

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19505

研究課題名（和文）分化誘導型アイソフォーム誘導療法によるMEF2D融合遺伝子陽性白血病治療

研究課題名（英文）Development of a new treatment of leukemia with the induction of the differentiation-initiating isoform of MEF2D by splicing manipulation

研究代表者

早川 文彦（HAYAKAWA, FUMIHIKO）

名古屋大学・医学系研究科（保健）・教授

研究者番号：30402580

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：MEF2Dには 1エクソンと 2エクソンをそれぞれ使用するMEF2D 1とMEF2D 2がある。今回我々はALL細胞におけるMEF2D 融合遺伝子の 2スイッチ誘導は、MEF2D 融合蛋白質によるPAX5機能抑制の解除に働くかを検証した。MEF2D-BCL9 (M-B) 2は、HDAC4と結合した。また、M-B 1とM-B 2はPAX5の転写活性を同程度に抑制した。さらに、RFX2を発現させ 2スイッチを誘導してもM-B陽性ALL細胞におけるPAX5標的遺伝子発現、細胞増殖、分化状態に変化はみられなかった。これらは、 2スイッチ誘導によるALL治療効果が低いことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、リンパ球分化障害を起こして白血病発症の原因となっていると考えられるMEF2D融合蛋白質に対し、融合遺伝子のスプライシングに働きかけ、分化抑制型のアイソフォームから分化促進型のアイソフォームへの転換を誘導することで融合蛋白質による分化障害を解消するという試みであった。目的とするアイソフォーム転換の誘導には成功したが、分化誘導型であると期待したアイソフォームには分化誘導能がなかった。アイソフォーム転換の誘導には成功しているため、別な融合遺伝子では分化誘導能を持つアイソフォームの誘導に成功する可能性はあり、新たながん治療開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Two isoforms of MEF2D, MEF2D 1 and MEF2D 2, use 1 exon and 2 exon as exon 3, respectively. In the present study, we investigated whether inducing 2 switch to MEF2D fusion genes in ALL cells released the inhibition of PAX5 by MEF2D fusion protein and caused differentiation or death of ALL cells. M-B 2 interacted with HDAC4 in cells. M-B 1 and M-B 2 similarly inhibited the transcriptional activity of PAX5. Furthermore, 2 switch of M-B did not affect the expression of the transcriptional target genes of PAX5, cell proliferation, or differentiation status in M-B-positive ALL cells. These findings indicate that therapeutic effect of 2 switch in MEF2D fusion-positive ALL cells is less to be expected.

研究分野：発癌の分子メカニズム

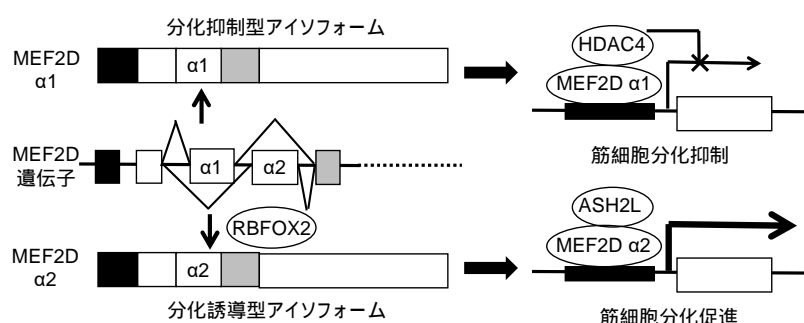
キーワード：分化誘導療法 スプライシング MEF2D 白血病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

筋細胞分化の転写因子 MEF2D の exon 3 には 1 と 2 の 2 種類があり相互排他的に使い分けられている (MEF2D<sub>1</sub>、MEF2D<sub>2</sub>)。MEF2D<sub>1</sub> は HDAC4 と結合し分化に抑制的に作用するが、MEF2D<sub>2</sub> は ASH2L と結合し分化誘導に働くと考えられている (図 1)。RNA 結合蛋白 RBFox2 は、スプライシングにおける 2 exon の選択を誘導して MEF2D<sub>2</sub> を発現させることで、筋芽細胞の分化を促進すると考えられている。MEF2D はリンパ球分化制御にも働き、一部の急性リンパ性白血病 (ALL) では、MEF2D 融合遺伝子が認められることが明らかとなった。MEF2D 融合タンパクは PAX5 の機能を抑制することでリンパ球分化を抑制する考えられている。

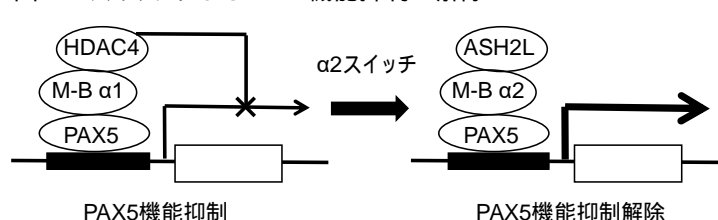
図1 MEF2Dはα exonを使い分けて機能の異なる2つのアイソフォームを産生



### 2. 研究の目的

本研究では、MEF2D 融合遺伝子陽性 ALL に対して、MEF2D 融合遺伝子のスプライシングにおける 2 エクソンの使用 (2 スイッチ) を誘導し、分化誘導型アイソフォームにすることで、MEF2D 融合蛋白の分化抑制能を解消する治療法開発を行う (図 2)。

図2 α2スイッチによるPAX5機能抑制の解除



### 3. 研究の方法

#### 1. RBFox2 発現誘導による MEF2D 融合遺伝子陽性 ALL 細胞の分化 / 細胞死誘導の検証

ドキシサイクリン誘導性に RBFox2 を発現するレンチウイルスベクターを KOPN70 (MEF2D-BCL9 陽性 ALL 細胞株) に安定導入し、RBFox2 発現誘導に伴う MEF2D 融合遺伝子への 2 スイッチの誘導、B 細胞分化段階の変化、細胞死誘導、PAX5 転写標的遺伝子 (CD19、BLNK など) 発現量の変化などを検討する。

#### 2. MEF2D-BCL9<sub>1</sub> (M-B<sub>1</sub>) と MEF2D-BCL9<sub>2</sub> (M-B<sub>2</sub>) の機能的相違の確認

M-B<sub>1</sub> と M-B<sub>2</sub> の発現ベクターを作成し、GST-HDAC4、GST-ASH2L を用いて GST-pull down により M-B<sub>1</sub> と M-B<sub>2</sub> の間の HDAC4、ASH2L への結合親和性の違いを比較する。さらに、M-B<sub>1</sub> と M-B<sub>2</sub> による PAX5 転写活性抑制能の違いをルシフェラーゼアッセイで検討する。

#### 3. 2 スイッチ誘導作用を持つ薬剤スクリーニングシステムの構築

LCL 細胞の MEF2D<sub>2</sub> exon の中央付近に、ゲノム編集により HiBiT 遺伝子を挿入し、2 スイッチが起こると HiBiT タグの挿入された MEF2D<sub>2</sub> が発現する LCL 細胞を作成する。この細胞が MEF2D 遺伝子に 2 スイッチが起きたことを簡便に検出できる細胞として、リンパ球に 2 スイッチを誘導する化合物のスクリーニングに使用できるかどうかを検討する。

### 4. 研究成果

まず Kasumi-7 (MEF2D-HNRNPUL1 陽性 ALL 細胞株)、KOPN70 細胞を用いて RT-PCR を行い、これらの細胞において発現する MEF2D 融合遺伝子が 1 exon のみを使用していることを確認した。さらに、ドキシサイクリン (DOX) 誘導性に RBFox2 を発現するレンチウイルスベクターを作成し、これを LCL (不死化 B 細胞) および KOPN70 に安定導入した細胞を作製した。これらの細胞で RBFox2 を発現誘導すると LCL では野生型 MEF2D 遺伝子に、KOPN70 では M-B 遺伝子に 2 スイッチが起こることを確認した (図 3)。しかし予想に反して、KOPN70 では細胞増殖、生存率、pre-B cell receptor 発現状態 (KOPN70 の分化状態を反映して変化することが期待される) のいずれにも 2 スイッチ誘導に伴う変化が認められなかった (図 4)。さらに、既報の PAX5 転写標的遺伝子である CD19、BLNK、および 323 例の ALL 臨床検体の RNA-seq データを用いて MEF2D 融合遺伝子陽性 ALL と陰性 ALL の遺伝子発現を比較することで得られた MEF2D 融合蛋白により発現抑制されている可能性のある候補遺伝子 (MEF2C、RAG1、TNFSF4) について、定量 PCR により KOPN70 において RBFox2 発現に伴うこれら

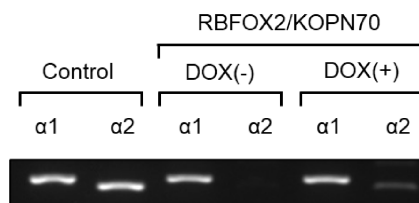


図3 RBFox2発現によるM-Bα2スイッチの誘導

遺伝子の発現の変化を調べたが、いずれも有意な変化は認められなかった(図5)。

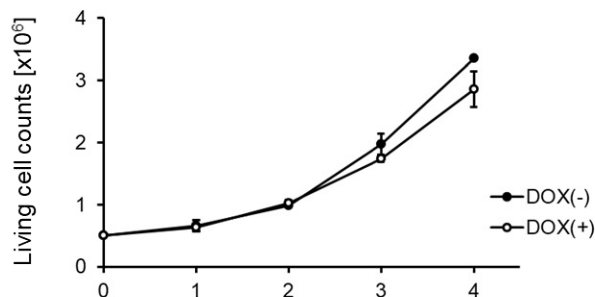


図4 RBFOX2発現によるM-B陽性細胞株増殖変化

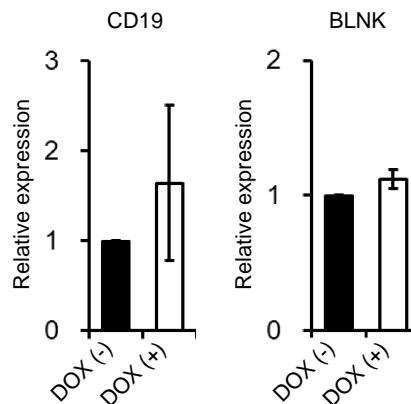


図5 RBFOX2発現によるPAX5転写標的遺伝子発現変化

M-B 1とM-B 2の発現ベクターを作製し、HDAC4およびASH2Lとの結合能を調べた。HDAC4との結合は、MEF2DがMEF2D 1しか結合しないのに反して、M-B 1とM-B 2のいずれも結合が見られた。その結合は、in vitroの結合(GST-pull down)ではM-B 2の方が強かったが、細胞内での結合(共免疫沈降)ではM-B 1の方が強かった(図6)。MEF2Dは細胞内ではPKAによるリン酸化を受けることが報告されており、そのリン酸化サイトは1エクソン部分にあり2部分にはない。PKA発現ベクターを共発現すると細胞内でのMB 1とHDAC4の結合は著明に増強されたが、MB 2とHDAC4の結合は増強されなかった。これらの結果から、翻訳後修飾のない状態ではMB 2の方がHDAC4との結合親和性が高いが、細胞内では、MB 1はPKAによるリン酸化を受けHDAC4との結合能が上昇し、MB 2より高い結合親和性を示すと考えられた。一方、ASH2Lとの結合は、MEF2DではMEF2D 2のみが結合するのに反して、M-B 1、M-B 2ともに結合が認められなかった(図7)。M-B 1とM-B 2によるPAX5転写活性の抑制をルシフェラーゼアッセイで比較した。両者ともにPAX5の転写活性を抑制し、その抑制能には相違がなかった(図8)。

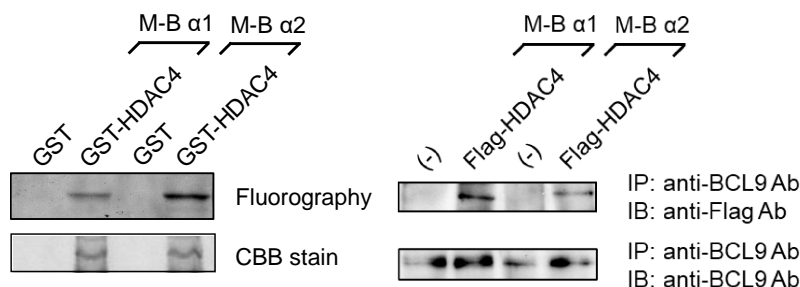


図6 M-BとHDAC4結合 GSTpull down(左) 共免疫沈降(右)

これらの結果から、M-Bでは、2スイッチが起きててもM-BとHDAC4の結合は解消されず、ASH2Lとの結合は起こらず、M-BによるPAX5転写活性抑制も解除されず、期待した抗白血病効果は得られないと予想された。そこで、2スイッチ誘導作用を持つ薬剤のスクリーニングシステムの構築は中止し、M-BによるPAX5転写活性抑制の解除に働く可能性のある化合物の効果の検証をおこなった。検証をおこなった化合物は以下の通りである。Rp-8-Br-cAMPs: cAMPと拮抗しPKA阻害に働く。PKAによるM-B 1とHDAC4結合を減弱する効果を期待した。BML-210: MEF2DとClass II HDAC(HDAC4を含む)の結合を阻害する可能性がある。TMP195, TMP269, LMK235: Class II HDAC選択的阻害剤。Rp-8-Br-cAMPsによるM-B 1とHDAC4結合の阻害効果はなく(共免疫沈降) M-BによるPAX5転写活性抑制を減弱する効果もなかった(ルシフェラーゼアッセイ)。BML-210はM-B 1とHDAC4結合を阻害せず、KOPN70に対する選択的な増殖抑制効果もなかった。TMP195, TMP269, LMK235のいずれもKOPN70に対する選択的な増殖抑制効果を示さなかった。

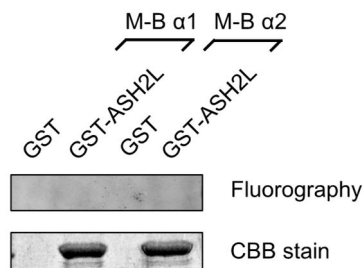


図7 M-BとASH2L結合

以上の如く、本研究ではMEF2D融合遺伝子のアイソフォームを転換することには成功したが、それによる抗白血病効果は得られなかった。おそらく、MEF2DとMEF2D融合蛋白の構造的な相違によりM-B 2がM-B 1同様にHDAC4との結合能を維持し、ASH2Lとの結合能を獲得できなかったことによる。

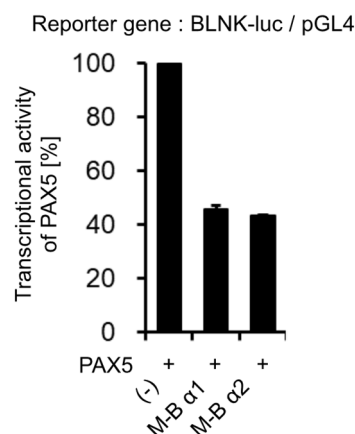


図8 M-BによるPAX5転写活性抑制

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Noura Mina, Matsuo Hidemasa, Yasuda Takahiko, Tsuzuki Shinobu, Kiyoi Hitoshi, Hayakawa Fumihiko	4. 巻 43
2. 論文標題 Suppression of super-enhancer-driven TAL1 expression by KLF4 in T-cell acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 447 ~ 456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-023-02913-1	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 Kojima Yukino, Kawashima Fumika, Yasuda Takahiko, Odaira Koya, Inagaki Yuichiro, Yamada Chiharu, Muraki Ami, Noura Mina, Okamoto Shuichi, Tamura Shogo, Iwamoto Eisuke, Sanada Masashi, Matsumura Itaru, Miyazaki Yasushi, Kojima Tetsuhito, Kiyoi Hitoshi, Tsuzuki Shinobu, Hayakawa Fumihiko	4. 巻 118
2. 論文標題 EBF1-JAK2 inhibits the PAX5 function through physical interaction with PAX5 and kinase activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 65 ~ 74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-023-03585-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 Odaira K, Yasuda T, Okada K, Shimooka T, Kojima Y, Noura M, Tamura S, Kurahashi S, Iwamoto E, Sanada M, Matsumura I, Miyazaki Y, Kojima T, Kiyoi H, Tsuzuki S, Hayakawa F.	4. 巻 114
2. 論文標題 Functional inhibition of MEF2 by C/EBP is a possible mechanism of leukemia development by CEBP-IGH fusion gene.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 781-792
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15641.	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 Yasuda T, Sanada M, Tsuzuki S, Hayakawa F.	4. 巻 114
2. 論文標題 Oncogenic lesions and molecular subtypes in adults with B-cell acute lymphoblastic leukemia.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 8-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15583.	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 5. Tsuzuki S, Yasuda T, Goto H, Maeda N, Akahane K, Inukai T, Yamamoto H, Karnan S, Ota A, Hyodo T, Konishi H, Hosokawa Y, Kiyoi H, Hayakawa F.	4. 巻 108
2. 論文標題 BCL6 inhibition ameliorates resistance to ruxolitinib in CRLF2-rearranged acute lymphoblastic leukemia.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Haematologica.	6. 最初と最後の頁 394-408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2022.280879.	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 Dai YT, Zhang F, Fang H, et al.	4. 巻 119
2. 論文標題 Transcriptome-wide subtyping of pediatric and adult T cell acute lymphoblastic leukemia in an international study of 707 cases.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2120787119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2120787119.	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 Dai YT, Zhang F, Fang H, Li JF, Lu G, Jiang L, Chen B, Mao DD, Liu YF, Wang J, Peng LJ, Feng C, Chen HF, Mu JX, Zhang QL, Wang H, Ariffin H, Moy TA, Wang JH, Lou YJ, Chen SN, Wang Q, Liu H, Shan Z, Matsumura I, Miyazaki Y, Yasuda T, Dou LP, Yan XJ, Yan JS, Yeoh AE, Wu DP, Kiyoi H, Hayakawa F, et al	4. 巻 119
2. 論文標題 Transcriptome-wide subtyping of pediatric and adult T cell acute lymphoblastic leukemia in an international study of 707 cases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2120787119	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

1. 著者名 Odaira Koya, Kawashima Fumika, Tamura Shogo, Suzuki Nobuaki, Tokoro Mahiru, Hayakawa Yuri, Suzuki Atsuo, Kanematsu Takeshi, Okamoto Shuichi, Takagi Akira, Katsumi Akira, Matsushita Tadashi, Shima Midori, Nogami Keiji, Kojima Tetsuhito, Hayakawa Fumihiko	4. 巻 213
2. 論文標題 F9 mRNA splicing aberration due to a deep Intronic structural variation in a patient with moderate hemophilia B	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 91 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2022.03.010	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 Tamura Shogo, Mukaide Masato, Katsuragi Yumi, Fujii Wataru, Odaira Koya, Suzuki Nobuaki, Tsukiji Nagaharu, Okamoto Shuichi, Suzuki Atsuo, Kanematsu Takeshi, Katsumi Akira, Takagi Akira, Ikeda Katsuhide, Ueyama Jun, Hirayama Masaaki, Suzuki-Inoue Katsue, Matsushita Tadashi, Kojima Tetsuhito, Hayakawa Fumihiko	4. 巻 298
2. 論文標題 Periosteum-derived podoplanin-expressing stromal cells regulate nascent vascularization during epiphyseal marrow development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101833 ~ 101833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101833	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 Yasuda T, Sanada M, Kawazu M, Kojima S, Tsuzuki S, Ueno H, Iwamoto E, Iijima-Yamashita Y, Yamada T, Kanamori T, Nishimura R, Kuwatsuka Y, Takada S, Tanaka M, Ota S, Dobashi N, Yamazaki E, Hirose A, Murayama T, Sumi M, Sato S, Tange N, Nakamura Y, et al	4. 巻 139
2. 論文標題 Two novel high-risk adult B-cell acute lymphoblastic leukemia subtypes with high expression of <i>CDX2</i> and <i>IDH1/2</i> mutations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1850 ~ 1862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021011921	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7件 (うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Noura M, Yasuda T, Tsuzuki S, Matsuo H, Kiyoi H, Hayakawa F.
2. 発表標題 Suppression of super-enhancer-driven TAL1 expression by KLF4 in T-cell acute lymphoblastic leukemia.
3. 学会等名 65th annual meeting of American Society of Hematology
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田千晴 岡田健太郎 大平晃也 村木愛実 能浦三奈 岡本修一 安田貴彦 都築忍 早川文彦
2. 発表標題 ZNF384融合蛋白転写標的の探索
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koya Odaira, Takahiko Yasuda, Kentaro Okada, Takuya Shimooka, Yukino Kojima, Mina Noura, Shogo Tamura, Shingo Kurahashi, Eisuke Iwamoto, Masashi Sanada, Tetsuhito Kojima, Shinobu Tsuzuki, Fumihiko Hayakawa.
2. 発表標題 Aberrantly Expressed C/EBP in B Cells Functionally Inhibits MEF2 Family Transcription Factors: A Possible Mechanism of Leukemia Development by CEBP-IGH.
3. 学会等名 12th AACR-JCA Joint Conference: Breakthroughs in Cancer Research. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大平晃也, 岡田健太郎, 下岡拓弥, 向出正人, 桂木裕実, 小嶋有希乃, 藤井涉, 田村彰吾, 小嶋哲人, 丹下直幸, 安田貴彦, 都築忍, 早川文彦
2. 発表標題 Aberrant expression of CEBP inhibits MEF2 transcriptional activity in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia.
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小嶋有希乃, 河島史華, 安田貴彦, 大平晃也, 岡田健太郎, 下岡拓弥, 田村彰吾, 清井仁, 都築忍, 早川文彦
2. 発表標題 Functional analysis of EBF1-JAK2 fusion protein in B-cell acute lymphoblastic leukemia.
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 早川文彦
2. 発表標題 B細胞性急性リンパ性白血病 最近の知見と今後の治療
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 都築 忍, 安田 貴彦, 河津 正人, 上野 敏秀, カルナン・シバスンダラン, 太田 明伸, 真田 昌, 永井 宏和, 富田 章裕, 高橋 義行, 宮崎 泰司, 松村 到, 清井 仁, 細川 好孝, 間野 博行, 早川 文彦
2. 発表標題 AYA世代のがん研究における最新の知見 Pre-B細胞性急性リンパ球性白血病における転写制御ネットワーク
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021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
---------	---------