

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08368

研究課題名(和文) ABLファミリー遺伝子に内在する新たな造白血病活性抑制機構の解明

研究課題名(英文) novel endogenous mechanism against leukemogenesis in ABL family oncogene.

研究代表者

奥田 恵子 (OKUDA, KEIKO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70305572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ABL (ABL1) と ARG (ABL2) は互いに相同性の高いファミリー遺伝子であるが、相似するTEL/ABL、TEL/ARGを発現させたマウスでは異なる病態発症を確認している。この相違を導く分子基盤の解明に向けて各種変異体遺伝子を作製して検討した。造腫瘍活性を反映する細胞増殖能の相違はARG-C末の抑制機能に起因しており、その責任部位と思われるC末内特定のプロリンとチロシン残基を突き止めた。またYeast Two Hybrid法によりARG-N末へのSTAT3の特異的結合を検出し、病型を反映する血球分化誘導には特定STATアイソフォームの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回得た基礎結果をさらに発展させて造白血病活性を制御する新たな内因性メカニズムの特定を目指しており、その理解により新規分子標的治療法の開発に繋がることが期待できる。また Mastocytosis の病因として新たにARGの関与を提言できたことは、今後の診断や治療選択への有用性から臨床に大きく貢献できる。病態方向性の違いを通して、基礎的にはABLファミリー遺伝子間での血球分化誘導における役割や、特異的機能発現に関わる転写因子STATアイソフォーム使い分けの理解に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：ARG (ABL2) is highly homologous to ABL (ABL1), and the chimeric TEL/ABL and TEL/ARG have been identified in leukemia patients. In previous study, TEL/ABL and TEL/ARG induce the specific disease in mice, that is early onset myeloid leukemia and long-latency mastocytosis, respectively.

To determine the molecular mechanisms on their distinct biological properties, a series of mutants of TEL/ARG were generated. The difference in cell proliferative activity was caused by the restraint action of ARG-C terminus and located specific proline and tyrosine residue was considered to participate for the function. ARG-N terminus, where the specific binding to STAT3 was observed by Yeast Two Hybrid system, might have a role in mast cell development. These findings suggest that specific site in ARG C-terminus is responsible for cell proliferation reflecting the disease latency, and specific isoform of STAT may influences on differentiation of hematopoietic cells reflecting the disease phenotype.

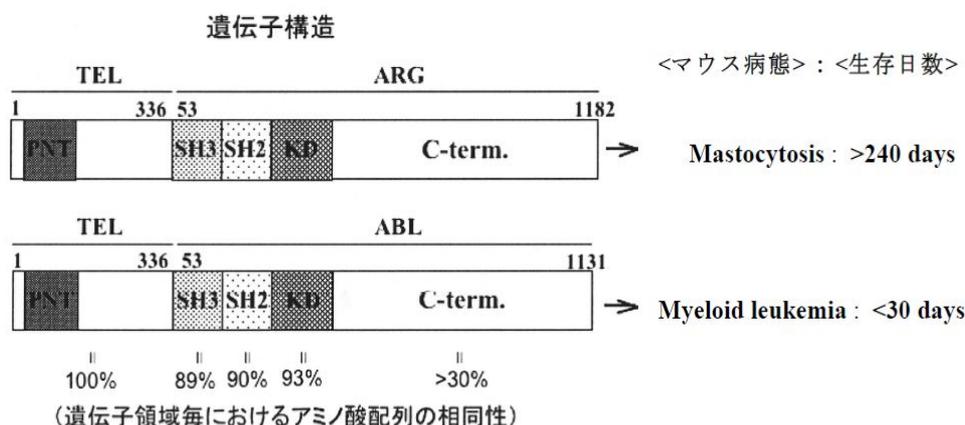
研究分野：血液腫瘍学、細胞生物学

キーワード：ABL ファミリー遺伝子 造血器腫瘍 発がんシグナル 白血病 Mastocytosis 発がん制御

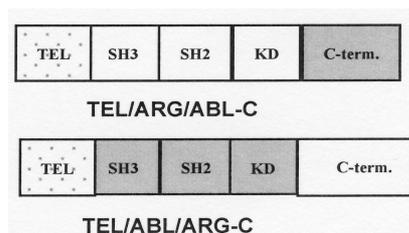
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ABL ファミリー遺伝子である ABL (ABL1) と ARG (ABL2) は互いに約 80% の高い相同性を有しているが、これまで ABL では慢性骨髄性白血病原因の BCR/ABL として広く研究、認知されてきたのに対し、ARG の特性や病原性はまだよく理解されていない。その後 ABL、ARG と、転写因子 TEL との転座融合遺伝子 TEL/ABL、TEL/ARG が白血病患者より検出された。両者では融合相手 TEL 側での切断点も同一部位であり、互いの遺伝子構造ならびに蛋白アミノ酸配列に非常に高い相同性を有している。我々はこの TEL/ABL、TEL/ARG を互いのキナーゼ活性型相補対照モデルと捉えて比較解析に従事し、骨髄移植法を用いて両者のマウス生体作用を検討した結果、TEL/ABL では全例骨髄性白血病発症による早期死亡、一方 TEL/ARG では同様の白血病を誘導せず、長期経過後に特異的な Mastocytosis を発症させる事を確認した。



さらに生物活性における遺伝子内部構造の役割について、両者 C 末端構造を相互置換させた変異遺伝子 (右図) を作製して検討を行った。その結果 in vitro 細胞における形質転換能と、骨髄移植法で観察したマウスの生存日数に現れる両者の in vivo 造腫瘍活性は、ABL-C 末の存在にて亢進、ARG-C 末の存在にて減弱する事を確認した。同時にマウスに現れた病態も後述の如く変化を認めた。野生型 TELARG において発症した Mastocytosis では両相互置換遺伝子での完全な再現はなかったが、注目すべきことに TEL/ARG/ABL-C において早期死亡するマウス血液中に一部 Mast cell の増加が認められた。



- ・ TEL/ARG/ABL-C myeloid leukemia (short latency) : 生存日数 50~120 days
- ・ TEL/ABL/ARG-C T-cell leukemia (long latency) : 生存日数 > 150 days

以上背景となる予備段階での結果から、生体の発病時期を反映する造腫瘍活性には両者 C 末端、病型を決定する血球分化誘導には N 末端領域に未知の制御機構への関与を示唆する結果を得た。

2. 研究の目的

これまでに明らかとした生体作用の相違に注目し、以下項目の解明と臨床への発展を目指す。

- (1) ARG 遺伝子機能、特に白血病化の抑制や特異的病型を導く責任部位とその機構を解明する。
- (2) 同時に相補対象である ABL の特性および白血病化機構に対する理解を深める。
- (3) 最終的に白血病化抑制機構を応用して TKI とは作用の異なる新規治療法開発へと繋げる。

3. 研究の方法

(1) 各種変異体遺伝子の構築

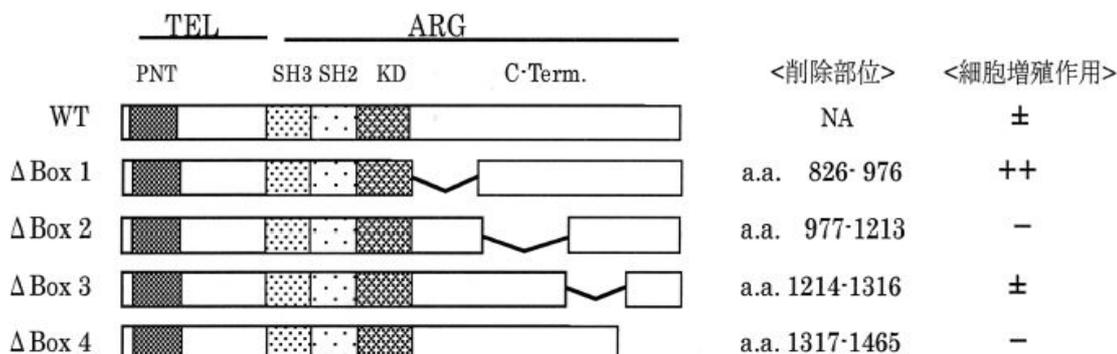
機能発現に必要な遺伝子責任領域の検討に向け、関与を疑う領域、配列に対する削除変異体、点変異体、あるいは ABL、ARG 相互置換変異体遺伝子を、分子生物学的手法により構築。

- (2) 全ての変異遺伝子に対してその薬剤誘導発現細胞株の樹立。
構築した全ての変異遺伝子は薬剤誘導発現ベクター (pTRE) に組み入れ、テトラサイクリン誘導規制遺伝子を持つ Ba/F3 (Ton.B.) 細胞株にエレクトロポレーション法にて導入。
導入時はハイグロマイシン耐性遺伝子を共導入し、同薬剤での選択によりゲノムに恒常的に組み込まれて安定して目的遺伝子産物 (蛋白) が誘導できる細胞株を選択する。
- (3) 樹立した細胞株における遺伝子機能解析, 野生型との比較検討
目的遺伝子産物各々の発現に伴う細胞への作用, 特に **IL-3** 非依存性増殖作用の有無から形質転換能の評価と, それに伴う自身キナーゼからのシグナルカスケードや下流標的分子の変化について比較検討。
機能発現に関わる特異的結合分子検索には, まず以下の方法でその候補を回収・単離,
・樹立細胞株 **lysate** から抗 **ARG** 抗体免疫沈降により共沈する結合蛋白
・特定の領域や配列を有する **GST** 融合蛋白作製による細胞内蛋白 **pull down** 解析
・目的の遺伝子配列を用いた **Yeast Two Hybrid** 法にて結合クローンの **sequence** 続いて単離した分子について特異的抗体での western blotting あるいは結合クローンの **sequence** にて同定。

4. 研究成果

(1) 造血病作用における責任部位同定への検討

責任領域には両者 C 末端を疑い, まず ARG-C 末端内を Box1~4 の分画で部分削除 (下図) により検討したところ, **Ton B.** 細胞での自己増殖作用は **Box1** 削除により **TEL/ABL** と匹敵する程度にまで顕著に増強した。これにより形質転換能の違いには両者 C 末端の関与を確認し, またその原因として ARG 側 C 末端 Box1 部分での抑制作用が窺われた。



さらに **Box1** 領域内を 50 アミノ酸毎 3 領域での細分画削除により増殖作用を検討したところ, 同責任部位は **Box1** 最初 1/3 の部分であると確認した。同領域の 50 アミノ酸で遺伝子機能への関与が疑われる以下の 4 配列に着目,

- ・ SSSS 配列 SSSS 配列削除変異体: 4S
- ・ チロシン残基: Y568 チロシン残基をフェニルアラニンに点変異: Y568F
- ・ 3 連続する PXXP 配列 プロリン残基をアラニンに点変異 (P567, P570, P573, P576) (P567A, P570A, P573A, P576A)
- ・ KKR 配列 KKR 配列削除変異体: KKR

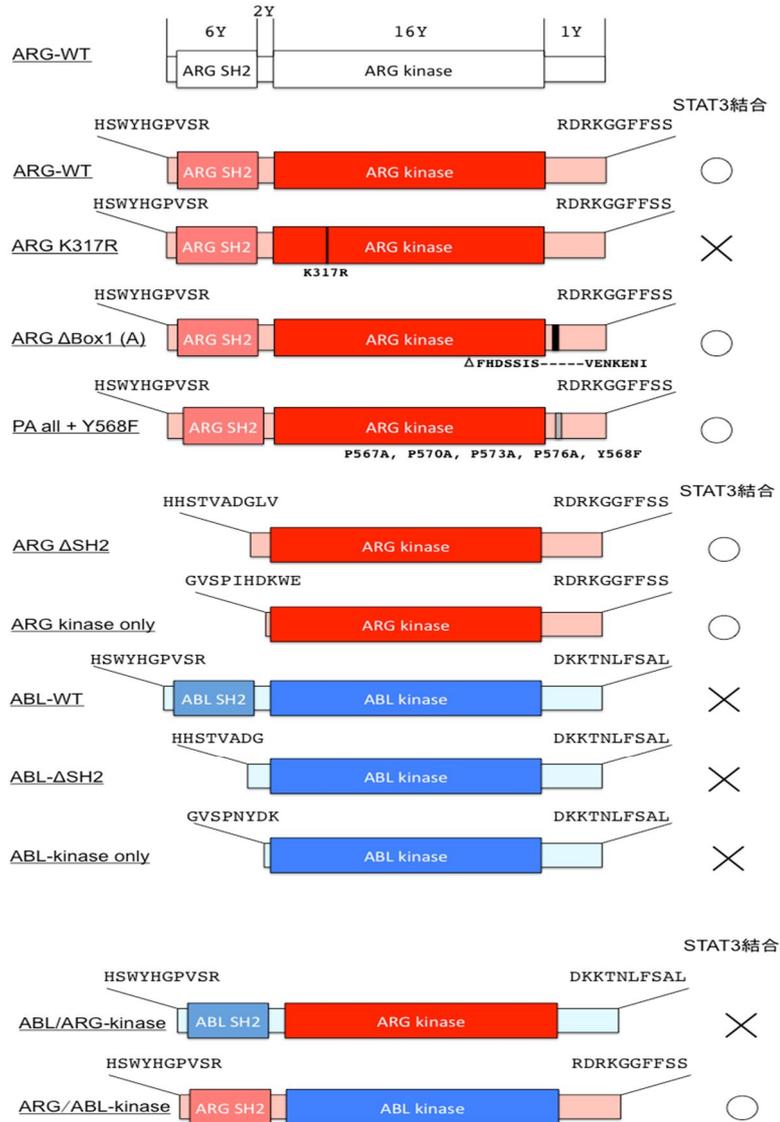
それぞれ矢印右側に示す変異体構造の 1 箇所単独, あるいは複数箇所を組み合わせ挿入した変異遺伝子をこれまでに計 13 種類作製して発現細胞に現れる変化を検討した結果, それぞれ単独の変異のみでは **Ton.B.** 細胞に **IL-3** 非存在下での増殖を誘導せず, 増殖抑制作用の維持を示したが, チロシン **Y568** とプロリン **P567, 570, 573, 576** の 5 箇所全ての変異を持つ遺伝子ではその抑制が解除されて, **Box1** 全体の削除と同等の細胞増殖能を獲得する事を確認した。これより増殖抑制機能の発現は一元的な要因ではなく, 複数の因子による複合的な作用機構が必要であると窺われた。

(2) 特異的生物作用発現に必要な結合分子の単離・同定への検討

これまでに ARG 抗体を用いた免疫沈降と GST 融合蛋白による pull down 法による検索では

ABL 野生型と比較して ARG に特異的な結合分子をまだ検出できていないが Yeast Two Hybrid 法により ARG の SH2-Kinase domain を含む 485 アミノ酸領域への特異的な結合分子として STAT3 を検出した。両者の結合はキナーゼ不活化型の変異体 ARG (k317R) では認められず、構造内で自己リン酸化したチロシン残基への特異的な結合が窺われる。またこの結合は Box1 部分の削除およびアミノ酸変異体でも認められたので、直接増殖抑制機能に関わるとは考えにくく、むしろ STAT は造血因子や腫瘍の種類により働くアイソフォームが異なる事、我々の動物実験で病型選択に両者 N 末端側の関与が窺われた事より Mastocytosis 発症への関与を疑っている。

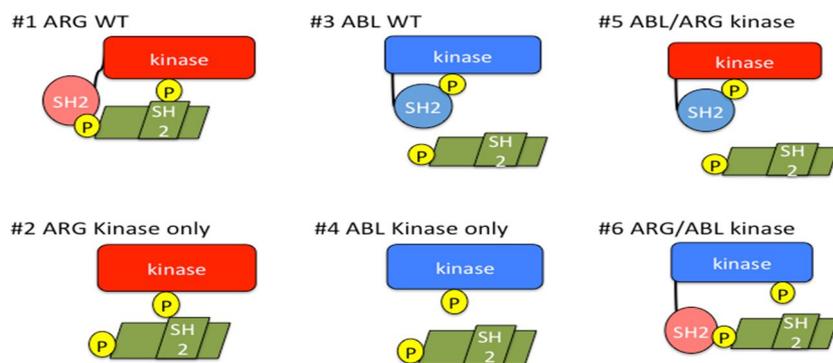
ARG は Kinase domain のみでも STAT3 との結合を認めたが、ABL の SH2 domain 構造と入れ替えたキメラ型 ARG では STAT3 との結合が消失した。一方、ABL に STAT3 の結合は認めないが、相互置換により ARG の SH2 domain を有する ABL は STAT3 と結合した。
(右に結果の一覧を図式化)



以上の結果よりファミリー遺伝子 ABL と ARG について着目した特徴的な生物作用として白血病発症時期など造腫瘍活性を反映する細胞増殖能の相違は ARG-C 末の抑制機能に起因しており、責任部位には C 末開始 50 アミノ酸内に存在するプロリンとチロシン残基の複合的関与が窺われた。また病型を反映する造血細胞の分化誘導の違いには ARG N 末に特異的に結合する STAT3 の関与が示唆された。

ARG の増殖抑制機能に対しては遺伝子の責任部位をアミノ酸単位まで絞り込めたが、その発現機構、作用発現に必須の結合分子等はまだ確認できておらず、今後もさらに検索が必要である。一方、ARG 特異的な結合分子として STAT3 を検出したが、その結合が導く正確な生理作用は確認できていない。両者の結合にはチロシンキナーゼ活性が必須であったので、その様式としていずれかに出現するリン酸化チロシン残基と相手側の SH2 domain を介する事が示唆される。解析に使用した ARG N 側 SH2-Kinase domain 構造内には SH2 domain に 6, Kinase domain に 16, C 末残存部位に 1 箇所のチロシン残基が存在するが、うち自己リン酸化を受ける部位は明らかではない。結合部位同定に向けては、少なくとも ARG Kinase domain 単体に結合を認めたので、STAT3 SH2 domain 結合部位の候補となる内部 16 箇所 (Y299, 303, 310, 358, 363, 366, 372, 388, 399, 439, 459, 481, 486, 495, 502, 515) の各チロシンをフェニルアラニンに置換した変異遺伝子 (Y F) を作製中である。またキメラ遺伝子での結果から ARG と ABL SH2 domain が関わる結合様式として ARG SH2 domain 内リン酸化チロシンへの STAT3 SH2 domain 結合、あるいは

STAT3 リン酸化チロシンへの ARG SH2 domain 結合, の2つの可能性が考えられる. 前者では ARG には異なる domain に STAT3 SH2 domain が認識する2箇所のリン酸化チロシンの存在が示唆される. 後者の場合に疑問となる ABL SH2 domain の役割については一つの可能性として ARG の SH2 domain は自身および ABL Kinase domain のリン酸化チロシンとの結合能はないか, ある場合もより強い親和力で STAT3 リン酸化チロシンに結合し, 逆に ABL SH2 domain では STAT3 SH2 domain よりも強い親和力で ARG Kinase domain リン酸化チロシンに結合して STAT3 の結合を阻害するというモデルを想定している (下にモデルを図式化).



今回得た結果は ABL ファミリーに特異的な造血器腫瘍発症機構本質の理解までに到っておらず, 引き続きさらに詳細な検討が必要であるが, その解明に向けた基盤として有用性は高い.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------