

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03113

研究課題名(和文) Mycスーパーエンハンサーに着目した骨肉腫発症メカニズムの統合的理解

研究課題名(英文) Integrated understanding of molecular mechanisms of osteosarcoma development focusing on Myc super-enhancer

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)：骨芽細胞特異的p53欠損マウス(OSマウス)を用いて、骨肉腫発症メカニズムの解明を目指した。その結果、TGF β が、p53非存在下でスーパーエンハンサーMycSEを介しRunx3依存的にMycの発現誘導をもたらすことを見出した。そこで、1.MycSEを欠失したマウス、2.MycSEの中心に存在するRunx転写因子結合配列を欠失したマウス、3.TGF β タイプ2受容体を欠失したマウスライン、を導入した。それぞれをOSマウスと交配させ観察したところ、OSマウスと比較して、骨肉腫発症が抑制され、寿命が延長した。

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が明らかになり、TGF β -Runx3-Mycの機軸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できた。今後はこれらの成果をもとに、この機構のなかで中心的な役割をもつRunx3の特異的阻害剤、あるいは、Runx3と他の因子の相互作用を阻害する化合物を同定・開発することで、抗骨肉腫創薬につなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：Osx-Cre;p53f/f mice (herein; OS mice) have been widely utilized to study the mechanisms of osteosarcomagenesis. Using this line, we recently reported that Runx3 aberrantly upregulates c-Myc in the absence of p53, providing a molecular basis for osteosarcoma development. However, the environmental factors contributing to the Myc upregulation by Runx3 remain unknown. In this study, we found that TGF β induces Myc upregulation in a Runx3-dependent manner through a Myc super-enhancer (MycSE) in p53-deficient cells. To further explore the significance of this finding in vivo, we generated the following genetically modified mouse lines; 1. a mouse line lacking MycSE (MycSE^{-/-}), 2. a mouse line lacking the Runx binding sequence within MycSE (MycSE^{Rx} m/m), and 3. a mouse line lacking the TGF β type 2 receptor (Tgfbr2 flox). Each of these lines was crossed with OS mice. The crossed lines exhibited delayed osteosarcoma development and extended lifespan compared to OS mice.

研究分野：分子腫瘍生物学

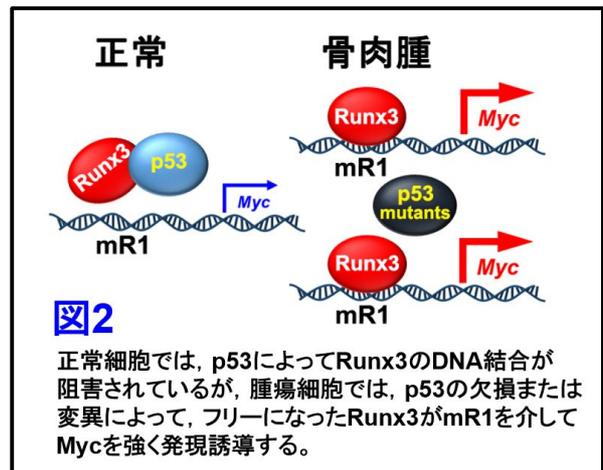
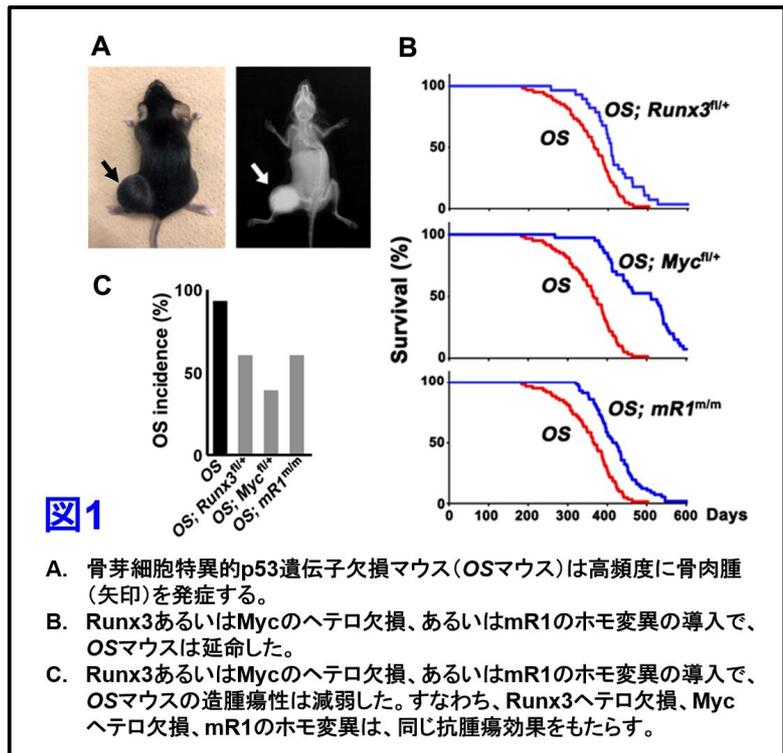
キーワード：TGF β Runx3 Myc スーパーエンハンサー C/ebp

1. 研究開始当初の背景

「がん抑制遺伝子」p53 の遺伝子変異と、「がん遺伝子」Myc の過剰発現は、それぞれ、大半のヒトがんの発症・悪化過程に関わる極めて重要で広範な発がんイベントである。同時に、それを介在する腫瘍微小環境も重要な要因となるが、ほとんど解明されていない。

そこで私たちはこれを解析するため、p53 欠損だけでヒト同様の発がんをマウスモデルで再現できる骨肉腫に着目した。ヒト骨肉腫では、p53 遺伝子の高頻度の不活性化が知られている。前骨芽細胞特異的 p53 遺伝子欠損マウス (*Osx-Cre;p53^{fl/fl}* マウス; OS マウス) (図 1A) は、100%に近い個体がヒト骨肉腫に酷似した腫瘍を発症するため、ヒト骨肉腫モデルとして広く利用されている。そこで、この OS マウスを用いて解析したところ、骨肉腫発症機序の根本は、p53 非存在下における転写因子 Runx3 による Myc の過剰発現であることが判明した。具体的に次の(1)~(4)の知見を得ていた (Refs 1 & 2)。

- (1) ヒトp53欠損型骨肉腫では RUNX3とMYCの発現が顕著に上昇する。
- (2) OSマウスにRunx3あるいはMycのヘテロ欠損を導入すると、延命し骨肉腫の発症が抑制される(図1B, C)。このMyc依存性は既報 (*Science* 297; 102-104, 2002) の結論に合致する。
- (3) p53非存在下で、Runx3はMycプロモーター内Runx3結合配列; *mR1*を介して、Mycの発現を亢進させる。OSマウスの *mR1*にホモ変異を導入すると、Runx3ヘテロ欠損と同程度に延命し、骨肉腫発症が抑制される(図1B,C)。同様に、p53欠失型T細胞リンパ腫の発症においては、Runx1が *mR1*を介して、Mycの発現を亢進させることも判明した (Ref 3)。
- (4) 正常細胞においてp53はRunx3と直接相互作用し、Runx3のDNA結合を阻害し、Mycの過剰発現を抑制する(図2)。しかし、p53が欠失する、あるいは変異型p53を発現する骨肉腫細胞では、Runx3によってMycが過剰発現される(図2)。



2. 研究の目的

骨肉腫発症における微小環境を考慮し、種々の増殖因子/サイトカインを検討したところ、Runx3 依存的な TGFβ による Myc の強い発現誘導を確認した。そこで、TGFβ を作用させた p53 欠損骨肉腫細胞を用いて、Runx3、Smad2/3 および活性化ヒストンの指標である H3K27ac(27 番リジン-アセチル化ヒストン H3) の ChIP-Seq を行った。そして、Myc の 3Mb にわたる発現制御領域(TAD) から、進化的に

保存された領域で、Runx3、Smad2/3 および H3K27ac が強く共占有する場所を選別し、スーパーエンハンサー (MycSE) を見出した。

そこで本研究は、以下の(1)～(3)の課題を検討することを目的とした。

- (1) TGFβ シグナルは骨肉腫の発症・進展に必須か。
- (2) TGFβ による Runx3 依存性 Myc 発現誘導に必須な MycSE は、骨肉腫の発症・進展に必須か。
- (3) TGFβ による Myc の過剰発現において、Runx3 と相互作用する転写因子は何か。

3. 研究の方法

マウス生体レベルで検証するため、以下の遺伝子改変マウスを作成し、上記の目的に記載した事項を検討した。作成したマウスは、長期にわたり観察し、寿命および骨肉腫の発症頻度を確認した。

- (1) *Tgfb2^{fl/+}*マウスを導入し、OSマウスと交配し、OS;*Tgfb2^{fl/+}*マウスを作成した。
- (2) *MycSE* および *MycSE* 中の Runx3 配列欠損マウス (それぞれ *MycSEΔ* および *MycSERx^{m/m}* マウス) を作製し、OSマウスと交配、OS;*MycSEΔ* および OS;*MycSERx^{m/m}* マウスを作成した。
- (3) 免疫共沈により Runx3 と相互作用をもつ因子を確認した。

4. 研究成果

OS;*Tgfb2^{fl/+}*マウスおよび OS;*MycSEΔ* マウスを飼育し観察したところ、双方とも、OS マウスより有意に延命し、骨肉腫の発症頻度も低かった (図 3)。なお、OS;*MycSERx^{m/m}* マウスは現在も観察を継続中である。

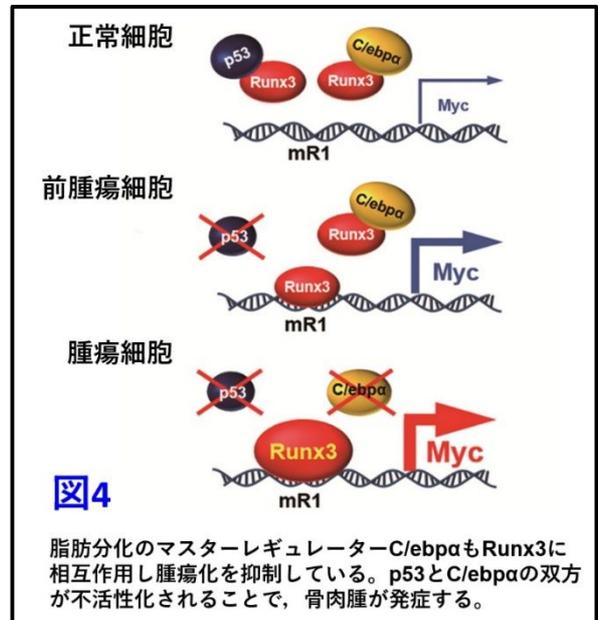
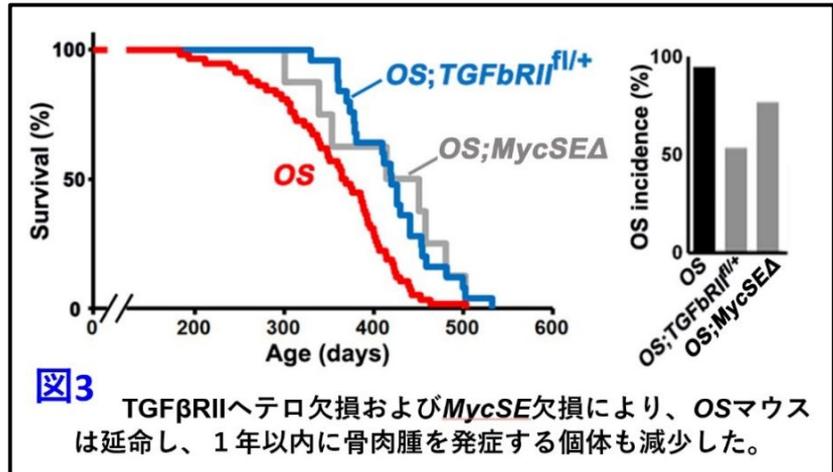
これらのこれまでに得られた結果は、以下の事実を示している。

- (1) p53 欠損型骨肉腫の発症に TGFβ シグナルは必須である。
- (2) TGFβ による Runx3 依存性 Myc 発現誘導に必須な MycSE は、p53 欠損型骨肉腫の発症に必須である。

さらに、(3) 脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである転写因子 C/ebpα が、Runx3 と特異的相互作用を持つことが判明した。この相互作用によって Runx3 の DNA 結合が阻害され、抗腫瘍効果が発揮される (図 4)。実際、ヒト骨肉腫において、C/ebpα の発現は減少し、骨肉腫患者においては、予後良好因子となっている (Ref 4)。この相互作用はこれまでに同定された Myc プロモーター内 Runx3 結合配列; *mR1* による制御を示していると思われるが (図 4)、*MycSE* の中心部分にも、Runx3 結合配列とともに、C/ebpα 結合配列が進化的に保存されている。この意義については今後の検討課題である。

References

1. Otani S, Date Y *et al.* *Oncogene* 41, 683-691 (2022)
2. Ito K, Otani S, Date Y *Cells* 12, 1122 (2023)
3. Date Y, Taniuchi I, Ito K *Gene* 819, 146234 (2022)
4. Omori K, Otani S *et al.* *Oncogene* 42, 2485-2494 (2023)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Otani S, Date Y, Ueno T, Ito T, Kajikawa S, Omori K, Taniuchi I, Umeda M, Komori T, Toguchida J, Ito K	4. 巻 41
2. 論文標題 Runx3 is required for oncogenic Myc upregulation in p53-deficient osteosarcoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 683-691
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-021-02120-w	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, Taniuchi I, Ito K	4. 巻 819
2. 論文標題 Oncogenic Runx1-Myc axis in p53-deficient thymic lymphoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 146234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2022	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 Omori Keisuke, Otani Shohei, Date Yuki, Ueno Tomoya, Ito Tomoko, Umeda Masahiro, Ito Kosei	4. 巻 42
2. 論文標題 C/ebp represses the oncogenic Runx3-Myc axis in p53-deficient osteosarcoma development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2485 ~ 2494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-023-02761-z	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 Ito Kosei, Otani Shohei, Date Yuki	4. 巻 12
2. 論文標題 p53 Deficiency-Dependent Oncogenicity of Runx3	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells12081122	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 Otani Shohei, Ohnuma Mizuho, Ito Kosei, Matsushita Yuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Cellular dynamics of distinct skeletal cells and the development of osteosarcoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1181204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2023.1181204	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 Kosei Ito, Tomoya Ueno, Shohei Otani, Yuki Date
2. 発表標題 TGF signaling facilitates Myc upregulation by Runx in p53-deficient osteosarcoma development
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoya Ueno, Yuki Date, and Kosei Ito
2. 発表標題 Runx3 dysregulates Myc under p53 deficiency via TGF -responsive Myc enhancer during osteosarcomagenesis
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 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、第7212943号	取得年 2023年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 分子腫瘍生物学分野
https://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
研究 分 担 者	神崎 秀嗣 (Kohzaki Hidetsugu) (60807345)	秀明大学・看護学部・教授 (32513)	

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