

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17842

研究課題名(和文) DNA修復機構を標的とした難治性急性骨髄性白血病治療の開発

研究課題名(英文) Targeting DNA repair system for a novel treatment of refractory / relapsed acute myeloid leukemia

研究代表者

脇田 知志 (Wakita, Satoshi)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：70465350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：急性骨髄性白血病(AML)細胞株を対象としてDNA損傷の有無を解析した。すると複数の細胞でH2AXの恒常的な発現が確認された。このH2AX発現細胞株に対してRAD51阻害薬B02を投与すると、DNMT3A変異陰性株では速やかに細胞死が誘導されたが、DNMT3A変異陽性株では細胞死が誘導されなかった。この耐性にはG2/M期での細胞周期停止が関与していた。次に、我々は日本人de novo AML 605人を対象としてDNMT3A変異の臨床的意義を解析した。DNMT3A遺伝子のR882部位の変異はAMLの強力な予後不良因子として抽出された。(Cancer Sci.114(4):1297)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では急性骨髄性白血病細胞株において恒常的にH2AXが発現しており、持続的にDNA損傷が生じていることを示した。さらにDNA二重鎖修復に働くRAD51阻害を行うことで複数の細胞株に細胞死が誘導されることを明らかにした。この事実は、急性骨髄性白血病治療においてDNA修復機構が効果的な治療標的となりうることを示している。

さらに、本研究ではRAD51阻害下でDNMT3A変異陽性細胞株においてG2/M期の停止とそれに伴う細胞死の回避が観察されることが明らかになった。これは予後不良因子であるDNMT3A変異の薬剤耐性機序となっている可能性が高い。今後の新規標的治療の開発に繋がる成果と考える。

研究成果の概要(英文)：DNA damage was analyzed in acute myeloid leukemia (AML) cell lines. We found constant expression of H2AX in several cells. Treatment of these H2AX-expressing cell lines with the RAD51 inhibitor B02 induced cell death rapidly in the DNMT3A mutation-negative line, but not in the DNMT3A mutation-positive line. This resistance involved cell cycle arrest at the G2/M phase. Next, we analyzed the clinical significance of DNMT3A mutations in 605 Japanese de novo AML patients; mutations at the R882 site of the DNMT3A gene were extracted as a strong poor prognostic factor in AML. (Cancer Sci. 114(4):1297).

研究分野：急性骨髄性白血病

キーワード：DNA修復機構 RAD51 急性骨髄性白血病

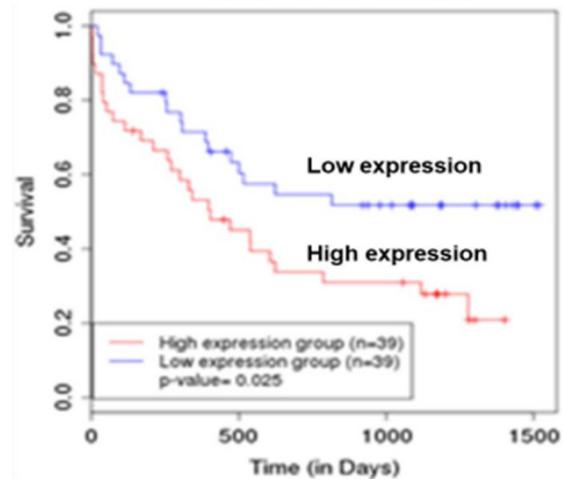
DNA 修復機構を標的とした難治性急性骨髄性白血病治療の開発

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia: AML) や骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome: MDS) において *TP53* 遺伝子変異陽性、染色体複雑核型陽性は強力な予後不良因子であり、その治療抵抗性の獲得には遺伝子不安定性が関わっているものと考えられている。興味深いことに AML 細胞において DNA 二本鎖切断 (DNA-double strand break: DNA-DSB) を伴う DNA 損傷の存在を意味するリン酸化ヒストン H2AX (γ-H2AX) の核内集積が恒常的に観察されることが報告されている (Nat Med. 2014; 20(6): 599-606) (Leuk Res. 2017; 57:112-118)。DNA-DSB を伴う細胞では遺伝子複製が起こらず増殖が停滞するものと考えられるため、これらの白血病細胞の生存・増殖には、DNA 修復機構が強く働いているものと推定される。

DNA-DSB の修復機構には、相同組換え (homologous recombination: HR) 修復機構、非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ) 修復機構などが働くことが知られている。そこで、これらの DNA-DSB 修復機構の担い手である分子について GEO database ならびに canevolve.org を用いて AML における mRNA 発現とその臨床的意義を解析した。すると GSE12417 の結果に基づいた解析において BCRA complex の構成因子である RAD51 の発現が正常核型 AML の予後因子となりえることが明らかとなった (図: GSE12417 の結果に基づいた RAD51 発現による生存曲線. log-rank test: $p = .025$)。この事実は、「AML/MDS においては DSB を伴う DNA 損傷が恒常的に生じており、HR 修復機構を介した DNA 修復が細胞生存に強く関与している」という仮説を支持するものと考えられた。

GSE12417 の結果に基づいた
RAD51 発現による生存曲線



2. 研究の目的

本研究は AML に発生する恒常的 DNA 損傷ならびに DNA 修復機構の働きを解明することを目的としたものである。AML は多様な遺伝学的な背景を持つ疾患であり、背景の遺伝子変異による DNA 損傷・修復の活性化の違いを解明すること、RAD51 に対する標的治療への感受性の評価することを目指して開始された。さらに研究成果の中で、*DNMT3A* 変異が DNA 損傷への耐性に関与することが推定されたことから *DNMT3A* 変異が AML の予後に及ぼす影響について解析を行った。

3. 研究の方法

本研究では得られた研究成果を踏まえ以下の実験が実施された。

- (1) AML 細胞株を対象とした DNA 修復機構に関連したタンパク発現解析 (ウェスタンブロットティング法)
- (2) H2AX 発現細胞を対象とした、sh-RAD51 knock-in 細胞の作製
- (3) H2AX 発現細胞を対象とした、RAD51 阻害薬 BO2 の投与 (トリパンブルーアッセイ)
- (4) AML 細胞株への BO2 の投与後の細胞周期評価 (PI アッセイ)
- (5) BO2 耐性 AML 細胞株への BO2 と PARP 阻害薬 Olaparib の併用効果の検討
- (6) *DNMT3A* 変異陽性 AML の予後解析

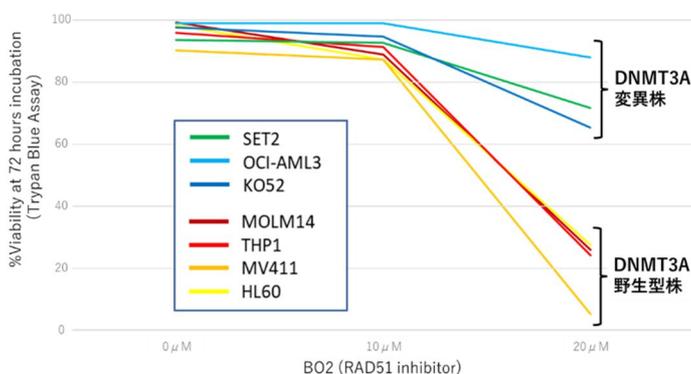
4. 研究成果

- (1) AML 由来の細胞株 12 種を対象として DNA-DSB の存在を反映する H2AX の発現を解析し、HL60, KG1, THP1, MOLM14, MV4-11, OCI-AML3, SET2, KO52, 9 種の細胞株で H2AX が恒常的に発現していることを発見した。
- (2) OCI-AML3 細胞株に対して、DNA-DSB の修復経路である HR 修復のエフェクター分子の一つ RAD51 を抑制する shRNA 導入レンチウィルスベクターを用いた遺伝子導入をおこなった。shRNA は OCI-AML3 細胞株に対して強い増殖阻止効果を示し、細胞内では顕著に H2AX が増加することが明らかになった。この事実から、RAD51 が DNA-DSB の修復に働き、細胞生存に強く関わっていることが明らかになった。この shRAD51 導入細胞は継

代することが困難であった。

- (3) (1)で H2Ax を発現した 9 種の細胞に対して RAD51 阻害薬 BO2 の投与実験を行った。*DNMT3A* 変異陰性細胞株 6 種 (HL60, KG1, THP1, MOLM14, MV4-11) では TP53 変異の有無にかかわらず、速やかに細胞死が誘導された。一方で、*DNMT3A* 変異陽性細胞株 3 種 (OCI-AML3, SET2, KO52) では細胞増殖が抑制されるものの細胞死の誘導が遅延することが明らかになった (図 1)。

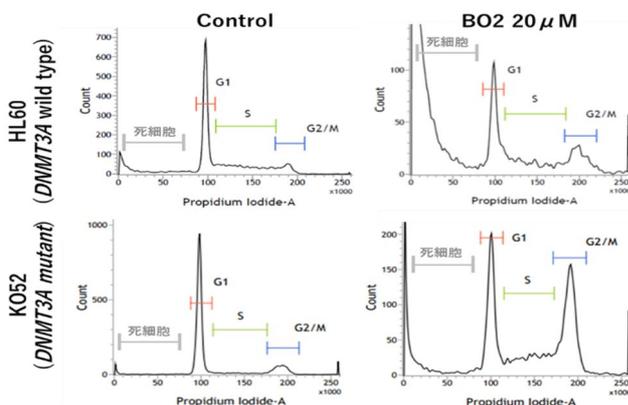
図1: RAD51阻害薬BO2暴露後の細胞生存率 (トリパンブルーアッセイ)



*DNMT3A*変異野生型AML細胞株ではRAD51阻害薬 BO2により細胞死が強く誘導されるが、*DNMT3A*変異陽性AML細胞では細胞死が誘導されにくい。

- (4) *DNMT3A* 変異陰性細胞株 6 種 (HL60, KG1, THP1, MOLM14, MV4-11) および *DNMT3A* 変異陽性細胞株 3 種 (OCI-AML3, SET2, KO52) を用いて BO2 投与後の細胞周期の変化を PI アッセイによって評価すると、*DNMT3A* 変異陽性細胞株では BO2 投与後に G2/M 期で細胞周期が停滞し、生存が維持されていることが判明した (図 2)。

図2: 細胞周期アッセイ (PI法)



*DNMT3A*野生型細胞株HL60ではBO2投与後に死細胞死が増加するが、その一方で、*DNMT3A*変異陽性細胞株KO52ではBO2投与後にG2/M期の細胞が増加し細胞周期が停止していることが解る。

- (5) *DNMT3A* 変異陽性細胞株における HR 修復を代替する DNA 修復機構について PARP1 に依存する NHEJ 修復の関与を想定し、*DNMT3A* 変異陽性細胞株 3 種 (OCI-AML3, SET2, KO52) への BO2 と PARP1 阻害薬 Olaparib の投与実験を行った。BO2 と Olaparib は相加効果が認められたものの相乗効果は確認されなかった。
- (6) *DNMT3A* 変異の予後に与える影響を明確にするため、*NPM1* mutated AML 174 人を含む日本人 *de novo* AML 605 人の予後を後方視的に解析した。*DNMT3A* 遺伝子の R882 部位の変異が、*NPM1* mutated AML の強力な予後不良因子となることが明らかになった。また、染色体正常核型 (normal-karyotype: NK) *NPM1* mutated AML 症例に限定した場合にも、*DNMT3A* 変異は有意な予後不良因子であった。さらに全 AML を対象とした多変量解析を行うと OS に関わる独立した予後不良因子として検出された (Hazard ratio: *DNMT3A*-R882 変異 1.946)。 (Cancer Sci. 2023 Apr;114(4):1297-1308.)

図3: DNMT3A変異陽性AMLの予後解析

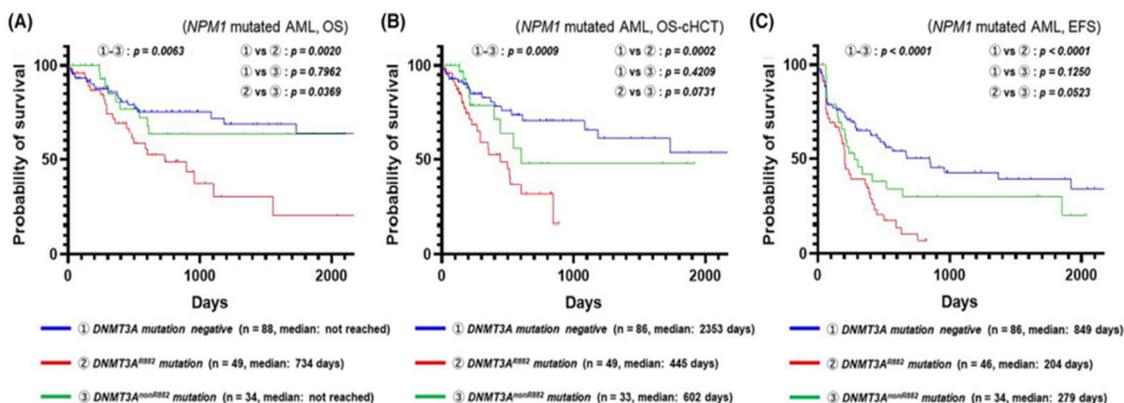
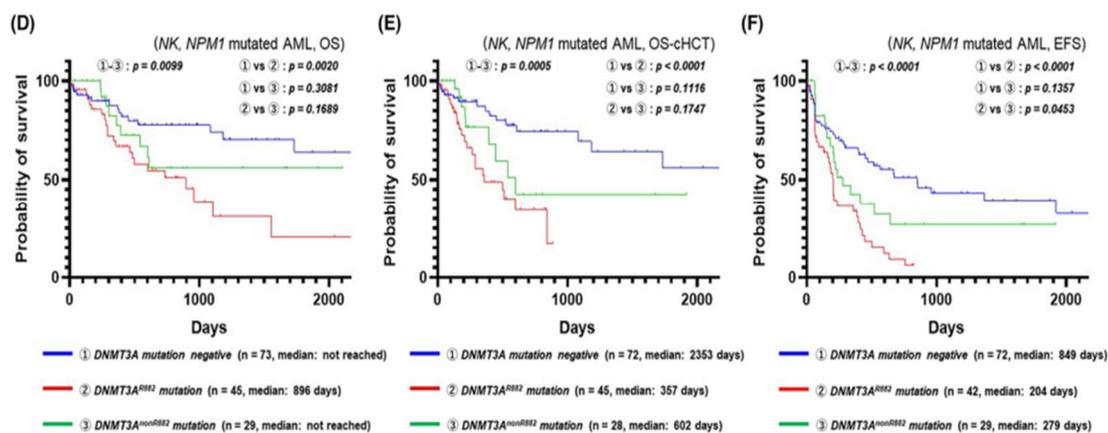


図3: DNMT3A変異陽性AMLの予後解析 (つづき)



(Cancer Sci. 2023 Apr;114(4):1297-1308 より転載)

本研究の結果から、H2AXを発現するAML細胞株においてRAD51の抑制が細胞増殖阻止を誘導することが明らかになった。TP53変異陽性細胞株においても細胞死が強く誘導されたことからDNA修復機構への標的治療がp53非依存性アポトーシスを誘導する可能性を示したものと見える。さらに我々は、RAD51を抑制することによって、特にDNMT3A変異陽性細胞株ではG2/M期が延長し細胞生存維持が引き起こされることを発見した。これらの細胞株ではBO2暴露ならびにsi-RAD51抑制下で顕著なH2AXの増加が認められており、DNMT3A変異陽性細胞株ではDNAダメージが発生した際の細胞維持システムが活性化しているものと考えられた。さらに、我々はこのDNMT3A変異がAMLの予後に及ぼす影響を解析し、DNMT3A-R882部位の変異が強力な予後不良因子となることを明らかにした。これらの事実から、我々はDNMT3A変異陽性AMLにおける抗癌剤耐性にはG2/M期の延長を伴って生じるDNA-DSBの修復機構の活性化が関与しているのではないかと推定している。

本研究ではAMLにおけるHR修復機構の重要な働き、一部のAMLにおけるHR修復機構に依存しないDNA修復機構の活性化の存在が明らかになった。これらの結果をもとに、TP53変異陽性AMLに対するRAD51標的治療の開発、DNMT3A変異陽性AMLにおけるG2/M期での遺伝子発現パターンの解明を目指し、臨床検体での遺伝子発現解析を含めた追加研究を行っている。今後、DNA修復機構を標的とした難治性急性骨髄性白血病治療の開発をさらに発展させていく計画で有る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wakita Satoshi, Marumo Atsushi et al.	4. 巻 114
2. 論文標題 Mutational analysis of <i>DNMT3A</i> improves the prognostic stratification of patients with acute myeloid leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1297 ~ 1308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15720	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 脇田知志
2. 発表標題 Mutation analysis for DNMT3A gene improves the prognostic stratification of acute myeloid leukemia
3. 学会等名 第84回日本血液学会総会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------