

変異チロシンキナーゼによる相互作用タンパクネットワーク錯乱から紐解く白血病分子基盤

武藤朋也

国立がん研究センター研究所 がん RNA 研究分野

【研究の背景】

急性骨髄性白血病(AML)における FLT3-ITD 変異は約 25% の頻度で認められ、代表的な予後不良因子として知られている。この変異は受容体型チロシンキナーゼ FLT3 のキナーゼ活性型変異であり、これを標的とした FLT3 阻害薬が開発され一定の治療効果を示しているものの、耐性化や治療抵抗性の問題は依然として未解決である。本研究助成の受領者はこれまでに、自然免疫シグナルの中樞をなすユビキチン E3 リガーゼ TRAF6 が FLT3 陽性 AML においてがん抑制的に機能していることを見出してきた。一般に TRAF6 は、自身や下流標的分子へのユビキチン付加を介して NF- κ B などのシグナルを活性化し、生体防御に寄与する分子として理解されている。一方で受領者らは近年、TRAF6 が血液がんにおいて、遺伝子変異などの「状況依存的」な基質をユビキチン化することで病態形成に関与することを示した¹⁾。そこで本研究では、FLT3-ITD 変異下に特有の TRAF6 依存的病態に着目し、その分子基盤を解明することで新たな病態理解と治療標的の同定を目指した。

【目 的】

FLT3-ITD 変異下に特有の TRAF6 依存的病態を明らかにし、得られた知見を新規治療戦略へと発展させる。

【方 法】

- FLT3-ITD マウスと TRAF6 トランスジェニックマウスのコンパウンドマウスの詳細な機能解析
- ハイエンド質量分析計を用いた FLT3-ITD 白血病細胞における TRAF6 基質の網羅的同定

【結 果】

まず FLT3-ITD マウスと TRAF6 トランスジェニックマウス(TRAF6-Tg)のコンパウンドマウスを作製し、血液学的表現型を解析した。受領者の前所属先におけるコホート 1 の検討では、FLT3-ITD マウスに TRAF6-Tg を付加すると、FLT3-ITD による骨髄増殖性腫瘍(MPN)様表現型が減弱する傾向が認められた。しかし、国立がん研究センター研究所において構築したコホート 2 では、FLT3-ITD 単独マウスと FLT3-ITD;TRAF6-Tg マウスのいずれにおいても著明な下痢が出現し、生存期間に関してはコホート 1 とは逆に FLT3-ITD;TRAF6-Tg マウスの方が有意に短い生存期間を示した。コホート 2 における下痢発症の原因は現時点で不明であるが、この消化管毒性により末梢血球数や生存期間などの指標が大きく修飾され、血液がんモデルとしての評価が困難であると判断された。このため、in vivo 解析から in vitro 系へとアプローチを切り替えた。具体的には、FLT3-ITD 陰性白血病細胞株である HEL および THP-1 に対し、CRISPR-Cas9 技術を用いて FLT3 遺伝子に ITD 配列を挿入し FLT3-ITD 変異株を樹立したうえで、TRAF6 を過剰発現させた。その結果、TRAF6 過剰発現は野生型 FLT3 を有する白血病細胞株では増殖能にほとんど影響を与えなかった一方で、FLT3-ITD 変異を導入した白血病細胞株では増殖能を抑制し、FLT3 の代表的下流シグナルである STAT3 のリン酸化レベルを低下させた。これらの結果から、TRAF6 は FLT3-ITD 変異下においてがん抑制的に機能することが示唆された。

次に、TRAF6 の FLT3-ITD 変異下におけるがん抑制機構の解明を目的として、TRAF6 の基質に着目した。高深度解

析が可能なハイエンド質量分析計を用いるにあたり、まずユビキチン結合人工タンパク質 TUBE (LifeSensors 社)を用いてユビキチン化タンパク質をプルダウンし、質量分析による網羅的解析を試みた。しかし、TUBE による回収タンパク質は非特異的な成分が多く、TRAF6 依存的基質を特定するには至らなかった。そこで、APEX2 を用いた近接ラベリング法によるサンプリングへと切り替え、TRAF6 近傍タンパク質の同定を試みた。その結果、ポジティブコントロール条件において既知の相互作用分子が再現性よく検出されるなど、妥当性の高いデータが得られた。この系を FLT3-ITD 変異白血病細胞へと応用し、FLT3-ITD 変異細胞に特異的な TRAF6 基質の同定に現在取り組んでいる。

【考 察】

TRAF6 は多くの固形がんなどにおいて、炎症シグナルを介して腫瘍促進的に働く分子と考えられてきた²⁾。一方、本研究では FLT3-ITD 変異白血病の文脈において、TRAF6 がむしろがん抑制的に機能しうることを示した点が特徴である。

当施設において、最新のハイエンド質量分析計を用いた相互作用・基質同定解析の基盤が整備されたことにより、今後は FLT3-ITD 変異下に特有な TRAF6 基質のユビキチン修飾とシグナル伝達異常を統合的に解析することが可能となった。TRAF6 依存的ユビキチン化ネットワークを解明することで、FLT3-ITD 変異白血病における新規がん抑制メカニズムの同定と、それに基づく治療標的の提案につなげることを今後の課題とする。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

現在、臨床で用いられている FLT3 阻害薬は、FLT3 の ATP 結合部位への競合的結合により下流シグナル活性化を抑制する薬剤であり、構造最適化を通じて阻害活性を高めることで治療効果の改善が図られてきた³⁾。しかしながら、FLT3 阻害薬単剤で白血病を根治させることは極めて困難であり、獲得耐性や治療抵抗性の問題も未だ解決されていない。このような状況を踏まえると、FLT3 分子そのものへの直接介入だけでは治療戦略として限界に近づいていると考えられる。本研究のように、TRAF6 を介して制御される FLT3-ITD 変異下特有のシグナルネットワークを解明し、FLT3 以外の分子を標的とする治療標的を同定する試みは、今後の併用療法や新規分子標的薬開発において重要な意義をもつと考えられる。

【参考・引用文献】

1. Muto T et al. TRAF6 functions as a tumor suppressor in myeloid malignancies by directly targeting MYC oncogenic activity. *Cell Stem Cell*. 2022 Feb 3;29(2):298-314.e9
2. Starczynowski DT et al. TRAF6 is an amplified oncogene bridging the RAS and NF- κ B pathways in human lung cancer. *J Clin Invest*. 2011 Oct;121(10):4095-105.
3. Perl et al. Approaching a therapeutic inflection point for FLT3-mutated AML. *Blood*. 2025 Jun 12;145(24):2834-2839.