



Title	Roles of tyrosine residues 845, 892 and 922 in constitutive activation of murine FLT3 kinase domain mutant
Author(s)	石河, 純
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46240">https://hdl.handle.net/11094/46240</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	石河 純
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第19768号
学位授与年月日	平成17年8月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Roles of tyrosine residues 845, 892 and 922 in constitutive activation of murine FLT3 kinase domain mutant (FLT3 キナーゼ領域変異の恒常的活性化における Tyr845、Tyr892、Tyr922 の重要性)
論文審査委員	(主査) 教授 金倉 譲  (副査) 教授 平野 俊夫 教授 辻本 賀英

## 論文内容の要旨

## [目的]

レセプター型チロシンキナーゼ FLT3 のキナーゼ領域変異は、activation loop 内に位置する Asp835 の点突然変異であり、急性骨髓性白血病(AML)の約7%に認められる。この変異は FLT3 の恒常的活性化を生じ AML の発症・悪性化に関与すると共に、最近開発されている FLT3 阻害剤に対して抵抗性を示す。今回我々は、マウス FLT3 のキナーゼ領域変異体を用い、その活性化機構の解明を試みた。

## [方法ならびに成績]

ヒト FLT3 のキナーゼ領域変異体に相当するマウス FLT3 のキナーゼ領域変異体 (mFLT3<sup>Asp838Val</sup>) を作製した。細胞内領域のチロシン残基は、レセプターの活性化や下流のシグナルに重要な役割を担っている。そこで特に mFLT3<sup>Asp838Val</sup> のキナーゼ活性化に関与するチロシン残基を同定するために、細胞内領域に存在する全22個のチロシン残基(Tyr)を、それぞれフェニルアラニン(Phe)に置換した22種の変異体を作製し(Tyr-Phe変異体)、以下の解析を行った。まずこれらの変異体を、Plat-E細胞にリン酸カルシウム法を用いて一過性に発現させ、ウェスタンプロット(WB)法により FLT3 のリン酸化を検討すると 796、845、892、922番目の Tyr-Phe 変異体 (それぞれ Tyr796Phe、Tyr845Phe、Tyr892Phe、Tyr922Phe)において、FLT3 のチロシンリン酸化は著明に低下していた。次に、これら4種類の変異体を IL-3 依存性細胞株 Ba/F3 に遺伝子導入後、安定発現株を樹立し、これらを用いて下記の検討を行った。まず Tyr592 が自己リン酸化された活性化 FLT3 を認識する抗体を用いて WB 法による解析を行うと、Tyr845Phe、Tyr892Phe、Tyr922Phe において FLT3 の活性化が阻害されることが明らかとなった。これら3種の変異体において、下流シグナルである Erk1/2、STAT3/5 の活性化を活性化特異抗体による WB 法にて評価すると、FLT3 のキナーゼ活性低下に対応して、これらの下流シグナルの活性化が低下していた。更にリアルタイム RT-PCR の解析において STAT3/5 の標的遺伝子である Pim-2 遺伝子の発現低下が認められた。細胞増殖解析では Tyr845Phe、Tyr892Phe、Tyr922Phe の変異により mFLT3<sup>Asp838Val</sup> が有する IL-3 非依存性細胞増殖が低下していた。DNA ヒストグラムを用いた apoptosis 解析では、Tyr892Phe、Tyr922Phe 変異において mFLT3<sup>Asp838Val</sup> の IL-3 非存在下での生存能が障害され apoptosis が誘導された。以上より、Tyr845、Tyr892、Tyr922 は mFLT3<sup>Asp838Val</sup> の

恒常的活性化に必須のチロシン残基であり、その Phe 変異により下流のシグナル伝達や、細胞増殖が著明に阻害されることが明らかとなった。一方、野生型 mFLT3 のリガンド依存性活性化および抗アポトーシス活性は Tyr845Phe、Tyr892Phe、Tyr922Phe 変異、特に後二者では部分的にしか阻害されなかつた。また Tyr845Phe、Tyr892Phe、Tyr922Phe 変異は、mFLT3 の他の恒常的活性化変異である mFLT3-ITD、mFLT3<sup>Asp838Tyr</sup>、mFLT3<sup>Ile839Del</sup> の活性化も阻害し、Tyr845、Tyr892、Tyr922 は種々の活性化変異 mFLT3 に共通したキナーゼ活性制御領域であることが示唆された。

Tyr845Phe、Tyr892Phe、Tyr922Phe 変異による mFLT3<sup>Asp838Val</sup> 活性化の低下は、培養温度を 37°C から 33°C に低下させることで回復を認め、温度感受性を示した。次に変異 FLT3 蛋白の half life を評価した結果、mFLT3<sup>Asp838Val</sup> の half life は Tyr845Phe、Tyr892Phe、Tyr922Phe 変異を伴うことで短縮し、Tyr-Phe 置換により蛋白質としての不安定性が増すと考えられた。そこでレセプター型チロシンキナーゼの高次構造の安定化に重要なシャペロン蛋白が、Tyr-Phe 変異による mFLT3<sup>Asp838Val</sup> キナーゼ活性低下を改善できるかを検討した。Plat-E 細胞に変異 mFLT3<sup>Asp838Val</sup> と共にシャペロン蛋白である Hsp90 と Cdc37 を発現させると、mFLT3<sup>Asp838Val</sup> のキナーゼ活性は一部回復を認めた。また Ba/F3 細胞においても、変異 mFLT3<sup>Asp838Val</sup> に加えて Hsp90 と Cdc37 を共発現することで、下流シグナルである Erk1/2 の活性化と細胞増殖の回復が、特に Tyr845Phe において顕著に認められた。以上より Tyr845Phe、Tyr892Phe、Tyr922Phe は mFLT3<sup>Asp838Val</sup> の高次構造に不安定性を生じそのキナーゼ活性の阻害を生じている可能性が示唆された。

#### [総括]

FLT3 キナーゼ領域変異  $\text{FLT3}^{\text{Asp838Val}}$  において、Tyr845、Tyr892、Tyr922 が恒常的活性化に必須であり、変異  $\text{FLT3}$  の腫瘍原性に重要である可能性が示唆された。また、Tyr-Phe 変異体の解析から Tyr845、Tyr892、Tyr922 は  $\text{FLT3}^{\text{Asp838Val}}$  の高次構造安定化に関与していると考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

レセプター型チロシンキナーゼ  $\text{FLT3}$  のキナーゼ領域変異体は恒常的活性化をきたし、急性骨髓性白血病の発症や、その薬物治療に対する抵抗性の原因となる。本論文では、 $\text{FLT3}$  キナーゼ領域変異体の恒常的活性化に重要な、3箇所の細胞内チロシン残基の同定に成功した。これらのチロシン残基 (Tyr) がフェニルアラニン (Phe) へ置換されることで、 $\text{FLT3}$  のキナーゼ活性自身が阻害され、下流シグナル伝達、細胞生存、細胞増殖の全てが阻害された。これらの阻害現象は、キナーゼ領域変異以外の恒常的活性化変異  $\text{FLT3}$  (ITD、Ile<sup>839</sup> 欠失変異など) でも見られたが、野生型  $\text{FLT3}$  のリガンド依存性活性化に対しては見られなかつた。また、これら3箇所の Tyr-Phe 変異  $\text{FLT3}$  が温度感受性の性質を示すことを示し、Tyr-Phe 変異による活性低下が  $\text{FLT3}$  蛋白質の構造の不安定性によるものではないかと推察した。その証明のため、シャペロン蛋白を共発現させたところ、 $\text{FLT3}$  変異体の低下した活性、及び細胞増殖能を回復させることに成功した。急性白血病の原因となるキナーゼ領域変異  $\text{FLT3}$  の恒常的活性化機構を解明し、 $\text{FLT3}$  を標的とした分子標的療法の可能性を示した本論文は、学位論文に値する。