

審査の結果の要旨

氏名 藪下知宏

本研究は、実臨床で用いられているエピゲノム薬（DNA脱メチル化薬およびHDAC阻害剤）の急性骨髄性白血病(AML)に対する作用機序ならびに耐性機構を明らかにするため、主にマウス白血病細胞を用いたCRISPR活性化スクリーニング系にてアプローチを行い、下記の結果を得た。

1. DNA脱メチル化剤(Decitabine (DAC)・Azacitidine (AZA)) と HDAC 阻害剤 (Vorinostat (SAHA)) の *in vitro* における AML 細胞株での AUC 値は公共データベース(CTD<sup>2</sup>)においていずれの薬剤も AML 細胞株で他の細胞株よりも AUC 値が有意に低く、特に DAC において顕著な差を認めた。また、2 次性白血病において、*de novo* AML 細胞と比較して DAC の AUC 値が有意に低かった。実際に複数の AML 細胞株を用いた薬剤感受性試験でも同様に、2 次性白血病は *de novo* AML 細胞と比較して約 20 倍の感受性上昇を認めた。
2. DAC・SAHA の感受性/抵抗性を付与するパスウェイを同定するために、マウス二次性白血病 (MDS/AML) 細胞株(ASXL1 変異/SETBP1 変異共発現細胞株, cSAM 細胞)に Suntag システム(CRISPR activation)を導入した Suntag-cSAM 細胞を作成後、全ゲノムを対象とする機能獲得型 CRISPR スクリーニングをおこなった。その結果、SAHA の抵抗性因子に関しては、Myc・Myb・Trib1 などの複数の転写因子が治療抵抗性因子として抽出され、HDAC 阻害剤の作用機序ならびに抵抗性には HDAC 阻害剤の転写活性化が大きく関わっていることが示唆された。一方で、DAC の抵抗性を規定するパスウェイとして有糸分裂制御機構、特に有糸分裂後期における染色体分配に関わる遺伝子群 (Cdk1, Cdc20, Cdca8, Dsn1) が抽出された。特に、2 次性白血病において、DAC が忠実な染色体分配を標的としていることが示唆された。
3. FACS 解析により、cSAM 細胞ならびに多くのヒト AML 細胞において広範な DNA 異数性および多数性が誘導されることを明らかにした。また、DAC による異数性および多数性の程度は、TP53 変異の有無と有意に相関した。さらに、DNA 異数性・多数性の変化のみならず、mCherry-hCdt1 (30/120)を導入した白血病細胞株を用いて G1 期の 4 倍体細胞が増加していること、これらは異常な細胞質分裂を呈していることを確認した。

4. DAC による染色体分配異常を引き起こす機序を明らかにするため、DAC 処理による DNMT1 タンパク質の発現および局在の変化を調べたところ。多くの白血病細胞株において、DAC は可溶性核分画中の DNMT1 タンパク質を顕著に減少させたが、クロマチンに結合した DNMT1 タンパク質は維持され、これは 5-Aza-DNMT1-DNA adducts (DNMT1 と chromatin の異常な共有結合)を反映すると考えられた。CRISPR/Cas9 による DNMT1 遺伝子ノックアウト(DNMT1-KO)ならびに DNMT1-KO 細胞株への DAC 添加では、4 倍体・異数性/多数性細胞の顕著な増加は見られなかった一方で、レトロウイルスを用いて導入された Dnmt1 過剰発現 AML 細胞において、顕著な DAC への感受性増強ならびに有糸分裂異常の増強を確認した。また、5-Aza-DNMT1-DNA adducts の形成に関わるとされる Dnmt1C1229S 変異体を導入した細胞では上記の現象が減弱した。これらの結果から、5-aza-DNMT1-DNA adducts の存在が、non-epigenetic (DNA methylation-independent) な機序で直接的に有糸分裂異常を引き起こし、AML (特に 2 次性 AML) における DAC 感受性上昇の主な要因になっていると考えられた。また、DAC 処理では有糸分裂中期において姉妹染色分体の結合不全の頻度が有意に増加した。さらに、UHRF 依存的な DNA 複製・DNA メチル化が再現可能な *Xenopus* の無細胞系において、5-aza-dCTP の添加はコヒーシン複合体構成因子である SMC3 ならびに SCC1 のクロマチン結合を顕著に低下させた。生体内での検証は十分ではないが、この現象は DNA 脱メチル化薬がもたらす有糸分裂異常の一つの要因であると考えられた。
5. 最初のスクリーニングにおいて同定された染色体分配において必須な分子(CDC20, CDCA8, CDK1)の薬理的阻害は、一部の白血病細胞において DAC と相乗的に有糸分裂期の細胞死を誘導した。さらに、DAC の治療抵抗性経路として、コレステロール代謝経路も同定された。実際にヒト白血病細胞を用い、コレステロール低下作用を有する複数の HMG-CoA 還元酵素阻害薬と相乗的な細胞増殖抑制・分化誘導を確認した。これらの併用療法は、DAC の治療抵抗性を改善する一助となることが期待される。

以上、本文はSuntagシステムを用いたCRISPR activation screenにより、DNA脱メチル化薬の主要な作用機序はDNA脱メチル化ではなく、5-Aza-DNMT1-DNAが均等な染色体分配を妨げることが大きく関与していることを明らかにした。また、一部の白血病細胞においては有糸分裂を標的としたDACとの併用療法が有効であることを示した。本研究の結果は、骨髄系腫瘍の治療薬として重要なbackboneとなったDNA脱メチル化薬の作用機序・耐性機構についての正しい理解ならびに、DNA脱メチル化薬のbiomarkerの同定や併用療法の開発に大きな貢献をなすとえられる。

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。