

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16297

研究課題名（和文）遺伝子改変マウスを用いたEVI1高発現白血病の下流標的の探索

研究課題名（英文）Exploring downstream targets of EVI1-highly expressing leukemia using genetically engineered mice

研究代表者

千葉 晶輝（Chiba, Akira）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70875947

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、CRISPR-Cas9システムを用いて3×FLAGタグをEvi1遺伝子の3'端にノックインしたマウスを作製し、Evi1の下流標的を探索した。正常造血幹前駆細胞LSKとEVI1を高発現するAMLマウスモデルの骨髄細胞に対してCUT&RUN-seqを行い、両者のデータを比較した。GSEAなどで解析した結果、Evi1高発現白血病特異的に上昇するターゲット遺伝子候補として、増殖シグナルに關与するEGFL7やPHACTR1が含まれることを確認した。さらに、これらの遺伝子をノックアウトすることで、白血病細胞の増殖が抑制されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EVI1を高発現するAMLは極めて予後不良だが、正常造血幹細胞の維持にもEVI1は必須なため治療標的とするのは難しい。本研究ではCRISPR-Cas9 systemを用いた遺伝子改変マウスを用いてEVI1の正常造血およびEVI1高発現白血病における下流標的の網羅的な探索を行い、白血病特異的に作用するいくつかの候補遺伝子を明らかにした。これはEVI1高発現AMLのみならず、造血幹細胞に発現する遺伝子の高発現で特徴づけられるタイプの他の難治性AMLに共通する治療開発のモデルとなりうる可能性があり、学術的な意義が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We used the CRISPR-Cas9 to generate mice in which a 3×FLAG tag was knocked in at the 3' end of the Evi1 locus. The mice were used to perform CUT&RUN-seq to comprehensively search for downstream targets of Evi1. First, CUT&RUN-seq was performed on Lineage-c-kit+Sca-1+ fraction expressing Evi1 to comprehensively explore downstream targets of EVI1 in a normal hematopoiesis.

In addition, we retrovirally transfected the bone marrow cells with genes that cause AML with high expression of EVI1. Secondary transplantation of these cells produced a mouse model of AML with high expression of EVI1, and genome-wide binding of EVI1 was analyzed with anti-FLAG antibody. The results were compared using GSEA and other methods. As a result, we obtained several target genes of Evi1, specifically up-regulated in Evi1+AML. These genes include EGFL7 and PHACTR1, assumed to be involved in proliferation signaling. When these genes were silenced in Evi1-expressing AML cells, the proliferation was suppressed.

研究分野：血液内科学

キーワード：急性骨髄性白血病

1. 研究開始当初の背景

EVI1 は AML と正常造血双方において重要な遺伝子であり、治療標的とするのが難しい

EVI1 はヒト染色体 3q26 上に位置する MDS and EVI1 complex (MECOM) locus にコードされている転写因子である。AML では、その 8-10% に EVI1 遺伝子の高発現が認められ、この特徴を持つ患者群は他の AML の患者群と比較しても極めて予後不良であり、その特殊性から EVI1 高発現 AML という独立した病型とみなされている。一方正常造血においては、マウスモデルにおいて Evi1 欠失で胎生期の HSC の発生不全が起こり、Evi1 のホモ欠失個体ではマウスは骨髄不全・出血・発育不全により胎生 10.5 日で死亡する。また Evi1 は成体マウスの HSC の維持にも関わっていることが、成体マウスで条件付き欠失させた時に HSC の自己複製能が減少し、HSC の減少をきたすことから証明された。また Evi1 の末端に GFP を挿入して、Evi1 の発現を GFP で標識可能にしたレポーターマウスを用いることで、造血系における Evi1 の発現は胎生期・成体期ともに長期の骨髄再構築能を有する HSC に限局することが明らかになった。これらより Evi1 は正常造血において重要であり、HSC 維持に必須の遺伝子であると考えられる。

このように EVI1 は AML と HSC の両方に発現するものの、AML では発症や治療抵抗性に寄与するのに対し、正常造血では必須という点が、高発現では難治性で予後不良にもかかわらず、EVI1 を治療標的とするのが難しい理由である。この 2 面性は EVI1 の下流標的が発現量および細胞の状態によって大きく異なっていることに起因している可能性があり、その違いを明らかにすることが難治性 AML の病態解明と治療標的の探索につながると考える。

正常造血における EVI1 の網羅的な下流標的の探索はこれまで進んでいない

AML においては、EVI1 が Gata2 (GATA binding protein 2) や Pbx1 (Pre B cell leukemia homeobox 1) の遺伝子の制御領域に直接結合し、転写を活性化させたり、Pten (Phosphatase and tensin homolog) の転写を直接抑制したりすることが知られている。一方正常造血における EVI1 の下流標的の探索はこれまで殆ど行われていなかった(図 1)。その理由の 1 つとしては、in vivo では先程述べたように Evi1 の発現が長期の骨髄再構築能を有する HSC に限局しており、その後のアッセイに必要な細胞数が十分確保しにくいことがある。また抗体クロマチン免疫沈降シークエンス (ChIP-seq) においては、安定して使用可能な品質の anti-EVI1 抗体がないことが、下流標的の探索を困難にしている。

2. 研究の目的

Ecotropic viral integration site 1 (EVI1) を高発現する急性骨髄性白血病 (Acute Myeloid Leukemia; AML) は極めて予後不良な一型だが、正常造血幹細胞 (Hematopoietic Stem Cell; HSC) の維持にも EVI1 は必須なため治療標的とするのは難しい。EVI1 の下流標的が発現量および細胞の状態によって大きく異なっている可能性があり、造血細胞と AML 細胞での下流標的の違いを明らかにすることが、難治性 AML の病態解明と治療標的の探索につながると考えられる。本研究では CRISPR-Cas9 system を用いた遺伝子改変マウスを用いて EVI1 の正常造血および EVI1 高発現白血病における下流標的の探索を行う。本研究は BAALC (brain and acute leukemia cytoplasmic) や ERG (ETS-related gene) など、HSC に発現する遺伝子が高発現することによって特徴づけられるタイプの他の難治性 AML にも共通する治療開発のモデルとなりうる可能性があり、これによって難治性 AML の病態解明と新規治療開発の基盤を確立する。

3. 研究の方法

本研究では AML と正常造血における EVI1 の下流標的の違いを明らかにするために、まずは EVI1 の正常造血における下流標的を探索し、次に EVI1 高発現 AML における EVI1 の下流標的を探索し、正常造血に影響を及ぼすことのない AML 特異的な治療標的の同定を目的とする。申請者らは CRISPR-Cas9 system を用いて、3×FLAG タグを Evi1 遺伝子の 3' 端にノックインしたマウスを作製した。

遺伝子改変マウスを用い、anti-FLAG 抗体で Cleavage Under Targets & Release Using Nuclease シークエンス (CUT&RUN-seq) を施行し、Evi1 の下流標的を網羅的に探索する。具体的には、まずは同マウスで Evi1 を発現している Lineage 陰性、c-kit 陽性、Sca-1 陽性 (LSK) 分画において CUT&RUN-seq を行うことで、正常造血モデルにおいて網羅的に Evi1 の下流標的を探索する。その後そのマウスの骨髄細胞に MLL-ENL、cMyc-bcl2 といった EVI1 を高発現する AML を発症する遺伝子をレトロウイルスで導入し、二次移植することにより内因性の EVI1 が高発現となる AML マウスモデルを作成し、同様に anti-FLAG 抗体で CUT&RUN-seq を行い、両者を比較することで AML 特異的な EVI1 の下流標的を探索する。

実際に AML 特異的な EVI1 の下流標的候補を見出した後は、EVI1 高発現の白血病細胞株や、EVI1 高発現 AML 患者検体の白血病細胞を免疫不全マウスに移植して作製した異種移植モデルに対し

て有望な候補の阻害薬を用いて、その in vitro, in vivo での効果を検証する予定であった。

4. 研究成果

CRISPR-Cas9 system を用いて、3×FLAG タグを Evi1 遺伝子の 3' 端にノックインしたマウスを作製した。この遺伝子改変マウスを用い、anti-FLAG 抗体で Cleavage Under Targets & Release Using Nuclease シークエンス (CUT&RUN-seq) を施行し、Evi1 の下流標的を網羅的に探索した。まずは同マウスで Evi1 を発現している Lineage 陰性、c-kit 陽性、Sca-1 陽性 (LSK) 分画において CUT&RUN-seq を行うことで、正常造血モデルにおいて網羅的に Evi1 の下流標的を探索した。さらにそのマウスの骨髄細胞に MLL-ENL、cMyc-bcl2 といった EVI1 を高発現する AML を発症する遺伝子をレトロウイルスで導入した。この細胞を二次移植することにより内因性の EVI1 が高発現となる急性骨髄性白血病 (AML) マウスモデルを作成し、同様に anti-FLAG 抗体で CUT&RUN-seq を行った。両者の結果を Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 等で検討比較した。その結果 Evi1 高発現白血病特異的に上昇する Evi1 のターゲット遺伝子の候補を複数得た。この中には増殖シグナルに関わることが想定される EGFL7 や PHACTR1 などの遺伝子が含まれており、in vitro で Evi1 高発現の白血病細胞株においてこれらの遺伝子をノックアウトしたところその増殖が抑制されることを確認した。

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 Masamoto Y, Chiba A, Mizuno H, Hino T, Hayashida H, Sato T, Bando M, Shirahige K, Kurokawa M.	4. 巻 7
2. 論文標題 EVI1 exerts distinct roles in AML via ERG and cyclin D1 promoting a chemoresistant and immune-suppressive environment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1577-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2022008018.	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0件

〔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
---------	---------