

主論文の要旨

**Altered EZH2 splicing and expression is associated  
with impaired histone H3 lysine 27 tri-Methylation  
in myelodysplastic syndrome**

骨髄異形成症候群における EZH2 遺伝子の選択的スプライシングと  
発現の異常は、ヒストン H3K27 のトリメチル化の異常と関連する

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：清井 仁 教授)

白幡 瑞穂

## 【緒言】

骨髓異形成症候群 (MDS) は血球減少と急性白血病への移行という臨床的特徴をもつ、造血幹細胞における遺伝子異常蓄積を原因とする不均一な症候群である。最新のゲノム解析研究ではヒストンメチル化およびアセチル化酵素、DNA メチル化酵素などの、エピゲノム関連因子やスプライス関連因子の遺伝子変異の蓄積が確認されている。EZH2 (Enhancer of Zeste homolog 2) は PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) 複合体に含まれる、ヒストン (H3) リジン (K27) メチル化酵素で、標的遺伝子の H3K27 トリメチル化 (me<sub>3</sub>) を通して転写抑制に働くとされている。最近の報告ではスプライス関連因子 *SRSF2* の変異が *EZH2* の異常スプライスを誘導し、酵素活性を持たない C 端欠失 *EZH2* 蛋白が産生される可能性が示唆されている一方、悪性リンパ腫においては *EZH2* の機能獲得型変異が同定され、H3K27me<sub>3</sub> の亢進と病態の関連が推測されている。これらを背景に *EZH2* 発現の異常が MDS の病態と関連する可能性も推測されるが、MDS における *EZH2* 発現の詳細は未だ報告がない。本研究では MDS 患者検体を用いて *EZH2* 発現の詳細を解析した。

## 【対象及び方法】

2009 年 8 月から 2013 年 2 月に MDS と診断された患者 (N=26) と、健常人もしくは非骨髓性の血液疾患患者 (N=4) より得た骨髓検体より単核球を分離し、DNA, RNA, 蛋白を抽出した。*EZH2* の各部分を増幅するプライマー (Fig. 1A) を用いて RT-PCR を行い、*EZH2* の coding 領域の cDNA を作成し、pCR II-TOPO ベクターにクローニングし、Sanger 法にて遺伝子変異解析を行った。また同様の方法を用いて、*U2AF1*, *SRSF2*, *SF3B1* の変異集積部位についての変異解析を行った。UPN11, 26 については、target sequence を行った。また、single nuclear polymorphism (SNP) アレイ解析、G バンド法による染色体解析を行った。野生型および変異 *EZH2* を pcDNA4/HisMax TOPO 発現ベクターにクローニングして 293T 細胞に導入し、全長および C 端欠失 *EZH2* を強制発現させ、H3K27me<sub>3</sub> の発現を Western ブロット法で確認した。

## 【結果】

骨髓単核球由来全 RNA を用いて、酵素活性部位 (SET ドメイン) を含む *EZH2* コード領域の 3' 末端を RT-PCR 法にて半定量的に増幅し (*EZH2*-RT1: Fig. 1A)、mRNA の発現量を確認した (Fig. 1B)。評価可能であった 11 例では発現量に比較的大きな差を認め、より小さなサイズの転写産物も検出された。これらの発現と骨髓芽球比率とに有意な相関は確認できなかった。コントロール群では発現量が比較的低い傾向を認めた (Fig. 1B)。

MDS における既知の変異は機能喪失型変異であることから、今回確認された *EZH2* 高発現症例においては、機能喪失型の蛋白をコードする転写産物が蓄積している可能性が推測されたので、発現量の比較的高い 10 例で *EZH2* のコード領域全長について RT-PCR を行い、増幅産物をサブクローニングし、各症例につき約 10 クローンずつ変異解析を行った。転写産物の構造を Fig. 2A に示す。解析された全ての症例において挿入、

欠失が確認され、合計 48 通りのクローンを認めた。これらから翻訳される蛋白の構造の解析では、C 端の SET ドメインや蛋白-蛋白結合に重要な部位を欠失することが確認された (Fig. 2B)。既知のゲノム情報との比較から、挿入、欠失はスプライシングの異常により生じることが推測された (Fig. 3A)。SET ドメイン欠失クローンの割合は症例ごとに異なり、スプライス関連因子 (*SRSF2*, *U2AF1*, *SF3B1*) の変異との有意な相関は確認できなかった (Fig. 3B)。

スプライス関連因子の変異と転写産物のスプライス異常との関連性を検討するため、複数のプライマーセットを用いて RT-PCR で確認をした。5' 領域の増幅 (EZH2-RT2) では症例ごとに差を認めなかったが、蛋白結合領域を含む、より 3' 側の増幅 (EZH2-RT3, -RT4) では複数の転写産物が検出され、その量は *SRSF2* と *U2AF1* 変異症例で顕著である傾向が確認された (Fig. 4)。

全細胞溶解液を用いた Western ブロットでは、野生型に比べてサイズの小さな EZH2 蛋白を検出したが (Fig. 5 MDS10-25)、コントロール検体においては野生型 EZH2 として期待されるサイズの蛋白発現を確認した (Fig. 5 C1-C4)。また患者検体の殆どにおいて、H3K27me3 の発現は確認されなかった。

C 端欠失 EZH2 の発現が H3K27me3 に与える影響を確認するために、SET ドメインを欠失した EZH2  $\Delta$  SET, D2 ドメインより C 端を欠失した EZH2  $\Delta$  D2 を 293T 細胞に強制発現させ、内因性 H3K27 のトリメチル化の程度を Western ブロット法で確認した (Fig. 6A)。EZH2  $\Delta$  SET, EZH2  $\Delta$  D2 の発現に伴って、内因性 H3K27me3 の発現は用量依存的に低下し、野生型 EZH2 に対してドミナントネガティブに働くことが示唆された (Fig. 6B, 6C)。

## 【考察】

スプライス関連因子の変異などを原因とする異常 *EZH2* 転写産物は、C 端欠失 EZH2 の発現を誘導し、野生型 EZH2 に対して機能阻害を行うことで細胞内の H3K27me3 の程度を減少させることが示唆された。7q 欠失や *EZH2* 変異により野生型 EZH2 発現が低下することや酵素活性が阻害されることについては既に推測されてきたが、今回の検討ではスプライス異常による EZH2 の機能障害についても、MDS の病態形成に重要である可能性が新たに推測された。MDS で見られた主な欠失・挿入は殆どすべて GT-AG ルールのもと生じており、このことは異常な選択的スプライシングにより誘導された可能性を強く示唆すると考えられる。今回我々が同定したエクソン 9 と 10 の間の 82bp の挿入は、Kim らによる *SRSF2* 変異マウスの検討で検出された選択的エクソンと同等のものと考えられるが、今回の検討では多くの選択的エクソンの存在が示唆された。これらの転写産物の存在と、染色体異常やスプライス因子の変異との明確な関連性は確認できず、更なる検討が必要と考えられた。

今回の検討から、MDS 患者において、これまで考えられてきたよりも多い頻度で EZH2 機能の低下が起こっている可能性が推測された。特異な臨床像やアザシチジン治療への反応性などとの関連性については、今後の興味深い検討課題と考えられる。また今回は単一細胞ではなく骨髓細胞全体から RNA, 蛋白を抽出して解析を行ったが、今後

芽球をソートした細胞を用いることにより、さらに詳細に検討できる可能性がある。MDS 患者検体を用いて *EZH2* 発現を確認する研究は極めて限られており、本研究は *EZH2* のスプライス異常と MDS の病態との関わりを示唆する重要な情報を提供するものと考ええる。

**【結語】**

異常なスプライシングにより誘導される C 端欠失 *EZH2* 蛋白の発現は、MDS の病態に重要である可能性が示唆される。