

氏 名 西下 愛

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士第999号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項

学 位 授 与 年 月 日 令和6年3月21日

学 位 論 文 題 目 FUS-ERG induces late-onset azacitidine resistance in acute myeloid leukaemia cells.
(FUS-ERG は急性骨髄性白血病細胞において遅発性のアザシチジン耐性を誘導する)

審 査 委 員 主査 教授 九嶋 亮治
副査 教授 塩見 直人
副査 教授 依馬 正次

論文内容要旨

※整理番号	1008	(ふりがな) 氏名	にしいた あい 西下 愛
博士論文題目	FUS-ERG induces late-onset azacitidine resistance in acute myeloid leukaemia cells (FUS-ERGは急性骨髄性白血病細胞において遅発性のアザシチジン耐性を誘導する)		
<p>目的 FUS-ERG は t(16;21)転座により生じるキメラ遺伝子で、骨髄異形成症候群(MDS)や急性骨髄性白血病(AML)に稀にみられ予後不良因子とされている。RNA スプライシングに関与するFUSの障害により、アイソフォーム変化が生じやすくなると報告されている。また、造血分化に必須の転写因子 ERG が障害され正常な造血分化が妨げられることで、白血病発症に寄与すると報告されている。しかし、FUS-ERG の化学療法抵抗性に関与するメカニズムは不明である。一方、DNA 脱メチル化薬のアザシチジン(Aza)は、高リスクMDSや高齢者AMLへの第一選択薬として近年使用されるが、FUS-ERGを有するMDS/AMLへの有効性については不明である。今回、AzaがFUS-ERGを有するMDS/AMLに有効かどうかを明らかにするために本研究を行った。</p> <p>方法 FUS-ERGないし空ベクターを導入したBa/F3細胞をAza含有培地で7日間培養した後、Aza非含有培地で21日間培養するコースを繰り返して生細胞数測定を行いAzaに対する感受性の変化を解析した。Aza耐性を獲得した段階でRNAシーケンス(RNA-seq)を行い、発現量が2倍以上変化した遺伝子、リファレント遺伝子の中を含むまたは1つ以上のジャンクションを含む転写バリエーションを有した遺伝子を抽出し遺伝子オンロジー(GO)解析を行った。また、FUS-ERGをもつMDSに対しAza複数回投与後にAMLへ転化した臨床症例の骨髄細胞を用いて全ゲノムシーケンス(WGS)を行い、MDS診断時とAML転化時のゲノム変異を比較した。AML転化時に新たにみられたコーディング領域の変異遺伝子と、転写調節領域(TRA)の変異から20kb以内にある遺伝子を抽出した。それらをRNA-seqで得られた遺伝子リストと照合し、FUS-ERGによるAza耐性獲得に関わる遺伝子を同定した。変異したTRAにリクルートされる転写調節因子を検索し、特定の転写調節因子と関連するTRAに変異がないか解析を行った。AML転化時の細胞を培養しBCL-2阻害薬やMCL-1阻害薬を7日間暴露した後、生細胞数測定やアネキシンVアッセイを行って有効性を解析した。</p> <p>結果 FUS-ERGを導入したBa/F3細胞は3コース後にAzaへの耐性を獲得した。この段階でRNA-seqを行い、74遺伝子の発現上昇、320遺伝子の発現低下を認めた。これら394遺伝子のGO解析では、サイトカイン産生、キナーゼ活性の調節が上位に挙げられた。また、NCOR2を含む1321遺伝子にアイソフォーム変化を認め、GO解析ではmRNAおよびDNA代謝プロセス、クロマチン構成が上位にリストされた。WGSではコーディング領域にBCORを含む29遺</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、
2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

伝子に新たに変異が加わっていた。TRAの変異から20kb以内にある遺伝子として48遺伝子が抽出された。これらの遺伝子はクロマチン構成に関与しており、RNA-seqデータと重複する遺伝子としてNCOR2が含まれていた。変異したTRAにおいて転写調節因子を検索したところ、RCOR1、CHD2、PHF8、STAT1、GATA1、RXRA、KDM5B、HDAC1がリクルートされるTRAの変異がMDS診断時よりもAML転化時で多くみられた。AML転化時の細胞に対してBCL-2阻害薬は効果を認めなかったが、MCL-1阻害薬では濃度依存性に細胞生存率が低下し、アネキシンV陽性細胞が有意に増加した。

考察 FUS-ERG導入細胞はAza複数回暴露後に耐性を獲得し、FUS-ERGはクロマチン構成に影響を与える可能性が示唆された。さらに臨床検体を用いたWGS結果と統合的に解析することで、BCORやNCOR2、RCOR1などクロマチン構成に重要なコリプレッサーの異常が関与している可能性が示唆された。BCORは脱メチル化されたCpGアイランドを標的にして遺伝子発現抑制に関わるため、DNA脱メチル化薬との関連性が推測される。NCOR2は遺伝子発現抑制や染色体安定化に寄与するため、スプライシング異常によるNCOR2のアイソフォーム変化は染色体を不安定化させる可能性がある。ヒストン修飾補因子であるRCOR1が関わるTRAに選択的変異を認めることから、TRAの調節不全が耐性獲得の一因である可能性も考えられた。AML転化時の細胞においてWGSではBCL-2遺伝子に異常を認めず、BCL-2阻害薬耐性の機序は不明であった。MCL-1阻害薬がDNA脱メチル化薬耐性を克服できるかどうかは今後症例数を増やした研究が必要である。今回の結果はFUS-ERG陽性細胞に限った検討であるが、FUS-ERGに特有の機序なのかFUS-ERGにとどまらずAML/MDSのAza耐性に一般的に言えるのかについてはさらなる研究が必要である。

結論 FUS-ERGは遅発性のAza耐性獲得を誘導した。BCOR、NCOR2、RCOR1などの異常によってクロマチンの不安定化が起こりAza耐性獲得に寄与する可能性が示唆された。また、MCL-1阻害薬は、FUS-ERGを有するAMLにおけるAza耐性克服の一助になる可能性がある。

博士論文審査の結果の要旨

整理番号	1008	氏名	西下 愛
論文審査委員	主査	九嶋 亮治	
	副査	塩見 直人	
	副査	依馬 正次	
<p>(博士論文審査の結果の要旨)</p> <p>t(16:21)転座により生じるキメラ遺伝子FUS-ERGは骨髄異形成症候群 (MDS) や急性骨髄性白血病 (AML) で稀にみられ予後不良因子のひとつとされている。一方、DNA脱メチル化薬のアザシチジンは高リスクMDSや高齢者AMLへの第一選択薬として使用されている。今回、FUS-ERG陽性例でのアザシチジンの有効性を明らかにするため、FUS-ERGを強発現する細胞とFUS-ERG陽性症例を対象とした研究を行い以下の点を明らかにした。</p> <p>1) FUS-ERGを導入したBa/F3細胞でアザシチジンに対する感受性を検討したところ3コース後に耐性を獲得した。この段階でRNA-seqを行い、74遺伝子の発現上昇、320遺伝子の発現低下を認め、GO解析では、サイトカイン産生、キナーゼ活性の調節が上位にあがった。</p> <p>2) NCOR2を含む1321遺伝子にアイソフォーム変化を認め、GO解析ではmRNAおよびDNA代謝プロセス、クロマチン構成が上位にあがった。</p> <p>3) 初診時MDSで再燃時AMLとなったFUS-ERG陽性症例の全ゲノムシーケンス解析を行い比較した。RCOR1, CHD2, PHF8, STAT1, GATA1, RSRA, KDM5B, HDACがリクルートされる転写調節領域 (TRA) の変異がAML転化時で多くみられた。</p> <p>4) AML転化時の細胞に対してBCL-2阻害薬は効果を認めなかったが、MCL-1阻害薬では濃度依存性に細胞生存率が低下し、アネキシンV陽性細胞が有意に増加した。</p> <p>本論文は、MDS/AMLの病態と治療について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総文字数599字)</p> <p style="text-align: right;">(令和6年2月21日)</p>			