

T細胞性急性リンパ性白血病の増殖因子を発見

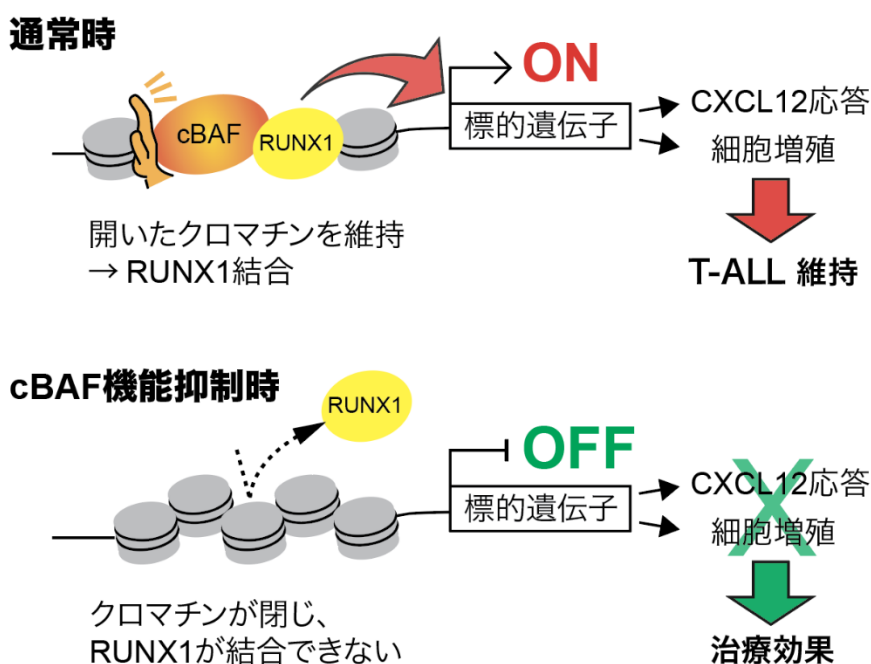
– 新規治療法開発への手がかりに –

概要

急性白血病と呼ばれる血液腫瘍のうち、成人では約 5%、小児では約 10-15%が T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-ALL) に分類されます。治療成績は比較的良好で約 80%の長期生存率が得られていますが、治療が奏功しない患者さんがいることも事実です。これらの患者さんの治療には既存の方法とは異なる全く新しい治療法の開発が求められており、T-ALL の病態の詳細な解析が欠かせません。

京都大学医生物学研究所の青木一成 助教、遊佐宏介 同教授らの研究グループは、T-ALL 細胞が骨髄内に留まり増殖する分子メカニズムとして、遺伝子発現の制御に関わるクロマチンリモデリング因子の一つ cBAF 複合体が重要な役割を担っていることを明らかにしました。cBAF 複合体はそのクロマチンリモデリング活性によりがん原性転写因子である RUNX1 の標的遺伝子への結合を促進しており、白血病細胞の増殖に対し正に関与していました。一方、cBAF 複合体のクロマチンリモデリング活性を阻害する薬剤は RUNX1 のゲノム DNA からの乖離と増殖抑制を誘導すること、白血病マウスモデルにおいても増殖抑制効果を示すことを確認しました。本研究は T-ALL に対する新しい治療法開発の手がかりとなる成果で、今後の研究が期待されます。

本研究成果は、2023 年 11 月 3 日に、国際学術誌「*Blood*」にオンライン掲載されました。



T-ALL 細胞では、cBAF 複合体が RUNX1 結合領域を開いた状態に維持し RUNX1 の結合を促すことで病態が維持されている。cBAF 機能を抑制すると RUNX1 は結合できず、標的遺伝子の発現が低下する。これにより CXCL12 応答や細胞増殖が低下し、治療効果が期待される。

1. 背景

急性骨髄性白血病、B 細胞性急性リンパ性白血病、T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-ALL) を含む急性白血病は、悪性度の高い血液のがんです。化学療法と造血幹細胞移植の進歩により、これらの血液腫瘍の予後は飛躍的に改善してきました。しかし、再発・治療抵抗性の急性白血病の予後は依然不良です。従って、これらの白血病に対する新しい治療戦略を見出し、治療法を開発していくことが求められています。そのためには、白血病の細胞増殖の分子機構の詳細な理解が欠かせません。

急性白血病細胞は、正常な造血幹細胞と同様に骨髄に存在し、ニッチと呼ばれる特殊な微小環境によって維持されています。これまでの研究から骨髄内に存在する CXCL12-abundant reticular (CAR) 細胞がニッチの中心的構成細胞であることが近年明らかになってきました。これまでに、正常な造血幹細胞や急性白血病細胞は骨髄内で CAR 細胞に接着していること、CAR 細胞が分泌する CXCL12 および血液細胞側の受容体 CXCR4 が骨髄内での正常造血幹細胞の維持、また白血病の発症及び維持に必須であることが明らかとなっています。しかし、この上流あるいは下流で CXCL12-CXCR4 軸に関わっている因子の全貌は明らかになっていません。本研究は、この分子機序を明らかとすることを突破口として、新しい治療戦略を策定することを目的に研究を行いました。

2. 研究手法・成果

本研究では、T-ALL 細胞が骨髄内で増殖すること、これには骨髄内に存在する CAR 細胞（注1）が分泌する液性因子 CXCL12 と T-ALL 細胞表面に発現する CXCL12 の生理的受容体 CXCR4 が必須であることに着目しました。そこで、ゲノムワイド CRISPR スクリーニング（注2）を用いて、CXCL12-CXCR4 軸に関係する T-ALL 細胞因子を網羅的に同定することから着手しました。ゲノムワイド CRISPR スクリーニングは、我々の研究室で世界に先駆けて開発したゲノム編集技術を応用した遺伝子探索法で、これまで我々の研究室のみならず、世界中の研究室において、がん研究を始めとする広い研究分野で用いられています。この遺伝子探索を実施した結果、我々は、これまでに関連が指摘されていなかったクロマチンリモデリング（注3）因子を見出し、詳細な分子機構を解析しました。

クロマチンリモデリング因子は大別して4種類（SWI/SNF, ISWI, CHD, INO80）知られています。今回見出されたのはこのうち SWI/SNF に関連する複数の遺伝子でした。SWI/SNF は10個以上のタンパク質で構成される巨大複合体ですが、その構成タンパク質の違いにより機能が分かれており、3つの複合体（cBAF, PBAF, ncBAF）に細分化されます。遺伝子探索から見出された遺伝子パターンから、これらのうち cBAF が T-ALL 細胞の CXCL12 との相互作用に関わっていることが強く示唆されました。複合体特異的因子を個別に遺伝子破壊した細胞株を作製し CXCL12 に対する応答を調べた結果、cBAF 破壊細胞のみで応答が有意に減弱することを確認しました。

次に、cBAF 複合体がどのような機序で T-ALL 細胞の CXCL12 に対する応答に関わっているのか解析を進めました。cBAF 複合体をはじめとするクロマチンリモデリング因子は、DNA とヒストンタンパク質の相互作用を調節し、DNA 結合タンパク質が標的 DNA にアクセスできるよう、開いた状態（オープンクロマチン）とする、またその維持を担っていると考えられています。そこで、cBAF 複合体の遺伝子破壊細胞において ATAC-seq 法（注4）を用いた解析を実施し、約 10,000 か所でアクセシビリティが低下していることを見出しました。さらに、これらの箇所には RUNX1 という転写因子の結合モチーフが特に強く濃縮されていました。RUNX1 は T-ALL 細胞の増殖に必須の転写因子であることが知られていて、その機能欠損は腫瘍細胞の増殖を減弱させ、

細胞死を惹起します。我々の結果は、cBAF 複合体が RUNX1 の標的配列への結合に必須であることを示唆しています。そこで、cBAF 複合体の遺伝子破壊細胞において RUNX1 のゲノムへの結合を ChIP-seq 法（注5）を用いて解析しました。結果、先の閉じたクロマチンとなった約 10,000 か所において RUNX1 の結合が有意に低下していることを見出しました。この結合低下は遺伝子発現パターンにも影響を及ぼしていて、RNA-seq 解析を実施したところ RUNX1 の標的遺伝子とされる遺伝子群の発現が有意に低下することも確認しました。

cBAF 破壊細胞の遺伝子発現解析から CXCL12 の受容体である CXCR4 の発現が顕著に低下していることを見出したため、CXCR4 は RUNX1 と cBAF 複合体により転写活性化されている可能性が示唆されました。そこで、CXCR4 遺伝子座を詳細に解析した結果、CXCR4 遺伝子のイントロン1の1箇所と遺伝子上流の複数箇所において、アクセシビリティが高く、さらに RUNX1 が結合している部位があることを発見しました。これらの部位においてはヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のアセチル化も検出され、エンハンサーとして働いていることが強く示唆されました。更なる解析の結果、これらの部位では、cBAF 複合体の機能を阻害することでアクセシビリティの低下、RUNX1 の結合減弱やヒストン脱アセチル化が確認でき、エンハンサー機能の喪失が CXCR4 の発現低下を誘導、CXCL12 に対する応答性を阻害することが明らかとなりました。

cBAF 複合体の機能阻害により RUNX1 のゲノム結合が広範囲に影響を受けることは、cBAF 複合体の機能阻害は、RUNX1 の機能阻害と同様に、増殖抑制効果があると考えられます。そこで、T-ALL 細胞株5つ、また4人の患者由来 T-ALL 細胞に対し cBAF 阻害剤を処理した結果、全ての細胞において増殖抑制効果を確認することができました。増殖に関連する RUNX1 標的遺伝子として CDK6 を見出し、その遺伝子座を解析した結果、CXCR4 遺伝子座と同様に、CDK6 イントロン内に cBAF 破壊でアクセシビリティが低下し、かつ RUNX1 結合が低下する箇所が2つあることを確認しました。これらのゲノム部位が CDK6 の RUNX1 を介したエンハンサーとして機能していることを示しています。CDK6 の過剰発現は cBAF 阻害による増殖抑制効果を部分的に打ち消したことから、RUNX1 が cBAF のクロマチンリモデリング活性によって CDK6 発現を誘導し、細胞増殖を促進していることが明らかとなりました。

cBAF 阻害剤はこれまでに複数開発されています。最後に cBAF 阻害がマウスの体内においてヒト T-ALL 細胞の CXCR4 の発現低下や増殖抑制を誘導できるか、cBAF 阻害剤の一つを用いて解析を行いました。結果、複数の細胞株、また複数の患者由来 T-ALL 細胞において CXCR4 の発現低下と細胞増殖の低下を検出しました。

以上の結果から、cBAF クロマチンリモデリング因子は RUNX1 転写因子が誘導する白血病遺伝子発現プログラムに重要な役割を担い、その機能抑制は抗腫瘍効果を発揮することを明らかとしました。

3. 今後の展望

エンハンサー活性に強い依存性を示すがんとして前立腺がんが挙げられ、本研究のように、cBAF 阻害による必須転写因子のゲノムへの結合阻害が腫瘍細胞の増殖抑制効果を示すことがすでに示されています。cBAF はほとどの細胞でも発現していることから他のがん種においても同様に機能していると考えられ、更に解析を進めることで cBAF 阻害が幅広いがん種の治療法となる可能性があります。転写因子やエンハンサーの活性調節によるがん細胞の増殖をコントロールし、より有効な治療法を開発するため、今後も研究を続けていく計画です。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業 21H04959 (研究代表者：遊佐宏介)、21K08393 (研究代表者：青木一成)、武田科学振興財団 (研究代表者：青木一成) 他の支援を受けて実施されました。また、本研究は、京都大学医学研究科小川誠司教授、同滝田順子教授、同高折晃史教授、山梨大学犬飼岳史教授の各グループとの共同研究により実施されました。

<用語解説>

- [注1] CAR 細胞 … 骨髄内に存在する間葉系細胞で CXCL12 や Stem cell factor を高発現する細胞。造血幹細胞のニッチとして機能し、その維持に必須の役割を担っている。
- [注2] ゲノムワイド CRISPR スクリーニング … ヒトゲノムにはタンパク質をコードする遺伝子が2万種類ある。それぞれの遺伝子が生命活動のどこに関わっているのかを調べるには、着目した遺伝子を破壊し、どこに異常が出るのかを調べる方法があり、遺伝学的手法と呼ばれる。ゲノムワイド CRISPR スクリーニングでは、2万種類すべての遺伝子をゲノム編集ツール CRISPR-Cas9 を使って個別に破壊した変異細胞集団を作り、着目する表現形質 (今回の場合は CXCL12 との相互作用ができなくなるという表現形質) を示す変異細胞を同定し、遺伝子の機能を明らかとする。
- [注3] クロマチンリモデリング … 細胞核内では DNA2 本鎖はヒストンタンパク質8量体に1.67回巻きついた形をしており、これをヌクレオソーム単位といい、その集合をクロマチンという。ヌクレオソーム単位が密接した部分は閉じたクロマチン、ヌクレオソーム間が緩やかな部分は開いたクロマチンといい、転写因子等がゲノム DNA に結合する際には、開いたクロマチンとなる必要がある。このようなクロマチンの構造転換をクロマチンリモデリングという。
- [注4] ATAC-seq 法 … ゲノム上の開いたクロマチン部分を、次世代シーケンサーを用いて検出する方法。細菌由来の DNA 転移酵素がアクセスできることを指標に解析する。
- [注5] ChIP-seq 法 … 特定のタンパク質がゲノム上のどこに結合しているかを、次世代シーケンサーを用いて検出する方法。クロマチンを断片化し、着目タンパク質の抗体で免疫沈降して、一緒に沈降したゲノム DNA の配列を次世代シーケンサーで検出することで、結合部位を同定する。

<研究者のコメント>

「T 細胞性急性リンパ性白血病の CXCL12 に対する遊走性を制御する遺伝子を網羅的に探索していく中で、cBAF 複合体が CXCL12 応答性と細胞増殖の両方を制御していることを発見することができました。cBAF 複合体を標的とした治療法は、予後不良な再発・治療抵抗性 T 細胞性急性リンパ性白血病に対する有望な治療法になる可能性があります。」(青木一成)

<論文タイトルと著者>

タイトル: Canonical BAF complex regulates the oncogenic program in human T-cell acute lymphoblastic leukemia (canonical BAF 複合体はヒト T 細胞性急性リンパ性白血病のがん転写プログラムを制御する)

著者: Kazunari Aoki, Mizuki Hyuga, Yusuke Tarumoto, Gohei Nishibuchi, Atsushi Ueda, Yotaro Ochi, Seiichi Sugino, Takashi Mikami, Hirokazu Kobushi, Itaru Kato, Koshi Akahane, Takeshi Inukai, Akifumi Takaori-Kondo, Junko Takita, Seishi Ogawa, Kosuke Yusa

掲載誌：*Blood* DOI：10.1182/blood.2023020857