

論文題目 MLL 関連白血病に対するポリコーム群複合体阻害剤の腫瘍抑制効果と作用機序に関する研究  
植田航希

## 要旨

ヒストンアセチル化・脱アセチル化、ヒストンメチル化・脱メチル化は、急性白血病の発症に深く関与していることが解明されつつある。しかし、ヒストンメチル化を標的とした薬剤は臨床応用されていない。私は、トリメチル化されることで遺伝子発現を抑制する方向に働くヒストンH3リジン27のメチル化酵素であるEZH2に注目した。EZH2はSUZ12・EEDとポリコーム群複合体2(PRC2)を構成し、ヒストンH3リジン27をトリメチル化すると同時に、PRC1の構成要素であるBmi1などの分子をリクルートすることで、標的遺伝子の発現低下を引き起こす。EZH2によってヒストンH3リジン27のトリメチル化(H3K27Me3)が過剰に生じた場合、がん抑制遺伝子の発現低下を介して、悪性腫瘍の病勢が加速すると考えられている。EZH2の阻害剤としては、NCIの化合物スクリーニングによって発見された

3-deazaneplanocinA(DZNep)が知られている。これまで、急性骨髄性白血病に対するDZNepの効果を解析した報告が二報存在するが、生体内での作用機序は十分に解析されていない。私は、白血病マウスモデル生体内へのDZNepの投与とshort hairpin RNA(shRNA)を用いた解析を行い、Mixed Lineage Leukemia(MLL)関連白血病におけるポリコーム群複合体の役割を検討した。急性白血病には様々な病型が存在するが、染色体上の11q23に存在するMLL遺伝子の変異や転座を有するMLL関連白血病は、予後不良な一群として知られている。私は、このMLL遺伝子の転座を有する白血病細胞株においてDZNepによる増殖抑制効果が高いことを見出し、主にMLL関連白血病におけるDZNepの作用について、解析を行うこととした。

様々なヒト白血病細胞株を、DZNepを各濃度で添加した培地上で72時間培養したところ、MLL遺伝子の転座を持つMV4-11・THP1・MOLM13の各細胞株は、他の細胞株と比較して低濃度で増殖が阻害され、高濃度においてはほぼ死滅することが示された。また、マウス骨髄細胞にレトロウイルスを用いて白血病原性遺伝子を感染させた実験系においても、MLL転座を含む融合遺伝子を感染させた細胞は、正常マウス骨髄細胞やAML1/ETOを感染させた細胞と比較して、より低濃度のDZNepで増殖を阻害されることが示された。マウスのMLL/AF9白血病細胞を、DZNepを各濃度で添加した液体培地で24時間培養すると、H3K27Me3は著しく阻害された。しかし、EZH2の発現低下は、統計学的には有意であったものの20%程度であり、DZNepの効果はEZH2を転写レベルで抑制することによるものではないことが示唆された。また、既報のように、Hoxa9・Meis1の発現が低下し、p16・p19・p21・p27・FBXO32といったアポトーシスやsenescence、細胞分化に関与する遺伝子の発現が濃度依存性に増加した。一方で、p53・CyclinE・CEBP $\alpha$ などの、一般にアポトーシスや細胞分化に重要と考えられる遺伝子の転写レベルでの発現には変化がなく、白血病細胞において転写レベルで発現が上昇すると報告されているTXNIPについても、10 $\mu$ Mの高濃度を

添加した場合のみ発現上昇がみられた。また、フローサイトメトリーを用いた解析にてアポトーシスを誘導されている細胞が多いことが示された。

In vivo での DZNep の抗白血病作用の検証のため、MLL/AF9 白血病細胞を二次移植したマウスに対して、2 $\mu$ g/g(body weight)の DZNep を週三回腹腔内投与したところ、MLL/AF9 白血病モデルにおいて、生存期間の延長がみられた。生存解析に使用したものは別に、白血病を発症した時点で解剖して解析した白血病マウスの骨髄細胞では、ヒストン H3K27Me3 が阻害されていた。また、MLL/AF9 腫瘍蛋白を発現している細胞である GFP 陽性細胞のみを用いてコロニーアッセイを行ったところ、DZNep 投与群より採取した白血病細胞のコロニー形成能がコントロール群に有意に劣った。また、フローサイトメトリー解析において、GFP は両群ともほぼすべての細胞で陽性であったが、DZNep 投与群の GFP 陽性細胞中の LGMP の割合は有意に少なかった。マウス MLL 関連白血病の腫瘍細胞における lineage- $\cdot$  Sca1- $\cdot$  cKit+ $\cdot$  CD34+ $\cdot$  CD16/32+分画である LGMP には、leukemia initiating cell が濃縮されていることが知られており、LGMP の減少とコロニー形成能の低下は、DZNep の投与によって白血病細胞の総数が減少しているだけではなく、白血病幹細胞が減少していることを示唆している。また、骨髄 GFP 陽性細胞の qRT-PCR における遺伝子発現は、in vitro の実験よりも変化に乏しく、変化する傾向があった遺伝子は Hoxa9 の発現低下、p16 の発現上昇のみであった。LGMP のみで遺伝子発現変化を検討しても同様の傾向を示したが、いずれも個体間のばらつきが大きく、統計学的有意差は得られなかった。DZNep が白血病幹細胞分画に作用していることを裏付けるため、LGMP のみを二次移植したところ、やはり DZNep の投与で生存期間の延長や cKit の発現低下、LGMP 分画の減少が得られた。一方、TEL/PDGF  $\beta$  R-IRES-AML1/ETO(TPAE)白血病の二次移植モデルでは、DZNep の投与によって生存期間の延長は得られなかった。

前述のように、DZNep は EZH2 のみを特異的に機能抑制するわけではない。このため私は、MLL 関連白血病細胞に対して shRNA による EZH2 のノックダウンを行い、DZNep 投与と同様の反応が起こるか否か検討し、アポトーシス・細胞分化関連遺伝子の発現比較を行った。二種類の shRNA(shEZH2-1 および shEZH2-2)を作成したが、shEZH2-1 の方が、より強力に EZH2 の発現をノックダウンできた。shEZH2-1 では H3K27Me3 も抑制していたが、shEZH2-2 では、H3K27Me3 を抑制するには効果不十分であった。In vitro で培養した MLL/AF9 白血病細胞でのアポトーシス解析では、shEZH2-1 において、コントロールよりアポトーシスが亢進していた。また、コロニーアッセイで、shEZH2-1 のコロニー数が減少した。遺伝子発現については、shEZH2-2 はコントロールと大きな差が出なかったが、EZH2 を強く抑制している shEZH2-1 では、p16 の発現が上昇した。p19,p21,p27 などに関しては、DZNep 投与と異なり、発現が変わらないか低下する傾向がみられた。同様に shEZH2-1 を、E2A/HLF 不死化細胞および正常マウス骨髄由来 cKit 陽性細胞に感染させた場合、コロニーあたりの細胞数が 25-50%に減少するものの、コロニーの数には大きな変化が見られなかった。しかし、p16 の発現上昇はこれらの細胞でもみられた。

同じ配列の shRNA を、pSIREN ZsGreen のベクターに挿入して MLL/ENL 白血病細胞に感染し、ZsGreen 陽性細胞をソーティングした後、二次移植した。shEZH2-1 を感染させたマ

ウスはコントロール群と比較して大幅に生存が延長したのに対して、H3K27Me3 を抑制できない shEZH2-2 ではほとんど生存が延長しなかった。shEZH2-1 は、in vivo でも H3K27Me3 の減少を起していた。また、移植後 day23 での ZsGreen のキメリズムを比較すると、shEZH2-1 ではコントロールよりも大幅に低く、EZH2 が抑制された白血病細胞は、生着はしているものの、増殖が抑制されていることがわかった。また、白血病マウスより採取した ZsGreen 陽性細胞のコロニーアッセイでは、shEZH2-1 において、有意にコロニーが少なかった。フローサイトメトリーによる LGMP の定量でも、ZsGreen 陽性細胞中に占める LGMP の割合は shEZH2-1 で明らかに少なく、EZH2 のノックダウンによって、白血病幹細胞が減少していることが示唆された。各種遺伝子発現量は、機能的に有効であった shEZH2-1 とコントロールを比較したが、ZsGreen 陽性細胞全体でも LGMP 分画でも p16 が上昇する傾向を示しており、EZH2 の機能阻害によって p16 の発現上昇が生じることが、MLL 関連白血病に対する抗腫瘍効果の本態であることが予想された。

p16 に対する shRNA を感染させた MLL/ENL 白血病細胞を二次移植すると、DZNep 投与によって生存期間は延長しなかった。また、EZH2 と p16 に対する shRNA を MLL/ENL 不死化細胞に同時に感染させると、p16 をノックダウンしていない場合は shEZH2 によって大幅にコロニー数が減少するのに対して、コロニーの減少は 50%程度に抑制された。

MLL 関連白血病において最も EZH2 の抑制が有効である理由は現時点では未解明である。PRC2 のコンポーネントと、MLL 融合蛋白が直接結合する可能性を免疫沈降にて検討したが、タンパクレベルでの直接結合は示されなかった。また、クロマチン免疫沈降にて、p16 プロモーター領域の H3K27 のメチル化状態は、大きな差がなかった。また、p16 の遺伝子発現上昇は、EZH2 抑制による増殖抑制効果が弱い E2A/HLF 不死化細胞や正常 cKit 陽性細胞でも生じているため、現時点での仮説は、EZH2 の抑制によって何らかの機序で p16 の発現が上昇し、p16 の上昇に対する感受性が強い MLL 関連白血病が最も増殖を抑制されやすい、というものである。この仮説を証明するための実験は現在施行中である。

私の実験から、DZNep の白血病増殖抑制機序の本態は EZH2 の阻害作用であり、p16 の上昇が鍵になっている可能性が高いことが示された。現時点で結果が出ていない上記のような点も含め、更に DZNep の作用機序を明らかにしていくと同時に、より特異性の高い EZH2 阻害剤を開発することが、ヒストンメチル化阻害剤の臨床応用に向けて重要であると考えられる。