

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461396

研究課題名(和文) Ezh2欠損骨髄異形成症候群モデルマウスによる病態基盤の解明

研究課題名(英文) Epigenetic dysregulation in myelodysplastic syndromes in the absence of Ezh2

研究代表者

指田 吾郎 (SASHIDA, GORO)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授

研究者番号：70349447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群(MDS)は造血幹細胞から発生するクローン性造血器腫瘍であり、造血不全を来し、一部が急性骨髄性白血病へ移行する治療困難な疾患群である。近年の網羅的な遺伝子解析によって、TET2、DNMT3A、EZH2などのエピゲノム制御遺伝子の変異がMDSで次々と同定された。また、健常高齢者におけるMDS同様のエピゲノム制御遺伝子の変異を伴ったクローナル造血の存在が注目され、前がん状態から造血器腫瘍への進展メカニズムの解明が求められている。本研究では、ポリコム複合体2の構成因子であるEZH2によるMDSを始めとした造血器腫瘍の発症過程の分子基盤の解明と治療標的の基礎的検証を実施した。

研究成果の概要(英文)：Myelodysplastic syndrome (MDS) is a clonal hematopoietic stem cell disease characterized by impaired hematopoiesis and an increased risk of transformation to acute myeloid leukemia (AML). Epigenetic regulators including TET2, DNMT3A and EZH2 are often mutated in patients with MDS. Recently, exome sequencing of blood cells from aged people without hematological malignancies demonstrated the presence of clonal hematopoiesis as given myeloid malignancies-associated mutations such as TET2 and DNMT3A. In this study, I have unveiled molecular mechanisms of how accumulation of epigenetic alterations and genetic mutations including EZH2 promote the development of MDS and hematological malignancies by utilizing Ezh2 conditional knockout mice. In addition, I have provided a basis for specific rational epigenetic therapy for myeloid malignancies with Ezh2 dysfunction.

研究分野：造血器腫瘍の病態基盤解明

キーワード：骨髄異形成症候群 慢性骨髄増殖性腫瘍 骨髄線維症 エピゲノム ポリコム複合体 TET2 RUNX1 JAK2

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(MDS)は造血幹細胞から発生するクローン性造血器腫瘍であり、血球分化異常と機能障害による造血不全と、急性骨髄性白血病(MDS/AML)への移行性を認める治療困難な疾患群である。その病原は遺伝子変異を伴った MDS 造血幹細胞であり、さらに 5q-、-7/7q-、20q-、-Y といった染色体異常が MDS の病態や予後に密接に関連している。ただし、MDS 幹細胞の発生と病態進展過程における分子メカニズムは、MDS 細胞が培養に適さず、さらに病態を忠実に再現できるモデルマウスが無かったことがあり、研究が進んでいなかった。近年、複数の研究室から 5q- 染色体異常を認める 5q- MDS syndrome の分子病態が明らかになったが(Barlow JL et al. Nature Med 2010. Starczynowski DT et al. Nature Med 2010)、最も生命予後が不良である -7/7q- 染色体異常を認める MDS の分子病態はほとんど解明されていなかった。

近年の次世代シーケンサーの進歩による網羅的な遺伝子変異解析から、従来検出されていなかった DNA メチル化またヒストン修飾といったエピゲノム制御を行う遺伝子である *EZH2*、*TET2*、*IDH1/2*、*ASXL1* などの変異が MDS や AML で次々と報告された。本研究課題の開始直前には、MDS ヒト 439 例の網羅的な遺伝子変異解析の結果が報告され、*p53*、*EZH2*、*ETV6*、*RUNX1* と *ASXL1* 変異が単独の予後不良因子であり、個々の症例で比較的高頻度に *EZH2*、*RUNX1* に加えて *TET2* の機能喪失型変異が複数共在していた(Bejar R et al. NEJM 2011)。

申請者が所属していた千葉大学大学院医学研究院・細胞分子医学(岩間厚志教授)では、長年にわたり *EZH2* をはじめとしたポリコム遺伝子による造血幹細胞の機能解析を行ってきた実績がある。*EZH2* はヒト 7 番染色体長腕にあり、7 番染色体異常と *RUNX1* 点突然変異の関連は指摘されてきた。

そこで、本研究では-7/7q-染色体異常を認める MDS の病態を理解するために、*Ezh2* 欠損マウスモデルに *Tet2* 発現低下マウス(*Tet2*<sup>KD/KD</sup>)あるいは *RUNX1* 点突然変異体を加えて、MDS クローン性幹細胞の増殖および血球分化の障害過程とともに、標的遺伝子を含めた分子メカニズムの解明を目指した。

また、並行して骨髄増殖性腫瘍(MPN)のひとつである原発性骨髄線維症 (PMF) の病態基盤を理解するために、*JAK2*<sup>V617F</sup> 活性化変異体トランジェニックマウスと *Ezh2* 欠損マウスを作製して解析した。

## 2. 研究の目的

がんはジェネティック変異とエピジェネティック変異が重なり蓄積した分子病態である。初期に発生した前がん細胞・がん幹細胞が正常組織から排除されずに、増殖優位性を獲得した場合にがんの発症に至る。MDS は血球分化異常と機能障害による造血不全を来とし、一部が急性骨髄性白血病(MDS/AML)へ移行する治療困難な疾患群である。MDS の病源となる MDS 幹細胞の存在は、ヒト MDS 細胞に加えて患者由来の間葉系細胞を併用した免疫不全マウスへの異種移植実験によって最近証明された。興味深いことに、MDS はクローナルな造血を示す悪性腫瘍であるが、MDS 幹/前駆細胞の増殖活性は野生型幹細胞と比較して変わらないか低下している。MDS 幹細胞が共存する正常造血幹細胞を駆逐して MDS 発症に至るメカニズムは、ヒト MDS を忠実に再現するモデルマウスの確立が困難であったために理解が進んでいなかった。近年のゲノムワイドな遺伝子解析によって、*TET2*、*DNMT3A*、*EZH2*、*ASXL1* などエピジェネティック制御遺伝子に加えて、*SF3B1* を始めとした RNA スプライシング遺伝子変異が MDS や AML 患者細胞を用いて次々と同定された。このように、以前から知られた分化や増殖に関与する転写因子変異

だけでなく転写制御機構の破綻が、MDS を含めた造血器腫瘍の発症過程でより重要であると広く認識された。さらに、血液学的所見のない健常高齢者に遺伝子変異を伴ったクローナル造血が報告され、興味深いことに造血器腫瘍で変異を認める *DNMT3A*、*TET2*、*ASXL1*、*SF3B1* といったエピジェネティック制御遺伝子や RNA スプライシング因子の変異が高頻度に存在した。加齢に伴うクローナル造血の全てが造血器腫瘍に進展するわけではなく、これらは遺伝子変異を伴った前がん状態とも言える。

ポリコーム群複合体は、Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) および PRC2 の二つの複合体が存在する。ヒストンの化学的修飾を介して転写を抑制しており、造血幹細胞ではその機能と血球分化を制御している。PRC2 の構成因子である *EZH1/2* は H3K27 トリメチル化酵素 (H3K27me3) として機能し、標的遺伝子の転写を抑制する。*EZH2* の機能喪失型変異が骨髄増殖性腫瘍や骨髄異形成症候群に認められており、MDS や MPN において *EZH2* 変異は予後不良因子として知られる。以上、こうした研究知見に基づき、本研究では、*EZH2* による MDS と MPN の発症過程における分子基盤解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

MDS の病態基盤を理解するために、ヒト MDS で高頻度に認められる転写因子 *RUNX1S291fs* 変異体をレトロウイルスベクターによって、*Ezh2<sup>wt/wt</sup>;Cre-ERT* または *Ezh2<sup>lox/lox</sup>;Cre-ERT* 造血幹細胞に導入する。導入された造血幹細胞を競合させる野生型骨髄細胞と共に、致死量放射線照射した CD45.1+ レシピエントマウスに移植する。移植後 1 か月でタモキシフェン投与により、*Ezh2* を欠損させた。造血の表現形解析と MDS 発症を 12 か月まで観察した。

また、同様に *EZH2* 機能喪失型変異による

骨髄線維症の病態基盤を理解するため、*JAK2<sup>617F</sup>* TG マウスと *Ezh2<sup>lox/lox</sup>* を用いて *JAK2<sup>617F</sup>;Cre-ERT;Ezh2<sup>lox/lox</sup>* マウスを交配作製した。致死量放射線照射したレシピエントマウスに  $4 \times 10^6$  個の骨髄細胞を野生型、*JAK2<sup>617F</sup>* 単独、*Cre-ERT;Ezh2<sup>lox/lox</sup>* または *JAK2<sup>617F</sup>;Cre-ERT;Ezh2<sup>lox/lox</sup>* マウスから採取して移植した。移植後 1 か月の時点でタモキシフェンを腹腔内投与して、*Cre* リコンビナーゼ発現を誘導して同様に *Ezh2* を欠損させた。造血の表現形解析と骨髄線維症の発症を 12 か月まで観察した。

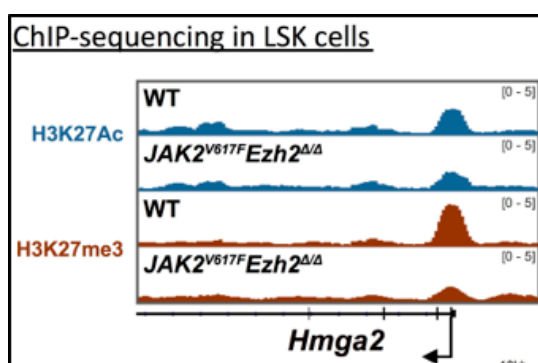
### 4. 研究成果

前記したように、AML や B 細胞性リンパ腫とは対照的に、*EZH2* 機能喪失型変異が MDS や MPN に高頻度に認められ、がん抑制遺伝子として機能している。また、他の PRC2 構成遺伝子 *EED* や *SUZ12* にも頻度は少ないが機能喪失型変異が認められる。*EZH2* は 7 番染色体長腕 (7q36) にあり、-7/7q-染色体異常あるいは *EZH2* の機能喪失型変異を有する MDS 細胞では H3K27me3 修飾レベルが低下している。実際、*Ezh2* ノックアウトマウスの解析では、*Ezh2*-PRC2 標的遺伝子の一部の発現が脱抑制 (活性化) しており、*Ezh2* 欠損単独で長期間を要するが MDS や MDS/MPN を発症した (Mochizuki-Kashio M, et al 2015)。さらに、*Ezh2* 欠損に加えて *Tet2* や *Runx1* 変異との協調によって MDS および MDS/MPN の発症が著しく促進された (Sashida G, et al. Nat Commun 2014, Hasegawa N, et al. Leukemia 2017)。この際、H3K27me3 修飾が消失・減少して発現レベルの上昇した *Ezh2*-PRC2 標的遺伝子には多くの“がん遺伝子”候補が含まれており、エンハンサー・プロモーター領域の活性化ヒストン修飾 H3K27ac を伴って、MDS や MPN の病態進展に貢献していた。また、MDS 細胞が生体内で過剰かつ慢性的な炎症性サイトカイン産生を介して、共存する野生

型幹細胞を障害する機序も想定されており、細胞増殖活性が強くない MDS 幹細胞が競合優位性を獲得するとともに、共存する野生型幹細胞が障害されることで、MDS における造血不全が加速されることが分かった (Sashida G, et al Nat Commun 2014)。

一方、MPN である骨髄線維症の病態解析に関して以下に記載する。*JAK2<sup>V617F</sup>* 単独マウスは 9 か月前後で MF を発症して死亡するが、*JAK2<sup>V617F</sup>/Ezh2 KO* マウスにおいては、移植後 4 か月までの早期に血球減少、形態異常のある巨核球の増生、骨髄・脾臓の線維化像を認める MF を発症して死亡した。このことから *Ezh2* 欠損によって *JAK2<sup>V617F</sup>* による骨髄線維症発症の促進が確認され、MF において *Ezh2* が癌抑制遺伝子として働くことが証明された。

*Ezh2* 欠損による MF 発症促進の分子基盤を解明するため、初めに骨髄造血幹/前駆細胞分画(Lin<sup>-</sup>Scal<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>, LSK 細胞)を採取してマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。*Ezh2 KO* および *JAK2<sup>V617F</sup>/Ezh2 KO* 細胞では予想どおり PRC2/*Ezh2* 標的遺伝子群の発現が亢進していた。ヒト MF の病態基盤を再現していると考えられた。実際にこうした遺伝子変化が *Ezh2* 欠損によるヒストン修飾変異によるものか明らかにするため、同じ細胞分画を用いて H3K27me3 抗体 (また H3K27ac 抗体) によるクロマチン免疫沈降実験(ChIP) シークエンスを実施した。この解析によって、遺伝子のプロモーター領域およびエンハンサー領域におけるヒストン修飾の病態形成過程における変化を検証した。一例として、MF 幹/前駆細胞では、MF だけでなく固形腫瘍においても“がん遺伝子”としても知られる *Hmga2* の過剰発現とヒストン修飾の有意な変化を認めた (図参照)。近年、エンハンサーのうちスーパーエンハンサーによる幹細胞機能制御における役割が注目されている。がん細胞においても、長距離で密集した活性



化ヒストン修飾 H3K27ac によって形成されるスーパーエンハンサーががん細胞の発生・維持に必須な遺伝子発現に重要であり、H3K27ac を認識するプロモドメインの拮抗的阻害剤 JQ1 などエンハンサー活性を標的とした新しいがん治療法の可能性が示唆されている。実際、申請者が確立した MF モデルマウスに JQ1 を投与すると、MF 病態進展の抑制効果だけでなく、連続移植実験において、MF 幹細胞機能の障害が確認された。また、この抑制効果は活性化ヒストン修飾の抑制作用によることが ChIP シークエンスでも確認された (Sashida G, et al. J Exp Med 2016)。

以上、本研究課題では新規に確立した *JAK2<sup>V617F</sup> TG/Ezh2 KO* 骨髄線維症モデルマウスを用いて、巨核球など個々の分化細胞の病態形成における役割から MF 病態基盤を解明するだけでなく、MF 細胞特異のエピゲノム異常を明らかにすることで、エピジェネティック制御因子・機構を標的とした治療応用への基礎的検証を実施した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Hasegawa N, Oshima M, Sashida G, Matsui H, Koide S, Saraya A, Wang C, Muto T, Takane K, Kaneda A, Shimoda K, Nakaseko C, Yokote K, Iwama A. Impact of combinatorial dysfunctions of Tet2 and Ezh2 on the epigenome in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2017; 31(4): 861-71. (査読有り)
2. Sashida G, Iwama A. Multifaceted role of the polycomb-group gene EZH2 in hematological malignancies. *Int J*

- Hematol.** 2017; 105(1): 23-30 (査読有り)
3. Sashida G<sup>#</sup>, Wang C, Tomioka T, Oshima M, Aoyama K, Kanai A, Mochizuki-Kashio M, Harada H, Shimoda K, Iwama A<sup>#</sup>. The loss of Ezh2 drives the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. **J Exp Med.** 2016; 213(8): 1459-77 <sup>#</sup>**corresponding authors** (査読有り)
  4. Mochizuki-Kashio M, Aoyama K, Sashida G, Oshima M, Tomioka T, Muto T, Wang C, Iwama A. Ezh2 loss in hematopoietic stem cells predisposes mice to develop heterogeneous malignancies in an Ezh1-dependent manner. **Blood** 2015; 126(10): 1172-83. (査読有り)
  5. Wang C, Oshima M, Sashida G, Tomioka T, Hasegawa N, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Kusunoki Y, Kyoizumi S, Imai K, Nakachi K, Iwama A. Non-Lethal Ionizing Radiation Promotes Aging-Like Phenotypic Changes of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Humanized Mice. **PLoS One.** 2015 Jul 10;10(7):e0132041. (査読有り)
  6. Kameda T, Shide K, Yamaji T, Kamiunten A, Sekine M, Taniguchi Y, Hidaka T, Kubuki Y, Shimoda H, Marutsuka K, Sashida G, Aoyama K, Yoshimitsu M, Harada T, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Sueta M, Yamamoto S, Hasuike S, Nagata K, Iwama A, Kitanaka A, Shimoda K. Loss-of-TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator. **Blood** 2015; 125(2): 304-15. (査読有り)
  7. Kameda T, Shide K, Yamaji T, Kamiunten A, Sekine M, Hidaka T, Kubuki Y, Sashida G, Aoyama K, Yoshimitsu M, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Yamamoto S, Hasuike S, Nagata K, Iwama A, Kitanaka A, Shimoda K. Gene expression profiling of loss of TET2 and/or JAK2V617F mutant hematopoietic stem cells from mouse models of myeloproliferative neoplasms. **Genom Data.** 2015; 4: 102-8. (査読有り)
  8. Sashida G, Harada H, Matsui H, Oshima M, Yui M, Harada Y, Tanaka S, Mochizuki-Kashio M, Wang C, Saraya A, Muto T, Hayashi Y, Suzuki K,

Nakajima H, Inaba T, Koseki H, Huang G, Kitamura T, Iwama A. Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic transformation. **Nature Commun.** 2014; 5: 4177. (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

1. Sashida G, Wang C, Sato D, et al. Ezh2 loss promotes the transformation of early T cell precursor ALL via suppressing critical genes for T-cell commitment. 第 78 回日本血液学会学術集会 2016.10.13-15 パシフィコ横浜
2. Sashida G, Wang C, Ohshima M, et al. The loss of Ezh2 cooperates with an active JAK2 mutant in the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. The 45<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the International Society for Experimental Hematology. 2016.8.25-28 米国 San Diego
3. Sashida G, Wang C, Sato D, et al. Ezh2 loss promotes the transformation of early T cell precursors via suppressing critical genes for T-cell differentiation. American Society of Hematology Annual Meeting. 2015.12.5-8 米国 Orlando
4. Sashida G. Epigenetic Dysregulation of Myelodysplastic Syndrome (Symposium). The 6th JSH International Symposium 2015.5.22-23. 軽井沢プリンスホテル
5. Sashida G, Wang C, Ohshima M, et al. Ezh2 loss promotes the formation of myelofibrosis accompanied with impaired erythropoiesis. The 13th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes 2015. 4/29-5/2 米国 Washington, DC
6. Sashida G, Tomioka T, Wang C, et al. Ezh2 loss accelerates JAK2<sup>V617F</sup>-driven primary myelofibrosis. 第 76 回日本血液学会学術集会 2014.10/31-11/2 大阪国際会議場

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

指田吾郎 (SASHIDA Goro)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘  
教授

研究者番号：70349447

### (3)連携協力者

岩間厚志 (IWAMA Atsushi)

千葉大学大学院医学研究院・教授

研究者番号：70244126