

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08845

研究課題名（和文）RUNX1による造血幹細胞分化プロセスの解明と新たな分子標的薬の開発

研究課題名（英文）Elucidation of cell differentiation by hematopoietic transcription factor RUNX1 and translation to a novel molecular target strategy

研究代表者

忠垣 憲次郎（TADAGAKI, Kenjiro）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：30416268

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：RUNX1は造血関連転写因子であり白血病発症に関わるが、RUNX1自身の遺伝子発現の分子機構は十分には解明されていない。当研究ではRUNX1遺伝子発現を制御する転写因子の探索を試みたところ6種の新規候補転写因子を特定し、いずれもRUNX1プロモーターを活性化した。このうち5種の強制発現系とsiRNAによるノックダウン系の両者を用いて、RUNX1の遺伝子発現が確かに転写因子依存性であることを細胞レベルで確認した。さらに、このうちの4種で、各転写因子の結合をクロマチン免疫沈降法によって確認した。以上から、これら4種はRUNX1の新規候補転写因子であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RUNX1は造血幹細胞の発生制御、血小板産生やT細胞分化に関わる転写因子であり、白血病発症にも深くかかわる。本研究によって、これまで知られていなかった6つのRUNX1発現に関わる転写因子を新規に特定することに成功した。これら転写因子群とRUNX1との機能協調の詳細な解析が進めば、RUNX1の分子メカニズムの解明へと展開するものと期待される。さらに、RUNX1の発現を細胞外から制御する方法を見出せれば、RUNX1を造血器疾患の新規分子標的療法の開発へも貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：RUNX1 gene acts as a hematopoietic transcription factor and is a frequent target of leukemia-related gene aberrations, however regulation of RUNX1 expression has not been elucidated fully. In this project, we focused on the identification of the novel transcriptional factors for RUNX1 and selected six candidate transcriptional factors which regulated RUNX1 promoter activity detected by luciferase reporter assay. We found that the message level of RUNX1 gene was regulated depending on the five transcriptional factors of the six status in the cell-level experiments. In addition, ChIP assay showed that the four transcriptional factors of six bound to the RUNX1 promoter region. Thus, the four genes of the six candidate transcriptional factors should be the novel transcriptional factors for RUNX1.

研究分野：生化学 分子生物学 腫瘍学 血液学

キーワード：造血幹細胞 転写因子 RUNX1 遺伝子発現制御 プロモーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RUNX1(AML1)遺伝子は急性骨髄性白血病 (AML)における 8;21 染色体転座切断点からクローニングされたものであり、AML 症例全体の 15-20%という高頻度で遺伝子異常の標的となる遺伝子である。この遺伝子は CBF と会合してヘテロ 2 量体を形成するランドメインタンパクをコードし、転写因子複合体として GM-CSF 受容体や M-CSF 受容体など、造血に関わる一連の標的遺伝子群の転写調節に携わることが報告されている。染色体転座によって生じる融合型 RUNX1 は野生型 RUNX1 の機能をトランス・ドミナントに抑制することで血球分化障害を起こし、白血病発症を引き起こすものと考えられている。Runx1 遺伝子破壊マウスの作製から、Runx1 が造血の初期発生において重要な役割を担っていることが明らかにされた。また、Runx1 遺伝子座に生体マーカーを導入したノックインマウス、微細変異導入マウス、そして誘導的遺伝子破壊マウスの解析結果などから、Runx1 が AGM(aorta-gonad-mesonephros)領域から造血幹細胞が生み出される段階で機能していること、そして成体における血小板造血や T 細胞、B 細胞の分化においても重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

以上のように、RUNX1 は正常造血、白血病発症において極めて重要な働きを担っているが、RUNX1 自身の遺伝子発現の制御メカニズムについてはまだ多くの不明な点が残されている。そこで RUNX1 のプロモーターを解析し、RUNX1 自身の発現制御を詳細に理解することは、RUNX1 による造血幹細胞の分化プロセス機構を有機的に解明してゆくうえで極めて重要であると考えた。また、RUNX1 の発現を細胞外から制御する方法を見出せば、RUNX1 を造血器疾患の新規分子標的療法の開発へ利用することができると考えた。

2. 研究の目的

上述した背景のもと、造血制御に関与する RUNX1 のプロモーターを解析し、RUNX1 遺伝子の発現制御に関わる転写因子群を新規に同定する。そして、これら転写因子群と RUNX1 との協調機能を解析するとともに、RUNX1 の造血幹細胞発生制御、血小板産生、そして T 細胞分化に関わる分子機構を細胞レベル、マウス個体レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

RUNX1 遺伝子の発現制御に関わる転写因子群を同定する方法として、以下の 3 通りで検索を行った。

- (1) RUNX ファミリー遺伝子の発現制御に関わる既知の転写因子の中から検索する。
- (2) データベース JASPAR を用いて転写因子を検索する。
- (3) DNA に親和性のある DNA 結合タンパク質を DNA 結合ビーズを用いて分離し、分離した DNA 結合タンパク質を高感度の質量分析計を用いて転写因子を検索する。

細胞培養

HeLa 細胞は 10% fetal bovine serum と 2mmol/L glutamine を添加した DMEM(Wako)で培養した。K562 細胞と Jurkat 細胞は 10% fetal bovine serum と 2mmol/L glutamine を添加した RPMI 1640(Wako)で培養した。各細胞は、37 °C、5%CO₂にて培養した。

ルシフェラーゼアッセイによる転写活性解析

細胞に Lipofectamine2000(Thermo Fisher Scientific)または Nucleofector (LONZA)を用いて、レポータープラスミドと発現プラスミドをトランスフェクションした。24 時間後に細胞抽出液を調整し、Dual-luciferase reporter assay(Promega)を用いて転写活性を測定した。

クロマチン免疫沈降法

K562 細胞または Jurkat 細胞にホルマリン固定を行い、その後細胞から DNA を抽出した。超音波処理により DNA を断片化し、それぞれの転写因子の抗体による免疫沈降を行った。得られた DNA 断片と特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR(Toyobo)を行い、それぞれの転写因子と相互作用している DNA 領域を解析した。

遺伝子発現解析

細胞から Total RNA を ISOGEN II(Nippon gene)により抽出し、SuperScript IV(Thermo Fisher Scientific)を用いて cDNA を精製した。特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR(Toyobo)を行い、各遺伝子の発現を定量化した。

4. 研究成果

(1) 転写因子群の同定

RUNX1 遺伝子の発現制御に関わる新規候補転写因子として、(1)より A,B 遺伝子(A はフォークヘッドボックスタンパク質、B はホメオティック遺伝子)の 2 種、(2)より C,D,E 遺伝子(C と D は Zinc Finger タンパク、E はインターフェロン調節遺伝子)の 3 種、(3)より F 遺伝子 (ヘテロ核

リボ核タンパク質)の1種、計6種を選定することができた。

(2) ルシフェラーゼアッセイによる転写制御解析

6種のうち5種(A,B,C,D,E)の候補転写因子による RUNX1 プロモーター領域(P1 と P2)の転写活性化能をルシフェラーゼアッセイにて検討した。ヒト慢性骨髄性白血病由来 K562 細胞に対し、Nucleofector を用いた電気パルスによりそれぞれの遺伝子発現プラスミドとルシフェラーゼベクターを導入し、24 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、A 遺伝子により P1 と P2 共に転写活性は抑制された。B 遺伝子により P1 と P2 共に転写活性は促進された。C 遺伝子の過剰発現では P1 の転写活性は促進され、P2 は抑制された。D,E 遺伝子の場合、いずれも、P1 と P2 共に転写活性は抑制された。次にヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞と A,B 遺伝子に対し、リポフェクション法によりそれぞれの遺伝子発現プラスミドとルシフェラーゼベクターを導入し、24 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、これら 2 種の遺伝子により P1 と P2 共に転写は活性化されなかった。

(3) クロマチン免疫沈降法による解析

RUNX1 プロモーターP1 領域中に存在するそれぞれの転写因子結合部位付近に候補転写因子が結合しているかを確認するために、クロマチン免疫沈降法を行った。ヒト急性T細胞性白血病細胞由来の Jurkat 細胞に対し、それぞれの抗体(B,C,D,E 遺伝子)で免疫沈降させた DNA 断片を鋳型としてリアルタイム PCR を行い、相対定量比較を行った。その結果、これら 4 種の RUNX1 プロモーターP1 領域への結合を確認することができた。K562 細胞では、C,D,E の 3 種で確認することができた。

(4) 候補転写因子による RUNX1 遺伝子の発現の変化

RUNX1 遺伝子の発現が候補転写因子より制御されているかを確認した。まず、それぞれの候補転写因子(A,B,C,D,E)を強制発現させた K562 細胞及び Jurkat 細胞から Total RNA を ISOGEN II により抽出し、SuperScript IV を用いて cDNA を精製した。特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、RUNX1 遺伝子の発現の相対定量比較を行った。その結果、これらの細胞で A 遺伝子により RUNX1 遺伝子の発現は抑制され、B 遺伝子により RUNX1 遺伝子の発現は促進されていた。C 遺伝子により K562 細胞で RUNX1 遺伝子の発現を促進することが、Jurkat 細胞では抑制することが確認でき、細胞により発現の制御の違いが見られた。D,E 遺伝子の導入では、いずれの細胞においても RUNX1 の発現が抑制されることを確認することができた。

次に、siRNA でそれぞれの転写因子(A,B,C,D,E)をノックダウンさせた Jurkat 細胞から Total RNA を ISOGEN II により抽出し、SuperScript IV を用いて cDNA を精製した。特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、RUNX1 遺伝子の発現の相対定量比較を行った。その結果、A 遺伝子のノックダウンより RUNX1 遺伝子の発現は促進され、B 遺伝子により RUNX1 遺伝子の発現は抑制されていた。C,D,E 遺伝子のノックダウンより RUNX1 遺伝子の発現は促進されることを確認することができた。これらの結果は、強制発現させた場合と反対の結果となり、RUNX1 遺伝子の発現が候補転写因子により制御されていることを示唆すると考えられた。

本研究によって、これまで知られていなかった RUNX1 遺伝子の発現を制御する 6 種の転写因子を新規に特定することに成功した。これは RUNX1 作用の分子メカニズムの理解を一歩進めるものと考えている。今後、これらの候補転写因子の生物作用と RUNX1 との機能協調の詳細解析へと研究が展開するものと期待される。こうした研究によって、RUNX1 による造血の分子メカニズムの詳細解明や RUNX1 を造血器疾患の新規分子標的療法の開発への利用に貢献することが期待される。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshida Tatsushi, Yamasaki Kenta, Tadagaki Kenjiro, Kuwahara Yasumichi, Matsumoto Akifumi, Sofovic Adem, Kondo Noriko, Sakai Toshiyuki, Okuda Tsukasa	4. 巻 60
2. 論文標題 Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand is a novel transcriptional target of runt-related transcription factor 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 6-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2021.5296	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 Matsumoto Akifumi, Yoshida Tatsushi, Shima Takahiro, Yamasaki Kenta, Tadagaki Kenjiro, Kondo Noriko, Kuwahara Yasumichi, Zhang Dong-Er, Okuda Tsukasa	4. 巻 2
2. 論文標題 C11orf21, a novel RUNX1 target gene, is down-regulated by RUNX1-ETO	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BBA Advances	6. 最初と最後の頁 100047 ~ 100047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbadv.2022.100047	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 忠垣憲次郎、山崎健太、近藤則子、柴原康通、吉田達士、奥田司
2. 発表標題 転写因子RUNX1/AML1の新規候補標的遺伝子群の探索
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsushi Yoshida, Kenjiro Tadagaki, Yasumichi Kuwahara, Toshiyuki Sakai, Tsukasa Okuda.
2. 発表標題 Analysis of a novel transcriptional target gene of RUNX1.
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akifumi Matsumoto, Tatsushi Yoshida, Takahiro Shima, Kenta Yamasaki, Kenjiro Tadagaki, Noriko Kondo, Yasumichi Kuwahara, Donger Zhang, Tsukasa Okuda
2. 発表標題 Identification of a novel RUNX1 target by public data re-analysis that is suppressed by RUNX1-ETO.
3. 学会等名 第 8 1 回日本血液学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎健太、忠垣憲次郎、近藤則子、柴原康通、吉田達士、奥田司
2. 発表標題 造血関連転写因子 RUNX1による制御遺伝子の探索
3. 学会等名 第 4 2 回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴原康通、近藤則子、忠垣憲次郎、山崎健太、吉田達士、奥田司
2. 発表標題 クロマチンリモデリング因子研究におけるラブドイド腫瘍細胞株の有用性
3. 学会等名 第 2 4 回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴原康通、家原知子、勝見良樹、土屋邦彦、宮地充、田尻達郎、忠垣憲次郎、吉田達士、奥田司、細井創
2. 発表標題 DNAメチル化プロファイルを用いたラブドイド腫瘍患者の同時多発病変より樹立した新規 2 細胞株の解析
3. 学会等名 第 7 9 回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsushi Yoshida, Kenjiro Tadagaki, Yasumichi Kuwahara, Tsukasa Okuda.
2. 発表標題 A seaweed-derived compound that inhibits growth of acute myeloid leukemia cells.
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田達士、山崎健太、忠垣憲次郎、柴原康通、近藤則子、松本晃典、酒井敏行、奥田司
2. 発表標題 造血制御転写因子 RUNX1 標的遺伝子の解析
3. 学会等名 第11回4大学連携研究フォーラム
4. 発表年 2021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	奥田 司 (OKUDA Tsukasa) (30291587)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	

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