

審査の結果の要旨

氏名 浅田 修平

本研究は変異型 ASXL1 が白血病を促進する新たな分子メカニズムを解明するため、脱ユビキチン化酵素 BAP1 との関係性に注目し、生化学的解析、機能的解析および遺伝子発現解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. 変異型 ASXL1 タンパクは BAP1 の強制発現により強く安定化し、351 番目のリシン残基にモノユビキチン化が誘導されることが、ウエスタンブロット法、免疫沈降法にて示された。質量分析法にて、BAP1 存在下にて変異型 ASXL1 に誘導されるユビキチンリガーゼとして UBE2O を同定した。Crispr-Cas9 法による UBE2O のノックアウトにより、変異型 ASXL1 蛋白の安定化を認めたが、モノユビキチン化バンドの消失は認めなかった。一方で、UBE2O の強制発現は変異型 ASXL1 のポリユビキチン化を誘導した。
2. 変異型 ASXL1 の強制発現により、BAP1 は安定化されることをウエスタンブロット法により示した。また、BAP1 の核内への保持能を高めることを免疫染色法にて示した。また、変異型 ASXL1 は、野生型 ASXL1 と比較して BAP1 のヒストン H2AK119 への脱ユビキチン化活性をより強く高めることをウエスタンブロット法により示した。さらに、BAP1 の作用を強めるには ASXL1 のモノユビキチン化が重要であることを、非ユビキチン化模倣変異体と比較することで示した。
3. 変異型 ASXL1 は BAP1 と協調して、肥満細胞、マクロファージ、顆粒球および赤血球の分化を阻害し、一方で、単球系細胞への分化を促進することを細胞株 32Dcl3, TF-1 および c-Kit 陽性マウス骨髄細胞および CD34 陽性ヒト臍帯血細胞を用いた分化誘導実験およびフローサイトメトリーにて示した。
4. 変異型 ASXL1 および BAP1 はマウス骨髄造血前駆細胞のコロニー形成能を高めることを示した。また、マウス移植モデルにおいて、変異型 ASXL1 は RUNX1-ETO9a と協調して白血病を促進することを示した。変異型 ASXL1 による白血病促進能は BAP1 によってさらに増強されることを示した。さらに、RUNX1-ETO を導入したヒト臍帯血細胞においても、変異型 ASXL1 が導入された細胞は増殖優位性を獲得し、その効果は BAP1 によってさらに増強されることを示された。
5. マウス c-Kit 陽性骨髄造血前駆細胞を用いた RNA-seq による遺伝子発現解析により、コントロール群と比較して変異型 ASXL1 および BAP1 を導入した細胞にて Hoxa 遺伝子群および IRF8 の発現上昇を認め、これらの上昇が白血病促進能および単球系への分化促進に寄与している可能性が示唆された。同様の結果を RUNX1-ETO

を導入したヒト臍帯血細胞においても確認した。この発現上昇は、非ユビキチン化模倣変異体にて部分的に低減されることを示した。また、マウス骨髄造血前駆細胞でのクロマチン免疫沈降法・定量的 PCR 法にて、変異型 ASXL1 が *Hoxa* 遺伝子群および *IRF8* のプロモータ領域に直接結合し、H2AK119 のモノユビキチン化修飾をコントロールと比較して有意に減少させることを示した。

6. 変異型 ASXL1 を発現する 32Dcl3 に対し、Crispr-Cas9 法を用いて内在性の *Bap1* をノックアウトすることにより、変異型 ASXL1 の強制発現に起因する分化抑制能を解除することを示した。また、変異型 ASXL1 および変異型 SETBP1 を共発現するマウス白血病細胞において Crispr-Cas9 法にて内在性の *Bap1* をノックアウトすることにより、*Hoxa* 遺伝子群の発現が低下することを示し、その白血病原性を大きく抑制することをコロニーアッセイ法およびマウス移植モデルにて示した。
7. *Hoxa* 遺伝子群の発現に依存しているマウス MLL-AF9 白血病細胞においても、Crispr-Cas9 法にて内在性の *Bap1* をノックアウトすることにより、*Hoxa* 遺伝子群の発現が低下することを示し、その白血病原性を大きく低減することをコロニーアッセイ法およびマウス移植モデルにて示した。また、ヒト細胞株にて ASXL1 変異を有する細胞株 (Kasumi-1, MEG-01 および TS9:22) および MLL-AF9 白血病細胞株 (THP-1, Molm-13) において、Crispr-Cas9 法にて内在性の BAP1 をノックアウトすることにより、増殖能を有意に抑制することを示した。

以上、本論文は変異型 ASXL1 および BAP1 が相互に安定化に寄与し、協調して白血病を促進することを、生化学的解析およびマウス骨髄細胞、ヒト臍帯血細胞を用いた機能的解析にて明らかにした。また、内在性の BAP1 を阻害することが、ASXL1 変異を持つ白血病のみならず、*Hoxa* 遺伝子群の発現に依存した白血病に対しても有効である可能性を示唆した。本研究は変異型 ASXL1 の分子メカニズムの解明および骨髄性白血病に対する新規治療の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。