

研究報告書
令和3年度：A課題

令和5年 4月 13日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設	東海大学 医学部
住所	神奈川県伊勢原市下糟屋 143
研究者氏名	細川 裕之

(研究課題)

変異型 RUNX1 が T 細胞急性リンパ性白血病を誘導する分子機序の解明

令和4年 4月 1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

[背景および目的]

免疫システムは様々な細胞が協調的に働くことで恒常性が保たれている。その中でも、T細胞は体内に侵入した病原体(抗原)を認識し、特異的な免疫応答を引き起こす司令塔として働く。T細胞の発生には胸腺と呼ばれる臓器が必要で、骨髄に存在する前駆細胞が胸腺に移入し、胸腺微小環境から Notch シグナルを受けることで、前期 T 前駆細胞、後期 T 前駆細胞を経て、末梢において機能的な T 細胞へと分化し生体防御を担う。RUNX 転写因子は、造血幹細胞から末梢における機能的な T 細胞サブセットに至るまで恒常的に発現し、各発生段階や末梢における T 細胞サブセットの機能に重要な役割を果たすことが知られている。我々はこれまで、RUNX 転写因子が前期、および後期 T 前駆細胞において、発生段階特異的にゲノム上の結合領域をダイナミックに変化させ、ステージ特異的な機能を発揮することを明らかにしてきた (Hosokawa, *Immunity*, 2018, *Nat Immunol*, 2018, *J Exp Med*, 2020, *PNAS*, 2021, *J Exp Med*, 2021)。これらの研究成果から、新しい遺伝子発現制御メカニズムとして、転写因子は直接 DNA に結合し遺伝子発現を制御するだけでなく、複合体構成分子を別の複合体から奪い取ることによって、直接的な DNA 結合を介さずに遺伝子発現をコントロールする、という新しいコンセプト (co-factor redeployment model) を提示した (Hosokawa, *Nat Rev Immunol* 2021, *BioEssays* 2021)。様々な細胞系列決定機構の破綻と腫瘍化などの疾患が、co-factor redeployment の機能不全によって引き起こされることが想定され、これまで原因が不明であった様々な疾患の原因究明に貢献することが期待される。本研究では、T 前駆細胞および、リンパ球前駆細胞を用いたオミクス解析を行うことで、発現レベルの変化しない RUNX 転写因子が発生段階特異的な機能を発揮し、生理的な T 細胞の初期発生をコントロールする分子メカニズムの統合的な理解を試みた。

T 細胞急性リンパ性白血病 (T-ALL) は、未熟な T 前駆細胞が過剰に増殖する悪性腫瘍である。現在行われている化学療法などの T-ALL の治療法は、長期にわたる QOL の著しい低下を伴うため、メカニズムに基づいた画期的な予防、および治療法の開発が強く望まれている。RUNX1 は T-ALL を引き起こす最も主要な原因遺伝子のひとつとして知られている。しかし、患者変異型 RUNX1 がどのように T 前駆細胞を腫瘍化するのか、その分子メカニズムは不明である。T-ALL が発症するメカニズムの研究が遅れている理由として、T 前駆細胞が生体内には極わずかしか存在しない事が挙げられる。我々は Cas9 を発現するリンパ球前駆細胞から *in vitro* で T 細胞の初期発生を再現する方法と、レトロウイルスによる sgRNA または cDNA の導入を組み合わせることで、前期および後期 T 前駆細胞においてステージ特異的、且つ acute (3 日以内) に RUNX1 遺伝子欠損および変異型 RUNX1 遺伝子導入の影響を解析する実験系を独自に確立した (Hosokawa, *PNAS* 2021, *J Exp Med* 2021, Hirano, *eLife* 2021, Koizumi *J Biol Chem*, 2022)。本研究では、この実験系を用いて、患者変異型 RUNX1 遺伝子が T 前駆細胞の腫瘍化を引き起こす最も初期の反応をトランスクリプトーム解析、ChIP-seq 解析、および変異型 RUNX1 会合分子のプロテオミクス解析を組み合わせたオミクス解析で明らかにする事を目指す。

[結果および考察]

Notch シグナルを受けた T 前駆細胞は 3 日間ほど前期 T 前駆細胞にとどまり、同じ培養をさらに 7 日間(合計 10 日間)続けると全ての細胞が後期 T 前駆細胞へ移行する。RUNX1 の過剰発現は T 前駆細胞の細胞死を誘導するが、我々は Flag および Myc タグを付加した RUNX1-ERT2 発現ベクターを構築し、タモキシフェン処理により核移行させた RUNX1 複合体を細胞死が起こる前に 2 段階の免疫沈降により高度に精製し、LC-MS/MS 解析を行った。さらに、RUNX1 の ChIP-seq 及び、RUNX 機能欠損細胞のトランスクリプトーム解析を行い、多くの発生段階特異的な RUNX 結合ゲノム領域と RUNX ターゲット遺伝子を網羅的に同定した。現在、ステージ特異的な RUNX1 会合分子、R

UNX1 結合ゲノム領域、RUNX ターゲット遺伝子の情報を統合的に解析し、RUNX1 が発生段階特異的な機能を発揮する分子メカニズムの解明に向けて解析を行っている。これまでの解析から、Notch シグナル依存的な T 細胞分化プログラムの始動が、RUNX 転写因子複合体の再構築と機能転換によって制御される事を示すデータが得られている。

RUNX1 は悪性度の高い T-ALL を引き起こす最も主要な原因遺伝子のひとつとして知られている。T-ALL 患者における RUNX1 遺伝子の体細胞変異は、DNA 結合ドメインとタンパク質相互作用に関わる機能ドメインに集中しており、これらの変異型 RUNX1 はドミナントネガティブ体として働き、生理的な RUNX1 の機能の一部を破綻させることで腫瘍化を誘導すると推測されているが、その分子メカニズムは不明である。我々は、特に T-ALL で発生頻度の高い機能ドメインの 1~3 アミノ酸置換を持つ変異体 (RUNX1 C72Y, AEL115-117TP, R174Q, R178Q, P308fs) に着目し、RUNX1 変異体の機能解析を開始した。RUNX1 変異体発現 T 前駆細胞のフェノタイプ解析から、C72Y および AEL115-117TP 変異体は機能欠失型、P308fs はドミナントネガティブ型の変異である事が予想された。今後オミクスデータを取得し統合的に解析し、T-ALL の新規治療戦略の確立に向けて変異型 RUNX1 の発現によって RUNX1 を中心とした生理的な転写制御ネットワークが破綻する最も初期の分子メカニズムを明らかにし、治療ターゲットの候補分子の同定を目指す。

T-ALL 患者において RUNX1 の体細胞変異が起きてからどのような過程を経て腫瘍が誘導されるのかについては明らかにされていない。本研究では、in vitro で正常な T 細胞の初期発生を再現し、そこに患者変異型 RUNX1 を遺伝子導入することで、変異型 RUNX1 が最も初期に誘導する反応を解析し、生理的な RUNX1 の機能と比較する。現在行われている T-ALL に対する治療法の多くは、すでに癌化した T 前駆細胞の増殖抑制や細胞死を誘導するものである。本研究では、野生型 RUNX1 と比較して、変異型 RUNX1 に特異的、且つ最も初期におこる反応を制御することで変異型 RUNX1 依存的な T 前駆細胞の腫瘍化を制御する、新しいコンセプトに基づいた治療法の確立が期待される。本研究では RUNX1 の変異を対象とするが、本研究によって確立された実験手法はそのまま他の T-ALL 原因遺伝子 (NOTCH1, FBXW7, PHF6, DNMT3A など) の解析にも応用できる。従って、本研究が世界の先駆けとなり、原因となる遺伝子変異に選択的な副反応の少ない新規治療法や、多くの遺伝子変異に共通のメカニズムを制御する事による汎用性の高い治療法の確立に関する新しいコンセプトの提示が期待される。

[発表論文]

1. Koizumi M, Kama Y, Hirano K, Endo Y, Tanaka T, Hozumi K and **Hosokawa H**. :Transcription factor Zbtb1 interacts with bridging factor Lmo2 and maintains the T-lineage differentiation capacity of lymphoid progenitor cells. *J Biol Chem*. 298(11): 102506 (2022)
2. Hirano K, **Hosokawa H**, Yahata T, Ando K, Tanaka M, Imai J, Yazawa M, Ohtsuka M, Negishi N, Habu S, Sato T and Hozumi K. :Dll1 can function as a ligand of Notch1 and Notch2 in the thymic epithelium. *Front Immunol*. 13: 852427 (2022)