

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 雄太郎

本研究は急性骨髄性白血病において最も高頻度に見られる DNMT3A 変異について、不明な点が多い病態維持への関与の解明および特異的な治療法の開発について、ヒト急性骨髄性白血病細胞株を CRISPR-Cas9 システムを用いた遺伝子編集により野生型へと修復した細胞株を用いて詳細な解析を行い、さらにゲノムワイド CRISPR-Cas9 ノックアウトライブラリーを用いて、細胞増殖および生存に関わる遺伝子群のスクリーニングを行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. OCI-AML2, OCI-AML3 の DNMT3A 変異修復細胞株(OCI-AML2^{WT}、OCI-AML3^{WT}) について、もとの変異株と変異修復株の間で増殖能には差がみられなかった。また、血清濃度依存性の差があるか OCI-AML3^{Mut}、OCI-AML3^{WT} に関して α -MEM にウシ胎仔血清を 20%、10%、5%、1% と希釈系列で培養し、増殖の変化を見たが、明らかな差はみられず、コロニー形成能に関しても同様であった。このように血清濃度依存性やコロニー形成能、増殖能に関しては変異株と変異修復株の間で変化はみられなかった。
2. DNMT3A 遺伝子変異が生じることで、メチル化能の低下が局所的に生じることにより特定の遺伝子の発現の変化が生じる可能性が示唆されており、特に HOX クラスター遺伝子については、マウスモデルや細胞株を用いた報告でメチル化の低下が生じることが報告されている。公共データベースの TCGA Acute Myeloid Leukemia (LAML) データセットから、急性骨髄性白血病の DNMT3A 変異陽性および HOXA 遺伝子のメチル化状態、発現量を可視化したところ、興味深いことに DNMT3A 変異陽性 AML では HOXA 遺伝子群の特定の領域において低メチル化と発現量が亢進している傾向がみられた。そこで、本実験で作成した OCI-AML3 細胞株でもメチル化の状態に変化が生じているかどうか、パイサルファイトシーケンスにより検証した。HOXA5 に関しては 10 の CpG 領域のうち、変異修復前の段階から全てメチル化シトシン(10/10)であり、変異修復細胞株についても同様(10/10)であった。HOXA9 に関しては、変異修復前の細胞株については 13 の CpG 領域のうち、変異修復前は全て非メチル化シトシン(0/13)であり、変異修復後の細胞株については標的領域の増幅ができておらず評価困難であったが、読み取れる範囲では一部でメチル化された CpG 領域があるものと思われた。いずれの遺伝子も RT-PCR の結果は、OCI-AML3^{Mut} と比較し OCI-AML3^{WT} で僅かに発現量が低下しており、メチル化状態と関連している可能性が考えられた。

3. 作成した細胞株を用いてゲノムワイド CRISPR-Cas9 スクリーニングを行ったところ、DNMT3A^{Mut}細胞株特異的に依存度が高い複数の遺伝子を抽出した。その中で、INO80C, MCM6, CNOT2, NBPF1, HSD17B10 についてノックダウンベクターによる増殖能の変化について検証したところ、INO80C で OCI-AML3^{Mut}の増殖が OCI-AML3^{WT}よりも僅かに低下する傾向を示した。コロニーアッセイでも同様の傾向を確認した。

以上、本論文は DNMT3A 変異陽性 AML 細胞株の変異を遺伝子編集により修復しても、増殖そのものには影響しないことを明らかにした。また、ゲノムワイド CRISPR-Cas9 スクリーニングによって、特定の遺伝子が DNMT3A 変異陽性 AML にとって DNMT3A 野生型の AML よりも依存度が高く、合成致死をきたす遺伝子として治療標的になる可能性を示し、クロマチンリモデリング因子である INO80C をそうした傾向を持つ候補遺伝子の一つとして明らかにした点について、DNMT3A 変異陽性 AML の病態解明および治療に関して重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士(医学)の学位請求論文として合格と認められる。