

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07630

研究課題名（和文）急性骨髄性白血病の発症と維持における転写因子Bach2の機能解明

研究課題名（英文）Functional elucidation of transcription factor Bach2 in the development and maintenance of acute myeloid leukemia

研究代表者

伊藤 亜里（Itoh-Nakadai, Ari）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・客員研究員

研究者番号：90749772

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、多能性前駆細胞において、ミエロイド遺伝子を抑制するBACH2のAMLでの機能を明らかにすることを目的とした。まず、マウスで発見された前述のBACH2の機構がヒトでも存在することを臍帯血から採取したヒト造血幹細胞と免疫不全マウスを使った分化実験で明らかにした。その後、患者から採取したAML細胞でBACH2の発現を低下させることにより増殖能が低下するAML検体があることを見出した。タンパク質マルチパラメーター解析で、BACH2とミエロイド系転写因子との発現相関が高い検体と低い検体があることがわかった。この相関とBACH2によるAMLの増殖・生存の機能制御との関連性を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液細胞のがんであるAMLは、複数の要因で発症することが知られており、その発症と増殖維持機構の解明は個別の発症機序によるAMLの治療戦略につながる可能性がある。AMLは遺伝子の発現を調節する転写因子の機能の異常でも発症する。本来は寿命の短い単球や顆粒球に分化するはずの未熟な細胞が転写因子の異常で分化できずに増殖し続ける。本研究では、リンパ球で発現し、ミエロイド分化を抑制する転写因子BACH2のAMLでの働きを解析した。BACH2の発現を低下させると増殖が弱まるAMLが存在することがわかり、BACH2の異所性の機能亢進がAMLの維持に関与している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to clarify the function of myeloid repressor BACH2 in AML. First, we demonstrated that the BACH2 mechanism discovered in mice also exists in humans by differentiation experiments using human hematopoietic stem cells collected from umbilical cord blood and immunodeficient mice. Subsequently, we found that downregulation of BACH2 expression in some AML cell clones from patients reduced proliferative capacity. Protein multiparameter analysis by CyTOF revealed that AML cells with high and low expression correlation between BACH2 and myeloid transcription factors. We are investigating its relationship to the functional regulation of AML proliferation and survival.

研究分野：免疫学

キーワード：Bach2 AML 急性骨髄性白血病 C/EBPa 転写因子

### 1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (AML) の転写因子異常による発症機序と問題点：血液細胞のがんである AML は、複数の要因で発症することが知られており、その発症と増殖維持機構の解明は個別の発症機序による AML の治療戦略につながる可能性がある。AML は、染色体転座により、細胞増殖促進因子やサイトカインシグナル伝達因子の遺伝子が高発現することなどで発症するが、分化を調節する転写因子の遺伝子変異によっても引き起こされる。顆粒球分化のマスターレギュレーターである C/EBP $\alpha$  は、ロイシンジッパー構造を有する転写調節因子で、CEBPA 遺伝子にコードされる。CEBPA 遺伝子の変異は、AML 患者の 10% に見られ、そのうちの半数は、CEBPA 遺伝子の単独変異である。CEBPA 遺伝子の変異により、Trans activation domain1 (TAD1) が欠失した 30kDa の C/EBP $\alpha$ p30 が産生され、AML 発症の原因となる (Avellino, R., and Delwel, R. Blood 2017)。C/EBP $\alpha$ p30 は、DNA 結合能を保存していることから、正常な C/EBP $\alpha$ p42 と二量体を形成し、C/EBP $\alpha$  の機能を阻害すると考えられている。一方で、Cebpa 欠損マウスでは白血病を発症しないことから、C/EBP $\alpha$ p30 による AML の発症は、C/EBP $\alpha$  の機能欠失ではなく、機能変化が原因であると予想されるが、その詳細は明らかではない。

ミエロイド抑制転写因子 Bach2 と C/EBP ファミリーの拮抗と AML の関係と問題点：C/EBP $\alpha$  と同じくロイシンジッパー構造を有する転写抑制因子である Bach2 は、B 細胞の最終分化過程であるクラススイッチと体細胞突然変異に必須の転写因子である。申請者は、Bach2 が、多能性前駆細胞及びリンパ球前駆細胞において、ミエロイド遺伝子を抑制することで、リンパ球分化を促進する事を見出した (Itoh-Nakadai A., et al. Nat. Immunol. 2014, Itoh-Nakadai A., et al. Cell Reports 2017)。その過程で、Bach2 は、C/EBP $\alpha$  や C/EBP $\beta$  と同一の標的遺伝子の発現調節を行い、両者は機能的に拮抗していた (Itoh-Nakadai A., et al. Cell Reports 2017, Kato, H., Itoh-Nakadai A., et al. Nat. Immunol. 2018)。さらに、申請者は、マウスの造血幹細胞、前駆細胞分画 (HSPCs) に Bach2 遺伝子を導入し、マウスに移植すると、ミエロイド分化が抑えられること、c-Kit 陽性の未熟な細胞がコントロール細胞の 7 倍に増加すること (未発表) を発見した。これらの結果から、強力なミエロイド分化能を持つ HSPCs やミエロイド前駆細胞では Bach2 の発現は低く保たれているが、Bach2 が過剰に働いてしまうと、AML 様の症状を呈する可能性が示唆された。しかし、これらの解析はすべてマウスで行われており、ヒトでもこの機構が存在するか不明である。

### 2. 研究の目的

急性骨髄性白血病 (AML) は、主に顆粒球やマクロファージなどのミエロイド系の前駆細胞が分化できずに増殖し続ける病気で、細胞の分化や増殖を調節する転写因子の機能変化によっても引き起こされる。C/EBP $\alpha$  は、顆粒球分化に必須の転写因子で、その変異は、AML の発症の一因である。Bach2 は、ミエロイド分化を抑制することでリンパ球分化を促進する転写抑制因子である。C/EBP ファミリーと Bach2 は、同一の標的遺伝子の発現を逆方向に調節し、ミエロイド系とリンパ球系の分化を調節している。申請者は、マウスの多能性前駆細胞で、Bach2 が過剰に働くと c-kit 陽性の未熟な細胞分画の増殖促進と、ミエロイド分化を抑制することを見出した (未発表)。そこで、本研究では、BACH2 が AML の発症と維持に関わる可能性を、臍帯血や Patient derived xenograft (PDX) を用いた実験系で解析することを目的とした。

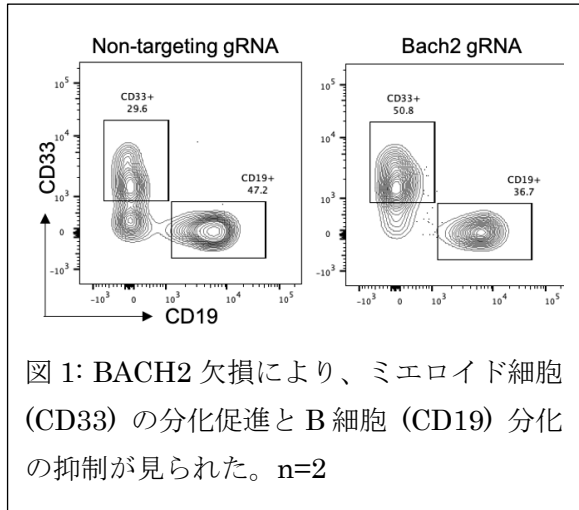
### 3. 研究の方法

・ BACH2 遺伝子及び他の転写因子の欠損には、gRNA と Cas9 タンパク質複合体 (RNP) をエレクトロポレーション法により導入する CRISPR 法を用いた。臍帯血や PDX はその時の細胞の状態での KO 効率が変化する。そこで、実験ごとに CD45 遺伝子の RNP を導入した細胞を準備し、実験の遺伝子欠損効率を予測した。BACH2 遺伝子の発現には、pHR\_SFFV (Addgene) に in fusion を用いて Bach2 遺伝子を導入した発現ベクターを使用した。コントロールとして、pHR\_SFFV-GFP を作成した。遺伝子発現ベクターは 293T 細胞にヘルパーベクターと主にリン酸カルシウム法で導入し、ウイルスを作製した。

・ 患者から採取された AML は、生後二日の NOD/SCID/IL2rg<sup>null</sup> マウスに移植された。移植後 6 週以降に解剖し、骨髄及び脾臓の細胞をサンプルとした。

・ タンパク質マルチ発現解析は、CyTOF (Helios) を用いて 30 種類前後のタンパク質を金属ラベルした抗体で検出した。

#### 4. 研究成果



た HSC を免疫不全マウス (NSG マウス) に移植し、分化能を調べた。ヒト CD45 中の CD19 の割合は減少傾向、CD33 の割合は増加傾向にあった (図 1)。これらの結果は、マウスで観察されている BACH2 の機能と類似していた。次に、レンチウイルスを用いて、BACH2 遺伝子を過剰発現した HSC を、NSG マウスに移植した。その結果、ヒト CD45 を発現した幼弱な赤血球の割合の有意な減少とミエロイド細胞の増加傾向が見られたが、CD19 については変化が見られなかった。造血幹細胞及び、多能性前駆細胞、B 細胞で BACH2 タンパク質の発現を調べたところ、有意な差が見られなかった (図 2) ことから、これらの細胞ではすでに十分量の BACH2 タンパク質が存在し、過剰発現系でミエロイドと B 細胞の分化の変化が見られなかったのではないかと考えられた。

遺伝子欠損実験より、BACH2 がヒトでもマウスと同様にミエロイド分化を抑制すると考えられたことから、BACH2 の AML での機能を検証した。AML での BACH2 の発現は、正常の CD34<sup>+</sup>細胞より低かった (図 1)。CEBPA の変異のある 2 つの検体 CEBPA p1 及び CEBPA p2 で BACH2 の発現を調査したところ、変異のない WT p2 と比べて高い検体 (CEBPA p1) と低い検体 (CEBPA p2) があつた (図 1)。このことから、AML での BACH2 の発現は、CEBPA の変異の有無だけでは説明されないことがわかった。また、BACH2 の発現は、全ての AML 検体で、脾臓で最も高く、次に骨髓、末梢血の順であつた ( $P < 0.0001$ )。次に、BACH2 の有無による AML への影響を評価した。C/EBP $\alpha$  をコードする遺伝子である CEBPA の変異を有する 1 検体 (C/EBPa p1) と、変異を持たない 4 検体の AML 細胞に対し、BACH2、C/EBP $\alpha$ 、及びその類縁因子である、BACH1 と C/EBP $\beta$  の遺伝子を CRISPR 法で欠損させた (表 1)。このとき同時に CD45 遺伝子の欠損を行い、AML の遺伝子欠損の割合を予測した。BACH2 欠損を行ったところ、C/EBPa p1 では、non targeting gRNA に対し、90%程度の細胞数であり、大きな影響は見られなかった (表 1)。

BACH2 と機能の一部を補完できる BACH1 との同時欠損では、74%に減少した。WT p3 では、BACH2 単独欠損で生細胞数は 35%にまで減少し、BACH2 が単独で増殖もしくは生存を支持している AML も存在することが示唆された。この検体ではむしろ 2 重欠損をすると生細胞数は 69%と BACH2 単独欠損より傷害は少なかった。アポトーシス抑制因子である MCL1 の欠損で最も死細胞が増加したこと、FLT3-ITD 変異がある検体で、FLT3 の欠損での影響を最も受けることを、観察することができ、実験系の有効性を確かめることができた。

最後に、BACH2 の AML での発現量の比較と C/EBPa を含む、転写因子群との関連をタンパク質マルチ発現解析 (CyTOF) で調査した。正常 CD34<sup>+</sup>細胞では、C/EBPa、

ヒト細胞で BACH2 の機能を検証するため、ヒト臍帯血由来の造血幹細胞、及び Patient derived xenograft (PDX) マウスの体内から採取した AML 細胞における遺伝子増減の手法を確立した (研究の方法に示した)。ヒト造血幹細胞分画 (HSC: CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>) は、ヒト造血前駆細胞分画 (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) とエレクトロポレーションの至適条件が異なることを見出した。患者から単離した AML は、株化されている AML 細胞に比べて増殖能が弱く、in vitro で長期に培養することができない。我々は、PDX マウスの骨髓もしくは脾臓から採取した AML 細胞を速やかにエレクトロポレーションすることで、70%前後の AML 細胞で CRISPR による遺伝子欠損が可能となることを発見した。BACH2 を欠損し

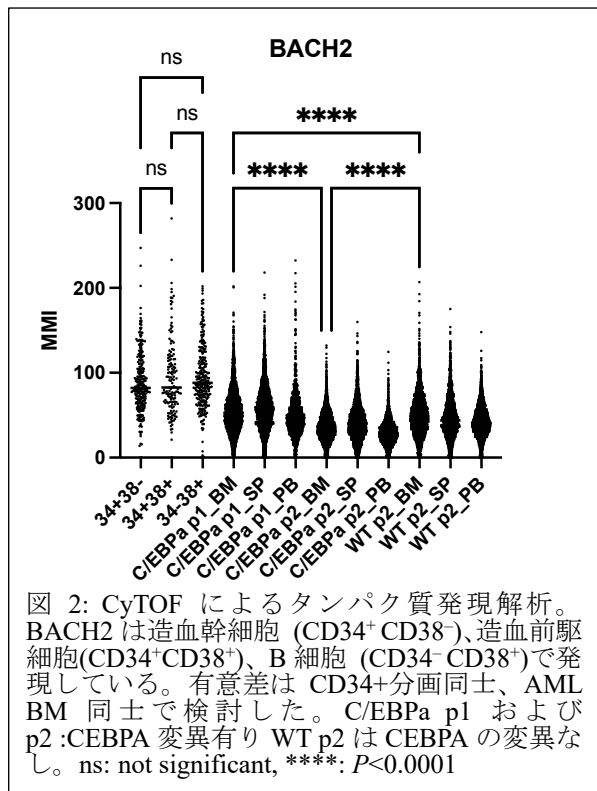


表 1: AML に対して各遺伝子の欠損を行い、3 から 5 日間培養後、1well あたりの細胞数を測定した。Non targeting gRNA をエレクトロポレーションしたものを 100% として各 well の割合を算出した。n.a. (no analysis)

FLT3-ITD	C/EBPa	ID	CD45	FLT3	MCL1	BACH1	BACH2	BACH1&BACH2	CEBPA	CEBPB	CEBPA&CEBPB
ITD	monoallelic	C/EBPa p1	17	n.a.	n.a.	n.a.	89	74	74	n.a.	56
WT	WT	WT p1	23	94	43	63	101	84	50	53	46
ITD	WT	WT p2-1	32	74	22	90	92	67	70	80	n.a.
ITD	WT	WT p2-2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	92	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
ITD	WT	WT p3	49	27	7	66	35	69	80	n.a.	70
ITD	WT	WT p4	37	61	19	78	81	62	83	69	n.a.

IRF4, CD19、で高く、IRF8、GATA2 では低かった。AML では C/EBPa p1 では、Bach2 と他の転写因子の発現に相関が全く見られなかったのに対し、C/EBPa p2、C/EBPa p3、WT p2 では、IRF4、TCF1、C/EBPα の間で強い相関が見られた。C/EBPα と PU.1、IRF4 の相関は、正常 CD34<sup>+</sup> でも AML でも非常に高かった。これらのことから、AML では、ミエロイド系の転写因子の強固なネットワークが存在し、BACH2 はこれと同調して発現するときと、関係しない時があると考えられた。

##### 5. まとめ

BACH2 は多くの AML で発現するが、その量は多能性前駆細胞よりも低いことがわかった。また、BACH2 欠損で細胞数が減少する AML のタイプが存在する可能性が示唆された。ヒトでは正常 CD34<sup>+</sup> 細胞でも AML 細胞でも C/EBPα と BACH2 の排他的機能を確認することができなかった。今後は BACH2 の欠損で増殖の障害を受ける AML について調査し、AML でのリンパ球転写因子の働きを探索する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊藤亜里
2. 発表標題 急性骨髄性白血病の予後不良因子CD25を標的としたケモカイン受容体発現CAR-T細胞の開発
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ari Itoh-Nakadai, Yoriko Saito, Fumihiko Ishikawa
2. 発表標題 The examination of chemokine receptor for targeting poor prognosis leukemia with CD25-targeted CAR T cell therapy
3. 学会等名 第80回 日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ari Itoh-Nakadai, Yoriko Saito, Mariko Murasawa-Tomizawa, Hiroshi Kajita, Takehisa Matsumoto, Masashi Matsuda, Takashi Watanabe, Mikako Shirouzu Osamu Ohara, Haruhiko Koseki, Leonard Shultz and Fumihiko Ishikawa
2. 発表標題 CXCR4-Expressing Anti-CD25 CAR T-Cells Effectively Eliminate Human AML Cells In Vivo
3. 学会等名 62nd ASH annual meeting and exposition (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ari Itoh-Nakadai, Yuho Najima, Rintaro Ono, Masashi Mastuda, Kaori Sato1, Mariko Murasawa-Tomizawa, Osamu Ohara, Haruhiko Koseki, Fumihiko Ishikawa
2. 発表標題 Creation of HLA class I and class II Tg NOD/SCID/Il2rgKO (NSG) mice for studying interaction between human immunity and leukemia
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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