



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	FIP1L1を介して生じる白血病融合遺伝子FIP1L1-RARA, FIP1L1-PDGFRαの機能解析 [全文の要約]
Author(s)	岩崎, 純子
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2076 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11204号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55716
Type	doctoral thesis
File Information	Junko_Iwasaki_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

FIP1L1 を介して生じる

白血病融合遺伝子 FIP1L1-RARA, FIP1L1-PDGFRA の機能解析

(Functional analysis of FIP1L1-RARA and FIP1L1-PDGFRA; the
leukemogenic fusion genes associated with FIP1L1)

2014 年 3 月

北 海 道 大 学

岩 崎 純 子

【背景と目的】

造血器腫瘍の発症には疾患特異的な染色体異常や遺伝子異常を伴うことが知られており、FIP1-like1 (FIP1L1) 遺伝子を介して生じる白血病因融合遺伝子には FIP1L1-RARA と FIP1L1-PDGFR α の 2 種類が存在する。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 部分は必要ないとされている。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も推測されている。

上記のように、同じ FIP1L1 を介する融合遺伝子産物である FIP1L1-RARA と FIP1L1-PDGFR α でも FIP1L1 の役割は異なることが推定され、本研究では FIP1L1 を介して生じる 2 種類の白血病因融合遺伝子における FIP1L1 の機能解析を行い、各々の融合遺伝子における FIP1L1 の白血病発症への関与と治療標的の可能性を検討した。

まず、FIP1L1-RARA においては、FIP1L1 のホモ 2 量体を形成し、レチノイン酸応答を抑制する機能領域の同定を行い、初めて FIP1L1 のホモ 2 量体形成を生じる領域を明らかにした。

FIP1L1-PDGFR α では、protein inhibitor of activated STAT1 (PIAS1) が FIP1L1 を介して会合していることを明らかにし、チロシンキナーゼである FIP1L1-PDGFR α と SUMO 化 E3 リガーゼである PIAS1 が会合することでの FIP1L1-PDGFR α の活性化に与える影響を検討した。その結果、FIP1L1-PDGFR α は PIAS1 による SUMO 化修飾により、細胞増殖が促進され、白血病発症に関与していることが明らかとなり、更に SUMO 化経路の抑制が新たな治療法への発展へつながる可能性を見出した。

【方法と結果】

I. FIP1L1-RARA における FIP1L1 の機能解析

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 量体を形成し、レチノイン酸応答を抑制するタンパク相互作用領域であることを同定した。

II. FIP1L1-PDGFRα における FIP1L1 を介する細胞増殖促進経路の解析

① FIP1L1 部分は増殖活性を高める

FIP1L1-PDGFRα と FIP1L1 を欠失した C 末端 PDGFRα (dN-PDGFRα) 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-PDGFRα では完全 IL-3 非依存性となったが、dN-PDGFRα 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 FIP1L1-PDGFRα は FIP1L1 を介して PIAS1 と会合し、リン酸化する。

FIP1L1-PDGFRα 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。HEK293 細胞に FIP1L1-PDGFRα 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-PDGFRα 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-PDGFRα (野生型, キナーゼ活性喪失変異体) を共発現させ、更に imatinib 処理の有無による PIAS1 の発現量を確認した。PIAS1 はリン酸化により安定し、発現量が上昇することが示された。

④ PIAS1 は SUMO 化 E3 リガーゼとして機能し、FIP1L1-PDGFRα の SUMO 化を促進する

HEK293 細胞に SUMO1, PIAS1, FIP1L1-PDGFRα を共発現させると、PIAS1 により FIP1L1-PDGFRα の SUMO 化が増強することを確認した。PIAS1 の SUMO-E3 リガーゼ活性欠損 C351S 変異体では FIP1L1-PDGFRα 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-PDGFRα の SUMO 化は抑制された。以上より、PIAS1 は FIP1L1-PDGFRα の SUMO 化 E3 リガーゼとして機能することが示された。

⑤ PIAS1 は FIP1L1-PDGFRα 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 の発現量が低下することを確認した。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 の発現量は低下した。以上より、PIAS1 は SUMO 化を介して FIP1L1-PDGFR α の発現レベルを維持することが示された。

⑥ SUMO 化修飾は FIP1L1-PDGFR α 陽性白血病の治療標的分子となり得る可能性がある

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。WB 法にて FIP1L1-PDGFR α の発現量は GA 濃度依存性に低下することを確認した。細胞増殖において、アポトーシスに影響を与えない濃度の GA でも細胞増殖は抑制され、imatinib との併用は協調的に細胞増殖抑制に作用した。アポトーシス誘導についても同様の結果であり、imatinib と GA の併用効果が示された。また、imatinib 耐性の FIP1L1-PDGFR α T674I 変異体では imatinib 耐性を反映し、imatinib と GA の併用効果は認めなかったが、GA 濃度依存性にアポトーシス誘導を認めた。以上より、GA は imatinib との併用により強調して抗腫瘍効果を発揮するのみならず、高濃度の GA では imatinib への感受性を問わず、単独でも FIP1L1-PDGFR α 依存性増殖をする細胞にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

【考察】

本研究では、FIP1L1 を介して生じる 2 種類の白血病原因融合遺伝子 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 が必要であることが確認された。一方、FIP1L1-PDGFR α においては、PDGFR α のみでもキナーゼの恒常的活性化を認めるが、FIP1L1 部分が FIP1L1-PDGFR α の増殖活性を高め、細胞増殖を促進することが確認され、FIP1L1-PDGFR α の細胞増殖促進分子の一つとして FIP1L1 を介して SUMO 化 E3 リガーゼである PIAS1 が会合することを明らかとした。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が示唆され、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、FIP1L1-PDGFR α 陽性白血病の新規治療薬として、SUMO 化阻害剤の有用

性について動物モデルを用いた *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】

本研究では、FIP1L1 を介する 2 種類の白血病原因融合遺伝子において、FIP1L1-RARA では FIP1 motif を介したホモ 2 量体形成、FIP1L1-PDGFR α では FIP1L1 を介する PIAS1 との会合による SUMO 化修飾が白血病発症に関与することが明らかとなり、FIP1L1-PDGFR α 陽性白血病において SUMO 化経路が新たな治療法への発展へとつながる可能性が示唆された。