

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03679

研究課題名(和文) 白血病融合遺伝子産物によるHox遺伝子活性化の分子メカニズム

研究課題名(英文) The molecular mechanism of Hox gene regulation by leukemic fusion proteins

研究代表者

岡 正啓 (Oka, Masahiro)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：40432504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：急性白血病でみられるHOX(ホメオボックス)遺伝子発現異常の分子メカニズムは未だに謎が多い。本研究ではヒト白血病細胞株において、核膜孔構成因子(ヌクレオポリン)融合遺伝子産物や変異型NPM1など核外輸送因子CRM1と相互作用する白血病関連因子が、クロマチンに結合しているCRM1によってHOXクラスター領域にリクルートされ、HOX遺伝子を活性化していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、核細胞質間分子輸送機構の異常と病態との関連が明らかになりつつある。本研究によって、核から細胞質への分子輸送に必須の核外輸送因子CRM1と核膜孔構成因子(ヌクレオポリン)との相互作用や、CRM1と核外移行シグナルとの相互作用が、白血病でみられるHOX遺伝子の発現異常にも深く関わっていることが明らかとなった。今後の新規治療薬の開発にもつながる成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of abnormal HOX (homeobox) gene expression in acute leukemia remains largely elusive. In this study, we found that leukemia-related proteins such as nucleoporin fusion proteins and mutant NPM1 are recruited to HOX cluster regions through their interaction with a nuclear export factor, CRM1, in human leukemia cell lines. Furthermore, our results showed that the transcriptional activation of HOX genes occurs in a CRM1-dependent manner in these cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：CRM1 ヌクレオポリン 白血病 HOX

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核膜孔構成因子(ヌクレオポリン)Nup98 や Nup214 の遺伝子は染色体転座によって様々な遺伝子と融合し、その結果生成される融合遺伝子産物の発現が急性白血病の病態に寄与している。また、これらのヌクレオポリン融合遺伝子産物は核膜孔から離れて核内で特徴的なドット構造を形成することが分かっている。しかしながらヌクレオポリンと全く異なる機能を持つパートナー分子(転写因子やヒストン結合タンパク質など)との融合タンパク質がどのように機能しているのか、そのメカニズムは不明のままであった。我々はマウス胚性幹(ES)細胞に発現させた Nup98-HoxA9 (Nup98 とホメオボックス転写因子 HoxA9 の融合タンパク質)が、核外輸送因子 Crm1 によって Hox 遺伝子クラスター領域へリクルートされ、広範囲の Hox 遺伝子を活性化する現象を見出した(Oka et al., eLIFE, 2016)。また、ヌクレオポリン融合遺伝子産物以外の白血病関連因子の中にも核外移行シグナルを有し CRM1 と相互作用するものが幾つか知られていることから、白血病における HOX 遺伝子発現異常と CRM1 の関連が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト白血病患者細胞株を用いてヌクレオポリン融合遺伝子産物や変異型 NPM1 などの白血病患者関連因子、ならびに CRM1 のゲノム上の結合部位や分子相互作用を解析し、多くの白血病患者で異常が見られる HOX 遺伝子発現制御のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト白血病患者細胞株におけるヌクレオポリン融合遺伝子産物の機能解析

様々なヒト白血病患者細胞株を用いて融合遺伝子産物のゲノム結合部位や結合因子の同定を行う。また HOX 遺伝子発現制御との関連を明らかにする。

(2) CRM1 の役割の検証

白血病患者関連因子による HOX 遺伝子活性化、ならびに白血病患者関連因子とクロマチン間の相互作用における CRM1 の役割を明らかにする。

(3) 変異型 NPM1 と HOX 遺伝子発現の関連

ヒト白血病患者細胞株における変異型 NPM1 のゲノム結合部位、ならびに転写活性化との関連を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ヒト白血病患者細胞株におけるヌクレオポリン融合遺伝子産物の機能解析

ヌクレオポリン NUP214 とヒストン結合タンパク質 SET の融合遺伝子産物 SET-NUP214 を発現するヒト T 細胞性急性リンパ性白血病患者細胞株 LOUCY を用いて、SET-NUP214 のクロマチン上の結合部位を解析した。抗 NUP214 抗体を用いて ChIP-seq ならびに ChIP-qPCR 解析を行った結果、SET-NUP214 はゲノム上の特異的な部位に結合しており、特に HOXA および HOXB クラスター上に顕著に集積していることが明らかとなった。さらに SET-NUP214 と相互作用することが知られる核外輸送因子 CRM1 も同様に HOXA および HOXB クラスターに集積していることが分かった。SET-NUP214 を発現する別の細胞株 MEGAL でも同様の現象が見られたが、ヌクレオポリン融合遺伝子産物を発現していない HL60 や K562 細胞株では、CRM1 の HOX 領域への集積が見られなかった。以上の事から、SET-NUP214 と CRM1 が HOX クラスターに集積して遺伝子発現を活性化していることが示唆された。

(2) CRM1 の役割の検証

CRM1 阻害剤 KPT330 は CRM1 と NES タンパク質の結合を阻害するとともに、CRM1 自体を分解することが知られている。LOUCY 細胞を KPT330 で細胞を処理すると、SET-NUP214 および CRM1 の HOX クラスター上のピークが消失し、HOX 遺伝子が抑制されることが分かった。したがって、LOUCY 細胞においては CRM1 および SET-NUP214 依存的な HOX 遺伝子の活性化が起きていることが示された。また HOXA および HOXB クラスター上の活性化型 RNA ポリメラーゼ II のシグナルが KPT330 処理後に著しく減少したことから、HOX クラスター領域では CRM1 依存的に RNA ポリメラーゼ II が活性化されていることが分かった。それに対して周辺領域や、それ以外のゲノム領域では薬剤処理の影響はほとんど見られなかった。また、KPT330 で細胞を処理した際に SET-NUP214 のタンパク質発現量が顕著に減少していたことから、CRM1 が SET-NUP214 融合タンパク質の安定化にも関わっていることが示唆された。さらに SET-NUP214 をノックダウンしても CRM1 と HOX 遺伝子領域の結合には影響がほとんど見られなかったことから、クロマチン上の CRM1 が

SET-NUP214 を HOX 領域にリクルートしている可能性が示唆された。

(3) 変異型 NPM1 と HOX 遺伝子発現の関連

急性骨髄性白血病(AML)では高頻度に NPM1 (Nucleophosmin 1) の遺伝子変異が見られる。この変異により NPM1 の C 末端近傍で起きるフレームシフトの結果、変異型 NPM1 には新規の核外移行シグナルが付加されるため、変異型 NPM1 は主に細胞質に局在する。近年、変異型 NPM1 を速やかに分解させると HOX 遺伝子の発現が選択的に抑制されることが報告されており (Brunetti et al., Cancer Cell, 2018) その遺伝子発現制御との関連が示唆されていた。本研究ではヒト急性骨髄性白血病細胞株 OCI-AML3 を用いて変異型 NPM1 のゲノム結合部位の解析を行った。その結果、変異型 NPM1 が HOXA ならびに HOXB クラスター領域に結合していることが明らかとなった。また CRM1 も、ほぼ同じゲノム領域に結合していることが分かった。さらに CRM1 と変異型 NPM1 の関連を検証するために、HOXA、B、C、D すべてのクラスターに CRM1 が結合しているマウス ES 細胞で異所的に変異型 NPM1 を発現させた安定発現株を取得しゲノム結合部位の解析を行った。その結果、4 つすべての HOX クラスター上に変異型 NPM1 が結合することが分かった。それに対し、野生型 NPM1 では HOX クラスターとの有意な相互作用が見られなかった。以上のことから、変異型 NPM1 の核外移行シグナルと CRM1 の相互作用が、変異型 NPM1 の HOX クラスター領域へのリクルートに重要な役割を担っていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Oka M, Mura S, Otani M, Miyamoto Y, Nogami J, Maehara K, Harada A, Tachibana T, Yoneda Y, Ohkawa Y. | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Chromatin-bound CRM1 Recruits SET-Nup214 and NPM1c Onto HOX Clusters Causing Aberrant HOX Expression in Leukemia Cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 eLIFE | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.46667. | 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 Tokunaga M, Miyamoto Y, Suzuki T, Otani M, Inuki S, Esaki T, Nagao C, Mizuguchi K, Ohno H, Yoneda Y, Okamoto T, Oka M, Matsuura Y. | 4. 巻 541 |
| 2. 論文標題 Novel anti-flavivirus drugs targeting the nucleolar distribution of core protein. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Virology | 6. 最初と最後の頁 41-51 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2019.11.015. | 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 Sobuz SU, Sato Y, Yoshizawa T, Karim F, Ono K, Sawa T, Miyamoto Y, Oka M, Yamagata K. | 4. 巻 1866 |
| 2. 論文標題 SIRT7 regulates the nuclear export of NF- B p65 by deacetylating Ran. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Res | 6. 最初と最後の頁 1355-1367 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2019.05.001. | 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 Oka M, Yoneda Y | 4. 巻 94 |
| 2. 論文標題 Importin : functions as a nuclear transport factor and beyond | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B | 6. 最初と最後の頁 259 ~ 274 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.94.018 | 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 Higa M, Oka M, Fujihara Y, Masuda K, Yoneda Y, Kishimoto T. | 4. 巻 115 |
| 2. 論文標題 Regulation of inflammatory responses by dynamic subcellular localization of RNA-binding protein Arid5a | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 E1214 ~ E1220 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1719921115 | 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 Tanaka K, Kasahara Y, Miyamoto Y, Okuda T, Kasai T, Onodera K, Kuwahara M, Oka M, Yoneda Y, Obika S. | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Correction: Development of oligonucleotide-based antagonists of Ebola virus protein 24 inhibiting its interaction with karyopherin alpha 1 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry | 6. 最初と最後の頁 7530 ~ 7530 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8ob90140f | 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 Tanaka K, Kasahara Y, Miyamoto Y, Okuda T, Kasai T, Onodera K, Kuwahara M, Oka M, Yoneda Y, Obika S. | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Development of oligonucleotide-based antagonists of Ebola virus protein 24 inhibiting its interaction with karyopherin alpha 1 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry | 6. 最初と最後の頁 4456 ~ 4463 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8ob00706c | 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 - |

〔学会発表〕 計13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

| |
|-----------------------------|
| 1. 発表者名 岡正啓 |
| 2. 発表標題 核外輸送因子CRM1の新たな機能 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮本洋一、佐々木光穂、宮田治彦、物部容子、赤木謙一、伊川正人、米田悦啓、岡正啓 |
| 2. 発表標題 マウス精子の形態形成における核輸送分子importin 4の機能的重要性 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 櫻井航輝、宮本洋一、岡正啓、疋田貴俊 |
| 2. 発表標題 Kpna4 ノックアウトマウスにおける行動異常の分子的背景の解明 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 盛山哲嗣、米田悦啓、岡正啓、山田雅己 |
| 2. 発表標題 エストロゲン受容体 の細胞内移動における分子決定因子の解析 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Oka M, Mura S, Miyamoto Y, Ohkawa Y, Kimura H, Yoneda Y. |
| 2. 発表標題 The role of Crm1, a nuclear export receptor, in the regulation of gene expression. |
| 3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Miyamoto Y, Itou T, Morita M, Nagai M, Sasaki M, Moriyama T, Loveland KL, Yoneda Y, Hikida T, Oka M. |
| 2. 発表標題 The nuclear transport factor importin 4 is involved in normal male fertility and brain development in mouse. |
| 3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡正啓 |
| 2. 発表標題 異所的な核膜孔構成因子 核輸送因子の相互作用がもたらす遺伝子発現異常 |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮本洋一、伊藤大一、森田真規子、永井理博、盛山哲嗣、Kate L. Loveland、米田悦啓、疋田貴俊、岡正啓 |
| 2. 発表標題 統合失調症関連症状を示す核輸送分子 importin 4ノックアウトマウスの解析 |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Moriyama T, Yoneda Y, Oka M, Yamada M. |
| 2. 発表標題 Analysis of molecular determinants of estrogen receptor mobility. |
| 3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 盛山哲嗣、田中秀、福本昌宏、辻村賢二、山田幸司、中山泰宗、馬場健史、福崎英一郎、米田悦啓、岡正啓 |
| 2. 発表標題 翻訳開始点の異なる2つのトランスアルドラーゼが糖代謝全体に影響を及ぼす |
| 3. 学会等名 第69回日本細胞生物学大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮本洋一、Penny A.F. Whiley, 岡正啓、Kete L. Loveland |
| 2. 発表標題 生殖細胞形成とストレス応答におけるSTK35L1の役割 |
| 3. 学会等名 第69回日本細胞生物学大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡正啓、村苑子、野上順平、前原一満、大川泰行、木村宏、米田悦啓 |
| 2. 発表標題 Nup98融合遺伝子産物による Hox 遺伝子活性化のメカニズム |
| 3. 学会等名 ConBio2017 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田中敬介、笠原勇矢、宮本洋一、笠井達郎、小野寺健太郎、桑原正靖、岡正啓、小比賀聡 |
| 2. 発表標題 人工核酸アプタマーを用いたエボラウイルスタンパク質に対するPPI阻害 |
| 3. 学会等名 日本核酸医薬学会第3回年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計3件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 宮本洋一、岡正啓、米田悦啓 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 646 |
| 3. 書名 タンパク質・RNAの核 細胞質間輸送、阻害剤・活性化剤ハンドブック | |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Miyamoto Y, Yoneda Y, Oka M. | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 Academic press | 5. 総ページ数 - |
| 3. 書名 Nuclear Architecture and Dynamics | |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 山田幸司、米田悦啓、岡正啓 | 4. 発行年 2017年 |
| 2. 出版社 NTS | 5. 総ページ数 347 |
| 3. 書名 次世代がん治療 - 発症・転移メカニズムからがん免疫療法・ウイルス、診断法まで | |

〔出願〕 計2件

| | | |
|-------------------------------------|---------------|---------------|
| 産業財産権の名称 フラビウイルス感染に対する抗ウイルス治療 | 発明者 宮本洋一 他 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-101399 | 出願年 2018年 | 国内・外国の別 国内 |
| 産業財産権の名称 精神疾患モデル動物およびその製造方法 | 発明者 岡 正啓 他 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/005019 | 出願年 2018年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

ホームページ等
<https://www.nibiohn.go.jp/activities/nuclear-transport.html>
<http://www.oka-lab.info/>

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 |
|-------|---------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 大川 恭行 (OHKAWA Yasuyuki) | | |
| 研究協力者 | 宮本 洋一 (MIYAMOTO Yoichi) | | |
| 研究協力者 | 米田 悦啓 (YONEDA Yoshihiro) | | |