

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09936

研究課題名（和文）新規RUNX1阻害因子による造血制御機構の解明と分子標的としての応用

研究課題名（英文）Analysis of hematopoietic regulation mechanisms by a novel repressor for RUNX1

研究代表者

吉田 達士（YOSHIDA, TATSUSHI）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：80315936

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）：RUNX1は多くの急性白血病や骨髄異形成症候群において染色体転座や点突然変異が認められる。RUNX1は胎仔肝成体型造血に必須で、成体の血球分化の役割を担う。RUNX1は転写因子として働き、造血関連遺伝子の発現を制御するが、RUNX1自体が受ける制御は十分解析されていなかった。研究代表者らは、RUNX1に結合するタンパク質CRP1を見出し、この因子がRUNX1による転写を抑制する働きを持つことを発見した。本研究では、RUNX1機能に対するCRP1の作用機序解析、遺伝子改変マウスにおけるRUNX1に対するCRP1の影響解析、RUNX1とCRP1の結合を阻害する化合物スクリーニング系の構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RUNX1は白血病発症や造血分化異常と関連する因子であるが、RUNX1の機能を調節する効果的な手法は今まで報告されていなかった。本研究では、新たなRUNX1結合因子を発見し、そしてその因子がRUNX1機能に及ぼす影響を解析した。この因子とRUNX1との相互作用を標的とすることによって、RUNX1の機能不全を回復することができ、将来的には白血病や造血異常の改善に結び付くことが示唆された。したがって、本研究成果は十分な学術的意義および社会的意義を有していると考えられた。

研究成果の概要（英文）： RUNX1 gene is frequently point mutated or chromosomal translocated in acute leukemia and myelodysplasia. RUNX1 is essential for definitive hematopoiesis in fetal liver and plays a role in hematopoietic development in adult. RUNX1 acts as a transcription factor and regulates gene expression related to hematopoiesis, however regulation of RUNX1 itself has not been elucidated fully. Thus, we identified CRP1, a novel binding factor of RUNX1 and found that it repressed transcriptional regulation by RUNX1. In this research project, we analyzed the mechanism in which CRP1 affected to RUNX1 function and the effect of CRP1 on hematopoiesis regulated by RUNX1 in gene-modified mice. In addition we performed an establishment of a screening system to search compounds which can block the interaction between RUNX1 and CRP1.

研究分野：造血腫瘍学

キーワード：RUNX1 白血病 造血 転写因子

1. 研究開始当初の背景

RUNX1 (別名: AML1) は FAB 分類 M2 亜型のヒト急性白血病の約 40%に見られる t(8;21)染色体転座切断点からクローニングされた遺伝子で、ETO (MTG8 と呼ばれる) 遺伝子と融合遺伝子を形成することが白血病発症の原因と考えられている。また、染色体転座による融合遺伝子の形成がなくても 5~10%の急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群に RUNX1 の体細胞変異が見出されている。RUNX1 ノックアウトマウスは胎仔肝での成体型造血が完全に欠如し致死となり、また、コンディショナルノックアウトマウスと変異型ノックインマウスの解析から、成体の T 細胞、B 細胞の分化、血小板産生においても機能することが明らかにされている。RUNX1 は転写因子として機能し、共役因子 CBF と標的遺伝子のプロモーター上にあるコンセンサス配列 TGT/cGGT に結合し、M-CSF 受容体、T 細胞受容体、IL2、IL3、GM-CSF などの造血関連遺伝子の発現を制御する。以上のように RUNX1 は正常造血および白血病発症において極めて重要な働きを担っているが、それ自体が受ける制御メカニズムについてはまだ部分的にしか判明していない状況であった。

RUNX1 のこれら重要な生理機構の分子メカニズムを解明するため、新規結合因子を Yeast two-hybrid screening によって探索し 3 つのポジティブクローンを得た。研究代表者らは、この中の 1 クローンに着目して解析を進め、このクローン由来の遺伝子産物が哺乳動物細胞内でも RUNX1 と結合できることを明らかにした。この遺伝子はシャペロンに関連した遺伝子をコードしていたため、当該研究計画書では仮に Chaperon-related protein 1 (CRP1) と呼ぶこととした。RUNX1 の機能に及ぼす影響を調べた結果、CRP1 は RUNX1 依存的な転写を抑制でき、生理的な RUNX1 機能のブレーキとして働いている可能性があった。CRP1 による RUNX1 の機能調節に関して、更なる解析を行った。

2. 研究の目的

造血発生制御および白血病発症において重要な働きを担う RUNX1 は、標的遺伝子群の転写調節を行うことでその機能を発揮している。しかし、RUNX1 自身が受ける制御メカニズムについてはまだ部分的にしか解明されていない。私は、これまでの先行研究によって新規 RUNX1 結合因子 CRP1 を同定し、これは全く新しい機序により RUNX1 の転写機能を阻害していることを発見した。当該研究では、マウス個体を用いて CRP1 が実際に関与する造血・白血病における役割を明らかにし、更に CRP1 を細胞外から制御する手法を確立することによって、RUNX1 変異と失活に起因する造血異常および白血病の新たな治療法の開発に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞培養

HeLa 細胞と COS7 細胞は 10% fetal bovine serum と 2 mmol/L glutamine を添加した Dulbecco 's modified Eagle 's medium (WAKO) で培養した。K562 細胞は 10% fetal bovine serum を添加した RPMI 1640 (WAKO) で培養した。細胞は 37°C、5% CO₂ にて加湿して培養した。

Plasmid 構築

RUNX1 および CRP1 の欠失変異体を作成した。タンパク質コード領域の一部を PCR で増幅し pcDNA3.1 発現ベクターにサブクローニングした。蛍光タンパク質との融合タンパク質作成では、まず初めに蛍光タンパク質の cDNA を PCR で増幅して、pcDNA3.1 発現ベクターにサブクローニングした。蛍光タンパク質とフレームが合うように C 末端側に RUNX1、CRP1 と CBFβ の cDNA を

サブクローニングした。

mRNA 発現解析 (RT-qPCR)

TotalRNA を細胞から ISOGEN(Nippon gene)によって抽出し Superscript IV (Thermo Fisher Scientific)を用いて cDNA 化した。特異的プライマーと THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (TOYOBO) および StepOne Real-Time PCR System(Applied Biosystems)によって PCR 反応を行い mRNA 発現量を定量化した。

転写制御解析 (ルシフェラーゼアッセイ)

細胞に Lipofectamine2000(Thermo Fisher Scientific)を用いてレポータープラスミドと発現プラスミドをトランスフェクションした。48 時間後に細胞抽出液を調製し、dual-luciferase reporter assay (Promega)とルミノメーターLumat LB 9507 (Berthold)を用いて転写活性を定量化した。

タンパク相互作用解析 (免疫沈降法)

RUNX1 と CRP1 の発現プラスミドを、Lipofectamine2000 を用いて COS7 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に RIPA バッファーで細胞抽出液を調製した。特異的抗体と protein G-sepharose を添加してタンパク複合体を精製した。免疫沈降物を Western blotting により検出した。

遺伝子改変マウスの解析

CRP1 遺伝子変異体マウス (作成した研究施設より分与) と RUNX1 遺伝子解析マウスとを交配させ、血球の解析を行った。

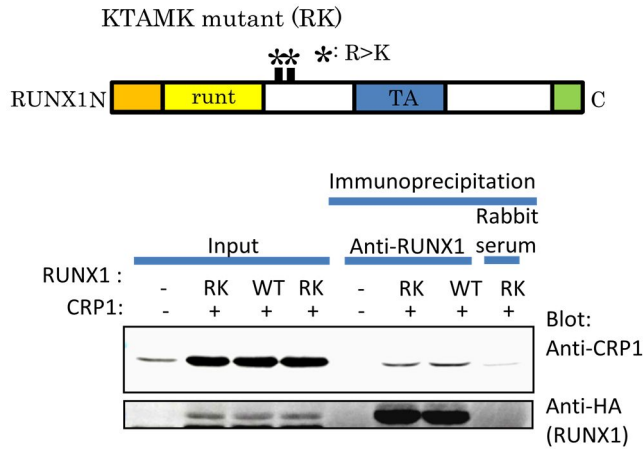
4 . 研究成果

1) CRP1 および RUNX1 結合部位の探索 :

451 アミノ酸 (AAs) によって構成される RUNX1 を 1-177 AAs (N 末端の DNA 結合領域 runt のみ)、1-137 AAs (runt と転写活性化領域を含む) の欠失変異体発現ベクターを作成した。これらの変異体と CRP1 発現ベクターを COS7 細胞に導入して発現させ、免疫沈降実験を行った。その結果、RUNX1 の 1-177 AAs 領域と CRP1 が会合することがわかった。また、CRP1 の N 末端部位と C 末端部位の欠失変異体を作成し、全長 RUNX1 と免疫沈降実験を行った。CRP1 の C 末端部位と RUNX1 が結合することが判明した。

2) RUNX1 翻訳後修飾による影響 :

RUNX1 は翻訳後にリン酸化、メチル化、アセチル化、ユビキチン化といった修飾を受け、それにより生物活性が大きく変化することが近年報告されてきている。これらの修飾のうち、メチル化されるアルギニンをリシンに置換した変異体 (KTAMK) と CRP1 との結合を免疫沈降実験によって調べた。KTAMK 変異体も野生型同様に CRP1 と結合することがわかった。



3) 標的遺伝子の解析

CRP1 は RUNX1 によって活性化される M-CSFR 遺伝子プロモーター、Osteocalcin2 遺伝子プロモーター、(CBF4)プロモーター (RUNX1 コンセンサス配列を4つつけたプロモーター)の活性を減弱させることを見出した。研究代表者は、さらに新規の RUNX1 標的遺伝子として TRAIL を発見した。CRP1 は RUNX1 によって活性化された TRAIL のプロモーター活性も抑制することを見出した。

4) CRP1 および RUNX1 遺伝子改変マウスの解析

RUNX1 遺伝子改変マウスと CRP1 遺伝子改変マウスを交配させて血球分化の解析を行った。RUNX1 遺伝子改変マウスでは T 細胞の分化および末梢血の造血発生異常が認められるが CRP1 遺伝子改変マウスと交配させることによって部分的に改善するという予備的データが得られた。交配マウスの作成に時間がかかっているが、さらに交配マウスを増やしてデータの確認を行う予定である。

5) RUNX1-CRP1 結合阻害化合物の探索

RUNX1 と CRP1 結合を阻害する化合物をスクリーニングするためのアッセイ系の構築を行った。Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) によって RUNX1 と CRP1 結合を解析するために、蛍光タンパク質 EGFP, ERFP, ECFP および EYFP と融合させた RUNX1 および CRP1 発現ベクターを構築した。また、蛍光タンパク質と CBF の融合タンパク質発現ベクターもポジティブコントロールとして用いるために構築した。これらのコンストラクトを細胞に発現させて蛍光顕微鏡下で観察することによって、蛍光タンパク質として機能することを確認した。また FRET 解析に用いるための in cell analyzer の FRET システムが導入されたので、これらを用いて解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 吉田達士, 山崎健太, 奥田司	4. 巻 128
2. 論文標題 特集「がん研究・診療を巡る最新トピックス」細胞死とがん	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 京府医大誌	6. 最初と最後の頁 81-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32206/jkpum.128.02.081	査読の有無 無
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12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 忠垣憲次郎, 山崎健太, 近藤則子, 柴原康通, 吉田達士, 奥田司
2. 発表標題 転写因子RUNX1/AML1の新規候補標的遺伝子群の探索
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsushi YOSHIDA, Kenjiro TADAGAKI, Yasumichi KUWAHARA, Toshiyuki SAKAI, and Tsukasa OKUDA
2. 発表標題 Analysis of a novel transcriptional target gene of RUNX1.
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akifumi Matsumoto, Tatsushi Yoshida, Takahiro Shima, Kenta Yamasaki, Kenjiro Tadagaki, Noriko Kondo, Yasumichi Kuwahara, Donger Zhang, Tsukasa Okuda
2. 発表標題 Identification of a novel RUNX1 target by public data re-analysis that is suppressed by RUNX1-ETO
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 健太、忠垣 憲次郎、近藤 則子、桑原 康通、吉田 達士、奥田 司
2. 発表標題 造血関連転写因子 RUNX1による制御遺伝子の探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsushi YOSHIDA, Kenta YAMASAKI, Kenjiro TADAGAKI, Yasumichi KUWAHARA, Noriko KONDO, Akifumi MATSUMOTO, Toshiyuki SAKAI, and Tsukasa OKUDA.
2. 発表標題 A novel transcriptional target of RUNX1.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasumichi KUWAHARA, Tatsushi YOSHIDA, Kenjiro TADAGAKI and Tsukasa OKUDA.
2. 発表標題 Functional interaction between SWI/SNF complex and a hematopoietic transcription factor in malignant rhabdoid tumor.
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenjiro Tadagaki, Kenta Yamasaki, Noriko Kondo, Yasumichi Kuwahara, Tatsushi Yoshida, Tsukasa Okuda.
2. 発表標題 Analysis of a novel candidate target gene of the hematopoietic transcription factor RUNX1 (AML1).
3. 学会等名 第80回日本血液学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 忠垣憲次郎、山崎健太、近藤則子、柴原康通、吉田達士、奥田司
2. 発表標題 造血関連転写因子RUNX1(AML1)の新規転写標的候補遺伝子の探索
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 忠垣憲次郎、山崎健太、柴原康道、吉田達士、奥田司
2. 発表標題 RUNX1/AML1転写因子の新規候補標的遺伝子の解析
3. 学会等名 第64回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenjiro Tadagaki, Yasumichi Kuwahara, Tatsushi Yoshida, Tsukasa Okuda.
2. 発表標題 An array-based approach for novel RUNX1(AML1)-target genes.
3. 学会等名 第76回日本癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenjiro Tadagaki, Kenta Yamasaki, Yasumichi Kuwahara, Tatsushi Yoshida, Tsukasa Okuda.
2. 発表標題 Candidate target genes of hematopoietic transcription factor RUNX1 (AML1).
3. 学会等名 第79回日本血液学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasumichi Kuwahara, Kenta Yamasaki, Kenjiro Tadagaki, Tatsushi Yoshida, Tsukasa Okuda
2. 発表標題 Mechanism of recruitment of SWI/SNF complex via interaction between SNF5 and transcription factor.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会/第90回日本生化学会大会)
4. 発表年 2017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
研究分担者	奥田 司 (OKUDA TSUKASA) (30291587)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	