

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16306

研究課題名（和文）クロマチン高次構造変化と慢性炎症による白血病の遺伝子異常獲得機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of 3D genome alteration and chronic inflammatory effects associated with the acquisition of mutations in leukemia development

研究代表者

河合 麻友（徳舛麻友）（Kawai, Mayu）

熊本大学・国際先端医学研究機構・特定事業研究員

研究者番号：50942687

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：クロマチン高次構造の変化は遺伝子発現調節に重要な役割を担っている。遺伝子異常や染色体異常は白血病の主病因であるが、これらの異常がクロマチン高次構造に与える影響を検証するため、16番染色体逆位急性骨髄性白血病（inv(16)AML）マウスモデルを用いて解析を行った。高深度のクロマチン高次構造解析からinv(16)AMLに特異的なクロマチンループが明らかとなり、本疾患特異的オンコプロテイン（CBF⁻SMMHC）と共役転写因子RUNX1がこのクロマチンループ形成に関与していることを見出した。本研究により、染色体異常により生成されるオンコプロテインのクロマチン高次構造変化への影響が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、inv(16)AML特有の染色体異常から生成されるオンコプロテインが、異常転写因子複合体の形成を経て、転写という機能面のみならず、クロマチン高次構造の変化も引き起こすことが明らかとなった。この高次構造変化は白血病特異的遺伝子発現の調節に関与していることが示唆され、新たな白血病化機序の解明につながると期待できる。さらに、この異常転写因子複合体の形成に關与するエピジェネティック制御因子を同定することで、疾患特異的新規治療法の開発へと進展することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：3D genome organization is a fundamental feature of genome interactions and influences transcriptional regulation. Genetic and chromosomal abnormalities are the main cause of leukemia, and it is not fully understood if these abnormalities affect 3D genome organization. To understand this correlation, we investigated genome-wide chromatin looping in the mouse model of acute myeloid leukemia (AML) with inversion of chromosome 16, inv(16). Our observations showed enhanced chromatin loops in the leukemia cells. Notably, CBF⁻SMMHC oncoprotein produced in inv(16) AML and its binding partner, RUNX1, colocalized at most of the loop anchors. Our leukemia model provides evidence that oncogenic transcriptional machinery greatly influences the looping structure, leading to leukemia-specific gene expression.

研究分野：白血病

キーワード：クロマチン高次構造 急性骨髄性白血病 染色体異常

1. 研究開始当初の背景

現在までに、白血病関連遺伝子の特性が明らかになってきたが、クロマチン高次構造の変化が白血病化に与える影響については報告が限られている。さらに、白血病化には背景となる染色体異常・遺伝子異常の他に二次的遺伝子異常が必要となるが、加齢や放射線以外で、二次的遺伝子異常の原因となる宿主要因、環境要因は明らかになっていない。

inv(16)AML は、inv(16)(p13.1;q22)または t(16;16)(p13.1;q22)をもつ AML で、小児・成人共に AML の 1 割程度を占める。inv(16)により、短腕側に *CBFB-MYH11* 融合遺伝子が形成され、そこから CBFβ-SMMHC オンコプロテインが産生される (図 1)。化学療法への反応性は比較的良好であるが、再発が 30~40% と多く、再発例の予後

が不良であることが問題となっている。再発時の白血病サブクローンには、inv(16)に加え、初発時と異なる二次的遺伝子異常が認められ、この新たな二次的遺伝子異常の蓄積が再発と関連していると考えられている (Sood et al., *Leukemia*, 2016.)。このことから、本疾患には二次的遺伝子異常が発生しやすい不安定な分子基盤が背景にあることが予想される。CBFβ-SMMHC は造血系転写因子 RUNX1 への結合を介して、白血病化に寄与することが明らかになっている (Zhen et al., *Blood*, 2020.)。そして過去の全がん解析において、がん細胞ではクロマチンループ領域や、その境界近傍のクロマチン閉鎖領域に遺伝子異常の集積が認められることから (Chen et al., *Cell*, 2018., Akdemir et al., *Nat. Genet.*, 2020.) CBFβ-SMMHC がクロマチン高次構造の変化をもたらし、それが白血病化や再発につながる二次的遺伝子異常の獲得を促進するのではないかと、またその過程に感染などの炎症が関与するのではないかと、いう仮説に至った。

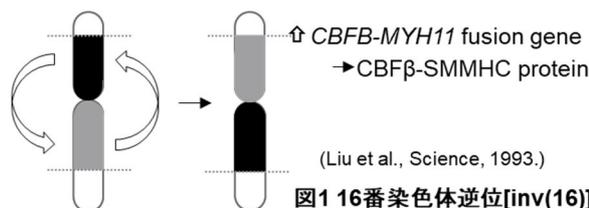


図1 16番染色体逆位[inv(16)]

2. 研究の目的

クロマチンループは、DNA に結合した CCCTC-binding factor (CTCF) が近接しダイマーを形成することによって完成する (Zheng et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2019.)。CBFβ-SMMHC はマルチマー形成能を有することから (Zhao et al., *Leukemia*, 2017.) CTCF 同様にクロマチンループを形成する能力を有すると考えられた。そこで本研究では CBFβ-SMMHC と RUNX1 のゲノム上の局在部位を同定し、CBFβ-SMMHC が直接関与するクロマチンループを明らかにするとともに、その共役因子を同定する。また、CBFβ-SMMHC が関与するクロマチン高次構造の変化に伴う遺伝子発現調節変化、二次的遺伝子異常獲得について検証する。

3. 研究の方法

従来用いられてきた *Cbfb-MYH11* コンディショナルノックインマウスは、*Cbfb-MYH11* 融合遺伝子が発現誘導された後、2~4 か月で白血病を発症する。しかし CBFβ-SMMHC には特異的な抗体が存在しないことから、申請者らは *Cbfb-MYH11* の C 末端に HA タグをノックインしたマウスを樹立し、さらにマウス *Runx1* の 2 つのアイソフォーム、*Runx1b* と *Runx1c* にそれぞれ *3xMyc* と *3xFLAG* のタグをノックインしたマウスも樹立した。これらを交配し、*Cbfb-MYH11-HA* と *Mx1-Cre*、*3xMyc-Runx1b*、*3xFLAG-Runx1c* の遺伝子型をもつマウスを作成した。このマウスにおいて白血病を誘導し、Lin⁺Kit⁺Sca-1⁺骨髄細胞 (LK 細胞) を用いて次の実験を行う。CBFβ-SMMHC と RUNX1b/1c のゲノム上局在部位について、上記タグに対する抗体と Chromatin immunocleavage sequencing (ChIC-seq) (Ku et al., *Nat. Methods*, 2019.) を用いて解析する。クロマチン高次構造解析には Hi-Transposase-mediated analysis of chromatin looping (Hi-TrAC) (Liu et al., *Nat. Commun.*, 2022.) を用いる。これは、Transposase-mediated analysis of chromatin looping (TrAC-Looping) (Lai et al., *Nat. Methods*, 2018.) を少数細胞解析のために改変した手法であり、短い DNA リンカーで連結された 2 セットの Tn5 トランスポゼースを使用することで、オープンクロマチン部位とクロマチン相互作用部位双方を検出できる最先端の技術である。また、代表的なクロマチンループ形成因子である CTCF とコヒーシンの関与を調べるため、ChIC-seq にてこれらの結合部位を同定する。また、ChIC-seq による H3K4me3 や H3K27ac 解析から、プロモーター・エンハンサー活性を評価するとともに、エピジェネティック制御因子である BRD4 結合部位を同定する。

4. 研究成果

新規の *Cbfb-MYH11-HA* コンディショナルノックインマウスは CBFβ-SMMHC タンパクを発現するにもかかわらず白血病を発症しなかった。そこで、従来の *Cbfb-MYH11* コンディショナルノックインマウスにて白血病を誘導し、LK 細胞を用いて Hi-TrAC によるクロマチン高次構造解析を行った。コントロールの正常 LK 細胞では 2376 個の特異的クロマチンループが検出されたのに対し、白血病 LK 細胞では 4464 個の白血病特異的クロマチンループが検出された。これら白血病特異的クロマチンループの多くが Topologically associating domain (TAD) 内の小さな subTAD

形成に関与していることが分かり、エンハンサー-プロモーター相互作用を促進させている可能性が示唆された。実際、このような活性型の subTAD が、コントロールの正常 LK 細胞では 964 個、白血病 LK 細胞では 1914 個検出され、382 個の白血病特異的活性型 subTAD が明らかとなった。これらの subTAD には、骨髄系細胞の分化制御やタンパクリン酸化、サイトカインシグナル経路に属する遺伝子群が含まれており、白血病の進展に関与していると考えられた。

さらに、抗 CBF β と抗 SMMHC 抗体を用いた ChIC-seq により両者の結合部位から CBF β -SMMHC のゲノム上局在部位を解析したところ、RUNX1 と共に白血病特異的クロマチンループのアンカー部位へ結合していることが明らかとなった。興味深いことに、CBF β -SMMHC と RUNX1 は正常 LK 細胞における RUNX1 結合部位とは異なる部位に強く結合していることが示唆された。さらに、コヒーシンや BRD4 の白血病特異的クロマチンループ形成への関与も示唆されており、さらなる解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河合 麻友
2. 発表標題 CBF -SMMHC rewires chromatin looping and drives acute myeloid leukemia development.
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022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		
米国	National Institutes of Health	NHGR1	NHLBI