

## BCR-ABL キナーゼとエピゲノム制御破綻による白血病発症機構の解明と治療標的検証

指田吾郎

熊本大学 国際先端医学研究機構 白血病転写制御研究室

## 【研究の背景】

慢性骨髄性白血病(CML)はフィラデルフィア染色体転座によって再構成されたがんキメラ遺伝子 BCR-ABL チロシンキナーゼの恒常的なシグナル伝達によって病態が形成されるがんである<sup>1)</sup>。TIF1 $\beta$ /KAP1/TRIM28 は、HP1 結合蛋白質であり、ヒストン H3K9 メチル化酵素 ESET 誘導を介したヘテロクロマチン形成やユークロマチン領域における H3K9me3 修飾による転写抑制機能が知られる<sup>2,3)</sup>。CML 細胞では、BCR-ABL によって直接 TIF1 $\beta$  のチロシン残基(Tyr449/458/517)がリン酸化され、H3K9me3 修飾と HP1 結合が減弱することで、標的遺伝子の発現レベルが上昇する<sup>4)</sup>。一方、TIF1 $\beta$ -3YF リン酸化欠失変異体は HP1 結合を維持してがん遺伝子の転写を抑制することを、申請者は見出した。こうした知見に基づき、白血病特異的な TIF1 $\beta$  複合体によるエピゲノム制御機構を解明するとともに、チロシンキナーゼ阻害剤耐性の難治性白血病の新規治療標的として検証するに至った。

## 【目 的】

本研究では、申請者が新たに確立した *BCR-ABL;Tif1 $\beta$*  変異体白血病マウスを用いて、白血病幹細胞における TIF1 $\beta$  機能を統合的に解析する。続けて、TIF1 $\beta$  チロシンリン酸化特異的複合体を同定すると共に、TIF1 $\beta$  チロシンリン酸化を介した白血病幹細胞のクロマチン制御機構を解明する。最後に、チロシンキナーゼ阻害剤耐性の難治性白血病に対する新規治療法の基礎的検証を実施する。

## 【方 法】

始めに、白血病幹細胞に Tif1 $\beta$  が必須であるかを解明するために、*BCR-ABL* 発現 *Tif1 $\beta$*  欠損造血細胞を移植したマウスの表現型および白血病幹細胞機能を解析する。*BCR-ABL* 発現 *Tif1 $\beta$ <sup>+/+</sup>* また *Tif1 $\beta$ <sup>-/-</sup>* 白血病細胞はいずれも *Tif1 $\beta$ <sup>+/+</sup>* 白血病と比較して Tif1 $\beta$  発現量に依存した生存期間の延長がみられ、Tif1 $\beta$  のがん遺伝子機能が確認された。また、*Tif1 $\beta$ <sup>-/-</sup>* 白血病細胞は、病型が変わり生存期間が延長するだけでなく、2 次移植したマウスでは白血病発症能が消失した。従って、Tif1 $\beta$  は白血病幹細胞の生存に不可欠であった。このモデルを用いて、幹細胞における細胞系列の決定と分化の制御機構、また白血病細胞増殖の分子メカニズムを解析する(研究計画 1)。また、*BCR-ABL* 陽性白血病細胞を用いた TIF1 $\beta$ -3YF 結合蛋白の LC/MS 解析によって、TIF1 $\beta$  リン酸化複合体に特異的な候補因子を同定しており、新たな治療標的として検証する(研究計画 2)。

## 【結 果】

研究計画 1) *BCR-ABL* 白血病幹細胞に特異的な TIF1 $\beta$  のエピゲノム制御機構の解明

白血病病態進展における Tif1 $\beta$  機能を解明するため、*Tif1 $\beta$ <sup>fllox/fllox</sup>* ノックアウトマウス(仏・Florence Cammas 博士供与)と、*BCR-ABL* を誘導できる *Rosa26 loxP-STOP-loxP BCR-ABL IRES-GFP* コンディショナルノックインマウスを新たに作製して *Cre-ERT2* マウスと交配した。白血病幹細胞に Tif1 $\beta$  が必須であるかを解明するために、*BCR-ABL;Tif1 $\beta$ <sup>fllox/fllox</sup>;Cre-ERT2*

骨髄細胞を野生型レシピエントマウスに移植して、タモキシフェン投与により変異を誘導することで、白血病発症と表現型を検証した。*BCR-ABL;Tif1 $\beta$*  野生型マウスは、おもに CML また一部のマウスが B 細胞性急性リンパ性白血病 (B-ALL) を発症した。一方で、*BCR-ABL;Tif1 $\beta$*  欠損細胞は有意に生存期間が延長するとともに、B-ALL または骨髄不全病態を認めた。さらに、この *BCR-ABL;Tif1 $\beta$*  欠損骨髄細胞を連続移植すると細胞増殖活性がなく、マウスは 6 か月以上に渡って無病で生存した。こうした *Tif1 $\beta$*  の幹細胞維持機能と細胞系列決定の仕組みを理解するため、白血病幹細胞における遺伝子発現解析と *Tif1 $\beta$*  の ChIP シークエンス解析を実施した。統合的な解析によって、TIF1 $\beta$  によるがん遺伝子 MYC の活性化を中心とした白血病細胞特異的なエピゲノム制御機構が明らかになった。

#### 研究計画 2) TIF1 $\beta$ チロシンリン酸化を介した白血病幹細胞の病態基盤解明と治療標的の検証

引き続き、BCR-ABL による TIF1 $\beta$  チロシンリン酸化の白血病発症過程における機能を検証した。BCR-ABL でリン酸化された TIF1 $\beta$  が存在しないクロマチン領域と対照的に、MYC がん遺伝子や分化制御遺伝子の領域においては、TIF1 $\beta$  結合が維持された。申請者が確立した *BCR-ABL; Tif1 $\beta$ <sup>flax/flax</sup>; Cre-ERT2* マウスを用いて、TIF1 $\beta$  チロシンリン酸化に依存したエピゲノム制御機構を解析し、さらに、リン酸化 TIF1 $\beta$  に結合する蛋白を LC/MS 解析とゲノム編集による細胞機能評価によって同定した。同定した白血病 TIF1 $\beta$  複合体の機能を阻害すると、培養系での抗腫瘍効果を認めた。今後、この TIF1 $\beta$  複合体を標的とした白血病治療効果を生体レベルで検証する。

#### 【考 察】

近年、網羅的な遺伝子変異解析によって、エピジェネティック制御遺伝子の変異が多くのがんで明らかになった<sup>5)</sup>。さらに、個体レベルでの老化や環境ストレスによるエピゲノム制御破綻のがん発症における重要性も昔から認識されている<sup>6)</sup>。しかし、こうしたゲノム変異やシグナル伝達経路の活性化から惹起されるエピゲノム変化と、こうした機能異常の協調によるがん発症過程は未だ明白ではない。本研究を引き続き実施していくことで、BCR-ABL 遺伝子と TIF1 $\beta$  エピゲノム制御因子との機能的関連を手掛かりに、こうした疑問に答えることが期待される。

#### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

BCR-ABL 阻害剤によって劇的に予後が改善された慢性骨髄性白血病の治療においても、白血病幹細胞の薬剤抵抗性といった限界に直面している。今後の治療成績改善には、白血病幹細胞のエピゲノム制御機構に関する知見の獲得と、新規治療戦略が求められている。本研究によって、こうしたがんにおける重要な基礎的・臨床的課題の解決に向けて、その一歩を踏み出せたと考える。

#### 【参考・引用文献】

- 1 Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N *et al.* Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006; **355**: 2408-2417.
- 2 Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova I a, Miyachi H, Kimura H *et al.* Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* 2010; **464**: 927-31.
- 3 Miyagi S, Koide S, Saraya A, Wendt GR, Oshima M, Konuma T *et al.* The TIF1 $\beta$ -HP1 system maintains transcriptional integrity of hematopoietic stem cells. *Stem Cell Reports* 2014; **2**: 145-152.
- 4 Kubota S, Fukumoto Y, Aoyama K, Ishibashi K, Yuki R, Morinaga T *et al.* Phosphorylation of KRAB-associated protein 1 (KAP1) at Tyr-449, Tyr-458, and Tyr-517 by nuclear tyrosine kinases inhibits the association of KAP1 and Heterochromatin Protein 1a (HP1a) with heterochromatin. *J Biol Chem* 2013; **288**: 17871-17883.
- 5 Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 599-612.
- 6 Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**: 646-74.