

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2022

課題番号：18KK0440

研究課題名（和文）スーパーエンハンサー解析を介したがん関連遺伝子 integrin 発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the regulatory mechanisms of integrin expression by super-enhancer analysis

研究代表者

南部 晶子（NAMBU, AKIKO）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特別研究員

研究者番号：40572087

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 36ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究は、白血病におけるインテグリンの発現制御機構解明を目標とし、この概念や方法論を通じて、脳腫瘍におけるインテグリン発現制御機構に応用、発展させることを目的としている。その結果、ITGA9はAML幹細胞（LSC）に高発現し、ITGA9の発現がMYCの発現を増加させ、AKT/PI3K経路活性化を介してAMLのリボソーム生合成を促進し、AML増殖に関与していることを示した。また、TGA9の発現はMYC自身あるいは、MYC遺伝子座上に形成されるスーパーエンハンサーのクラスター遺伝子により制御されている可能性があることを示唆した基礎的知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、スーパーエンハンサーを解析することにより、がん関連遺伝子インテグリンの発現制御機構を明らかにする新しい試みであり、本研究によって得られた知識や技術は脳腫瘍のみならず、他の腫瘍においても応用可能であると考えられる。また本研究によって得られた結果を発展させることで、今後白血病や脳腫瘍において新たな治療標的を探索することができる可能性があることから、本研究成果は腫瘍生物学にとって重要な基礎的知見を提供できたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate the regulatory mechanism of integrin expression in leukemia, and to apply and develop this idea and methodology to the regulatory mechanism of integrin expression in glioblastoma stem cells. Our results showed that ITGA9 is highly expressed in AML stem cells (LSCs), and that ITGA9 expression is involved in AML proliferation by increasing MYC expression and promoting AML ribosome biogenesis through activation of the AKT/PI3K pathway. These basic findings suggest that the expression of TGA9 may be regulated by MYC itself or by a cluster of super-enhancer genes formed on the MYC locus.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：白血病 インテグリン エンハンサー

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫 (グリオーマ) は頭蓋内組織に発生する悪性脳腫瘍の中で最も多く、外科的手術による完全な治癒は不可能である。術後脳内に残った腫瘍細胞は放射線療法・化学療法に対する反応性、再発などの予後を決める最も重要な因子とされ、脳腫瘍の放射線・化学療法抵抗性、再発のメカニズム解明は新規治療薬開発の重要な基礎的知見になり得る。これまでに、グリオーマ組織由来のがん幹細胞が樹立され、放射線・化学療法抵抗性、脳腫瘍再発の根底はがん幹細胞であると考えられ、がん幹細胞は新規脳腫瘍治療標的になり得ることが強く示唆されている。しかしながら、がん幹細胞のマーカー分子はもとより、増殖・分化誘導に関わる分子群については情報が乏しいのが現状である。

本研究に先駆けた研究では、9種類の GIC を単離・樹立し、独自の融合プロテオミクス (プロテオームとトランスクリプトームの融合解析システム)、データマイニングソフトウェア iPEACH (an integrated protein/gene expression analysis chart) を用いて GIC の分化制御に関わる細胞外マトリックスとそのレセプターであるインテグリン αV からなる「分化ニッチ」の存在を証明し、GIC の分化誘導機構に分化ニッチ形成が重要であること、また、これが治療ターゲットとなることを世界で初めて明らかにした (Nambu et al, *PLoS ONE* 2013)。また、インテグリン αV の中和抗体やインテグリン αV の阻害ペプチド投与は GIC への細胞毒性や細胞増殖抑制効果を顕著に増加させたことから、GIC の治療標的としてインテグリン αV が有効であることが強く示唆された。インテグリンは多くの腫瘍で発現が認められ、腫瘍細胞の分化あるいは、浸潤、再発に大きく寄与することが知られているが、それにも関わらず、その発現制御機構は未だ明らかにされていない。腫瘍学の中で最も概念が確立され、研究が進んでいる白血病分野においても、白血病発症にインテグリンが関与することが示唆されており、脳腫瘍同様、インテグリンの発現制御も白血病の新たな治療標的になると考えられた。

2. 研究の目的

そこで、本国際共同研究では、白血病におけるインテグリンの発現制御機構解明を目標とし、この概念や方法論を通じて、脳腫瘍におけるインテグリン発現制御機構に応用、発展させることを目的としている。

3. 研究の方法

本研究は、白血病におけるインテグリンの発現制御機構解明を目的に、以下の方法により研究を行う。

(1) AML におけるインテグリン $\alpha 9$ (ITGA9) の影響

白血病の責任遺伝子として同定された ITGA9 過剰発現細胞を用いて、AML 発症機序あるいは AML 細胞増殖亢進に ITGA9 が関与しているか AML 培養細胞、あるいはヒト AML 患者骨髄細胞由来異種移植 (PDX) マウスモデルを用いて移植能や増殖能を検討する。また評価系にはフローサイトメトリーを用いる。

(2) AML 増殖における ITGA9 の機能解析

マイクロアレイを用いて、ITGA9 がどのようなシグナル経路を介して AML を亢進するか検討を行い、AML 培養細胞により同定経路を評価する。

(3) ITGA9 の発現制御機構

ITGA9 の発現がどのようなメカニズムで関与しているか検討する。主には CHIP-seq データを用いて、ITGA9 あるいは ITGA9 の発現に関与していると考えられる遺伝子上のエンハンサーに注目して解析を行い、ITGA9 の発現制御に関与する分子等の阻害剤や過剰発現システムなどを用い

て確認を行う。

4. 研究成果

(1) AMLにおけるインテグリン $\alpha 9$ の影響

白血病幹細胞 (LSC) は、定常状態ではほとんど休眠状態であるが、LSCは白血病細胞集団を再構成できる細胞である。休眠状態にいる間、LSCは化学療法から逃れ、最大の臨床問題である疾患再発の主因となる。このLSCの休眠状態は、骨髄微小環境、すなわちニッチとの相互作用によって行われることが明らかにされている。従って、LSCとニッチの相互作用を解離させることがLSCに対する新規治療ターゲットになる可能性がある。先行研究では、LSCにおいてニッチと相互作用する分子の探索を行ないITGA9がニッチ相互作用分子として同定された。

AMLにおける同定分子ITGA9の発現を検討するため、ヒト患者白血病細胞におけるITGA9の発現を検討した。ITGA9は他のAMLサブタイプと比較して、ヒトt(8;21)(p22;q22)およびinv(16)(p13;q22)白血病細胞でより高い発現を示した(図1)。また、t(8;21)とinv(16)を持つAML細胞株、Kasumi-1とME-1でも同様に高発現していた。ITGA9がRUNX白血病において機能的に重要

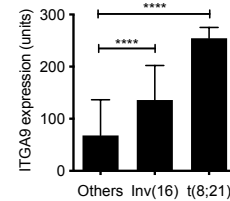


図1. ヒトAML患者におけるITGA9の発現

かどうかを調べるため、ITGA9のN末端欠失変異体(ITGA9 Δ N)とITGA9全長(ITGA9FL)またはmock配列を組み込んだレトロウイルスを作成した。このレトロウイルスを用いて、t(8;21)によって生じるRUNX1-ETO(RE)を発現するEML細胞にItga9FL, Itga9 Δ N, mockをそれぞれ導入し、この細胞を免疫不全マウスに骨髄移植した。RUNX1-ETO-Itga9 Δ N(RE-Itga9 Δ N)を移植したマウスはRUNX1-ETO-mock(RE), RUNX1-ETO-Itga9FL(RE-Itga9FL)の発現細胞を移植したマウスよりも有意に生存期間が短かった(図2)。

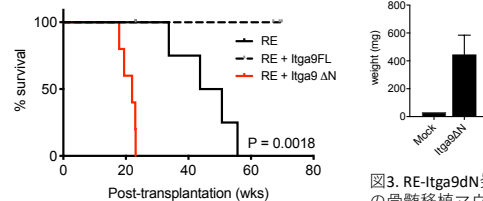


図2. ITGA9発現細胞を用いた骨髄移植実験

また、RE-Itga9 Δ N細胞移植マウスでは明らかな脾臓の腫大(脾腫)がみられたが、他の細胞を移植したマウスでは観察されなかった(図3)。これらの結果から、ITGA9の発現、特にN末端が欠損したITGA9によりAMLが惹起される可能性が示唆された。

図3. RE-Itga9 Δ N発現細胞の骨髄移植マウスの脾臓

次に、ヒトAML患者においても同様の現象が見られるのか検討した。その結果、マウス実験と同様、ヒトAML患者においてもITGA9の発現は正常なヒト骨髄細胞と比較してAML患者の骨髄細胞で有意に増加していることがわかった。また、興味深いことにITGA9の発現はCD34陽性細胞がエンリッチされるAML幹細胞画分に高発現していることがわかった(図4)。次にITGA9がAML細胞増殖に関与するか、ヒトAML患者骨髄細胞由来異種移植(PDX)マウスモデルを用いて評価した。PDXマウスから採取した骨髄細胞をITGA9陽性細胞と陰性細胞に分画し、免疫不全マウスに骨髄移植し、移植3ヶ月後の骨髄におけるヒトCD45(hCD45)の頻度をフ

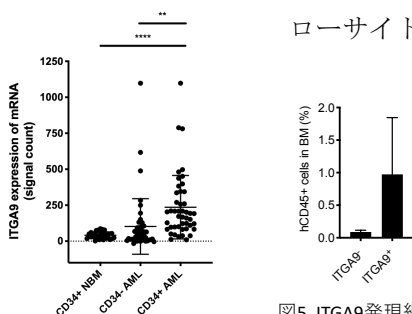


図4. ヒトAML患者CD34陽性細胞におけるITGA9の発現

図5. ITGA9発現細胞を用いた骨髄移植実験

ローサイトメトリーにより解析した。ITGA9陰性細胞の頻度は約0.1%に対し、ITGA9陽性細胞は約1.5%程度増加した(図5)。また、ITGA9陰性細胞と陽性細胞を用いて、コロニーアッセイを用いて細胞増殖を評価した結果、陰性細胞ではコロニー形成が観察されなかったが、陽性細胞では有意にコロニー形成が認められた。これらの結果から、ITGA9はAML幹細胞に高発現し、AMLの増殖に関与することが示唆された。

(2) AML 増殖における ITGA9 の機能解析

次に、白血病になりやすい Runx 欠損マウス (DKO) の骨髄細胞に Itga9 Δ N あるいは mock を過剰発現させた細胞を用いてマイクロアレイを行なった。その結果、Itga9 Δ N を過剰発現させた細胞 (DKO_Itga9 Δ N) では mock (DKO_mock) 発現細胞と比較して、Myc あるいは Myc 関連遺伝子群の発現がアプレギュレーションされていることがわかった (図 6)。

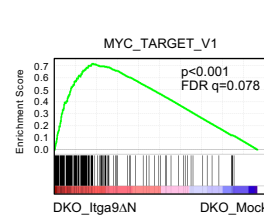


図6. Myc signature

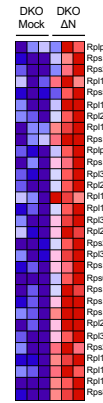


図7. ITGA9過剰発現位におけるリボソーム関連遺伝子群の発現変化

また、Itga9 過剰発現細胞では、AKT および p38MAPK シグナル伝達経路が活性化することがわかった。これまでの報告から、がん細胞では c-MYC と協調して AKT 経路を介してリボソーム生合成が促進されていることがわかっている (J Chan et al., *Science.Signal* 2011)。私たちのマイクロアレイの結果においても Itga9 Δ N 過剰発現細胞は、Myc の発現に伴いリボソーム関連遺伝子群の発現が増加していること (図 7)、AKT/PI3K 経路が活性化していることがわかった。これらの結果から、ITGA9 の過剰発現は、MYC の発現を増加させ、AKT/PI3K 経路を介して AML のリボソーム生合成を促進し、AML 増殖に関与していることが示唆された。

(3) ITGA9 の発現制御機構

近年の報告から、がん遺伝子である MYC 遺伝子座には強力な遺伝子活性を示すスーパーエンハンサーを形成していることが報告されている。スーパーエンハンサーはマスター転写因子と転写制御因子であるメディエーター複合体、クロマチン調節因子が局所的にクラスターを形成したゲノム領域と考えられている。これらの巨大複合体は互いに協調しあい、標的分子の転写・発現を強力に制御していると考えられる。従って、がん遺伝子におけるスーパーエンハンサーの領域及び構成因子群を同定し、これらの機能が解析されることによって、がん遺伝子の発現制御を行うことが可能になり、新たな治療標的分子創出が期待される。AML においても c-MYC の遺伝子座上にスーパーエンハンサーが形成され、そこに遺伝子クラスターが形成されることにより AML 発症あるいは増殖に関与していることが報告されている。スーパーエンハンサーの活性はクロマチン制御タンパク質である BRD4 への依存度が高い。そこで、BRD4 が持つ BED ドメイン阻害剤 JQ1 を用いて、MYC と ITGA9 の関連性を調べるため、ITGA9 が高発現している t(8;21)AML 細胞 Kasumi-1 に JQ1 処理し、MYC と ITGA9 の発現を検討した。これまでの報告と同様、MYC の発現減少が観察されたが、興味深いことに ITGA9 の発現も減少していた (図 8)。

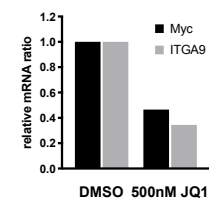


図8. JQ1処理における MYC と ITGA9 の発現

この結果は ITGA9 の発現制御機構にスーパーエンハンサーが関与することを示唆している。そこで、ITGA9 の遺伝子座上のスーパーエンハンサーの有無を調べるため、Kasumi-1 細胞における PROq-Seq データを用いて解析した。その結果、ITGA9 遺伝子から上流 50Gb までの間に JQ1 によって消失するスーパーエンハンサーと考えられるピークは検出されなかった。このことから、ITGA9 の発現は MYC 自身あるいは、MYC 遺伝子座上に形成されるスーパーエンハンサーのクラスター遺伝子により制御されている可能性があることが示唆された。今後、クラスター遺伝子群が解析されることにより、スーパーエンハンサーの実態が明らかとなり、新たな治療標的が見つかる可能性につながると考えられる。本研究は、ITGA9 が LSC に高発現する分子であることを見出し、ITGA9 の発現制御がスーパーエンハンサーによって行われていることを示唆した基礎的知見であり、脳腫瘍に関与するインテグリンを含むがん関連遺伝子がスーパーエンハンサーによって制御される可能性

を示唆したものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Mohamed G, Akiko Niibori-Nambu, Morii M, Yokomizo T, Yokomizo T, Ideue T, Kubota S, Vania Teoh, Michelle Mok, Chelsia Wang, Abdellah O, Tokunaga K, Iwanaga E, Matsuoka M, Asou N, Nakagata N, Araki K, Mabrouk AboElenin, Sayed Madboly, Sashida G, Osato M	4. 巻 35(10)
2. 論文標題 RUNX1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) induces myeloid leukemia in mice in an age-dependent manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2983-2988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-021-01268-4	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 Seiko Yoshino, Miwa Tanaka, Yoshitaka Sunami, Tomoko Takahara, Yukari Yamazaki, Mizuki Homme, Akiko Niibori-Nambu, Motomi Osato, Takashi Minami, Keiichi Ishihara & Takuro Nakamura	4. 巻 36
2. 論文標題 Trib1 promotes the development of acute myeloid leukemia in a Ts1Cje mouse model of Down syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 558-561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-021-01384-1	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 Hosoi Hiroki, Niibori-Nambu Akiko, Nah Giselle Sek Suan, Bahirvani Avinash Govind, Mok Michelle Meng Huang, Sanda Takaomi, Kumar Alan Prem, Tenen Daniel G., Ito Yoshiaki, Sonoki Takashi, Osato Motomi	4. 巻 774
2. 論文標題 Super-enhancers for RUNX3 are required for cell proliferation in EBV-infected B cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145421 ~ 145421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2021.145421	査読の有無 無
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 Kun Liang, Ki Hyun Bae, Akiko Nambu, Bibek Dutta, Joo Eun Chung, Motomi Osato and Motoichi Kurisawa	4. 巻 8
2. 論文標題 A two-pronged anti-leukemic agent based on a hyaluronic acid green tea catechin conjugate for inducing targeted cell death and terminal differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 497-505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9bm01146c	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 2件）

1. 発表者名 Akiko Niibori-Nambu
2. 発表標題 Molecular mimicry of niche-interacting status by ITGA9 overexpression underlines the extramedullary maintenance of leukemia stem cells in AML
3. 学会等名 SICS 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akiko Niibori-Nambu
2. 発表標題 Targeting Integrin a9 by a Blocking Monoclonal Antibody in Acute Myeloid Leukemia
3. 学会等名 Frontiers in Cancer Scneince
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akiko Niibori-Nambu
2. 発表標題 Targeting Integrin a9 by a Blocking Monoclonal Antibody in Acute Myeloid Leukemia
3. 学会等名 Frontiers in Cancer Science
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Niibori-Nambu
2. 発表標題 argeting Integrin a9 by a Blocking Monoclonal Antibody in Acute Myeloid Leukemia
3. 学会等名 RUNX meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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			
シンガポール	Cancer Science Institute			