

機関番号：13901

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591117

研究課題名 (和文)

PML の SUMO E3 リガーゼ同定による PML NB 形成機構解明

研究課題名 (英文) Elucidation of the mechanism of PML NB formation.

研究代表者

早川 文彦 (Fumihiko Hayakawa)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30402580

研究成果の概要 (和文)：抗腫瘍蛋白PMLはSUMO化されてPML NBを形成する事で機能を発揮する。PAX5-PMLは急性リンパ性白血病で見つかった新たなPML関連融合遺伝子である。今回の研究でPAX5-PMLが、PMLのSUMO化を阻害することによりPML NBの形成を阻害し、細胞にアポトーシス抵抗性をもたらす事が発見された。一方、亜ヒ酸はPMLのSUMO化の増強、破壊されたPML NBの再構成を誘導し、PAX5-PMLによりもたらされたアポトーシス抵抗性を克服し、PAX5-PML発現細胞に効率的にアポトーシスをもたらす事が明らかにされた。これら研究により白血病におけるPML NBの破壊機構の一端が解明されるとともに、亜ヒ酸がPML及びPML関連融合蛋白のPML部分を標的として作用する事が示された。

研究成果の概要 (英文)：The purpose of this study is elucidation of the mechanism of PML NB formation that is important for PML to exert its function. We investigated the mechanism of PML NB disruption by oncoprotein and the mechanism of PML NB restoration by arsenic trioxide (ATO), anti-tumor drug. PAX5-PML is the first PML-fusion gene discovered other than PML-RAR α . We demonstrated that PAX5-PML inhibited PML sumoylation, disrupted PML NB, and conferred apoptosis resistance on cells. Furthermore, treatment with arsenic trioxide induced PML sumoylation and reconstitution of PML NBs, and overcame the anti-apoptotic effect of PAX5-PML in cells. These data shed light to the mechanism of PML NB disruption and indicated that ATO targeted PML portion of PML fusion protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：PAX5、PML、融合癌遺伝子、白血病、発癌機構

1. 研究開始当初の背景

PMLはアポトーシス誘導、抗腫瘍、抗ウイルス、DNA修復、転写調節などの多彩な機

能を持つ蛋白である。PMLはSUMO化という翻訳後修飾を受けてPML Nuclear body (NB)を形成する事で機能を発揮する。急性前

骨髄球性白血病においては、本疾患の原因となる融合癌蛋白 PML-RAR α が PML NB を破壊する事で、細胞に抗アポトーシス作用をもたらす事が白血病化の一因であり、その治療薬の一つである亜ヒ酸は、破壊された PML NB を再構成する事で白血病細胞に細胞死を誘導すると考えられている。しかしながら、PML NB の破壊・再構成ともにその詳細は不明な点が多い。特に、亜ヒ酸の作用機序に関しては、PML NB の再構成ではなく、活性酸素(Reactive Oxygen Species: ROS)の誘導が重要であるとする説もある等諸説があり、はっきりしていない。その解明は白血病のみならず悪性腫瘍全般の発症機構の解明と、治療薬の開発に役立つ。

PAX5-PML は急性リンパ性白血病で見つかった新たな PML 関連融合遺伝子であり、これが PML の機能にどのような影響を与え、急性リンパ性白血病の発症に関与したかを検討する事は、PML-RAR α の発癌機構及び、亜ヒ酸の作用機序を解明する事にもつながると考えられる。

また亜ヒ酸は、レチノイン酸や化学療法に抵抗性になった急性前骨髄球性白血病にも高い効果を示す事が知られているが、本剤使用後の再発や、本剤に対する耐性化も報告されているが、その機序は分かっていない。その機序として、PML-RAR α 遺伝子への付加的な遺伝子異常による亜ヒ酸耐性変異 PML-RAR α の出現があるのかどうかは、亜ヒ酸の作用機序を考える上で非常に興味深い点である。

2. 研究の目的

本研究の目的はPML機能の発現に重要であるPML NB形成機構の解明にあり、そのためにPML 関連融合蛋白によるPML NB破壊の機構と、抗腫瘍薬亜ヒ酸によるPML NB再構成の機構を研究した。

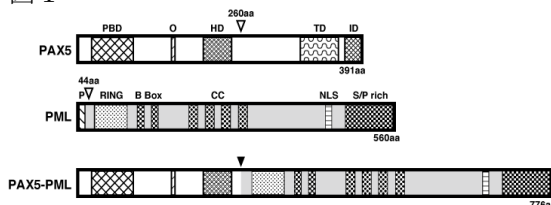
3. 研究の方法

新たに発見された PML 関連融合遺伝子である PAX5-PML に関して、細胞株に導入して PML NB の変化、アポトーシス抵抗性の変化、及びこれに対する亜ヒ酸の効果を検討した。また亜ヒ酸治療に抵抗性となった急性前骨髄球性白血病患者の PML-RAR α 遺伝子を調べ、遺伝子変異の追加の有無を検討した。

4. 研究成果

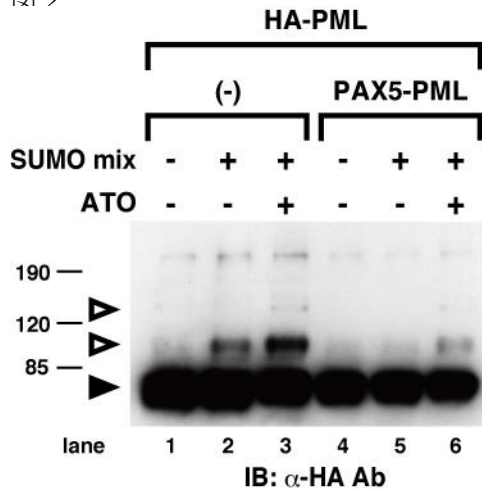
・PAX5-PML は PAX5 の N 末端側の DNA 結合部位を含む部分と PML の C 末端側ほぼ全長の融合蛋白である (図 1)。

図 1



・PAX5-PMLは、PMLのSUMO化を阻害し、亜ヒ酸は抑制されたSUMO化を再誘導する(図2)。

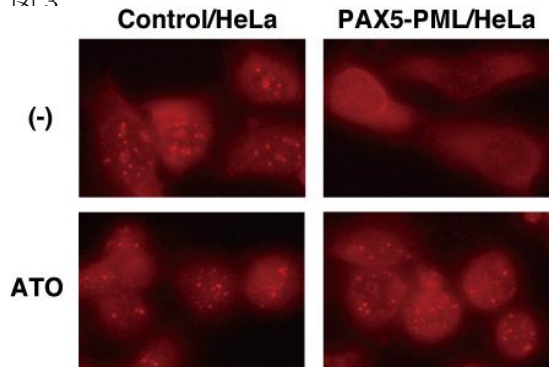
図 2



黒矢印、白矢印で示されているのはそれぞれSUMO化されていないPMLとSUMO化されたPML。ATO:亜ヒ酸 IB:イムノブロット

・PAX5-PMLを安定発現したHeLa細胞ではPML NBが破壊される。亜ヒ酸はそれを再構成する(図3)。

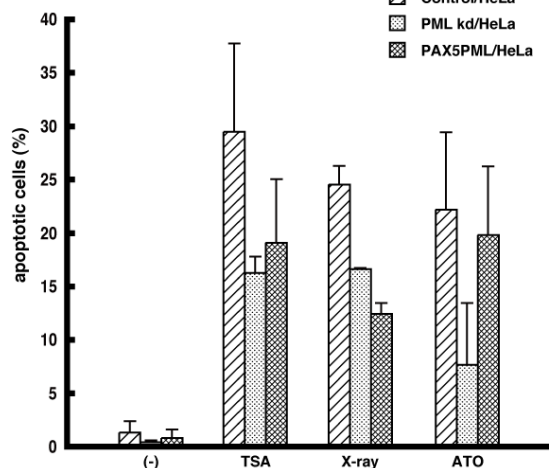
図 3



PML抗体での免疫染色。核内のドット状の構造物がPML NB。PAX5-PML/HeLa細胞(右上パネル)ではPML NBが認められないが、亜ヒ酸を投与するとPML NBが出現する(右下パネル)。

・亜ヒ酸はPAX5-PML発現細胞のアポトーシス抵抗性を克服する(図4)。

図 4



コントロール細胞 (Control/HeLa)、ShRNAでPMLをノックダウンしたHeLa (PML kd/HeLa)、PAX5-PMLを安定発現したHeLa (PAX5-PML/HeLa)をPML依存性にアポトーシスを誘導する事が知られているヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (トリコスタチンA: TSA)、X線照射で処理し、アポトーシス誘導 (細胞周期解析におけるサブG1ピークの出現で計測) を亜ヒ酸処理と比較した。PML kd/HeLaは3つの処理いずれにおいてもアポトーシス誘導が低くアポトーシス耐性を示した。一方PAX5-PML/HeLaはTSA処理、X線照射に対してはアポトーシス耐性を示したが、亜ヒ酸に対してはコントロール細胞と同等のアポトーシスを示した。

これらのデータにより、PAX5-PMLはPMLのSUMO化を阻害することによりPML NBの形成を阻害し、細胞にアポトーシス抵抗性をもたらし、一方亜ヒ酸はPMLのSUMO化の増強、破壊されたPML NBの再構成を誘導し、PAX5-PMLによりもたらされたアポトーシス抵抗性を克服する事が示された。PAX5-PMLを導入した細胞においてPML-RAR α による白血病におけるのと同様にこれらの減少が認められた事は亜ヒ酸の作用標的がPML融合蛋白のPML部分である事を示している。

・亜ヒ酸耐性急性前骨髄球性白血病患者の白血病細胞のPML-RAR α に付加的な点変異を認めた (未発表データであり図は示さない)

・変異PML-RAR α は細胞内局在が変化し、PML NBの破壊のパターンが変化しており、亜ヒ酸への反応性が失われていた (図は示さない)

これら研究により、亜ヒ酸がPML-RAR α のPML部分を標的として作用する事が示された。

今回の研究で、PMLの機能を回復させる事で白血病を治療できる事が示された。PML NBが癌遺伝子で破壊されている症例は、現時点では一部の白血病で認められているのみだが、PMLの発現低下は多くの固形癌で認められている事である。PMLの機能を高める薬剤にはこうした腫瘍に対する抗腫瘍効果を示す可能性があり、今後こうしたコンセプトでの薬剤の開発の検討も必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Kurahashi S, Hayakawa F (以下5名省略2番目) PAX5-PML acts as a dual dominant-negative form of both PAX5 and PML. **Oncogene**. 2011; In press. 査読有

2. Suzuki M, Abe A (以下11名省略5番目) BCR-ABL-independent and RAS / MAPK pathway-dependent form of imatinib resistance in Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cell line with activation of EphB4. **Eur J Haematol**. 2010;84:229-38. 査読有

3. Abe A, Minami Y (以下9名省略1番目) Retention but significant reduction of BCR-ABL transcript in hematopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia after imatinib therapy. **Int J Hematol**. 2008;88:471-5. 査読有

4. Hayakawa F, Abe A (以下3名省略1番目) Acetylation of PML is involved in histone deacetylase Inhibitor-mediated apoptosis. **J Biol Chem**. 2008;283:24420-5 査読有

[学会発表] (計9件)

1. Kurahashi S, Hayakawa F (4名省略2番目) PAX5-PML acts as a dual dominant-negative form of PAX5 and PML. The American Society of Hematology, 52nd Annual Meeting. 2010. 12. 4, Orlando, FL, USA

2. Hayakawa F, Sugimoto K (9名省略1番目) A novel direct STAT3 inhibitor OPB-31121 induces tumor-specific growth inhibition in a wide range of hematopoietic malignancies and effectively suppresses the chemotherapy resistant quiescent cells *in vivo*. The American Society of Hematology, 52nd Annual Meeting. 2010. 12. 6, Orlando, FL, USA

3. Yasuda T, Hayakawa F (2名省略2番目) PAX5 phosphorylation by MAP kinase signal potentially suppresses PAX5 function and might be a trigger of the plasma cell differentiation. The American Society of Hematology, 52nd

Annual Meeting. 2010. 12. 6, Orlando, FL,
USA

4. Hayakawa F, Kurahashi S (4名省略1番
目) PAX5-PML acts as a dual dominant-
negative form of PAX5 and PML. 5th
International Symposium on ACUTE
PROMYELOCYTIC LEUKEMIA. 2009. 9. 25, Rome,
Italy

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 文彦 (HAYAKAWA FUMIHIKO)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30402580

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：