HOKKAIDO UNIVERSITY

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	https://hdl.handle.net/2115/95847
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	MIYASHITA_Naoki_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏名　宮　下　直　樹

	主査	教　授	真　部　　淳
審査担当者	副査	教　授	園　下　将　大
	副査	准教授	橋　本　　茂

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)

本研究は、慢性骨髄性白血病（CML）において ASXL1 変異がチロシンキナーゼ阻害薬(TKI) 耐性を誘導する分子機構を解明することを目的とした。Tet-on 系で ASXL1-Y591* 変異を過剰発現させた CML 細胞株では TKI 感受性が低下し、RNA マイクロアレイ解析により ALOX5 の発現上昇を確認した。ChIP-qPCR により ALOX5 プロモーター領域で H3K27me3 や H3K27ac の変化が確認され、ASXL1 変異がヒストン修飾を変化させ ALOX5 の転写を制御することが示唆された。ALOX5 の強制発現は TKI 耐性を誘導し、逆に CRISPR/Cas9 による ALOX5 ノックアウト TKI 感受性を増強した。また、BLTR 阻害薬である LY293111 と TKI の併用効果が認められた。本論文は ASXL1 変異と ALOX5-BLTR 経路の関わりを示し、BLTR 阻害剤を組み合わせた治療が TKI 耐性 CML の克服法となり得ることを示した。

審査にあたり、まず副査の橋本准教授から、ASXL1 遺伝子の発現誘導に用いた Tet-on システムにおいて、生理的な発現量との乖離や使用培地の影響について質問があり、申請者は、当初は Tet-free 培地で発現を確認していたが、RPMI や DMEM など一般的な培地でも発現が得られたため、以降の実験では通常培地を用いたこと、Tet-on による発現は過剰である可能性があり、今後は発現量を調整した実験系も検討すべきと考えていることを回答した。

次に、Western blot における 150kDa 付近のバンドが本当に野生型 ASXL1 由来と断定できるかについて質問があり、申請者は、野生型として認識していたが、ノンスペシフィックなバンドと重なっている可能性もあり、本来であれば ASXL1 変異がない細胞株に遺伝子

をノックインするなどの実験が望ましかったと回答した。また、ALOX5 プロモーター領域の ChIP-qPCR におけるプライマー設定根拠について質問があり、申請者は、既報において ALOX5 に対する ChIP 解析が行われた領域を引用して設定したが、ASXL1 との直接的関連は未検証であり、今後はルシフェラーゼアッセイ等でプロモーター活性を確認すべきであると回答した。また、図中のデータにおいて条件（DOX 濃度や薬剤濃度）が異なることによる解釈のずれについて指摘があり、薬剤濃度に差があることを追記するべきだったと返答した。

続いて、副査の園下教授から、AKT のリン酸化抑制が細胞死に直結するかについての因果性の確認について質問があり、申請者は、LY293111 処理や ALOX5 ノックアウトにより AKT リン酸化が低下し、それに伴って細胞の生存率が下がったことを確認したが、因果関係を断定するには不十分であり、記述には再検討の余地があると認めた。また、関連する PDK1 や PTEN を評価したかという質問があり、今回は AKT のみの検討であり今後の検討課題とすると返答した。

続いて、変異型 ASXL1 による表現型の変化が発現量の違いに由来している可能性についての指摘があり、申請者は、変異型は分子量が小さく mRNA 安定性も高いことから、発現量が高くなっている可能性があると認識しており、今後は DOX 濃度を調整し、発現量を統一した条件で比較すべきであると回答した。LTB4 は細胞自体が産生しているのか、外因性かという点について質問があり、申請者は、内因性の産生を想定していたが実際の確認は行っておらず、今後の課題であると回答した。またエピジェネティック制御機構としての ASXL1 の機能をより具体的に記述する必要性について指摘があり、追記すると回答した。

最後に、主査の真部教授から、ASXL1 変異と予後や急性転化の因果関係について質問があったが因果関係はあまり分かっていない、と返答した。

また、ロイコトリエン阻害薬の実臨床応用について質問があり、申請者は、膵がんなど固形がんで一部臨床試験が行われたが有効性は限定的であり、呼吸器領域では FLAP 阻害薬の開発が進んでいることを紹介した。また、ALOX5 の阻害は全身に副作用が出る可能性についても言及した。次に、将来的には PDX モデルや患者検体での検証が望ましいと提案いただき、今後は CRISPR によるノックインモデルや PDX モデルの導入、臨床検体での再現性検証を進めたいという方針を示した。最後に、ALOX5 以外に得られた候補遺伝子の検討状況について質問があり、申請者は、ALOX5 以外にも数個の遺伝子を検証したが、再現性や発現変化の乏しさから、ALOX5 に絞ったことを説明し、陰性結果であっても適切に記載すべきであるとの指摘に同意した。

この論文は，ASXL1 変異に起因する CML 薬剤耐性のエピジェネティック機構の研究という点において高く評価され，今後の標的治療開発への貢献が期待される。

審査委員一同は，これらの成果を高く評価し，大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ，申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。