

48. 7 番染色体欠失を有する白血病特異的な治療標的の探索

黒川 峰夫

東京大学 医学部附属病院 血液腫瘍内科

Key words : 白血病, 7 番染色体欠失, エピゲノム異常, iPS 細胞, 網羅的遺伝子発現解析

結 言

難治性造血器腫瘍の治療開発を推進するためには、網羅的解析技術により遺伝子異常を同定することに加え、エピジェネティクス、代謝、骨髄造血環境など、難治性病態を形成する異常の相互作用を、*in vitro*、*in vivo*の適切なモデルを活用して明らかにし、治療標的化する必要がある。その中でも 7 番染色体欠失（モノソミー7）を有する急性骨髄性白血病（AML）は極めて難治性であり、その治療標的の同定と制御は重要な課題である [1]。一方で、モノソミー7の存在が AML や骨髄異形成症候群（MDS）の予後に与える影響についてはこれまでに多数の報告があるのにも関わらず、モノソミー7が癌化を促進するメカニズムに関してはいまだに十分に理解されていない [2]。これまでの研究から、多数の癌抑制遺伝子が第 7 染色体上にコードされており、7 番染色体の欠失によりそれらの作用が減弱し、腫瘍化の原因となると考えられている。これはモノソミー7の腫瘍化メカニズムは単一遺伝子の欠失により全てが説明できるのではなく、癌抑制遺伝子を含んだ多数の遺伝子の欠失が複合的に作用した結果であることを示唆している。実際に、これまでの報告から、SAMD9、SAMD9L、CUX1 といった癌抑制遺伝子だけでなく、H3K4 のヒストンメチル化酵素の一種である MLL3 や、H3K27 のヒストンメチル化酵素の一種である EZH2 といったエピジェネティックな制御に関わる因子、LUC7L2 のような RNA スプライシングに関わるような因子などの欠失がモノソミー7 の責任遺伝子の 1 つであるとされている [3, 4]。さらに、7 番染色体の欠失は AML の病態形成の早期に獲得される異常であり、7 番染色体の欠失を獲得した造血幹細胞は、SAMD9 や SAMD9L の欠失により他の造血幹細胞と比較して優位な増殖能を獲得し、クローン性に拡大していき、その後 MLL3 や EZH2 の欠失によるエピジェネティクス制御の異常によりエピゲノム異常が蓄積され、白血病に進展するということが知られている。このように、7 番染色体の欠失により腫瘍抑制遺伝子の作用減弱、エピゲノム異常や RNA スプライシングの異常といったさまざまな現象が生じることが報告され、それらが協調して予後不良な AML を形成すると考えられるものの、治療標的の同定という観点からすると何らかの単一の標的を同定することは極めて重要である。単一の標的は単一の遺伝子に限るわけではなく、特定の経路がモノソミー7 を有する AML の維持において重要であるのであれば、その経路に介入するというのも治療戦略の 1 つ考えられる。しかし、現時点ではこれらの研究からモノソミー7 を有する AML に対する特異的な治療標的の同定には至っておらず、依然としてその予後は不良のままである。

方法および結果

1. モノソミー7 を有する AML 細胞の生存は *EED* 遺伝子の発現に選択的に依存している

今回我々は、7 番染色体欠失によりエピゲノム異常が生じることに着目し、7 番染色体を有する AML 細胞株を用いてヒストン修飾に関連する遺伝子に対する siRNA ライブラリーによるドロップアウトスクリーニングを行い、結果として鍵遺伝子 *EED* を同定した (図 1)。EED は、ポリコーム抑制複合体 2 (PRC2) の構成分子であり、ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基 (H3K27) のジメチル化およびトリメチル化の反応を触媒する際に重要な分子として知られている。

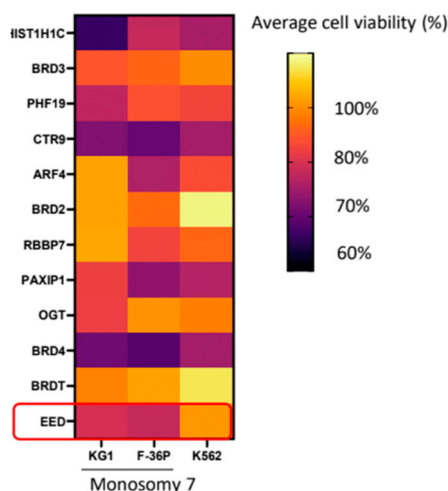


図1. *EED* 遺伝子のノックダウンはモノソミー7 染色体異常を有する AML 細胞株の生存割合を選択的に抑制する。

3つの異なる AML 細胞株 (KG1、F-36P、K562) において shRNA を用いたヒストン修飾関連遺伝子についてそれぞれノックダウンを実施し、細胞株の生存割合を ATP 試薬を用いてプレートリーダーで評価した。

2. モノソミー7 を有する AML 細胞の生存において *EED* 遺伝子の発現が重要となる直接的な要因は、7 番染色体上に存在する *GTF2I* 遺伝子が欠失していることにある

さらに、7 番染色体欠失を持たない AML 細胞株を用いた 7 番染色体上のエピゲノム関連遺伝子の siRNA ライブラリーによるドロップアウトスクリーニングの結果と精緻に照合することで、モノソミー7 を有する AML では、7 番染色体上に存在する *GTF2I* 遺伝子の発現量の低下により *EED* のノックダウンに対する選択的な脆弱性を獲得したことを明らかにした (図2)。

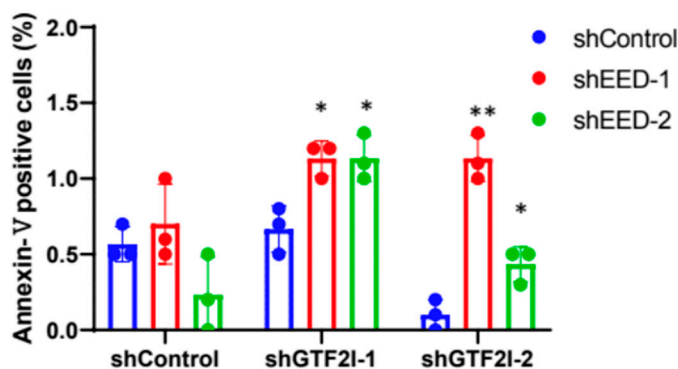


図2. *GTF2I-1* をノックダウンは *EED* 遺伝子の発現が低下した細胞で特異的な細胞死を誘導する。

AML 細胞株 (OCI-AML2) において shRNA を用いた遺伝子ノックダウンを *EED* 及び *GTF2I-1* について実施し、細胞死 (アポトーシス) をフローサイトメトリーで評価した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Student's t-test)。

そこで、なぜ *GTF2I* 遺伝子の発現量の低下により *EED* のノックダウンに対する選択的な脆弱性を獲得するのか、その分子メカニズムを明らかにし、治療標的化するために、網羅的遺伝子発現解析、選択的遺伝子ノックダウン、マウス AML モデルを駆使して検証した。加えてヒト細胞を用いた検証を実行するため、モノソミー7 染色体異常を有する AML 患者の骨髄細胞より iPS 細胞の樹立を試みた。

まず、AML細胞において*EED* 遺伝子または*GTF2I* 遺伝子を選択的にノックダウンすることで生じる遺伝子変化を RNA-seq法により網羅的に検証したところ、両者に共通する標的遺伝子候補として*RUNX3* が同定された (図3) [5, 6]。

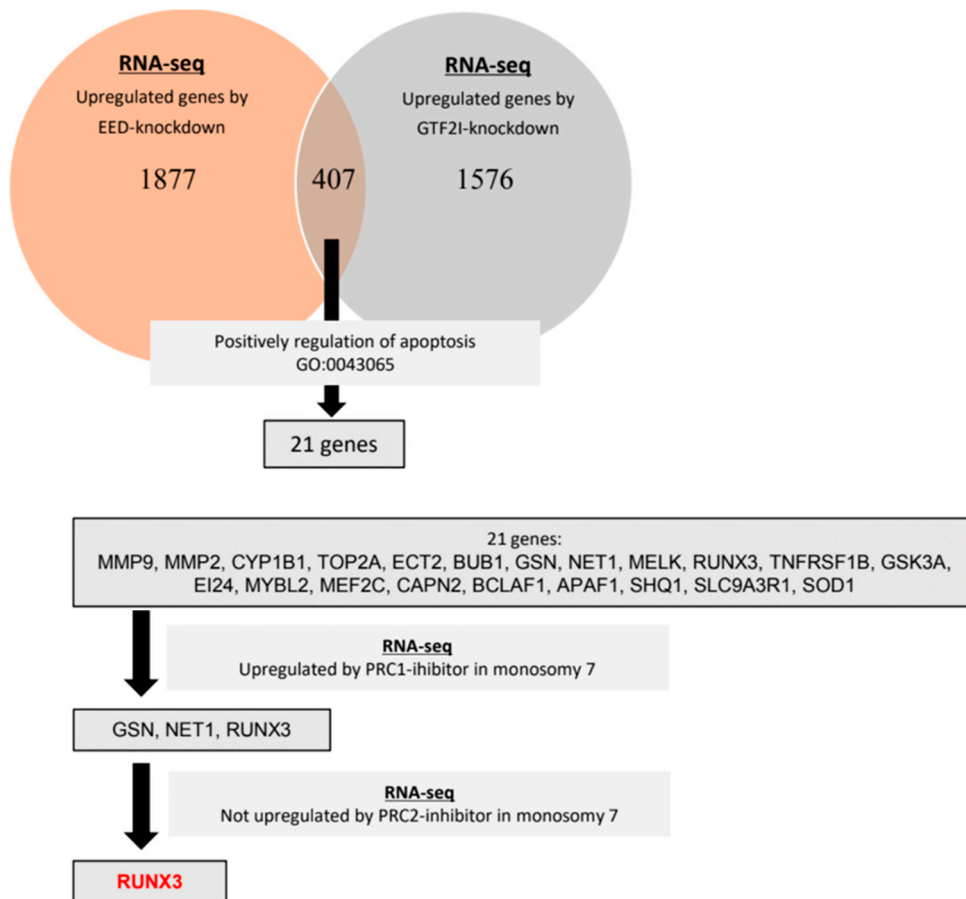


図3. *RUNX3* 遺伝子は *EED* および *GTF2I* の共通の標的遺伝子である。

AML 細胞株 (KG-1、OCI-AML2) において shRNA を用いた遺伝子ノックダウンを *EED* 及び *GTF2I-1* についてそれぞれ行い、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を実施した。標的遺伝子候補の中でアポトーシス関連遺伝子に着目することで、共通標的として *RUNX3* 遺伝子を同定した。Differential gene expression (DGE) analysis。

さらに、選択的遺伝子ノックダウン法を用いた実験結果から、モノソミー7 を有する AML では、7 番染色体上に存在する *GTF2I* 遺伝子の発現量の低下により *EED* をノックダウンすると *RUNX3* の発現が誘導され、引き続いて *RUNX3* の既知の下流遺伝子標的である *TP53* 経路を活性化することで細胞死を誘導していることが明らかになった (図4)。

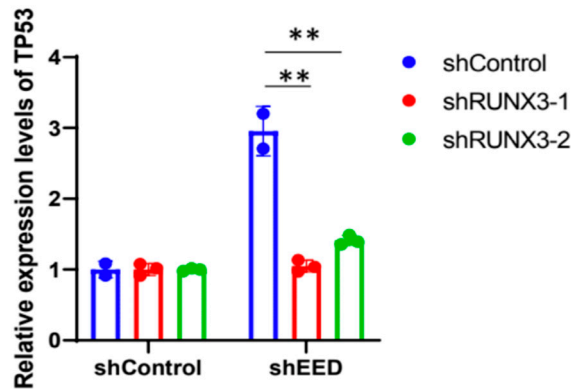


図4. *RUNX3* 遺伝子の抑制により、*EED* 遺伝子の抑制に伴う p53 の活性化はキャンセルされる。モノソミー7を有するAML細胞株 (KG-1) において *EED* 遺伝子を shRNA を用いてノックダウンすると TP53 のタンパク質発現が上昇することを、ウェスタンブロット法を用いて確認した。その細胞株において *RUNX3* 遺伝子の発現を shRNA を用いて特異的に抑制すると、*EED* のノックダウンによる TP53 のタンパク質発現の上昇は消失した (n=3、Student's t-test、*** P<0.01)。

これらの細胞株を用いた実験と並行し、モノソミー7染色体異常を有するAML患者の骨髓細胞を用いたiPS細胞の樹立を行った。東京大学医学部附属病院を受診したモノソミー7染色体異常を有するAML患者から1ヶ月に1~2例程度の頻度で検体を採取し、モノソミー7AML-iPS細胞を複数系統樹立した。一部の細胞株について血球へ分化誘導を行い、フローサイトメトリー検査によって造血幹・前駆細胞マーカーを発現していることを確認した。

考 察

本研究を通して我々はモノソミー7を有するAMLでは、7番染色体上に存在する *GTF2I* 遺伝子の発現量の低下により *EED* をノックダウンすると *RUNX3* の発現が誘導され、引き続いて *RUNX3* の既知の下流遺伝子標的である TP53 経路を活性化することで細胞死を誘導していることを明らかにした。AMLやMDSにおいて7番染色体欠失は高頻度で認められる異常でありながら特異的な標的治療が存在せず、かつ極めて予後が悪いことが知られている。欠失により予後を悪化させ難治化に寄与するような遺伝子や経路を同定することは難治性白血病の病態解明という点で大きな意義があるだけでなく、新規標的治療の開発につながれば、患者の生存期間の延長およびQOLの向上に加え医療産業に絶大なインパクトを与え医学の発展に大きく寄与すると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究は主に東京大学大学院医学系研究科血液・腫瘍病態学教室の松田健佑助教、千葉晶輝助教、水野秀明助教らによって遂行された。本研究の円滑な実施を直接的・間接的にサポートしてくれた教室員、技術支援職員の皆様にこの場を借りて心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Inaba T, Honda H, Matsui H (2018) The enigma of monosomy 7. *Blood* 131 (26):2891-2898. doi:10.1182/blood-2017-12-822262

- 2) Eisfeld AK, Kohlschmidt J, Mrózek K, Volinia S, Blachly JS, Nicolet D, Oakes C, Kroll K, Orwick S, Carroll AJ, Stone RM, Byrd JC, de la Chapelle A, Bloomfield CD (2017) Mutational Landscape and Gene Expression Patterns in Adult Acute Myeloid Leukemias with Monosomy 7 as a Sole Abnormality. *Cancer Res* 77 (1):207-218. doi:10.1158/0008-5472.Can-16-1386
- 3) Inaba T, Nagamachi A, Wolff L, Koller R, Honda H, Matsui H (2012) Haploinsufficiency of Samd9l that Encodes an Endosome Fusion Facilitator Develops Myeloid Malignancies in Mice Mimicking Human Diseases with Monosomy 7. *Exp Hematol* 40 (8):S134-S134
- 4) Chen C, Liu Y, Rappaport AR, Kitzing T, Schultz N, Zhao Z, Shroff AS, Dickins RA, Vakoc CR, Bradner JE, Stock W, LeBeau MM, Shannon KM, Kogan S, Zuber J, Lowe SW (2014) MLL3 Is a Haploinsufficient 7q Tumor Suppressor in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* 25 (5):652-665. doi:10.1016/j.ccr.2014.03.016
- 5) Yamada C, Ozaki T, Ando K, Suenaga Y, Inoue K, Ito Y, Okoshi R, Kageyama H, Kimura H, Miyazaki M, Nakagawara A (2010) RUNX3 Modulates DNA Damage-mediated Phosphorylation of Tumor Suppressor p53 at Ser-15 and Acts as a Co-activator for p53. *Journal of Biological Chemistry* 285 (22):16693-16703. doi:10.1074/jbc.M109.055525
- 6) Ozaki T, Nakagawara A, Nagase H (2013) RUNX Family Participates in the Regulation of p53-Dependent DNA Damage Response. *Int J Genomics* 2013:271347. doi: 10.1155/2013/271347.