

論文の内容の要旨

Functional analysis of the *SEPT9-ABL1* chimeric fusion gene derived from

T-prolymphocytic leukemia

(T 細胞前リンパ球性白血病より同定した *SEPT9-ABL1* 融合遺伝子の機能解析)

学位申請者 川井 英嗣

キーワード： *SEPT9-ABL1*、ABL1 融合遺伝子、T 細胞前リンパ球性白血病、

チロシンキナーゼ阻害薬、癌遺伝子と癌抑制遺伝子

[背景]

我々は、T 細胞前リンパ球性白血病の一例より新たに同定した ABL1 融合遺伝子である、*SEPT9-ABL1* 融合遺伝子の機能解析を行った。ABL1 遺伝子は非受容体型チロシンキナーゼであり、細胞増殖、生存、遊走等の調整に関与することが知られている。今日までに、造血器腫瘍において、9 つの ABL1 融合遺伝子が報告されている。BCR-ABL1 は慢性骨髄性白血病と急性リンパ性白血病の一部に認められ、最も頻度が高い。その他の ABL1 融合遺伝子の報告は少数である。ABL1 融合遺伝子は恒常的なチロシンキナーゼ活性を有し、チロシンキナーゼ阻害薬の治療標的と考えられる。一方、SEPT9 は、アクチンフィラメント、微小管、細胞膜などの細胞骨格を構成する構造蛋白である。6 つのアイソフォームを有し、SEPT9 の過剰発現、プロモーター領域のメチル化、いずれかのアイソフォームの特異的な発現がさまざまな腫瘍で認められ、腫瘍化に関わることが報告されている。

[目的]

本研究では、*SEPT9-ABL1* の各アイソフォームにおいて、腫瘍原性とチロシンキナーゼ阻害薬に対する感受性を解析した。

[方法]

患者サンプルを用いたウエスタンブロット解析では、少なくとも 3 つのバンドを確認し、数種類のアイソフォームの発現を予想した。RT-PCR より、SEPT9c-ABL1 を除く、N 末構造の異なる SEPT9a-ABL1、SEPT9b-ABL1、SEPT9d-ABL1、SEPT9e-ABL1、SEPT9f-ABL1 の 5 つのアイソフォームを同定した。得られた相補的 DNA を HEK293T に導入し、発現を確認した。マウスの骨髄前駆細胞株で、インターロイキン-3 依存的に増殖する 32D 細胞に、SEPT9-ABL1 の各アイソフォームの相補的 DNA をレトロウイルスベクター感染により導入し、マーカーである EGFP の発現によりソーティングし、培養を行い、各実験に使用した。

[結果]

SEPT9-ABL1 の構造は、ABL1 側は BCR-ABL1 同様に SH3 ドメイン以下が融合し、SEPT9 は機能ドメインである CDC/SEPT ドメインの一部を保持し融合する。各アイソフォームで、N 末がそれぞれ異なる構造を示した。32D 細胞における細胞内分布は、SEPT9d-ABL1 を除くすべてのアイソフォームは細胞質優位に分布し、特に SEPT9f-ABL1 は細胞質に強く分布した。これらは ABL1 自身のリン酸化を起こし、さらに、BCR-ABL1 の代表的な下流シグナルである、Stat5、Crkl をリン酸化させた。SEPT9f-ABL1 が ABL1、Stat5 を最も強くリン酸化した。SEPT9-ABL1 を導入した 32D 細胞は、SEPT9d-ABL1 を除き、インターロイキン-3 非依存的な増殖を認めた。同系マウスである C3H マウスに移植すると、個体死を導いた。これらは、著明な肝脾腫を示し、組織学的には骨髄、肝臓、脾臓への白血病細胞の浸潤を認め、白血病による腫瘍死と判断された。SEPT9f-ABL1 を導入した 32D 細胞を移植したマウスは、47 日までに全例の腫瘍死を確認した。

BCR-ABL1 以外の ABL1 融合遺伝子も多くはチロシンキナーゼ阻害薬に感受性をもち、SNX2-ABL1 のみがダサチニブに耐性であると報告されている。SEPT9f-ABL1 導入 32D 細胞のイマチニブ、ダサチニブに対する 50%阻害濃度は、BCR-ABL1 導入 32D 細胞と比較し、特にダサチニブでは 20 倍前後の高濃度であった。SEPT9f-ABL1 の ABL1 遺伝子には耐性を誘導する変異を認めなかった。イマチニブまたはダサチニブ存在下において、特に Stat5 のリン酸化は、BCR-ABL1 では著明に低下する一方、SEPT9f-ABL1 ではより高濃度まで保持された。マウスを用いた皮下腫瘍モデル、静注モデルにおいて、いずれも SEPT9f-ABL1 導入 32D 細胞はダサチニブに耐性であった。

[考察]

BCR-ABL1 は Stat5、Crkl などの多数のシグナルを活性化し、細胞質で機能する。Stat5 は細胞増殖を促進し、Crkl はアポトーシスを抑制する。特に、

SEPT9f-ABL1 は細胞質に強く分布し、Stat5 を強くリン酸化した。Crkl のリン酸化は、インターロイキン-3 非依存的な増殖能をもたない SEPT9d-ABL1 でもみられ、生存に寄与すると考えられる。SEPT9-ABL1 も細胞質で機能し、細胞増殖には特に Stat5 が重要である。

各アイソフォームによる機能の違いは、N 末の構造の違いにより生じると考えられる。SEPT9 はプロリンに富む領域をもち、SEPT9f で最も短い。SEPT9f-ABL1 で強い腫瘍原性を認めたことから、プロリンに富む領域が ABL1 の機能を抑制し、機能の違いを生じる一因かもしれない。

BCR-ABL1 のチロシンキナーゼ阻害薬に対する耐性獲得のメカニズムに ABL1 の点突然変異がある。しかし、SEPT9f-ABL1 では認められなかった。また、耐性を有する SNX2-ABL1 では、ABL1 の機能を抑制すると考えられる SH3、SH2 ドメインを有していないことが耐性獲得に関与していると考えられるが、SEPT9f-ABL1 の ABL1 側は BCR-ABL1 同様の構造であり、耐性獲得は N 末の構造に依存すると考えられる。

[結論]

細胞内分布や細胞増殖能は、N 末配列の異なる各アイソフォームにおいて異なり、特に SEPT9f-ABL1 は強い腫瘍原性を示した。また、ABL1 側に点突然変異がないにもかかわらず、チロシンキナーゼ阻害薬に対する耐性が示され、薬剤感受性も N 末の構造に依存することが推測された。BCR-ABL1 以外の ABL1 融合遺伝子の報告は少数であるが、近年の遺伝子解析の発展により、ABL1 融合遺伝子をもつ造血器腫瘍が発見される頻度は増えることが予想される。ABL1 融合遺伝子の解析は、今後、ABL1 を標的とした新たな治療開発に寄与する可能性があり、本研究は臨床的にも大きな意義を有すると考える。