

201209011A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

MLL-AF4白血病の分子標的薬創製を目指したAF4特異的な分解経路の解明

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 横山 明彦

平成25(2013)年 5月

目 次

| | |
|---|----------|
| I. 総括研究報告 | |
| MLL-AF4白血病の分子標的薬創製を目指したAF4特異的な分解経路の解明に関する研究 横山明彦 | ----- 1 |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- 11 |

MLL-AF4白血病の分子標的薬創製を目指したAF4特異的な分解経路の解明

研究代表者 横山 明彦 京都大学 准教授

研究報告書

研究要旨： 多くの乳児白血病が現行の治療法でよく治癒する中で、*MLL-AF4* 融合遺伝子を発現する急性リンパ性白血病は生存率が悪く、新規の治療法が求められている。乳児は後の発育不良の可能性を考えると治療法に限られるため、できるだけ副作用の少ない分子標的薬を開発する事が治癒率の向上及び治癒後の QOL の改善に必要である。*MLL* と様々な遺伝子によって形成される融合遺伝子は骨髄性、リンパ性両方の白血病に関わる事が知られているが、*MLL-AF4* 融合遺伝子は乳児の急性リンパ性白血病の主要な原因である一方で、成人の骨髄性白血病ではほとんど見られないという特徴を持つ。この事は *MLL-AF4* タンパク質には特異的な性質がある事を示唆している。我々は白血病を起こす *MLL-AF4* タンパク質が多く存在する細胞で未知の分解経路を介して特異的に分解される事を見いだした。実際に *MLL-AF4* はこの分解経路が活性化されている骨髄系の細胞では白血病を引き起こさない。従ってリンパ性の *MLL-AF4* 白血病細胞中で、何らかの化合物／タンパク質によってこの分解経路を活性化する事ができれば、*MLL-AF4* 白血病を根絶できる可能性を示唆している。本研究で我々は、この **AF4** 特異的な分解経路の全容を明らかにする事を目指す。我々は平成 23 年度に **AF4** を不安定化する最小ドメイン(A4DD:AF4 destabilization domain)を 130 残基程にまで限定した。平成 24 年度にはこの不安定化ドメインに結合するタンパク質の同定に取り組んだ。我々はこの未知のタンパク質分解経路を明らかにすることで、長期的には人為的にこの分解経路を活性化するような薬剤を創製することを目指す。既に細胞が持っているタンパク質分解経路を利用してがん遺伝子産物を特異的に破壊する事で、副作用が少ない新規治療法を開発できる可能性がある。この **AF4** 分解経路はリンパ系以外の多くの組織で既に活性化されており、薬剤によって人為的に活性化しても他の組織に対する細胞障害性は少ないと予想される

。

A. 研究目的

AF4不安定化ドメインに結合するタンパク質を同定する（平成24年度）

乳児の急性リンパ性白血病の約3分の2がMLLキメラ遺伝子によって引き起こされ、その内80%がAF4を融合パートナーとするMLL-AF4によるものである。この白血病は予後が悪く新規の治療法の開発が切望されている。MLLキメラによる白血病は骨髄性、リンパ性、そして両者の混合型である場合があり、MLL(Mixed Lineage Leukemia)という名前の由来になっている。しかし、MLL-AF4は、なぜかリンパ性の白血病を引き起こすが骨髄性の白血病はほとんど起こさない。我々はAF4ファミリータンパクであるAF5q31とMLLのキメラ(MLL-AF5q31)とMLL-AF4の相違点を調べたところ、「MLL-AF5q31は骨髄性の造血細胞を不死化する活性を持つが、MLL-AF4にはその活性が無い事」や、「MLL-AF4タンパク質は様々な細胞で不安定化されており、未知のメカニズムで分解されてしまう事」を見いだした。これらの知見から「MLL-AF4は骨髄性の細胞ではAF4特異的な分解経路によって分解されてしまうために機能しないが、リンパ性の細胞ではその分解経路が働かないために白血病を引き起こす」と考えられる。もし細胞に元からMLL-AF4を分解する装置があるのならば、その装置をリンパ性白血病細胞において人為的に活性化することでMLL-AF4白血病細胞を根絶することができるかも知れない。

研究目標:AF4特異的な分解メカニズムを解明し、 リンパ系で分解経路を活性化する分子標的薬を創製する

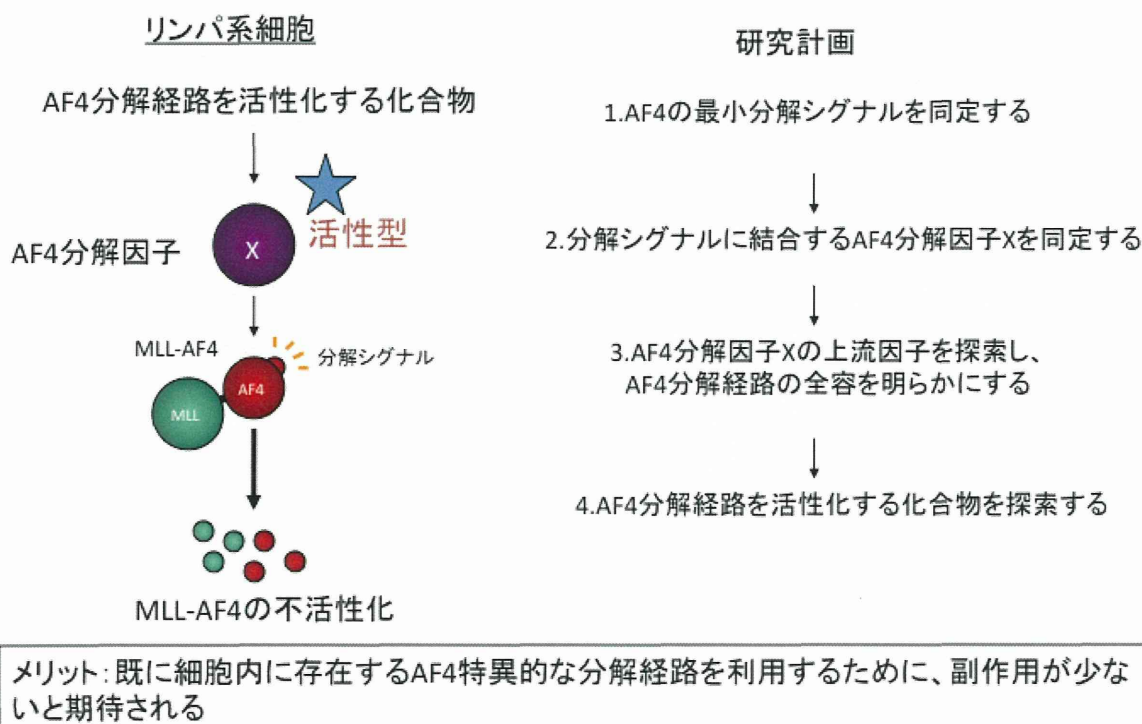


図1 研究計画の概要 長期的にはリンパ系でMLL-AF4を不安定化させ、不活性化させる化合物の同定を目指し、短期的にはAF4の分解経路の解明に取り組む。

このAF4特異的な分解経路はまだ明らかにされておらず、我々はその作用機序を調べる事で新規の分子標的治療法を開発するための分子基盤を見いだしたいと考えている（図1）。我々は平成23年度中にAF4には存在するがAF5q31には存在しない不安定化ドメインの同定を行った。平成24年度にはAF4特異的な不安定化ドメインに結合するタンパク質の同定に取り組んだ。

B. 研究方法

AF4不安定化ドメインに結合するタンパク質を同定する（平成24年度）

我々は難治性の乳児白血病を引き起こすMLL-AF4タンパク質が多く組織・細胞でAF4特異的な分解経路によって分解される事を見いだした。また、様々なMLL-AF4の変異体を作成し、そのタンパク質の発現や骨髄前駆細胞を不死化する活性を調べる事で、まずAF4の不安定化に必要な最小ドメインを決定した。この不安定化ドメインとFLAG tagをつけたGAL4 DNA binding domainの融合タンパクを発現するベクターを作製し、293T細胞に一過性に発現させ、抗FLAG抗体を用いたaffinity精製にて結合するタンパク質を精製する。その後、精製物を質量分析装置にて解析し、結合タンパク質を同定する。293T細胞は造血系の細胞ではないが、我々はこの細胞株においてもAF4がAF5q31に比べて不安定化されている事を示す予備的実験結果を得ており、目的とするAF4不安定化タンパク質の同定が出来ると考えた。

C. 研究結果

我々は、平成23年度中に同定したAF4特異的な分解に必要な130残基程の最小ドメイン構造（A4DD）に特異的に結合するタンパク質の同定を試みた。我々はまず、FLAGタグを持ったGAL4 DNA binding domainにAF4のC末端部分を融合させたFLAG-GAL4-AF4-4タンパク質の発現ベクターと及びそのAFDDをAF5q31の構造で置き換えた安定化変異体であるFLAG-GAL4-AF4-4Bcの発現ベクターを構築した。293T細胞にFLAG-GAL4-AF4-4タンパク質及びFLAG-GAL4-AF4-4Bcタンパク質を一過性に発現させ、抗FLAG抗体を用いたaffinity精製を行った。この際我々はまず、293T細胞を段階的な抽出によって三つの分画に分け、そのうちの二つの分画からaffinity精製を行った。三つの分画とは、可溶性タンパク質からなる可溶性画分、クロマチン構成因子からなるクロマチン画分、残りのタンパク質からなる難溶性画分であり、我々は可溶性画分とクロマチン画分から、それぞれ精製を行った（図2）。

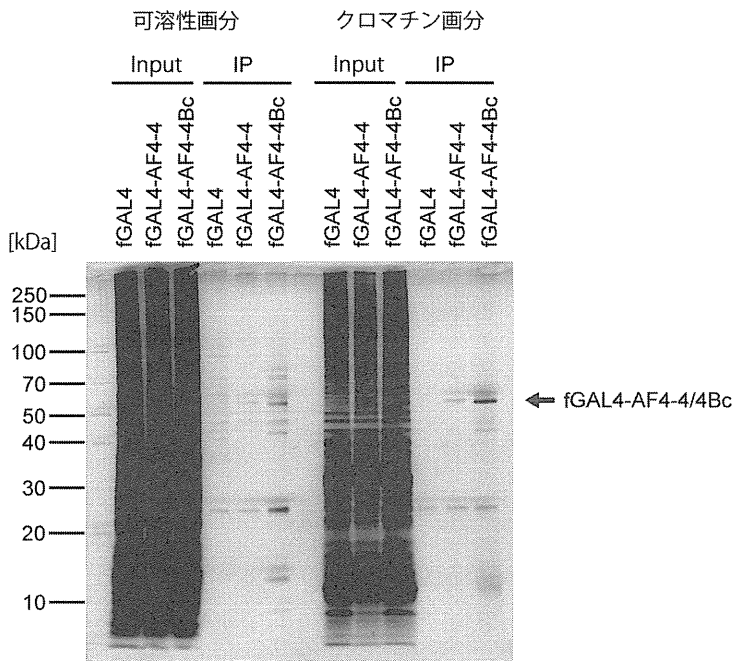


図2 AF4 不安定化ドメインに結合するタンパク質の同定
293T 細胞に FLAG-GAL4, FLAG-GAL4-AF4-4, FLAG-GAL4-AF4-4Bc を一過性に発現させ、可溶性画分とクロマチン画分に分画した後に抗 FLAG 抗体を用いてそれぞれのタンパク質とその結合タンパク質を精製した。精製物は SDS-PAGE にて分離後銀染色にてタンパク質を可視化した。

得られた精製物の質量分析を行ったところ、様々なタンパク質が同定された。可溶性画分において AF4 と結合するが安定型の AF4-4Bc 変異体とは結合しないタンパク質は LIG3, PNKP, TOP2B, XRCC1, RPA1, LEMD2, DHX30 などであった (表 1)。しかし、これらのタンパク質の多くは DNA repair や DNA metabolism に関するものであり、タンパク質分解に関与するとは考え難いものばかりだった。一方で、AF4-4Bc には結合して AF4-4 には結合しないタンパク質として、USP9X, TMEM43, CSNK2A2, AGPS が同定された (表 2)。クロマチン画分においては AF4-4 特異的な結合タンパク質はなく、AF4-4Bc 特異的な結合タンパク質として、HADHA, RPL7, DSG1, NCL, HISTH1C/E, AZGP1, USP9X, PPM1G, TOMM10A, HNRNPR, RPL13, SEC63 など同定された (表 3)。同定した AF4 特異的結合因子の中で、タンパク質の分解に関わると予想されるものはなかった。一方、AF4-4Bc に結合するタンパク質の中にはタンパク質の安定性に関与すると考えられるものが含まれていた。可溶性画分において、HSP4A という分子シャペロンが AF4-4Bc に結合するが、AF4-4 には結合しない (表 2)。この事は分子シャペロンに認識され易いかどうかの違いがタンパク質の安定性の違いを生み出している可能性を示唆している。また、AF4-4Bc 特異的に結合するタンパク質の一つである UPS9X が脱ユビキチン活性を持つ事から、AF4-4 が分解され易く、AF4-4Bc が分解されにくいのは UPS9X が AF5q31 特異的に結合し、ユビキチン経路を介した分解を抑制している事によって決定されている可能性が考えられた。我々は、USP9X が実際に AF4-4Bc 特異的に結合するかどうかは USP9X 特異的な抗体を用いて検証した。その結果、確かに USP9X が可溶性画分でもクロマチン画分でも AF4-4Bc 特異的に結合している事が確認された (図 3)。

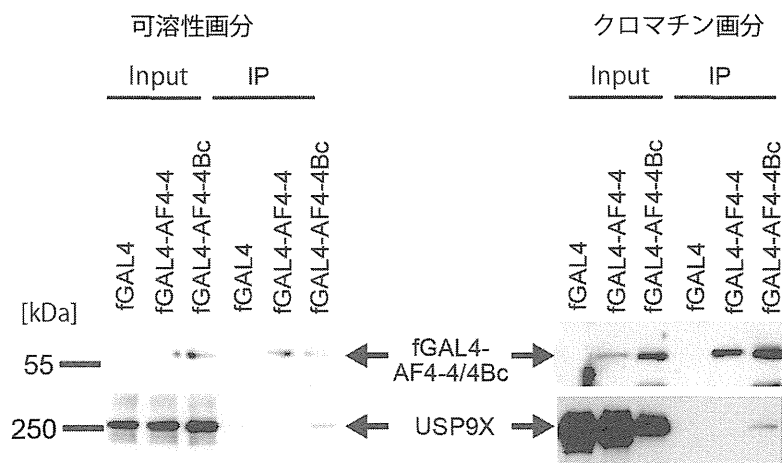


図3 USP9X が AF5q31 の A4DD 相当部分に特異的に結合する。
 図2にて精製した蛋白質を SDS-PAGE にて分離後 Immunoblotting にて可視化した。AF5q31 の A4DD 部分に相当する構造を持つ FLAG-GAL4-4Bc 蛋白質に特異的に USP9X が共沈してくる。

D. 考察

残念ながら今回の実験では、当初想定したAF4の不安定化モチーフに結合して特異的に分解するタンパク質は同定することができなかった。一方で、AF5q31のA4DD相当部分に結合してタンパク質分解を抑制する働きをもつ結合因子が同定された。一つの可能性として、A4DDを認識して特異的に分解するタンパク質は存在せず、モチーフの構造そのものが、正常な折りたたみがされにくいものであり、多くの細胞では成熟したタンパク質として産生されずに、分解されているという事が考えられる。その場合、リンパ系の細胞で特異的に発現する分子シャペロンのようなものが機能的なAF4の産生を可能にしているのかもしれない。今後はその可能性を視野に入れて、「骨髄系で特異的にAF4を分解する因子」と「リンパ系で特異的にAF4の折りたたみを助けるシャペロン」の両方を探索していきたい。

E. 結論

AF4特異的な分解経路を同定する目的で、AF4の不安定化モチーフに特異的に結合するタンパク質を探索した結果、幾つかのタンパク質が同定されたが、それらの多くはDNA repairやDNA metabolismに関するものが多く、タンパク質分解に関与する事がわかっているものは含まれていなかった。一方、不安定化されないAF5q31のA4DD相当部分に結合するタンパク質が同定された。そのうちの一つはUSP9Xであり、この分子はタンパク質分解の目印であるユビキチンを切断する活性を持つ事から、タンパク質分解を抑制する働きがあると考えられる。これらの結果から、AF4の不安定化はA4DD構造の折りたたまれ難さに起因するものであり、AF4以外のAF4 familyタンパク質は同様の構造を持つ一方で、USP9Xなどの特定のタンパク質と相互作用する事で分解から逃れている可能性が示唆された。AF4がリンパ系の細胞で機能するためには、リンパ系においてAF4を安定化する因子が存在するのかもしれない。今後はリンパ系の細胞で特異的にA4DDと作用して安定化する因子の探索を進めるべき

である事がわかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

「MLL 白血病と転写制御」三重先端がんフォーラム(招待講演)、平成24年4月7日、三重大学医学部

「Molecular mechanism of MLL fusion-dependent transformation」2013 USA-Japan Science Conference (日米造血器腫瘍セミナー)(招待講演)平成25年3月24-26日、Makena Beach and Golf Resort, Maui, Hawaii、USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

表1 可溶性画分でAF4-4特異的に結合する因子 (数値は質量分析におけるスコアを示す)

| Gene Symbol/Sample Name | CSK Vec | CSK AF4-4 | CSK AF4-4Bc |
|-------------------------|---------|-----------|-------------|
| TOP2A | 0 | 61.34 | 2.98 |
| LIG3 | 0 | 32.57 | 6.85 |
| PARP1 | 0 | 18.11 | 2.17 |
| PNKP | 0 | 15.16 | 0 |
| TOP2B | 0 | 15.01 | 0 |
| XRCC5 | 0.14 | 12.95 | 3.55 |
| XRCC1 | 0 | 12.07 | 2.89 |
| RPA1 | 0 | 11.68 | 2.12 |
| LEMD2 | 0 | 11.28 | 2.12 |
| DHX30 | 0 | 8.14 | 0 |
| SLC25A13 | 0.09 | 5.75 | 0 |
| TTF2 | 0 | 5.42 | 0 |
| PEO1 | 0 | 4.93 | 0 |
| SMC4 | 0 | 4.83 | 0 |
| HNRNPA1 | 0 | 4.80 | 0 |
| SATB1 | 0 | 4.56 | 0 |
| LMNA | 0 | 4.11 | 0 |
| PABPC1 | 0 | 4.10 | 0 |
| LMNB1 | 0 | 4.05 | 0.89 |

表2 可溶性画分でAF4-4Bc特異的に結合する因子 (数値は質量分析におけるスコアを示す)

| Gene Symbol/Sample Name | CSK Vec | CSK AF4-4 | CSK AF4-4Bc |
|-------------------------|---------|-----------|-------------|
| USP9X | 0 | 0 | 25.71 |
| HADHB | 0 | 2.11 | 16.08 |
| WDR18 | 0 | 4.56 | 16.00 |
| TMEM43 | 0 | 2.86 | 15.92 |
| CSNK2A2 | 1.62 | 0 | 13.97 |
| TUBA1A | 0 | 0 | 13.46 |
| HSPA4 | 0.81 | 0 | 12.21 |
| TEX10 | 0 | 2.00 | 10.68 |
| AGPS | 0 | 0 | 10.54 |
| AFF4 | 0 | 0 | 8.47 |
| ACTA1 | 0 | 0 | 7.66 |
| HK1 | 0 | 0.24 | 7.32 |
| TRIM26 | 0 | 0 | 7.15 |
| ACSL3 | 0 | 0 | 7.08 |
| HSPH1 | 0.94 | 0.71 | 6.82 |
| BSG | 0 | 0 | 5.86 |
| APMAP | 0 | 0 | 5.48 |
| SET | 0 | 0 | 4.69 |
| SENP3 | 0 | 0.63 | 4.20 |
| APLP2 | 0 | 0.07 | 4.09 |
| OCIAD1 | 0 | 0.09 | 4.07 |
| MSN | 0 | 0 | 4.04 |
| ABCD3 | 0 | 0 | 4.00 |
| MOSC1 | 0.26 | 0 | 4.00 |

表3 クロマチン画分でAF4-4Bc特異的に結合する因子（数値は質量分析におけるスコアを示す）

| Gene Symbol/Sample Name | NUC Vec | NUC AF4-4 | NUC AF4-4Bc |
|-------------------------|---------|-----------|-------------|
| HNRNPM | 0 | 3.55 | 48.25 |
| PARP1 | 0.30 | 3.90 | 36.34 |
| HADHA | 0 | 1.38 | 29.09 |
| AFF4 | 0 | 8.09 | 26.45 |
| DDX21 | 0 | 0 | 16.26 |
| RPL7 | 0 | 0 | 15.57 |
| TOP2A | 0 | 0 | 15.44 |
| DSG1 | 0.18 | 0 | 15.34 |
| NCL | 0 | 0 | 14.88 |
| POR | 0 | 1.62 | 14.37 |
| HIST1H1E | 0 | 0 | 12.03 |
| AZGP1 | 1.47 | 0.25 | 11.85 |
| PPM1G | 0 | 0 | 10.57 |
| TOMM70A | 0 | 0 | 10.50 |
| TUBA1A | 0 | 0 | 9.57 |
| HNRNPR | 0 | 0 | 9.56 |
| WDR18 | 0 | 0 | 9.42 |
| RPL13 | 0 | 0 | 9.35 |
| CENPB | 0 | 0.40 | 9.11 |
| ANP32B | 0 | 0 | 8.98 |
| PELP1 | 0 | 0 | 8.58 |
| SEC63 | 0 | 0 | 8.27 |
| RCC1 | 0 | 0.28 | 8.22 |
| TOP1 | 0 | 0 | 8.22 |
| RBM14 | 0 | 0 | 8.16 |
| SDHA | 0 | 0 | 8.06 |
| RPS6 | 0 | 0 | 8.00 |
| DDB1 | 0 | 0 | 7.76 |
| CKAP4 | 0 | 1.21 | 7.66 |
| SRPR | 0 | 0 | 7.63 |
| H2AFY | 0 | 0 | 7.60 |
| BSG | 0 | 0.51 | 7.45 |
| AGPS | 0 | 0 | 7.45 |
| SLC25A11 | 0 | 0 | 7.21 |
| ILF3 | 0 | 0.17 | 7.12 |
| IGF2BP1 | 0 | 0 | 6.61 |
| SND1 | 0 | 0 | 6.50 |
| CDC73 | 0 | 0 | 6.38 |

| | | | |
|----------|---|------|------|
| RPS8 | 0 | 0 | 6.25 |
| GNAI3 | 0 | 0 | 6.05 |
| USP9X | 0 | 0 | 6.01 |
| HOXD13 | 0 | 0 | 6.01 |
| TMPO | 0 | 0 | 6.00 |
| SET | 0 | 0 | 6.00 |
| TBL2 | 0 | 0 | 6.00 |
| RPL7A | 0 | 0 | 5.92 |
| SLC25A13 | 0 | 0.22 | 5.82 |
| RPS3A | 0 | 0 | 5.76 |
| RPL3 | 0 | 0 | 5.13 |
| VAPB | 0 | 0 | 4.80 |
| RPL6 | 0 | 0 | 4.44 |
| PGAM5 | 0 | 0 | 4.22 |
| ZNF384 | 0 | 0 | 4.15 |
| PAF1 | 0 | 0 | 4.06 |
| SLC25A4 | 0 | 0 | 4.04 |
| CADM1 | 0 | 0 | 4.03 |
| LAMP1 | 0 | 0.50 | 4.00 |
| ANP32A | 0 | 0 | 4.00 |
| LMNB2 | 0 | 0 | 4.00 |
| MTDH | 0 | 0 | 4.00 |
| RPL8 | 0 | 0 | 4.00 |
| STXBP3 | 0 | 0 | 4.00 |
| CASP14 | 0 | 0 | 4.00 |

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

特になし

雑誌

