

論 文 要 旨

**The knock-down of overexpressed EZH2 and BMI-1
does not prevent osteosarcoma growth**

ポリコーム蛋白である EZH2、BMI-1
ノックダウンは骨肉腫細胞の増殖には関与しない

佐々木裕美

【序論および目的】

エピジェネティック機構の異常はヒストンのメチル化、アセチル化等を介した遺伝子の発現抑制を行い、癌の発生・進展に重要な役割を果たしている。Polycomb 蛋白はエピジェネティックを制御する重要な因子であり、核内で複数のポリコーム蛋白による複合体(polycomb repressive complex:PRC)を形成してその機能を発揮している。そのメンバーである EZH2 はヒストン H3K27 のメチル化に関与する。また、BMI-1 は INK4/ARF の発現を抑制することで p53 経路、Rb 経路を不活性化し、癌化を促進していることが報告されている。しかし、ヒト骨肉腫におけるポリコーム蛋白の機能はいまだ不明である。そこで我々はヒト骨肉腫の発生におけるポリコーム蛋白の発現量の変化を検討し、その機能を解析した。

【材料および方法】

骨肉腫細胞株 (143B、HOS、Saos2、NOS-1)、骨肉腫患者検体における Polycomb group 蛋白 (PcGs) 遺伝子 (EZH2、BMI-1) の発現を確認するため real-time PCR を行った。また、蛋白レベルでの発現を確認するために免疫染色を行った。また、ヒストン H3-K27 のトリメチル化を評価するため骨肉腫細胞株、骨肉腫患者検体にて免疫染色を行った。また、Polycomb group 蛋白の機能を評価するために EZH2、BMI-1 を shRNA を用いてノックダウンすることにより骨肉腫細胞の増殖能に関する機能を in vitro、in vivo において検討した。

【結 果】

遺伝子レベルでの発現を確認するため、real-time PCR を行ったが、骨肉腫細胞株 (143B、HOS、Saos2)、骨肉腫患者検体において EZH2、BMI-1 の発現は正常骨芽細胞、正常骨髄と比較し亢進していた。また、蛋白レベルでの発現を確認するため免疫染色を行ったが、骨肉腫細胞株、骨肉腫患者検体においては正常骨芽細胞、正常骨髄と比較し EZH2 蛋白、BMI-1 蛋白、ヒストン H3-K27 蛋白の発現の亢進を認めた。これらの結果より、骨肉腫細胞株・骨肉腫患者検体においては EZH2、BMI-1 の発現が亢進しておりヒストン H3-K27 のトリメチル化も亢進していることが分かった。次に、ShRNA を用いて EZH2、BMI-1 をノックダウンし、cell proliferation assay を行い、EZH2、BMI-1 ノックダウンにおける腫瘍増殖抑制効果を検討した。EZH2、BMI-2 ノックダウンによって腫瘍細胞の増殖は抑制できなかった。

た。また EZH2、BMI-1 をノックダウンした細胞をヌードマウスの皮下に移植したが *in vivo* においても腫瘍増殖抑制効果は認められなかった。

【結論及び考察】

これまで様々な悪性腫瘍において、EZH2 発現と予後や悪性度との関連を調べた報告が散見される。本研究では、悪性骨腫瘍である骨肉腫においてポリコーム蛋白である EZH2、BMI-1 の発現について検討し、EZH2、BMI-1 の発現を抑制することで腫瘍細胞増殖抑制効果があるかを検討した。骨肉腫細胞株・臨床検体いずれにおいても EZH2、BMI-1 の強発現を認めヒストン H3-K27 の発現亢進を認めたことより EZH2 は機能していることが推察されるが、EZH2、BMI-1 ノックダウンによる腫瘍細胞増殖抑制効果は認められなかった。McGarvey らは EZH2 を knock down することでメチル化が低い部分の遺伝子の発現は誘導するが、高メチル化により発現が抑制されている遺伝子の発現を誘導することはできないと報告している。骨肉腫においてはこのようなメカニズムが働いている可能性があると考えられた。Steele らは BMI-1 と EZH2 を高発現している患者の血液中に BMI-1 と EZH2 に対する T 細胞の免疫反応を認め、T 細胞は EZH2 と BMI-1 の抗原刺激に対して *INF- γ* の発現を誘導すると報告している。これまでの報告と異なり、EZH2 と BMI-1 のノックダウンによる骨肉腫増殖抑制は認めなかった。骨肉腫における EZH2 と BMI-1 の機能については今後更なる研究が必要である。

(Oncology Reports 23:677-684, 2010 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 214 号		学位申請者	佐々木 裕美
審査委員	主査	河野 嘉文	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	夏越 祥次	副査	古川 龍彦
	副査	小賤健一郎	副査	岸田 昭世

The knock-down of overexpressed EZH2 and BMI-1 does not prevent osteosarcoma growth

ポリコーム蛋白質をコードする EZH2、BMI-1 遺伝子の

ノックダウンは骨肉腫細胞の増殖を抑制しない

エピジェネティック機構の異常はヒストンのメチル化、アセチル化等を介した遺伝子の発現抑制を行い、癌の発生や進展に重要な役割を果たしている。ポリコーム蛋白質 (PcGs 蛋白質) はエピジェネティックを制御する重要な因子であり、核内で複数のポリコーム蛋白質による複合体(polycomb repressive complex:PRC)を形成してその機能を発揮している。EZH2、BMI-1 は代表的なポリコーム蛋白質である。EZH2 はヒストン H3K27 をメチル化し遺伝子発現を制御しており、BMI-1 は INK4/ARF の発現を抑制することで p53 経路、Rb 経路を不活性化し、癌化を促進していることが報告されている。しかし、ヒト骨肉腫におけるポリコーム蛋白質の機能は未だに不明である。そこで、申請者らはヒト骨肉腫における EZH2、BMI-1 の発現量の変化を検討し、その機能を解析した。

骨肉腫細胞株 (143B、HOS、Saos2、NOS-1) と、骨肉腫患者検体における PcG 蛋白質遺伝子 (EZH2、BMI-1) の発現を確認するため RT-PCR を行った。また、蛋白レベルでの発現を確認するために免疫染色を行った。また、ヒストン H3-K27 のトリメチル化を評価するため骨肉腫細胞株 (143B)、骨肉腫患者検体 (1 例) にて免疫染色を行った。EZH2、BMI-1 を shRNA を用いてノックダウンすることにより骨肉腫細胞の増殖能に関する機能を in vitro、in vivo において検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかとなった。

- 1) 骨肉腫細胞株 (143B、HOS、NOS-1) と、骨肉腫患者検体 3 例では正常骨芽細胞、正常骨髄と比較して、遺伝子レベルでも蛋白質レベルでも EZH2、BMI-1 の発現が亢進しており、またトリメチル化ヒストン H3-K27 蛋白の染色性も亢進していた。
- 2) 143B、HOS 細胞において shRNA を用いて EZH2、BMI-1 をノックダウンし、cell proliferation assay を行ったが、腫瘍細胞の増殖は抑制できなかった。
- 3) EZH2、BMI-1 をノックダウンした 143B 細胞をヌードマウスの皮下に移植し観察したが in vivo においても腫瘍増殖抑制効果は認められなかった。

今回、骨肉腫細胞株・臨床検体いずれにおいても遺伝子レベル・蛋白レベルでも EZH2、BMI-1 の発現亢進とトリメチル化ヒストン H3-K27 の発現亢進を証明した。しかし、EZH2、BMI-1 ノックダウンによる腫瘍細胞増殖抑制効果は認められなかった。EZH2、BMI-1 のノックダウンでは高メチル化された遺伝子発現の誘導には至らないとする論文もあり、骨肉腫においてはこのようなメカニズムが働いている可能性があると考えられた。一方、本研究で骨肉腫において EZH2、BMI-1 の発現亢進とトリメチル化ヒストン H3-K27 の発現亢進というエピジェネティックな変化が起きていることが明らかにされた。すでに EZH2、BMI-1 の抗原刺激に対して INF- γ の発現誘導が報告されており、申請者らはこれらの遺伝子が骨肉腫における免疫療法のターゲットとなりうる可能性を否定するものではないと考えている。

以上のように、従来解明されていなかった骨肉腫における EZH2 と BMI-1 の役割を検討した本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 214 号		学位申請者	佐々木 裕美
審査委員	主査	河野 嘉文	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	夏越 祥次	副査	古川 龍彦
	副査	小賤健一郎	副査	岸田 昭世

主査および副査の5名は、平成24年9月6日、学位申請者 佐々木裕美 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) いくつかの cell line を使用しているがその特徴はなにか。

回答) 143B は P53 の変異、Saos2 では P53 の欠損が報告されている。

質問2) cell line の特徴と今回の結果のとの因果関係はあるのか。

回答) P53 についての検討は行っていないので不明である。

質問3) 骨肉腫患者における EZH2、BMI-1 と臨床的な病理学的特徴や予後との関連についての報告はあるのか。

回答) ほかの悪性腫瘍では報告があるが、骨肉腫ではない。

質問4) 他のがんではどのような報告があるのか。

回答) 乳がん・肝がん・前立腺がん・白血病などでは EZH2、BMI-1 の高発現が予後不良と関連するという報告がある。

質問5) BMI-1 はがん幹細胞のマーカーとして知られているが、今回の結果との関連はあるのか。

回答) 直接は関係ないと思われる。

質問6) 臨床応用は可能か。

回答) DNA メチル化は安定したエピジェネティクス修飾であるため、マーカーとしての有用性が高いといわれているが、骨肉腫においては現時点ではその有用性については不明である。

質問7) EZH2、BMI-1 の下流の遺伝子は何か。

回答) EZH2 は c-myc、cyclin D1 の転写調節を、BMI-1 は ink4a をそれぞれ抑制するという報告がある。

質問8) EZH2、BMI-1 ノックダウンした時のそれらの下流の遺伝子の発現変化はみているか。

回答) 今回は検討していない。

質問9) EZH2、BMI-1 を shRNA でノックダウンし、MTT assay を行っているが、EZH2、BMI-1 の蛋白量が減少していることを確認しているか。

回答) 今回は、real-time PCR で mRNA レベルでしか検討していない。

質問10) 一般的な in vivo での転移能の評価方法はどのようなものがあるのか。

回答) GFP を導入した骨肉腫細胞株をヌードマウスの膝関節内に注射し、肺転移モデルマウスを作製した。一定期間観察後犠死せしめて肺を摘出し、イメージングにて転移巣の大きさと個数を計測している。

最終試験の結果の要旨

質問 11) Fig. 2 で H3K27 トリメチル化は、EZH2 あるいは BMI-1 が発現している細胞内の局在と一致しているのか。

回答) 2 つとも核内に発現していると思われるが、同時に染色していないので、今回は評価は困難であると思われる。

質問 12) Fig. 2 で正常組織では細胞質が染色され、腫瘍組織では核が強く染色されているが、細胞質から核内への移行についての報告があるのか。

EZH2、BMI-1 については核内移行に関する報告はないが、今後検討していきたい。

質問 13) EZH2、BMI-1 は協調して働くのではなく、それぞれ働くのか。

EZH2 や BMI-1 はポリコーム蛋白質と呼ばれ、協調して働くことでヒストン H3K27 をメチル化することが知られているが、それぞれに下流遺伝子が存在し、独立して働くこともある。

質問 14) EZH2、BMI-1 を shRNA を用いてノックダウンしているが、ノックダウン後 H3K27 のトリメチル化も抑制されていることを確認しているか。

回答) 今回は検討していない。

質問 15) Fig. 3 のグラフで SD bar がない理由はなにか。

回答) MTT assay は 3 回ずつ施行し、その平均をとっているため、SD bar を入れるべきであった。

質問 16) Fig. 2 で cell line と臨床検体で免疫染色を行っているが、臨床検体の方が腫瘍と正常の差が明瞭 (cell line では正常でも淡い染色) な結果となっている。原因は。

回答) 培養細胞は例え初代培養であっても微小環境が再現できないので、完全に今回の現象の正確な原因は分からないが、蛋白量については定量できていないので、western blotting でも検討すべきであった。

質問 17) ノックダウンの細胞株の作製方法はどのようなものか。

回答) 骨肉腫細胞株に shRNA をトランスフェクション後に抗生物質で選択した後、シングルコロニーをピックアップして複数の細胞株を樹立し、その中から最もノックダウン効率が高かった細胞株 1 株を本実験に使用して検討した。

質問 18) その際のノックダウン効率の確認方法はどのようなものか。

回答) mRNA の発現を real-time PCR で確認したが、蛋白レベルでのノックダウンも確認すべきであった。

質問 19) shRNA にてノックダウンを行っているが、ノックダウン効率の調節は可能であるのか。

回答) shRNA の導入方法や、試薬・DNA の量等で変化するが、効率の調整はほとんどできない。

質問 20) 今回行った EZH2、BMI-1 以外の組み合わせでの実験系はありうるのか。

回答) PRC1 は 4 つ、PRC2 は 5 つのサブユニットから構成されるが、それぞれのグループで最も重要である遺伝子が EZH2、BMI-1 であり、最も研究が進んでいる遺伝子の組み合わせである。今回、EZH2 のコファクターである SUZ12 と EED についても同様の研究を行ったが、これら 2 つに加えて EZH2 をノックダウンしても増殖抑制効果は認められなかった。

質問 21) ノックアウトマウスを用いた研究であれば結果が変わった可能性はあるか。

回答) 可能性はあると考える。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。