

博士論文(要約)

Investigation of therapeutic target of

DNMT3A-mutant acute myeloid leukemia

(DNMT3A 変異陽性急性骨髄性白血病に対する新規治療

標的の探索)

鈴木 雄太郎

【序文】

AML の遺伝子異常は大規模な調査で DNA メチル化に関わる酵素である DNMT3A 遺伝子異常が 14~22%の割合で陽性となることが分かっており、複数の報告で予後不良因子として再発率や全生存率で負に影響していることが示されている。また、最近では DNMT3A 変異は単独で白血病を引き起こす変異ではなく、前白血病幹細胞クローンを形成し、かつ拡大させる因子の一つとして注目されており、AML 以外にも骨髄異形成症候群や骨髄増殖性腫瘍、T 細胞急性リンパ性白血病、再生不良性貧血など多岐にわたる造血器疾患でも認められることが報告されている。一方で大規模なシーケンス解析の結果から、健常者においても 70 歳以上の高齢者では 5~10%程度に DNMT3A 変異が認められることが明らかになっており、こうした知見から DNMT3A 変異は多くの造血器疾患の病態形成における最初の細胞遺伝学的イベントの一つと考えられている。この様に AML で最も高頻度に見られる遺伝子異常の一つであるにも関わらず、これを標的とした治療は未だに存在しない。DNMT3A 遺伝子の異常が AML で高頻度に認められ、予後不良因子であることなどが明らかになっている一方で、AML の発症や維持にどう関わるかについては不明な点も多い。我々は DNMT3A 変異遺伝子が AML の病態維持・進行に何らかの影響を持っているはずで、同時に特異的な合成致死経路や脆弱性を有するのではないかと仮説を立て、CRISPR-Cas9 スクリーニングを用いて DNMT3A 変異陽性 AML に対する新規治療標的の探索を行った。

【結果】

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、バ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。

【考察】

本研究では、まず CRISPR-Cas9 により DNMT3A 変異陽性白血病細胞株である OCI-AML2 および OCI-AML3 の DNMT3A 変異そのものを修復することで AML の増殖能に影響があるかどうかを調べたものの、特に目立った変化はみられなかった。そこで次に治療標的の探索という観点から、DNMT3A 変異陽性 AML に対する脆弱性がないか、ゲノムワイド CRISPR ノックアウトライブラリーを用いてスクリーニングを行った。スクリーニング結果から複数の候補を抽出して増殖能に与える影響の検証を行い、INO80C 遺伝子のノックダウンにより DNMT3A 変異陽性 AML 細胞株においてコロニー形成能が低下する傾向がみられた。

本研究の結果から、DNMT3A 変異陽性 AML において、DNMT3A 変異そのものは AML の増殖能には必須ではないことが明らかになった。一方でスクリーニングの結果からは、特定の遺伝子が DNMT3A 変異陽性 AML にとって DNMT3A 野生型 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が考えられた。