

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16089

研究課題名（和文）網羅的機能解析技術を用いた白血病必須クロマチン制御機構の解明と新規治療標的の同定

研究課題名（英文）CRISPR-Cas9 screen identifies essential chromatin-remodeling factors and novel therapeutic targets for acute myeloid leukemia

研究代表者

仙波 雄一郎 (Yuichiro, Semba)

京都大学・医学研究科・特別研究員（PD）

研究者番号：90816787

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：成人急性骨髄性白血病（AML）は依然として予後不良な疾患で、新規治療法の開発が喫緊の課題である。本研究者は、エピゲノム制御の側面、特にクロマチンリモデリング因子による転写制御に着目し、AML関連転写因子とクロマチンリモデリング因子を介したクロマチン制御異常がAML細胞の維持に寄与していると仮説を立てた。AML細胞における複雑なクロマチン制御機構の全容を解明するためには、従来の個々の遺伝子の機能解析だけでは限界がある。そこで、本研究では、CRISPR/Cas9スクリーニング法による網羅的な遺伝子機能解析を用い、AML細胞の維持に重要なクロマチンリモデリング因子を同定し、その機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究者は、AML細胞の維持に重要な転写因子およびクロマチンリモデリング因子を同定するため、CRISPR-Cas9システムによる全ゲノムスクリーニングの実験系を確立した。このスクリーニングの結果から、AML細胞増殖に必須である、または腫瘍抑制因子として機能するエピゲノム制御関連遺伝子を抽出可能であった。さらに、予後不良AMLに遺伝子異常が高頻度に認められる転写因子TP53に注目し、各因子についてTp53 pathway依存性を明らかにした。本研究の結果から、AMLにおいて転写因子が制御するエピゲノム制御因子が明らかとなり、本知見は今後の新たなAML治療開発につながることで期待される。

研究成果の概要（英文）：Acute myeloid leukemia (AML) is a devastating disease with low long-term survival rates, underscoring the critical need to devise a novel therapeutic strategy. In this study, we focused on the epigenetic regulating system, especially on the chromatin remodeling factors, and hypothesized that these factors play essential roles in AML cell survival in concert with transcription factors. Since there is a limitation to the conventional method of targeting individual factors in elucidating the complicated epigenetic regulating system involved, we instead performed genome-wide CRISPR-Cas9 screens to comprehensively identify the chromatin remodeling factors essential to AML cell survival and analyzed their functions.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：急性骨髄性白血病 CRISPRスクリーニング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人 AML の治療成績は多剤併用化学療法が導入されて以降、ごく一部の病型を除いて、過去 30 年以上にわたって大きな進歩を遂げておらず、新規治療法の開発が喫緊の課題である。昨今の白血病ゲノム解析から、転写因子の遺伝子変異や、転写因子結合部位の変異が同定され、転写因子の機能異常が白血病発症に直接関与していることが明らかになった (Crispino: *Blood* 2017, Sood: *Blood* 2017)。その一方で、転写因子による細胞分化制御の分子機構は未だ不明な点が多く、その解明が新規白血病治療法の開発につながる可能性がある。本研究者らは、これまでに造血幹細胞における *PU.1*・*GATA1* を中心とした転写因子による細胞分化制御機構を解明してきた (Iwasaki: *Genes Dev* 2006, Miyawaki: *Stem Cells* 2015)。本研究者は、エピゲノム制御の側面、特にクロマチンリモデリング因子による転写制御に着目し、正常幹細胞では転写因子がクロマチンリモデリング因子と共役し、分化関連遺伝子の転写を制御していること (Semba: *Nucleic Acid Research* 2017) を明らかにした。これらの知見より、本研究者は AML 関連転写因子とクロマチンリモデリング因子を介したクロマチン制御異常が AML 細胞の維持に寄与しているとの仮説を立てた。AML 細胞における複雑なクロマチン制御機構の全容を解明するためには、従来の個々の遺伝子の機能解析だけでは限界があり、多数の遺伝子を同時に対象とした機能的な解析が必要である。さらに、AML 特異的なクロマチンリモデリング因子は、新たな治療標的となる可能性があり、薬剤開発へ向け、機能的に重要なドメインを同定する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、正常造血細胞の分化、AML 細胞の維持に重要なクロマチンリモデリング因子の同定とその機能解析である。さらに、その詳細な責任ドメインを決定することで、クロマチン制御機構を標的とした新たな白血病治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、具体的に次の研究方法を用いる。

- (1) CRISPR/Cas9 スクリーニング法を用いた網羅的な遺伝子機能解析
- (2) CRISPR-Cas9 saturation mutagenesis 法を用いたタンパクドメインの機能的解析
- (3) ChIP-seq (転写因子、クロマチンリモデリング因子、ヒストン) および RNA-seq を用いた網羅的遺伝子発現解析

4. 研究成果

- (1) 白血球細胞に必須なクロマチンリモデリング因子の同定および機能解析

本研究者は、AML 細胞の維持に重要な転写因子およびクロマチンリモデリング因子を同定するため、CRISPR-Cas9 システムによる全ゲノムスクリーニングの実験系を確立した。まず、AML 細胞に Cas9 スクレアーゼを強発現した AML 細胞株 (Cas9AML 細胞) を 2 系統樹立した。本研究では、マウスの 20,611 遺伝子及び 1,175 の miRNA を標的とし、1 遺伝子あたり 6 つの異なる sgRNA がデザインされた GeCKO sgRNA ライブラリを用いた。7x10⁷ 個の Cas9AML 細胞に sgRNA ライブラリを感染させ、約 14 日培養後に、各 sgRNA の全 sgRNA リード数に占める割合の変化を MAGeCK プログラムで解析した。その結果、腫瘍抑制因子 *Tp53* を標的とする sgRNA が最も enrich し、Trp53 タンパク質発現を負に制御する *Mdm2* 及び *Mdm4* を標的とする sgRNA は dropout した。このことから、AML 細胞増殖の表現型に対する遺伝子スクリーニングが可能であることが示された。さらに、このスクリーニングの結果から、我々は AML 細胞増殖に必須であ

るエピゲノム制御関連遺伝子、腫瘍抑制因子として機能するエピゲノム制御関連遺伝子を抽出した(図 1C, 1D)。さらにその中から、白血病に対する治療標的の探索を念頭に、公開されているヒト腫瘍細胞 CRISPR スクリーニングデータベース (Depmap: <https://depmap.org>) およびヒト白血病患者遺伝子発現情報を用いてヒト白血病細胞においても機能が重要な因子を絞り込んだ。

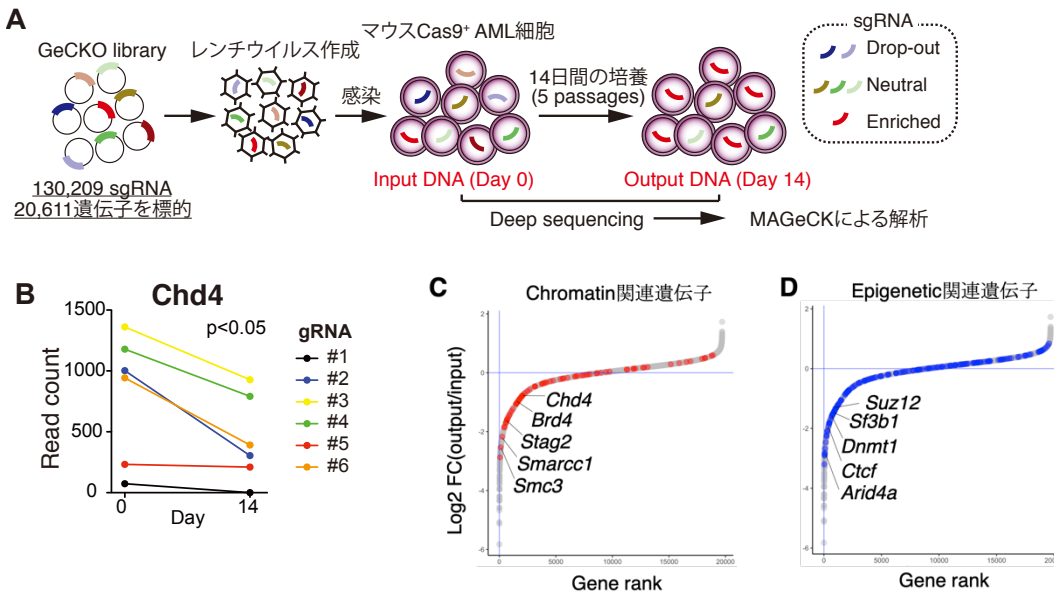


図 1A. CRISPR/Cas9 スクリーニングの概略図。B. *Chd4* に対する sgRNA は AML 細胞の 14 日間の培養中に量が減少した。C. スクリーニングの結果から、AML 細胞増殖に必要な chromatin 関連遺伝子を抽出した。D. スクリーニングの結果から、AML 細胞増殖に必要な epigenetics 関連遺伝子を抽出した。

(2) *Trp53* 変異白血病の治療標的となるクロマチンリモデリング因子の同定

本研究者は、予後不良な高齢者 AML で遺伝子変異が高頻度に認められる転写因子 *TP53* に注目した。独自に *Trp53* 野生型、欠失型のマウス急性骨髄性白血病 (AML) 細胞株を樹立し、CRISPR スクリーニングを駆使して転写因子 *TP53* 依存的に機能が変化する候補因子の抽出を行った (図 2A)。例えば、*Trp53* 自身を標的とした sgRNA は *Trp53* 野生型 AML スクリーニングでのみ enriched し、*Trp53* 抑制因子である *Mdm2*, *Mdm4* を標的とした sgRNA は *Trp53* 野生型 AML スクリーニングでのみ dropout した。この結果から、本スクリーニングにより *Trp53* に機能を依存した因子が抽出可能であることが確認された。さらに、上記で同定した白血病増殖に必要な chromatin 関連遺伝子について各々評価を行い、*Trp53* 変異状態による細胞増殖に与える影響の差異を検証した。その結果、これらの chromatin 関連遺伝子の中から、*Trp53* 野生型白血病でのみ細胞増殖に必要な因子 (e.g. *Smarcc1*, *Smarcc1*) を同定した (図 2B)。これらの因子は *Mdm2*, *Mdm4* と同様に *Trp53* pathway に機能を依存していると考えられ、*Trp53* 変異白血病では細胞増殖に対して必要ではないことが明らかとなった。一方で、*Trp53* 変異白血病に対する治療標的の探索を念頭に、*Trp53* 変異白血病細胞に対しても細胞死を誘導する遺伝子、つまり *Trp53* pathway に機能を依存していない因子について複数同定した (例えば *Gene X*, *Gene Y* とする, 図 2B)。さらに、その結果を追試するため、約 1000 候補遺伝子を標的とした二次スクリーニングを行った。そして、RNA-seq を用いて *Trp53* 変異白血病において遺伝子発現が認められ、かつ *Trp53* 欠失 AML で sgRNA が dropout した遺伝子を候補因子として抽出した。現在、これらの抽出した各因子について *Trp53* 変異 AML における機能解析を行っている。

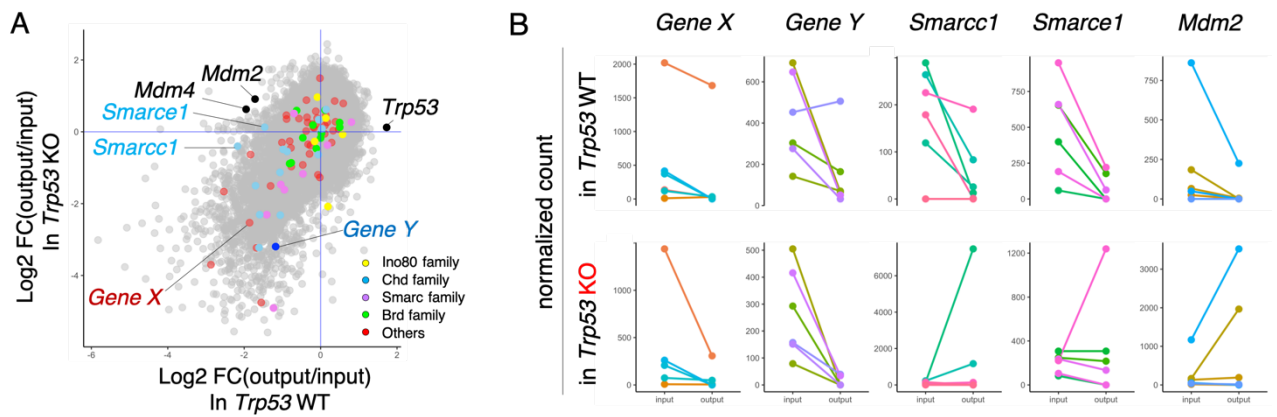


図 2A. *Trp53* 野生型および変異型 AML の CRISPR/Cas9 スクリーニングの結果の概略図。各遺伝子について、X 軸に *Trp53* 野生型、Y 軸に *Trp53* 変異型白血病における sgRNA の量的変化を log2FC で示した。値が小さければ細胞培養期間中に sgRNA 量が減少した、つまり細胞増殖に必要な遺伝子であったことを示す。B. 代表的な chromatin 関連遺伝子について、*Trp53* 野生型 (上段) および変異型 (下段) の sgRNA の経時的変化を示す。

(3) 白血病治療標的となるクロマチンリモデリング因子のドメイン同定

近年の medicinal chemistry の飛躍的進歩により、標的タンパクの機能的に重要なアミノ酸残基・タンパクドメインを同定することができれば、その部位に結合する化合物の合成を経て、PROTAC (proteolysis targeting chimera) 等の新規治療薬開発が可能となった (Milosevich: Biochemistry 2015)。本研究では、CRISPR/Cas9 saturation mutagenesis (SM) 法 (Canver: Nature 2015) をコーディング領域のドメインマッピングに応用した。今回、上記で同定した *Trp53* 欠失白血病の増殖に必要な遺伝子の全エクソンを網羅する、sgRNA ライブラリを作成し、*Trp53* 野生型および欠失型 AML 細胞を用いて SM 法を行なった (図 3A)。その結果、CRISPR/Cas9 スクリーニングの結果と同様に、*Mdm2* を標的とした sgRNA は *Trp53* 野生型では 14 日間の細胞培養期間中にその量が減少したが、*Trp53* 欠失型では sgRNA の量は変化しなかった。その一方で、*Gene X* を標的とした sgRNA は *Trp53* 野生型、*Trp53* 野生型ともにその量の減少を認めた。さらに、*Mdm2* を標的としたスクリーニングでは既知のドメイン部位に一致して sgRNA の量的変化が認められ、タンパク質の機能部位を評価可能であることが示された。*Gene X* についてもデータベースに登録されている N 末端側のタンパク質のドメインに一致して、特に sgRNA の減少を認め、細胞増殖に重要なドメイン部位が新規に明らかとなった (図 3B)。現在、この部位が関与する分子メカニズムについて検証を行っており、以上の研究で得られた知見をまとめ論文発表予定である。

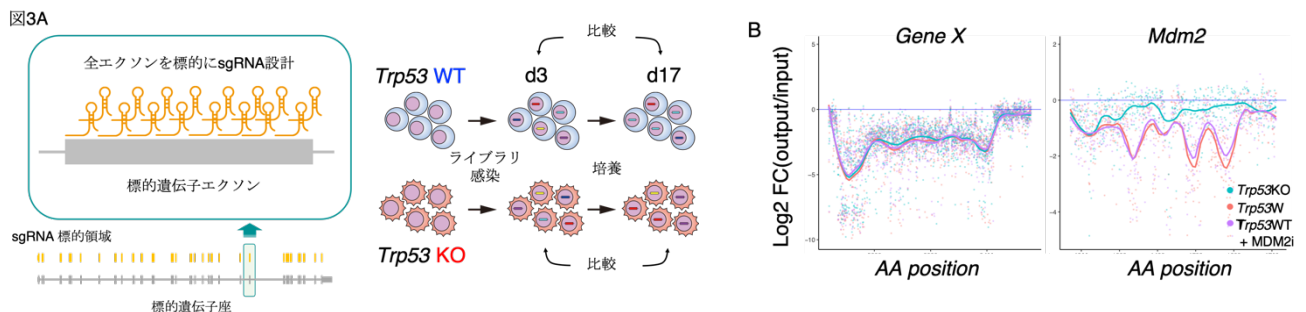


図 3A. CRISPR/Cas9 saturation mutagenesis (SM) 法の概略図。B. *Gene X* および *Mdm2* について、*Trp53* 野生型 (赤)、*Trp53* 野生型 + MDM2 阻害薬投与下 (紫)、および *Trp53* 変異型 (緑) の SM 法の結果を示す。各 sgRNA について X 軸に sgRNA の各アミノ酸上の部位、Y 軸に sgRNA の経時的な log2FC を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamauchi T, Masuda T, Canver MC, Seiler M, Semba Y, Shboul M, Al-Raqad M, Maeda M, Schoonenberg VAC, Cole MA, Macias-Trevino C, Ishikawa Y, Yao Q, Nakano M, Arai F, Orkin SH, Reversade B, Buonamici S, Pinello L, Akashi K, Bauer DE, Maeda T.	4. 巻 33
2. 論文標題 Genome-wide CRISPR-Cas9 Screen Identifies Leukemia-Specific Dependence on a Pre-mRNA Metabolic Pathway Regulated by DCPS	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Cell	6. 最初と最後の頁 386 ~ 400.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ccell.2018.01.012	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Semba Y, Yamauchi T, Nakao F, Nogami J, Canver MC, Pinello L, Bauer DE, Akashi K and Maeda T.
2. 発表標題 CRISPR-Cas9 Screen Identifies XP07 As a Potential Therapeutic Target for TP53-Mutated AML.
3. 学会等名 The 61st American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Semba Y, Yamauchi T, Nakao F, Yao Q, Nogami J, Canver MC, Pinello L, Bauer DE, Akashi K and Maeda T.
2. 発表標題 Genome-wide CRISPR-Cas9 screen identifies novel therapeutic targets for TP53-mutated AML.
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (JSH)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Semba Y, Yamauchi T, Nakao F, Yao Q, Nogami J, Canver MC, Pinello L, Bauer DE, Akashi K and Maeda T.
2. 発表標題 CRISPR-Cas9 Screen Identifies XP07 as a Novel Therapeutic Target for TP53-mutated AML.
3. 学会等名 The seventh annual meeting of the Society of Hematologic Oncology (SOHO) (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Semba Y, Yamauchi T, Nakao F, Nogami J, Yao Q, Canver MC, Pinello L, Bauer DE, Akashi K, Maeda T.
2. 発表標題 CRISPR-Cas9 screen identifies XP07 as a novel therapeutic target for TP53-mutated AML.
3. 学会等名 The FASEB Hematologic Malignancies Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020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

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