

論文の内容の要旨

論文題目 成人 T 細胞白血病におけるエピゲノム異常の包括的解析及びその機能的意義の
解明

氏名 藤川 大

<背景> ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は感染後約 50 年という長期潜伏感染期間を経て成人 T 細胞白血病 (ATL) を引き起こすレトロウイルスである。国内の 100 万人超の HTLV-1 感染者から今後約 5 万人が ATL を発症すると予想されているが、有効な治療法は未だ存在しない。ATL はくすぶり型、慢性型、急性型、リンパ腫型の 4 病型に分類される。悪性度の高い急性型、リンパ腫型は極めて予後が悪く、2 年生存率が 15% 程度である。また、ATL の発症を予防する方法も確立されていない。新規治療法の創出のためには ATL の分子基盤の解明が急務である。

近年、腫瘍の治療標的として、ヒストンメチル化酵素などのエピジェネティック因子が注目されている。特に Polycomb Repressive Complex2 (PRC2) は乳がん、B 細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病などにおいて、癌細胞の生存、増殖、がん幹細胞の維持に重要な役割を果たすことが報告されている。PRC2 はヒストン H3 の 27 番目のリジンをトリメチル化 (H3K27me3) することで遺伝子発現を負に制御する。正常組織では胚発生や組織の形成過程に関与することが知られている。我々は、ATL で過剰発現した PRC2 がエピジェネティックに miR-31 の発現を抑制し、NF- κ B の恒常的な活性化を誘導することを明らかにし、エピジェネティックな異常の重要性を示してきた。しかしながら、ATL 細胞におけるエピゲノムの実態、エピゲノムの変化を受ける遺伝子群、ATL 細胞に与える影響は不明である。また、HTLV-1 感染から ATL 発症に至る過程におけるエピジェネティックな異常の蓄積と変遷、HTLV-1 との関連も明らかでない。

<目的>

- ・ ATL におけるエピゲノムの実態とそれがもたらす影響を明らかにする。
- ・ HTLV-1 感染から ATL 発症、悪性化の過程でのエピジェネティックな異常の変遷を明らかにする。

<方法・結果> ① PRC2 依存的なエピゲノムの変化が全遺伝子の約半数の遺伝子上に存在する

ATL 細胞において重要なエピジェネティック因子を理解するために、ヒストンメチル化酵素群の発現変化を調べたところ、ATL では PRC2 の活性を担う EZH2 の発現が最も上昇していた (Fig.1A)。また、エピジェネティック複合体という視点から発現変化を捉えると、PRC2 の構成因子はすべて発現上昇しており、これは他の複合体には見られない特徴であった。

患者由来の ATL 細胞、健常人由来の正常 CD4 陽性 T 細胞を用いて Agilent G3 Promoter Array によって網羅的に H3K27me3 及び H3K4me3 のパターンを解析した。驚くべきことに、ATL において H3K27me3 の増加もしくは減少が約半数の遺伝子上に観察され、ATL における PRC2 依存的なエピゲノムの再編成が明らかになった (Fig.1B)。H3K27me3 の蓄積していた領域について、PRC2 の機能が重要であることが報告されている ES 細胞や B 細胞

リンパ腫での分布と比較すると、大部分は ATL に特徴的な領域であった (Fig.1C)。H3K27me3 の蓄積は転写開始点より上流 1~4kb に有意に起こっていた。また、遺伝子プロモーター上に CpG サイトを有する遺伝子には、ATL において H3K27me3 の蓄積がより顕著に見られた。一方で、H3K4me3 は、変動した領域は H3K27me3 より少ないが、全体的に増加傾向にあることが明らかとなった。

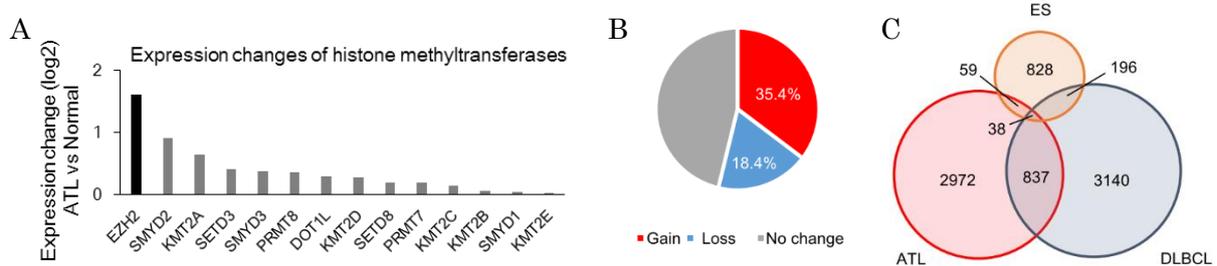


Fig.1 (A) ヒストンメチル化酵素の発現変化。正常 T 細胞と比較して ATL で発現上昇の見られる遺伝子を表示した。(B) 全遺伝子に占める H3K27me3 の変化した遺伝子の割合。正常 T 細胞と比較し ATL 細胞に Fold change (FC) > ±1.5 の H3K27me3 の変化が見られた遺伝子を表示した。(C) ATL において H3K27me3 の蓄積が見られた領域を、ES 細胞、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫のものと比較した。

② エピゲノムの異常は転写因子、エピジェネティック因子、miRNA を広範に抑制する

今回新たに明らかとなったエピゲノムの異常が遺伝子発現に与える影響を調べるため、網羅的な遺伝子発現アレイの結果と統合解析を行った。ATL 細胞と正常 T 細胞との比較から、遺伝子発現の変化と H3K27me3 の変化が負に相関するという全体的な傾向が見られ、エピゲノムの異常が広範な遺伝子発現の制御に関与していることが示唆された (Fig.2A)。ATL で発現が抑制される遺伝子群は病型の進行とともに発現が低下していた (Fig.2B)。これらの遺伝子群には、多数の癌抑制遺伝子 (*CDKN1A*, *Bim*, *NDRG2*, *IKZF3* など) や、miRNA が多く含まれていた。さらに GO 解析を行った結果、興味深いことに転写制御に関与する遺伝子群が最も有意であった (Fig.2C)。この中には機能が未知の Zinc finger protein、H3K27me3 の脱メチル化酵素 KDM6B を含むヒストン脱メチル化酵素が多く含まれていた。

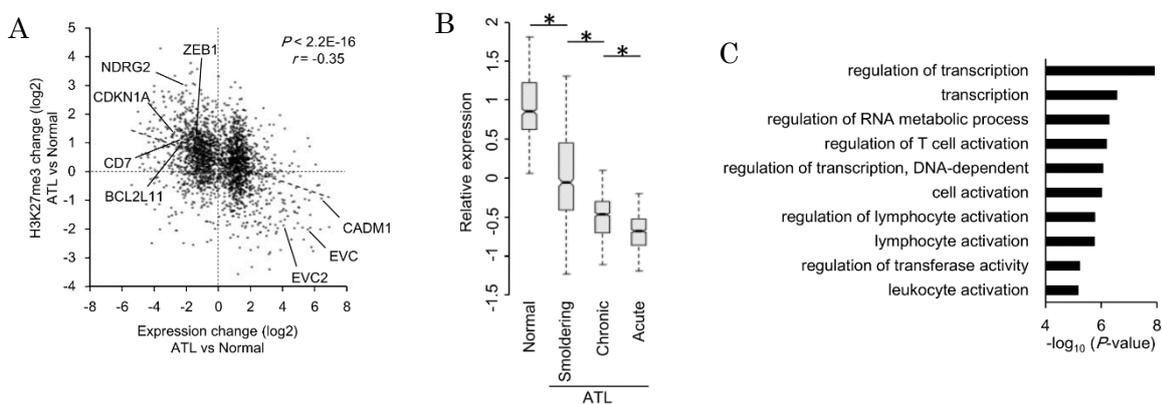


Fig.2 (A) ATL と正常 T 細胞を比較し、遺伝子発現変化 (横軸、 $P < .001$) と H3K27me3 の変化 (縦軸) を表示した。(B) ATL において PRC2 に抑制される遺伝子についてその発現値を正常 T 細胞、ATL の各病型について表示した。(C) B に表示した遺伝子の GO 解析結果。上位 10 のカテゴリーを表示した。

③ HTLV-1 タンパク質 Tax は ATL 様なエピゲノムの異常を誘導する

ATL の発症初期にエピゲノムの異常が起こっていることが示唆されたため (Fig.2B)、次に HTLV-1 の因子が関与するという仮説を立てた。HTLV-1 のタンパク質 Tax は NF- κ B など様々なシグナル伝達系への関与が知られ、また、Tax トランスジェニックマウスが ATL 様のリンパ腫を発症することから、その機能解明が ATL 発症メカニズムの理解につながると考えられている。そこで、Tax が宿主細胞のエピゲノムに与える影響を調べるため、健康人由来末梢血単核球 (PBMC) に Tax を導入し、Tax 導入細胞を作出した。Tax の発現ベクターでは、Tax と緑色蛍光タンパク質 Venus が同一 mRNA 上に転写されるため、細胞集団での Tax 導入細胞を Venus によって可視化できる。Tax を導入した群では Venus 陽性細胞の増殖が起こったのに対し、EZH2 の 2 種類の阻害剤をそれぞれ処理した群では Venus 陽性細胞の増殖は見られなかった (Fig.3A)。また、増殖した Tax 導入細胞では EZH2 の発現が高く、H3K27me3 の蓄積が起こっていた (Fig.3B,C)。さらに網羅的に H3K27me3 の分布を解析したところ、興味深いことに、ATL で H3K27me3 が増加していた領域は、Tax 導入細胞においても増加が見られ、その領域は大部分が重複していた (Fig.3D)。しかしながら、H3K27me3 の蓄積レベルは Tax 導入細胞の方が低かった。

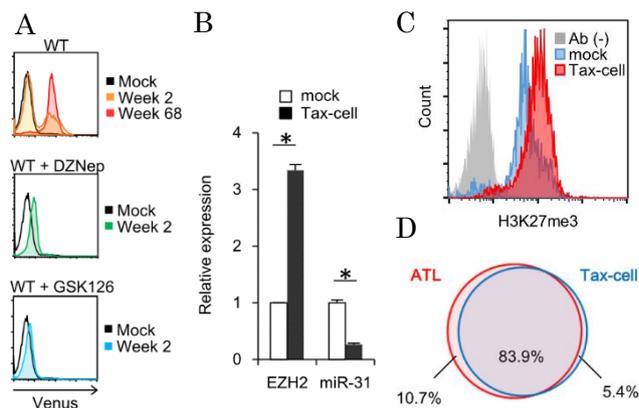


Fig.3 (A) 健康人由来末梢血単核球に Tax を遺伝子導入し、その細胞の割合を Venus の蛍光で調べた。その際、2 種類の EZH2 阻害剤 (DZNep, 500 nM; GSK126, 1 μ M) を処理した。(B) 樹立した Tax 導入細胞における EZH2 と miR-31 の発現量を、定量 PCR を用いて定量した (n = 3, mean \pm SD, P < .05)。(C) Tax 導入細胞における H3K27me3 のレベルを解析した。(D) 正常 T 細胞に比べて ATL 細胞に有意に H3K27me3 の変化が見られる領域について、Tax 導入細胞の H3K27me3 の変化を比較し、割合を表示した。

④ エピジェネティックな異常は ATL 発症以前から存在する

Tax がエピゲノムに影響を与えるという結果から、ATL 発症前の HTLV-1 感染細胞において既にエピジェネティックな異常が存在する可能性を検証した。HTLV-1 感染細胞が濃縮される CADM1 陽性細胞では EZH2 の発現が 4 倍程度上昇していた。また、ATL においてエピジェネティックに発現が抑制される遺伝子群は CADM1 陽性細胞において既に発現が低下していた。さらに CD4 陽性 T 細胞を CADM1 陰性と CADM1 陽性に分取し、H3K27me3 の免疫染色を行ったところ、CADM1 陽性細胞では H3K27me3 の蓄積が観察された (Fig.4A)。さらに、無症候性キャリアの PBMC に

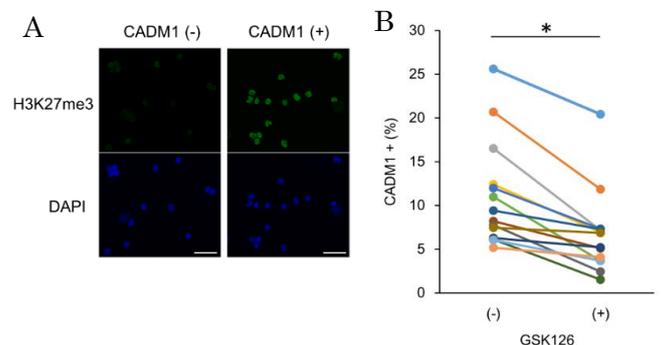
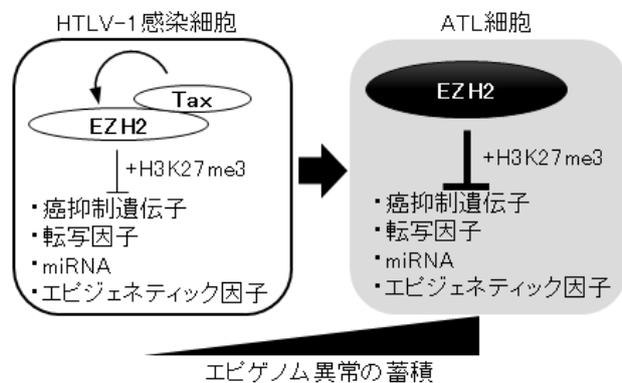


Fig.4 (A) HTLV-1 無症候性キャリアの末梢血由来 CD4 陽性 T 細胞を、細胞表面の CADM1 陽性/陰性に分取し、H3K27me3 の抗体を用いて免疫染色を行った (スケールバー=20 μ m)。HTLV-1 無症候性キャリアの末梢血由来単核球を 5 μ M の GSK126 存在下で 9 日間培養し、CD4 陽性中の CADM1 陽性率を測定した (n = 14; *, P < .05)

EZH2 阻害剤 GSK126 を処理すると、CADM1 陽性率が低下し、EZH2 の阻害により選択的に HTLV-1 感染細胞に細胞死を誘導できる可能性が示された (Fig.4B)。

<考察> 本研究により、ATL において、PRC2 によるエピゲノムの異常が大規模に遺伝子発現を攪乱していることが示唆された。EZH2 阻害剤の処理により ATL 患者検体に対しアポトーシスを誘導できることが先行研究により示されている。今回、EZH2 の阻害により無症候性キャリア中の CADM1 陽性細胞率が低下したことから、HTLV-1 感染細胞を選択的に体内から排除し、ATL の発症を予防する治療への応用可能性が期待できる。



エピジェネティックに抑制を受ける遺伝子群は病型の進行とともに発現が低下していたこと、また、抑制の強さと予後不良因子には相関が見られ、予後の悪さとも傾向が見られていることから、PRC2 依存的なエピゲノムの異常が ATL の病態に大きく影響していることが示唆され、EZH2 の分子標的としての重要性が示された。

・ATL での H3K27me3 の蓄積は転写開始点より上流 1~4kb 付近に有意に起こっていた。この領域は一般的に転写因子の結合箇所が多いため、この領域へのメチル化の蓄積は転写因子の結合を妨げ、発現抑制へとつながると予想される。また、プロモーター領域に CpG サイトを持つ遺伝子の方が H3K27me3 の蓄積が顕著に見られたことから、DNA のメチル化と H3K27me3 が関連する可能性が示唆された。

・HTLV-1 タンパク質 Tax が宿主細胞のエピゲノムを攪乱し、ATL 様なエピゲノムの異常を誘導した。ATL 細胞と Tax 導入細胞での H3K27me3 の増加した領域が一致することから、Tax が H3K27me3 の蓄積部位の決定に関与する可能性が示された。HTLV-1 感染細胞において、クロマチン上の Tax の蓄積が高い遺伝子群は、H3K27me3 の蓄積も高いという結果が得られている。先行研究により Tax が EZH2 と結合することがわかっており、Tax が EZH2 との結合を介して、その局在を変化させ、それが結果として ES 細胞や B 細胞リンパ腫とは異なる H3K27me3 の分布をもたらすのかもしれない。

・エピゲノム異常は広範に作用しうる。H3K27me3 の変化が半数以上の遺伝子上に起こっており、多くの遺伝子発現変化に関与している可能性が示唆された。さらに、転写因子、miRNA という複数の標的に作用しうる遺伝子群が抑制されていたことは、PRC2 が直接的に制御するだけでなく、間接的に遺伝子発現を制御するという、エピゲノム異常の広がり性を示唆している。