

研究助成 2018 –がん領域– 研究成果報告書（最終） <概要>

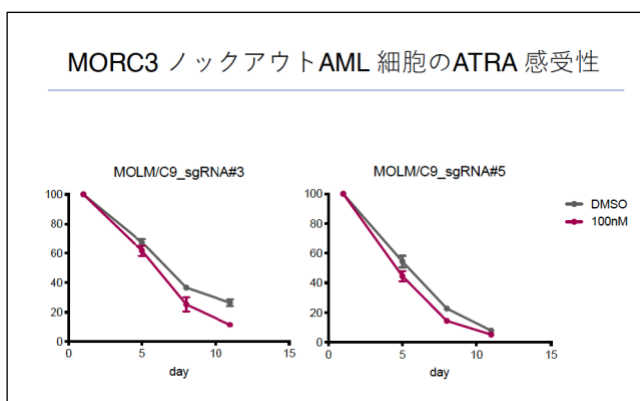
所 属	九州大学病院 遺伝子・細胞療法部
氏 名	山内拓司
研 究 テーマ	CRISPR-Cas9 機能的ノックアウトスクリーニング法を用いた AML に対する ATRA 併用新規分化誘導療法の開発

- 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- 枚数は 1 ページにまとめること。（図表、写真などの添付を含む）

・研究結果

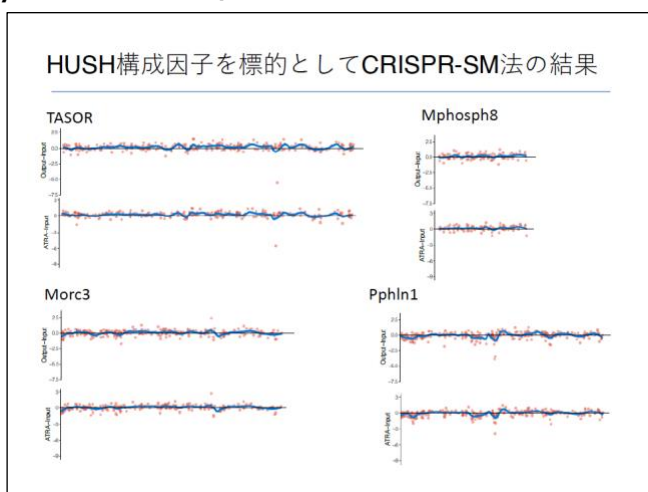
1. HUSH 複合体構成因子欠損 AML 細胞株における ATRA 感受性・分化誘導能

CRISPR-Cas9 system を用いて、各 HUSH 複合体構成因子を欠損したヒト AML 細胞株を樹立した。各 sgRNA は蛍光色素 Crimson で標識されており、標的遺伝子が欠損した AML 細胞は FACS により Crimson 陽性細胞として同定可能である。HUSH 構成因子欠損 AML 細胞と、非欠損 AML 細胞を共培養し、そこに ATRA を添加することで ATRA に対する感受性を評価した。右図に示すように、DMSO 添加時と比較して ATRA 添加時において、MORC3 欠損 AML 細胞 (Crimson 陽性細胞) は明らかに減少した。このデータは MORC3 欠損が ATRA に対する感受性を増大させていることを示唆する。その他の HUSH 構成因子である、Tasor, Mphosph8, Pph1n1 の欠損は ATRA に対する感受性に明らかな影響を及ぼさなかった。



2. HUSH 複合体構成因子を標的とした CRISPR/Cas9-SM 法の結果

各 HUSH 構成因子に対して CRISPR-saturating mutagenesis 法を行い、各構成因子欠損が ATRA と協働して AML 細胞死を誘導するのを検証するとともに、各 sgRNA の情報をその sgRNA が標的とする double-stranded break コドンの情報にマップし、重要なアミノ酸残基・ドメインの同定を試みた。右図に示すように、Tasor, Mphosph8, Pph1n1 に関しては、ATRA 添加時、非添加時で有意な差を認めなかった。Morc3 に関しては、ATRA 非添加時と比して ATRA 添加時に若干の AML 細胞死の誘導を認められた。現在、結アミノ酸残基の情報をその結晶構造に投影・可視化するために解析中である。



・考察

今回の研究で、スクリーニングで ATRA と協働して AML 細胞死を誘導する候補因子として HUSH 複合体に着目し、その各構成因子を検証した。Morc3 に関しては、その欠損が ATRA と協働して AML 細胞死を誘導する可能性が示された。Morc3 は PML body を形成する因子として必須であることが報告されており、Morc3 欠損が、ATRA と協働して AML 細胞死を誘導する、そのメカニズムを研究していく必要がある。

研究助成 2018 –がん領域–

研究成果報告書（最終）＜発表実績/予定一覧＞

所	属	九州大学病院 遺伝子・細胞療法部
氏	名	山内拓司

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> □ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。 □ 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 □ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に<u>下線</u>を引く。 □ 国内外雑誌を問わない。 □ 印刷中は in press と記入、投稿中の論文はその旨を記載すること。なお学会のabstractは含めない。 □ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
1	Suzuki K, Yanagihara T, Matsumoto K, Kusaba H, <u>Yamauchi T</u> , Ikematsu Y, Tanaka K, Otsubo K, Inoue H, Yoneshima Y, Iwama E, Arimura-Omori M, Harada E, Hamada N, Okamoto I, Nakanishi Y. Immune-checkpoint profiles for T cells in bronchoalveolar lavage fluid of patients with immune-checkpoint inhibitor-related interstitial lung disease. Int Immunol. 2020 Jul 28;32(8):547-557. doi:10.1093/intimm/dxaa022. PMID: 32253426.
2	Jinnouchi F, <u>Yamauchi T</u> , Yurino A, Nunomura T, Nakano M, Iwamoto C, Obara T, Miyawaki K, Kikushige Y, Kato K, Maeda T, Miyamoto T, Baba E, Akashi K, Takenaka K. A human SIRPA knock-in xenograft mouse model to study human hematopoietic and cancer stem cells. Blood. 2020 May 7;135(19):1661-1672. doi:10.1182/blood.2019002194. PMID: 32206775.
3	<u>Yamauchi T</u> . [Exploration of novel therapeutic targets in acute myeloid leukemia via genome-wide CRISPR screening]. Rinsho Ketsueki. 2019;60(7):810-817. Japanese. doi: 10.11406/rinketsu.60.810. PMID: 31391371.
4	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 <input type="checkbox"/> 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 <input type="checkbox"/> 国内外を問わない。 <input type="checkbox"/> 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2019年9月	Society of hematologic oncology, Takuji Yamauchi, [Genome-wide CRISPR screen identifies PAICS, an enzyme involved in de novo purine synthesis, as a potential target for AML therapy]
2	2019年10月	日本血液学会学術集会, 山内拓司, [CRISPR screen identifies PAICS, a de novo purine synthetic gene, as a new target for AML therapy]
3	2019年12月	American society of hematology, Takuji Yamauchi, [PAICS, a de novo purine synthetic enzyme, is a novel target for AML therapy]
4		
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2019年5月投稿	Blood
2		
3		
4		