

学 位 論 文 題 名

t (11;17)急性骨髄性白血病における ATRA 耐性機序の解析

学位論文内容の要旨

【背景】急性前骨髄性白血病 (Acute Promyelocytic Leukemia, APL) においては, 17番染色体の転座が生じており, 17q23 に存在するレチノイン酸受容体 α 鎖 (RAR α) 遺伝子が再構成を起こしている. これまでに RAR α と融合遺伝子を形成し, APL を発症する遺伝子は5種類が報告されているが, 15q22 に存在する PML 遺伝子によって生じる PML-RAR α によって発症する APL は, もっとも頻度が高く, 全トランス型レチノイン酸(all-trans retinoic acid, ATRA) により分化誘導を生じることが証明されている. 一方, t(11;17) (q23;q23)転座によって形成される PLZF-RAR α によって発症する APL は, ATRA への感受性が無く, 臨床的にも予後不良であることが報告されている. これらの融合遺伝子では RAR α の部分は共通であるため, ATRA の感受性は N 末の構造が規定していると考えられる.

PLZF は N 末に BTB/POZ ドメイン, C 末には 9 つの zinc-finger (ZF) ドメインと呼ばれる構造を有している. PLZF-RAR α は PLZF の N 末~2 つ目の ZF ドメインまでと RAR α の C 末側が融合したタンパク分子として翻訳される. PLZF-RAR α においては, PLZF 部分と RAR α 部分の両方に転写抑制複合体が会合するため, 治療量のレチノイン酸存在下でも PLZF の BTB/POZ ドメイン部分を介して, 転写抑制複合体を解離しないと報告されている.

近年, BTB ドメインを有する分子は, Cullin3 (Cul3), Rbx1 と複合体を形成し, E3 ユビキチンリガーゼ活性を有することが明らかにされた. この際, BTB/POZ タンパクは基質を認識する際の, アダプター分子として機能する. 本研究では, APL 原因遺伝子産物である PLZF-RAR α 分子が, PLZF 部分を介して Cul3 と会合, また RAR α 部分を介して RXR α と会合し, RXR α をユビキチン化によって分解するという仮説を立て, また, RXR α の分解が ATRA 抵抗性に関与する可能性について検討した.

【方法と結果】RAR α 部分と RXR α の会合を確認するために, FLAG-RXR α と T7-RAR α , T7-PLZF または T7-PLZF-RAR α を HEK293 細胞に共発現し, 抗 T7 抗体で免疫沈降 (IP) を行い, RXR α が共沈してくるかどうかを抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロット (WB) で確認した. RXR α は RAR α および PLZF-RAR α と共に, 共沈するが, PLZF では共沈しなかった. このことより, RAR α および PLZF-RAR α は RAR α 部分を介して, RXR α と会合することが確認された. 次に FLAG-PLZF または FLAG-PLZF-RAR α と T7-Cul3 の会合の有無を検討した. 細胞抽出液を抗 T7 抗体で IP したところ, PLZF, PLZF-RAR α が共沈し, BTB ドメインを有する PLZF, PLZF-RAR α は, Cul3 と会合することが確認された. また, RXR α と RAR α , PLZF, PLZF-RAR α または PML-RAR α を HEK293 細胞に共発現し, それぞれの発現を検討したところ, RXR α の発現は, PLZF-RAR α が共発現したときに低下した. この RXR α の発現低下は, PLZF-RAR α 発現に用量依存性に起

きることを確認した。更に、PLZF-RAR α とRXR α を共発現し、RXR α をIPした後に、抗ユビキチン抗体でWBを行ったところ、RXR α は、PLZF-RAR α と共発現したときに高分子量のスメアリングが観察され、ユビキチン化が生じていることが明らかとなった。更に、このPLZF-RAR α によるRXR α のユビキチン化を介した分解が、E3 ユビキチンリガーゼであるCul3複合体を介して行われていることを検討するため、優性阻害型のCul3欠失変異体(Cul3N380)を作成し、Cul3N380の発現を変動させて検討したところ、PLZF-RAR α の発現によって減少したRXR α の発現が、Cul3N380用量依存性に回復した。以上の結果より、PLZF-RAR α はCul3とE3ユビキチンリガーゼ複合体を形成し、RAR α 部分を介して、RXR α をユビキチン化することが示された。PLZF-RAR α によるRXR α の分解が、ATRA抵抗性に関与していることを確かめるためレチノイン酸応答プロモーターによるレポーターアッセイを行った。PLZF-RAR α 遺伝子導入細胞に、TAT-RXR α タンパクを導入することで、PLZF-RAR α によるRARE抑制効果が拮抗できるかどうかを検討した。pRARE7-lucとpCGT-PLZF-RAR α を、HEK293細胞に共発現し、ATRAの有無、TAT-RXR α の有無によるルシフェラーゼ活性を検討した。PLZF-RAR α によるルシフェラーゼ活性の抑制は、TAT-RXR α の存在下では、部分的に回復した。以上の結果より、PLZF-RAR α による、ATRA不応性の機序には、RXR α の分解が関与することが示唆された。

【考察】今回、PLZF-RAR α によるATRA抵抗性の機序に関して、PLZFがBTB/POZドメインを有することに注目して解析した。PLZFはN末にBTB/POZドメイン、C末にZFドメインを有して、特異的DNA配列に結合し、転写抑制因子として機能する。E3リガーゼとしての報告は未だ明らかとされていないが、今回の結果より、ユビキチンリガーゼとしての機能も推定され、今後の解析が期待される。一方、PLZF-RAR α については、N末側のPLZF部分を介して、Cul3との会合が、また、C末側のRAR α 部分を介して、RXR α と会合することが示された。今回の解析では、PLZF-RAR α によって、RXR α がユビキチン化を受けて分解される事が示された。PLZF-RAR α はCul3と複合体を形成し、E3ユビキチンリガーゼとして、RXR α を基質として認識するアダプターとして機能していると考えられる。

PLZF-RAR α によって発症するAPLのATRA不応性については、PLZF-RAR α によってリクルートされる転写抑制複合体が、ATRA存在下でも解離しないことで説明されてきた。本研究では、RXR α 分子をPLZF-RAR α 発現細胞内に導入したところ、ATRAへの反応性が部分的に回復しており、本研究で示されたRXR α の分解も、ATRAの不応性を規定しているものと考えられた。近年、分子標的療法のターゲットとして、プロテアソーム阻害剤も臨床応用段階になっており、難治性白血病であるPLZF-RAR α 陽性APLについては、その予後の改善に向けた新たな治療戦略の開発に、今後、ユビキチン・プロテアソーム系を標的とすることも候補となりうると考えられる。

【結語】t(11;17)転座由来融合遺伝子産物であるPLZF-RAR α がBTB/POZドメインを介してCul3と複合体を形成し、ユビキチン・プロテアソーム系を介してRXR α を分解することを証明した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 武 藏 学

学 位 論 文 題 名

t (11;17)急性骨髄性白血病における ATRA 耐性機序の解析

t(11;17)急性骨髄性白血病は急性前骨髄性白血病の形態をとるが、t(15;17)急性前骨髄性白血病とは異なり、ATRA に不応性であることが知られている。t(11;17)転座遺伝子産物である PLZF-RAR α は、近年 Cul3 との会合でユビキチンリガーゼ活性を持つと報告されている BTB ドメインをもつ蛋白であることに着目し実験を行った。免疫沈降による蛋白会合実験において、PLZF-RAR α は RAR α 部分を介して RXR α と会合し、BTB ドメインを含む PLZF 部分を介して Cul3 と会合することを示した。また、PLZF-RAR α と RXR α を共発現すると PLZF-RAR α の用量依存性に RXR α の発現低下が起こり、この時 RXR α のユビキチン化が促進されていることを示した。さらに、Cul3 の優性抑制型変異体(Cul3N380)を発現させることにより、PLZF-RAR α の RXR α 発現低下作用は減弱すること、この時 PLZF-RAR α 自身も安定化することを示した。レチノイン酸反応配列によるレポーターアッセイを行い、PLZF-RAR α 発現による ATRA 不応性は TAT-RXR α の導入により一部回復することを示した。以上から、t(11;17)由来融合遺伝子産物である PLZF-RAR α が BTB/POZ ドメインを介して Cul3 と複合体を形成し、ユビキチン・プロアソーム系を介した RXR α の分解を引き起こし、このことが t(11;17)急性骨髄性白血病の ATRA 耐性に関わっていることを示した。

口頭発表に際し、副査の畠山教授より Cul3 の発現により PLZF が安定化しているように見える点についての確認、Cul3 との会合を欠く PLZF-RAR α 変異体が優性抑制型変異体として機能する可能性、免疫染色をした場合の PLZF-RAR α 、RXR α の局在についての質問があった。これに対して申請者は、Cul3 の発現による PLZF の安定化は有意なものとは考えていないこと、BTB ドメインを欠く PLZF-RAR α 変異体は発現が安定化すること、RXR α の発現低下が起きないこと、優性抑制型変異体としての効果については、明らかではなかったこと、免疫染色は行っていないことを回答した。次いで、副査の武蔵教授より PLZF と Cul3 を共発現した際に MG132 処理で Cul3 が安定化して見える点について、レポーターアッセイにおいて TAT-RXR α を導入しても ATRA 反応性が部分的にしか回復しない点について、また、同じ系で HDAC 阻害剤、MG132、Cul3N380 を用いても ATRA 反応性が回復するかどうかについて

て、この知見を分子標的療法に応用するときにはどのような標的に対して治療を行うかについて質問があった。これに対して申請者は、遺伝子導入効率の問題もあり、今回の実験で MG132 処理によって Cul3 の発現が低下しているとは断定できないこと、TAT-RXR α を内因性の RXR α の量と同程度に導入しても ATRA 反応性は部分的な回復にとどまるのは、BTB ドメインを介した転写抑制複合体の会合による影響が残るためと考えられること、レポーターアッセイでは HDAC 阻害剤、MG132, Cul3N380 を使用しておらず今後の検討課題であること、臨床応用については、既に臨床使用が可能な、プロテアソーム阻害剤と ATRA の併用や HDAC 阻害剤と ATRA の併用が考えられることを回答した。

さらに主査 浅香教授より本研究を行った動機、今後の展開、臨床応用への可能性に関して質問があった。これに対して申請者は、3年前研究を開始した時期に BTB ドメインをもつ蛋白と Cul3 の会合を介したユビキチンリガーゼ活性についての論文が相次いだことが研究動機となったこと、B 細胞リンパ腫の原因遺伝子である BCL6 も BTB ドメインをもつ蛋白であり、BCL6 においてもリンパ腫の発症にユビキチンリガーゼ活性が関与するかどうかについて研究することは新たな治療戦略の開発に向けて興味深いテーマであることを回答した。

本研究は、t(11;17)転座由来融合遺伝子産物である PLZF-RAR α が BTB/POZ ドメインを介して Cul3 と複合体を形成し、ユビキチン・プロアソーム系を介して RXR α を分解することを証明した。本研究を足がかりとして今後、PLZF や BCL6 など他の BTB 蛋白におけるユビキチンリガーゼ活性の証明と、造血器腫瘍におけるこれらの蛋白の機能解析が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するもの判定した。