

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08722

研究課題名（和文）がん遺伝子MLL-AF4のRNA結合因子による発がん抑制機構

研究課題名（英文）RNA-binding proteins control the oncogenic activity of MLL-AF4

研究代表者

奥田 博史（OKUDA, Hiroshi）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：10629215

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：がん遺伝子MLL-AF4はt(4;11)転座によって生じ、乳児急性リンパ性白血病の約80%の症例で認められる。本転座を持つ白血病は予後が非常に不良であり新規治療法の開発が強く望まれている。本研究によってMLL-AF4はRNA結合因子によって機能が制御されていることが明らかとなった。本研究結果からRNA結合因子による細胞系列選択的なMLL-AF4の発現抑制機構という概念、MLL-AF4陽性白血病細胞においてRNA結合因子をターゲットした新規抗がん剤を作出する分子基盤、さらにはMLL-AF4陽性白血病に対する薬剤を評価できるマウスモデルを構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってがん遺伝子MLL-AF4はRNA結合因子によって機能が制御されていることが明らかとなった。本研究結果の学術的意義は、RNA結合因子による細胞系列選択的ながん遺伝子発現抑制メカニズムを明らかにしたことである。本研究結果の社会的意義は、MLL-AF4陽性白血病細胞においてRNA結合因子をターゲットした新規抗がん剤を作出するための分子基盤を構築できただけでなく、MLL-AF4陽性白血病に対する薬剤を評価できるマウスモデルを作製できたことである。今後これらの研究成果を基に、MLL-AF4陽性白血病に対する新規抗がん剤開発に繋がることを期待する。

研究成果の概要（英文）：Chromosomal translocation generates the MLL-AF4 fusion gene, which causes 80% of pediatric leukemia cases with worse prognoses. Thus, a novel therapeutic approach is required. Our findings demonstrate that RNA-binding proteins control the oncogenic activity of MLL-AF4. This study establishes a concept for lineage-specific inactivation of the oncogene, the molecular basis for targeting RNA-binding proteins for this leukemia, and the murine leukemia model of MLL-AF4-dependent oncogenesis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：白血病 MLL-AF4 発現制御 RNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) MLL 白血病について

11q23 染色体転座によって生じる MLL 融合遺伝子は急性リンパ性白血病(ALL)と急性骨髄性白血病(AML)でそれぞれ約 6%と 7%の症例で認められる。11q23 転座陽性白血病患者のゲノム解析によってこれまでに 100 種を超える MLL 融合パートナー遺伝子が発見され、特に 6 種のがん遺伝子(MLL-AF4, MLL-AF9, MLL-ENL, MLL-AF10, MLL-AF6, MLL-ELL)が高頻度に認められる(図 1)。MLL 白血病は難治であることから他の白血病より予後が不良であり、新規治療法の開発が強く望まれている。MLL 融合遺伝子はその強力ながん化能のため、実験動物であるマウスにて容易に白血病を発症させることができることから、白血病の発症メカニズムの解明や抗がん剤の薬効の評価に広く使用されている。

(2) MLL-AF4 の特徴

上記のがん遺伝子の中で MLL-AF4 が認められる症例は乳児・小児の B 細胞性 ALL が多く、特に予後不良である。また、このがん遺伝子が認められる AML の症例はほとんどない(図 1)。本がん遺伝子はマウスにて白血病を発症できないだけでなく、細胞を用いたがん化アッセイにおいても機能しないことが知られている。

(3) MLL-AF4 の発現制御機構の発見

遺伝子は DNA から転写によって RNA が産生され、その RNA を基に翻訳によってタンパク質が産生されることで機能する。研究代表者はこれまでの MLL 白血病の一連の研究の中で、MLL-AF4 の RNA は産生されるが転写後の制御によってタンパク質が産生されないことで機能しないことを発見した。これまでに研究代表者は MLL-AF4 の変異体解析によって転写後に制御される配列 (PTRS: post-transcriptional regulatory sequence) を決定した。この PTRS にサイレント変異を加えることで、細胞をがん化させることができたことから、PTRS が転写後制御に関わっていることが明らかとなった。さらに、その PTRS に結合する候補因子 (RNA 結合タンパク質) をタンパク質質量分析にて解析した。

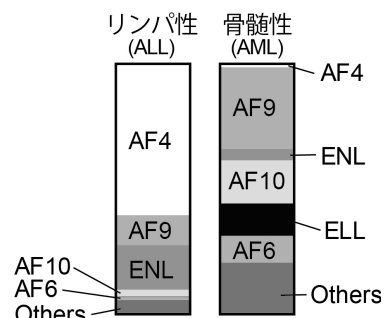


図 1. 急性白血病における MLL 融合パートナー遺伝子別の発症比率

2. 研究の目的

本研究ではがん遺伝子 MLL-AF4 が RNA 結合因子によって転写後制御されるメカニズムを解明した。この解析によって MLL-AF4 の機能を阻害する新たな抗がん剤の開発のための分子基盤と MLL-AF4 陽性白血病に対する薬剤を評価できるマウスモデルを構築した。

本目的を達成するために以下の 2 つの解析を行った。

- (1) MLL-AF4 の転写後制御に関わる因子の同定とそのメカニズムの解析
- (2) MLL-AF4 の転写後制御による細胞系列選択性の解明

3. 研究の方法

(1) MLL-AF4 の転写後制御に関わる因子の同定とそのメカニズムの解析

本研究では PTRS の RNA を用いたプルダウンアッセイにてタンパク質量分析で検出された結合因子の候補の中から、PTRS に結合する因子を同定した。データベース解析を用いて RNA 結合タンパク質が認識する RNA 配列が予測できることから、特定の RNA 結合タンパク質の認識する領域に変異導入してその結合因子が MLL-AF4 発現抑制機構に必要なのかを確認することができる。変異導入した MLL-AF4 を用いた細胞のがん化アッセイでがん化能が現れるのかを評価するとともに、プルダウンアッセイにて変異導入した PTRS の RNA を用いてその因子の結合特異性を確認した。さらに、CRISPR-Cas9 システムを用いて MLL-AF4 発現抑制因子の候補遺伝子をノックアウトすることで、MLL-AF4 の発現抑制が解除される表現型を探索した。また、マウス移植モデルを用いて、PTRS に変異導入した MLL-AF4 の白血病発症能を評価した。

緑色蛍光タンパク質 GFP に PTRS を融合させたレポーターを用いて上記と同様の変異導入を行い GFP レポーターの蛍光の細胞内局在とその蛍光強度を評価した。また、ヒト PTRD を繋いだ GFP レポーターの蛍光が RNA 結合タンパク質と共同存在しているのか確認した。さらに、本レポーターをベイトとして免疫沈降し、共沈降してくる因子の同定を行った。

(2) MLL-AF4 の転写後制御による細胞系列選択性の解明

MLL-AF4 が転写後制御されることによって細胞系列選択性が現れるのかを解析した。研究方法 (1) で明らかとなった MLL-AF4 の発現制御に関わる RNA 結合因子の発現パターンを、MLL 白血

病の患者検体のトランスクリプトームデータを用いて解析した。また、マウスの出生前と出生後の造血前駆細胞における RNA 結合因子の発現パターンを解析することで、MLL-AF4 が転写後制御されないクローンの出現が起こりえるのか評価した。

4. 研究成果

(1) MLL-AF4 の転写後制御に関わる因子の同定とそのメカニズムの解析

研究代表者は MLL-AF4 の PTRS に結合する RNA 結合タンパク質をプルダウンアッセイにて解析した結果、KHDRBS タンパク質ファミリー (KHDRBS1, KHDRBS3)、IGF2BP タンパク質ファミリー (IGF2BP1, IGF2BP2, IGF2BP3)、HNRNP タンパク質ファミリー (HNRNPA0, HNRNPAB, HNRNPC, HNRNPD, HNRNPDL, HNRNPL, HNRNPR, SYNCRIP)、ELAVL1 が PTRS 領域に結合していた。データベース解析により PTRS には 3 つの AU リッチ配列が存在しておりこの 3 つの配列にサイレント変異を導入すると、MLL-AF4 の転写後制御を解除することができたことから、この 3 つの AU リッチ配列の変異体 PTRS のプルダウンアッセイを行うと、KHDRBS タンパク質ファミリーと IGF2BP タンパク質ファミリーの変異体 PTRS への結合が消失した (図 2)。さらにこの変異体 PTRS を持つ MLL-AF4 は細胞をがん化させることができたことから、これらの PTRS 結合因子が MLL-AF4 の転写後制御に関わることが推察された。

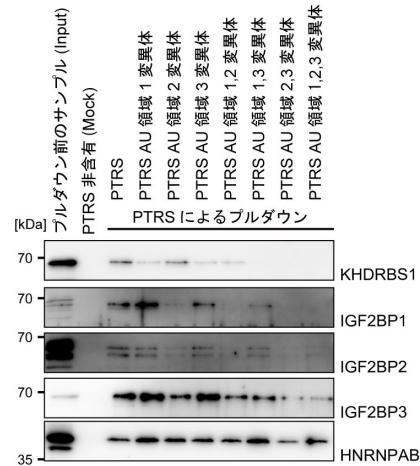


図 2. PTRS に結合する因子のプルダウンアッセイ解析結果

KHDRBS タンパク質ファミリーと IGF2BP タンパク質ファミリーが MLL-AF4 の転写後制御に関わるのか明らかにするために、MLL-AF4 を細胞に導入すると同時に、CRISPR-Cas9 を用いて KHDRBS1, KHDRBS3, IGF2BP1, IGF2BP2 および IGF2BP3 遺伝子をノックアウトして細胞のがん化能を評価した。しかし、各因子を 1 つノックアウトするだけでは細胞のがん化は誘導できなかった。そこで、KHDRBS タンパク質ファミリーが結合する領域に変異を導入した PTRS 領域 1,3 変異体を用いて評価した。この変異体の PTRS には IGF2BP タンパク質ファミリーは結合できるが KHDRBS タンパク質ファミリーは結合できないもので、細胞をがん化させることはできない (図 2 右から三つ目のレーン)。この変異体に IGF2BP1, IGF2BP2 および IGF2BP3 をノックアウトしてみると、IGF2BP3 をノックアウトした場合に細胞をがん化させることができた。このことから、MLL-AF4 の PTRS 領域には KHDRBS タンパク質ファミリーと IGF2BP3 が結合することで、転写後制御されることが明らかとなった。

次に PTRS に変異を持つ MLL-AF4 遺伝子導入造血前駆細胞をマウスに移植すると白血病を発症した。このことから、PTRS が転写後制御を受けることによって白血病の発症を阻害していることが明らかとなった。本成果によって MLL-AF4 陽性マウスモデルを構築でき、今後 MLL-AF4 陽性白血病に対する薬剤評価が可能となると考えられる。

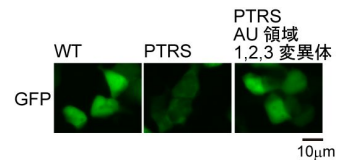


図 3. GFP レポーターの蛍光強度

最後に、緑色蛍光タンパク質 GFP に PTRS を融合させたレポーター遺伝子を用いて上記と同様の変異導入を行い GFP レポーターの蛍光の細胞内局在と蛍光強度を評価した。その結果、GFP レポーターの蛍光強度が PTRS を繋ぐと顕著に減少し、PTRS に変異を導入するとその蛍光強度が戻った (図 3)。また、PTRS を繋いだ GFP レポーターと RNA 結合タンパク質の共存を確認すると、RNA 結合タンパク質と GFP レポーターの蛍光強度は逆相関していた。

さらに、本 GFP レポーターをベイトとして免疫沈降し、共沈降する因子の同定をタンパク質質量分析とウエスタンブロッティングにて行った。その結果、GFP レポーターに PTRS を繋ぐとリボソームのサブユニットが顕著に多く質量分析にて検出され、ウエスタンブロッティングにおいても特異的に GFP-PTRS に結合していた。これらのことから GFP レポーターの翻訳中に PTRS でリボソームが停滞していると考えられた。

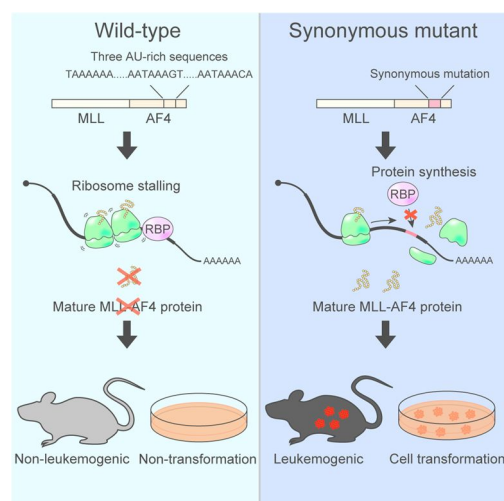


図 4. MLL-AF4 の不活性化の概念図

これらのことを考察すると、MLL-AF4 はその配列の中に PTRS が存在し RNA 結合因子が結合することでリボソームによるタンパク質翻訳を停滞させることで、機能しないことが考えられた(図4)。

(2) MLL-AF4 の転写後制御による細胞系列選択性の解明

研究代表者は次に MLL-AF4 が転写後制御されることによって細胞系列選択性が現れるのか明らかにした。研究方法(1)で明らかとなった RNA 結合タンパク質遺伝子の発現パターンを、MLL 白血病の患者検体のトランスクリプトームデータを用いて解析した。その結果、*KHDRBS3* 遺伝子は急性リンパ性白血病の中で、MLL-AF4 陽性と考えられる検体で有意に低下していることが明らかとなった(図5 赤色のプロット)。

また、マウスの出生前と出生後の造血前駆細胞における RNA 結合因子の発現パターンを解析すると、*IGF2BP3* が発現している造血前駆細胞が出生後徐々に減少することが明らかとなった。

これらのことから、ヒトにおいて MLL-AF4 陽性白血病は、RNA 結合因子である *KHDRBS3* や *IGF2BP3* の発現が減少またはないクローンが選択され、白血病を引き起こす可能性が示唆された。

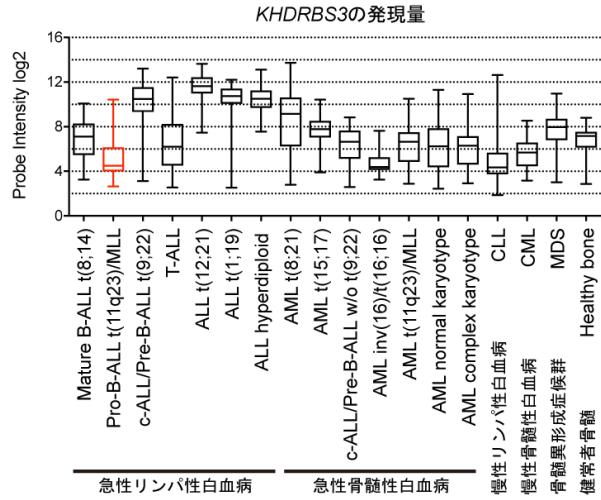


図5. さまざまな白血病の検体における *KHDRBS3* 遺伝子の発現量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okuda Hiroshi, Miyamoto Ryo, Takahashi Satoshi, Kawamura Takeshi, Ichikawa Juri, Harada Ibuki, Tamura Tomohiko, Yokoyama Akihiko	4. 巻 13
2. 論文標題 RNA-binding proteins of KHDRBS and IGF2BP families control the oncogenic activity of MLL-AF4	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-34558-1	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥田博史、宮本亮、高橋慧、市川珠理、原田生起、田村智彦、横山明彦
2. 発表標題 RNA結合タンパク質による MLL-AF4の翻訳阻害メカニズム
3. 学会等名 第26回 造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥田博史、宮本亮、高橋慧、市川珠理、原田生起、田村智彦、横山明彦
2. 発表標題 RNA結合タンパク質による MLL-AF4の発現制御メカニズム
3. 学会等名 第18回血液学若手研究者勉強会（麒麟塾）
4. 発表年 2023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
---------	---------