

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08662

研究課題名(和文) MLL複合体の固形癌進展における機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of MLL complex in solid tumor progression

研究代表者

米田 光宏 (YONEDA, Mitsuhiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：80508367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： MLL複合体構成因子として既知のMEN1、BRD4の安定発現細胞株を樹立し、MLL遺伝子変異がない正常型MLL複合体を精製した。加えて、MLL遺伝子変異を有する大腸癌細胞株でのMLL複合体構成因子の安定発現細胞株を樹立した。

また、MLL複合体構成因子が固形癌の増殖に重要であることをヒト子宮頸癌の細胞株であるHeLa細胞でのノックダウン実験により明らかにした。

MLL遺伝子異常を有する固形癌に対する早期診断・予後診断や、より有効な分子標的療法の発見につながる礎となる知見を得るため、MLL複合体形成阻害化合物をスクリーニングする実験系を確立し、候補化合物を含む粗抽出物を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MLL遺伝子変異を有するMLL複合体に特異的な構成因子やMLL複合体形成を阻害する薬剤が発見された場合、MLL遺伝子異常を有する固形癌患者の早期診断・予後診断や、より有効な分子標的療法の発見につながる礎となる知見が得られる。

研究成果の概要(英文)： The cells stably expressing MEN1 or BRD4 which are already known as subunits of the MLL complex were established. MLL complex without MLL mutation was purified. Further, MLL-mutated colon cancer cells stably expressing subunit of the MLL complex were also established.

Knockdown experiments in HeLa cells revealed that subunits of the MLL complex have an important role in solid tumor proliferation.

The extract which includes a candidate molecule for disruption of MLL complex formation was identified by a developed screening assay, in order to obtain knowledge which is served as a foundation for the discoveries of early diagnosis, prognosis and more effective molecular targets for MLL-mutated solid tumors.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、医師免許取得後、これまで遺伝子改変マウスや癌検体を用いた肺癌進展の分子メカニズムの研究に従事し、主に以下の3点を明らかにしてきた。

- ・肺癌手術検体で発現低下が多く認められる ANA (TOB/BTG細胞増殖抑制ファミリー)は、血管新生、浸潤および転移に関連した腫瘍抑制遺伝子候補であることを証明した (Yoneda *et al.*, Cancer Sci. 2009)。

- ・転写因子 C/EBP の非 DNA 結合性ドミナントネガティブ変異体は、肺腺腫から腺癌への悪性を抑制することを証明した (Kimura and Yoneda *et al.*, Mol Cancer. 2012)。

- ・血液中の microRNA である *let-7b* や *miR-223* の発現低下と肺癌患者の予後不良の相関性を明らかにした (Heegaard and Yoneda *et al.*, Int J Cancer. 2012)。

申請者現所属の研究室では、ヒストン修飾のクロストークの異常が、癌の発生や進展に与える報告をしており、(1)ヒストン H2A リシン 119 番目 (H2A K119) のユビキチン化が、ヒストン H3 リシン 4 番目 (H3K4) のメチル化を抑制し

(Nakagawa *et al.*, Genes & Dev. 2008) (2)一方、H2A スレオニン 120 番目のリン酸化が、H2A K119 のユビキチン化を拮抗的に阻害することで、H3K4 メチル化抑制を解除する (Aihara *et al.*, Mol Cell. 2016) (1) (2)の成果から、**これら3つのヒストン修飾のバランスが崩れる**

ことが癌化誘引の原因であるという仮説を立てた (図1)。本研究は、さらに発展課題として、

H3K4 メチル化酵素である Mixed Lineage Leukemia (MLL)の変異体に着目し、H3K4 メチル化異常による癌化のメカニズムについて、固形癌をモデルに解明することを目的とする。

MLL 融合遺伝子や点突然変異などの遺伝子異常は、白血病の発症件数中約 10%で見られる。これらの MLL 変異体は、癌遺伝子の転写を活性化し、白血病を発症させることが遺伝子改変マウスを用いて証明されている (Thiel *et al.*, Cancer Cell. 2010)。一方、肺癌などの固形癌検体においても、MLL 遺伝子異常は高頻度に見られ、患者の予後との相関があることから、(表1、Rao, R. C. and Dou, Y., Nat Rev Cancer 2015 より改変) MLL 変異体の固形癌進行への関与が推測される。

MLL には、1-4 のサブファミリーが存在し、各遺伝子欠損マウスは胎生致死であるため、発生過程における個々の MLL の独自の役割が示唆される。MLL は複合体を形成し、ファミリー共通のサブユニット (ASH2L, DPY30, RBBP5, WDR5) と、ファミリー特異的因子 (MLL1

には Menin、MLL3 には PTIP など) を構成因子とする (図2)。個々の MLL 複合体の基質特異性や標的遺伝子の選択は、構成因子の違いが関与すると考えられる。これまでの報告では、MLL 遺伝子異常のない正常型 MLL の複合体構成因子は調べられているが (Jiang *et al.*, Nat Struct Mol Biol. 2013) MLL 遺伝子異常を伴う変異型 MLL では、MLL1-AF9 融合型のみで、MLL2, 3, 4 では報告がない。

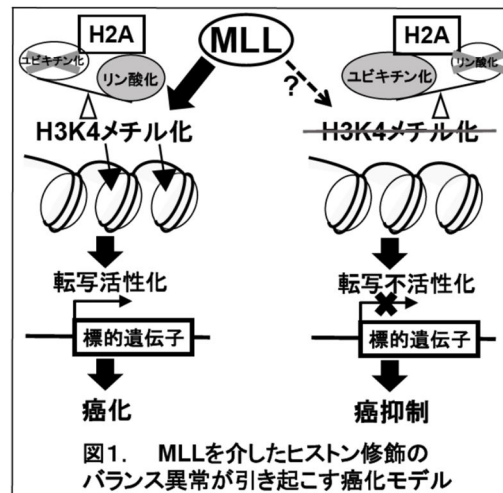


図1. MLLを介したヒストン修飾のバランス異常が引き起こす癌化モデル

MLL遺伝子	変異がみられる癌 (頻度順)	報告症例数	Setdメイン変異 (%)
MLL1	1. 大腸癌 2. 肺癌 3. 膀胱癌	305	22.9
MLL2	1. 血液腫瘍 2. 大腸癌 3. 肺癌	627	37.0
MLL3	1. 肺癌 2. 大腸癌 3. 乳癌	845	28.3
MLL4	1. 子宮内膜癌 2. 大腸癌 3. 肺癌	236	26.2

表1 MLL遺伝子変異の検出される癌、報告症例数およびSetdメイン変異頻度

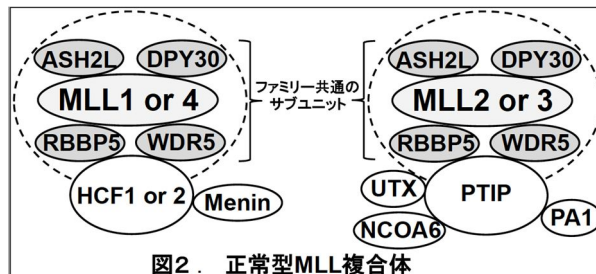


図2. 正常型MLL複合体

白血病の分子療法として、MLL1-AF9 融合変異体の複合体成分の DOT1L(図 3)を阻害する EPZ-5676 は、臨床試験中である (Ford *et al.*, Cancer Genet. 2015)。同複合体成分の BRD4 (図 3)を阻害する JQ1 は、ファースト・イン・クラスとして画期的ではあ

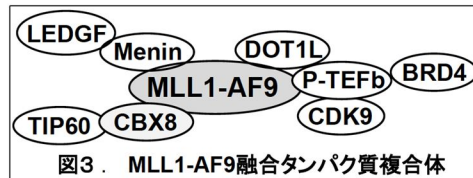


図3. MLL1-AF9融合タンパク質複合体

るが、癌細胞の薬剤耐性の獲得が問題であり (Fong *et al.*, Nature 2015) 二次的、三次的な薬剤の選択や開発が切望されている。また、MLL2, 3, 4 変異複合体因子の同定やそれらを標的とした有効な治療法については現段階で未到達である。また肺癌などの固形癌の発生・進行における MLL の役割は不明である。本研究の独創的な点は、**固形癌の MLL 変異体特有の構成因子を同定し、ヒストン H3K4 メチル化異常を介した癌発生・進展の分子メカニズムを解明することにある。**本研究は、MLL 遺伝子異常を有する固形癌に対する早期診断・予後診断や、より有効な分子標的療法の発見につながる礎となる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究は、ヒストン H3K4 メチル化酵素 MLL の遺伝子変異・融合がエピゲノム変化をもたらし、細胞を癌化させる分子メカニズムを解明することが最終目標である。MLL によるヒストンのメチル化異常を指標に、癌化に関わる MLL の変異を選択し、変異型 MLL の標的癌遺伝子または癌抑制遺伝子を網羅的に同定し、癌化経路特定の足がかりとする。また、変異型 MLL に特異的な複合体因子を同定し、変異型 MLL 複合体によるクロマチン構造・転写制御の分子メカニズムを明らかにする。さらに変異型 MLL 複合体阻害化合物の探索を行い、癌研究基盤ならびに臨床応用に貢献できる基礎的な知見を得ることが、将来的な展望である。

3. 研究の方法

以下の3つの課題に取り組み、変異型 MLL 複合体構造の全貌や、変異型 MLL 依存的な発癌、あるいは癌進行の分子メカニズム解析を試みる。

(1) H3K4 メチル化活性を指標に、変異型 MLL 依存性癌細胞株を探索する。

癌細胞株および患者検体のゲノム配列データベース、COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer)を用いて検索した結果、750 種類程度存在する MLL 変異を持つ癌細胞株のうち、SET ドメインに変異が存在する細胞株を優先に 15 種類見出した (表 2)。SET ドメイン以外の領域も H3K4 メチル化活性調節に関与する可能性も考慮し、H3K4 メチル化状態を調べる細胞種を選び出し、ATCC 細胞バンクから入手して解析を開始した。

細胞株	変異遺伝子	変異の種類	由来
NCI-H1836 NCI-H1963	MLL1	K2434E Q605fs*17	小細胞肺癌 小細胞肺癌
NCI-H209 NCI-H1734 NCI-H2171 SK-LU-1 Ca-Ski	MLL2	S2614* R2519Q T4028I I5160M Q4079*	小細胞肺癌 肺腺癌 小細胞肺癌 肺腺癌 子宮頸癌
NCI-H1435 NCI-H1688 NCI-H1869 NCI-H2342	MLL3	S3394R V4859L A117V G313*	肺腺癌 小細胞肺癌 肺扁平上皮癌 肺腺癌
NCI-H1048 NCI-H1435	MLL4	E2429* R1057W	小細胞肺癌 肺腺癌
KOCL33 THP-1	MLL1-ENL MLL1-AF9	融合遺伝子 融合遺伝子	白血病 白血病

表2 MLL遺伝子変異がある細胞株

※*: ナンセンス, fs*: フレームシフト

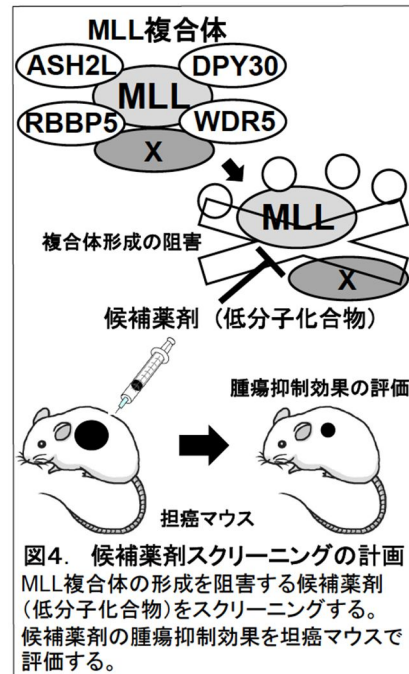
先ずこれらの細胞と、申請者所属研究室で所有する固形癌・血液腫瘍細胞約 60 種類を比較して、ウェスタンブロットングを用いて H3K4 メチル化状態を確認する。上記細胞を材料に抗 MLL 抗体を用いた免疫沈降で MLL 複合体を精製し、塩透析法で作製したクロマチンを基質とした *in vitro* メチル化アッセイを行う。の結果を総合的に判断し、**変異型 MLL がもたらす H3K4 メチル化が異常に高レベルもしくは低レベルの癌細胞を特定する。**この実験は、計画 II-III の方向性を定めるために非常に重要である。

(2) 変異型 MLL 複合体特有の構成因子や固形癌細胞増殖維持に必須な構成因子を同定する。

変異型 MLL はヘテロに発現するので、変異型 MLL を特異的に認識するペプチド抗体を作製し、免疫沈降を行う。また タグを付加した正常型と変異型 MLL をそれぞれ発現する安定癌細胞株を樹立し、免疫沈降を行う。 の複合体を SDS-PAGE 後、銀染色し、変異型特異的なバンドを見出し、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS/MS) でタンパク質を同定する。同定された因子に対する抗体を用いるなど、変異型 MLL 複合体の精製純度を上げ、複合体構成メンバーの全貌を明らかにする。過去の報告と一致しているか確認するため、正常型 MLL 複合体においても新たな構成因子が見出せる可能性も考慮し、*MLL* 遺伝子変異がないヒト胎児腎臓細胞株 293T 細胞由来の MLL 複合体との比較検討も行う。さらに、同定された因子を siRNA ノックダウンし、細胞増殖抑制を指標として、固形癌細胞の維持に必須なサブユニットの同定も試みる。

(3) MLL 複合体形成の阻害化合物をスクリーニングする。

過去に多くの抗生剤、抗癌剤等の生理活性物質が分離されてきた未知の物質を多数含有する放線菌や海洋微生物の代謝産物のライブラリーを用いて、変異型 MLL 複合体の形成を阻害する低分子化合物を探索する。化合物のスクリーニングは、変異型 MLL と複合体構成因子の共免疫沈降を指標に行う。スクリーニング効率化のため、予め化合物のプール群によるグループ分けを行い、MLL 複合体形成維持に必須な因子を見極めておく (変異型 *MLL* 特異的構成因子の siRNA ノックダウンおよび共免疫沈降実験で判断する)。将来的には、MLL 変異細胞の増殖抑制、担癌マウスモデルにおける腫瘍抑制効果を視野に入れる (図 4)。

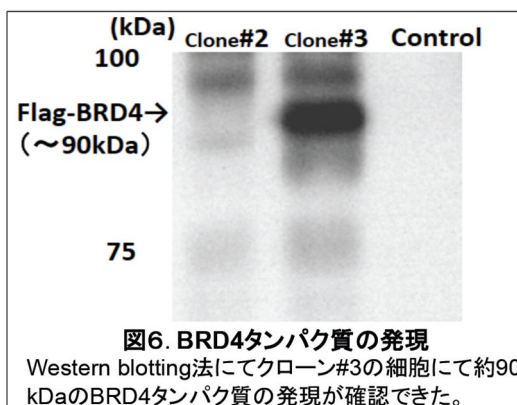


研究体制 -連携研究者及び研究協力者の役割-

申請者が上記の計画を進め、研究全体の統括を行うが、研究分担者である伊藤敬教授が、質量分析を用いた解析を行う。

4. 研究成果

MLL 複合体構成因子として既知の Menin (MEN1) の安定発現 293T 細胞を樹立し、*MLL* 遺伝子変異がない正常型 MLL 複合体を精製した (図 5)。また、BRD4 安定発現 293T 細胞も樹立した (図 6)。加えて、*MLL* 遺伝子変異を有する大腸癌細胞株で



の MLL 複合体構成因子の安定発現細胞株を樹立した。

また、MLL複合体構成因子が固形癌の増殖に重要であること
をヒト子宮頸

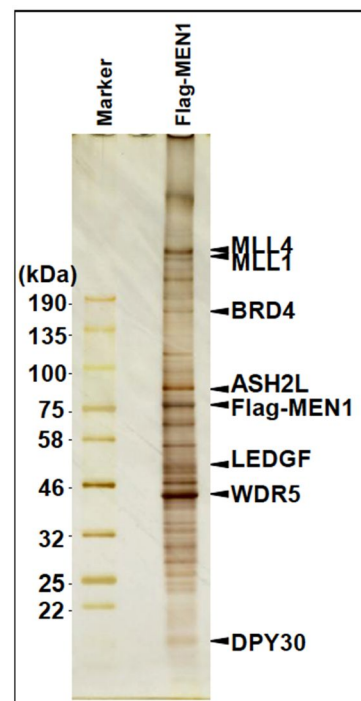


図5. MEN1タンパク質の発現
銀染色法にて、およそ80 kDaのMEN1タンパク質の発現が確認できた。

癌の細胞株であるHeLa細胞（*MLL*正常）でのノックダウン実験により明らかにした。既知のサブユニットであるDPY30, WDR5, RBBP5, BRD4, MEN1などをノックダウンすると癌増殖を抑制した。さらに、申請者所属研究室で所有する固形癌細胞20種類を複合体構成因子のノックダウンにより増殖が抑制される*MLL*遺伝子変異を有する大腸癌細胞株Aと増殖が抑制されない*MLL*変異のない癌細胞株Bを見出した（図7）。

MLL 遺伝子異常を有する固形癌に対する早期診断・予後診断や、より有効な分子標的療法の発見につながる礎となる知見を得るため、*MLL* 複合体形成阻害化合物をスクリーニングする実験系を確立し、候補化合物を含む粗抽出物を同定した（図8）。

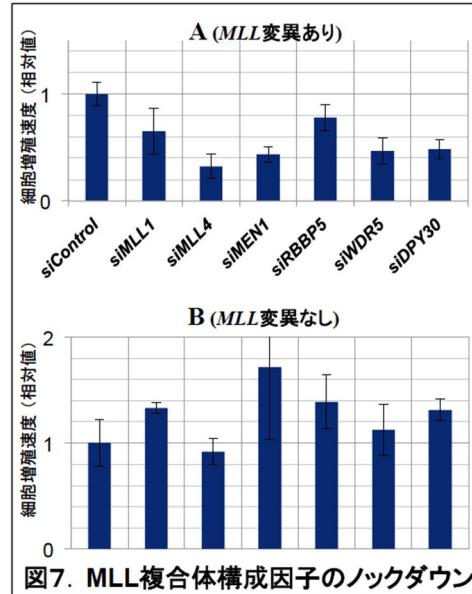


図7. *MLL*複合体構成因子のノックダウン

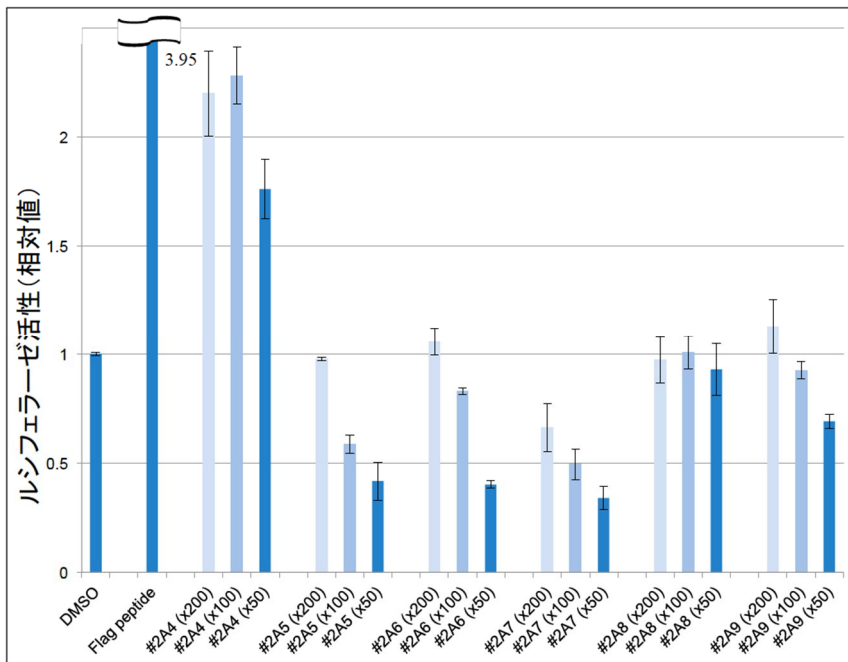


図8. 候補化合物スクリーニング
2A4の粗抽出物のみコントロールのDMSOに比してルシフェラーゼ活性が約2倍高かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊藤 敬 (ITO Takashi) (90306275)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	