

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02972

研究課題名(和文) RUNX転写因子の作用機序をターゲットにした革新的骨肉腫治療戦略の創出

研究課題名(英文) The anti-osteosarcoma strategy targeting functions of RUNX transcription factors

研究代表者

伊藤 公成 (ITO, Kosei)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：00332726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫は代表的なヒト「希少がん」であり、研究者人口が少なく解析が遅れている。そこで、骨肉腫発症の分子メカニズムの解明を目指し、骨肉腫発症モデルマウス(骨芽細胞特異的p53遺伝子欠損マウス/OSマウス)を使用して、Runx転写因子の機能を検討してきた。
その結果、骨肉腫発症の分子基盤は「p53の遺伝子異常に伴う、Runx3によるc-Mycの過剰誘導」であることが判明し、さらにRunx3によるc-Mycの発現誘導に必須なゲノム上の特定エレメント「mR1」を見出した。ゲノム上でこのmR1を改変すると、OSマウスにおいて、極めて効果的な抗腫瘍効果が得られることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、p53非存在下でRunx3によるc-Mycの発現誘導に必要なゲノム上のエレメント「mR1」が、革新的な抗骨肉腫創薬ターゲットになりうることを、マウス生体レベルで確認した。今後はこれらの成果をもとに、核酸標的薬をデザイン・開発してゲノム上でmR1そのものをブロックすること、あるいは、mR1上のRunx3と他の因子の機能を阻害する化合物を同定・開発することで、抗骨肉腫創薬に役立てていきたい。

研究成果の概要(英文)：Osteosarcoma (OS) in human patients is characterized by genetic alteration of TP53. Osteoprogenitor-specific p53-deleted mice (OS mice) have been widely used to study the process of osteosarcomagenesis. However, the molecular mechanisms responsible for the development of OS upon p53 inactivation remain largely unknown. In this study, we detected prominent RUNX3/Runx3 expression in human and mouse p53-deficient OS. Myc was aberrantly upregulated by Runx3 via mR1, a consensus Runx site in the Myc promoter, in a manner dependent on p53 deficiency. Reduction of the Myc level by disruption of mR1 or Runx3 knockdown decreased the tumorigenicity of p53-deficient OS cells and effectively suppressed OS development in OS mice. These results show that p53 deficiency promotes osteosarcomagenesis in human and mouse by allowing Runx3 to induce oncogenic Myc expression via mR1.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：骨肉腫 p53 Runx3 c-Myc

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は代表的なヒト「希少がん」であり、研究者人口が少なく、解析が遅れている。そこで私たちは、骨肉腫発症の分子メカニズムの解明を目指し、ヒト骨肉腫の性状に酷似した骨肉腫を発症するモデルマウス；*Osx-Cre;p53^{f1/f1}* マウス（骨芽細胞特異的に p53 を欠損したマウス / OSマウス）を使用して、ヒトがん発症に広く関与することが知られる Runx 転写因子の機能を検討してきた。これまでの解析から、骨肉腫発症の分子基盤は「p53 の遺伝子異常に伴う、Runx3 による c-Myc の過剰誘導」であることが判明した。さらに Runx3 による c-Myc の発現誘導に必要なゲノム上の特定エレメント「mR1」を見出した。そこで Runx3 による c-Myc 過剰発現を抑制する目的で、マウスおよびヒト骨肉腫細胞において、CRISPER/Cas9 システムを用いたゲノム編集によってゲノム上の mR1 を改変すると、極めて効果的な抗腫瘍効果が得られることが判明した（図 1）。

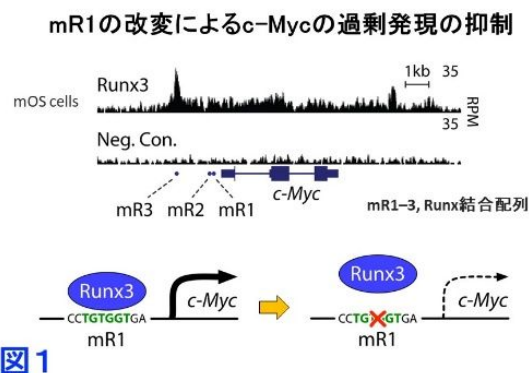


図 1

2. 研究の目的

マウスおよびヒト骨肉腫細胞において、ゲノム上の mR1 を改変すると、極めて効果的な抗腫瘍効果が得られる。そこで本研究では、mR1 そのものが革新的な抗骨肉腫創薬ターゲットになりうるかどうかをマウス生体レベルで検証した。すなわち本研究は、「骨肉腫細胞において確認された mR1 の改変による強力な抗腫瘍効果が生体でも見られるか」「mR1 の改変によって、OSマウスの造腫瘍性をレスキューできるか」を検証することを目的とした。

mR1, 2, 3改変でOSマウスはレスキューできるか？

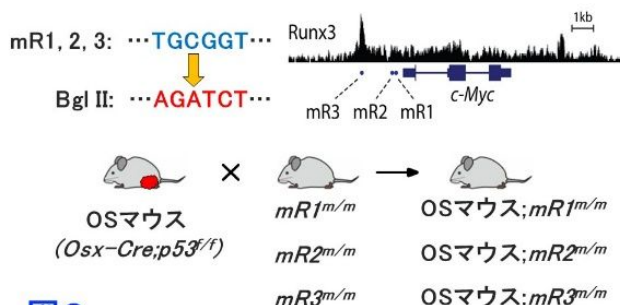


図 2

3. 研究の方法

本研究では、mR1 とその近傍に存在する mR2 と mR3 を合わせ、3 か所において、全身性に制限酵素 *Bgl* サイトに置換したマウスをそれぞれ作出した（図 2）。mR2、mR3 は、mR1 同様 c-Myc のプロモーター領域に存在する Runx3 の結合能が高い Runx 結合配列部位である。特に mR3 は Runx3 の結合量が最大となっているが（図 2）ただ、これらの部位はヒトゲノム DNA 配列との相同性が低い。しかし本研究では、より多角的に検証する目的で、これらをターゲットにしたマウスも併せて作製し、比較することにした。デザインしたドナーDNA と CRISPR/Cas9 システムを受精卵に RNA で導入することによって、mR1、mR2、mR3 の各変異体（*mR1^{m/+}*、*mR2^{m/+}*、*mR3^{m/+}*）マウス

を作出したが、ゲノム編集では off-target の危険性があるため、 $mR1^{m/+}$ 、 $mR2^{m/+}$ 、 $mR3^{m/+}$ マウスにおいて、違う受精卵由来の系統を 2 ライン以上保持・観察し、同じ結果が得られることを確認することにした。さらに、細胞レベルでその重要性が確認

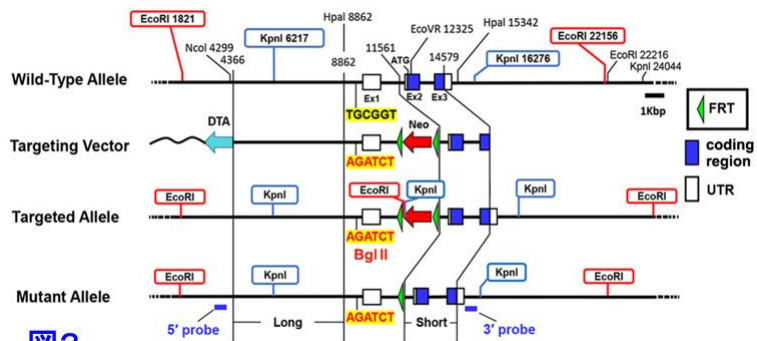


図3

された $mR1$ については、定法の ES 細胞を用いた相同組み換えにより作製した $mR1$ 変異マウスラインも用意して (図 3) 万全を期すことにした。それらから図 2 に示した交配により、以下のマウスラインを作出し、骨肉腫発症が抑制回避できるかどうかを 2 年間観察して検討した。

- A. $Osx/Sp7-Cre; p53^{fl/fl}$ (OS マウス)
- B. $Osx/Sp7-Cre; p53^{fl/fl} mR1^{m/m}$ (OS マウス; $mR1^{m/m}$)
- C. $Osx/Sp7-Cre; p53^{fl/fl} mR2^{m/m}$ (OS マウス; $mR2^{m/m}$)
- D. $Osx/Sp7-Cre; p53^{fl/fl} mR3^{m/m}$ (OS マウス; $mR3^{m/m}$)

4. 研究成果

解析の結果を図 4 にまとめた。それぞれのライン数十匹を 1 年以上観察したところ、 OS マウスに比べて顕著に造腫瘍性が低下したのは OS マウス; $mR1^{m/m}$ のみであった。すなわち、A. OS マウスと比較して、 OS マウス; $mR1^{m/m}$ のみ骨髄間葉系細胞における Myc の発現量が低い。B. OS マウスと比較して、 OS マウス; $mR1^{m/m}$ のみ延命する。C. OS マウスと比較して、 OS マウス; $mR1^{m/m}$ のみ骨肉腫の発症率が低い。これらの結果から、 $mR1$ の特異性・有効性がマウス生体レベルで明らかになった。

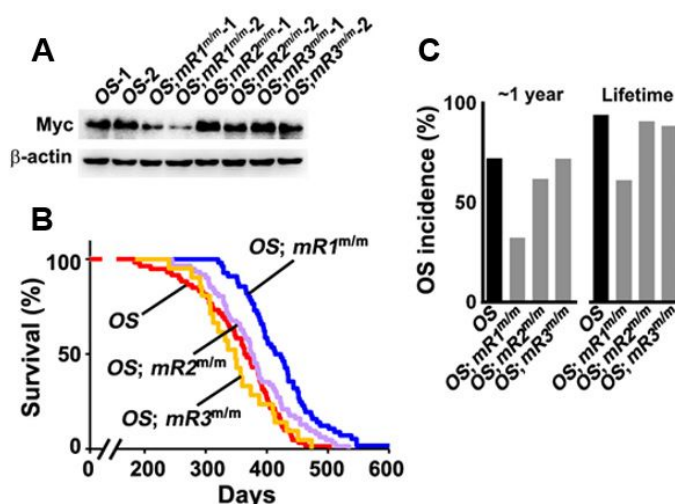


図4 $mR1$ は、 OS マウスの造腫瘍性において重要なエレメントである。

- A. $OS; mR1^{m/m}$ マウスのみ、骨髄間葉系細胞における Myc の発現が低い。
- B. $OS; mR1^{m/m}$ マウスは他に比べ延命する。
- C. $OS; mR1^{m/m}$ マウスの (1 年以内および生涯) 骨肉腫発症率は他に比べ低い。

以上の結果から、これまでに得られた解析結果をすべてまとめると図5のようになる。すなわち、p53 不活性化に伴う造腫瘍能は、Runx3 あるいは Myc のヘテロ欠損、あるいは mR1 のホモ欠損によって、同様に減弱させることが可能であり、p53 非存在下で Runx3 による c-Myc の発現誘導に必要なゲノム上のエレメント「mR1」は、革新的な抗骨肉腫創薬ターゲットになりうることをマウス生体レベルで確認できた。

今後は、この mR1 を阻害することで革新的な抗骨肉腫戦略となる創薬へ進展させたいと考えている。その方向性として、核酸標的薬をデザインしてゲノム上で mR1 そのものをブロックするか、あるいは、mR1 上の Runx3 と他の因子の機能を阻害する化合物を同定・開発するか、2つの方法が考えられる。

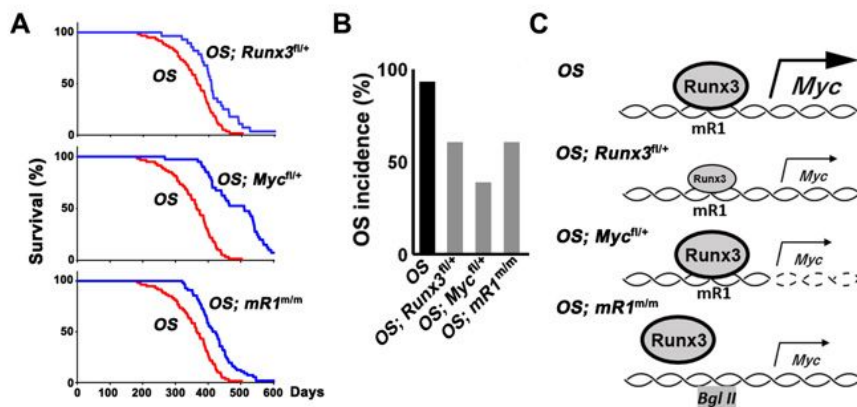


図5 Runx3あるいはMycのヘテロ欠損、あるいはmR1ホモ変異は、同様にOS マウスをレスキューする。

- A. OS マウスは、Runx3あるいはMycのヘテロ欠損、あるいはmR1のホモ変異で延命した。
- B. OS マウスの造腫瘍性は、Runx3あるいはMycのヘテロ欠損、あるいはmR1のホモ変異で減弱した。
- C. Runx3ヘテロ欠損、Mycヘテロ欠損、mR1のホモ変異は、同じ結果をもたらした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Date Y and Ito K	4. 巻 43
2. 論文標題 Oncogenic RUNX3: A Link between p53 Deficiency and MYC Dysregulation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules and Cells	6. 最初と最後の頁 176-181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14348/molcells.2019.0285.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Date Y, Otani S, Ueno T, and Ito K	4. 巻 80
2. 論文標題 The oncogenic Runx3 - Myc axis defines p53-deficient osteosarcomagenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 301-301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1538-7445.AM2020-301	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kosei Ito
2. 発表標題 Oncogenic Runx3 in osteosarcoma development.
3. 学会等名 第22回 International RUNX conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大谷昇平, 伊達悠貴, 伊藤公成
2. 発表標題 p53 represses c-Myc by inhibition of Runx3 to suppress osteosarcoma development.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊達悠貴, 大谷昇平, 伊藤公成
2. 発表標題 mR1 is an essential genomic element for p53-deficient osteosarcomagenesis.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤公成
2. 発表標題 骨肉腫発症におけるRUNX転写因子の役割
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上野智也, 伊達悠貴, 伊藤公成
2. 発表標題 TGF- β upregulates Runx3 to promote osteosarcomagenesis
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤公成
2. 発表標題 骨肉腫発症におけるがん遺伝子RUNX3の役割
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大森景介、伊達悠貴、大谷昇平、伊藤公成
2. 発表標題 がん遺伝子RUNX3は骨肉腫発症においてC/ebp の発現を抑制する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊達悠貴、大谷昇平、上野智也、伊藤公成
2. 発表標題 RUNX3 upregulates c-MYC via mR1 - an essential genomic element for p53-deficient osteosarcoma-genesis
3. 学会等名 米国がん学会 (AACR 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 がん遺伝子の転写調節領域	発明者 伊藤公成	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/023028	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 分子硬組織生物学 http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/dokuji/mbb/
--

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------