

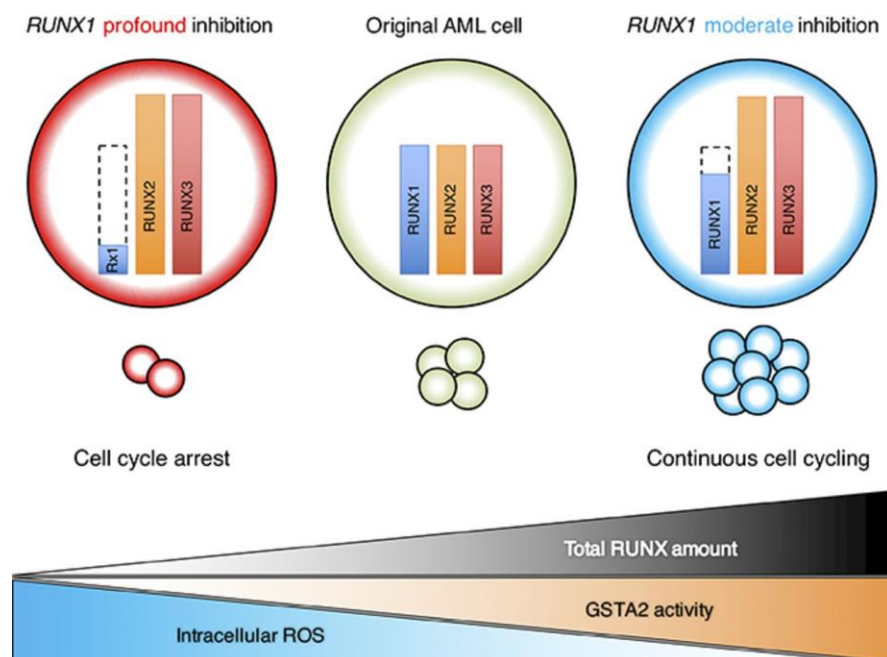
急性骨髄性白血病の新しい転写因子調節メカニズムを解明

—従来とは逆にがん抑制遺伝子をターゲットにした治療戦略を提唱—

概要

従来<がん抑制因子>と考えられてきた転写因子：Runt-related transcription factor 1 (RUNX1)は、RUNX ファミリー因子 (RUNX1・RUNX2・RUNX3) の構成要素です。造血に重要な役割を果たす RUNX1 は、最近むしろ白血病の発症と増殖・維持に重要な役割も担っていることがわかってきました。しかし、RUNX1 に、このような<がん抑制因子>と<がん促進因子>という相反する性質が見られる理由はほとんど解明されてはいませんでした。京都大学大学院医学研究科 上久保靖彦 准教授、足立壮一 教授、森田剣 博士研究員、前田信太郎 修士課程学生を中心とする研究チームは、京都大学大学院理学研究科 杉山弘 教授らと共同で、この未知のメカニズムを解明するために、難治性骨髄性白血病細胞で、RUNX1 を様々な強さで抑制する実験系を用いて解析しました。その結果、RUNX1 を強く抑制してほぼ消失させると白血病細胞増殖は強く抑制されるものの、RUNX1 を中等度に抑制した場合には、RUNX ファミリー因子の蛋白総量が最大となり、ROS スキャベンジャー遺伝子である GSTA2 が最も高く発現するため、白血病細胞増殖が反対に強く促進されました。これは、RUNX1 を抑制すると白血病増殖が増強することから、従来 RUNX1 が<がん抑制遺伝子>として認識されてきた経緯を説明することのできる重要な発見です。

本研究成果は、2017 年 8 月 8 日（米国東部標準時間）に米国の国際学術誌「Blood Advances」に掲載されました。



RUNX1 を強く抑制すると白血病細胞の増殖が強く抑制される（上左）一方、中等度に抑制すると、ROS スキャベンジャー遺伝子 GSTA2 が最も高く発現するため、逆に白血病細胞の増殖が促進される（上右）。

1. 背景

RUNX ファミリー因子には、DNA に結合する転写因子 α ファミリー：RUNX1・RUNX2・RUNX3 と、そのヘテロダイマー（2 首類の異なるモノマー〈単量体〉で構成されたダイマー〈二量体〉）を作るパートナーである β ファミリー：CBFB（ α ファミリーの蛋白量及び機能を強調する補因子）が存在します。本研究チームは以前に、CBFB の蛋白量が、RUNX の総蛋白量（RUNX1 + RUNX2 + RUNX3）との間に正の相関があり、正常細胞より各種がん細胞で恒常的に高く発現していることを発見しました。そこで、RUNX ファミリー（RUNX1 + RUNX2 + RUNX3）及び CBFB は抗腫瘍ターゲットであることを提唱し、RUNX1（又は α ファミリー全て）を抑制することで、白血病細胞に細胞死が誘導されることを報告しました。

本研究チームは現在、RUNX 阻害剤（Chb-M'）を開発しており、この阻害剤によって α ファミリーを包括的に抑制した場合にも強い抗白血病作用が誘導されることを確認しました。本研究では、このように RUNX1 を強く抑制したり、 α ファミリーを包括的に抑制した場合に誘導される強い抗白血病作用と相反し、中等度の抑制を行った場合に生じる逆説的な強い白血病細胞増殖メカニズムの解明を目指し、RUNX1 が〈がん抑制因子〉であるとともに〈がん促進因子〉でもあるという、この相反する性質が生じる原因を探りました。

2. 研究手法・成果

まず本研究チームは、白血病患者の臨床データ（The Cancer Genome Atlas (TCGA) clinical dataset）において、RUNX1 高発現・低発現・中等度発現の 3 グループに分けて予後解析を行ったところ、RUNX1 が中等度に発現している患者群が、高発現群と低発現群より、予後が不良であることを見出しました。（Figure 1）

さらに、ヒト難治性急性骨髄性白血病（AML）：MLL-AF4 細胞株において、RUNX1 を中等度抑制（Moderate inhibition）および強度抑制（Profound inhibition）を可能とする細胞株を樹立したところ、中等度抑制にて細胞増殖は強く増強され、強度抑制では反対に強く抑制されることを発見しました。（Figure 2）

次に、この原因を探索するために、RUNX1 を中等度抑制した時に上昇する遺伝子群と、強度抑制した条件下で強く抑制される遺伝子群に共通する遺伝子をマイクロアレイで検討したところ、ROS スキャベンジャー遺伝子 GSTA2（glutathione S-transferase a 2）が有力な候補因子として抽出されました。（Figure 4）

そこで、RUNX1 を中等度抑制すると発現上昇する GSTA2 を同時にノックダウンしたところ、増強した細胞増殖は元にもどることなどから、RUNX1 は GSTA2 を介して、細胞内の ROS（活性酸素種）を抑制することにより、細胞増殖を正に制御していることが判明しました。（Figure 5）

本研究チームはさらに、RUNX1・RUNX2・RUNX3 が GSTA2 の転写を制御するプロモーター領域にある RUNX 結合配列（TGTGGT）に RUNX1・RUNX2・RUNX3 が全て結合し、レポーターアッセイのデータからも、GSTA2 遺伝子の発現は、RUNX1・RUNX2・RUNX3 全てに制御されており、RUNX1 の中等度抑制時に、RUNX1～3 の総量が最大になることにより、GSTA2 の発現が最大になることを発見しました。（Figure 6、Figure 7）

次に、MLL-AF4 細胞株を免疫不全マウスに移植した生体モデルでは、生体内に移植した白血病細胞の内部で RUNX1 を中等度抑制した場合に生存期間は最も短くなり、RUNX1 を強度抑制した場合には、生存期間は著明に延長しました。また GSTA2 を抑制することのできる GST 抑制剤（Ethacrynic acid）を投与したところ、濃度に依存して生存期間が延長したことから、生体内で GSTA2 を抑制することで白血病増殖が抑制されることを見出しました。（Figure 8）

3. 波及効果、今後の予定

従来 RUNX ファミリーはがん抑制因子と考えられてきました。その最も大きな理由として、RUNX1 を抑制すれば、白血病細胞の増殖が促進する現象が多くみられたことがあります。本研究チームは、RUNX1 の中等度抑制で白血病細胞の増殖が促進し、強度抑制でその増殖が抑制されるメカニズムを解明することに成功しました。恐らく多くの抑制実験では、中等度抑制による細胞増殖フェノタイプが前面に出たことが原因と考えられます。本研究は、中等度抑制と強度抑制で相反する、がん抑制因子の機能メカニズムを検証する必要があることを示唆します。また、従来一つの因子に対して一つの遺伝子が転写を制御していると考えられているものについても、遺伝子ファミリーの総量で制御されている可能性があることを、本研究は明確に提示しています。本研究が明らかにしたメカニズムは、様々ながん抑制因子でしばしば認められる相反する機能の原因となっている可能性があります。

最後に、ROS スキャベンジャー遺伝子 GSTA2 を制御することにより、急性骨髄性白血病の細胞増殖機構が抑制されることを示す本研究は、新規の治療ターゲットを提唱するだけでなく、それを制御する RUNX ファミリーを包括的に制御する必要性を示すものです。本研究チームが現在開発中の RUNX 阻害剤 (Chb-M' : RUNX1・RUNX2・RUNX3 の DNA 結合コンセンサス配列に結合し、そのターゲット遺伝子群を包括的に抑制可能)の有効性を、このメカニズムは支持しています。今後は Chb-M'の臨床応用に向けた研究を継続していきます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究プロジェクトは、科学研究費補助金 日本学術振興会・基盤研究 B「分子標的薬耐性を克服する革新的抗腫瘍 コンセプトの構築」、日本医療研究開発機構 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業・技術開発課題 A (中核技術の開発)「任意の遺伝子発現制御を可能にする革新的ポリアミド薬剤の開発」、創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 : BINDS 「遺伝子発現制御と塩基配列認識を基盤とするライブラリー創薬支援の」支援を受けて行われました。

<論文タイトルと著者>

タイトル : Paradoxical enhancement of leukemogenesis in acute myeloid leukemia with moderately-attenuated RUNX1 expressions.

著者 : Morita K*, Maeda S*, Suzuki K, Kiyose H, Taniguchi J, Liu P.P., Sugiyama H, Adachi S and Kamikubo Y.

* These authors contributed equally to this work.

掲載誌 : Blood Advances. 2017 Aug 8;1(18):1440-1451.

DOI : doi10.1182/bloodadvances.2017007591.

Figure 1 RUNX1中等度抑制でRUNXファミリー総蛋白量が最大となる。ROSスクベンジャー遺伝子GSTA2発現は、RUNXファミリー蛋白量に依存し転写制御される。

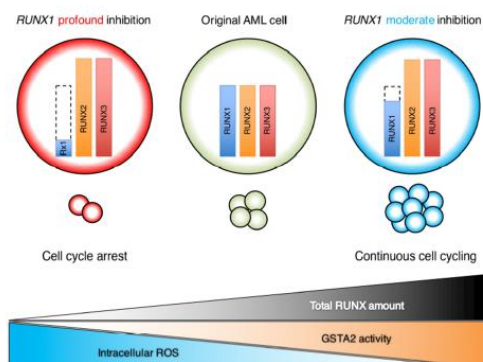


Figure 3 RUNX1の中等度抑制にて、白血病細胞増殖は強く促進されるが、RUNX1の強い抑制では細胞増殖は抑制される

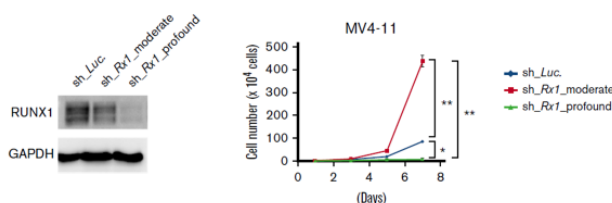


Figure 2 RUNX1中等度発現群が最も予後不良

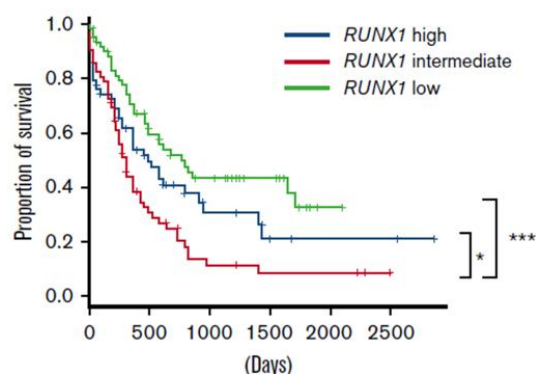


Figure 4 RUNX1中等度抑制時に最も発現がUpし、強度抑制時にDownする遺伝子群より、ROSスクベンジャー遺伝子：GSTA2を抽出

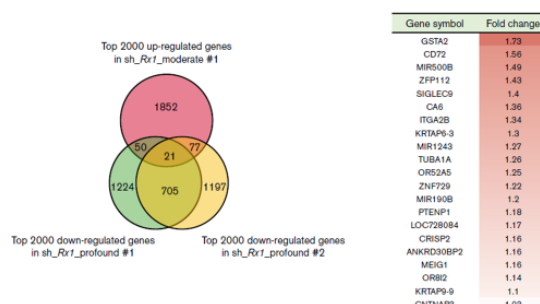


Figure 5 RUNX1中等度下では細胞増殖は強く増強する。原因となるGSTA2を同時にノックダウンすると細胞増殖はもとの戻る。RUNX1~3はGSTA2を正に転写制御し、ROSを抑制することにより、細胞増殖を促進させる。

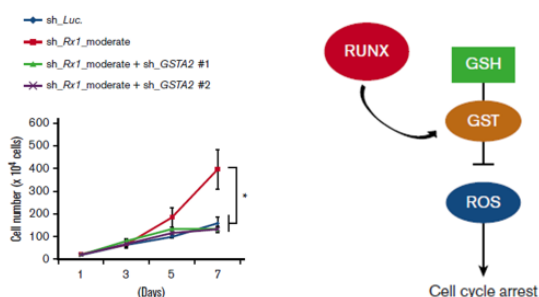


Figure 6 GSTA2を制御するプロモーター領域にRUNX結合配列が2所存在し、RUNX1、RUNX2、RUNX3が結合し、転写を制御する。

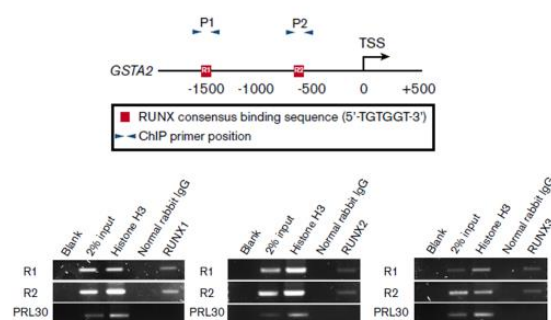


Figure 7

左：RUNX1中等度抑制により、Pan_RUNX（RUNX総量）は最大となる。
右：RUNX1中等度抑制により、GSTA2の転写が促進するが、強抑制では、転写は抑制される。

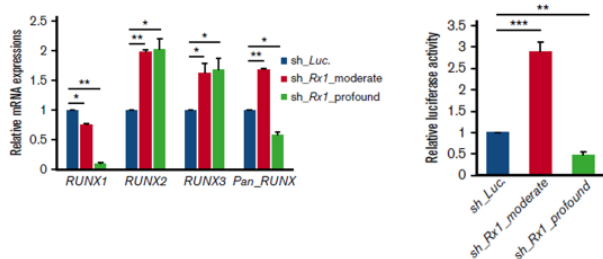
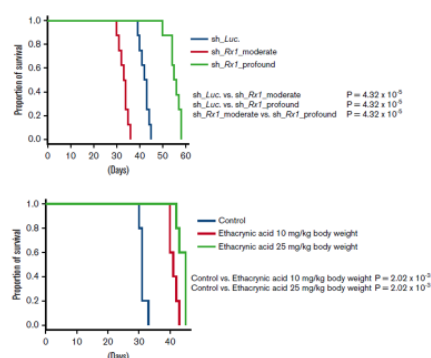


Figure 8 免疫不全マウス移植実験

上：RUNX1を中等度抑した場合に最も生存期間が短縮する。下：Ethacrynic acid（GST抑制剤）を投与すると、生存期間が延長する。



<用語解説>

ROS : Reactive Oxygen Species (活性酸素)

一般的にスーパーオキシドアニオンラジカル(通称スーパーオキシド)、ヒドロキシルラジカル、過酸化水素、一重項酸素の4種類とされる。発生した活性酸素は様々な物質に対して非特異的な化学反応をもたらす、細胞に損傷を与え得るために、細胞増殖に抑制的に機能する。ROS スキャベンジャー遺伝子とは、ROS と反応しそれを吸収する因子。GSTA2 は、がん細胞内で生じた活性酸素を吸収し、そのがん細胞増殖抑制効果を減弱させている。

ヒト難治性急性骨髄性白血病 (AML) : MLL-AF4 細胞株

MLL-AF4 は乳児白血病でもっとも高頻度にみられ、しかも最も予後が悪い染色体転座 t(4;11)により形成されるキメラ遺伝子。キメラ遺伝子によって生じた MLL-AF4 フュージョン蛋白により発症した難治性白血病細胞株。

マイクロアレイ :

マイクロアレイは、多数の DNA 断片をプラスチックやガラス等の基板上に高密度に配置した分析器具で、数千から数万種類の遺伝子の発現パターンを短時間で網羅的に調べることができる。

レポーターアッセイ :

遺伝子発現の活性を測定するために、測定したい遺伝子を、ルシフェラーゼなど蛍光を発する遺伝子に置き換えることによって、単なる蛍光測定から遺伝子の発現状態が分かるようになる。このような、遺伝子の活性状態を目に見える形で“レポート”するアッセイ（分析評価手法）をレポーターアッセイという。

細胞増殖フェノタイプ :

細胞周期の進行が促進され、最終的に細胞が分裂し増殖が亢進すること。