

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03694

研究課題名(和文) MLL白血病発症メカニズムの統一的理解

研究課題名(英文) Mechanisms of MLL-rearranged leukemia

研究代表者

横山 明彦 (Yokoyama, Akihiko)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：10506710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：MLL遺伝子異常による白血病の発症機構を理解するために多様なMLLキメラによる白血病発症メカニズムの解析を行なった。構造の異なる様々なタイプのMLLキメラは、複数の異なるメカニズムを介してAEPという転写活性化因子を標的遺伝子プロモーター上にリクルートすることで白血病を引き起こしているという事を見出した。特に、AEPと直接結合するのではなく、AEPを標的プロモーターに積み込むタイプのMLLキメラ(例MLL-ELLなど)は、HB01というヒストンアセチル化酵素の働きに依存して発がんドライバーとして機能していることが明らかにされ、HB01とAEPがMLL白血病の創薬標的となる分子基盤が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MLL遺伝子異常による白血病は現行の治療法でも予後が悪く、新しい治療法の開発が望まれている。そのためには病気の分子メカニズムを解明し、新たな分子標的薬を開発する事が強く求められている。我々は、多様なMLLキメラ遺伝子による白血病化の分子メカニズムを統一的理解するために、複数の代表的なMLLキメラ遺伝子による白血病化のメカニズムを解析した。その結果、MLLキメラはAEPという転写関連因子とHB01という転写関連因子を介して発がんドライバーとして機能していることが明らかになった。これらの転写関連因子は今後、分子標的薬開発において分子標的として役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular pathology of MLL-rearranged leukemia, which often results in poor prognosis, we analyzed the molecular mechanisms of oncogenic transformation by various types of MLL fusion genes. We demonstrated that most (if not all) of MLL fusions recruit an AEP transcriptional coactivator to the target promoters to activate gene expression. Some subtypes of MLL fusions need to interact with HB01 histone acetyl transferase to fully exert their oncogenic functions, especially the ones that activate gene expression by loading AEP, but not tethering it, to the target chromatin (e.g., MLL-ELL).

研究分野：血液内科学

キーワード：白血病 分子標的 MLL HB01 転写 タンパク結合 AEP

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

染色体転座によって MLL 遺伝子とパートナー遺伝子が融合し、MLL キメラ遺伝子が形成されることが予後不良の白血病を引き起こす。MLL の融合パートナーは多岐にわたり、これまでに 100 種類以上が報告されている。しかし、何故 MLL キメラはかくも多様なパートナーと融合しながら、白血病という同じ結果を生み出すのか、明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究で我々は「多様な MLL キメラは全て AEP と SL1 という転写マシナリーを介して転写を活性化することで白血病を引き起こす」という独自に立てた仮説を検証し、MLL キメラによる白血病発症メカニズムを統一的に理解することを目指した。また、これによって AEP や SL1 が MLL 白血病の共通の創薬標的である事を示し、後に続く創薬研究のための論理基盤となる事を目指した。

3. 研究の方法

多様な MLL キメラの不死化に必要な最小機能ドメインの同定 (2019-2021 年度)

それぞれの MLL キメラが造血細胞を白血病化する上で、必要とする最小限のドメイン構造を本研究期間中に明らかにする。マウスの骨髄から未分化な造血細胞を採取し、これに MLL キメラを発現するレトロウイルスを感染させ、半固形培地中で培養する。通常このように培養した造血細胞は、最初は増殖能を持っておりコロニー形成能を示すが、数回継代すると分化してしまい、コロニーを作らなくなる。ところが、MLL キメラを発現させてやることで、延々と増殖するようになり、半年以上継代できるようになる。この事を我々は、MLL キメラが初代培養造血細胞を「不死化する」と表現する。この不死化能は白血病細胞が自己複製能を持っていることを表しており、MLL キメラによる白血病化の重要な性質を反映している。この手法を用いて、我々はこれまでに MLL-AF5Q31 が、標的クロマチンを認識する最小標的認識モジュール (MTM) と AF5Q31 に含まれる AF4 との結合ドメインを介して造血細胞を不死化していることを見出してきた。この知見は MLL-AF5Q31 が不死化する上で、標的クロマチンに AF4 をリクルートすることが必要十分である事を示した。興味深いことに、MLL 部分のドメイン要求性はキメラによって若干異なる。例えば MLL-AF10 は最小標的認識モジュールと AF10 部分の DOT1L 結合ドメインに加えて、MLL 部分の TRX2 ドメインという AF4 結合ドメインを必要とする。この結果は、MLL-AF10 が DOT1L を介して ENL を呼び込み、TRX2 ドメインを介して AF4 を呼び込むことで、近傍クロマチンに AEP を構築し、白血病を引き起こしているという知見を導いた。本研究で我々は期間中に上述の研究手法を用いて、MLL-Af4、MLL-ELL、MLL-AF6、及び MLL-AFX が「造血細胞を不死化する上で必要とする機能ドメイン」を明らかにする。

AF4 をリクルートする THD2 ドメインの機能解析 (2019-2021 年度)

これまでの予備的実験結果から、MLL キメラは TRX2 ドメインを必要とするタイプ (MLL-AF10 キメラ、2 量体形成タイプなど) と THD2 ドメインを必要としないタイプ (MLL-AEP キメラ) に大別される。これは、パートナー部分を介して AEP と直接結合できる MLL キメラは THD2 ドメインを必要としないが、それ以外の MLL キメラは THD2 ドメインを介して AEP をリクルートする事を示唆している。何らかのクロマチン結合因子が THD2 と結合していると予想される。我々はこれまでに fanChIP 法というクロマチンに結合した状態のタンパク質複合体を精製する手法を開発した。本研究で、THD2 ドメインがクロマチン上で形成しているタンパク質複合体を分離精製し、質量分析にてその構成因子を同定する。

多様な MLL キメラが AEP をリクルートすることを示す ChIP-seq 解析 (2020-2021 年度)

多様な MLL キメラが最終的 AEP をリクルートして転写を活性化することを示すために、ゲノムワイドなクロマチン免疫沈降 (ChIP-seq) 解析を行う。我々はこれまでに AEP/SL1 複合体構成因子である AF4、ENL、TAF1C の ChIP-seq 解析に成功している。様々な MLL キメラによって不死化した細胞を用いて ChIP-seq 解析を行い、それぞれの MLL キメラが最終的には AEP を近傍クロマチンにリクルートすることを示す。

4. 研究成果

研究成果

我々はマウスの造血前駆細胞を使った白血病発症モデルを用いて、MLL 変異体タンパク質が白血病を引き起こすために必要とするタンパク質構造を同定した (Takahashi et al. 2021 elife)。MLL 変異体タンパク質はこれまでに 80 種以上が報告されているが、そのうちの多くが THD2 という構造を介して白血病化能を発揮していることがわかった。そこで、その THD2 という構造に結合する共作用タンパク質をアフィニティ精製法及び質量分析法を用いて探索したところ、HB01 タンパク質複合体がこの構造に特異的に結合する事を見出した。クロマチン免疫沈降法を用い

た解析により、MLL 変異体は HBO1 複合体と結合する事で別の遺伝子発現調節因子である AEP 複合体を呼び込み、遺伝子発現を活性化する事が示された (図 1)。実際に MLL タンパク質と HBO1 複合体及び AEP 複合体は様々な細胞株で *MYC* や *HOXA9* 遺伝子の発現を調節する領域に集積している事が観察された。また、MLL 変異体タンパク質と HBO1 複合体の結合を仲介する THD2 構造を欠損させたり、HBO1 複合体構成因子の遺伝子を欠失させると、細胞の無限増殖能が失われる事から、この THD2 と HBO1 複合体のタンパク質間相互作用を阻害する化合物が新たな治療法の開発に繋がる事が示された。

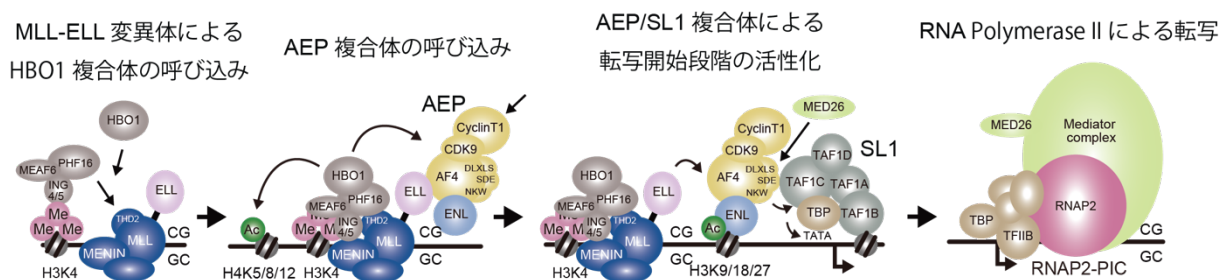


図 1 MLL 変異体が HBO1 複合体と相互作用して白血病を引き起こすメカニズム
MLL-ELL 変異体がまず HBO1 複合体を遺伝子発現調節領域に呼び込み、次に AEP 複合体を呼び込む。AEP 複合体は SL1 複合体と結合し、RNA Polymerase II による転写を活性化する。

MLL キメラの中でも、ELL, AF6, AF10 は THD2 ドメインを必要としており、これを欠失させると白血病発症能が低下する。一方で ENL, AF9 は THD2 が欠損していても強いトランスフォーメーション活性を示すが、THD2 欠損変異体は若干の分化傾向を示した。これらの結果から、HBO1 複合体との結合が MLL キメラの白血病化能に寄与しているが、その要求性は融合パートナーによって異なる事が窺われた。特に、直接 AEP と結合する ENL や AF9 は HBO1 との結合をあまり必要としないが、ELL や AF10 のように、一旦 AEP をリクルートした後にクロマチン上に AEP 複合体をローディングするタイプの融合パートナーは THD2 を必要とする傾向にあった。この結果からは、AEP 複合体のクロマチンへのローディングに HBO1 複合体の機能が重要であることが示唆された。また、MLL-CBP や MLL-p300 のような MLL キメラは近傍ヒストンの H3K18/27 をアセチル化し、そこに ENL タンパク質をリクルートすることで AEP 複合体を呼び込んでいることを示した (Miyamoto et al. 2020 Cell Rep)。これらの知見から MLL キメラはほとんどの場合最終的には AEP を標的クロマチンにリクルートすることで転写を活性化し、白血病発症を誘導すると思われる。従って、当初の仮説通り、多様な MLL キメラは AEP を恒常的にリクルートすることで転写を恒常的に活性化し白血病発症を引き起こすという統一的な分子メカニズムをとると考えられた。また、HBO1 はこの AEP 複合体のクロマチンへのローディングに寄与すると予想された。

今後の展望

本結果は MLL 変異体タンパク質が白血病を引き起こす上で AEP 複合体のリクルート及び HBO1 タンパク質複合体との相互作用を必要とすることを示しており、この AEP の機能や MLL-HBO1 相互作用を阻害する化合物は MLL 関連白血病の新たな治療薬となると思われる。今後はそのような薬剤の開発研究を進めていきたい。

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 1件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Miyamoto R, and Yokoyama A	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for fractionation-assisted native ChIP (fanChIP) to capture protien-protein/DNA interactions on chromatin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100404	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 Nagamachi A, Kanai A, Nakamura M, Okuda H, Yokoyama A, Shinriki S, Matsui H, Inaba T	4. 巻 131(4)
2. 論文標題 Multi-organ failure with abnormal receptor metabolism in mice mimicking Samd9/9L syndromes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e140147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI140147	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 #Miyamoto R, #Okuda H, #Kanai A, Takahashi S, Kawamura T, Matsui H, Kitamura T, Kitabayashi I, Inaba T, *Yokoyama A	4. 巻 32:13
2. 論文標題 Activation of CpG-rich promoters mediated by MLL drives MOZ-rearranged leukemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108200	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 Takeda R, Asada S, Park SJ, Yokoyama A, Becker H, Kanai A, Visconte V, Hershberger C, Hayashi Y, Yonezawa T, Tamura M, Fukushima T, Tanaka Y, Fukuyama T, Matsumoto A, Yamasaki S, Nakai K, Yamazaki S, Inaba T, Shibata T, Inoue D, Honda H, Goyama S, Maciejewski J, Kitamura T.	4. 巻 136(14)
2. 論文標題 HHEX promotes myeloid transformation in cooperation with mutant ASXL1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1670-1684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2019-126663	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 Ochi Y, , , , , , , , Yokoyama A , , , , , , Ogawa S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Combined Cohesin-Runx1 deficiency synergistically perturbs chromatin looping and causes myelodysplastic syndromes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 836-853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2159-8290.CD-19-0982	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 S, *Yokoyama A.	4. 巻 1863(7)
2. 論文標題 The molecular functions of common and atypical MLL fusion protein complexes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BBA - Gene Regulatory Mechanisms	6. 最初と最後の頁 194548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagr.2020.194548	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 Tatsumi G, Kawahara M, Imai T, Nishihata-Asai A, Nishida A, Inatomi O, Yokoyama A, Kakuta Y, Kito K, Andoh A.	4. 巻 34(3)
2. 論文標題 Thiopurine-mediated impairment of hamtopoietic stem and leukemia cells in Nudt15R138C knock-in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 882-894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-019-0583-9	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 -

1. 著者名 Paubelle E, Zylbersztein F, Maciel TT, Carvalho C, Mupo A, Cheok M, Lieben L, Sujobert P, Decroocq J, Yokoyama A, Asnafi V, Macintyre E, Tamburini J, Bardet V, Castaigne S, Preudhomme C, Dombret H, Carmeliet G, Bouscary D, Ginzburg YZ, de The H, Benhamou M, Monteiro RC, Vassiliou GS, Hermine O, Moura IC	4. 巻 30(3)
2. 論文標題 Vitamin D receptor controls cell stemness in acute myeloid leukemia and in normal bone marrow	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 739-754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.12.055	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 Paubelle E, Zylbersztejn F, Maciel TT, Carvalho C, Mupo A, Cheok M, Lieben L, Sujobert P, Decroocq J, Yokoyama A, Asnafi V, Macintyre E, Tamburini J, Bardet V, Castaigne S, Preudhomme C, Dombret H, Carmeliet G, Bouscary D, Ginzburg YZ, de The H, Benhamou M, Monteiro RC, Vassiliou GS, Hermine O, Moura IC	4. 巻 30(3)
2. 論文標題 Vitamin D receptor controls cell stemness in acute myeloid leukemia and in normal bone marrow	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 739-754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.12.055	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 Tatsumi G, Kawahara M, Imai T, Nishihata-Asai A, Nishida A, Inatomi O, Yokoyama A, Kakuta Y, Kito K, Andoh A	4. 巻 34(3)
2. 論文標題 Thiopurine-mediated impairment of hamtopoietic stem and leukemia cells in Nudt15R138C knock-in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 882-894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-019-0583-9	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 横山明彦
2. 発表標題 白血病における遺伝子発現異常の根源的なメカニズム
3. 学会等名 鶴岡カンファレンス2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiko Yokoyama
2. 発表標題 Replication of epigenetic profiles by abnormal transcriptional regulators causes leukemia
3. 学会等名 The 6th Cancer Epigenomics Symposium & Seminar in Hematological Malignancies and Epigenetics (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立がん研究センター・鶴岡連携研究拠点
<https://www.tml.ncc.go.jp>

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	川村 猛 (Kawamura Takeshi) (70306835)	東京大学・アイソトープ総合センター・准教授 (12601)	

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