

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670450

研究課題名(和文) MLL融合蛋白質がニッチ非依存的に自己複製を活性化する分子メカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms of niche-independent self-renewal by MLL fusion proteins

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：白血病は多くの場合、自己複製の過剰な活性化による無制限な造血細胞の増殖によって引き起こされる。MLL融合遺伝子はそれ単体で白血病幹細胞をin vitroで作ることができることから、幹細胞の居場所であるニッチを必要としていないと思われる。本研究で我々は、MLL融合遺伝子産物の機能を詳細に解析し、このがん遺伝子産物がニッチ非依存的に自己複製を活性化するメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Leukemia is often caused by a mutation which hyper-activates self-renewal. Normally self-renewal is controlled by the niche so that the stem cells are not overly produced. Some mutations such as MLL fusion are thought provoke niche-independent self-renewal to cause leukemia. In this research project, we investigated the mechanism by which MLL fusion stimulates self-renewal in the absence of the niche and proposed a novel mechanism of cell-autonomous self-renewal.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：自己複製 白血病 ニッチ 転写

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は多くの場合、活発な自己複製をする事で病気を引き起こすが、そのメカニズムは良く分っていない。正常な幹細胞はニッチから発せられるシグナルによって自己複製すると思われるが、がん幹細胞は *in vitro* でも人工的に作り出すことができることからニッチに依存しない自己複製能を獲得している可能性が高い。MLL 融合遺伝子は、非常に予後の悪い白血病を引き起こすがん遺伝子である。MLL 融合遺伝子を *in vitro* でマウス骨髄前駆細胞に導入すると細胞は不死化し、さらに同系マウスに移植すると白血病を発症する。この事は MLL 融合遺伝子が生体内のニッチに依存せずにごん幹細胞を生み出すことができるという事を示している。我々はこれまでに MLL 融合蛋白質が自律的な自己複製を促進し、細胞を不死化する分子メカニズムを調べてきた。

2. 研究の目的

がん幹細胞とは自己複製能を獲得したがん細胞であると考えられるが、自己複製の分子メカニズムはよくわかっていない。*in vitro* (ニッチの無い環境) で分化能を維持したまま造血幹細胞を増幅させる事は大変難しいが、白血病発症能を維持したまま白血病細胞を増幅させる事は比較的容易である。この事から、正常な造血幹細胞はニッチに厳しく制御され不必要に自己複製しないようにコントロールされている一方で、白血病幹細胞はニッチによる制御を受けない自律的な自己複製能を獲得していると考えられる。本研究で我々はこのがん特異的な自己複製メカニズムの詳細を明らかにする事を目指す。我々は、MLL 融合蛋白質によるニッチ非依存的な自己複製のメカニズムを詳細に調べる事によって、長期的にはがん特異的な自己複製作用を阻害するための分子標的を見いだしたいと考えている。そのために、本研究期間内に下記の三つの目的に取り組み、MLL 融合蛋白質複合体がニッチからのシグナルに依存せずに、標的を認識し、転写を活性化し、白血病を引き起こすメカニズムを明らかにする。

- 1.LEDGF がクロマチン上で構成する複合体の解析
- 2.PWWP ドメインが結合するクロマチンの解析
- 3.MLL 融合蛋白質複合体がニッチ非依存的に自己複製を促進するメカニズムの解明

3. 研究の方法

白血病を引き起こす MLL 融合蛋白質はニッチ非依存的な自己複製を促進する事で病気を引き起こしている。我々は MLL 融合蛋白質複合体の構成因子であり、クロマチン結合因子である LEDGF がクロマチン上で形成する複合体を解析する事で、MLL 融合蛋白質複合体がクロマチンと結合するために必要な共作用

因子を同定し、その意義をマウス白血病モデルにて検証する。それによって MLL 融合蛋白質がニッチ非依存的に自己複製を活性化する分子メカニズムを明らかにするとともに、がん特異的な自己複製を阻害する分子標的薬の創製に向けて、候補となる分子標的を同定する。

1.LEDGF がクロマチン上で構成する複合体の解析

LEDGF を 293T 細胞に一過性に発現させたのちにクロマチンを調整し、LEDGF を複合体を精製する。精製物を質量分析にて調べることで LEDGF がクロマチン上で結合する因子を同定する。

2. PWWP ドメインが結合するクロマチンの解析

PWWP ドメインのみを 293T 細胞に一過性に発現させ、精製物を質量分析にて調べることで PWWP ドメインが特異的に結合するヒストン修飾を同定する。

3.MLL 融合蛋白質複合体がニッチ非依存的に自己複製を促進するメカニズムの解明

マウス白血病発症モデルを用いて、MLL 融合タンパク質複合体が造血細胞を不死化する上で必須の構造を同定する。

4. 研究成果

1.LEDGF がクロマチン上で構成する複合体の解析

LEDGF を 293T 細胞に発現させ、その共作用因子を質量分析によって同定するという実験を行った結果、既知の LEDGF 結合因子(MENIN, CDCA7L, POGZ)に加えて、十種類程度の新規結合因子が同定された。これらは LEDGF の IBD ドメインに結合する因子であり、MLL 融合蛋白質複合体とは相互排他的に結合するものだった。例えば、POGZ などは転写が抑制的なヘテロクロマチンと結合する HP1 と結合すると考えられており、MLL 融合蛋白質複合体の標的クロマチンへの結合には直接関係がない。LEDGF は IBD ドメインを介して様々な、転写抑制因子や転写活性化因子と結合しており、それ自身には転写の方向性を決める機能はないと思われた。

2. PWWP ドメインが結合するクロマチンの解析

LEDGF は自身に含まれる PWWP ドメインを介してクロマチンと結合していることから、次に PWWP ドメインが結合しているヌクレオソームとその他の共作用因子を質量分析にて解析した。その結果 PWWP ドメインは H3K36me2/3 に特異的に結合していることが確認されたが、他の共作用因子は同定されなかった。このことから、LEDGF は PWWP ドメインと結合して H3K36me2/3 に特異的に結合し、さらに IBD を介して他の共作用因子と結合することで異なるクロマチン領域に作用すると考えられる。H3K36me3 は転写の活発な遺伝子のコーディング部分に多く見られるエピジェネ

ニックマーカである。H3K36me2 は比較的にどこにでもある標識だが、転写の活発なプロモーターの転写開始点近傍でより多く見られる事が報告されている。MLL 融合蛋白質複合体は転写の活発なプロモーターの転写開始点近傍に特異的に局在することが我々の ChIP-seq 解析によって確認された。したがって、MLL 融合蛋白質複合体の場合は LEDGF の PWWP ドメインと MLL 部分の機能が転写の活発なクロマチン領域に対する親和性を持っているために特異的に転写の活発なクロマチンへと作用するのであると考えられた。

3. MLL 融合蛋白質複合体がニッチ非依存的に自己複製を促進するメカニズムの解明

我々は以前に、LEDGF の PWWP ドメインと MLL-ENL の MENIN 結合モチーフを置換した PWWP-MLL-ENL 変異体が不死化能を示すことを見出していた。我々は、MLL 融合蛋白質複合体が標的クロマチンを認識するために必要な構造を同定するべく、様々な PWWP-MLL-ENL 部分欠損変異体を作成し、その骨髄細胞の不死化能を調べた。その結果、MLL-ENL が標的を認識するためには LEDGF の PWWP 以外に MLL の CXXC ドメインのみが必要であることがわかった。CXXC ドメインは抑制されていないプロモーターに多く含まれる CpG 配列と特異的に結合する。これらの結果から、MLL 融合蛋白質複合体は LEDGF 部分の PWWP ドメインと MLL 部分の CXXC ドメインを介してクロマチンに結合することがわかった。実際に、PWWP ドメインと CXXC ドメインを融合させた人工タンパク質は HOXA9 遺伝子のプロモーターに結合することができた。したがって、MLL 融合蛋白質複合体は、PWWP ドメインを介して過去に転写が活発であったクロマチンを認識し、CXXC ドメインを介して抑制されていないプロモーターを認識する。その結果、MLL 融合蛋白質は以前に転写されたプロモーターを認識してその転写を活性化するという事を見いだした(図1)。自己複製とは「親細胞と同じ遺伝子発現プロファイルを持つ娘細胞を生み出す増殖の様式」だと考えられる。MLL 融合蛋白質は以前に転写された事を示すエピジェネティックマークを認識し、その近傍の遺伝子の転写を活性化すると、そこには転写が行われた事を示すエピジェネティック標識が残されるため、さらに MLL 融合蛋白質による転写活性化を受ける。このようなサイクルによって**親細胞で転写されていた遺伝子を同じように発現する娘細胞が生まれる**事が MLL 融合蛋白質によるニッチ非依存的な自己複製の本質的なメカニズムであると思われる。

LEDGF の PWWP が特異的な機能を持っているために MLL 複合体の転写を活性化できるのか、それとも同様に H3K36me2/3 に特異的に結合できる他の PWWP ドメインでも MLL 融合蛋白質複合体依存的な自己複製の促進

をできるのかどうかを調べるために、ドメインスワッピング実験を行った。これまでに、H3K36me2/3 に特異的に結合することがわかっている BRPF1 の PWWP ドメインや、機能未知の HRP2 の PWWP ドメインを LEDGF の PWWP ドメインと置き換えた変異体を作成し、骨髄細胞の不死化活性を調べた。その結果、すべての PWWP ドメインが自己複製を促進する活性を示し、細胞を不死化した。この結果から、自己複製に必要な LEDGF の機能は H3K36me2/3 に特異的に結合することであることが示唆された。

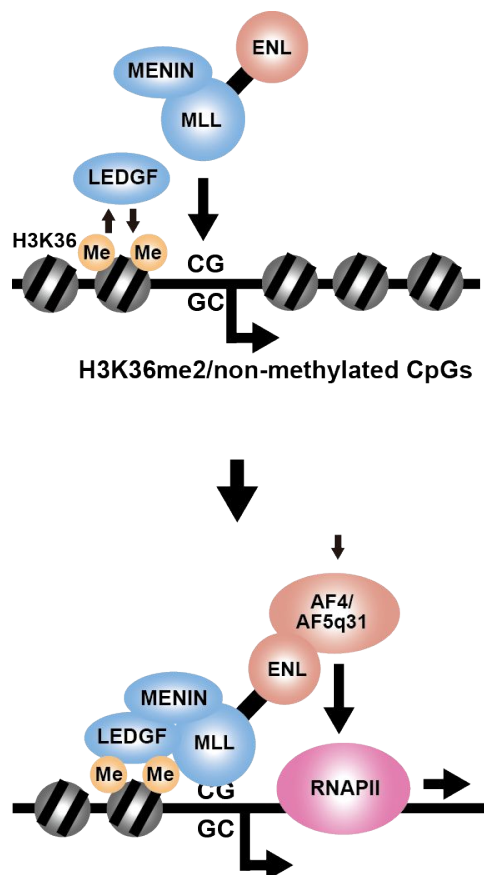


図1 MLL 融合タンパク質複合体が標的遺伝子を認識するメカニズム

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3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

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 「Reading epigenetic marks and activating transcription by MLL fusion proteins」第 9 回 3R Symposium 2014
2. 「Mechanisms of aberrant self-renewal caused by MLL fusion oncoproteins」第 4 回 Global Cancer Genomics Consortium 2014
3. 「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
4. 「Molecular mechanism of MLL-associated leukemia」第 72 回日本癌学会学術総会 Yokoyama A. 2013

〔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
研究者番号：10629215