

論文の内容の要旨

論文題目 骨髄異形成症候群におけるアザシチジン
治療抵抗性をもたらす遺伝子変異の網羅的解析
氏名 塚本 彩人

骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome: MDS) は遺伝子異常を持つ造血幹細胞によって生じるクローン性の造血器腫瘍であり、単一あるいは複数の血球減少、形態学的異形成、骨髄での無効造血、急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia: AML) への進展を特徴とする。高リスクの MDS は造血不全よりも腫瘍性疾患としての特徴が強く、非常に予後不良な疾患群である。唯一の根治的治療法は同種造血幹細胞移植であるが、MDS 発症時の患者年齢中央値は 70 歳前後であり、多くの高リスク MDS 患者はその適応とならない。そのため大多数の高リスク MDS 患者に対して、この病態に対して唯一生存延長効果が証明された薬剤である DNA メチル化阻害剤による治療が行われる。

DNA メチル化阻害剤であるアザシチジンやデシタビンは DNA 複製時に DNA に取り込まれ、DNA メチル化酵素を直接的かつ非可逆的に阻害する。MDS では多くの遺伝子がメチル化されて発現抑制を受けているとされており、アザシチジンにより細胞分裂後の細胞のゲノム DNA メチル化が抑制されて癌抑制遺伝子などの発現が回復すると考えられているが、作用機序には未だ不明な点が多い。一方、アザシチジン治療の奏効例に対して治療を長期継続しても治療経過中の再燃は不可避であり、治療上の大きな問題となっている。

今までにアザシチジン治療に関する研究として細胞株を用いた *in vitro* の解析や、MDS および AML 症例検体を利用したシーケンス解析などの報告がある。これらの研究の問題点として、*in vitro* の研究はアザシチジンの長期暴露によって作製した薬剤耐性細胞における耐性機序の解析が主であり、実際の臨床上的アザシチジン耐性獲得機序を正確に反映しているかどうかは不明であることが挙げられる。またヒト検体を用いたシーケンス解析は MDS や AML に高頻度で認められる遺伝子変異の有無を治療導入前の検体で解析したもので、アザシチジン治療の予後予測因子

の解明を目的としており、アザシチジンに対する耐性機序の解明を目的としたものではない。またこれらの遺伝子異常とアザシチジン治療抵抗性との機能的な関連も明らかにされていない。

そこで本研究ではアザシチジン治療が奏効した後に再発した高リスク MDS もしくは低腫瘍量の AML 症例の、治療前、治療奏効時、病勢増悪後の各段階の骨髄検体に対する経時的な全エクソンシーケンスを行い、臨床上でアザシチジン治療抵抗性をもたらしている可能性がある遺伝子変異を探索し、実際にヒト白血病細胞株を用いてその遺伝子変異の機能を検証した。

2011年3月から2013年7月までの期間、東京大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科で高リスク MDS または AML に対してアザシチジン治療を導入した 27 症例のうち、アザシチジン治療により奏効が得られ、病勢増悪時まで含めて時系列に沿った骨髄細胞検体を入手可能であったのは 4 症例であった。これらの治療前、治療奏効時、病勢増悪後、コントロールとして骨髄中 T 細胞のそれぞれのサンプルから抽出した genomic DNA を用いて、経時的な全エクソンシーケンスを行った。得られたシーケンスデータに対して遺伝子変異解析や経時的なアレル頻度推移、遺伝子変異の機能解析などで絞り込みを加え、候補となった計 397 遺伝子 (456 箇所) について、治療前と病勢増悪時の検体を用いてサンガー法で変異の存在を再確認した。その結果、治療前と比較して増加傾向がある、もしくは新規新出が疑われる 28 個の候補遺伝子が得られた。これらの遺伝子変異について、ターゲットシーケンスによるアレル頻度の推移を解析した結果、最終的にアザシチジン治療抵抗性をもたらす可能性が示唆される変異として、1 つの新規新出変異 (MAP4K2) と 6 つの増加傾向を来す変異 (BARD1, CD163L1, PCDHB7, PCDHB8, PLCG2, TNRC6A) を同定した。

続いて今回の解析で同定された遺伝子変異がアザシチジン治療に抵抗性をもたらしているかを確認するため、新規新出変異である MAP4K2 の野生型および変異体を外因性に発現させるレトロウイルスベクターを作成し、白血病細胞株である Kasumi-1 へ導入しアザシチジン暴露に対する表現系の変化を調べることにした。

まず MAP4K2 の野生型および変異体を導入した細胞と空ベクターを導入したコントロール細胞に対して、アザシチジン 250 nM または 1 μ M の添加を行い、72 時間後の生細胞数をルシフェラー

ゼアッセイで計測したところ、これらの各細胞の間でアザシチジンに対する感受性の変化は認められなかった。次に DNA メチル化阻害剤は短期間では殺細胞効果を持つピリミジン系代謝拮抗薬としての作用を有し、メチル化の変化は長期間持続することが知られているため、アザシチジン 250 nM を添加し長期間の細胞増殖能の変化を確認した。その結果、アザシチジン暴露後の早期では各細胞の間で増殖能に差は認められなかったものの、day 10 からの 3 日間では MAP4K2 野生型および変異体を発現した細胞はコントロール細胞と比較して有意に高い増殖能が認められた。またこれらの細胞増殖能変化は、一般的に白血病の治療に使用されるピリミジン系代謝拮抗剤であるシタラビンでは認められず、MAP4K2 の発現による治療抵抗性は細胞障害性薬剤全般に対するものではなく、薬剤特異的である可能性が示唆された。

次に MAP4K2 が真にアザシチジンの DNA 脱メチル化効果に対して耐性を惹起することを確認するため、脱メチル化が強く見られるアザシチジンの添加条件における MAP4K2 の効果を、細胞の増殖能で再度評価した。まず DNA 脱メチル化効果を確認するため、アザシチジン 3 μ M を 3 日間連日で Kasumi-1 に添加し、day 4 および day 11 の時点で抗 5 メチルシトシン抗体を用いて DNA のメチル化状態をフローサイトメトリーで確認したところ、アザシチジンを添加した細胞は希釈用の溶媒を添加した細胞と比較して有意な DNA 脱メチル化が認められた。続いて、MAP4K2 野生型および変異体を発現させた細胞とコントロールの細胞に対して、同じ条件でアザシチジンを添加し day 8 から 6 日間の細胞増殖を評価したところ、アザシチジン暴露後の MAP4K2 野生型および変異体を発現させた細胞はコントロールの細胞株と比較して有意に高い増殖能が認められた。また同条件でのアザシチジン添加後のアポトーシス細胞の増加の有無について、アザシチジン添加後 day 11 の時点で解析を行ったところ、コントロール細胞では有意なアポトーシス細胞の増加が認められたものの、MAP4K2 野生型および変異体を発現した細胞では、アポトーシスの有意な増加は認められなかった。

またアザシチジンやデシタビンなどの DNA メチル化阻害剤の添加による長期的影響を増殖・分化能の保持の点から解析することを目的として、半固形培地を用いたコロニー形成能の変化を確認したところ、MAP4K2 変異体を発現した細胞はコントロールと比較してアザシチジン 250 nM 添加後に高いコロニー形成能が認められ、長期的に高い増殖・分化能を保持していることがわか

った。以上のような表現系の結果から、MAP4K2 の野生型および変異体を導入した細胞では、アザシチジン暴露に対して耐性を獲得していることが確認された。

DNA メチル化阻害剤の生物学的な作用機序として、細胞内の dsRNA 発現を亢進しストレス応答経路を活性化するという機能があり、TNF- α やインターフェロンなどのサイトカイン産生を促進することが知られている。また他癌腫と異なり、白血病細胞に対して TNF-a などのサイトカインは増殖亢進に働くことが知られており、MAP4K2 自身もストレス応答経路に関わる遺伝子であることが知られている。そのためアザシチジン暴露後のストレス応答経路の活性化について、DNA 脱メチル化が得られる条件でアザシチジン添加を行い、day 11 の時点の細胞から RNA を抽出し、作成した cDNA に対して定量 PCR を用いてサイトカイン産生の側面から評価した。その結果、MAP4K2 野生型や変異体を発現させた細胞では、DNA 脱メチル化が得られる条件でのアザシチジン添加後に IL28A や TNF- α の産生が増加していることが認められた。

最後に CRISPR/Cas9 システムで作成した MAP4K2 遺伝子変異の片アレルノックインを導入した細胞を作成し、前述の試験と同様にアザシチジン 3 μ M の添加を 3 日間施行し、day 8 より 6 日間の細胞増殖能を細胞数の測定により評価した。結果、MAP4K2 遺伝子変異の片アレルノックインを導入した細胞は MAP4K2 野生型および変異体を導入した細胞と同様に、アザシチジン暴露による増殖抑制効果が認められず、コントロールの細胞と比較して増殖優位性が得られることがわかった。そのため今回認められた MAP4K2 の遺伝子変異は、機能獲得型の変異であることが示唆された。

本研究は MDS 患者検体の経時的な全エクソンシーケンスにより認められた遺伝子変異を用いて、*in vitro* でアザシチジン治療抵抗性が誘導されることを証明した初めての報告である。アザシチジンなどの DNA メチル化阻害剤は血液疾患のみならず様々な癌腫での治療にも用いられ、非常に有用な抗癌剤として全世界で使われている。本研究で認められた MAP4K2 によるアザシチジン耐性獲得の知見が、DNA メチル化阻害剤の作用や耐性獲得機序の解明に大きく貢献することを期待する。