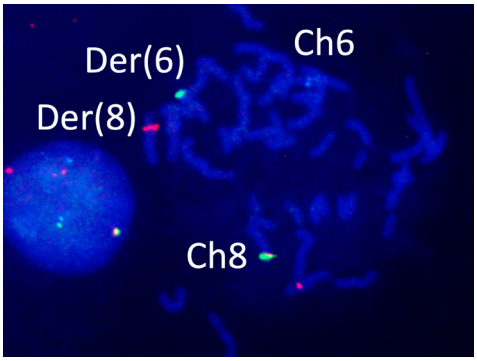
37　芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍の統合的標的治療法の開発	指田　吾郎

【目的】芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍・Blastic plasmactyoid dendritic cell neoplasm（BPDCN）は、急性骨髄性白血病に分類される希少がんであり、ウイルス感染防御に重要な plasmacytoid dendritic cells（pDCs）の前駆細胞から発生すると推測されているが、がん幹細胞を含めた病態基盤は未だ明らかでなく、新しい標的治療が求められている。次世代シーケンサーの進歩によって、BPDCN においても多くの遺伝子変異・エピゲノム異常が報告されているが、こうした異常の BPDCN 発症過程での機能的役割や、その病態基盤や BPDCN に特異的なバイオマーカーも未だ同定されていない。こうした課題を克服するために、我々は BPDCN 特異的な染色体転座 t（6；8）（p21；q24）からアイデアを得て、転座によって活性化された *MYC*（8q24）と *RUNX2*（6p21）による BPDCN 発症機構解明に着手した。t（6；8）（p21；q24）によって生じた RUNX2 スーパーエンハンサーの交換による MYC と RUNX2 発現制御破綻の分子基盤の一端を明らかにした。さらに、BPDCN 患者で高率に変異しているがん抑制遺伝子 *p53* と *TET2* を欠損させたマウスを用いて、*RUNX2* スーパーエンハンサーに依存した MYC 高発現 BPDCN 病態を再現する世界初のマウスモデルの作製に成功した。本研究では、このモデルを活用して BPDCN に対する新規標的治療の検証を実施した。

【方法】BPDCN 発症機構に関して、BPDCN 特異的な染色体転座による RUNX2 スーパーエンハンサーの交換による MYC と RUNX2 活性化とがん細胞増殖の分子メカニズムを、ゲノム・エピゲノム解析と細胞機能解析を実施した。実際、*MYC* と *RUNX2* をノックダウンすると BPDCN 細胞の増殖活性は著しく抑制された。さらに、BPDCN 患者で高率に認められる *p53* と *TET2* の機能喪失型変異と、RUNX2 スーパーエンハンサーによる MYC 高発現の協調による発症機構を解明する過程において、世界で初めて BPDCN マウスモデルの作製に成功した。この pDCs-specific *MYC*-*RUNX2*-expressing *Tet2/p53* double KO マウスによって、初めて生体レベルにおける BPDCN の病態基盤を詳細に検証することが可能になった。本研究では、未だ実験的に証明されていない BPDCN の発生起源・がん幹細胞を、純化した各細胞系列の前駆細胞をレシピエントマウスに移植して解析した（研究計画 1）。次に、BPDCN に対する新規治療開発のために、同定したがん幹細胞特異的スーパーエンハンサー機能を化学的に阻害する検証を *in vitro* および *in vivo* にて実施し、ゲノム編集技術によって遺伝学的に欠損させることでも検証した（研究計画 2）。続けて、BPDCN マウスを用いて、pDCs 関連転写因子 RUNX2 と、その標的因子・経路の阻害を目指した。転写因子の DNA 結合を特異的に阻害できる技術を用いて、RUNX2 標的遺伝子の発現を包括的な抑制を試みた。以上、がん生存に不可欠な細胞系列転写因子・RUNX2 を阻害する統合的ながん標的治療開発のための検証を実施した（研究計画 3）。

【結果】本研究課題によって、希少な難治性がんである BPDCN に対して、世界初のマウスモデルを活用することで、その病態基盤を解明した。また、がん幹細胞特異的スーパーエンハンサーと細胞系列特異的転写因子の機能阻害による新しいがん治療法のための重要な基礎的知見が得られた。

BPDCN 細胞 FISH 解析



37. 芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍の統合的標的治療法の開発

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

Key words：芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍，スーパーエンハンサー，染色体転座，MYC，RUNX2

緒　言

芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍・Blastic plasmactyoid dendritic cell neoplasm（BPDCN）は、急性骨髄性白血病に分類される希少がんであり、ウイルス感染防御に重要な plasmacytoid dendritic cells（pDCs）の前駆細胞から発生すると推測されているが、がん幹細胞を含めた病態基盤は未だ明らかでない。また、この白血病細胞は皮膚や多臓器に浸潤するだけでなく、従来の抗がん剤治療に抵抗性で予後は極めて不良であり、新しい標的治療が求められている。次世代シーケンサーの進歩によって、BPDCN においても多くの遺伝子変異・エピゲノム異常が報告されているが、こうした異常の BPDCN 発症過程での機能的役割は明白でない。実際、効果的な治療標的となり得る BPDCN に特異的なバイオマーカーは同定されていない。

こうした課題を克服するために、我々は BPDCN 特異的な染色体転座 t（6；8）（p21；q24）からアイデアを得て、転座によって活性化された *MYC*（8q24）と *RUNX2*（6p21）による BPDCN 発症機構解明に着手した。研究開始時までに、t（6；8）（p21；q24）によって生じた RUNX2 スーパーエンハンサーの交換による MYC と RUNX2 発現制御破綻の分子基盤を明らかにした。RUNX2 は pDCs 分化に不可欠であり、実際、BPDCN 細胞でも *RUNX2* や *MYC* をノックダウンすると細胞増殖活性は著しく抑制される。さらに、BPDCN 患者で高率に変異しているがん抑制遺伝子 *p53* と *Tet2* を欠損させたマウスを用いて、RUNX2 スーパーエンハンサーに依存した MYC 高発現 BPDCN 病態を再現する世界初のマウスモデルの作製に成功した。このマウスは白血病細胞の増殖と浸潤によって早期に死亡するだけでなく、ヒト BPDCN 細胞の形態、表現形、遺伝子発現プロファイルを忠実に再現している。我々は、このモデルを活用することで、生体レベルにおける BPDCN 病態基盤を詳細に検証するとともに、新規治療法開発のための基礎的検証を実施した。本研究課題のもとになった知見は、昨年、論文に発表している［1］。

方法および結果

1.　芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍の病態基盤の解析と治療標的の検証

始めに、方法と結果の概要を説明する。我々は、BPDCN 発症機構を理解するために、BPDCN 特異的な t（6；8）染色体転座による RUNX2 スーパーエンハンサーの交換による MYC と RUNX2 活性化とがん細胞増殖の分子基盤を、ゲノム・エピゲノム解析と細胞機能解析実験にて検証した。実際、*MYC* と *RUNX2* をノックダウンすると CAL-1 細胞（t（6；8）転座と *TET2* 機能喪失型変異のあるヒト BPDCN 細胞株）の増殖活性は著しく抑制された。さらに、BPDCN 患者で高率に認められる *p53* と *TET2* の機能喪失型変異と、RUNX2 スーパーエンハンサーによる MYC 高発現の協調による発症機構を解析する過程において、世界で初めて BPDCN マウスモデルの作製に成功した。この pDCs-specific *MYC*-*RUNX2*-expressing *Tet2*/*p53* double KO マウスによって、初めて生体レベルにおける BPDCN の病態基盤を詳細に検証することが可能になった。このモデルを活用することで、未だ実験的に証明されていない BPDCN の発生起源・がん幹細胞を、純化した各細胞系列の前駆細胞をレシピエントマウスに移植して解析した（研究結果 2、3）。さらに、BPDCN に対する新規治療開発のために、同定したがん幹細胞特異的スーパーエンハンサー機能を阻害する検証実験を実施した。また、ゲノム編集によって遺伝学的に欠損させることでも検証する（研究結果 3、4）。続けて、BPDCN マウスを用いて、BPDCN 細胞の生存に不可欠な pDCs 特異的転写因子 RUNX2

と、その標的因子・経路を阻害する。また、転写因子の DNA 結合を特異的に阻害できる技術を用いて、RUNX2 標的遺伝子の発現を包括的に抑制することを試みた。以上、がん特異的スーパーエンハンサー機能阻害に加えて、がん生存に不可欠な細胞系列転写因子・RUNX2 を阻害する統合的ながん標的治療を検証した（研究結果 5）。

2. BPDCN における MYC と RUNX2 のがん遺伝子機能の分子基盤解明

始めに、c-MYC と RUNX2 発現レベルを、t（6；8）転座のある BPDCN 細胞株・CAL-1（長崎大学の前田隆浩博士より供与）、および患者骨髄細胞にて検証した（東京医科大学血液内科の大屋敷一馬博士、熊本大学血液内科の徳永賢治博士、岩永栄作博士の協力）。少数例の検討ではあったが、実際に、t（6；8）転座のある BPDCN 細胞において MYC と RUNX2 の mRNA・タンパク質における非常に高い発現レベルを認めた。実際、BPDCN における *MYC* と *RUNX2* のがん遺伝子機能を検証するために、CAL-1 細胞にて shRNA によってノックダウンすると、CD56 や CD123（IL3-RA）といった BPDCN 表面マーカー発現レベルが低下するとともに、有意に細胞増殖活性が阻害された。がん遺伝子として機能していることが分かった。続けて、BPDCN における標的遺伝子を含めた分子メカニズムを理解するために、*MYC* または *RUNX2* ノックダウン BPDCN 細胞を用いた遺伝子発現解析を実施すると、がん関連の MYC 標的遺伝子の発現低下とともに、RUNX2 の標的遺伝子でもある pDC 分化関連遺伝子の低下が確認された。

3. 染色体転座由来スーパーエンハンサーによる BPDCN 病態基盤の解明

次に、がん特異的な MYC と RUNX2 の発現亢進が染色体転座によるものかを確認するために、t（6；8）転座のある CAL-1 BPDCN 細胞の全ゲノムシークエンス解析に加えて（シンガポール国立大学の大里元美博士の協力）、*MYC* エンハンサー領域/*RUNX2* 領域の FISH 解析（東京医科大学血液内科の梅津知宏博士、大屋敷一馬博士の協力）によって、*MYC* と *RUNX2* の遺伝子領域と *MYC* と *RUNX2* のエンハンサー領域の間に転座点を確認した。活性化ヒストン修飾 H3K27ac に対する ChIP-sequencing と既報の BRD4 の ChIP-sequencing データの解析によって［2］、10 kb 以上に広がる *RUNX2* のスーパーエンハンサーを確認した（図 1）（東京大学の岩間厚志博士、大島基彦博士の協力）。さらに、Chromosome Conformation Capture（3C）解析によって、*RUNX2* エンハンサー領域（6p21）は、*MYC* プロモーター領域（8q24）と近接していた。

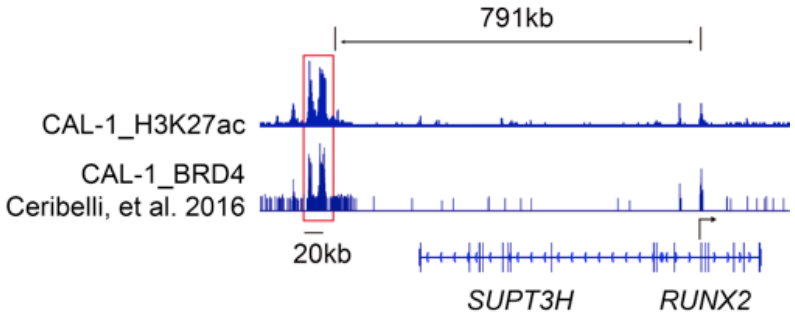


図 1. *RUNX2* 近傍の H3K27ac 修飾と BRD4 結合
活性化ヒストン修飾 H3K27ac と BRD4 に対する ChIP-sequencing。

同定したスーパーエンハンサーによるがん促進機能を確認するために、エンハンサー機能を抑制する BRD4 阻害剤 JQ1 によって、BPDCN 細胞の増殖抑制効果と MYC および RUNX2 発現抑制効果を *in vitro* にて検証した。実際に、JQ1 処理すると BPDCN 細胞は有意に増殖が抑制された。その増殖抑制効果は、MYC または RUNX2 をレトロウイルスベクターで強発現させることで、消失したことから、エンハンサー活性化による MYC と RUNX2 強発現に依存していることが証明された。さらに、転座由来のエンハンサーを、転座点をはさむ形で（野生型アリルではなく）ゲノム編集によって欠損させると、MYC 発現レベルの減少と細胞増殖抑制が認められ、その機能が遺伝学的に証明された。以上、染色体転座由来スーパーエンハンサーによる BPDCN の病態進展機構が明らかとなった。

4. BPDCN マウスモデルの確立と c-MYC と RUNX2 による BPDCN 発症機構の解明

RUNX2 と c-MYC が BPDCN 幹細胞の発生に十分であるか疾患モデルで検証した。実際に、BPDCN 生体モデルは一切報告されておらず、成功すれば、世界で初めての BPDCN マウスモデルとなった。始めに、BPDCN 患者に *TET2* と *p53* 変異が高頻度にある知見から、*Tet2flox/flox;Trp53flox/flox;CreERT2* DKO マウスを交配準備した。患者におけるがん発症過程を模擬するために、*Tet2* または *p53* を欠損させた後に、造血幹細胞を採取して *RUNX2* と *MYC* をレトロウイルスベクターによって導入した。導入された幹細胞を FACS ソートした後に、致死量放射線照射した野生型レシピエントマウスに移植して、BPDCN 発症の有無を解析した。pDC 分化誘導条件下においてマウスで BPDCN 様白血病（$CD11b^{-}B220^{+}Bst2^{+}$）の発症が確認された（図 2）。さらに、BPDCN 幹細胞を同定するために、幹細胞また pDC 前駆細胞の遺伝子発現解析に加えて、FACS で純化した pDC 前駆細胞分画の移植実験によって、生体におけるがん幹細胞としての機能を確認した。以上、世界で初めての BPDCN マウスモデルの確立と、その発症機構を解明した。

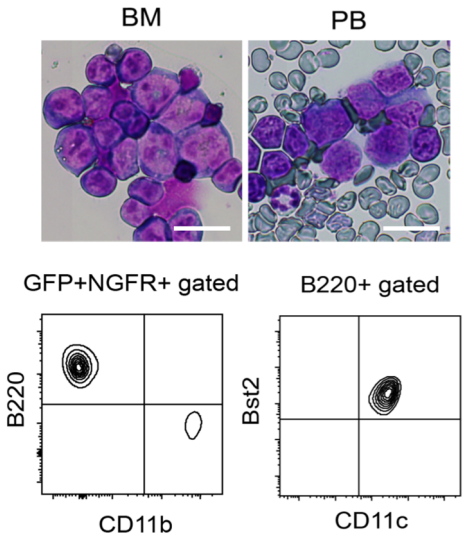


図 2. BPDCN の細胞形態と FACS 解析

骨髄と末梢血の BPDCN 細胞と BPDCN 特異的表現型（$CD11b^{-}B220^{+}Bst2^{+}$）。

スケールバー：20 μm。

5. がん特異的スーパーエンハンサー機能を阻害する BPDCN 治療の基礎的検証

ヒト BPDCN 細胞をヒト化サイトカイン免疫不全マウスに移植する異種移植モデルを用いて、エンハンサー活性化を障害する BRD4 阻害剤などによる BPDCN 抑制効果の解析を実施した。また、エンハンサー領域をゲノム編集によって欠損させた BPDCN 細胞を移植することで、転座エンハンサーに依存した白血病増殖活性化の生体での機能を、現在も実験個体数を増やすとともに、継続して検証している。また、転写因子の DNA 結合を特異的に阻害できる技術を用いて、RUNX2 標的遺伝子の発現を包括的に抑制する試みとして、予備的な実験を実施した。以上、BPDCN に対する新規治療開発のために、がん特異的スーパーエンハンサー機能を阻害する基礎的検証を実施した。

考　察

急性骨髄性白血病の一つである BPDCN は、従来の急性白血病に対する抗がん剤治療には抵抗性で予後不良である［3］。近年、BPDCN に対する治療薬とされる SL-401 は、BPDCN 細胞に発現する表面マーカーCD123（IL3-RA）に作用する抗体である［4］。ただし、CD123 は正常細胞も発現しており、BPDCN 細胞に特異的ではなく、今後のさらなる検討が必要である。近年、がん発症過程において、スーパーエンハンサー活性化によるがん遺伝子発現制御機構の破綻が着目され報告されている［5，6］。がん遺伝子である MYC の活性化機構として、組織特異的なエンハンサーが異常に活性化する大腸がん、急性リンパ性白血病が知られていたが、BPDCN においては、染色体相互

転座によって、pDCs 細胞系列特異的な RUNX2 スーパーエンハンサーが MYC 発現を活性化していることを解明した。実際、BPDCN を含めたがんは、正常細胞や組織と比較して、スーパーエンハンサーにより依存して機能しており、JQ1 などの BRD4 阻害剤に対して感受性が高い。一方、RUNX2 は、造血細胞において特異的に pDCs に発現する pDCs の成熟と遊走能に不可欠な転写因子であると報告されている［7］。pDCs の前駆細胞が起源である BPDCN においても、がん細胞の生存に不可欠な転写因子である。こうした BPDCN の基礎・臨床研究の状況において、本研究では、がん幹細胞特異的エンハンサー活性化による BPDCN 発症機構の解明を通して、MYC のエンハンサー活性化機構をがん治療標的とするだけでなく、細胞系統特異的転写因子・RUNX2 と標的因子群を併せて標的とすることで、より効果的で特異性の高い複合的がん治療法の開発を目指した。また、複数の標的治療を組み合わせたがん治療法の開発段階において、相互作用や副作用を含めた生体モデルでの治療効果判定が可能であることは、この研究課題の大きな利点である。従って、将来のより早い時期に、難治性がんである BPDCN の治療法への展開と応用が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、シンガポール国立大学の大里元美博士、東京医科大学の大屋敷一馬博士、梅津知宏博士、東京大学医科学研究所の岩間厚志博士、大島基彦博士、長崎大学の前田隆浩博士、熊本大学の徳永賢治博士、岩永栄作博士、広島大学の金井昭教博士、その他の皆様であり、感謝申し上げます。また、熊本大学国際先端医学研究機構白血病転写制御研究室（指田研究室）の久保田翔博士を始めとした他の研究員、研究補助員の皆さんに感謝します。

文　献

1） Kubota S, Tokunaga K, Umezu T, Yokomizo-Nakano T, Sun Y, Oshima M, Tan KT, Yang H, Kanai A, Iwanaga E, Asou N, Maeda T, Nakagata N, Iwama A, Ohyashiki K, Osato M, Sashida G. Lineage-specific RUNX2 super-enhancer activates MYC and promotes the development of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. Nat Commun. 2019 Apr 10;10(1):1653. PMID: 30971697 DOI: 10.1038/s41467-019-09710-z.

2） Ceribelli M, Hou ZE, Kelly PN, Huang DW, Wright G, Ganapathi K, Evbuomwan MO, Pittaluga S, Shaffer AL, Marcucci G, Forman SJ, Xiao W, Guha R, Zhang X, Ferrer M, Chaperot L, Plumas J, Jaffe ES, Thomas CJ, Reizis B, Staudt LM. A Druggable TCF4- and BRD4-Dependent Transcriptional Network Sustains Malignancy in Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm. Cancer Cell. 2016 Nov 14;30(5):764-778. PMID: 27846392 DOI: 10.1016/j.ccell.2016.10.002.

3） Pagano L, Valentini CG, Grammatico S, Pulsoni A. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: diagnostic criteria and therapeutical approaches. Br J Haematol. 2016 Jul;174(2):188-202. PMID: 27264021 DOI: 10.1111/bjh.14146.

4） Frankel AE, Woo JH, Ahn C, Pemmaraju N, Medeiros BC, Carraway HE, Frankfurt O, Forman SJ, Yang XA, Konopleva M, Garnache-Ottou F, Angelot-Delettre F, Brooks C, Szarek M, Rowinsky E. Activity of SL-401, a targeted therapy directed to interleukin-3 receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm patients. Blood. 2014 Jul 17;124(3):385-92. PMID: 24859366 DOI: 10.1182/blood-2014-04-566737.

5） Lovén J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR, Bradner JE, Lee TI, Young RA. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. Cell. 2013 Apr 11;153(2):320-34. PMID: 23582323 DOI: 10.1016/j.cell.2013.03.036.

6） Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, Lau A, Saint-André V, Sigova AA, Hoke HA, Young RA. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. Cell. 2013 Nov 7;155(4):934-47. PMID: 24119843 DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.053.

7） Sawai CM, Sisirak V, Ghosh HS, Hou EZ, Ceribelli M, Staudt LM, Reizis B. Transcription factor Runx2 controls the development and migration of plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med. 2013 Oct 21;210(11):2151-9. PMID: 24101375 DOI: 10.1084/jem.20130443.