

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08846

研究課題名(和文)造血転写制御への新規介入方法の探索とその臨床応用に向けた研究

研究課題名(英文) Search for novel intervention methods for hematopoietic transcription control and research for its clinical application

研究代表者

奥田 司 (Okuda, Tsukasa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30291587

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)：RUNX1は造血細胞の発分化において重要な役割を担う転写因子であり、その遺伝子異常は高頻度にヒト白血病の発症に關与する。本研究ではRUNX1の作用メカニズムについて多面的な解析を行った。その結果、(1)RUNX1の生物作用に重要となる翻訳後修飾の標的となるアミノ酸残基を何カ所か特定した。(2)RUNX1と会合する新規抑制因子と新規活性化因子を同定し検討を加えている。(3)RUNX1とSNF5との關連性を検討するうえで役立つ細胞株を新規樹立した。そして(4)RUNX1によって転写制御を受ける新規標的遺伝子としてTRAILとC11orf21を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RUNX1は造血関連転写因子であり、これまでの多くの先行研究からは、この分子の機能不全が高頻度にヒト白血病の発症に關与していることが明らかにされている。明らかにRUNX1は次世代の新規白血病予防・治療薬や造血細胞制御薬などの開発における新規標的分子と見なされているものの、その機能の詳細が不明なことが、開発上の隘路となっていた。本研究によって新規に見いだされた知見はRUNX1の作用メカニズム・調節メカニズムの理解を多面的に進める意義があるものと考えている。こうした研究の延長上に新たな造血器疾患克服への道筋が見いだされるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：RUNX1 is a transcription factor that plays important roles in the development and differentiation of hematopoietic cells, and its genetic alteration is frequently involved in the development of human leukemia. In this study, we performed a multifaceted analysis to look into the molecular mechanism of RUNX1 function. As a result, (1) several amino acid residues targeted for post-translational modification, which are important for the biological action of RUNX1, were identified. (2) New inhibitory factor and novel activator that interact with RUNX1 were identified and now are under investigation. (3) New cell lines were established that should serve as the useful tools for further analysis of the interplay of RUNX1 and SNF5. (4) We found TRAIL and C11orf21 as novel target genes that are transcriptionally regulated by RUNX1.

研究分野：腫瘍生化学

キーワード：造血器腫瘍 転写制御 染色体転座 RUNX1 AML1 分子標的薬 Yeast Two-Hybrid 遺伝子改変マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血発生制御においては一連の転写因子群が細胞分化の運命決定に重要な役割を果たしているとともに、こうした転写因子の機能異常が白血病発症に深くかかわることが知られる。典型例の一つが RUNX1 (AML1) である。この遺伝子は急性骨髄性白血病 (AML) における 8;21 染色体転座の切断点からクローニングされたものであり、AML 症例全体の 15-20%、骨髄異形成症候群 (MDS) 症例の 5-10% という高頻度で遺伝子異常の標的となる。RUNX1 はヘテロ 2 量体である core binding-factor の DNA 結合サブユニットであり、転写因子複合体として配列特異的 DNA 結合を介して GM-CSF や M-CSF 受容体などのプロモーターを活性化し、造血に関わる一連の標的遺伝子群の転写調節に携わる。

染色体転座によって生じる融合型 RUNX1 は野生型 RUNX1 の機能をトランス・ドミナントに抑制することで血球分化障害を起こし、また先天性/散発性の RUNX1 点変異も広義のハプロ不全によって白血病発症に関与するものと考えられている。Runx1 遺伝子破壊マウスの解析から、RUNX1 が造血の初期発生において重要な役割を担っていることが明らかにされ、また、Runx1 遺伝子座のノックインマウス、微細変異導入マウス、そして誘導的遺伝子破壊マウスの解析結果などから、RUNX1 が AGM (aorta-gonad-mesonephros) 領域から造血幹細胞が生み出される段階で機能していること、そして成体における血小板造血や T 細胞、B 細胞の分化においても重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

重要なことに、Runx1 欠損表現型は野生型 RUNX1 を適切に再導入することによってレスキューすることが可能であり、他方、転写制御機能に欠陥のある変異体ではレスキューが観察されない。RUNX1 機能の不全が白血病発症を招来していることを考え合わせると、細胞外から手を入れて、RUNX1 の「十全な転写制御能の確保」あるいは「RUNX1 機能を回復」させることが白血病の予防や治療のうえで有効となることを示唆している。

2. 研究の目的

上述のように、RUNX1 による転写調節の障害が造血細胞腫瘍化につながることから、RUNX1 機能の詳細な理解と新規分子標的薬剤開発につながる下記の知見を集めることを目的として研究を行った：

- (1) RUNX1 に生じる翻訳後修飾を解析し、その生物学的意義を明らかにすること。
- (2) RUNX1 と機能的会合を行うコファクターを探索し、そのなかから RUNX1 機能を制御する候補タンパクを同定すること。
- (3) 新たな RUNX1 標的遺伝子を探索しその作用を明らかにすること。

3. 研究の方法

- (1) RUNX1 の翻訳後修飾の解析とその生化学的・生物学的意義の解明。

セリン (S) / スレオニン (T) 残基についてはリン酸化酵素の基質コンセンサスを持つ残基や実際の細胞内タンパクの質量分析によってデータベース上に記載のある部分についてほぼすべてをカバーする 16 か所について、それぞれ非リン酸化アミノ酸を模倣するアラニン (A) やリン酸化アミノ酸を模倣するグルタミン (E) やアスパラギン酸 (D) に置き換えた RUNX1 変異体を site-directed mutagenesis の手法を用いて作製し、それぞれ生化学的特性を解析した。

アルギニン (R) 残基のメチル化変異については、白血病発症家系における遺伝子解析を行って RUNX1 のアルギニン残基の先天的変異の検討を行った。並行して、protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) の標的である R206 と R210 の両者をリシン (K) に変化させた Runx1^{KTAMK/KTAMK} ノックインマウスを対象に、骨髄移植実験系を用いて、こうしたメチル化の欠如がどのように造血幹細胞の特質を変化させるか、検討を行った (共同研究グループ)。

RUNX1 のいくつかのチロシン (Y) 残基についてはフェニルアラニン (F) へ置換する形のノックインベクターの構築を site-directed mutagenesis の手法を用いて行った。

- (2) RUNX1 と機能的会合を行うコファクターの探索とその機能干渉の解析。

RUNX1 の候補会合分子 (DNA 断片) の探索は接合法を応用した Yeast Two-Hybrid (Y2H) 法によって行った。ライブラリーについてはマウス成体由来のもの、胎生中期の胎仔由来のもの 2 種を用いた。Bait としてはマウス Runx1 の全長、5' 側断片、そして 3' 側断片の 3 種を用いた。

検出された候補クローンについては、クローニングまたは分与によって、全長の cDNA を得た。

候補分子の全長 cDNA を用いて RUNX1 との酵母細胞内での会合を、再度の Y2H 再構築によってレポーター遺伝子が発現されるか否かを指標とすることで確認した。

酵母細胞内での相互作用が認められたものについては哺乳動物株細胞内で、野生型 RUNX1 と共発現させた。免疫複合体をいずれかの抗体で沈降させウエスタンブロット解

析を行うことで共沈降の有無を検討した。
候補コファクターについては RUNX1 の転写活性化能にどのような影響を与えるか検討した。
必要性によっては、候補結合因子遺伝子をマウスにおいてノックアウトし、その表現型を観察するとともに、RUNX1 遺伝子変異マウスとのかけ合わせによってその機能相関について動物個体レベルでの検討に供した。

- (3) RUNX1 によって転写調節を受ける新規標的遺伝子の特定とその生物学的意義の解明
RUNX1 結合配列をそのプロモーター領域に持つ遺伝子群や、公的 RNA-seq データベースの再解析で検出する RUNX1 の変異によって発現レベルが大きく変動する遺伝子群の中から candidate-gene approach によって RUNX1 の候補標的遺伝子候補を複数選び出した。
RNA-seq データベースとしては Gene Expression Omnibus(GEO)を参照した。
血液腫瘍症例における遺伝子発現データベースとしては、BloodSpot や Cancer Genome Atlas Research Network(NEJM2013)や The Beat AML program (OHSU, Nature 2018)を参照した。
得られた候補標的についてはそのプロモーター配列をクローニングして、レポーターアッセイによって、RUNX1 の転写標的かどうかの検討を行った。ここでは各種 RUNX1 変異体を用いた検証実験も含めた。
RUNX1 が候補遺伝子プロモーターに結合するか否かについては ChIP Assay を用いて行った。また公開データベースである ChIP アトラスを補完的に参照した。
候補遺伝子については培養細胞中で高発現させて細胞増殖、細胞死、または細胞周期への影響を検討した。分泌タンパクである場合は培養細胞に添加してその影響を検討した。また、生物学的作用については、公開データベースである The Cancer Dependency Map を参照して突合した。

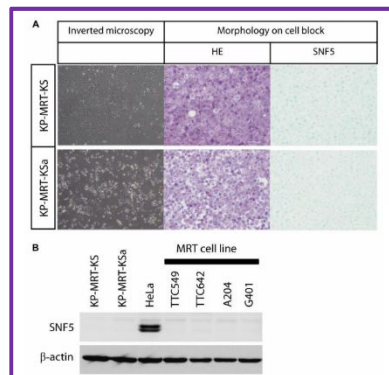
4. 研究成果

- (1) RUNX1 の翻訳後修飾の解析とその生化学的・生物学的意義の解明
当初、既知セリン/スレオニンキナーゼの標的となる 7 か所の S または T 残基の変異体を作製し、その転写活性化能について検討を行った。繰り返し検討を行い 10 か所まで増やして検討したが、いずれも RUNX1 作用に大きな変化は観察されなかった。この結果は多くの先行研究グループの報告と合致した。そこで標的のアミノ酸残基を、既知のキナーゼコンセンサスには該当しないものの、マス解析で実際にリン酸化を受けていることが示されているアミノ酸残基についても追加して、それぞれ変異体を作製した。すると意外なことに、1 か所、変異導入によって転写活性化能が顕著に低下するアミノ酸残基を見出した。文献検索を行ったところ、同じ部位の変異が、血液疾患症例で観察されるとする記載を見出した。現在このアミノ酸残基の化学修飾が、どのような酵素によって行なわれているのか探索している（発表準備中）。
シンガポール大学の研究グループ (Matsumura and Suda) が、自験の家族性白血病家系の解析から RUNX1 の germline での R210K 変異を検出した。当方の作製した KTAMK/KTAMK (R206/210K ホモ接合) マウスを用いた共同研究によって、この変異が確かに造血前駆細胞プールの増大やアポトーシス回避に傾いて全白血病クローンの形成に関与することが明らかとなった (Blood, 2020, 国際共同研究)。
RUNX1 ポリペプチド鎖なかのいくつかの Y 残基もリン酸化を受けることが知られ、先行研究では重要な役割が予想されている。研究代表者らはリン酸化を受けないが同じベンゼン環を側鎖荷物アミノ酸である F 残基に置き換えるベクターを作製し終え、ノックインマウス作製の途上にある（発表準備中）。
- (2) RUNX1 と機能的会合を行うコファクターの探索とその機能干渉の解析。
成体マウス由来ライブラリーを対象とした Y2H スクリーニングで CRP-1 (仮の名称) と呼ぶタンパクをクローニングした。この分子は RUNX1 の N 末端側と相互作用し、RUNX1 の転写活性化能を阻害する。現在こうした細胞レベルの減少が個体レベルでも確認できるかどうか CRP-1 ノックアウトマウスと各種 RUNX1 変異マウスとのかけ合わせ実験によって解明中である。また、*in vitro* ではあるが、この会合を阻害する薬剤の探索も終えている。マウス匹数の調整に手間取っていたが、現在は解消され、近々第 1 報の発表を予定している（発表準備中）。
胎生中期のマウス胎仔由来ライブラリーを用いた Y2H スクリーニングにより十数個の DNA 断片を陽性クローンとして得ている。RUNX1 との相互作用が哺乳動物内で確認できたクローンのうち 1 つは、あるタンパク化学修飾酵素であった。これまで RUNX1 とのかかわりは知られていない。この酵素タンパクに constitutive active 変異を導入し野生型 RUNX1 と共発現させたところ、RUNX1 は化学修飾され、M-CSF-R プロモーターなどの既知標的遺伝子の転写を顕著に活性化することを見出した。一方 R174Q 変異体との共発現ではこのような活性化は見られなかった。RUNX1 を直接修飾して転写活性化をもたら

したことが示されている。現在、この化学修飾の正確な位置と状況の確認作業を行っている（発表準備中）。

RUNX1 はクロマチンリモデリング因子である SNF5 と会合することが先行研究によって過去に報告されているが、その詳細や生物学的意義は明らかにされていない。この相互作用を詳細に解明する第 1 歩として、研究代表者らは SNF5 を持たないヒト腫瘍である malignant rhabdoid tumor (MRT) に由来する細胞株を新規に 2 株樹立してその特性を解析して報告した (*Anticancer Research*, 2020、国際共同研究)(図 1)。

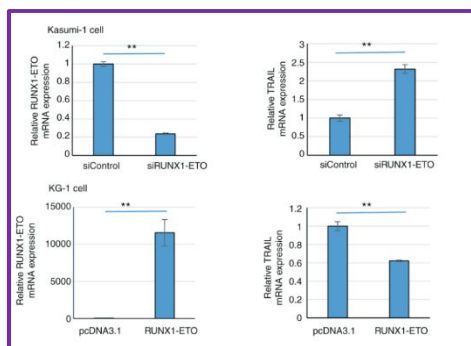
図 1 新規樹立した MRT 由来細胞株 2 種。いずれも SNF5 の発現が観察されないことが分かる(ウエスタンプロットの左の 2 つのレーン)



(3) 当該研究によって同定された新たな RUNX1 標的遺伝子

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)
 TRAIL は TNF スーパーファミリーに属するシグナル伝達リガンドであり、膜結合型あるいは分泌型のアイソフォームが知られている。TRAIL はある種の腫瘍細胞の受容体に結合し、アポトーシスを誘導するが、多くの正常細胞には影響を及ぼさないとされ、新規がん治療薬剤としてその可能性が検討されている生理活性物質である。研究代表者らは TRAIL プロモーターが RUNX1 によって活性化されることを見出した。重要なことに白血病遺伝子である RUNX1-ETO はこの作用を抑制した (図 2)。

図 2 8 ; 21 転座をもつ Kasumi-1 細胞において siRNA による RUNX1-ETO ノックダウンは TRAIL 遺伝子発現の上昇を (上段) 一方 RUNX1 に異常を持たない急性骨髄性白血病細胞である KG-1 では、RUNX1-ETO の強発現によって内因性 TRAIL の発現は抑制される (下段)

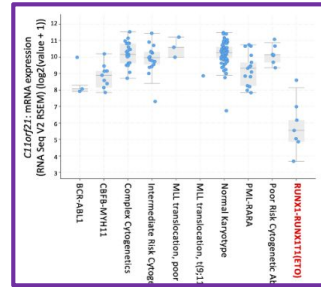


実際公的データベースの 8;21 転座型白血病細胞では TRAIL 発現が顕著に低下していることが示されている。また TRAIL は RUNX1-ETO をもつ白血病細胞株のアポトーシスを誘導することも見出した。以上のように TRAIL 分子の白血病治療における有用性の可能性が示唆された (*International Journal of Oncology*, 2021)。

Chromosome 11 Open Reading Frame 21 (C11orf21)

8;21 型転座を持つヒト急性骨髄性白血病細胞株において誘導的に RUNX1-ETO 白血病タンパクをノックダウンさせ、その RNA 量の変化を RNA-seq で正確にかつ網羅的に検討したデータベースが公開されている。このデータベースを再解析し、最も大きく量的変化した遺伝子として C11orf21 を特定した。C11orf21 のプロモーター配列には RUNX1 結合コンセンサスが認められ、RUNX1 によるレポーター活性はこの部位に変異を入れると消失した。また RUNX1 変異体ではこのプロモーターは活性化されなかった。このようにこの遺伝子は RUNX1 標的遺伝子として典型的なふるまいを呈した。各種公開データベースでも 8;21 転座型白血病で発現の著減が認められた (図 3)。

図3 公開データベースである The Genome Atlas Research Network (TCGA) を再解析して C21orf21 の発現を疾患別に比較したグラフ。右端のレーンのように RUNX1-ETO を持つ白血病症例では際立ってこの遺伝子の発現が低い。



以上のように C11orf21 は定型的な RUNX1 標的遺伝子であり、RUNX1-ETO により強い抑制を受けている。この ORF がコードしているタンパクの生物学的意義は今のところ不明である。研究代表者らによる初期解析でも今のところ明らかな生物作用を解明できていないが、今後の解析によって大きな発見がもたらされる可能性があるものと考えている (BBA Advances, 2022、国際共同研究)。

(4) まとめ

RUNX1 が造血細胞制御や白血病治療の新たな標的分子であることは論を待たない。この分子の機能を細胞外から手を加えて変化させてやる手法の開発が待たれるところである。しかしながら、この分子の詳細な機能調節機構が明らかにされていないことがそうした応用への障害となっている。当該研究では多面的なアプローチによって、それまで知られていなかった RUNX1 機能の詳細のいくつかを明らかにした。こうした知見を総合することによって新規分子標的治療法の確立に向けた新たな展開が遠からず生まれることを期待したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshida Tatsushi, Yamasaki Kenta, Tadagaki Kenjiro, Kuwahara Yasumichi, Matsumoto Akifumi, Sofovic Adem, Kondo Noriko, Sakai Toshiyuki, Okuda Tsukasa	4. 巻 60 (6)
2. 論文標題 Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand is a novel transcriptional target of runt-related transcription factor 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2021.5296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Akifumi, Yoshida Tatsushi, Shima Takahiro, Yamasaki Kenta, Tadagaki Kenjiro, Kondo Noriko, Kuwahara Yasumichi, Zhang Dong-Er, Okuda Tsukasa	4. 巻 2 (100047)
2. 論文標題 C11orf21, a novel RUNX1 target gene, is down-regulated by RUNX1-ETO	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BBA Advances	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadv.2022.100047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 KUWAHARA YASUMICHI, IEHARA TOMOKO, ICHISE EISUKE, KATSUMI YOSHIKI, OUCHI KAZUTAKA, TSUCHIYA KUNIHICO, MIYACHI MITSURU, KONISHI EIICHI, SASAJIMA HIROYASU, NAKAMURA SATOAKI, FUMINO SHIGEHIISA, TAJIRI TATSURO, JOHANN PASCAL D., FRUHWALD MICHAEL C., YOSHIDA TATSUSHI, OKUDA TSUKASA, HOSOI HAJIME	4. 巻 40
2. 論文標題 Novel Two MRT Cell Lines Established from Multiple Sites of a Synchronous MRT Patient	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6159 ~ 6170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.14636	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsumura Takayoshi, Nakamura-Ishizu Ayako, Muddineni Siva Sai Naga Anurag, Tan Darren Qiancheng, Wang Chelsia Qiuxia, Tokunaga Kenji, Tirado-Magallanes Roberto, Sian Stephanie, Benoukraf Touati, Okuda Tsukasa, Asou Norio, Matsuoka Masao, Osato Motomi, Suda Toshio	4. 巻 136
2. 論文標題 Hematopoietic stem cells acquire survival advantage by loss of RUNX1 methylation identified in familial leukemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1919 ~ 1932
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019004292	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 該当する

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tatsushi Yoshida, Kenjiro Tadagaki, Yasumichi Kuwahara, Tsukasa Okuda.
2. 発表標題 A seaweed-derived compound that inhibits growth of acute myeloid leukemia cells.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会(横浜)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasumichi Kuwahara, Tomoko Iehara, Yoshiki Katsumi, Kunihiko Tsuchiya, Mitsuru Miyachi, Tatsuro Tajiri, Tatsushi Yoshida, Tsukasa Okuda, Hajime Hosoi
2. 発表標題 Two New MRT Cell Lines Established from Multiple Sites of a Synchronous MRT with a Unique DNA Methylation Pattern.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会(広島)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 忠垣憲次郎、山崎健太、近藤則子、柴原康通、吉田達士、奥田司
2. 発表標題 転写因子RUNX1/AML1の新規候補標的遺伝子群の探索
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会(横浜)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsushi YOSHIDA, Kenjiro TADAGAKI, Yasumichi KUWAHARA, Toshiyuki SAKAI, and Tsukasa OKUDA
2. 発表標題 Analysis of a novel transcriptional target gene of RUNX1.
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会(京都)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akifumi Matsumoto, Tatsushi Yoshida, Takahiro Shima, Kenta Yamasaki, Kenjiro Tadagaki, Noriko Kondo, Yasumichi Kuwahara, Donger Zhang, Tsukasa Okuda
2. 発表標題 Identification of a novel RUNX1 target by public data re-analysis that is suppressed by RUNX1-ETO
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会（東京）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 健太、忠垣 憲次郎、近藤 則子、桑原 康通、吉田 達士、奥田 司
2. 発表標題 造血関連転写因子 RUNX1による制御遺伝子の探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（福岡）
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
研究 分担者	桑原 康通 (Kuwahara Yasumichi) (30590327)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	
研究 分担者	吉田 達士 (Yoshida Tatsushi) (80315936)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	

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			
米国	University of California San Diego			
シンガポール	National University of Singapore			
カナダ	Memorial University of Newfoundland			
ドイツ	University Hospital Heidelberg	Swabian Children's Cancer Center		