

令和 4 年 4 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22809

研究課題名(和文) コヒーシン遺伝子変異を有する白血病の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of leukemia with cohesin mutations and development of novel treatment

研究代表者

越智 陽太郎 (Ochi, Yotaro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40883707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄系腫瘍の約10-20%がコヒーシンの遺伝子変異を有するが、コヒーシン変異が白血病を引き起こす分子機序は十分に明らかになっていない。本研究では、コヒーシン変異による分子異常を詳細に解明するとともに、変異特異的な新規治療法の開発を目指す。ゲノム編集を応用し、コヒーシン欠失白血病細胞株を複数樹立した。エピゲノムを標的とする抗癌剤の一部がコヒーシン欠失株に特異的な増殖抑制効果を示した。この効果は免疫不全マウスへの移植モデルでも同様に観察された。また、新たにコヒーシン変異と他のドライバー遺伝子変異の複数変異マウスモデルを作成し、両遺伝子の協調的な効果を表現型および分子レベルで示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、白血病の約10-20%と高頻度に認められるコヒーシン遺伝子変異の意義を詳細に解析した。ゲノム編集技術によって、白血病のコヒーシン遺伝子変異を細胞株やマウスモデルで再現することで、分子病態の解明や新規治療開発などの実験を可能にした。これらの新規に作成した遺伝子変異モデルを活用することで、コヒーシン変異が白血病を引き起こす機序を明らかにするとともに、コヒーシン遺伝子変異を特異的に標的とする新規の抗癌剤候補を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：Approximately 10-20% of myeloid neoplasms have mutations in cohesin complex genes, but the molecular mechanisms by which cohesin mutations cause leukemia are not fully understood. This study aims to elucidate the molecular abnormalities caused by cohesin mutations and to develop mutation-specific therapies.

We applied genome editing to establish cohesin-deficient leukemia cell lines. Some anticancer drugs targeting the epigenome showed specific growth inhibitory effects on the cohesin-deficient lines. This effect was also observed in a transplantation model in immunodeficient mice. In addition, a new multiple mutant mouse model of cohesin mutation and other driver gene mutations was generated to demonstrate the cooperative effects of both genes at the phenotypic and molecular levels.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：白血病 コヒーシン

## 1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)や骨髄異形成症候群(MDS)などの造血器腫瘍では、いくつかの新規薬剤が試験されているものの、長年にわたり革新的な新規治療法は登場せず、現在でも侵襲の強い化学療法や造血幹細胞移植以外に根治治療がない。そのため、有効かつ安全な新規治療法の開発が特に望まれている。

以前、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析により、15%程度のAML/MDSが *STAG2*、*SMC1*、*SMC3*、*RAD21* などのコヒーシン遺伝子変異を有することを申請者の所属研究室より報告した(Kon et al. Nat Genetics 2013)。一方、コヒーシン変異が白血化を誘導する分子機序は不明のままであった。

しかし最近、申請者らは大規模ゲノム解析、ノックアウトマウスモデル作成、次世代シーケンサーを用いた統合的エピジェネティック解析(RNA-seq、ChIP-seq、ATAC-seq、Hi-C)を駆使し、コヒーシン *STAG2* 変異が転写因子 *RUNX1* 変異と協調的に作用し、エンハンサー・プロモーター間のループ破綻およびRNAポリメラーゼIIの転写異常を起こす事を新規に報告した(Ochi et al. Cancer Discovery 2020)。この研究成果より、コヒーシン変異細胞では染色体三次元構造や転写制御機構が破綻していることが明らかになり、コヒーシン変異環境下では、転写関連の遺伝子・タンパクなどの標的に対して脆弱性を示すことが期待される。

以上より、コヒーシン変異細胞の脆弱性を見出し、新規治療標的を同定することで、コヒーシン正常の通常造血細胞への影響を最小限に、コヒーシン変異腫瘍細胞特異的に治療を行うことが可能になると期待され、白血病の遺伝子変異の主要クラスの一つであるコヒーシン変異への新規アプローチを可能とすることが本研究の命題である。

## 2. 研究の目的

上記の背景より、本研究においてはコヒーシン遺伝子変異によって生じる分子異常を引き続き詳細に解明するとともに、特異的治療法が現状では存在していないコヒーシン変異を標的とした新規治療法の開発を目指す。

本研究期間においては、コヒーシン遺伝子変異モデルを白血病細胞株やマウスモデルにおいて複数樹立することで、上記の目的を遂行しやすい環境作りを行うことにも焦点を当てる。ゲノム編集や患者腫瘍組織移植モデル(Patient-derived xenografts: PDX)を活用し、複数の異なる実験系で検証を行うことを可能とする。

また、CRISPR ライブラリスクリーニングによる遺伝子脆弱性の網羅的評価や、統合的なエピジェネティクス解析による病態解明にも取り組み、多層的な解析による確度の高いデータを得ることを目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、CRISPR-Cas9を用いたゲノム編集を応用し、コヒーシン変異をモデルした白血病細胞株を複数樹立することで、オミクス解析や候補薬剤の有効性検証を可能とする系を確立する。この白血病細胞株を免疫不全マウスに移植することで、*in vivo*の系でも薬効試験などの検証を可能とするモデルを確立する。これらのisogenicな細胞株を用いて、エピゲノムを介して薬効を発揮する抗癌剤の有効性を検証する。

患者検体を免疫不全マウスに移植したPDXモデルを多数樹立することで、より実臨床に近いモデルでも薬効試験を行うことを可能とする。患者検体の選択については、*STAG2*や*RAD21*などコヒーシン遺伝子変異を有する白血病症例のほか、コントロールとして用いるためのコヒーシン遺伝子変異以外の白血病症例も含める。

分子病態の解明のために、コヒーシンノックアウトマウスと他のドライバー遺伝子変異マウスを交配し、複数遺伝子変異マウスモデルを作成する。このモデルを用いてオミクス解析を行うことで、コヒーシン遺伝子変異と他のドライバー遺伝子変異の作用の協調効果についても評価を行う。

CRISPR ライブラリスクリーニングの実験系を確立するとともに、コヒーシン遺伝子変異細胞における遺伝学的な脆弱性を網羅的に評価することで、コヒーシン変異の標的治療候補を創出する。

#### 4. 研究成果

本研究では、まずコヒーシオン遺伝子変異をモデルした白血病細胞株の樹立を試みた。既に樹立済の *STAG2* 遺伝子欠失 HL-60 白血病細胞株に加え、K562 細胞株でも *STAG2* 遺伝子をノックアウトし、単一細胞由来クローンを複数株樹立した。さらに、*RUNX1* 遺伝子変異も同様にノックアウトを行うことで、野生型細胞、*STAG2* 遺伝子変異細胞、*RUNX1* 遺伝子変異細胞、*STAG2/RUNX1* 両遺伝子変異細胞の4種の isogenic 細胞株を作成した。

次に、これらの細胞株を用いて RNA シーケンスを実施した。これにより、コヒーシオン遺伝子変異によるトランスクリプトームの変化や、そこに協調的な *RUNX1* 遺伝子変異が加わることで一段と発現が変動する遺伝子群を多数抽出することができた。既存の *STAG2* 変異と *RUNX1* 変異のマウスモデルにおける RNA シーケンスデータ (Ochi et al. Cancer Discovery 2020) とも比較を行うことで、一部の遺伝子サブセットの変化は、ヒト白血病モデルにとどまらず、マウスモデルでも観察されることが明らかになった。

こうした複数のエピジェネティクス遺伝子変異の協調効果を鑑みて、白血病発症には遺伝子変異によって生じるエピジェネティクス変化が重要な働きをするものと考えられた。そこで、近年登場しているエピゲノムを介する機序で薬効を発揮する新規抗癌剤を用いて、薬効試験を行った。対象細胞は上記で樹立した HL-60 細胞に *STAG2* 遺伝子変異、*RUNX1* 遺伝子変異、*STAG2/RUNX1* 両遺伝子変異を導入した遺伝子改変細胞株である。細胞培養液中に候補薬剤を含めて培養する in vitro の実験系で薬効の指標である IC50 を測定したところ、*STAG2* 遺伝子ないし *RUNX1* 遺伝子変異を有する細胞株で特に効果を発揮する薬剤を複数同定した。

これらの候補薬剤の有効性を動物モデル in vivo で評価するために、*STAG2* 遺伝子ないし *RUNX1* 遺伝子変異を有する遺伝子改変 HL-60 細胞株を免疫不全マウスに移植した。このマウスに候補薬剤を投薬したところ、遺伝子変異細胞株を移植したマウスにおいてより顕著な腫瘍抑制効果が認められた。

また、患者白血病検体を免疫不全マウスに移植する患者腫瘍組織移植モデル (Patient-derived xenografts: PDX) の樹立も複数検体で行った。次世代シーケンサーを用いた変異解析により、コヒーシオン遺伝子変異が元の患者検体と PDX 検体の両方で認められることを複数症例で確認した。

また、コヒーシオン遺伝子変異の遺伝学的脆弱性を網羅的に同定するために、CRISPR ライブラリスクリーニングの実験系を構築することとした。白血病細胞株 K562 や HL-60 にレンチウイルスベクターを用いて Cas9 タンパクを恒常発現させることで、スクリーニングに用いることが可能な細胞株を複数種類で準備した。遺伝子ノックアウトを行う sgRNA ライブラリは GeCKO v2 ライブラリを用いることとし、レンチウイルスの作成を行った。Cas9 恒常発現 HL-60 細胞株に sgRNA ライブラリを感染させ、2 週間培養後に DNA を抽出した。次世代シーケンサーにより sgRNA 配列を解読することで、sgRNA ライブラリが十分な多様性をもって細胞株において発現していること、長期培養後に配列多様性に变化が認められることなどを確認できたことから、スクリーニングが有効に実施できたものと判断した。さらに、上記で樹立した *STAG2* 遺伝子ないし *RUNX1* 遺伝子変異を有する細胞株と同様のスクリーニングを実施中である。

コヒーシオン遺伝子変異は *RUNX1*、*SRSF2*、*ASXL1* などの他のドライバー遺伝子変異と有意に共存しやすい。この機能的意義にも焦点を当て、病態の解明のために、コヒーシオンノックアウトマウスと他のドライバー遺伝子変異マウスを交配し、複数遺伝子変異マウスモデルを作成した。これらのマウスモデルにおいては、コヒーシオン遺伝子変異より複数遺伝子変異マウスの方が造血器により顕著な異常を示すことが分かってきている。RNA シーケンス解析でもこうした複数遺伝子変異の相乗効果が観察されており、引き続きコヒーシオン遺伝子変異と他のドライバー遺伝子変異の作用の協調効果についても評価を行う。

以上より、本研究においてコヒーシオン遺伝子変異によって生じる分子異常を詳細に評価し得る遺伝子改変モデルを複数樹立した。また、RNA シーケンス解析によってコヒーシオン変異による共通の分子異常を同定したほか、コヒーシオン遺伝子変異特異的に作用し得る候補薬剤の同定に成功した。引き続き患者検体を用いた PDX モデルの樹立を進めており、今後は前臨床においてコヒーシオン遺伝子変異を標的とした特異治療の有効性を確立することを目指す。

## 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 2件）

1. 著者名 Saiki Ryunosuke, Momozawa Yukihide, Nannya Yasuhito, Nakagawa Masahiro M., Ochi Yotaro et al	4. 巻 27
2. 論文標題 Combined landscape of single-nucleotide variants and copy number alterations in clonal hematopoiesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 1239 ~ 1249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41591-021-01411-9	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 -
1. 著者名 Fujii Yoichi, Sato Yusuke, Suzuki Hiromichi, Kakiuchi Nobuyuki, Yoshizato Tetsuichi, Lenis Andrew T., Maekawa Shigekatsu, Yokoyama Akira, Takeuchi Yasuhide, Inoue Yoshikage, Ochi Yotaro et al	4. 巻 39
2. 論文標題 Molecular classification and diagnostics of upper urinary tract urothelial carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Cell	6. 最初と最後の頁 793 ~ 809.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ccell.2021.05.008	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 -
1. 著者名 越智 陽太郎	4. 巻 62
2. 論文標題 コヒーシオンSTAG2および転写因子RUNX1変異を有する骨髄異形成症候群の分子病態	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 352 ~ 359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.62.352	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 -
1. 著者名 Ochi Yotaro, Yoshida Kenichi, Huang Ying-Jung, et al	4. 巻 12
2. 論文標題 Clonal evolution and clinical implications of genetic abnormalities in blastic transformation of chronic myeloid leukaemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23097-w	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 Ochi Yotaro, Ogawa Seishi	4. 巻 13
2. 論文標題 Chromatin-Spliceosome Mutations in Acute Myeloid Leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1232 ~ 1232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13061232	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 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yotaro Ochi, Kenichi Yoshida, Yasuhito Nannya et al
2. 発表標題 Clonal evolution and prognostic impact of mutations in blast crisis of chronic myeloid leukemia
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yotaro Ochi, Kenichi Yoshida, Yasuhito Nannya et al
2. 発表標題 Clonal evolution and clinical impact of genetic lesions in blast crisis of chronic myeloid leukemia
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 越智陽太郎
2. 発表標題 骨髄性腫瘍の遺伝子変異による転写異常の解明と新規治療法の開発
3. 学会等名 日本血液学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 越智陽太郎	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 53
3. 書名 Medical Science Digest 2021年 2月号	

1. 著者名 越智 陽太郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版(株)	5. 総ページ数 104
3. 書名 医学のあゆみ	

〔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
---------	---------