

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08362

研究課題名(和文)概日リズム因子を標的とした難治性急性骨髄性白血病の治療開発

研究課題名(英文)Targeting circadian clock genes in leukemia treatment

研究代表者

沼田 晃彦 (Numata, Akihiko)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60423563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：急性骨髄性白血病は様々な遺伝子異常により発症する。その中で、MLL遺伝子異常による白血病は、小児や若年成人を中心に発症し、予後は極めて不良である。本研究では、MLL-AF6融合遺伝子陽性の急性骨髄性白血病細胞に、概日リズム遺伝子のSHARP1が高く発現しており、その遺伝子を欠失させることで、白血病の発症や病気の進展を抑えることが示された。また、SHARP1蛋白を標的とすることが治療法として有望であり、その白血病化の分子機構を明らかにすることで、今後の創薬の基盤となるデータを構築することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白血病発症における概日リズム遺伝子の関与が示唆されてきたが、その分子機構の研究は網羅的には行われていない。本研究で、過去に白血病への関与が報告されていないSHARP1が、白血病MLL融合蛋白との、ヒストン修飾、クロマチン構造へ作用し、白血病発症・維持へ重要な役割を果たしていることを明らかにでき、学術的に極めて興味深い。若年者に発症する難治性の白血病の病態の分子基盤を一つずつ明らかにしていくことは、病気に苦しむ患者に福音をもたらす治療法開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The translocation of MLL gene is one of the most frequent chromosomal abnormalities in acute leukemia. More than 70 genes have been characterized as partner genes. Among them, MLL-AF6 AML patients present with a dismal clinical prognosis due to resistance to initial chemotherapy and high rate of relapse. We demonstrated that circadian clock gene SHARP1 is expressed solely in MLL-AF6 AML, and its deletion delays the development of leukemia and attenuated leukemia-initiating potential in mouse model. We elucidated molecular role of SHARP1 in MLL-AF6 AML, which could help develop new therapies.

研究分野：血液内科学

キーワード：急性骨髄性白血病 概日リズム因子 クロマチン修飾酵素

1. 研究開始当初の背景

- (1) 地球上のほぼすべての生物は、その体内に正確に時間を刻む分子機構を保持し、概日リズムを形成する。全ゲノムのうち 10%もの遺伝子の発現に概日リズムが認められている。脊椎動物では、bHLH 型の転写因子である CLOCK と BMAL1 が巧緻な転写ネットワークを形成し、24 時間をかけて 1 サイクルすることにより生物時計のリズムが生み出されている。
- (2) 急性白血病発症に関わる遺伝子異常の一つ MLL1 遺伝子は、ヒストンメチル化酵素をコードするが、CLOCK, BMAL1 とともに、概日リズムを伴ったヒストンメチル化能を発揮することが明らかにされ (Katada et al., Nat Struct Mol Biol.2010)、白血病の病態における概日リズム因子と MLL 融合タンパクとの相関が示唆される。
- (3) 近年、概日リズム因子と急性骨髄性白血病の病態への関与が示唆されている。PER2 が骨髄球系転写因子 CEBPA の標的遺伝子として同定され、急性骨髄性白血病発症に重要な役割を果たすこと (Gery et al., Blood 2005)、RNAi スクリーニングを用いたマウス白血病発症に重要な因子の探索研究では、CLOCK/BMAL1 が白血病幹細胞維持に重要であること (Purma et al., Cell 2016)、が報告された。
- (4) MLL 遺伝子関連白血病に関与する概日リズム因子は明らかにされていない。

2. 研究の目的

概日リズム因子群がどのように MLL 遺伝子関連急性白血病の発症、維持機構に関わるかを、プロテオミクス、トランスクリプトーム、クロマチン解析で明らかにすることで、治療標的の同定を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 急性骨髄性白血病の中で遺伝子発現プロファイルが類似した MLL 遺伝子転座を伴うサブタイプ(56 例)の中で予後が最も不良な MLL-AF6 (14 例) vs その他の MLL 転座白血病(42 例)で、概日リズム遺伝子の発現を比較した。
- (2) 最も発現に差があった転写因子 DEC2 (別名 SHARP1)と白血病遺伝子 MLL-AF6 との関連を調べた。具体的には、MLL-AF6 白血病細胞株 ML-2 を用いて、SHARP1 抗体と MLL 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 + 全ゲノムシーケンス (ChIP シーケンス)を行い、プロモータ領域に共通して結合する標的遺伝子群を同定した。SHARP1 のノックダウンを行い、RNA シーケンスで遺伝子発現変化を解析し、SHARP1 と MLL-AF6 が正に調節する遺伝子群を同定した。
- (3) SHARP1 に MLL-AF6 白血病細胞の発症、維持に必須かを調べた。具体的には、SHARP1 ノックアウトマウスと野生型マウスから造血幹前駆細胞分画を FACS ソートし、レトロウイルスを用いて MLL-AF6 遺伝子を導入した後に放射線照射した同系マウスに移植することで白血病を発症させた。SHARP1 の有無の、白血病マウスの生存への影響、白血病幹細胞の頻度への影響を解析した。
- (4) SHARP1 は転写因子であるため治療標的とはなりにくく、結合する蛋白群に治療標的を模索した。具体的には、MLL-AF6 白血病細胞株 ML-2 を用いて、SHARP1 と結合する蛋白群を、抗 SHARP-1 抗体を用いて定量的マス・スペクトロメトリーを用いて明らかにし、治療標的の基礎データを

構築を目指した。

4. 研究成果

(1) 急性骨髄性白血病患者の遺伝子発現プロファイル (データベース Gene Expression Omnibus から GSE19577, GSE14468, GSE61804 を用いた) を用い、白血病サブタイプごとに概日リズム因子 (BMAL1, CLOCK, CRY1, PER1, PER2, PER3, CUL1, NR1D1, SHARP1, DEC1) の発現を解析した。MLL-AF6 白血病に特異的に発現する SHARP1 を同定した。(図 1)

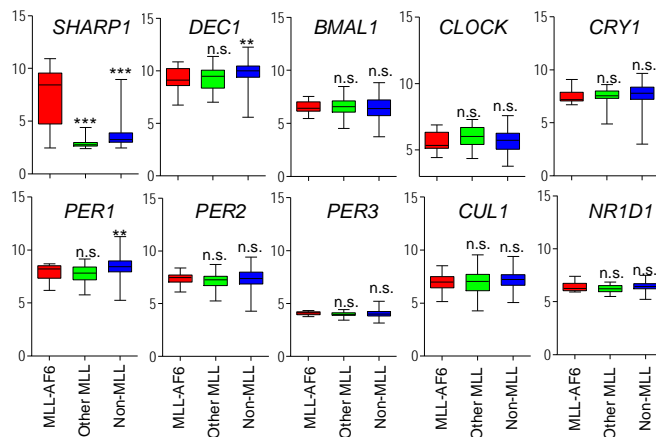


図 1. 急性骨髄性白血病患者における概日リズム遺伝子の発現

(2) 転写因子 SHARP1 は E-box シーケンス特異的に結合する転写因子である。MLL-AF6 白血病細胞株 ML-2 では、SHARP1 は 7443 遺伝子のプロモーター領域に結合し、その中で MLL-AF6 蛋白と 78 の標的遺伝子を共有していた (ChIP シーケンスによる解析)。その中に、CDK6、RUNX2、MEF2C など、過去の報告で白血病発症に重要な蛋白を見つけることができた。SHARP1 を shRNA を用いてノックダウンすることで、それらの遺伝子の発現が低下することから、直接の標的遺伝子と考えられた。SHARP1 は MLL-AF6 蛋白と白血病発症に重要な遺伝子群を正に調節することで、白血病発症に関わっていることが示唆された (図 2)。

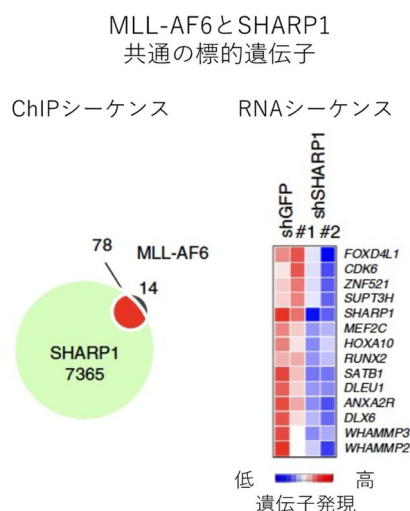


図 2. MLL-AF6 急性骨髄性白血病細胞における SHARP1 の標的因子の同定

(3) SHARP1 ノックアウトマウスに MLL-AF6 白血病を発症させると、その生存はコントロールと比較し延長した (図 3)。また、MLL-AF9 白血病では生存延長効果は認めなかった。SHARP1 ノッ

クアウトにより白血病幹細胞の頻度が低下していることが、限外希釈法を用いた移植実験で示された（データは供覧せず）。

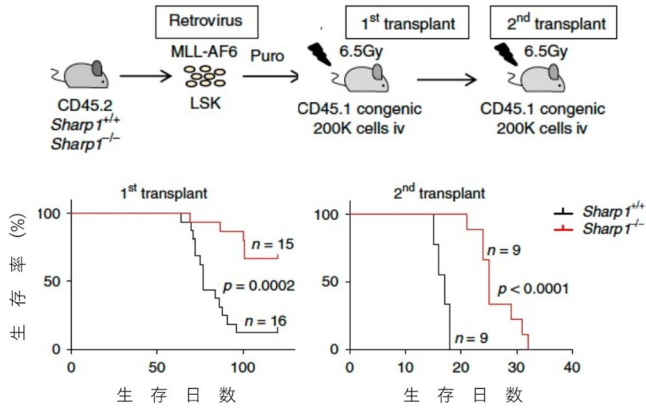


図 3. SHARP1 ノックアウトによる MLL-AF6 白血病マウスの生存延長効果

(4) SILAC 法を用いて、MLL-AF6 白血病細胞株 ML-2 で、SHARP1 と結合する蛋白群を明らかにした。興味深いことに、SHARP1 は転写のみならず、他の生物学的機能（RNA スプライシング、蛋白への翻訳）に関わる蛋白との結合が示唆され、過去に報告されていない機能を有することが示唆された（図 4）。これらのタンパクは、今後の治療法開発における有用な基礎データとなることが期待される。

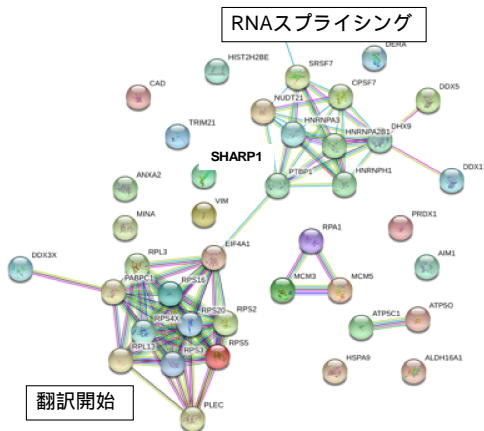


図 4. MLL-AF6 白血病細胞で SHARP1 と結合する蛋白群の同定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Numata A, Kwok HS, Kawasaki A et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 The basic helix-loop-helix transcription factor SHARP1 is an oncogenic driver in MLL-AF6 acute myelogenous leukemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-03854-0	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

1. 著者名 Numata A, Kwok HS, Zhou QL et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Lysine acetyltransferase Tip60 is required for hematopoietic stem cell maintenance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1735-1747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2019001279	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Numata A, Kwok HS, Bararia D, and Tenen DG
2. 発表標題 The lysine acetyltransferase Tip60 is required for hematopoietic stem cell maintenance
3. 学会等名 アメリカ血液学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沼田 晃彦, 赤司 浩一, ダニエル テネン
2. 発表標題 Tip60は造血幹細胞の維持に必須である.
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
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	菊繁 吉謙 (Kikushige Yoshikane) (40619706)	九州大学・医学研究院・講師 (17102)	

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			
米国	Harvard Stem Cell Institute	Beth Israel Deaconess Medical Center	University of Alabama	他4機関
シンガポール	Cancer Science Institute of Singapore	National University of Singapore		
英国	Oxford University	Cambridge University		