

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870373

研究課題名(和文) AF4による転写活性化および白血病化のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of transcriptional activation and leukemogenesis by AF4

研究代表者

奥田 博史 (OKUDA, HIROSHI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10629215

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)：染色体転座によって生じるMLL キメラはAF4転写複合体と融合しており、その活性を介して下流の遺伝子の転写を恒常的に活性化することで白血病を引き起こす。しかし、AF4複合体がどのようにして白血病を引き起こすのか明らかとなっていない。本研究にてAF4複合体に結合する共作用因子を同定し、この共作用因子を介して転写を活性化するメカニズムを明らかにした。さらに、本因子の発現を抑制させると、MLL白血病細胞の増殖を抑えることができた。

研究成果の概要(英文)：Chromosomal translocation generates MLL chimeras. MLL chimeras are fused with a component of AF4 transcriptional co-activator complex, constitutively activate the downstream genes to immortalize hematopoietic progenitor cells. However, it is not yet known how AF4 complex activates transcription of the downstream genes to cause leukemia. Here, we identified co-factors that bind to the AF4 complex, and characterized the mechanism of transcriptional activation by AF4 complex through the function of the co-factors. We also succeeded to attenuate growth of leukemic cells by inhibition of the co-factor.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：白血病 発がん MLL AF4 転写

1. 研究開始当初の背景

(1) MLL 白血病

近年の小児急性リンパ性白血病 (ALL) の治療成績は比較的良好。しかし、乳児 ALL は MLL 遺伝子の染色体転座を持つ場合が多く、無病生存率が極めて低い。これまでに、新規レジメンの臨床研究が各国で行われているが、既存のレジメンとの間に有意な差は認められていない。このように、既存の治療法の改善のみでは治療成績の向上に限界がみられることから、新規薬剤の開発が望まれている。MLL 白血病における新規薬剤の標的として、MLL 融合遺伝子とその複合体パートナーおよび下流の遺伝子群が候補として考えられる。しかし、それらの作用機序は未だ不明な点が多く、より良い分子標的の選定のためにも MLL キメラによる白血病化の分子メカニズムを解明することが急務である。MLL 遺伝子はこれまでに 60 を超える遺伝子と染色体転座によって融合することが報告されており、特に乳児 ALL において、t(4;11)、t(9;11) および t(11;19) の転座が多く報告され、それらの遺伝子産物である MLL-AF4、MLL-AF9 および MLL-ENL が白血病を引き起こす事が明らかになっている。

(2) AF4 複合体と細胞の白血病化

我々はこれまでに AF4、AF5Q31、ENL および P-TEFb が AF4 複合体を形成し、AF9 が ENL と相互排他的に AF4、AF5Q31 に結合することを見いだした (Yokoyama et al. Cancer Cell 17, 198-212 2010)。MLL 白血病の症例の約 70% が MLL と AF4 複合体構成因子とのキメラによるものであり、AF4 複合体の活性が白血病化に必須の役割を果たしている。AF4 はそのホモログである AF5Q31 と C 末端領域で結合し、ヘテロダイマーを形成している。AF4 複合体はこのヘテロダイマーを足場として、N 末端側の領域で RNA polymerase II をリン酸化して転写伸長を促進する P-TEFb 複合体と結合し、中央領域で ENL またはそのホモログである AF9 と結合する。野生型 MLL は造血細胞において HOX 遺伝子の転写を活性化させ、造血細胞の自己複製を促進するが、分化の過程でその転写活性は抑制される。しかし、MLL キメラは HOX 遺伝子の転写を恒常的に活性化させてしまうために、造血細胞の自己複製を無制限に促進する。これまでに我々は AF4 複合体の中心的な構成因子である AF4 タンパク質 (及びそのホモログ) が転写活性化に必要であることを示す予備的実験結果を得た。しかし、AF4 タンパク質がどのようにして下流遺伝子の転写を活性化しているのかはまだ明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では MLL 融合パートナーである AF4 複合体が血液前駆細胞で転写を恒常的に活性化し、細胞をがん化させるメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) AF4 タンパク質の転写に必要な共作用因子の同定

我々はこれまでに AF4 複合体に含まれる AF4 による転写の活性化が MLL 白血病の原因である事を見いだしている。まず、AF4 タンパク質の転写活性化に必須の機能ドメインの同定には、マウス骨髄から採取した造血前駆細胞のトランスフォーメーションアッセイ及び GAL4 融合蛋白質によるレポーターアッセイを用いた。共作用因子の同定には、独自に開発した免疫沈降法で精製したタンパク質を質量分析で解析した。質量分析で同定した結合因子はウエスタンブロッティングでその結合特異性を確認した。

(2) AF4 タンパク質および共作用因子の局在化の解析

転写活性化因子のクロマチン局在解析には ChIP-PCR および ChIP-Seq 法を用いた。これによって質量分析にて同定した結合因子が白血病細胞において AF4 複合体と遺伝子プロモーター上で共局在しているのか、AF4 複合体と機能的な高次複合体を形成しているのかを明らかにした。

(3) MLL 白血病における転写複合体の依存性の解析

MLL キメラによって不死化した細胞を用いて、質量分析にて同定した結合因子のノックダウンの効果を検討した。これによって質量分析にて同定した結合因子が MLL キメラ依存的な白血病化に重要な役割を果たしているかどうかを明らかにした。

4. 研究成果

(1) AF4 タンパク質の転写の恒常的な活性化を介した細胞のがん化に必要な共作用因子の同定

我々は AF4 タンパク質が細胞をがん化するメカニズムを明らかにするために、まず細胞のがん化に必須の機能ドメインを同定した。マウス大腿骨の骨髄から造血前駆細胞を採取し、レトロウイルスを用いて MLL キメラを発現させると細胞はがん化する。そこで、MLL と様々な AF4 タンパク質の機能ドメインを融合させ、それらのトランスフォーメーション活性を調べることで細胞のがん化に必要な最小構造を同定することができる。我々は、本法を用いて AF4 の pSER 領域が細胞のがん化に必須であることを見いだした (図 1)。さらに、AF4 のさまざまなドメインを酵母 GAL4 DNA 結合ドメインに融合し、レポーターアッセイにて転写活性化を解析した結果、pSER ドメインに転写活性化能があることを明らかにした。次に AF4 の pSER ドメインに特異的に結合するタンパク質を同定した。具体的には、pSER ドメインを酵母 GAL4 DNA 結合ドメインに融合し 293T 細胞に発現させ、FLAG タ

グを用いた免疫沈降法により共作用因子を精製した後、質量分析にて同定した。その結果、AF4 の pSER ドメインに特異的に TAF1A, TAF1B, TAF1C および TBP が結合することを明らかにした(図 2)。

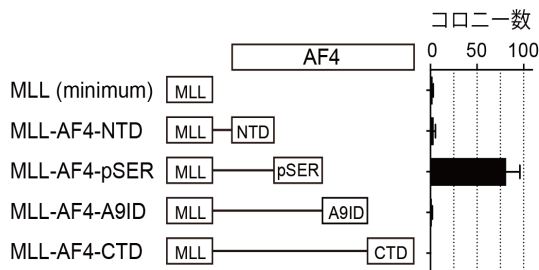


図 1 マウス骨髄前駆細胞トランスフォーメーションアッセイによる AF4 のがん化に必須なドメインの同定

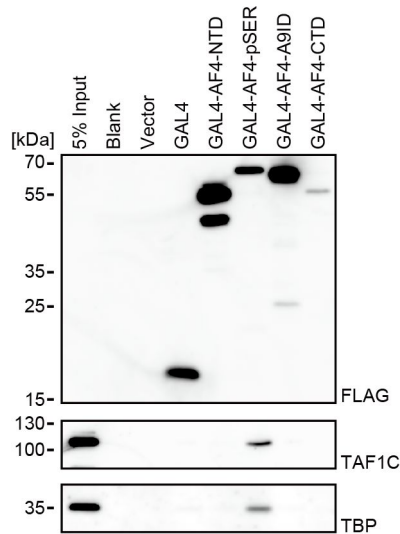


図 2 TAF1C および TBP の AF4 の機能ドメインへの結合特異性

また、リコンビナントタンパク質の発現解析から、質量分析にて同定した TAF1A, TAF1B, TAF1C および TBP は SL1 複合体として AF4 の pSER ドメインに結合していることが明らかとなった。

(2) 白血病細胞における AF4 複合体と SL1 複合体の様々な遺伝子プロモーター上での局在化

MLL 白血病細胞株を用いて MLL 複合体、AF4 複合体、SL1 複合体、RNA polymerase II の様々な遺伝子プロモーター上での局在を、ChIP-PCR および ChIP-Seq 法を用いて解析した。ChIP-PCR にて特定のプロモーター上の局在解析の結果、MLL 標的遺伝子である HOXA9、CDKN1B などの遺伝子のプロモーター上には MLL 複合体、AF4 複合体、SL1 複合体および RNA polymerase II が局在していることが明

らかとなった。さらに ChIP-Seq 法を用いた網羅的解析の結果、MLL 標的遺伝子のプロモーター上の多くに AF4 複合体と SL1 複合体が共同存在していることが明らかとなった。これらの結果から、MLL 白血病細胞において、MLL-AF4 複合体と SL1 複合体は機能的な高次複合体を形成し、RNA polymerase II の転写を促進していることが明らかとなった。

(3) MLL 白血病細胞における SL1 複合体の必要性

マウス骨髄前駆細胞のトランスフォーメーションアッセイにおいて MLL キメラで不死化した細胞は、MLL キメラ依存的な細胞増殖を示し、MLL キメラやその共作用因子を阻害すると、MLL キメラが働かなくなる為、細胞は死滅する。この細胞を用いて、我々が同定した MLL-AF4 キメラの共作用因子の一つである Taf1c を二種類の shRNA を用いてノックダウンすると(図 3A)、細胞のコロニー形成能が有意に阻害された(図 3B)。さらに、コロニー形成能が阻害された細胞の *Hoxa9* の発現量は、低下していた(図 3C)。これらの結果から、SL1 複合体は MLL キメラと共同して、下流遺伝子である *Hoxa9* の転写を促進することで、細胞をがん化させるのに必要であることが明らかとなった。

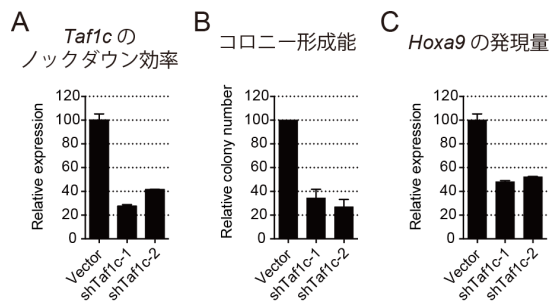


図 3 MLL キメラによってがん化したマウス白血病細胞における Taf1c の必要性

本研究によって MLL キメラによる恒常的な転写活性化および細胞のがん化に必要な転写活性化因子である SL1 複合体が同定された。SL1 複合体は RNA polymerase I の転写開始コア因子として働く複合体を構成することが知られているが、我々が知る限り SL1 複合体が RNA polymerase II の転写に直接関与している報告はなく、本研究成果は新規の転写活性化メカニズムを提案するものである。また、我々は野生型 AF4 複合体にも SL1 複合体が結合することも明らかにした。このことから、白血病細胞だけでなく正常細胞においても、AF4-SL1 高次複合体による転写が行われていることが示唆された。本研究成果が MLL 白血病の新規治療法開発の進展に寄与することが期待される。

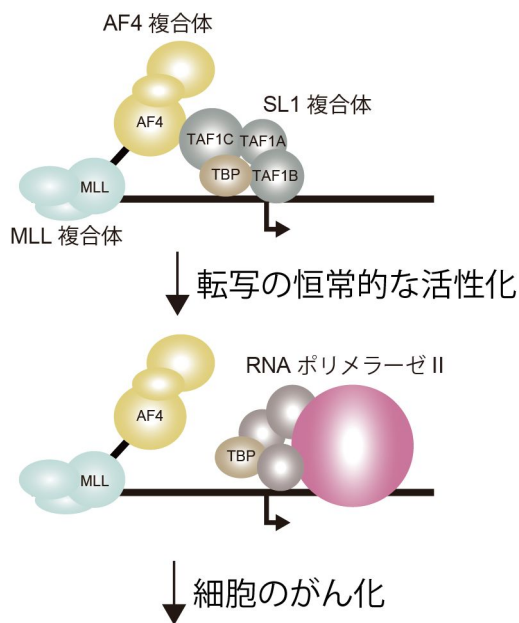


図4 SL1複合体を介したMLL-AF4キメラによる転写の活性化モデル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Okuda H, Kawaguchi M, Kanai A, Matsui H, Kawamura T, Inaba T, Kitabayashi I and Yokoyama A. MLL fusion proteins link transcriptional coactivators to previously active CpG-rich promoters. *Nucleic Acid Res.*, 査読有り, **42**, 2014, 4241-4256

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥田 博史 (OKUDA, Hiroshi)

京都大学・大学院医学研究科・特定助教

研究者番号：10629215

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

横山 明彦 (YOKOYAMA, Akihiko)

京都大学・大学院医学研究科・特定准教授

研究者番号：10506710