

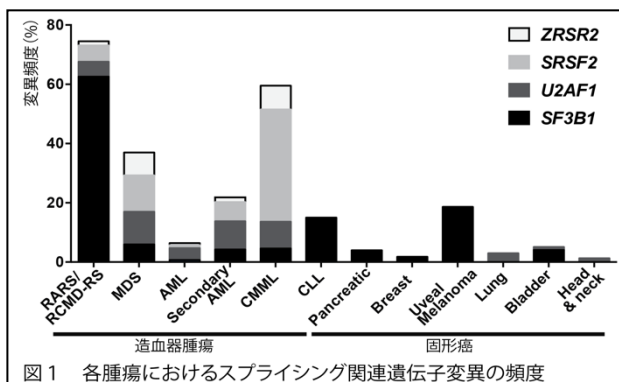
スプライシングによるクロマチン3次元構造の制御機構の解明

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
井上大地

背景

近年の遺伝子解析技術の進歩により、腫瘍細胞においてクロマチンやスプライシングの制御に関与する遺伝子の変異が高頻度に検出されることが明らかとなった。しかし、生物学上必須の役割をに担う両者をつなぐ詳細な機構は全く明らかとなっていない。我々はこれまでに、ヒトの腫瘍、特に骨髄異形成症候群 (MDS) でスプライシング関連遺伝子の変異が高頻度に検出されることに着目してきた。MDSはクローン性造血、血球形態異常、無効造血、DNA損傷、ゲノム不安定性などを特徴とする予後不良な疾患群であり、高齢化に伴い増加の一途を辿っている。半数の症例で*SF3B1*、*SRSF2*、*U2AF1*などのスプライシングを司る遺伝子の変異が同定されており、それらは相互排他的である (Yoshida et al. *Nature* 2011)。中でも*SF3B1*変異は環状鉄芽球 (RS, Ringed sideroblast) を有するMDS の70%近くで認められるだけでなく、慢性リンパ性白血病、悪性黒色腫、乳癌、膵臓

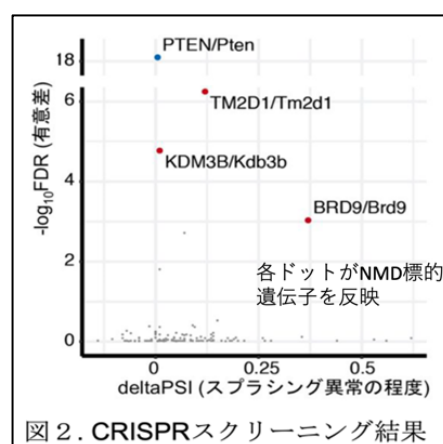
癌など癌種をまたいで変異が高頻度に報告されている (図1)。*SF3B1*変異によるスプライシング制御異常に由来する新たな転写産物 mRNA の多くは Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) により分解されるが、申請者は癌横断的な大規模な患者mRNAの解析と機能的CRISPRスクリーニングの結果から、疾患発症とバイオマーカー両面から極めて重要なNMD標的遺伝子の存在を明らかとしてきた (Inoue et al.



Nature 2019) (図2)。また、クロマチン制御の観点からは*ASXL1*、*EZH2*、*TET2*などのエピゲノム制御因子の変異がMDSの半数の症例で検出されることから、クロマチンやスプライシングの双方が病態において非常に重要な役割を果たしていると予想される。

研究目的

これまでの申請者の研究により、*SF3B1*の機能獲得型変異は*BRD9*(Bromodomain-containing protein 9)の異常なスプライシングを惹起し*BRD9*自体の変異を伴うことなく機能喪失をきたし、悪性黒色腫などの腫瘍発症につながることを示した (Inoue et al. *Nature* 2019)。これらの研究では、血液癌から固形癌に至るまで大規模なRNAシーケンスデータの解析を行い、NMDの標的となる遺伝子群を非常に高い精度で予測・抽出するパイプラインの開発に成功した (Inoue et al. *Nature* 2019, Inoue et al. *Nature Genetics* 2021)。その成果に基づいて作成したカスタムsgRNAライブラリーとCas9発現細胞株、Cas9ノックインマウスを用いて腫瘍化に直接的



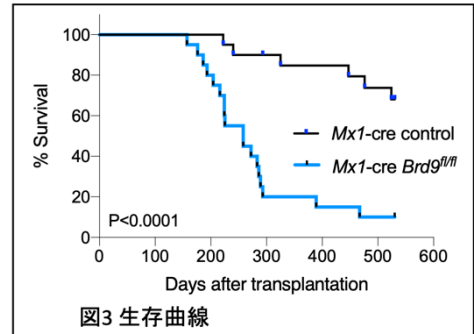
に寄与するCRISPRスクリーニングを行い、*BRD9*のNMDを伴うスプライシング異常の発癌における重要性を証明することができた。分子レベルでは、*SF3B1*変異は*BRD9*は新規SWI/SNF複合体 (ncBAF) の必須の構成因子であり、*SF3B1*変異による*BRD9*の機能喪失はncBAFによるクロマチン制御を阻害すると予想される。さらに、

ChIP-seqを用いたゲノムマッピングにより、BRD9ならびにncBAFはクロマチン構造維持に関わるCTCFと共局在しており、ncBAFはクロマチン3次元構造の制御を介して造血において重要な役割を果たしていることが示唆された。ncBAFは他のSWI/SNF複合体と異なり悪性腫瘍において変異は検出されないため、これらの結果はncBAFに変異を持たなくてもスプライシング異常によりクロマチン構造が変化し転写異常が生じるという新たな可能性を示唆している。したがって、本研究では*SF3B1*変異を起点とするスプライシング異常による、クロマチン構造の変化およびそれに伴う造血幹細胞の形質変化について明らかとすることを目的とした。

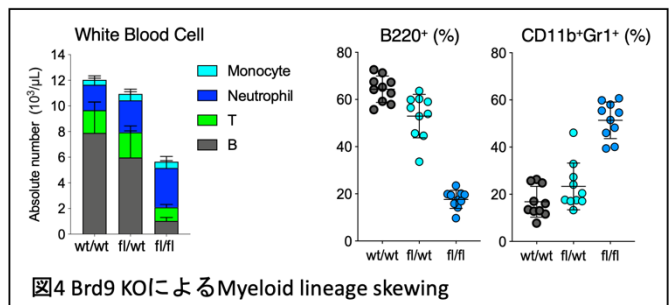
研究成果

(1) 造血幹細胞におけるBRD9の機能解析

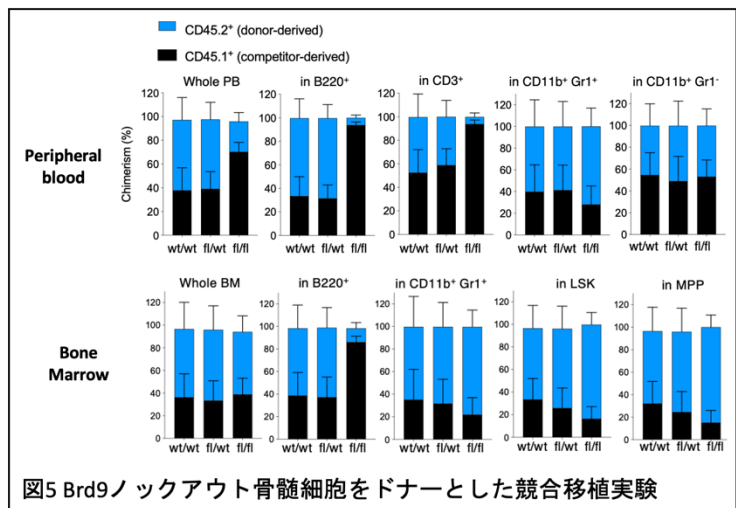
BRD9の消失はncBAFの構成を阻害するため、世界に先駆けてncBAFの機能低下モデルとして*Brd9*の条件的ノックアウトマウスを作成した。プロモドメインに該当するexon4-6を標的として、Mx1Cre/loxPシステムによる造血細胞特異的ノックアウトシステムを実現した。ホモノックアウトマウスではpIpC投与後3週間



mRNAレベル・タンパクレベルともに*Brd9*の発現が完全に消失することを確認した上で各実験を遂行した。興味深いことに、同マウスは、血球減少、Myeloid skewing、造血幹細胞分画の増大、血球の異形成など、MDSを反映するフェノタイプが得られ、移植後7~10ヶ月で死亡した(図3-4)。ホモノックアウトを用いた競合移植実験では、B細胞を中心に末梢血全体でのキメリズムは低下するが、CD11b+Gr1+の好中球分画やCD11b+Gr1-の単球分画でのキメリズムは亢進し、また骨髄内の幹細胞分画も同様にキメリズム上昇を認めた(図5)。

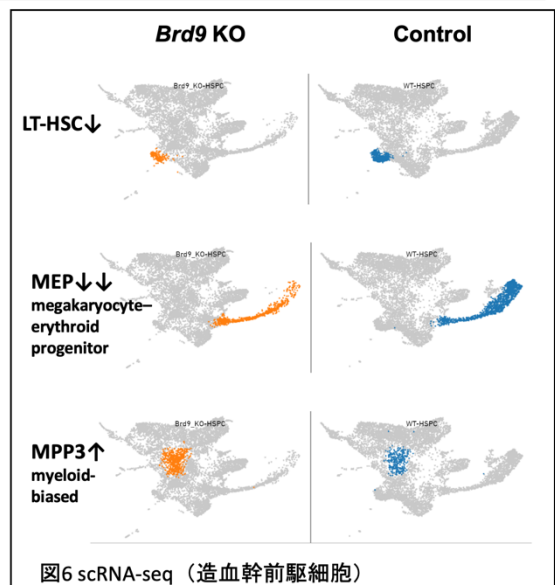


造血幹細胞分画を用いたRNA-seqによるとランスクリプトーム解析の結果、翻訳・ミトコンドリア機能(酸化的リン酸化)・DNA修復・ヘム代謝の低下、Myeloid分化シグナルの亢進などが顕著であった。さらに、造血幹前駆細胞における多様性を評価するために、単一細胞レベルでのランスクリプトーム解析を行った(scRNA-seq)。多能性前駆細胞(MPP)のうち、Myeloid系列にシフトした分画は増大していたが、Erythroid系列にコミットメントしたポピュレーションは低下し(図6)、MEP(megakaryocyte-erythroid progenitor cell)の顕著な減少が確認された。CLP(common lymphoid progenitor)においては数の減少は認められないものの、*Il7r*・*Dntt*などの発現低下を示し、多能性前駆細胞の段階でMyeloid系列にシフトしている減少を単一細胞レベルでとらえることに成功した。



(2) 腫瘍性造血におけるBRD9の機能解析

上述のとおり、正常造血でBrd9を消失させると細胞分化の



運命制御機構の破綻により、Myeloid skewingおよびMDSの発症を誘導する。次にMLL-AF9融合遺伝子のcDNAを用いたレトロウイルス過剰発現系による白血病モデルにおける*Brd9*の役割について検証を行った。興味深いことに*Brd9*をノックアウトした造血幹細胞ではMLL-AF9白血病が全く発症せず、発症後にpIpCを投与することで*Brd9*を欠失させたモデルにおいても発症を有意に遅延させた(図7)。腫瘍性造血における*Brd9*の喪失は複製ストレスの亢進、DNA損傷修復の蓄積をきたし、MLL-AF9白血病のような非常に増殖の早いモデルでは*Brd9*が腫瘍促進的に機能することが明らかとなった。クロマチン構造の観点からは*Brd9*はMycのスーパーエンハンサーに局在し、MLL-AF9白血病の維持に不可欠なMycの発現に深く寄与していることが示唆された。

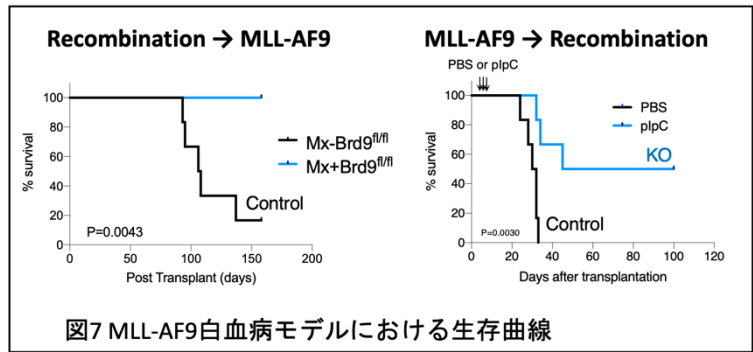


図7 MLL-AF9白血病モデルにおける生存曲線

(2) クロマチン構造制御におけるBRD9の機能解析

これまでの研究でヒト白血病細胞株を用いた実験により、BRD9およびncBAFはエンハンサー、プロモーター以外にもゲノム上でクロマチン構造維持に関わるCTCFやコヒーシンと共存していることが明らかとなった(Inoue et al. *Nature* 2019)。そこで、本研究ではマウス造血幹細胞における*Brd9*の局在や*Brd9*をノックアウトした造血幹細胞におけるクロマチンアクセシビリティやスーパーエンハンサーの変化について検討を行った。まず、様々なマウス

*Brd9*抗体を用いてChIP-seqを試みたが十分なピークが得られず、クロマチン上での局在について十分な情報を得ることができなかった。しかし、ATAC-seqおよびH3K27Ac抗体を用いたChIP-seqの結果、*Brd9*をノックアウトした造血幹細胞ではH3K27Acシグナルが亢進したスーパーエンハンサー領域が、とくにSpi1などMyeloid系への分化に必要な遺伝子において顕著に確認された。Motif enrichment analysisの結果からも、RARやPU.1の結合モチーフを有するスーパーエンハンサー領域において亢進が確認された。ティピカルエンハンサーと比べても、ノックアウト細胞においてATACシグナル(オープンクロマチン領域)の顕著な上昇が確認された(図8)。

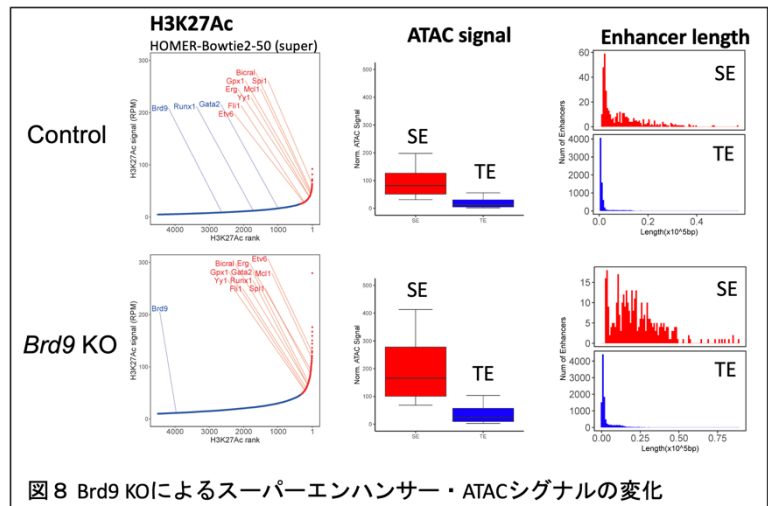


図8 *Brd9* KOによるスーパーエンハンサー・ATACシグナルの変化

近年のクロマチン解析の進歩により、CTCFとコヒーシンの協調的なループ形成がゲノムをTAD (topologically associated domain) と呼ばれる機能ドメインに区画化している可能性が示されている。そこで、ncBAFによる染色体の立体構造における機能を明らかにするために野生型マウスと*Brd9*ノックアウトマウスの造血幹細胞を用いてHi-C解析を行った。特にTopologically Associated Domains (TADs) と呼ばれる遺伝子発現調節の基本構造単位となる機能ドメインを検出し、TAD内部でのエンハンサー・プロモーターループなどゲノム(染色体)の3次元空間内の立体構造に着眼したが、現段階の解析においてコンパートメントやTADレベルでの顕著な違いをノックアウト細胞において見だせていない。そのため、エンハンサー・プロモーターループレベルでの解析を進めている。