

# EZH2 作为抗肿瘤免疫治疗靶点研究进展

李倩 王艳林

(三峡大学医学院 三峡大学分子生物学研究所, 宜昌 443002)

**摘要:** 多梳蛋白复合物 (PcG) 的核心亚基 zeste 基因增强子同源物 2 (Enhancer of zeste homolog2, EZH2) 是一种组蛋白甲基转移酶, 参与维持细胞密度、干细胞多能性、细胞周期调节等重要的生理作用。研究发现, EZH2 在多种肿瘤组织中高表达, 是促进肿瘤发生和发展的致癌因子。由于 EZH2 在正常组织中低表达或者不表达, 使其最近被鉴定为一种肿瘤相关抗原。已经在 EZH2 蛋白分子中鉴定出多条特异性抗原肽, 这些抗原肽能激发机体免疫细胞对 EZH2 表达异常增高肿瘤细胞的杀伤活性。上述研究提示, EZH2 可能是一种新的抗肿瘤治疗分子靶点, 并在肿瘤免疫治疗中具有潜在的应用价值。就该领域的最新研究进展作一简要综述。

**关键词:** EZH2; 分子靶点; 抗肿瘤免疫; 肿瘤相关抗原

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.01.004

## Research Progress in EZH2 as a Target for Anti-tumor Immunotherapy

Li Qian Wang Yanlin

(Medical College, Institute of Molecular Biology, Three Gorges University, Yichang 443002)

**Abstract:** EZH2 (enhancer of Zeste homolog2), the core subunit of polycomb group protein complex (PcG), is a histone methyltransferase which involves in cell density maintenance, stem cell pluripotent, cell cycle regulation and other important physiological roles. The study has found that EZH2 is over-expressed in many tumor tissues and can be used as a carcinogen to promote tumorigenesis. Since EZH2 has been proved to be non- or low-expressed in normal tissues, it has recently been identified as a tumor-associated antigen. Multiple antigen peptides derived from the EZH2 protein have been identified and their ability in stimulating the killing activity of immune cells against the tumor cells with over-expressed EZH2 has been proved. These studies indicate that EZH2 could be a new molecular target for anti-tumor therapy and has potential value in tumor immunotherapy. This paper gives a brief review on the research progress in these study fields.

**Key words:** EZH2; molecular target; anti-tumor immunology; tumor-associated antigen

多梳蛋白复合物 (Polycomb group protein, PcG) 是参与染色质基因表观遗传负性调控重要蛋白因子, 在哺乳动物中, PcG 主要分为结构和功能不同的两类, 即多梳蛋白抑制性复合物 2 (Polycomb repressive complex 2, PRC2) 和多梳蛋白抑制性复合物 1 (Polycomb repressive complex 1, PRC1)。复合物 PRC2 由 4 个亚基构成, 即 EZH2、EED、SUZ12 和 RbAp48, 其中 EZH2 为 PRC2 的核心亚基<sup>[1]</sup>。研

究发现, 在多种高度增殖的肿瘤中 EZH2 的表达显著性高于正常细胞, 且其表达水平与癌症病人的预后呈负相关, 提示 EZH2 有可能成为肿瘤诊断及抗肿瘤治疗的新靶点<sup>[2-4]</sup>。本文简要综述 EZH2 与肿瘤发生发展的关系, 以及作为肿瘤相关抗原引起机体抗肿瘤免疫的研究进展。

### 1 EZH2 的结构与功能

EZH2 最早由 Chen 等<sup>[5]</sup>于 1996 年在对 Down

收稿日期: 2014-05-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81372265), 湖北省高等学校优秀中青年创新团队计划项目 (T201203)

作者简介: 李倩, 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤免疫; E-mail: ml5672484851@163.com

通讯作者: 王艳林, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤免疫; E-mail: fzwangyl@ctgu.edu.cn

综合征 (Down syndrome) 的研究中发现, 随后 Cardoso 等<sup>[6]</sup>在对 ATR-X 综合征致病位点附近基因的研究中将该基因定位于人染色体 7q35 上。人 EZH2 基因由 20 个外显子和 19 个内含子构成, 编码由 746 个氨基酸残基构成的 EZH2 蛋白分子。作为 PRC2 的核心亚基, EZH2 具有组蛋白甲基转移酶活性, 主要参与 H3K27 的三甲基化修饰。而该活性的稳定发挥需要以下两个必备条件: (1) EZH2 与其他非催化亚基结合为稳定的复合物; (2) EZH2 本身具有完整的 SET 结构域及相邻的 CXC 结构域。

近来研究发现, EZH2 在细胞密度维持、干细胞自我更新、细胞周期调节以及肿瘤的发生发展中起着重要的作用<sup>[7, 8]</sup>。EZH2 能与 HDACs (组蛋白去乙酰化酶)、DNMTs (DNA 甲基转移酶) 共同作用而导致抑癌基因表观遗传性沉默, 促进肿瘤的形成及迁移<sup>[9, 10]</sup>。

## 2 EZH2 高表达与肿瘤的发生及发展

Wan 等<sup>[11]</sup>定量分析 EZH2 在不同肺癌组织中的表达水平发现, 淋巴转移癌显著高于原位癌, 低分化癌高于高分化癌, TNM III - IV 期癌高于 TNM I - II 期癌, 提示 EZH2 在肺癌组织高表达与肿瘤恶性程度正相关。EZH2 在肿瘤细胞中的高表达往往是细胞生长调控信号异常的结果。Coe 等<sup>[12]</sup>报道, 小细胞肺癌中 EZH2 高表达与 E2F/Rb 信号系统异常密切相关。E2F 是一种促细胞周期相关基因表达的转录因子, EZH2 也是受 E2F 激活的靶基因之一。而 RB 蛋白则通过与 E2F 相互结合而抑制后者的促转录活性。在小细胞性肺癌细胞株和肺癌组织中, Rb 表达显著性下降而 E2F 的表达显著性升高, 二者的综合作用使得更多功能性 E2F 结合到 EZH2 启动子上, 由此上调 EZH2 基因的表达。Hwang-Verslues 等<sup>[13]</sup>的研究发现, 抑癌基因生物钟基因 2 (period2, PER2) 通过抑制上皮间质转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关基因, 如 TWIST1、SLUG 和 SNAIL 的表达而抑制细胞的侵袭和转移, 且这一过程需要 EZH2 的协助。作为一种辅助转录抑制因子, PER2 能将 EZH2、SUZ12 和 HDAC2 等基因负性表达调控因子募集到 TWIST1 和 SLUG 基因启动子的 OCT-1 元件上, 并以复合体的

形式抑制上述基因的转录。在实体瘤的低氧环境下, PER2 大量降解, 结合在 OCT-1 元件上的复合物解体, 由此解除对 TWIST1 和 SLUG 基因表达的抑制, 进而促进 EMT 发生。此外, 在缺氧环境中, 肿瘤细胞内转录因子缺氧诱导因子 (Hypoxia-induced factor, HIF) 表达显著性增加, 它也可以诱导 EZH2 的表达而促进肿瘤细胞恶化<sup>[13, 14]</sup>。

EZH2 高表达与前列腺癌的关系已被广泛研究, 有研究发现, 在用手术去势治疗无效的前列腺癌中, EZH2 的致癌活性与其表观遗传转录抑制功能无关, 但与其另一种功能, 即作为雄性激素受体的辅助活化转录因子的功能相关。这种从转录抑制到转录活化功能的转换, 需要 EZH2 的磷酸化修饰<sup>[15]</sup>。

Hajósi-Kalcakosz 等<sup>[16]</sup>发现, EZH2 是鉴别肝脏恶性肿瘤与良性肿瘤的一个非常可靠而又敏感的免疫组化指标。在大多数的恶性肝细胞肿瘤中 EZH2 表达阳性, 而在腺瘤、肝硬化结节和胆管错构瘤等良性肿瘤中, EZH2 表达阴性。

由于在 EZH2 分子中含有糖原合成酶激酶 3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ ) 的作用基序, 因而 GSK3 $\beta$  可催化 EZH2 的磷酸化修饰并使之失活。Ma 等<sup>[17]</sup>的研究首次发现, 鼻咽癌细胞中 EZH2 过度表达与 GSK3 $\beta$  自身磷酸化失活密切相关。用 GSK3 $\beta$  的抑制剂也能上调 EZH2 的表达水平, 而用 siRNA 沉默 Gsk3 $\beta$  的表达抑制瘤细胞的侵袭能力。

## 3 EZH2 介导的抗肿瘤免疫效应

Ogata 等<sup>[18]</sup>在对前列腺癌的研究中发现, EZH2 可能是一种肿瘤相关抗原。他们基于人类白细胞抗原 (Human leukocyte antigen, HLA) 的抗原结合基序, 从 EZH2 蛋白分子中选择了 11 条肽段作为潜在的抗原肽, 然后分析来源于前列腺癌患者血清的 IgG 识别和结合这些多肽的能力。结果发现, 其中 3 条多肽 (Aa243-245、Aa291-299 和 Aa735-742) 能被 IgG 有效识别与结合。这 3 条多肽中的 2 条 (Aa291-299 和 Aa735-742) 能诱导 HLA-A24-A24 限制性的、前列腺癌细胞特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞 (Cytotoxic T lymphocyte, CTL) 增殖。

Steele 等<sup>[19]</sup>在对原发性肝细胞癌 (Hepatic cell cancer, HCC) 的研究中, 进一步证实了 EZH2 的

肿瘤相关抗原特征。他们发现 HCC 患者血清存在 EZH2 特异性的 T 细胞效应。将含 EZH2 编码序列的重组腺病毒载体转入外周血单核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 的细胞核中,能大幅提高该细胞群 IFN- $\gamma$  的合成与分泌水平。他们还鉴定了几种源于 EZH2 的 CD8<sup>+</sup>T 细胞表型发现,源于 EZH2 的多肽 YMCSFLFNL (Aa666-674) 能更显著性地刺激这些 T 细胞释放 IFN- $\gamma$ 。该抗原肽还能刺激外周血淋巴细胞中特异性 CTL 增殖,除去外周血淋巴细胞中的 CD25<sup>+</sup>T 细胞 (Treg 细胞) 后,上述抗原肽对 CTL 的增殖活化效应更加明显。

Komohara 等<sup>[20]</sup> 的研究也发现,在膀胱癌细胞中 EZH2 (734-742) 抗原肽高表达。这种抗原多肽能够诱导 HLA-A24 表型的膀胱癌患者 PBMC 产生特异性杀伤膀胱癌的 CTL,且这种细胞毒性反应受 HLA-A24 的限定并主要依赖于 CD8<sup>+</sup>T 细胞。但患者血清来源的 IgG 与上述 EZH2 抗原多肽之间无直接相互作用,提示在膀胱癌患者中,EZH2 作为肿瘤相关抗原并不能引起体液免疫反应。利用类似的研究策略,该研究组随后发现,EZH2 (291-299) 和 EZH2 (735-743) 这两段抗原多肽能够诱导 HLA-A24 表型的肾癌患者 PBMC 产生特异性杀伤肾癌细胞的 CTL,且这种细胞毒性反应是 HLA-I 类分子限制性的并主要依赖于抗原肽特异性的 CD8<sup>+</sup>T 细胞<sup>[21]</sup>。此外,该研究组还分析了 EZH2 作为 HLA-A2 表型的前列腺癌肿瘤相关抗原的能力。他们依据 HLA-A2 分子的抗原结合基序,从 EZH2 选择了 12 条潜在的肿瘤抗原肽,然后分析它们结合患者血清 IgG 的能力,以及诱导特异性肿瘤杀伤 CTL 的能力。结果发现,在 12 条候选肽中有 5 条 (Aa120-128、Aa165-174、Aa669-577、Aa665-674 和 Aa699-708) 出现在患者血清中,并能被患者血清 IgG 有效识别和结合。在这 5 条肽中,有 2 条 (Aa120-128、Aa165-174) 能够诱导 HLA-A2 表型的前列腺癌患者 PBMC 产生特异性杀伤前列腺癌细胞的 CTL,且这种细胞毒性反应主要依赖于抗原肽特异性的和 HLA-A2 限制性的 CD8<sup>+</sup>T 细胞<sup>[22]</sup>。

T 细胞介导的抗肿瘤免疫存在两大障碍,一是肿瘤相关抗原免疫原性低下;二是肿瘤组织中存在免疫抑制性微环境。为克服上述障碍,有学者开始

探索通过移植肿瘤抗原特异性的异体 CTL 来进行抗肿瘤免疫治疗的新途径<sup>[23]</sup>。Thiel 等<sup>[24]</sup> 在对尤氏瘤 (Ewing tumor) 的研究中发现,EZH2 在该类肿瘤中的表达显著性上调。随后他们从健康人体的血液 PBMC 中分离树突状细胞 (Dendritic cells, DC),并在体外用细胞因子刺激这些 DC 使其成熟,并用源于 EZH2 的抗原肽 (Aa666-674) 处理成熟的 DC 细胞,然后将这些经过处理的成熟 DC 与健康人的 PBMC 共孵育,由此获得 EZH2 特异性的异源 CTL 细胞。这种异源 CTL 能够识别膜上表达 EZH2 抗原肽的尤氏瘤细胞并对其产生杀伤活性,同时也能显著性抑制小鼠移植尤氏瘤的生长。

上述关于 EZH2 作为抗原诱发抗肿瘤免疫效应的研究中均强调了 CD8<sup>+</sup>T 细胞的重要性,而 Hayashi 等<sup>[25]</sup> 在对肺癌的研究中指出,CD4<sup>+</sup>T 细胞也在这一过程中发挥重要作用。他们发现,肺癌患者癌组织中 EZH2 高表达,用源于 EZH2 的抗原肽 EZH2 (95-109) 能有效诱导 HLA-DR 限制性的 CD4<sup>+</sup>T 细胞效应,提示上述肽段具有多重抗原表位特征。重要的是,EZH2 (95-109) 诱导的效应 T 细胞能直接识别表达 EZH2 的肺癌细胞,由此导致免疫杀伤。

## 4 结语

综上所述,EZH2 作为一种表观遗传酶参与肿瘤的发生与发展,有望成为肿瘤治疗新的分子靶点。EZH2 新近被鉴定为一种肿瘤相关抗原,这也为抗肿瘤免疫治疗提供了新的手段和途径。由于 EZH2 诱发肿瘤的相关分子机制尚未完全阐明,目前基于 EZH2 的抗肿瘤免疫治疗还停留在细胞和动物实验阶段,对此进一步深入研究,将有助于新型抗肿瘤药物的研发和肿瘤特异性疫苗的研制,有重要的临床意义和应用前景。

## 参考文献

- [1] Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life [J]. Nature, 2011, 469 (7330): 343-349.
- [2] Benetatos L, Vartholomatos G, Hatzimichael E. Polycomb group proteins and MYC: the cancer connection [J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71 (2): 257-269.

- [ 3 ] Chang CJ, Hung MC. The role of EZH2 in tumour progression [ J ] . Br J Cancer, 2012, 106 ( 2 ) : 243-247.
- [ 4 ] Crea F, Paolicchi E, Marquez VE, et al. Polycomb genes and cancer: time for clinical application? [ J ] . Crit Rev Oncol Hematol, 2012, 83 ( 2 ) : 184-193.
- [ 5 ] Chen H, Rossier C, Antonarakis SE. Cloning of a human homolog of the *Drosophila* enhancer of zeste gene ( EZH2 ) that maps to enchromosome 21q22.2 [ J ] . Genomics, 1996, 38 ( 1 ) : 30-37.
- [ 6 ] Cardoso C, Timsit S, Villard L, et al. Specific interaction between the XNP/ATP-X gene product and the SET domain of the human EZH2 protein [ J ] . Hum Mol Genet, 1998, 7 ( 4 ) : 679-684.
- [ 7 ] Kim W, Bird GH, Neff T, et al. Target disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer [ J ] . Nature Chemical Biology, 2013, 9 ( 10 ) : 643-650.
- [ 8 ] Abdel-Wahab O, Levine RL. EZH2 mutations : mutating the epigenetic machinery in myeloid malignancies [ J ] . Cancer cell, 2010, 18 ( 2 ) : 105-107.
- [ 9 ] Yaswen P. HDAC inhibitors conquer polycomb proteins [ J ] . Cell Cycle, 2010, 9 ( 14 ) : 2705.
- [ 10 ] Viré E, Brenner C, Deplus R, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation [ J ] . Nature, 2006, 439 ( 7078 ) : 871-874.
- [ 11 ] Wan L, Li X, Shen H, et al. Quantitative analysis of EZH2 expression and its correlations with lung cancer patients' clinical pathological characteristics [ J ] . Clin Transl Oncol, 2013, 15 ( 2 ) : 132-138.
- [ 12 ] Coe BP, Thu KL, Aviel-Ronen S, et al. Genomic deregulation of the E2F/Rb pathway leads to activation of the oncogene EZH2 in small lung cancer [ J ] . PLoS One, 2013, 8 ( 8 ) : e71670.
- [ 13 ] Oike T, Okiwara H, Amornwachet N, et al. Chromatin-regulating proteins as targets for cancer therapy [ J ] . Journal of Radiation Research, 2014, 55 ( 4 ) : 613-628.
- [ 14 ] Hwang-Verslues WW, Chang PH, Jeng YM, et al. Loss of corepressor PER2 under hypoxia up-regulates OCT1-mediated EMT gene expression and enhances tumor malignancy [ J ] . Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110 ( 30 ) : 12331-12336.
- [ 15 ] Xu K, Wu ZJ, Groner AC, et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent [ J ] . Science, 2012, 338 ( 6113 ) : 1465-1469.
- [ 16 ] Hajósi-Kalcakosz S, Dezső K, Bugyik E, et al. Enhancer of zeste homologue 2 ( EZH2 ) is a reliable immunohistochemical marker to differentiate malignant and benign hepatic tumors [ J ] . Diagn Pathol, 2012, 7 : 86.
- [ 17 ] Ma R, Wei Y, Huang X, et al. Inhibition of GSK 3 $\beta$  activity is associated with excessive EZH2 expression and enhanced tumour invasion in nasopharyngeal carcinoma [ J ] . PLoS One, 2013, 8 ( 7 ) : e68614.
- [ 18 ] Ogata R, Matsueda S, Yao A, et al. Identification of polycomb group protein enhancer of zeste homolog2 ( EZH2 ) -derived peptides immunogenic in HLA-A24<sup>+</sup> prostate cancer patients [ J ] . Prostate, 2004, 60 ( 4 ) : 273-281.
- [ 19 ] Steele JC, Torr EE, Noakes KL, et al. The polycomb group proteins, BMI-1 and EZH2, are tumour-associated antigens [ J ] . Br J Cancer, 2006, 95 ( 9 ) : 1202-1211.
- [ 20 ] Komohara Y, Harada M, Arima Y, et al. Anti-cancer vaccine candidates in specific immunotherapy for bladder carcinoma [ J ] . Int J Oncol, 2006, 29 ( 6 ) : 1555-1560.
- [ 21 ] Komohara Y, Harada M, Arima Y, et al. Identification of target antigens in specific immunotherapy for renal cell carcinoma [ J ] . J Urol, 2007, 177 ( 3 ) : 1157-1162.
- [ 22 ] Itoh Y, Komohara Y, Komatsu N, et al. New peptides of the polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 with the potential to induce cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes in human leukocyte antigen-A2+prostate cancer patients [ J ] . Oncol Rep, 2007, 18 ( 5 ) : 1231-1237.
- [ 23 ] Felix NJ, Allen PM. Specificity of T-cell alloreactivity [ J ] . Nat Rev Immunol, 2007, 7 ( 12 ) : 942-953.
- [ 24 ] Thiel U, Pirson S, Müller-Spahn C, et al. Specific recognition and inhibition of Ewing tumor growth by antigen-specific allo-restricted cytotoxic T cell [ J ] . BR J Cancer, 2011, 104 ( 6 ) : 948-956.
- [ 25 ] Hayashi S, Kumai T, Matsuda Y, et al. Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate and enhancer of zeste homolog 2 as immunotherapeutic targets for lung cancer [ J ] . J Transl Med, 2011, 9 : 191.

( 责任编辑 狄艳红 )