

# シグナル伝達を介した転写因子機能制御と疾患治療応用

東北大学大学院医学系研究科生物化学分野

落合 恭子

## 1. 背景と目的

近年の報告から、シグナル伝達異常およびシグナル下流で制御される転写因子機能異常が血球系細胞における腫瘍性疾患と関連することが示唆される。とりわけ、転写因子抑制因子Bach2 (BTB and CNC homolog 2) は白血病疾患発症と深く関与する。すなわち、プレB細胞白血病細胞ではBach2遺伝子発現低下が認められ、またシグナル伝達異常に伴うBach2機能異常から、Bach2機能回復がプレB細胞白血病治療に有用である可能性が示された (Swaninathan S. *Nat. Med.* 2013)。しかしながら、プレB細胞におけるBach2機能制御およびその直接標的遺伝子についての多くは不明である (Ochiai K. *J. Biol. Chem.* 2006, Ando R. *J. Biol. Chem. in press*)。

一方、正常なプレB細胞分化過程では、抗体軽鎖遺伝子の転写、組換え酵素の発現誘導、細胞周期停止などが生ずることで抗体軽鎖組換えが誘導される。こうした分化イベントは、「IL-7受容体からの細胞増殖シグナル」と「プレB細胞受容体からの細胞分化シグナル」のバランスにより決定され、シグナル下流の転写因子Foxo1活性化が分化誘導に寄与する (Ochiai K. *Nat. Immunol.* 2012)。さらに我々は、同細胞分化誘導時におけるBach2遺伝子発現誘導とBach2タンパク質蓄積を見出した。また、Bach2遺伝子発現はFoxo1による直接的制御を受けることが示唆された (投稿準備中)。すなわち、Bach2は同細胞分化過程においてシグナル伝達を介し、その遺伝子発現とタンパク質調節の二段階での機能制御を受ける。そこで、プレB細胞におけるBach2制御と機能解析をおこなうことで、プレB細胞白血病におけるBach2機能を活用した新規効果的治療法を模索した。

## 2. 方法

本研究では、*Irf4<sup>-/-</sup>Irf8<sup>-/-</sup>*プレB細胞株を用いる。同細胞は、IL-7受容体シグナルの減少に伴いプレB細胞受容体シグナル主体の分化状態へとスイッチさせることが可能であり、IL-7受容体シグナル減弱によるタンパク質蓄積を伴うFoxo1活性化に加え、Bach2遺伝子発現誘導とBach2タンパク質蓄積が認められる。そこで、同細胞を用いて以下の解析をおこなった。

- (1) Bach2制御機構解明: 種々のシグナル伝達経路阻害剤を用い、Bach2タンパク質およびBach2遺伝子発現レベルを検討する。
- (2) Bach2標的遺伝子同定: マイクロアレイによる遺伝子発現解析をおこない、新規Bach2標的遺伝子同定をおこなう。

## 3. 結果

### (1) Bach2制御機構解明

プレB細胞において機能するシグナル伝達経路として、IL-7受容体からのPI3キナーゼ/mTORC1経路、およびmTORC2経路に着目し、IL-7受容体シグナル存在下における以下の阻害剤の影響を検討した。

#### ①PI3キナーゼ阻害剤添加による影響

Bach2タンパク質の蓄積が認められたが、Foxo1タンパク質の蓄積およびBach2遺伝子発現誘導は認められなかった。すなわち、PI3キナーゼ下流ではFoxo1タンパク質安定性は制御されておらず、Bach2タンパク質安定性が制御されていることが示唆された。

#### ②mTORC1阻害剤 (Rapamycin) 添加による影響

Bach2タンパク質蓄積が認められたが、Foxo1タンパク質蓄積およびBach2遺伝子発現誘導が認められなかった。①の結果と統合すると、PI3キナーゼ/mTORC1経路がBach2タンパク質安定性を制御していることが明らかとなった。

#### ③mTORC1/2阻害剤 (AZD8055) 添加による影響

Bach2タンパク質蓄積のみでなく、Foxo1タンパク質蓄積およびBach2遺伝子発現誘導が認められた。すなわち、mTORC2経路がFoxo1タンパク質安定性を制御することが明らかとなった。

### (2) Bach2標的遺伝子同定

#### ①マイクロアレイ解析による標的遺伝子抽出

プレB細胞におけるBach2機能を明らかにするため、

- ・ IL-7受容体シグナル減弱時 (Bach2タンパク質蓄積とBach2遺伝子発現誘導)
- ・ レトロウイルス発現ベクターによるBach2過剰発現時

においてマイクロアレイ解析をおこなった。双方で共通して発現抑制される遺伝子を抽出した結果、細胞周期調節因子を見出した。同遺伝子領域上にBach2結合配列であるMAREを二ヶ所同定し、IL-7受容体シグナル減弱時におけるこれらのMARE配列へのBach2結合を定量ChIP-PCRにおいて確認した。

## ②Bach2による細胞周期調節の重要性

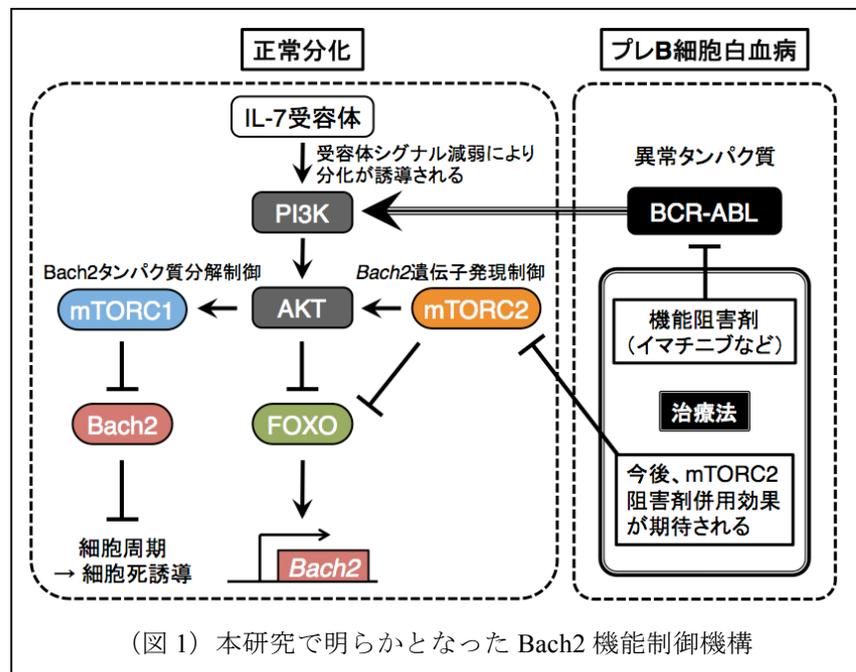
Bach2標的遺伝子として同定した細胞周期調節因子は、細胞周期のG1期からS期移行を促進する機能をもつ。野生型マウスおよびBach2ノックアウトマウスプレB細胞における細胞周期解析をおこなったところ、野生型プレB細胞ではBach2活性化条件における優位なG1期停止が認められたが、Bach2ノックアウトマウスのプレB細胞ではG1期停止が顕著に減少していた。

## 4. 考察とまとめ

本研究により、Bach2のプレB細胞における制御機構およびその機能の一旦が明らかとなった(図1)。すなわち、プレB細胞分化過程においてIL-7受容体シグナル減弱をきっかけに分化誘導が生じたとき、PI3キナーゼ/mTORC1経路の活性減弱によるBach2タンパク質安定化、またmTORC2経路の活性減弱によるFoxo1タンパク質安定化とそれに伴うBach2遺伝子発現誘導が生ずることがわかった。さらに、Bach2新規標的遺伝子として細胞周期調節因子を同定した。プレB細胞では抗体軽鎖組換え反応が生ずるが、このときDNA損傷修復応答機構が働き細胞周期を停止させる必要がある。Bach2は細胞周期調節因子の遺伝子発現抑制により、細胞周期停止を誘導することで抗体軽鎖組換え反応を促進することが示唆される。

現在、プレB細胞白血病細胞ではBCR-ABLという染色体転座が見つかっており、同異常タンパク質はPI3

キナーゼの異常活性化を引き起こす。治療法にはイマチニブなどのBCR-ABL機能阻害薬が有効であり、同阻害薬は主にPI3キナーゼ/mTORC1経路阻害に機能する。本研究結果により、PI3キナーゼ/mTORC1経路下流で負の制御を受けるBach2は、プレB細胞白血病治療においてBCR-ABL機能阻害薬によりタンパク質安定化が生じ、細胞周期停止を引き起こすことで腫瘍細胞をアポトーシスに誘導すると考えられる。さらに今後は、本研究により明らかとなったmTORC2経路を介したFoxo1によるBach2遺伝子発現制御の観点から、mTORC2機能阻害薬の併用によりBach2発現レベル自体を上昇させることでより効果的治療へ貢献できるか検討していきたい。



(図1) 本研究で明らかとなった Bach2 機能制御機構

## 5. 発表論文

この研究に関する論文は現在作成中であり、近日中の投稿を目指している。Bach2のPI3キナーゼ経路によるリン酸化調節については、以下の論文を発表した。

The Transcription Factor Bach2 is Phosphorylated at Multiple Sites in Murine B Cells But a Single Site Prevents Its Nuclear Localization.

Ryo Ando, Hiroki Shima, Toru Tamahara, Yoshihiro Sato, Miki Watanabe-Matsui, Hiroki Kato, Nicolas Sax, Hozumi Motohashi, Keiko Taguchi, Masayuki Yamamoto, Masaki Nio, Tatsuya Maeda, Kyoko Ochiai, Akihiko Muto and Kazuhiko Igarashi.

The Journal of Biological Chemistry, *in press*.

## 6. 謝辞

この助成金によりBach2の詳細な制御および機能解析が着実に進み、その知見から現在 *in press*である論文(Ando R. *J. Biol. Chem.*)にも貢献できました。あらためて貴研究会からの助成に対して感謝を申し上げます。