

# 博士論文（要約）

ノックインマウスモデルによるDNMT3A変異の  
造血機構における意義の探索

比護 貴史

## 論文の内容の要旨

論文題目 ノックインマウスモデルによる *DNMT3A* 変異の造血機構における意義の探索

比護 貴史

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia :AML) は、幼弱な骨髄系細胞の自律的増殖を特徴とする血液腫瘍であり、短期間で致死的となる重篤な疾患である。近年飛躍的に進歩した次世代シーケンスシステムにより AML における遺伝子変異プロファイルが網羅的に明らかになってきており、こうした解析により新たに同定された新規遺伝子変異が AML の発症及び維持においてどのような役割を担っているかを明らかにしていくことで、新規治療の開発やさらなる治療成績の改善につながっていくものと考えられる。

本研究において我々が着目した DNA methyltransferase 3 alpha (*DNMT3A*) 変異は 2010 年に新たに AML において存在が報告されたエピゲノム制御遺伝子の変異であるが、特に染色体異常を有さない正常核型 AML において 2 割程度に存在が認められておりエピゲノム関連遺伝子変異のなかでも最も頻度の多いものの一つである。*DNMT3A* は DNA 中のシトシンをメチル化修飾し 5-メチルシトシンに変換する酵素をコードしている遺伝子であり、特に *de novo* の DNA メチル化パターン形成に寄与している。*DNMT3A* 変異を有する造血器腫瘍患者において、非腫瘍性の骨髄細胞や治療後の血球細胞で *DNMT3A* 変異がしばしば存在していることが報告されている。さらに、健常高齢者においても 5~10%の頻度で *DNMT3A* 変異を持つクローンが存在することも明らかになっている。また、*DNMT3A* 変異を有する AML 細胞は *IDH1* 変異や *NPM1* 変異、*FLT3-ITD* 変異といった他のドライバー変異を伴うことから、*DNMT3A* 変異を有する造血幹細胞が前白血病造血幹細胞、すなわち正常血球への分化能や自己複製能を保ちつつクローン性に緩やかに増大し、ドライバー変異の獲得により腫瘍化する幹細胞として寄与しているのではないかと推測されている。この *DNMT3A* 変異と白血病の発症及び維持の関係を示唆するいくつかの実験的な報告が存在するが、それらは変異型 *DNMT3A* の過剰発現やノックアウトマウスモデルによる報告であり、これまで内在性レベルの変異型 *DNMT3A* の発現が造血系にもたらす影響についての報告はいまだにない。従って、本研究では Cre-loxp システムを用いて造血

器細胞特異的に *Dnmt3a* 変異をノックインできるマウスモデルを作製し、その機能的意義に迫ることを目的とした。なお、AML における *DNMT3A* 変異はその大部分が R882H および R882C という点突然変異であることから、マウスにおける相同部位である R878C 変異をノックインすることとした

本研究において、*Dnmt3a* 変異をノックインしたマウスは造血器腫瘍を自然発症することではなく、内在性レベルの *Dnmt3a* 変異が単独で腫瘍化を引き起こす可能性は低いと考えられた。このことから、*DNMT3A* 変異を有する白血病の発症過程においてこの変異が、細胞増殖をもたらすクラス I 変異と分化異常をもたらすクラス II 変異が合わさることで異常な骨髄芽球の無秩序な増殖、すなわち AML の発症がおきるという古典的発症モデルに先立つ形で発症に寄与しているのではないかと考えられた。

私は、本研究において *Dnmt3a* 変異は単独で骨髄中の長期造血幹細胞 (Long term -Hematopoietic Stem Cell : LT-HSC) 分画の増大を引き起こすが、一方でこの増大は LT-HSC 分画のみにとどまることを示した。また、*Dnmt3a* 変異を有する LT-HSC では静止期に存在している細胞の割合が増加していたことを併せて示した。マウスにおける造血細胞は、LT-HSC を頂点としたヒエラルキーのもとで下流に向かい分化していくことが知られているが、LT-HSC の殆どは抗がん剤投与時や瀉血時など血球細胞が大幅に失われるような非常時にのみ細胞周期に入り、分裂を起こして造血細胞の回復を導く存在であり、平常時には前駆細胞が造血を支える役割を果たしていることが知られている。本研究においては、そのような平常時では造血機構の構築に寄与しておらず殆ど細胞分裂を行っていない LT-HSC が増加しているために下流の分化細胞が増加していないのだと考えられた。

さらに、コロニー継代実験を行い、*Dnmt3a* 変異を有する造血幹前駆細胞は、in vitro 環境で自己複製能および増殖能が亢進していることを示した。*Dnmt3a* 変異を有さないマウス由来の造血幹/前駆細胞は4継代目までにコロニー形成能を失っており、本研究で使用した半固形培地による培養と継代はマウス造血幹細胞の自己複製能に対し抑制的に働く環境であると言える。こうした環境下において *Dnmt3a* 変異はコロニー継代数の増加および各継代時におけるコロニー形成数の増加をもたらしており、造血幹前駆細胞の自己複製能および増殖能を亢進させていると考えられる。

これらのことから、*Dnmt3a* 変異を有する造血幹細胞は、その多くが静止期にあることで平常時の造血機構には大きな影響を及ぼさないが、細胞周期にエントリーした場合には自己複製能や増殖能が亢進していることが示唆される。このような幹細胞性の維持機能が造血器腫瘍を発症していない健常高齢者における *DNMT3A* 変異クローンの存在や拡大につながっており例えば抗

がん剤や紫外線への曝露、感染や失血などの外的刺激により前駆細胞以降が枯渇して造血幹細胞が分裂せざるを得ない状況や、あるいは加齢に伴い徐々に造血幹細胞が静止期から動員されていく中で *DNMT3A* 変異を有する細胞が増加していくというモデルが考えられる。さらに、造血幹細胞を強制的に分裂させると一定の割合で DNA 損傷が蓄積されていくことが知られており、*DNMT3A* 変異陽性造血幹細胞が分裂し徐々にクローンを拡大していく過程で DNA 損傷が蓄積されていくことで造血器腫瘍の発症につながることを推測される。さらに、*DNMT3A* 変異は AML において予後不良因子であることが知られているが、抗がん剤は細胞周期依存性の薬剤が多く、静止期にある *DNMT3A* 変異陽性造血幹細胞には効果が減弱する可能性があり、また抗がん剤による造血ストレスによって *DNMT3A* 変異クローンがむしろ拡大することが治療抵抗性を付与している可能性が考えられた。

この *DNMT3A* 変異細胞の骨髄におけるクローン性の増加を確かめるためにマウスを用いた競合的移植モデルを作成しキメリズムの解析を行ったが、本研究では骨髄内環境における *Dnmt3a* 変異細胞の野生型細胞に対する優位性を実証することはできなかった。即ち、本研究結果から *Dnmt3a* R878C 変異は他の AML におけるドライバー変異でみられるような、増殖や造血再構築における強い優位性は単独では有していないことが示唆された。

さらに、*DNMT3A* 変異はゲノム全体のメチル化状態の変化を起こしていると考えられるため、多くの遺伝子の発現に変化が起こることが予測されるが、*DNMT3A* 変異による静止期造血幹細胞の増加の原因となりうる遺伝子群の発現解析を行った結果、*Cdc20*、*Cdc45l*、*Trp53* などの遺伝子発現の上昇や *Cend1*、*Tgfb1*、*Cdc6* などの遺伝子発現の低下が明らかとなった。*Cdc20*、*Cdc45l*、*Cdc6*、*Cdc45l* は DNA の複製過程で機能する遺伝子であるが、特に DNA 損傷存在下におけるチェックポイント応答に密接にかかわっている。*Tgfb1* は TGF- $\beta$  をコードしている遺伝子であり、TGF- $\beta$  は多くの腫瘍において発症早期には腫瘍抑制的に働くと報告されている。また *Trp53* はがん抑制遺伝子としてその存在を広く知られているが、細胞周期制御の中心となる遺伝子でもあり、ノックダウンにより静止期の細胞が減少することから、本研究で見出された静止期造血幹細胞の増加と *Trp53* の発現上昇に密接な関わりがあることが推測された。

まとめると、私は本研究において、*Dnmt3a* R878C 変異を血球系細胞にノックインしたマウスでは LT-HSC 分画が増大することを示し、さらにその分画では細胞周期における静止期細胞の比率が増加することを示した。さらに、この *Dnmt3a* R878C 変異は *in vitro* において造血幹細胞の自己複製能と増殖能の亢進をもたらすことを示した。また、*Dnmt3a* 変異が *Cdc20*、*Cdc45l*、

**Trp53** の発現上昇および *Ccnd1*、*Tgfb1*、*Cdc6* の発現低下をもたらすことを示した。これらの知見は、*DNMT3A* 変異を有する細胞が造血幹細胞分画において幹細胞機能を保ちながら緩徐に増加し、その過程でドライバー変異を獲得していくことで白血病を発症する可能性を示すものである。こうした *DNMT3A* 変異における増殖・細胞周期制御のより詳細な分子機構の解明が、*DNMT3A* 変異陽性白血病の発症抑制や治療抵抗性の解消につながっていくものと考えられる。