

審査の結果の要旨

氏名 塚本 彩人

本研究は高リスクの骨髄異形成症候群（Myelodysplastic syndrome: MDS）に対する標準治療であるアザシチジンの治療抵抗性の機序を明らかにするため、ヒト検体を用いた全エクソンシーケンスによる遺伝子変異の網羅的解析を行い、検出した遺伝子変異のアザシチジン抵抗性を白血病細胞株で検証したものであり、下記の結果を得ている。

1. 東京大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科でアザシチジン治療を導入した 4 症例に対して、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、治療前と病勢増悪時の検体を用いてサンガー法で候補遺伝子の変異の存在を再確認した。続いて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。その結果、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。

2. 上記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 に着目し、そ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た。低用量のアザシチジン投与から 12 日間増殖能を確認したところ、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の細胞株と比較して有意に高い増殖能が認められた。

3. 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、day 8 から 6 日間の細胞増殖を評価した。結果、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。

4. アザシチジン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。

5. 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、脱メチル化が強く見られるアザシチジンの添加条件で day 8 より 6 日間の細胞増殖能を評価した。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。

以上、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。本研究はこれまでの既報では知られていなかった、アザシチジン治療中の治療抵抗性の解明および DNA メチル化阻害剤の抗腫瘍効果の理解に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。