

令和元年6月14日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07379

研究課題名（和文）MLL-AF4キメラとその制御因子を介した白血病化メカニズムの解析

研究課題名（英文）Mechanism of leukemogenesis through MLL-AF4 and its regulatory factors

研究代表者

奥田 博史（Okuda, Hiroshi）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・外来研究員

研究者番号：10629215

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：白血病の約7%の患者で11番染色体転座が認められ、その転座によってMLL遺伝子がAF4など遺伝子と融合することで癌遺伝子が生じる。MLLは遺伝子の転写活性化を持つAF4複合体と融合することによって、遺伝子の転写制御を異常化することで細胞は癌化する。本研究成果は、AF4複合体にRSBN複合体が結合することで、MLL-AF4複合体による細胞の白血病化を補助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

本研究成果によってMLL-AF4複合体による細胞の白血病化メカニズムをより詳細に解明することができた。11番染色体転座をもつ白血病は難治であり、既存の治療法でも再発する例が多い。本研究成果を基にMLL-AF4複合体の機能を阻害する薬剤の開発ができれば、11番染色体転座をもつ白血病を治療できるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：11q23 chromosomal translocation is found in 7% of leukemia patients and an oncogene, MLL-fusion, is expressed by the translocation. MLL chimera fuses with a component of the AF4 transcriptional co-activator complex and constitutively activates the downstream genes to immortalize hematopoietic progenitor cells. Here, we identified a RSBN1 complex that binds to the AF4 complex, and assists with MLL-AF4 mediated leukemogenesis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：白血病 発がん MLL AF4 転写

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MLL 白血病は急性白血病の約 7%の患者で認められる染色体転座 t(11q23)の遺伝子産物である MLL キメラによって発症する。本疾患は乳児で好発し、付加の変異が認められないのが特徴であり、MLL キメラは単独で細胞をがん化させることができる強力ながん遺伝子である。また、MLL 遺伝子の染色体転座を持つ急性白血病患者の予後は極めて悪く、既存の化学療法や骨髄移植を行っても往々にして再発する。このことから、MLL 遺伝子の染色体転座を持つ患者に対する新規薬剤の開発が望まれ、その基盤として MLL キメラによる白血病化の分子メカニズムを解明することが急務である。

MLL 遺伝子はこれまでに 70 を超える遺伝子と染色体転座によって融合することが報告されている。特に高頻度に融合するパートナーは *AF4*、*AF9*、*ENL* である。これらの遺伝子産物は AF4 転写活性化複合体(AEP)の構成因子である。MLL は MENIN および LDEGF と複合体を形成し、非メチル化 CpG とヒストン H3K36me2/3 という「これまでに転写されていたプロモーター」に特徴的なエピジェネティックな修飾を認識して、下流遺伝子の転写を活性化する。MLL-AEP キメラは転写活性化複合体である AEP をプロモーター上に留めてしまうため、造血細胞の未分化性を保つ HOXA9 や MEIS1 などの転写因子群の転写を恒常的に活性化し、前駆細胞の自己複製を無制限に促進させる。申請者は AEP の構成因子である AF4 が転写の活性化に必要であることを明らかにし、AF4 に存在する転写活性化ドメインに特異的に結合する因子として、RNA ポリメラーゼ I の基本転写因子である SL1 複合体を同定した。クロマチン上で AF4 と会合した SL1 はプロモーター上に存在する TATA ボックスに TBP を供給し、RNA ポリメラーゼ II の転写開始前複合体(PIC)の形成を促進することで転写を活性化させていると考えられる。この AEP-SL1 転写活性化複合体の構築にはメディエーター複合体による介助が必要であり、AEP-SL1 転写活性化複合体の構築には複雑な制御系が存在する。また、AEP-SL1 複合体による転写の活性化だけでは細胞が白血病化するのに必要十分ではなく、これと協調的に働く DOT1L 複合体による転写の維持機能が必要である。しかし、AEP-SL1 転写活性化複合体による詳細な転写制御メカニズムおよびそれによる細胞の白血病化メカニズムはまだ謎が多い。申請者の研究過程で、MLL-AEP 新規転写活性化複合体に結合する新規共作用因子を新たに発見した。

2. 研究の目的

本研究では MLL-AEP 新規転写活性化複合体に結合する新規共作用因子による白血病化メカニズムおよび未分化な血液細胞特異的な転写制御系の解明を目的とした。まず、新規共作用因子の複合体形成および、細胞のがん化おける働きを明らかにする。また、新規共作用因子のターゲット遺伝子のプロモーター上での複合体形成能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) AEP-SL1 複合体に会合する新規共作用因子 RSBN1 の複合体形成

申請者は AEP-SL1 複合体に結合する共作用因子を同定した。そこで、これら共作用因子が AEP-SL1 複合体とどのような複合体を形成しているのかを明らかにするために AEP-SL1 複合体の中心的なタンパク質である AF4 をベイトに用いて、免疫沈降にてクロマチン上で形成している複合体を単離した。さらに AF4 に結合する SL1 を含む作用因子を全て同じタグでラベルし、AF4 に結合する因子の結合比を算出した。また、免疫沈降で使用する細胞抽出液は細胞質画分、核可溶画分、クロマチン結合画分に画分し、それぞれの抽出液を用いて免疫沈降することで AEP-SL1-新規結合因子複合体が細胞のどこで形成しているのかを明らかにした。

(2) RSBN 複合体の AEP 依存的転写活性化における働き

AF4 による転写活性化における RSBN 複合体の役割を明らかにする。AF4 に存在するいくつかの機能ドメインを分割し GAL4 DNA 結合ドメインに融合してその転写活性化能を測定すると、AF4 の pSER ドメインに特異的に転写活性化能があることが明らかとなっている。事実、SL1 や RSBN1 は AF4 の pSER ドメインに特異的に結合する。そこで、本評価系を用いて RSBN1 を shRNA を用いてノックダウンした時の pSER ドメインに特異的な転写活性化能にどのような影響があるのか評価した。

(3) RSBN 複合体の細胞の不死化能に対する役割

AEP-SL1 複合体を介した細胞の不死化における新規共作用因子である RSBN1 の働きを明らかにした。マウス大腿骨の骨髄から造血前駆細胞を単離し、レトロウイルスを用いて MLL 融合遺伝子を導入すると、細胞はメチルセルロース培地中で無制限な増殖(白血病化)をするようになる。そこで、RSBN1 の shRNA を用いて RSBN1 をノックダウンすることで MLL 融合遺伝子によって白血病化させた細胞に対する効果を評価した。

(4) AEP-SL1 と結合する RSBN 複合体のプロモーター上で機能的な複合体形成

RSBN1 複合体が AEP-SL1 複合体とプロモーター上で機能的な複合体を形成しているのかを明らかにするために、293T 細胞に人口プロモーターを作成し、ChIP-PCR 法にて各因子の局在を明らかにする。

かにした。

4. 研究成果

(1) AEP-SL1 複合体に会合する新規共作用因子の複合体形成

免疫沈降にてクロマチン上で形成している AEP-SL1-新規共作用因子の複合体形成を単離した結果、RSBN1 とそのパラログである RSBN1L が同定された。次に、RSBN1 および RSBN1L を発現させた 293T 細胞を用いて細胞質画分、核可溶画分、クロマチン結合画分にそれぞれ分画し、それらの細胞内の局在をウエスタンブロッティングにて確認したところ、RSBN1 は主に細胞質画分に分画され、RSBN1L は主にクロマチン結合画分に分画された。次に RSBN1 および RSBN1L を発現させた 293T 細胞を用いて、RSBN1 と RSBN1L の結合を確認したところ、安定な RSBN1-RSBN1L ヘテロダイマーの形成がクロマチン上に確認されたのに対して、RSBN1 ホモダイマーや RSBN1L ホモダイマーの形成は RSBN1-RSBN1L ヘテロダイマーと比較して安定ではないことが明らかとなった。このことから AEP-SL1 複合体には RSBN1-RSBN1L ヘテロダイマーという形で複合体形成していると考えられる。

さらに、SL1 の構成因子と RSBN1、RSBN1L を同じタグにてラベルしたものを 293T 細胞に発現させ、AF4 にどれくらいの比で複合体形成しているのかを評価した。その結果 AF4 には SL1 複合体の構成因子である TAF1A、TAF1B などはモル比約 1:1 で結合していることが明らかとなった。また、RSBN1 および RSBN1L も SL1 構成因子とモル比約 1:1 で結合していることから、AF4-SL1-RSBN1 複合体はそれぞれ 1:1 のモル比で機能的な複合体を形成していると考えられる。しかし、RSBN1 は主に細胞質に局在しており、どのようにしてクロマチン画分にリクルートされてくるのかまだ解明できていない。

(2) RSBN 複合体の細胞の不死化能に対する役割

次に、AF4 による転写活性化における RSBN 複合体の役割を明らかにした。まず、GAL4 DNA 結合ドメインに AF4 の pSER ドメインを融合させ、その転写活性化能を測定すると転写活性化能があることが明らかとなっている。さらに、SL1 および RSBN1 複合体は pSER ドメインに結合している。本評価系に shRNA を用いて RSBN1 および RSBN1L をノックダウンすると pSER ドメイン依存的な転写活性化能に変化はなかった。また、GAL4 DNA 結合ドメインに直接 RSBN1 および RSBN1L を結合しても転写活性化能は検出できなかった。このことから、RSBN1 および RSBN1L は pSER ドメイン依存的な転写活性化能には直接的な関与はないと考えられる。また、RSBN1 および RSBN1L 本体にも転写活性化能はない。しかし、RSBN1 および RSBN1L には DNA に結合できる活性があり、AEP-SL1 のリクルートやクロマチン修飾などの機能を持っている可能性がありこれらの機能の解明が今後の課題である。

(3) RSBN 複合体の細胞の不死化能に対する役割

次に、AEP-SL1 複合体を介した細胞の不死化における新規共作用因子である RSBN1 の働きを明らかにした。研究方法の項にも示した通りマウス大腿骨の骨髓から造血前駆細胞を単離し、レトロウイルスを用いて MLL 融合遺伝子を導入すると、細胞はメチルセルロース培地中で無制限な増殖(白血病化)をするようになる。この細胞に RSBN1 および RSBN1L に対する shRNA を導入すると MLL 融合遺伝子を導入した細胞のコロニー形成能力が減弱した。このことから RSBN1 および RSBN1L は MLL 融合遺伝子による細胞の白血病化に重要な役割を果たしていると考えられる。

(4) RSBN 複合体のプロモーター上で機能的な複合体形成

最後に、RSBN 複合体のプロモーター上で機能的な複合体形成を評価するために、293T 細胞に人口的なプロモーターを導入した。まず、蛍ルシフェラーゼ遺伝子に酵母 GAL4 タンパク質結合配列をプロモーターとして連結し、レンチウイルスベクターに導入した。このコンストラクトからレンチウイルスを作製し 293T 細胞に感染させることで 293T 細胞のゲノム DNA に人口プロモーターを導入した。本細胞株を用いて GAL4 DNA 結合ドメインに AF4 の pSER ドメインを融合させたプラスミドを発現させ、共作用因子に対する抗体にてクロマチン免疫沈降実験を行った。その結果、RSBN1 および RSBN1L は AEP-SL1 複合体と同様に蛍ルシフェラーゼ人口プロモーター上で複合体を形成していることが明らかとなった。

これらの研究成果から MLL 白血病発病メカニズムにおいての重要な分子複合体である AEP-SL1 に新たに会合する分子として RSBN1 および RSBN1L を同定し、これらが AEP-SL1 ターゲット遺伝子上で機能的な複合体を形成することが明らかになった。これらの複合体の詳細な機能解析は今後の課題であるが、少なくとも MLL 融合遺伝子によって白血病化させた細胞の機能には必要である。本研究成果を基に MLL 白血病の発病メカニズムがより詳細に明らかになることで、MLL 白血病に対する新規分子標的薬の開発の基盤となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Okuda H and Yokoyama A. Myeloid progenitor transformation assay. Bio-protocol. 7, e2626 (2017) DOI:10.21769/BioProtoc.2626.
2. Okuda H and Yokoyama A. In vivo leukemogenesis model using retrovirus transduction. Bio-protocol. 7, e2627 (2017) DOI:10.21769/BioProtoc.2627.

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。