

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 岩崎純子

学位論文題名

FIP1L1 を介して生じる白血病融合遺伝子 FIP1L1-RARA, FIP1L1-PDGFR α の機能解析
(Functional analysis of FIP1L1-RARA and FIP1L1-PDGFR α ; the leukemogenic fusion genes associated with FIP1L1.)

【背景・目的】

FIP1L1 を介する白血病融合遺伝子には FIP1L1-RARA と FIP1L1-PDGFR α が存在する。FIP1L1-RARA は、FIP1L1 を介するホモ 2 量体形成により、レチノイン酸刺激による転写活性を抑制し、急性前骨髄球性白血病の発症を誘導する。一方、FIP1L1-PDGFR α では、PDGFR α キナーゼ活性の恒常的活性化が生じることで慢性好酸球性白血病(Chronic Eosinophilic Leukemia, CEL)の発症を誘導するが、キナーゼ活性化には PDGFR α の膜直下領域の一部が欠失することが必要であり、FIP1L1 部分はないとされている。しかし、FIP1L1-PDGFR α の下流のシグナル伝達分子である STAT5, PKB/AKT の活性化には FIP1L1 が必要であることも報告されており、FIP1L1-PDGFR α による白血病発症には FIP1L1 を介する増殖促進経路の存在が推測されている。

本研究では白血病を発症する 2 種類の FIP1L1 融合遺伝子について、FIP1L1 を介する腫瘍化機構の解析を試みた。

【方法と結果】

1. FIP1L1-RARA での FIP1L1 を介したホモ 2 量体形成領域の同定とレチノイン酸応答抑制
FIP1L1 には種を超えて保存されている FIP1 motif が存在しているため、この領域がホモ 2 量体形成に必要であると推測し、FIP1L1-RARA の欠失変異体の発現ベクターを作製して、IP-WB 法とルシフェラーゼアッセイ法を行った。その結果、FIP1L1-RARA では FIP1 motif がホモ 2 量体形成とレチノイン酸刺激による転写活性の抑制に必須であることを確認した。
2. FIP1L1-PDGFR α における細胞増殖促進経路の解析
 - ① FIP1L1 部分による増殖活性亢進
FIP1L1-PDGFR α と FIP1L1 を欠失した C 末端 PDGFR α (dN-PDGFR α) について解析した。これらではキナーゼ活性は恒常的に活性化しており、IL-3 依存性の BAF/B03 細胞に導入すると、IL-3 非依存性増殖形質を獲得した。しかし、FIP1L1-PDGFR α では完全 IL-3 非依存性となったが、dN-PDGFR α では一部 IL-3 依存性に増殖し、FIP1L1 を介した増殖経路が推定された。
 - ② PIAS1 は FIP1L1-PDGFR α に会合する
FIP1L1-PDGFR α を bait として yeast two-hybrid screening でマウス B 細胞性リンパ腫のライブラリーをスクリーニングしたところ PIAS1 が同定された。293 細胞に FIP1L1-PDGFR α と PIAS1 を共発現させ、IP-WB 法を用いて会合を確認した。更に、この会合が FIP1L1 部分を介していること、また、PIAS1 は FIP1L1-PDGFR α によってリン酸化を受けることを確認した。
 - ③ リン酸化 PIAS1 は安定化する
PIAS1 と FIP1L1-PDGFR α (野生型, キナーゼ活性喪失変異体) を共発現し、更に Imatinib 処理の有無による PIAS1 の発現を確認した。PIAS1 はリン酸化により安定し、発現が上昇することが示された。

④ PIAS1 は FIP1L1-PDGFR α の SUMO 化リガーゼとして機能する

293 細胞に SUMO1, PIAS1, FIP1L1-PDGFR α を共発現させると、PIAS1 により FIP1L1-PDGFR α の SUMO 化の増強が確認された。PIAS1 の SUMO-E3 リガーゼ活性欠損 C351S 変異体では FIP1L1-PDGFR α の SUMO 化は増強しなかった。また、siRNA により内在性 PIAS1 の発現を抑制したところ、FIP1L1-PDGFR α の SUMO 化は抑制された。以上より、PIAS1 は FIP1L1-PDGFR α の SUMO 化リガーゼとして機能することが示された。

⑤ PIAS1 は FIP1L1-PDGFR α の発現を維持する

FIP1L1-PDGFR α 発現 293 細胞由来安定発現細胞株を用いて、siRNA で PIAS1 を抑制すると FIP1L1-PDGFR α の発現は低下した。また、SUMO 化阻害剤である Ginkgolic acid (GA) を投与し、SUMO 化を抑制すると FIP1L1-PDGFR α の発現は低下した。以上より、PIAS1 は SUMO 化を介して FIP1L1-PDGFR α 発現を維持することが示された。

⑥ CEL 治療における、SUMO 化修飾の分子標的の可能性

FIP1L1-PDGFR α 発現 BAF/B03 細胞由来安定発現細胞株を用いて、GA による SUMO 化抑制が FIP1L1-PDGFR α 依存性細胞増殖に及ぼす影響を検討した。FIP1L1-PDGFR α の発現は GA の濃度依存性に低下した。細胞増殖については、GA 20 μ M までは生存率は影響を受けなかったが、細胞増殖は低下した。Imatinib との併用効果を検討したところ、GA 20 μ M 存在下では低濃度 Imatinib で apoptosis が誘導され、併用効果が示された。

【考察】

本研究では、FIP1L1 を介して生じる 2 種類の白血病融合遺伝子 FIP1L1-RARA、FIP1L1-PDGFR α について解析を行った。FIP1L1 の腫瘍化における役割は異なり、FIP1L1-RARA では、ホモ 2 量体形成には FIP1L1 に存在する FIP1 motif が重要であることが確認された。一方、FIP1L1-PDGFR α においては、FIP1L1 を介さないホモ 2 量体形成が示され、キナーゼの恒常的活性化が生じることを確認したが、FIP1L1-PDGFR α の細胞増殖促進経路の一つとして FIP1L1 を介して SUMO 化 E3 リガーゼ PIAS1 が会合することを見出した。この会合において、FIP1L1-PDGFR α のキナーゼ活性と PIAS1 の E3 リガーゼ活性には、相互に分子を安定化するポジティブフィードバック機構が存在することを証明した。SUMO 化阻害剤は、このポジティブフィードバック機構を標的として、キナーゼ阻害剤と協調した抗腫瘍効果を示した。

今後、CEL の新規治療薬として、SUMO 化阻害剤の有用性についてモデルマウスを用いた in vivo での検討も進めていく必要がある。また、FIP1L1-RARA と PIAS1 の会合については未だ検討していないが、FIP1L1-RARA の転写抑制機構における PIAS1-SUMO 化経路の関与の有無についても検討が必要である。

【結論】

今回の検討では、FIP1L1 を介する 2 種類の白血病融合遺伝子の解析を行った。FIP1L1-RARA では、FIP1 motif を介したホモ 2 量体形成、FIP1L1-PDGFR α では PIAS1 とのポジティブフィードバック機構が白血病発症に関与することが明らかとなった。