

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：小関 昭仁

専攻分野：最新医学研究コース

指導教授：山野 嘉久

主論文の題目：

EZH1/2 Dual Inhibitors Suppress HTLV-1-infected Cell Proliferation and Hyperimmune Response in HTLV-1-associated Myelopathy

(EZH1/2 二重阻害剤は HTLV-1 関連脊髄症における HTLV-1 感染細胞の増殖と過剰免疫応答を抑制する)

共著者：

Natsumi Araya, Makoto Yamagishi, Junji Yamauchi, Naoko Yagishita, Naoki Takao, Katsunori Takahashi, Yasuo Kunitomo, Daisuke Honma, Kazushi Araki, Kaoru Uchimaru, Tomoo Sato, Yoshihisa Yamano

緒言

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) は、HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1-associated myelopathy: HAM) 及び成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (adult T-cell leukemia-lymphoma: ATL) を引き起こすが、HAM は HTLV-1 感染細胞に対する過剰免疫応答により、ATL は感染細胞ががん化した ATL 細胞の増殖により生じる。ATL 細胞では、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関わるヒストンメチル化酵素 Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) が過剰発現し、EZH1/2 阻害剤のバレメトスタットが ATL の治療薬となっている。本研究では、EZH2 の過剰発現が HAM で認められるか、EZH1/2 阻害剤が HAM における過剰免疫応答及び HTLV-1 感染細胞の増殖を抑制できるか検証し、HAM の治療薬としての可能性を検討した。

方法・対象

HAM 患者由来の HTLV-1 感染細胞集団 (CD4+細胞、CD4+CCR4+細胞) をフローサイトメトリー (FC) で分離し、その EZH2 発現量をマイクロアレイ及び Reverse transcriptase-quantitative PCR (RT-qPCR) で解析し、健常人由来の細胞集団と比較した。HAM 患者由来の末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) (HAM-PBMC) の自発的増殖応答を利用し、EZH2 阻害剤 (GSK126 及びタゼメトスタット) 又は EZH1/2 阻害剤 (OR-S1 及びバレメトスタット) の存在下で培養し、³H チミジン取り込みアッセイにより細胞増殖評価を行った。EZH1/2 阻害剤の存在下で HAM-PBMC を培養し、FC で細胞増殖マーカー Ki67 の発現率、real-time PCR により HAM-PBMC 中のプロウイルス量、cytometric bead array により培養上清中サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-10) 濃度を測定した。HAM 患者由来の HTLV-1 感染細胞株を OR-S1 又はバレメトスタット存在下で培養し、7、11、14、21 日目時点の細胞生存率を調べた。さらに、アネキシン V と 7-アミノアクチノマイシン D で染色しフローサイトメーターで測定しアポトーシス細胞を解析した。

統計は、CD4+CCR4+細胞の EZH2 発現量の比較には対応のない t 検定を用いた。多群比較にはフリードマン検定を使用し、次いでダン多重比較検定を用いた。有意水準は 5%とした。本研究は聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会 (承認番号 第 1646 号) の承認を得たものである。

結果

マイクロアレイ解析では、HAM 患者由来の CD4+細胞の EZH2 発現は健常人由来細胞の 2.4 倍高く、RT-qPCR 解析では HAM 患者由来の CD4+CCR4+細胞の EZH2 発現は健常人由来細胞の 2.6 倍高かった ($p=0.001$)。HAM-PBMC の自発的増殖応答を、EZH2 阻害剤は $1\ \mu\text{M}$ で有意に抑制し、EZH1/2 阻害剤はより低い濃度の $0.1\ \mu\text{M}$ で有意に抑制した (各 $p<0.01$, $p<0.05$)。EZH1/2 阻害剤は Ki67+CD4+T 細胞及び Ki67+CD8+T 細胞の割合を減少させ、HAM-PBMC 中の HTLV-1 プロウイルス量を $1\ \mu\text{M}$ で有意に減少させた

($p < 0.05$)。また、HAM-PBMC 培養上清中の IL-10 レベルを OR-S1 では $1 \mu\text{M}$ で、バレットスタットでは $0.1 \mu\text{M}$ で有意に上昇させたが (各 $p < 0.0001$, $p < 0.05$)、IFN- γ 及び TNF- α レベルは変化させなかった。EZH1/2 阻害剤は HTLV-1 感染細胞株の増殖を経時的かつ濃度依存的に阻害した。EZH1/2 阻害剤は、HTLV-1 感染細胞株 HCT-4 及び HCT-5 とともに、アネキシン-V 陽性 7-アミノアクチノマイシン D 陰性の初期アポトーシス細胞の割合を増加させた。

考察

本研究により、HAM 患者の HTLV-1 感染細胞における EZH2 発現上昇が明らかになった。また、EZH2 阻害剤及び EZH1/2 阻害剤が、HAM における過剰免疫応答を模した HAM-PBMC の自発的増殖応答を抑制した。そのメカニズムとして、EZH1/2 阻害により、①アポトーシス誘導による HTLV-1 感染細胞数の減少、②HTLV-1 特異的 CD8+T 細胞の増殖反応の抑制、③抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生亢進の作用が考えられた。炎症性サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α) の産生は抑制されず IL-10 の産生が亢進したメカニズムについては更なる研究が必要である。

結論

本研究より、EZH1/2 阻害剤は、HAM 患者における過剰免疫応答と HTLV-1 感染細胞の増殖を抑制し、HAM の治療薬としての可能性が示された。