

[要約]

PRC1.1 insufficiency accelerates the
progression of myelofibrosis
(PRC1.1 機能不全は、骨髄線維症
を著明に促進させる)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：田中 知明 教授)

篠田 大輔

[背景]

骨髄増殖性腫瘍(MPN)は主に慢性骨髄性白血病・真性多血症・骨髄線維症・本態性血小板血症の4種類の疾患から構成され、その中でも骨髄線維症 (PMF) は予後不良であることが知られている。PMFは、造血幹細胞に起こる遺伝子異常によって骨髄中で巨核球と顆粒球系細胞が増殖し、増殖した巨核球や単球から種々のサイトカインが産生され、骨髄の線維化や血管新生および骨硬化を引き起こすと考えられている。MPNのドライバー変異として *JAK2/MPL/CALR* の3種類の遺伝子変異が同定されているが、次世代シーケンサーによる網羅的解析によりMPN患者はepigenome因子やスプライシング調節因子の変異を有することが報告されている。特にPMFにはヒストン修飾異常の頻度が高く、*ASXL1* や *EZH2* の変異が報告されている。

Polycomb repressive complex (PRC) は主にPRC1とPRC2の2種類に大別され、標的遺伝子発現を抑制的にコントロールしているタンパク複合体である。PRC2はH3K27のトリメチル化に加えて、canonical PRC1をリクルートしてH2AK119のモノユビキチン化を介して標的遺伝子発現を制御している。一方で、PRC2非依存的に標的部位にリクルートされ、モノユビキチン化を起こすnon-canonical PRC1の機能が近年注目されている。*EZH2* はPRC2の一因子であり、PMFの約10%程度に変異が認められ、機能喪失型変異によりその標的遺伝子の発現が脱抑制される。*Ezh2* 欠失は *JAK2* 変異と協調してPMFを促進することが既報で示されている。PMFにおいてPRC1構成遺伝子の変異頻度はPRC2構成遺伝子の変異頻度に比べて低く、PMFの病態におけるPRC1の役割については十分には明らかにされていない。そこで我々は、non-canonical PRC1の一因子である *Pcgf1* を欠失させたマウスを用い、PRC1機能不全と *JAK2* 変異の協調作用について検証した。

[方法]

Pcgf1 欠損マウス、*JAK2V617F* マウス、並びにこれら2種類の遺伝子改変マウスをかけあわせたコンパウンドマウスを用いて、血液学的な表現系の観察、RNA シーケンス (RNA-seq)、並びにクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) を施行した。

[結果]

各CD45.2由来の野生型 (WT)、*JAK2* 変異マウス、*Pcgf1* 欠損マウス、及びコンパウンドマウスの骨髄細胞 5×10^6 個をドナー細胞として、致死量の放射線照射を行ったCD45.1由来のレシピエントマウスに移植した。生着後、タモキシフェン投与により造血細胞特異的に *Pcgf1* を欠損させ解析を行った。コンパウンドマウスでは貧血と著明な血小板減少症、および末梢血中の骨髄球系細胞の増加が認められた。また、コンパウンドマウスは優位な生存期間の短縮を示し、骨髄や脾臓では明らかな線維化の進行が認められた。以上の所見より、*Pcgf1* 欠損は *JAK2* 変異に伴うPMFを著明に促進することが示された。

WT、*JAK2* 変異マウス、*Pcgf1* 欠損マウス、コンパウンドマウスの骨髄を解析したところ、造血幹前駆細胞 ($c\text{-Kit}^+ \text{Sca-1}^- \text{Lineage}^-$, LSK) や巨核球赤芽球前駆細胞 ($\text{CD34}^+ \text{Fc}\gamma\text{R}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^- \text{Lineage}^-$, MEP) や巨核球前駆細胞 ($\text{CD150}^+ \text{CD41}^+ \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^- \text{Lineage}^-$, MkP)

は著減する一方で、顆粒球マクロファージ前駆細胞 (CD34⁺FcγR⁺c-Kit⁺Sca-1⁻Lineage⁻, GMP) は増加しており、*Pcgf1*欠失は*JAK2*変異に伴う骨髄球系への分化をさらに増強させることが示された。また、コンパウンドマウスの赤芽球系細胞で分化ブロックが認められ、p53経路の活性化によって赤血球造血障害を引き起こしていることが示唆された。

コンパウンドマウスにおける線維化進行の機序を解明するため、RNA-seq並びにChIP-seq解析を行った。コンパウンドマウスの複数の前駆細胞分画 [LSK, GMP, MEP, 並びにLK細胞 (c-kit⁺Lineage⁻)] におけるRNA-seq結果を用いてgene set enrichment analysis (GSEA) を行ったところ、骨髄球系細胞の分化制御に関わる遺伝子セットや急性骨髄性白血病の関与する遺伝子セットが正にエンリッチメントしており、*Pcgf1*欠損が骨髄球系細胞への分化誘導を増強することが示された。またH2AK119Ub1抗体によるChIP-seqにより、*Pcgf1*欠損マウス及びコンパウンドマウスのLKIにおいてH2AK119ub1レベルの低下を確認した。さらに、RNA-seqとChIP-seqの結果をあわせて解析したところ、標的遺伝子候補に*Hoxa9*が含まれており、*Hoxa*遺伝子群の脱抑制が線維化増悪に寄与している可能性が示唆された。

次に、マウスから採取したLSK細胞を液体培地上で培養を行い、LSKの増殖能を評価した。*Pcgf1*欠損マウスLSKではWTマウスのLSKに比べて増殖能の亢進が認められ、逆に*JAK2*変異マウスLSKでは既報と同じく増殖能の低下が認められた。コンパウンドマウスLSKではWTと同等レベルの増殖能を示しており、*Pcgf1*欠損が*JAK2*変異による増殖能障害を回復させることが示された。さらに、WTマウスと*JAK2*変異マウスのLSKに*Hoxa9*を過剰発現させたところ、*Hoxa9*の過剰発現により細胞増殖能の亢進と骨髄球系細胞への分化誘導効果が確認できた。以上より、*JAK2*変異マウスにおいて*Pcgf1*欠損は*Hoxa*遺伝子群の脱抑制を誘導し、幹細胞活性の増強と骨髄球系への分化促進を引き起こす可能性が示された。

最後に、*JAK2*陽性PMFにおけるnon-canonical PRC1とPRC2の機能の差異を評価するために、*JAK2*変異・*Pcgf1*欠損コンパウンドマウスのLSK及びMEPにおける遺伝子発現データを*JAK2*変異・*Ezh2*欠損コンパウンドマウスのLSK及びMEPにおける遺伝子発現データと比較することで、non-canonical PRC1とPRC2の機能差異を評価した。LSK及びMEPにおいて発現が亢進する遺伝子を比較したところ、両者では目立った重複は認められなかった。また、*Ezh2*欠損コンパウンドマウスの代表的な標的遺伝子である*HMGA2*は*Pcgf1*欠損コンパウンドマウスにおいて優位な変化は認められず、逆に*Pcgf1*欠損コンパウンドマウスで認められた*Hoxa*遺伝子群の発現亢進は*Ezh2*欠損コンパウンドマウスにおいて認められなかった。以上のことから*JAK2*変異陽性のPMFの病態において、non-canonical PRC1とPRC2の標的遺伝子の機能は異なり、*Pcgf1*欠失によるnon-canonical PRC1機能不全と*Ezh2*欠失によるPRC2機能不全は異なるメカニズムで*JAK2*変異に伴うPMFを促進することが示唆された。

[考察]

今回我々は、*Pcgf1*欠損は*JAK2*変異マウスのPMFを促進させることを示し、non-canonical PRC1が*JAK2*変異陽性のPMFの病態に関与する可能性を示唆した。*Ezh2*欠損によるPRC2機能不全は、*JAK2*変異マウスのPMFを促進させることが既に報告されている。*Ezh2*欠損コン

パウンドマウスモデルでは巨核球系の異常増殖を誘導するが、*Pcgf1*欠損コンパウンドマウスでは骨髄球系の異常増殖が認められる。それぞれのコンパウンドマウスモデルでは標的遺伝子も異なることから、*Pcgf1*欠損コンパウンドマウスモデルと*Ezh2*欠損コンパウンドマウスモデルでは異なる機序でPMFを増悪させている可能性が考えられた。近年、骨髄でのマクロファージが $\text{osterix}^+ / \alpha$ -smooth muscle actin(SMA) $^+$ 筋線維芽細胞などと協調して、PMFの病態において重要な仲介役を担うことが報告されている (Wakahashi et .al. Blood 2019;133(15):1619-1629)。 *Pcgf1*欠損による骨髄球系誘導が*JAK2*変異に付加されることで、どのように線維化を促進させているかという機序の詳細な解析は今後の研究課題である。

*Pcgf1*欠損コンパウンドマウスモデルで認められた赤血球造血障害は、*Ezh2*欠損コンパウンドマウスモデルやPRC機能不全を有するMDSマウスモデルでも同様に認められている。PRC2機能不全MDSマウスモデルにおいて、PRCの主標的である*Cdkn2a*の脱抑制が、E3ユビキチンリガーゼであるMDM2の抑制を介してp53経路を赤芽球特異的に活性化することが報告されている。PRC機能不全を有するPMF患者では、この経路の活性化が線維化の進行に伴う骨髄機能不全に加えて、貧血をさらに増悪させている可能性が示唆される。

*PCGF1*の遺伝子異常はヒトの造血器疾患において報告されていないが、*ASXL1*変異はPMFにおいてdriver変異に合併する頻度の高い遺伝子異常である。*Asx1/1*変異マウスはH2AK119の脱ユビキチン化や*Hoxa*遺伝子群の脱抑制を認めることが報告されており、*Pcgf1*コンパウンドマウスモデルは*ASXL1*変異と*JAK2*変異が共存する病態を模倣している可能性が示唆される。以上より、本研究での*Pcgf1*コンパウンドマウスモデルでの病態解析は、ヒトのPMFの病態解明につながることを期待される。