

博士論文（要約）

骨髄系腫瘍に対するエピゲノム治療薬の
作用機序および耐性機構の解明

藪下 知宏

近年、ゲノム解析技術の進歩に伴い、急性骨髄性白血病（AML）ならびに骨髄異形成症候群（MDS）では、エピジェネティクス因子をはじめとする遺伝子異常が同定された。それに伴い、造血器腫瘍では他の固形腫瘍に先立って複数のエピゲノム薬が開発・臨床応用されている。

DNA 脱メチル化剤（DNA-hypomethylating agents: HMA）は、FDAにおいて最初に承認されたエピゲノム薬であり、Decitabine や Azacitidine が AML および MDS に対して実臨床で用いられている。HMA は、DNA 複製依存的に DNA に取り込まれた後に DNMTs との不可逆的な共有結合を形成し、ユビキチン-プロテアソーム系を介した DNMTs の分解、そして最終的に DNA 脱メチル化を誘導する。AML や MDS を含めた多くの癌において、正常細胞とは異なる DNA メチル化パターンがみられるが、HMA 投与により解除されることで、癌抑制遺伝子の再活性化や分化を誘導することが、最初の報告から 40 年間にわたり HMA の主な作用機序と考えられてきた。一方で、どのがん抑制遺伝子の再活性化が重要なのか、またどのようにして分化が誘導されるのか、など詳細な作用機序は不明である。そのうえ、治療効果は今なお不十分であり、新規併用療法の開発などの治療成績向上が望まれる。

ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤は、HMA と並んでほぼ同時期に注目されたエピゲノム薬であり、HDAC による脱アセチル化反応を阻害する。これまでの多くの研究から、HDAC 阻害剤はヒストンアセチル化の亢進を介した種々の発がん抑制に働く遺伝子群の発現促進、ならびにヒストン以外の種々の重要な機能をもつ蛋白質のアセチル化を介した機能変化により、抗腫瘍効果を示すと考えられている。一方で、これまで HDAC 阻害剤単剤ならびに併用にて多くの臨床試験が行われてきたが、骨髄系腫瘍における臨床応用には至っておらず、骨髄系腫瘍に対する HDAC 阻害剤の治療抵抗性の機序の解明も急務である。

したがって、本研究の目的は AML および MDS に対する HDAC 阻害剤（Vorinostat）・DNA 脱メチル化剤（Decitabine）の作用機序の解明ならびに併用療法の開発である。

はじめに、DNA 脱メチル化剤（Decitabine・Azacitidine）と HDAC 阻害剤（Vorinostat）の *in vitro* における AML 細胞株での感受性を公共データベース（DepMap）を用いて評価したところ、いずれの薬剤も AML 細胞株で他の細胞株よりも有意に低く、DAC において特に顕著な差が見られた。さらに、DAC の AML に対する AUC 値が他の固形癌と比較して幅広く分布していることに着目して、DAC の感受性規定因子の同定を試みた。その結果、DAC の AUC 値は DNMT1 発現と有意に相関したが、DNMT3B や DNMT3A の発現とは

相関しなかった。また、CRISPR ノックアウトおよび RNAi スクリーニングにおける DNMT1、DNMT3A、DNMT3B のノックアウトおよび発現抑制による細胞増殖抑制効果とも相関しなかった。この点は、Decitabine が DNMT 阻害剤、DNA 脱メチル化剤として以外の作用点がある可能性を示唆する。臨床的観点では、二次性白血病（先行する造血器腫瘍、または化学療法・放射線療法の曝露歴あり）において、de novo AML 細胞と比較して DAC の AUC 値は有意に低かった。私達が行った複数の AML 細胞株を用いた薬剤感受性試験でも二次性白血病は de novo AML 細胞と比較して約 20 倍の感受性を認めた。

上記のような Decitabine・Vorinostat の感受性/抵抗性を付与する遺伝子またはパスウェイを同定するために、全ゲノムを対象とする機能獲得型 CRISPR スクリーニングを計画した。当研究室にて樹立された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) に Suntag システム (CRISPR/Cas9 を応用し内在性遺伝子発現の強い活性化を可能にした系) を導入した Suntag-cSAM 細胞を作成し、任意の遺伝子が活性化可能なことを確認した。Genome-wide CRISPR-dCas9 activation library を Suntag cSAM 細胞に導入した後、Vorinostat および Decitabine にて薬剤処理を 1 週間おこない、回収したサンプルの DNA 抽出・PCR 増幅にてサンプルを調製し、それぞれの薬剤投与直前ならびに投与開始 1 週間後の sgRNA の増減を次世代シーケンサーにて比較した。スクリーニングの結果、Vorinostat の抵抗性因子に関しては、既報と合致するような 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た。Decitabine については、感受性を規定する遺伝子として複数の先行研究で報告されている DCK (Deoxycytidine Kinase: Decitabine を細胞内で最初に代謝する律速段階酵素) や Slc29a1 (Solute Carrier Family 29 Member 1 : Decitabine の細胞内取り込みに必要な核酸トランスポーター) が抽出された一方で、治療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) を同定した。

そこで Decitabine がどのように染色体分配に影響を与えるか、FACS 解析により DNA 倍数性を評価したところ、スクリーニングに使用した cSAM 細胞のみならず、ほとんどすべてのヒト AML 細胞においても広範な DNA 異数性および多数性を誘導することを明らかにした。また、Decitabine 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異常な細胞質分裂 G1 期の 4 倍体細胞が増加していることを確認した。

Decitabine 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、Decitabine 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。MDS-L-2007 細胞において、DAC は核分画中の 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 タンパク質はむしろ増加させた。"核分画における DNMT1 の減少"または"クロマチン分画における DNMT1 の増加"のどちらが有糸分裂異常に寄与するかを明らかにするために、CRISPR/Cas9 システムを用いて DNMT1 遺伝子ノックアウトした細胞を作製した

うえで、Decitabine で処理した。予想外なことに、DNMT1 ノックアウトならびに DNMT1 ノックアウト細胞株への Decitabine 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 Decitabine 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。これらの結果から、DNMT1 と chromatin の異常な共有結合(5-aza-DNMT1-DNA adducts)こそが、non-epigenetic (DNA methylation-independent) な機序で直接的に有糸分裂異常を引き起こすことと考えられた。

また、DAC 処理では有糸分裂中期における染色体標本において姉妹染色分体の結合不全の頻度が MDS-L-2007 細胞ならびに THP1 細胞において有意に増加した。さらに、UHRF 依存的な DNA 複製が再現可能な *Xenopus* の無細胞系において、5-aza-dCTP の添加は SMC3 ならびに SCC1 (コヒーシン複合体の構成分子) 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 Decitabine 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る。

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、有糸分裂期において Decitabine と相乗的に細胞死を誘導した。さらに、Decitabine 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 HMG-CoA 還元酵素阻害薬(Simvastatin)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、Decitabine の治療抵抗性を改善する一助となることが期待される。

【結語】

CRISPR-dCas9 活性化システムを用いた全ゲノムスクリーニングにより、DNA 脱メチル化薬ならびに HDAC 阻害剤に対し、それぞれ有糸分裂制御機構ならびに転写活性化が主要な治療抵抗性であると示した。また、DNA 脱メチル化薬は、二次性 AML や TP53 変異を有する AML を中心に DNMT1-DNA の異常な共有結合が有糸分裂異常を誘導し作用していること、この脆弱性を利用して CDK1 阻害剤・CDC20 阻害剤・AURKB 阻害剤・HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (スタチン) と Decitabine の併用療法が AML の治療において有効であることを示した。