

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860245

研究課題名(和文)変異型エピジェネティクス制御因子による高分化型リンパ腫発症の機構解析

研究課題名(英文)Analysis of mature B cell lymphomagens by mutated epigenetic factors

研究代表者

杉原 英志(Sugihara, Eiji)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：50464996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティクスの異常による遺伝子発現の制御破綻はがん化に密接に関与すると考えられてきた。本研究では成熟型悪性リンパ腫で変異が報告されたヒストン修飾を制御する因子Ezh2及びMEF2Bを解析した。変異型Ezh2はヒストンH3K27のトリメチル化を亢進したが、胚性中心B細胞へ発現してもリンパ腫の傾向を示さなかった。MEF2Bにおいてもリンパ腫の傾向を示さなかった。一方、リンパ腫で高発現が見られるc-Mycはリンパ腫を直接誘導できることを見出した。これらの結果から変異型エピジェネティクス因子はリンパ腫の直接的なドライバー因子ではなく、リンパ腫形成に間接的に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that deregulation of gene transcription by epigenetic abnormality contributes to tumorigenesis. In this study, we focused on the histone modification-regulated factors Ezh2 and MEF2B whose gene mutations have been often reported, and studied their roles in mature B cell lymphomagenesis. Although mutated Ezh2 enhanced the tri-methylation of histone H3K27, exogenous expression of mutated Ezh2 in germinal center B cells did not induce lymphoma in transplanted mice. MEF2B also showed similar results. On the other hands, c-Myc, frequently overexpressed in lymphoma, could directly induce mature B cell lymphoma. Therefore, mutated histone modification-regulated factors are not direct drivers in lymphomagenesis but probably contribute to the promotion of lymphoma.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：リンパ腫 エピジェネティクス c-Myc Ezh2 MEF2B

1. 研究開始当初の背景

非ホジキンリンパ腫である濾胞性リンパ腫及び、びまん性大細胞 B リンパ腫はリンパ節内における胚中心に存在する B リンパ球が起源細胞である高分化型 (成熟) B 細胞性の悪性リンパ腫であり、リンパ腫の中で最も頻度が高い。昨今の治療法の開発により、両リンパ腫はある程度の治療成績の改善が見られるものの、未だ多くの患者の再発が報告されている。加えて、既存の抗癌剤治療ではほとんど効果のない症例の報告もあり、更なる治療の改善には新規薬剤の開発が強く望まれている。

近年、エピジェネティクスの異常が癌の発生や進行に強い関連性があることが報告されている。特に DNA の CpG アイランドにおけるシトシン残基のメチル化、ヒストンのメチル化の異常やアセチル化の異常が多くの悪性腫瘍で報告されており、エピジェネティクスの異常によって遺伝子発現の制御に破綻が生じることが癌化や悪性化に大きく影響を与えると考えられている。

濾胞性リンパ腫及び、びまん性大細胞 B リンパ腫におけるエクソームシーケンス解析によって、ヒストン修飾に関わる *Ezh2* や *MEF2B* などの遺伝子に高頻度に変異が見出された (Morin RD et al, Nature 2011; Pasqualucci L et al, Nat Genet, 2011; Lohr JG et al, PNAS, 2012)。*Ezh2* はポリコーム群複合体 2 (PRC2) の構成因子であり、ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基 (H3K27) のメチル化を促進し、遺伝子発現を負に制御する。*MEF2B* はヒストン脱アセチル化酵素複合体 (HDAC) と N 末端部位で結合し、ヒストンの脱アセチル化を制御すると考えられている。しかしながら、変異型分子によって生じたヒストン修飾の異常、ひいては遺伝子発現の異常が両リンパ腫の発症や悪性化のプロセスにどのように影響するのかはこれまで全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究ではエピジェネティクス制御分子に注目し、遺伝子変異によって生じた機能異常によるヒストン修飾の異常が高分化型リンパ腫の発生や悪性化にいかに関わるのかを明らかにするため、これまでに構築した *ex vivo* システムやリンパ腫マウスモデルを用いて、変異分子のリンパ球やリンパ腫前駆細胞の発癌・悪性化における役割を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 変異型 *Ezh2* 及び *MEF2B* 発現ベクターの構築及び解析

Ezh2 及び *MEF2B* 遺伝子の cDNA をクローニ

ングし、Site directed mutagenesis 法により実際の患者で頻繁にみられる変異型 *Ezh2*^{Y641F}、*Ezh2*^{Y641H} 及び *MEF2B*^{K4E}、*MEF2B*^{D83V} を作製した。これら cDNA を GFP が同時に発現するレトロウイルスベクター (pMXs-IRES-GFP) ヘサブクローニングし、NIH3T3 細胞へ感染・発現させた。ヒストン修飾へ与える影響をヒストン H3 メチル化抗体、アセチル化抗体を用いてウエスタンブロットを行った。また、野生型、変異型 *MEF2B* と c-Myc 発現ベクター及び Tert promoter-luciferase ベクターを 293T 細胞へコトランスフェクションを行い、その後のルシフェラーゼの活性を測定した。

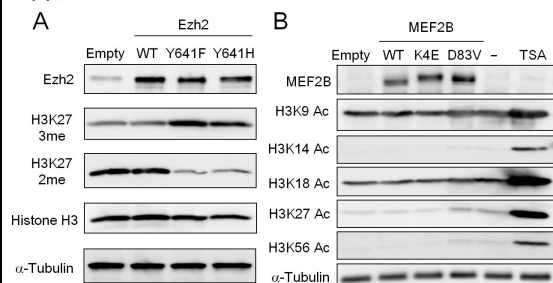
(2) 成熟 B 細胞リンパ腫モデルの構築及び解析

マウス脾臓細胞からナイーブ B 細胞を採取し、IL-4 及び抗 CD40 抗体にて刺激することで胚中心 B 細胞を *ex vivo* で作製した。胚中心 B 細胞へリンパ腫で発現異常が多く見られる *c-Myc*、*Bcl2*、*Bcl6* 及び変異型 *Ezh2* 及び *MEF2B* 遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、同種マウスへ移植を行った。その後の経過観察を行うため、末梢血や脾臓、リンパ節を採取し、フローサイトメーターにてリンパ腫マーカーなどを評価した。また、リンパ腫を発症したマウスからリンパ節を採取し、初代培養を行った。

4. 研究成果

まず、変異型 *Ezh2* 及び *MEF2B* がヒストン修飾に与える影響を解析するため、NIH3T3 細胞へ野生型 *Ezh2* 及び変異型 *Ezh2*^{Y641F}、*Ezh2*^{Y641H}、*MEF2B*^{K4E}、*MEF2B*^{D83V} をレトロウイルスベクターにて導入した。導入細胞におけるヒストン H3K27 のメチル化、ヒストン H3 のアセチル化をそれぞれウエスタンブロットにて検討した。その結果、変異型 *Ezh2*^{Y641F}、*Ezh2*^{Y641H} を発現した細胞では野生型 *Ezh2* と比較して、H3K27 のトリメチル化が顕著に増加し、逆にジメチル化が減少することが分かった (図 1A)。一方、変異型 *MEF2B* を発現した細胞においてはヒストン H3 の K9、K14、K18、K27、K56 のアセチル化に変化がないか、ほとんど見られないことが分かった (図 1B)。

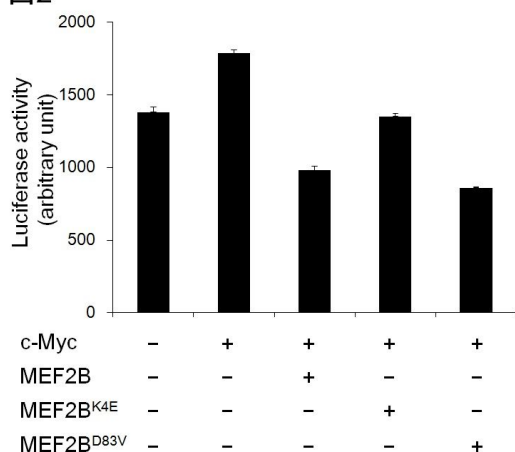
図 1



これらの結果より変異型の Ezh2 はヒストン H3K27 のトリメチル化を亢進することでグローバルに転写を負に制御する機能獲得型の変異である可能性が示唆された。しかし、変異型 MEF2B においてはヒストン H3 のグローバルなアセチル化の増減に影響を与えず、ローカルなアセチル化に影響あるいは他の機能に影響を与える可能性が示唆された。

MEF2B は過去に c-Myc と結合し、c-Myc の転写を促進することが報告されている (Wang K et al., Nat Biotechnol. 2009)。そこで変異型 MEF2B が c-Myc の転写に直接的に影響を与えるのか、c-Myc のターゲットである *Tert* プロモーターシフェラーゼベクターを用いて c-Myc の転写活性を測定した。その結果、野生型及び変異型 MEF2B は c-Myc による転写活性化を促進せず、むしろ転写抑制の傾向にあることが分かった (図2)。

図2



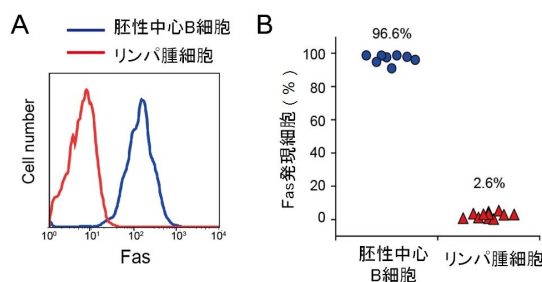
一方、他の研究グループより変異型 MEF2B はリンパ腫で高発現が見られる *Bcl6* を増加させる機能があると報告された (Carol YY et al., Nat Immunol. 2013)。これらの結果から変異型 MEF2B は c-Myc の機能を促進せず、単独で *Bcl6* の直接的な転写活性化に寄与している可能性が示唆された。しかし、変異型 MEF2B がローカルなヒストンのアセチル化に影響するのかどうか未解明であり、今後更なる解析が必要である。

次にリンパ腫発症において変異型 Ezh2 及び MEF2B が及ぼす影響に関して検討を行った。マウス脾臓より採取したナイーブ B 細胞を培養し、胚性中心 B 細胞へと分化誘導した後、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入を行った。その結果、Ezh2 及び MEF2B の野生型、変異型ともに同等の割合の発現 (GFP 発現) 細胞が確認された。そこで導入細胞を同種マウスへ移植し、経過観察を行ったが、リンパ節や脾臓など、どのリンパ器官においても GFP 陽性細胞が確認されず、リンパ腫の発症の傾向を認めることができなかった。さ

らに、リンパ腫で高発現が見られる *c-Myc*、*Bcl2*、*Bcl6* を導入した胚性中心 B 細胞を移植してもリンパ腫形成が見られなかった。次にリンパ腫における癌抑制遺伝子である *Ink4a/Arf* ノックアウトマウス由来の胚性中心 B 細胞を用いて前述同様に遺伝子を発現し移植したところ、c-Myc 発現細胞を移植した時のみ、リンパ節・脾臓の腫大化が観察され、リンパ腫の形成が認められた。つまり c-Myc は *Ink4a/Arf* 遺伝子の欠損とともにリンパ腫を形成することが分かった。同様に野生型、変異型 Ezh2 及び MEF2B を *Ink4a/Arf* を欠損した胚性中心 B 細胞へ発現し移植したが、リンパ腫の形成が見られなかった。これらの結果から、c-Myc は成熟 B 細胞リンパ腫のドライバー遺伝子であることが明らかになったが、変異型 Ezh2 及び MEF2B はドライバー遺伝子ではないことが示唆され、リンパ腫形成に間接的に関与することが推察された。

c-Myc 発現及び *Ink4a/Arf* 欠損由来のリンパ腫細胞は、細胞表面マーカー B220⁺IgM⁺ と成熟 B 細胞性を示したこと及びリンパ腫組織像より、ヒトバキットリンパ腫に類似した成熟 B 細胞リンパ腫であることが分かった。興味深いことに起源細胞である胚性中心 B 細胞とリンパ腫細胞の表面マーカーを比較したところ、アポトーシス誘導因子である Fas の発現がリンパ腫細胞において著しく低下していることが分かった (図 3A 及び 3B)。

図3



そこで Fas の発現の低下が胚性中心 B 細胞からの腫瘍化に重要かどうか明らかにするため、shRNA にて Fas の発現を抑制したところ、c-Myc によるリンパ腫形成の頻度及び発症速度が有意に増加することが分かった。Fas は T 細胞やナチュラルキラー細胞に発現する Fas リガンドによってアポトーシスを仲介する役割があるため、Fas の発現低下は免疫細胞によるアポトーシス誘導を回避しリンパ腫を発症する鍵となるイベントであることが示唆された。

さらにヒトのリンパ腫の細胞株において Fas の発現低下がどの程度で見られるのか調べたところ、84%において Fas の発現レベルが低いことが分かった。この低発現にエピソード

エネティクスによる発現抑制が関与するのか阻害剤を用いた検討を行ったところ、幾つかの細胞株においては DNA のメチル化及びヒストンの脱アセチル化の解除により Fas の発現が回復することが分かった。しかしながら Ezh2 の阻害剤 DZnep では Fas の発現低下を回復できなかった。このことからリンパ腫発症に伴う Fas 発現抑制の制御には少なくとも Ezh2 によるヒストンのメチル化は関与していない可能性が示唆された。

本研究において c-Myc 発現によりマウス成熟 B 細胞リンパ腫誘導の新規手法を確立することができた一方で、実際のリンパ腫の症例で見られる変異型エピジェネティクス分子 Ezh2 や MEF2B 単独ではリンパ腫を誘導できないことを明らかにした (日本癌学会学術総会 2013、AACR2015)。他の研究グループにおいても変異型 Ezh2 はヒストン H3K27 のトリメチル化亢進により、癌抑制遺伝子である Blimp1 の発現が抑制され、リンパ腫増大を促進する一方で単独では腫瘍形成には不十分であることを示唆しており、本研究結果と類似する結果であると考えられる (Caganova et al., J Clin Invest. 2013)。今後 c-Myc だけでなく、びまん性大細胞 B リンパ腫で異常が見られる NFκB のようなドライバー遺伝子群と変異型エピジェネティクス制御分子がいかに相互作用しリンパ腫を発症・促進させるのか、また現実的に薬剤の標的となり得るのか明確にすることで新規治療薬へと繋げていきたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Yamaguchi SI, Ueki A, Sugihara E, Onishi N, Yaguchi T, Kawakami Y, Horiuchi K, Morioka H, Matsumoto M, Nakamura M, Muto A, Toyama Y, Saya H, Shimizu T. Synergistic antiproliferative effect of imatinib and adriamycin in PDGF receptor-expressing osteosarcoma cells. *Cancer Sci*. 2015 May 2. doi: 10.1111/cas.12686. 査読有
2. Sugihara E, Inukai T and Saya H. Molecular pathogenesis of leukemic stem cell in acute lymphoblastic leukemia (Review article). *Hematology* (Japan) 69(5):595-601, 2014. <http://www.kahyo.com/brand/b-KS201411-69> 5 査読無
3. Shimizu T, Sugihara E, Yamaguchi-Iwai S, Tamaki S, Koyama Y, Kamel W, Ueki A, Ishikawa T, Chiyoda T, Osuka S, Onishi N, Ikeda H, Kamei J, Matsuo K, Fukuchi Y, Nagai T, Toguchida J, Toyama Y, Muto A and Saya H: IGF2 preserves osteosarcoma cell survival by creating an autophagic state

of dormancy that protects cells against chemotherapeutic stress. *Cancer Res* 74:6531-6541,2014. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0914. 査読有

4. Hosonaga M, Arima Y, Sugihara E, Kohno N, Saya H. Expression of CD24 is associated with HER2 expression and supports HER2-Akt signaling in HER2-positive breast cancer cells. *Cancer Sci*. 105(7):779-787, 2014. doi: 10.1111/cas.12427. 査読有
5. Nobusue H, Onishi N, Shimizu T, Sugihara E, Oki Y, Sumikawa Y, Chiyoda T, Akashi K, Saya H, Kano K. Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation. *Nat Commun* 26;5:3368, 2014. doi: 10.1038/ncomms4368. 査読有
6. Ishikawa T, Shimizu T, Ueki A, Yamaguchi S, Onishi N, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Morioka H, Nakayama R, Kobayashi E, Toyama Y, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Yamaguchi R, Miyano S and Saya H: Twist2 functions as a tumor suppressor in murine osteosarcoma cells. *Cancer Sci*. 104(7):880-888, 2013. doi: 10.1111/cas.12163 査読有
7. Atsumi Y, Inase A, Osawa T, Sugihara E, Sakasai R, Fujimori H, Teraoka H, Saya H, Kanno M, Tashiro F, Nakagama H, Masutani M, Yoshioka KI. Arf/p53 module, which induces apoptosis, downregulates histone H2AX to allow normal cells to survive in the presence of anti-cancer drugs. *J Biol Chem*. 288(19):13269-13277, 2013. doi: 10.1074/jbc.M112.402560. 査読有
8. Osuka S, Sampetean O, Shimizu T, Saga I, Onishi N, Sugihara E, Okubo J, Fujita S, Takano S, Matsumura A, Saya H. IGF1 Receptor Signaling Regulates Adaptive Radioprotection in Glioma Stem Cells. *Stem Cells*. 31(4):627-640, 2013. doi: 10.1002/stem.1328. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Sugihara E, Shimizu T, Mogushi K, Hashimoto N, Saya H. Characterization of leukemic stem-like cells with drug resistance and plasticity in B-ALL model, 第 76 回日本血液学会学術集会,2014 年 10 月 31 日, 大阪府大阪市, 大阪国際会議場
2. Hashimoto N, Sugihara E, Ueno S, Saya H. Establishment of simple and rapid Burkitt lymphoma model. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 5 日, 神奈川県横浜

市, パシフィコ横浜

3. Sugihara E, Shimizu T, Mogushi K, Hashimoto N, Saya H. Cancer stem-like cells in mouse B-ALL model show the quiescent state, glycolytic gene expression and plasticity. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3日, 神奈川県横浜市, パシフィコ横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.genereg.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉原 英志 (EIJI SUGIHARA)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号: 50464996