

## 1. 骨髄系腫瘍患者における全エクソンシーケンス解析による MBD4 変異の同定

留学先施設における家族性再発難治性 AML 症例から、*MBD4* (methyl-CpG-binding domain 4) 遺伝子の germline 変異が同定されたことから、この遺伝子に着目し、国際共同研究による 1692 例の骨髄系腫瘍患者(MDS732 例/AML960 例)コホートにおいて、この *MBD4* 変異の解析を行った。計 24 例で damaging 変異を認め、4 例が methyl-CpG-binding domain に、5 例が glycosylase domain に変異を認めた。*MBD4* 野生型患者と比較し、*MBD4* 変異患者では *TET2* 変異を有する頻度は低い傾向にあった。*MBD4* は MBD 分子の中で唯一 DNA hydrolase の機能を有しており、*MBD4* germline 変異ではミスマッチ修復(MMR)不全による C>T 変異が増加することが既に報告されている。*MBD4* は 5-methylcytosine (5mC)と *TET2* の酸化物である 5-hydroxymethylcytosine (5hmC)に結合し、メチル化 CpG DNA 周辺の MMR に関わっていることが報告されているが、*TET2* との関わりを含む詳細な分子動態はまだ明らかにされていない。そこで我々は、*MBD4* の機能不全は *TET2* と相互作用して MMR の異常をきたし、AML の変異クローン増殖を引き起こすと仮説を立て、*MBD4* 欠失の分子基盤の解明を行った。

## 2. MBD4 ノックアウト細胞の作製と増殖能の検討

AML 細胞株(THP1、K562 細胞)を用いて CRISPR/Cas9 システムによる *MBD4* knockout (*MBD4*KO)、*TET2* knockout (*TET2*KO)、double knockout(DKO)細胞を作製した。*MBD4* と *TET2* の欠失が白血病化に関与するのか、これらのノックアウト細胞において、コロニーアッセイで評価した。*MBD4*KO と *TET2*KO は同等に野生型よりコロニー形成能の増加を認めたが、DKO ではこの作用はキャンセルされた。次に正常造血幹細胞における *MBD4* 欠失の影響を検討した。ヒト臍帯血より CD34 陽性細胞をソートし、CRISPR/Cas9 を用いて *MBD4* をノックアウトした。野生型と比較し、*MBD4*KO のみ replating 後もコロニー形成を認めた。この結果から、*MBD4* 欠失が白血病クローン進化に関わることが示唆された。

## 3. MBD4 ノックアウトが及ぼす DNA メチル化への影響

*MBD4*KO、*TET2*KO、DKO THP1、K562 細胞株で 5mC、5hmC の蛋白発現量をドットブロット法および蛍光免疫染色を用いて定量した。*TET2* 野生型細胞では両方法において *MBD4* 欠失により 5hmC/5mC 比が増加したのに対し、*TET2* 欠失下では *MBD4* 欠失によるこの変化は認めなかった。この結果から、*MBD4* は *TET2* 依存性に *TET2* の下流で 5hmC>C への置換に関わっていることが示唆された。

## 4. MBD4 ノックアウトによる発現変動解析

*MBD4*KO、*TET2*KO、DKO による AML 細胞株での発現変化を RNAseq にて解析した。*MBD4*KO 細胞では、base excision repair (BER) 遺伝子群の発現が有意に低下していた。また *MBD4* と *TET2* それぞれの KO 細胞では発現変動遺伝子に重複はなく、DNA 修復における独立した役割が想定された。

## 5. MBD4 ノックアウトによる薬剤感受性変化の検討

BER 遺伝子群の一つである PARP1 の発現変化に着目し、PARP 阻害剤 Olaparib の感受性を *MBD4*KO、*TET2*KO、DKOAML 細胞において検討した。AML の標準治療に使用される Cytarabine 単剤、Olaparib 単剤、併用投与を行い、72 時間後の生細胞率を計測し、IC50 を算出した。IC50 は DKO で最も低下を認め、また *MBD4*KO DKO THP1 細胞株において AraC と Olaparib 併用治療による相乗効果を認め、我々の仮説通り *MBD4* と *TET2* が相互作用し BER/MMR に関わっていることが示唆された。

上記研究課題について第 64 回米国血液学会でポスター発表を行った(Blood (2022) 140 (Supplement 1): 8783–8784)。現在、継続して *MBD4*KO、*TET2*KO、DKO、*MBD4* ノックイン AML 細胞を移植したマウスモデルを用いて vivo での増殖能の変化を検討している。さらに Mass spectrometry を用いて *MBD4* 分子に結合し BER に作用している蛋白の同定を行っている。この他に、発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)患者における免疫チェックポイント分子を介した PNH クローン進化機序について研究し、第 64 回米国血液学会でポスター発表を行い、ASH-IPiG Abstract Achievement Award を受賞した (Blood (2022) 140 (Supplement 1): 5790–5791)。