

# Dual EZH2 and G9a inhibition suppresses multiple myeloma cell proliferation by regulating the interferon signal and IRF4-MYC axis

Cell Death Discov. 2021 Jan 12; 7(1): 7. doi: 10.1038/s41420-020-00400-0

Ishiguro K, Kitajima H, Niinuma T, Maruyama R, Nishiyama N, Ohtani H, Sudo G, Toyota M, Sasaki H, Yamamoto E, Kai M, Nakase H, Suzuki H

**要旨** 多発性骨髄腫 (MM) において、ヒストンメチル化酵素 EZH2 と G9a の共阻害は、インターフェロンシグナルの活性化と MM の重要な生存シグナルである IRF4-MYC シグナルの抑制を介して、腫瘍増殖を抑制し、細胞周期停止とアポトーシスを誘導することを明らかにした。

## 1. 背景

多発性骨髄腫 (MM) は、骨髄での異常な形質細胞のモノクローナルな増殖により、高 Ca 血症、腎不全、貧血、骨病変などを引き起こす根治不能な血液腫瘍の一つである。最新の治療としては、免疫調節薬 (サリドマイド, レナリドミド, ポマリドミド), 抗体製剤 (エロツズマブ, ダラツムマブ, イサツキシマブ) などの免疫治療が中心である。

一方 MM においても、DNA メチル化やヒストン修飾の異常などのエピジェネティックな変化が病因の一つであると報告されており、その可塑性からエピジェネティック異常は MM の有望な治療標的の一つであると考えられている。実際、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤のパノピノスタットは、ボルテゾミブとデキサメタゾンとの併用で再発・難治性 MM に対して実臨床で使用されている。

ヒストンメチル化は転写の制御に関与し、ヒストン H3 リシン 27 (H3K27) メチル化酵素の EZH2 とヒストン H3 リシン 9 (H3K9) メチル化酵素の G9a は転写の抑制に関与する。我々は以前の研究で EZH2 阻害剤と G9a 阻害剤は、それぞれ単剤で MM 細胞株の増殖をある程度抑制することを明らかにした<sup>1)</sup>。一方で EZH2 と G9a は相互作用し、協働して転写抑制に関与するという報告もある<sup>2)</sup>。本研究では MM における、EZH2 と G9a 阻害剤併用による相加的あるいは相乗的な抗腫瘍効果を検証した。

## 2. 結果

我々はまず EZH2 阻害剤 (GSK126, EPZ-6438), G9a 阻害剤 (UNC0638, UNC0642) を用いて *in vitro* での MM 細胞株の細胞増殖アッセイを行った。その結果、それぞれの阻害剤 1  $\mu$ M の濃度で 6-14 日間処理することにより 6 種類の MM 細胞株すべてで、

EZH2 阻害剤と G9a 阻害剤併用による相加的な細胞増殖抑制効果を確認できた。MM 細胞株の RPMI-8226 細胞株を用いたゼノグラフトマウスモデルでも EZH2 阻害剤と G9a 阻害剤併用による抗腫瘍効果を確認できた (図 A)。細胞増殖抑制の機序を解明するために、細胞周期解析とアポトーシスアッセイを行ったところ、EZH2 阻害剤と G9a 阻害剤併用により、細胞周期停止とアポトーシスが誘導されていることが明らかとなった。

次に阻害剤による遺伝子発現の変化を検証するために、RPMI-8226 と MM.1S 細胞株を用いて、マイクロアレイ解析を行った。その結果、両細胞株に共通して、EZH2 阻害剤と G9a 阻害剤の併用によりインターフェロンシグナル関連遺伝子の発現が上昇し (図 B)、また MM の生存の鍵となる遺伝子である IRF4 の発現が低下していた。我々は、qRT-PCR でも阻害剤併用によるインターフェロン誘導遺伝子 (ISGs) の発現上昇と IRF4-MYC シグナル遺伝子の発現低下を確認した。さらにウェスタンブロッティングでも阻害剤併用によるリン酸化 Stat1 の発現上昇を確認した (図 C)。

近年がん細胞株において、DNA メチル化阻害剤のアザシチジンが、内在性レトロウイルス遺伝子 (ERVs) を再活性化し、インターフェロンシグナル活性化することで、抗腫瘍効果を呈すると報告されている<sup>3), 4)</sup>。我々も EZH2 阻害剤と G9a 阻害剤併用による ERVs 領域のヒストン修飾の変化と ERVs の発現の変化を調べたところ、阻害剤併用により ERVs 領域の H3K27me3 と H3K9me2 の両者が低下し、ERVs の発現が上昇していることが明らかとなり、インターフェロンシグナル活性化の機序の一つと考えた (図 D)。

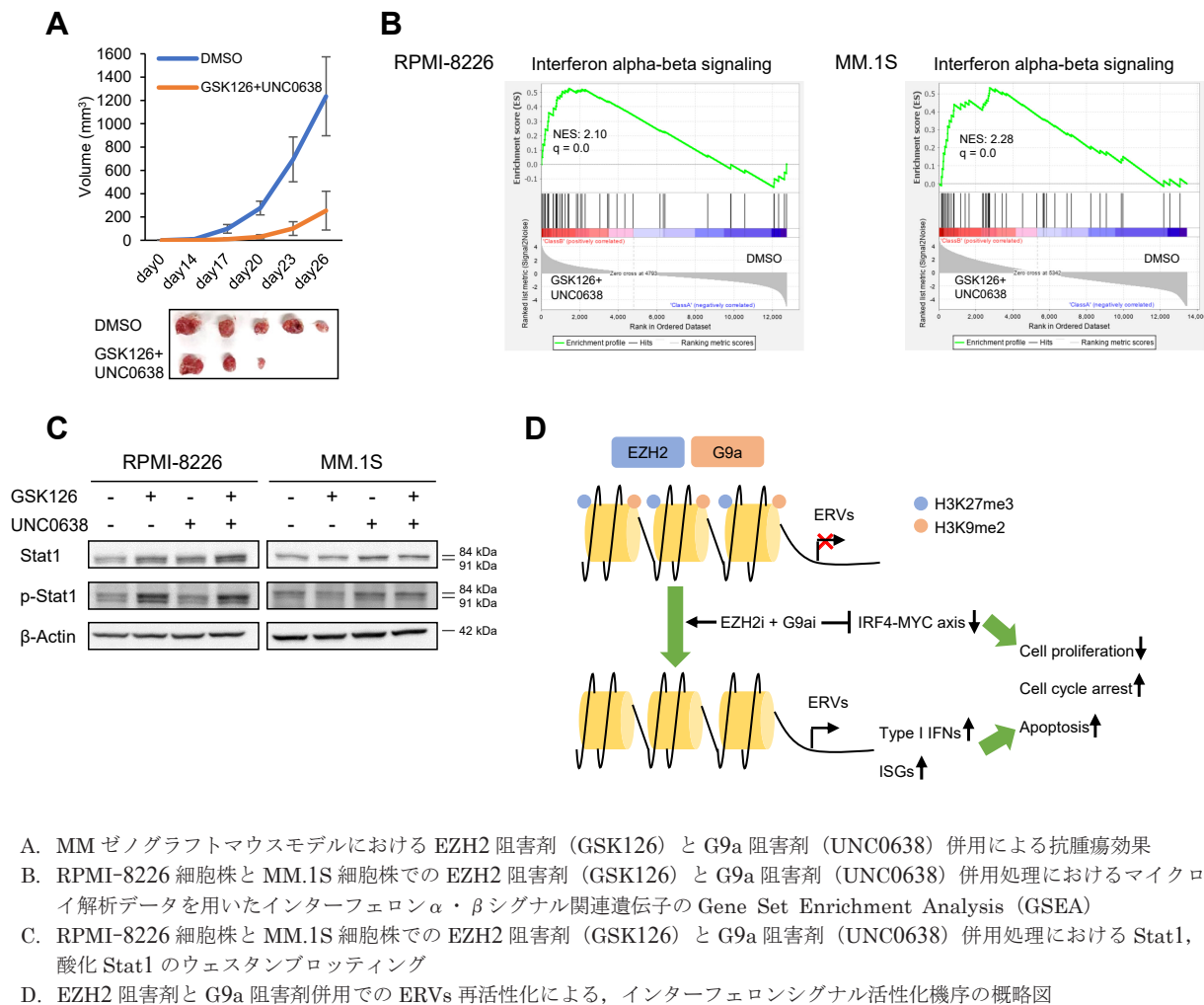


図1 A. MMゼノグラフトマウスモデルにおける EZH2 阻害剤 (GSK126) と G9a 阻害剤 (UNC0638) 併用による抗腫瘍効果  
 B. RPMI-8226 細胞株と MM.1S 細胞株での EZH2 阻害剤 (GSK126) と G9a 阻害剤 (UNC0638) 併用処理におけるマイクロアレイ解析データを用いたインターフェロン  $\alpha \cdot \beta$  シグナル関連遺伝子の Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)  
 C. RPMI-8226 細胞株と MM.1S 細胞株での EZH2 阻害剤 (GSK126) と G9a 阻害剤 (UNC0638) 併用処理における Stat1, リン酸化 Stat1 のウェスタンブロットング  
 D. EZH2 阻害剤と G9a 阻害剤併用での ERVs 再活性化による, インターフェロンシグナル活性化機序の概略図

### 3. 考察

我々は本研究で, EZH2 阻害剤と G9a 阻害剤の併用は MM の新規治療法の一つなる可能性を見出した. 近年エピジェネティック治療薬による抗腫瘍効果の機序の一つとして, ERVs の再活性化などの免疫賦活化が報告されている<sup>3), 4)</sup>. MM においては, ヒストンメチル化修飾と免疫反応の関連を本研究が初めて明らかにした. 今後はヒストンメチル化酵素阻害剤と免疫調節薬, 抗体製剤, 免疫チェックポイント阻害剤などとの併用による抗 MM 効果に関してさらに検証していきたい.

### 参考文献

- Ishiguro K, Kitajima H, Niinuma T, Ishida T, Maruyama R, Ikeda H, Hayashi T, Sasaki H, Wakasugi H, Nishiyama K, Shindo T, Yamamoto E, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Nakase H, Suzuki H. DOT1L inhibition blocks multiple myeloma cell proliferation by suppressing IRF4-MYC signaling. *Haematologica* 2019; 104: 155-165.
- Mozzetta C, Pontis J, Fritsch L, Robin P, Portoso M, Proux C, Margueron R, Ait-Si-Ali S. The histone H3 lysine 9

methyltransferases G9a and GLP regulate polycomb repressive complex 2-mediated gene silencing. *Mol Cell* 2014; 53: 277-289.

- Chiappinelli KB, Strissel PL, Desrichard A, Li H, Henke C, Akman B, Hein A, Rote NS, Cope LM, Snyder A, Makarov V, Budhu S, Slamon DJ, Wolchok JD, Pardoll DM, Beckmann MW, Zahnow CA, Merghoub T, Chan TA, Baylin SB, Strick R. Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses. *Cell* 2015; 162: 974-986.
- Roulois D, Loo YH, Singhania R, Wang Y, Danesh A, Shen SY, Han H, Liang G, Jones PA, Pugh TJ, O'Brien C, De Carvalho DD. DNA-demethylating agents target colorectal cancer cells by inducing viral mimicry by endogenous transcripts. *Cell* 2015; 162: 961-973.

### 石黒 一也

#### 略歴

- 2011年 札幌医科大学医学部卒業  
 2018年 札幌医科大学大学院卒業  
 2018年～ 札幌医科大学医学部訪問研究員