

## 論文の内容の要旨

論文題目 **Study of leukemogenic activity of a gain-of-function mutant of IL-7 receptor  $\alpha$  chain**

(IL7 受容体  $\alpha$  鎖の機能獲得型変異体による白血病化の解析)

氏名 横山 和明

IL7はTリンパ球の生存、分化、増殖因子である。IL7のシグナルを細胞内に伝えるインターロイキン7受容体(IL7R)は $\alpha$ 鎖と共通 $\gamma$ 鎖( $\gamma$ c鎖)のヘテロ二量体である。IL7と結合することによって $\gamma$ c鎖と会合するJak3、次いで $\alpha$ 鎖と会合するJak1が活性化を受け、それぞれ下流の経路が活性化される。

T細胞性急性リンパ芽急性白血病(T-ALL)は、T細胞の形質を有する未熟なリンパ芽球が増殖する比較的稀な白血病の一病型である。標準的治療により、その半数以上に治癒が期待できる。しかし、寛解導入療法不応例や再発・再燃例が依然多く、それらの例の予後は極めて不良であり、より有効な分子標的薬等の新薬の開発が切望されている。

これまでの報告から、IL7シグナルはT細胞の初期分化、支持因子としてT細胞発生・分化・増殖に深く関与する一方で、その調節異常は、T-ALL細胞の生存・増殖の異常としてT-ALLの分子病態にも関与する可能性があると考えられた。

そこでIL7 $\alpha$ 鎖のうち、膜貫通領域に焦点を当て、ヒトT-ALL細胞株16種類、非T-ALL造血器腫瘍細胞株18種類についてダイレクトシーケンス法にて塩基配列の解析を行った。このうち、2種類のT-ALL細胞株においてアレルの片方に変異を見いだした(DND-41にシステインを含む4アミノ酸の膜貫通領域への挿入変異(INS)、及びMOLT-4にて細胞内領域の一塩基欠失変異(DEL))。

次に、これらの変異の機能的な意義をBa/F3細胞を用いてin vitroで検討した。まずレトロウイルスベクターを用いて変異型(INS、DEL)および野生型(WT)のIL7 $\alpha$ 鎖cDNAを導入

した Baf/3 細胞を (Ba/F-WT、INS、DEL と略す) を樹立した。その後、Ba/F-WT、INS、DEL 各細胞の IL3 非存在下における増殖能力を評価した。その結果、Ba/F-WT、DEL は IL3 非存在下では増殖できなかったのに対して、Ba/F-INS は IL3 非依存性の増殖を示した。

さらに IL7 に対する増殖応答性を WST-1 アッセイにより評価した。Ba/F/3 細胞は元来マウス  $\gamma c$  鎖を発現しているため、ヒト IL7 刺激時にヒト IL7 R $\alpha$  鎖とヘテロ二量体を形成してシグナルを伝えることが期待された。Ba/F-WT はヒト IL7 濃度依存性に増殖した。なお、Ba/F-DEL は Ba/F-WT における増殖飽和濃度の 100ng/mL でも増殖しなかった。以上より、INS は増殖誘導能に関して機能獲得型の変異であり、DEL は IL7 に反応して誘導される増殖能に関して機能喪失型変異であることが示唆された。二量体形成の可能性を検証する為、まず、Baf/3-WT・INS の細胞溶解液を用いて非還元条件下にてウェスタンブロット法を行ったところ、Baf/3-INS において  $\alpha$  鎖二量体を検出した。さらに、WT と INS の C 末端を FLAG、HA でそれぞれ標識した WT,INS の  $\alpha$  鎖を 293T 細胞に共発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、抗 HA 抗体でウェスタンブロットティングを行い、二量体の形成を確認した。

さらに、 $\alpha$  鎖二量体の形成により、IL7 R の増殖シグナルが誘導されるかを検討した。この目的のために EpoR の細胞外ドメインと IL7 R $\alpha$  鎖の膜貫通領域及び細胞内領域を融合させたキメラレセプター (E/7R) を発現する Baf/3-E/7R を作成した (EpoR はリガンドである Epo 結合後、ホモ二量体を形成して JAK-STAT 経路を活性化することが知られている)。この Ba/F3-E/7R 細胞の Epo に対する増殖応答性を調べたところ、Epo 刺激により、Ba/F-E/7R 細胞は Epo 濃度依存的に増殖した。

次に、INS $\alpha$  鎖によって活性化される Jak ファミリーキナーゼについて検討した。既に述べたように、IL7 R は  $\alpha$  鎖と  $\gamma c$  鎖のヘテロ二量体から構成される。リガンド結合後、 $\alpha$  鎖と会合するのは、Jak1 であることから、INS $\alpha$  鎖のホモ二量体のシグナル伝達に関与するのは  $\gamma$  鎖に会合する Jak3 ではなく、Jak1 であると予想された。そこで、INS $\alpha$  鎖を、Jak1 を発現するが Jak3 は発現しない 293 細胞に一過性に発現させ、Jak3 非依存性の Jak1 のリン酸化の有無を検討した。

その結果、293 細胞に INS $\alpha$  鎖を発現させると、内在性の Jak1 のチロシンリン酸化が誘導された。

さらに、INS $\alpha$  鎖の発現による Jak3 リン酸化の変化を検討した。WT、INS 各  $\alpha$  鎖と共に HA 標識ヒト Jak3 を 293 細胞に一過性に発現させ、細胞溶解液から抗 HA 抗体で免疫沈降後、抗リン酸化チロシン抗体でウェスタンブロッティングを行った。Jak3 のみを過剰発現させた場合でもチロシンリン酸化が観察されたが、WT および INS $\alpha$  鎖を共発現させてもリン酸化の増強は認めなかった。以上より、INS $\alpha$  鎖ホモ二量体により Jak1 は活性化されるが、Jak3 の活性化は有意ではないことが確認された。

最後に、Ba/F-WT、INS を用いて、WB を行い、IL3 非存在下での INS $\alpha$  鎖によって活性化される Jak1 下流のシグナルを検討した。INS $\alpha$  鎖により活性化されるシグナル伝達経路は、IL7/IL7R シグナル伝達経路とほぼ同じであることが示唆された。Ba/F-E/7R では、Epo 刺激により Stat5 のリン酸化が誘導された。

リガンド非依存性に二量体を形成する INS  $\alpha$  鎖が Jak3 ではなく Jak1 を活性化した事 (293 細胞の系)、Ba/F-INS において通常リガンド依存性に誘導されるべき既知の IL7R 下流のシグナルが恒常的に誘導されている本研究の結果を総括すると、IL7R 下流のシグナルにおける JAK1 の重要性が示唆される。

本研究で見いだした IL7R $\alpha$  鎖の 2 種類の変異(INS と DEL)はごく最近まで報告されていない新規の知見である。前者が位置する膜貫通領域に正の電荷を帯びたアルギニン、そしてジスルフィド結合を形成するシステインを含む 4 アミノ酸が挿入されることにより、膜貫通領域全体の電荷、高次構造を変化させている可能性が考えられた。一方、当研究により見出されたもう一つの変異 DEL は膜貫通領域近傍の細胞内領域の一塩基欠失変異であり、フレームシフトを生じて翻訳が早期に中断される。従って、殆どの細胞内領域を欠く構造の IL7R $\alpha$  鎖が産生される。この変異は Jak1 との会合に重要な box1 モチーフの変化を伴う機能喪失変異と考えられる。

本年度に Shochat ら、Zenatti らにより当研究と類似の研究が報告され、T-ALL の臨床検体の約 10%に同様の変異が存在する事が明らかになった。

これらの報告と当研究での実験結果を総括すると、**Jak1・Jak3** シグナル軸の破綻、特に今回見いだした恒常的に活性化した **Jak1** のシグナル軸が約 10%前後の T-ALL の病態形成、特に細胞の生存、増殖に関する遺伝子異常を担っている可能性が示唆された。