

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21066

研究課題名（和文）骨肉腫発症・進展におけるTGF 誘導性Myc過剰発現の時空間的制御機構とその役割

研究課題名（英文）Spatial and temporal regulation mechanism and its role of TGFbeta-induced Myc overexpression in osteosarcoma development and progression

研究代表者

上野 智也（Ueno, Tomoya）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・助教

研究者番号：40968583

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は先行研究で、骨肉腫においてp53不活性化とMycの過剰発現がRunxによって媒介されることを明らかにした。しかし、p53欠損下でRunxによるMyc発現誘導機序は不明のままであった。本研究では、TGF $\beta$ が骨前駆細胞にMycを過剰に誘導することを見出した。さらに、TGF $\beta$ 刺激により活性化するMyc遺伝子下流の領域、Mycスーパーエンハンサーを同定した。この領域には、TGF $\beta$ 刺激下でRunx、AP1、Smads等のがん関連転写因子が集積する。一連の結果は、Mycの調節不全がこの領域によって媒介されていることを示しており、TGF $\beta$ はMycを過剰発現させる上でRunxと共に重要な役割を果たす。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん抑制遺伝子p53とがん遺伝子Mycは、ヒトの悪性腫瘍に広く関わる代表的な遺伝子であり、これらを取り巻く分子機序の解明に多くの研究者が取り組んでいる。そのため、p53とMycがRunxやTGF $\beta$ によって仲介されることを示した本研究結果は、骨肉腫以外の悪性腫瘍の研究にも繋がるだろう。特に、Myc過剰発現誘導の中核を成すTGF $\beta$ 作動性転写装置は、骨肉腫だけでなく、他の悪性腫瘍の治療標的となる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：We recently demonstrated that p53 inactivation and Myc overexpression, which are essential for OS development, are mediated by Runx transcription factors. However, the mechanisms inducing Myc upregulation by Runx in a p53-deficient microenvironment remain unclear. We found that p53 disruption causes TGF $\beta$  to aberrantly induce Myc in osteoprogenitors. We identified its cognate enhancer (super enhancer) downstream of the Myc gene, which interacted with the Myc promoter upon TGF $\beta$  stimulation via chromatin looping. At this region, TGF $\beta$  promoted the occupancy of each member of a transcriptional complex consisting of Runx, its cooperative factors, AP1 and Smads, and CBP, further activating the enhancer by H3K27ac deposition. These results suggest that Myc dysregulation are mediated by the epigenetic node, where TGF $\beta$  plays a pivotal role in collaboration with Runx to unleash Myc.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：骨肉腫 Runx c-Myc TGF

### 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫研究では骨芽前駆細胞特異的 p53KO マウス(OS マウス)が骨肉腫発症モデルとして広く使用されている。このマウスを用いた先行研究により、p53 欠損骨肉腫では転写因子 Runx3 が、がん遺伝子 c-Myc(Myc)のプロモーターに存在する Runx 結合配列(mR1)を介して、Myc の過剰発現を誘導していることが明らかとなった(図 1)。この成果から、p53 非存在下における Runx3 と Myc の発現異常が骨肉腫発症の根幹を成すと考えられた。

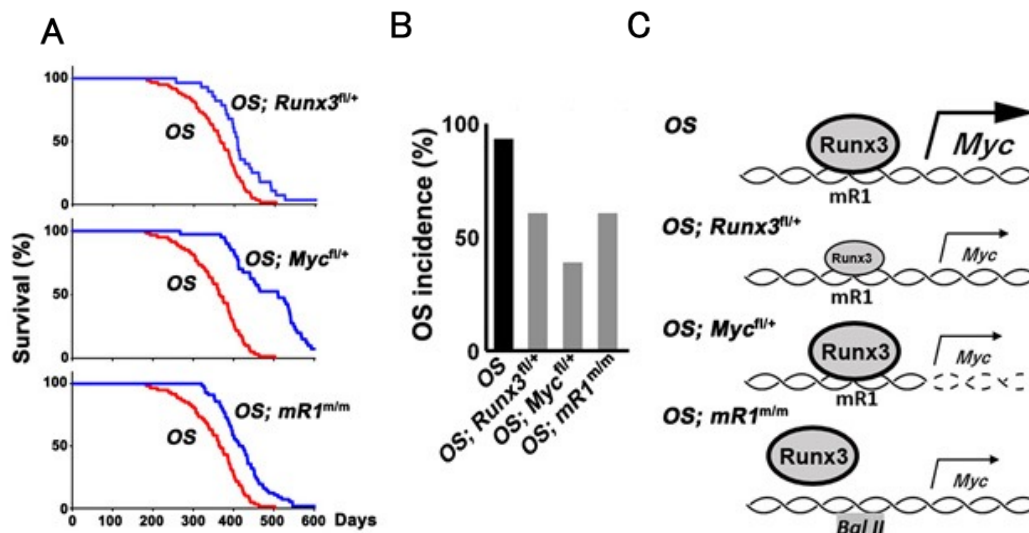


図1 Runx3はmR1を介してMyc過剰発現を誘導する

- OSマウスは、Runx3及びMycのヘテロ欠損またはmR1のホモ変異により延命した。
- OSマウスの骨肉腫発症率は、Runx3及びMycのヘテロ欠損またはmR1のホモ変異により低下した。
- p53欠損下において、Runx3はmR1を介して、Myc過剰発現を誘導する。

### 2. 研究の目的

OSマウスでは腫瘍発症に至るまでに6ヶ月以上を要するため、p53欠損によるゲノムが不安定な環境下に長期間曝された腫瘍細胞は、遺伝子発現が複雑化し、骨肉腫発症に関わる因子の特定は非常に困難である。そこで、ヒト(公共データ:86検体)・マウスの骨肉腫サンプルのバルクRNA-seqデータを活用することにより、ヒト・マウスに共通して発現が上昇する因子TGFβに着目した。実際に、OSマウスから得られた骨肉腫細胞(OS細胞)をTGFβで刺激すると、Runx3を介したMyc過剰発現が誘導された。さらに、OS細胞を用いてATAC-seq、ChIP-seq解析を行なったところ、TGFβ刺激によって活性化されるMycスーパーエンハンサー(MycSE)が同定された。以上の結果から、このTGFβ-Runx3-Mycの基軸の活性化が骨肉腫発症・進展に関わると考え、その詳細な分子機序の解明と骨肉腫発症における役割(腫瘍発症と進展のどちらに関わるのか)を検証することにした。

### 3. 研究の方法

- TGFβ刺激によるMycSE活性化の分子機序を解明するために、タンパク質/DNA間の結合を検出するChIP-qPCR、タンパク質間の相互作用を検出するCoIP、クロマチンの3次元構造(ゲノムDNA領域間の相互作用)を検出する3CqPCR解析を実行する。
- 骨肉腫を発症したOSマウスにTGFβ阻害薬を投与し、その抗腫瘍効果を検証する。
- 骨芽細胞特異的TGFβタイプ2受容体(Tgfr2)欠損マウスを導入し、OSマウスと掛け合わせて、OS;Tgfr2<sup>fl/+</sup>またはOS;Tgfr2<sup>fl/fl</sup>マウスを作成し、抗腫瘍効果を検証する。

### 4. 研究成果

- TGFβ刺激を行ったOS細胞を用いてChIP-qPCRとCoIPを実行したところ、MycSE上にRunx3-Runx2-Smad2/3-JunB-c-Jun-CBPというがん関連転写因子複合体が形成されることが確認できた(図2A,B)。ゲノム編集でRunx2/3をKDまたはKOしたOS細胞で同様の実験を行うと、これらの複合体の形成は阻害された(図2C)。

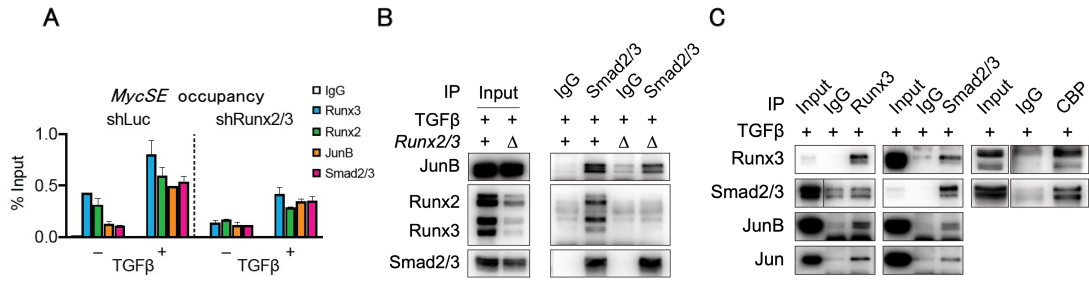


図2 マウス骨肉腫細胞では、MycSE上に種々の転写因子が集積し、相互作用がある  
 A. OS細胞を用いたChIP-qPCRでは、Runx3、Runx2、Smad2/3、JunBはMycSEと相互作用があることが示された。  
 B. OS細胞を用いたCoIPではRunx3-Runx2-Smad2/3-JunB-Junのタンパク間結合が示された。  
 C. Runx2/3KO OS細胞を用いたCoIPではB.で見られた複合体の形成は阻害された。

3C-qPCRを行ったところ MycSE と DNA 間相互作用を持つ領域が Myc プロモーター周辺にあることがわかった(図 3)。これは先行研究で同定した mR1 サイトと一致することを踏まえると、TGFβ 刺激によって MycSE が活性化すると、mR1 と共に種々のがん関連タンパクと複合体を形成し、転写装置として機能することで、過剰な Myc 発現を誘導すると考えられる。

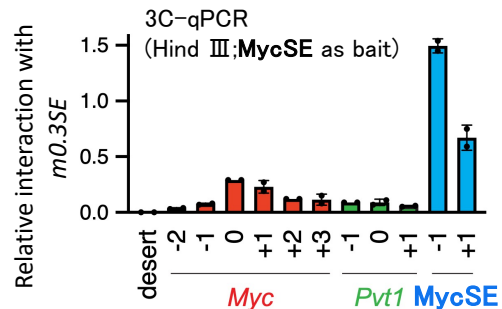


図3 マウス骨肉腫細胞を用いた3C-qPCR(クロマチンの三次元的位置関係の検証)

次に、ゲノム編集で p53 を KO したマウス骨髄由来間葉系幹細胞株(ST2)を用いて同様な実験を行ったところ、ChIP-qPCR と CoIP により、MycSE 上に Runx 3-Runx2-Smad2/3-JunB の複合体が形成され、Runx 阻害剤(AI-10-104)によりそれらの複合体の形成が阻害される可能性が示唆された(図 4AB)。また、3C-qPCR においても TGFβ 刺激により MycSE と Myc プロモーター周辺領域との相互作用が確認できた(図 4C)。以上の結果は、OS 細胞だけでなく、p53 を欠損した直後の ST2 においても同様に TGFβ-Runx3-Myc という基軸が活性化していることを示しており、骨肉腫進展・発症の双方に通ずる Myc 発現誘導機序であることを示唆している。

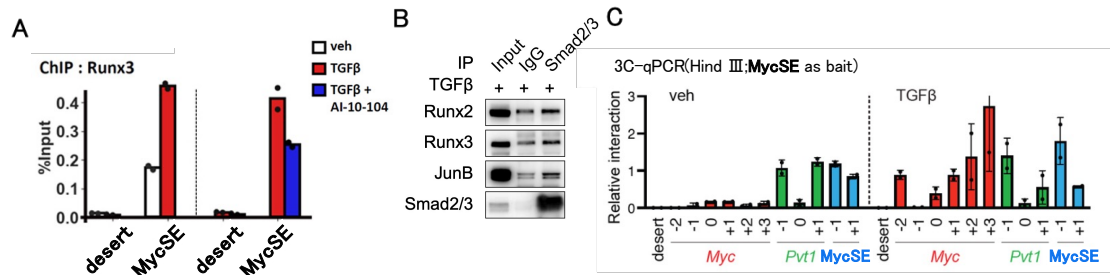


図4 ST2p53Δ細胞を用いたChIP-qPCR,CoIP,3C-qPCRでもOS細胞と同等の結果が得られた  
 A. TGFβ 刺激によるMycSEへのRunx3の集積は、pan-Runx阻害薬(AI-10-104)の使用で半減した。  
 B. TGFβ 刺激下では、Runx3-Runx2-Smad2/3-JunBの結合がみられた。  
 C. TGFβ 刺激によって、MycSEとプロモーター領域の相互作用が活性化された。

(2) 骨肉腫発症した OS マウスに TGFβ 阻害薬(SB431542)の投与をしたところ、TGFβ 阻害薬投与群では延命の効果が得られた(図 5)。(1)の結果を踏まえると、TGFβ シグナルの阻害により、MycSE 上への複合体の形成が阻害され、それらの転写装置としての機能が抑制されたと考えられる。

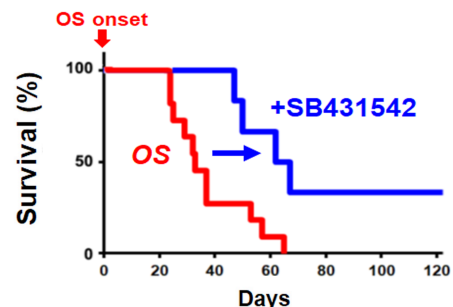


図5 骨肉腫を発症したOSマウスにTGFβ 阻害薬(SB431542)を投与したところ、延命した。

(3) *OS;Tgfb $\beta$ 2<sup>fl/+</sup>*または *OS;Tgfb $\beta$ 2<sup>fl/fl</sup>* マウスを作成し観察したところ、*OS;Tgfb $\beta$ 2<sup>fl/fl</sup>* マウスは生後間もなく死亡することがわかった。一方で、*OS;Tgfb $\beta$ 2<sup>fl/+</sup>*マウスは、*OS* マウスと比較して延命効果が得られた(図6)。これは、腫瘍細胞における TGF $\beta$  タイプ2 受容体のヘテロ欠損により、TGF $\beta$  シグナルの入力が半減した結果、MycSE 活性化も減弱したと考えられる。

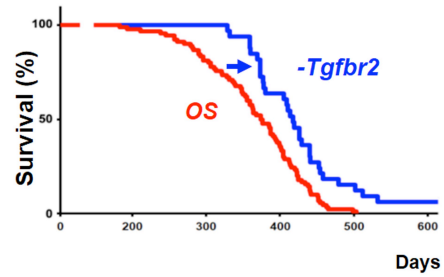


図6 *OS*マウスと比較して、TGF $\beta$  タイプ2受容体ヘテロ欠損マウスは延命した。

以上、(1)、(2)、(3)の実験により、MycSE 上に形成される、Runx3 を中心とした転写装置が中核となって、TGF $\beta$ -Runx3-Myc 基軸の活性化による骨肉腫発症・進展を制御していることが、明らかとなった。

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 1件）

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 上野智也、伊達悠貴、伊藤公成
2. 発表標題 TGF シグナルはp53欠損骨肉腫において、RunxによるMyc過剰誘導を促進する
3. 学会等名 第35回発癌病理研究会
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
---------	---------