

造血器腫瘍原因遺伝子NPM1c の腫瘍制御機構の解明および NPM1c を直接標的とした新規治療薬の開発

Analysis of NPM1-mutanted (NPM1c) cells gene regulation and Development of NPM1c inhibitor for NPM1c-dependent leukemia

所属機関： ベイラー医科大学 代表研究者氏名：米澤 大志

研究期間： 2021年4月1日～2022年3月31日

区分：個人A

研究分担者：(個人Aの方は、以下の表を空白、あるいは、削除してください。)

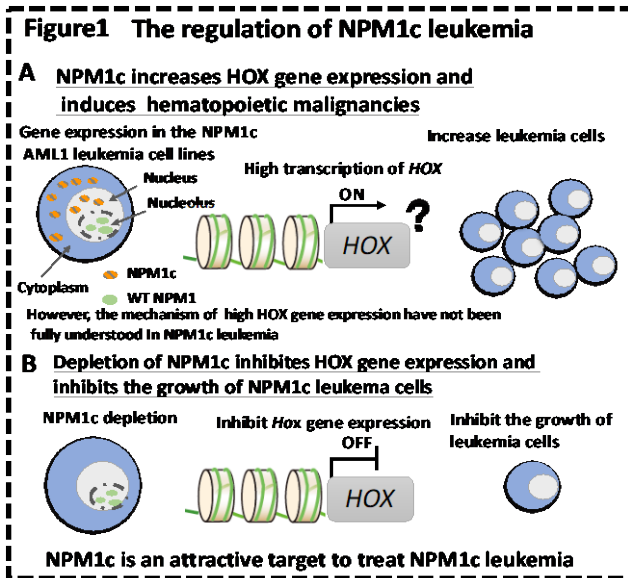
滞在研究機関： Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston TX 77030, the U.S.

Nucleophosmin1 (NPM1) localizes mainly nucleolus and plays important roles in ribosome synthesis and chromatin remodeling. NPM1 mutation, NPM1c, is small insertion in the terminal exon that result in getting nucleolar export signal (NES). NPM1c interacts XPO1 and change its localization toward cytoplasm. NPM1c is also a promising therapeutic target in many hematopoietic malignancies. However, the precise mechanisms of NPM1c leukemia have not been fully understood and targeted NPM1c to treat leukemia has not established. In this study I have been trying to understand the molecular mechanisms of NPM1c leukemia and to develop MPM1c direct inhibitor.

海外研究活動概要

Nucleophosmin (NPM1) は、主に核小体に局在するタンパク質で、リボソーム生合成やクロマチン形成など、多くの細胞内機構に関与している。また、NPM1の変異体であるNPM1cは、急性骨髄性白血病の主な原因遺伝子として知られている。NPM1cはNPM1のフレームシフト型変異体で、核外移行シグナル(NES)を獲得し、核外移行タンパク質 Exportin1 (XPO1) と結合する。そして、NPM1cは核及び多くは細胞質へと移行する。その結果、NPM1c 保有細胞では、多くの腫瘍で異常な亢進を認める homeobox cluster (HOX) 遺伝子の発現が上昇し、腫瘍化を引き起こす (当該腫瘍をNPM1c白血病と呼ぶ) (Uckelmann.J.H., et al., Science. 2020)。しかし、NPM1c白血病においてなぜHOX遺伝子の発現上昇が起こるか、詳細な分子機構は不明である (Fig1 A)。また、NPM1c白血病においてNPM1cの活性を下げることや、XPO1の機能を阻害することで、腫瘍細胞の増殖抑制や腫瘍モデルマウスにおける生存の延長などが

認められる為、NPM1cはNPM1c白血病において有望な治療標的である (Brunetti .L., et al., Cancer Cell.2018)。加えてXPO1阻害剤は存在するが、XPO1が生体内に恒常的に発現している為、細胞内の多様なタンパク質の核外移行も阻害し、正常細胞にも一定の毒性を示す。一方、NPM1c は、腫瘍細胞や前癌状態の造血系細胞のみに変異が認められる為、NPM1c を直接標的にする阻害剤の方がより、他の細胞への影響が少なく、腫瘍を抑制できると考えられる。よって、NPM1cを直接標的とした阻害剤は、NPM1c白血病に対して副作用軽減、併用及び根治療法の可能性を含め、より良い治療法となる可能性がある (Fig 1B)。そこで申請者は、(A): NPM1c 白血病におけるHOX 遺伝子の制御機構の解明 (B): NPM1cを直接標的とした阻害剤の開発 を研究内容及び目的とし、質量分析器 /低温電子顕微鏡 (Cryo-EM)/次世代シーケンサー/バーチャルスクリーニングなどを駆使して研究を遂行している。



成果

(A): NPM1c 白血病における HOX 遺伝子の制御機構の解明

本研究では、NPM1c に相互作用するタンパク質複合体の検出のために、Bio-ID と質量分析を組み合わせることで取り組んだ。Bio-ID とは、ビオチンリガーゼを用いて、リガーゼ近傍のタンパク質をビオチン化させる手法である。実際には、ビオチンリガーゼと NPM1c の融合タンパク質を急性骨髄性白血病細胞株である OCI-AML3 細胞株に発現させた。さらに、それら細胞株を核と細胞質画分に分けた。その結果ビオチン化タンパク質を核と細胞質画分両方に認めた。それらタンパク質を質量分析器にかけ、NPM1c によりビオチン化されるタンパク質を複数同定した。核と細胞質画分両方に既知の NPM1c の結合タンパク質および核外移行誘導タンパク質である、XPO1 のビオチン化を確認した。さらに、核分画において、HOX 遺伝子発現制御に関わるビオチン化タンパク質の同定に成功した。現在、CRISPR activation and interference システムを用いて、これらタンパク質の素となる遺伝子の転写を負又は正に制御し、HOX 遺伝子群の発現レベルを検討するとともに、NPM1c 保有造血器腫瘍細胞株である OCI-AML3 細胞株の増殖能力を検討している。NPM1c は XPO1 と結合することで、細胞質に局在を変化することが白血病の発症に大きく関わると予想されていたが、今回の研究で興味深いことに、核内から細胞質に移行する前の NPM1c が、HOX 遺伝子の発現上昇直接関与している可能性が示唆された。

(B): NPM1c を直接標的とした阻害剤の開発

NPM1c 自体が、NPM1c を起因とした白血病の良い治療薬となることから、NPM1c を直接標的とした阻害剤の開発に取り組んでいる。現在、NPM1c 阻害剤を探索するために、NPM1c-XPO1 の立体構造の同定を Cryo-EM 試みている。立体構造が同定され次第、NPM1c の XPO1 ドッキングサイトに結合する化合物を、バーチャルスクリーニング及びサーマルシフトアッセイを用いて同定する。

今後の展望

米国滞在一年間の中で、本研究における実験系の準備および確立を行ってきた。現状としては、NPM1c がもたらす NPM1c 白血病の、作用機序の手がかりが掴めた。また、NPM1c を直接標的とした阻害剤の開発のために NPM1c-XPO1 の立体構造の同定にも取り組んでいる。今後は、より詳細に分子レベルで NPM1c の白血病制御機構を探索したいと考えている。具体的には、NPM1-XPO1 がどのようにして、HOX 遺伝子発現制御に関わるタンパク質と複合体を形成して、さらに HOX 遺伝子領域に与える影響を検討したい。おそらく、HOX 遺伝子が上昇することから、HOX 遺伝子転写領域において、HOX 遺伝子発現制御に関わるタンパク質と複合体を形成した後、エピジェネティクス等の変化をもたらしていると推測される。なので、CHIP-seq や WGBS を用いて、HOX 遺伝子転写領域のヒストンや DNA のメチレーションレベルを検討していきたいと考えている。また、NPM1c を直接標的とした阻害剤に関しては、NPM1c に直接結合する化合物が同定され次第、NPM1-XPO1 の結合を阻害するかどうか、さらに、NPM1-XPO1 の結合を阻害する化合物に関しては、OCI-AML3 細胞株の増殖能力に影響を与えるかなどを検討していきたい。そして、ゆくゆくは、前臨床試験や臨床試験に臨める薬にと成長させて行きたい。

研究の発表

口頭発表

1. なし-----
誌上発表

1. なし-----