

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08414

研究課題名（和文）非定型3q26転座型骨髄性腫瘍のEVI1エピジェネティック制御機構解明と治療応用

研究課題名（英文）Elucidation of epigenetic regulation mechanism of myeloid neoplasms with atypical 3q26 translocation toward therapeutic applications

研究代表者

蝶名林 和久（Chonabayashi, Kazuhisa）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00646010

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）：本研究では、t(3;8)(q26.2;q24)転座を有するMDS患者から作製した疾患iPS細胞を用いて病態モデルを作製した。iPS細胞由来MDS細胞は、元の患者MDS細胞と同様のEVI1（MECOM）発現変化、EVI1プロモーター/エンハンサー及びMYC血液エンハンサークラスターのH3K27アセチル化パターンを示した。さらにBET阻害剤JQ1がiPS細胞由来MDS細胞のEVI1活性化を抑制することでアポトーシスを誘導することを明らかにした。本研究成果は、染色体構造変化によるエンハンサーハイジャックの詳細なメカニズムの解明及び治療薬候補探索におけるiPS細胞モデルの有用性を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、非定型EVI1転座型骨髄性腫瘍の詳細な病態解明及び治療薬候補探索におけるiPS細胞モデルの有用性を示すものであり、予後不良なEVI1（MECOM）高発現骨髄性腫瘍の治療抵抗性・再発に対する新規治療の基盤に繋がると考えられる。

さらにこの疾患iPS細胞を用いた新しいプラットフォームは、骨髄性腫瘍のみならずエンハンサーハイジャック（染色体の転座や遺伝子増幅などによりエンハンサーが本来制御すべき遺伝子とは異なる遺伝子を制御するようになり、がん細胞の増殖や生存に関わる遺伝子の発現亢進を引き起こすこと）が関与する腫瘍性疾患全体に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we created a pathological model using iPS cells generated from MDS patients with the t(3;8)(q26.2;q24) translocation. iPS cell-derived MDS cells showed similar EVI1 (MECOM) expression changes, H3K27 acetylation patterns of the EVI1 promoter/enhancer and MYC blood enhancer cluster as the original patient MDS cells. Furthermore, we revealed that the BET inhibitor JQ1 induces apoptosis in iPS cell-derived MDS cells by suppressing EVI1 activation. The results of this research demonstrate the usefulness of iPS cell models in elucidating the detailed mechanism of enhancer hijacking due to chromosome structural changes and in searching for therapeutic drug candidates.

研究分野：血液腫瘍

キーワード：非定型3q26転座型骨髄性腫瘍 EVI1（MECOM）活性化 エンハンサーハイジャック 疾患特異的iPS細胞 BET阻害剤

1. 研究開始当初の背景

MDS や AML などの骨髄性腫瘍の約 10-50% では *EVII* (Ectopic viral integration site 1) 遺伝子が高発現し、発症、進展及び治療抵抗性に寄与している。そのため *EVII* (MECOM) を標的とする治療戦略が研究されているが、*EVII* は造血幹細胞の維持増殖に必須であるため単純な *EVII* 阻害は正常造血をも妨げてしまうと考えられる。白血球細胞のみで *EVII* の発現を抑制することができれば、副作用の少ない効率的な治療が可能である。*EVII* 高発現の機序としては *EVII* 遺伝子の再構成による場合が多く、最も頻度の高い異常としては 3 番染色体転座 t(3;3)(q21;q26.2) 及び逆位 inv(3)(q21q26.2) があるが、これら以外にも数多くの *EVII* 遺伝子再構成を来す染色体異常が報告されており腫瘍化との関連が未知のものが数多く存在する。

非定型 *EVII* 転座 t(3;8)(q26.2;q24) を持つ骨髄性腫瘍は *EVII* 高発現を示しこれまで 50 例程度の報告があるが、化学療法抵抗性で長期生存症例はいない。MDS 細胞の網羅的なエンハンサー解析や分化能・増殖能などの機能解析を進めるにあたり、多量の患者骨髄細胞が必要であったが、本症例では骨髄線維化の程度が強く、十分量の細胞を得ることが非常に困難であった。そこで申請者は、患者血液細胞より複数の疾患特異的 iPS 細胞 (MDS-iPS 細胞) を樹立した。樹立した MDS-iPS 細胞は、正常 iPS 細胞と同様に未分化性を維持したまま長期間増幅可能であった。t(3;8)(q26.2;q24) のような非定型 *EVII* 遺伝子再構成の腫瘍化における役割についての詳細は不明であり、“*EVII* がどのような制御を受けて活性化しているのか、他の共存するゲノム変異とどのように関連して MDS や AML の病態及び治療抵抗性に寄与しているのか” を、本研究課題の核心をなす学術的「問い」と設定した。

2. 研究の目的

本研究は、十分量の患者検体を得ることが困難なことが多い MDS 症例から、リプログラミング技術を用いて患者と同様の非定型 *EVII* 遺伝子再構成を持つ iPS 細胞を樹立することで、詳細なゲノム・エピゲノム解析及び機能解析を行い *EVII* 活性化の機構を解明し、*EVII* 発現を抑制するような新規治療法を開発することを目的とする。

疾患 iPS 細胞を用いた腫瘍特異的スーパーエンハンサーの機能解析は、これまで世界的にも報告がないため、本研究は非常に新規性・独自性の高い研究と考える。また、同一患者内の多様な MDS サブクローンから iPS 細胞を作製することができれば、治療抵抗性のマイナーサブクロンの検出やサブクローン毎の共存する変異パターンの正確な同定、サブクローン毎の機能解析も可能であり、他にはない独自性のある解析ツールとなり得る。

本研究が産み出す成果は、異常クローンの根絶 (total cell kill) が必要な MDS、AML 治療に向けた遺伝子発現制御薬創薬の新たなプラットフォーム構築に貢献することに繋がり、革新的な病態解析法及び薬効評価系が創造されることにつながる。さらに、MDS や AML の個別治療に繋がるバイオマーカーや本質的な新規治療薬に繋がる可能性を持つ。また、この疾患 iPS 細胞を用いた新しいプラットフォームは、骨髄性腫瘍のみならずエンハンサーハイジャックが関与する腫瘍性疾患全体に波及効果をもたらすと期待される。このように、学術的にも医療応用の観点からも本研究は高い創造性を持つものとする。

3. 研究の方法

1) 次世代シーケンサーを用いた非定型 *EVII* 遺伝子再構成 MDS 症例のゲノム解析

EVII-FISH 解析で非定型 *EVII* 遺伝子再構成を認める MDS 症例に関して、骨髄単核細胞のゲノム DNA を材料に、全ゲノムシーケンシングを行い *EVII* 転座の切断点を同定する。またターゲットシーケンシングにより、症例の腫瘍内多様性及びクローン進化の詳細な評価を行う。

2) MDS-iPS 細胞を用いた病態再現

1) で *EVII* 転座の切断点を同定した MDS 患者の骨髄もしくは末梢血の単核細胞から MDS-iPS 細胞を作製する。クローン多様性及び iPS 細胞作製過程における影響を考慮し、同一 MDS 症例から複数クローンを樹立し、以後の実験に供することを旨とする。MDS-iPS 細胞は、*EVII*-FISH 解析、核型解析、サンガーシーケンシングなどで元の患者検体と同一クローンであることを確認する。MDS-iPS 細胞を胚様体形成法による分化誘導系を用いて in vitro で造血誘導し、造血前駆細胞分画 (CD45+CD34+) などでソートして分画をそろえた上で、GM-CSF、G-CSF、IL3、IL-6、SCF、EPO 存在下でコロニーアッセイを行い、コロニー形成能力を評価すると共に、分化能力 (CFU-G、-M、-GM、-GEMM、-E など) も評価する。また造血前駆細胞から成熟血球誘導を行い、赤血球、好中球、巨核球などへの分化異常を、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原マーカー解析やギムザ染色による形態学的手法などで評価する。iPS 細胞由来造血前駆細胞の網羅的遺伝子発現解析 (RNA-Seq) を行い、MDS-iPS 細胞と正常 iPS 細胞での比較を行う。1) のターゲットシーケンシングから得られた遺伝子変異の情報を参考にして同一症例内でのクローン多様性、クローン進化についても検討する。

3) MDS-iPS 細胞の網羅的エンハンサー解析

MDS-iPS 細胞株及び再分化させた造血前駆細胞のゲノム DNA を材料に、H3K27ac などの

ChIP-seq により網羅的な転写制御領域の解析を行い、腫瘍特異的に活性化しているスーパーエンハンサーなどの転写調節部位を同定する。

4) スーパーエンハンサーを標的とした EVI1 発現抑制

MDS-iPS 細胞由来造血前駆細胞を用いて、3) で同定されたスーパーエンハンサーなどの転写制御領域を標的として、利用可能な BET 阻害剤などによる EVI1 発現抑制効果を確認する。さらに EVI1 発現抑制が得られた化合物に関しては、2) の病態再現系を用いて増殖及び分化異常の表現系が改善するかどうか検討する。増殖能の評価は MTS アッセイや Annexin V アッセイにて行い、分化能の評価は 2) と同様にコロニーアッセイ、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原マーカー解析やギムザ染色による形態学的手法などで評価する。

4. 研究成果

1) 次世代シーケンサーを用いた非定型 EVI1 遺伝子再構成 MDS 症例のゲノム解析

EVI1-FISH 解析で非定型 EVI1 遺伝子再構成を認めた t(3;8)(q26.2;q24)を持つ MDS 患者の骨髓単核細胞から抽出したゲノム DNA を用いて全ゲノムシーケンスを行い本転座の切断点を同定した。シーケンスの結果から本症例の染色体異常は、3q26 に存在する EVI1 遺伝子の転写開始点の上流領域と 8q24 領域の転座であることが分かり、EVI1 高発現の機序として 8q24 領域の転写調節領域が関与していることが推定された。また症例の骨髓検体のターゲットシーケンスを行い、ETNK1、EZH2、PTPN11 など MDS で高頻度に認められる変異を同定した。

2) MDS-iPS 細胞を用いた病態再現

1) で EVI1 転座の切断点を同定した MDS 患者の骨髓もしくは末梢血の単核細胞から複数の MDS-iPS 細胞及び正常 T 細胞由来 iPS 細胞を作製した。樹立した MDS-iPS 細胞は元の症例と同様の核型異常を保持しており、サンガーシーケンスにより元の患者 MDS 細胞と同一切断点をもつ転座であることを確認した。MDS-iPS 細胞株、正常 iPS 細胞株を造血誘導し、造血前駆細胞 (CD45+CD34+)、赤芽球系細胞 (CD235a+) の割合を検討したところ、正常 iPS 細胞株と比較して MDS-iPS 細胞株において有意に CD34 陽性率の上昇、CD235a 陽性率の低下を認め、元の症例で認めた血液成熟障害を反映していると考えられた (図 1)。また造血前駆細胞分画でソートしてコロニーアッセイを行ったところ、MDS-iPS 細胞株では骨髓球系、赤芽球系いずれのコロニー形成能も著明に障害されており、患者 MDS の病態を in vitro で再現することが可能であった (図 2)。

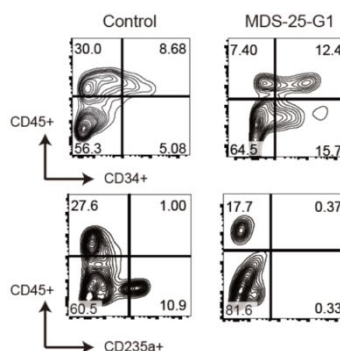


図 1. MDS-iPS、正常iPS細胞の造血系への分化成熟能の差異 MDS-iPS細胞において造血前駆細胞 (CD45 + CD34+) の割合の増加、CD235a陽性率の低下を認める。

MDS-iPS 細胞由来造血前駆細胞は正常 iPS 細胞由来と比較して、EVI1 の著明な発現上昇を認めた (図 3)。さらに iPS 細胞由来造血前駆細胞の網羅的遺伝子発現解析 (RNA-Seq) を行い、MDS-iPS 細胞と正常 iPS 細胞での比較を行ったところ、MDS-iPS 細胞由来造血前駆細胞では AML 関連の遺伝子の発現が亢進していた。

樹立した iPS 細胞のうち 5 クローンについて、1) のターゲットシーケンスから得られた遺伝子変異の有無についてサンガーシーケンスを用いて解析を行った。全ての株で ETNK1 及び EZH2 変異が検出されたが、PTPN11 変異を持つクローンは 1 株のみであり、本 MDS 症例におけるクローン多様性を反映していると考えられた。

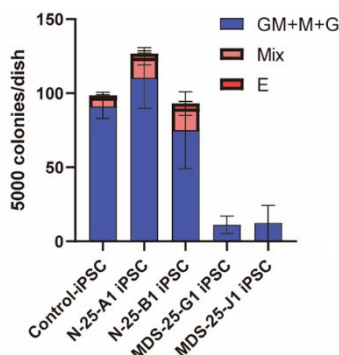


図 2. MDS-iPS細胞及び正常iPS細胞由来造血前駆細胞のコロニー形成能力の差異 MDS-iPS細胞は骨髓球系、赤芽球系いずれのコロニー形成能も著明に障害されている。

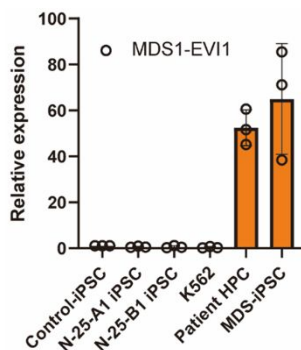


図 3. 定量的PCRによる造血前駆細胞のEVI1発現量の比較 MDS-iPS細胞由来及び患者由来造血前駆細胞は、正常iPS細胞由来造血前駆細胞と比較して、EVI1の著明な発現上昇を認めた。

3) MDS-iPS 細胞の網羅的エンハンサー解析

MDS-iPS 細胞株及び再分化させた造血前駆細胞のゲノム DNA を材料に、H3K27ac の ChIP-seq により網羅的な転写制御領域の解析を行ったところ、MDS-iPS 細胞では、未分化状態においても 8q24 の MYC distal enhancer 領域の活性化が見られた。(図 4)

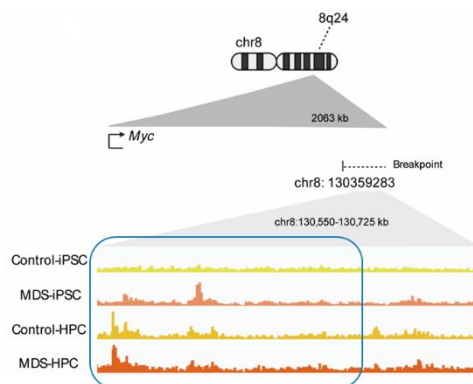


図 4. H3K27ac ChIP-seqによる8q24転写制御領域の解析
MDS-iPS細胞では、未分化状態においても8q24のMYC distal enhancer領域の活性化が見られる。

4) スーパーエンハンサーを標的とした EVI1 発現抑制

MDS-iPS 細胞株由来造血前駆細胞を用いて、3) で同定された転写制御領域を標的として BET 阻害剤 JQ1 による EVI1 発現抑制効果を確認し、Annexin V アッセイで用量依存性のアポトーシス誘導効果を確認した(図 5)

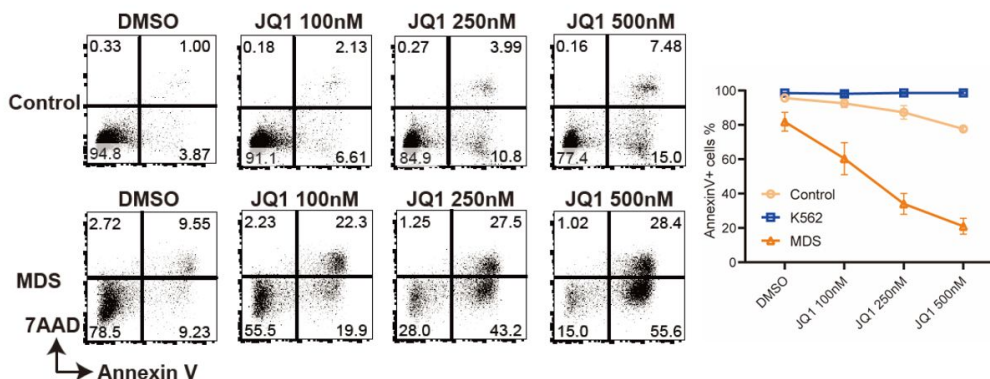


図 5. Annexin VアッセイによるBET阻害剤 JQ1のアポトーシス誘導効果の検討
MDS-iPS細胞株由来造血前駆細胞では用量依存性のアポトーシス誘導効果を確認する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Katagiri T, Espinoza JL, Uemori M, Ikeda H, Hosokawa K, Ishiyama K, Yoroidaka T, Imi T, Takamatsu H, Ozawa T, Kishi H, Yamamoto Y, Elbadry MI, Yoshida Y, Chonabayashi K, Takenaka K, Akashi K, Nannya Y, Ogawa S, Nakao S.	4. 巻 3
2. 論文標題 Hematopoietic stem progenitor cells with malignancy-related gene mutations in patients with acquired aplastic anemia are characterized by the increased expression of CXCR4	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EJHaem.	6. 最初と最後の頁 669-680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jha2.515.	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 Morimoto Y, Chonabayashi K, Kawabata H, Okubo C, Yamasaki-Morita M, Nishikawa M, Narita M, Inagaki A, Nakanishi K, Nagao M, Takaori-Kondo A, Yoshida Y.	4. 巻 6
2. 論文標題 Azacitidine is a potential therapeutic drug for pyridoxine-refractory female X-linked sideroblastic anemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Adv.	6. 最初と最後の頁 1100-1114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2021005664.	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 Tanabe M, Hosokawa K, Nguyen MAT, Nakagawa N, Maruyama K, Tsuji N, Urushihara R, Espinoza L, Elbadry MI, Mohiuddin M, Katagiri T, Ono M, Fujiwara H, Chonabayashi K, Yoshida Y, Yamazaki H, Hirao A, Nakao S.	4. 巻 36
2. 論文標題 The GPI-anchored protein CD109 protects hematopoietic progenitor cells from undergoing erythroid differentiation induced by TGF-	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia.	6. 最初と最後の頁 847-855
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-021-01463-3.	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村桃子
2. 発表標題 患者由来iPS細胞を用いた非定型3q26転座を有するAMLの病態解明
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

リプログラミング技術を用いた骨髄性腫瘍（MDS、AML）研究
<https://hematol.kuhp.kyoto-u.ac.jp/research/ips.html>

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
研究協力者	吉田 善紀 (Yoshida Yoshinori)		

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