

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 本田 晃

### 【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。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。多剤併用化学療法による寛解導入療法により多くの症例が完全寛解 (complete remission: CR)に至る一方で、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、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。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。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、これまでに用いられている染色体異常による予後分類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。

## 【主な材料と方法】

### 患者検体からのゲノム DNA の抽出

当院において AML と診断され治療を行った症例よりゲノム DNA の抽出を行った。

### 次世代シーケンサーによる解析

治療抵抗性 AML6 症例について、初発時、治療不応期、正常コントロールの各ゲノム DNA を用いて全エクソン解析を行った。

### GBP4 変異体過剰発現細胞株における抗がん剤感受性試験

上記の解析により検出された変異の内、GBP4 の変異が AML の治療抵抗性に寄与する可能性が考えられたため、GBP4 変異体を過剰発現するレトロウイルスベクターを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解析した。

### 多数症例におけるターゲットリシーケンス

6 症例の全エクソン解析により変異が検出された 50 遺伝子について、治療不応期 AML の検体 45 サンプル、初発時 AML の検体 50 サンプルを用いて 50 遺伝子の全 coding sequence (CDS) 領域に対するターゲットリシーケンスを行った。

### gene X ノックダウン細胞株における抗がん剤感受性試験

上記の解析により gene X の変異が AML の治療抵抗性に寄与する可能性が考えられたため、gene X に対する shRNA ベクターを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解析した。

### gene X ノックアウト細胞株を用いた解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて gene X ノックアウト細胞株を作成し、細胞増殖速度の変化、抗がん剤感受性の変化、アポトーシスの変化について解析した。

## 【結果】

### 治療抵抗性 AML6 症例における全エクソン解析

6 症例のサンプルから計 50 個の体細胞変異が検出された。2 症例以上で重複する変異は認めなかった。初発時と比較し治療不応期において variant allele frequency (VAF) が大きく増加してい

る変異は検出されなかったが、1 症例において、初発時に検出されていない GBP4 の K547R 変異が治療不応期に新たに検出された。

#### **GBP4 変異体過剰発現細胞株における抗がん剤感受性試験**

AML の治療抵抗性に寄与している可能性があると考えられた GBP4 の変異体をヒト白血病細胞株に導入し抗がん剤の感受性の変化を調べた。2 種類の細胞株 (kasumi-1, ME-1) と 2 種類の抗がん剤 (idarubicin, AraC) を用いたが、いずれの組み合わせにおいても抗がん剤感受性の変化は認めなかった。

#### **治療不応期 AML におけるターゲットリシーケンス**

治療不応期 AML の 45 サンプルを用いて上記の 50 遺伝子の全 CDS 領域に対するターゲットリシーケンスを行った。複数症例で重複する遺伝子として gene X が検出され、統計学的に有意に治療抵抗性 AML において gene X 変異の出現頻度が高いことが示された。

#### **初発時 AML におけるターゲットリシーケンス**

初発時 AML の 50 サンプルを用いて gene X の全 CDS 領域に対するターゲットリシーケンスを行った。治療抵抗性 AML 15 例中 3 例において gene X 変異を認めた。初発時の検体においても統計学的に有意に gene X 変異の出現頻度が高いことが示され、gene X 変異が AML の治療抵抗性に寄与している可能性が示唆された。

#### **gene X ノックダウン細胞株における抗がん剤感受性試験**

gene X 変異が抗がん剤感受性に与える影響を検討するために、ヒト白血病細胞株に対して gene X に対する shRNA ベクターを導入し gene X ノックダウン細胞株を樹立した。2 種類の細胞株 (THP-1, OCI-AML2) と 2 種類の抗がん剤 (idarubicin, AraC) を用いたが、いずれの組み合わせにおいても抗がん剤感受性の変化は認めなかった。

#### **gene X ノックアウト細胞株を用いた解析**

gene X 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細胞増殖速度の低下を認めた。またノックアウト細胞株では idarubicin、AraC に対する感受性が低下し、抗がん剤投与後のアポトーシス細胞の割合が減少することが示された。

## 【考察】

私は本研究において gene X 変異が AML の治療抵抗性に寄与する可能性のあることを見出した。造血器腫瘍におけるこれまでの報告によると gene X 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。gene X 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、gene X を標的とした新規治療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。