

京都大学	博士（医学）	氏名	蝶名林和久
論文題目	Direct binding of Grb2 has an important role in the development of myeloproliferative disease induced by ETV6/FLT3 (ETV6/FLT3 融合遺伝子による骨髄増殖性疾患の発症における Grb2 結合部位の重要性)		
(論文内容の要旨)			
<p>FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) は、血液腫瘍で最も高頻度に変異が見つかる遺伝子の一つである。最も頻度の高いFLT3 変異は、膜近傍領域のinternal tandem duplication (ITD) 変異で、急性骨髄性白血病 (AML) 症例の 20~30% で認められる。近年、好酸球増多を伴う骨髄性/リンパ性腫瘍 (MLN-eo) において、FLT3 と ETV6 (TEL) の融合遺伝子を伴う症例が報告されているが、詳細な腫瘍化機構は解明されていない。Tリンパ芽球性リンパ腫 (T-LBL) を合併した t(12;13)(p13;q12)転座陽性の骨髄増殖性腫瘍 (MPN) から、ETV6/FLT3 (E/F-1) を単離し、マウス骨髄移植モデルを用いて腫瘍化機構の解析を行った。E/F-1 を導入した骨髄細胞を移植した同系マウスは、全例 3-4 週間で、白血球増多、脾腫及び骨髄系細胞 (Mac-1+Gr-1+) の著名な増加を伴う骨髄増殖性疾患 (MPD) を発症した。MPD細胞を同系マウスに二次移植したところ、高率にT-LBL、MPDを発症し、腫瘍細胞にはドナーのMPD細胞と同一のプロウイルス組み込みを認めた。Growth factor receptor binding protein 2 (Grb2) は、種々の受容体チロシンキナーゼと結合するアダプタータンパク質であり、Grb2-associated binder 2 (Gab2) との結合を介して、正常FLT3 の生存シグナルに関与することが知られている。FLT3 のチロシン 768, 955 及び 968 はGrb2 結合部位であり、FLT3-ITD による細胞増殖及び生存に重要であるとされているが、in vivoでの腫瘍化における意義は明らかでない。そこで、ETV6/FLT3 によるMPD発症におけるGrb2 結合部位の役割を検討した。E/F-1 には、FLT3 領域の 3ヶ所に加えて、ETV6 領域に 2ヶ所 (Y314/354) のGrb2 結合部位候補がある。種々のGrb2 結合部位変異体を Ba/F3 細胞に導入し、免疫沈降法を用いてE/F-1 とGrb2 の結合について検討した所、5ヶ所全てにGrb2 が結合することが判明した。5ヶ所全ての変異体 (5F) では、Grb2 結合及びGab2 リン酸化が見られず、STAT5、Erk1/2 及びAkt活性化が低下していた。5Fを導入したマウス骨髄細胞では、E/F-1 を導入した骨髄細胞と比較して、コロニー形成能低下が見られ、移植実験では白血球増多及び肝脾腫が軽減し、生存期間の延長を認めた (中央値: 55 日 vs 18 日、P<0.001)。Gab2 ノックアウトマウスを用いた解析では、E/F-1 を導入したGab2^{-/-}骨髄細胞は、E/F-1 を導入したGab2^{+/+}骨髄細胞と比較して、コロニー形成能が低下し、移植実験で生存期間が延長した (中央値: 56 日 vs 21 日、P<0.001)。以上の結果より、ETV6/FLT3 はFLT3-ITDより強い造腫瘍性があり、骨髄系・リンパ系両方の分化能を有する造血前駆細胞の腫瘍化を引き起こすことが明らかとなった。最近、ETV6/FLT3 陽性 MLN-eoの 2 症例において、FLT3 阻害剤が有用であるとする報告がなされたが、FLT3-ITD陽性AML患者と同様、再発・抵抗性を示し長期生存には至っていない。FLT3-ITDにおいてもGrb2-Gab2 経路の重要性が報告されており、この経路の阻害がETV6/FLT3 陽性MLN-eoを含むFLT3 の関連した血液腫瘍の治療に有用である可能性が示唆さ</p>			

れた。

(論文審査の結果の要旨)

クラス III 受容体チロシンキナーゼに属し血液腫瘍で高頻度に変異が認められる FLT3 分子を標的とした阻害薬の開発が精力的にすすめられているが、獲得耐性等の問題により臨床応用には至っていない。また、近年、好酸球増多を伴う骨髄系/リンパ系腫瘍において、原因遺伝子として ETV6/FLT3 融合遺伝子が報告されている。そこで、本研究は ETV6/FLT3 を用いて、活性型 FLT3 による造腫瘍性の分子レベルでの解析を行った。

患者検体よりクローニングした ETV6/FLT3 の機能解析を、レトロウイルス発現系を用いて行った。マウス骨髄移植モデルでは、ETV6/FLT3 は移植後早期に骨髄増殖性疾患を誘発し、二次移植にて高率に T リンパ芽球性リンパ腫に転化した。

Grb2 結合部位の変異体を導入した Ba/F3 細胞株を用いた免疫沈降法により、ETV6/FLT3 は FLT3 領域の 3ヶ所、ETV6 領域の 2ヶ所で Grb2 と結合することがわかり、結合部位の減少に伴い Gab2 及びその下流の STAT5, Erk1/2, Akt のリン酸化が低下することを示した。さらに、前述の骨髄移植モデルを用いて、Grb2-Gab2 シグナル伝達経路が ETV6/FLT3 による骨髄増殖性疾患の発症及び進展に重要であることを示した。

以上の研究は、ETV6/FLT3 の造腫瘍性の解明に貢献し、活性型 FLT3 による血液腫瘍の病態究明及び治療に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 25 年 2 月 21 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日: 年 月 日以降