

(研究結果報告書)

平成 29 年 3 月 27 日

<研究課題>

高齢者骨髄異形成症候群患者の薬物治療法の発展へ向けた アザシチジン耐性メカニズムの解析

代表研究者 東京大学医学部附属病院輸血部 助教 正本 庸介

【まとめ】

本研究では高リスクの骨髄異形成症候群患者の標準治療となっているアザシチジン治療に対する耐性機序の解明を目的とし、これまでの我々の研究で患者検体から検出されている遺伝子変異に対し、白血病細胞株を用いた耐性機序の確認および機能解析を行った。結果、MAP4K2 という新規新出変異遺伝子の野生型および変異体をレトロウイルスで白血病細胞株に外因性に発現させたところ、アザシチジンに対する耐性獲得が認められた。

1. 研究の目的

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^{1,2}。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³。

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⁴。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^{5,6}。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^{7,8}。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、実際の臨床上的の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。

今までに申請者ら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髓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の探索を行っている。本研究では、今までの結果より得られている遺伝子変異に着目し、実際にヒト白血病細胞株を用いてその遺伝子変異によるアザシチジン耐性惹起の有無およびその耐性機序を検証した。

2. 研究方法と経過

2-1 変異遺伝子発現細胞の作成

今までの研究で同定した変異遺伝子 (MAP4K2) に対して、変異体発現細胞の作成を目的とし、遺伝子のクローニングを行った。クローニングにより得られた変異遺伝子の野生型および変異体を組み込んだレトロウイルスベクターを用いてウイルスを作成し、ヒト白血病細胞株である Kasumi-1 (JCRB1003) に感染させた。これらのフローサイトメトリー (FCM) によるソート後の細胞を、変異遺伝子の野生型および変異を外因性に発現した細胞として以降の実験に使用した。

2-2 細胞に対する薬剤感受性試験

変異遺伝子の野生型および変異体を外因性に発現した Kasumi-1 細胞を用いて、培地にアザシチジンおよびシタラピンを添加して実験を行った。増殖のコントロールとしては空ベクターを導入した同細胞を用い、各継代時の生細胞数はトリパンブルーで染色した細胞を Cytorecon (GE Healthcare, Illinois, USA) を使用して計測した。ルシフェラーゼアッセイ

による生細胞数測定は、発光試薬である RealTime Glo (Promega, Wisconsin, USA) とプレートリーダー ARVO X (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) を用いて行い、発光量計測結果は、バックグラウンドを除去した後、コントロールとの比で評価した。

コロニー形成能試験は、メチルセルロース半固形培地 Methocult H4434 Classic (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) を用いた。

2-3 FCM を用いた解析

アザシチジン添加後の DNA メチル化の解析は既報に従い⁹、HCl による酸処理を加え、Anti-5-methylcytosine 抗体 (Merck Millipore, Massachusetts, USA) で染色し、FACS Aria III (Becton Dickinson, New Jersey, USA) で解析を行った。アポトーシス解析は Annexin-APC および DAPI を用いて解析を行った。

2-4 統計解析

細胞株を用いた *in vitro* の実験では、レトロウイルスによる遺伝子導入を含めて独立した実験を 3 回以上行い、同様の傾向が得られることを確認し、平均値±標準誤差の形式で記載した。統計学的有意差は unpaired t-test を用いて評価した。また FCM データは、全て FlowJo (Star Tree, Oregon, USA) を使用して解析を行った。

3. 研究の成果

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(Fig 1)。

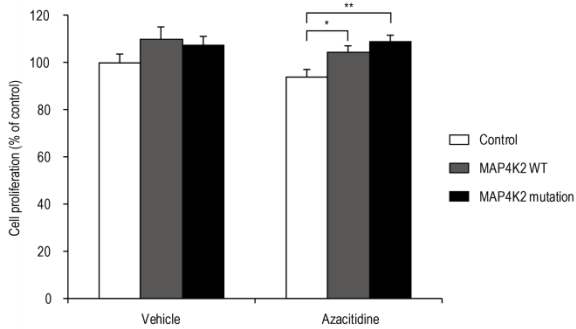


Fig 1. アザシチジン添加後の長期細胞増殖能

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なかったため、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 μM 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、低濃度アザシチジン添加後の長期細胞増殖能の結果と同様に、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(Fig 2)。

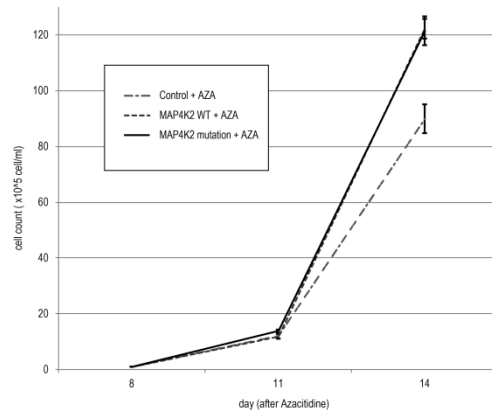


Fig 2. DNA 脱メチル化時の 6 日間の増殖曲線

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(Fig 3)。

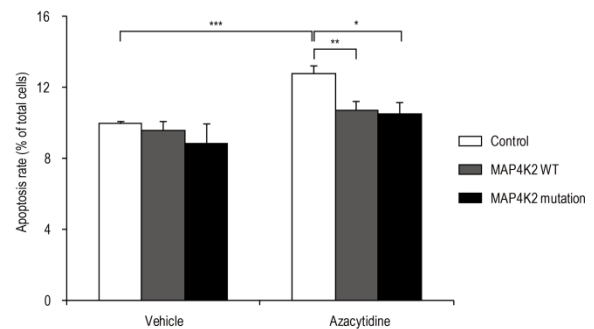


Fig 3. DNA 脱メチル化時のアポトーシス率

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(Fig 4)。

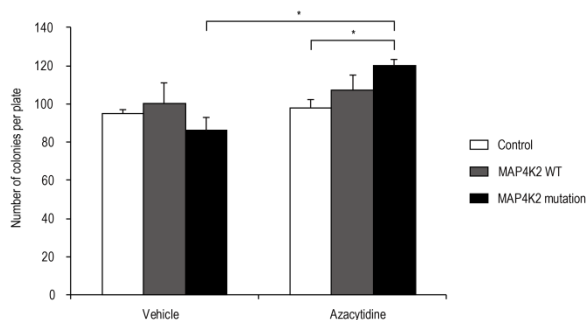


Fig 4. アザシチジン添加後のコロニー形成能

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。

4. 今後の課題

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。今後はこの耐性メカニズムを分子学的機序の面から明らかにし、DNAメチル化阻害剤の作用機序の解明および治療法の改善に貢献することが課題である。

5. 研究成果の公表方法

本研究は2016年10月13日の第78回日本血液学会学術集会で口演を行っている。また今後は医学英文紙への投稿を予定している。

以上

<参考文献>

1. Luger S, Sacks N. Bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome--who? when? and which? *Bone Marrow Transplant* 2002;30:199-206.
2. Cutler CS, Lee SJ, Greenberg P, et al. A decision analysis of allogeneic bone marrow transplantation for the myelodysplastic syndromes: delayed transplantation for low-risk myelodysplasia is associated with improved outcome. *Blood* 2004;104:579-85.

3. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet Oncology* 2009;10:223-32.

4. Issa JP, Kantarjian HM, Kirkpatrick P. Azacitidine. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:275-6.

5. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Methylation of p15INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003;17:1813-9.

6. Shen L, Kantarjian H, Guo Y, et al. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2010;28:605-13.

7. Cluzeau T, Robert G, Puissant A, et al. Azacitidine-resistant SKM1 myeloid cells are defective for AZA-induced mitochondrial apoptosis and autophagy. *Cell Cycle* 2011;10:2339-43.

8. Desoutter J, Gay J, Berthon C, et al. Molecular prognostic factors in acute myeloid leukemia receiving first-line therapy with azacitidine. *Leukemia* 2016;30:1416-8.

9. Habib M, Fares F, Bourgeois CA, et al. DNA global hypomethylation in EBV-transformed interphase nuclei. *Exp Cell Res* 1999;249:46-53.