

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23689050

研究課題名(和文) MLL白血病におけるAEP複合体の作用機序

研究課題名(英文) The role of the AEP complex in MLL fusion-dependent leukemogenesis

研究代表者

横山 明彦 (Yokoyama, Akihiko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10506710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,100,000円

研究成果の概要(和文)：癌が多くの人の健康を脅かす中、白血病は乳児を含む若年層にも起こりうる病気である。MLLという遺伝子に異常が起こることで引き起こされる白血病は乳児白血病の大きな原因の一つであり、現在の治療法では未だ予後が悪い。我々は、MLL関連白血病の発症メカニズムを明らかにし、最終的には新しい治療法の開発を目指す。本研究において、MLL変異体が異常な遺伝子発現を引き起こす仕組みを明らかにした。MLL変異体はまずAEPという遺伝子制御因子と結合し、さらに細胞内の別の遺伝子発現制御因子と協調して癌を引き起こしていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Cancer threatens the lives of many people. Even the young generation including infants suffers from leukemia. One of the major causes of infant leukemia is the mutation of the MLL gene. The prognosis of this type of leukemia is unfavorable in the current regimens. We aim to develop new therapeutic strategies for this leukemia by deciphering the mechanisms of the genesis of leukemia. In this research, we unveiled the mechanisms by which MLL mutants cause hyper activation of their target genes. We showed that MLL mutants first associate with a transcriptional regulatory factor called AEP and then recruit other regulatory factors to activate gene expression to cause leukemia.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：白血病 MLL 転写 AF4

1. 研究開始当初の背景

染色体転座によって MLL キメラが形成されると細胞は白血病化する。MLL 白血病は乳児に多く、予後は悪いため、新たな治療法の確立が切実に望まれている。MLL の融合パートナーは多岐に渡り 60 種類以上もある。しかし、融合パートナーごとの発症頻度は非常に偏っており、全 MLL 白血病症例中の 3 分の 1 が AF4 ファミリー(AF4, AF5q31 など)とのキメラに起因し、もう 3 分の 1 が ENL ファミリー(ENL 及び AF9)とのキメラによる。近年、申請者らは AF4、AF5q31、ENL が P-TEFb と一つの高次複合体(AEP)を形成する事を見いだした(Yokoyama et al. Cancer Cell 17(2): 198-212 2010)。P-TEFb は CDK9 と CyclinT1 から成る複合体であり、RNAPolymeraseII(PolII)をリン酸化して転写伸長を促進する。従って AEP もまた PolII に直接作用する事が予想される。MLL は造血細胞において HOXA9 などの HOX 関連因子の転写を活性化する。HOXA9 には造血細胞の自己複製を促進し幹細胞のプールサイズを大きくする働きがあり、分化の進行に伴ってその発現は抑制される。MLL キメラは HOXA9 の転写を恒常的に活性化する事により、細胞の無制限な自己複製を引き起こす。正常組織における MLL 標的遺伝子の転写は、AEP が標的クロマチンに条件的にリクルートされたり、解離したりする事によって調節されている。一方で MLL と AEP 構成因子とのキメラ(例 MLL-AF4, MLL-ENL)は、MLL と AEP の ハイブリッド複合体を形成して、AEP 構成因子を標的クロマチンに恒常的にリクルートする事で転写を恒常的に活性化する。MLL-AF6 は直接 AEP と結合しないが、何らかの間接的なメカニズムを介して AEP を恒常的にリクルートすることで転写を活性化している。これらの結果は、AEP が MLL 標的クロマチンに恒常的にリクルートされ、転写が活性化され続ける事が白血病化の根源的な原因であるという事を示している。本研究で AEP がどのようなメカニズムで標的クロマチンに作用し、転写を促進するのかを明らかにする。

2. 研究の目的

申請者は本研究期間内に以下の三つの問いに答えることで、AEP の作用メカニズムを解明する。

(1) 「AEP はいかにして転写を活性化するか？」

造血細胞のトランスフォーメーションに必要な AEP の機能ドメインを同定し、そのドメイン構造の機能を調べる事で AEP 複合体が転写を活性化するメカニズムを明らかにする。

(2) 「すべての MLL キメラは AEP 依存的に転写を活性化するか？」

50 種類以上ある未解析の MLL キメラが、AEP を介してがん化能を発揮しているかどうかを調べる。AEP は本来 MLL 標的遺伝子領域に条件的にリクルートされ、転写を活性化する。主要な MLL キメラはすべて AEP を恒常的にリクルートする事で白血病を引き起こしていた。MLL-AF6 の様に AEP と直接結合しないけれども、間接的なメカニズムで AEP をリクルートする MLL キメラも存在する。AEP と直接結合しない MLL キメラは、AEP の上流のイベントを活性化している可能性が高い。様々な MLL キメラの白血病化における AEP 依存性を調べる事で AEP の周辺で働く因子を同定する。

(3) 「AEP はどのようなメカニズムで標的クロマチンにリクルートされるのか？」

AEP は何らかのエピジェネティックな変化に呼応して標的クロマチンと結合すると考えられる。AEP が直接結合するクロマチン構造を明らかにし、そのような修飾を施すエピジェネティック制御因子を同定する。これらの解析によって AEP が条件的に標的クロマチンに作用するメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究計画では以下の研究を平行して行う。

1. マウス白血病モデルを用いて AEP が転写を活性化する上で必要なドメイン構造を同定する。
2. AEP の転写活性化に必要なドメインに結合するタンパク質を同定する。
3. AEP 構成因子に対する sh-RNA を用いて様々な MLL キメラの AEP 依存性を調べる。
4. 修飾ヒストンペプチドを用いて AEP が結合する標的クロマチン構造を明らかにする。

申請者はこれまでに AEP 複合体による転写活性化が MLL 白血病の原因である事を見いだしてきた。本研究ではどのような分子メカニズムで AEP が転写を活性化するのかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 「AEP はいかにして転写を活性化するか？」

MLL-AEP キメラがトランスフォーメーション活性を発揮するために必要な機能ドメインをマウス骨髄前駆細胞トランスフォーメーションアッセイを用いて解析した。このアッセイは、マウス骨髄から骨髄前駆細胞を採取し、任意の遺伝子を遺伝子導入した後、半固形培地で培養しコロニー形成能を観察する。MLL キメラ変異体によってトランスフォームした細胞は高い HOXA9 発現と 3 代、4 代と継代してもコロニーを作り続ける性質を示す。様々な MLL-AF4 キメラ変異体を解析したところ、AF4 の pSER ドメインと呼ばれる serine が豊富な

構造がトランフォーメーションに必須であることがわかった。次に、この構造と GAL4 の DNA 結合ドメインを融合させた人工蛋白質は転写活性化能を示したことから、この構造がなんらかの転写関連因子と結合して転写を活性化することで造血細胞をトランスフォームしていると考えられた。そこで、この GAL4-pSER 蛋白質に結合する因子を探索した結果、SL1 と呼ばれる転写関連因子が同定された。MLL-ENL によって不死化された細胞において SL1 の構成因子である TAF1C をノックダウンすると、MLL キメラの標的遺伝子である HOXA9 の発現低下が見られた。これらの結果から、MLL-AEP キメラは SL1 を介して転写を活性化し、造血細胞をトランスフォームすると考えられた。この結果は本報告書作成時点で学術誌に投稿され審査中である。

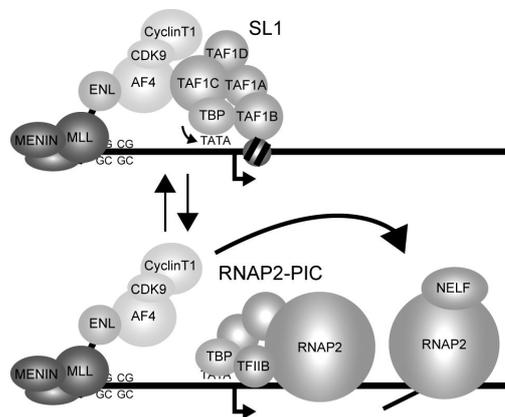


図1、MLL キメラによる転写活性化のメカニズム

(2) 「すべての MLL キメラは AEP 依存的に転写を活性化するか？」

様々な MLL キメラによるトランフォーメーションが AEP を介するものかどうかを調べるために、MLL キメラによって不死化された細胞において AEP の構成因子である ENL をノックダウンした場合のコロニー形成能の変化を調べた。その結果、調べたすべての MLL キメラが程度の差はあるものの ENL ノックダウンによってコロニー形成能の減弱をしめした。これらの結果は、MLL キメラは程度の差こそあれ、AEP の活性に依存して造血細胞を不死化しており、AEP の機能が分子標的となりうることを示唆した。

(3) 「AEP はどのようなメカニズムで標的クロマチンにリクルートされるのか？」

MLL-AEP キメラを発現する細胞において AEP は直接的な結合を介して MLL キメラによってリクルートされる。MLL-AEP 以外の MLL キメラにおいて AEP がリクルートされるメカニズムはよくわかっていなかった。我々は AEP 中の ENL が特定のヒストン修飾を認識すること

で特定のクロマチンにリクルートされるという仮説を立てて解析を行った。ENL は N 末端側に YEATS ドメインと呼ばれる構造を持ち、このドメインがヌクレオソームとの結合に必要であるという知見を得た。計画当初はこのようなクロマチン結合ドメインのリコンビナント蛋白質を作成し、ペプチドプルダウンアッセイを用いて解析することを計画していたが、より生理的な条件下で結合するヌクレオソームに含まれる修飾を質量分析にて網羅的に調べる手法がコストパフォーマンス、精度共に優れていると判断してこちらの解析に切り替えた。ENL に結合するヌクレオソーム中のヒストン修飾を調べたところ、アセチル化 Histone H3 K27 が優位に濃縮されていることがわかった。このことから、ENL がアセチル化ヒストンと直接結合することで標的クロマチンにリクルートされることが予想された。しかし、我々の研究が進行している最中に、この観察結果を含む詳細な解析結果が、アメリカのテキサス大学の Xiaobing Shi らのグループによって発表された (Li et al. Cell 2014 159:558-571)。これを受けて、この目的での研究は一旦中止した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. *Yokoyama, A. Molecular mechanisms of MLL-associated leukemia. International Journal of Hematology 2015 101:352-361
2. #Okuda H, # Kawaguchi M, # Kanai A, # Matsui H, Kawamura T, Inaba T, Kitabayashi I, *Yokoyama A MLL fusion proteins link transcriptional coactivators to previously active CpG-rich promoters Nucleic Acids Research 2015 42:7 4241-4256
3. *Yokoyama A, Ficara F, Murphy M, Meisel C, Hatanaka C, Kitabayashi I, *Cleary ML MLL becomes functional through intra-molecular interaction not by proteolytic processing. PLOS ONE 2013 (9):e73649
4. *Yokoyama, A. Molecular mechanisms of leukemogenesis in MLL-leukemias. Rinsho Ketsueki 2011 52(8), 679-685

〔学会発表〕(計 6 件)

5. 「Reading epigenetic marks and activating transcription by MLL fusion proteins」第9回 3R Symposium 2014
6. 「Mechanisms of aberrant self-renewal caused by MLL fusion oncoproteins」第

4回 Global Cancer Genomics Consortium
2014

研究者番号：10629215

7. 「The molecular mechanisms of MLL fusion-dependent leukemic transformation」第5回 日本血液学会 国際シンポジウム 2014
8. 「Molecular mechanism of MLL fusion-dependent transformation Japan-US Hematology meeting」(日米造血器腫瘍セミナー) Yokoyama A., 2013
9. “Molecular mechanism of MLL-associated leukemia” 第72回日本癌学会学術総会 Yokoyama A., 2013
10. 「MLL白血病の発症メカニズム」平成23年度 第3次対がん10か年総合戦略(平成16年~25年度)・文部科学省 がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 合同公開シンポジウム 横山明彦 2012

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dsk.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

横山 明彦 (YOKOYAMA, Akihiko)
京都大学・医学研究科・特定准教授
研究者番号：10506710

(2)研究協力者

奥田 博史(OKUDA, Hiroshi)
京都大学・医学研究科・特定助教