

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16320

研究課題名（和文）白血病のエピジェネティクス制御因子の変異によって生じる分子異常の解明

研究課題名（英文）Molecular Abnormalities Caused by Mutations in Epigenetic Regulators of Leukemia

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：急性骨髄性白血病(AML)は難治性の造血器腫瘍であり、侵襲性の高い化学療法が標準治療として多く用いられるが、より腫瘍特異性の高い層別化治療の開発が望まれる。本研究では、AMLのエピジェネティクス制御因子、特にコヒーシン遺伝子変異に対し、転写装置に対する標的治療が有効性を示す可能性について検証した。ゲノム編集でコヒーシンや共存遺伝子の変異を導入した白血病細胞株を樹立し、CDK阻害剤が変異細胞に特異的に有効であることを見出した。また、白血病マウスモデルでも変異特異的な有効性が示された。以上より、エピジェネティクス遺伝子変異に特異的な転写異常を標的とした層別化治療開発の道筋が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白血病は患者間で極めて異なる臨床的・遺伝学的特徴を有するが、大部分の症例では画一的な化学療法や造血幹細胞移植が行われている。本研究ではエピジェネティクス制御因子の変異をもつ白血病細胞で特に転写異常が強く生じ得る点に注目し、変異陽性白血病が転写を阻害する薬剤に脆弱性を示すという仮説について検証を行った。遺伝子変異を導入した白血病細胞株を樹立し、培養実験およびマウスモデルにて転写を阻害するCDK阻害剤の薬効を測定したところ、変異陽性細胞は高い感受性を示した。以上より、白血病に高頻度に認められるエピジェネティクス遺伝子変異を標的とする層別化治療の開発が期待できるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Acute myeloid leukemia (AML) is a refractory hematopoietic neoplasm, and although highly invasive chemotherapy is often used as standard treatment, the development of more tumor-specific stratified therapy is desirable.

In this study, we investigated the potential efficacy of molecularly targeted drugs targeting the transcription system against mutations in epigenetic regulators of AML, particularly cohesin complex components. We established and cultured leukemia cell lines in which cohesin and coexisting mutations were introduced by genome editing, and showed the efficacy of the drugs including the CDK inhibitor. The drug also showed mutation-specific efficacy in a mouse model of leukemia. These findings pave a way toward the development of stratified therapies targeting mutation-specific transcriptional abnormalities.

研究分野：血液内科学

キーワード：急性骨髄性白血病 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)に対して、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、特に忍容性の低い高齢者について、有効かつ安全な新規治療法の開発が特に望まれる。

これまでの次世代シーケンサーを用いた大規模ゲノム解析により、15%程度のAML・骨髄異形成症候群(MDS)がSTAG2などのコヒーシン遺伝子変異を有することが報告された。さらに、コヒーシン遺伝子変異陽性例では、他のエピジェネティクス制御因子の変異が高頻度に共存し、病態の進展に関わっているものと考えられる。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であったが、我々はコヒーシン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Pol IIの転写異常を起こす事を報告した(Ochi et al., Cancer Discov, 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おり、コヒーシン変異環境下では、転写関連遺伝子・タンパク群に対して脆弱性を示すことが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、白血病に高頻度に認められるエピジェネティクス制御因子の遺伝子変異を標的とする腫瘍特異的治療の開発を目的とする。特に、コヒーシン遺伝子変異が広範な転写異常をもたらすことに注目し、脆弱性を示すことが予想される転写装置やエンハンサーを標的とした治療薬の有効性と分子機序を検証する。

3. 研究の方法

CRISPR-Cas9ゲノム編集によって、コヒーシン遺伝子変異を含む複数のエピジェネティクス遺伝子変異の組み合わせを有する白血病細胞株を数種類樹立し、エピジェネティクスに作用する既存候補薬剤の有効性を検証した。白血病細胞株はHL-60、K562細胞株を用いた。

薬効試験には、エンハンサーを標的とするBET阻害剤や、Pol IIの転写伸長反応を標的とするCDK阻害剤に加え、DNA repair経路に作用するPARP阻害剤を使用した。野生型および変異型の白血病細胞株を薬剤混入培地にて短期培養し、細胞増殖アッセイを行った。薬効の評価のために、IC50を定量した。また、コヒーシン欠損白血病細胞株を免疫不全マウスに皮下移植し、CDXマウスモデルを樹立した。このマウスに対し、抗癌剤あるいは候補薬剤を投与し、皮下腫瘍径を測定することで、腫瘍細胞の薬剤応答性を評価した。共存変異と薬剤感受性の関係についても検証するために、STAG2/RUNX1ダブルノックアウトの白血病細胞株についても同様の検証を行った。

また、AMLにおける遺伝子変異および薬剤スクリーニングの大規模公開データ(Tyner et al., Nature 2018)を用いて、遺伝子変異、遺伝子発現、薬剤感受性の関連解析を行った。解析には東京大学医科学研究所のスーパーコンピューターを使用した。

4. 研究成果

ゲノム編集によって樹立したコヒーシンSTAG2ノックアウト白血病細胞株を用い、遺伝子変異特異的に抗がん作用を示すことが期待される薬剤の有効性を検討した。さらに、共存変異の意義と薬剤感受性の変化についても明らかにするために、STAG2/RUNX1ダブルノックアウトについても検証した。

白血病細胞株を薬剤混入培地で短期培養するin vitroアッセイでは、BET阻害剤の有効性はコヒーシン遺伝子欠損の有無に影響されなかった。一方、PARP阻害剤やCDK阻害剤はコヒーシン遺伝子野生型株に比べ、コヒーシン遺伝子欠損株に特に有効であった。すなわち、コヒーシン変異細胞は特定の薬剤に対して変異特異的な脆弱性を示すことが明らかになった。また、PARP阻害剤はコヒーシン変異有無に依存した薬効を示し、STAG2/RUNX1共存変異株でも概ね同程度の有効性であった。一方、CDK阻害剤はSTAG2単独変異株より、STAG2/RUNX1共存変異株に対してより大きな効果を示したことから、共存変異による協調的な転写異常が本薬剤の有効性に影響しているものと考えられた。

次に、急性骨髄性白血病患者における遺伝子変異および薬剤スクリーニングの大規模公共データベース(Tyner et al., Nature 2018)を用いて、コヒーシン遺伝子変異に特異的に有効性を示す薬剤・化合物のスクリーニングを行った。その結果、コヒーシン遺伝子変異を有する白血病に特異的に有効と考えられる候補薬剤を複数同定することができた。これらの候補薬剤については、今後、上記と同様のアッセイ系を用いて薬剤感受性試験を実施していくよう計画である。また、興味深いことに、コヒーシン遺伝子変異のみならず、エピジェネティクス制御パスウェイに変異を有する様々な急性骨髄性白血病患者で類似した薬剤感受性プロファイルを示す傾向が

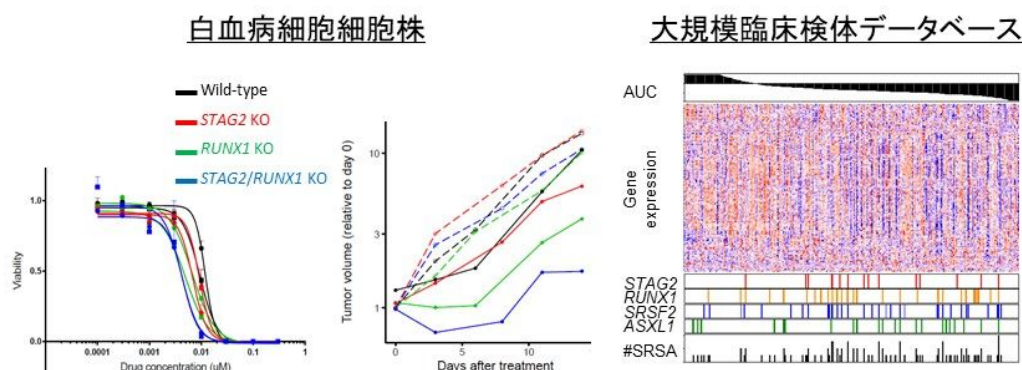
認められたことから、特定の遺伝子変異のみによらず共通の分子機構が広範な白血病患者に認められ、分子層別化治療の対象となる可能性が示唆された。

また、コヒーシン欠損 HL-60 細胞株を免疫不全マウスに皮下移植し、薬剤感受性を試験可能な実験系を構築した (CDX マウスモデル)。in vitro でコヒーシン遺伝子変異株に有効性が示された上記の薬剤に関して、この CDX マウスモデルを利用した薬剤感受性試験を実施したところ、in vitro と同様の傾向を示し、コヒーシン遺伝子変異陽性株に対して特に顕著な腫瘍抑制効果を示した。また、特に RUNX1 変異共存時には、一段と顕著な腫瘍縮小を認め、同様の転写制御メカニズムを引き起こす遺伝子変異間の協調的な効果が、薬剤応答性においても確認できた。以上より、in vivo においても遺伝子変異特異的な薬剤応答が確認できた。

最後に、CRISPR ライブラリスクリーニングを実施し、コヒーシン欠失細胞の増殖あるいは増殖抑制に作用し得る遺伝子群の網羅的な探索を行った。その結果、コヒーシン遺伝子ノックアウトにより脆弱性を示し得る多数の遺伝子群を同定することができた。今後、同定された脆弱性を示す遺伝子群に対し、個々の遺伝子ノックアウトによる検証実験を実施予定である。

以上の成果より、白血病特異的な遺伝子変異、特にエピジェネティクス制御因子を標的とする層別化治療について、いくつかの候補薬剤について有望な有効性が認められ、引き続き開発を進めることが望ましいと考えられた。

図1: STAG2・RUNX1変異白血病に対するCDK阻害剤の有効性



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ochi Yotaro	4. 巻 117
2. 論文標題 Genetic landscape of chronic myeloid leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 30 ~ 36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-022-03510-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 Takeda June, ... , Ochi Yotaro, et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 Amplified EPOR/JAK2 Genes Define a Unique Subtype of Acute Erythroid Leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 410 ~ 427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2643-3230.BCD-21-0192	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 Makishima Hideki, ... , Ochi Yotaro, et al.	4. 巻 141
2. 論文標題 Germ line DDX41 mutations define a unique subtype of myeloid neoplasms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 534 ~ 549
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2022018221	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 Aoki Kazunari, Hyuga Mizuki, Tarumoto Yusuke, Nishibuchi Gohei, Ueda Atsushi, Ochi Yotaro, Sugino Seiichi, Mikami Takashi, Kobushi Hirokazu, Kato Itaru, Akahane Koshi, Inukai Takeshi, Takaori-Kondo Akifumi, Takita Junko, Ogawa Seishi, Yusa Kosuke	4. 巻 143
2. 論文標題 Canonical BAF complex regulates the oncogenic program in human T-cell acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 604 ~ 618
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2023020857	査読の有無 無
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 64
2. 論文標題 慢性骨髄性白血病のクローン進化と臨床的意義	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 369 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.64.369	査読の有無 無
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7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yotaro Ochi, Hiroshi I Suzuki, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Molecular mechanism of leukemogenesis caused by cohesin mutations
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of JCA (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 越智陽太郎
2. 発表標題 コヒーシン遺伝子変異によるMDS発症機構
3. 学会等名 Advanced Hematology Seminar 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yotaro Ochi
2. 発表標題 Clonal evolution and clinical implications of genetic abnormalities in blastic transformation of chronic myeloid leukemia
3. 学会等名 Japan Adult Leukemia Study Group 35th Anniversary International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 越智陽太郎
2. 発表標題 コヒーシオン遺伝子変異による白血病発症の分子機構
3. 学会等名 第二回日本医学会連合Rising Starリトリート
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 越智陽太郎
2. 発表標題 Integrated Epigenetic and Genetic Profiling of Acute Myeloid Leukemia
3. 学会等名 The 82nd Annual meeting of JCA (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 越智陽太郎
2. 発表標題 Chromatin accessibility profiling demonstrates epigenetic heterogeneity in acute myeloid leukemia
3. 学会等名 JSH2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yotaro Ochi
2. 発表標題 Epigenetic Classification of Acute Myeloid Leukemia Revealed By Genome-Wide Chromatin Profiling
3. 学会等名 65TH ASH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION
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
---------	---------