

2023年12月25日

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構

造血と白血病を制御する未知の機構を解明

概要

1. 背景

高齢化の進行とともに血液がんは増加の一途を辿り、その病態解明や治療応用に様々な取り組みがなされてきました。特にシーケンス技術の発達により、がん細胞の DNA 上の遺伝子変異が同定されるようになると、血液がんの多くに RNA スプライシング（※1）を制御する因子の変異が認められることが明らかとなりました。特に骨髄異形成症候群（※2）の半数ではスプライシング遺伝子の変異が検出され、ある病型では SF3B1 という遺伝子の変異割合が 80%を超えるなど、疾患発症に重要な役割を果たしていると予想されます。これらの変異は、様々な標的遺伝子の RNA スプライシングに異常をきたし、DNA レベルではなく RNA レベルで機能を喪失させたり、機能を変容させてしまうことを報告してきました（Inoue et al. Nature. 2019, Inoue et al. Nature Genetics. 2021, Tanaka et al. Blood. 2022）。これまでの我々の研究（Inoue et al. Nature. 2019）において、臨床検体の大規模な解析と機能的 CRISPR スクリーニング法（※3）を駆使して、BRD9 (Bromodomain Containing 9) 遺伝子が SF3B1 変異に伴うスプライシング異常によって RNA レベルで喪失する現象の重要性を報告しました。

BRD9 はアセチル化リジン等を認識するブロモドメイン（※4）を有する分子群のひとつであり、創薬標的として有名な BRD4 とともに大きな注目を浴びています。我々のグループを含むこれまでの研究により、BRD9 は、DNA 上での変異ではなくスプライシング異常によって RNA レベルで機能喪失され、そしてクロマチン制御複合体である ncBAF (non canonical BAF)（※5）に特異的な構成因子である、という 2 点から非常に興味深い因子として知られています。一部の肉腫などで ncBAF や BRD9 の役割について研究が進んできましたが、はるかに高頻度に生じる血液がんや造血機能そのものにおいて、BRD9 が果たす役割については全く解明されていませんでした。本研究は、この分子機序をヒト・マウス両面から明らかとすることを突破口として、生物学的な意義を探索し病態解明と治療戦略へと迫ることを目的に研究を行いました。

2. 研究手法・成果

我々の造血は自己複製能と多分化能を有する造血幹細胞（※6）を頂点として、各系統にコミットした前駆細胞を経て、B 細胞などのリンパ球や好中球などのミエロイド系列の細胞などに分化成熟しながら維持されています。研究ではまず、この分化ヒエラルキーの頂点に存在する骨髄内の造血幹細胞における BRD9 の役割について調べました。BRD9 は造血幹細胞としての性質を維持する上で不可欠であり、

BRD9 の喪失は B 細胞系列への分化を阻害し、ミエロイド系列への分化を促進しました。B 細胞への分化には BRD9 のプロモドメインが不可欠であることも見出しました。造血細胞で長期間 BRD9 が欠失したノックアウトマウスモデルでは、やはりヒトと同じように骨髄異形成症候群を発症し（**図 1**）、ミトコンドリア機能低下や DNA ダメージ蓄積の観点からも加齢形質を再現しました。これらはスプライシング遺伝子 SF3B1 の変異を伴う骨髄異形成症候群において、BRD9 のスプライシング異常による RNA レベルでの喪失が病態理解の鍵になっていることを示唆していました。

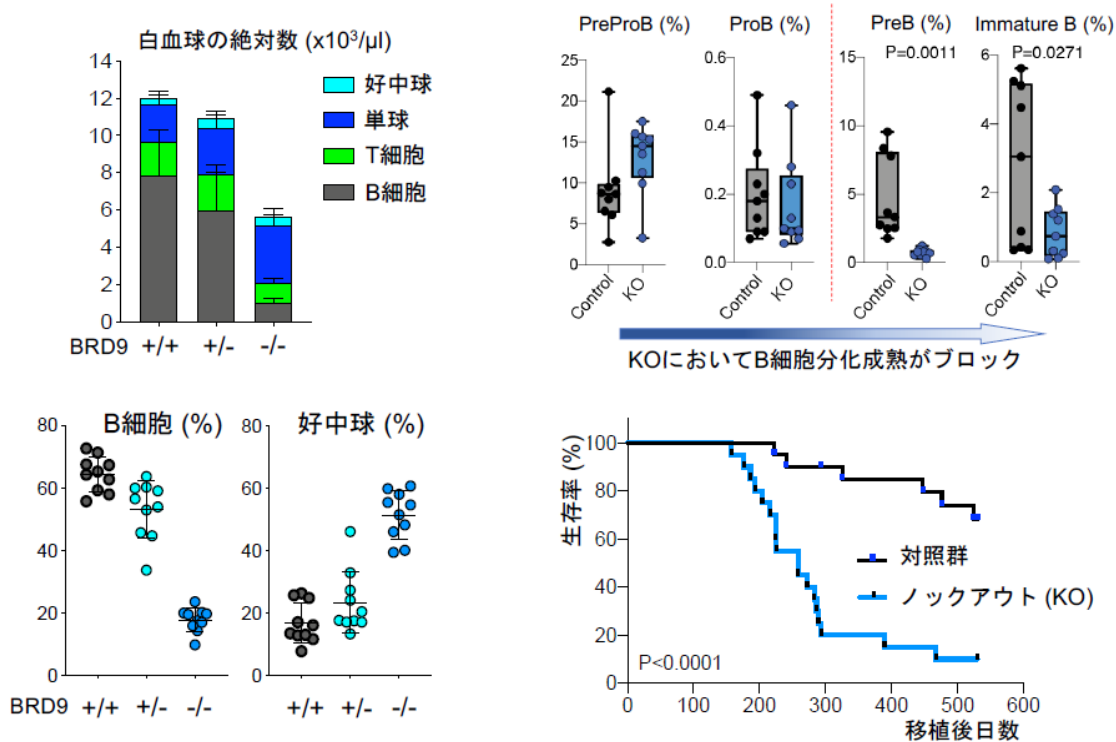


図1. ノックアウトマウス(-/-)では分化障害を伴うB細胞の減少（上左・上右）を認め、相対的な好中球増加（下左）を伴う血球減少が観察された。骨髄異形成症候群を発症し長期観察後に死亡した（下右）。

上記の通り、新たに作出した BRD9 ノックアウトマウスを用いた解析では、造血幹細胞の数が減り、ヒト臍帯血由来造血幹細胞やマウス造血幹細胞を用いた体外での実験でも幹細胞性の維持が難しいことが確認されました。しかし、興味深いことに、BRD9 野生型の骨髄細胞と BRD9 ノックアウト骨髄細胞を、骨髄破壊的な放射線照射を施したレシピエントマウスに競合的に移植した実験モデルでは、野生型細胞に対してノックアウトマウス由来の造血幹細胞や前駆細胞の比率が保たれ、ミエロイド系列への造血も維持されていました。一方でノックアウトマウス由来の B 細胞はほぼ消失していました。これらの知見は、ヒトの MDS 幹細胞においても一見すると自己複製能が減弱し弱々しいクローンに見えるにも関わらず、骨髄内でしぶとく残存し分化異常をきたす現象を再現しているものと考えられます。

次に、BRD9 はクロマチンリモデリング複合体 ncBAF に必須の構成因子であることから、BRD9 及び ncBAF 喪失下のクロマチンや遺伝子発現における影響を調べました。このような制御因子は同じ分子であっても細胞系列によって振る舞いが異なることが報告されていますが、ES 細胞では既報があるものの造血幹細胞における BRD9 の役割、ましてや生体レベルでの報告はこれまでに皆無でした。そこで、

ノックアウトマウスの造血幹細胞を用いて、シングルセルレベルを含めた RNA シーケンス、ATAC シーケンス (※7)、ChIP シーケンス (※8)、HiC 解析 (※9) などを用いたマルチオミックス解析を行いました。興味深いことに、BRD9 の喪失はクロマチンをよりオープンにすること、それらは特にスーパーエンハンサーやミエロイド系列の遺伝子において顕著であることを見出し、造血幹細胞の運命制御においてクロマチン制御に深く寄与する分子であることを見出しました (図 2)。

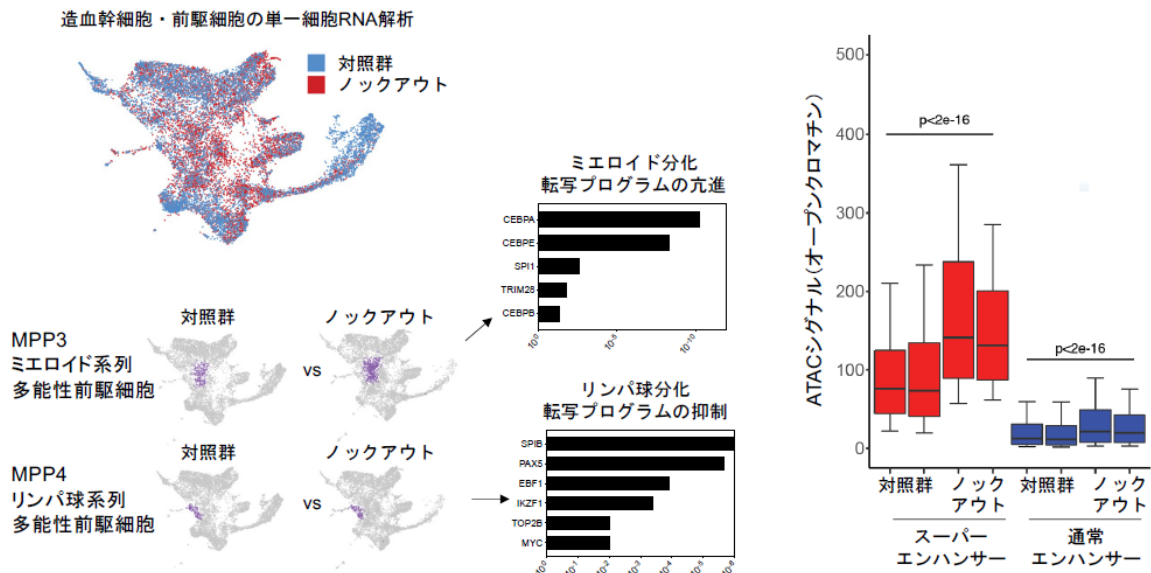


図2. ノックアウトマウスの単一細胞レベルでのRNAシーケンスよりミエロイド分化およびリンパ球分化プログラムがそれぞれ亢進・抑制されており (左)、ATACシーケンスによりエンハンサーにおけるオープンクロマチンが観察された (右)。

それでは、BRD9 はクロマチン上で一体何をしているのでしょうか？ これまで、我々が指摘してきたように、BRD9 はゲノム上で、クロマチンや転写単位の区画化に重要な CTCF (※10) が結合する部位に強く局在していることを造血幹細胞レベルで明らかにしました (図 3)。そして、BRD9 の喪失は CTCF 自身のゲノムへの結合を増強させるという全く新しい現象を発見しました。HiC 解析によりクロマチンの 3 次元構造をゲノムワイドに推測する手法を用いて、この現象がプロモーター領域で生じる場合には、同部位のクロマチンループを亢進させ、とりわけミエロイド系列遺伝子の発現を正に制御する傾向が確認されました。

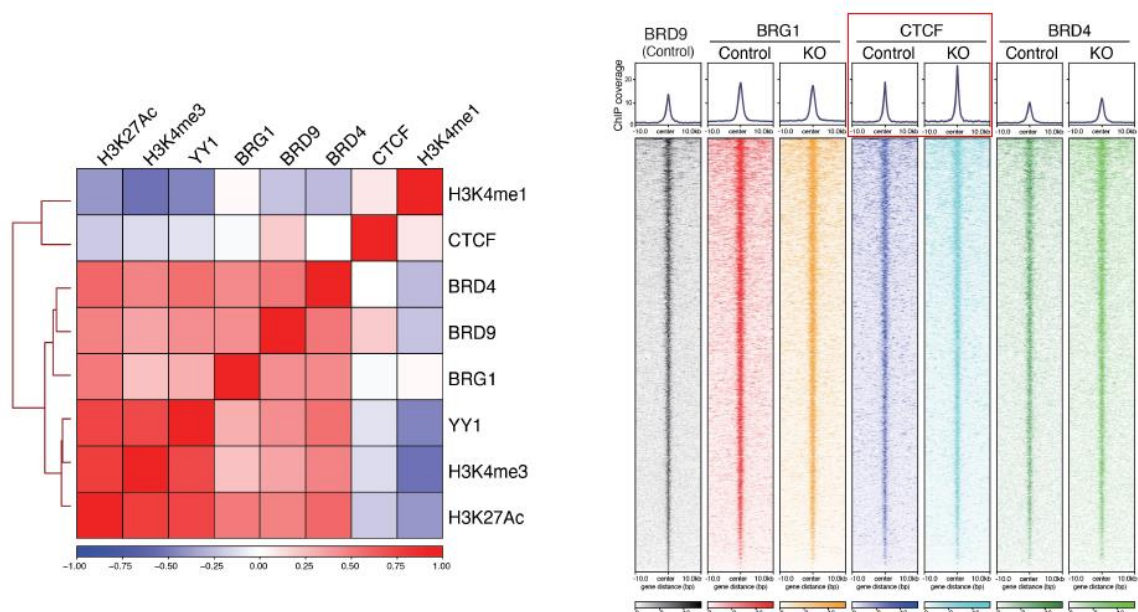


図3. 野生型造血幹細胞のChIPシーケンスによりクロマチン上でBRD9とCTCFの共局在が確認された(左)。また、BRD9ノックアウト(KO)によりCTCFピークの増強が観察されたが、他の共局在分子であるBRG1やBRD4ではその傾向は認められなかった(右)。

これらの研究と並行して、CRISPR 技術による BRD9 ノックアウトや BRD9 分解誘導剤(※11)などを用いて、上述のクロマチン変化を介したミエロイド分化プログラムの促進は、阻害後速やかに生じること、自己複製能が異常に亢進した白血病細胞でも速やかに分化誘導が可能であることを見出しました。白血病の中で最も多い急性骨髄性白血病の多くは、未だ予後不良であり、ミエロイド系列にわずかな分化コミットメントを示すものの、正常分化が著しく抑制された疾患です。分化した白血病細胞は生存し続けることができないため、歴史的にも分化誘導療法(※12)は白血病の重要な戦略となってきました。実際に 100%白血病を誘導しうるヒト転座遺伝子(MLL-AF9)を導入しても、BRD9 をノックアウトした造血幹細胞を形質転換することはできず、ひとたび発症しても BRD9 阻害により分化が誘導され、脾臓への白血病細胞浸潤などが改善し長期生存することから、新規治療戦略の大きな可能性を示唆する成果が得られました(図4)。正常造血で認められたように、BRD9 阻害は ncBAF が元々結合するゲノム領域や CTCF 結合領域においてクロマチンをよりオープンにすることでミエロイド系列への分化を誘導することが明らかとなり、BRD9/CTCF 部位のクロマチン状態の変化が急性骨髄性白血病の治療において重要であることが示されました。

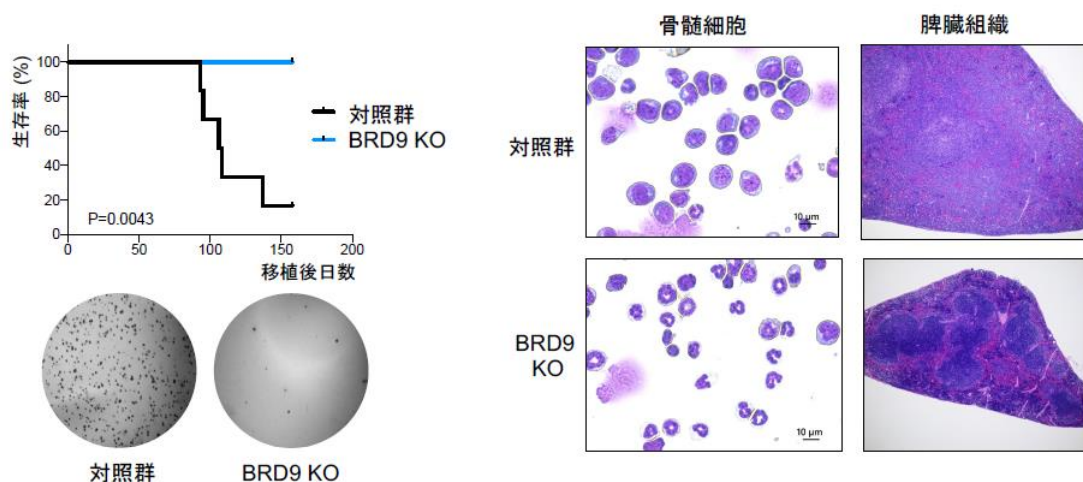


図4. BRD9をノックアウト (KO) した造血幹細胞はMLL-AF9 cDNA導入によって白血病を発症せず (上左)、発症後にKOしたモデルでも不死化コロニーの著減 (下左)、白血病細胞の分化・脾臓浸潤の改善 (右) が認められた。

3. 波及効果

まず、RNA レベルで発現が消失するような遺伝子が組織幹細胞のクロマチン制御においてこれほど重要な役割を果たしていることを広範な実験から証明した報告は今回が初めてであり、がん領域だけでなく分子生物学や遺伝学全般に大きなインパクトを与える成果となりました。特に、RNA、すなわち転写後レベルでの異常が、他の遺伝子の転写に深く関与するという知見は、BRD9 だけでなく、転写因子 EVI1 におけるスプライシング異常 (Tanaka et al. Blood. 2022) による機能変容についても報告を重ねてきました。これらは、がんにおける遺伝子発現調節がより複雑であることを示唆しており、今後のさらなる病態解明が期待されます。また、ブロモドメインタンパクは BRD4 をはじめとして、がん領域で非常に注目をされる創薬標的として知られています。これまでに、横紋筋肉腫や滑膜肉腫など比較的まれながんで BRD9 を治療標的とする臨床試験が進んでおり、その効果が期待されます。しかし、長期的な投与は本研究で示したように造血幹細胞の幹細胞性や分化機構にも大きな影響を与えるものと考えられます。一方で短期的な分化誘導療法として急性骨髄性白血病での治療応用についてのコンセプトは本研究で確立しており、クロマチンレベルでのメカニズムに基づいた開発が期待されます。

4. 今後の予定

まず、急性骨髄性白血病を中心とした血液がんにおいて BRD9 を標的とした治療応用について阻害剤開発を進めていきます。同時に、BRD9 スプライシング異常を利用した治療戦略についても、ゲノムワイドなスクリーニングから合成致死性遺伝子の探索などを行っていきます。また、造血における BRD9 の役割について、胎児レベルでの造血ではどうか?、BRD9 のブロモドメインが何を認識しているのか?、BRD9-CTCF による詳細なクロマチン制御メカニズムとは何か? など、まだまだ分子レベルで解決すべ

き問題が残されています。このように、がんのメカニズム解明、プロモドメインタンパクの分子基盤の観点から、大きな発展性を孕んだ同領域を推進する成果に挑戦していきます。

5. 謝辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業（JP20H00537、JP20H03717、16H06279（先進ゲノム支援）、JP20H00537、JP20KK0184、JP20H03512）、日本医療研究開発機構（21ck0106697h0001、22ck0106697h0002、23ck0106697h0003、23ama221126h0001）に加えまして、日本血液学会、日本白血病研究基金、アステラス病態代謝研究会、持田記念医学薬学振興財団、化血研、ブリストルマイヤーズスクイブ、三菱財団、住友財団、千里ライフサイエンス振興財団、Leukemia & Lymphoma Society、American Society of Hematology の研究助成のもと進めることができました。関係者の皆様、研究にご協力いただいた皆様に深く御礼申し上げます。

■ 論文タイトルと著者

掲載誌：*Nature Communications*

英文タイトル：BRD9 determines the cell fate of hematopoietic stem cells by regulating chromatin state

タイトル和訳：BRD9 はクロマチン状態を制御して造血幹細胞の運命制御を決定する

著者名：肖慕然^{1,2,*}、近藤伸二^{3,4*}、野村真樹^{1,5,*}、加藤真一郎^{6,7,8}、西村耕太郎¹、臧維嘉^{1,9}、張一帆^{1,9}、紅朋浩^{8,10}、Aaron Viny¹¹、重廣司¹²、伊川友活¹²、山崎博未¹、福本未記¹、田中淳^{1,13}、林康貴¹、小池優依¹、青山有美^{1,9}、伊藤裕美¹、西川博嘉^{6,7,8,14}、北村俊雄^{1,2}、金井昭教^{15,16}、横山明彦¹⁷、藤原亨^{18,19}、合山進²⁰、野口英樹^{3,4}、Stanley C. Lee^{21,22}、豊田 敦^{4,23}、日野原邦彦^{6,7,8}、Omar Abdel-Wahab²⁴、井上大地^{1,9}

所属：

¹ 公益財団法人神戸医療産業都市推進機構 先端医療研究センター血液・腫瘍研究部

² 東京大学 医科学研究所 細胞療法分野

³ 国立遺伝学研究所 情報・システム研究機構 データサイエンス共同利用基盤施設ゲノムデータ解析支援センター

⁴ 国立遺伝学研究所 先端ゲノミクス推進センター

⁵ 京都大学 iPS 細胞研究所

⁶ 名古屋大学 大学院医学系研究科 分子細胞免疫学

⁷ 名古屋大学 高等研究院

⁸ 名古屋大学 大学院医学系研究科 5D 細胞ダイナミクス研究センター

⁹ 京都大学 大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学

¹⁰ 名古屋大学 大学院医学系研究科神経疾患・腫瘍分子医学研究センター システム生物学分野

¹¹ Department of Medicine, Division of Hematology and Oncology, and Department of Genetics & Development, Columbia University Irving Medical Center, New York, NY, USA

¹² 東京理科大学 生命医科学研究所 免疫アレルギー部門

¹³ 京都大学 医生物学研究所 再生免疫学分野



- 14 国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 腫瘍免疫分野
15 広島大学 原爆放射線医科学研究所 がん分子病態研究分野
16 東京大学 大学院新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻情報生命科学講座
17 国立がん研究センター 鶴岡連携研究拠点がんメタボロミクス研究室
18 東北大学 大学院医学系研究科 血液免疫病学分野
19 岩手医科大学医学部 臨床検査医学講座
20 東京大学 大学院新領域創成科学研究科 先進分子腫瘍学分野
21 Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Center, Seattle, WA, United States.
22 Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Washington, Seattle, WA, United States.
23 国立遺伝学研究所 比較ゲノム解析研究室
24 Molecular Pharmacology Program, Sloan Kettering Institute, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, United States.

*These authors are equally contributed.

*責任著者:

井上大地, MD, PhD, d-inoue@fbri.org

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構 先端医療研究センター血液・腫瘍研究部

DOI : 10.1038/s41467-023-44081-6

■ 用語解説

※1 **RNA スプライシング** ; RNA 転写後修飾の一つ。転写された RNA 前駆体の一部 (イントロン) が切断、除去された後、残りの部分 (エクソン) が再結合する反応。真核生物において、主に mRNA の成熟過程で起こる。

※2 **骨髄異形成症候群** ; 造血幹細胞における遺伝子変異などが原因で、骨髄内での造血細胞の異常な増殖と細胞死を特徴とする腫瘍性疾患であり、正常な血液細胞が造られなくなる。貧血、出血傾向、感染に伴う発熱などの症状が現れる。

※3 **CRISPR スクリーニング法** ; 遺伝子をノックアウト可能な CRISPR-Cas9 システムを用いたスクリーニング手法。CRISPR ライブラリーと呼ばれる多数の遺伝子をターゲットにした gRNA プールと Cas9 タンパク質を細胞に導入した後、細胞増殖や薬剤耐性など目的に応じた指標をもとにノックアウトされた遺伝子を特定する方法。

※4 **プロモドメイン** ; アセチル化されたリジン残基を認識するタンパク質ドメイン。アセチル化ヒストンを認識し、クロマチン構造や遺伝子発現を制御する機能がよく知られる。

※5 **ncBAF (non canonical BAF)** ; BAF (SWI/SNF) 複合体の一種。BAF 複合体は ATP 依存的にクロマチン構造を制御しゲノム全体の包括的な遺伝子制御に寄与している。構成するサブユニットの違いにより cBAF, PBAF, ncBAF に分類され、それぞれ特異的な生体機能を有することが近年明らかにされている。

※6 **造血幹細胞** ; 主に骨髄の中で血球をつくり出す源の細胞。赤血球・白血球 (リンパ球や好中球など) ・血小板などさまざまな細胞に成長、分化する。造血幹細胞は自らを複製可能な性質をもっており、このことによって持続的に血液を造



り出している。

※7 **ATAC シーケンス**；トランスポゼースを用いてゲノム DNA のオープンクロマチン領域を同定する次世代シーケンス技術。さらにヌクレオソーム位置の特定や転写因子の DNA 占有状態の解析も可能である。

※8 **ChIP シーケンス**；クロマチンと結合する転写因子、リモデリング因子やヒストン修飾を特異的抗体で免疫沈降 (IP) し、IP したクロマチン断片を次世代シーケンスにより解析し、相互作用領域やヒストン修飾のマッピングを可能とする手法。

※9 **HiC 解析**；次世代シーケンスによりゲノムワイドにクロマチン相互作用や3次元構造を検出、解析する手法。

※10 **CTCF**；CCCTC-binding factor。ジンクフィンガー (ZF) ドメインを有する転写調節因子。CTCF は他の因子と共に転写活性化因子、転写抑制因子、両方の機能が知られている。また、エンハンサーとプロモーター間の会合を制御するインシュレーターとして機能することも知られている。

※11 **BRD9 分解誘導剤**；タンパク質分解経路であるユビキチン-プロテアソーム系を利用し BRD9 を選択的に分解誘導する低分子化合物。

※12 **分化誘導療法**；白血病細胞を正常細胞に分化させることで、増殖を止め死滅させる治療法。急性前骨髄球性白血病における all-trans retinoic acid (ATRA)などが臨床応用されている。

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構 <https://www.fbri-kobe.org>

FBRI：Foundation for **B**iomedical **R**esearch and **I**nnovation at Kobe

神戸医療産業都市推進機構 (理事長：本庶佑) は、阪神・淡路大震災からの創造的復興プロジェクト「神戸医療産業都市」の中核的支援機関および先端医療研究機能を併せ持つ財団法人として2000年3月に設立されました。2018年4月、神戸医療産業都市推進機構へと組織を発展的に改組、「健康長寿社会に向けた課題解決策を神戸から世界へ発信していく」ことを掲げ事業を推進しています。

先端医療研究センター 血液・腫瘍研究部 URL <https://www.fbri-kobe.org/laboratory/research5/>

■お問合せ

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構

経営企画部 IBRI 事業推進課 林、金子

TEL: 078-306-0708 FAX: 078-306-1708

E-mail: kenkyu-fbri (末尾に @fbri.org をつけてください)