

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590259
 研究課題名（和文）分子シャペロンによる発癌原因分子チロシンキナーゼのキナーゼ領域依存性分解制御
 研究課題名（英文） Regulation of kinase domain-dependent degradation of oncoprotein tyrosine kinase by molecular chaperon
 研究代表者
 塚原 富士子（TSUKAHARA FUJIKO）
 東京女子医科大学・医学部・講師
 研究者番号：40119996

研究成果の概要：分子シャペロンによる発癌原因分子チロシンキナーゼのキナーゼ領域依存性分解制御について研究を行った。その結果、構成型熱ショック蛋白質（Hsc）70 と熱ショック蛋白質（Hsp）90 分子シャペロン系は、慢性骨髄性白血病発癌原因分子 BCR/ABL キナーゼ蛋白質のフォールディングと成熟（キナーゼ活性化）に関与し、ユビキチンリガーゼ CHIP と c-Cbl による BCR/ABL 蛋白質の分解を制御していることを解明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：生理活物質、分子シャペロン、チロシンキナーゼ、癌

1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病原因分子 BCR/ABL は、9 番染色体長腕と 22 番染色体長腕の相互転座の結果生ずるキメラ蛋白質である。BCR/ABL キナーゼは、恒常的に活性化され、細胞の増殖を促進、アポトーシスを抑制して白血病を惹起する。近年、BCR/ABL 分子標的薬であるイマチニブが慢性骨髄性白血病の有効な治療薬として臨床効果を発揮している。しかしながらイマチニブに対する薬剤耐性の獲得が治療上大きな障害となっている

例が報告されている。その原因として BCR/ABL キナーゼ領域の遺伝子変異および BCR/ABL 遺伝子の増幅が指摘されている。これに対して、Hsp90 阻害薬は、BCR/ABL 蛋白質の分解を促進することからイマチニブ耐性を克服する抗癌薬として期待され、現在臨床開発が進められている。しかしながら BCR/ABL 蛋白質の分解機序の詳細は未だ解明されていない状況であった。

分子シャペロンは、蛋白質のフォールディングや分解、細胞内輸送等の制御に関与し、

細胞機能の調節に重要な役割を演じている。申請者は、これまで BCR/ABL 蛋白質の分解機序について検討を行い、分子シャペロンと相互作用して働く CHIP、および BCR/ABL と結合するアダプター蛋白質 c-Cbl が BCR/ABL を基質として認識するユビキチン E3 ligase として働き、蛋白質をユビキチン化して分解を促進することを明らかにした。さらに白血病モデル細胞を用いて、これらの E3 ligase の細胞内過剰発現は、BCR/ABL 依存性細胞増殖を特異的に阻害することを明らかにした。また種々の分子内ドメインの欠失変異体を作製して検討した結果、BCR/ABL のキナーゼ領域が、CHIP および c-Cbl による分解に必須の領域であることが示唆された。そこでさらに BCR/ABL のキナーゼ領域依存性分解制御機構における分子シャペロンの役割について解明することを着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、CHIP および c-Cbl によるチロシンキナーゼ BCR/ABL の分解促進機序の詳細について明らかにするために、BCR/ABL 蛋白質の成熟過程（キナーゼ活性獲得機構）と分解機序における分子シャペロンとコシャペロンの役割について解明し、さらに Hsp90 阻害薬による蛋白質分解機序およびイマチニブ耐性の原因の一つとなる蛋白質安定化の機序を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) BCR/ABL蛋白質の分解

BCR/ABLで形質転換したBa/F3細胞、白血病モデル細胞であるK562細胞およびBCR/ABL発現プラスミドを導入したCOS7細胞を用いた。種々の分子シャペロンおよびコシャペロン（Hsp90, Hsc70, Hsp40, p23, p60, cdc37, CHIP, c-Cbl等）を導入またはイマチニブ、Hsp90阻害薬処置後、各蛋白質量をウエスタンブロット法にて測定した。

(2) BCR/ABL蛋白質のユビキチン化

Rabbit reticulocyte lysate を用いて翻訳した未成熟あるいは成熟BCR/ABL蛋白質を、ユビキチン活性化酵素（E1）、種々のユビキ

チン結合酵素（E2）、およびユビキチンリガーゼ（E3, CHIPおよびc-Cbl）と共にインキュベートし、BCR/ABL蛋白質のユビキチン化を *in vitro* ubiquitination assayにて検討した。

(3) BCR/ABL蛋白質合成初期の成熟過程における分子シャペロンの相互作用

BCR/ABL およびキナーゼ領域欠失変異体を rabbit reticulocyte lysate を用いて Hsp90 阻害薬存在下または非存在下で翻訳した。Hsp90 阻害薬またはイマチニブ存在下で合成した未成熟な BCR/ABL と種々の分子シャペロンおよびコシャペロン（Hsp90, Hsc70, Hsp40, p23, p60, cdc37, CHIP, c-Cbl 等）との結合を GST-pull down 法および免疫免疫沈降法にて検討した。

(4) BCR/ABL のキナーゼの活性化と分解に必須なアミノ酸領域の解析

BCR/ABLのキナーゼ領域単独およびSH2ドメインとキナーゼ領域融合蛋白を細胞内に発現させ、CHIP、c-CblおよびHsp90阻害薬による分解を検討した。

(5) BCR/ABL依存性細胞増殖

細胞の増殖は、フローサイトメーターおよび alamar blue assay 等で計測した。

4. 研究成果

(1) BCR/ABLキナーゼの成熟過程における分子シャペロンの役割

Hsp90阻害薬によるBCR/ABL蛋白質の分解は、プロテアソーム阻害薬および蛋白質合成阻害薬で抑制されたことから、BCR/ABL蛋白質の分解は、蛋白質の合成直後にプロテアソームで起こることが示唆された。

さらに *in vitro* 蛋白質翻訳系を用いて蛋白質合成直後のBCR/ABLに対するHsp90阻害薬の効果を検討した結果、Hsp90阻害薬は、BCR/ABL蛋白質自己リン酸化（蛋白質の成熟）を抑制した。またHsp90阻害薬は、BCR/ABLとHsp90およびそのコシャペロンであるcdc37の結合を阻害したが、Hsc70との結合を増加した。

Hsc70の細胞内発現を増加させたところ、Hsc70の発現増加に伴い、BCR/ABL蛋白質の安定がみられた。

以上の結果から、Hsc70はBCR/ABL合成直後の蛋白質のフォールディングに関与して蛋白質を安定化させ、さらにHsp90-cdc37シャペロン系は蛋白質の成熟（キナーゼ活性化）に関与することが示唆された。

以上より、Hsp90阻害薬は、BCR/ABL蛋白質の成熟過程を阻害することにより分解を促進することが示唆される。またHsp90阻害薬は、イマチニブ耐性変異体（T315I, E255K）の分解を促進したことからHsp90-cdc37シャペロン系はこれらの変異体蛋白質の成熟過程にも関与していることが示唆された。

（２）CHIPとc-CblによるBCR/ABL蛋白質のコビキチン化と分解

BCR/ABLの種々の変異体とCHIPまたはc-Cblをテトラサイクリン制御下で細胞内に過剰発現させ、BCR/ABL蛋白質量を検討した結果、CHIPは構造異常依存性に、一方c-Cblはリン酸化依存性にBCR/ABL蛋白質の分解を促進した。種々のタンパク質分解酵素阻害薬を用いて検討したところ、CHIPは主としてプロテアゾーム、一方、c-Cblは主としてリソゾームにおいてBCR/ABL蛋白質の分解を促進することが明らかとなった。

さらにHsp90阻害薬存在または非存在下で合成したBCR/ABL蛋白質を基質としてコビキチン化を検討したところ、CHIPは、Hsp90阻害薬存在下で合成したBCR/ABLをより強くコビキチン化した。一方、c-CblはHsp90阻害薬非存在下で合成したBCR/ABLをより強くコビキチン化した。

以上の結果から、Hsp90阻害薬により、成熟化（キナーゼ活性化）が阻害されたBCR/ABL蛋白質は、CHIPにより認識され、コビキチン化されることによりプロテアゾームで分解されることが示唆された。

（３）イマチニブによるBCR/ABL蛋白質の成熟過程阻害と蛋白質安定化

BCR/ABLのキナーゼ領域に特異的に結合する分子標的薬イマチニブは、Hsp90とコシャペロンcdc37の結合を阻害してキナーゼの成熟過程を阻害した。

イマチニブは、BCR/ABLとCHIPおよびc-Cblの結合を阻害し、これらのE3 ligase

およびHsp90阻害薬によるBCR/ABL蛋白質の分解を抑制した。

以上の結果より、イマチニブはBCR/ABL蛋白質のキナーゼ領域に結合することにより、BCR/ABLの成熟過程を抑制するが、一方、CHIPおよびc-Cblによる分解を抑制することによって、BCR/ABL蛋白質の安定化を促進し、イマチニブ耐性でみられるBCR/ABL蛋白質の増加を引き起こす要因の一つとなることが考えられる。

（４）BCR/ABLとc-Cblのキナーゼ依存性分解の双方向性シグナル

BCR/ABL依存性細胞増殖に対するc-Cblの効果は、CHIPに比べ弱かった。

c-Cbl蛋白質の安定化に対するBCR/ABLの効果を検討したところ、c-Cblは、リン酸化依存性にBCR/ABLを分解する一方で、自分自身もコビキチン化して分解を促進した。

c-Cbl蛋白質のリン酸化および分解の促進は、BCR/ABLのSH2領域とキナーゼ領域融合蛋白質（キナーゼ活性を持つ）によっても見られたが、キナーゼ領域蛋白質（キナーゼ活性を持たない）では見られなかった。さらにSH2領域とキナーゼ領域融合蛋白質の種々の変異体を用いて検討したところ、リン酸化依存性にc-Cblの分解が促進することが明らかとなった。

以上の結果より、c-CblとBCR/ABLは双方向性のシグナルが存在し、BCR/ABLによるc-Cbl分解促進は、BCR/ABL依存性細胞増殖に対する抑制作用を減弱することが示唆された。

（５）Hsp90阻害薬依存性に結合するHsc70コシャペロンの役割

Hsp90阻害薬依存性にBCR/ABLキナーゼ領域に強く結合する新たなコシャペロンを見出した。今後、このコシャペロンのBCR/ABL成熟過程および分解における生物学的意義についてさらに明らかにしたい。

本研究で得られた成果は、今後BCR/ABL蛋白質分解に基づく新たな治療薬の開発に繋がることが期待される。

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3件)

1) F. Tsukahara and Y. Maru, Regulation of stabilization and degradation of chronic myelogenous leukemia oncoprotein, BCR-ABL by molecular chaperone. Journal of Pharmacological Sciences 109, 121P, 2009, 査読有

2) 塚原富士子, 丸 義朗, イマチニブは慢性骨髄性白血病原因分子 BCR-ABL の Hsp90-cdc37 シャペロン依存性蛋白質成熟過程を阻害する, くすりとからだ 133, 18P, 2009, 査読有

3) F. Tsukahara and Y. Maru, Bidirectional signaling between chronic myelogenous leukemia oncoprotein, BCR-ABL kinase and ubiquitin ligase c-Cbl. Journal of Pharmacological Sciences 106, 105P, 2008, 査読有

[学会発表](計4件)

(1) 塚原富士子, 丸 義朗, 分子シャペロンによる慢性骨髄性白血病原因分子 BCR-ABL の安定化と分解制御, 第82回日本薬理学会年会, 2009.3.18, 横浜

(2) 塚原富士子, 丸 義朗, イマチニブはコシャペロン cdc37 依存性 BCR-ABL の成熟過程を阻害する, 第67回日本癌学会学術総会, 2008.10.29, 名古屋

(3) 塚原富士子, 丸 義朗, イマチニブは慢性骨髄性白血病原因分子 BCR-ABL の Hsp90-cdc37 シャペロン依存性蛋白質成熟過程を阻害する, 第119回日本薬理学会関東部会, 2008.10.4, 東京

(4) 塚原富士子, 丸 義朗, 慢性骨髄性白血病原因分子 BCR-ABL キナーゼと c-Cbl コピキチンリガーゼの双方向のシグナル, 第81回日本薬理学会年会, 2008.3.19, 横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚原 富士子 (TSUKAHARA FUJIKO)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40119996

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし