

「ポリコム抑制複合体 2 機能低下型骨髄異形成症候群の がん幹細胞維持機構の解明と新規治療標的分子の探索」

慶應義塾大学薬学部衛生化学講座 助教

青山 和正

要旨

ポリコム抑制複合体 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2) の機能低下は骨髄異形成症候群 (MDS) の発症に関連するが、その分子機構は未解明であり、有効な治療法も開発されていない。我々は *EZH2* 機能喪失を伴う PRC2 機能低下型 MDS の維持に “残存 H3K27me3” が必須であることを見出してきた。本研究では、“残存 H3K27me3” の制御タンパク質を同定することを目的とした。“残存 H3K27me3” を触媒する酵素である *EZH1* の相互作用タンパク質を近位ビオチン化法、*EZH2* 機能喪失と合成致死性を示す分子をクリスパースクリーニングにより同定し、一つの標的候補分子を得た。この標的候補分子の阻害は“残存 H3K27me3” に影響しないものの、*EZH1* をクロマチンから解離させ、その標的遺伝子である分化関連遺伝子の発現抑制を解除した。これにより、同定された標的候補分子が *EZH2* 機能喪失時に *EZH1* を標的遺伝子の制御領域に維持する機能を有しており、*EZH2* 機能喪失を伴う PRC2 機能低下型 MDS に対する有望な創薬標的分子であることが示された。この研究成果は、*EZH2* 阻害剤との併用薬の開発、加齢関連疾患研究、PRC2 制御分子喪失型疾患研究などへの応用も期待される。

背景・目的

ポリコム抑制複合体 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2) はヒストン H3 の N 末端 27 番目のリジンにトリメチル化 (H3K27me3) を修飾することで、転写を抑制するタンパク質の複合体である [1,2]。主に酵素サブユニットである *EZH2* の遺伝子変異やスプライシング異常を伴う PRC2 の機能低下が骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome: MDS) の患者に認められる [3]。しかし、PRC2 の機能低下が MDS の発症に関わる詳細な分子機構は明らかではなく、有効な治療法も確立されていない。

我々は、*EZH2* 機能喪失を伴う PRC2 機能低下型 MDS において、残存する H3K27me3 (残存 H3K27me3) が MDS がん幹細胞の維持に必須であることを明らかにしてきた [4,5]。*EZH2* 機能喪失時においては、唯一の H3K27 メチル基転移酵素かつ PRC2 酵素サブユニットである *EZH1* が残存 H3K27me3 を触媒する。本研究では「H3K27me3 が残存するクロマチン領域には、*EZH1* のリクルート促進や活性亢進、あるいは H3K27me3 の分解抑制に働くタンパク質 (残存 H3K27me3 維持タンパク質 X とする) が存在する」と考え、残存 H3K27me3 の維持を担うタンパク質 (X) を同定することを目的とした。これにより、H3K27me3 が残存する分子機構を解明するとともに、MDS がん幹細胞を排除する新しい MDS 治療法の確立を目指してきた。

方法

近位ビオチン化法

残存 H3K27me3 維持タンパク質 X を同定する目的で、残存 H3K27me3 を触媒する酵素である EZH1 の相互作用タンパク質を、近位ビオチン化法を用いて同定した(共同研究:徳島大学 先端酵素学研究所 藤井節郎記念医科学センター 小迫英尊教授)[6,7]。

CRISPR ノックアウトスクリーニング

EZH1 の相互作用タンパク質から、ノックアウトが *EZH2* 機能喪失と合成致死性をもつ分子を抽出するため、CRISPR ノックアウトスクリーニングを行った。

結果

近位ビオチン化法と CRISPR スクリーニングを用いて、阻害すると *EZH2* 機能喪失と合成致死性を示し、かつ EZH1 と相互作用するタンパク質を 7 個同定した。その中で、*EZH2* の機能喪失において、EZH1 との相互作用が増強する 1 分子 (以降、標的候補分子とする) に注目した。両スクリーニングの結果を共免疫沈降法と共培養細胞アッセイにより確認した。しかし予想に反して、標的候補分子をノックアウトしても、western blotting で検出したグローバルな残存 H3K27me3 のレベルに有意な変化は認められなかった。次に、クロマチン免疫沈降-シーケンス(ChIP-seq)を用いて、標的候補分子のノックアウトが EZH1 のクロマチン結合に与える影響を調べた。191 箇所のクロマチン領域において、標的候補分子のノックアウトによって、EZH1 の結合量が減少することがわかった。その EZH1 が減少した 191 箇所の付近に存在する遺伝子群 (転写制御において影響をうけると予測される遺伝子群) は、主に分化関連遺伝子であった。その遺伝子群の発現レベルを RNA-シーケンス(RNA-seq)により解析したところ、標的候補分子のノックアウトによる顕著な増加傾向が認められた。

以上の結果から、同定した標的候補分子は *EZH2* の機能喪失時に、EZH1 を標的遺伝子の制御領域に維持する機能を有していることが明らかとなった。すなわち、*EZH2* 機能喪失時における標的候補分子の阻害・分解は、EZH1 の標的遺伝子からの離脱、分化関連遺伝子群の脱抑制を介して、細胞を消滅させることができると考えられる[図 1]。標的候補分子のノックアウトが残存 H3K27me3 のレベルには影響しなかった点は興味深く、酵素活性に依存しない EZH1 の機能の関与が示唆される。より詳細な解析や検証が必要となるものの、今回同定した標的候補分子は、創薬標的として大変有力である。

EZH2 機能低下型 MDS 細胞

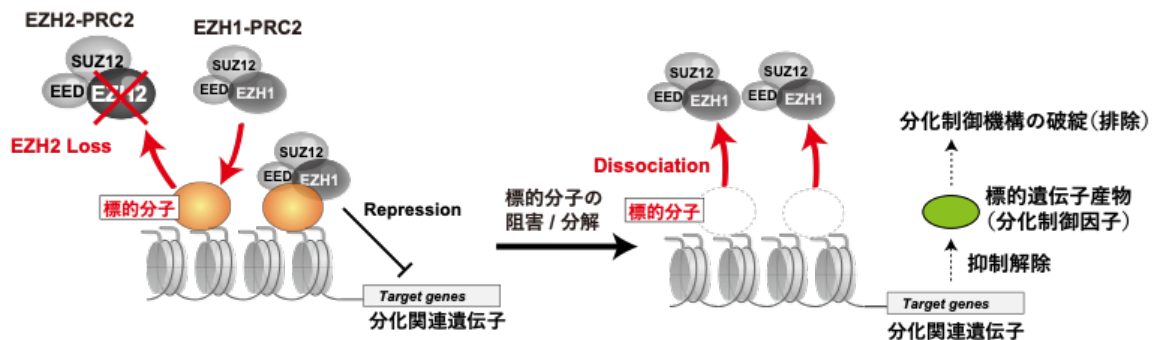


図 1 研究成果の概要

考察

PRC2によるH3K27me3の破綻は様々な疾患を引き起こす。そのためH3K27me3の制御機構は世界中で精力的に研究されており、(non-canonical/variant) PRC1によるH2AK119ub1がPRC2のリクルートに重要であることが明らかとなった[8]。最近でも、次々と新しいPRC2を制御するクロマチンタンパク質が同定されている(例えば、BEND3 [9]、G-quadruplex RNA [10])。この状況において、本研究におけるPRC2制御機構の解析は“残存H3K27me3”の維持機構の解明を目的とした全く新しい視点に基づいたものであった。我々はこれまでに、“残存H3K27me3”がPRC2機能低下型MDSのがん幹細胞維持に必要であることを世界で初めて示してきた[4,5]。本研究はこうした我々自身の知見に基づいており、“残存H3K27me3”という独自の観点から、PRC2機能低下型MDSの新規治療標的の有力な候補を見出すに至った。

本研究成果の波及効果は大きい。*EZH2*は、機能亢進型の疾患も認められており、*EZH2*阻害剤が多くの*EZH2*機能亢進型疾患において有効性が示されている。*EZH2*阻害剤処理後の細胞ではH3K27me3レベルが顕著に低下するが、一部の領域に局限して残存するため、本研究の研究成果が、*EZH2*阻害剤との併用薬の開発に応用できると考えている。さらに、加齢によりヒト造血幹細胞のH3K27me3レベルが低下することも報告されており[11]、老化細胞除去療法 (senolytic therapy) への応用も検討している。加えて、申請者らは最近、造血幹細胞のエピジェネティック記憶 (クロマチン構造やヒストン修飾の変化) を解析し、その記憶が加齢に伴うストレスに応答するうえで重要な役割を担っていることを示した[12,13]。そのため、将来的には残存H3K27me3の研究を老化分野に拡大することで、多くの加齢関連疾患に対しても新しいアプローチが可能である。さらに、*BCOR*の機能喪失型造血器腫瘍 (MDS、Tリンパ腫など) が知られている。我々は、*BCOR*機能喪失型の造血器腫瘍のモデルマウスを作成、解析してきた[14,15]。*BCOR*は、PRC2のリクルートに関わる non-canonical / variant PRC1の構成因子であり[8]、*BCOR*機能喪失型の造血器腫瘍でもH3K27me3レベルの低下が予想されるため、ここにも残存H3K27me3研究成果を応用できる可能性がある。このように、本研究課題は発展性が高く、MDSの新規治療法の確立に加えて、*EZH2*阻害剤の併用薬開発、加齢関連疾患研究、PRC2制御分子喪失型疾患治療などへの貢献が期待できる。

共同研究者

徳島大学 先端酵素学研究所 藤井節郎記念医科学センター 小迫英尊教授

引用論文

1. Margueron, R.; Reinberg, D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* **2011**, *469*, 343-349, doi:10.1038/nature09784.
2. Schuettengruber, B.; Bourbon, H.M.; Di Croce, L.; et al. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell* **2017**, *171*, 34-57, doi:10.1016/j.cell.2017.08.002.
3. Iwama, A. Polycomb repressive complexes in hematological malignancies. *Blood* **2017**, *130*, 23-29, doi:10.1182/blood-2017-02-739490.
4. Aoyama, K.; Oshima, M.; Koide, S.; et al. Ezh1 Targets Bivalent Genes to Maintain Self-Renewing

- Stem Cells in Ezh2-Insufficient Myelodysplastic Syndrome. *iScience* **2018**, *9*, 161-174, doi:10.1016/j.isci.2018.10.008.
5. Aoyama, K.; Shinoda, D.; Suzuki, E.; et al. PRC2 insufficiency causes p53-dependent dyserythropoiesis in myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **2021**, *35*, 1156-1165, doi:10.1038/s41375-020-01023-1.
 6. Motani, K.; Kosako, H. BioID screening of biotinylation sites using the avidin-like protein Tamavidin 2-REV identifies global interactors of stimulator of interferon genes (STING). *The Journal of biological chemistry* **2020**, *295*, 11174-11183, doi:10.1074/jbc.RA120.014323.
 7. Nishino, K.; Yoshikawa, H.; Motani, K.; et al. Optimized Workflow for Enrichment and Identification of Biotinylated Peptides Using Tamavidin 2-REV for BioID and Cell Surface Proteomics. *J Proteome Res* **2022**, *21*, 2094-2103, doi:10.1021/acs.jproteome.2c00130.
 8. Blackledge, N.P.; Farcas, A.M.; Kondo, T.; et al. Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell* **2014**, *157*, 1445-1459, doi:10.1016/j.cell.2014.05.004.
 9. Zhang, J.; Zhang, Y.; You, Q.; et al. Highly enriched BEND3 prevents the premature activation of bivalent genes during differentiation. *Science (New York, N.Y.)* **2022**, *375*, 1053-1058, doi:10.1126/science.abm0730.
 10. Song, J.; Gooding, A.R.; Hemphill, W.O.; et al. Structural basis for inactivation of PRC2 by G-quadruplex RNA. *Science (New York, N.Y.)* **2023**, *381*, 1331-1337, doi:10.1126/science.adh0059.
 11. Adelman, E.R.; Huang, H.T.; Roisman, A.; et al. Aging Human Hematopoietic Stem Cells Manifest Profound Epigenetic Reprogramming of Enhancers That May Predispose to Leukemia. *Cancer Discov* **2019**, *9*, 1080-1101, doi:10.1158/2159-8290.Cd-18-1474.
 12. Aoyama, K.; Itokawa, N.; Oshima, M.; et al. Epigenetic Memories in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cells* **2022**, *11*, doi:10.3390/cells11142187.
 13. Itokawa, N.; Oshima, M.; Koide, S.; et al. Epigenetic traits inscribed in chromatin accessibility in aged hematopoietic stem cells. *Nat Commun* **2022**, *13*, 2691, doi:10.1038/s41467-022-30440-2.
 14. Tanaka, T.; Nakajima-Takagi, Y.; Aoyama, K.; et al. Internal deletion of BCOR reveals a tumor suppressor function for BCOR in T lymphocyte malignancies. *The Journal of experimental medicine* **2017**, *214*, 2901-2913, doi:10.1084/jem.20170167.
 15. Tara, S.; Isshiki, Y.; Nakajima-Takagi, Y.; et al. Bcor insufficiency promotes initiation and progression of myelodysplastic syndrome. *Blood* **2018**, *132*, 2470-2483, doi:10.1182/blood-2018-01-827964.

助成研究に関連した発表論文

該当なし