



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	A leukemogenic kinase, FIP1L1-PDGFR α , and a SUMO E3 ligase, PIAS1, form a positive crosstalk via their enzymatic activities [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	井端, 淳
Description	配架番号 : 2271
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12530号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65866
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Makoto_Ibata_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 井端 淳

学 位 論 文 題 名

A leukemogenic kinase, FIP1L1-PDGFR α , and a SUMO E3 ligase, PIAS1, form a positive crosstalk via their enzymatic activities.

(白血病原因キナーゼである FIP1L1-PDGFR α と SUMO 化 E3 リガーゼである PIAS1 は、その酵素活性により正の相互作用を形成する.)

【背景と目的】血液悪性腫瘍では、融合遺伝子の出現が腫瘍細胞の生存や増殖に関与する事が知られている。FIP1L1-PDGFR α 融合遺伝子は、慢性好酸球性白血病(CEL)においてその下流シグナルである PI3K や JAK/STAT 経路、MAPK 等を活性化させることで腫瘍増殖や生存に深く関与している。これまでの研究では、FIP1L1-PDGFR α 融合タンパクの核内移行、蓄積が細胞増殖に重要であることは知られているが、核内でのシグナルに関しては不明な点も多い。そこで、本研究では FIP1L1-PDGFR α と核内で作用する標的分子を仮定しこれを同定、これらが FIP1L1-PDGFR α 陽性腫瘍において果たす役割に関して検討を行った。

【方法と結果】FIP1L1-PDGFR α と会合する分子を同定する為に、酵母 two-hybrid 法を用いてスクリーニングを行った。得られた陽性コロニーより DNA を採取、シーケンスを行った結果、候補分子として PIAS1 が同定された。FIP1L1-PDGFR α と PIAS1 の会合については免疫沈降を行い両者の会合を確認した。細胞内での共存については、FIP1L1-PDGFR α を HEK293 細胞に遺伝子導入し、共焦点顕微鏡にて内在性 PIAS1 と核内に共存することを確認した。次に FIP1L1-PDGFR α と PIAS1 の会合について機能解析を行った。FIP1L1-PDGFR α を発現させた際に、会合する PIAS1 の分子量がウェスタンブロッティングにて増加しているため、抗リン酸化チロシン抗体で検討したところ、PIAS1 のチロシン残基のリン酸化が示された。このリン酸化はキナーゼ活性喪失変異体 FIP1L1-PDGFR α -KD では観察されなかったことから、FIP1L1-PDGFR α が PIAS1 をリン酸化しているものと考えられた。更に、一連の実験から FIP1L1-PDGFR α のキナーゼ活性が PIAS1 タンパクを安定化している可能性が示唆されたため、FIP1L1-PDGFR α 発現下でドキシサイクリン誘導系を用い PIAS1 を一過性に発現誘導し、PIAS1 のタンパク安定性をチロシンキナーゼ阻害剤 imatinib 存在下、非存在下で検討したところ、PIAS1 は FIP1L1-PDGFR α のキナーゼ活性に依存してタンパクの安定化が生じていることが示された。一方、SUMO 化 E3 リガーゼとして PIAS1 が FIP1L1-PDGFR α の SUMO 化を生じる可能性を検討した。FIP1L1-PDGFR α 、PIAS1、SUMO1 の発現ベクターを HEK293 細胞に導入し過剰発現したところ、FIP1L1-PDGFR α の SUMO 化促進が観察された。この効果はリガーゼ活性を喪失させた PIAS1-C351S では確認できなかった。また FIP1L1-PDGFR α 、SUMO1 の過剰発現系でも FIP1L1-PDGFR α の SUMO 化は観察されたが、siRNA にて内因性 PIAS1 の発現を低下させると 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。更に、FIP1L1-PDGFR α の SUMO 化の意義を明らかにするために、BAF-B03 細胞及び HEK293 細胞由来 FIP1L1-PDGFR α 安定発現形質転換細胞株を樹立し siRNA にて内因性 PIAS1 の発現を抑制したところ、FIP1L1-PDGFR α の発現が低下した。以上より、PIAS1 は FIP1L1-PDGFR α の SUMO 化を介して発現を安定化させることが確認できた。以上より、FIP1L1-PDGFR α と PIAS1 は酵素活性を介して相互にタンパク安定

化をもたらしていることが示された。FIP1L1-PDGFR 陽性慢性好酸球性白血病への治療戦略に繋がる可能性を考え、PIAS1/SUMO 化が分子標的となる治療の可能性について検討した。BAF-B03 由来の FIP1L1-PDGFR 安定発現形質転換細胞株は、FIP1L1-PDGFR のキナーゼ活性に依存した増殖を示すが、SUMO 化 E1 酵素阻害剤であるギンコール酸で処理するとギンコール酸は濃度依存的に FIP1L1-PDGFR の発現を低下させ、アポトーシスを誘導した。更に imatinib とギンコール酸を併用すると協調的にアポトーシスを誘導することが示された。同様の効果は PIAS1 siRNA と imatinib 処理の併用によっても観察されており、PIAS1 を標的とすることで imatinib の作用を増強できることが示された。

【考察】本研究では、PIAS1 が FIP1L1-PDGFR の会合分子であることを初めて同定し、これらの分子が各々の酵素活性を介して、相互のタンパク発現を安定化させていることを見出した。これまで FIP1L1-PDGFR と直接会合する分子は少数しか同定されていない。アダプタータンパクである Lnk や c-Cbl が代表的なものであるが、これらは主に細胞質に存在することが報告されている。本研究では、FIP1L1-PDGFR が核内に集積することから核内に存在する分子の同定を試み PIAS1 を同定した。PIAS1 を介した腫瘍の維持機構は CEL の増殖、生存に関する新しい知見といえる。また、FIP1L1-PDGFR の発現は SUMO 化阻害剤であるギンコール酸を加えることにより抑制され、その効果は濃度依存性であることが示された。FIP1L1-PDGFR 依存性増殖を示す BAF-B03 由来細胞での解析では、ギンコール酸を加えることで腫瘍の細胞死を誘導でき、その効果は imatinib を併用することにより増強できることを確認した。更に siRNA による PIAS1 の発現抑制でも同等の効果を得られたことにより、ギンコール酸による腫瘍抑制効果は PIAS1 による SUMO 化抑制によるものであることが示唆され、PIAS1 抑制及び SUMO 化の阻害は imatinib に対する感受性を増強させる可能性が示唆された。CEL の治療においては、imatinib 中止に伴う再発や imatinib 耐性化が問題となることが知られており、SUMO 化阻害によるアポトーシス誘導は、この問題を解決する為の CEL に対する新しい治療法の確立にも寄与する可能性が示唆された。

【結語】

本研究では、FIP1L1-PDGFR の核内会合分子として PIAS1 を同定し、FIP1L1-PDGFR と PIAS1 が機能的に相互の発現安定化をもたらすことを証明した。PIAS1 の機能を抑制することは、FIP1L1-PDGFR 陽性白血病の imatinib 感受性を増強する可能性が示され、FIP1L1-PDGFR 陽性白血病の治療における新たな分子標的となりうることを示唆された。