

論文の内容の要旨

論文題目 RUNX1関連キメラ蛋白質とポリコーム複合体による
協調的転写調節機構

氏名 藤岡 洋成

エピジェネティクスは、DNA塩基配列の変化を伴うことなく、後天的なクロマチン修飾により遺伝子発現の多様性が生じる仕組みを指す。エピジェネティクスは、ゲノム上の多数の遺伝子のON/OFFを制御することで、発生から再生、老化、がん化、遺伝にいたる様々な生命現象を制御する高次元のシステムと言える。エピジェネティック制御因子はヒストン修飾、DNAメチル化、miRNAなどを介して遺伝子発現を時間的・空間的に制御し、細胞分裂後も遺伝子発現を正確に継承する働きをもつ。この中でヒストンはメチル化、アセチル化、ユビキチン化、リン酸化など多様な修飾を受けてクロマチンの高次構造を決定し、転写制御を行う。特異的なヒストン修飾を担う様々な因子がこれまでに同定されているが、中でもポリコーム群(PcG)複合体はその代表例である。PcG複合体は数十個ものタンパク質から成り、生化学的にはさらに2つの複合体に大別される(Polycomb repressive complex [PRC] 1およびPRC2)。PRC2はヒストンテールのメチル化(ヒストン3リジン27; H3K27)を、PRC1はヒストンテールのユビキチン化(ヒストン2Aリジン119; H2AK119)を介してクロマチン高次構造を変換し、数百を越える標的遺伝子の発現を抑制し、あるいはいくつかの主要なシグナルの制御に関与することが知られている。EZH2は、SUZ12、EED、RBBP4(RbAp48)などとともにPRC2に属し、H3K27のメチル化活

性を有するとともに、DNA メチル化酵素 (DNA methyltransferase ; DNMT) をリクルートして DNA メチル化も誘導する分子である。一方、RING2 は BMI1 などとともに PRC1 に分類され、E3 ligase として H2AK119 のユビキチン化を担当する。近年、がんとエピゲノム異常をめぐる研究成果は確実に積み上げられ、造血器腫瘍の病態にエピジェネティクス異常が深く関与することが明らかになってきた。7 番染色体およびその長腕の欠失 (-7, 7q-) は急性骨髄性白血病 (AML) や骨髄異形成症候群 (MDS) で見られ、予後不良と関連することが以前から報告されていたが、その特異的標的遺伝子については知られていなかった。2008 年から 2009 年にかけて、7 番染色体長腕の acquired uniparental disomy (aUPD) が MDS や骨髄増殖性疾患 (MPN) に認められることが報告され、2010 年になり、その標的遺伝子の一つとして 7 番染色体長腕 7q36.1 に位置する EZH2 の変異が複数のグループにより同定された。これらの報告はいずれも高解像度 SNP アレイにより 7q36 を含む領域の aUPD や microdeletion を解析した結果、EZH2 に注目し、DNA resequence によって EZH2 のフレームシフトやナンセンス変異、ミスセンス変異の同定に至っている。Ernst らによれば、このような EZH2 の変異は MDS の 6% (9 例/154 例)、MDS/MPN の 12% (27 例/219 例)、MPN の 6% (5 例/90 例) に認められた。また、慢性好酸球性白血病にも少数の変異が認められたが、一方で-7/7q-を伴う AML (54 例) や慢性骨髄性白血病 (CML) (40 例) には EZH2 の変異が認められなかった。Nikoloski らも同様に MDS の 6% (8 例/126 例) に EZH2 の変異を同定した。続いて Makishima らも UPD7q や 7q36.1 の microdeletion を伴う MDS、MDS/MPN、まれに AML に EZH2 の変異が見られることを報告している。上記の報告で認められた EZH2 変異はヒストン修飾に必要な CXC-SET ドメインや、SUZ12 など他のポリコームタンパク質との結合に必要なドメイン II に多く認められる傾向があった。実際に *in vitro* での機能アッセイにより、いくつかの EZH2 変異体は H3K27 のメチル化能が低下することが示されており、骨髄球系腫瘍にみられる EZH2 の変異は機能欠失型変異と考えられている。一方で、EZH2 ががん遺伝子として働く例もいくつか報告されている。Morin らによれば、EZH2 の機能亢進型変異が、胚中心 B 細胞型のびまん性大細胞型リンパ腫 (DLBCL) の 22% に、濾胞性リンパ腫 (FL) の 7% にそれぞれ見いだされた。EZH2 は胚中心 B 細胞の免疫グロブリン H 鎖遺伝子再構成を伴う早期発達に必須の遺伝子であることが知られており、EZH2 の機能異常がリンパ球系腫瘍の病態形成にも関与する可能性が示唆される。DLBCL および FL にみられる EZH2 変異は骨髄球系腫瘍と異なり、Tyr641 の点突然変異に局限する。さらに、PcG 複合体が正常の発現・機能を保っていても、染色体転座などによりがんの病態の鍵となるような異常産物、転写因子が生じ、それらが PcG 複合体をリクルートすることで、がん抑制遺伝子などの発現を異常に抑制する例がある。例として、融合遺伝子 PML/RAR α 、PLZF/RAR α や白血病がん遺伝子 Evi1 の過剰発現などが挙げられる。また、前立腺がんで頻繁にみられる TMPRSS2/ERG 融合タンパクは EZH2 の発現を誘導する。これらの文脈では EZH2 はがん遺伝子としての機能をもつと考えられ、上述の骨髄球系腫瘍における EZH2 の働きとは相反する。上記のことから、正常細胞やがん細胞において、EZH2 をはじめとするエピジェネティック制御因子は時間的・空間的に多様な、ときに相反するような機能を発揮していることを示唆し、エピジェネティクスによる精緻な制御バランス

の崩壊ががん化につながりうることを表している。私が所属する研究室でも、PcG が Evi1 と結合してその標的遺伝子 PTEN の発現をエピジェネティックに制御すること、染色体転座 t(8;21) により生じるキメラ蛋白質 AML1/ETO が PcG に結合することをこれまでに見出したが、特に後者の意義については研究が進んでいない。また、慢性骨髄性白血病の急性転化症例や MDS にみられる染色体転座 t(3;21) によって生じる AML1/Evi1 も、同様にして PcG と結合することが予想される。これらのことから、私は AML1 関連白血病と PcG 複合体との関係について研究を進めることとした。今回私は、AML1/ETO および AML1/Evi1 と PcG 複合体との結合をもとに、これらのキメラ遺伝子が PcG 複合体と協調してエピジェネティックな制御を介して転写を制御する標的遺伝子の同定を試みた。その結果、AML1 の標的遺伝子として知られている 11 の候補遺伝子の中から IEX1 (the immediate early gene X-1) を転写制御を受ける可能性のある候補として同定した。この IEX1 は別名として、IER3 (immediate early response gene 3) とも呼ばれるストレス誘導遺伝子であり、放射線照射、成長因子、ウイルス感染、炎症性サイトカインなどにより発現が惹起され、細胞周期やアポトーシスの調節に関与している。IEX1 は TNF および Fas に代表される様々なアポトーシス誘発因子により誘導されるアポトーシスに対して NF- κ B シグナルを介して細胞抵抗性に重要な役割を果たすことやあるいくつかの細胞株において細胞周期進行を加速することが報告されている。ただし、その発現は癌種によって、様々な報告があり、固形癌では膵臓癌や乳癌で高発現が認められている一方で、ハイリスクの直腸癌では低下が認められる。血液腫瘍領域においても同様に、多発性骨髄腫ではその発現が上昇しているという報告がある一方で、初期の MDS において発現の低下が認められるという報告も存在する。このように IEX1 は発癌との関連に対して、論議の分かれる遺伝子であるが、上記の私の検討では AML1/ETO あるいは AML1/Evi1 はともに PcG と協調して IEX1 の発現を負に制御していることが示唆された、AML1/ETO あるいは AML1/Evi1 発現骨髄細胞においては IEX1 ががん抑制遺伝子として機能している可能性が考えられる。今後は造血器における IEX1 の発現と造腫瘍性との関係について、主に細胞周期やアポトーシスへの影響をもって評価する必要があると考えられる。今回、候補に選択した 11 の標的遺伝子に関しては、いずれも AML1、AML1/ETO あるいは AML1/Evi1 による直接の制御が知られている遺伝子である。これらの標的遺伝子の転写は、いずれも AML1 あるいはキメラ蛋白質がその Runt ドメインを介して PEBP2 サイトに結合して制御していると考えられる。しかし、それらの制御で EZH2 が関わる標的遺伝子は IEX1 のみであった。AML1 あるいはキメラ蛋白質による標的遺伝子制御には、PcG 複合体以外にも複数の結合タンパク質が関与する。CBF β は AML1 の DNA 結合領域に結合し、AML1 の安定化と DNA 結合能を強化する。また、p300 と CBP はヒストンアセチル化を介して AML1 の標的遺伝子の発現を誘導する。一方で、転写抑制因子である mSin3A も AML1 と結合し、AML1 の安定化と標的遺伝子の発現抑制に関与するが、MAP キナーゼの一つである ERK により AML1 がリン酸化されると、AML1 と mSin3A は解離する。AML1/ETO は DNA 結合能を保持し、野生型 AML1 に対して dominant negative に働く。AML1/ETO は C 末端側の転写活性化ドメインなどを欠損し、代わりに ETO 部分が転写抑制因子である N-CoR、HDAC、mSin3A などと結合することにより、正常 AML1

が転写を活性化する遺伝子の発現を異常に抑制する。AML1/ETO と PcG 複合体が結合することから、PcG 複合体は N-CoR、HDAC や mSin3A などとともに AML1/ETO による dominant negative な転写制御に関わる複合体を形成する可能性が考えられたが、複数の標的遺伝子が PcG 複合体により制御されるわけではなく、IEX1 のみがその関与を示した。したがって AML1/ETO による転写抑制機構には標的遺伝子ごとに異なるエピジェネティック制御因子複合体に関わる可能性が示唆された。この観点から、AML1/ETO と PcG 複合体の協調によって制御される標的遺伝子は、N-CoR、HDAC や mSin3A などとは異なる context で制御される可能性が考えられる。同時に、既知の標的遺伝子以外にも AML1 やそのキメラ遺伝子と PcG 複合体により制御される標的遺伝子が存在する可能性がある。IEX1 の AML1 関連標的遺伝子の中での位置づけは不明であるが、AML1 関連造血器腫瘍の発症におけるその意義についてはさらに検討が必要である。AML1 関連造血器腫瘍における治療標的としての PcG 複合体に意義について、現時点での結論は早急であるが、すでに腫瘍発症に関わることが示されている p19Arf などの制御には関わらないことから、PcG 複合体の抑制による抗腫瘍効果が十分に得られない可能性がある。近年、PcG 複合体、あるいは EZH2 の働きを抑制する阻害剤が複数報告されており、いずれも造血器腫瘍に対する抗腫瘍効果が注目されているが、例えば AML でも subtype によって治療効果が異なるのは、subtype ごとに異なる標的遺伝子の転写制御に関わっていることが一つの理由として考えられる。AML1 関連造血器腫瘍における PcG 複合体の標的については上記のように解析が現時点では不十分であるが、IEX1 をはじめとする AML1 関連キメラ蛋白質と PcG 複合体の共通標的のうち、造腫瘍性に関わる鍵分子が存在すれば、PcG 複合体の AML1 関連造血器腫瘍における治療標的としての意義も深まる。