

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07574

研究課題名（和文）MLL遺伝子変異による大腸癌進展のメカニズム解析

研究課題名（英文）Mechanistic analysis of the colorectal cancer progression by MLL mutation

研究代表者

米田 光宏（Yoneda, Mitsuhiro）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・講師

研究者番号：80508367

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：白血病原因遺伝子の一つであるMLLノックダウンにより、MLL遺伝子変異を有する大腸癌細胞の細胞増殖が抑制された。しかし、変異のない大腸癌細胞の細胞増殖は抑制されなかった。

さらに、MLL4遺伝子変異特異的な標的遺伝子を同定するため、MLL4遺伝子変異の有る細胞と無い細胞において、MLL4をノックダウンした。これらの細胞由来のRNAサンプルを精製し、RNA-seqを行うためのライブラリーを作製した。

メカニズム解明のためのin vitro転写の材料として、MLLファミリー共通の複合体構成因子にFlagやHA、およびHisタグなどを付加した組換えタンパク質を作製し、MLL複合体の形成を確かめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヒストンH3リシン4番目(H3K4)メチル化酵素Mixed Lineage Leukemia (MLL)の遺伝子変異がエピゲノム変化をもたらし、細胞を癌化させる分子メカニズムを解明することが最終目標である。MLL遺伝子変異を有する（変異型MLL）大腸癌細胞においてMLLの標的癌遺伝子または癌抑制遺伝子を網羅的に同定し、癌化経路特定の手がかりとする。

本研究は、MLL遺伝子変異を有する固形癌に対する早期診断・予後診断や、より有効な分子標的療法の発見につながる礎となる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）： The proliferation of colon cancer cells with MLL mutant was suppressed by subunits of MLL4 complex knockdown, while the proliferation of colon cancer cells without MLL mutant was not suppressed by the subunits knockdown. As a result, subunits of MLL4 complex facilitated proliferation of colon cancer cells with MLL mutant.

Moreover, we knockdowned MLL4 in colon cancer cells with and without MLL4 mutation to identify MLL4 mutation specific target genes. We purified RNAs from these cells and made libraries for RNA-seq. MLL complex formation was confirmed with Flag, HA, or His tagged recombinant proteins of common MLL complex subunits for in vitro transcription to clarify the mechanism.

研究分野：癌

キーワード：大腸癌

1. 研究開始当初の背景

MLLには、1-4のサブファミリーが存在し、各遺伝子欠損マウスは胎生致死であるため、発生過程における個々のMLLの独自の役割が示唆される。MLL融合遺伝子や点突然変異などの遺伝子異常は、白血病の発症件数中約10%で見られる。MLLに異常があると予後不良であることが知られている。これらのMLL変異体は、癌遺伝子の転写を活性化し、白血病を発症させることが遺伝子改変マウスを用いて証明されている(Thiel *et al.*, *Cancer Cell*. 2010)。一方、大腸癌などの固形癌検体においても、MLL遺伝子変異は高頻度に見られ(表1、Rao, R. C. and Y. Dou., *Nat Rev Cancer* 2015より改変)、患者の予後との相関があることから、MLL変異の固形癌進行への関与が推測される。実際に癌細胞株および患者検体のゲノム配列データベース、COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer)を用いて検索した結果、大腸癌の22%、子宮頸癌の15%、肺癌の14%、乳癌の12%の検体にMLL遺伝子変異が検出された。にもかかわらず固形癌の発生・進行におけるMLLの役割はほとんど明らかになっていない。乳癌細胞株を用いた2つの報告がある。Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)陽性の細胞の増殖にMLL2が重要であり、MLL2が抗癌剤のHER2阻害剤に対する感受性を減弱させる(Matkar *et al.*, *Cancer Cell* 2015)。AKTがMLL2に直接結合し、リン酸化することでH3K4メチル化とEstrogen receptor (ER)の働きを阻害する(Toska *et al.*, *Science* 2017)。従って、固形癌においてMLLが何らかの促進的な役割を担っていることが推察される。また、白血病の分子療法として、MLL1-AF9融合変異体の複合体成分のDOT1Lを阻害するEPZ-5676は、臨床試験中である(Ford *et al.*, *Cancer Genet.* 2015)。同複合体成分のBRD4を阻害するJQ1は、ファースト・イン・クラスとして画期的ではあるが、癌細胞の薬剤耐性の獲得が問題であり(Fong *et al.*, *Nature* 2015)、二次的、三次的な薬剤の選択や開発が切望されている。また肺癌などの固形癌の発生・進行におけるMLLの役割は不明である。本研究の独創的な点は、**固形癌のMLL変異体特有の構成因子を同定し、ヒストンH3K4メチル化異常を介した癌発生・進展の分子メカニズムを解明することにある。**本研究は、MLL遺伝子異常を有する固形癌に対する早期診断・予後診断や、より有効な分子標的療法の発見につながる礎となる可能性を秘めている。

MLL遺伝子	変異がみられる癌 (頻度順)	報告症例数	Setドメイン 変異 (%)
MLL1	1. 大腸癌 2. 肺癌 3. 膀胱癌	305	22.9
MLL2	1. 血液腫瘍 2. 大腸癌 3. 肺癌	627	37.0
MLL3	1. 肺癌 2. 大腸癌 3. 乳癌	845	28.3
MLL4	1. 子宮内膜癌 2. 大腸癌 3. 肺癌	236	26.2

表1 MLL遺伝子変異の検出される癌、報告症例数
およびSetドメイン変異頻度

2. 研究の目的

本研究は、ヒストンH3リシン4番目(H3K4)メチル化酵素 Mixed Lineage Leukemia (MLL)の遺伝子変異がエピゲノム変化をもたらし、細胞を癌化させる分子メカニズムを解明することが最終目標である。MLL遺伝子変異を有する(変異型MLL)大腸癌細胞においてMLLの標的癌遺伝子または癌抑制遺伝子を網羅的に同定し、癌化経路特定の足がかりとする。また、変異型MLLに特異的な複合体構成因子を同定し、変異型MLL複合体によるクロマチン構造・転写制御の分子メカニズムを明らかにする。さらに担癌マウスにおける変異型MLL複合体構成因子のノックダウン実験を行い、癌研究基盤ならびに臨床応用に貢献できる基礎的な知見を得ることが、将来的な展望である。

3. 研究の方法

以下の3つの課題に取り組み、変異型MLL複合体構造の全貌や、変異型MLL依存的な発癌、あるいは癌進行の分子メカニズム解析を試みる。

(1) 変異型MLL複合体の標的癌関連遺伝子の網羅的な同定

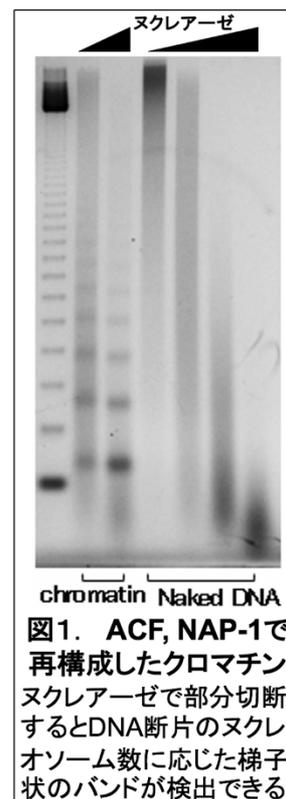
正常型MLLに比べ、変異型MLL複合体は、クロマチンへの結合部位が変化して新たな癌遺伝子の転写活性化や癌抑制遺伝子の不活性化が起きてクロマチン環境が攪乱されるため癌が進行すると推測される。そのため、MLL遺伝子変異を有する細胞と変異のない細胞において、①クロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)を用いて、正常型と変異型MLLの結合領域を網羅的に同定・比較する。次に、②変異型MLL特異的なsiRNAノックダウンは不可能ではあるが、正常および変異型MLLを両方ノックダウンし、RNA-seqを実施し、MLL標的遺伝子候補リストを作製する。①②を統合的に解釈し、**変異型MLL特異的な標的癌遺伝子および癌抑制遺伝子を同定する。**

(2) 変異型 MLL 複合体特有の構成因子や固形癌細胞増殖維持に必須な構成因子の同定

①変異型 MLL はヘテロに発現するので、変異型 MLL を特異的に認識するペプチド抗体を作製し、免疫沈降を行う。また②タグを付加した正常型と変異型 MLL をそれぞれ安定発現する癌細胞株を樹立し、免疫沈降を行う。①②の複合体を SDS-PAGE 後、銀染色し、変異型特異的なバンドを見出し、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS/MS) でタンパク質を同定する。同定が困難な場合は、MLL 変異の有る細胞と無い細胞を用いて、変異に特異的な因子を見出せないか試みる。同定された因子に対する抗体を用いるなど、変異型 MLL 複合体の精製純度を上げ、複合体構成メンバーの全貌を明らかにする。過去の報告と一致しているか確認するため、正常型 MLL 複合体においても新たな構成因子が見出せる可能性も考慮し、予備実験として既に行った 293T 細胞由来の MLL 複合体との比較検討も行う。さらに、同定された因子を siRNA ノックダウンし、細胞増殖抑制を指標として、固形癌細胞の維持に必須な因子の同定も試みる。変異型 MLL 複合体形成に必須な因子か否か共免疫沈降実験も行い、判断する。

(3) 変異型 MLL 複合体による転写・クロマチン構造制御の分子機能の *in vitro* の系を用いた解析

①正常型および変異型 MLL による転写制御の違いを調べるため、転写因子を自在に組み合わせて因子個々の作用を解析できる *in vitro* 転写を用いて解析する。我々は *in vitro* 転写の実験系を確立しており、材料も変異型 MLL 複合体を除いて準備済みである。鋳型クロマチンは、方法 1 で同定した変異型 MLL 標的遺伝子のプロモーターとエンハンサー領域を組み込んだプラスミドと精製コアヒストンを材料に、ACF/NAP-1 クロマチン形成法 (図 1 Ito *et al.*, Cell 1997) もしくは塩透析法で作製する。方法 2 で精製した正常型あるいは変異型 MLL 複合体を加え、MLL 遺伝子変異を有する大腸癌細胞株 SW48 (MLL2, 3, 4 に点突然変異あり) の核抽出液あるいは精製した基本転写因子群と RNA ポリメラーゼ II を用いた転写反応を行い、プライマー伸長法により転写産物量の変化をモニターする。次に、ヒト全ゲノムを鋳型とする *in vitro* 転写を用いて MLL 複合体の直接的な標的遺伝子を網羅的に同定する。②MLL 複合体は標的遺伝子のメチル化状態を切替え、クロマチン構造を変化させるので (Nakamura *et al.*, Mol Cell 2002)、MLL 変異のない細胞をコントロールとし、変異型 MLL を過剰発現させた細胞から粗精製したクロマチンをヌクレアーゼ処理後、標的領域上プローブによるサザンブロットを実施し、ヌクレオソームアレイ変動を観察し、正常および変異型 MLL 複合体がクロマチン構造に与える影響を評価する。③さらに、方法 2 で変異型 MLL 複合体形成に必須な因子が明らかになった場合には、MLL 変異を有する細胞を用いてノックダウン実験を行い、NOG や NSG などの高度免疫不全マウスに皮下移植して生体内での腫瘍抑制効果を検討する。



4. 研究成果

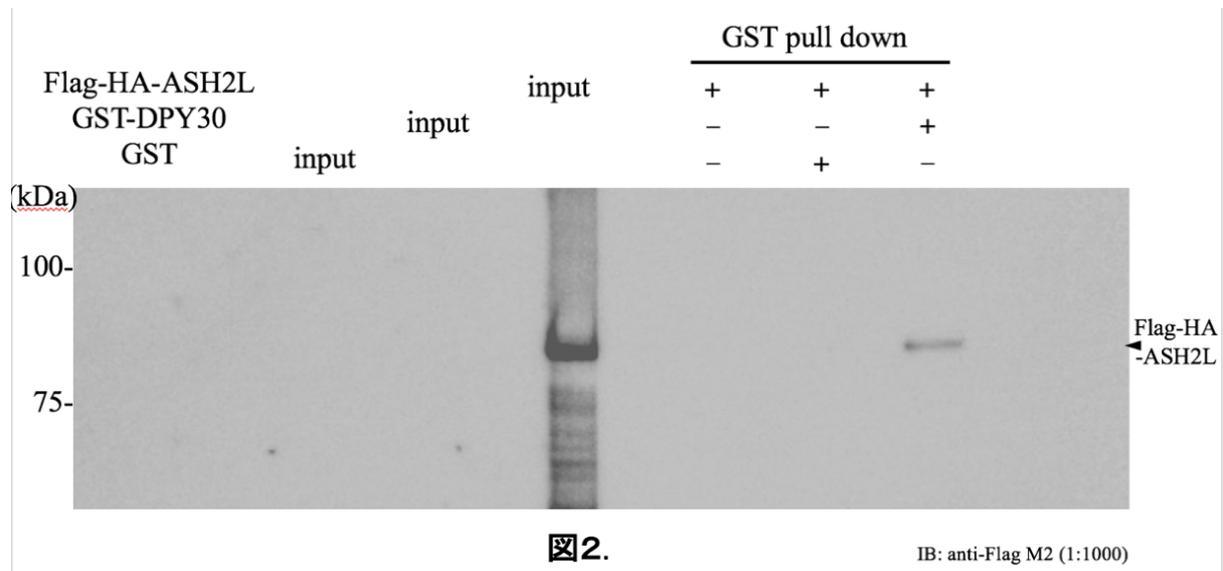
MLL ノックダウンにより、MLL 遺伝子変異を有する大腸癌細胞では細胞増殖が抑制された。しかし、変異のない大腸癌細胞において、細胞増殖は抑制されなかった。すなわち、MLL 変異がある大腸癌細胞株において MLL 複合体構成因子は細胞増殖を促進していた。

さらに、MLL4 遺伝子変異特異的な標的遺伝子を同定するため、MLL4 遺伝子変異を有する細胞と変異のない細胞において、MLL4 をノックダウンした。ノックダウンによって発現低下がみられた癌遺伝子もしくは発現が上昇した癌抑制遺伝子が標的遺伝子候補となると考えられる。これらの細胞由来の RNA サンプルを精製し、RNA-seq を行うためのライブラリーを作製した。

メカニズム解明のための *in vitro* 転写の材料として、MLL ファミリー共通の複合体構成因子に Flag や HA、および His タグなどを付加した組み換えタンパク質を作製し、MLL 複合体の形成を確かめた。複合体構成因子のノックダウンにより増殖が抑制される MLL 遺伝子変異を有する大腸癌細胞株 A と増殖が抑制されない MLL 変異のない癌細胞株 B を見出した。

in vitro 転写に用いるための、MLL ファミリーに共通の複合体構成因子である ASH2L, DPY30, RBBP5, WDR5 に Flag や HA や GST のタグを付加した全長の組換えタンパク質を大腸菌 (BL21 株) を用いて作製し、各サブユニット間の結合、すなわち複合体形成能を有することを Western blotting にて確かめた。

GST pull down 及び抗 Flag M2 抗体を用いた Western blotting により、Flag-HA-ASH2L と GST-DPY30 との結合が確認出来た(図2)。また、抗 FlagM2 抗体を用いた免疫沈降及び抗 HA 抗体を用いた Western blotting により、HA-His-RBBP5 と Flag-His-WDR5 並びに Flag-His-MLL4 との結合が確認出来た(図3)。同様の種々の結合の有無を確かめる実験を行い、これまでの報告と同じように精製した組換えタンパク質によって MLL 複合体が形成されていることを確認した(図4)。



HA-His-RBBP5	input	+	+	+
Flag-His-WDR5		-	+	-
Flag-His-MLL4C		-	-	+
Flag resin		+	+	+

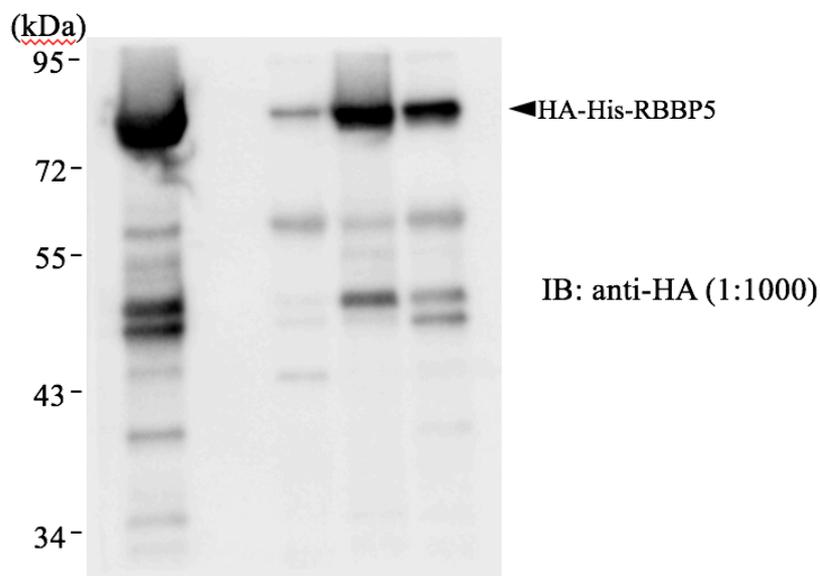


図4. MLLファミリーに共通する複合体構成因子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米田光宏 中川武弥 服部尚子 伊藤敬
2. 発表標題 MLL遺伝子変異による大腸癌進展のメカニズム解析およびMLL複合体内タンパク質間相互作用を標的とする創薬
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022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	伊藤 敬 (ITO TAKASHI) (90306275)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	

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