



|                     |                                                                                                         |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 変異型ASXL1を発現するCML細胞は、ALOX5-BLTRシグナル伝達経路のアップレギュレーションを介して、TKI治療に対する感受性の低下を示す [論文内容及び審査の要旨]                 |
| Author(s)           | 宮下, 直樹                                                                                                  |
| Description         | 配架番号 : 2942                                                                                             |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                   |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                                  |
| Dissertation Number | 甲第16551号                                                                                                |
| Issue Date          | 2025-06-30                                                                                              |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/95847">https://hdl.handle.net/2115/95847</a>                       |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                         |
| File Information    | MIYASHITA_Naoki_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                   |



## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称      博士（医 学）      氏 名      宮下 直樹

### 学 位 論 文 題 名

変異型 ASXL1 を発現する CML 細胞は、ALOX5-BLTR シグナル伝達経路の  
アップレギュレーションを介して、TKI 治療に対する感受性の低下を示す  
(CML with mutant ASXL1 showed decreased sensitivity to TKI treatment via upregulation of the  
ALOX5-BLTR signaling pathway)

【背景と目的】 慢性骨髄性白血病(CML)は白血病全体の約 20%を占め、年間 10 万人あたり 1-2 人の割合で発症する。CML の原因は染色体転座により生じる BCR-ABL1 融合遺伝子であり、ABL1 チロシンキナーゼが恒常的に活性化することで造血細胞の異常増殖をきたす。未治療の場合、数年間の慢性期の間に付加染色体異常や Src ファミリーキナーゼ等の活性化が起こり、移行期、急性期へと進行し予後不良となる。

チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)の登場により CML の予後は劇的に改善したが、一定数の患者では至適治療効果を得ることができない。ABL1 遺伝子変異が TKI 抵抗性の原因となるが、TKI 抵抗性の患者の約半数にしか ABL1 遺伝子変異が見つからないことから、TKI 抵抗性をもたらす原因は他にも存在すると考えられる。

ASXL1 や DNMT3A といったエピゲノム関連遺伝子の変異を有する CML 患者の予後が不良であるという報告はすでにされているが、その詳細な機序については明らかにされていない。そのため我々はこれらの遺伝子変異を有する細胞株を樹立し、TKI に対する感受性の変化や薬剤耐性の原因となりうる遺伝子などについて解析を行うこととした。

【材料と方法】 慢性骨髄性白血病細胞株である K562、KU812、TCC-S を使用した。野生型、変異型(Y591\*)それぞれの ASXL1 cDNA を pRetroX-TetOne-Puro ベクターにクローニングし、それぞれレトロウイルスを用いて各細胞株に感染させた。各細胞株は puromycin( $1 \mu\text{g/mL}$ )下で選択した。

【結果】 DOX の有無では TKI の感受性に変化がないことを確認した。野生型 ASXL1 を発現誘導しても TKI の感受性に変化はなかったが、変異型 ASXL1 を発現誘導した細胞株は TKI 抵抗性となった。次に ASXL1 変異によってもたらされる TKI 抵抗性の原因を調べるために RNA マイクロアレイ解析を行った。変異型 ASXL1 を発現誘導した際に発現が上昇した遺伝子について上位からランク付けを行った。その中でアラキドン酸オキシゲナーゼ-5 (ALOX5)についての検討を行った。ALOX5 が TKI 抵抗性に関与しているかを検討するために、ALOX5 cDNA を pRetroX-TetOne-Puro ベクターにクローニングし、それぞれレトロウイルスを用いて各細胞株に感染させた。各細胞株は puromycin( $1 \mu\text{g/mL}$ )下で選択した。ALOX5 を発現誘導することで TKI 抵抗性となることが確認できた。次に、ALOX5 をノックアウトすることで TKI の感受性が増強するかどうかを検討した。K562、KU812、TCC-S の各細胞株に対して二重鎖切断型 Cas9 タンパク発現誘導ベクターをレトロウイルスを用いて感染させた。各細胞株は puromycin( $1 \mu\text{g/mL}$ )下で選択した。Cas9 を発現誘導させた細胞株に対して single guide RNA (sgRNA)を用いて標的遺伝子のノックアウトを試みた。sgRNA-ALOX5#1, sgRNA-ALOX5#2 の 2 種類の sgRNA を同時にエレクトロポレーション法で細胞株に導入した。ノックアウト細胞株のコントロールとして AAVS1 領域のノックアウトを行った細胞株を用いるために sgRNA-AAVS1 を使用した。ALOX5 をノックアウトした結果、AKT のリン酸化が抑制された。

また、AAVS1 ノックアウト細胞株と比較して ALOX5 ノックアウト細胞株は TKI に対する感受性が著明に増強した。このことから ALOX5 は TKI の感受性に関与していることが示唆された。

次に ALOX5 の下流に位置する BLTR シグナルの阻害について検討した。BLTR 阻害薬である LY293111 を用いることで、ALOX5 ノックアウトと同様に AKT のリン酸化が抑制された。LY293111 は単独では細胞死を誘導しなかったが、TKI との併用効果があることが示された。最後に、変異型 ASXL1 を発現誘導した細胞株に対する TKI と LY293111 の併用効果を検討した。TKI 単剤と比較して、TKI と LY293111 の併用は変異型 ASXL1 による TKI 耐性を抑制できることが示された。

**【考察】** ASXL1 変異は CML 慢性期 (CML-CP) において最も頻度の高い変異 (14%) であり、予後の悪化と関連している。ASXL1 変異はエクソン 12 に多く見られ、エピジェネティック制御遺伝子として造血細胞の機能障害や腫瘍形成を引き起こす。また、ASXL1 変異は Akt/mTOR シグナル伝達を亢進させることが知られているが、そのメカニズムは未解明である。一方、ALOX5 に関する研究では、ALOX5 が CML における白血病幹細胞 (LSC) の重要な制御因子であり、その過剰発現が TKI 耐性に寄与することが示されている。ALOX5 ノックアウトは TKI 感受性を高めることが報告されている。ALOX5 はロイコトリエン (LT) 合成経路の初期段階を仲介し、LTB4などを生成する。LTB4 は受容体 BLTR に結合し、LY293111 はこの BLTR を阻害する薬剤である。LY293111 と TKI の併用は、白血病細胞株において TKI 単独よりも効率的に細胞死を誘導する。

本研究では、ASXL1 変異が ALOX5 の発現を増加させ、TKI 耐性をもたらすことを明らかにした。ASXL1 変異が AKT リン酸化を介してクローン形成の優位性をもたらすことが示唆されているが、TKI 耐性細胞株でのマイクロアレイ解析により、ALOX5 の発現が TKI 抵抗性に寄与することが確認された。さらに、LY293111 と TKI の併用により、AKT リン酸化が抑制され、TKI 感受性が向上することが示された。

結論として、CML における ASXL1 変異は、ALOX5 の過剰発現を通じて AKT リン酸化を亢進させ、TKI 耐性を引き起こす。BLTR 阻害剤 LY293111 の併用は、TKI 耐性を克服する新たな治療戦略となる可能性がある。ASXL1/ALOX5/AKT 経路の標的化は、既存の TKI に抵抗性を示す CML 患者に対する有望な治療選択肢となり得る。

**【結論】** 慢性骨髄性白血病において、ASXL1 変異によりもたらされる TKI 抵抗性の一因に ALOX5 の発現上昇が関与している可能性がある。また、ALOX5-BLTR シグナル伝達の阻害は TKI 抵抗性を改善することが示唆された。