

博士論文

急性骨髄性白血病の治療抵抗性に寄与する  
遺伝子変異の同定

本 田 晃

# 急性骨髄性白血病の治療抵抗性に寄与する遺伝子変異の同定

所属：血液・腫瘍内科

指導教員：黒川 峰夫

本田 晃

## 目次

【目次】 .....	1
【要旨】 .....	2
【序文】 .....	3
【研究方法】 .....	7
【結果】 .....	27
【考察】 .....	64
【結論】 .....	68
【謝辞】 .....	69
【参考文献】 .....	70

## 【要旨】

治療抵抗性の急性骨髄性白血病 (AML)は多剤併用化学療法が無効であり、その予後は不良である。本研究では、当科において集積した治療抵抗性 AML の腫瘍サンプルを用いて次世代シーケンサーによる変異解析を行うことにより、治療抵抗性 AML では治療感受性 AML に比較して *BCOR* 変異の出現頻度が有意に高いことを明らかにした。また *BCOR* をノックアウトしたヒト白血病細胞株においては抗がん剤感受性が低下することを示した。これらの結果から、*BCOR* 変異が AML の治療抵抗性に寄与している可能性があり、新たな治療標的として有望であると考えられた。

## 【序文】

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML)は造血器悪性腫瘍の一種で、未熟な造血前駆細胞が腫瘍化することによって発症すると考えられている。骨髄中での白血病細胞のモノクローナルな異常増殖により正常造血が著しく抑制され、顆粒球減少、貧血、血小板減少に伴う多彩な症状を呈する。顆粒球減少による感染症、血小板減少による出血傾向、凝固障害による出血、臓器不全、また白血病細胞の臓器浸潤などの症状が認められ、診断後速やかに適切な治療がなされない場合には致死的となりうる重篤な疾患である。

従来、AML の診断は形態学的な特徴に基づいた French-American-British (FAB)分類に従ってなされてきた[1]。近年においては染色体分析の発展によってAML に特徴的な染色体異常が同定されるに伴い、形態学的特徴に加えて染色体異常も加味した新しい診断基準が用いられるようになってきている[2]。特に頻度の高い染色体異常としては、 $t(15;17)(q24.1;q21.1)$ 、 $t(8;21)(q22;q22)$ 、 $inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)$ などが挙げられ、これらの異常を有するAML は形態学的な特徴を共有するとともに有意な予後規定因子であることも報告されており診断における重要性が高まっている[3][4][5][6]。また、現在ではその他にも多くの染色体異常と臨床的特徴や予後との相関が報告されており、今後さらに細分化された分類がなされていくと考えられる[7][8][9][10][11][12][13]。従来治癒を目的としたAML に対する治療には多剤併用化学療法が行われている。

現在主流となっているのはイダルビシン (idarubicin: IDR)もしくはダウノルビシン(daunorubicin: DNR)などのアントラサイクリン系抗がん剤とシタラビン(cytarabine, AraC)による2剤併用化学療法 (IDR/DNR+AraC)であり、世界的にも標準治療となっている[14][15]。本邦における大規模臨床試験によると IDR+AraCによる初回寛解導入療法により 78.2%の症例は完全寛解 (complete remission: CR)に至り、5年生存率は48%と比較的良好な治療成績が報告されている[16]。特に AML の中でも一部の予後良好群においては、IDR+AraCによる初回寛解導入療法に引き続き大量 AraC 療法による地固め療法を数コース行うことにより、化学療法のみで治癒する症例が存在することも明らかとなってきている[17][18]。一方、寛解導入療法により CR に至ったもののその後再発した症例や、寛解導入療法により CR に至らなかった症例については、その後の多剤併用化学療法に対しても抵抗性であることが多い。このような難治性 AML に対しては造血幹細胞移植を含めた救援療法が試みられているが、今のところ十分な治療効果は得られておらず[19][20][21][22][23][24]、白血病の診療を進める上で未だに大きな問題となっている。

近年、次世代シーケンサーを用いた解析により新規の白血病関連遺伝子の発見や、腫瘍のクローン進化に関する新たな知見が相次いで報告されてきている。2008年にヒトの腫瘍に対する初めての全ゲノムシーケンスが AML の検体を用いて行われ[25]、以降 AML の新たな原因遺伝子の候補が数多く報告

されている[26][27][28][29]。2013年には米国の National Cancer Institute (NCI) 主導の大規模がんゲノム解析プロジェクトである The Cancer Genome Atlas (TCGA) より初発 (de novo) AML 200 例における全ゲノム/エクソン解析の結果が報告され de novo AML における遺伝子異常がほぼ明らかとなった(Figure 1) [30]。これらの全ゲノム/エクソンシーケンスにより得られた大量のデータは、上述した染色体異常に加えて遺伝子異常を加味することによるさらに詳細な予後因子の抽出、頻度の高い遺伝子異常に対する特異的な新規治療薬の開発など AML 治療の進展に大きく寄与することが期待されているが、現状においては臨床的なブレイクスルーには未だ至っていない。その原因の一つとして、全ゲノム/エクソンシーケンスが明らかにしたように AML 自体が分子学的にも極めて多様性に富んだ疾患であるため、こうした網羅的ゲノム解析から得られる大量の情報と各症例の詳細な臨床情報を結び付け、そこから意義を見出すことが困難になっている点が挙げられる。今後、次世代シーケンサーによるゲノム解析で得られた大量のデータを実際に臨床へ直結させていくためには、臨床的な観点から対象症例を絞り込んでいくことが重要な手法となりうると考えられた。そこで私は AML の中でも臨床的に最も予後が悪いとされる治療抵抗性 AML に注目し、これらの症例に絞って全エクソンシーケンスによる変異解析を行うことで AML の治療抵抗性に寄与する遺伝子変異を同定することを目的とし、本研究を開始することとした。

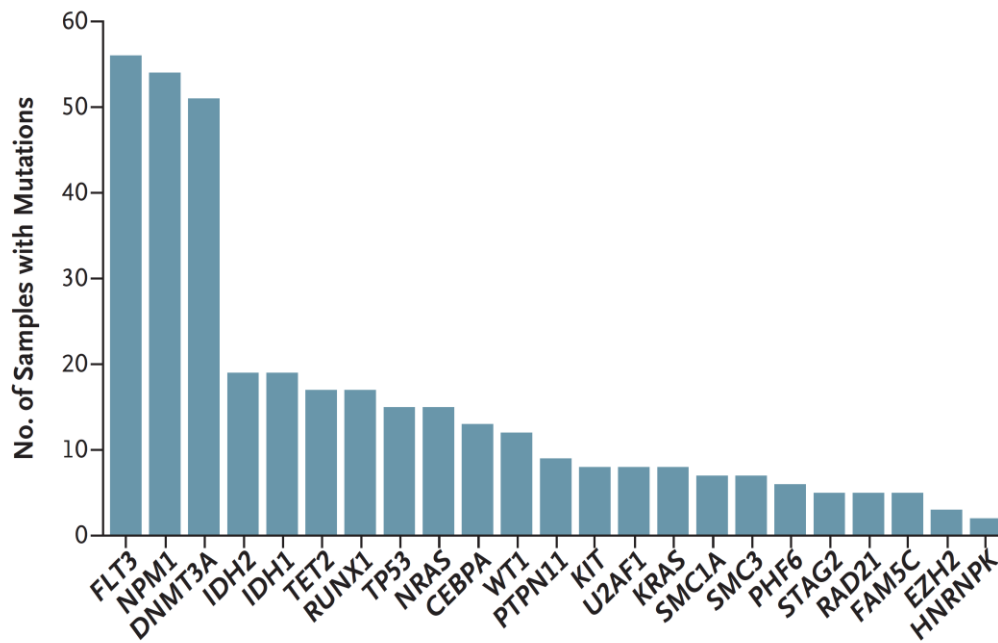


Figure1. TCGA による de novo AML200 検体における全ゲノム・エクソン解析

de novo AML における遺伝子変異の種類、頻度はほぼ明らかとなりつつある。

## 【研究方法】

### 1. 対象検体の選定

本研究は東京大学 ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を受けて施行された（造血器腫瘍における遺伝子異常の網羅的解析 承認番号: 2341）。

東京大学医学部附属病院血液・腫瘍内科において AML (急性前骨髄性白血病を除く)と診断され、2回の寛解導入療法 (IDR: 12 mg/m<sup>2</sup> for 2-3 days AraC: 100 mg/m<sup>2</sup> for 5-7 days)によっても CR に至らなかった治療抵抗性 AML の 6 症例を探索群 (discovery cohort)として選定し、初発時および治療不応期のサンプルより genomic DNA (gDNA)を抽出し全エクソン解析を行った。さらに discovery cohort において検出された候補遺伝子をさらに多数例で解析することを目的として、のべ 68 例の AML を検証群(validation cohort)として選定し、初発時、治療不応期、再発時などのサンプルより gDNA を抽出した。また各検体に対応する正常 gDNA として頬粘膜もしくは CD3 陽性 T 細胞より gDNA を抽出して、腫瘍サンプルに対する正常コントロールとした。

### 2. 患者検体からの gDNA 抽出

患者検体からの gDNA 抽出は QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて行った。白血病細胞を含む骨髄液を採取直後に Pancoll (PAN BIOTECH)を用いて



密度勾配遠心分離法により単核球層を分離・回収し-80度のディープフリーザーに凍結保存した。gDNA抽出直前に凍結検体の一部を融解し上記のキットを用いてgDNAを抽出した。使用する細胞数は少なくとも $1 \times 10^5$ 細胞以上を目標とした。回収した細胞を200  $\mu$ Lのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)に再懸濁したのち、上記のキットによりメーカー推奨のプロトコールに従ってgDNAを抽出し、最終的に50  $\mu$ Lの溶出バッファーに溶出した。抽出したgDNAはNanodrop (thermo fisher scientific)およびQubit (thermo fisher scientific)を用いて精製度の確認、核酸濃度の定量を行った。凍結単核球から十分量のgDNAが抽出できなかった症例においては、骨髓塗抹標本からのgDNA抽出を行った。抽出はQIAamp DNA Mini Kit および QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN)を用いてプロトコールを一部改変して行った。スライドガラスに塗抹されている骨髓標本を剥離し、1.5 mLのエッペンチューブに回収した。200  $\mu$ LのBuffer ATL、20  $\mu$ Lのproteinase Kを添加し十分にボルテックスした後、ヒートブロックにて70度で3時間インキュベートした。さらに200  $\mu$ LのBuffer ALを添加しボルテックスした後、ヒートブロックにて56度で10分間インキュベートした。200  $\mu$ Lの100%エタノールを加えボルテックスした後、上記のキット付属のQIAamp MinElute Columnに添加した。以降はメーカー推奨のプロトコールに従ってgDNA抽出を行い、最終的に30  $\mu$ Lの溶出バッファーにて溶出した。

### 3. 次世代シーケンサーによる解析

#### [3-1] 探索群 (discovery cohort)における全エクソン解析

6例の治療抵抗性 AML の初発時、治療不応期の gDNA とそれに対応する正常 gDNA について計 18 サンプルを用いて全エクソン解析を行った。100 ng の gDNA と Ion AmpliSeq Exome Kit (Life technologies)を用いてメーカー推奨のプロトコール通りにシーケンス用のライブラリ作製を行った。調整したライブラリは 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)を用いて定量を行った後 100 pM に希釈した。完成したライブラリは Ion OneTouch 2 (Life technologies)および Ion Proton (Life technologies)を用いてメーカー推奨のプロトコール通りにシーケンスを行った。得られたシーケンスリードは Ion Torrent Server (Life technologies)のソフトウェア Torrent Suite にてヒトリファレンス配列 (hg19)にマッピングを行った。変異解析は Ion Torrent Server より得られた BAM ファイルを用いて Ion Proton/PGM 専用の変異解析ソフトである Ion Reporter (Life technologies)により行った。Workflow は”AmpliSeq Exome tumor-normal pair”を用いて解析を行った。Ion Reporter にて解析後の TSV ファイルをダウンロードし、以下の条件に該当する変異は除去した。

- ・アミノ酸置換を伴わない変異
- ・coverage が 20 未満の変異
- ・dbSNP138 において minor allele frequency (maf) > 0.01 以上の変異

- variant allele frequency (VAF) が 0.1 未満の変異
- 正常 DNA において VAF が腫瘍サンプルの 1/2 以上の変異
- Human Genetic Variation Browser (HGVD)の single nucleotide polymorphism (SNP)データベースにて集団の 1%以上に認める変異

最終的に残った変異を各腫瘍サンプルにおける体細胞変異の候補とした。

### [3-2] Discovery cohort において検出された変異の確認

[3-1]で検出された変異について、変異の確認のために同一の gDNA を用いて Ion PGM を用いたターゲットリシーケンスによる確認を行った。各サンプルから検出された変異について Ion AmpliSeq Designer (Life technologies)を用いて multiplex PCR 用のプライマーを設計した。10ng の gDNA と Ion AmpliSeq Library Kits 2.0、上記の multiplex 用のプライマーを用いてメーカー推奨のプロトコール通りにシーケンス用のライブラリ作製を行った。調整したライブラリは 2100 Bioanalyzer にて定量後に 100pM に希釈した。完成したライブラリは Ion OneTouch 2 および Ion PGM (Life technologies)を用いてメーカー推奨のプロトコール通りにシーケンスを行った。得られたシーケンスリードは Ion Torrent Server (Life technologies)のソフトウェア Torrent Suite にてヒトリファレンス配列 (hg19)にマッピングを行った。変異解析は Ion Torrent Server より得られた BAM ファイルを用いて Ion Proton/PGM 専用の解析ソフトである Ion Reporter (Life

technologies)により行った。Workflow は”AmpliSeq Exome tumor-normal pair”を用いた。また Ion Reporter 上で下記の条件で変異の絞り込みを行った。

- Allele Ratio 0.05~1.0
- Allele Read Count 10~100000
- Alternative Allele Count 6~100000
- Location utr-3, exonic-nc, splicesite-3, exonic, splicesite-5, utr-5, missense, nonframeshiftInsertion, nonframeshiftDeletion, nonframeshiftBlockSubstitution, nonsense, stoploss, frameshiftInsertion, frameshiftDeletion, frameshiftBlockSubstitution
- UCSC Common SNP Not In
- Filtered Coverage 10~100000

得られた変異の内、HGVD の SNP データベースにおいて集団の 1%以上で検出された変異は除去した。最終的に残った変異を各サンプルにおける体細胞変異の候補としてリストを作成した。6 症例のうち 1 例は頬粘膜由来の正常 gDNA でのシーケンスができなかったため腫瘍サンプルのみで解析を行った。

#### 4. ヒト白血病細胞株の培養

ヒト白血病細胞株である Kasumi-1、THP-1、ME-1 を RPMI1640 培地 (nacalai tesque)に 10% ウシ胎仔血清(FCS; 和光純薬)、100 unit/mL ペニシリン (Penicillin; Sigma-Aldrich)、100 µg/mL ストレプトマイシン (Streptomycin; Sigma-Aldrich)を添加し、37 度、5%CO<sub>2</sub> の環境下で培養し各種実験に用いた。

またヒト白血病細胞株である OCI-AML2 を MEM $\alpha$  (和光純薬)に 20%FCS、100 unit/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを添加し、37 度、5%CO<sub>2</sub> の環境下で培養し各種実験に用いた。以降、「通常の場合で培養を行った」と記載した場合はこの培養条件を指すこととする。

#### 5. ヒト白血病細胞株への遺伝子導入

##### [5-1]レトロウイルスベクターによる遺伝子過剰発現細胞株の樹立

レトロウイルスパッケージング細胞株である PLAT-A を 10%FCS、100 unit/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した DMEM (high glucose)培地 (nacalai tesque)にて 37 度、5%CO<sub>2</sub> の環境下で培養した。導入する遺伝子の全長 cDNA は正常ヒト骨髄より SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific)を用いてメーカー推奨のプロトコール通りに抽出した cDNA より polymerase chain reaction (PCR)反応にて増幅し作製した。PCR 反応試薬は KOD FX Neo (TOYOBO)をメーカーのプロトコールに従い使用した。PCR

のプライマーには 5 末端側に FLAG タグを 1 コピーコードする配列をタグ付けした。PCR 後の cDNA を制限酵素 BamHI-EcoRI サイトを用いて pMX-neo に ligation high (TOYOBO)を用いてライゲーションを行った。ライゲーション後の産物を用いてコンピテントセルである DH-5  $\alpha$  の形質転換を行った。形質転換後の菌液を 1  $\mu$ g/mL Ampicillin in LB plate に播種した。37 度で 16 時間培養後に得られたシングルコロニーを爪楊枝にて採取し 1  $\mu$ g/mL Ampicillin in LB 培地 2 mL にて 37 度で 16 時間培養した。プラスミド抽出には miniprep を PI-50 Automatic DNA isolation system (KURABO)を用いて行った。このプラスミドを鋳型として、BigDye Direct Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いてメーカー推奨のプロトコール通りに sequencing PCR 反応、カラムによる精製、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems)による塩基配列の同定を行った。目的の配列を有することが確認できたプラスミドの抽出に用いた菌液を、再度 1  $\mu$ g/mL Ampicillin in LB 培地 250 mL にて 37 度で 16 時間培養した。その後 Plasmid DNA purification kit (NucleoBond Xtra Midi / Maxi) (TAKARA)を用いてプラスミドを抽出し、遺伝子過剰発現用のプラスミドとして以降の実験に使用した。変異体の過剰発現ベクターは、上記のプラスミドを鋳型として KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO)を用いて、メーカー推奨のプロトコール通りに目的とする変異を発現するベクターを作成した。また上記と同様の手順にてダイレクトシーケンシングを行い、変異が正しく導入されていることを確認した。

PLAT-A 細胞には empty vector、目的とする遺伝子の野生型、目的とする遺伝子の変異型をそれぞれ PEI 法により遺伝子導入し一過性発現させ、約 48 時間後にウイルスを含む培地を回収し、レトロネクチン (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS) をコーティングした 12 well plate に播種し、ウイルスをプレートの底面に付着させるため 2070 G、32 度、2 時間の遠心を行った。その後プレートを PBS で洗浄後に細胞株を  $1 \times 10^5$  cell/well の密度で播種した。増殖を観察しながら 48-72 時間後に感染細胞を回収し通常の状態での培養を継続した。感染細胞株が対数増殖期となったタイミングで G418 (nacalai tesque) による薬剤セレクションを開始した。G418 の濃度は 1.0 mg/mL とした。2-3 週間のセレクションの後、得られた細胞を安定発現株として以降の実験に使用した。実験に使用したプライマーは下記の通りである。

GBP4 cDNAクローニング用プライマー	
Forward	GCCGGATCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGGTGAGAGAACTCTTCACGCTGC
Reverse	GCCGCGGCCGCTTAAATACGTGAGCCAAGATATTTTGTCCCTACTC
GBP4 K547R変異導入用プライマー	
Forward	GGAAGTTGGAGGAGGAAAAGGGAAAAC
Reverse	TCTCCATTTGGGCCATGTATTCCTG
GBP4 インサート配列確認用プライマー	
GBP4_47_F	AGTGCCACACACCAGGTTATC
GBP4_396_F	GAATGACTCGTGGATCTTTGC
GBP4_902_F	GACCCTGAGAGAGGGAATCA
GBP4_1406_F	GCTAGTGCCAGAAAAGGAG
GBP4_249_R	GCTTTCCTGCAAGACGATTC
GBP4_760_R	TTCGGTTTTCGGAAGAAATG
GBP4_1254_R	GCAGCACAAAGTCTCCCTTC
GBP4_1746_R	GCATTTCTTCTTGTACCTTCAGC
GBP4_1895_R	AGCCCCAGGTAGAGTGACAA



[5-2]レトロウイルスベクターによる内因性遺伝子のノックダウン

内因性遺伝子のノックダウンには short hairpin RNA (shRNA)による遺伝子ノックダウンシステムを用いた。Clontech RNAi Designer を用いて対象となる遺伝子を標的とする 3 種類のオリゴヌクレオチドを作成し、レトロウイルスベクターである RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen (takara)に制限酵素 BamHI、EcoRI による切断の後、ligation high (TOYOBO)を用いてライゲーションを行った。また実験のコントロールとしてルシフェラーゼを標的としたベクターを同様の手順で作成した。以降は過剰発現ベクターと同様の手順でプラスミドの増幅と配列の確認、細胞株への感染を行った。感染細胞株は BD FACSAria II (BD Biosciences)を用いて ZsGreen 陽性細胞をソートし通常の条件で培養した。2 回継代した後に再度 ZsGreen 陽性細胞をソートし、得られた細胞を安定発現株として以降の実験に使用した。実験に使用したプライマーは下記の通りである。

BCOR shRNA1	
Forward	gatccGCCACCATGTACAGTGTGTTTTCAAGAGAAACACACTGTACATGGTGGTTTTTTACGCGTg
Reverse	aattcACGCGTAAAAAACCACCATGTACAGTGTGTTTCTCTTGAAAACACACTGTACATGGTGGCg
BCOR shRNA2	
Forward	gatccGATGGCTTCAGTGCTATATTTCAAGAGAAATATAGCACTGAAGCCATCTTTTTTACGCGTg
Reverse	aattcACGCGTAAAAAAGATGGCTTCAGTGCTATATTTCTCTTGAAATATAGCACTGAAGCCATCg
BCOR shRNA3	
Forward	gatccGCAAAAAGCATGTCGCTGAATTCAAGAGATTCAGCGACATGCTTTTTGCTTTTTTACGCGTg
Reverse	aattcACGCGTAAAAAAGCAAAAAGCATGTCGCTGAATCTCTTGAATTCAGCGACATGCTTTTGCg

### [5-3]CRISPR/Cas9 システムによる内因性遺伝子のノックアウト

CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>)を用いて対象となる遺伝子を標的とするオリゴヌクレオチドを設計した。pSpCas9(BB)-2A-GFP を制限酵素 BBSI により切断した後、ligation high を用いてベクターとオリゴヌクレオチドのライゲーションを行った。以降は過剰発現ベクターと同様の手順でプラスミドの増幅と配列の確認を行った。細胞株への導入には NEPA21 (Nepa Gene)を用いてエレクトロポレーション法により行った。エレクトロポレーション後の細胞株は 48 時間培養した後に BD FACSAria II を用いて GFP 陽性細胞をソートした。単一細胞由来クローン樹立のために、GFP 陽性細胞を 1 細胞/100  $\mu$ L となるよう希釈し 96 well プレートに 100  $\mu$ L ずつ播種し通常の状態にて培養を行った。2-3 週間培養を継続した後に増殖が見られた株を回収しダイレクトシーケンス法により塩基配列の決定を行った。全てのアレルにおいてフレームシフト変異もしくはナンセンス変異を認めるクローンをノックアウト細胞株として以降の実験に使用した。また実験のコントロールには、遺伝子改変がおきなかったクローンを使用した。実験に使用したオリゴヌクレオチドの配列は下記の通りである。

BCOR CRISPRベクター用オリゴヌクレオチド配列		BCOR10F	GGCAGGTACCAACAAAGAGAA
Forward	CACCGagctgtgaacgtccatac	BCOR10R	CTCTTACTGGCCACATTGCATA
Reverse	AAACgtagtgggaacgtcacagctC	BCOR11F	AAAAAGGTTGCTTAAAGGGATAGAG
pSpCas9(BB)-2A-GFPインサート配列確認用プライマー		BCOR11R	TTGCATACAGACAGACATTCTCTT
Forward	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC	BCOR12F	TCATAAGCTGTGGTTGGTTTTG
Reverse	CTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTG	BCOR12R	TGTCCCAGGAAACTATCTTTCA
BCOR ゲノム配列確認用プライマー		BCOR13F	CAGCTGTCAATAGCAGATTACCTT
BCOR1F	TCTGCATCCTTTATGAATCACC	BCOR13R	CCCCTACCGACTCTGTCTAC
BCOR1R	CTGTAAATCAAGAGCGGCCTAC	BCOR14F	CAAAAGCAGAGACCAGTGACC
BCOR2F	CGGAGGGTTAAGGACAGTTTA	BCOR14R	CCTGCCACATCTTCGTTGA
BCOR2R	AGGAAGGCAAGACTGGAAGAG	BCOR15F	TGAAGCCGCTCCAGTGAT
BCOR3F	CCTGCTTTAACCCTTTGTGCT	BCOR15R	CCTCTAGGACAGGGGAGTGAC
BCOR3R	CGAGTCGAGGAAAGGGTAGAT	BCOR16F	AGGAATAAAGTGCCCTCTCTCCA
BCOR4F	ATACAAAACACCGCCTGGAATA	BCOR16R	GATGTGGAGGGGGCTGAG
BCOR4R	GGGTGGGAAGGTGGACTC	BCOR17F	CTAAATGATGCTGTCCCTGTCA
BCOR5F	CCTATCCTCACATCCAGAACAG	BCOR17R	TGTGCTTACAGTCACCCTCTGT
BCOR5R	GTGGGAGCCATCTTTTTCAT	BCOR18F	TAGGAGGCTCAGTACCCAAGGT
BCOR6F	AGCGGTTCAAGACAGAAAAG	BCOR18R	CACTCGGCTGCTCTCCTAAA
BCOR6R	CATCTGCATTGGCATTGG	BCOR19F	GCTGAGAAAGAGGAAGACAGGA
BCOR7F	CTGAAAAACAAGGCATTGGACT	BCOR19R	GAGCAGCTCAGCTAGTTTTCAA
BCOR7R	TTGGTAGGTCACAACTCTGGA	BCOR20F	ACTGGAAGCAGGACTCACTTG
BCOR8F	CTGAGGGCATTGCTGTAAAGTC	BCOR20R	GTTCGTGGACAGTTAAGGAGGT
BCOR8R	CTCTCTCAGGGCGATGAAATC	BCOR21F	GGGAGCAGAATGAAAGGACAT
BCOR9F	TGCTAAAACCTGACACAAACGTG	BCOR21R	TTTCTAAGTCCTTCTGACTGGAGTA
BCOR9R	GAATCGGTCACCCACGTAAC		

## 6. 定量リアルタイム PCR による遺伝子導入の確認

NucleoSpin RNA (takara)を用いて total RNA を抽出後、これを鋳型として ReverTra Ace (TOYOBO)により逆転写反応を行い cDNA を合成した。定量リアルタイム PCR 反応は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)と LightCycler480 (Roche)を用いたインターカレーター法で行った。全ての定量リアルタイム PCR 反応は実験誤差の補正のため triplicate で行った。全てのウェルについて融解曲線解析により PCR 合成産物の特異性を確認した。遺伝子発現量の比較は比較 Ct 法を用いて行った。以下に使用したプライマーの配列を示す。

18s rRNA	
Forward	GAATCGAACCCCTGATTCCCCG
Reverse	CGGCGACGACCCATTCGAAC
GBP4-1	
Forward	GAATCGTCTTGCAGGAAAGC
Reverse	GGCAAAGATCCACGAGTCAT
GBP4-2	
Forward	AAGCTGATTCCAGGCAAGAA
Reverse	CAGGGTCTTGGTCTTTGCAT
BCOR-1	
Forward	TTCACAGCTGGATGAACAGC
Reverse	CGTTGTGGTTCAAGGGATTC
BCOR-2	
Forward	CATAGTGCTTGTGGA ACTCCG
Reverse	GGACACAGCTCTCCTGTTGC
BCOR-3	
Forward	CCCCACCCATGTTAACCACT
Reverse	ACACTCCCCCTAGCTATTGAGG

## 7. ウェスタンブロットによる遺伝子導入の確認

$1 \times 10^6$  個の細胞を用いて細胞からのタンパク質抽出を行った。目的とする細胞を Lysis Buffer (1 % NP-40, 15 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , Protease inhibitor cocktail (Roche)) にて溶解し  $4^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベートした。溶解液を 21500 g で 10 分間遠心分離したのち上清をタンパク溶液として回収した。さらに上清の 1/3 量の sample buffer (0.1 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10 % glycerol, 0.01 % bromophenol blue, 10 % 2-mercaptoethanol) を加え、 $95^\circ\text{C}$  で 5 分間煮沸しタンパク質の変性を行った。得られたタンパク溶液を用いて SDS-PAGE (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) を行った後に、ゲルから Polyvinylidene Difluoride (PVDF) 膜へタンパク質の転写を行った (25V、2 時間)。転写後の PVDF 膜は 5 % スキムミルクにてブロッキングを行い、1000 倍希釈した一次抗体で  $4^\circ\text{C}$ 、16 時間、さらに二次抗体で室温、1 時間反応させた後、ImmunoStar (Wako) にて目的タンパク質を発光させ LAS4000 (FUJI Film) にて検出を行った。

1 次抗体 : Anti-BCoR, Rabbit-Poly (Bethyl laboratories),  $\beta$ -actin antibody (Cell Signaling Technology)

2 次抗体 : goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology)

## 8. 抗がん剤感受性試験

遺伝子導入を行ったヒト白血病細胞株を用いて抗がん剤感受性試験を行った。細胞数のカウントには血球計算盤を用いた標準トリパンブルー色素除去法、Countess II (Life technologies)による自動セルカウント、ATP 発光試薬とプレートリーダーTriStar2 LB942 (BERTHOLD TECHNOLOGIES)を用いた方法の3種類で検討を行った。標準トリパンブルー色素除去法、自動セルカウント法においては、対数増殖期にある細胞株を24 ウェルプレートに1 ウェルあたり25000細胞ずつ播種し、各ウェルには0, 5, 10, 20, 50, 100 nMの濃度でAraCを添加した。通常の培養条件で48時間培養した後、各ウェル毎に生細胞数を計測した。各濃度における測定値を、濃度0 nMにおける測定値で割った数値を各濃度における増殖率 (relative cell growth)とした。ATP 発光試薬とプレートリーダーを用いた方法においては、対数増殖期にある細胞株を $5.2 \times 10^4$ /mLに希釈し384 ウェルプレートに24  $\mu$ Lずつ播種した。各ウェルには0, 10, 50, 100, 500, 1000, 10000 nMのAraCもしくはIDRを添加した。通常の培養条件で48時間培養した後、細胞のATP試薬 (TOYO INK) 25  $\mu$ Lを各ウェルに添加し、室温にて10分インキュベート後にTriStar2 LB942 (BERTHOLD TECHNOLOGIES)を用いてメーカー推奨のプロトコール通りに発光量の測定を行った。各濃度における測定値を、濃度0 nMにおける測定値で割った数値を各濃度における増殖率(relative cell growth)とした。

## 9. 検証群(validation cohort)におけるターゲットリシーケンス(治療不応期)

Discovery cohort にて検出された体細胞変異についてさらに多数例で解析するために 45 例の AML 検体を用いてターゲットリシーケンスを行った。対象サンプルは、2 回の寛解導入療法で治療抵抗性と判断された AML 症例の治療不応期の検体 18 サンプル、寛解導入療法により CR に至るも、その後再発した症例の治療不応期の検体 27 サンプルを用いた。計 50 遺伝子の全 coding sequence (CDS)領域をターゲットとして、Ion AmpliSeq Designer にて multiplex PCR 用のプライマーを設計した。10 ng の gDNA と Ion AmpliSeq Library Kits 2.0、上記のプライマーを用いてメーカー推奨のプロトコール通りにシーケンス用のライブラリ作製を行った。シーケンスは[3-2]と同様の手順で行った。得られたシーケンスリードは Ion Torrent Server (Life technologies)のソフトウェア Torrent Suite にてヒトリファレンス配列 (hg19)にマッピングを行った。変異解析は Torrent Suite のプラグイン variantCaller を用いて行った。variantCaller より得られた変異の一覧である VCF ファイルを Ion Reporter にて情報付与 (annotation)を行った (Workflow: Annotate variants single sample v4.4)。また Ion Reporter 上で下記の条件で変異の絞り込みを行った。

- Allele Ratio: 0.05~1.0
- Allele Read Count: 10~100000
- Alternative Allele Count: 6~100000

- Location: utr-3, exonic-nc, splicesite-3, exonic, splicesite-5, utr-5
- variant effect: missense, nonframeshiftInsertion, nonframeshiftDeletion, nonframeshiftBlockSubstitution, nonsense, stoploss, frameshiftInsertion, frameshiftDeletion, frameshiftBlockSubstitution
- UCSC Common SNP: Not In
- Filtered Coverage:50~100000

得られた変異の内、VAF が 0.1 未満の変異、HGVD の SNP データベースにおいて集団の 1%以上で検出された変異は除去した。最終的に残った変異を各サンプルにおける体細胞変異の候補としてリストを作成した。

#### 10. 検証群 (validation cohort)におけるターゲットリシーケンス(初発時)

[8]で検出された変異についてさらに初発時のサンプルを用いてターゲットリシーケンスを行った。サンプルは治療抵抗性 AML の初発時の検体 15 サンプル、CR に至った AML の初発時の検体 35 サンプル、計 50 サンプルを用いた。[8]で検出された治療抵抗性に寄与する可能性の高い 1 つの遺伝子について、Ion AmpliSeq Designer にて全 CDS 領域に対する multiplex primer を設計した。以降は[8]と同様の手順で行った。



## 11. ダイレクトシーケンス法による変異の確認

上記の[8]および[9]にて検出された体細胞変異は、さらにダイレクトシーケンス法にて変異の検証を行った。腫瘍由来の gDNA、正常由来の gDNA をともに鋳型として使用した。gDNA 5 ng を鋳型として GoTaq Master Mix (Promega)を用いて PCR (polymerase chain reaction)反応を行った。PCR 条件は、熱変性 98 度 2 分、熱変性 96 度 30 秒+アニーリング 58 度 30 秒+伸長反応 72 度 1 分を 40 サイクル、最後に伸長反応を 72 度で行った。得られた PCR 溶液を illustra Exo ProStar (GE Healthcare Life Sciences)を用いて精製した後、BigDye Direct Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いてメーカー推奨のプロトコール通りに sequencing PCR 反応、カラムによる精製、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems)によるキャピラリーシーケンスを行った。得られた塩基配列データは CLC Sequence Viewer 7 (CLC bio)および Chromas lite を用いて解析した。

## 12. 細胞増殖能の評価

遺伝子導入を行った細胞株を用いて細胞増殖率の変化について解析を行った。

各細胞を  $5 \times 10^4$  個/mL の濃度に調整し 24well プレートに 500  $\mu$ L ずつ播種し通常の条件にて培養を行った。培養開始から 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目、5 日目にそれぞれ細胞数を測定した。細胞数の測定には血球計算盤を用いた標準トリパンブルー色素除去法を用いた。

## 13. アポトーシス解析

遺伝子導入を行ったヒト白血病細胞株を用いて抗がん剤投与後のアポトーシス細胞の割合の変化について解析を行った。annexin V-APC apoptosis detection kit (eBioscience)および 7-AAD Viability Staining Solution (BioLegend)をメーカー推奨のプロトコールに従って使用した。アポトーシス細胞の割合は BD FACS Aria II を用いて計算した。

#### 14. 統計解析

患者由来のサンプルにおける各群間の体細胞変異の出現頻度の比較には **chi-square test** を用いた。細胞株を用いた実験においては、独立した実験を 3 回以上行ったものについては平均値±標準偏差の形式で記載し、統計学的有意差は **unpaired t-test** を用いて評価した。生存期間の解析は統計解析ソフトウェア **EZR** を用いて **log-rank test** により比較した。

## 【結果】

### 1. Discovery cohort における全エクソン解析

今回全エクソン解析を行った 6 症例を表に示す(Table1)。6 症例の初発時、治療不応期、正常コントロールそれぞれのサンプルを用いて施行した全エクソン解析 (計 18 サンプル)において、各サンプルは平均 96.8 リードの深度でシーケンスされ、各サンプルにおけるターゲット領域(全エクソン領域)のカバー率は平均 94.2%であった。腫瘍サンプルからは合計で 696 個の体細胞変異が検出された。さらにこれら 696 個の変異に対して Ion PGM を用いた deep sequence による変異の確認を行った。各サンプルは平均 4857.0 リードの深度でシーケンスされた。各サンプルにおけるターゲット領域(全エクソン領域)のカバー率は平均 93.1%であった。Figure 1 で示したように AML において最も高頻度に認められる変異は *DNMT3A*, *FLT3*, *NPM1* であるが、今回はこれらの変異は検出されなかった。*FLT3* の変異は大部分が internal tandem duplication であり数 bp-100bp 程度の挿入であり、*NPM1* は数塩基の欠失もしくは挿入である。これらの変異は、挿入・欠失の検出感度が低いとも言われている Ion Proton/PGM を用いた今回の検出系においては見逃されている可能性も考えられる。また *DNMT3A* は 1 塩基の置換が多く認められるが、AML 全体における出現頻度は 20-25%程度であり、治療抵抗性 AML という特殊な一群を解析していることも考慮すると今回検出されなかったとしても既報と比較して大きな矛盾ではないと考えられる。最終的に計

50 個の体細胞変異が検出され、2 症例以上で重複する変異は認めなかった (Figure 2, 3) (Table 2, 3)。初発時と比較し治療不応期において VAF が大きく増加している変異は認めなかったが、1 症例において、治療前に検出されていない guanylate binding protein 4 (*GBP4*)の K547R 変異が治療後に新たに検出された。今回変異が検出されたこの 50 遺伝子の中に治療抵抗性に寄与する遺伝子があると考えられ、これらの遺伝子の変異についてさらに多数例で解析することとした。

patientID	sex	age	subtype	chromosome	induction
W1	M	71	AML M2	46, XY, add(15)(p11.2)	2+5
W2	M	67	AML M2	46, XY, t(8;21)	3+7
W3	M	37	AML M2	normal	3+7
W4	M	50	AML M2	normal	3+7
W5	F	65	AML M5b	normal	3+7
W6	F	65	AML M2	normal	2+5

Table 1. 全エクソン解析を行った 6 症例(discovery cohort)

2+5: IDR 2days + AraC 5days    3+7: IDR 3days + AraC 7days

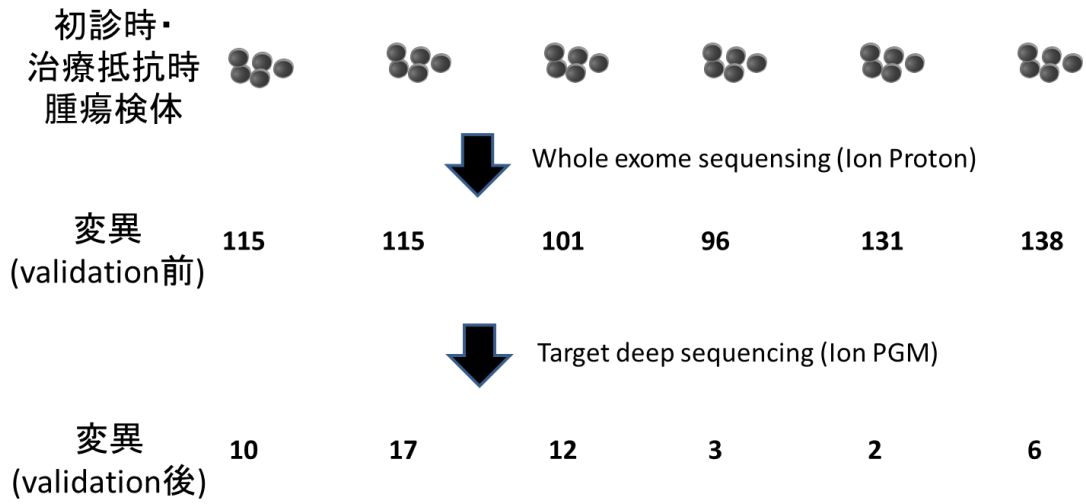


Figure 2. Discovery cohort における全エクソン解析およびターゲットリシーケンス

6 症例から計 50 個の遺伝子変異が検出された。各症例間で重複する変異は検出されなかった。

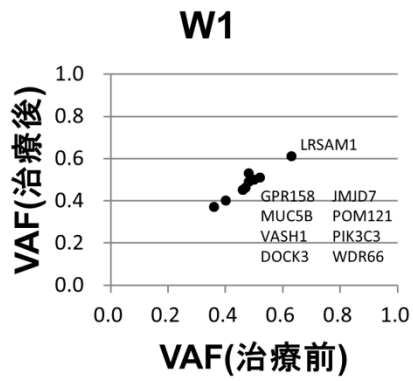
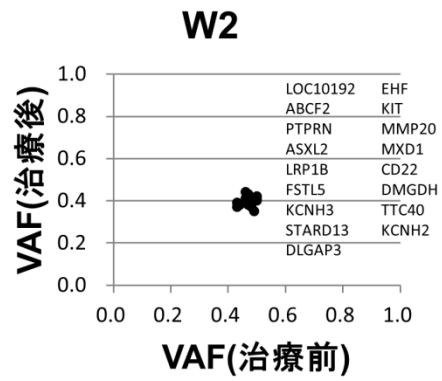
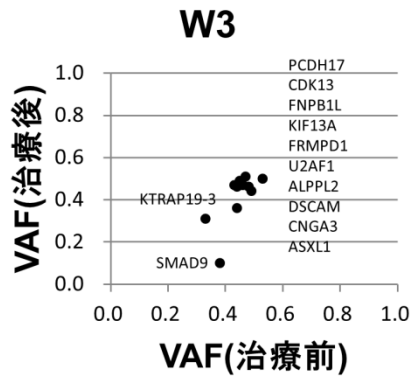
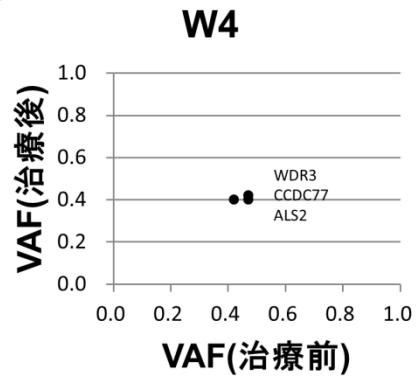
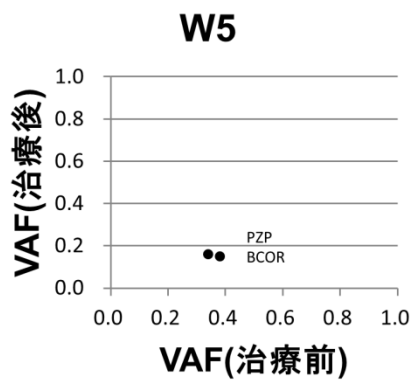
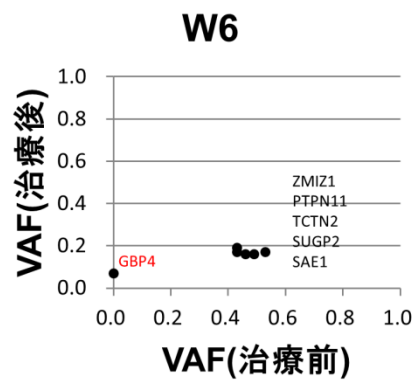
**A****B****C****D****E****F**

Figure 3. (A)-(F) 各症例における治療前後の VAF の推移を示した。横軸は治療前、縦軸は治療後の VAF を示している。初発時と比較し治療不応期に VAF が大きく増加している変異は認めなかった。 (F) 治療前には検出されなかった *GBP4* 変異が治療後に新たに検出された。



patient ID	gene	type	VAF	function	protein
W1	LRSAM1	SNV	0.61	missense	p.Arg716His
W1	GPR158	SNV	0.53	missense	p.Asn991Asp
W1	MUC5B	SNV	0.51	missense	p.Ala4404Gly
W1	VASH1	SNV	0.50	missense	p.Arg364Gly
W1	DOCK3	SNV	0.49	missense	p.Met988Thr
W1	JMJD7	SNV	0.46	missense	p.Gln883Leu
W1	POM121	SNV	0.45	missense	p.Tyr756His
W1	PIK3C3	SNV	0.45	missense	p.Gln423Glu
W1	WDR66	INDEL	0.40	missense	p.Gly62Gf
W1	WDR66	SNV	0.37	missense	p.Glu61Lys
W2	LOC101926905	SNV	0.44	missense	p.Ser150Pro
W2	ABCF2	SNV	0.43	missense	p.Arg178Gln
W2	PTPRN	SNV	0.42	missense	p.Gln423His
W2	ASXL2	INDEL	0.41	nonsense	p.Arg741Ser
W2	LRP1B	SNV	0.41	missense	p.Lys3099Ile
W2	FSTL5	SNV	0.41	missense	p.Arg175Pro
W2	KCNH3	SNV	0.41	missense	p.Gly780Ala
W2	STARD13	SNV	0.41	missense	p.Asn494Ser
W2	DLGAP3	SNV	0.40	missense	p.Val681Met
W2	EHF	SNV	0.40	missense	p.Lys210Arg
W2	KIT	SNV	0.39	missense	p.Asp816Val
W2	MMP20	SNV	0.39	missense	p.Ser65Asn
W2	MXD1	SNV	0.38	missense	p.His71Tyr
W2	CD22	SNV	0.38	missense	p.Trp658Ser
W2	DMGDH	SNV	0.37	missense	p.Gly387Glu
W2	TTC40	SNV	0.37	missense	p.Val1049Ile
W2	KCNH2	SNV	0.35	missense	p.Val409Met
W3	PCDH17	SNV	0.51	missense	p.Arg223His
W3	CDK13	INDEL	0.50	frameshiftDeletion	p.Tyr1329fs
W3	FNBP1L	SNV	0.49	missense	p.Ala452Pro
W3	KIF13A	SNV	0.47	nonsense	p.Arg530Ter
W3	FRMPD1	SNV	0.47	missense	p.Arg133His
W3	U2AF1	SNV	0.47	missense	p.Ser34Phe
W3	ALPPL2	SNV	0.46	missense	p.His451Pro
W3	DSCAM	SNV	0.46	missense	p.Arg483His
W3	CNGA3	SNV	0.44	missense	p.Arg646Cys
W3	ASXL1	INDEL	0.36	frameshiftDeletion	p.Gln757fs
W3	KRTAP19-3	SNV	0.31	missense	p.Arg68Cys
W3	SMAD9	SNV	0.10	missense	p.Arg84His
W4	WDR3	SNV	0.42	missense	p.Ser13Asn
W4	CCDC77	SNV	0.40	missense	p.Arg428Gln
W4	ALS2	SNV	0.40	missense	p.Lys1281Asn
W5	PZP	INDEL	0.15	nonsense	p.Glu1415Ter
W5	BCOR	SNV	0.16	nonsense	p.Gln156Ter
W6	ZMIZ1	SNV	0.19	missense	p.Ala299Asp
W6	PTPN11	SNV	0.17	missense	p.Gly60Cys
W6	TCTN2	SNV	0.17	missense	p.Tyr425Cys
W6	SUGP2	SNV	0.16	missense	p.Arg431Ser
W6	SAE1	SNV	0.16	missense	p.Asn103Lys
W6	GBP4	SNV	0.07	missense	p.Lys547Arg

Table 2. 6 症例(discovery cohort)から検出された遺伝子変異の一覧

SNV: single nucleotide variant, INDEL: insertion and deletion, VAF: variant allele frequency

LRSAM1	ABCF2	MMP20	FRMPD1	CCDC77
GPR158	PTPRN	MXD1	TRIOBP	ALS2
MUC5B	ASXL2	CD22	U2AF1	PZP
VASH1	LRP1B	DMGDH	ALPPL2	BCOR
DOCK3	FSTL5	TTC40	DSCAM	ZMIZ1
JMJD7	KCNH3	KCNH2	CNGA3	PTPN11
POM121	STARD13	PCDH17	ASXL1	TCTN2
PIK3C3	DLGAP3	CDK13	KRTAP19-3	SUGP2
WDR66	EHF	FNBP1L	SMAD9	SAE1
LOC101926905	KIT	KIF13A	WDR3	GBP4

Table 3. 6 症例(discovery cohort)から体細胞変異が検出された遺伝子の一覧

6 症例の中で 2 症例以上に重複する遺伝子は認めなかった。これらの 50 遺伝子を治療抵抗性に寄与する遺伝子の候補として、さらに多数症例で変異の検索を行った。

## 2. GBP4 変異体過剰発現細胞株における抗がん剤感受性試験

1 で行った解析により、*GBP4* の遺伝子変異が治療抵抗性に寄与している可能性があると考えられた。*Guanylate binding protein (GBP)*はインターフェロン $\gamma$ により発現が誘導されるタンパク質として*GBP1-5*の5種類のアイソフォームが知られている。いくつかの報告により発癌や治療抵抗性との関連も指摘されているが[31][32][33]、*GBP4*と腫瘍との関連についてはこれまでに報告はない。*GBP4*変異とAMLの治療抵抗性との関連を調べるために、*GBP4 K547R*変異体を過剰発現するレトロウイルスベクターを作成しヒト白血病細胞株へ導入し、抗がん剤に対する感受性の変化を調べた。ヒト白血病細胞株である *kasumi-1*, *ME-1* に対して *GBP4* 野生型および *K547R* 変異体を過剰発現させ抗がん剤に対する感受性の変化を評価した。*GBP4* 野生型および変異体の発現確認は定量リアルタイム PCR にて行った (Figure 4)。細胞数の計測は血球計算盤 (Figure 5)、自動セルカウンター (Figure 6)、ATP 発光試薬による計測 (Figure 7, 8)をそれぞれ用いた。いずれの細胞株、薬剤においても抗がん剤感受性の変化は認めず、*GBP4 K547R* 変異体と抗がん剤感受性の関連は不明であった。

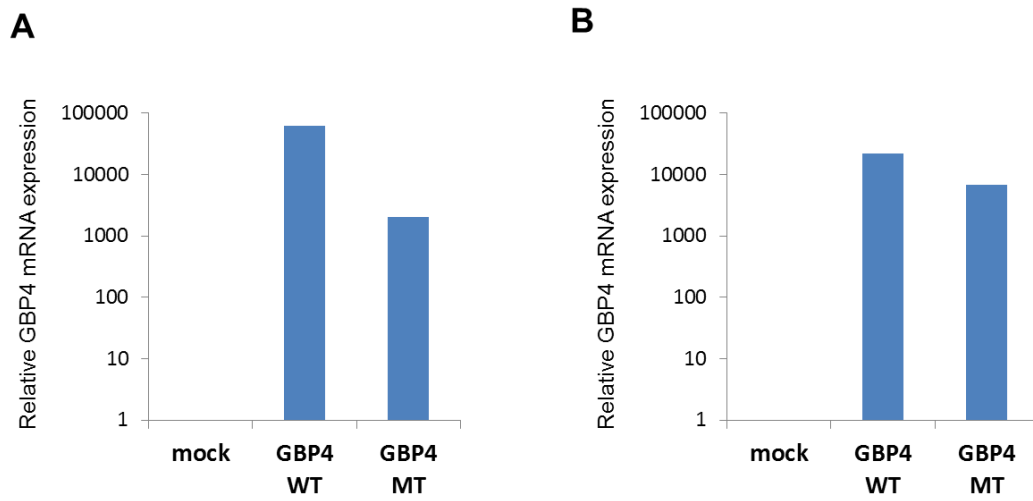


Figure 4. 定量リアルタイム PCR による GBP4 野生型および変異体の発現確認

(A) kasumi-1 (B) ME-1

WT: wild type, MT: mutant

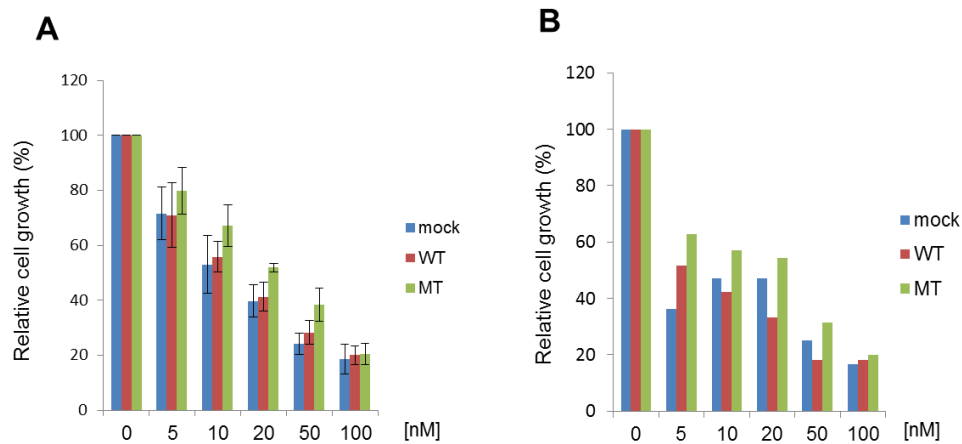


Figure 5. 血球計算盤を用いた抗がん剤感受性試験

(A) kasumi-1 (n=3) 平均値±標準偏差 (B) ME-1 (n=2) 平均値

GBP4の野生型(WT)および変異体(MT)を過剰発現させた細胞株にAraCを投与し48時間後に細胞数を計測した。どちらの細胞株においてもGBP4(K547R)の過剰発現による明らかな抗がん剤感受性の変化は認めなかった。

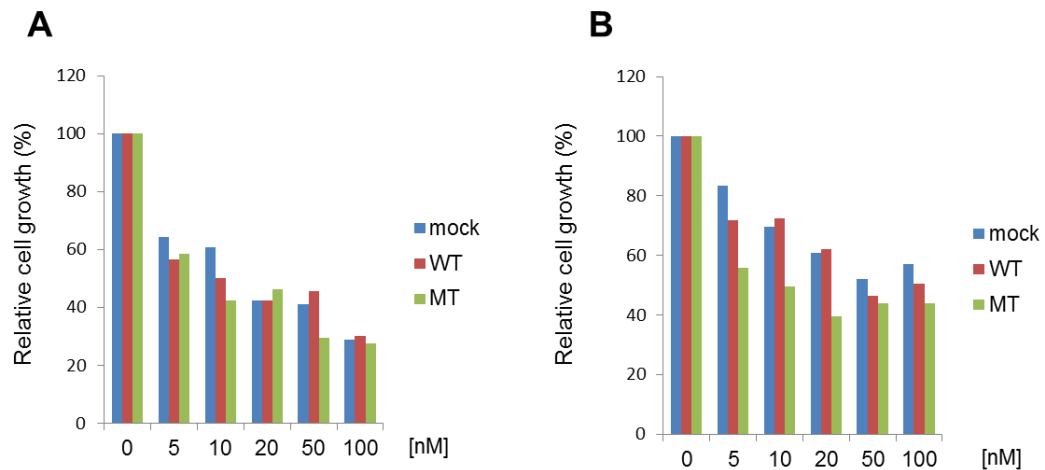


Figure 6. 自動セルカウンターを用いた抗がん剤感受性試験

A) kasumi-1 (n=1) B) ME-1 (n=1)

GBP4の野生型(WT)および変異体(MT)を過剰発現させた細胞株にAraCを投与し48時間後に細胞数を計測した。どちらの細胞株においてもGBP4(K547R)の過剰発現による抗がん剤感受性の変化は認めなかった。

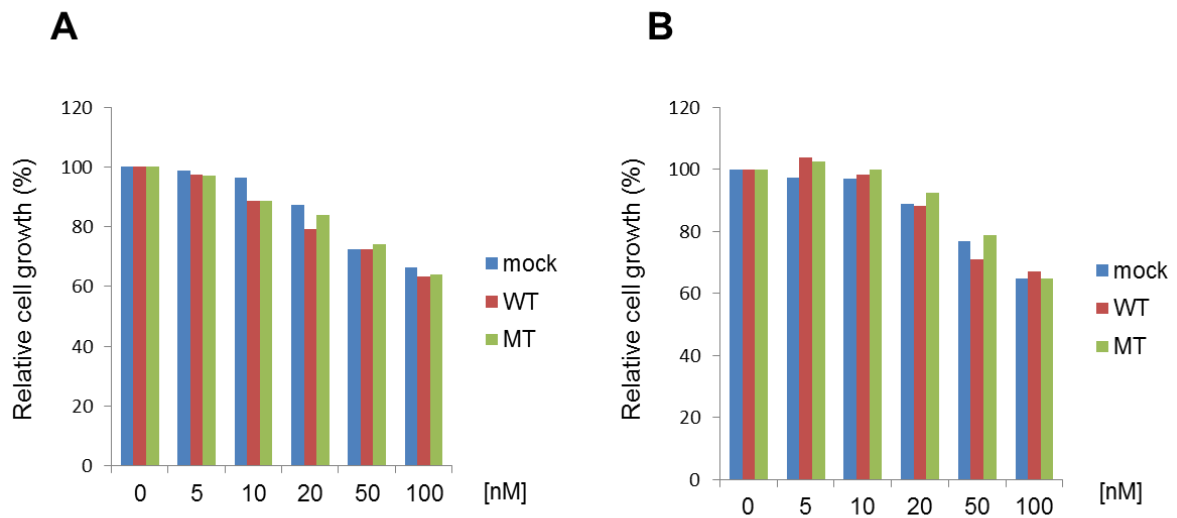


Figure 7. ATP 発光試薬を用いた抗がん剤感受性試験

A) AraC (n=1) B) IDR (n=1)

GBP4 の野生型(WT)および変異体(MT)を過剰発現させた kasumi-1 に AraC, IDR を投与し 48 時間後にプレートリーダーを用いて発光強度を測定した。どちらの抗がん剤においても GBP4(K547R)の過剰発現による抗がん剤感受性の変化は認めなかった。

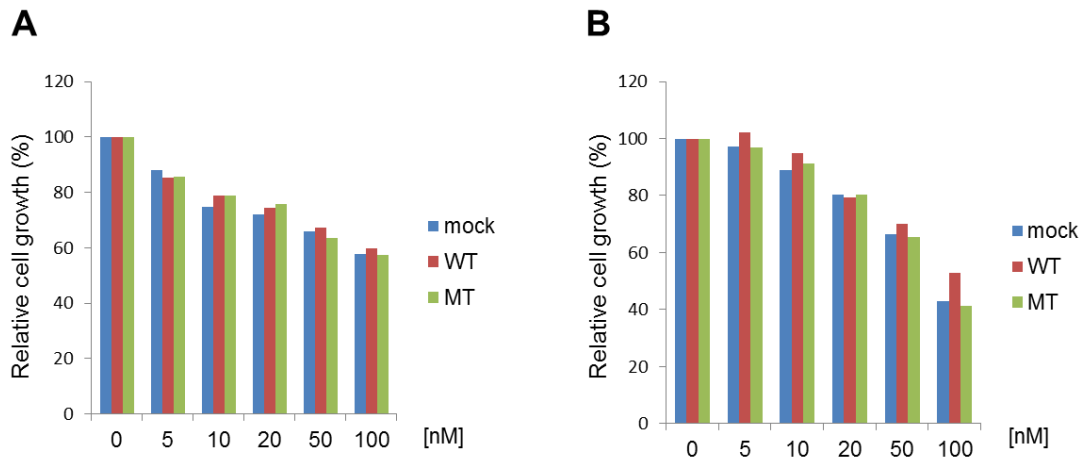


Figure 8. ATP 発光試薬を用いた抗がん剤感受性試験

A)AraC (n=1) B) IDR (n=1)

GBP4 の野生型(WT)および変異体(MT)を過剰発現させた ME-1 に AraC, IDR を投与し 48 時間後に発光強度を計測した。どちらの抗がん剤においても GBP4(K547R)の過剰発現による抗がん剤感受性の変化は認めなかった。



### 3. Validation cohort (治療不応期)におけるターゲットリシーケンス

治療抵抗性 AML18 例、再発 AML27 例の治療不応期のサンプルを使用し候補である 50 遺伝子(Table 3)の全 CDS 領域のターゲットリシーケンスを行った(Table 4)。その結果、複数症例で重複する遺伝子として BCL6 corepressor (*BCOR*)が抽出された (Table5)。*BCOR* は X 染色体上に位置する遺伝子であり、転写因子である BCL6 のコリプレッサーとして発見された。*BCOR* 変異は AML の特定のサブタイプにおいて出現頻度が高いことが報告されており、造血器腫瘍との関連が示唆されている[34]。今回の解析においては、治療抵抗性 AML18 例中 4 例、再発 AML27 例中 0 例において *BCOR* の変異が検出され、統計学的に有意に治療抵抗性 AML において *BCOR* 変異の出現頻度が高いことが示された ( $p=0.01$  by chi-square test)。これまでの報告によると、de novo AML における *BCOR* 変異の出現頻度はおおむね 1~4%程度であることが示されており[30][34]、このことから *BCOR* 変異が治療抵抗性に寄与している可能性が高いと考えられた。*BCOR* 変異の出現パターンは、過去に報告されている通り、ナンセンス変異、フレームシフト変異など不完全な *BCOR* タンパクが生成される truncate 型の変異であった (Table 6)。

patient ID	locus	gene	type	genotype	p-value	coverage	VAF	function	protein
R01	chr21:44524430	U2AF1	INDEL	T/TA	0.0103992	107	0.140186916	nonsense	p.Ser43Ter
R03	chr6:17852239	KIF13A	INDEL	C/CT	3.00E-04	63	0.174603175	frameshift	p.Val177fs
R03	chr2:141135762	LRP1B	SNV	T/C	2.47E-29	263	0.19391635	missense	p.Asp3542Gly
R04	chr9:37719159	FRMPD1	SNV	A/G	0	1994	0.47893681	missense	p.Ser168Gly
R04	chr4:162402264	FSTL5	SNV	C/A	0	769	0.477243173	missense	p.Ala506Ser
R05	chrX:39931966	BCOR	SNV	A/G	0	833	0.44057623	missense	p.Val878Ala
R05	chrX:39934133	BCOR	SNV	G/A	2.90E-58	1108	0.134476534	nonsense	p.Gln156Ter
R05	chr12:9304239	PZP	INDEL	T/TAA	2.48E-27	507	0.132149901	nonsense	p.Glu1415Ter
R06	chr2:233274335	ALPL2	SNV	A/C	0	1776	0.461711712	missense	p.His451Pro
R06	chr20:31022784	ASXL1	INDEL	CAGCCA/C	0	1226	0.374388254	frameshift	p.Gln757fs
R06	chrX:39923604	BCOR	SNV	G/A	9.53E-111	1525	0.155409836	nonsense	p.Arg1163Ter
R06	chr7:40134021	CDK13	INDEL	CACTT/C	0	1265	0.464031621	frameshift	p.Tyr1329fs
R06	chr2:99013569	CNGA3	SNV	C/T	1.46E-120	302	0.433774834	missense	p.Arg646Cys
R06	chr21:41711105	DSCAM	SNV	C/T	0	1960	0.460714286	missense	p.Arg483His
R06	chr1:94012478	FNBP1L	SNV	G/C	0	812	0.458128079	missense	p.Ala452Pro
R06	chr12:49951610	KCNH3	INDEL	A/AC	0.0465586	77	0.12987013	frameshift	p.Glu1043fs
R06	chr6:17826300	KIF13A	SNV	G/A	8.69E-91	266	0.398496241	nonsense	p.Arg530Ter
R06	chr21:31864074	KRTAP19-3	SNV	G/A	0	1514	0.440554822	missense	p.Arg68Cys
R06	chr2:220154949	PTPRN	INDEL	C/CG	0.0080724	200	0.105	stoploss	p.Ter980Ser
R06	chr21:44524456	U2AF1	SNV	G/A	2.44E-182	431	0.445475638	missense	p.Ser34Phe
R07	chr4:55599321	KIT	SNV	A/T	0	881	0.421112372	missense	p.Asp816Val
R07	chr2:141208209	LRP1B	INDEL	A/AT	0.0019143	152	0.151315789	frameshift	p.Cys3329fs
R07	chr2:70164511	MXD1	INDEL	TC/T	0	584	0.970890411	frameshift	p.Asp156fs
R08	chr12:550946	CCDC77	INDEL	GT/GTT	2.70E-168	217	0.723502304	frameshift	p.Asn444fs
R08	chr1:89651139	GBP4	INDEL	A/AT	0.0639735	87	0.126436782	frameshift	p.Met574fs
R08	chr12:9345311	PZP	SNV	A/C	0	926	0.543196544	missense	p.Cys427Gly
R08	chr4:83788032	SEC31A	SNV	G/C	1.22E-277	544	0.509191176	missense	p.Gln376Glu
R08	chr19:19135936	SUGP2	INDEL	T/TA	0.0647143	129	0.108527132	frameshift	p.Leu407fs
R09	chr2:202580556	ALS2	SNV	C/A	2.70E-201	603	0.384742952	missense	p.Lys1281Asn
R10	chr10:25886739	GPR158	INDEL	T/TA	0.004256	99	0.111111111	frameshift	p.Gln1119fs
R10	chr4:55599320	KIT	SNV	G/T	2.75E-219	588	0.411564626	missense	p.Asp816Tyr
R10	chr12:112919915	PTPN11	INDEL	T/TA	1.92E-05	81	0.259259259	frameshift	p.Glu379fs
R10	chr4:83772636	SEC31A	INDEL	G/GA	3.13E-42	85	0.494117647	frameshift	p.Ala759fs
R11	chrX:39923735	BCOR	INDEL	TG/T	2.43220400	374	0.887700535	frameshift	p.Gln1119fs
R11	chr13:33704066	STARD13	SNV	T/C	1.50E-18	187	0.187165775	missense	p.Lys250Glu
R12	chr20:31022470	ASXL1	SNV	G/C	9.38E-06	71	0.154929577	missense	p.Gly652Ala
R12	chr20:31024233	ASXL1	SNV	T/C	0	1800	0.520555556	missense	p.Cys1240Arg
R13	chrX:39913197	BCOR	INDEL	C/CA	0.034914	222	0.103603604	nonsense	p.Glu1640Ter
R13	chr3:51347703	DOCK3	SNV	T/C	3.65E-298	640	0.475	missense	p.Met988Thr
R13	chr10:25887526	GPR158	SNV	A/G	8.38E-283	554	0.505415162	missense	p.Asn991Asp
R13	chr15:42139542	JMJD7	SNV	A/T	1.51E-18	81	0.296296296	missense	p.Gln838Leu
R13	chr9:130265153	LRSAM1	SNV	G/A	2.51E-175	303	0.551155116	missense	p.Arg716His
R13	chr18:39593502	PIK3C3	SNV	C/G	3.39E-141	300	0.483333333	missense	p.Gln423Glu
R13	chr14:77245353	VASH1	SNV	C/G	4.18E-278	529	0.516068053	missense	p.Arg364Gly
R14	chr7:150921035	ABCF2	SNV	C/T	1.84E-189	501	0.417165669	missense	p.Arg178Gln
R14	chr19:35832806	CD22	SNV	G/C	0	1957	0.408277976	missense	p.Trp658Ser
R14	chr1:35334650	DLGAP3	SNV	C/T	4.34E-238	805	0.356521739	missense	p.Val681Met
R14	chr5:78338139	DMGDH	SNV	C/T	1.55E-60	178	0.387640449	missense	p.Gly387Glu
R14	chr11:34678473	EHF	SNV	A/G	3.56E-251	906	0.342163355	missense	p.Lys210Arg
R14	chr4:162697112	FSTL5	SNV	C/G	1.71E-69	208	0.389423077	missense	p.Arg175Pro
R14	chr7:150644116	KCNH2	INDEL	AG/AG	3.62E-116	119	0.1	frameshift	p.Met1060fs
R14	chr7:150649845	KCNH2	SNV	C/T	2.33E-279	1166	0.314751286	missense	p.Val409Met
R14	chr12:49949605	KCNH3	SNV	G/C	7.03E-127	328	0.420731707	missense	p.Gly780Ala
R14	chr4:55599321	KIT	SNV	A/T	2.32E-203	622	0.379421222	missense	p.Asp816Val
R14	chr5:140431503	LOC101926905	SNV	T/C	0	1996	0.416332665	missense	p.Ser150Pro
R14	chr2:141243041	LRP1B	SNV	T/A	8.04E-201	531	0.427480916	missense	p.Lys3099Ile
R14	chr11:102487723	MMP20	SNV	C/T	0	1061	0.381715363	missense	p.Ser65Asn
R14	chr2:70162490	MXD1	SNV	C/T	1.22E-137	477	0.35639413	missense	p.His71Tyr
R14	chr2:220164874	PTPRN	SNV	C/A	4.15E-131	358	0.413407821	missense	p.Gln423His
R14	chr13:33703333	STARD13	SNV	T/C	4.19E-133	434	0.361751152	missense	p.Asn494Ser
R15	chr2:220167468	PTPRN	SNV	G/A	0	1608	0.368159204	missense	p.Leu157Phe
R16	chr12:112888162	PTPN11	SNV	G/T	2.40E-20	261	0.157088123	missense	p.Gly60Cys
R16	chr19:47653557	SAE1	SNV	C/A	1.44E-08	123	0.138211382	missense	p.Asn103Lys
R16	chr12:124179806	TCTN2	SNV	A/G	9.10E-15	160	0.16875	missense	p.Tyr425Cys
R16	chr10:81052052	ZMIZ1	SNV	C/A	6.08E-22	326	0.144171779	missense	p.Ala299Asp
R17	chr18:39593407	PIK3C3	INDEL	A/AT	1.45E-06	68	0.279411765	frameshift	p.Leu392fs
R17	chr12:112888197	PTPN11	SNV	T/A	1.00E-16	294	0.129251701	missense	p.Phe71Leu

patient ID	locus	gene	type	genotype	p-value	coverage	VAF	function	protein
S01	chr12:124184270	TCTN2	INDEL	CA/A	0	693	0.974025974	frameshift	p.Leu509fs
S01	chr2:141208226	LRP1B	INDEL	CG/CGA	1.36E-05	93	0.23655914	frameshift	p.Arg3323fs
S03	chr12:124171560	TCTN2	SNV	G/T	0	1097	0.452142206	missense	p.Gly248Cys
S03	chr9:37692717	FRMPD1	SNV	C/T	4.9E-323	758	0.451187335	missense	p.Arg27Cys
S05	chr1:89651095	GBP4	INDEL	CT/CT	8.97E-66	64		1 frameshift	p.Glu589fs
S05	chr10:81053252	ZMIZ1	SNV	T/C	6.70E-39	78	0.512820513	missense	p.Ser358Pro
S05	chr2:141135836	LRP1B	INDEL	C/CA	6.75E-48	111	0.81981982	frameshift	p.Leu3517fs
S05	chrX:39933012	BCOR	INDEL	G/G	0	607		1 frameshift	p.Asn529fs
S07	chr19:35832489	CD22	SNV	C/T	0	1984	0.465221774	missense	p.Ala584Val
S08	chr19:35826980	CD22	SNV	C/G	0	1498	0.869158879	missense	p.Gln152Glu
S10	chr11:102479668	MMP20	SNV	C/T	0	981	0.455657492	missense	p.Gly271Arg
S16	chr19:35823522	CD22	SNV	A/T	1.38E-08	81	0.172839506	missense	p.Glu36Val
S17	chr6:17790138	KIF13A	SNV	C/T	0	1422	0.495077356	missense	p.Asp1076Asn
S18	chr12:112915524	PTPN11	SNV	A/G	1.83E-59	145	0.427586207	missense	p.Asn308Ser
S18	chr12:521046	CCDC77	SNV	C/T	0	1866	0.488210075	missense	p.Leu58Phe
S18	chr2:141356283	LRP1B	SNV	C/T	6.98E-32	87	0.402298851	missense	p.Asp2371Asn
S20	chr4:162380470	FSTL5	SNV	G/A	4.43E-106	208	0.509615385	missense	p.Ala537Val
S20	chr9:130216837	LRSAM1	SNV	A/G	0	1949	0.453052848	missense	p.Ser11Gly
S24	chr5:78351696	DMGDH	INDEL	G/GT	0.0053703	53	0.20754717	frameshift	p.Asn104fs
S27	chr12:9310428	PZP	SNV	C/G	6.85E-114	237	0.481012658	missense	p.Glu1102Gln
S27	chr13:58209042	PCDH17	SNV	A/C	0	1591	0.42991829	missense	p.Ser906Arg
S27	chr7:150644943	KCNH2	INDEL	AG/AG	1.10E-63	57		1 frameshift	p.Ser906fs
S30	chr2:141232775	LRP1B	SNV	C/T	5.94E-108	197	0.517766497	missense	p.Arg3186His
S30	chr20:31022468	ASXL1	INDEL	CA/CA	4.95E-117	103		1 frameshift	p.Gly652fs
S33	chr1:89651095	GBP4	INDEL	C/CT	1.40E-13	91	0.318681319	frameshift	p.Glu589fs
S34	chr12:547635	CCDC77	SNV	T/C	2.38E-138	270	0.507407407	missense	p.Val319Ala
S34	chr21:44524456	U2AF1	SNV	G/A	3.30E-83	246	0.382113821	missense	p.Ser34Phe
S34	chr4:55564683	KIT	SNV	G/A	0	1872	0.448183761	missense	p.Glu191Lys
S34	chr6:17799607	KIF13A	SNV	T/C	7.57E-263	672	0.425595238	missense	p.Thr894Ala
S35	chrX:15827430	ZRSR2	INDEL	A/AT	2.11E-25	81	0.555555556	frameshift	p.Gly184fs
S37	chr9:130236155	LRSAM1	SNV	G/A	0	1992	0.488955823	missense	p.Arg232Gln
S40	chr10:134648829	TTC40	SNV	G/T	0	1994	0.503510532	missense	p.Asp2241Glu
S40	chr15:42139569	JMJD7	INDEL	AG/A	0.0105682	77	0.155844156	frameshift	p.Ile894fs
S40	chr4:162376236	FSTL5	SNV	G/T	1.96E-27	94	0.340425532	missense	p.His587Gln
S43	chr13:58207151	PCDH17	INDEL	TC/TC	6.98E-241	199		1 frameshift	p.Asp158fs

Table 4. 治療不応期のサンプル(validation cohort)を用いた50遺伝子のターゲット  
リシーケンスで検出された変異一覧

R01-R19: 治療抵抗性 AML

S01-S49: 初回寛解導入療法により CR に至った AML

\*記載のない症例は変異が検出されなかった。

Refractory phase	BCOR MT	BCOR WT	
Primary Refractory	4	14	18
Responder	0	27	27
total	4	41	45

Table 5. 治療不応期のサンプル(validation cohort)における BCOR 変異の有無

de novo AML において治療不応期のサンプルでは治療感受性のサンプルと比較し BCOR 変異の出現頻度が有意に上昇している (p=0.01 by chi-square test)。

case	gene	type	VAF	function	protein	coding
R05	BCOR	SNV	0.13	nonsense	p.Gln156Ter	c.466C>T
R06	BCOR	SNV	0.16	nonsense	p.Arg1163Ter	c.3487C>T
R11	BCOR	INDEL	0.89	frameshiftDeletion	p.Gln1119fs	c.3355_3355delC
R13	BCOR	INDEL	0.10	nonsense	p.Glu1640Ter	c.4917_4918insT

Table 6. 治療不応期のサンプル(validation cohort)から検出された BCOR 変異

変異のパターンは全てフレームシフト変異、ナンセンス変異であった。これはこれまでに造血器腫瘍において報告されている結果と矛盾しない。このことから BCOR 変異が治療抵抗性に寄与する可能性が考えられた。

#### 4. Validation cohort (初発時)におけるターゲットリシーケンス

上記の3の結果をもとに、初発時における truncate 型 *BCOR* 変異の出現頻度を明らかにすることとした。治療抵抗性 AML15 例、初回寛解導入療法により CR に至った AML35 例の初発時のサンプルを使用し *BCOR* の全 CDS 領域のターゲットリシーケンスを行った。その結果、治療抵抗性 AML15 例中 3 例、初回寛解導入療法により CR に至った AML35 例中 1 例に *BCOR* 変異を認め、初発時の検体においても治療抵抗性 AML において統計学的に有意に *BCOR* 変異の出現頻度が高いことが示された ( $p=0.041$  by chi-square test) (Table 7)。治療不応期サンプルの結果と合わせて validation cohort の症例における *BCOR* 変異の有無の一覧を下記に示す (Table 8)。

Diagnosis	BCOR MT	BCOR WT	
Primary Refractory	3	12	15
Responder	1	34	35
total	4	46	50

Table 7. 初発時のサンプル(validation cohort)における BCOR 変異の有無

de novo AML において初発時のサンプルにおいても、truncate 型の *BCOR* 変異の出現頻度が有意に上昇している (p=0.041 by chi-square test)。

patientID	sex	age	subtype	os_days	chromosomal abnormality	Induction	初発時 BCOR	治療不応期 BCOR
R01	M	55	M4	228	NK	3+7	WT	WT
R02	M	57	M4	157	NK	3+7	WT	WT
R03	M	19	Biphonotypic	194	NK	3+7	WT	WT
R04	F	75	M1	274	NK	2+5	WT	WT
R05	F	56	M5b	272	NK	3+7	Gln156Ter	Gln156Ter
R06	M	29	M2	636	NK	3+7	Arg1163Ter	Arg1163Ter
R07	M	32	M2	200	45, X, -Y, t(8;21)	3+7	NA	WT
R08	M	66	M5b	428	47, XY, +8, del(20)(q13)	2+5	NA	WT
R09	M	42	MRC	1957	NK	3+7	WT	WT
R10	F	31	M2	757	46, XY, t(8;21), del(9)	3+7	NA	WT
R11	M	63	M2	165	add(9)	3+7	Gln1119fs	Gln1119fs
R12	F	64	M0	123	-6	2+5	NA	WT
R13	M	71	M2	153	46, XY, add(15)(p11.2)	2+5	WT	Glu1640Ter
R14	M	66	M2	370	t(8;21)	2+5	WT	WT
R15	F	73	MRC	95	complex	2+5	WT	WT
R16	F	68	M4	202	NK	2+5	WT	WT
R17	M	53	MRC	181	45, XY, add(5)(q13), add(11)	3+7	WT	WT
R18	M	54	M0	498	47, XY, +8	3+7	WT	NA
R19	F	49	M4	442	NK	3+7	WT	WT
S01	M	52	M6b	1547	t(9;13)	3+7	NA	WT
S02	M	47	MRC	2109	trisomy8	3+7	NA	WT
S03	M	62	M1	304	NK	3+7	WT	WT
S04	M	41	M2	744	-	3+7	WT	WT
S05	F	43	M2	771	t(2;8)	3+7	WT	WT
S06	F	53	M2	753	t(8;21)	3+7	NA	WT
S07	F	57	M5b	226	NK	3+7	NA	WT
S08	F	21	M1	2328	del(12)(p11)	3+7	NA	WT
S09	M	40	M6b	270	NK	3+7	NA	WT
S10	M	50	M2	318	NK	3+7	WT	WT
S11	F	45	M2	635	NK	3+7	WT	NA
S12	F	64	M4Eo	2011	inv(16)	3+7	WT	NA
S13	F	43	M5b	356	add(10)(p11), del(11)(q21)	3+7	NA	WT
S14	M	53	M2	1887	NK	3+7	WT	NA
S15	F	65	M4Eo	1194	NK	2+5	WT	WT
S16	M	46	M4	266	t(6;9)	3+7	WT	NA
S17	F	31	M4	2700	-	3+7	WT	NA
S18	F	49	M0	496	NK	3+7	WT	WT
S19	M	30	M1	2728	trisomy21	3+7	WT	NA
S20	F	51	M2	911	-	3+7	WT	WT
S21	F	51	M2	2529	NK	3+7	WT	NA
S22	F	63	M4	890	NK	3+7	WT	NA
S23	F	66	M2	2457	NK	2+5	WT	NA
S24	F	42	M4	463	NK	3+7	WT	WT
S25	M	75	M2	2015	-	2+5	WT	NA
S26	F	69	M4	445	monosomy7	2+5	Ser1604fs	NA
S27	F	46	M5a	271	complex	3+7	NA	WT
S28	M	61	M2	461	NK	3+7	NA	WT
S29	F	57	M1	287	NK	3+7	WT	NA
S30	F	22	M1	355	NK	3+7	NA	WT
S31	M	65	M5b	2000	NK	3+7	WT	NA
S32	M	33	M7	723	monosomy6,der(16)	3+7	NA	WT
S33	M	70	M4	474	-	2+5	NA	WT
S34	M	59	M2	321	del(20q)	3+7	WT	WT
S35	M	72	M4Eo	402	trisomy21	2+5	WT	WT
S36	M	41	M2	1310	NK	3+7	WT	WT
S37	M	48	M4	237	t(11;19)	3+7	WT	WT
S38	F	56	M4	1155	NK	3+7	WT	NA
S39	F	68	M5a	255	MLL	2+5	NA	WT
S40	M	68	M6b	658	complex	2+5	NA	WT
S41	F	37	M1	1003	NK	3+7	WT	NA
S42	M	58	M2	947	NK	3+7	WT	NA
S43	M	75	MRC	293	t(10;16)	2+5	WT	WT
S44	M	53	M4Eo	612	inv(16),+8	3+7	WT	NA
S45	F	45	M2	593	NK	3+7	WT	NA
S46	M	64	M1	540	t(1;11)	3+7	WT	NA
S47	F	65	M4	334	trisomy8	2+5	WT	NA
S48	F	42	M5b	291	NK	3+7	WT	NA
S49	F	50	M4	137	inv(16)	3+7	WT	NA

Table 8. 初発時、治療抵抗時における *BCOR* 変異の有無

R01-R19: 治療抵抗性 AML

S01-S49: 初回寛解導入療法により CR に至った AML

NK: normal karyotype, WT: wild type, NA: not available

2+5: IDR 2days + AraC 5days, 3+7: IDR 2days + AraC 7days



次に *BCOR* 変異陽性の治療抵抗性 AML について治療前後の VAF の推移について解析を行った (Table 9)。治療抵抗性 AML の内 1 例は、初発時の凍結検体が得られず、初発時の骨髄塗抹標本から DNA を抽出しサンガーシーケンスにて *BCOR* の変異を検出したため正確な VAF は計測できなかった (Figure 9)。

*BCOR* は X 染色体上に存在する遺伝子であり、性別により VAF の解釈に注意が必要である。(一般的にはヘテロな変異の場合には VAF は実際にその変異を有する腫瘍細胞の割合よりも低く見積もられるが、男性において X 染色体上の遺伝子に変異が存在する場合、VAF はその変異を有する腫瘍細胞の割合と概ね一致すると推定される)。今回の結果においては、R13 においては治療前に検出できなかった *BCOR* 変異が治療後に新規に同定されており、*BCOR* 変異を有するクローンが治療抵抗性であることが示唆された。また R11 においては、上述の理由で治療前の VAF は計測不能であったが、治療不応期には骨髄中の大部分の血液細胞が *BCOR* 変異を有していると想定され、やはり *BCOR* 変異を有するクローンは治療抵抗性であると考えられた。また今回解析した症例において、初発時の *BCOR* 変異の有無により 2 群に分けて全生存期間 (overall survival: OS) の比較を行ったところ、*BCOR* 変異なしの群と比較して、変異ありの群において OS が短縮する可能性が示唆された ( $p=0.095$  by log-rank test) (Figure 10)。以上の解析により、*BCOR* 変異が治療抵抗性に寄与している可能性が示された。

patientID	mutation	VAF(diag)	blast(diag)	VAF(ref)	blast(ref)
R05	Q156Ter	40.8	52	13.4	25
R06	R1163Ter	71.8	64	15.5	42
R11	Q1119fs	-	-	88.8	78
R13	E1640Ter	0	45	10.4	46
S26	S1604fs	47.3	71	-	-

Table 9. AML の治療前後における *BCOR* 変異の VAF と白血病細胞数の推移

diag: 初発時、ref: 治療不応期、Blast: 骨髄塗抹標本における骨髄中の白血病細胞の割合(%)

R13 では、初発時には検出できていない *BCOR* 変異クローンが治療不応期には比較的ドミナントなクローンとなりつつあることが示された。R06 では、*BCOR* 変異クローンは初発時からドミナントなクローンであり、治療不応期にも白血病細胞の中の大部分を占めると推定される。R11 は初発時の VAF は計測できていないが、治療不応期には *BCOR* 変異クローンはドミナントクローンとなっている。R05 では *BCOR* 変異クローンは初発時にはドミナントであるが治療不応期にはサブクローンとなっていることが推定されるが、化学療法後にも残存しており、*BCOR* 変異クローンは治療抵抗性であることが推定される。

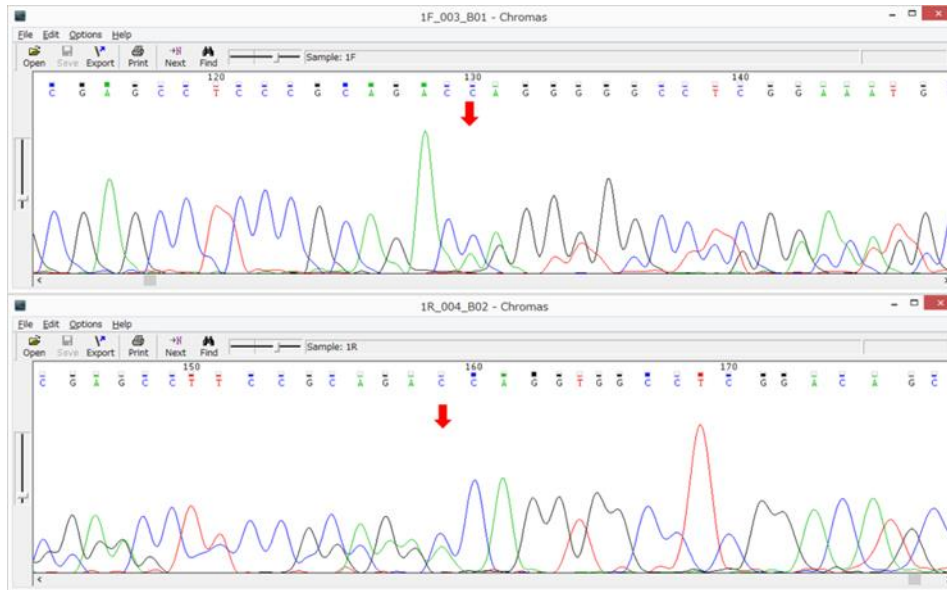


Figure 9. 塗抹標本から gDNA を抽出したサンプル(R11)での *BCOR* のサンガーシーケンス

治療不応期のサンプルと同様に *BCOR* Gln1119fs (3355delC)変異が検出された。

このサンプルは次世代シーケンサーによる解析ができておらず正確な VAF は不明である。サンガーシーケンスの波形からは *BCOR* 変異クローンは比較的ドミナントなクローンであることが推定される。

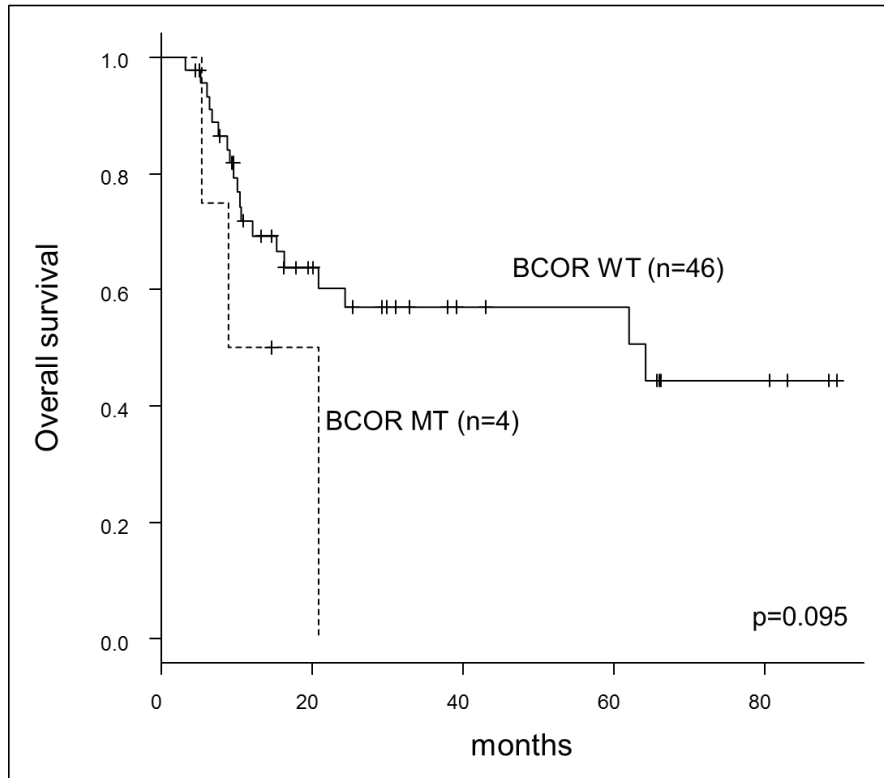


Figure 10. 初発時 *BCOR* 変異の有無による全生存期間 (overall survival: OS)の比較。

*BCOR* 変異なしの群と比較して *BCOR* 変異ありの群において OS が短縮している可能性が示された (p=0.095 by log-rank test)。

## 5. BCOR ノックダウン細胞株における抗がん剤感受性試験

次に私は *BCOR* 変異が抗がん剤感受性に与える影響を検討することとした。*BCOR* 変異はその出現パターンから機能喪失型の変異と想定されたため、ヒト白血病細胞株の THP-1、OCI-AML2 に対して *BCOR* に対する shRNA ベクターを導入し *BCOR* ノックダウン細胞株を樹立し、抗がん剤に対する感受性の変化を評価した。*BCOR* に対する shRNA ベクター3種類、コントロールとしてルシフェラーゼに対する shRNA ベクターを用いた。ノックダウン効率の確認にはリアルタイム定量 PCR を用いた。THP-1 においては、30-80%程度、OCI-AML2 においては sh*BCOR*1 ではノックダウンが確認できなかったが、sh*BCOR*2, 3 では30-40%程度のノックダウン効率が得られた (Figure 11)。生細胞数の測定は ATP 発光試薬とプレートリーダーを用いて行った。いずれの細胞株、薬剤においても *BCOR* ノックダウンによる抗がん剤感受性の変化は認めなかった (Figure 12, 13)。

*BCOR* 変異は機能喪失型の変異と想定されるが、男性においてはもともと1コピーしかない *BCOR* の機能が完全に失われている状態であると考えられている。また女性においても *BCOR* 変異は X 染色体上の2コピーの遺伝子の内、不活化されていない方のアリルに変異が出現することが報告されており、こちらも機能が完全に失われている状態であると考えられる。上記のノックダウン

効率を考慮すると、*BCOR* 変異の機能解析にはロックダウンよりもロックアウトの方がより適していると考えられた。

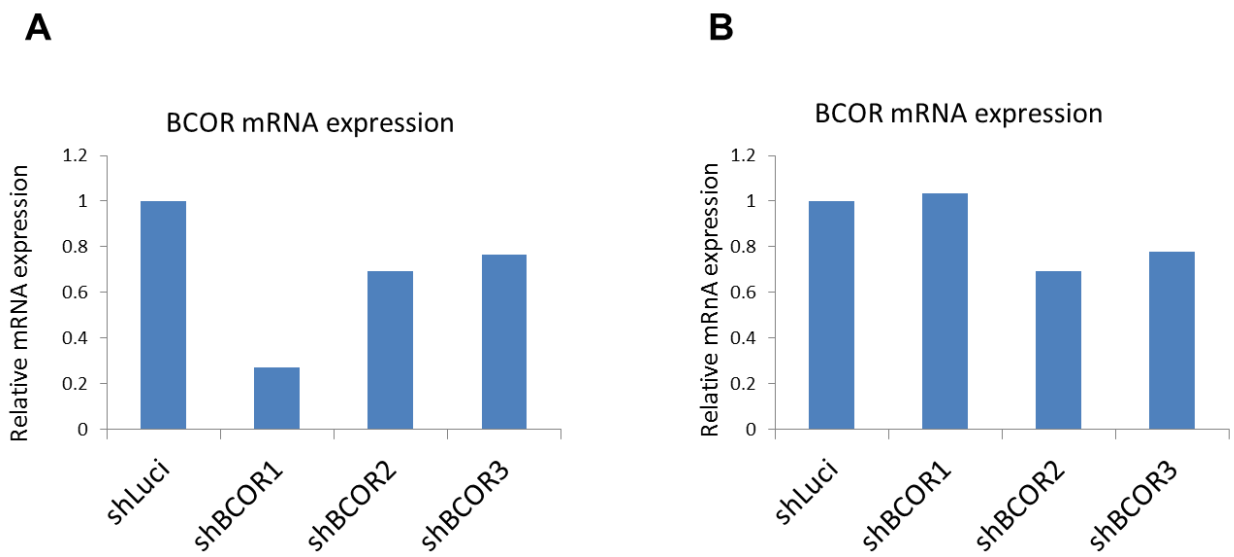


Figure 11. BCOR に対する shRNA ベクターのノックダウン効率

各細胞株に BCOR に対する 3 種の shRNA ベクターを導入した後、cDNA を抽出し定量リアルタイム PCR を行った。

(A) THP-1 (B) OCI-AML2

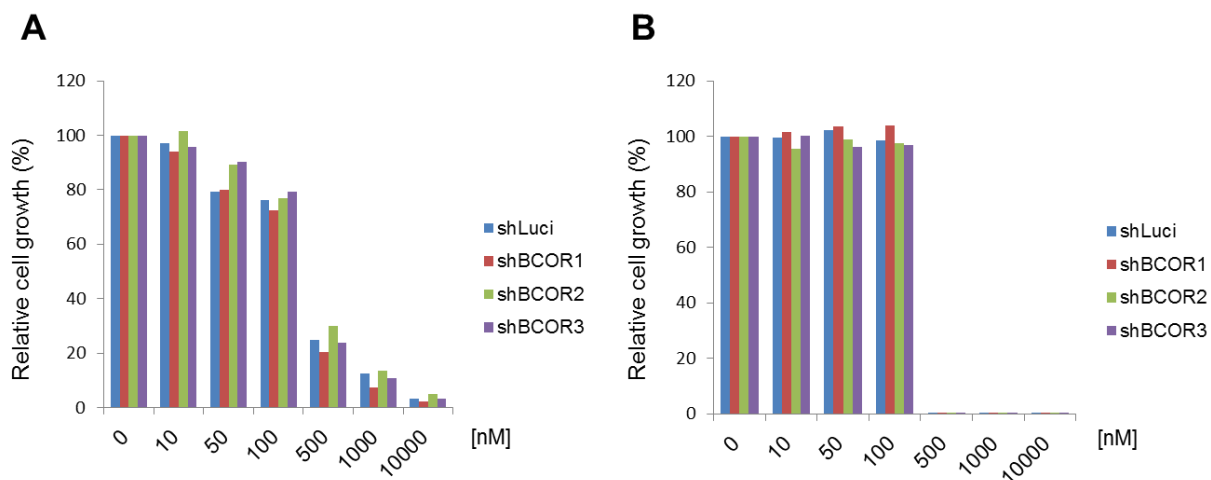


Figure 12. ATP 発光試薬を用いた抗がん剤感受性試験

A) AraC (n=1) B) IDR (n=1)

BCOR に対する shRNA ベクター1-3 を導入した THP-1 に抗がん剤を投与し 48 時間後に生細胞数を計測した。いずれの抗がん剤においても BCOR のノックダウンによる感受性の変化は認めなかった。



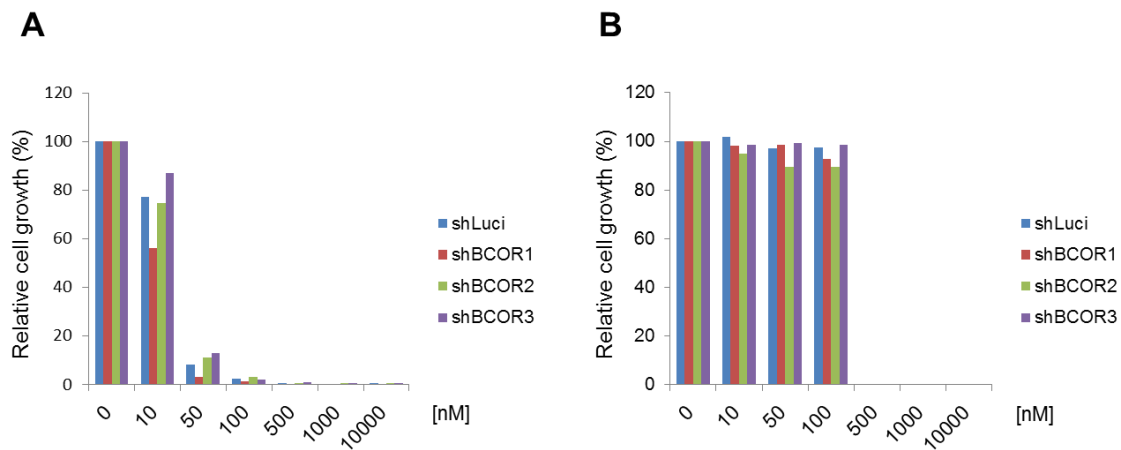


Figure 13. ATP 発光試薬を用いた抗がん剤感受性試験

A) AraC (n=1) B) IDR (n=1)

BCOR に対する shRNA ベクター1-3 を導入した OCI-AML2 に抗がん剤を投与し 48 時間後に生細胞数を計測した。いずれの抗がん剤においても BCOR のノックダウンによる感受性の変化は認めなかった。

#### 14. BCOR ノックアウト細胞株における抗がん剤感受性試験

BCOR ノックアウトが抗がん剤感受性に与える影響を検討するためにヒト白血病細胞株である THP-1 を用いて CRISPR/Cas9 システムにより BCOR ノックアウト細胞株を樹立した。ノックアウトの確認にはリアルタイム定量 PCR およびウエスタンブロットを用いた。リアルタイム定量 PCR により BCOR 遺伝子発現量の低下が確認され(Figure 14)、またウエスタンブロットにより BCOR タンパクの発現消失が確認された(Figure15)。まず、BCOR ノックアウトが白血病細胞の増殖速度に与える影響を調べるために、BCOR ノックアウト細胞株とコントロールの細胞株を用いて増殖能の評価を行ったところ、BCOR ノックアウト細胞株においてはコントロールと比較して有意に細胞増殖率が低下していることが示された(Figure 16)。続いて、抗がん剤感受性試験をノックダウン細胞株と同様の実験系にて行った。BCOR ノックアウト細胞株は、コントロールと比較して IDR、AraC に対する抗がん剤感受性が統計学的に有意に低下していることが示された(Figure17)。さらに抗がん剤投与後のアポトーシス解析を行ったところ、やはり同様に BCOR ノックアウト細胞株はコントロールと比較して IDR 投与後のアポトーシス細胞の割合が統計学的に有意に低下していることが示された(Figure18)。

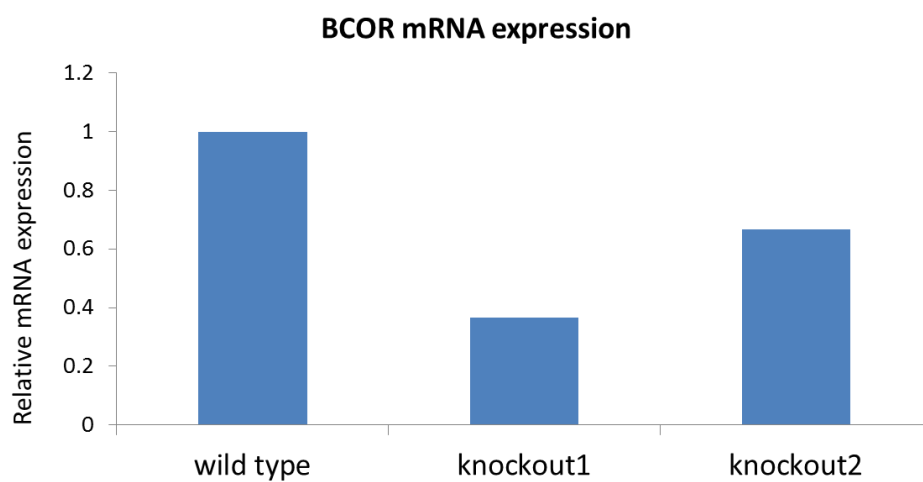


Figure 14. 定量 PCR による BCOR ノックアウトの確認

CRISPR/Cas9 システムにより BCOR をノックアウトしたヒト白血病細胞株 (THP-1)を作成し RNA 抽出・cDNA 合成の後に定量 PCR を行った。

## BCOR Western Blot

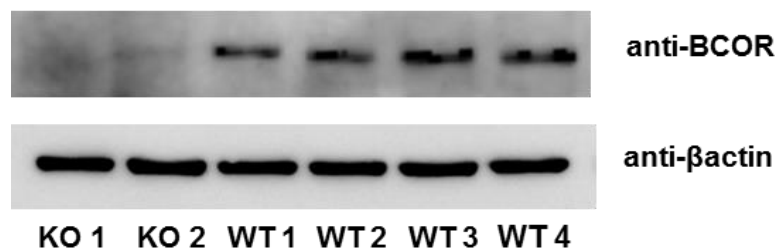


Figure 15. ウェスタンブロットによる BCOR ノックアウトの確認

CRISPR/Cas9 システムにより BCOR をノックアウトしたヒト白血病細胞株 THP-1 から抽出したタンパク質を用いて抗 BCOR 抗体によるウェスタンブロットを行った。

KO: knockout, WT: wild type

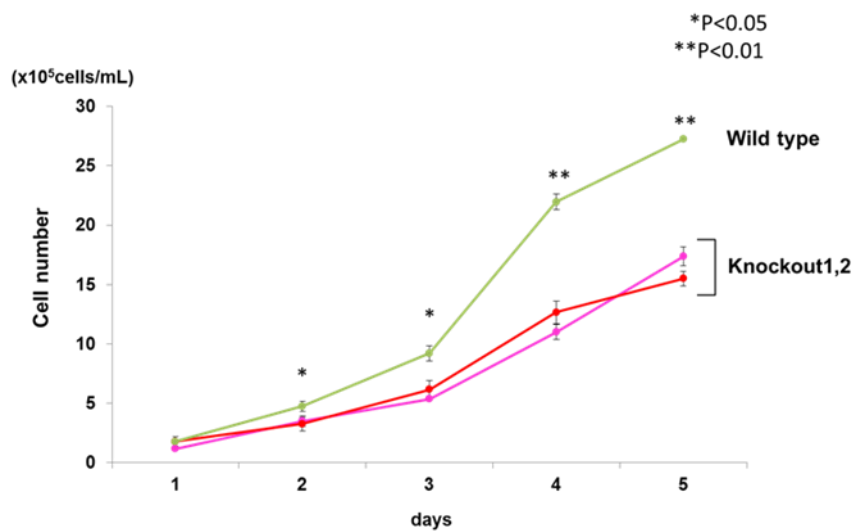


Figure 16. BCOR ノックアウト細胞株における細胞増殖曲線

BCOR ノックアウト細胞株を  $5 \times 10^4$  cell/mL の濃度に調整し、培養開始から 5 日目まで 1 日ごとに細胞数を測定した (n=3)。グラフの数値は平均値±標準偏差を示している。BCOR ノックアウト細胞株においては細胞増殖率が有意に低下していることが示された。

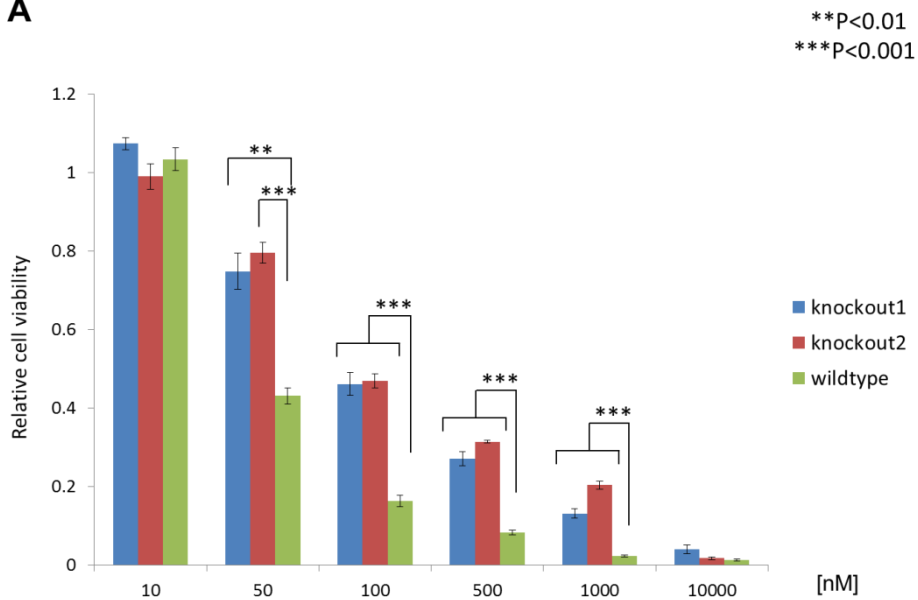
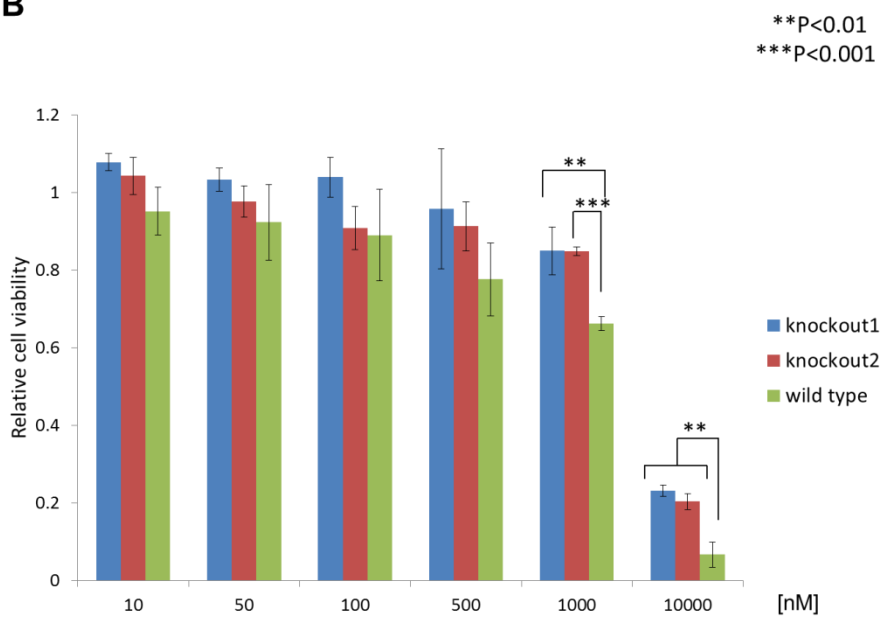
**A****B**

Figure 17. BCOR ノックアウト細胞株を用いた抗がん剤感受性試験

A) IDR (n=3) 平均値±標準偏差 B) AraC (n=3) 平均値±標準偏差

BCOR をノックアウトした THP-1 に抗がん剤を投与した後に ATP 発光試薬を用いて生細胞数を計測した。いずれの抗がん剤においても BCOR ノックアウト細胞株では抗がん剤感受性が低下している。

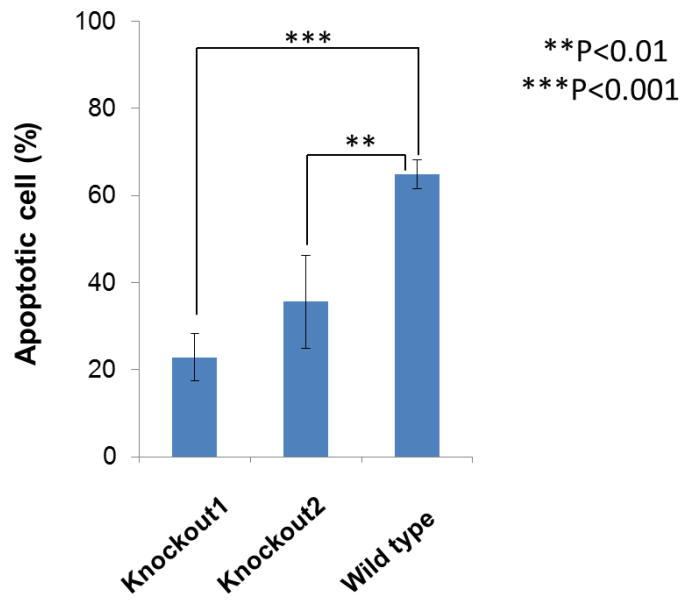


Figure 18. BCOR ノックアウト細胞株を用いたアポトーシス解析

BCOR をノックアウトした THP-1 に IDR を投与した後に FACS Aria II によるアポトーシス解析を行った (n=3)。グラフの数値は平均値、エラーバーは標準偏差を示している。BCOR ノックアウト細胞株においては抗がん剤投与後のアポトーシス細胞の割合が低下していることが示された。



## 【考察】

本研究において私は *BCOR* が AML における治療抵抗性に寄与する遺伝子である可能性を見出した。*BCOR* は X 染色体上 (Xp11.4) に位置する遺伝子であり、2000 年に Nagase らによりクローニングされ[35]、また同時期に Huynh らにより *BCL6* のコリプレッサーとして発見されている[36]。Huynh らは、*BCOR* は少なくとも 2 つのバリエントをコードしており、完全長の *BCOR* タンパクのみが *BCL6* のコリプレッサーとして機能でき、また 2 つのバリエントはともにヒストン脱アセチル化酵素と関連していることを報告している。*BCOR* の異常と疾患との関連については、Pierron らは骨肉腫において 594 例中 24 例に *BCOR-CCNB3* 融合遺伝子が検出されたと報告しており[37]、また Ishikawa らは *BCOR-RARA* 融合遺伝子が AML 症例で検出されたと報告している[38]。また Ng らは先天性疾患である Oculofaciocardiodental (OFCD) syndrome において高頻度に *BCOR* のフレームシフト変異、ナンセンス変異が見られ、ゼブラフィッシュにおける *BCOR* の ortholog をノックダウンすると OFCD syndrome と同様に眼球、骨格、中枢神経系に異常をきたし、胎生期において *BCOR* が重要な役割を果たしていることを報告している[39]。造血器悪性腫瘍においては、Grossmann らがはじめて AML の特定のサブセットにおいて *BCOR* 変異が高頻度にみられることを報告しており[34]、さらに再生不良性貧血、骨髄異形成症候群、二次性の AML など各種造血器疾患における *BCOR* 変異が次々と報告されている[40][41][42]。

このように **BCOR** は筋骨格系、中枢神経系のみならず造血器においても重要な機能を担っていることが示唆されているが、**BCOR** の正常造血における役割、また造血器悪性腫瘍の発生にどのように寄与しているかについてはいまだほとんど解明されていない。上記の通り **BCOR** は **BCL6** のコリプレッサーとして発見されているが、**BCL6** は造血器腫瘍、特に非ホジキンリンパ腫において発現の亢進が病態形成に寄与していると考えられており [43][44][45]、**BCOR** 変異が **BCL6** を介して造血に対しても何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられるが、**BCOR** 変異型と **BCOR** 野生型は **BCL6** との相互作用における差異が見られなかったとも報告されており [39]、**BCOR** 変異を高頻度に認める各種疾患の病態形成における **BCOR** 変異の意義については **BCL6** 以外の転写調節因子との関連によることも想定されている。近年、造血器腫瘍を含む種々のがんとエピジェネティクスとの関連が注目されているが、**BCOR** についてもエピジェネティクスに関わる因子であることが報告されている。**BCOR** がポリコーム抑制複合体 1 (**PRC1**)の構成分子である **Ring1b** や **Bmi1** とともに non-canonical **PRC1** と呼ばれる **BCOR** 複合体を形成することが報告されており [46][47]、**PRC1** や **PRC2** と異なる機序によりエピジェネティクスを制御していることも想定されている。一方で **BCOR** 複合体は **PRC1**、**PRC2** のターゲット領域へのリクルートに必須であることも報告されており [48]、**BCOR** はポリコーム抑制複合体によるヒストン

修飾において、これまでに想定されていた以上に重要な役割を担っていることがわかってきている。

私は本研究において *BCOR* 変異が AML の治療抵抗性に寄与する可能性があることを見出したが、*BCOR* と抗がん剤感受性との関連についてはこれまでの知見だけでは十分には説明できず、今後詳細な機序の解明が望まれる。造血器腫瘍におけるこれまでの報告によると *BCOR* 変異はほぼ全てが、ナンセンス変異、フレームシフト変異であり、ここからは機能喪失型の変異であることが想定される。さらに *BCOR* は X 染色体上にあることから、機能喪失によるハプロ不全というよりは、完全な機能喪失に近いと考えられる。今回は *BCOR* の機能喪失が抗がん剤感受性に与える影響を調べるために、CRISPR/Cas9 システムを用いて *BCOR* ノックアウト細胞株を作成し解析を行った。*BCOR* ノックアウト細胞株は *BCOR* 野生型と比較して細胞増殖速度が低下すること、また抗がん剤感受性が低下することが示された。さらに抗がん剤感受性の変化は、細胞周期の S 期に特異的な抗腫瘍効果を示す AraC よりも G2/M 期において特に強い抗腫瘍効果を示す IDR で大きくなっている[49]。Jacobs らはポリコーム群タンパク質(PcG)の構成成分である Bmi-1 が細胞周期を制御していること[50]、Zheng らは Bmi-1 のノックダウンにより p21 や p27 を介した G0/G1 arrest が引き起こされること[51]、Aoto らは PcG を介したクロマチンの再構築が細胞周期における G1 期から S 期への進行に必要であるということ[52]、Wu らは PRC2 の構成要素

である EZH2 のノックダウンにより G1 および G2/M チェックポイント機構が阻害されアポトーシスが誘導されること[53]、Posfai らはマウスにおいて Ring1b の機能喪失により S-phase arrest が引き起こされることを報告している[54]。今回の結果と合わせて推察すると、BCOR の機能喪失により BCOR 複合体の機能低下をきたし、さらに PRC1, 2 を介した細胞周期の制御、DNA 損傷チェックポイント機構が破綻することにより抗がん剤感受性が低下しているという可能性が考えられる。さらに G0/G1 arrest および S phase arrest が同時に引き起こされることにより、G2/M 期において強い抗がん作用を示す IDR の感受性が大きく低下していることも想定される。

今後、BCOR の機能喪失がどのような分子メカニズムを通して AML における抗がん剤耐性に寄与しているかを明らかにすることで、BCOR を標的とした新規治療法への足掛かりとなることが期待される。本研究で得られた知見をもとに治療抵抗性 AML の診断・治療の研究が大きく進展することを期待したい。

## 【結論】

本研究では、6 症例の治療抵抗性 AML の検体を用いて全エクソン解析を行い、AML の治療抵抗性に寄与する可能性のある 50 の遺伝子を抽出した。さらに多数の AML 検体を用いて、*BCOR* の truncate 型変異の出現頻度が治療抵抗性 AML において治療感受性 AML に比較して有意に上昇していることを明らかとした。さらに *BCOR* ノックアウト細胞株においては細胞増殖速度が低下し、抗がん剤感受性が低下することを示した。今後 *BCOR* 変異の詳細な機能解析を行うことにより、治療抵抗性 AML の新規治療薬につながる可能性がある。

## 【謝辞】

本研究の遂行ならびに論文作成にあたってご指導頂きました、東京大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍病態学講座 教授 黒川峰夫先生に心より感謝申し上げます。

実験全般に関してご指導頂きました東京大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 助教 古屋淳史先生、講師 荒井俊也先生、京都大学腫瘍生物学講座 特定助教 片岡圭亮先生、メモリアルスローンケタリングがんセンター 吉見昭秀先生に深く感謝申し上げます。

また本研究室助手、外間洋子氏、中田友華里氏には優れた実験技術をもってサポート頂き深く感謝いたします。

## 【参考文献】

1. Bennett J, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton D, Gralnick H, et al.: Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia: a Report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103:626–629.
2. Vardiman JW, Thiele J ADEA: The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2015;114:937–952.
3. Rowley JD: ASH 50th anniversary review Chromosomal translocations : revisited yet again. *Blood* 2008;112:2183–2189.
4. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al.: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children’s Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998;92:2322–2333.
5. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Paietta E, et al.: Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia : a Southwest Oncology Group / Eastern Cooperative Oncology Group study. *Blood* 2009;96:4075–4083.
6. Delaunay J, Vey N, Leblanc T, Fenaux P, Witz F, Lamy T, et al.: Prognosis of inv ( 16 ) / t ( 16 ; 16 ) acute myeloid leukemia ( AML ): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 2003;102:462–469.
7. Byrd JC, Mro K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al.: Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success , cumulative incidence of relapse , and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia : results from Cancer and Leukemia Group B ( CALGB 8461 ). *Blood* 2002;100:4325–4336.
8. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al.: Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukaemia: Determination of prognostic significance of rarer recurring chromosomal abnormalities amongst 5,876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010;116(3): 354-365..
9. Schlenk RF: Individual Patient Data-Based Meta-Analysis of Patients Aged 16 to 60 Years With Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia: A Survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol* 2004;22:3741–3750.
10. Breems DA, Van Putten WLJ, De Greef GE, Van Zelderen-Bhola SL, Gerssen-Schoolt KBJ, Mellink CHM, et al.: Monosomal Karyotype in Acute

- Myeloid Leukemia: A Better Indicator of Poor Prognosis Than a Complex Karyotype. *J Clin Oncol* 2008;26:4791–4797.
11. Kayser S, Zucknick M, Do K, Ko C, Horst HA, Held G, et al.: Monosomal karyotype in adult acute myeloid leukemia : prognostic impact and outcome after different treatment strategies. *Blood* 2012;119:551–558.
  12. Medeiros BC, Othus M, Fang M, Roulston D, Appelbaum FR, Dc W: Prognostic impact of monosomal karyotype in young adult and elderly acute myeloid leukemia : the Southwest Oncology Group ( SWOG ) experience. *Blood* 2011;116:2224–2228.
  13. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD: Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004;18:115–136.
  14. Wheatley K: A systematic collaborative overview of randomized trials comparing idarubicin with daunorubicin (or other anthracyclines) as induction therapy for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1998;103:100–109.
  15. Bob Lowenberg, M.D., James R. Downing, M.D., and Alan Burnett MD: Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341: 1051-1062
  16. Ohtake S, Miyawaki S, Fujita H, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, et al.: Randomized study of induction therapy comparing standard-dose idarubicin with high-dose daunorubicin in adult patients with previously untreated acute myeloid leukemia: the JALSG AML201 Study. *Blood* 2011;117:2358–2365.
  17. Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, Carroll A, Pettenati MJ, Tantravahi R, et al.: Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res* 1998;58:4173–4179.
  18. Miyawaki S, Ohtake S, Fujisawa S, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, et al.: Arandomized comparison of 4 courses of standard-dose multiagent chemotherapy versus 3 courses of high-dose cytarabine alone in postremission therapy for acute myeloid leukemia in adults: The JALSGAML201 Study. *Blood* 2011;117:2366–2372.
  19. Fung HC, Stein A, Slovak ML, O'donnell MR, Snyder DS, Cohen S, et al.: A long-term follow-up report on allogeneic stem cell transplantation for patients with primary refractory acute myelogenous leukemia: impact of cytogenetic characteristics on transplantation outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:766–771.
  20. Camera A, Rinaldi CR, Palmieri S, Cantore N, Mele G, Mettivier V, et al.: Sequential continuous infusion of fludarabine and cytarabine associated with liposomal daunorubicin (DaunoXome®) (FLAD) in primary refractory or relapsed adult acute myeloid leukemia patients. *Ann Hematol* 2009;88:151–158.



21. Cortes J, Tsimberidou AM, Alvarez R, Thomas D, Beran M, Kantarjian H, et al.: Mylotarg combined with topotecan and cytarabine in patients with refractory acute myelogenous leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;50:497–500.
22. Kim H, Lee J-H, Joo Y-D, Bae SH, Lee J-H, Kim D-Y, et al.: A prospective, multicenter phase II study of continuous infusion of FLAG for patients older than 60 yr with resistant acute myeloid leukemia: a comparison with intensive younger patients' trial. *Eur J Haematol* 2016;96(2): 188-197.
23. Konopleva M, Thall PF, Yi CA, Borthakur G, Coveler A, Bueso-Ramos C, et al.: Phase I/II study of the hypoxia-activated prodrug PR104 in refractory/relapsed acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2015;100:927–934.
24. Hemmati PG, Terwey TH, Na I-K, Jehn CF, le Coutre P, Vuong LG, et al.: Allogeneic stem cell transplantation for refractory acute myeloid leukemia: a single center analysis of long-term outcome. *Eur J Haematol* 2015;95(6): 498-506.
25. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, et al.: DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 2008;456:66–72.
26. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al.: Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009;361:1058–1066.
27. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Ph D, Kandoth C, Payton JE, et al.: DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2010;363(25): 2424-2433.
28. Yan X-J, Xu J, Gu Z-H, Pan C-M, Lu G, Shen Y, et al.: Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet* 2011;43:309–315.
29. Kon A, Shih L-Y, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, et al.: Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet* 2013;45:1232–1237.
30. Leukemia AM: Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2013;368:2059–2074.
31. Li M, Mukasa A, Inda M del-M, Zhang J, Chin L, Cavenee W, et al.: Guanylate binding protein 1 is a novel effector of EGFR-driven invasion in glioblastoma. *J Exp Med* 2011;208:2657–2673.
32. Duan Z, Foster R, Brakora K a, Yusuf RZ, Seiden M V: GBP1 overexpression is associated with a paclitaxel resistance phenotype. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;57:25–33.

33. Fellenberg F, Hartmann TB, Dummer R, Usener D, Schadendorf D, Eichmuller S: GBP-5 splicing variants: New guanylate-binding proteins with tumor-associated expression and antigenicity. *J Invest Dermatol* 2004;122:1510–1517.
34. Grossmann V, Tiacci E, Holmes AB, Kohlmann A, Martelli MP, Kern W, et al.: Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood* 2011;118:6153–6163.
35. Nagase T, Ishikawa K, Suyama M, Kikuno R, Miyajima N, Tanaka A, et al.: Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XI. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* 2000;5:273–281.
36. Huynh KD, Fischle W, Verdin E, Bardwell VJ: BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev* 2000;14:1810–1823.
37. Pierron G, Tirode F, Lucchesi C, Reynaud S, Ballet S, Cohen-Gogo S, et al.: A new subtype of bone sarcoma defined by BCOR-CCNB3 gene fusion. *Nat Genet* 2012;44:461–466.
38. Ichikawa S, Ichikawa S, Ishikawa I, Takahashi T, Fujiwara T, Harigae H: Successful treatment of acute promyelocytic leukemia with a t(X;17)(p11.4;q21) and BCOR-RARA fusion gene. *Cancer Genet* 2015;208:162–163.
39. Ng D, Thakker N, Corcoran CM, Donnai D, Perveen R, Schneider A, et al.: Oculofaciocardiodental and Lenz microphthalmia syndromes result from distinct classes of mutations in BCOR. *Nat Genet* 2004;36:411–416.
40. Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, et al.: Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. *N Engl J Med* 2015;373:35–47.
41. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman P V, Shareef S, Allen SL, et al.: Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood* 2015;125:1367–1377.
42. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al.: Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2014 Feb;28:241–247.
43. Zanis M, Facility OA, Tsai A, Durbin E: The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 2004;432:635–639.
44. Basso K, Dalla-Favera R: Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol Rev* 2012;247:172–183.
45. Phan RT, Saito M, Basso K, Niu H, Dalla-Favera R: BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat Immunol* 2005;6:1054–1060.

46. Gearhart MD, Corcoran CM, Wamstad JA, Bardwell VJ: Polycomb group and SCF ubiquitin ligases are found in a novel BCOR complex that is recruited to BCL6 targets. *Mol Cell Biol* 2006;26:6880–6889.
47. Sanchez C, Sanchez I, Demmers JAA, Rodriguez P, Strouboulis J, Vidal M: Proteomics Analysis of Ring1B/Rnf2 Interactors Identifies a Novel Complex with the Fbxl10/Jhdm1B Histone Demethylase and the Bcl6 Interacting Corepressor. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:820–834.
48. Blackledge NP, Farcas AM, Kondo T, King HW, McGouran JF, Hanssen LLP, et al.: Variant PRC1 Complex-Dependent H2A Ubiquitylation Drives PRC2 Recruitment and Polycomb Domain Formation. *Cell* 2014;157:1445–1459.
49. Ketley NJ, Allen PD, Kelsey SM, Newland AC: Mechanisms of resistance to apoptosis in human AML blasts: the role of differentiation-induced perturbations of cell-cycle checkpoints. *Leukemia* 2000;14:620–628.
50. Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho R a, van Lohuizen M: The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* 1999;397:164–168.
51. Zheng X, Wang Y, Liu B, Liu C, Liu D, Zhu J, et al.: *Bmi-1*-shRNA Inhibits the Proliferation of Lung Adenocarcinoma Cells by Blocking the G1/S Phase Through Decreasing Cyclin D1 and Increasing p21/p27 Levels. *Nucleic Acid Ther* 2014;24:210–216.
52. Aoto T, Saitoh N, Sakamoto Y, Watanabe S, Nakao M: Polycomb group protein-associated chromatin is reproduced in post-mitotic G1 phase and is required for S phase progression. *J Biol Chem* 2008;283:18905–18915.
53. Wu Z, Lee ST, Qiao Y, Li Z, Lee PL, Lee YJ, et al.: Polycomb protein EZH2 regulates cancer cell fate decision in response to DNA damage. *Cell Death Differ* 2011;18:1771–1779.
54. Posfai E, Kunzmann R, Brochard V, Salvaing J, Cabuy E, Roloff TC, et al.: Polycomb function during oogenesis is required for mouse embryonic development. *Genes Dev* 2012;26:920–932.