

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08765

研究課題名(和文)急性骨髄性白血病における新規分子標的の単離

研究課題名(英文) Isolation of molecular targets for AML with poor prognosis

研究代表者

山形 和恒 (Yamagata, Kazutsune)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：70311412

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)：マウスMLL-ENL白血病細胞を用いたCRISPR/Cas9スクリーニングが終了し、分子標的候補遺伝子を102遺伝子中21遺伝子に絞った。その中から、脂質代謝を制御する転写因子SREBF1に注目した。これまでに、SREBF1が様々なタイプのAML細胞のin vitroでの生育とin vivoでのAML発症に必須である事が明らかとなった。SREBF1はAKT/mTOR経路を活性化し、TGF beta/SMAD経路を抑制していた。SREBF1は脂質代謝を制御する事によって、細胞膜上のlipid raftの機能を促進する事により、これらシグナル経路を制御する事が推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMLの予後不良群に罹患した患者は、5年生存率が20%前後とされ未だに治療が困難である。本研究課題を通じて、AMLの発症や予後不良化を促進する因子を複数単離した。これらの因子、もしくはこれら因子が関与する経路は、予後不良AMLの新規分子標的となり得る点に社会的意義がある。一方、それら因子から、SREBF1に注目して解析を行なっている。その結果、SREBF1が脂質代謝を促進する事によって、造血前駆細胞のAML細胞化、又はAML細胞の予後不良化を促進する事が明らかとなった。脂質代謝が、原因としてAML発症及び予後不良化に寄与する事を示した点に学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In murine MLL-ENL leukemia cells, CRISPR/Cas9 screening for the isolation of the molecular targets for AML with poor prognosis was completed, and the candidates of molecular targets were narrowed down to 21 genes out of 102 genes. Among them, we focused on the transcription factor SREBF1, which regulates lipid metabolism. So far, we have shown that SREBF1 is essential for the growth of various types of AML cells in vitro and the development of AML in vivo. SREBF1 activated the AKT/mTOR pathway and suppressed the TGF beta/SMAD pathway. It was speculated that SREBF1 regulates these signaling pathways by promoting the function of lipid raft on the cell membrane by regulating lipid metabolism.

研究分野：造血器腫瘍における脂質代謝、及びエピジェネティクス制御

キーワード：急性骨髄性白血病 予後不良化 SREBF1 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病、特にその予後不良群は5年生存率が20%以下であり、新規治療法の開発が望まれる。本研究の最終目的は、新規の分子標的薬を作製することである。その目的を達成するために、本申請では、下記の要件を満たすような因子を単離する Screening 系の構築を行い、その過程で得られた因子から分子標的候補を単離する。

- 1) MLL-ENL (MLL-fusion)白血病発症に必須の因子を同定する。
- 2) 1)で同定された因子の中で、他のタイプのAMLにも必須の因子を同定する。

1)が必須の条件であり、2)が望ましい分子標的の条件である。これらの研究を通して MLL-ENL AML、出来得れば様々なタイプのAMLの治療を可能とする新規分子標的を同定する。我々は、MLL融合遺伝子産物 (MLL-fusion)によって発症するAMLの発症メカニズムを解析してきた。MLL-fusionは、転写活性化因子として *HoxA* cluster、及び *Meis1* 遺伝子などの造血に關与する遺伝子の転写を恒常的に活性化して急性骨髄性 (AML)及び急性リンパ性白血病(ALL)を引き起こす。特に MLL-fusion が主因となるAML (MLL-fusion AML) は、治療予後不良である。我々は、この MLL-fusion による白血病発症メカニズムを解析するために、主要な MLL-fusion の一つである MLL-ENL に Cre-loxP システムを応用したトリックを施し、MLL-ENL flox システムを構築した

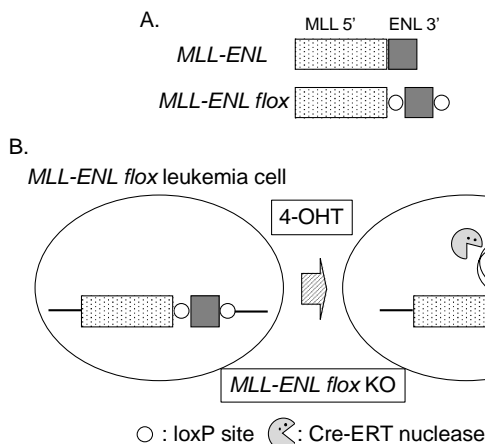


FIG. 1 MLL-ENL flox コンストラクト

(FIG. 1A)。この MLL-ENL flox システムを用いて ERT2 マウス (Cre-ERT を発現する transgenic マウス) 由来の幼若骨髄細胞 (c-Kit+) から、MLL-ENL flox AML 細胞を作製する。この MLL-ENL flox AML 細胞は、4-OHT で処理する事によって ENL 部分が削除され、白血病発症能を失う (FIG. 1B)。この際、遺伝子発現が減少する遺伝子が 1193、遺伝子発現が上昇する遺伝子が 1112 個確認できた。MLL-fusion AML では MLL 転座以外の遺伝子変異がほとんど見られず、その発症には MLL-fusion が主たる役割を果たす。この事から、前述の MLL-ENL を KO した時に発現が変動する遺伝子中に MLL-ENL AML 発症に必須な遺伝子の多くが潜んでいる

可能性がある。以降では、将来的な分子標的薬の作製や実験の簡便さの観点から MLL-ENL を KO したときに発現減少する遺伝子 1193 個に注目する。興味深い事に、これらの遺伝子群の中には、MLL-fusion AML を含む様々なタイプのAMLで発症に必須 (もしくは重要) であり、高発現すると治療予後が不良になる事が報告されている遺伝子が確認できた。そこで我々は、以下のような仮説を立てた。

仮説 1

MLL-ENL が制御する因子の中には、典型的な予後不良 AML である MLL-ENL AML の発症に必須であり、且つ高発現すると予後不良になる遺伝子が存在する。

仮説 2

それら遺伝子の中には、MLL-fusion を含めた様々なタイプのAMLでも発症に必須であり、高発現すると予後不良化因子として働く遺伝子が存在する。

これらの仮説に合致する因子は、理想的な分子標的となる事が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、新規の分子標的薬を作製することである。そこで、最終目標を達成するために「研究開始当初の背景」に示した特徴を持つ遺伝子の単離を本研究の目的とする。それらの

遺伝子は、MLL-ENLをはじめとした MLL-fusion 白血病や様々なタイプの予後不良 AML の治療を可能とする新規分子標的となる可能性がある。

3. 研究の方法

MLL-ENL floxをKOした時に発現低下する1193遺伝子について、The Cancer Genome Atlas (TCGA) のLAMLデータと照会して、高発現している時にAMLの予後が優位に不良(p<0.05)である遺伝子を選択する。その結果102遺伝子が単離された。以降、上述の102遺伝子を対象に以下のScreeningを進めていく。

1st screening

マウスMLL-ENL AML細胞にCas9を発現させたMLL-ENL/Cas9 AML細胞株を使用する。1遺伝子に対して3組のsgRNAを設計する。レンチウイルス系発現系を用いてMLL-ENL/Cas9 AML細胞にsgRNAを発現させる。sgRNAを発現させると細胞数が5/9以下に落ちる遺伝子を分子標的候補として残す。

2nd screening

1st screeningで単離された遺伝子の機能ドメインに対するsgRNAを3組づつ作製し、MLL-ENL/Cas9 AML細胞株に発現させる。sgRNAを発現させると生育できなくなる遺伝子を単離する。また、それらの遺伝子に対するshRNAも作製し、knockdownした時にも生育が阻害されるか確認する。

3rd screening

マウスMLL-ENL/Cas9 AML細胞株で生育に必要な遺伝子が、ヒト白血病細胞株でも必須かどうか、機能ドメインに対するsgRNAを発現させて検討する。

4th screening

ここまで単離した因子について、KO マウスや KO 細胞株の表現系などを考慮に入れる。個体や細胞の生育に必要な遺伝子などは除いた druggable な分子について、マウス白血病発症モデル系やヒト白血病細胞株を用いた xenograft 系を用いて *in vivo* の白血病発症にも必須であるか検討する。

4. 研究成果

(1) Screening の終了

本研究期間中に、提案した 1st~4th screening が全て終了した。その結果、本申請当初に単離していた 108 遺伝子中 21 遺伝子が AML の発症、及び予後不良化に関与する候補遺伝子として単離された。更に、その中からコレステロールや脂肪酸の代謝を促進する転写因子、SREBF1 に注目し解析を進める事にした。

(2)SREBF1 は AML 発症に必須であり、発現亢進すると AML の発症を促進する。

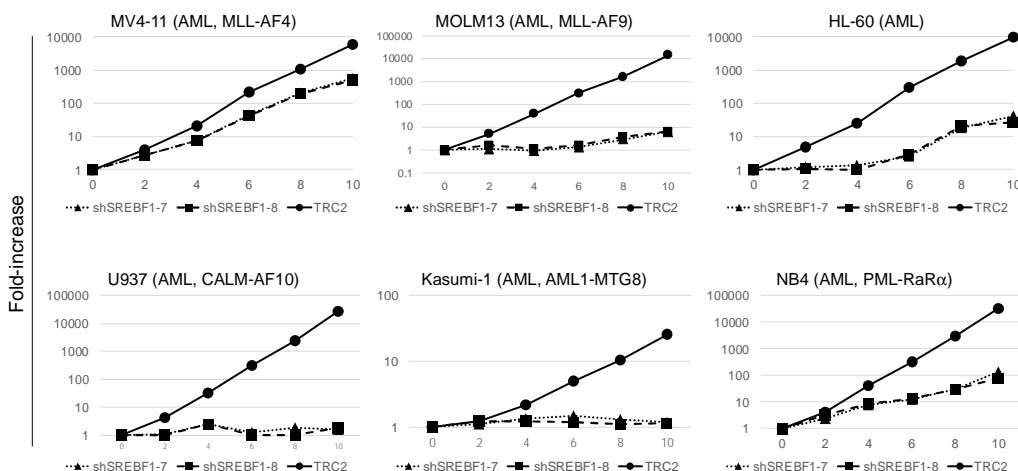


FIG.2 SREBF1をノックダウンすると、様々なヒトAML細胞株の増殖が抑制される。

これまでに、AML 細胞内での SREBF1 の 3 つの特徴が明らかとなっている。

SREBF1 は多様なタイプの AML 細胞の増殖や、AML の発症に必須である (FIG. 2, 3)。

SREBF1 の発現亢進は、AML 細胞をよりアグレッシブにして発症を促進する (FIG. 4)。

SREBF1 を強制発現すると、マウス造血前駆細胞を不死化する (以降、SREBF1-immortalized cell)。

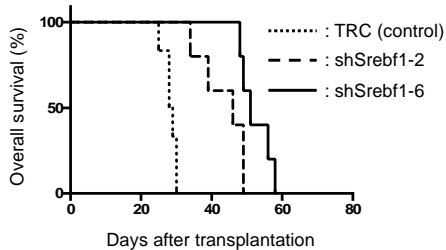


FIG.3 Srebf1をノックダウンしたAML細胞を骨髄移植した。その結果、AML発症が遅延した。

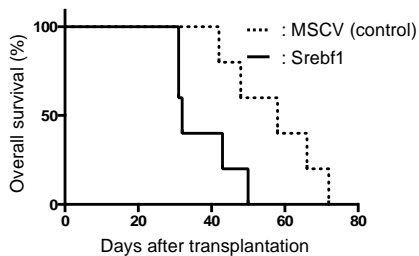


FIG.4 Srebf1を強制発現したAML細胞を骨髄移植した。その結果、有意にAML発症が早まった。

に関しては、SREBF1 が様々なタイプの AML において、発症に必須の役割を果たしている事が考えられる。 に関しては、マウス AML 細胞に SREBF1 を強制発現すると AML 発症死が有意に早くなる事が分かった。臨床データと単純に比較するのは難しい面もあるが、この実験結果から SREBF1 の発現亢進によって AML 細胞がよりアグレッシブな表現系を示すようになった為に予後不良になったと推測できる。 では、マウスの造血前駆細胞を培養すると分化、増殖停止を経て最終的には死滅する。一方、AML 発症の原因となる融合遺伝子や変異型遺伝子を強制発現すると不死化される例が多く報告されている。この融合遺伝子や変異型遺伝子が持つ不死化能は、AML 発症能に重要であると考えられている。SREBF1 は、それら oncogene と同様に不死化能を持つ事から、単に癌化した事によって脂質の需要が増大しただけではなく、SREBF1 が AML 細胞化に (原因として) 関与する事を示唆する。

(3)SREBF1 はシグナル経路を制御する事によって、AML 細胞に HSC 様な表現系を与える

上述の 3 つの特徴から、SREBF1 が AML 細胞を Leukemia stem cell レベルで制御する可能性があると考えた。そこで、SREBF1 をノックダウンした AML 細胞と SREBF1-immortalized cell の網羅的遺伝子発現解析を行い、常法に従い GSAE、GO 解析を行い、その結果をリン酸化抗体などを用いた Western blotting などで検証した。更に、Harmonizome (<https://maayanlab.cloud/Harmonizome/>)、ChEA3 (<https://maayanlab.cloud/chea3/>)、BioGRID (<https://thebiogrid.org>)、ChIP-Atlas (<https://chip-atlas.org>)などのデータベースから得られる "転写因子のダイレクトターゲット情報" や "タンパク質間結合情報" から作製した GeneSet を作製し、GO、GSEA 解析を合わせて行った。その結果、下記の 2 つの特徴が見えてきた (FIG.5 の概略図を参照)。

SREBF1 は AKT/mTOR 経路の活性化、及び TGF beta/SMAD 経路の不活化に関与する。

SREBF1 は HSC (Hematopoietic Stem Cell) の特性を維持する転写システムを制御する。

特に については、SREBF1 を KD した時に発現増加する遺伝子にも、発現減少する遺伝子にも HSC の維持に必須の転写因子の direct target gene が多く含まれており、且つ TGF beta/SMAD 経路の主要な下流経路である転写因子 SMAD2/3/4 のターゲット遺伝子と強くオーバーラップしていた。この結果は、 と が密接に関連する可能性を示すと考えている。これまでに、SMAD2/3/4 は HSC の維持に関与する様々な転写因子と直接的に結合して転写活性化や抑制する事が報告されてきた。それらの報告も考慮した上で下記のような仮説を立て検証して行く (FIG. 5 を参照のこと)。

- A. SREBF1 発現亢進に伴って、lipid raft が活性化される。それに伴い AKT/mTOR 経路が活性化、及び TGF beta/SMAD 経路が不活化される。
- B. SREBF1 発現亢進に伴って、TGF beta/SMAD 経路が不活化し核内の SMAD が減少する。それに伴い SMAD と結合して機能していた HSC 関連転写因子の活性、又はターゲット遺伝子の

変化が起きて HSC 様な幹細胞性の獲得や促進が起きる (Leukemia stem cell の生成)。

今後の方針としては、上述の詳細なメカニズムの解明を目指している。Leukemia stem cell の維持機構については不明な点が多い。その解明は、再発の少ない新規治療法の開発につながる。

(4) 研究の特色と今後の展望

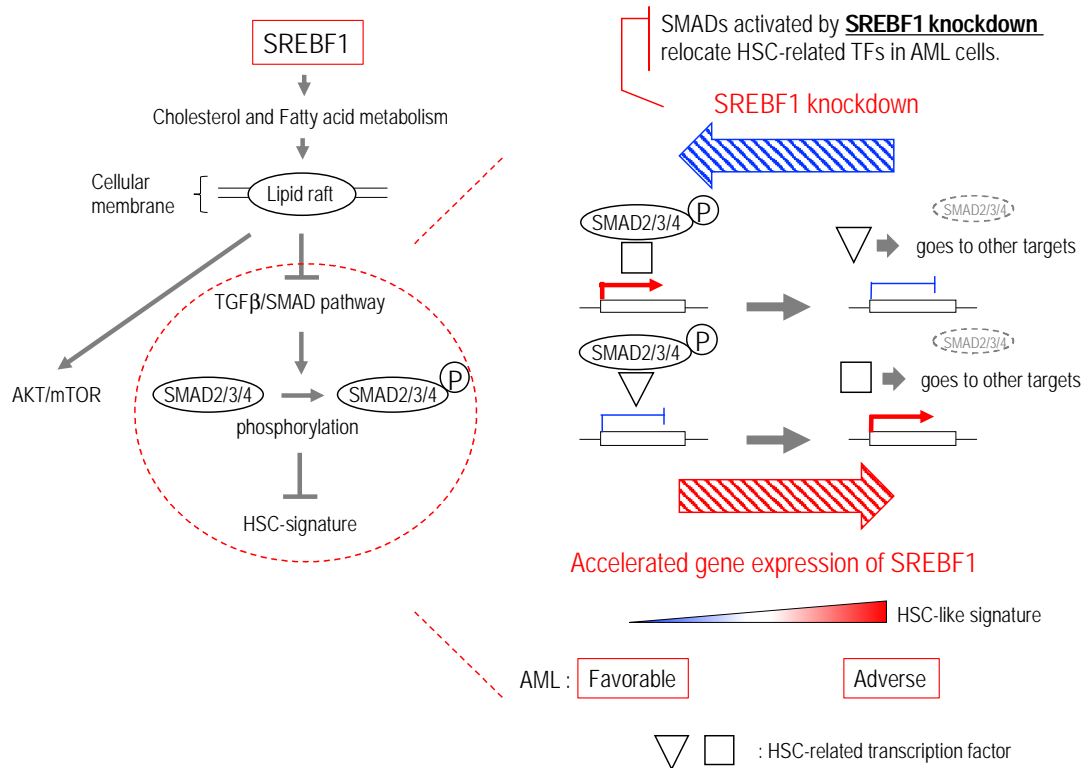


FIG. 5 Schematic view

AML を予後不良化する遺伝子変異や染色体異常について、個々の機能について様々な解析が行われてきた。しかし、本研究では予後不良 AML に共通するメカニズムが存在するのではないか、という観点からスクリーニングを行い SREBF1 を単離してきた。SREBF1-immortalized cell や SREBF1 を KD して発現変動する遺伝子群 (SREBF1 signature) は、様々なタイプの AML 患者が混在する遺伝子発現データセット (TCGA から取得) から、予後不良群と良好群を分類できる。この結果は、SREBF1 の発現亢進や下流経路の活性化 (又は、不活性化) が、予後不良 AML の普遍的なメカニズムである事を示している。更に、SREBF1 は AML を引き起こす oncogene と同様に造血前駆細胞の不死化能を持つ事から、SREBF1 が AML 細胞化に (原因として) 関与する事を示唆する。癌の発症における脂質代謝の重要性は注目されつつあるとはいえ、発症そのものに関与する事を示した報告は少なく、本研究の特色の一つと言える。今後の本研究の進展によって SREBF1、又はその下流経路が予後不良 AML の分子標的として有用である事を示す事が可能となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山形和恒
2. 発表標題 脂質代謝による急性骨髄性白血病の制御
3. 学会等名 がんと代謝研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山形和恒
2. 発表標題 Lipid metabolism regulated by SREBF1 is indispensable for AML development
3. 学会等名 造血管腫瘍研究会
4. 発表年 2023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
---------	---------