

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2014～2015
 課題番号：26893051
 研究課題名（和文）造血器腫瘍におけるSETBP1変異体の機能解析と治療応用

 研究課題名（英文）The role of SETBP1 mutation in leukemic transformation

 研究代表者
 井上 大地（Inoue, Daichi）

 東京大学・医科学研究所・特任助教

 研究者番号：80735746

 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄異形成症候群（MDS）は予後不良な疾患であり急性骨髄性白血病（AML）に形質転換する。申請者はASXL1変異体を用いたMDSモデルマウスを用いてSETBP1遺伝子変異を獲得することで形質転換することを多岐にわたる実験により明らかとした。SETBP1変異はMDS検体においてASXL1変異MDSと有意に共存する予後不良因子であり、アポトーシス抑制・分化抑制に作用した。ASXL1変異/SETBP1変異双方を発現したマウスモデルではMDSではなくAMLを惹起し、そのメカニズムとしてPP2Aの抑制、HOAX遺伝子の発現誘導、TGFシグナルの抑制の3つが複合的に関与していることを示した。

研究成果の概要（英文）：Mutations in ASXL1 are frequent in patients with MDS and are associated with adverse survival. Here, we find that SETBP1-MT are enriched among ASXL1-mutated MDS patients and associated with increased incidence of leukemic transformation, as well as shorter survival, suggesting that SETBP1-MT play a critical role in leukemic transformation of MDS. Expression of SETBP1-MT inhibited protein PP2A activity, leading to Akt activation and enhanced expression of posterior Hoxa genes in ASXL1-mutant cells. Biologically, SETBP1-MT augmented ASXL1-MT-induced differentiation block, inhibited apoptosis and enhanced myeloid colony output. SETBP1-MT collaborated with ASXL1-MT in inducing acute myeloid leukemia in vivo. The combination of ASXL1-MT and SETBP1-MT repressed the tumor growth factor-signaling pathway. These data reveal that SETBP1-MT are critical drivers of ASXL1-mutated MDS and identify several deregulated pathways as potential therapeutic targets in high-risk MDS.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄異形成症候群 急性骨髄性白血病 エピジェネティクス TGF

1. 研究開始当初の背景

近年の遺伝子解析技術の進歩により、骨髄異形成症候群(MDS)の患者の骨髄細胞からは多岐にわたる遺伝子変異が検出されている。特に、ヒストン修飾に関与すると考えられる ASXL1 (Additional sex comb-like 1) の変異が MDS 患者の早期から、あるいは幹細胞レベルで高頻度に認められることが報告され、発症を惹起する driver mutation である可能性が示唆されている。申請者はこれまでにマウス骨髄移植モデルを用いて ASXL1 変異体 (ASXL1-MT) を発現させた造血幹細胞を移植したマウスではヒト MDS に類似した病態になること、in vitro では分化を顕著に抑制することを示した。そのメカニズムとして以下の知見を得た。ASXL1-MT は ASXL1 野生型と EZH2 との結合を阻害し EZH2 による抑制性ヒストン修飾 (H3K27me3) を低下させ、これにより本来は抑制されるべき HOXA9 や腫瘍性 micro-RNA として知られる miR-125a の脱抑制へと導き、そのターゲットであり好中球分化に必須である CLEC5A の発現低下による分化異常が加わり MDS 発症へと繋がる点を多岐にわたる詳細な実験から示した (Inoue et al. J Clin Invest 2013)。

しかし、临床上 MDS の多くは次第にアポトーシスに対する抵抗性や増殖に対するアドバンテージを獲得し、急性骨髄性白血病 (AML) 様の病態を呈する。MDS から AML に至った症例は大半が治療抵抗性であり、また輸血依存となることも多く患者の QOL や予後を著しく低下させる。そこで、MDS クローンの腫瘍性造血幹細胞がどのようにしてアポトーシス抵抗性や増殖能を獲得するのかについては、明らかにするべき重要な課題である。申請者らはこれまでに ASXL1 変異を伴う MDS 患者の全エクソシーケンスを行い、病期の進行と関連する SETBP1 (SET binding protein 1) 変異を同定した。これまでの研究で慢性骨髄性白血病 (CML) の急性転化時にも SETBP1 の過剰発現が認められることから、AML への形質転換において SETBP1 変異体 (SETBP1-MT) が重要な役割を果たしていることが予想される。しかし、分子生物学レベルでの SETBP1 変異の意義はこれまでに全く解明されておらず、マウスモデルを用いて SETBP1 変異の意義を解明することが急務である。

2. 研究の目的

申請者はこれまでにエピジェネティックな異常をきたす遺伝子変異が発症の原因となっていることをマウスモデルを用いて見出した。これまでの臨床サンプルの検討から SETBP1 遺伝子の変異がアポトーシス抵抗性・増殖能の獲得に深く関与し AML への形質転換に重要であると考えられる。SETBP1 の正常細胞での機能や変異体の分子生物学的な意義については全く解明されておらず、本研

究ではこの点を臨床サンプル・細胞株・マウスモデルを用いた多岐にわたる詳細な実験により明らかとし、病態の正しい理解と新たな治療ターゲットの探索を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒトサンプルでの遺伝子変異の探索
ASXL1 変異をもつ MDS 期と AML へと転換した病期と双方の paired sample が入手可能なヒト骨髄サンプルについて、SETBP1 変異がどの程度含まれるか、ならびに他にどのような変異を獲得して AML に形質転換しているのか検討する。また SETBP1 遺伝子の変異部位について、hot spot となる部位を同定する。

(2) SETBP1-MT と野生型タンパクの発現・安定性について
これまでに申請者が同定した SETBP1 変異は PEST domain 内の missense mutation であり、これにより同部位のコピキチン化が阻害されプロテアソームによる分解をエスケープする事で gain-of-function に機能しているものと予想される。よって、患者サンプルに加えて SETBP1-MT、SETBP1-WT を導入した細胞株でのタンパク発現を評価する。コピキチン蛋白の存在下、プロテアソーム阻害剤の存在下でタンパク分解や発現を検討する。

(3) 生体モデルで SETBP1-MT の意義を検討
所属研究室で開発した造血幹細胞への導入効率が良好な pMys-IRES-GFP ベクターを用いて、患者由来の ASXL1-MT と SETBP1-MT を過剰発現させた造血幹細胞を作成しマウスに移植した。対照群の ASXL1-MT 単独群、SETBP1-MT 単独群と比較して移植した造血幹細胞が AML への形質転換に寄与するか、またその発症機構は何かを詳細に検討した。

(4) SETBP1-MT のミエロイド系への分化・アポトーシス・腫瘍化・細胞周期に対する影響を評価
マウス造血幹細胞を使用したコロニー形成能、マウス骨髄系細胞の 32Dcl3 細胞株やヒト白血病細胞株の HL60 を用いた分化・アポトーシス・増殖能・細胞周期への影響を検討し、in vitro における形質がどのように変化しているのか生体モデルと関連付けて検討した。

(5) SETBP1-MT による遺伝子ならびにシグナル制御機構の解明
骨髄移植モデルで MDS 由来の AML を発症後、そのメカニズムを解明するために各種網羅的解析を施行した。発現解析には RNA-seq を SETBP1-MT のゲノムとの結合ならびにヒストン修飾の解析には ChIP 法を用いた。発現解析に続いて、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) によりどのような遺伝子セットが SETBP1-MT により影響を受けているか検討した。

(6) シグナル伝達経路への影響を評価
翻訳後修飾として各シグナル伝達経路のリン酸化を網羅的に評価する。特に PP2A のリン酸化による活性低下により AKT シグナルが亢進していることが予想される。

(7) 治療モデル

ここまでで得られた知見により SETBP1-MT が作用するパスウェイに作用する薬剤を検討する。

4. 研究成果

(1) 368 例にわたる MDS 患者の検討により ASXL1 変異を有する MDS (n=64) は 9.38% に SETBP1 変異が認められるのに対して、ASXL1 変異を認めない MDS (n=304) ではわずか 0.66% に SETBP1 変異を認めるのみであった (p=0.0005)。また変異の部位は SKI homologous region に集中しておりユビキチン化部位近傍に hot spot を有することが明らかとなった。

(2) 細胞株に発現して検討したところ、予想通り SETBP1-MT は野生型に比べてタンパクが不安定でありこれらはプロテアソーム阻害剤でレスキューされた。すなわち、SETBP1 変異はユビキチン化による分解メカニズムからエスケープすると考えられた。

(3) ASXL1-MT を発現した造血幹細胞を移植したマウスは MDS 様の病像を呈するが、ASXL1-MT と SETBP1-MT 双方を発現した造血幹細胞を移植したマウスでは、未分化な白血球の上昇、貧血、血小板減少、肝脾腫をみとめ AML となった。生存期間も有意に短縮した (p<0.0001)。

(4) ASXL1-MT に加えて SETBP1-MT を発現した細胞株ではアポトーシスの抑制、好中球分化の抑制が確認された。一方、造血幹細胞を用いたコロニー形成能を評価したところミエロイドコロニーの顕著な増加を認めた。

(5) AML に至ったマウス骨髄細胞を用いて RNA-seq を行い GSEA にて MDS マウスと遺伝子セットの違いを検討した。予想通り、AML マウスでは造血幹細胞に関連した遺伝子セットが集積していた。興味深いことに TGF β シグナルの低下とそれと対照的に Myc シグナルの上昇を認めた。また SETBP1 タンパクはこれまでの研究成果により Hoxa9/10 近傍のゲノムに結合することが知られているが、ChIP 法により SETBP1-MT は野生型に比べてより強く結合することを明らかとした。

(6) SETBP1-MT が PP2A のリン酸化を促進し活性を抑制することで Akt のリン酸化が亢進していることを明らかとした。また PP2A 活

性化剤である FTY720 は AML マウスの骨髄細胞の増殖を容量依存性に抑制した。

(7) SETBP1 は転写活性に関与するヒストンアセチル化酵素と結合することが先行研究で明らかとなっている。そのため上記の内容をさらに発展させ以下のデータを得ている。

SETBP1-MT と ASXL1-MT による AML 発症マウスの骨髄細胞では正常マウスと比較してゲノム全体で脱アセチル化傾向(特にヒストン H3K14, H4K5, H4K8)であった。AML マウスの骨髄細胞に HDAC 阻害剤 (vorinostat) を作用させることによって、H3K14, H4K5, H4K8 でみられる白血化による脱アセチル化がレスキューされた。クロマチン免疫沈降法により、AML マウスの骨髄細胞に SAHA を作用させることで、TGF 関連分子の転写開始領域 (TSS) にヒストンアセチル化酵素である p300 の結合が促進されることが示された。AML マウスの骨髄細胞に SAHA を作用させ 2 次移植するとコントロールに比べ、有意に生存期間が延長した。これらの知見は SETBP1 変異タンパクの存在により何らかのヒストン脱アセチル化作用が起きていることを示唆しており、HDAC 阻害剤が治療候補の一例として有望であることを示唆している。これらの内容は未発表データであるが、新規治療モデルの構築に向けて今後のさらなる発展が期待される。

<引用文献>

Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering ASXL1 mutations. Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, Kagiya Y, Kawabata KC, Nakahara F, Izawa K, Oki T, Maehara A, Isobe M, Tsuchiya A, Harada Y, Harada H, Ochiya T, Aburatani H, Kimura H, Thol F, Heuser M, Levine RL, Abdel-Wahab O, Kitamura T. *J Clin Invest*. 2013 Nov;123(11):4627-40.

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2件)

SETBP1 mutations drive leukemic transformation in ASXL1-mutated MDS. Inoue D, Kitaura J, Matsui H, Hou HA, Chou WC, Nagamachi A, Kawabata KC, Togami K, Nagase R, Horikawa S, Saika M, Micol JB, Hayashi Y, Harada Y, Harada H, Inaba T, Tien HF, Abdel-Wahab O, Kitamura T. *Leukemia*. 2015 Apr;29(4):847-57. doi: 10.1038/leu.2014.301.

Truncation mutants of ASXL1 observed in myeloid malignancies are expressed at

detectable protein levels.
Inoue D, Matsumoto M, Nagase R, Saika M,
Fujino T, Nakayama KI, Kitamura T.
Exp Hematol. 2016 Mar;44(3):172-176.e1.
doi: 10.1016/j.exphem.2015.11.011.

〔学会発表〕(計1件)

Daichi Inoue, Sayuri Horikawa, Hirotaka
Matsui, Reina Nagase, Makoto Saika, Ki
mihito Kawabata, Susumu Goyama, Toshio
Kitamura. Novel roles of ASXL1 in epigeneti
c regulation. ISEH 44th Annual Scientific Me
eting. 2015年9月18日, 国立京都国際会
館

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/clinical_oncol/laboratory.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 大地 (INOUE, Daichi)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号: 80735746