

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17859

研究課題名(和文) CRISPRスクリーニングを用いたATRA併用AML新規分化誘導療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy for AML via CRISPR screen

研究代表者

山内 拓司 (Yamauchi, Takuji)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20796213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：新たなAML治療法開発のため、CRISPR/Cas9遺伝子改変技術を応用し、CRISPR全ゲノムスクリーニングを抗白血病薬(ATRA)と併用して行った。ATRAと協働してAML細胞を分化・細胞死を誘導する遺伝子としてHUSH複合体を構成する因子を同定した。本研究結果より、HUSH構成因子のなかで、MORC3遺伝子の欠損がATRAと協働してAML細胞死を誘導することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMLは難治性の造血器悪性腫瘍であり、新たな治療法開発は喫緊の課題である。我々が用いた手法により、既存の抗白血病薬との新たな治療法開発が可能であると考えられる。今回の研究は、AML治療法における新たな治療法開発基盤となるシーズを創出した。

研究成果の概要(英文)：Whole genome CRISPR/Cas9 screen with ATRA was performed to develop a new treatment for AML. We identify HUSH component genes as synthetic lethal genes with ATRA for AML cells. Our results in this study indicated that the loss of MORC3 gene among the component of HUSH induced apoptosis with ATRA for AML cells.

研究分野：血液学

キーワード：AML novel therapy CRISPR HUSH MORC3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昨今のゲノムシーケンシング技術の進歩により、AML 発症の起因となる細胞レベルでの遺伝子異常の多様性が明らかになり、さらに個体レベルでの白血病クローンの多様性 (clonal heterogeneity) も明白になった。これら細胞・個体レベルでの多様性こそ、AML が難治性たる所以であり、その多様性に対処するためには、単に抗がん剤により細胞死を誘導するだけではなく、免疫療法、移植療法を組み合わせた多面的なアプローチが必要である。骨髄球系腫瘍である AML の細胞レベルの病態には、増殖異常と分化ブロックが背景にあり、APL に対する ATRA 治療にみられるように、腫瘍細胞の分化を誘導する治療、いわゆる分化誘導療法が一つの有望な治療アプローチである。ATRA は前骨髄球性白血病 (APL) の第一選択薬であるが、その分化誘導効果は PML-RAR 遺伝子を有する APL 細胞に限られている。しかしながら、レチノイン酸受容体が正常骨髄球の分化に必須であること、ATRA と他剤との併用により APL 以外の AML 細胞株でも、ときに分化、細胞死をきたすことが知られており (Wang: Blood, 2008)、申請者は ATRA 刺激に加えて他のタンパク・複合体の機能を阻害することで、ATRA の分化・細胞死誘導効果をより効率よく惹起できると仮説を立てた。

2. 研究の目的

成人急性骨髄性白血病 (AML: acute myeloid leukemia) の治療成績は、ごく一部の病型を除いて、過去 30 年以上にわたって大きな進歩を遂げておらず、新規治療法の開発が急務である。AML の発症には、遺伝子変異に起因する増殖異常と、分化ブロックが背景にあり、急性前骨髄球性白血病 (APL: acute promyelocytic leukemia) に対するレチノイン酸 (ATRA: all-trans retinoic acid) 治療の成功に端を発し、分化誘導療法が治療法の一つとして期待されてきた。しかしながら、APL 以外の AML に対しての分化誘導療法は未だ確立されていない。

CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子改変技術の進歩により、タンパクをコードする全ゲノムをターゲットとした、細胞の表現系 (増殖、分化など) に基づいた責任遺伝子のスクリーニングが可能となった。申請者は、この遺伝子改変技術をいち早く導入し、全ゲノムスクリーニングを AML の増殖・分化に関わる遺伝子の探索に応用することで、AML 細胞の分化を誘導する因子として、DCPS (decapping enzyme scavenger) を同定し、その阻害剤の抗白血病効果を報告した (Yamauchi: Cancer Cell, 2018)。さらに CRISPR 全ゲノムスクリーニングを抗白血病薬と併用することで、その薬剤と協働して AML 細胞死を誘導する遺伝子 (synthetic lethal)、その薬剤に耐性を示す遺伝子 (drug resistant) を見いだすことが出来る。今回、申請者は、新たな分化誘導療法の標的を同定すべく、ATRA 存在下で CRISPR 全ゲノムスクリーニングを行い、ATRA と協働して AML 細胞の分化・細胞死を誘導する新規遺伝子を複数同定した。ATRA 存在下でのみ欠損する遺伝子群には、遺伝子抑制に必須の H3 ヒストンテイルのメチル化 (H3K9me3) に作用する HUSH (human silencing hub) 複合体を構成する因子が全て含まれており、ATRA 刺激と HUSH 複合体の機能阻害が AML 細胞の分化誘導を促進することが示唆された。

本研究のねらいは、ATRA 刺激と HUSH 複合体構成因子の欠失が協働して、AML 細胞の分化・細胞死を誘導する分子機序を解明すると同時に、ATRA/HUSH 阻害による新たな分化誘導療法の基盤となる知見を創出する。

3. 研究の方法

1. HUSH 複合体構成因子欠損 AML 細胞株の樹立と、ATRA による分化能の評価

スクリーニング結果から、ATRA 刺激と協働して AML 細胞の分化・細胞死を誘導すると考えられる HUSH 構成因子は、Tasor, Mphosph8, Pph1n1m Morc3 の 4 つである。HUSH 構成因子 (Tasor, Mphosph8, Pph1n1, Morc3) の各因子を欠損したヒト AML 細胞 (MOLM-13, OCI-AML3) を CRISPR/Cas9 で樹立し、各変異細胞株の ATRA に対する感受性・分化能を、FACS を用いた Edu/DAPI による細胞周期解析、骨髄・単球系分化マーカー (CD11b, CD15 など) の発現レベル解析、サイトスピン標本の May-Giemsa 染色後の鏡検などの手法で解析し、各因子の阻害が AML 細胞分化に及ぼす影響を検討する。

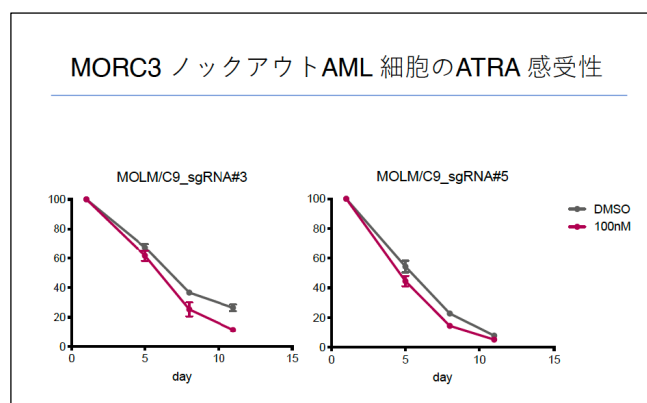
2. HUSH 複合体構成因子を標的とした CRISPR/Cas9-SM 法による機能的アミノ酸残基・ドメインの同定

CRISPR-SM 法の詳細は申請者の過去の論文を参照されたい(Yamauchi: Cancer Cell, 2018)。HUSH 構成因子(Tasor, Mphosph8, Pph1n1, Morc3)をコードする全てのエクソンのセンス、アンチセンス方向に設計可能な全ての sgRNA 約 2600 と non-targeting sgRNA 200 種を合わせた、約 2800 の sgRNA から構成されるレンチウイルスライブラリーを作成する。オリゴは米国の Custom Array 社から購入し、Gibson クローニング法で、lentiGuide-Puro ベクター(AddGene)に挿入する。1 つの sgRNA が少なくとも 500 個の細胞に導入されるよう、約 1.5×10^6 個の MOLM-13 細胞にライブラリーを感染させる。sgRNA を導入後、Puromycin による薬剤選択を経た時点で一部の細胞を保存し DNA を抽出する (day3 DNA)。その後、6 日間細胞を培養した後、ATRA 刺激する群としない群に系を分割し、さらに 7 日間培養し、細胞を回収して DNA を抽出する (day 18 DNA)。ATRA 刺激群、非刺激群ともに day3 と day18 DNA での各 sgRNA の abundance を次世代シーケンサー(NextSeq500)で算出し、MAGeCK プログラムで解析し、day18 DNA で有為に消失する sgRNA を同定する。各 sgRNA の情報をその sgRNA が標的とする double-stranded break コドンの情報にマップし、AML 細胞の増殖に重要なアミノ酸残基・ドメインを同定する。結晶構造がデータベース上に開示されているタンパク、ドメインに関しては、アミノ酸残基の情報をその結晶構造に投影し、可視化する。さらに、MOLM-13 細胞が分化した際に CD15、CD11b の細胞表面抗原の発現が上昇する特性を活かし、同様のスクリーニングで、分化した CD15+CD11b+ 強陽性細胞を day18 に FACS でソートし、その分画に有意に enrich した sgRNA を同定し、上記の dropout スクリーンの結果と照合することで、分化と細胞死(もしくはその両方)に寄与する HUSH 複合体構成因子のアミノ酸残基・タンパクドメインを決定する。特に分化誘導作用の強いアミノ酸残基に関しては、そのアミノ酸の変異体細胞株を、CRISPR を使って作製し、ATRA に対する反応性を検証する。

4. 研究成果

1. HUSH 複合体構成因子欠損 AML 細胞株における ATRA 感受性・分化誘導能

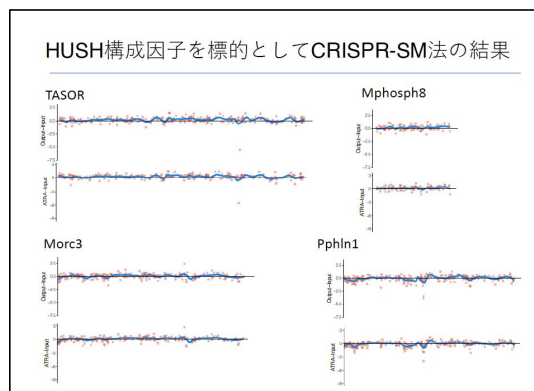
CRISPR-Cas9 system を用いて、各 HUSH 複合体構成因子を欠損したヒト AML 細胞株を樹立した。各 sgRNA は蛍光色素 Crimson で標識されており、標的遺伝子が欠損した AML 細胞は FACS により Crimson 陽性細胞として同定可能である。HUSH 構成因子欠損 AML 細胞と、非欠損 AML 細胞を共培養し、そこに ATRA を添加することで



ATRA に対する感受性を評価した。右図に示すように、DMSO 添加時と比較して ATRA 添加時ににおいて、MORC3 欠損 AML 細胞 (Crimson 陽性細胞) は明らかに減少した。このデータは MORC3 欠損が ATRA に対する感受性を増大させていることを示唆する。その他の HUSH 構成因子である、Tasor, Mphosph8, Pph1n1 の欠損は ATRA に対する感受性に明らかな影響を及ぼさなかった。

2. HUSH 複合体構成因子を標的とした CRISPR/Cas9-SM 法の結果

各 HUSH 構成因子に対して CRISPR-saturating mutagenesis 法を行い、各構成因子欠損が ATRA と協働して AML 細胞死を誘導するのかを検証するとともに、各 sgRNA の情報をその sgRNA が標的とする double-stranded break 様コドンの情報にマップし、重要なアミノ酸残基・ドメインの同定を試みた。右図に示すように、Tasor, Mphosph8, Pph1n1 に関しては、ATRA 添加時、非添加時で有意な差を認めなかった。Morc3 に関しては、ATRA 非添加時と比して ATRA 添加時に若干の AML 細胞死の誘導を認めた。現在、結アミノ酸残基の情報をその結晶構造に投影・可視化するために解析中である。



・考察

AML 細胞死を誘導する候補因子として HUSH 複合体に着目し、その各構成因子を検証しところ、Morc3 に関しては、その欠損が ATRA と協働して AML 細胞死を誘導する可能性が示されたが、その他の構成因子 (Tasor, Mphosph8, Pph1n1) に関しては、明らかではなかった。これらの結果から、HUSH 複合体構成因子の中でも、Morc3 が ATRA と協働して AML 細胞死を誘導する因子であることが示唆された。しかしながら、その細胞死誘導効果はわずかであった。元の全ゲノムスクリーニングは、マウス AML 細胞株を用いており、ヒトマウス間の差がある可能性も考え、現在、マウス AML 細胞株で HUSH 構成因子欠損 AML 細胞を作成し、検証を行っているところである。また、ヒト AML 細胞株に関して、今回は MOLM-13 細胞を用いたが、ヒト AML 細胞株の中には ATRA に全く感受性を示さない細胞株 (HEL, KG1a) あることを見出ししており、それらの細胞を用いて HUSH 複合体構成因子欠損の影響を検証する予定である。

・今後の課題

今回の研究で、スクリーニングで ATRA と協働して AML 細胞死を誘導する候補因子として HUSH 複合体に着目し、その各構成因子を検証した。Morc3 に関しては、その欠損が ATRA と協働して AML 細胞死を誘導する可能性が示された。Morc3 は PML body を形成する因子として必須であることが報告されており、Morc3 欠損が、ATRA と協働して AML 細胞死を誘導する、そのメカニズムを研究していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------