

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22399

研究課題名（和文）白血病エピゲノムを制御するH3K4メチル化酵素の機能的重複の解明

研究課題名（英文）Functional redundancy of H3K4 methyltransferase family on epigenetic regulation in leukemia

研究代表者

星居 孝之（Hoshii, Takayuki）

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：20464042

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：急性骨髄性白血病においてMLL再構成は予後不良因子であり、白血病細胞では遺伝子発現調節に重要なヒストンH3K4メチル化の亢進が報告されている。しかしながら異常の原因となる単一の修飾酵素は同定されておらず、複数の酵素の関与が示唆されている。本研究では酵素活性が重複して制御している可能性とその活性制御を担うKMT2ファミリー酵素に着目し、白血病細胞を用いて酵素活性ドメインの機能的重複性について解析を行った。本研究の結果から、二重変異体において相乗的に白血病の増殖抑制が可能となる組み合わせを同定し、複数の酵素活性ドメインを阻害剤の標的とすることが白血病治療に有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MLL再構成は小児性白血病で高頻度に認められる染色体転座であり、MLL再構成型急性骨髄性白血病は再発率が高く極めて予後が悪い。そのためMLL再構成型白血病の治療薬開発は急務と言える。MLL遺伝子自体がヒストンメチル化酵素であり、この白血病ではヒストンメチル化異常も報告されているが、その分子メカニズムは不明である。本研究結果はその一端を説明するものであり、この分子機構を標的とする治療法開発に有用であると期待される。

研究成果の概要（英文）：MLL-rearrangement (MLL-r) is one of a poor prognostic factor in acute myeloid leukemia (AML). Histone H3K4 methylation, which is important in regulating gene expression, is increased in this type of leukemia cells. However, no single modifying enzyme for H3K4me has been identified and this suggests that the involvement of multiple enzymes. In this study, we identified the dependency against enzymatic domains on KMT2 family proteins in both human and mouse leukemia cell lines, then analyzed the possibility of overlapping regulation of enzymatic activity on KMT2 family proteins in MLL-r AML cells. The results of this study suggest that targeting multiple enzymatic activity on KMT2 family proteins may produce a synergistic effect on cell growth suppression and will provide a new therapeutic tool for cancer therapy.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピゲノム 白血病 重複性 酵素ドメイン H3K4メチル化

1. 研究開始当初の背景

KMT2A (MLL1) の染色体転座を原因とする MLL 再構成型 (MLL-r) 白血病では、異常なヒストン H3K4 メチル化が観察されることから、片アレル上の野性型 KMT2A や他の KMT2 ファミリー分子 (KMT2B-G) がエピゲノム異常の誘導に関わると予想されてきた。しかしながら、個別の遺伝子破壊からは、H3K4 メチル化異常の明らかな原因分子の同定には至っていない (Thiel A, et al., Cancer Cell, 2010; Chen C, et al., Cancer Cell, 2014; Santos MA, et al., Nature, 2014)。近年、ダブルノックアウトマウスを利用した研究やメチル化酵素ドメインの生化学的研究から、H3K4 メチル化酵素はそれぞれ重複した機能を持つことが示唆されている (Chen Y, et al., Cancer Cell, 2017)。しかしながら、全ての酵素活性の重複の組み合わせを機能的に評価するには、より効率的なセルベースの評価系の確立が必要である。

2. 研究の目的

近年、CRISPR/Cas9 技術を利用した蛋白ドメイン解析技術の開発により、蛋白内の特定のドメインの機能を簡便に解析することが可能となった (Shi J et al., Nat Biotechnol, 2015)。申請者はこの CRISPR/Cas9 技術を活用し、KMT2F の機能ドメインと p53 の関係を解析することに成功している (Hoshii T 「申請者」 et al., Cell, 2018)。KMT2F (SETD1A) 欠損白血病細胞を用いた解析から KMT2F 蛋白は非常に重要な働きを持つが、H3K4 メチル化酵素活性は不要であるとの興味深い結果を得た。このことから KMT2F 欠損下においては、他の KMT2 ファミリー酵素が H3K4 メチル化活性を機能的に代償している可能性が強く示唆されたが、その実態は明らかではなかった。本研究では CRISPR/Cas9 技術により、白血病細胞の H3K4 メチル化制御を介した増殖制御に必要となる KMT2 ファミリー分子の重複の組み合わせを機能的に評価することを目的として研究計画を立案し、実験を行った。

3. 研究の方法

我々は安定的に Cas9 を高発現する、マウス MLL-r 白血病細胞株 (MLL-AF9, MLL-AF9/NrasG12D, MLL-AF9/FLT3-ITD) ヒト MLL-r 白血病細胞株 (MOLM-13, MV4-11) 非 MLL-r ヒト白血病細胞株 (U937, K562) 固形腫瘍細胞株を樹立済みである。まずは個々の KMT2 ファミリー分子の機能性領域を標的とする sgRNA ライブラリーを作製し、様々な細胞株を用いて KMT2 ファミリー分子の役割を解析した。またスクリーニングから重複する機能が示唆されたメチル化酵素の酵素活性ドメインを標的とする sgRNA を抽出し、それぞれを異なる標識を持つ発現ベクターに導入した後、二つの sgRNA を細胞内で発現させて、その組み合わせによる影響について評価した。増殖において影響の認められた組み合わせについて、その詳細についてさらに解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 5つの KMT2 ファミリーの既知の蛋白ドメインに加え、機能未知であるが進化的に保存性の高いドメイン様構造を選択し、ヒト sgRNA ライブラリーを設計した。sgRNA 発現カセットは GFP 発現ベクターに挿入した。樹立済み Cas9 発現白血病細胞株にレンチウイルスシステムで sgRNA 発現ベクターを導入し、GFP 陽性細胞の増殖を Flow cytometer で解析した。その結果 2 種類のヒト MLL-r 白血病細胞株 (MOLM-13, MV4-11) は非常に類似した結果を示し、KMT2B と KMT2D のメチル化酵素活性ドメインに高い依存性を示した (図 1A)。一方で非 MLL-r ヒト白血病細胞株 U937 では KMT2B と KMT2D に対する依存性は観察されず、KMT2A 変異細胞特異的な KMT2B/D の機能が明らかとなり、KMT2B と KMT2D は KMT2A と機能的重複を持つことが示唆された (図 1B)。KMT2A と KMT2B の機能的重複については過去の報告とも矛盾のない結果であり、本研究のスクリーニング系により得られる結果が正しいものであることを支持する。さらに

KMT2F の sgRNA のいくつかにおいて高い細胞毒性が認められ、メチル化酵素活性ドメインとは関係しないことから、我々のこれまでの研究結果とも一致した (Hoshii T et al. Cell, 2018)。本ドメインの機能は異なる型の白血病細胞株間においても保存されていることは証明済であるが、本スクリーニングでも細胞株間で大きな違いはなく、より一般的な機構として白血病の生存/増殖に寄与していることが示唆された。

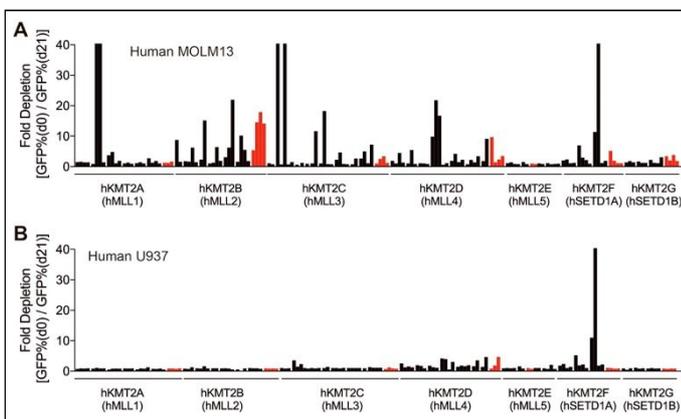


図 1. ヒト白血病細胞株を用いた KMT2 ファミリーの機能性領域を標的とする CRISPR スクリーニングの結果. (A) MLL-r 型 MOLM-13 細胞株の結果 (B) 非 MLL-r 型 U937 細胞株の結果

(2) 次にマウス MLL-r 白血病細胞株の KMT2 ファミリーメンバーを標的とするため、マウス sgRNA ライブラリーを新たに設計し、ヒト白血病細胞株の実験と同様に GFP 陽性細胞の増殖を解析した。本研究では MLL-AF9 融合遺伝子をマウス正常造血幹細胞 / 前駆細胞集団に遺伝子導入し、レシピエントマウスに移植して白血病マウスモデルを樹立した後に、骨髄由来白血病細胞を単離し、Cas9 遺伝子を再導入して Cas9 発現 MLL-r 白血病細胞株を樹立した。MLL-r 白血病患者の約 3 割では Ras シグナル経路の恒常的な活性化変異が同定されており、悪性度が高いことが報告されている。より臨床に近い MLL-r 白血病モデルとして、変異型 Nras (NrasG12D) を同時に発現する RN2 細胞 (MLL-AF9/NrasG12D) が研究に活用されていることから、RN2 細胞についてもスクリーニングを実施した。まず MLL-AF9 細胞でスクリーニングを実施した結果、ヒト MLL-r 白血病細胞株と同様に KMT2B、KMT2D、KMT2F への高い依存性が同定された(図 2A)。KMT2B と KMT2D のメチル化酵素活性ドメインが機能的に重要である点も共通しており、本マウス白血病モデルがヒト白血病細胞株と類似した KMT2 ファミリー依存性を持つことが明らかとなった。一方で RN2

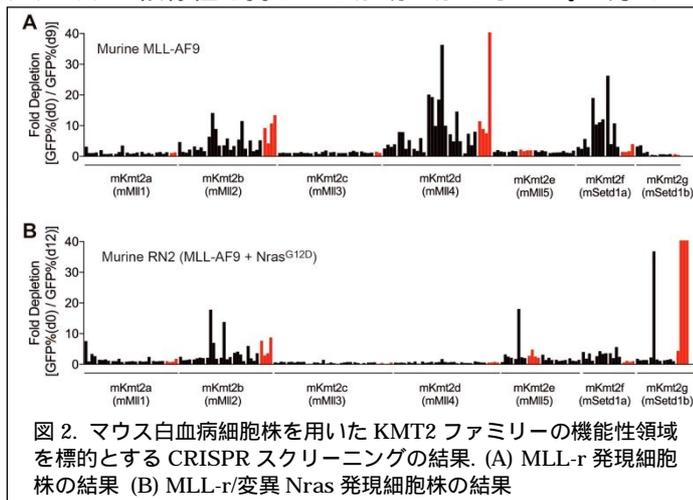


図 2. マウス白血病細胞株を用いた KMT2 ファミリーの機能性領域を標的とする CRISPR スクリーニングの結果. (A) MLL-r 発現細胞株の結果 (B) MLL-r/変異 Nras 発現細胞株の結果

細胞の結果では KMT2B/KMT2F の依存性は保持されているものの、KMT2D への依存性が大きく減少した(図 2B)。さらに RN2 細胞に特徴的な結果として、KMT2G を標的とする sgRNA への高い感受性が明らかとなった。KMT2G を標的とする sgRNA の中でもメチル化酵素活性ドメイン内の異なる領域を標的とする sgRNA の全てが高い細胞毒性を示したことから、KMT2G によるヒストンメチル化は白血病細胞の増殖に極めて重要と考えられた。更に類縁の MLL-AF9 細胞では認められない現象であることから、KMT2G は機能的な重複性を持つ酵素であることが強く示唆された。

(3) 異なる白血病細胞株を用いた個別の sgRNA によるスクリーニング結果から、類似したマウス MLL-r 白血病モデルにおいても KMT2D と KMT2G の依存性が遺伝的背景などにより大きく変動することが明らかとなった。これらのメチル化酵素と重複して機能するメチル化酵素を探索するため、マルチ sgRNA ベクターを用いた機能解析を実施した。具体的にはスクリーニングの際に使用したメチル化酵素活性ドメインを標的とする sgRNA 発現力セットを GFP 発現ベクターと同様に RFP 発現ベクターにも導入し、2 種類の異なる sgRNA を発現する MLL-AF9 細胞の増殖を観察し、相乗的な効果について解析を行った(図 3A)。その結果、KMT2G の SET ドメインを標的とする sgRNA と組み合わせることにより細胞毒性を示すものとして、KMT2F の SET ドメイン標的の sgRNA が同定された。MLL-AF9 細胞では KMT2F と KMT2G のメチル化酵素活性ドメインをそれぞれ単独で sgRNA により標的とした際には明らかな表現型は観察されなかったが、二つの sgRNA を組み合わせた場合に高い細胞毒性効果が認められた。次に RAS 活性型細胞においても SET ドメイン標的の sgRNA による更なる相乗効果が認められるかを検証した。RN2 細胞は樹立過程が異なり MLL-AF9 細胞との遺伝的背景の違いなどによる影響を排除出来ないため、KMT2G が元来不要な MLL-AF9/Cas9 細胞に RAS 活性化を誘導する FLT3-ITD 遺伝子を導入し、MLL-F9/FLT3-ITD 細胞を樹立した。この MLL-AF9/FLT3-ITD 細胞をマルチベクターにより解析した結果、KMT2G への依存性は認められたものの、KMT2F の SET sgRNA が KMT2G の SET sgRNA の効果をより増強することが確認された(図 3B)。ヒト MLL-r 型白血病細胞株 MV4-11 を用いた検証においても、KMT2F と KMT2G の sgRNA は協調的に細胞毒性を示すことが確認され、ヒト白血病細胞株においても KMT2F と KMT2G の共役が示唆された(図 3C)。以上の結果から、KMT2F と KMT2G は構造的相同性に加え、機能的にも重複することが明らかとなり、ファミリー分子間の機能的選択が RAS などのがん遺伝子によって制御されていることが示唆された。

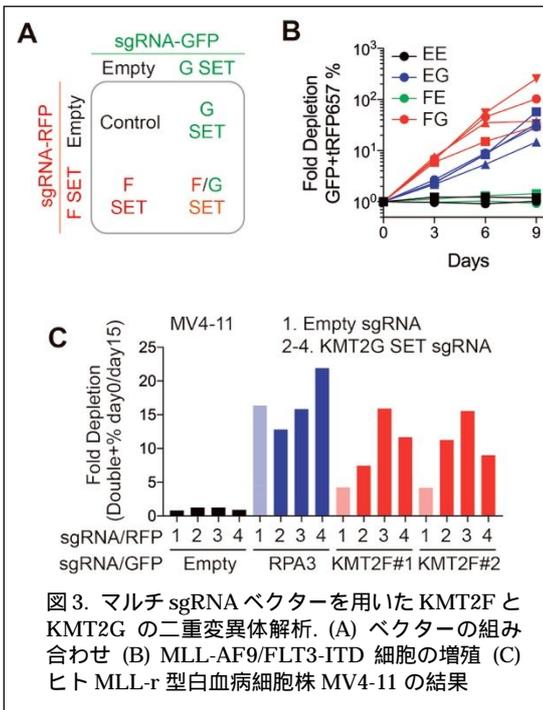


図 3. マルチ sgRNA ベクターを用いた KMT2F と KMT2G の二重変異体解析. (A) ベクターの組み合わせ (B) MLL-AF9/FLT3-ITD 細胞の増殖 (C) ヒト MLL-r 型白血病細胞株 MV4-11 の結果

(4) これまでのデータから KMT2F と KMT2G を同時に抑制することによって、より効果的な白血

病細胞の増殖抑制が可能であることが示唆された。二つの異なる分子の下流では、共通した下流分子が制御されているのか、それとも全く新規の下流標的が影響を受けているのかは不明である。遺伝子プロファイルから標的となる分子群を探索するため、sgRNA を発現する MLL-AF9/FLT3-ITD 細胞を用いて RNA-seq 解析を実施した。コントロール群(空ベクター発現細胞)と比較して、KMT2F SET sgRNA 発現細胞では 9 種の遺伝子が、KMT2G SET sgRNA 発現細胞では 179 の遺伝子の発現低下が観察された。興味深いことに発現変動を示す遺伝子はほとんど重複しておらず、それぞれが別の遺伝子群を制御していることが示された(図 4A)。一方で KMT2F と KMT2G を同時に抑制した二重変異体では、単独でそれぞれ減少した計 177 の因子を超える 292 因子の新たな減少が見出された(図 4A)。本実験で同定された 292 因子について Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)を行った結果、EGFR 経路や E2F 経路に関わる因子の発現低下が認められた(図 4B)。さらに個別の遺伝子プロファイルを用いて解析を行った結果から、KMT2F の単独抑制では有意でないが E2F 経路の抑制傾向が認められた(図 4C)。このような E2F 経路に対する効果は KMT2G の単独抑制では認められなかったが、KMT2G の抑制下では MYC 経路の著しい抑制が見出された(図 4D)。MYC の抑制に関しては二重変異体においても変化は認められなかったことから、KMT2G-MYC 経路に KMT2F は関与しないと考えられる。一方で二重変異体では MYC 経路に加え、E2F 経路に関する遺伝子群が有意に減少しており、その相乗効果により著しい増殖能の低下が誘導されたと考えられる(図 4E)。MYC と E2F は共に細胞周期の S 期進行に必須の転写因子であり、KMT2F と KMT2G はそれぞれが独自の下流標的を持ちながらも、一部は重複する形で、共役的に白血病細胞を含むがん細胞の増殖を制御していることが明らかとなった。また重要な知見として、これらの機能がヒストンメチル化酵素活性ドメインに依存していることを証明した。

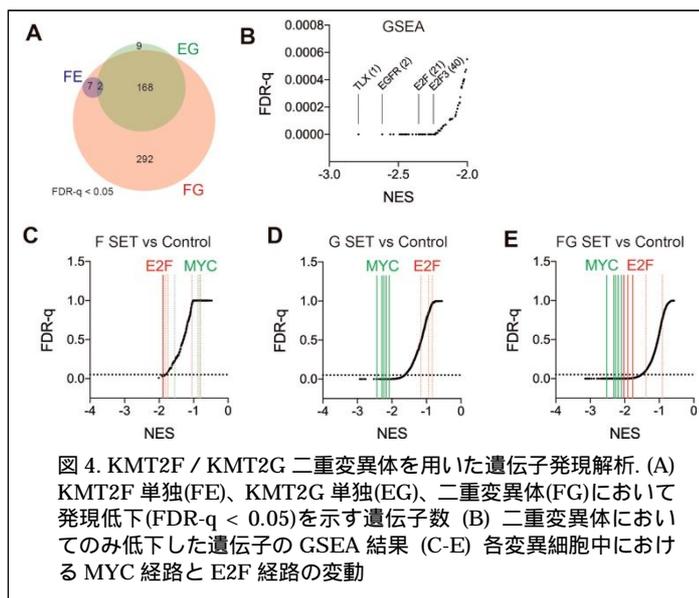


図 4. KMT2F / KMT2G 二重変異体を用いた遺伝子発現解析. (A) KMT2F 単独(FE)、KMT2G 単独(EG)、二重変異体(FG)において発現低下(FDR-q < 0.05)を示す遺伝子数 (B) 二重変異体においてのみ低下した遺伝子の GSEA 結果 (C-E) 各変異細胞中における MYC 経路と E2F 経路の変動

(5) 考察: 本研究では CRISPR/Cas9 技術により、白血病細胞の増殖制御に必要となる KMT2 ファミリー分子の機能的重複について解析した。その結果から、KMT2F と KMT2G の SET ドメインの機能抑制が MLL-r 白血病細胞の増殖抑制に相乗的效果を示すことが明らかとなった。RNA-seq 法による遺伝子発現解析から二重変異体では MYC 経路と E2F 経路の両者が抑制されており、細胞周期の進行が阻害されていることが示された。一方で他の KMT2 ファミリー間での重複する作用についてはまだ解析の余地が残った。今回は KMT2F と KMT2G の組み合わせに加えて、KMT2B-KMT2G、KMT2D-KMT2G 間などについても解析を行ったが、明らかな二重変異体による相乗効果は観察されなかった。マルチベクターを活用した方法は高い再現性があったもののスループット性の拡張が困難であり、様々な細胞株を使って網羅的にスクリーニングを行うことは困難であったことから、今後の技術開発が課題である。CRISPR/Cas9 技術を活用した機能解析はタンパクドメイン構造の解析に加えて、転写制御エレメントの機能解析にも重要である。我々はがん細胞で活性化されるエンハンサー領域の機能解析にも CRISPR/Cas9 システムを応用しており、複数の標的部位の複合的な機能解析は今後益々必要性が増加すると予想される (Okabe A et al., Nature Genetics, 2020)。本研究から得られた機能的重複性についてさらに詳細な解析を行い、下流標的のエピゲノム状態の変化などについても引き続き解析を実施する予定である。KMT2F と KMT2G は類似した蛋白構造を持っており、進化的にもよく保存された SET ドメインを持つタンパク質である。KMT2F と KMT2G を区別することなく標的とする阻害剤はがん細胞への特異性の点では懸念材料が残るものの、盛んに増殖するがん細胞に効果的な治療法になることが示唆されることから、引き続き解析を実施する計画である。

< 引用文献 >

MLL-AF9-induced leukemogenesis requires coexpression of the wild-type Mll allele. Thiel AT, Blessington P, Zou T, Feather D, Wu X, Yan J, Zhang H, Liu Z, Ernst P, Koretzky GA, Hua X. Cancer Cell. 2010 Feb 17;17(2):148-59. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.034.

MLL3 is a haploinsufficient 7q tumor suppressor in acute myeloid leukemia.

Chen C, Liu Y, Rappaport AR, Kitzing T, Schultz N, Zhao Z, Shroff AS, Dickins RA, Vakoc CR, Bradner JE, Stock W, LeBeau MM, Shannon KM, Kogan S, Zuber J, Lowe SW. Cancer Cell. 2014 May 12;25(5):652-65. doi: 10.1016/j.ccr.2014.03.016. Epub 2014 May 1.

DNA-damage-induced differentiation of leukaemic cells as an anti-cancer barrier. Santos MA, Faryabi RB, Ergen AV, Day AM, Malhowski A, Canela A, Onozawa M, Lee JE, Callen E, Gutierrez-Martinez P, Chen HT, Wong N, Finkel N, Deshpande A, Sharrow S, Rossi DJ, Ito K, Ge K, Aplan PD, Armstrong SA, Nussenzweig A. Nature. 2014 Oct 2;514(7520):107-11. doi: 10.1038/nature13483. Epub 2014 Jul 27.

MLL2, Not MLL1, Plays a Major Role in Sustaining MLL-Rearranged Acute Myeloid Leukemia. Chen Y, Anastassiadis K, Kranz A, Stewart AF, Arndt K, Waskow C, Yokoyama A, Jones K, Neff T, Lee Y, Ernst P. Cancer Cell. 2017 Jun 12;31(6):755-770.e6. doi: 10.1016/j.ccell.2017.05.002.

Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. Shi J, Wang E, Milazzo JP, Wang Z, Kinney JB, Vakoc CR. Nat Biotechnol. 2015 Jun;33(6):661-7. doi: 10.1038/nbt.3235. Epub 2015 May 11.

A Non-catalytic Function of SETD1A Regulates Cyclin K and the DNA Damage Response. Hoshii T, Cifani P, Feng Z, Huang CH, Koche R, Chen CW, Delaney CD, Lowe SW, Kentsis A, Armstrong SA. Cell. 2018 Feb 22;172(5):1007-1021.e17. doi: 10.1016/j.cell.2018.01.032.

Cross-species chromatin interactions drive transcriptional rewiring in Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma. Okabe A, Huang KK, Matsusaka K, Fukuyo M, Xing M, Ong X, Hoshii T, Usui G, Seki M, Mano Y, Rahmutulla B, Kanda T, Suzuki T, Rha SY, Ushiku T, Fukayama M, Tan P, Kaneda A. Nat Genet. 2020 Sep;52(9):919-930. doi: 10.1038/s41588-020-0665-7. Epub 2020 Jul 27.

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okabe Atsushi, Huang Kie Kyon, Matsusaka Keisuke, Fukuyo Masaki, Xing Manjie, Ong Xuewen, Hoshii Takayuki, Usui Genki, Seki Motoaki, Mano Yasunobu, Rahmutulla Bahityar, Kanda Teru, Suzuki Takayoshi, Rha Sun Young, Ushiku Tetsuo, Fukayama Masashi, Tan Patrick, Kaneda Atsushi	4. 巻 52
2. 論文標題 Cross-species chromatin interactions drive transcriptional rewiring in Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 919 ~ 930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-020-0665-7	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

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星居孝之
2. 発表標題 H3K4メチル基転移酵素の触媒作用非依存的な転写制御
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星居孝之
2. 発表標題 Targeting of a non-catalytic function of H3K4 methyltransferase SETD1A in leukemia
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星居孝之
2. 発表標題 H3K4メチル化酵素の触媒活性非依存的な転写調節による白血病細胞の増殖制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星居孝之
2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素SETD1Aによるミトコンドリアの機能制御
3. 学会等名 鶴岡カンファレンス2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星居孝之
2. 発表標題 新規H3K4メチル化複合体による細胞周期に伴うDNA損傷応答機構の制御
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会
4. 発表年 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
研究分担者	金田 篤志 (Kaneda Atsushi) (10313024)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

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