



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16551
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95990
Type	doctoral thesis
File Information	MIYASHITA_Naoki.pdf



学位論文

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)

2025 年 6 月

北 海 道 大 学

宮 下 直 樹

学位論文

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)

2025 年 6 月

北 海 道 大 学

宮 下 直 樹

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
方法	11 頁
結果	21 頁
考察	41 頁
総括と結論	42 頁
謝辞	44 頁
利益相反	45 頁
引用文献	46 頁

【発表論文目録および学会発表目録】

本研究の一部は以下の論文に発表した。

著者：Naoki Miyashita, Masahiro Onozawa, Kohei Kasahara, Toshihiro Matsukawa, Yasuhito Onodera, Kohjin Suzuki, Tomoiku Takaku, Takanori Teshima, Takeshi Kondo

論文タイトル：CML with mutant ASXL1 showed decreased sensitivity to TKI treatment via upregulation of the ALOX5-BLTR signaling pathway

学術雑誌名：Cancer Science

要 旨

【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(完全長)、変異型(Y591*:短縮型)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 を用いて選択した。

【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 抵抗性を示した。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。クロマチン免疫沈降(ChIP)により、ALOX5 のプロモーター領域において転写活性化マーカーであるヒストン H3 リジン 27 アセチル化 (H3K27ac) の増加が確認された。さらに遺伝子抑制マーカーであるヒストン H3 リジン 27 トリメチル化 (H3K27me3) は TCC-S 細胞で減少しておりヒストン修飾の変化を介した発現変化が示唆された。次に、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 µg/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、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 µg/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 耐性を解除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。

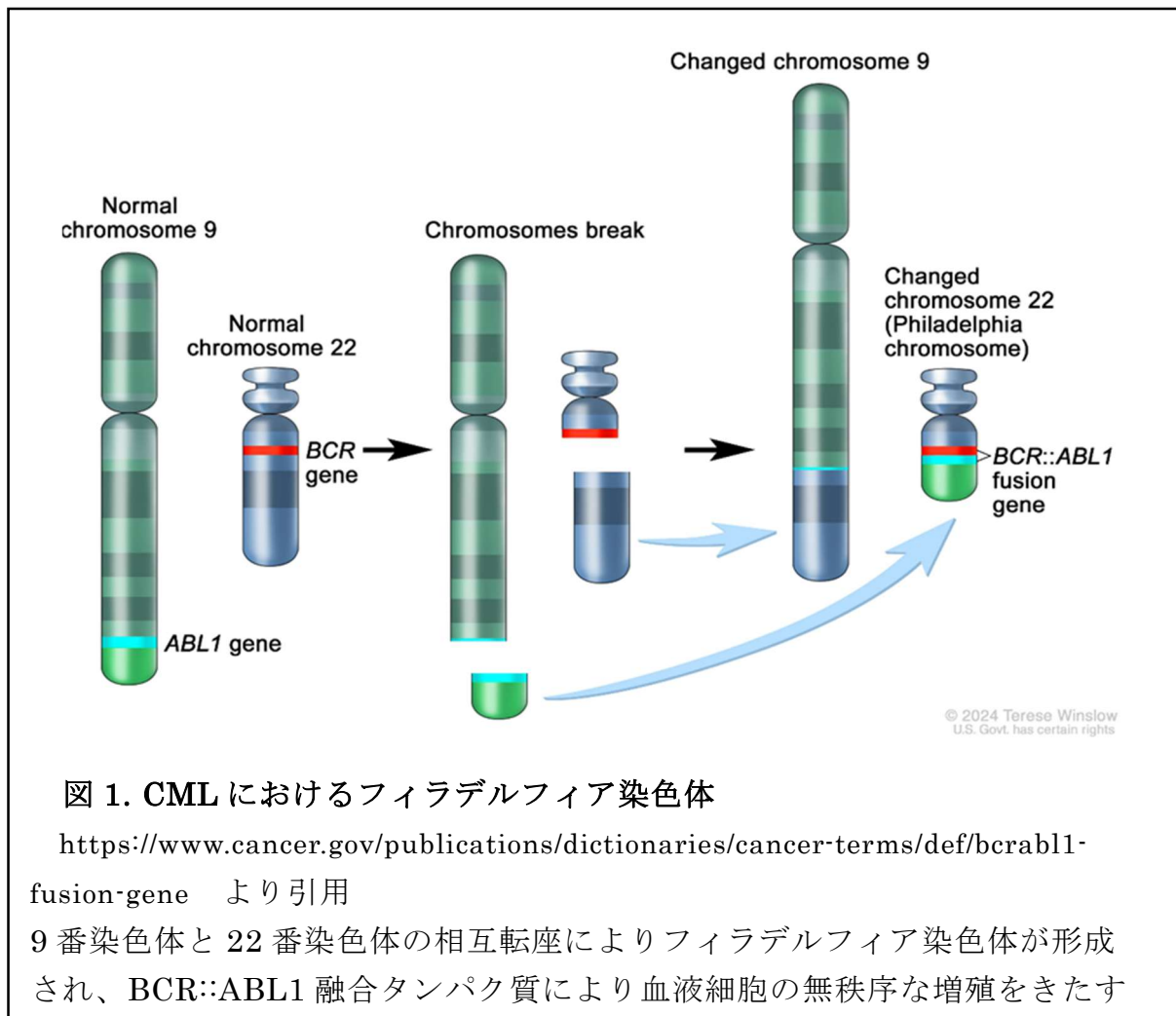
【略語表】

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AAVS1	adeno-associated virus integration site 1
ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase
ASXL1	additional sex combs-like 1
cDNA	complementary DNA
CML	chronic myeloid leukemia
CRISPR/Cas9	clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins9
DMSO	dimethyl Sulfoxide
DOX	doxycycline
DNMT3A	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
IC50	half maximal (50%) inhibitory concentration
MT	mutant type
mRNA	messenger RNA
N.S.	not significant
Opti-MEM	opti-minimal essential medium
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
TKI	tyrosine kinase inhibitor
WT	wild type
293T	Human embryonic kidney 293 T

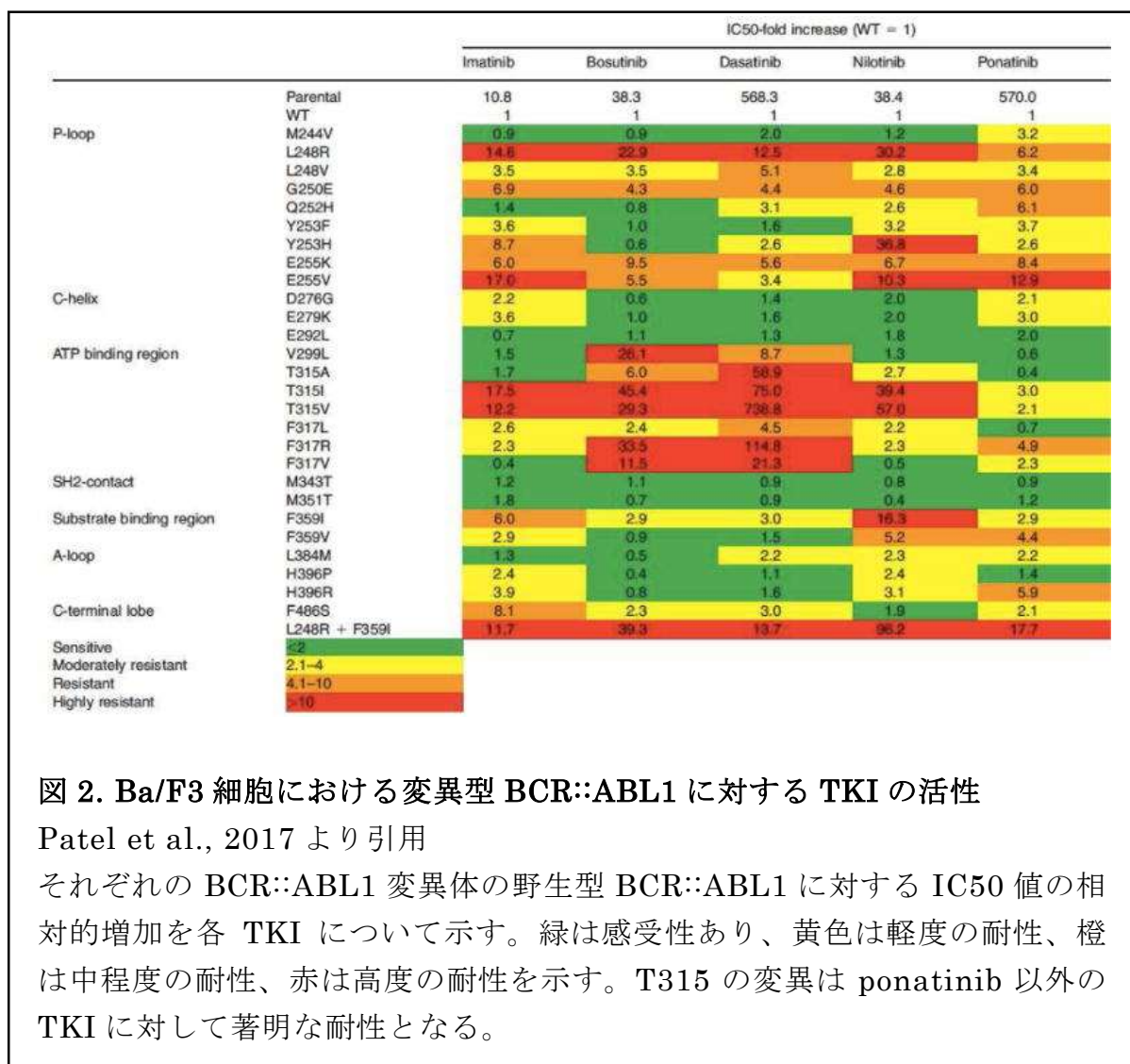
【緒言】

慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) は、図 1 に示すような 9 番染色体と 22 番染色体の相互転座に起因するフィラデルフィア染色体によって引き起こされる骨髄増殖性疾患である。



BCR::ABL1 融合タンパク質を標的とするチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) が登場し、第 1 世代であるイマチニブ(Hughes et al., 2003) は既存治療と比較して CML 患者の予後を劇的に改善した。その後 ABL1 遺伝子の阻害活性がさらに高まった第 2 世代 TKI であるダサチニブ (Kantarjian et al., 2010)、ニロチニブ(Saglio et al., 2010)、ABL1 遺伝子のゲートキーパー変異であり既存の TKI に耐性となる T315I 変異を有する場合にも効果がある第 3 世代 TKI のポナチニブ(Cortes et al., 2012)が登場した。しかし患者の約 30%は第 2 世代の TKI であるダサチニブ、ニロチニブ、ボスチニブで至

適治療効果が得られないとされている(Brummendorf et al., 2022; Cortes et al., 2016; Hochhaus et al., 2016)。上述の T315I 変異のような、ABL1 遺伝子のキナーゼドメインの変異が TKI 耐性をもたらすが、ABL1 遺伝子の変異は TKI 耐性を示す患者の約半数にしか認められない(Patel et al., 2017)。



このことは、ABL1 遺伝子のキナーゼドメインの変異以外にも TKI 耐性をもたらす経路が存在することを示唆している。図 2、図 3 で示すように他の血液悪性腫瘍と同様に CML でも遺伝子異常が報告されており、TKI 感受性や予後との関連も報告されている(Branford et al., 2018; Kim, Tyndel, Kim, et al., 2017)。

Kim らは、ABL1 キナーゼドメイン変異のない CML 患者 13 人の全エクソ

ーム塩基配列決定を行い、ABL1 キナーゼドメイン変異とは別に、DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha (DNMT3A) や Additional sex combs-like 1 (ASXL1) などのエピジェネティック制御に関連する遺伝子の変異が CML の進行や TKI 耐性の病因に関与していることを明らかにした (図 4) (Kim, Tyndel, Zhang, et al., 2017)。

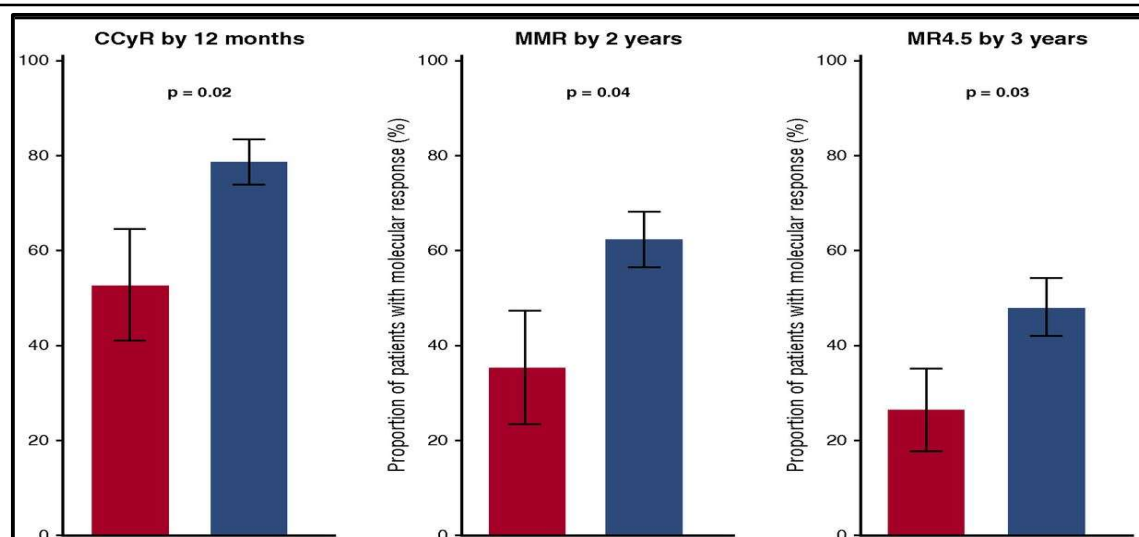


図 3. エピゲノム関連遺伝子変異と TKI による治療成績の関係

Branford et al., 2018 より引用

診断時にエピゲノム関連遺伝子変異を有する症例(左)では、そうでない症例(右)と比較して治療開始後 1 年、2 年、3 年経過時のいずれにおいても至適治療効果が得られていない症例が多い

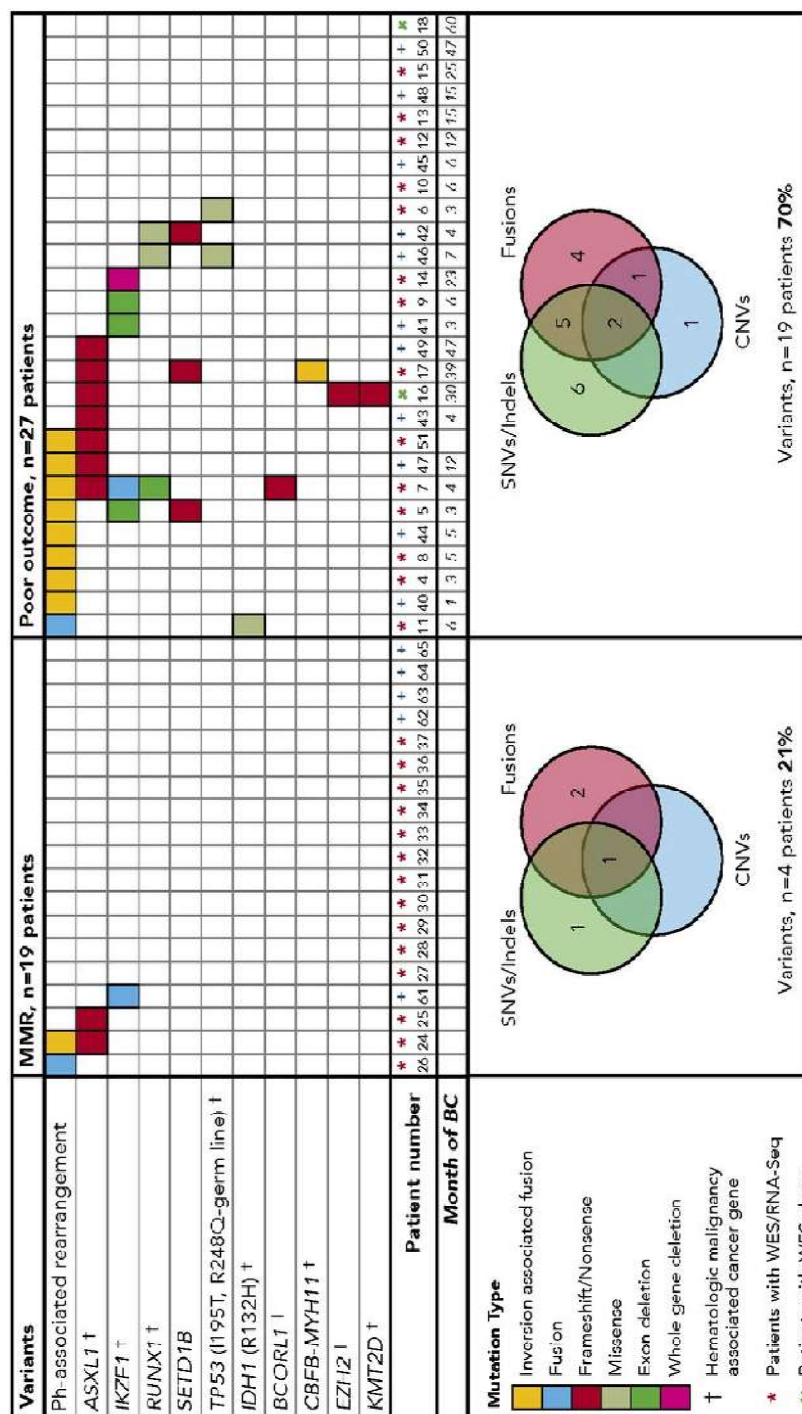


図 4. 初回治療を受けた CML-CP 患者の診断時の遺伝子変異

Kim, Tyndel, Kim, et al., 2017 より引用

左の至適治療効果が得られた群と比較して、右の予後不良群では ASXL1 などの遺伝子の変異が高頻度で見られる。

また、慢性期 CML (CML-CP) に最も多く見られる遺伝子変異は ASXL1 変異であり、その頻度は約 20% であることが報告されている (Ochi et al., 2021)。このように、ASXL1 を含むエピゲノム関連遺伝子の異常が、CML における TKI 耐性や予後不良と関連することが報告されている (Grossmann et al., 2011; Mologni et al., 2017; Nteliopoulos et al., 2019; Schonfeld et al., 2022; Wu et al., 2020)。ヒストン H3 リジン 27 トリメチル化 (H3K27me3) は転写抑制マークとして知られ、PRC2 複合体によって付加される一方、アセチル化 (H3K27ac) は転写活性化エンハンサーやプロモーターに存在する活性マークであり、両者は機能的に拮抗する (Margueron & Reinberg, 2011; Creighton et al., 2010)。近年、ASXL1 変異がこうしたヒストン修飾バランスの破綻を引き起こすことが明らかになりつつある。Y591*などの ASXL1 トランケーション変異は H3K27me3 の減少と H3K27ac の増加を誘導することで転写活性化を引き起こす gain-of-function 変異と捉えられている (Balasubramani et al., 2015; Yang et al., 2018)。ASXL1 変異と CML の薬剤耐性の詳細なメカニズムの関係は完全には解明されておらず、我々はいくつかの CML 細胞株を用いて、ASXL1 変異と TKI 耐性との関連およびそのメカニズムを検討した。

【方法】

1. 細胞培養

Human embryonic kidney 293 T (293T)、K562 および KU812 細胞は、Japanese Collection of Research Bioresources (Osaka, Japan) から購入した。TCC-S 細胞は栃木県立がんセンター (Tochigi, Japan) で樹立された細胞株であり (Tanaka et al., 2009)、埼玉医科大学血液内科学教室の高久智生教授よりご提供いただいた。K562、KU812 および TCC-S は全て CML 細胞株である。293T 細胞は 10% ウシ胎児血清と 1% ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を用いて、K562、KU812、TCC-S 細胞は 10% ウシ胎児血清と 1% ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したロズウェルパーク記念研究所培地 1640 (RPMI1640, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を用いて 37°C、5% CO₂ 下で培養した。

2. 標的遺伝子発現誘導細胞株の作成

ドキシサイクリン (DOX) により標的遺伝子の発現が誘導される細胞株を作製するために、ASXL1 の相補的 DNA (cDNA、野生型 : MHS6278-213245938, GE Open Biosystems, AL, USA; 変異型 Y591* : BC137280, Addgene, MA, USA) および Arachidonate 5-lipoxygenase (ALOX5、K562 細胞株から PCR で増幅) の cDNA を、In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて、N 末端に 3x Flag タグを付加したレトロウイルスベクター (pRetroX-TetOne-Puro, Takara Bio, Shiga, Japan) にクローニングした。ALOX5 の増幅には以下のプライマーを用いた (フォワード 5'-CCCTCGTAAAGAATTC-ATGCCCTCCTACACGGTCAC-3'、リバーズ 5'-GAGGTGGTCTGGATCC-TCAGATGGCCACACTGTTCG-3')。

各 CML 細胞株は ASXL1、ALOX5 の変異確認のためにサンガーシーケンスを行った。ASXL1 (フォワード 5'-CAACTTTCACGTATCAAACCACC-3'、リバーズ 5'-CCCATTAGAGGATAAGGCG-3')、ALOX5 (フォワード 5'-ATGCCCTCCTACACGGTCAC-3'、リバーズ 5'-GAGGTGGTCTGGATCC-3') 以上のプライマーを用いた PCR 産物を、ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents (Applied Biosystems, Waltham, MA) にて精製した。精製産物を鋳型とし、1 μM に希釈したフォ

ワードプライマー、リバープライマーをシーケンスプライマーとして、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を用いてシーケンス反応を行った。シーケンス反応産物をカラムに通して精製し(Illustra Sephadex G-50 Fine DNA Grade, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England)、SpeedVac 遠心濃縮システム(UT-80/CVE-100D, EYELA, Tokyo, Japan)にて乾燥、20 μ l の Hi-Di ホルムアミド (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) に溶解し、ブロックインキュベーターにて 95°C で 5 分処理したのち氷冷した。そのサンプルを用い、シーケンサー (Applied Biosystems SeqStudio, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用い、サンガーシーケンスにてその塩基配列を同定した。

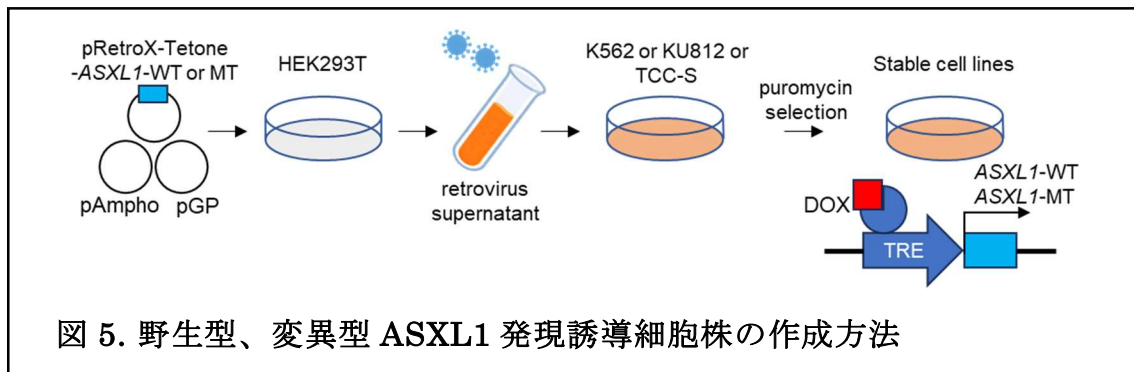
変異の有無を確認したのち、全長 ASXL1 (ASXL1-WT)、変異型 ASXL1 (ASXL1-MT) および ALOX5 を各 CML 細胞株にレトロウイルス感染させた。CML 細胞株へのレトロウイルス感染の概要を示す (図 5)。

最初に、293T 細胞を用いて標的遺伝子を含むレトロウイルスを作成した。トランスフェクション法としてリポフェクションを選択した。

トランスフェクションの 24 時間前に、293T 細胞 4.0×10^5 個/mL を 6cm dish に播種した。1 本目のチューブには opti-MEM 500 μ L、目的遺伝子をクローニングした pRetroX-Tetone-Puro ベクター 2 μ g、pAmpho ベクター 1 μ g、pGP ベクター 1 μ g の 3 種類のベクターを混合した。2 本目のチューブには Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 20 μ L と opti-MEM 500 μ L を混合し 5 分間室温で静置した。

その後、2 本のチューブを混合し 20 分間室温で静置し事前に準備した 293T 細胞に加え、4 時間後に培地交換を行った。感染から 24 時間後、dish の上清をろ過しレトロウイルス溶液を得た。

続いて、目的の CML 細胞株を 6well plate に播種し、上記のウイルス上清 1000 μ L と 4 μ g/mL のポリブレン(Nakalai tesque, Kyoto, Japan)を用いて CML 細胞株にレトロウイルスを感染させた。感染から 2 日後、各細胞株を 1 μ g/mL のピューロマイシン (Nakalai tesque, Kyoto, Japan)を用いて選択を開始した。選択後のバルク細胞を用いて、100 ng/ml の DOX (Apollo Scientific, Cheshire, UK) を添加し、各標的遺伝子を誘導した。



3. CRISPR/Cas9 による ALOX5 のノックアウト

ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) 由来の野生型 Cas9 スクレアーゼの cDNA を遺伝子合成サービスを利用して入手した。Cas9 cDNA の N 末端には SV40 NLS (PKKKRKV)、C 末端にはヌクレオプラスミン NLS (KRPAATKKAGQAKKKK) をコードする塩基配列を付加した。ウエスタンブロッティングによる検出のために、HA エピトープをコードする配列も N 末端に付加した。得られた Cas9 cDNA を piggyBac トランスポゾンベクター pPB-TRE3G-MCS-CEH-rtTA3-IP (Onodera et al., 2018) にクローニングした。これらの Cas9 コードトランスポゾンベクターを、Cell Line Nucleofector® Kit V と Nucleofector 2b 装置 (いずれも Lonza, Basel, Switzerland) を用いて、ハイパーアクティブ piggyBac トランスポザラーゼ (Onodera et al., 2018) の一過性発現用プラスミド DNA と各 CML 細胞株に共導入した。

CML 細胞株を用いたトランスフェクションの概要を示す。トランスフェクション方法としてエレクトロポレーション法を選択した。トランスフェクションの前に、12well plate に 2 ml の RPMI-1640 培地を入れ 37°C/5% の CO₂ インキュベーターでプレインキュベートした。対数増殖期の CML 細胞株 2.0×10^6 個を 4°C、1500 rpm、5 分の遠心を行いペレットとした。チューブ 1 本あたり SolutionV 82 μ L、Supplement1 18 μ L を混合し細胞ペレットに加えた。その細胞懸濁液に 1.8 μ g の Cas9 ベクター、0.7 μ g のトランスポザラーゼ cDNA を加え混合した。以上の溶液を入れたキュベットを Nucleofector2b 装置にセットし K562 細胞には T-003、KU812 細胞には T-006、TCC-S 細胞には X-001 プログラムを適用した。溶液はプレインキュベートしておいた 12well plate に移してインキュベートを継続した。

トランスフェクション 3 日後から細胞をピューロマイシン (1 $\mu\text{g/mL}$) で選択し Cas9 発現誘導細胞株を得た。バルクの安定クローン細胞株を DOX (100 ng/mL) で処理し、Cas9 タンパク質の発現を確認した (図 6)。

続いて、CRISPR/Cas9 による遺伝子ノックアウト細胞株の樹立方法を示す (図 7)。シングルガイド RNA (sgRNA) は北海道システムサイエンス社 (Sapporo, Japan) によって合成された。ALOX5 (5'-AGATGGATGAGTGGAACCC-3' および 5'-CTATCAAACCTGGATCACG-3') または AAVS1 (5'-GGGGCCACTAGGGACAGG-3') (Chiba et al., 2022; Chiba et al., 2023) を標的とする sgRNA を、DOX 添加から 1 日後の Cas9 発現誘導を行った細胞株に Nucleofector 2b を用いてトランスフェクションした。sgRNA トランスフェクションには各 sgRNA を 500 ng 用いて上述と同様の方法で行った。sgRNA トランスフェクションの 5-7 日後に各細胞株を 96 ウェルプレートに播種し、限界希釈法により単一クローンを樹立した。標的遺伝子のノックアウトはウエスタンブロッティングで確認した。

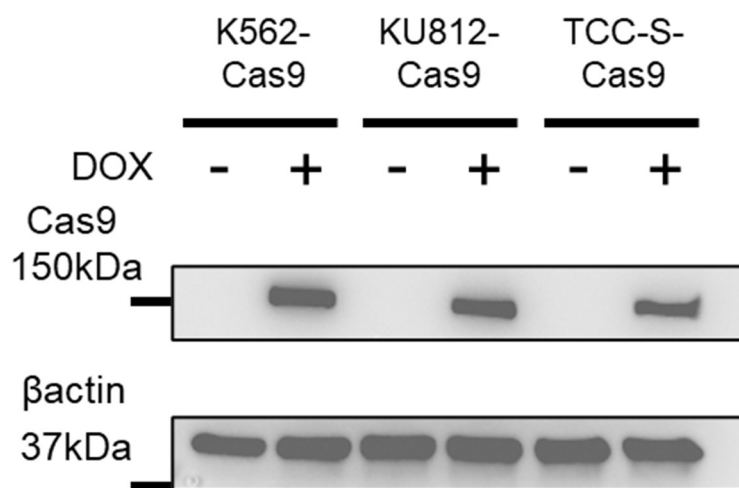
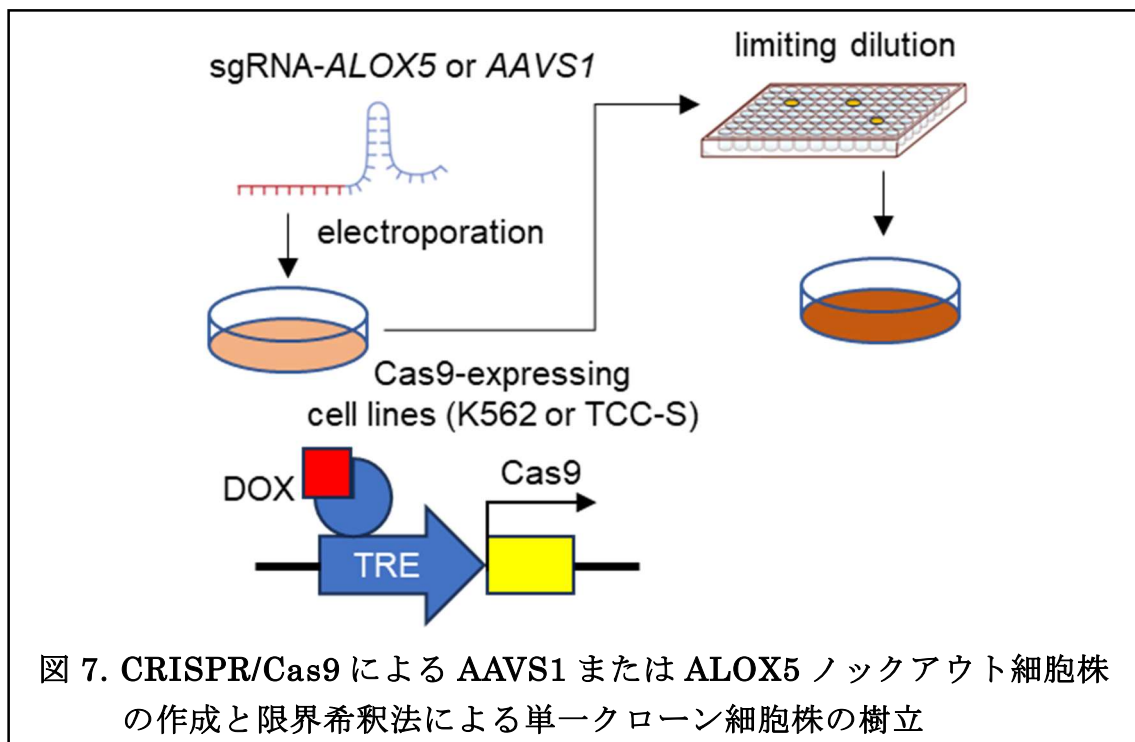


図 6. Cas9 発現誘導細胞株の Cas9 発現の確認
各細胞株とも、DOXにより Cas9 の発現が誘導されていることを確認した。



4. 細胞増殖アッセイ

5.0×10^5 cells/mL に調製した細胞懸濁液を 96 ウェルプレートに 90 μ L ずつ播種した。0.1%DMSO を陰性コントロールウェルに加え、目的のウェルにはイマチニブ (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI)、ニロチニブ (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI)、ダサチニブ (Biosynth Ltd, Compton, UK)、ポナチニブ (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ)、アシミニブ (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ)、および LY293111 (エタロシブ) (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ) の各試薬を含む RPMI-1640 培地を 10 μ L 添加した。ブランクウェルには 100 μ L の RPMI-1640 培地のみを添加した。48 時間後、各ウェルに 10 μ L の Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を加え、37℃の CO₂ インキュベーターで 3 時間静置した。その後、Promega GloMax-Multi Detection System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて各ウェルの吸光度を測定した。各ウェルの生存細胞率は、以下の式で求めた。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = [(As - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100$$

As : 細胞、試薬、Cell Counting Kit を含むウェルの吸光度

Ac : 陰性コントロール (細胞、Cell Counting Kit 溶液を含み試薬添加なしのウェル) の吸光度

Ab : ブランクウェル (細胞を含まない培地と Cell Counting Kit 溶液のみを含むウェル) の吸光度

5. RNA マイクロアレイ解析

RNA マイクロアレイ解析のために、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hulsterweg, Netherlands) を用いて K562-ASXL1 MT 細胞 1×10^6 個から全 RNA を調製した。RNA マイクロアレイ解析は、北海道システムサイエンス社 (Sapporo, Japan) により、SurePrint G3 Human GE Microarray 8x60K Ver.3.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて行った。RNA マイクロアレイ解析は、K562-ASXL1 MT 細胞を DOX の有無で比較した。Z スコアは、対数変換した Fold Change 値をもとに、以下の式で算出した :

$$Z = (\log_2(\text{Fold Change}) - \text{平均値}(\log_2(\text{Fold Change}))) / (\text{標準偏差}(\log_2(\text{Fold Change})))$$

6. 定量 PCR

TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて、各細胞株 1×10^6 個から total RNA を調製した。SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、1 μ g の total RNA から cDNA を作成した。定量 PCR には、CFX96 Real-Time System (Bio-rad, Berkeley, CA, USA) を用いた。95℃、3 分の初期変性ののち、変性 (95℃、30 秒)、アニーリング (60℃、30 秒)、伸長 (72℃、25 秒) の反応を 40 サイクル行った。この方法では、各 20 μ l の反応液中に 10 μ l の Power SYBR™ Green PCR Master MIX (Thermo Fisher Scientific)、1 μ l のプライマー (各最終濃度 0.5 μ M)、1 μ l の cDNA、8 μ l の水 (Sigma-Aldrich, St.) を含んでいる。各反応は triplicate で行った。各遺伝子の測定値は β -アクチン mRNA のレベルで正規化した。各遺伝子の発現差の解析には $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を用いた。使用したプライマーは以下の通りである。

ASXL1 (フォワード : 5'-TGATGAAACATCTTCGAACG-3'、リバーズ : 5'-AGAGGAGTCAGGACAACTCG-3')、

ALOX5 (フォワード : 5'-CTATGCCTCCCTGTGCTTTC-3'、リバーズ : 5'-CCTGGTCGCCCTCGTAGTAGA-3')、

β -アクチン (フォワード : 5'-AGGCCGGCTTCGCGGCGAC-3'、リバーズ : 5'-CTCGGGAGCCACGCAGCTC-3')。

7. ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングに用いる細胞は RIPA バッファー (Nakalai tesque, Kyoto, Japan) を加えボルテックスを行い、4℃、10000 g で 10 分間遠心分離し、上清を回収しライセートとした。それぞれのサンプルは 4x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad #1610747) を添加し 98℃ で 5 分間ボイルした。4-15% Mini-PROTEAN TGX Gels (Bio-Rad #4561086) で分離し、Trans-Blot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad #1704156) に移した。Blocking buffer として 5% PhosphoBLOCKER Blocking Reagent (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) を加えた 0.5% Tween-20 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (0.5% PBS-T) を使用し、室温にて 1 時間、ベリーダンサー・シェーカー (IBI Scientific, Peosta, IA) で緩徐に振盪しながらインキュベートした。Blocking 後、膜を Hybri-bag (COSMO BIO, Tokyo, Japan) に入れ、Blocking buffer で希釈した一次抗体と 4℃ で一晩反応させた。その際、旋回培養器 (ROTARY CULTURE RCC-100, IWAKI, Chiba, Japan) を用いた。反応後の膜を、0.5% PBS-T で 3 回 10 分間洗浄し、Blocking buffer を含む 0.5% PBS-T で希釈した二次抗体と 4℃ で 1 時間反応させた。その後、再度 0.5% PBS-T で 3 回 10 分間洗浄した。ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England) で化学発光を行い、バンドは ChemiDoc Touch (Bio-rad) を用いて同定した。バンドの定量は Image Lab ソフトウェア (Bio-rad) を用いて行った。

一次抗体 (クローン名、メーカー、希釈比率) として、ASXL1 (#228009, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000)、ALOX5 (#169755, abcam, 1:1000)、Flag (#200472-21, Stratagene, 1:1000)、 β -actin (A1978, Sigma-Aldrich, 1:2000)、AKT (#9272, Cell Signaling, 1:1000)、Phospho-AKT (#4060, Cell Signaling, 1:2000) を用いた。二次抗体は Horse Radish Peroxidase 標識ウサギ抗マウス抗体 (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England)、Horse Radish Peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ抗体 (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England) を用い、それぞれ 1:3000 の比率で希釈を行った。

8. クロマチン免疫沈降

ChIP 解析には SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit (#9003, Cell Signaling) を使用した。

タンパク質を DNA にクロスリンクするために、RPMI-1640 培地に懸濁した細胞に 37%ホルムアルデヒド(#252549, Sigma-Aldrich) を加え室温で 10 分間インキュベートした。続いて 10X グリシンを加え、軽く振り混ぜてから室温で 5 分間インキュベートした。その後細胞を 500 g、4℃で 5 分間遠心し、ペレットを 20ml の氷冷 PBS で 2 回洗浄し上清を除去した。ペレットを氷冷した 1X Buffer A + DTT + PIC に再懸濁し氷上で 10 分間インキュベートし、2000 g、4℃で 5 分間遠心し上清を除去したのち、ペレットを氷冷した 1X Buffer B + DTT に再懸濁した。DNA の断片化のためサンプルに Micrococcal Nuclease を添加し、37℃で 20 分間インキュベートした。その後 0.5 M EDTA を添加し、DNA 断片化を停止した。各サンプルを Bioruptor UCD-250 (COSMO BIO)を用いてソニケーション処理し、その後 4℃、10 分間、9,400 g で遠心した。上清を以降の実験に用いた。

断片化したクロマチン調製液を、ChIP Buffer + PIC 混合液で希釈した。一部を 2%インプットサンプルとして保存した。クロマチン調整液に H3K27ac (#8173, Cell Signaling)、H3K27me3 (#9733, Cell Signaling)、H2AK119ub1 (#8240, Cell Signaling)、ポジティブコントロールとして Histone H3 (D2B12) XP Rabbit mAb (#4620, Cell Signaling)、ネガティブコントロールとして normal Rabbit IgG(#2779, Cell Signaling)の各種抗体をそれぞれ加え、ローテーターを用いてサンプルを 4℃で一晩インキュベートした。その後 Protein G Magnetic Beads をそれぞれの免疫沈降反応液に加え、ローテーターを用いて 4℃で 2 時間インキュベートした。Magnetic Separation Rack を用いて Beads を分離し洗浄した。ChIP Elution Buffer を各サンプルに加えて 65℃で 30 分間処理し、クロマチンを溶出した。Magnetic Separation Rack を用いて Protein G Magnetic Beads を分離し、溶出されたクロマチンを含む上清を新しいチューブに移した。各チューブに、5 M NaCl および Proteinase K を加えて 65℃で 2 時間インキュベートし脱クロスリンクした。上記で得られた各 DNA サンプルからスピンカラムを用いて DNA を精製した。

ChIP 解析で使用したプライマー配列は以下の通りである（数値は転写開始点に対する塩基位置を示す）。

ALOX5-A (-522 から -234)

Forward: 5'-AGCCTCTGTGCTCCAGAATCCATC-3', Reverse: 5'-
CGTTCACTCGTTCTCTCCTGAATTG-3'

ALOX5-B (-259 から -79)

Forward: 5'-CAATTCAGGAGAGAACGAGTGAACG-3', Reverse: 5'-
GCAGTACTTCTCTCCCACTCTTCACG-3'

元サンプル中の DNA 量に対する、抗体によって沈殿したクロマチン DNA
の割合(%Input)は以下の計算式で求めた。

$\%Input = 2\% \times 2^{(Ct\ 2\%Input\ Sample - Ct\ IP\ Sample)}$

9. 統計解析

2 群間の比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。連続変数については複数回施行した測定値を用いて、t 検定によって 2 群間の平均値の比較を行った。P 値 < 0.05 を有意とした。これらの統計学的解析は EZR software 1.54 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan)を用いて行った(Kanda, 2013)。

【結果】

1. 変異型 ASXL1 の発現誘導は CML 細胞株の薬剤感受性を低下させた

まず、CML 細胞株 3 種(K562, KU812, TCC-S)に対して DOX の有無での細胞生存率の変化をみた。図 8 に示すように、DOX の有無は細胞生存率に影響を与えないことを確認した。

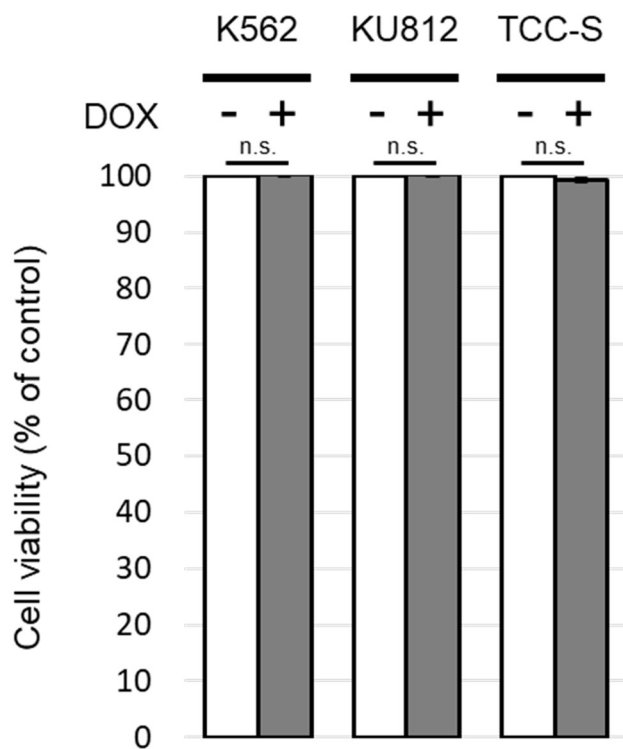


図 8. DOX の有無による細胞生存率

DOX 無し(白)と DOX 有り(灰)では生細胞率に有意差を認めなかった。

ASXL1 Y591*変異は、C 末端の植物ホメオドメイン（PHD）を欠く短縮型タンパク質の発現をもたらす（図 9）。また、K562 と KU812 はヘテロ接合性の ASXL1 変異を有しており、TCC-S は ASXL1 変異を有していない（表 1）。

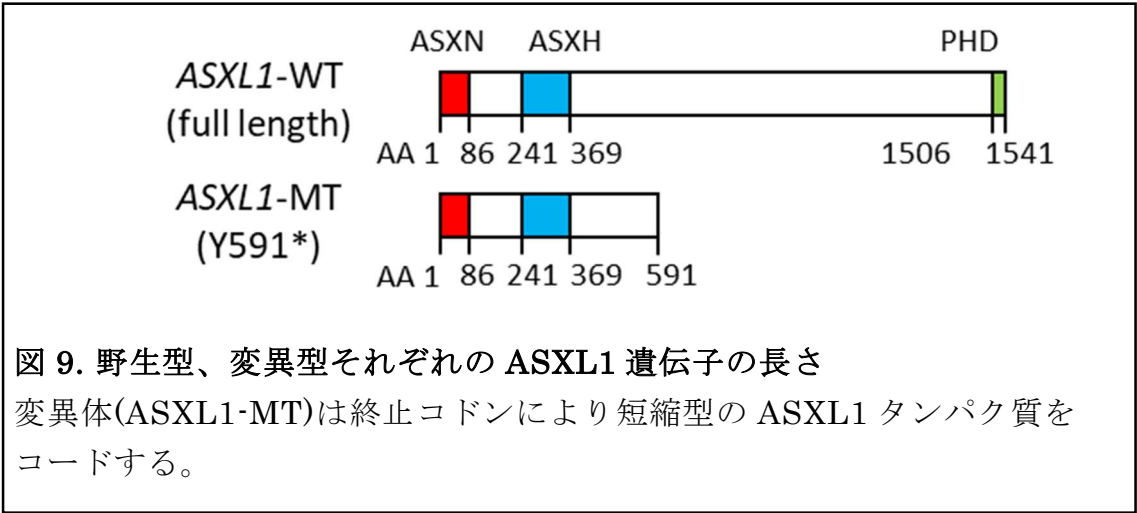
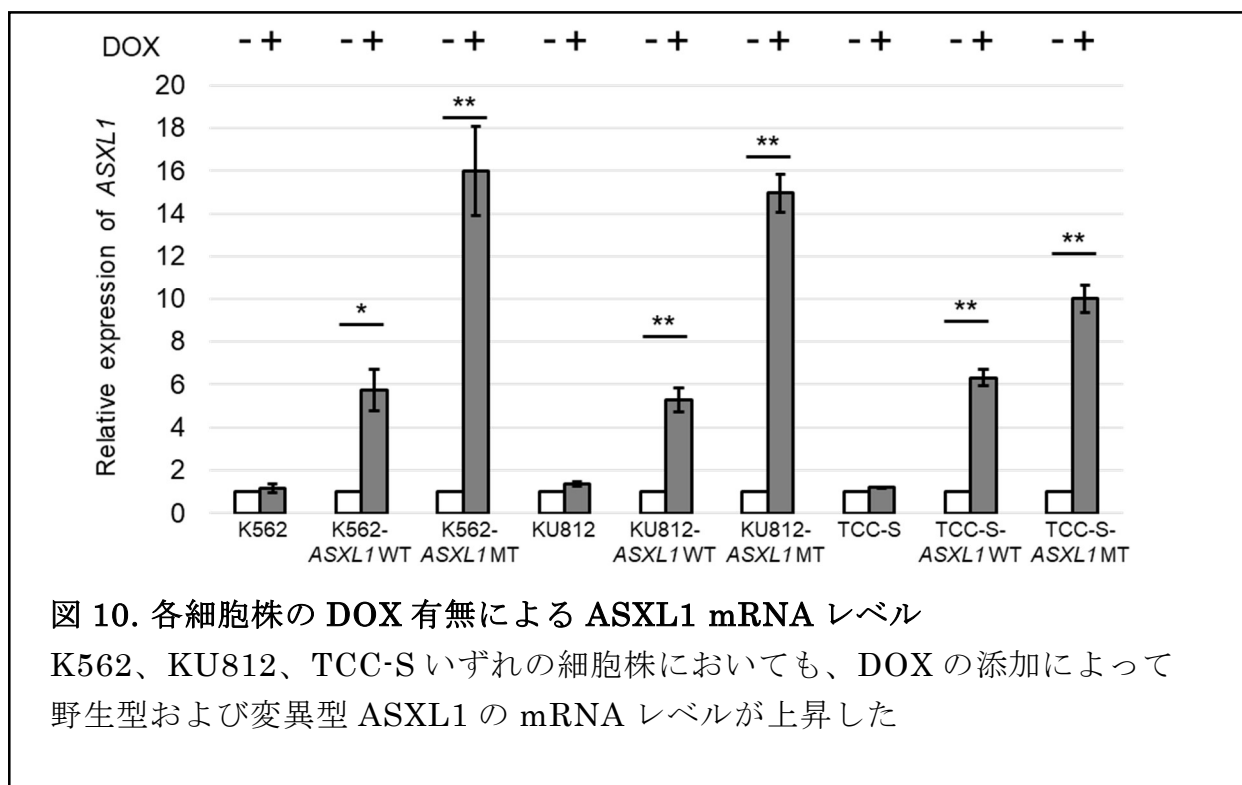


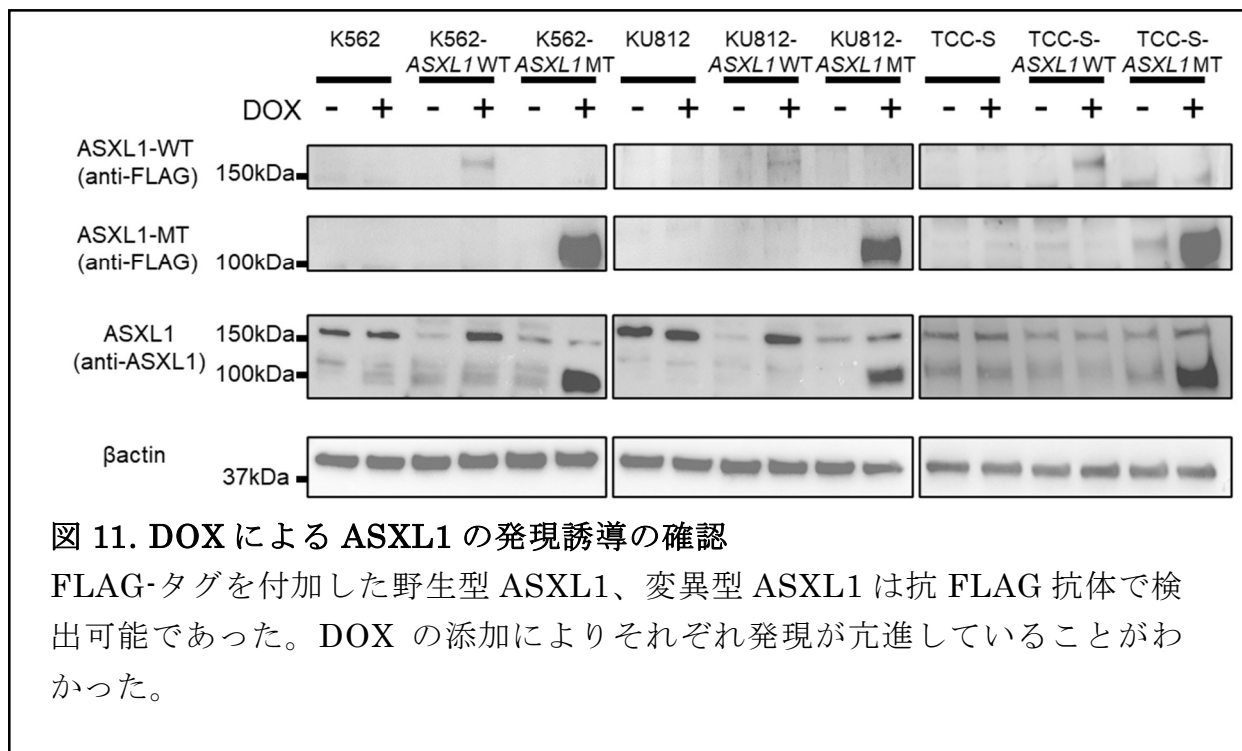
図 9. 野生型、変異型それぞれの ASXL1 遺伝子の長さ
変異体(ASXL1-MT)は終止コドンにより短縮型の ASXL1 タンパク質をコードする。

表 1. 各細胞株の ASXL1 変異
K562、KU812 は ASXL1 変異を有するが TCC-S は ASXL1 変異を有していない。

Cell line	Origin	ASXL1
K562	CML	heterozygous Y591*
KU812	CML	heterozygous R693*
TCC-S	CML	wild type

ASXL1 の発現誘導による薬剤感受性を検討するために、DOX 誘導可能な FLAG タグ付き ASXL1-WT または ASXL1-MT を持つ K562、KU812、TCC-S 細胞株を作製した。定量 PCR (図 10) およびウエスタンブロッティング (図 11) により、各細胞株における野生型および変異型 ASXL1 の DOX 依存的発現を確認した。





各細胞株の薬剤感受性を検討するため、K562、KU812、TCC-S について IC₅₀ の検討を行った(図 12, 13, 14)。

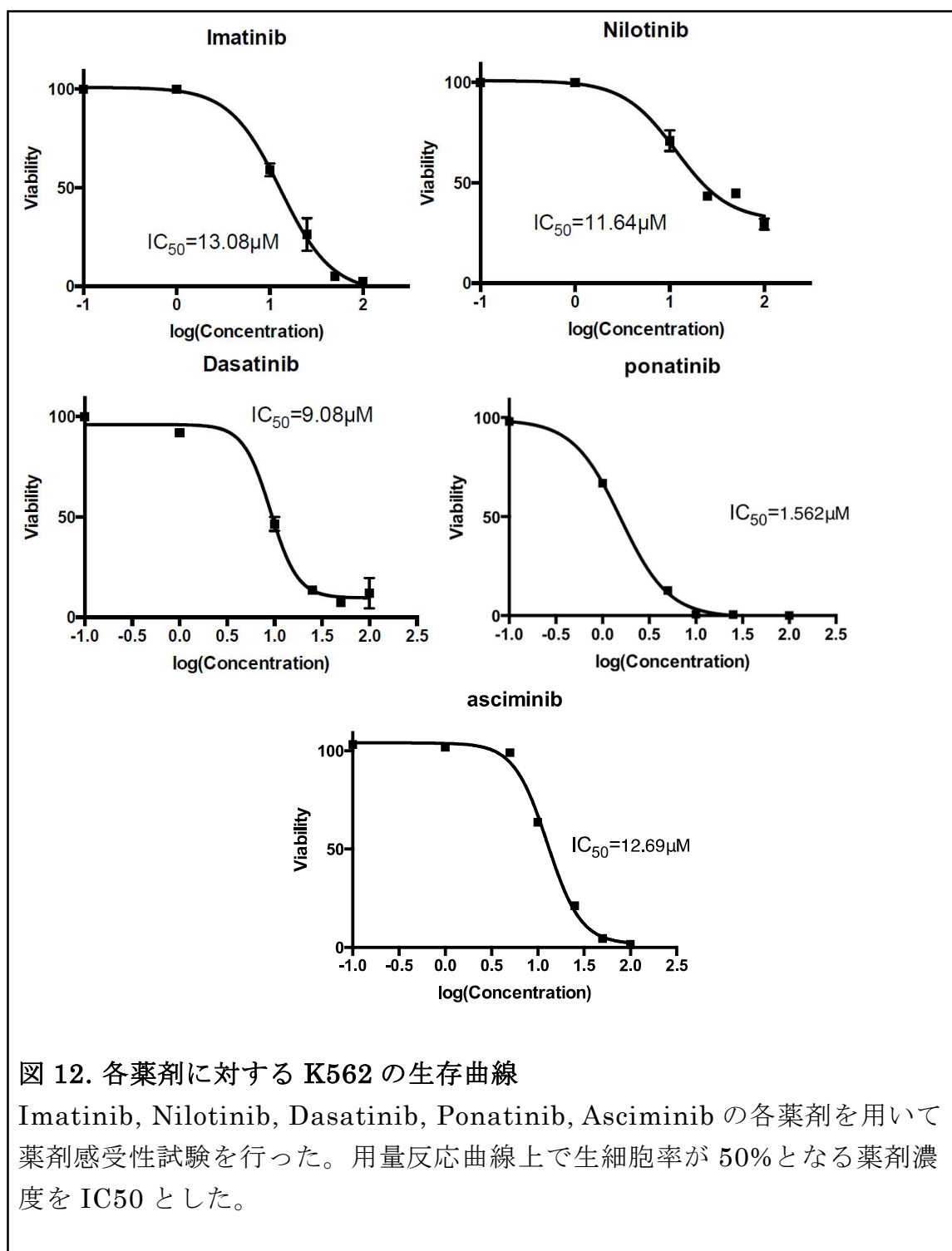


図 12. 各薬剤に対する K562 の生存曲線

Imatinib, Nilotinib, Dasatinib, Ponatinib, Asciminib の各薬剤を用いて薬剤感受性試験を行った。用量反応曲線上で生細胞率が 50%となる薬剤濃度を IC₅₀ とした。

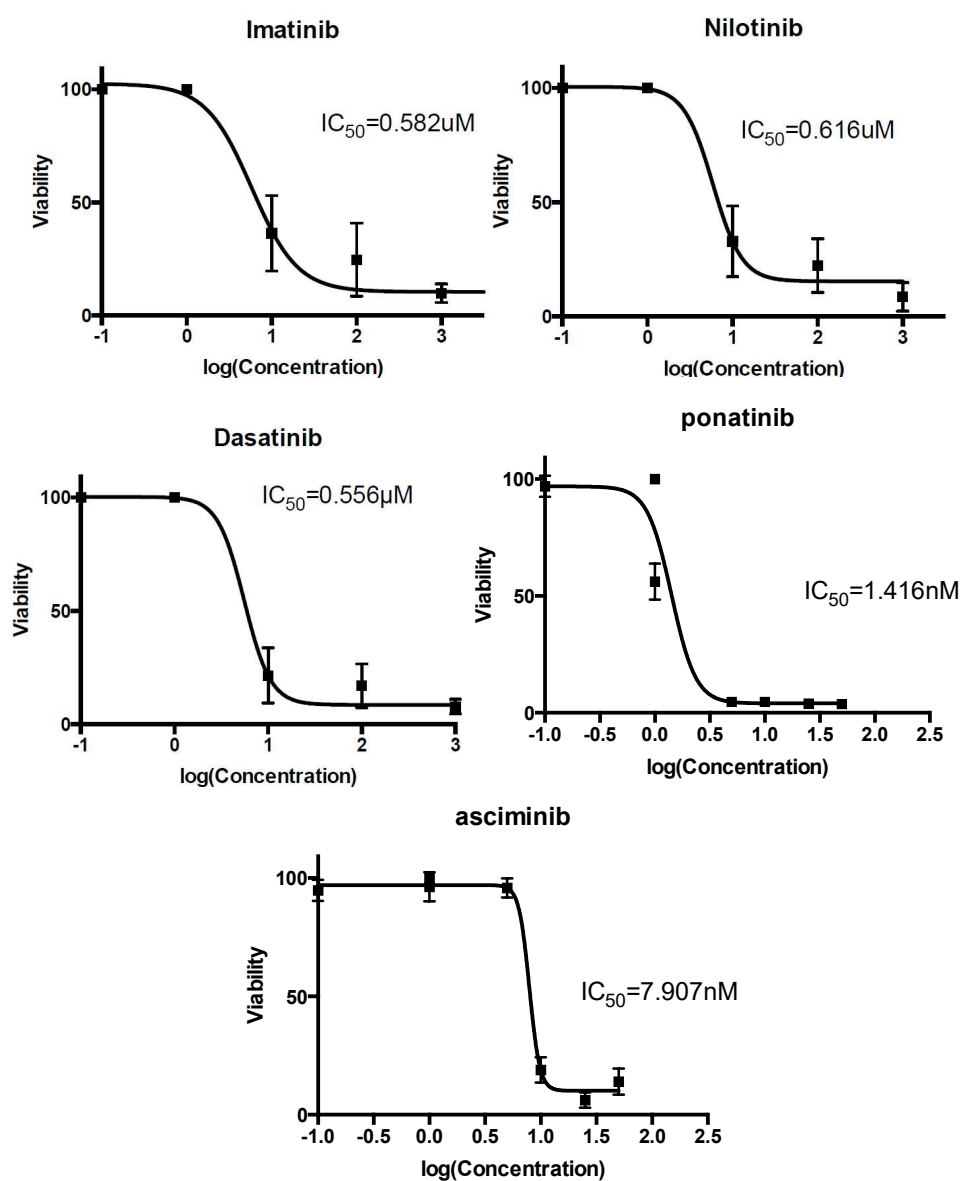


図 13. 各薬剤に対する KU812 の生存曲線

Imatinib, Nilotinib, Dasatinib, Ponatinib, Asciminib の各薬剤を用いて薬剤感受性試験を行った。用量反応曲線上で生細胞率が 50%となる薬剤濃度を IC_{50} とした。

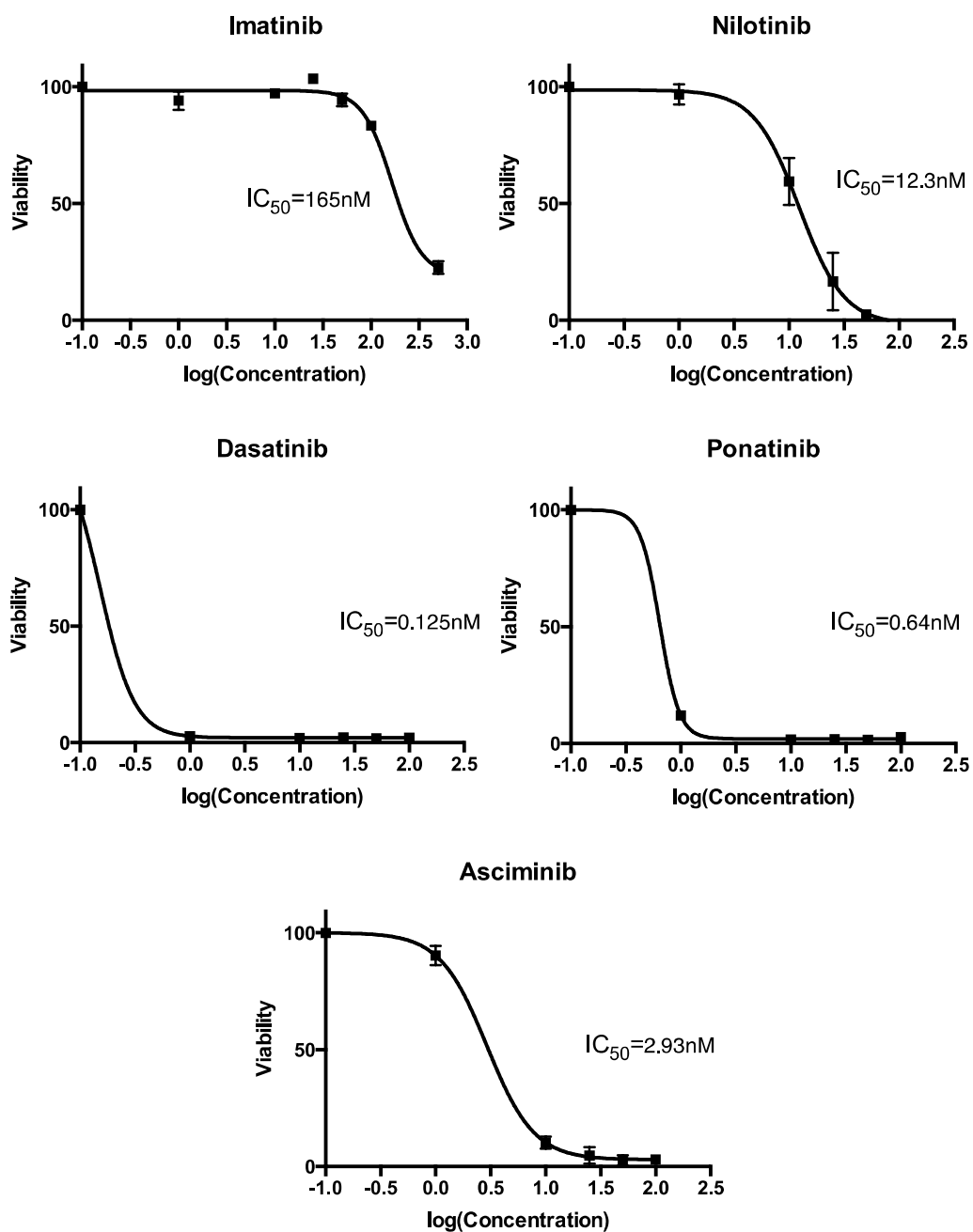


図 14. 各薬剤に対する TCC-S の生存曲線

Imatinib, Nilotinib, Dasatinib, Ponatinib, Asciminib の各薬剤を用いて薬剤感受性試験を行った。用量反応曲線上で生細胞率が 50%となる薬剤濃度を IC_{50} とした。

続いて、野生型または変異型の ASXL1 を発現誘導した細胞株に対して 4 種類のチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI)、ABL ミリス Toil ポケット 結合型阻害薬 (STAMP 阻害薬、アシミニブ) を添加し細胞生存率の変化をみた。薬剤投与量は事前の実験を参考に、各棒グラフの下部に示している濃度で設定した。図 15 に示すように、野生型 ASXL1 を発現誘導しても細胞生存率には変化がみられなかったが、変異型 ASXL1 を発現誘導することで薬剤感受性が低下し、細胞生存率が上昇することがわかった。

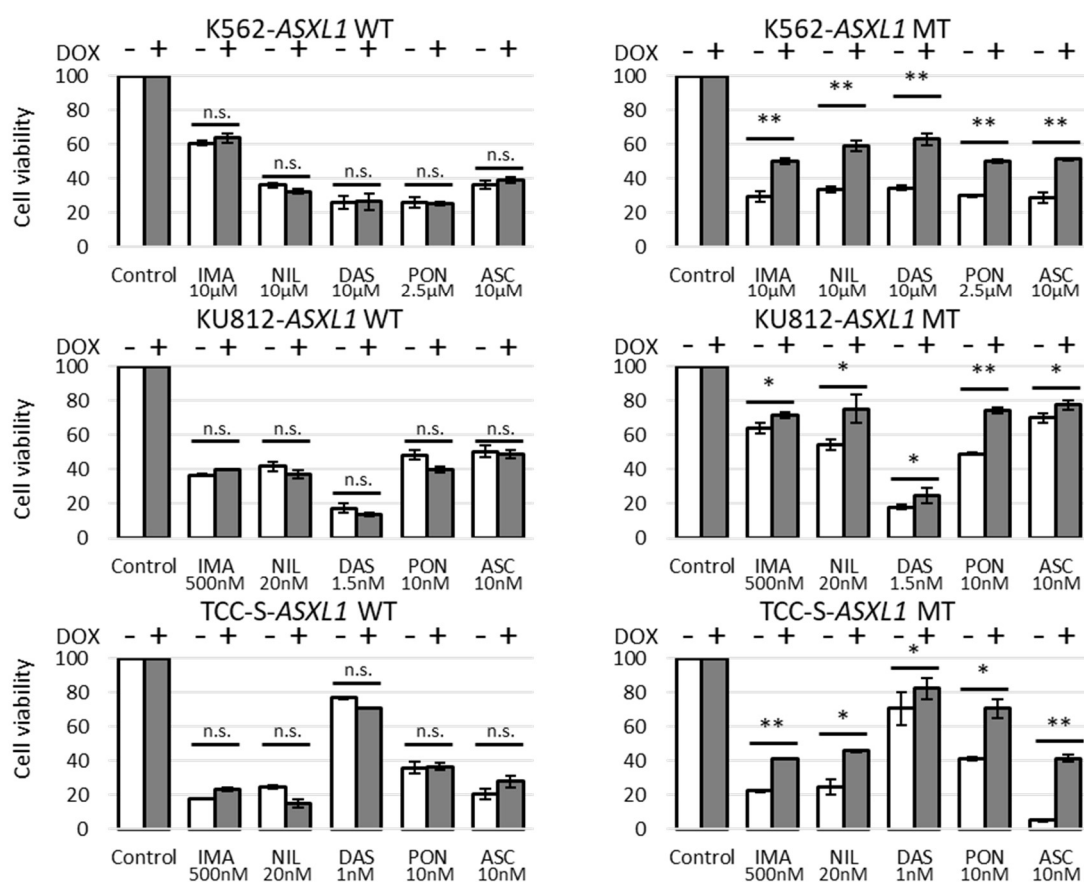


図 15. 各細胞株の生細胞率

各細胞株とも、野生型 ASXL1 (左列) は発現誘導の有無で生細胞率に変化は見られないが、変異型 ASXL1 (右列) を発現誘導すると各薬剤に対して耐性となった。

2. RNA マイクロアレイ解析によるチロシンキナーゼ抵抗性関与遺伝子の解析

RNA マイクロアレイ解析を用いて、変異型 ASXL1 の発現誘導による薬剤感受性低下の原因を探索した。

まず K562-ASXL1 MT DOX (+) において発現上昇した遺伝子の中から、発現薬剤トランスポーターとして機能する ATP-binding cassette sub-family C member 6 (ABCC6) や治療標的として活用可能と考えられる CD37 について検討した。しかし qPCR で mRNA 発現差がみられず (図 16)、それ以降の検討は行わなかった。

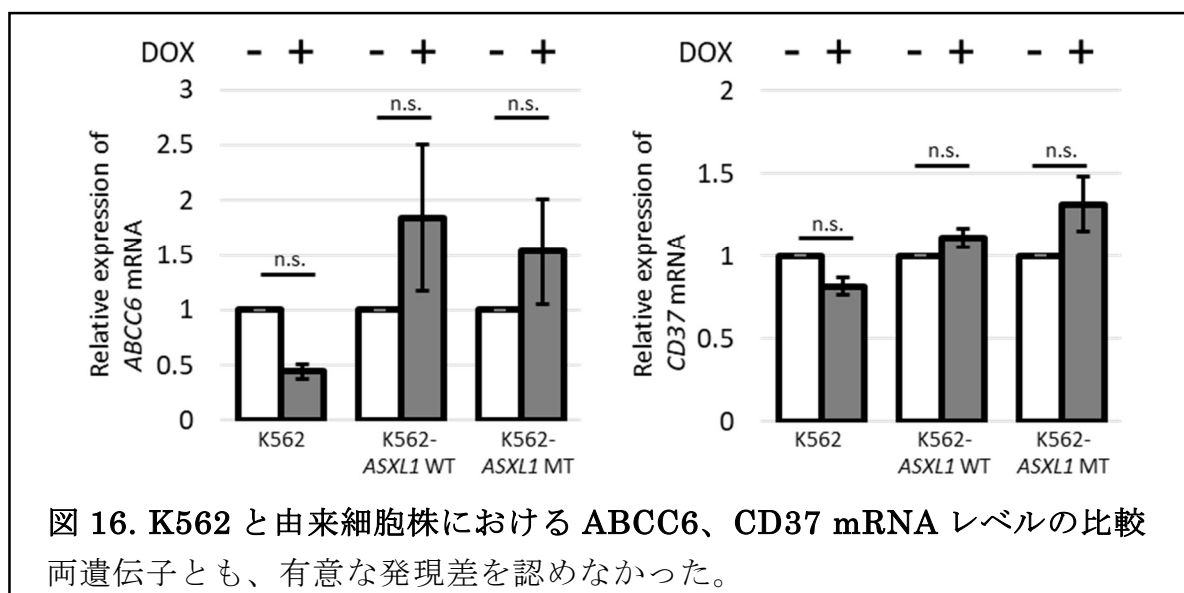


図 16. K562 と由来細胞株における ABCC6、CD37 mRNA レベルの比較
両遺伝子とも、有意な発現差を認めなかった。

続いて、発現変動遺伝子の中から 5 つのキナーゼ遺伝子（AXL, LYN, ROR2, FGR, TEC）を選抜し、qPCR で発現を検証した。しかしやはり十分な発現差が得られなかったため（図 17）、改めてマイクロアレイの全データに対し Fold Change と Z-score により候補遺伝子を再選抜した。

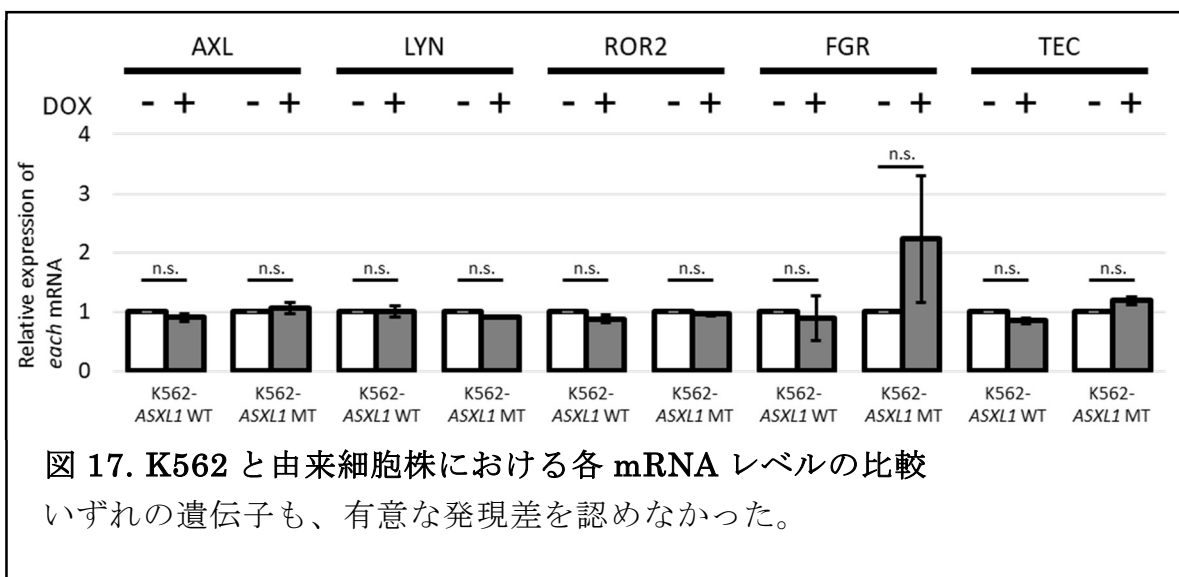


図 17. K562 と由来細胞株における各 mRNA レベルの比較

いずれの遺伝子も、有意な発現差を認めなかった。

K562-ASXL1 MT における DOX 曝露後のシグナル値でソートした Z スコア 1.5 以上の遺伝子上位 10 個を表 2 に示す。ALOX5 は発現上昇遺伝子リストの中で 6 番目に発現が増加した遺伝子である。

表 2. K562-ASXL1 MT 細胞において DOX により発現が上昇した遺伝子

Gene Name	Known Function	Signal Value	Fold Change
ALAS2	heme biosynthetic pathway	9627.35	3.12
MT2A	autophagy and apoptosis	6409.36	6.23
FAM178B	2q11.2 CNV syndrome-related	3717.26	5.02
MT1H	zinc ion binding activity	1153.68	4.68
TEX19	piRNA binding activity	694.94	3.42
ALOX5	arachidonic acid cascade	651.40	4.25
PFKFB4	glycolysis and gluconeogenesis	646.84	3.18
MT1B	heavy metal ion toxicity protection	636.05	4.50
MT1L	cellular response to zinc ion	599.48	5.99
MT1E	cellular response to zinc ion	420.33	5.49

ALOX5 は固形がんにおける細胞増殖、転移、浸潤に関連することが報告されており (Tang et al., 2023; Tang et al., 2021; Wang and Dubois, 2010)、我々は発現が変動した遺伝子の中で ALOX5 に注目した。RNA マイクロアレイ解析の結果を確認するため、各細胞株について ALOX5 の qPCR とウェスタンブロッティングを行った。ALOX5 の mRNA レベルとタンパク質発現は、マイクロアレイ解析の結果として、各細胞株において DOX 誘導に伴い ASXL1-MT 細胞で一貫して増加した (図 18、19)

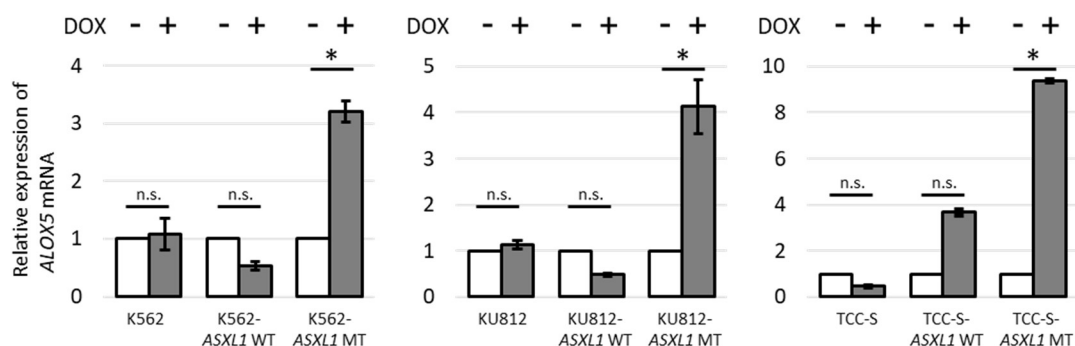


図 18. 各細胞株、ASXL1-WT 導入細胞株、ASXL1-MT 導入細胞株における ALOX5 mRNA レベルの比較

各細胞株とも、ASXL1-MT 導入細胞株において DOX の添加により ALOX5 mRNA レベルが上昇した。

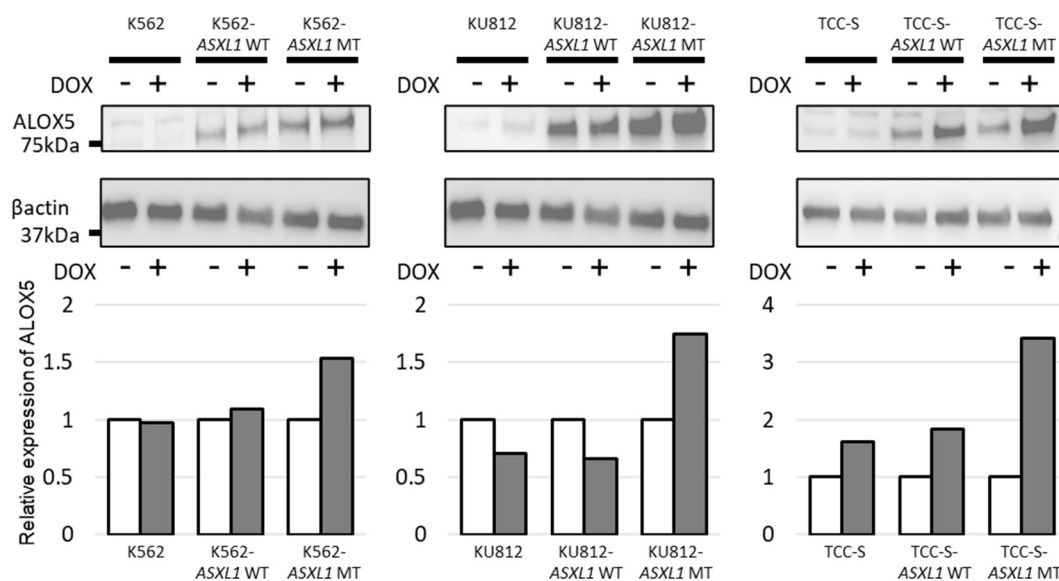
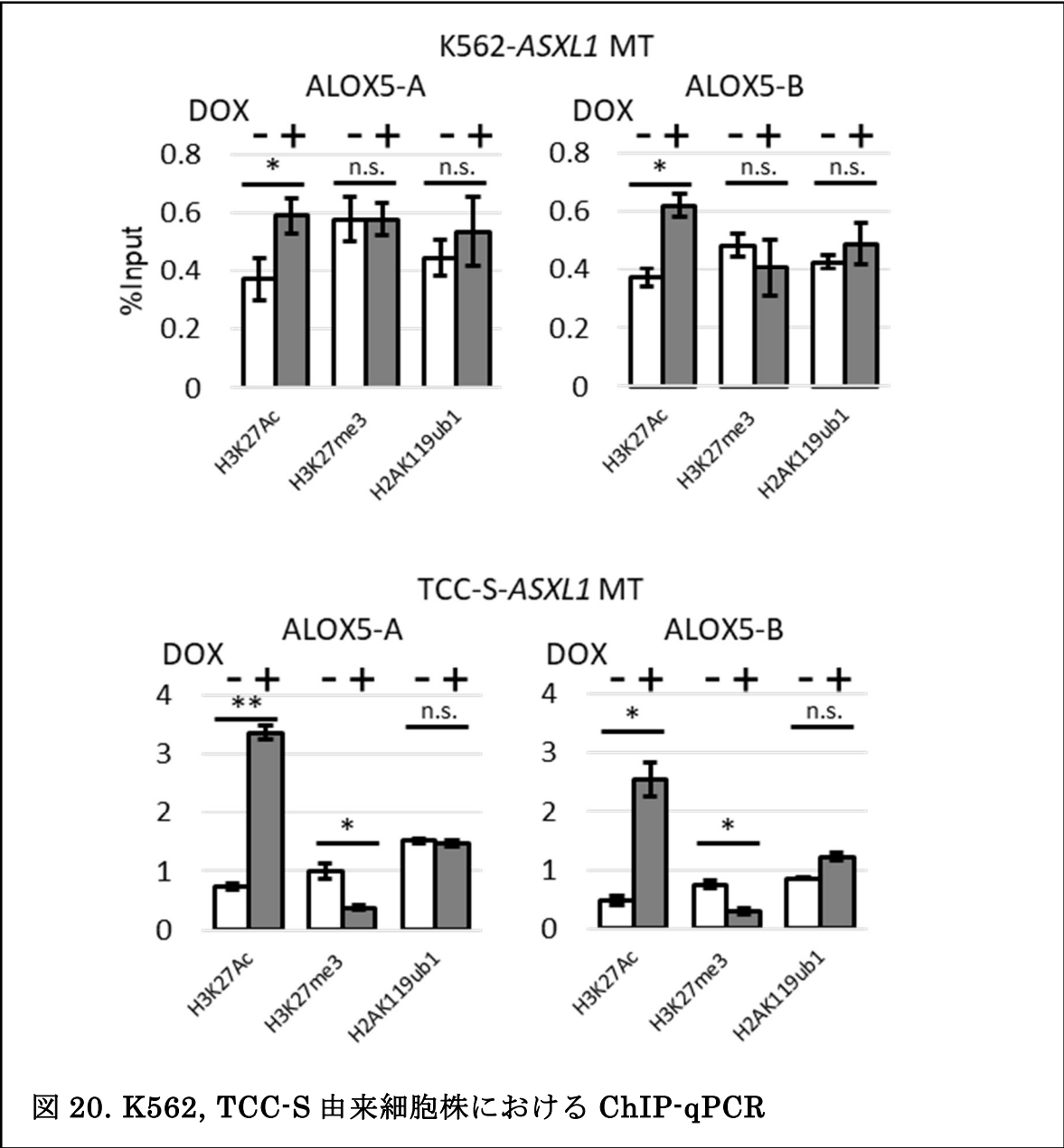


図 19. 各細胞株、ASXL1-WT 導入細胞株、ASXL1-MT 導入細胞株における ALOX5 発現の比較

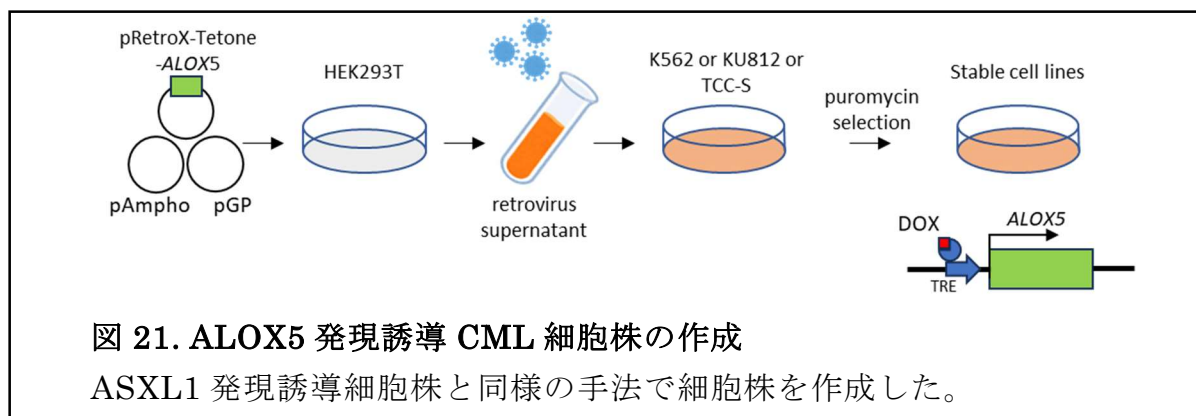
下段の棒グラフは、DOX 無を 1 としてバンドの濃さを定量化した。
mRNA と同様に、ASXL1-MT 導入細胞株で DOX 添加により ALOX5 の発現が上昇した

次に、ASXL1 変異が ALOX5 の発現をどのように調節するかをさらに調べるため、K562-ASXL1 MT 細胞および TCC-S-ASXL1 MT 細胞においてクロマチン免疫沈降（ChIP）アッセイを実施した。ALOX5 のプロモーター領域において H3K27ac の増加が確認された。さらに、H3K27me3 は TCC-S 細胞で減少した（図 20）。これらの結果は、ALOX5 の発現が ASXL1 の変異によって、ヒストン修飾の変化を介して転写レベルで発現誘導されていることを示唆する。

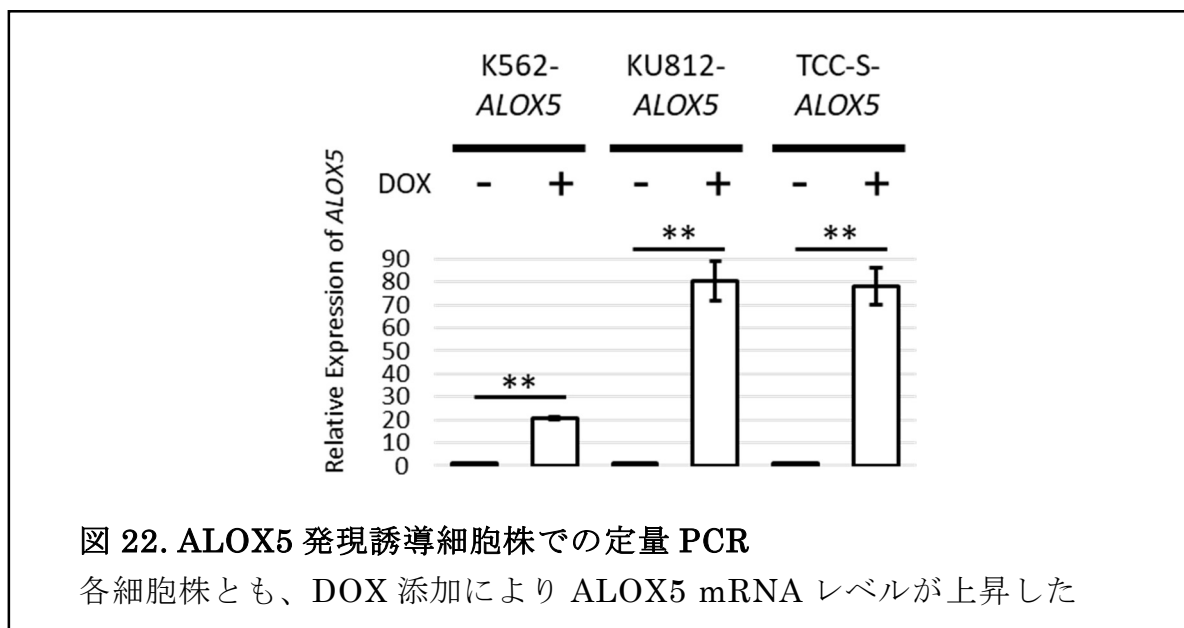


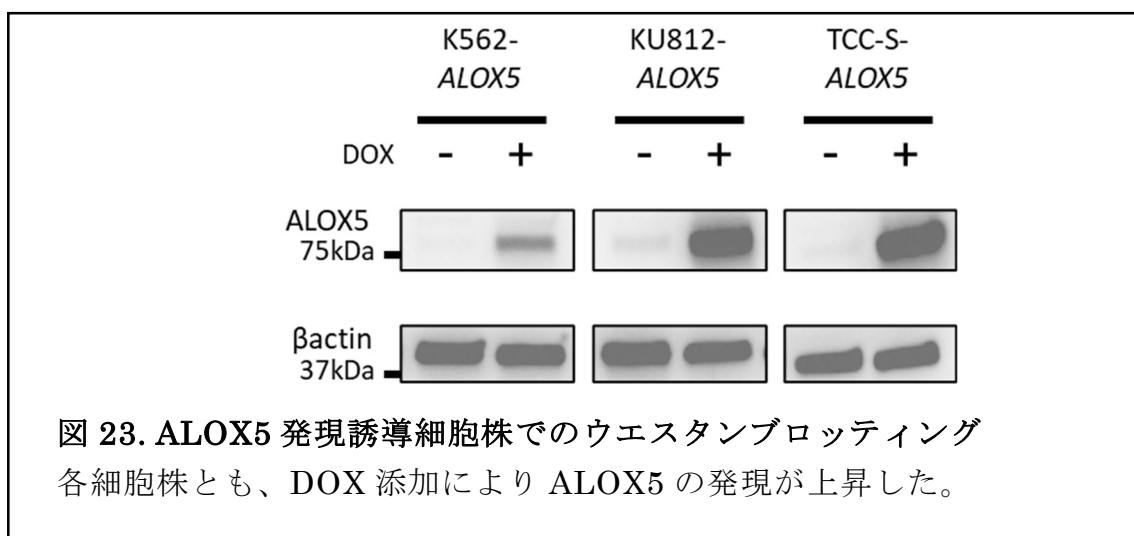
3. CML 細胞株での ALOX5 の強制発現は TKI に対する感受性を低下させる

ALOX5 の発現上昇が TKI 抵抗性に関与することを確認するため、ドキシンサイクリン誘導性の ALOX5 を有する CML 由来細胞株 (K562、KU812、TCC-S) を作製した (K562 または KU812 または TCC-S-ALOX5 細胞) (図 21)。

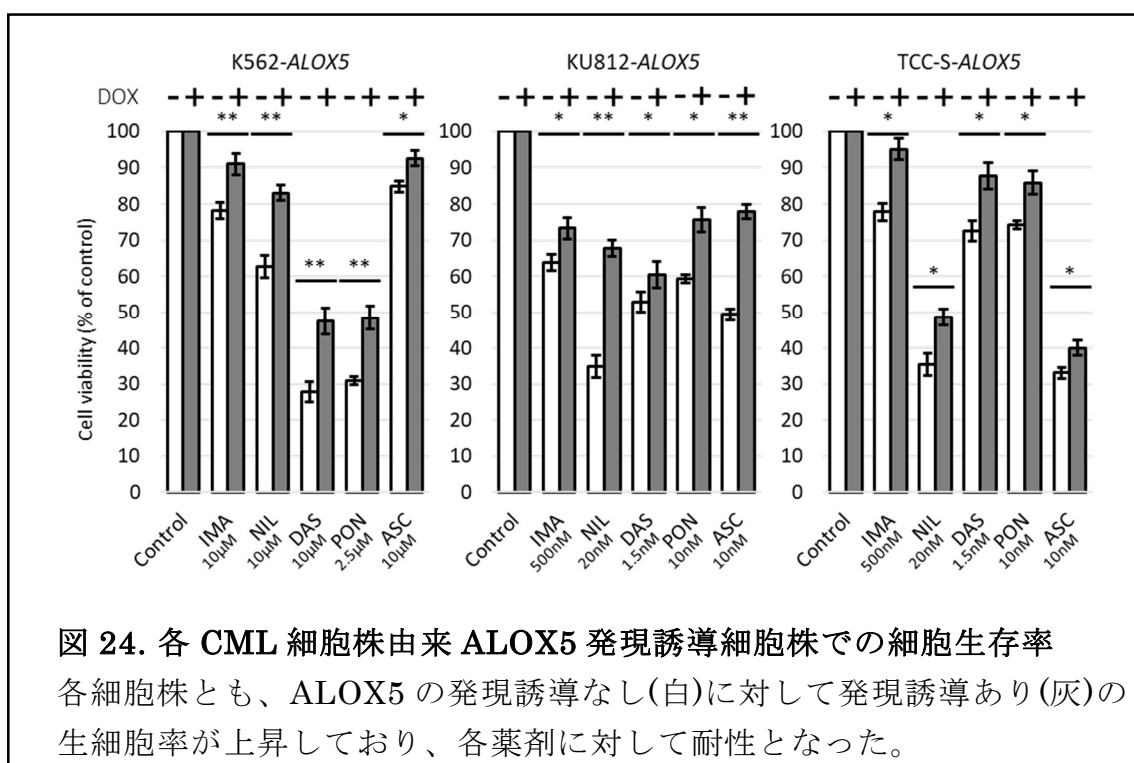


ALOX5 mRNA レベルおよびタンパク質発現の増加は、qPCR およびウエスタンブロッティングで確認した (図 22、23)。DOX により ALOX5 の mRNA、タンパク質双方の発現が上昇することを確認した。





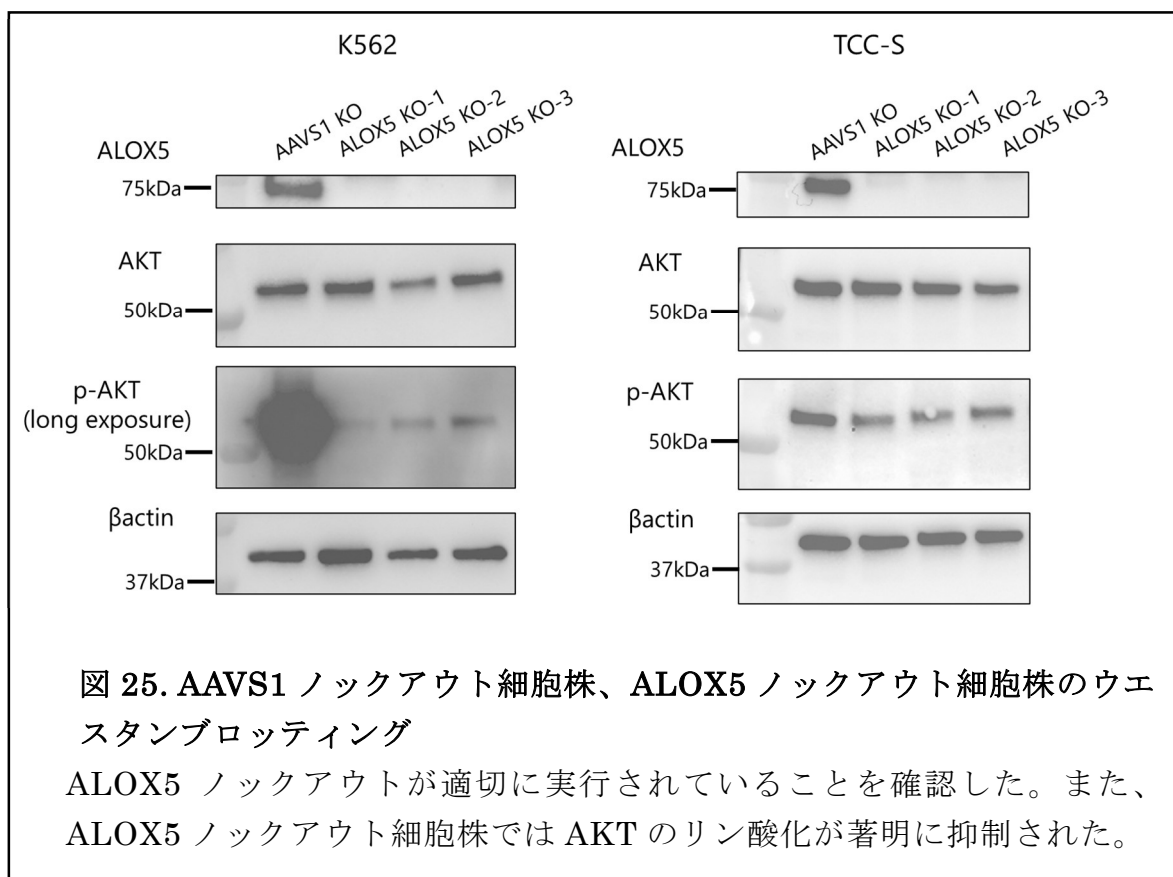
続いて、ALOX5 の発現誘導が TKI に対する感受性を変化させるかどうかを調べた。全ての細胞株で、ALOX5 発現誘導により TKI に対する抵抗性が増加した (図 24)。



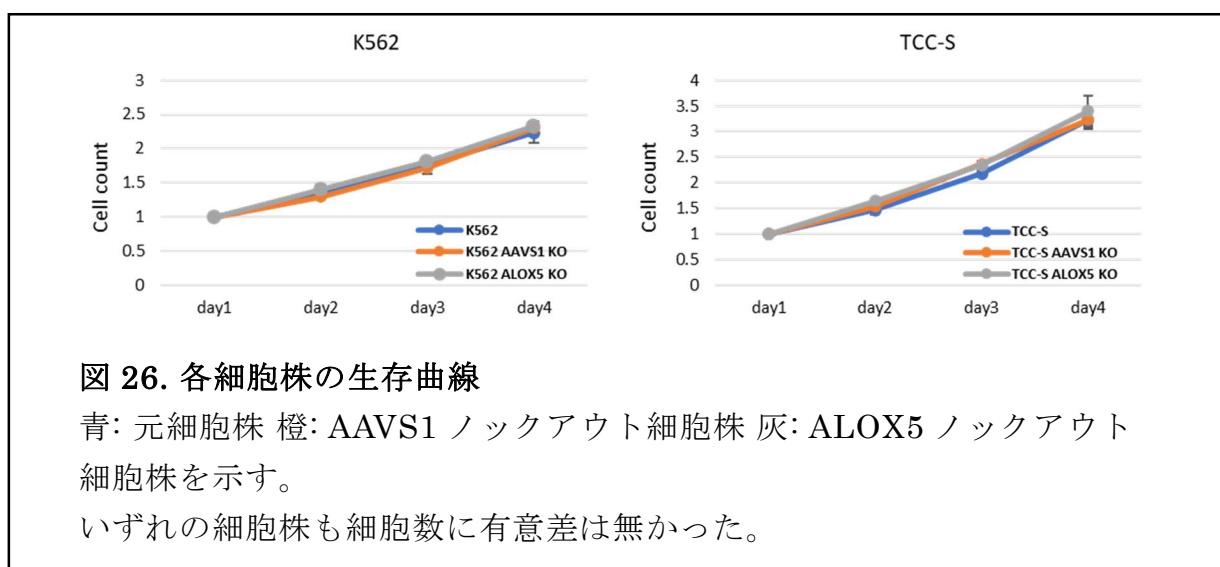
4. ALOX5 のノックアウトで TKI 感受性が上昇 する

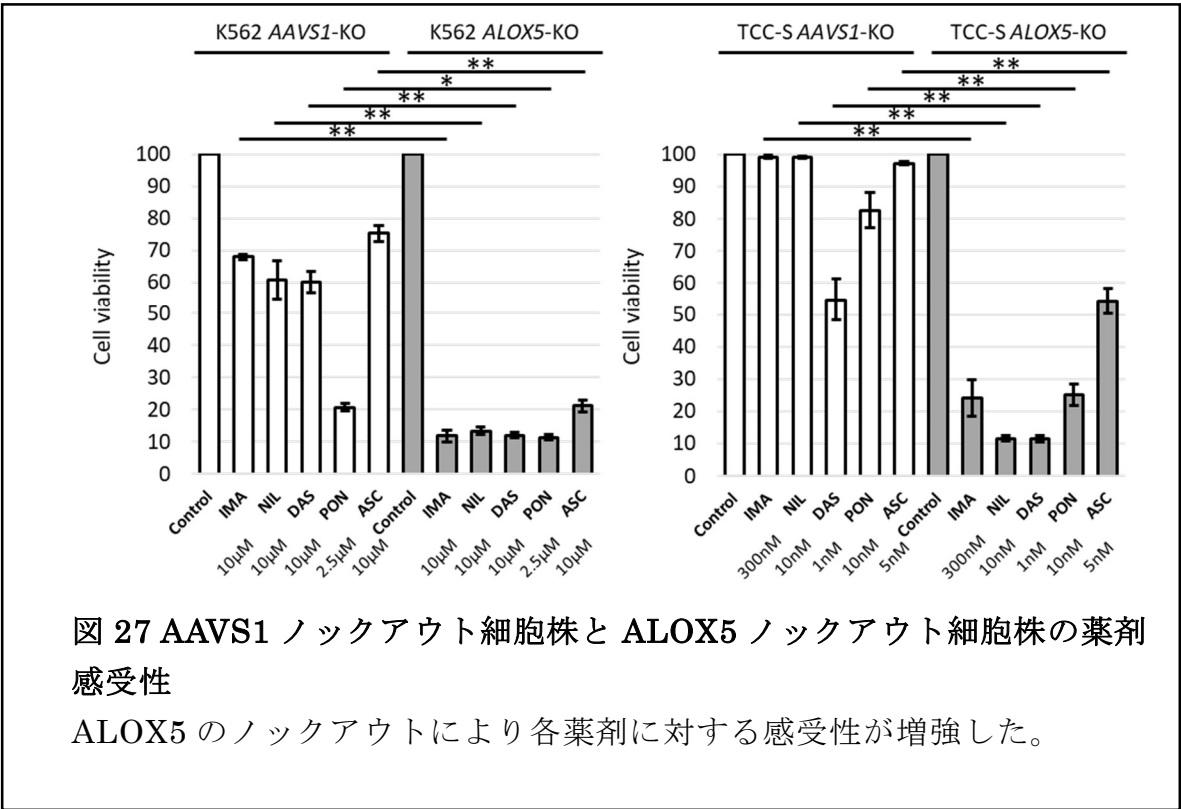
CML 細胞の TKI 感受性に対する ALOX5 の影響を調べるため、CRISPR/Cas9 システムを用いて CML 細胞株で ALOX5 をノックアウトした。2 種類の sgRNA (sgRNA-ALOX5#1 および sgRNA-ALOX5#2) を Cas9 タンパク質発現下で K562 および TCC-S 細胞にエレクトロポレーションし、ALOX5 がノックアウトされた細胞株を作製した。樹立した細胞株を限界希釈し、ALOX5 ノックアウトに成功し単一クローン細胞株を樹立した。ウエスタンブロッティングにより、ALOX5 ノックアウトを確認した (図 25)。また、ALOX5 の開始コドンが欠失により失われていることをサングーシーケンスで確認した。

K562 および TCC-S 細胞株について、TKI 感受性に対する ALOX5 ノックアウトの影響を調べた。ノックアウト手順の非特異的影響のコントロールとして、sgRNA-AAVS1 を用いて、セーフハーバー領域遺伝子である AAVS1 をノックアウトした細胞を作製した。K562 細胞と TCC-S 細胞の両方で、ALOX5 のノックアウトは AKT のリン酸化を抑制させた (図 25)。



親細胞株、AAVS1 ノックアウト細胞株、ALOX5 ノックアウト細胞株の細胞増殖に差はなかった（図 26）。しかしながら、5 つの TKI に対する感受性は、両方の細胞株において ALOX5 のノックアウトによって著しく増強された（図 27）。





5. ロイコトリエン B4 受容体拮抗薬 (LY293111) は TKI に対する感受性を増加させた

ALOX5 はアラキドン酸をロイコトリエン B4 (LTB4) を含む生理学的に重要なロイコトリエン (LT) に代謝する(Wan et al., 2017)。LTB4 受容体 (BLTR) 拮抗薬である LY293111 は、AKT リン酸化の潜在的阻害を介して細胞周期の停止とアポトーシスを誘導しうる(Zhang et al., 2005)。LY293111 単独で 3 つの細胞株を 48 時間処理すると、ALOX5 のノックアウトと同様に AKT のリン酸化が抑制された (図 28)。

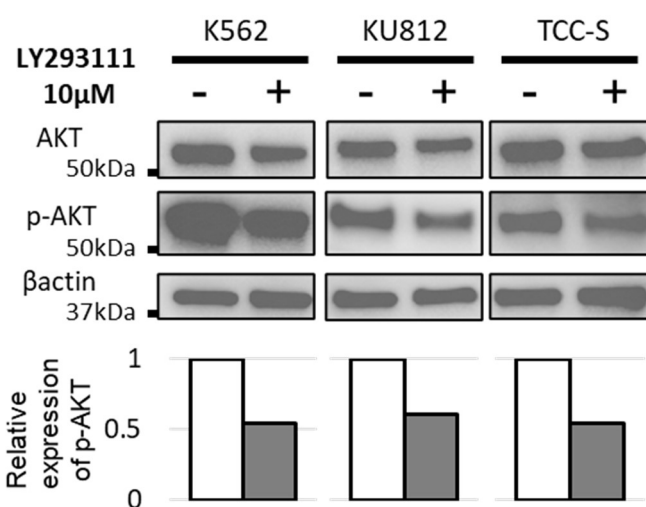
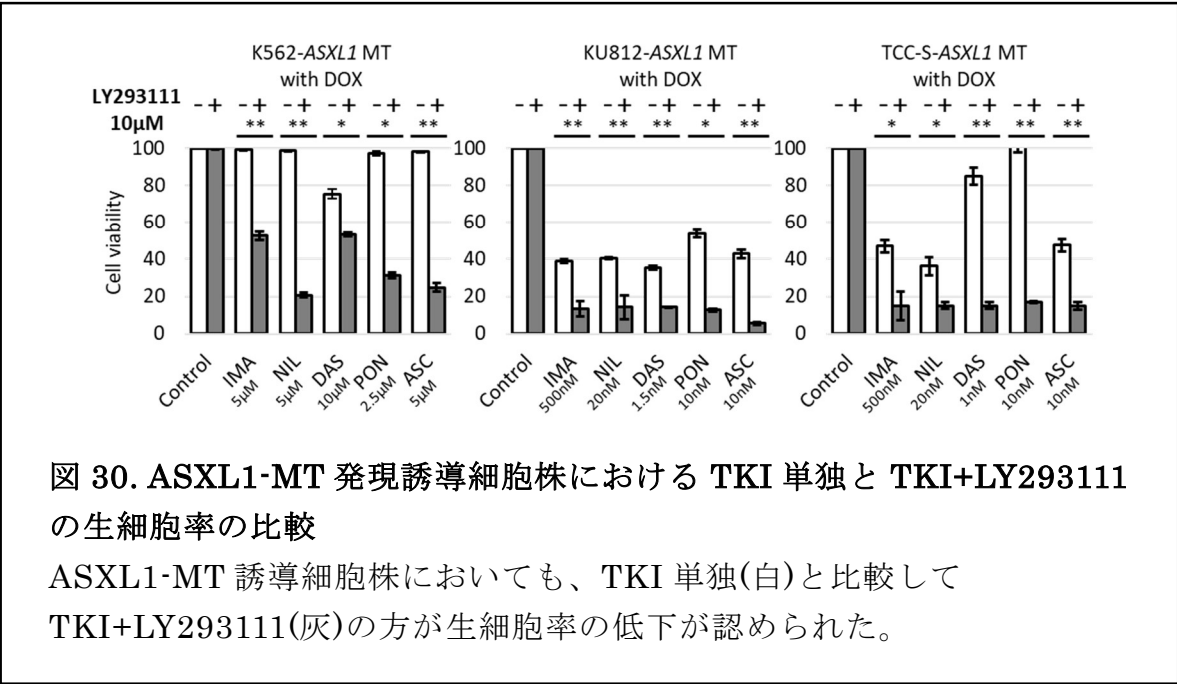
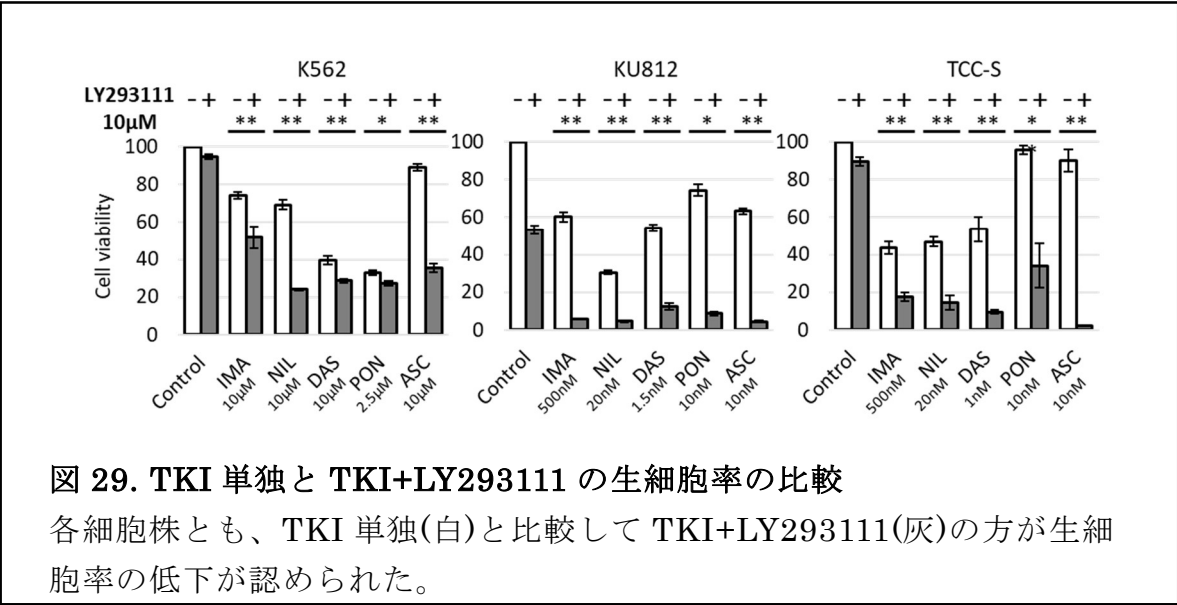


図 28. LY293111 処理による AKT のリン酸化状態の変化

LY293111 で各細胞株を処理することで AKT のリン酸化が抑制された。下の棒グラフは未処理細胞株を 1 とした、処理細胞株のリン酸化 AKT の定量値である。

続いて、LY293111 を TKI と併用するとそれぞれの細胞株で TKI 単独と比較して併用時の生細胞率が低下した（図 29）。さらに、ASXL1 変異体発現の誘導によってもたらされる TKI に対する耐性は、LY293111 を添加することによって中和することができた（図 30）。



【考察】

今回、我々は変異型 ASXL1 が CML 細胞株において薬剤耐性を誘導し、その原因の 1 つが ALOX5 の高発現である可能性を見出した。変異した ABL1 が介在する TKI 耐性については多くの報告があるが、他の遺伝子変異が CML における TKI 耐性とどのように関連するかについてはあまり知られていない。ASXL1 変異は、CML-CP において最も頻度の高い変異遺伝子

(14%) であり、転帰の悪化と関連することが報告されている (Bidikian et al., 2022)。ASXL1 変異のほとんどは、最後のエクソンであるエクソン 12 におけるフレームシフトまたはナンセンス変異であり、その結果、C 末端を欠く変異 ASXL1 タンパク質が生じる (Inoue et al., 2016)。ASXL1 はエピジェネティック制御遺伝子であり、多くの遺伝子の発現制御に関係していると考えられている。変異型 ASXL1 の機能解析によって、ASXL1 変異によりエピジェネティック制御が変化し、造血細胞の機能障害や腫瘍形成を引き起こすことが示されている (Asada et al., 2019)。今回、我々は ChIP-qPCR を用いて変異型 ASXL1 が ALOX5 のプロモーター領域において H3K27ac を増加させ、H3K27me3 を減少させることを見出した。これらの結果は、ALOX5 の発現が ASXL1 の変異によって、ヒストン修飾の変化を介して転写レベルで発現誘導されていることを示唆している。

さらに、AKT/mTOR シグナル伝達の亢進は、ASXL1 変異によってもたらされる機能の一つとして報告されている (Fujino et al., 2021)。しかし、変異 ASXL1 における AKT シグナル活性化の分子メカニズムは明らかにされていない。

一方、CML における ALOX5 に注目した報告もいくつかある (Chen, Li, et al., 2009; Ma et al., 2021)。ALOX5 は CML における白血病幹細胞

(LSC) の重要な制御因子として同定されており、ALOX5 を阻害すると CML マウスの生存期間が延長することも判明している (Chen, Hu, et al., 2009)。また、PKC- β によって誘導される TKI 耐性は、ALOX5 の過剰発現に依存していることが報告されている (Ma et al., 2021)。胃がん細胞株では、ALOX5 をノックアウトすると AKT リン酸化が抑制され、化学療法剤に対する感受性が上昇することが示されている (Tang et al., 2021) が、この知見は白血病細胞株では検証されていない。実際、我々は細胞株で ALOX5 をノックアウトすると AKT リン酸化が抑制されることを示した。さらに TKI に対する感受性が上昇することを示した。

ALOX5 は、LT 合成経路の初期段階を仲介し、LTA4、LTB4、LTC4、LTD4、LTE4 を含む LT ファミリー全体の合成に必要である (Wan et al.,

2017)。LTB4 は受容体 BLTR に選択的に結合することで生物学的機能を発揮する(Tager and Luster, 2003)。LY293111 は BLTR の阻害剤であり、LY293111 と化学療法剤との併用は、白血病細胞株においてより多くの細胞死を誘導する(Stranahan et al., 2022)。LY293111 は一般に忍容性の高い経口薬であり、第 II 相臨床試験において膵臓癌および非小細胞肺癌を対象に化学療法剤との併用試験が行われた(Janne et al., 2014; Saif et al., 2009)。本研究では、LY293111 と TKI の併用が TKI 単独よりも効率的に細胞死を誘導することを示した。

今回、我々はマイクロアレイ解析による TKI 耐性細胞株の網羅的遺伝子解析により、ASXL1 変異による TKI 耐性の原因解明を試みた。その結果、ASXL1 変異が TKI 抵抗性をもたらすこと、そしてこれらの細胞株では ALOX5 の発現が増加していることを示した。さらに、ALOX5 の発現誘導が TKI に対する抵抗性をもたらし、AKT のリン酸化がこの抵抗性の原因のひとつである可能性を示した。ASXL1 変異は造血幹細胞レベルで機能障害を引き起こし、AKT/mTOR 経路の活性化を通じてクローン形成に優位性をもたらす[31]、骨髄性悪性腫瘍における PTEN/AKT シグナル伝達との関連が報告されている(Cao et al., 2020)。

本研究では、CML における ASXL1 MT 誘導性 TKI 不感受性が、ALOX5 の過剰発現によって媒介されることを明らかにした。LTB4 受容体 BLTR の阻害は、AKT リン酸化の抑制を介して TKI 感受性を高めることがわかった。ASXL1/ALOX5/AKT 経路を標的とすることは、既存の TKI に抵抗性を示す患者に対する新たな治療選択肢となる可能性がある。

【総括と結論】

新知見

- ・ ALOX5 の発現亢進が ASXL1 変異を有する CML の予後不良の 1 つの原因である可能性を見出した。
- ・ 変異型 ASXL1 が ALOX5 の転写活性を上げ、ALOX5 タンパクの発現を上昇させることが分かった。
- ・ ALOX5 のノックアウトにより CML 細胞株の薬剤感受性が亢進することが分かった。
- ・ ALOX5 の下流に位置する BLTR の阻害によっても CML 細胞株の薬剤感受性が亢進し、既存治療薬との併用が有用である可能性を示した。

意義

- ・ ASXL1 変異を有する CML において ALOX5 は新規治療標的となりうる。
- ・ 至適治療効果が得られない CML の患者において、BLTR 阻害薬である LY293111 は TKI や STAMP 阻害薬との併用で効果の増強が期待できる。

本研究の課題

- ・ 変異型 ASXL1 がもたらす影響は ALOX5 のみではないと考えられるため、それ以外の影響について検討できていない。
- ・ 実際に ASXL1 変異を有する CML 患者で ALOX5 の発現がどう変化しているかの検討が出来ていない。
- ・ Tet-on 系における ASXL1 変異体の発現量は、患者体内での実際の発現と比較して過剰である可能性があり、本実験系で観察された表現型の一部が非生理的条件に基づく可能性は否定できない。
- ・ 本研究で対象とした ALOX5 プロモーター領域が ASXL1 と直接関連するかが定かではなく、今後はルシフェラーゼアッセイなどを用いて転写活性領域の特定と機能的関連性の検証が必要である。

今後の研究展開

- ・ マイクロアレイ解析で発現が変動した遺伝子は多数あるため、ALOX5 以外にも CML 細胞株の薬剤感受性に影響を及ぼす可能性があるものは存在すると考えられる。その遺伝子についての検討を行う。
- ・ 臨床検体を用いて、ASXL1 変異と ALOX5 の発現の関係、予後との関係を検討する。
- ・ 本実験で明らかになった薬剤併用効果につき、動物実験モデルを用いた検討を行う。

【謝辞】

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院内科系部門内科学分野血液内科学教室 豊嶋崇徳教授に深く感謝いたします。また、直接の御指導を賜りました北海道大学病院臨床研修センター 小野澤真弘講師、愛育病院血液病センター 近藤健医師に心より感謝申し上げます。最後に様々な面においてご協力いただいた教室員の皆様に心よりお礼申し上げます。

【利益相反】

本研究は、日本学術振興会 科学研究費補助金（基盤研究(C)、課題番号 21K08362、研究代表者 近藤健）の助成を受けたものです。

引用文献

- Asada, S., Fujino, T., Goyama, S., and Kitamura, T. (2019). The role of ASXL1 in hematopoiesis and myeloid malignancies. *Cell Mol Life Sci*, 76(13), 2511-2523.
- Balasubramani, A., Larjo, A., Bassein, J. A., Chang, X., Hastie, R. B., Togher, S. M., and Snyder, M. P. (2015). Cancer-associated ASXL1 mutations may act as gain-of-function mutations of the ASXL1-BAP1 complex. *Nat Commun*, 6, 7307.
- Bidikian, A., Kantarjian, H., Jabbour, E., Short, N. J., Patel, K., Ravandi, F., Sasaki, K., and Issa, G. C. (2022). Prognostic impact of ASXL1 mutations in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood Cancer J*, 12(10), 144.
- Branford, S., Wang, P., Yeung, D. T., Thomson, D., Purins, A., Wadham, C., Shahrin, N. H., Marum, J. E., Nataren, N., Parker, W. T., Geoghegan, J., Feng, J., Shanmuganathan, N., Mueller, M. C., Dietz, C., Stangl, D., Donaldson, Z., Altamura, H., Georgievski, J. and Hughes, T. P. (2018). Integrative genomic analysis reveals cancer-associated mutations at diagnosis of CML in patients with high-risk disease. *Blood*, 132(9), 948-961.
- Brummendorf, T. H., Cortes, J. E., Milojkovic, D., Gambacorti-Passerini, C., Clark, R. E., le Coutre, P., Garcia-Gutierrez, V., Chuah, C., Kota, V., Lipton, J. H., Rousselot, P., Mauro, M. J., Hochhaus, A., Hurtado Monroy, R., Leip, E., Purcell, S., Yver, A., Viqueira, A., Deininger, M. W., and investigators, B. s. (2022). Bosutinib versus imatinib for newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia: final results from the BFORE trial. *Leukemia*, 36(7), 1825-1833.
- Cao, L., Xia, X., Kong, Y., Jia, F., Yuan, B., Li, R., Li, Q., Wang, Y., Cui, M., Dai, Z., Zheng, H., Christensen, J., Zhou, Y., and Wu, X. (2020). Deregulation of tumor suppressive ASXL1-PTEN/AKT axis in myeloid malignancies. *J Mol Cell Biol*, 12(9), 688-699.

Chen, Y., Hu, Y., Zhang, H., Peng, C., and Li, S. (2009). Loss of the Alox5 gene impairs leukemia stem cells and prevents chronic myeloid leukemia. *Nat Genet*, 41(7), 783-792.

Chen, Y., Li, D., and Li, S. (2009). The Alox5 gene is a novel therapeutic target in cancer stem cells of chronic myeloid leukemia. *Cell Cycle*, 8(21), 3488-3492.

Chiba, M., Shimono, J., Ishio, T., Takei, N., Kasahara, K., Ogasawara, R., Ara, T., Goto, H., Izumiyama, K., Otsuguro, S., Perera, L. P., Hasegawa, H., Maeda, M., Hashino, S., Maenaka, K., Teshima, T., Waldmann, T. A., Yang, Y., and Nakagawa, M. (2022). Genome-wide CRISPR screens identify CD48 defining susceptibility to NK cytotoxicity in peripheral T-cell lymphomas. *Blood*, 140(18), 1951-1963.

Chiba, M., Shimono, J., Suto, K., Ishio, T., Endo, T., Goto, H., Hasegawa, H., Maeda, M., Teshima, T., Yang, Y., and Nakagawa, M. (2023). Whole genome CRISPR screening identifies molecular mechanisms of PD-L1 expression in Adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*.

Cortes, J. E., Kantarjian, H., Shah, N. P., Bixby, D., Mauro, M. J., Flinn, I., O'Hare, T., Hu, S., Narasimhan, N. I., Rivera, V. M., Clackson, T., Turner, C. D., Haluska, F. G., Druker, B. J., Deininger, M. W., and Talpaz, M. (2012). Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*, 367(22), 2075-2088.

Cortes, J. E., Saglio, G., Kantarjian, H. M., Baccarani, M., Mayer, J., Boque, C., Shah, N. P., Chuah, C., Casanova, L., Bradley-Garelik, B., Manos, G., and Hochhaus, A. (2016). Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naive Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *J Clin Oncol*, 34(20), 2333-2340.

Creyghton, M. P., Cheng, A. W., Welstead, G. G., Kooistra, T., Carey, B. W., Steine, E. J. and Jaenisch, R. (2010). Histone H3K27ac

separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(50), 21931–21936.

Fujino, T., Goyama, S., Sugiura, Y., Inoue, D., Asada, S., Yamasaki, S., Matsumoto, A., Yamaguchi, K., Isobe, Y., Tsuchiya, A., Shikata, S., Sato, N., Morinaga, H., Fukuyama, T., Tanaka, Y., Fukushima, T., Takeda, R., Yamamoto, K., Honda, H., and Kitamura, T. (2021). Mutant ASXL1 induces age-related expansion of phenotypic hematopoietic stem cells through activation of Akt/mTOR pathway. *Nat Commun*, 12(1), 1826.

Grossmann, V., Kohlmann, A., Zenger, M., Schindela, S., Eder, C., Weissmann, S., Schnittger, S., Kern, W., Muller, M. C., Hochhaus, A., Haferlach, T., and Haferlach, C. (2011). A deep-sequencing study of chronic myeloid leukemia patients in blast crisis (BC-CML) detects mutations in 76.9% of cases. *Leukemia*, 25(3), 557-560.

Hochhaus, A., Saglio, G., Hughes, T. P., Larson, R. A., Kim, D. W., Issaragrisil, S., le Coutre, P. D., Etienne, G., Dorlhiac-Llacer, P. E., Clark, R. E., Flinn, I. W., Nakamae, H., Donohue, B., Deng, W., Dalal, D., Menssen, H. D., and Kantarjian, H. M. (2016). Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. *Leukemia*, 30(5), 1044-1054.

Hughes, T. P., Kaeda, J., Branford, S., Rudzki, Z., Hochhaus, A., Hensley, M. L., Gathmann, I., Bolton, A. E., van Hoomissen, I. C., Goldman, J. M., Radich, J. P., and International Randomised Study of Interferon versus, S. T. I. S. G. (2003). Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 349(15), 1423-1432.

Inoue, D., Matsumoto, M., Nagase, R., Saika, M., Fujino, T., Nakayama, K. I., and Kitamura, T. (2016). Truncation mutants of ASXL1 observed in myeloid malignancies are expressed at detectable

protein levels. *Exp Hematol*, 44(3), 172-176 e171.

Janne, P. A., Paz-Ares, L., Oh, Y., Eschbach, C., Hirsh, V., Enas, N., Brail, L., and von Pawel, J. (2014). Randomized, double-blind, phase II trial comparing gemcitabine-cisplatin plus the LTB4 antagonist LY293111 versus gemcitabine-cisplatin plus placebo in first-line non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 9(1), 126-131.

Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*, 48(3), 452-458.

Kantarjian, H., Shah, N. P., Hochhaus, A., Cortes, J., Shah, S., Ayala, M., Moiraghi, B., Shen, Z., Mayer, J., Pasquini, R., Nakamae, H., Huguet, F., Boque, C., Chuah, C., Bleickardt, E., Bradley-Garelik, M. B., Zhu, C., Szatrowski, T., Shapiro, D., and Baccarani, M. (2010). Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 362(24), 2260-2270.

Kim, T., Tyndel, M. S., Kim, H. J., Ahn, J. S., Choi, S. H., Park, H. J., Kim, Y. K., Kim, S. Y., Lipton, J. H., Zhang, Z., and Kim, D. D. (2017). Spectrum of somatic mutation dynamics in chronic myeloid leukemia following tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*, 129(1), 38-47.

Kim, T., Tyndel, M. S., Zhang, Z., Ahn, J., Choi, S., Szardenings, M., Lipton, J. H., Kim, H. J., and Kim Dong Hwan, D. (2017). Exome sequencing reveals DNMT3A and ASXL1 variants associate with progression of chronic myeloid leukemia after tyrosine kinase inhibitor therapy. *Leuk Res*, 59, 142-148.

Ma, D., Liu, P., Wang, P., Zhou, Z., Fang, Q., and Wang, J. (2021). PKC-beta/Alox5 axis activation promotes Bcr-Abl-independent TKI-resistance in chronic myeloid leukemia. *J Cell Physiol*, 236(9), 6312-6327.

Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469(7330), 343-349.

Mologni, L., Piazza, R., Khandelwal, P., Pirola, A., and Gambacorti-Passerini, C. (2017). Somatic mutations identified at diagnosis by exome sequencing can predict response to imatinib in chronic phase chronic myeloid leukemia (CML) patients. *Am J Hematol*, *92*(10), E623-E625.

Nteliopoulos, G., Bazeos, A., Claudiani, S., Gerrard, G., Curry, E., Szydlo, R., Alikian, M., Foong, H. E., Nikolakopoulou, Z., Loaiza, S., Khorashad, J. S., Milojkovic, D., Perrotti, D., Gale, R. P., Foroni, L., and Apperley, J. F. (2019). Somatic variants in epigenetic modifiers can predict failure of response to imatinib but not to second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica*, *104*(12), 2400-2409.

Ochi, Y., Yoshida, K., Huang, Y. J., Kuo, M. C., Nannya, Y., Sasaki, K., Mitani, K., Hosoya, N., Hiramoto, N., Ishikawa, T., Branford, S., Shanmuganathan, N., Ohyashiki, K., Takahashi, N., Takaku, T., Tsuchiya, S., Kanemura, N., Nakamura, N., Ueda, Y., and Shih, L. Y. (2021). Clonal evolution and clinical implications of genetic abnormalities in blastic transformation of chronic myeloid leukaemia. *Nat Commun*, *12*(1), 2833.

Onodera, Y., Nam, J. M., Horikawa, M., Shirato, H., and Sabe, H. (2018). Arf6-driven cell invasion is intrinsically linked to TRAK1-mediated mitochondrial anterograde trafficking to avoid oxidative catastrophe. *Nat Commun*, *9*(1), 2682.

Patel, A. B., O'Hare, T., and Deininger, M. W. (2017). Mechanisms of Resistance to ABL Kinase Inhibition in Chronic Myeloid Leukemia and the Development of Next Generation ABL Kinase Inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am*, *31*(4), 589-612.

Saglio, G., Kim, D. W., Issaragrisil, S., le Coutre, P., Etienne, G., Lobo, C., Pasquini, R., Clark, R. E., Hochhaus, A., Hughes, T. P., Gallagher, N., Hoenekopp, A., Dong, M., Haque, A., Larson, R. A., Kantarjian, H. M., and Investigators, E. N. (2010). Nilotinib versus

imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 362(24), 2251-2259.

Saif, M. W., Oettle, H., Vervenne, W. L., Thomas, J. P., Spitzer, G., Visseren-Grul, C., Enas, N., and Richards, D. A. (2009). Randomized double-blind phase II trial comparing gemcitabine plus LY293111 versus gemcitabine plus placebo in advanced adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer J*, 15(4), 339-343.

Schonfeld, L., Rinke, J., Hinze, A., Nagel, S. N., Schafer, V., Schenk, T., Fabisch, C., Brummendorf, T. H., Burchert, A., le Coutre, P., Krause, S. W., Saussele, S., Safizadeh, F., Pfirrmann, M., Hochhaus, A., and Ernst, T. (2022). ASXL1 mutations predict inferior molecular response to nilotinib treatment in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 36(9), 2242-2249.

Stranahan, A. W., Berezniuk, I., Chakraborty, S., Feller, F., Khalaj, M., and Park, C. Y. (2022). Leukotrienes promote stem cell self-renewal and chemoresistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 36(6), 1575-1584.

Tager, A. M., and Luster, A. D. (2003). BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 69(2-3), 123-134.

Tanaka, M., Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Izumi, T., Yazawa, Y., Miyawaki, S., Mano, H., and Furukawa, Y. (2009). The cytotoxic effects of gemtuzumab ozogamicin (mylotarg) in combination with conventional antileukemic agents by isobologram analysis in vitro. *Anticancer Res*, 29(11), 4589-4596.

Tang, D., Hu, Y., and Gao, W. (2023). 5-lipoxygenase as a target to sensitize glioblastoma to temozolomide treatment via beta-catenin-dependent pathway. *Neurol Res*, 45(11), 1026-1034.

Tang, J., Zhang, C., Lin, J., Duan, P., Long, J., and Zhu, H. (2021). ALOX5-5-HETE promotes gastric cancer growth and alleviates

chemotherapy toxicity via MEK/ERK activation. *Cancer Med*, 10(15), 5246-5255.

Wan, M., Tang, X., Stsiapanava, A., and Haeggstrom, J. Z. (2017). Biosynthesis of leukotriene B(4). *Semin Immunol*, 33, 3-15.

Wang, D., and Dubois, R. N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer*, 10(3), 181-193.

Wu, W., Xu, N., Zhou, X., Liu, L., Tan, Y., Luo, J., Huang, J., Qin, J., Wang, J., Li, Z., Yin, C., Zhou, L., and Liu, X. (2020). Integrative Genomic Analysis Reveals Cancer-Associated Gene Mutations in Chronic Myeloid Leukemia Patients with Resistance or Intolerance to Tyrosine Kinase Inhibitor. *Onco Targets Ther*, 13, 8581-8591.

Yang, H., Kurtenbach, S., Guo, Y., Loh, J., Zhang, J., Ning, Y., and Abdel-Wahab, O. (2018). ASXL1-MT drives leukemogenesis through BAP1-dependent and independent mechanisms in vivo. *Blood*, 131(25), 2815–2826.

Zhang, W., McQueen, T., Schober, W., Rassidakis, G., Andreeff, M., and Konopleva, M. (2005). Leukotriene B4 receptor inhibitor LY293111 induces cell cycle arrest and apoptosis in human anaplastic large-cell lymphoma cells via JNK phosphorylation. *Leukemia*, 19(11), 1977-1984.