

令和 6 年 4 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08393

研究課題名(和文) CXCL12-CXCR4軸による造血幹細胞制御に必須の細胞内分子の網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive exploration of intracellular factors essential for HSC regulation via the CXCL12-CXCR4 axis

研究代表者

青木 一成 (Aoki, Kazunari)

京都大学・医生物学研究所・助教

研究者番号：30618020

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)：造血幹細胞や急性白血病細胞のCXCL12応答性がどのような分子メカニズムで制御されているのかに関しては不明である。我々は、CRISPRスクリーニングを用いて、cBAFがヒトT-ALLの細胞株のCXCL12応答性に必須であることを発見した。cBAFは、RUNX1結合領域のクロマチンアクセシビリティをゲノムワイドに制御しており、RUNX1のゲノムへの結合、CXCR4、CDK6などのRUNX1制御遺伝子の発現に必要である。そのため、cBAFの機能抑制は、CXCL12への遊走活性の低下、細胞増殖の抑制をもたらす。これらのことは、cBAFがT-ALLの有望な治療標的であることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

cBAFは、T-ALL細胞のCXCL12応答性と細胞自律的増殖を制御しており、T-ALLの有望な治療標的の一つである。急性白血病と呼ばれる血液腫瘍のうち、成人では約5%、小児では約10-15%がT-ALLに分類される。約80%の患者さんが長期生存率が得られているが、残りの患者さんでは治療抵抗性である。今後、有効かつ安全なcBAF機能抑制薬が開発され、T-ALL患者さんの予後の改善に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：It remains unclear how CXCL12 responsiveness is regulated in hematopoietic stem cells and acute leukemic cells. Using a CRISPR screen, we discovered that cBAF regulates the migratory response of human T-ALL cells to CXCL12. cBAF maintains chromatin accessibility genome-wide at RUNX1 binding sites, ensuring RUNX1 binding at these sites, and is required for expression of RUNX1-regulated genes, such as CXCR4 and CDK6; therefore, cBAF inhibition negatively impacts migratory response toward CXCL12 and cell proliferation. These results suggest cBAF as a promising therapeutic target.

研究分野：腫瘍学

キーワード：CXCL12 CXCR4 cBAF SMARCA4 ARID1A クロマチン RUNX1 転写制御

1. 研究開始当初の背景

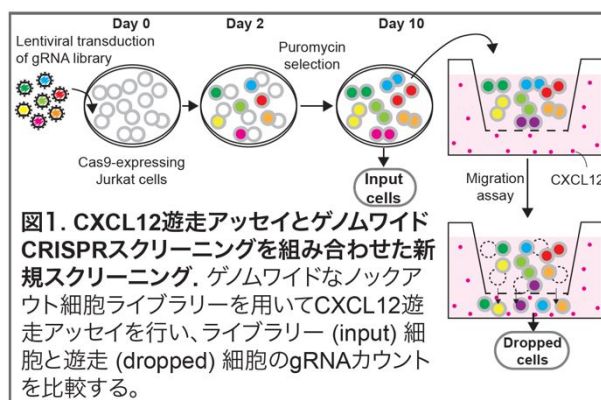
正常造血幹細胞と同様に、急性白血病や多発性骨髄腫などの血液がん細胞は骨髄で増殖している。これらの血液がんのモデルマウスにおいて、骨髄微小環境特異的に *Cxcl12* をノックアウトすると、骨髄中のがん細胞数が著明に減少し、マウスの生存は有意に延長する。これらのことは、骨髄に局在する血液がん細胞の増殖には骨髄微小環境が産生する CXCL12 が必須であることを示す。しかしながら、造血幹細胞やこれら血液がん細胞の CXCL12 応答性がどのような分子メカニズムで制御されているのかに関しては不明である。

2. 研究の目的

造血幹細胞や血液がん細胞における CXCL12 応答性制御因子を網羅的に探索する。同定された因子が CXCL12 応答性を制御する分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-ALL) の細胞株 Jurkat の Cas9 安定発現クローンを作製する。Cas9 発現 Jurkat 細胞にゲノムワイド CRISPR ライブラリーを形質導入し、薬剤セレクション後に一部細胞を回収し、残りの細胞を用いて CXCL12 マイグレーションアッセイを実施し、下層から細胞を回収する (図 1)。回収した細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR で増幅した後に、次



世代シーケンサーで gRNA をカウントし、MAGeCK で解析する。抽出された遺伝子が、他の血液がん細胞株の CXCL12 応答性にも必要かどうか、個別にマイグレーションアッセイを行うことで確認をする。

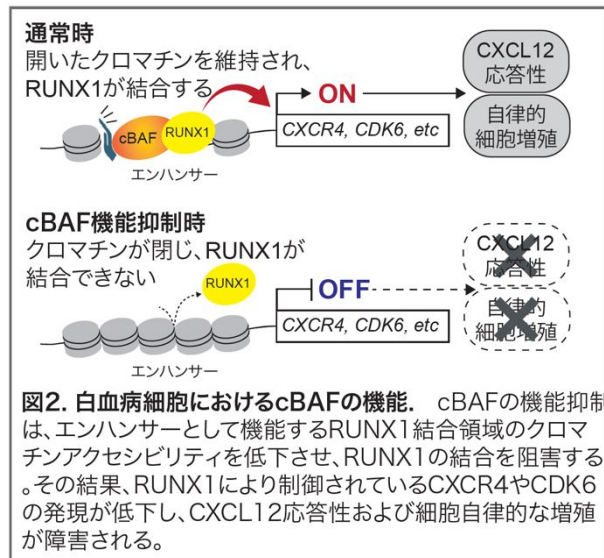
4. 研究成果

T-ALL の細胞株 Jurkat を用いて、CRISPR-Cas9 システムによりゲノムワイドノックアウト細胞ライブラリーを作製し、CXCL12 細胞遊走アッセイを実施した (図 1)。その結果、*CXCR4* や *RHOA* などの CXCL12 に対する遊走に必須であることが知られている既知の遺伝子が複数抽出された。それらに加えて、*SMARCA4*、*ARID1A*、*SMARCB1* などの cBAF の構成要素をコードする遺伝子が複数ヒットした。cBAF はクロマチンリモデリングに関わる複合体で、エンハンサー領域のクロマチンアクセシビリティを維持することで、転写因子などがエンハンサー領域に結合することを可能にしている。マウスにおいて、*Smarca4* や *Arid1a* は造血幹細胞の増殖に必須であることが報告されているが、T-ALL 細胞における機能は明らかされていない。また、どのような細胞においても、cBAF と CXCL12 応答性の関連は示されていない。

まず、Jurkat 細胞において、*SMARCA4* をノックアウトして CXCL12 応答性が大きく抑制されることを確認した。*SMARCA2* は *SMARCA4* のパラログで、*SMARCA4* と機能的冗長性があると言われているが、*SMARCA4/2* ダブルノックアウトと *SMARCA4* ノックアウトの CXCL12 応答性は同等であった。*ARID1A* をノックアウトすると、CXCL12 応答性は中程度に抑制された。*ARID1B* は *ARID1A* のパラログで、*ARID1A* と機能的冗長性があると言われている。*ARID1A/B* ダブルノックアウトは、

ARID1A よりも強く CXCL12 応答性が障害され、その程度は *SMARCA4/2* ダブルロックアウトと同等であった。さらに、複数の T-ALL 細胞株において、BRM014 を用いて cBAF の機能を抑制すると、CXCL12 遊走能が有意に低下することを確認した。

オープンクロマチン領域を評価できる ATAC-seq を行った結果、cBAF の機能を遺伝学的に抑制すると、転写因子 RUNX1 の結合領域特異的にクロマチンアクセシビリティが低下することがわかった。一方、転写因子 CTCF 結合領域のクロマチンアクセシビリティには変化を認めなかった。RUNX1 の ChIP-seq を行い、cBAF の機能抑制は RUNX1 のゲノムへの結合を障害することを確認した。さらに RNA-seq を行い、cBAF の機能抑制は、RUNX1 により正に制御されている遺伝子群の発現を有意に低下させることを確認した。これらのことから、**cBAF は RUNX1 結合領域のクロマチンアクセシビリティを維持することで、RUNX1 がゲノムに結合して機能すること可能性にしている**ことが明らかになった。



次に、cBAF-RUNX1 軸が CXCL12 応答性を制御する分子メカニズムの解明を試みた。cBAF 或いは RUNX1 の機能を遺伝学的に抑制すると、*CXCR4* の発現が著明に低下していた。複数の T-ALL 細胞株および Patient-derived xenograft (PDX) 細胞において、BRM014 を用いて cBAF の機能を抑制すると、*CXCR4* の発現が大きく低下することを確認した。興味深いことに、cBAF の機能を抑制した細胞において、レンチウイルスを用いて *CXCR4* cDNA を発現させることで *CXCR4* の発現をレスキューすると、遊走活性はほぼ完全に回復した。これらのことから、**cBAF-RUNX1 軸は *CXCR4* の発現を介して CXCL12 応答性を制御**していることがわかった (図 2)。

次に、既存の H3K27ac などの ChIP-seq データを用いて、*CXCR4* のエンハンサー領域の同定を試みた。既知のスーパーエンハンサー領域 (SE) 以外に、新規のエンハンサー候補領域 (E1、E2、E3、E4) を同定した。それぞれの領域を破壊したところ、SE および E4 の破壊により *CXCR4* の発現はそれぞれ 50%、25%低下した。興味深いことに、SE と E4 を両方破壊すると、*CXCR4* の発現は 90%以上低下した。以上より、**既知のスーパーエンハンサーSE と新規エンハンサーE4 が協調して *CXCR4* の発現を制御**することがわかった。

さらに、ATAC-seq および RUNX1 の ChIP-seq データから、cBAF の機能を抑制すると、SE と E4 領域のクロマチンアクセシビリティが低下し、RUNX1 の結合が障害されることがわかった。これらのことから、**cBAF は、*CXCR4* のエンハンサー領域のクロマチンアクセシビリティを維持することで、*CXCR4* の発現に必須の転写因子 RUNX1 のエンハンサー領域への結合を可能にし、*CXCR4* の発現を維持している**ことが明らかになった。

RUNX1 は T-ALL 細胞の細胞自律的な増殖に必須であることが知られている。cBAF は RUNX1 のゲノムへの結合に必須であることから、cBAF の機能抑制は T-ALL 細胞の細胞自律的増殖を障害することが期待される。そこで、遺伝学的及び薬理学的手法を用いて、in vitro で T-ALL 細胞における cBAF の機能を抑制したところ、T-ALL 細胞の細胞自律的増殖は有意に障害され、アポトーシスが誘導された。これらのことから、**cBAF が T-ALL 細胞の細胞自律的な増殖に必須**であることがわかった。また、この表現系には *CDK6* の発現低下が寄与していることを明らかにした

(図 2)。

cBAF は、T-ALL 細胞の CXCL12 応答性と細胞自律的増殖を制御していることから、cBAF の機能抑制は、in vivo において強い抗腫瘍効果をもたらすことが期待できる。そこで、T-ALL-PDX model を用いて、BRM014 の in vivo の抗腫瘍効果を評価した。3 患者由来の細胞で実験を行い、いずれのモデルにおいても BRM014 は骨髄中のがん細胞数を有意に低下させた。

本研究成果は、cBAF が T-ALL の有望な治療標的であることを示唆している。以上の研究成果は、*Blood* 誌に発表した。

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 0件）

1. 著者名 Aoki Kazunari, Hyuga Mizuki, Tarumoto Yusuke, Nishibuchi Gohei, Ueda Atsushi, Ochi Yotaro, Sugino Seiichi, Mikami Takashi, Kobushi Hirokazu, Kato Itaru, Akahane Koshi, Inukai Takeshi, Takaori-Kondo Akifumi, Takita Junko, Ogawa Seishi, Yusa Kosuke	4. 巻 143
2. 論文標題 Canonical BAF complex regulates the oncogenic program in human T-cell acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 604 ~ 618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2023020857	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Aoki Kazunari, Hyuga Mizuki, Tarumoto Yusuke, Nishibuchi Gohei, Ochi Yotaro, Sugino Seiichi, Mikami Takashi, Kobushi Hirokazu, Kato Itaru, Akahane Koshi, Inukai Takeshi, Takaori-Kondo Akifumi, Takita Junko, Ogawa Seishi, Yusa Kosuke
2. 発表標題 Canonical BAF complex is essential for the RUNX1-driven oncogenic transcriptional program in human T-cell acute lymphoblastic leukemia
3. 学会等名 The 13th JSH International Symposium in Tsukuba (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Aoki Kazunari, Hyuga Mizuki, Tarumoto Yusuke, Nishibuchi Gohei, Ochi Yotaro, Sugino Seiichi, Mikami Takashi, Kobushi Hirokazu, Kato Itaru, Akahane Koshi, Inukai Takeshi, Takaori-Kondo Akifumi, Takita Junko, Ogawa Seishi, Yusa Kosuke
2. 発表標題 Canonical BAF complex is essential for the RUNX1-driven oncogenic transcriptional program in human T-cell acute lymphoblastic leukemia
3. 学会等名 The 82th Annual Meeting of the JCA. 2023
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
---------	---------