

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16090

研究課題名(和文)染色体転座由来スーパーエンハンサー活性化による白血病発症機構解明

研究課題名(英文) Leukemic development through chromosomal translocation with super-enhancer exchange

研究代表者

久保田 翔 (Kubota, Sho)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特定事業研究員

研究者番号：70747831

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)：芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍(BPDCN)は、pDCに類似した表現形・遺伝子発現様式を持つ急性骨髄性白血病の一亜形である。従来の抗がん剤治療には抵抗性で生命予後は不良であり、その病態は未だ明らかでない。申請者は、BPDCNに特異的に認める染色体転座t(6;8)によって、強力ながん遺伝子であるc-MYCとpDC分化に重要なRUNX2のエンハンサー領域が相互転座していることを見出した。申請者が新たに同定した転座由来がん特異的スーパーエンハンサー活性化によるBPDCNの発症機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん遺伝子MYCの活性化機構として、従来、MYC遺伝子増幅や染色体転座によるプロモーターの置換が知られていた。また、組織特異的なエンハンサーが異常に活性化する膵臓がん、大腸がんや急性リンパ性白血病の場合もある。本研究では、染色体相互転座によって、c-MYCエンハンサーがRUNX2を、RUNX2スーパーエンハンサーがc-MYC発現を異常に活性化する機構を明らかにした。こうした染色体転座によって交換・活性化されたがん特異的エンハンサーによるBPDCN発症機構の解明は、MYCの新規活性化機構だけに限らず、新たながん発症メカニズムの視点を与えた独創的な研究である。

研究成果の概要(英文)：Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN) is an aggressive acute leukemia, which appears to be originated from the precursor of plasmacytoid dendritic cells (pDCs). Chromosomal translocation (6;8)(p21;q24) is often seen in BPDCN patients. RUNX2, located on chromosome 6p21, has been shown to regulate the differentiation of pDCs. We found that expression of RUNX2 and C-MYC, an potent oncogene, were significantly up-regulated in BPDCN bone marrow cells in patients as well as a cell line, CAL-1, harboring t(6;8)(p21;q24). Given that RUNX2 appeared to be critical for the development of BPDCN, we explored the mechanism of pathogenesis of BPDCN driven by t(6;8).

研究分野：白血病

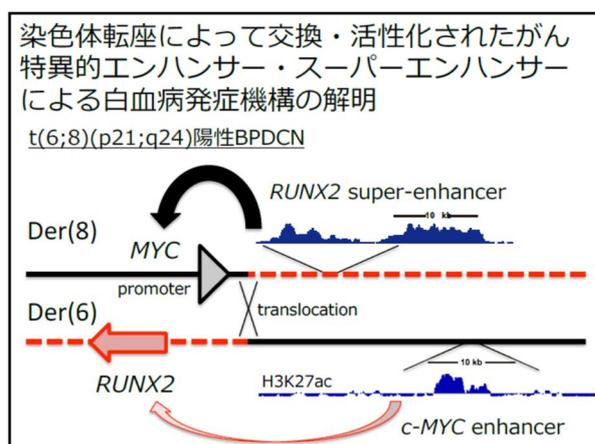
キーワード：BPDCN エンハンサー エピジェネティクス 白血病 染色体転座 スーパーエンハンサー

1. 研究開始当初の背景

芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍・Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN)は急性骨髄性白血病(AML)に分類される希少がんであり、その表現形と遺伝子発現様式から自然免疫に重要な plasmacytoid dendritic cell(pDC)に類似することが分かっている。従来の抗がん剤に抵抗性であり、平均生存期間は12から16か月と予後不良である。

BPDCNのゲノム変異として、転写因子 *p53* と DNA 脱メチル化酵素 *TET2* の機能喪失型変異が知られているが、申請者は、BPDCN 特異的な染色体転座 $t(6;8)(p21;q24)$ に着目した。この転座近傍には *RUNX2* と *c-MYC* がそれぞれ局在しており、患者細胞で *c-MYC* と *RUNX2* が高発現してい

た。*RUNX2* 転写因子は pDC で発現しており、pDC 分化に必須である。こうした知見に基づき、*c-MYC* と *RUNX2* のそれぞれの特異的なエンハンサー領域が転座によって、*MYC* また *RUNX2* を異常発現させることで、BPDCN を発症させる仮説を得た(右図参照)。



2. 研究の目的

がん遺伝子 *MYC* の活性化機構として、遺伝子増幅や染色体転座によるプロモーターの置換が知られていた。また、組織特異的なエンハンサーが活性化する膵臓がん、大腸がんや急性リンパ性白血病の場合もある。申請者は、BPDCN 細胞のゲノムシークエンスなどの解析によって、*MYC* と *RUNX2* の遺伝子領域とそれぞれのエンハンサー領域の間の転座を確認した。以上、本研究では、染色体転座によって交換・活性化されたがん特異的エンハンサーによる BPDCN の発症機構解明を目的とした。

3. 研究の方法

がん特異的なエンハンサー活性化とがん発症機構を理解するために、BPDCN における染色体転座による *c-MYC* と *RUNX2* 発現活性化のスーパーエンハンサーに依存した分子メカニズムを解明する。次に、重要ながん抑制遺伝子である *p53* と *TET2* の機能喪失と染色体転座によるスーパーエンハンサー活性化が、どのように協調しているのかを、マウスモデルを作製することによって、生体レベルにおける BPDCN の病態基盤を解明する。最後に、予後不良な BPDCN に対する新規治療開発のために、転座をきっかけに形成されたがん特異的スーパーエンハンサー機能を阻害する基礎的な検証を

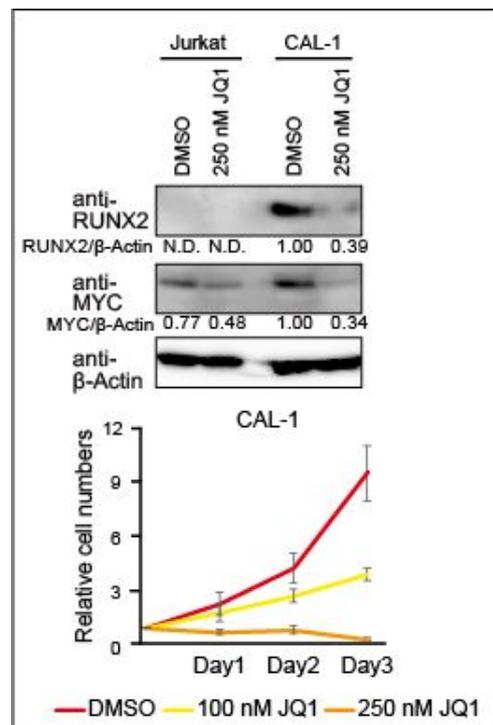
実施する。

4. 研究成果

始めに、c-MYC と RUNX2 発現レベルを、t(6;8)転座のある BPDCN 細胞株・CAL-1(長崎大学・前田隆浩博士より供与)、および患者骨髓細胞にて検証した。少数例の検討ではあるが、BPDCN において c-MYC と RUNX2 の mRNA・タンパク質における非常に高い発現レベルを認めた。実際、BPDCN における c-MYC と RUNX2 のがん遺伝子機能を検証するために、CAL-1 細胞にて shRNA によってノックダウンすると、CD56 や CD123(IL3-RA)といったがん特異的の表面マーカー発現レベルが源弱するとともに、有意に細胞増殖活性が阻害された。

特異的な c-MYC と RUNX2 の発現亢進が染色体転座によるものかを確認するために、t(6;8)転座のある BPDCN 細胞の全ゲノムシーケンス解析に加えて(シンガポール国立大学・大里元美博士との共同研究)、c-MYC エンハンサー領域/RUNX2 領域の FISH 解析(東京医科大学・大屋敷一馬博士との共同研究)によって、MYC と RUNX2 の遺伝子領域と MYC と RUNX2 のエンハンサー領域の間に転座点を確認した。さらに、活性化ヒストン修飾 H3K27ac に対する ChIP-sequencing によって、RUNX2 のスーパーエンハンサーを確認したが、このエンハンサー領域(6p21)は、3C 解析によって、確かに MYC のプロモーター領域(8q24)と近接していることが分かった。

同定したスーパーエンハンサーによるがん促進機能を確認するために、エンハンサー機能を抑制する BRD4 阻害剤 JQ1 によって、BPDCN 細胞の増殖抑制効果と c-MYC および RUNX2 発現抑制効果をまずは in vitro にて検証した。さらに、転座由来のエンハンサーを、転座点をはさむ形で(野生型アリルではなく)ゲノム編集によって欠損させたところ、MYC の発現減弱と共に BPDCN 細胞の増殖活性の低下を認めた(右図参照)。



RUNX2 と c-MYC が BPDCN 幹細胞の発生に十分であるか新規マウスモデルを確立することで検証する。現在まで、BPDCN 生体モデルは一切報告されておらず、成功すれば、世界で初めての BPDCN マウスモデルとなる。始めに、BPDCN 患者に TET2 および p53 変異が高頻度にある知見から、Tet2^{flx/flx};Trp53^{flx/flx};CreERT2 DKO マウスを交配準備した。患者でのがん発症過程を模擬するために、始めにタモキシフェンによって

Tet2 と p53 を欠損させた後に、造血幹細胞を採取して *RUNX2* と *c-MYC* をレトロウィルスベクターによって導入した。導入後の幹細胞を *in vitro* で pDC への分化誘導をかけた後に、致死量放射線照射した野生型レシピエントマウスに移植して、BPDCN 発症の有無を解析した。すると、マウスで BPDCN 様白血病(CD11b⁺B220⁺Bst2⁺)の発症が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuan JW, Su AT, Tay SP, Fong IL, Kubota S, Su'ut L, Osato M, Sashida G.	4. 巻 111
2. 論文標題 Low prevalence of the BCR-ABL1 fusion gene in a normal population in southern Sarawak.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 217-224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-019-02768-x.	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 Kubota S, Tokunaga K, Umezu T, Yokomizo-Nakano T, Sun Y, Oshima M, Tan KT, Yang H, Kanai A, Iwanaga E, Asou N, Maeda T, Nakagata N, Iwama A, Ohyashiki K, Osato M, Sashida G.	4. 巻 10
2. 論文標題 Lineage-specific RUNX2 super-enhancer activates MYC and promotes the development of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 1653
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-09710-z.	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 Nakajo H, Ishibashi K, Aoyama K, Kubota S, Hasegawa H, Yamaguchi N, Yamaguchi N	4. 巻 511
2. 論文標題 Role for tyrosine phosphorylation of SUV39H1 histone methyltransferase in enhanced trimethylation of histone H3K9 via neuregulin-1/ErbB4 nuclear signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 765-771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-09710-z.	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 Tenjin Y, Kudoh S, Kubota S, Yamada T, Matsuo A, Sato Y, Ichimura T, Kohroggi H, Sashida G, Sakagami T, Ito T.	4. 巻 99
2. 論文標題 Ascl1-induced Wnt11 regulates neuroendocrine differentiation, cell proliferation, and Ecadherin expression in small-cell lung cancer and Wnt11 regulates small-cell lung cancer biology.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lab Invest.	6. 最初と最後の頁 1622-1635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-019-0277-y.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ayaka Maeda, Sho Kubota, Yuqi Sun, Kimi Araki, Motomi Osato, and Goro Sashida
2. 発表標題 The age-specific induction of MLL-AF9 regulates the leukemic transformation
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田翔, 梅津知宏, 岩間厚志, 大屋敷一馬, 大里元美, 指田吾郎
2. 発表標題 樹状細胞特異的RUNX2スーパーエンハンサーによるMYCの活性化を介したBPDCNの発症メカニズムの解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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