

令和元年6月17日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19579

研究課題名(和文)造血幹細胞特異的エンハンサーの同定による白血病病態基盤の解明

研究課題名(英文)RUNX3 over-expression promotes the development of myelodysplastic syndrome

研究代表者

横溝 貴子 (Yokomizo, Takako)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別研究員(RPD)

研究者番号：40636867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：造血に重要な転写因子RUNX3は、加齢に伴い発現制御領域にメチル化が入りその発現は低下することが報告されている。しかしその一方、高齢者で罹患率の高い骨髄異形成症候群(MDS)および急性骨髄性白血病(AML)患者においては病期進行に伴いRUNX3の発現上昇が観察されている。我々が新規に作製したRUNX3を過剰発現させたMDS/AMLモデルマウスの解析により、RUNX3の過剰発現によりがん遺伝子であるMycのパスウェイが活性化し、白血病幹細胞の発生に至ることが示唆された。また、MDS白血病細胞株においてRUNX3エンハンサーが細胞の生存に必須であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄異形成症候群(MDS)は造血幹細胞より発生するクローン性造血器腫瘍であり、一部が急性骨髄性白血病(AML)に移行する高齢者に好発するがんである。近年の網羅的な遺伝子変異解析によって、TET2などのエピゲノム制御遺伝子変異が同定され、エピゲノム制御の破綻がMDS発症に深く関与することが認識された。近年、健常高齢者でTET2変異を伴ったクローナル造血が高頻度に存在することが明らかとなったが、MDS発症に至るには付加的なゲノムまたエピゲノム変異が不可欠であり、責任遺伝子を含めたMDS発症とAMLへの病態進展のメカニズムは未だ明白でない。本研究成果はそのメカニズム解明の一端となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：RUNX3 functions as either tumor suppressor or oncogene, however, it remains unknown how RUNX3 promotes the formation of myeloid malignancies including MDS. We found that RUNX3 expression was significantly increased in patients with progressive MDS. We hypothesized that RUNX3 promotes the development of MDS via super enhancer formation of RUNX3. To determine how RUNX3 promotes the formation of MDS, we generated a hematopoietic-specific Tet2 null and RUNX3 overexpressing (Tet2KO-RUNX3) mouse model. Tet2KO-RUNX3 MDS cells suppressed differentiation genes, but activated myc-related biological pathways such as ribosome, mitochondria, and cell cycle progression. Since FLT3-ITD+ MV4-11 AML has been shown to activate enhancers of RUNX3 (eRX3), Cas9-sgRNA-directed eRX3 significantly reduced expression of RUNX3 and lead to impairing the proliferative capacity. Thus, RUNX3 and C-MYC cooperatively promote the development of MDS in TET2 deficient cells via formation of oncogenic enhancers.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：Runx3 MDS

1. 研究開始当初の背景

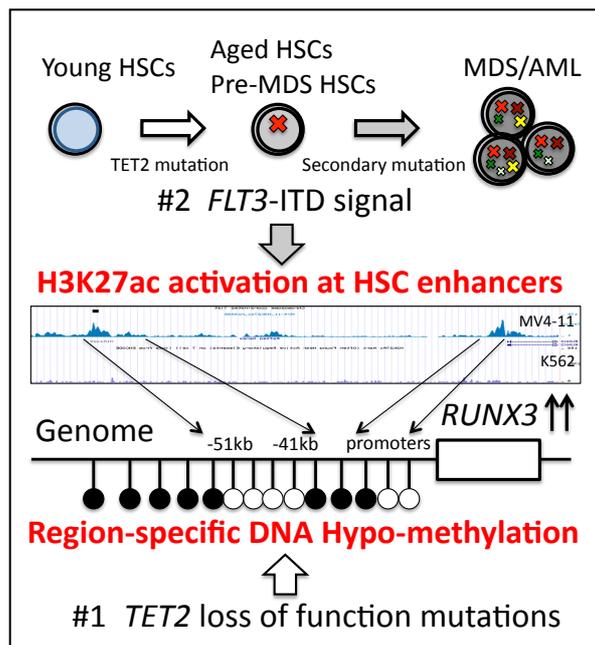
がん発症過程において、ゲノム変異のみならず、DNA メチル化やヒストン修飾といったエピゲノム異常が深く関与している。近年の次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析によって、*TET2*、*DNMT3A* などエピジェネティック制御遺伝子変異が次々と同定され、エピゲノム異常ががん発症に深く関与することが広く認識された。その一例として、長距離で密集した活性化ヒストン修飾 H3K27ac によって形成されるスーパーエンハンサーが、*MYC* がん遺伝子の転写活性化に極めて重要であることが示唆されている(Loven J, et al. Cell 2013)。*TET2* は 5-methylcytosine から 5-hydroxymethylcytosine へ変換する TET ファミリー DNA 脱メチル化酵素の一つである。*TET2* の機能喪失変異は 7-25% の AML や 10-20% の MDS また MPN において認められ、実際 *Tet2* 欠損マウスは長期間を有するが MPN 様病態を発症する。そのメカニズムの一つとして、*TET2* 機能喪失によるがん抑制遺伝子のエンハンサー領域の DNA メチル化亢進が示唆されている。近年、健常高齢者で *TET2* 変異を伴ったクローナル造血が高頻度に存在することが注目されているが、高齢者のクローナル造血がすべて造血器腫瘍を発症するのではなく、付加的なゲノムまたエピゲノム変異が必要と推察され、標的遺伝子を含めたがん発症メカニズムは明白でない。

MDS は造血幹細胞より発生するクローン性造血器腫瘍であり、造血不全症状を呈する高齢者に好発するがんである。完治が期待できる造血幹細胞移植に適応がない高齢患者では、DNA メチル化阻害剤 azacitidine によって輸血依存性の改善が期待できるが、生命予後の改善効果は乏しい(Silverman LR, et al. J Clin Oncol 2012)。

申請者らは予後不良な進行期 MDS 幹/前駆細胞において、転写因子 *RUNX3* の過剰発現を新たに見出した。従来、*RUNX3* は T 細胞分化を制御する転写因子として、その標的遺伝子の発現機構について盛んに研究されてきた。しかし、T 細胞に限らず *RUNX3* 自体の転写制御機構は明白でなかった。近年、Epstein-Barr(EB)ウイルス由来 B リンパ腫において *RUNX3* 近傍にスーパーエンハンサーが形成されることが報告された。実際 EB ウイルス由来 B リンパ腫細胞は他の B リンパ腫細胞と比較して *RUNX3* が高発現しており、*RUNX3* ノックダウンによって細胞増殖が抑制されることが報告されている(Zhou H, et al. Cell Host Microbe 2015, Spender LC, et al. J Virol 2002)。また、*FLT3*-internal tandem duplication (*FLT3*-ITD)活性化変異陽性 AML において、CD34 陽性細胞における *RUNX3* 高発現は予後不良因子として報告されている(Lacayo NJ, et al. Blood 2004)。さらに、*FLT3*-ITD を導入した *Tet2* 欠損マウスでは *Runx3* 発現が誘導され、抗癌剤耐性に寄与する知見が報告された。*RUNX3* は、状況依存的にがん遺伝子またはがん抑制遺伝子として相対する機能が知られていたが、以上の知見から *RUNX3* は造血器腫瘍においてがん遺伝子として機能することが示唆された。ただし、造血器腫瘍における *RUNX3* の変異の報告はなく、MDS 幹細胞におけるその機能は不明であった。

2. 研究の目的

MDS の基礎・臨床面の課題を克服するために、始めに高齢者のクローナル造血や MDS で変異が認められる *Tet2* 欠損造血幹細胞に、進行期 MDS 患者で高発現する *Runx3* が過剰発現する MDS/AML モデルマウスを新規に作製した。*Tet2* 欠損幹細胞ではゲノムワイドなエンハンサー領域の DNA メチル化亢進を認めるが(申請者ら未発表データ)、MDS 発症前後の遺伝子発現解析およびエンハンサー領域の DNA メチル化・ヒストン修飾のエピゲノム解析によって、MDS 幹細胞依存的なエンハンサー活性化機構を理解する。さらに、MDS 幹細胞における *RUNX3* 過剰発現の仕組みを理解するために、*RUNX3* スーパーエンハンサーの機能的関与を化学的・遺伝学的手段を用いて検証する。



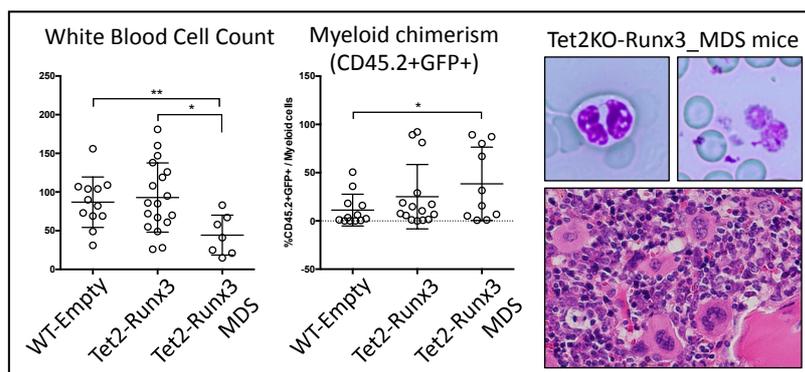
### 3. 研究の方法

本研究課題では、*Tet2* コンディショナルノックアウト (CKO) マウス (*Tet2<sup>flox/flox</sup>; Cre-ERT2*) 造血幹細胞に、*RUNX3* または *FLT3-ITD* 活性化変異体を導入した MDS/AML マウスモデルを作製した。MDS 発症前後の遺伝子発現解析およびエンハンサー領域の活性化ヒストン修飾 H3K27ac などのエピゲノム解析を通して、MDS 幹細胞の発生過程を理解する。次に、MDS 幹細胞における *RUNX3* 発現制御機構を理解するために、EB ウイルス由来 B リンパ腫でも報告された *RUNX3* スーパーエンハンサーの関与を CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いて検証する (Zhou H, et al. Cell Host Microbe 2015)。以上、*TET2* 変異と *RUNX3* 過剰発現の協調作用による MDS 発症の病態基盤を、*RUNX3* エンハンサー活性化機構を切り口として解明するとともに、新規治療標的開発のための基礎的検証を行う。

### 4. 研究成果

本研究では、エピゲノム異常がもたらすがん幹細胞発生と病態進展の分子基盤の解明を目指し、研究を進めている。がん幹細胞の病態基盤を理解するために、骨髄異形成症候群 (MDS)、骨髄増殖性腫瘍 (MPN) や急性骨髄性白血病 (AML) で機能喪失型変異を認める DNA 脱メチル化酵素 *TET2* コンディショナルノックアウト (CKO) マウス (*Tet2<sup>flox/flox</sup>; Cre-ERT2*) 造血幹細胞に、予後不良な進行期 MDS で高発現する転写因子 *RUNX3* を過剰発現させた MDS/AML モデルマウスを新規に作製した。*Tet2* を欠損した *Tet2<sup>Δ/Δ</sup>; Cre-ERT* または *Tet2<sup>wt/wt</sup>; Cre-ERT* マウスから CD150<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>C-Kit<sup>+</sup> 造血幹細胞 (LT-HSC) をソート採取し、3xFLAG-tagged *RUNX3* (IRES-GFP) をレトロウイルスベクターにて導入した後、致死量放射線照射した Ly5.1<sup>+</sup> レシピエントマウスに野生型細胞と共に移植した。移植後は経時的に MDS 発症およびその表現形を解析したところ、*RUNX3* 強発現/*Tet2* 欠損マウスは、貧血と血小板数低下、白血球数低下に加えて全系統の血球異形成を認めており、CD45.2<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> 細胞の相対的増加を来した。連続移植実験

でも MDS 細胞の競争的増殖能の亢進を認め、進行期 MDS の表現形が再現されていた。このモデルマウスを用い、MDS 発症前後の遺伝子発現解析およびエピゲノム解析によって、エピゲノム異常によるがん幹細胞の発生と進展の分子基盤解明に向けた解析を行った。



MDS 発症の病態基盤を解明するため、*RUNX3* 強発現/*Tet2* 欠損マウスの MDS 発症前後の造血幹細胞を採取して、遺伝子発現解析を RNA シーケンスによって実施した。野生型細胞、単独変異細胞と MDS 発症前後での遺伝子発現変化を比較解析したところ、*RUNX3* の強発現によりがん遺伝子である *Myc* の gene set が活性化していることが明らかとなった。*Myc* gene set の活性化は野生型のバックグラウンドでも確認され、その活性化は *Tet2* 欠損下においてさらに増強されるほか、MDS 発症後において最大となることが明らかとなった。このことから、*RUNX3* の強発現が *Myc* シグナルを活性化し、がん化に寄与するものと考えられる。*Myc* は様々な因子と協調して作用していることが知られているが、*Runx3* 過剰発現造血幹前駆細胞では、細胞分化を誘導する *RARα* との協調パスウェイが抑制されており、がん化に寄与する *MAX* との協調パスウェイが活性化していることを RNA-seq 及び ChIP-seq の解析より示した。*Runx3* 過剰発現造血幹前駆細胞は MYC-MAX 結合阻害剤に感受性であるという in vitro の実験結果も得られており、MYC/MAX パスウェイの活性化が *RUNX3* 強発現/*Tet2* 欠損マウスの MDS 発症に寄与しているものと考えられる。

また、*Runx3* 過剰発現造血幹前駆細胞において *Runx1* の標的遺伝子の発現が有意に抑制されていることを明らかとした。*Runx1* は MDS 患者において機能喪失型変異の報告が多数報告されている。*Runx1* の ChIP-seq で同定された直接の標的遺伝子の発現が *Runx3* 過剰発現造血幹前駆細胞で有意に発現抑制されていること、*Runx1* と *Runx3* の標的遺伝子が多数重複しており、ルシフェラーゼアッセイにより *Runx1* の標的遺伝子の発現制御を *Runx3* が量依存的に阻害するというデータも得た。また、*Runx1* の mRNA の量は変化がないのに対し、タンパク質の発現が *Runx3* の過剰発現により抑制されることから、転写後の発現制御機構を介した *Runx1* の発現制御機構が示唆された。このよ

うに、RUNX3 強発現/ Tet2 欠損造血幹前駆細胞では、がん遺伝子である Myc の活性化及びがん抑制遺伝子である Runx1 の機能阻害が起こり、MDS 発症に寄与していることが示された。

MDS や AML において *FLT3-ITD* 変異と *RUNX3* 高発現の関連が示唆されている。我々は *RUNX3* の転写開始点前後 100 kb の領域に、複数の細胞種特異的エンハンサーを同定しており、EBV 陽性 B リンパ腫で報告されたスーパーエンハンサーは、造血幹細胞特異的エンハンサーと一部が重複している。始めに、*FLT3-ITD* 陽性 AML 細胞におけるエンハンサーによる *RUNX3* 転写活性化を、エンハンサー機能を抑制する BRD4 阻害剤・JQ1 を用いて検証した。*FLT3-ITD* 陽性白血病 MV4-11 は、*FLT3-ITD* 陰性白血病 THP-1 に比較して、JQ1 によって *C-MYC* に比較して *RUNX3* 発現がより有意に低下し、細胞増殖活性が有意に抑制された。エンハンサーに依存した *RUNX3* による腫瘍増殖が示唆された。実際、CRISPR/Cas9 ゲノム編集ベクターを用いて *RUNX3* エンハンサーの欠失を誘導すると *FLT3-ITD* 陽性白血病において細胞死が誘導される様子が観察され、エンハンサーに依存した *RUNX3* の発現が細胞の生存に重要であることが示唆された。しかし、マウス造血幹細胞において *FLT3-ITD* 活性化変異体を強制発現させた系では *RUNX3* の過剰発現を誘導するには至らず、そのほかのシグナルの関与が示唆された。実際、ヒトの小児 AML において *FLT3-ITD* 活性化変異の有無に関わらず *RUNX3* の過剰発現が報告されている例もあり、*RUNX3* の過剰発現の誘導には複数のゲノム変異が関与している可能性が考えられ、現在ヒトの変異データおよび遺伝子発現解析を基に相関因子について解析中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 横溝貴子、造血器腫瘍研究会、*RUNX3* overexpression impedes *RUNX1* and promotes the development of MDS/MPN、2019 年
- ② 横溝貴子、第 79 回日本血液学会学術集会、Super enhancer mediated-*RUNX3* overexpression promotes myeloid malignancies、2017 年
- ③ Takako Yokomizo、59th ASH Annual Meeting(国際学会)、*RUNX3* Promotes the Development of MDS/MPN Overlap Syndrome Via Enhancing Expression of Myc in the Absence of Tet2、2017 年

## 6. 研究組織