

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02645

研究課題名(和文) ALL特異的融合遺伝子の in vivo機能解析から見た白血病多段階発癌機構の解明

研究課題名(英文) Deciphering leukemia development and maintenance from the perspective of functions of fusion genes

研究代表者

都築 忍 (Tsuzuki, Shinobu)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：00342965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：急性リンパ性白血病の中で、MEF2D遺伝子やCRLF2遺伝子に異常のあるタイプは治療成績が不良である。MEF2D遺伝子に異常(融合遺伝子)があるタイプでは、(a)この異常遺伝子の働きで、白血病細胞表面にプレB細胞受容体という特殊な蛋白質が発現し、これが白血病の増殖・維持に必須であること、(い)よってこのプレB細胞受容体の発現を弱めることで治療可能なことを本研究で示した。CRLF2遺伝子に異常があるタイプでは、この異常遺伝子の働きでJAKという酵素が活性化するのだが、このJAK酵素を阻害する薬剤だけでは治療効果は低い。本研究ではその理由の一端を明らかにし、対策となる薬剤を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性リンパ性白血病の成人における長期生存率は30%と不良で、治療成績の比較的良好な小児においても抗がん剤・放射線治療の長期的悪影響は無視できない。白血病の原因遺伝子の機能解析を通じた治療戦略ならびに新規治療法の開発が必要である。本研究では、2つの予後不良タイプを対象に、白血病がどのような機構で維持され、また、治療不応性を示すのか、その一端を明らかにし、その対策薬を同定した。この対策薬は動物での治療実験でも効果を確認でき、ヒトへの応用が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Acute lymphocytic leukemia harboring abnormalities in MEF2D or CRLF2 genes is associated with poor clinical outcomes. (1) In the type with an abnormality (fusion gene) in the MEF2D gene, we found that (a) this abnormal gene induces pre-B cell receptor on the cell surface, which plays essential roles for the growth and maintenance of leukemia. (b) Therefore, drugs weakening its expression have therapeutic efficacy. (2) In the type with an abnormality in the CRLF2 gene, this gene activates an enzyme called JAK, but the therapeutic effect of inhibitors of JAK itself is low. Here, we clarified a part of the reason and identified drugs exploitable as a countermeasure.

研究分野：造血器腫瘍学

キーワード：急性リンパ性白血病 MEF2D CRLF2

1. 研究開始当初の背景

急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia: ALL)の成人における長期生存率は30%と不良で、治療成績の比較的良い小児においても抗がん剤・放射線治療の長期的悪影響は無視できない。白血病の原因遺伝子の同定と、その機能解析を通じた治療戦略ならびに新規治療法の開発が必要である。

申請者を含むグループは、原因遺伝子の解析が遅れていた思春期・若年成人の B 細胞性急性リンパ性白血病(B cell ALL: B-ALL)について、RNA シーケンスによる網羅的融合遺伝子解析を行い、DUX4(Double Homeobox 4), ZNF384(Zinc Finger Protein 384), MEF2D(Myocyte Enhancer Factor 2D)という3つの転写因子が関与する融合遺伝子を新規に同定した。これらは、高頻度に存在し、うち MEF2D 融合遺伝子を有する ALL は予後不良である。その後、中高年者でも ZNF384 や MEF2D の融合遺伝子を有する症例が相当数存在することが明らかになっている。また、近年 Ph-like 型 B-ALL が極めて予後不良であるとの報告があり、特に AYA 世代で頻度が高い。なかでも CRLF2 遺伝子が高発現するタイプが最も高頻度であることから、重要な解析対象である。

これらの異常遺伝子の機能や、白血病における役割は不明な点が多い。機能解析を通じて、その白血病原あるいは白血病維持における役割を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、顕性白血病化した細胞において、その維持機構を明らかにする。その結果をもとに治療法を考案する。不顕性段階の白血病(白血病前駆段階)において、その成立機構を明らかにすることで多段階発がん機構を明らかにする、である。

3. 研究の方法

問題とする異常遺伝子は転写因子あるいは転写因子の活性化因子なので、その機能を明らかにするには、当該異常転写因子によってどの遺伝子の発現が制御されているのかを知ることが極めて重要である。そこで、ヒトの顕性白血病化した細胞(細胞株)を用いて、クロマチン免疫沈降-シーケンス(ChIP-seq)を行った。ただし、当該異常転写因子に対して ChIP-seq 可能な抗体が無いので、Crispr-Cas9 システムにより内在性の転写因子に HA タグを付加して行った。ChIP-seq の精度確認と結合領域同定のために ATAC-seq によるオープンクロマチン領域の同定、さらに、その細胞の性質を決めている遺伝子を支配することが知られているスーパーエンハンサーの同定解析もあわせて行った。

さらに、該当異常転写因子のノックダウンがもたらす遺伝子発現変化を解析し、同時に白血病細胞の増殖・生存への影響も解析して、機能的意義付けを行った。

以上から明らかとなる、顕性白血病化した細胞の維持機構をもとに、この維持機構を破綻させる可能性のある薬剤を選別し、その効果を *in vitro* での細胞増殖抑制試験、細胞死誘導試験およびマウスを用いた *in vivo* での治療実験により解析した。

白血病が顕性化する前の前がん病変(不顕性段階の白血病、白血病前駆段階)がどのような状態であるのかをマウスモデルを作成して解析した。当該異常転写因子によってもたらされる分化異常・増殖生存効果を解析し、また、顕性白血病化に伴ってどのような遺伝子異常が生じるかも解析した。

4. 研究成果

「1. 研究開始当初の背景」で記した4つの病型のうち、臨床的に予後不良な MEF2D 融合遺伝子を有するタイプ(以下、MEF2D-ALL)と、CRLF2 が高発現するタイプ(CRLF2-ALL)を取り上げる。これ以外のタイプについても研究を継続している。

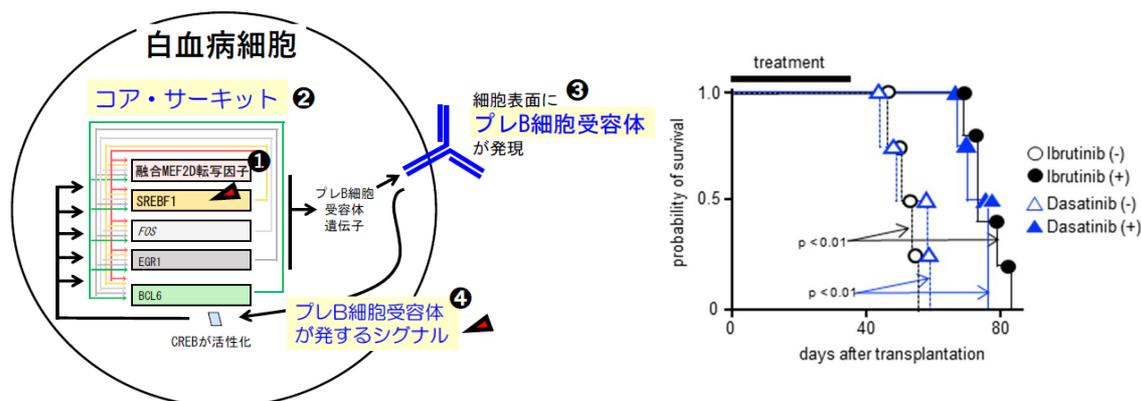
【MEF2D-ALL】

ヒト MEF2D-ALL 細胞株 Kasumi-7 においてその内在性 MEF2D 融合遺伝子の C 末端に HA-2A-GFP をノックインした Kasumi7-HA 細胞を樹立した。この細胞を用いて、抗 HA 抗体による ChIP-seq 解析、抗 H3K27Ac 抗体によるスーパーエンハンサー解析、ATAC-seq によるオープンクロマチン領域解析により、MEF2D 融合蛋白(これは上述のように異常転写因子である)は、プレ B 細胞受容体をコードする複数の遺伝子(IGLL1, VPREB1, CD79A) およびその下流のシグナル分子(FOS, BCL6, NFATC1 など)のプロモーターに結合するこ

とが判明した。これらの遺伝子はスーパーエンハンサーを伴っており、その遺伝子発現が堅牢に維持されるものと考えられた。実際、臨床検体細胞 2 種と細胞株 10 種において MEF2D-ALL 細胞はすべて細胞表面にプレ B 細胞受容体を発現していることも明らかとなった。このプレ B 受容体は、リガンドなしに細胞に増殖・生存・分化のシグナルを入れることがマウスでは明らかになっている。染色体転座により MEF2D 異常融合遺伝子が発現することで、プレ B 細胞受容体が発現し続けることが白血病の発症・維持に必須の役割を果たすことが想定される。事実、Kasumi-7-HA 細胞において MEF2D 融合蛋白をノックダウンすると、細胞は増殖を停止し、分化し、アポトーシスで死滅することが明らかとなった。さらに、マウスモデルにおいて正常の未分化 B 細胞に MEF2D 融合遺伝子を発現させると、プレ B 細胞段階で分化が停止し、やがてこの細胞からプレ B 細胞受容体陽性の B-ALL が発症することを観察している。この際、白血病化に伴って BTG1, CDKN2A などの細胞周期抑制性遺伝子の欠失を観察したが、ヒト MEF2D-ALL でのその頻度は低いことから、ヒトとマウスでは白血病化に必要な 2 次的遺伝子異常が異なる可能性が示唆された。

興味深いことに、MEF2D 融合遺伝子自身もスーパーエンハンサーに制御され、かつ、MEF2D 融合蛋白自身が自身の転写に寄与すること、つまり、self-enforcing feed-forward loop を形成することが明らかとなった。更に解析をすすめた結果、MEF2D 融合蛋白(下左図中①)・SREBF1 転写因子・FOS 転写因子・EGR1 転写因子・BCL6 転写因子がサーキットを形成(同②)して、各々自身およびお互いを転写しあう Core Regulatory Circuitry(CRC)を形成することも明らかとなった。この CRC はアウトプットとしてプレ B 細胞受容体の発現を誘導・担保し(同③)、このプレ B 細胞受容体が発するシグナルが今度は CRC を維持するために必須であること(同④)、よってここにも self-enforcing feed-forward loop があることがわかった。したがって、プレ B 細胞受容体シグナルを遮断する薬剤は、CRC を破壊し、よってプレ B 細胞受容体の発現を減弱させ、これがまた CRC の発現を低下させるという負のスパイラルを招き、よって MEF2D-ALL の治療に有効であることが判明した(下右図)。

SREBF1 転写因子は、細胞内コレステロールが低下すると、蛋白切断により活性化する転写因子で、コレステロール合成や取り込みに関与する遺伝子を転写する。SREBF1 もコア・サーキットのメンバーであり、実際細胞にコレステロールを負荷するとこの転写因子は不活化され、これに伴ってコア・サーキット転写因子の発現ならびにプレ B 細胞受容体の発現も低下した。さらに、SREBF1 の活性化を抑制する薬剤が MEF2D-ALL の治療効果を示すことも明らかとなった。

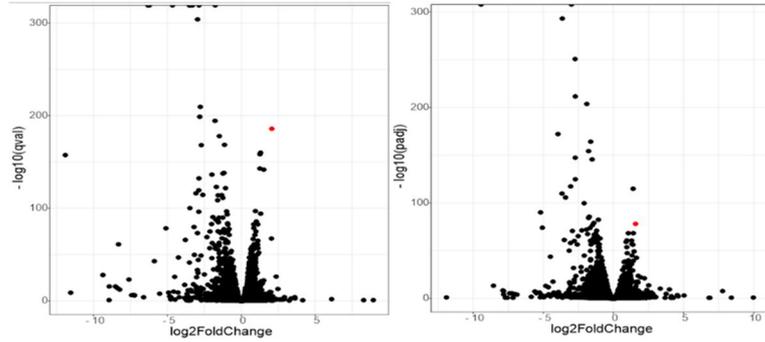


【CRLF2-ALL】

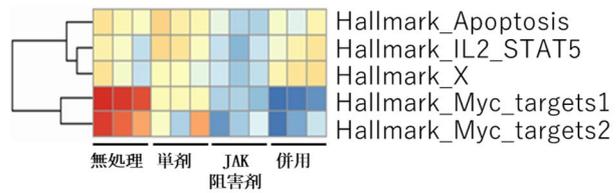
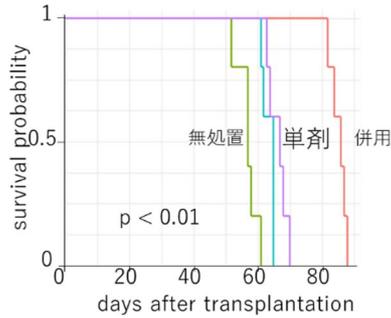
このタイプの B-ALL の発症・維持機構を解析するために、はじめにマウス未分化 B 細胞に CRLF2 遺伝子、IL7Ra 遺伝子、変異 JAK2 遺伝子を発現させて白血病のモデル化を行った。その結果、ヒト白血病と同様の性質 (JAK 活性化・STAT5 活性化など) が得られ、in vitro で自立増殖すること、よってモデル細胞となることが確認できた。

CRLF2-ALL は恒常的に JAK1/2 が活性化しているものの JAK1/2 阻害剤の臨床での治療効果が低いことが知られている。その機序を考察するために、CRLF2-ALL 細胞に JAK 阻害剤を作用させる前後で比較する形で RNA-seq 遺伝子発現解析を行った。その結果、2 種類の細胞で共通して JAK 阻害剤で発現増強する遺伝子群があることが明らかとなった (次図)。その中で、図中赤点で示す遺伝子に着目した。この遺伝子は、他の腫瘍ではがん遺伝子に分類される。このことから、CRLF2-ALL では、JAK1/2 阻害剤によりなるほど JAK1/2 活性が低下して

STAT5 活性も低下するが、一方でこのようながん遺伝子の発現を亢進させる副作用があることが示唆された。この遺伝子をノックダウンすると CRLF2-ALL 細胞の増殖が低下し、薬剤でその機能を阻害することでも同様の結果を得た。次に、この薬剤と JAK1/2 阻害剤の



協調作用を解析すると、両者は協調的に CRLF2-ALL の増殖を阻害し、このことはマウスでの CRLF2-ALL モデルによる治療実験でも確認できた（次図左）



この併用相乗作用の機序を探るために、再び遺伝子発現解析を行い、いくつかのパスウェイが変化することを Gene Set Variation 解析等で確認した（上図右）。特に着目すべきは、JAK 阻害剤でアポトーシスパスウェイが減弱し、薬剤併用により回復する点である。この点は、in vitro でのアポトーシス・アッセイでも確認することができた。

以上から、CRLF2-ALL が臨床的に JAK1/2 阻害剤の有効性が低い理由の一旦を明らかにするとともに、その対策薬を同定することができた。詳細についての研究を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shinobu Tsuzuki, T. Yasuda, S. Kojima, M. Kawazu, K. Akahane, T. Inukai, M. Imaizumi, T. Morishita, K. Miyamura, T. Ueno, S. Karnan, A. Ota, T. Hyodo, H. Konishi, M. Sanada, H. Nagai, K. Horibe, A. Tomita, K. Suzuki, H. Muramatsu, Y. Takahashi, Y. Miyazaki, I. Matsumura, H. Kiyoi, Y. Hosokawa, H. Mano, F. Hayakawa	4. 巻 1
2. 論文標題 Targeting MEF2D-fusion Oncogenic Transcriptional Circuitries in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 82 - 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2643-3230.bcd-19-0080	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 -

1. 著者名 Hirano D, Hayakawa F, Yasuda T, Tange N, Yamamoto H, Kojima Y, Morishita T, Imoto N, Tsuzuki S, Mano H, Naoe T, Kiyoi H.	4. 巻 38
2. 論文標題 Chromosomal translocation-mediated evasion from miRNA induces strong MEF2D fusion protein expression, causing inhibition of PAX5 transcriptional activity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2263-2274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-018-0573-9	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 -

1. 著者名 K. Akahane, T. Yasuda, S. Tsuzuki, F. Hayakawa, N. Kiyokawa, S. Somazu, A. Watanabe, K. Kagami, M. Abe, D. Harama, K. Goi, M. Kawazu, S. Kojima, T. Imamura, H. Goto, S. Iwamoto, M. Minegishi, M. Abe, H. Hojo, T. Inaba, H. Mano, K. Sugita, T. Inukai	4. 巻 38
2. 論文標題 High prevalence of MEF2D fusion in human B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cell lines.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hematological oncology	6. 最初と最後の頁 614-617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hon.2762	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安田貴彦、西島大、小島進也、河津正人、上野俊秀、都築忍、清井仁、松村到、宮崎泰司、堀部敬三、間野博行、直江知樹、真田昌、早川文彦
2. 発表標題 成人B細胞性急性リンパ性白血病のゲノム学的・臨床的な特徴
3. 学会等名 第80回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本秀行、早川文彦、安田貴彦、南川友香、丹下直幸、平野大希、小島勇貴、都築 忍、間野博行、直江知樹、清井仁
2. 発表標題 ZNF384融合遺伝子による急性リンパ性白血病発症機構の解明
3. 学会等名 第80回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤羽 弘賢, 安田 貴彦, 都築 忍, 早川 文彦, 清河 信敬, 加賀美 恵子, 阿部 正子, 原間 大輔, 渡邊 敦, 合井 久美子, 今村 俊彦, 後藤 裕明, 岩本 彰太郎, 峯岸 正好, 北条 洋, 稲葉 俊哉, 杉田 完爾, 犬飼 岳史
2. 発表標題 MEF2D融合遺伝子はBCP-ALL細胞株で最も高頻度に検出される
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 丹下 直幸, 早川 文彦, 安田 貴彦, 山本 秀行, 平野 大希, 都築 忍, 清井 仁
2. 発表標題 MEF2D融合タンパクの分解を誘導する薬剤をスクリーニングするシステムの開発
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 MEF2D融合型急性リンパ性白血病を治療するための医薬組成物	発明者 都築 忍	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-020729	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 MEF2D融合型急性リンパ性白血病を治療するための医薬組成物	発明者 都築 忍	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-020730	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	安田 貴彦 (Yasuda Takahiko) (20723977)	独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・その他部局等・分子診断研究室長 (83904)	

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
---------	---------