

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14613

研究課題名(和文) スーパーエンハンサーを介したRUNX3過発現によるEBウイルス関連癌化機構の解明

研究課題名(英文) Superenhancer-mediated RUNX3 overexpression in EB virus-associated tumorigenesis

研究代表者

大里 元美 (Osato, Motomi)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授

研究者番号：90314286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：EBウイルスは古くより多くのヒト癌への関与が示されているがその癌化メカニズムの詳細は不明な点が多い。本研究ではEBウイルスによる細胞癌化はRUNX3遺伝子上流に形成されるスーパーエンハンサーによりRUNX3遺伝子の発現が過剰に誘導されることが原因であるという仮説について、スーパーエンハンサー活性を薬剤JQ1により抑制したり、ゲノム編集手法CRISPR/Cas9法により欠失させることによって検討した。予想通り、スーパーエンハンサーが失活するとRUNX3の発現が低下し著名な細胞増殖抑制が見られた。従って、上記の仮説はほぼ正しいことが確認されたので、これらの結果の一部を国際誌に発表した。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) is well known to be a causative pathogen for widespread types of cancers; however, the molecular basis for its tumorigenesis remains poorly understood. Recent studies by us and others demonstrated that superenhancer (SE)-driven overexpression of the RUNX3 gene may underlie EBV-associated tumorigenesis. To address this question, we first suppressed the SE activity by a SE inhibitor, JQ1. In the presence of JQ1, proliferation of EBV-positive B cell and NKT lymphoma cell lines was all strongly suppressed, due to the suppressed activity of SE and resultant decreased expression of RUNX3. The significance of SE was further confirmed by CRISPR/Cas9 mediated excision of the SE region. In addition, RUNX3 knockdown also led to similar suppression of cell proliferation. These results suggest that SE-driven overexpression of RUNX3 is a key mechanism for EBV-associated tumorigenesis and the inhibition of SE activity by drugs appears to be a novel therapeutic approach.

研究分野：総合生物

キーワード：細胞不死化 EBウイルス スーパーエンハンサー

1. 研究開始当初の背景

近年の次世代シーケンスの登場により癌化に関連する遺伝子変異が網羅的に同定され癌発症機構の解明は大きく進んだ。一方で、古典的な癌原遺伝子であるc-Mycなどはその蛋白コード領域に塩基変異は殆ど検出されず変異を持たない遺伝子の過発現が癌化に重要であると考えられている。そしてその発現上昇の原因の一つとしてスーパーエンハンサーを介した機序が最近注目を集め始めている。スーパーエンハンサーは通常のエンハンサーと比べるとサイズが巨大であり強力に安定した遺伝子発現を維持するための調節機構と思われる。EBウイルスは古くより多種のヒト癌への関与が示されているがその癌化メカニズムは不明であった。最近、ChIP-シーケンス法により癌化に関連する細胞側遺伝子の発現調節異常が網羅的に検索された結果、スーパーエンハンサー形成を介するRUNX3遺伝子の過発現が原因である可能性が示された。これに先立って、RUNX3はEBウイルス関連B細胞腫瘍細胞株あるいは不死化細胞において高発現しており、RNAiノックダウン法によりその細胞増殖・不死化にRUNX3の発現が必須であることが示されていた。

申請者は白血病や種々の癌の発症に関与する転写因子RUNXファミリー遺伝子の生理的機能、疾病との関連をこれまで研究してきた(Wang et al. Cell Reports 8:767, 2014)。特にその発現制御機構を理解するために制御領域(エンハンサー)の検索をすすめてきた(Ng et al. Stem Cells 28:1869, 2010)が、その過程で上記の他グループからの報告とは別個に、RUNX3上流に形成されるスーパーエンハンサーの存在とB細胞不死化・癌化との関連を示唆する十分な知見を既に得ていた。

2. 研究の目的

EBウイルスによる細胞不死化・癌化はRUNX3遺伝子上流に形成されるスーパーエンハンサーによりRUNX3遺伝子の発現が過剰に誘導されることが原因の一つであることを次の3実験を行うことで証明し、多くのEBウイルス関連腫瘍の治療薬開発へつなげることを目指す。

(1)スーパーエンハンサー特異的阻害剤JQ1による細胞増殖抑制

(2)クロマチン免疫沈降(ChIP)-シーケンスによるスーパーエンハンサー形成の確認およびJQ1によるその消失

(3)ゲノム編集手法CRISPR/Cas9法によりスーパーエンハンサー領域を欠失させたときの細胞増殖抑制

3. 研究の方法

(1)スーパーエンハンサー特異的阻害剤JQ1による細胞増殖抑制

スーパーエンハンサー上には多数の転写

因子に加えMediator1やBRD4などのBETファミリー蛋白が結合し複合体を形成することが知られている。このBETに対する阻害剤が幾つか開発されておりJQ1は最も良く用いられている薬剤の一つである。このJQ1のEBウイルス陽性細胞株の増殖に対する効果を、細胞数の変化やフローサイトメトリーを用いた細胞周期、BrDU取り込みの検討等で調べる。EBウイルス陽性細胞株として、B細胞性細胞株2種(GM12878、Raji)、NK/Tリンパ腫細胞株5種(KHYG-1、NK-YS、HANK-1、SNK-1、SNK-6)を用いる。

また、JQ1の存在下でRUNX3発現の変化(低下)も検討する。さらにJQ1使用時にはRUNX3以外の遺伝子発現の変化も予想されるので、RUNX3の発現量に細胞増殖が大きく依存しているかの特異性を証明するために、RUNX3導入によるレスキュー実験を合わせて行う。また、RUNX3 RNAiノックダウン法により細胞増殖阻害が見られるかをJQ1の無い条件下で検討する実験も行う。

JQ1により抑制が予想されるc-Mycの関与も、ノックダウンやレスキュー実験を合わせて行い比較する。RUNX3とc-Mycはどちらも転写因子であり共同の標的遺伝子も多く、また相互に発現を誘導し合う可能性も大きいので、両者の関係は詳細に検討する。

(2)クロマチン免疫沈降(ChIP)-シーケンスによるスーパーエンハンサー形成の確認およびJQ1によるその消失

ChIP-PCR簡便法によりおおまかなエンハンサーの活性化、不活化などの挙動は随時検討してゆくが、重要な対比実験、例えばJQ1の有無によるスーパーエンハンサー形成の変化などはChIP-シーケンス法をやることで確認する。発現マイクロアレイを同時に行い対比させながら検討する。c-Mycなど他の遺伝子のスーパーエンハンサーの挙動、および発現変化も同時に得られるのでこれも合わせて検討してゆく。使用する抗体としてはH3K27Ac、H3K4me1、EBNA2、Med1などに対するものを使用する。得られたシーケンスデータは申請者のいる研究所のバイオインフォマティクスグループに解析してもらう。

(3)ゲノム編集手法CRISPR/Cas9法によりスーパーエンハンサー領域を欠失させたときの細胞増殖抑制

RUNX3遺伝子上流40Kbより50Kbにまたがるスーパーエンハンサー領域にガイドRNAを設計しCRISPR/Cas9レンチウイルスベクターに挿入する。このベクターはBroad InstituteのZhang研究室より供与をうけたもので、ガイドRNAの配列選定には同研究室のウェブサイトで紹介されている方法を用いる。このCRISPR/Cas9レンチウイルスベクターを前述したB細胞性腫瘍細胞株やNK/Tリンパ腫細胞株に導入しスーパーエンハンサーを欠失させることで細胞増殖抑制が誘導されるかを検討する。細胞増殖

抑制が観察されたとしてもオフターゲット効果による非特異的な影響である可能性は否定できない。従って、RUNX3 の発現が重要であることを RUNX3 導入によるレスキュー実験を行い確認する。これらの実験は複数の EB ウイルス感染細胞株を用いることで確認作業を重ねてゆく。さらに 上咽頭癌など他の EB 関連腫瘍の細胞株でも検討し、EB ウイルス関連腫瘍の癌化に共通の根本的メカニズムで有ることを検証する。

4. 研究成果

(1) スーパーエンハンサー阻害剤 JQ1 による細胞増殖阻害の検討

まず第一に EB ウイルス感染と関連があり RUNX3 の高発現の見られる癌の種類を検討した。以前より知られていた B 細胞性腫瘍細胞株 2 種 GM12878、Raji、また今回新たに NK/T リンパ腫の臨床サンプルや細胞株 5 種 (KHYG-1、HANK-1、SNK-1、SNK-6、HANK-1) において RUNX3 の高発現を認めた。また、これらの細胞株において RUNX3 の発現を RNAi ノックダウン法により抑制するとアポトーシスが誘導されることが確認された。これらの結果は RUNX3 の高発現が細胞増殖に重要であることを示唆していると考えられた。

この RUNX3 の発現上昇は、前述の研究背景で述べたようにその上流域に形成されるスーパーエンハンサーによるものが予想される。従って、スーパーエンハンサー阻害剤 JQ1 を EB ウイルス陽性 B 細胞株や NK/T リンパ腫細胞株の培養液に加えたところ、RUNX3 の発現低下とアポトーシスが濃度依存的に誘導された (図 1)。

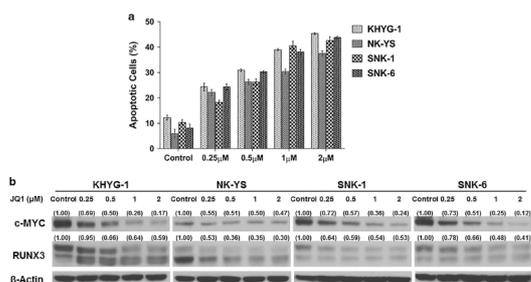


図 1 NK/T リンパ腫細胞株における JQ1 による RUNX3 の発現低下と細胞死誘導

EB ウイルス陽性 NK/T リンパ腫細胞株 4 種 (KHYG-1、NK-YS、SNK-1、SNK-6) における JQ1 の効果を示す (発表論文 2 にて報告済)

同時に c-Myc の発現も低下しており、RUNX3 のエンハンサー内に c-Myc の結合サイトも複数みられたため、JQ1 存在下では c-Myc の発現抑制を介した RUNX3 の発現低下の機序も同時に存在することが示唆された。

この効果は、検討した B 細胞性細胞株 2 種 (GM12878、Raji) に於いても同様に観察された。従って、EB ウイルス陽性細胞株において共通してみられる細胞不死化・癌化をも

たらずメカニズムである可能性が考えられた。

(2) ChIP-シーケンスによるスーパーエンハンサー形成の確認および JQ1 によるその消失の確認

EB ウイルス陽性リンパ芽球様細胞株 GM12878 を用いて H3K27Ac に対する抗体で行った ChIP-Seq により RUNX3 遺伝子の上流 40 Kb より 50 Kb にまたがるスーパーエンハンサーを確認した (図 2)。

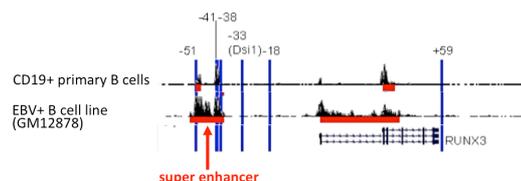


図 2 EB ウイルス陽性細胞株において RUNX3 領域に形成されるスーパーエンハンサー

RUNX3 遺伝子領域についての H3K27Ac 抗体を用いた ChIP-seq の結果を示す。使用した細胞を左側に列挙。垂直方向に描かれた青い線は種々の方法で同定された通常のエンハンサー、赤い水平方向の長方形はスーパーエンハンサーを示す。

JQ1 によるこのスーパーエンハンサーに対する効果を ChIP-PCR 簡便法により検討したところ、その不活化が確認された。

(3) CRISPR/Cas9 法によりスーパーエンハンサー領域を欠失させたときの細胞増殖阻害の検討

RUNX3 遺伝子の上流 40 Kb より 50 Kb にまたがるスーパーエンハンサー領域内より、種々の情報 (生物進化上の保存度、ChIP-シーケンスデータベースより得られた転写因子結合情報やクロマチン状況の情報、これまで申請者の研究室でモデル生物ゼブラフィッシュを用いて確認された *in vivo* エンハンサー活性など) をもとに 3 カ所の標的配列 (転写開始点より 51、41、38 Kb 上流、図 2 参照) を選択し、それぞれを挟み込む形で 3 対のガイド RNA を設計し CRISPR/Cas9 レンチウイルスベクターに挿入した。HEK293T 細胞を用いたパイロット実験において、これらガイド RNA 認識配列に挟まれる近接した 3 対の標的配列の個々の欠失のみならず、2 個の標的配列の同時欠失、3 個全ての同時欠失など、殆ど全ての組み合わせについて高効率で切断欠失が起こることを確認した。この CRISPR/Cas9 レンチウイルスベクターを B 細胞性腫瘍細胞株に導入しスーパーエンハンサーを欠失させたところ著名な RUNX3 遺伝子の発現低下および細胞増殖抑制が観察された。

従って、研究計画で挙げた仮説は大筋でほぼ正しいことが確認された。しかし、オフタ

ーゲット効果による非特異的な影響である可能性は否定できないため、今後 RUNX3 レスキューなどにより特異性を確認してゆく予定である。

これらの研究結果のうち NK/T リンパ腫細胞については発表論文 2 として報告済みである。B 細胞株についての結果は、スーパーエンハンサーに含まれる新たな分子を同定したため、さらに深い解析を現在行っており、これらの新規知見も含めて発表予定である。

本研究助成により得られたこれらの知見をもとに今後さらに詳細な分子機序の解析を行い治療法開発につなげてゆきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Wang CQ, Mok MM, Yokomizo T, Tergaonkar V, Osato M. Runx Family Genes in Tissue Stem Cell Dynamics. *Adv Exp Med Biol*. 査読 無、2017;962:117-138. doi: 10.1007/978-981-10-3233-2_9

② Selvarajan V, Osato M, Nah GS, Yan J, Chung TH, Voon DC, Ito Y, Ham MF, Salto-Tellez M, Shimizu N, Choo SN, Fan S, Chng WJ, Ng SB. RUNX3 is oncogenic in natural killer/T-cell lymphoma and is transcriptionally regulated by MYC. *Leukemia*. 査読有、2017 Feb 17. doi: 10.1038/leu.2017.40. [Epub ahead of print]

③ Liao WS, Tan SH, Ngoc PC, Wang CQ, Tergaonkar V, Feng H, Gong Z, Osato M, Look AT, Sanda T. Aberrant activation of the GIMAP enhancer by oncogenic transcription factors in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 査読有、2017 Jan 27. doi: 10.1038/leu.2016.392. [Epub ahead of print]

④ Zhou J, Chan ZL, Bi C, Lu X, Chong PS, Chooi JY, Cheong LL, Liu SC, Ching YQ, Zhou Y, Osato M, Tan TZ, Ng CH, Ng SB, Wang S, Zeng Q, Chng WJ. LIN28B Activation by PRL-3 Promotes Leukemogenesis and a Stem Cell-like Transcriptional Program in AML. *Mol Cancer Res*. 査読有、2017 Mar;15(3):294-303. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0275-T.

⑤ Manachai N, Saito Y, Nakahata S, Bahirvani AG, Osato M, Morishita K. Activation of EVI1 transcription by the LEF1/ β -catenin complex with

p53-alteration in myeloid blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有、2017 Jan 22;482(4):994-1000. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.146.

⑥ Matsuo J, Kimura S, Yamamura A, Koh CP, Hossain MZ, Heng DL, Kohu K, Voon DC, Hiai H, Unno M, So JB, Zhu F, Srivastava S, Teh M, Yeoh KG, Osato M, Ito Y. Identification of Stem Cells in the Epithelium of the Stomach Corpus and Antrum of Mice. *Gastroenterology*. 査読有、2017 Jan;152(1):218-231. e14. doi: 10.1053/j.gastro.2016.09.018.

⑦ Jayapal SR, Ang HY, Wang CQ, Bisteau X, Caldez MJ, Xuan GX, Yu W, Tergaonkar V, Osato M, Lim B, Kaldis P. Cyclin A2 regulates erythrocyte morphology and numbers. *Cell Cycle*. 査読有、2016 Nov 16;15(22):3070-3081. doi:10.1080/15384101.2016.1234546

⑧ Iizuka K, Yokomizo T, Watanabe N, Tanaka Y, Osato M, Takaku T, Komatsu N. Lack of Phenotypical and Morphological Evidences of Endothelial to Hematopoietic Transition in the Murine Embryonic Head during Hematopoietic Stem Cell Emergence. *PLoS One*. 査読有、2016 May 26;11(5):e0156427. doi: 10.1371/journal.pone.0156427.

[学会発表] (計 3 件)

① 大里元美、RUNX3 エンハンサーによる腸上皮細胞間リンパ球の抗腫瘍効果制御機構、金沢大学がん進展研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム、2017年2月14日-15日、金沢

② 大里元美、Enhancer for Runx1, eR1: a powerful tool in stem cell and cancer biology. 第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日-12月2日、横浜

③ 大里元美、Enhancer for Runx1, eR1: a powerful tool in stem cell and cancer biology. 第14回幹細胞シンポジウム、2016年5月20日-5月21日、淡路

[その他]
ホームページ等

<http://ircms.kumamoto-u.ac.jp/publications/2017/01/identification-of-stem-cells-in-the-epithelium-of-the-stomach-corpus-and-antrum-of-mice.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大里 元美 (OSATO, Motomi)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招
聘教授

研究者番号：90314286