The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	https://hdl.handle.net/11094/46240
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【19】

氏　　名	石　河　　純（いし こ じゅん）
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、急性骨髄性白血病（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（$mFLT3^{Asp838Val}$）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 $mFLT3^{Asp838Val}$ 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、ウェスタンブロット（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 $mFLT3^{Asp838Val}$ 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 $mFLT3^{Asp838Val}$ 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 $mFLT3^{Asp838Val}$ 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った。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、$mFLT3^{Asp838Tyr}$、$mFLT3^{Ile839Del}$ 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 $mFLT3^{Asp838Val}$ 活性化の低下は、培養温度を 37℃から 33℃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、$mFLT3^{Asp838Val}$ 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 $mFLT3^{Asp838Val}$ 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 $mFLT3^{Asp838Val}$ と共にシャペロン蛋白である Hsp90 と Cdc37 を発現させると、$mFLT3^{Asp838Val}$ 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 $mFLT3^{Asp838Val}$ に加えて Hsp90 と Cdc37 を共発現させることで、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 $mFLT3^{Asp838Val}$ 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 $FLT3^{Asp838Val}$ において、Tyr845、Tyr892、Tyr922 が恒常的活性化に必須であり、変異 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 $FLT3^{Asp838Val}$ 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 FLT3 のキナーゼ領域変異体は恒常的活性化をきたし、急性骨髄性白血病の発症や、その薬物治療に対する抵抗性の原因となる。本論文では、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、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 FLT3（ITD、Ile^{839} 欠失変異など）でも見られたが、野生型 FLT3 のリガンド依存性活性化に対しては見られなかった。また、これら 3 箇所の Tyr-Phe 変異 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 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、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 FLT3 の恒常的活性化機構を解明し、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。