

氏名（本籍） 榎並 輝和（埼玉県）
 学位の種類 博士（医学）
 学位記番号 博甲第 7086 号
 学位授与年月 平成26年 4月30日
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
 審査研究科 人間総合科学研究科
 学位論文題目 血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫において新規に同定された疾患
 特異的遺伝子変異 G17V RHOA の機能解析

主査	筑波大学教授	医学博士	加藤 光保
副査	筑波大学講師	博士（医学）	松井 裕史
副査	筑波大学助教	博士（理学）	齋藤 祥子
副査	筑波大学助教	博士（医学）	西村 健

論文の内容の要旨

（対象と方法）

血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫(AITL)は標準的治療が確立されていない、予後不良な T 細胞リンパ腫である。近年、*TET2*、*IDH2*、*DNMT3A* といったエピジェネティクス関連遺伝子の変異が AITL において高頻度に認められることが報告されている。しかし、これらの遺伝子変異は骨髄系腫瘍でも同様に認められており、疾患特異性は低い。そこで、先行研究において AITL における新規遺伝子変異の検索を行い、その結果、疾患特異的な *RHOA* 遺伝子変異を同定した。本研究は、この遺伝子変異によって生じる変異体、G17V *RHOA* の詳細な機能解析を行い、AITL の病態解明、および新規治療薬の創薬に貢献することを目的としている。

（対象と方法）

野生型 *RHOA* および変異体の発現コンストラクトを作製し、NIH3T3 細胞株に過剰発現させて機能解析を行った。まず、G17V *RHOA* それ自体が活性型になり得るのか、また、G17V *RHOA* の存在により、野生型 *RHOA* 活性が変化するのか、*RHOA* のエフェクタータンパク質である Rhotekin を用いた pull-down assay にて検討した。次に、GST 融合 *RHOA* タンパクを作製し、RHO GEF の 1 つである ECT-2 との結合の強さを評価した。さらに G17V *RHOA* の生物学的機能を検証するため、SRF-RE レポーターアッセイを用いて *RHOA* シグナルへの影響と免疫染色を用いた細胞骨格への影響を検討した。

T 細胞での機能評価に関しては、野生型及び G17V *RHOA* の発現を誘導することが可能な Jurkat 細胞を作製し、細胞増殖アッセイ、細胞周期アッセイを行った。最後に、NIH3T3 細胞、Jurkat 細胞における

遺伝子発現変化を評価するために mRNA シーケンスを行い、どの遺伝子群が変化しているのか、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) にて解析した。

(結果)

Pull-down assay の結果、G17V RHOA は GTP への結合能が失われているとともに、野生型 RHOA の活性を抑えるドミナントネガティブ(DN)効果を持つことが明らかとなった。また、ECT-2 への結合能が野生型 RHOA と比べて有意に上昇していた。この DN 効果は、RHOA シグナルの抑制、アクチン重合の低下といった生物学的な RHOA の機能解析においても確認された。

T 細胞株を用いた実験では、野生型 RHOA の発現を誘導すると、細胞増殖および G1 期から S 期への細胞周期移行が抑制されたが、G17V RHOA ではその抑制が見られなかった。このことは、RHOA の腫瘍抑制作用が G17V RHOA では欠如している可能性を示唆している。遺伝子発現データに関して GSEA 解析を行ったところ、野生型 RHOA 過剰発現細胞では SRF 経路の有意な発現上昇が見られたのに対し、G17V RHOA 発現細胞ではそれがみられず、遺伝子発現に関しても G17V RHOA が機能欠損型変異であることを支持する結果が得られた。

(考察)

本研究によって、G17V RHOA はそれ自体が活性型をとれないだけでなく、野生型 RHOA に対してドミナントネガティブに作用することが明らかとなった。RHO GEF との結合が G17V RHOA で亢進していることから、G17V RHOA が GEF と優先的に結合することにより、野生型 RHOA と結合可能な GEF が減少し、DN 効果が発揮されると予想される。

以前より DN 変異体の一つとして報告されている G17A RHOA は、GDP/GTP いずれにも結合ができず、nucleotide-free の状態で存在し、RHO GEF と強固に結合することが知られている。17 番目のグリシンが、非極性側鎖アミノ酸であるバリンやアラニンに変換されると、それぞれの側鎖によって、GDP/GTP との結合に必要な水分子を追い出すことが、立体構造上推定される。以上の結果は G17V RHOA がドミナントネガティブに作用することを強く支持するものである。

これまで、一般的に RHOA の発現上昇が発癌に関わっていることが複数のがん種で報告されているが、本研究の結果は、これと相反するものであった。興味深いことに、RHOA/B/C 全ての活性を阻害する C3 トランスフェラーゼを T 細胞特異的に発現するマウスでは、初期には胸腺細胞・成熟 T 細胞の減少を認めるが、4~8 ヶ月後に T 細胞リンパ腫を発症するという報告がある。本研究での Jurkat 細胞を用いた実験結果からも、少なくとも T 細胞においては、RHOA は腫瘍抑制的に働くと推測される。

また、RHOA 変異を有する例では全例に TET2 変異が認められた。当研究室における TET2 ノックダウンマウスの解析では、T 細胞リンパ腫を発症することが確認されており、TET2 の機能欠損による DNA メチル化制御の破綻も、AITL 発症には必須である可能性が高い。

(結論)

AITL において高頻度に認められる G17V RHOA は、野生型 RHOA に対してドミナントネガティブに作用することが明らかとなった。

これまで、多くの悪性腫瘍で RHOA の発現、活性の上昇が報告されてきたが、本研究の結果は、T 細胞においては RHOA 機能低下が腫瘍発生に関与する可能性を示唆するものである。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫の発症に関わる特異的 point mutation の発見に基づき、その機構解析を行い、G17V RHOA 変異体は野生型 RHOA に対してドミナントネガティブ作用をもつことを明らかにしたものである。高いオリジナリティーをもつ研究成果で実験結果も明瞭であり、今後、この変異体を用いたさらなる解析により、AITL の発症機構の解明、および特異的な治療法開発にさらに大きく貢献できると期待される。

平成 26 年 2 月 20 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。