

令和 2 年 4 月 30 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860641

氏名 加藤 真一郎

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: マサチューセッツ総合病院 (国名: ボストン/米国)
2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
ヒストンメチル化酵素 G9a による悪性黒色腫発症機構の解明と治療標的としての応用
3. 派遣期間: 平成 30 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
マサチューセッツ総合病院/ハーバードメディカルスクール、Cutaneous Biology Research Center
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も**

可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6.研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【はじめに】

本研究課題は、自身が新規に発見したがん遺伝子「G9a/EHMT2」による悪性黒色腫発生機構の解明と、G9a を標的とした新規治療法の確立を目指すものである。採択時申請書および中間報告書に示した通り、これまでの研究過程において、悪性黒色腫のおよそ 26%に G9a の点変異(G1069L/W)もしくは遺伝子コピー数の増幅を明らかにしている。さらに、

1. G9a は悪性黒色腫のがん遺伝子である、
2. G9a は転写因子 MITF を制御することで悪性黒色腫の発症および維持に関わる、
3. 変異型 G9a が GLP 依存的に(ヘテロダイマーとして)強いメチル化活性を示す、
4. G9a の遺伝子コピー数の増幅のある悪性黒色腫に対し、G9a 阻害剤が有効な治療標的となる、

ことを示してきた。2年間の採択期間中に当該研究課題をさらに推進することができたため、その詳細について報告する。また、本支援により、2020 年 4 月 8 日に『Cancer Discovery』に採択にされたことを併せて報告する。

【G9a は MITF を介して悪性黒色腫の生存を制御する】

ヒストンメチル化酵素 G9a が悪性黒色腫のがん遺伝子として機能するメカニズムを明らかにするために、G9a のコピー数増幅のあるヒト悪性黒色腫細胞株 Hs944T を用いて RNA-seq を行った。メラノサイト細胞系譜の発生・分化・生存に必須であり、悪性黒色腫のがん遺伝子として知られる転写因子 *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) (Figure 1A, 赤字) と、その標的遺伝子 (Figure 1A, 黒字) の発現量が、G9a のノックダウンによって著しく低下することが明らかになった (Figure 1A-C)。同様に、G9a のメチル化酵素活性阻害剤によっても MITF の発現量が抑制され、G9a のメチル化を介して MITF の発現が制御されることが示唆される (Figure 1D)。また、MITF を異所性にレスキューしておくことで、G9a のノックダウンによる増殖能の低下が抑制されることから、この G9a による MITF 制御機構が悪性黒色腫の生存・増殖に必要であり、悪性黒色腫の発症にも寄与する可能性が示唆された (Figure 1E)。

次に、G9a による MITF の制御機構について検証を行った。RNA-seq の結果から、G9a のノックダウンによって、WNT/ β -catenin シグナルに関わる遺伝子の発現変化が確認された。実際に、WNT/ β -catenin シグナルの下流 TCF/LEF による転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイによって解析すると、G9a のノックダウンによって TCF/LEF 転写活性が顕著に低下することが示された (Figure 1F)。MITF は、WNT/ β -catenin や PKA-CREB 経路など、様々なシグナル伝達によって制御されることが知られている。重要なことに、恒常的活性型 β -catenin を遺伝子導入しておくことで、G9a 阻害による MITF の発現低下が完全に抑制された (Figure 1G)。以上の結果は、G9a による MITF 制御機構は、WNT/ β -catenin を介していることを強く示唆している。

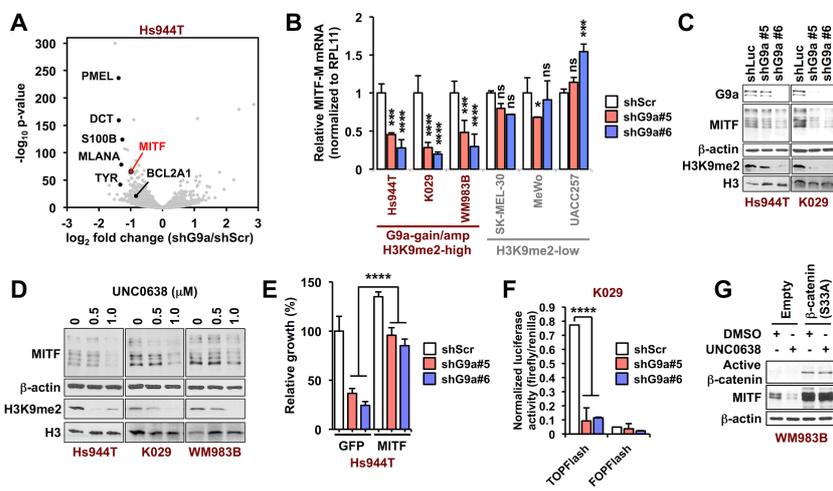


Figure 1. G9a stimulates MITF expression in melanoma through canonical WNT/ β -catenin signaling. (A) Volcano plot showing genes that are significantly altered by G9a knockdown in G9a-amplified Hs944T cells. The one red and six black dots indicate MITF and several of its target genes. The whole transcriptome RNA-seq was performed in duplicate. (B) qRT-PCR for MITF-M upon G9a knockdown in G9a-amplified, -gained, and G9a diploid melanoma cells. Data represent mean \pm SD of triplicates.

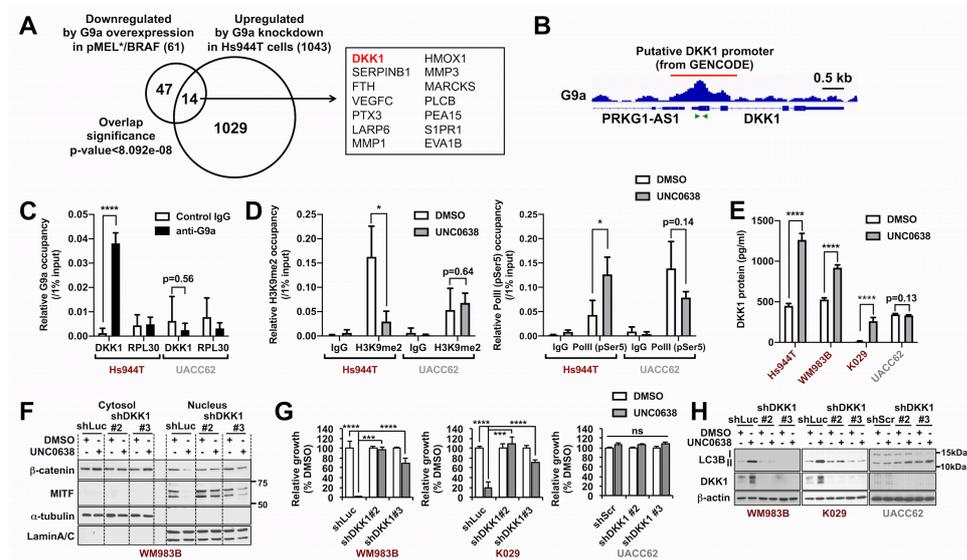
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. shScr in the same cell line by two-way ANOVA with the Holm-Šidák correction for pairwise comparisons. (See also Supplementary Fig. S4, A-C) (C and D) Western blots of MITF and H3K9me2 72h after (C) G9a knockdown and (D) pharmacological inhibition in G9a-amplified (Hs944T) or -gained (WM983B and K029) melanoma cells. Representative images from at least two independent experiments are shown. (E) Rescue of G9a-amplified or gained melanoma cells from G9a knockdown by ectopic MITF overexpression. **** $p < 0.0001$ by two-way ANOVA after normalizing to eliminate the difference between the shScr groups, with the Holm-Šidák correction for multiple pairwise comparisons. The data represent mean \pm SD from triplicates. (F) TOP/FOPFlash transcriptional activity 72 h after G9a knockdown in G9a-gained K029 melanoma cells. FOPFlash is a control luciferase reporter with mutant TCF/LEF-binding sites. Data represent mean \pm SD of 3-4 replicates from three independent experiments. (G) Western blots of MITF and non-phosphorylated (active) β -catenin in G9a-gained WM983B melanoma cells expressing constitutively active β -catenin (S33A) or empty vector, following incubation with UNC0638 (750 nM) for 72h. P-values were calculated by one-way ANOVA with the Holm-Šidák correction for multiple pairwise comparisons. (Kato S et al, Cancer Discovery, 2020, PMID: 32269030 より抜粋)

【G9a は WNT アンタゴニスト DKK1 を抑制することで、WNT/b-catenin の活性化を誘導する】

G9a の中心的な機能として、ヒストン H3 の 9 番目のリシン残基をジメチル化すること(H3K9me2)により、*enchromatin* 領域における転写抑制機能がよく知られている(Shinkai and Tachibana, *Genes Dev*, 2011, PMID: 21498567)。したがって、G9a が WNT/ β -catenin を活性化するメカニズムとして、WNT/ β -catenin の負の制御因子を抑制する可能性が考えられる。実際に、G9a によって発現が抑制される遺伝子を RNA-seq の結果から調べたところ、WNT アンタゴニストの一つである DKK1 が見出された(Figure 2A)。さらに、ChIP-seq(Figure 2B)および ChIP-qPCR(Figure 2C-D)によって、DKK1 プロモーター領域の G9a および H3K9me2 の占有率を検討した。G9a コピー数が増幅している悪性黒色腫細胞株 Hs944T では、DKK1 プロモーター近傍に G9a と H3K9me2 が占有しており、G9a 阻害剤 UNC0638 による H3K9me2 の抑制に伴って、転写活性化マーカーとしてリン酸化 PolII が転写開始点にリクルートされ(Figure 2D)、DKK1 の分泌が誘導される事が明らかになった。一方で、G9a が二倍体の悪性黒色腫細胞株 UACC62 では一連の UNC0638 の効果は認められなかった。

続いて、DKK1 が機能的に MITF の発現抑制や悪性黒色腫の増殖能低下に寄与しているかを明らかにするため、DKK1 ノックダウン実験を行った。DKK1 ノックダウンをしておくと、G9a 阻害によって生じる β -catenin の核移行抑制、MITF の発現低下、増殖能低下が全てキャンセルされる事が明らかになった(Figure 2F-G)。またこれらの表現系はオートファジーマーカーである LC3B-II と関連している事から、G9a 阻害剤による増殖抑制効果は、オートファジーを介したものである事が示唆された(Figure 2H)。

Figure 2. G9a stimulates WNT/ β -catenin and subsequent MITF expression by repressing WNT antagonist DKK1 in melanoma.



(A) Venn diagram shows genes that are downregulated by G9a overexpression in pMEL*/BRAF and upregulated by G9a knockdown in Hs944T, respectively (adjusted p-value<0.05). The 14 candidate target genes that overlap in the two datasets are shown in the box. (B) Snapshot image of G9a ChIP-seq

peak in colon cancer initiating cells (GSE82131) at the putative DKK1 promoter region (from GENCODE). The publicly available dataset was visualized by IGV (ver_2.3.55). Green arrows indicate the primer set used for ChIP-qPCR in subsequent Figures 4C and 4D. (C) G9a ChIP-qPCR for DKK1 promoter in Hs944T and UACC62 cells. RPL30 (human RPL30 gene body (exon 3)) serves as a negative control. (n=3 from two independent experiments). (D) ChIP-qPCR for (left) H3K9me2 and (right) phosphorylated-RNA-polymerase II (pSer5) at the DKK1 promoter region in Hs944T cells. Cells were treated with DMSO or UNC0638 (500 nM) for 72 h and subjected to H3K9me2-ChIP or Pol II (pSer5)-ChIP. (n=3-4 from two independent experiments). (E) ELISA for secreted DKK1 levels after UNC0638 (500 nM) for 72 h in G9a-amplified (Hs944T), -gained (WM983B and K029), and G9a diploid (UACC62) melanoma cells. Data represent mean \pm SD of 3-4 replicates. (F) Western blots of cytosolic and nuclear β -catenin and MITF expression in UNC0638-treated WM983B-shLuc and -shDKK1 cells. α -tubulin and LaminA/C

served as internal controls for the cytosolic and nuclear fractions, respectively. Representative images from one of two independent experiments are shown. **(G and H)** Growth measured by CellTiter-Glo assay (n=4) (G) and western blot of autophagy marker LC3B (representative images from one of two independent experiments are shown) (H) in WM983B, K029 and UAC62 cells stably expressing shLuc or shDKK1 hairpins, after 750 nM UNC0638 treatment for 72 h. P-values were calculated by unpaired, two-tailed T tests with the Holm-Šidák correction for multiple comparisons (**C, D and E**) or by two-way ANOVA with the Holm-Šidák correction for multiple pairwise comparisons (**G**). *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001. (Kato S et al, Cancer Discovery, 2020, PMID: 32269030 より抜粋)

【G9a-DKK1-WNT 経路は、様々ながん腫で保存される】

WNT/ β -catenin は、悪性黒色腫だけではなく、様々ながん腫において発がんとの密接な関連性が報告されている。したがって、G9a による WNT/ β -catenin 機構は、他のがん腫においても保存され、新規発がんメカニズムの一つになり得ると考えられた。

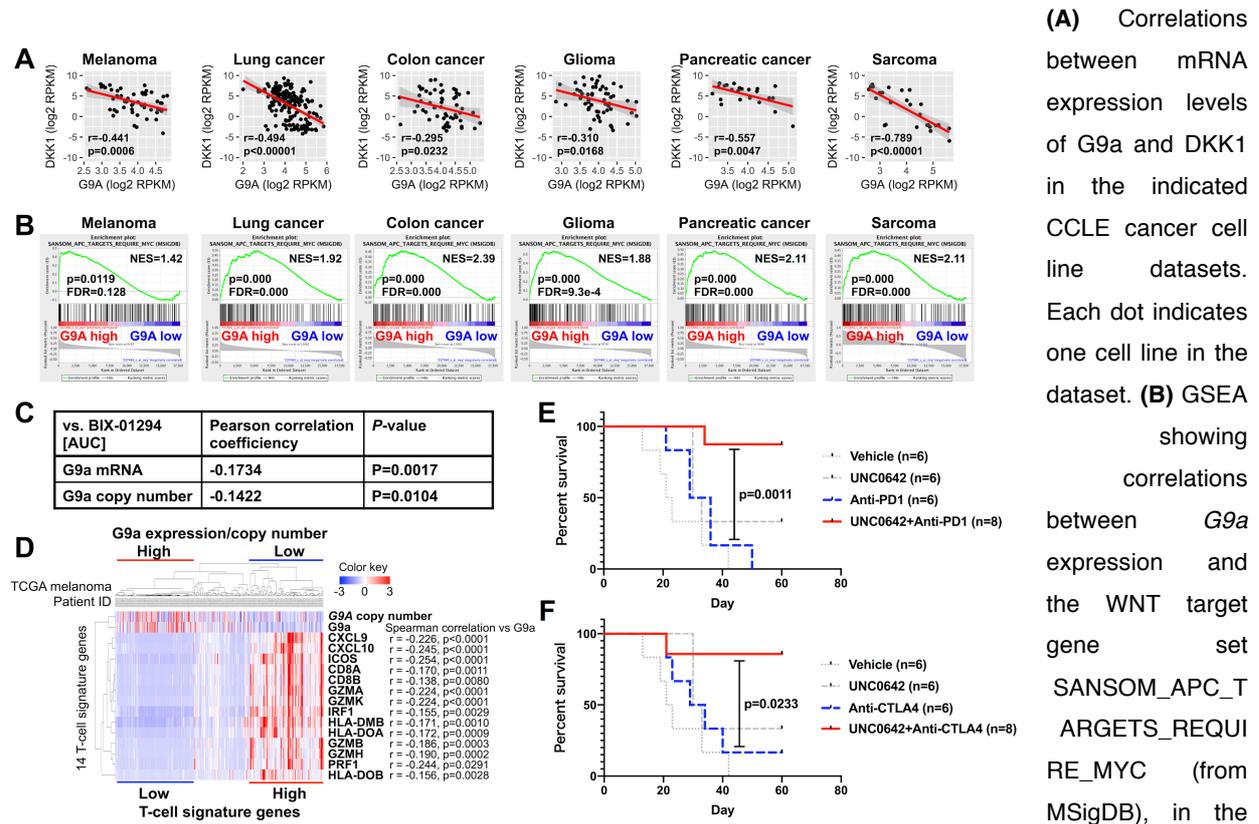
Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) に登録された各種がん細胞株のトランスクリプトームデータ (RNA-seq) を用いて、G9a-DKK1-WNT の相関性を検証した結果、悪性黒色腫に加え、肺がん (非小細胞肺がん + 小細胞肺がん)、大腸がん、神経芽腫、膵癌、肉腫などにおいて、G9a と DKK1 の間の「負の相関性」、G9a と WNT の間の「正の相関性」が明らかになった (Figure 3A-B)。また、G9a-DKK1-WNT 経路が保存されたがん腫を対象に、G9a 阻害剤感受性と G9a 発現量・コピー数の関連性を広範ながん細胞株 (>400 株) で検証したところ、G9a の発現量もしくはコピー数が高い腫瘍ほど G9a 阻害剤への感受性が高いことがわかった (Figure 3C)。この結果は、我々が悪性黒色腫で得たデータと一致する。

【G9a は腫瘍免疫応答を抑制する？】

近年、様々ながん遺伝子およびがん抑制遺伝子が腫瘍微小環境の形成に関わっていることが相次いで報告されている。WNT/ β -catenin もその一つであり、悪性黒色腫において腫瘍免疫応答に重要な樹状細胞集団と、腫瘍抗原特異的な細胞障害性 T 細胞の腫瘍内浸潤を阻害していることが明らかになっている (Spranger S et al, Nature, 2015, PMID: 25970248)。したがって、WNT/ β -catenin の上流に位置する G9a も一おそくは WNT/ β -catenin を介した一腫瘍免疫調節機能を有する可能性が予想された。

The Cancer Genome Atlas (TCGA) の RNA-seq データセットを用いて、悪性黒色腫患者の G9a 発現量 / コピー数と T 細胞シグネチャーの相関性を検討した。その結果、G9a と T 細胞浸潤性の間には明らかな負の相関性があり、我々の仮説通り、G9a が腫瘍免疫を抑制的に制御していることが示唆された (Figure 3D)。さらに、G9a が機能的に腫瘍免疫応答に関わっているかを検証するために、G9a 阻害剤 UNC0642 が免疫チェックポイント阻害剤感受性に及ぼす影響を調査した。本実験では、受け入れ先研究室で新規に樹立した D4M-UV3 マウス悪性黒色腫細胞株を用いた (Lo JA et al, Submitted)。この細胞株は、これまでのマウス悪性黒色腫細胞株 (例えば、B16 など) とは異なり、臨床的に認められるがん遺伝子変異 *BRAF*^{V600E} とがん抑制遺伝子の欠失 *PTEN*^{-/-} という遺伝子背景を持つ。さらに、免疫チェックポイント阻害剤に対する感受性は臨床のそれと同程度であり、腫瘍免疫実験に極めて有用なモデルを提供すると考えられる。D4M-UV3 を移植したマウスに免疫チェックポイント阻害剤として、抗 PD-1 抗体もしくは抗 CTLA4 抗体を投与すると、0-20% 程度の完全寛解が誘導される (Figure 3E-F)。興味深いことに、G9a 阻害剤 UNC0642 を併用すると寛解率は 70-80% に上昇することが示された (Figure 3E-F)。この結果は、G9a が腫瘍免疫を抑制することを強く示唆するものである。

Figure 3. G9a-DKK1-WNT pathway is highly conserved across cancers and associated with a ‘cold’ tumor immune microenvironment.



same CCLC datasets as in (A). **(C)** Correlation between sensitivity to G9a inhibitor BIX-01294 (area-under-the-curve metric) and G9a mRNA level or copy number across cancers available in the CTRPV2 dataset. **(D)** Hierarchical clustering of 367 TCGA melanoma patients with average linkage by G9a copy number/expression and Spranger T-cell signature genes. Correlations between G9a expression and each T-cell signature gene were analyzed by Spearman's rank correlation. **(E and F)** Kaplan-Meier plots showing overall survival of mice harboring D4M.3A.3-UV3 tumors and treated with vehicle (n=6; gray dotted line), UNC0642 (5 mg/kg) (n=6; gray dashed line), anti-PD-1 (F) or anti-CTLA-4 (G) (n=6; gray dashed line), or combination therapy (UNC0642 + either anti-PD-1 or anti-CTLA-4) (n=8; black solid line). P-values were calculated by the log-rank (Mantel-Cox) test. (Kato S et al, Cancer Discovery, 2020, PMID: 32269030 より抜粋)

【まとめ】

以上、本海外特別研究員制度を通じて、ヒストンメチル化酵素 G9a のがん遺伝子としての機能を明らかにし、その分子基盤として WNT/ β -catenin を介した経路を明らかにするに至った。G9a はこれまでに多くのがん腫で悪性化進展に関わることが示唆されてきたが、遺伝子変異やコピー数増幅などを伴ってがん遺伝子となることを明らかにした初めての研究である。また腫瘍免疫との関係性にまで言及しており、最終的に Cancer Discovery (IF=26.37) (Kato S et al, Gain-of-function genetic alterations of G9a drive oncogenesis, **Cancer Discovery**, 2020, PMID: 32269030) に採択されることが叶った。これも偏に本制度による支援により、海外での研究活動に思う存分没頭できたからであると言える。

また、今回の留学で得たのは、本業績だけではない。ボストン、ハーバード、MIT 界隈の世界最先端の研究環境で、多くの研究に関わり、また共同研究の機会を与えていただいた。そして、日本人研究者の枠を超え、世界中に研究者ネットワークを持つことができた。本支援に加え、今回私を受け入れてくれた Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School の David E Fisher 博士に、この場を借りて深く御礼申し上げたい。