

論文の内容の要旨

論文題目 Cloning and characterization of the novel chimeric gene
TEL/PTPRR in acute myelogenous leukemia with *inv(12)(p13q13)*.

和訳 *inv(12)(p13q13)*型急性骨髄性白血病における新規融合遺伝子
TEL/PTPRR のクローニングおよび機能解析.

指導教員 小川 誠司 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 中村 文彦

《要旨》

12p13 型染色体転座は、白血病および骨髄異形成症候群において高頻度に出現する転座の一つであり、12p13 上に存在する *TEL(ETV6)* 遺伝子が種々のチロシンキナーゼ遺伝子やホメオボックス遺伝子等と融合遺伝子を形成する。*TEL* は *ETS* ファミリーに属する転写因子であり、2つの機能ドメインを有する。すなわち、C末端の *ETS* ドメインは特異的 DNA 配列(*ETS binding site; EBS*)への結合を介して転写調節を行い、N末端の *HLH (helix-loop-helix)* ドメインはホモ二量体あるいはヘテロ二量体形成を担う。また、*TEL* は転写抑制因子として機能すると考えられており、標的遺伝子として *Bcl-X_L*, *Fli-1*, *Stromelysin-1*, *Id-1* が知られている。

本研究では、inv(12)(p13q13)を唯一の染色体異常として有する急性骨髄性白血病（FAB 分類：M2）の骨髄単核球から、新規融合遺伝子 *TEL/protein tyrosine phosphatase receptor type R (PTPRR)* をクローニングした。PTPRR は主として脳，子宮，小腸に発現している受容体型チロシンホスファターゼであるが、*TEL* 関連融合遺伝子の相手遺伝子としてホスファターゼ遺伝子を同定したのは、本研究が最初である。

上述の染色体転座が 12p13 に絡んでいることから、*TEL* 遺伝子が再構成を受けている可能性を考慮した。まず、*TEL* 遺伝子に対するプローブを用いて fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を行ったところ、同遺伝子のイントロン 5 あるいは 6 に切断点が存在することが判明した。次に、骨髄単核球から抽出した cDNA に対して 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法を行い、*TEL* のエクソン 1 に対するプライマーと 3'末端のアダプタープライマーを用いて polymerase chain reaction (PCR) 法により未知の融合遺伝子を増幅した。塩基配列を解析した結果、*TEL* 遺伝子のエクソン 4 と *PTPRR* 遺伝子のエクソン 7 が融合していることが判明した。患者骨髄単核球より抽出した mRNA を用いて reverse transcriptase-PCR 法により *TEL/PTPRR* を増幅すると、異なるサイズの PCR 産物を検出することから、同キメラ遺伝子は alternative splicing により複数の cDNA isoform を形成すると考えた。塩基配列を解析した結果、10 種類の isoform を同定したが、*PTPRR* 遺伝子のエクソン 7 および 8 を欠いた isoform のみが in-frame であり、*TEL* の N 末端領域と *PTPRR* の C 末端領域が融合したキメラ蛋白(*TEL/PTPRR*)をコードすると推定された。残りの 9 種類は、frameshift により *TEL* の N 末端領域のみを発現すると考えられた。骨髄

単核球では、TEL のエクソン 1~4 のみをコードする短縮型 (*tTEL*)および TEL/PTPRR が優位に発現しており、両者の機能解析を通じて inv(12)型白血病の発症機構の解明を試みた。

EBS がタンデムに配置されたレポータープラスミドを一過性に HeLa 細胞に導入してルシフェラーゼアッセイを行ったところ、野生型 TEL は既報どおり EBS 特異的かつ用量依存性の転写抑制機能を示した。一方、*tTEL* と TEL/PTPRR は ETS ドメインを欠いており、過剰発現させてもルシフェラーゼ活性は変化しなかった。次に野生型 TEL 発現下で *tTEL* あるいは TEL/PTPRR を共発現させたところ、野生型 TEL による転写抑制能は dominant-negative に阻害された。この dominant-negative 効果の機序を解明すべく、さらに以下の解析を行った。

NIH3T3 細胞に野生型 TEL, *tTEL* あるいは TEL/PTPRR を過剰発現させると、野生型 TEL が核に局在するのに対して、*tTEL* と TEL/PTPRR は細胞質優位に存在した。次に、野生型 TEL を *tTEL* あるいは TEL/PTPRR と共発現させると、野生型 TEL は核と細胞質に均等に分布した。これは、新規に産生された野生型 TEL の核内移行を *tTEL* と TEL/PTPRR が阻害した結果であると解釈される。また、野生型 TEL は Lys⁹⁹ で SUMO-1 による翻訳後修飾を受け、CRM1 依存性核外輸送の標的となることが既に報告されているが、本研究では COS-7 細胞での過剰発現系を用いて、*tTEL* と TEL/PTPRR も SUMO-1 により修飾されることを確認した。さらに、*tTEL* と TEL/PTPRR は HLH 領域を有し、野生型 TEL と *in vivo* でヘテロ二量体を形成することが免疫沈降法で示された。以上の結果を総合すると、*tTEL* と TEL/PTPRR は野生型 TEL との直接結合を介して核内移行の

阻害および核外輸送の調節を行うことが推定される。Inv(12)陽性白血病細胞で同様の現象がみられるかを検討すべく、核と細胞質に画分された蛋白抽出液を調製して内在性 TEL の局在を評価した。その結果、inv(12)陰性細胞では核優位に局在したのに対して、inv(12)陽性白血病細胞では細胞質のみに存在した。

放射能ラベルした EBS プロブを用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、野生型 TEL は既報どおり EBS に結合したが、tTEL と TEL/PTPRR は結合しなかった。次に、野生型 TEL の蛋白抽出液に tTEL あるいは TEL/PTPRR の蛋白抽出液を混ぜてアッセイを行ったところ、TEL/PTPRR の場合のみ野生型 TEL の EBS 結合能が阻害された。

Inv(12)型白血病で産生されるこれらの異常蛋白質が、TEL の標的遺伝子の発現に対しても dominant-negative 効果を発揮するか検討すべく、NIH3T3 細胞に野生型 TEL を恒常的に発現させ、内在性 Bcl-X_L 蛋白量をウェスタンブロット解析にて評価した。野生型 TEL の恒常発現株は mock と比較して Bcl-X_L が低下しているが、tTEL あるいは TEL/PTPRR を一過性に過剰発現させると Bcl-X_L が mock と同レベルまで回復した。このことから、野生型 TEL による Bcl-X_L 遺伝子の転写抑制機能に対して、tTEL と TEL/PTPRR が dominant-negative 効果が示すことが証明された。

TEL/PTPRR キメラ蛋白の PTPRR 部分はホスファターゼドメインのほぼ全長を有しており、酵素活性が残存している可能性が考えられる。p-NPP を基質として *in vitro* でホスファターゼアッセイを行ったところ、陽性コントロールの野生型 PTPRR は酵素活性を認めたが、TEL/PTPRR はホスファターゼ活性を示さなかった。

最後に、tTEL あるいは TEL/PTPRR を恒常的に過剰発現する UT7/GM 細胞株を樹立して、その生物学的機能を検討した。UT7/GM 細胞は急性骨髄性白血病 (M7) 由来の細胞株であり、granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) 依存性に増殖する。GM-CSF 存在下で、tTEL 発現株と TEL/PTPRR 発現株の増殖速度は、mock よりも若干速かった。次に、GM-CSF 非存在下で培養すると、mock と tTEL 発現株は死滅したが、TEL/PTPRR 恒常発現株は 60 日間の観察期間を超えても緩徐に増殖した。この現象を説明すべく、種々の細胞内情報伝達経路を担う蛋白質のリン酸化レベルを評価した。その結果、tTEL および TEL/PTPRR 過剰発現株では、増殖因子の非存在下でも STAT3 のリン酸化が保たれていることが判明した。この結果は、tTEL と TEL/PTPRR が STAT3 を介して JAK/STAT 経路を活性化することにより、細胞増殖に有利に働くことを示唆する。しかし、tTEL 恒常発現株は増殖因子枯渇により死滅することを鑑みると、TEL/PTPRR はさらに別の情報伝達経路を活性化して GM-CSF 非依存性増殖を獲得する可能性が高い。

以上、本研究では inv(12)(p13q13)陽性の急性白血病より新規融合遺伝子 TEL/PTPRR をクローニングして、その結果産生される tTEL と TEL/PTPRR の機能解析を行った。これらの異常蛋白質は野生型 TEL の癌抑制機能に対して dominant-negative に作用するだけでなく、STAT3 を介した JAK/STAT シグナル伝達経路を活性化させることにより、白血病発症に寄与すると考えられた。