

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19565

研究課題名(和文)造血腫瘍におけるポリコーム群ヒストンメチル化酵素 EZH1 の機能解析

研究課題名(英文) Role of polycomb histone methyltransferase EZH1 in hematologic malignances

研究代表者

青山 和正 (Aoyama, Kazumasa)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：50734266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Ezh1,2 は、抑制型ヒストン修飾である ヒストンH3 リジン 27 トリメチル化(H3K27me3)を触媒する。我々は、造血幹前駆細胞において、ある遺伝子群がその他の遺伝子群よりも高いレベルのH3K27me3で修飾され、しかもその高いレベルはEzh1+/-Ezh2 / においても維持される事をChIP sequenceを用いて示した。さらに、骨髓異形成症候群(MDS)患者由来の細胞を用いて、高レベルなH3K27me3に修飾された遺伝子群が抑制状態にある事は、PRC2機能低下型ヒトMDS幹細胞の維持に必要であることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Ezh1 and 2 repress gene expression by catalyzing trimethylation at histone H3 lysine 27 (H3K27me3). Here, we examined Ezh1+/-Ezh2 / mice. ChIP sequence analysis revealed that a cohort of PRC2 targets marked with higher levels of H3K27me3 than the other targets in hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs), retained high levels of H3K27me3 in Ezh1+/-Ezh2 / HSPCs. Moreover, using SKM-1 cells, derived from human MDS patients with EZH2 mutant, we showed that repression of core PRC2 targets is critical for the maintenance of human PRC2-insufficient MDS.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティック制御 癌 遺伝子発現制御 ポリコーム 造血器腫瘍

1. 研究開始当初の背景

ポリコーム抑制複合体 (PRC) は、PRC1 と PRC2 に大別され、それぞれ H2AK119 モノユビキチン化(H2AK119ub1)、H3K27 トリメチル化(H3K27me3)を触媒し、遺伝子発現を負に制御する。*EZH1* および *EZH2* は、PRC2 の酵素サブユニットであり、唯一の H3K27 メチル基転移酵素である (Laugesen and Helin, Cell Stem Cell 14:735, 2014)。PRC2 は、活性化ヒストン修飾である H3K4me3 と H3K27me3 が共存した bivalent ドメインの形成により分化制御に寄与するが (Bernstein et al. Cell 125, 315 2006)、このシステムの破綻は癌などの疾患で認められる (Conway et al. Curr Opin Cell Biol 37, 42, 2015)。*EZH2* は、濾胞性リンパ腫 (7%)、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (21%) で活性型変異が、骨髄異形成症候群 (MDS, 10%)、骨髄増殖性腫瘍 (MPN, 3-13%)、MDS/MPN (13%) で機能喪失型変異が報告されている (Shih et al, Nat Rev Cancer 12: 5995, 2012; Iwama et al., Blood 130, 23 2017; Sashida and Iwama, Int J Hematol 105, 23 2017)。スプライソゾーム関連遺伝子変異を持つ造血腫瘍においては、*EZH2* の発現がスプライシング異常により有意に低下することが報告され、*EZH2* は多くの造血腫瘍で低発現状態にある (Kim et al, Cancer Cell 27:617:2015)。

申請者らは、造血細胞特異的 *Ezh2* 欠損 (*Ezh2* /) により、MDS、MDS/MPN 様病態がマウスで再現されることを示した (Mochizuki-Kashio, Aoyama et al. Blood 126(10):1172-83, 2015)。この病態形成には *Ezh2* 欠損後 9-12 ヶ月間の長期を要する。*Ezh2* 欠損直後には多くの PRC2 標的遺伝子の発現抑制が解除され、bivalent 遺伝子群の明らかな活性化が認められるが、長期観察後の病態発症時には、bivalent 遺伝子群の発現が再度抑制される傾向が確認された。クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) により、H3K27me3 レベルが *Ezh2* 欠損直後 (1Mo) には一度減少し、病態発症時 (9Mo) には多くの遺伝子で回復することが明らかとなった。これらの遺伝子群は bivalent 遺伝子群と有意にオーバーラップした。この H3K27me3 レベルの回復は、*Ezh2* 欠損状態における唯一の H3K27me3 酵素である *Ezh1* の代償的機能によるものである。さらに、造血細胞特異的 *Ezh1*+/*Ezh2* / 状況では、造血が維持されるが、*Ezh1*, 2 同時欠損 (*Ezh1*-/*Ezh2*Δ/Δ 状況では、造血が維持できず造血腫瘍も発症しないことから、*Ezh1* は、*Ezh2* 欠損型造血腫瘍の発症・維持に必須であることが考えられた。しかし、その分子機構は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

上記の研究背景に基づき、本研究では以下の目的を設定した。

(1) 次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドなエピゲノム解析により *Ezh1* が *Ezh2* 欠損造血幹細胞を維持する分子メカニズムを解明する。

(2) PRC2 の残存活性が *Ezh2* 機能喪失型造血腫瘍の治療標的になりうる可能性を検証する。

3. 研究の方法

本研究の主な実験試料および実験方法を以下に示す。

(1) 造血細胞特異的な *Ezh1*, 2 欠損を行うため、*Cre-ERT*;*Ezh1*+/*Ezh2**flox/flox* マウスから骨髄を採集し(ドナー)、X 線照射したマウスに移植した。1 か月後、レシピエント由来細胞の喪失とドナー由来細胞の生着を確認した後、tamoxifen 投与により *Cre-ERT* を活性化し、*Ezh2* 欠損を行い(*Ezh2**flox/flox* *Ezh2* /), MDS マウスモデル (*Ezh1*+/*Ezh2* /) を作成する。

(2) *Ezh1*, 2 欠損造血幹・前駆細胞におけるエピゲノム解析を行うため、上記の *Ezh1*+/*Ezh2* / マウスより造血幹前駆細胞を純化し、抗 H3K27me3 抗体を用いた ChIP-sequencing (ChIP-seq) を行う。ChIP-seq のプロトコールは、*Ezh2* / を解析した時と同じものを用いて (Mochizuki-Kashio, Aoyama et al. Blood 126(10):1172-83, 2015)、クロマチンの断片化はマイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) を用いる。

(3) SKM-1 細胞 (ヒト *EZH2* 機能喪失型 MDS 患者より樹立された細胞株) の残存 PRC2 活性を *EZH1*, 2 阻害剤 UNC1999 で阻害し、その抗腫瘍効果を調べる。ChIP-seq によるエピゲノム解析も行い、*Ezh1*+/*Ezh2* / マウスの結果と比較する。

4. 研究成果

上記の *Ezh1*+/*Ezh2* / マウスより造血幹前駆細胞を純化し、ChIP-sequencing (ChIP-seq) により H3K27me3 を調べたところ、PRC2 の機能低下に伴い、PRC2 標的遺伝子から H3K27me3 が失われる様子をプロファイルすることができた。これにより、PRC2 活性を極限まで低くしても H3K27me3 が高レベルを維持している遺伝子群が存在していることが分かった。*Ezh1*-/*Ezh2* / 状況では、造血が維持できず MDS も発症しないことから (Mochizuki-Kashio, Aoyama et al. Blood 126(10):1172-83, 2015)、高レベル H3K27me3 を維持した遺伝子群を造血幹細胞、および、MDS 幹細胞の維持に必須な PRC2 標的遺伝子群 (corePRC2 標的遺伝子群) とした。興味深いことに、corePRC2 標的遺伝子群は、分化制御に関わる転写因子が多数含まれていることが分かった。

以上の結果をヒト疾患に応用するため、ヒト *EZH2* 機能喪失型 MDS 患者より樹立された細胞株である SKM-1 細胞を用意した。SKM-1 細胞は、*EZH2* 不活性型 Y641C 変異を有するとともに *EZH2* の発現レベルの低下が認められる (Ernst et al. Nat Genet 42:722 2010; Khan et al. Leukemia 27: 1301 2013)。我々の以前の研究成果から、SKM-1 細胞における *EZH1* ノックダウンは、グローバルな H3K27me3 の低下とともに細胞増殖を抑制したため、*EZH1* がヒト *EZH2* 機能喪失型造血疾患において癌遺伝子としての機能を有することが示されていた。*EZH1,2* 阻害剤 UNC1999 により、SKM-1 細胞における残存した PRC2 の活性を阻害したところ、SKM-1 の残存 H3K27me3 をグローバルに低下させ、細胞増殖を抑制した。これにより、UNC1999 が SKM-1 細胞に対して抗腫瘍効果を有することが示唆された。興味深いことに、抗 H3K27me3 抗体を用いた ChIP-seq により、SKM-1 細胞において残存 H3K27me3 にマークされた遺伝子群は、上記の実験で同定したマウスモデル (*Ezh1*+/*-Ezh2* /) における corePRC2 標的遺伝子群と大きくオーバーラップすることがわかった。

以上の結果から、corePRC2 標的遺伝子は、*EZH2* 機能喪失型造血疾患の有望な治療標的と考えられる。しかしながら、corePRC2 標的遺伝子群の発現制御機構に関して十分な理解に至っておらず、H3K27me3 以外にも複数のエピゲノムイベントが複雑に関係し合い制御される機構が想定される。したがって、今後は、PRC2 機能低下状態における DNA メチル化、H2AK119ub1、H3K4me3 などをゲノムワイドに解析し、H3K27me3 あるいは、RNA-seq データと比較することで、MDS における corePRC2 標的遺伝子制御機構を包括的に理解するとともに、効率よく corePRC2 標的遺伝子の脱抑制を促す方法を模索する予定である。特に、ポリコーム群複合体 1 (PRC1) による H2AK119ub1 は、H3K27me3 と協調してポリコームドメインとよばれる抑制領域を形成し、遺伝子発現を抑制することが知られている。PRC1 は H3K27me3 を介してポリコームドメインに結合するモデルがよく知られているが、最近 H3K27me3 非依存的に結合し、H2AK119ub1 を介して PRC2 をクロマチンヘリクルートする variant PRC1 の存在が明らかとなり注目されている (Blackledge et al., Nat Rev Mol Cell Biol 16, 643, 2015; Kondo et al., Trends Biochem Sci 41, 9, 2016)。このような、H3K27me3 と協調的に機能するエピゲノムイベントも、MDS の疾患エピゲノム要因を考える上で重要であると考えられる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)すべて査読有り

Tanaka T*, Nakajima-Takagi Y*, Aoyama K*, Tara S, Oshima M, Saraya A, Koide S, Si S, Manabe I, Sanada M, Nakayama M, Masuko M, Sone H, Koseki H, Iwama A. Internal deletion of BCOR reveals a tumor suppressor function for BCOR in T lymphocyte malignancies. J. Exp. Med., 2017 Oct 2; 214(10): 2901-2913. *Co-first authors

Kuki K, Yamaguchi N, Iwasawa S, Takakura Y, Aoyama K, Yuki R, Nakayama Y, Kuga T, Hashimoto Y, Tomonaga T, Yamaguchi N. Enhancement of TGF- β -induced Smad3 activity by c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of its coactivator SKI-interacting protein (SKIP). Biochem. Biophys. Res. Commun., 2017 Aug 26; 490(3): 1045-1051.

Rizq O, Mimura N, Oshima M, Saraya A, Koide S, Kato Y, Aoyama K, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Chiba T, Ma A, Jin J, Iseki T, Nakaseko C, Iwama A. Dual Inhibition of EZH2 and EZH1 Sensitizes PRC2-Dependent Tumors to Proteasome Inhibition. Clin. Cancer Res., 2017 Aug 15; 23(16): 4817-4830.

Ueda K, Ikeda K, Ikezoe T, Harada-Shirado K, Ogawa K, Hashimoto Y, Sano T, Ohkawara H, Kimura S, Shichishima-Nakamura A, Nakamura Y, Shikama Y, Mori T, Mason PJ, Bessler M, Morishita S, Komatsu N, Shide K, Shimoda K, Koide S, Aoyama K, Oshima M, Iwama A, Takeishi Y. Hmga2 collaborates with JAK2V617F in the development of myeloproliferative neoplasms. Blood Adv., 2017 Jun 14; 1(15): 1001-1015.

Yokoyama M, Chiba T, Zen Y, Oshima M, Kusakabe Y, Noguchi Y, Yuki K, Koide S, Tara S, Saraya A, Aoyama K, Mimura N, Miyagi S, Inoue M, Wakamatsu T, Saito T, Ogasawara S, Suzuki E, Ooka Y, Tawada A, Otsuka M, Miyazaki M, Yokosuka O, Iwama A. Histone lysine methyltransferase G9a is a novel epigenetic target for the treatment of hepatocellular carcinoma. Oncotarget, 2017 Mar 28; 8(13): 21315-21326.

Honda T, Soeda S, Tsuda K, Yamaguchi C, Aoyama K, Morinaga T, Yuki R, Nakayama Y, Yamaguchi N, Yamaguchi N. Protective role for lipid modifications of Src-family kinases against chromosome missegregation. Sci. Rep., 2016 Dec 12; 6: 38751.

Shimizu R, Muto T, Aoyama K, Choi K, Takeuchi M, Koide S, Hasegawa N, Isshiki Y, Togasaki E, Kawajiri-Manako C, Nagao Y, Tsukamoto S, Sakai S, Takeda Y, Mimura N, Ohwada C, Sakaida E, Iseki T, Starczynowski DT,

Iwama A, Yokote K, Nakaseko C. Possible role of intragenic DNA hypermethylation in gene silencing of the tumor suppressor gene NR4A3 in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.*, 2016 Nov; 50: 85-94.

Koide S, Oshima M, Takubo K, Yamazaki S, Nitta E, Saraya A, Aoyama K, Kato Y, Miyagi S, Nakajima-Takagi Y, Chiba T, Matsui H, Arai F, Suzuki Y, Kimura H, Nakauchi H, Suda T, Shinkai Y, Iwama A. Setdb1 maintains hematopoietic stem and progenitor cells by restricting the ectopic activation of nonhematopoietic genes. *Blood*, 2016 Aug 4; 128(5): 638-649.

Sashida G, Wang C, Tomioka T, Oshima M, Aoyama K, Kanai A, Mochizuki-Kashio M, Harada H, Shimoda K, Iwama A. The loss of Ezh2 drives the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. *J. Exp. Med.*, 2016 Jul 25; 213(8): 1459-1477.

Si S, Nakajima-Takagi Y, Aoyama K, Oshima M, Saraya A, Sugishita H, Nakayama M, Ishikura T, Koseki H, Iwama A. Loss of Pcgf5 Affects Global H2A Monoubiquitination but Not the Function of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *PLoS One*, 2016 May 2; 11(5): e0154561.

〔学会発表〕(計4件)

Kazumasa Aoyama, Emi Suzuki, Motohiko Oshima, Makiko Mochizuki-Kashio, Shuhei Koide, Yuko Kato, Yaeko Nakajima-Takagi, Goro Sashida, Atsushi Iwama, Profiling of the critical targets of polycomb repressive complex 2 in the maintenance of myelodysplastic syndrome stem cells, Keystone Symposia Cancer Epigenetics: New Mechanisms, New Therapies, 2018.2.10-14, Denver (USA)

青山 和正, 鈴木 瑛美, 大島 基彦, 望月-櫻尾 牧子, 小出 周平, 加藤 裕子, 中島 やえ子, 指田 吾郎, 岩間 厚志, Ezh2 欠損造血幹細胞維持における Ezh1 によるエピジェネティック制御, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017.12.6-9, 神戸ポートアイランド (兵庫県)

Kazumasa Aoyama, Makiko Mochizuki-Kashio, Motohiko Oshima, Shuhei Koide, Yaeko Nakajima-Takagi, Mitsutaka Maeda, Goro Sashida, Atsushi Iwama, Role of the polycomb methyltransferase Ezh1 in myelodysplastic syndrome induced by Ezh2 insufficiency, 58th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, 2016.12.3-6, San Diego (USA)

青山 和正, 望月-櫻尾 牧子, 大島 基彦, 小出 周平, 中島 やえ子, 指田 吾郎, 岩間 厚志, Ezh2 欠損造血細胞における Ezh1 によるエピジェネティック制御, 第 89 回日本生化学会大会, 2016.9.25-27, 仙台国際センター / 東北大学川内北キャンパス (宮城県)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

青山 和正 (AOYAMA, Kazumasa)
千葉大学・大学院医学研究院・特任助教
研究者番号: 50734266