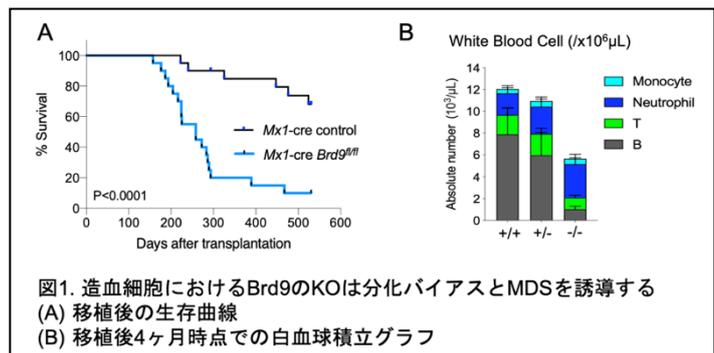


BRD9 を標的とした難治性白血病の新規治療応用

大阪大学大学院医学系研究科がん病理学教室
井上大地

背景

2019 年度に採択されたアステラス病態代謝研究会研究助成を通じて、我々のこれまでのがん横断的な研究において、プロモドメインタンパクである BRD9 に着眼し、がんや幹細胞における生物学的な役割を明らかにしてきた。なかでも、(1) BRD9 の発現量はスプライシングにより pre-mRNA レベルでダイナミックな転写後制御を受けること、(2) 造血幹細胞の分化運命制御に BRD9 が決定的な役割を果たすこと、に関して先駆的な成果を上げてきた。さらに、(3) BRD9 が non-canonical BAF (ncBAF) complex と呼ばれる新しく同定されたクロマチンリモデリング (SWI/SNF) 複合体に必須の構成因子であり BRD9 の喪失は ncBAF の機能破綻を導くことを実証した (Inoue et al. *Nature* 2019, Inoue et al. *Nature Genetics* 2021)。とくにがん横断的に変異が観察されるスプライシング制御タンパク質をコードする *SF3B1* 変異を起点とするスプライシング異常により、BRD9 の Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) が誘導され、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を伴うことを明らかにした。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、Mx1-Cre/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。興味深いことに、同マウスは、血球減少、顕著なミエロイド系列への分化シフト、造血幹細胞分画の増大、血球の異形成など、Myelodysplastic syndrome (MDS、骨髄異形成症候群) 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。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。単一細胞レベルでのトランスクリプトーム解析でも造血幹細胞からミエロイド系列への分化コミットメントの亢進が確認された。クロマチン上での BRD9 の挙動をマルチオミックス解析により探索すると、BRD9 はクロマチンの区画化の形成に不可欠な CTCF とゲノム上で有意に共局在していた。興味深いことに、BRD9 の喪失は CTCF ピークを亢進させ、主にミエロイド分化関連遺伝子でエンハンサープロモーターループを増強し、発現誘導へと導くことが明らかになった。以上の点から、BRD9 が造血幹細胞の幹細胞性だけでなく、分化運命制御を担う決定的な因子であることを 2019 年度採択の研究助成により明らかにした。



研究目的

ここまで、正常造血において BRD9 を欠失したモデル、およびその帰結について検討を重ねてきたが、クロマチンリモデリングの観点から詳細に BRD9 の役割の評価を試みた。さらに、ミエロイド分化プログラムの亢進は BRD9 喪失後に短時間で生じるため、急性骨髄性白血病 (AML) モデルにおける KO の影響について考察し、正常造血における影響と比較しながら、BRD9 そのものを治療標的とすることをステップアップ研究助成における第一の目的とした。

研究成果

(1) 正常造血および急性骨髄性白血病におけるBRD9の機能解析

マウスBrd9遺伝子を条件的にノックアウト(KO)するべく、BDに対応するExon4-6をflox配列で挟み、Brd9fl/flマウス

を作成した。Mx1-Creマウスと交配することで、Mx1-Cre; Brd9fl/fl モデルを作成し、pIpC投与下で時間依存的・誘導的かつ造血細胞特異的にBrd9をノックアウトできる生体モデルを確立した。同モデルの造血幹前駆細胞を用いたフローサートリ解析、骨髄移植モデルを用いた造血再構築能の評価、RNA/ATAC/ChIP-seq/HiC解析

を用いたマルチオミクス解析、単一細胞レベルでの発現解析(scRNA-seq)を行った。プロモドメインをコードするマウスBrd9遺伝子エクソン4-6を標的として、造血細胞特異的かつ時間依存的なMx1-Cre/LoxPシステムを用いた条件的KOモデルを確立した。プライマリーKOマウスの解析では、コントロールと比べて長期造血幹細胞の質的低下、B細胞系列への分化阻害、ミエロイド系列への顕著なスキューイングが確認された。また、致死放射線を照射したレシピエントマウスに対する非競合的骨髄移植実験においても、KO骨髄細胞を移植した群では、B細胞を中心とする血球減少、ミエロイド分化シフト、形態異常を呈しヒト骨髄異形成症候群(MDS)に合致する結果が得られ(図1)、それらは造血細胞自律的な作用であることが裏付けられた。B細胞分化はproB細胞以降で顕著に阻害され、IL-7を用いた半固形培地上でもproBコロニーは皆無であった。さらに、ドナー細胞として正常骨髄と1:1で混合し、致死放射線を照射したレシピエントマウスに対する競合的骨髄移植実験においても、末梢血B細胞中の顕著なKO由来キメリズム低下を認めたものの、ミエロイド細胞での影響は軽微であり相対的な分化シフトが確認された。

次にプライマリーKOマウスの造血幹細胞のバルクRNA-seqを行い、BRD9が制御するパスウェイについて検討を行った。従来の報告の通り、MYC経路の低下が確認された他、酸化的リン酸化の低下、B細胞分化関連因子の低下、リボソーム合成系の低下が確認された。一方、ミエロイド系列の分化は顕著な亢進を認めていた。造血幹前駆細胞を用いて、単一細胞レベルでのsingle cell RNA-seq、各種ヒストン修飾抗体・転写因子によるChIP-seq、クロマチン3次元構造を対象としたHiC、オープンクロマチンを評価するATAC-seqを行い、BRD9の喪失がもたらす造血幹細胞の運命制御について統合的な解析を試みた。予想通り、B細胞分化のプログラムが多能性前駆細胞のレベルで抑制され、ミエロイド系列への分化を促進する転写因子のエンリッチメントやパスウェイの亢進が認められた。他に、ヘム合成系の低下、ミトコンドリア膜電位の低下など加齢性造血に合致する所見が得られた。興味深いことに、BRD9の喪失は遺伝子発現を亢進させる傾向にありスーパーエンハンサー部位でのオープンクロマチンの亢進を誘導することを明らかとなった。

ChIP-seqの結果からBRD9は、ncBAFを構成するATPaseであるBRG1はもちろん、クロマチンの区画化に不可欠なCTCFや、プロモドメインファミリー分子であるBRD4とゲノム上で有意に共局在することが明らかになった。特にCTCFとの相関は、すべてのDNA結合タンパクとのモチーフとシュミレーションを行っても、顕著な共局在が確認された(図2)。実際、ゲノム上でのBRD9の分布はCTCF部位とプロモーター領域で70%を占めていた。BRD9喪失時の変動を見ると、BRD4やBRG1のピークは変化せず、CTCFのみピークの変動が見られた(図2)。BRD9はCTCFの発現を直接制御しないものの、CTCFと直接

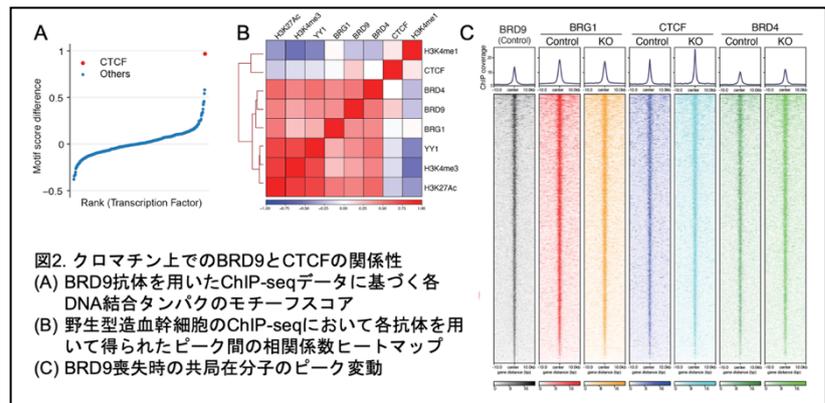


図2. クロマチン上でのBRD9とCTCFの関係性
(A) BRD9抗体を用いたChIP-seqデータに基づく各DNA結合タンパクのモチーフスコア
(B) 野生型造血幹細胞のChIP-seqにおいて各抗体を用いて得られたピーク間の相関係数ヒートマップ
(C) BRD9喪失時の共局在分子のピーク変動

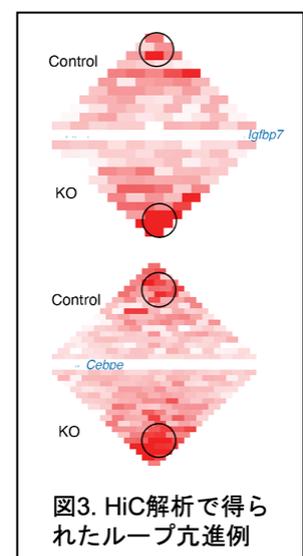
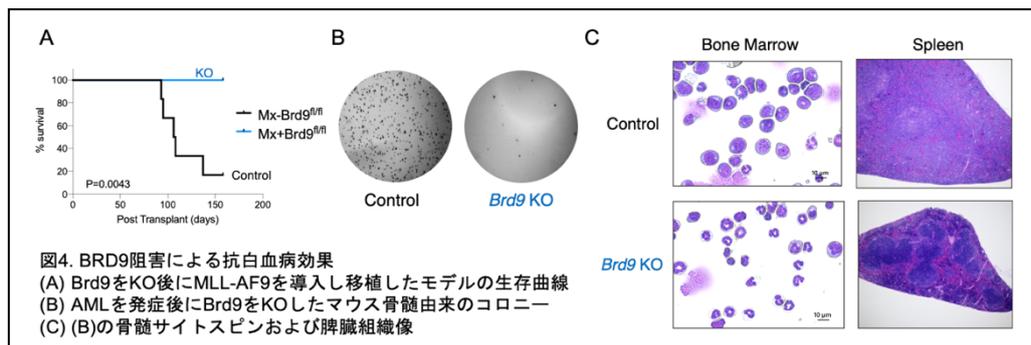


図3. HiC解析で得られたループ亢進例

結合することも明らかになった。CTCFピークが亢進する箇所を詳細に検討すると、野生型条件でCTCFが弱く結合する部位で顕著であり、それらがプロモーター部位で生じると有意に遺伝子発現の亢進が認められた。また、同部位では、H3K4me3やH3K27Acなどの活性型ヒストンマークの上昇が認められ、Gene Ontologyエンリッチメント解析では好中球分化に関連したオントロジーが最上位に検出された。これらの現象は、KOマウスでの知見に加えて、PROTAC技術による蛋白レベルでのBRD9喪失後、短時間で生じていたことから、BRD9による直接的な制御機構の存在が示唆された。とりわけ、ミエロイド分化に関連した遺伝子では、BRD9の喪失によってプロモーター・エンハンサーループを介して発現を促進していると予想された(図3)。

ここまで、正常造血においてBRD9を欠失したモデル、およびその帰結について検討を重ねてきたが、ミエロイド分化プログラムの更新はBRD9喪失後に短時間で生じることから、急性骨髄性白血病(AML)モデルにおけるKOの影響について考察した。本研究では、ヒトAMLモデルとして汎用されているMLL-AF9 cDNAをレトロウイルスで導入して形質転換させ、骨髄移植によって発症させるモデルを用いて検証した。興味深いことに、BRD9はAMLの発症および維持双方において不可欠であり、KOした造血幹細胞にMLL-AF9を導入してもAMLを発症させることができず、またAML発症後にKOが成功した個体においては長期生存を認めた(図4)。これらに一致して、KO個体では成熟ミエロイド細胞への分化を強力に促進しており、ATAC-seqによってクロマチン変化を検討すると、KOによってグローバルなオープンクロマチンを認め、同部位のモチーフ解析ではCTCFおよびCTCF(L BORIS)がトップモチーフとして検出された。すなわち、正常造血と同様に、BRD9/CTCF 部位のクロマチンがオープンとなることがミエロイド分化において重要な鍵となっていることを見出した。最後に、生体レベルで投与可能なBRD9特異的タンパク分解誘導剤(PROTAC)の開発にも成功し、ヒト白血病細胞株を用いた異種移植モデルを実現させ、顕著な生存期間延長効果が確認されている。

以上のとおり、BRD9の分子レベルでの機能解析を土台として、造血幹細胞および白血病細胞の運命制御を明



らかにすることができた。MDSの病態解明、AMLにおける治療応用など、今後幅広い知見につながるものと期待される。上述の成果の一部は、研究代表者を責任著者として *Nature Communications* に論文掲載された。「造血と白血病を制御する未知の機構を解明」とのタイトルで2023年12月25日にプレス発表され、BRD9が造血幹細胞の分化運命制御に果たす役割を初めて解明し、BRD9を標的とした白血病治療法の可能性について先駆的な成果を解説した。https://www.fbri-kobe.org/upload/view.php?news_id=1250&type=main これらの知見は本研究助成なしでは成し得なかった成果であり、選考委員の先生方、財団の皆様に深謝申し上げたい。

Xiao M, Kondo S, Nomura M, Kato S, Nishimura K, Zang W, Zhang Y, Akashi T, Viny A, Shigehiro T, Ikawa T, Yamazaki H, Fukumoto M, Tanaka A, Hayashi Y, Koike Y, Aoyama Y, Ito H, Nishikawa H, Kitamura T, Kanai A, Yokoyama A, Fujiwara T, Goyama S, Noguchi H, Lee S, Toyoda A, Hinohara K, Abdel-Wahab O, Inoue D. BRD9 determines the cell fate of hematopoietic stem cells by regulating chromatin state. *Nat Commun.* 2023 Dec 15;14(1):8372. doi: 10.1038/s41467-023-44081-6.