

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890045

研究課題名(和文) EZH2 を基点とした難治性白血病の克服

研究課題名(英文) Overcoming therapy-resistant leukemia using EZH2 inhibitor

研究代表者

植田 航希 (Ueda, Koki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80632190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円、(間接経費) 690,000 円

研究成果の概要(和文)：EZH2 阻害剤は MLL 融合遺伝子を有する白血病マウスモデルにおいて生存期間を延長した。EZH2 阻害によって、p16 プロモーターにおけるヒストン H3K27 のトリメチル化を阻害することで、p16 の発現上昇を介して腫瘍細胞(特に白血病幹細胞分画 LGMF)の減少をもたらすことが主な作用機序であることを解明した。

研究成果の概要(英文)：EZH2 inhibitor DZNep and shRNA for EZH2 strongly suppressed the proliferation of MLL-related leukemia cell lines and immortalized cells harboring MLL fusion genes with high specificity. In vivo administration of DZNep and transduction of shRNA targeting EZH2 decreased the leukemic granulocyte macrophage progenitors (LGMFs) and prolonged survival of MLL/AF9 and MLL/ENL-induced leukemic mice. Limiting dilution transplantation assay revealed that frequency of leukemia stem cells (LSCs) was reduced by DZNep administration. Expression analysis suggested that p16 up-regulation was responsible for LSC reduction. In fact, knockdown of p16 completely canceled the survival advantage of mice which received DZNep. Chromatin immunoprecipitation assays suggested that both H3K4 and H3K27 methylation marks were highly enriched around the TSS of p16, together with EZH2 and Bmi1. Therefore removal of EZH2 is supposed to convert the promoter of p16 to an active state.

研究分野：医学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：EZH2 MLL

1. 研究開始当初の背景

我々の研究室では以前、予後不良因子として知られる Evi1 を高発現する Evi1 白血病において、Evi1 がポリコム複合体 2 (PRC2) とタンパク質レベルで結合することで、がん抑制遺伝子である PTEN を抑制して PI3K/AKT/mTOR 系を活性化させていることを報告した (Yoshimi et al. Blood. 2011)。この際、PRC2 の主要構成因子である EZH2 阻害薬 3-deazaneplanocinA (DZNep) を各種不死化細胞に添加する実験を行ったが、MLL-ENL・MLL-AF9 などの MLL 融合遺伝子を感染させた不死化細胞株で、AML1-ETO や PML-RAR などを感染させた不死化細胞株よりも強く増殖を抑制された (Yoshimi et al. Journal of Cellular Biochemistry. 2011)。このことから私は、MLL 関連白血病において、EZH2 が病態に重要な役割を果たしていると予想した。これまで DZNep が白血病細胞の増殖を抑制することは *in vitro* の実験系において報告されているが、*in vivo* においては、単剤で白血病モデルマウスの生存期間を延長させることはできなかつたと報告されている (Fiskus et al. Blood. 2009)。私は、正常マウスに対して DZNep 2mg/Kg を週 3 回投与しても致命的な造血障害が生じないことを確認した後、レトロウイルスを用いた MLL-AF9・MLL-ENL 白血病細胞の二次移植の系で、同量の DZNep 投与が生存期間を延長させることを見出した (下図)。また、GFP で標識した白血病細胞を FACS Aria を用いて分取し、各種遺伝子発現を解析したところ、p16 の発現が DZNep 投与群で上昇していた。面白いことに、これらの細胞は、フローサイトメトリーによる解析で、白血病幹細胞が濃縮された分画である LGMP (leukemic granulocyte macrophage progenitor) の割合が減少していた。この LGMP の減少は、AraC の投与では見られず、DZNep に特異的な現象であると考えられた。DZNep 投与群において白血病幹細胞が減少していることは、DZNep 投与群および DDW 投与群 (コントロール) から採取した GFP 陽性細胞のコロニーアッセイ・Limiting dilution assay において確認された。DZNep に代わって、EZH2 に対する shRNA を感染させた MLL-ENL 白血病細胞を二次移植した場合も、同様にコントロールと比較して生存期間が延長し、p16 の発現上昇と LGMP 分画の減少がみられた。これらの結果から、MLL 関連白血病細胞において EZH2 が抑制されると、p16 の発現抑制を解除することで白血病幹細胞の減少を引き起こすと仮定した。p16 は、oncogene induced senescence を引き起こす遺伝子として知られており、腫瘍細胞においては、主に PRC1 の構成因子である Bmi1 によって抑制されていると考えられている

(Sauvageau et al. Cell Stem Cell. 2010)。この時、EZH2 は Bmi1 をリクルートするために必要であると考えられている (Agherbi et al. Plos One. 2009)。しかし、MLL 関連白血病において EZH2 の抑制が特に強力に腫瘍を抑制する機序は未解明である。特に、MLL 関連白血病は、MLL 融合遺伝子によって活性化される Hoxa9 が、Bmi1 と同様に p16 を抑制しており、Bmi1 のノックダウンは白血病の病勢を減退させないことが報告されている (Smith et al. Cell Stem Cell. 2010)。対照的に EZH2 の抑制が著明な腫瘍抑制効果を示すことは大変興味深い知見であり、その機序の解明が、EZH2 阻害薬による MLL 関連白血病の治療につながると考えた。我々は、p16 のプロモーターに EZH2 が作用しており、MLL 関連白血病においては MLL 融合タンパク質やその標的遺伝子産物がその作用を修飾することで、EZH2 への依存性を高めると考えた。この仮説に基づき、今後、ChIP シークエンス法により、EZH2 の p16 プロモーターへの作用、および MLL 融合蛋白による修飾の機序を明らかにしていく。

2. 研究の目的

平成 24 年度中に、MLL 関連白血病細胞およびコントロールとして他の白血病細胞の ChIP 産物の ChIP シークエンスを行い、p16 プロモーター上の EZH2 作用部位、MLL 融合蛋白およびその標的遺伝子産物による修飾の状態などを明らかにする。更に、p16 (INK4a)/p19 (Arf) ノックアウトマウスの骨髓細胞に、MLL-ENL 融合遺伝子を感染させてマウスに移植し、この白血病マウスでは EZH2 の抑制が病勢を制御できないことを確認する。以上のような実験系で、EZH2 による p16 を始めとする遺伝子制御の全容を解明し、平成 25 年度には MLL 関連白血病に対する EZH2 を標的とした治療モデルを確立することを目標とする。

3. 研究の方法

MLL 関連白血病における EZH2 の役割と p16 発現抑制との関係を明らかにするため、ChIP sequence による EZH2 と p16 プロモーター DNA の結合領域の同定を行い、更に p16 遺伝子の DNA メチル化解析、ヒストンメチル化解析などを行う。さらに、MLL 融合タンパク質やその標的遺伝子産物 (Hox 群遺伝子など) の抗体を用いた免疫沈降を行い、MLL 関連白血病に対して特に EZH2 の抑制が有効である理由を解明する。その後、臨床検体においても同様の知見が得られるか確認する。さらに、各種悪性腫瘍の遺伝子発現プロファイルのデータベース等を駆使して、MLL 関連白血病と同様に EZH2 が腫瘍幹細胞の維持に重要な役割を果たしている悪性腫瘍をスクリーニングし、それらの細胞株や患者検体を用いて解析を行う。

4. 研究成果

研究目的を達成し、学術論文掲載に至った。

Although aberrant histone methylation has been revealed to be important in MLL fusion leukemia, the role of H3K27 trimethylase EZH2 has not been fully clarified. Therefore, we investigated the role of EZH2 in MLL-related leukemia.

EZH2 inhibitor DZNep and shRNA for EZH2 strongly suppressed the proliferation of MLL-related leukemia cell lines and immortalized cells harboring MLL fusion genes with high specificity. In vivo administration of DZNep and transduction of shRNA targeting EZH2 decreased the leukemic granulocyte macrophage progenitors (LGMPs) and prolonged survival of MLL/AF9 and MLL/ENL-induced leukemic mice. Limiting dilution transplantation assay revealed that frequency of leukemia stem cells (LSCs) was reduced by DZNep administration. Expression analysis suggested that p16 up-regulation was responsible for LSC reduction. In fact, knockdown of p16 completely canceled the survival advantage of mice which received DZNep. Chromatin immunoprecipitation assays suggested that both H3K4 and H3K27 methylation marks were highly enriched around the TSS of p16, together with EZH2 and Bmi1. Therefore removal of EZH2 is supposed to convert the promoter of p16 to an active state.

We are investigating further crosstalk between p16, EZH2 and MLL fusion proteins.

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 1件)

Inhibition of histone methyltransferase

EZH2 depletes leukemia stem cell of mixed lineage leukemia fusion leukemia through upregulation of p16

Koki Ueda, Akihide Yoshimi, Yuki Kagoya, Satoshi Nishikawa, Victor E. Marquez, Masahiro Nakagawa and Mineo Kurokawa
Cancer Science Epub
〔学会発表〕(計 3件)

2012 (53rd) Annual Meeting of the American Society of Hematology in

Atlanta, GA, Monday, December10 (7-11), 2012, Poster Board no.: III-602

Inhibition of EZH2 Depletes MLL Fusion Leukemia Stem Cells Through Restoration of p16 Expression

Koki Ueda, Akihide Yoshimi, Masahiro Nakagawa, Satoshi Nishikawa, Victor E Marquez, Keiki Kumano and Mineo Kurokawa

The histone methyltransferase EZH2 Plays a crucial role in MLL-related leukemia

Koki Ueda, Akihide Yoshimi, Masahiro Nakagawa, Satoshi Nishikawa, Keiki Kumano and Mineo Kurokawa

第 74 回日本血液学会総会、
2012/10/19(19-21)、京都

The histone methyltransferase EZH2 plays a crucial role in MLL-related leukemia (ヒストンメチル化酵素 EZH2 は MLL 関連白血病の維持に重要な役割を果たしている)

Koki Ueda, Akihide Yoshimi, Masahiro Nakagawa, Satoshi Nishikawa, Keiki Kumano and Mineo Kurokawa

第 71 回日本癌学会学術総会、
2012/9/21(19-21)、札幌
〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

(植田航希)

研究者番号：80632190

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：