

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03992

研究課題名(和文) 新規技術による白血病の包括的エンハンサー解析と分子病態解明

研究課題名(英文) Comprehensive enhancer analysis and molecular pathogenesis of leukemia using our novel technology

研究代表者

村川 泰裕 (Murakawa, Yasuhiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50765469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：白血病は多様性に富んだ臨床像・細胞像を示す難治性の血液腫瘍である。白血病ではエピジェネティクス異常が重要である。とりわけエンハンサーによる遺伝子の転写制御は、白血病細胞のアイデンティティを決定する。活性化したエンハンサーは、それ自体から合成されるeRNAを次世代シーケンサーで検出することで高解像度に同定される。本課題では、我々はeRNAを超高感度に網羅的に検出する新技術を開発し、約100症例の造血器悪性腫瘍の検体に適用し、白血病エンハンサー・転写プログラムを同定した。臨床・ゲノムデータ、RNA発現情報、エピジェネティクス情報の統合により、新規の治療標的やバイオマーカーの同定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白血病は若年者から高齢者まで幅広い年齢層に発症する難治性の血液の腫瘍である。しかしながら、その分子メカニズムはほとんどわかっていなかった。腫瘍細胞の状態の決定に肝になるエンハンサー(遺伝子の発現スイッチとして働く)を超高感度に同定できる新しいゲノム解析技術を開発した。これにより、白血病細胞の詳細な分子状態の理解につながり、大規模な患者検体を用いた解析により、新しいバイオマーカーや創薬標的の候補を多数取得することに成功した。これにより、白血病の根源的な分子メカニズムの解明のみならず、新規治療法の創出に資する成果をあげることができた。

研究成果の概要(英文)：Leukemia is an intractable hematologic tumor that presents with a wide variety of clinical and cellular features. Epigenetic abnormalities are important in leukemia. In particular, transcriptional regulation of genes by enhancers determines the identity of leukemic cells. Activated enhancers can be identified with high resolution by detecting eRNAs synthesized from enhancers by next-generation sequencing. In this project, we developed a novel technology for ultra-sensitive and comprehensive detection of eRNAs and applied it to around 100 hematopoietic malignancy specimens to identify leukemia enhancer transcription programs. By integrating clinical and genomic data, RNA expression information, and epigenetic information, we identified novel therapeutic targets and biomarkers.

研究分野：ゲノムサイエンス

キーワード：白血病 エンハンサー ゲノム解析技術 バイオマーカー 転写ネットワーク NET-CAGE

## 1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia : AML) は、分化・成熟能が障害された幼若な骨髄系細胞のクローナルな自律性増殖を特徴とする難治性の血液腫瘍である。白血病細胞の成熟度、分化傾向、ゲノム変異、治療反応性などは症例毎に多様性に富む。よって患者の臨床データ・ゲノム情報・遺伝子発現情報に基づき、多様性に富む AML の発症機構および維持機構を分子レベルで病態解明することが重要である。造血器腫瘍はゲノム変異とエピゲノム変異が重なり発症する。特に AML では、遺伝子発現制御異常が重要な役割を担っており、白血病の転写プログラムの包括的な解析が必須である。様々な転写因子がプロモーターやエンハンサーといったゲノムのシスエレメントに結合し、標的遺伝子の発現を活性化する。興味深いことに、腫瘍細胞では正常細胞で使われていない特異的なプロモーターにより遺伝子を発現している例が多い。また、エンハンサーによる遺伝子の発現制御は、腫瘍細胞のアイデンティティーの決定や、疾患における細胞特性の脱制御に中心的な役割を担う。近年、後天的に白血病細胞に生じた遺伝子間領域のゲノム変異が、白血病に特異的な新たなエンハンサーを形成し白血病を引き起こすことが報告された (Mansour et al. Science 2014)。また、複数のエンハンサーが局所的にクラスターを形成したスーパーエンハンサーが提唱され、多くは細胞機能の鍵となる遺伝子の極近傍に同定されている (Whyte et al. Cell 2013、Hnisz et al. Cell 2013)。

2016 年に『Active medulloblastoma enhancers reveal subgroup-specific cellular origins』のタイトルで興味深い論文が発表された (Lin and Erkek et al. Nature 2016)。著者らは、WNT、SHH、Group 3、Group 4 の代表的な 4 つのサブタイプを含んだ 28 症例の髄芽腫に対してエピジェネティクス解析を行い、それぞれのサブタイプに特異的なスーパーエンハンサーを同定し、コアの転写プログラムの抽出に成功した。さらに Group 4 サブタイプの腫瘍の起源細胞の同定にも成功している。しかし、エピジェネティクス解析に、ヒストン修飾や転写制御因子に対する ChIP-seq 解析 (H3K27ac、H3K4me1、BRD4 など) および RNA-seq 解析を組み合わせた膨大な実験と複雑なデータ解析を要しており、多岐にわたる癌種への適用や多検体へのスケールアップはエフォートの的にもコスト的にも非現実的である。

エンハンサーおよび転写プログラムを解析する強力な別の手法として、申請者の所属機関で開発された Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) 法がある。CAGE 法は、RNA の 5'末端を次世代シーケンサーで解読し、転写開始点を網羅的に解析する。遺伝子から転写される RNA の 5'末端を解読することでプロモーター解析やトランスクリプトーム解析がなされてきた (Alistair et al. Nature 2014)。近年、驚くことに、エンハンサーにも RNA ポリメラーゼ II がリクルートされ、エンハンサー自体からも両方向性に RNA (eRNA) が合成されることが示された (Kim et al. 2010 Nature)。従って、CAGE 法により eRNA の 5'末端を検出することで、ChIP-seq に比べて飛躍的に“高塩基解像度”にエンハンサーが同定できる (Andersson et al. Nature 2014)。しかし、1 つのサンプルのみから通常の CAGE 解析を行ってもエンハンサーは極僅かしか同定できず、それぞれの臨床検体で個別に発現しているエンハンサーを網羅的に同定できない。そこで申請者らは、エンハンサーを飛躍的に超高感度に解析できる改良版 CAGE 法 (NET-CAGE 法) を開発した (2017 年 1 月特許 PCT 出願済、Nature Genetics 2019)。この NET-CAGE 法により、数百の症例に対してもエピジェネティクス解析を個々の患者検体レベルで行える。

## 2. 研究の目的

本課題では、研究代表者が独自に開発したエンハンサー解析技術 NET-CAGE 法により、白血病細胞を維持しているコアの転写プログラムを解析する。京都大学血液・腫瘍内科との共同研究により、約 100 症例の造血器悪性腫瘍の臨床検体に上述の NET-CAGE 法を用いて、白血病細胞を維持している転写プログラムを大規模かつ包括的に理解し、多様性に富む急性白血病の発生・維持を分子レベルで病態解明する。これにより、新しいバイオマーカーや創薬標的の候補を多数取得することを目指す。白血病の根源的な分子メカニズムの解明のみならず、新規治療法の創出に資する成果をあげることが本課題の目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 本課題では、約 100 症例の造血器悪性腫瘍検体に対して、我々が独自に開発した CAGE 法/NET-CAGE 法を適用し、腫瘍細胞で活性化している (スーパー) エンハンサーとプロモーターを包括的に高塩基解像度で同定・活性測定する。さらにバイオフィオマティクス解析により転写プログラムを reconstruct する。従来法のようにトランスクリプトームを descriptive に

profiling するのではなく、オリジナル技術と高度なコンピューター解析により、トランスクリプトームを形作っている上流の転写プログラムを明らかにする。

(2) 上記により、約 100 症例のそれぞれの造血器悪性腫瘍のプロモーター、エンハンサー、遺伝子発現量、転写プログラムをゲノムワイドに明らかにして、AML の包括的ゲノム発現アトラス(大規模データベース)を作成する。これにより、AML の患者毎の転写ネットワークの多様性を評価する。

(3) また、正常造血細胞との比較解析により、AML に特異的な(スーパー)エンハンサーおよびプロモーターを同定する。正常細胞のプロファイリングに関しては、国際 FANTOM プロジェクト第 5 期計画でヒトの全身の様々な部位由来の約 1,000 種類の CAGE データが既に所得されている。この中には、血球細胞や造血幹細胞由来の数百もの CAGE データが含まれている。今回は、さらに新たに未分化な正常芽球に対しても新規データを所得する。

(4) ほとんどの AML において、クロマチン制御因子、DNA 脱メチル化蛋白、転写因子をコードする遺伝子に DNA 変異を認める。異なる遺伝子変異を持つ患者検体のエンハンサー・プロモーターのモチーフ解析などを行うことで、トランス因子の DNA 変異がエピジェネティクスに及ぼす影響を解析する。

(5) 近年の全ゲノム解析により 99%近いゲノム変異はタンパク質をコードしない非コード領域に生じていることが示されている。シスエレメントに一定の頻度で認める遺伝子変異が近年相次いで報告されており、さらに遺伝子間領域に生じた変異が新規エンハンサーを形成する例などが発見されている。全ゲノム解析データとの統合解析により、非コード領域のシスエレメントに生じた DNA 変異が、エンハンサー活性・転写プログラムにどのような影響を与えるのか解析する。

(6) 臨床データと紐づけたデータ解析を行い、新規の創薬シーズやバイオマーカーを探索し、次世代の医療の創出に繋げる。

#### 4. 研究成果

CAGE によるエンハンサー同定の感度を高めて上述の問題点を克服するには、『RNA 分解の影響を無くす』ことである。これは、RNA ポリメラーゼにより合成中で RNA 分解を受ける前の nascent RNA (新生鎖 RNA) を用いることで実現できる。そこで我々は、30 分程度の one step のごく簡単な生化学的作業のみにより nascent RNA を精製できる画期的な手法を確立し、得られた nascent RNA を input に用いた改良版 CAGE 法 (NET-CAGE 法) を開発することに成功した (Hirabayashi et al. Nature Genetics 2019)。NET-CAGE 法により、『1つのサンプルのみからでもエンハンサーを飛躍的に高感度に同定』することに成功し、さらにエンハンサーとプロモーターからの(合成と分解の平衡値ではない)真の RNA の合成量の定量(つまり『エンハンサー・プロモーターの活性計測』)を可能にした。さらに従来 CAGE 法では検出困難な『スーパーエンハンサーが高感度に検出』できた。

また、京都大学血液・腫瘍内科との共同研究により、約 100 症例の造血器悪性腫瘍の臨床検体に上述の NET-CAGE 法を適用した。これにより、白血病細胞を維持している転写プログラムを大規模かつ包括的に理解し、多様性に富む急性白血病の発生・維持を分子レベルで病態解明することに成功した。これにより、mRNA や eRNA やゲノム情報に基づく新しいバイオマーカーや創薬標的の候補を多数取得でき、新規治療法の創出に資する成果をあげることになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Konishi Yoshinobu, Ichise Hiroshi, Watabe Tetsuya, Oki Choji, Tsukiji Shinya, Hamazaki Yoko, Murakawa Yasuhiro, Takaori-Kondo Akifumi, Terai Kenta, Matsuda Michiyuki	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Intravital imaging identifies the VEGF-TXA2 axis as a critical promoter of PGE2 secretion from tumor cells and immune evasion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 ahead of print
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-4245	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 Sasaki Kotaro, Oguchi Akiko, Cheng Keren, Murakawa Yasuhiro, Okamoto Ikuhiro, Ohta Hiroshi, Yabuta Yukihiko, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Yamamoto Takuya, Seita Yasunari, Saitou Mitinori	4. 巻 35
2. 論文標題 The embryonic ontogeny of the gonadal somatic cells in mice and monkeys	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109075 ~ 109075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109075	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 Yamamura Yuta, Furuichi Kengo, Murakawa Yasuhiro, Hirabayashi Shigeki, Yoshihara Masahito, Sako Keisuke, Kitajima Shinji, Toyama Tadashi, Iwata Yasunori, Sakai Norihiko, Hosomichi Kazuyoshi, Murphy Philip M., Tajima Atsushi, Okita Keisuke, Osafune Kenji, Kaneko Shuichi, Wada Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of candidate PAX2-regulated genes implicated in human kidney development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9123 (online)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88743-1	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 Hirabayashi Shigeki, Shirakawa Kotaro, Horisawa Yoshihito, Matsumoto Tadahiko, Matsui Hiroyuki, Yamazaki Hiroyuki, Sarca Anamaria Daniela, Kazuma Yasuhiro, Nomura Ryosuke, Konishi Yoshinobu, Takeuchi Suguru, Stanford Emani, Kawaji Hideya, Murakawa Yasuhiro, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 546
2. 論文標題 APOBEC3B is preferentially expressed at the G2/M phase of cell cycle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 178 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.008	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 Takahashi Tomoaki, Kawaji Hideya, Murakawa Yasuhiro, Hayashizaki Yoshihide, Murakami Takashi, Yabushita Yasuhiro, Homma Yuki, Kumamoto Takafumi, Matsuyama Ryusei, Endo Itaru	4. 巻 47
2. 論文標題 Significance of HMGA2 expression as independent poor prognostic marker in perihilar and distal cholangiocarcinoma resected with curative intent	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 394 ~ 400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejso.2020.08.005	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 Ooki Akio, Onodera Shoko, Saito Akiko, Oguchi Akiko, Murakawa Yasuhiro, Sakamoto Teruo, Sueishi Kenji, Nishii Yasushi, Azuma Toshifumi	4. 巻 141
2. 論文標題 CAGE-seq analysis of osteoblast derived from cleidocranial dysplasia human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115582 ~ 115582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115582	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 Hirabayashi Shigeki, Bhagat Shruti, Matsuki Yu, Takegami Yujiro, Uehata Takuya, Kanemaru Ai, Itoh Masayoshi, Shirakawa Kotaro, Takaori-Kondo Akifumi, Takeuchi Osamu, Carninci Piero, Katayama Shintaro, Hayashizaki Yoshihide, Kere Juha, Kawaji Hideya, Murakawa Yasuhiro	4. 巻 51
2. 論文標題 NET-CAGE characterizes the dynamics and topology of human transcribed cis-regulatory elements	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 1369 ~ 1379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-019-0485-9	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 該当する

1. 著者名 Miyazato Paola, Matsuo Misaki, Tan Benjy J. Y., Tokunaga Michiyo, Katsuya Hiroo, Islam Saiful, Ito Jumpei, Murakawa Yasuhiro, Satou Yorifumi	4. 巻 16
2. 論文標題 HTLV-1 contains a high CG dinucleotide content and is susceptible to the host antiviral protein ZAP	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Retrovirology	6. 最初と最後の頁 e48220 (online)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12977-019-0500-3	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 Hia Fabian, Yang Sheng Fan, Shichino Yuichi, Yoshinaga Masanori, Murakawa Yasuhiro, Vandenbon Alexis, Fukao Akira, Fujiwara Toshinobu, Landthaler Markus, Natsume Tohru, Adachi Shungo, Iwasaki Shintaro, Takeuchi Osamu	4. 巻 20
2. 論文標題 Codon bias confers stability to human mRNAs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 38 (online)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201948220	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 該当する

1. 著者名 Bardales Jorge, Wieser Evin, Kawaji Hideya, Murakawa Yasuhiro, Darzacq Xavier	4. 巻 9
2. 論文標題 Selective Activation of Alternative MYC Core Promoters by Wnt-Responsive Enhancers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 270 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes9060270	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 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 村川泰裕
2. 発表標題 A new genomic and computational approach to study human genomic enhancers and its association with diseases
3. 学会等名 1st International Symposium of CCII (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村川泰裕
2. 発表標題 Identification of Transcriptional Regulators Using Novel Next-generation Sequencing Technology
3. 学会等名 85th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村川泰裕
2. 発表標題 Decoding functional DNA elements in the human genome
3. 学会等名 1st ASHBi SignAC Workshop (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村川泰裕
2. 発表標題 RNAの生死から俯瞰する遺伝子発現制御
3. 学会等名 IPR seminar (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村川泰裕
2. 発表標題 Novel NET-CAGE Technology Reveals the Dynamics and Topology of Human Cis-regulatory Elements
3. 学会等名 Asia Pacific Conference on Human Genetics 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1. 村川泰裕、久米慧嗣、前田光代、須賀三雄、田村勝、小林紀郎
2. 発表標題 腎組織のイメージングビッグデータ解析
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村川泰裕
2. 発表標題 新規のNET-CAGE-seq法により明らかになる遺伝子発現ネットワークの正体
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村川泰裕
2. 発表標題 ゲノムデータの再生医療への応用 iPS細胞におけるゲノム変異の解明
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村川泰裕
2. 発表標題 腎組織のイメージングビッグデータ解析
3. 学会等名 第5回腎と生活習慣病先端医学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村川泰裕
2. 発表標題 NET-CAGEの現状と展望
3. 学会等名 第6回理研・順天堂共同研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 村川泰裕 廣瀬直毅 佐野浩美 川路英哉 河合純
2. 発表標題 次世代ヒト科学を推進するゲノム基盤の構築
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔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
研究分担者	高折 晃史 (Takaori Akifumi)  (20324626)	京都大学・医学研究科・教授  (14301)	
研究分担者	白川 康太郎 (Shirakawa Kotarou)  (80728270)	京都大学・医学研究科・助教  (14301)	

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