

博士学位論文審査要旨

2018年 2 月 14日

論文題目： 慢性骨髄性白血病の病原因子である p210 BCR-ABL の PH ドメインに関する病理的機能解析

学位申請者： 島崎 健太郎

審査委員：

主 査： 生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

副 査： 生命医科学研究科 教授 小林 聡

副 査： 生命医科学研究科 教授 池川 雅哉

要 旨：

慢性骨髄性白血病 (CML) は、9 番染色体と 22 番染色体の相互転座により生じる融合遺伝子産物、p210 BCR-ABL を原因因子とする疾患である。CML 治療薬として使用されているイマチニブ等のチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) は治療成績を劇的に改善したが、近年薬剤耐性が大きな問題となっており、キナーゼドメインとは異なる、他の機能ドメインを標的とした治療薬の開発が望まれている。本研究では、病理的機能が不明である PH ドメインに着目し、1) そのリガンド特性を解析すること、2) そのリガンド特性を基盤として PH ドメインの病理的機能を解明すること、を目的とした。

研究項目 1) では、p210 BCR-ABL PH ドメインは報告されていたモノホスホイノシタイドではなく、カルジオリピン (CL: cardiolipin) に最も強く、次いで PA (phosphatidic acid)、PtdIns(3,4)P₂、PtdIns(4,5)P₂、PtdIns(3,4,5)P₃に結合することを見出した。さらに、PH ドメインに存在する R726 がリガンド認識において主要な役割を果たしていることを見出した。

研究項目 2) では、マイトファジー誘導時に、p210 BCR-ABL が PH ドメイン依存的に CL を介してミトコンドリアへとその局在性を変化させること、その結果マイトファジーが抑制され、活性酸素種 (ROS) 産生が亢進すること、を見出した。本現象は CML 細胞の増殖・維持に関わる新たな機構である可能性を示唆しており、p210 BCR-ABL PH ドメインが CML 治療戦略における新たな創薬標的となりうることを示している。

よって、本論文は、博士 (理学) (同志社大学) の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2018年 2月 14日

論文題目： 慢性骨髄性白血病の病原因子である p210 BCR-ABL の PH ドメインに関する病理的機能解析

学位申請者： 島崎 健太郎

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

副査： 生命医科学研究科 教授 小林 聡

副査： 生命医科学研究科 教授 池川 雅哉

要 旨：

総合試験は、2018年1月18日午後3:00から、口頭発表(45分)、質疑応答・口頭試問(1時間)の構成で実施した。申請者は総合試験において、がん領域、脂質領域、タンパク質構造領域等様々な方面からの質問に関する確に回答しており、幅広い分野で十分な専門知識を有していることが確認できた。また、各実験について、その目的、意義、研究全体の中での位置付けが十分に理解できていること、各々が慎重に組み合わせられて結論が導き出されていること、など博士に相応しい研究スタイルを習得していることが確認できた。さらに、得られた実験結果をベースとして、これまでの文献情報に習熟した上で説得力のある独自性の高いモデルへと再構築する能力を備えていることが確認できた。特に、現在CML治療で問題となっているCML幹細胞の増殖制御に関してこれまでになく視点を提唱し、新たな創薬への可能性を提供していた点は高く評価できる。

申請者は、博士課程(後期)入学時の語学試験(英語)に合格している。また、2018年1月にGenes to Cells誌に筆頭著者の論文が掲載されている。以上のことから、十分な語学能力を有していると判断される。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目： 慢性骨髄性白血病の病原因子である p210 BCR-ABL の PH ドメインに関する病理的機能解析

氏名： 島崎 健太郎

要旨：

慢性骨髄性白血病 (CML: chronic myeloid leukemia) は造血幹細胞の腫瘍化を起点とした白血球の異常増殖を主症状とする骨髄増殖性疾患である。CML は、9 番染色体と 22 番染色体の相互転座により生じる融合染色体、フィラデルフィア染色体を有するという特徴がある。相互転座の結果、22 番染色体上の *bcr* 遺伝子と 9 番染色体上の *abl* 遺伝子の融合が生じる。その融合遺伝子産物である BCR-ABL タンパク質には *bcr* 遺伝子の転座部位の違いにより、p190、p210、p230 といった複数のバリエーションが存在する。これらの内、CML で最も頻繁にみられる p210 BCR-ABL は、およそ 90% 以上の CML 患者においてその発現が認められていることから CML のドライバー因子であると考えられている。その一方で、p190 BCR-ABL は急性リンパ性白血病に、p230 BCR-ABL は好中球に限定的な CML の発症にそれぞれ関係することが知られている。

ABL は非受容体型チロシンキナーゼであり、細胞骨格のリモデリングによる細胞運動性の決定や細胞接着、さらには受容体のエンドサイトーシス制御、DNA 損傷に対する応答やアポトーシス等、様々な役割をもつことが知られており、その活性は厳密な制御を受けている。しかしながら、BCR-ABL は BCR の CC ドメイン依存的に多量体化することで ABL 本来の活性制御機構から逸脱し、恒常的な活性を獲得する。そして BCR-ABL の下流シグナル経路である PI3K/AKT 経路、JAK/STAT 経路、RAS/MAPK 経路などが過剰に活性化されることで、CML 細胞の生存、増殖が促進される。CML の治療薬として開発されたチロシンキナーゼ阻害剤 (TKIs: tyrosine kinase inhibitors) であるイマチニブ、続く第 2 世代 TKIs であるニロチニブ、ダサチニブは CML 患者の治療成績を劇的に改善したが、キナーゼドメインの ATP 結合領域中の 315 番目のスレオニンがイソロイシンに置換した変異体 (Thr315Ile) が第 1、第 2 世代 TKIs に対して耐性をもつことが報告されており、その存在は臨床上大きな問題となっている。近年その使用が国内においても承認された第 3 世代 TKIs であるボナチニブは Thr315Ile 変異体に対しても治療効果を示すが、キナーゼドメインに 2 箇所以上の点変異を有する変異体がボナチニブに対しても耐性を示すことが報告されていることから、TKIs 耐性を克服したとは言い難い。また TKIs 断薬後の患者の多くで CML の再発が認められていること、CML 幹細胞は自身の生存、増殖にそのチロシンキナーゼ活性を必要としないこと、が報告されている。以上のことから、キナーゼドメインとは異なる、p210 BCR-ABL の他の機能ドメインを標的とした治療薬の開発が望まれている。

p210 BCR-ABL のキナーゼドメインを除く各ドメインの CML における機能を以下に示す。これらのドメインは BCR に由来するドメイン (N 末端から CC: coiled coil, DH: Dbl homology, PH: pleckstrin homology) と、ABL に由来するドメイン (N 末端から SH(3/2): Src homology,

FAB: F-actin binding)、に大別される。CC ドメインは p210 BCR-ABL の多量体化を担い、本機構は p210 BCR-ABL のチロシンキナーゼ活性の獲得、それに続く CML の発症に必須であると考えられている。DH ドメインは RhoA 特異的な GEF (Guanine nucleotide exchange factor) 活性を有し、CML 細胞の運動性に寄与する。さらに近年、本ドメインの下流因子である ROCK の活性化が CML 細胞の自然免疫回避に働くことが示されている。PH ドメインは各種リン脂質の内、PtdIns(3)P、PtdIns(4)P、PtdIns(5)P を認識することが示されているが、CML の病態への関与は不明である。SH3 ドメインは ABL においてはチロシンキナーゼ活性の抑制性自己制御領域として機能するが、CC ドメイン依存的に活性化した BCR-ABL においては十分に機能していないと考えられている。SH2 ドメインもまた ABL チロシンキナーゼ自己制御領域として機能するが、SH3 ドメインとは異なり、SH2 ドメインによるチロシンキナーゼ活性制御機構は BCR-ABL の活性化、それに続く CML の発症においても重要な役割を果たしていることが判明している。FAB ドメインは F-actin 結合活性を有する領域であり、BCR-ABL を細胞骨格へと繋ぎ止めることでその細胞内局在性を決定している。FAB ドメインの結合変異導入によって F-actin 依存的な局在性が変化し、その結果 BCR-ABL のがん化誘導能が低下することから、CML の発症に関与していると考えられている。そこで本研究では、これらドメインのうち病理的機能の不明である PH ドメインに着目した。

PH ドメインは現在細胞内に 250 種類以上のタンパク質において存在しホスホイノシタイドや酸性リン脂質と相互作用することで、細胞内情報伝達機構において重要な役割を果たしている。p210 型 BCR-ABL の PH ドメインは、PtdIns(3)P や PtdIns(4)P、PtdIns(5)P といったモノホスホイノシタイドを認識しうることが報告されている。しかしながらこの知見は、シート上に各種 100% の割合でスポットされたリン脂質に対する結合特性を調べたものであるうえに、そのリガンド特性が CML 病態にもたらす影響に関しては依然として明らかになっていない。そこで本研究では、リン脂質小胞を用いることでリガンドの存在状態を生理的条件に近い状態に再構成し、1) p210 型 BCR-ABL PH ドメインのリガンド特性を解析すること、2) そのリガンド特性を基盤とし、p210 型 BCR-ABL PH ドメインの病理的機能を解明すること、を目的とした。

研究項目 1) では、まず pET 発現系により発現させた 6 x His タグ融合 p210 BCR-ABL PH ドメインを Ni²⁺ビーズを用いたアフィニティー精製により回収し解析に用いた。脂質小胞を用いたリガンド特性解析の実験系の確立を、PtdIns(4)P を特異的に認識することが知られているセラミド輸送タンパク質である CERT (Ceramide transport protein) の PH ドメインをポジティブコントロールとして用いて行った。その結果、p210 BCR-ABL PH ドメインは報告されていたモノホスホイノシタイドではなく、カルジオリピン (CL: cardiolipin) に最も強く、次いで PA (phosphatidic acid)、PtdIns(3,4)P₂、PtdIns(4,5)P₂、PtdIns(3,4,5)P₃ に結合することを見出した。更なる解析の結果、p210 BCR-ABL PH ドメインは脂質小胞内の CL 密度に強く依存した結合様式をとることが明らかとなった。

続いて、これらリガンドとの相互作用に関わるアミノ酸部位を特定するため、リガンド既知の PH ドメインとのアラインメント解析を行った。その結果、BCR PH ドメインの 711 番目のリシン、723 番目のアルギニン、724 番目のリシンおよび 726 番目のアルギニンがリガンド認識に関わると推測された。これらのアミノ酸残基のリガンド認識への寄与を検証するため、4つのアラニン置換変異体 (K711A, R723A, K724A, R726A) を新たに作製し、CL、PtdIns(3,4)P₂、

PtdIns(4,5)P₂含有小胞を用いて解析を行った。その結果、いずれの変異体においても野生型と比較し結合活性の減少が認められたが、特に R726A において顕著な減少がみられた。即ち、R726 が p210 BCR-ABL PH ドメインのリガンド認識において主要な役割を果たしていることが明らかとなった。

続く研究項目 2)では、CL に着目し p210 BCR-ABL PH ドメインの病的機能の解析を行った。CL はミトコンドリアに特徴的なリン脂質であり、定常時ではその大部分はミトコンドリア内膜に限定して局在する。その一方で、ミトコンドリア特異的なマクロオートファジーであるマイトファジー誘導時には、CL は外膜へと表出し、被分解ミトコンドリアの指標として機能することで、不良ミトコンドリアの分解、除去に働くことが知られている。そこで我々はまず、p210 BCR-ABL を一過性に発現させた HEK293 細胞を、マイトファジー誘導作用をもち CL の表出を促進させることが知られている脱共役剤 CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) により刺激し、p210 BCR-ABL の細胞内局在性を検討した。その結果、p210 BCR-ABL は刺激に応じてミトコンドリアへと集積し、その縁を取り囲むような構造体 (以後この構造をリング様構造とする) を形成することを見出した。その一方で、CL 結合変異体として用いた R726A 変異型 p210 BCR-ABL ではリング様構造数およびその形成率の有意な減少が認められた。この結果は、p210 BCR-ABL が PH ドメイン依存的に CL を介してミトコンドリアへとその局在性を変化させたことを示している。また刺激後の細胞から CCCP を除去すると、リング様構造形成率が減少したことから、この局在性変化は可逆的な現象であることが判明した。

マイトファジーにおいてミトコンドリア外膜上に表出した CL は、オートファゴソーム形成やその伸長に必須のタンパク質である LC3 (microtubule-associated protein-1 light chain 3) により認識されることで、被分解ミトコンドリアのオートファゴソームへの取り込みを促進すると考えられている。そこで我々は、複数の指標を基に p210 BCR-ABL のミトコンドリアへの局在性変化がもたらすマイトファジーへの影響について解析した。その結果、R726A 変異型 p210 BCR-ABL 発現細胞では非発現細胞と同様に CCCP 刺激に応じたマイトファジーの亢進が認められるのに対し、野生型 p210 BCR-ABL 発現細胞ではマイトファジーが抑制されていることを見出した。またこの抑制は ABL チロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブ存在下でもみられたことから、キナーゼ活性非依存的な抑制効果であることが示唆された。また CCCP 刺激後の細胞内活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) 産生を評価したところ、R726A 変異型 p210 BCR-ABL 発現細胞に比べて、野生型発現細胞において有意な ROS 産生の増加が認められた。以上より、p210 BCR-ABL の PH ドメイン依存的なマイトファジー抑制により不良ミトコンドリアが蓄積し、その結果細胞内 ROS 産生が増加する可能性が示唆された。

本研究では、p210 BCR-ABL はミトコンドリアへのストレスに応じて、PH ドメイン依存的にミトコンドリアへとその局在性を可逆的に変化させるという、ダイナミックな応答を示すことを明らかにした。また、ミトコンドリアへと移行した p210 BCR-ABL はマイトファジーを阻害すること、その結果蓄積した不良ミトコンドリアより ROS 産生が増強されることを明らかにした。これまでに、過剰な ROS は細胞死を誘導するが、適度な ROS はがん細胞の増殖シグナルを活性化させるシグナル分子として機能すること、さらに CML 細胞あるいは CML 幹細胞においては、高レベルの ROS 産生により CML の悪性化および TKI 耐性体の出現が促進されることが

報告されている。これらのことから、本研究で示された p210 BCR-ABL PH ドメインによるマイトファジー阻害は、不良なミトコンドリアを ROS の供給源として保持することで CML 細胞の増殖促進に働く可能性を示唆しており、p210 BCR-ABL PH ドメインが CML 治療戦略における新たな創薬標的となりうる可能性を示している。