは NF- $\kappa$ B が転写に関与する遺伝子であった。

質問 3) pcDNA3.1 を用いたトランスフェクションによる遺伝子導入とレトロウイルスによる遺伝子導入を使い分けた理由はなにか。またレトロウイルスベクターのパッケージ細胞は何を用いたか。Mock とは対照のことか。

(回答) 浮遊細胞である Jurkat 細胞を用いたレポーターアッセイ等の機能解析では、トランスフェクションによる一過性発現ではトランスフェクション効率が低く、十分に機能評価できなかった。その為レトロウイルスを用いて恒常的に RLTPR を発現させたものを解析に用いた。293T 細胞を用いた免疫沈降法ではトランスフェクションによる遺伝子導入で十分な発現を得られたため、一過性発現での機能評価を行った。またパッケージ細胞はヒト細胞に感染力のある PLAT-A 細胞を用いた。Mock は疑似遺伝子導入対照で eGFP 発現を用いた。

質問 4) RLTPR と CARD11 は直接結合しているのか、複合体の一部として結合しているのか。

(回答) 大腸菌で RLTPR と CARD11 を発現させ、プルダウンアッセイ法により結合が直接的か間接的かを評価できる可能性がある。マウス胸腺細胞に発現した RLTPR の結合タンパク質をアフィニティー精製質量分析法で解析した報告では、CARD11、CD28、VAV1 などは RLTPR の結合タンパク質であることが示されている。また CARD11 は T 細胞活性化の際に、BCL-10、MALT1 と直接結合し CBM 複合体を形成するため、今回 RLTPR と MALT1、RLTPR と BCL-10 の結合についても検討したが、共沈降は認めなかった。

質問 5) 片岡らの報告 (Kataoka K et al. Nature Genetics 2015; 47:1304-15) で RLTPR Q575E 変異を 1 例認めているが、患者背景に違いがあるか。

(回答) 片岡らによる 81 例中のエクソーム解析で RLTPR Q575E 変異は慢性型患者 1 例のみからの検出であったため、反復性ではないとして追加解析から除外された。我々の検討では慢性型やくすぶり型で検討できていないものの患者背景に大きな差はないと考えられ、多数例で検討した場合には同変異が検出される可能性がある。

質問 6) ATL 患者細胞のサンプル数を増やし、RLTPR Q575E 変異に絞って検査することで同変異の検出数は増えるのではないか。

(回答) 検索範囲を限定し、サンプル数を増やすことで RLTPR Q575E 変異検出数が増えることが予想される。ホットスポット (RLTPR Q575) に絞った遺伝子パネル検査による検討を予定している。

質問 7) RLTPR Q575E 変異による NF- $\kappa$ B のリン酸化は ATL 腫瘍化時、腫瘍化後のいずれで出現することが予想されるか。

(回答) HTLV-1 キャリアを ATL 発症前から追跡した研究では、アグレッシブ ATL を発症する 10 年前までに HTLV-1 感染細胞がドライバー遺伝子変異を獲得し、診断の 6 カ月前には獲得した遺伝子変異の変異頻度とそのクローンの総数が上昇していた報告がある。RLTPR についても、このような経時的な解析を行う必要がある。

## 最終試験の結果の要旨

**質問 8)** CD28 によっても活性化される PKC $\theta$  は、PMA 刺激のみでも活性化されるが、CD86 刺激の意義は何か。

(回答) RLTPR は CD28 と CARD11/ PKC $\theta$  をカップリングする機能が報告されている。PMA 刺激と PMA + CD86 刺激を評価することで、RLTPR が CD28 共刺激経路を介した NF- $\kappa$ B 活性化機能を持つことを確認した。

**質問 9)** 非刺激下で変異型 RLTPR は NF- $\kappa$ B の活性化を惹起しないのか。また CD28 単独の刺激はしてないのか。

(回答) RLTPR は T 細胞活性化の際にマイクロクラスター形成にかかわる。T 細胞は、T 細胞受容体のシグナルと共刺激経路 (CD28) の副刺激を同時に受けて活性化するため共刺激を行った。また非刺激下で RLTPR の野生型と変異型で NF- $\kappa$ B の活性に差がない報告がある。

**質問 10)** ATL における NF- $\kappa$ B の活性化は、腫瘍化と腫瘍維持にどのような役割があるか。

(回答) 様々な腫瘍で恒常的増殖シグナルによって、腫瘍内の遺伝子発現プロファイルのリプログラミングが起きること知られている。その際に genetic/epigenetic 変化が蓄積することが腫瘍化・腫瘍維持に寄与していると考えられている。ATL においても網羅的遺伝子解析により多様な増殖シグナル経路の活性化が明らかとなり、特に T 細胞受容体/ NF- $\kappa$ B 活性化経路は重要な恒常的増殖シグナルの一つと考えられる。

**質問 11)** Q575E 変異はエクソン 14 欠損部位と重なっているか。変異と欠損は共存しないのではないのか。

(回答) Isoform 3 はエクソン 14 の一部のみの欠損であり、Q575 はエクソン 14 欠損部位より C 末側に位置するため、共存している。

**質問 12)** 遺伝子解析の変異情報によるランドスケープ解析は検討したか。

(回答) 本報告では、変異情報を基にしたグループ分けや、系統樹の作成には実施できていない。既報では T 細胞受容体/NF- $\kappa$ B 経路をはじめ、G タンパク共役型受容体、他のシグナリング経路、転写因子群など、多様な遺伝子変異を示している。

**質問 13)** 機能獲得型変異として NF- $\kappa$ B の活性や IL-2mRNA の上昇以外の機能を評価する方法はないか。

(回答) IL-2 依存性 ATL 患者由来細胞株 (KaTO1F 細胞など) に RLTPR 野生型/Q575E を発現させ、変異によって IL-2 刺激非依存的な増殖能力の獲得を検討することで、*in vitro* での増殖能の評価が可能となる。

**質問 14)** RLTPR Q575E 変異を有した症例に特徴的な経過や、予後の傾向などはみられたか。

(回答) RLTPR 変異を有している患者群の経過や予後について症例ごとに検討したが、一定の傾向は得られなかった。特に皮膚 T 細胞リンパ腫で当初同定されたことから、皮膚指向性について検討したが、1 例 (25%) に認められるのみであった。予後の評価をするには症例数・イベント数が不十分であり結論づけられていない。

**質問 15)** RLTPR Q575E 変異の導入によって、細胞形態に変化はみられたか。

(回答) 恒常的 RLTPR Q575E 変異を Jurkat 細胞に発現させたが、光学顕微鏡下では形態変化は見られなかった。

**質問 16)** 変異 RLTPR 発現細胞を用いたマイグレーションアッセイは行ったか。

(回答) マイグレーションアッセイは行っていない。既報では RLTPR 欠損細胞において対照と比較して移動速度が低下した報告がある (Lanier MH, et al. J Biol Chem. 2016; 293 (3):1076-1091)。

**質問 17)** 反復性という意味はなにか。

(回答) 複数例で同じアミノ酸部位に変異が認められた場合に用いられる。

**質問 18)** 片岡らは 81 例を解析しており、今回の検討は 47 例である。少ないのではないのか。

(回答) 片岡らの 81 例の解析では、急性型、リンパ腫型に限れば、50 例での検討であるため、症例数に関してはほぼ同規模であり症例数を倍増した解析ができた。

**質問 19)** 慢性型やくすぶり型には同じ変異は見つからないと考えるか。

(回答) これまで報告された他の変異は頻度の差はあるが急性型や慢性型に関わりなく検出されている。RLTPR の変異についても症例数を増加させることで、慢性型やくすぶり型においても発見できる可能性がある。片岡らの報告で 1 例検出されているが、慢性型であった。

**質問 20)** 本実験においてそれぞれの細胞株の選定理由は何か。

(回答) Jurkat 細胞: T 細胞腫瘍であり、T 細胞受容体経路の検討のため。Su9T01 細胞: ATL 患者由来細胞での検討のため。MT-2: HTLV-1 ウイルス産生細胞での検討のため。293T 細胞・Hela 細胞: 上皮系細胞として、血球系細胞との比較のため。また特定のタンパク質の一過性発現での検討が行いやすいため。

**質問 21)** RLTPR に対する創薬の可能性はどうか。

(回答) T 細胞受容体経路分子の一つである MALTI は ATL 創薬のターゲットとされている。一方で共刺激受容体である CD28 の欠損マウスや CD28 の下流分子である RLTPR の欠損マウスでは、制御性 T 細胞が著しく減少することが報告されている。制御性 T 細胞由来腫瘍である ATL では CD28 共刺激経路分子の共抑制も治療標的となりうると考えている。

**質問 22)** RLTPR との免疫沈降は CARD11 でしか行ってないのか。PKC $\theta$  や CD28 との検討は行ったか。

(回答) RLTPR と PKC $\theta$  や CD28 との免疫沈降は行ってない。しかし CD28、PKC $\theta$ 、RLTPR 及び CARD11 は T 細胞受容体とシグナル伝達タンパク質の集合体である T 細胞受容体マイクロクラスターの形成に関与する報告があるため、免疫沈降によって RLTPR と PKC $\theta$  や CD28 の結合増強の有無について評価することは RLTPR 変異の意義についてより詳細に解明できる可能性がある。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。