

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	成育科学領域小児病態学分野 氏名 田中 龍彦
<p>(論文題目)</p> <p>Antileukemic effect of azacitidine, a DNA methyltransferase inhibitor, on cell lines of myeloid leukemia associated with Down syndrome</p> <p>(ダウン症関連骨髄性白血病細胞株に対する DNA メチル基転移酵素阻害剤, アザシチジンの抗白血病効果)</p>	
<p>【背景】</p> <p>ダウン症関連骨髄性白血病 (ML-DS) は, シタラビンをはじめ化学療法に対する感受性が高く, 良好な治療成績が得られているが, 治療関連死亡率も高い. また, 治療抵抗例や再発例の予後は不良であり, 低毒性の新規治療法の開発が望まれる.</p> <p>アザシチジン (AZA) は DNA メチル基転移酵素阻害剤 (DNMTis) であり, 非ダウン症の急性骨髄性白血病 (non-DS AML) における有効性/安全性が臨床的に証明されている. 我々は以前, 重篤な副作用を伴わずに AZA が奏効した再発 ML-DS の症例を報告した. しかし, AZA が難治性または再発性の ML-DS に有効であるかどうかは, 依然として不明である. また, ダウン症では, トリソミー21 を背景としたインターフェロン (IFN) 受容体発現の上昇に起因する IFN 反応異常が報告されているが, ML-DS における IFN 反応性は未解明である.</p> <p>本研究では, 再発症例から樹立した ML-DS 細胞株に対する AZA の抗白血病効果を検討した. さらに, ML-DS における IFN 経路の影響を検討した.</p> <p>【方法】</p> <p>はじめに, ML-DS 細胞株と non-DS AML 細胞株を 3 日間の AZA 処理後に半数阻害濃度を測定し, 細胞増殖抑制効果を測定した. また, ML-DS 細胞株に異なる濃度の AZA を 3 日間連日投与後, 細胞増殖能を測定した. 次に AZA 投与後 ML-DS 細胞を用いてアポトーシス解析, 細胞周期解析, フローサイトメトリー, アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) 活性測定, コロニー形成アッセイをおこない, AZA の増殖抑制効果の機序を検討した. また, RNA-seq を用いた遺伝子発現差解析を実施し, AZA が ML-DS の細胞増殖を阻害する機序について調べた. さらに, AZA 投与による I 型 IFN 経路活性化の ML-DS 細胞の増殖への影響について調べるため, IFN-α/β 受容体抗体の存在下または非存在下で細胞増殖抑制効果を調べた. 最後に, AZA のダウン症正常造血細胞に対する毒性を調べるため, ML-DS 患者および non-DS AML 患者の両者における寛解期骨髄細胞を用いて, コロニー形成アッセイを行い, 毒性を比較した.</p> <p>【結果】</p> <p>AZA は, 用量依存性に ML-DS 細胞株の増殖を抑制した. AZA は G1+G2M 期での細胞周期の停止を引き起こし, アポトーシスを誘導した. フローサイトメトリー, ALDH 活性測定では白血病幹細胞様集団が AZA 投与後減少していた. コロニー形成アッセイではコロニー形成能が低下し, 長期間持続した. 包括的な遺伝子発現差解析により, AZA は巨核球分化を誘導した. さらに, AZA は主に抗増殖シグナル伝達に関与する I 型 IFN 刺激遺伝子の活性化を誘導したが, IFN 遺伝子発現や IFN 受容体発現は変化が見られなかった. また, IFN 受容体の遮断は AZA の抗白血病効果を変化させなかった. 寛解期の non-DS AML と ML-DS の骨髄細胞の間で, AZA 投与後のコロニー形成能に有意差は認めなかった.</p>	

【考察】

我々は AZA が *in vitro* で ML-DS 細胞株に対して抗白血病活性を示すことを証明した. AZA の作用機序としては, 細胞周期の停止, アポトーシスおよび細胞分化の誘導, 白血病幹細胞様集団の減少, IFN 経路の内在性免疫調節活性化などが挙げられた. ML-DS 細胞株において, AZA 投与後に巨核球分化に関与する遺伝子群の発現の上昇が認められたが, これらは non-DS AML では見られず ML-DS 特異的な変化と思われた. ダウン症においては治療関連合併症が多いため, non-DS AML と ML-DS の寛解期骨髓細胞を用いてコロニー形成アッセイを行い, AZA 投与の正常造血に対する影響を検討したが, 2 群間でコロニー形成能に有意差はなく, 重篤な副作用が少ない可能性が示唆された.

最近, ダウン症は 21 番染色体過剰による IFN 受容体の高発現を介して, IFN 刺激に対する持続的な異常応答と関連することが報告された. AZA の IFN 経路活性化による抗白血病効果に IFN 受容体高発現がどのように影響するか検討したが, AZA 投与によって IFN 遺伝子発現や IFN 受容体発現は変化せず, また IFN 受容体の遮断は AZA の抗白血病効果を変化させなかった. これらの結果から, IFN 受容体を介した白血病細胞増殖への影響は低いことが示唆された.

以上より, 我々は, AZA が難治性 ML-DS の病勢コントロールにおいて, 比較的安全かつ有効な治療選択肢となりうることを明らかにした. 今後, 動物モデルや大規模臨床試験などにより, 臨床的な安全性及び有効性のさらなる検討が望まれる.