

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：84503

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03717

研究課題名(和文)新規SWI/SNF複合体の機能喪失に基づくMDS発症機構の解明と治療応用

研究課題名(英文)Elucidation of MDS pathogenesis based on understanding the roles of newly identified SWI/SNF complex

研究代表者

井上 大地(Inoue, Daichi)

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・研究員(副センター長・部長クラス)

研究者番号：80735746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：がんにおいてDNA変異に加えてRNAレベルでの転写後制御機構が注目されている。中でも、RNAスプライシング関連遺伝子変異が骨髄異形成症候群(MDS)の約半数で同定されるなど、腫瘍細胞特異的なRNA制御異常も想定されるが、その理解は不十分であった。本研究では、クロマチンリモデリングに関わる新規SWI/SNF複合体に不可欠な構成因子BRD9ががん細胞内でスプライシング異常によって消失する現象に着眼した。主にノックアウトマウスを用いて、造血幹細胞におけるBRD9の役割を中心に解明し、BRD9のスプライシング異常がどのように幹細胞の運命制御を規定しているのか、クロマチン制御の点から明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はゲノム変異を認めないBRD9遺伝子が転写後RNAレベルでの制御破綻によって機能喪失をきたし、それに伴うクロマチン状態の改変が造血幹細胞の新たな運命制御を示唆する知見と言える。このように、がんにおいては、DNAレベルの異常を伴わなくとも、他の重要な遺伝子の転写を脱制御するような現象が転写制御因子のRNAレベルで起こりうることを実験的に証明した成果と言え、今後の病態理解や治療応用につながる内容と言える。

研究成果の概要(英文)：Beyond DNA mutations, post-transcriptional regulatory mechanisms at the RNA level are gaining significant attention in cancer research. Notably, tumor cell-specific RNA dysregulation is emerging as a critical area of investigation, particularly given that RNA splicing-related gene mutations have been identified in approximately half of myelodysplastic syndromes (MDS). Despite this, the understanding of such dysregulation remains limited. In this study, we investigated the phenomenon wherein BRD9, a vital component of the novel SWI/SNF complex responsible for chromatin remodeling, is frequently lost in cancer cells due to the aberrant splicing. Utilizing knockout mice as our primary model, we concentrated on elucidating the role of BRD9 in hematopoietic stem cells (HSCs). Our research uncovered how aberrant splicing of BRD9 affects the cell fate of HSCs through the chromatin regulation.

研究分野：血液内科学

キーワード：BRD9 造血幹細胞 SWI/SNF複合体 クロマチンリモデリング CTCF RNAスプライシング

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群（MDS, Myelodysplastic syndrome）は高齢者に多い血液がんであり、クローン性造血、エピゲノム・スプライシング異常、DNA ダメージなどによる多因子性難病である。細胞死の亢進、無効造血、白血病への進展などを特徴とする。半数の症例で *SF3B1*、*SRSR2*、*U2AF1* などのスプライシングを司る遺伝子の変異が同定されており、それらは相互排他的である<sup>1)</sup>。中でも *SF3B1* 変異は環状鉄芽球（RS）を有する MDS の 70% 近くで認められるだけでなく、慢性リンパ性白血病、悪性黒色腫、乳がん、膵臓がんなどがん種をまたいで最も高頻度に報告されているが<sup>2-3)</sup>、*SF3B1* 変異などがもたらす RNA スプライシング異常がどのように発がんに寄与するかは長い間の謎であった。

スプライシング制御異常がもたらす新たな転写産物の多くは Nonsense-mediated mRNA decay（NMD）により分解される。我々のこれまでの研究により、がん横断的な大規模な患者 mRNA の解析と機能的 CRISPR スクリーニングの結果から、疾患発症とバイオマーカー両面から極めて重要な NMD 標的遺伝子の存在を明らかにしてきた。中でも *SF3B1* の変異により、クロマチン制御因子 *BRD9* のスプライシング異常を介した mRNA レベルでの分解機構が腫瘍化に必須であることを報告した<sup>4)</sup>。*SF3B1* 変異を有するあらゆる腫瘍細胞で、*BRD9* 遺伝子上のイントロン 14 配列内のエキソン化を介して *BRD9* の分解を誘導していた。この結果、転写産物は NMD 機序により分解され、*BRD9* 自体のゲノム変異を認めることなく *BRD9* の機能が喪失し、発癌を誘導することをこれまでに明らかとした。これらの研究成果は、遺伝子変異を起点にスプライシング制御とエピゲノム制御がリンクするという新しいがんの病態を示唆しているものの<sup>4)</sup>、*BRD9* の役割については未解明のままであった。

*BRD9* のように、アセチル化されたリジンのリーダータンパクとして知られるプロモドメインファミリー分子は 40 種類以上知られており、ヒストンマークを介した転写因子複合体やクロマチンリモデリング因子のリクルートメントを行なっている。BET ファミリーに属するプロモドメインファミリー分子 *BRD4* は転写伸長や MYC 誘導に寄与し、広く創薬対象として開発が進んでいる。一方、本研究で注目する *BRD9* は単一のプロモドメイン（BD, Bromodomain）と機能不明ドメイン（DUF, Domain of Unknown Function）を有しているが、その詳細な分子基盤は全く明らかになっていない。*BRD9* はゲノムレベルで遺伝子変異を認められないものの、スプライシング異常によって発現量が著減すること、そして近年同定された新規 SWI/SNF クロマチン制御蛋白複合体（non canonical BAF complex, ncBAF）<sup>5)</sup> に必須の構成因子であることを我々の報告において明らかにしてきた。しかし、「遺伝情報の新たな脆弱性」とも言える *BRD9* の RNA レベルでの制御異常が、幹細胞レベルでの運命をどのように変化させているのか、その理解は不十分なままである。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、造血幹細胞における *BRD9* の生物学的役割や ncBAF、他のクロマチン制御因子との連携がどのように行われ、運命制御が決定されているのかについて、生体モデルを作成し、その詳細なメカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

マウス *Brd9* 遺伝子を条件的にノックアウト (KO) するべく、BD に対応するエクソン 4-6 を flox 配列で挟み、*Brd9*<sup>fl/fl</sup> マウスを作出した。Mx1-Cre マウスと交配することで、Mx1-Cre; *Brd9*<sup>fl/fl</sup> モデルを作出し、pIpC 投与下で時間依存的・誘導的かつ造血細胞特異的に *Brd9* をノックアウトできる生体モデルを確立した。同モデルの造血幹前駆細胞を用いたフローサイメトリ解析、骨髄移植モデルを用いた造血再構築能の評価、RNA/ATAC/ChIP-seq/HiC 解析を用いたマルチオミックス解析、単一細胞レベルでの発現解析 single cell RNA-seq (scRNA-seq) を行った。

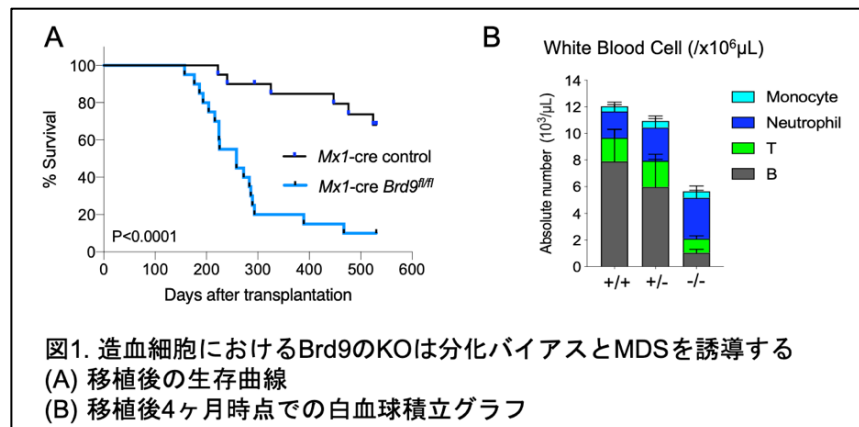
### 4. 研究成果

プロモドメインをコードするマウス *Brd9* 遺伝子エクソン 4-6 を標的として、造血細胞特異的かつ時間依存的な Mx1-Cre/LoxP システムを用いた条件的 KO モデルを確立した。プライマリーKO マウスの解析では、コントロールと比べて長期造血幹細胞の質的量的低下、B 細胞系列への分化阻害、ミエロイド系列への顕著なスキューイングが確認された。

また、致命的放射線を照射したレシピエントマウスに対する非競合的骨髄移植実験においても、KO 骨髄細胞を移植した群では、B 細胞を中心とする血球減少、ミエロイド分化シフト、形態異常を呈しヒト骨髄異形成症候群 (MDS) に合致する結果が得られ (図 1)、それらは造血細胞自律的な作用であることが裏付けられた。B 細胞分化は proB 細胞以降で顕著に阻害され、IL-7 を用いた半固形培地上でも proB コロニーは皆無であった。さらに、ドナー細胞として正常骨髄と 1:1 で混合し、致命的放射線を照射したレシピエントマウスに対する競合的骨髄移植実験においても、末梢血 B 細胞中の顕著な KO 由来キメリズム低下を認めたものの、ミエロイド細胞での影響は軽微であり相対的な分化シフトが確認された。

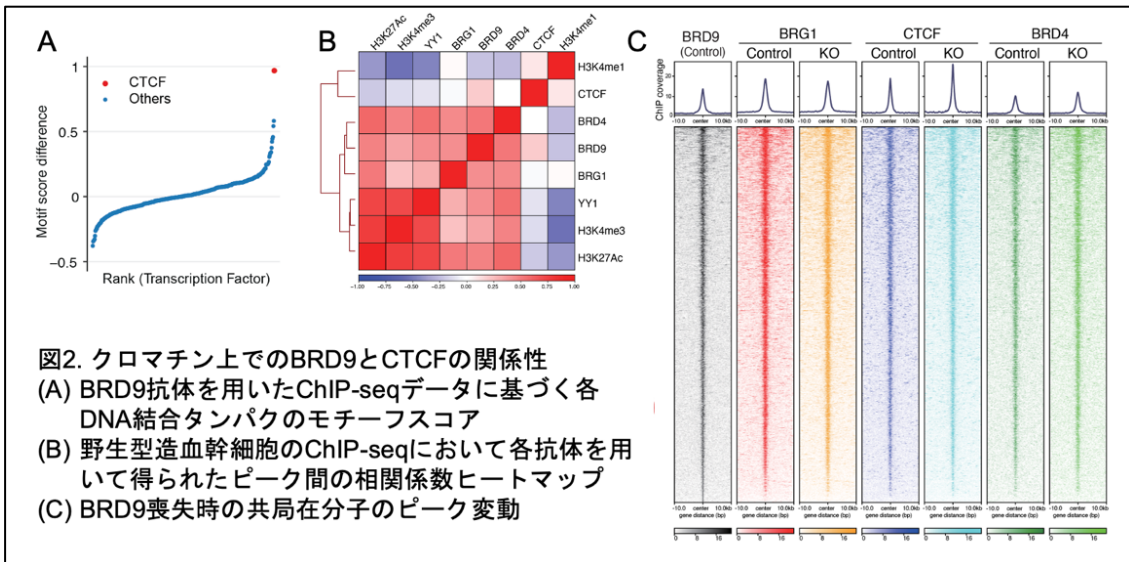
次にプライマリーKO マウスの造血幹細胞のバルク RNA-seq を行い、BRD9 が制御するパスウェイについて検討を行った。従来の報告の通り、MYC 経路の低下が確認された他、酸化リン酸化の低下、B 細胞分化関連因子の低下、リボソーム合成系の低下が確認された。一方、ミエロイド系列の分化は顕著な亢進を認めていた。造血幹前駆細胞を用いて、単一細胞レベルでの scRNA-seq、各種ヒストン修飾抗体・転写因子による ChIP-seq、クロマチン 3 次元構造を対象とした HiC、オープンクロマチンを評価する ATAC-seq を行い、BRD9 の喪失がもたらす造血幹細胞の運命制御について統合的な解析を試みた。予想通り、B 細胞分化のプログラムが多能性前駆細胞のレベルで抑制され、ミエロイド系列への分化を促進する

転写因子のエンリッチメントやパスウェイの亢進が認められた。他に、ヘム合成系の低下、ミトコンドリア膜電位の低下など加齢性造血に合致する所見が得られた。興味深いことに、



BRD9 の喪失は遺伝子発現を亢進させる傾向にありスーパーエンハンサー部位でのオープンクロマチンの亢進を誘導することを明らかとなった。

ChIP-seq の結果から BRD9 は、ncBAF を構成する ATPase である BRG1 はもちろん、クロマチンの区画化に不可欠な CTCF や、プロモドメインファミリー分子である BRD4 とゲノム上で有意に共局在することが明らかになった。特に CTCF との相関は、すべての DNA 結合タンパクとのモチーフとシミュレーションを行っても、顕著な共局在が確認された (図 2)。実際、ゲノム上での BRD9 の分布は CTCF 部位とプロモーター領域で 70% を占めていた。BRD9 喪失時の変動を見ると、BRD4 や BRG1 のピークは変化せず、CTCF のみピークの亢進が認められた (図 2)。BRD9 は CTCF の発現を直接制御しないものの、CTCF と直接



結合することも明らかになった。CTCF ピークが亢進する箇所を詳細に検討すると、野生型条件で CTCF が弱く結合する部位で顕著であり、それらがプロモーター部位で生じると有意に遺伝子発現の亢進が認められた。また、同部位では、H3K4me3 や H3K27Ac などの活性化型ヒストンマークの上昇が認められ、Gene Ontology エンリッチメント解析では好中球分化に関連したオントロジーが最上位に検出された。これらの現象は、KO マウスでの知見に加えて、PROTAC 技術による蛋白レベルでの BRD9 喪失後、短時間で生じていたことから、BRD9 による直接的な制御機構の存在が示唆された。とりわけ、ミエロイド分化に関連した遺伝子では、BRD9 の喪失によってプロモーター・エンハンサーループを介して発現を促進していると予想された (図 3)。

ここまで、正常造血において BRD9 を欠失したモデル、およびその帰結について検討を重ねてきたが、ミエロイド分化プログラムの更新は BRD9 喪失後に短時間で生じることから、急性骨髄性白血病 (AML) モデルにおける KO の影響について考察した。本研究では、ヒト AML モデルとして汎用されている *MLL-AF9* cDNA をレトロウイルスで導入して形質転換させ、骨髄移植によって発症させるモデルを用いて検証した。興味深いことに、*Brd9* は AML の発症および維持双方において不可欠であり、KO した造血幹細胞に *MLL-AF9* を導入しても AML を発症させることができず、また AML 発症後に KO が成功した個体においては長期生存を認めた (図 4)。これらに一致して、KO 個体では成熟ミエロイド細胞への分化を強力に促進しており、ATAC-seq によってクロマチン変化を検討すると、KO によってグローバルなオープンクロマチンを認め、同部位のモチーフ解析では CTCF および CTCFL (BORIS) がトップモチーフとして検出された。すなわち、正常造血と同様に、BRD9/CTCF

部位のクロマチンがオープンとなることがミエロイド分化において重要な鍵となっていることを見出した。

最後に、治療応用に関して、アンチセンスオリゴを用いて *BRD9* の転写後制御を正常化し NMD を阻害する治療戦略についても考察を行った。*SF3B1* 変異により *BRD9* のスプライシング異常を有するヒト MEL202 細胞の皮下移植モデルにおいて、アンチセンスオリゴの局所投与により腫瘍の縮小効果を認めた。また、全く別の観点から、*BRD9* スプライシング異常を利用した合成致死について全遺伝子を対象とした CRISPR スクリーニングを行い、SWI/SNF 複合体の構成因子だけでなく、代謝酵素やシグナル分子を候補遺伝子として同定し、生体モデルにおける標的妥当性の検証を重ねている。これらの成果の多くについては、代表研究者を責任著者として、*Nature Communications* 誌に掲載し、オープンアクセスとして広く公開されている (doi: 10.1038/s41467-023-44081-6)。

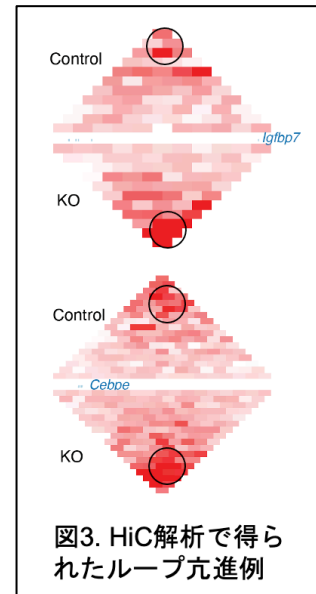


図3. HiC解析で得られたループ亢進例

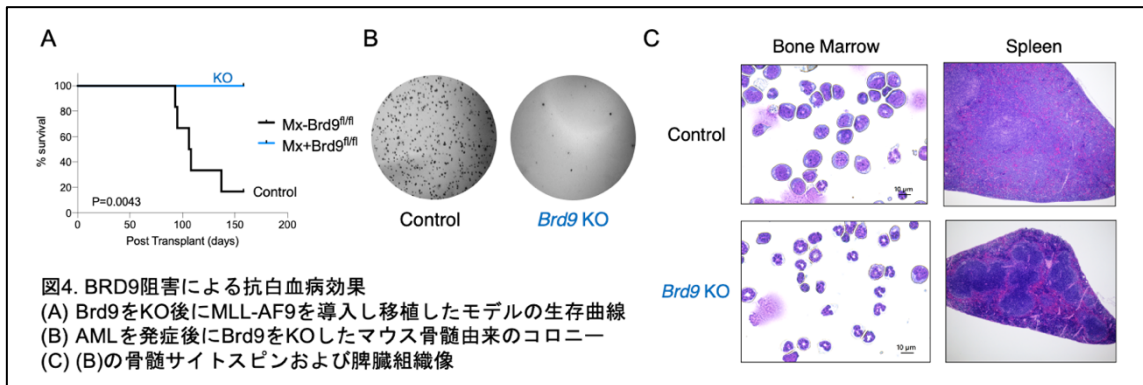


図4. BRD9阻害による抗白血病効果  
(A) Brd9をKO後にMLL-AF9を導入し移植したモデルの生存曲線  
(B) AMLを発症後にBrd9をKOしたマウス骨髄由来のコロニー  
(C) (B)の骨髄サイトスピンおよび脾臓組織像

#### 引用文献

- 1) Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011. 478:64-9.
- 2) Dvinge H, Kim E, Abdel-Wahab O, et al. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nat Rev Cancer*. 2016. 16:413-30.
- 3) Inoue D, Bradley RK, Abdel-Wahab O. Spliceosomal gene mutations in myelodysplasia: molecular links to clonal abnormalities of hematopoiesis. *Genes Dev*. 2016. 30:989-1001.
- 4) Inoue D, Chew GL, Liu B, et al. Spliceosomal disruption of the non-canonical BAF complex in cancer. *Nature*. 2019. 574:432-436.
- 5) Michel BC, D'Avino AR, Cassel SH, et al. A non-canonical SWI/SNF complex is a synthetic lethal target in cancers driven by BAF complex perturbation. *Nat Cell Biol*. 2018. 20:1410-1420.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hayashi Yasutaka, Inoue Daichi, Kitamura Toshio et al.	4. 巻 39
2. 論文標題 MDS cells impair osteolineage differentiation of MSCs via extracellular vesicles to suppress normal hematopoiesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110805 ~ 110805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110805	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 Tanaka Atsushi, Inoue Daichi et al.	4. 巻 140
2. 論文標題 Aberrant EVI1 splicing contributes to EVI1-rearranged leukemia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 875 ~ 888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021015325	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 Nishimura Koutarou, Yamazaki Hiromi, Zang Weijia, Inoue Daichi	4. 巻 113
2. 論文標題 Dysregulated minor intron splicing in cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2934 ~ 2942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15476	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 Chen Sisi, Inoue Daichi, Abdel-Wahab Omar et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Impaired Proteolysis of Noncanonical RAS Proteins Drives Clonal Hematopoietic Transformation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 2434 ~ 2453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2159-8290.CD-21-1631	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 Ochi Tetsuro, Fujiwara Tohru, Ono Koya, Suzuki Chie, Nikaido Maika, Inoue Daichi, Kato Hiroki, Onodera Koichi, Ichikawa Satoshi, Fukuhara Noriko, Onishi Yasushi, Yokoyama Hisayuki, Nakamura Yukio, Harigae Hideo	4. 巻 12
2. 論文標題 Exploring the mechanistic link between SF3B1 mutation and ring sideroblast formation in myelodysplastic syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-18921-2	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 1)Xiao M, Kondo S, Nomura M, Kato S, Nishimura K, Zang W, Zhang Y, Akashi T, Viny A, Shigehiro T, Ikawa T, Yamazaki H, Fukumoto M, Tanaka A, Hayashi Y, Koike Y, Aoyama Y, Ito H, Nishikawa H, Kitamura T, Kanai A, Yokoyama A, Fujiwara T, Goyama S, Noguchi H, Lee S, Toyoda A, Hinohara K, Abdel-Wahab O, Inoue D.	4. 巻 14
2. 論文標題 BRD9 determines the cell fate of hematopoietic stem cells by regulating chromatin state	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-44081-6	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18件 (うち招待講演 17件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Daichi Inoue
2. 発表標題 Deciphering the Mechanisms of Cancer Development Driven by Aberrant Splicing Events
3. 学会等名 SECOND JCA-AACR PRECISION CANCER MEDICINE INTERNATIONAL CONFERENCE (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上大地
2. 発表標題 BRD9を標的とした血液がん治療
3. 学会等名 第27回日本がん分子標的治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Daichi Inoue
2. 発表標題 Altered Post-transcriptional regulation in malignant hematopoiesis
3. 学会等名 IRCMS Mini Symposium on Normal Hematopoiesis and Transformation (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Daichi Inoue
2. 発表標題 Dual roles of BRD9 in normal and malignant hematopoiesis
3. 学会等名 ASH/JSH 2023 Normal/Malignant Hematopoiesis and Novel Therapies for Hematologic Malignancies Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上大地
2. 発表標題 骨髓異形成症候群における骨髓間質細胞の病態解明
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上大地
2. 発表標題 プロモドメインタンパクの転写後制御を介した造血幹細胞運命制御機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (幕張) (招待講演)
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 井上大地
2. 発表標題 プロモドメインタンパクのスプライシング異常がもたらす細胞運命制御
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（名古屋）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Inoue Daichi
2. 発表標題 Dysregulated Minor Intron Splicing and Cancer.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（横浜）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Inoue Daichi
2. 発表標題 Dual roles of BRD9 in normal and malignant hematopoiesis.
3. 学会等名 ASH/JSH 2023 Normal/Malignant Hematopoiesis and Novel Therapies for Hematologic Malignancies Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Inoue Daichi
2. 発表標題 Dissecting the mechanisms for cancer development caused by aberrant splicing.
3. 学会等名 The 12th AACR-JCA Joint Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Inoue Daichi
2. 発表標題 Aberrant splicing events lead to altered cell fate of hematopoietic stem cells.
3. 学会等名 The 19th Stem Cell Research Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上大地
2. 発表標題 スプライシング異常を介した新規発がん機構
3. 学会等名 第92回日本遺伝学会ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上大地
2. 発表標題 Clarifying the Role of Minor Introns in Cancer Predisposition
3. 学会等名 The 4th CCII Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上大地
2. 発表標題 マイナーイントロンを介した発癌機構
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 井上大地
2. 発表標題 RNAの視点からみた造血器腫瘍
3. 学会等名 第11回神奈川MDS研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上大地
2. 発表標題 イントロンから発癌を読み解く
3. 学会等名 東京血液懇話会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上大地
2. 発表標題 スプライシング異常から紐解く造血器腫瘍
3. 学会等名 第3回先端医科学研究センター「マルチオミックスによる遺伝発現制御の先端的医学共同研究拠点」セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上大地
2. 発表標題 ZRSR2 Mutation Induced Minor Intron Retention Drives MDS and Diverse Cancer Predisposition Via Aberrant Splicing of LZTR1
3. 学会等名 The 62nd ASH Annual Meeting and Exposition（国際学会）
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	Memorial Sloan Kettering Cancer Center			