

氏名	NGUYEN THI THU THAO
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医工農博4甲 第75号
学位授与年月日	令和5年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	医学専攻
学位論文題名	Introduction of the T315I gatekeeper mutation of BCR/ABL1 into a Philadelphia chromosome - positive lymphoid leukemia cell line using the CRISPR/Cas9 system (CRISPR/Cas9 システムを利用したフィラデルフィア染色体陽性リンパ球性白血病細胞株の BCR/ABL1 に対する T315I ゲートキーパー変異の導入)
論文審査委員	委員長 教授 桐戸 敬太 委員 講師 三井 広 委員 講師 高野 勝弘

学位論文内容の要旨

Objective:

Imatinib and second-generation tyrosine kinase inhibitors (TKIs) have dramatically improved the prognosis of Philadelphia chromosome-positive (Ph+) acute lymphoblastic leukemia (ALL). However, overcoming TKI resistance due to the T315I gatekeeper mutation of *BCR/ABL1* is crucial for further improving the prognosis. The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 system is appropriate for establishing a human model of Ph+ ALL with the T315I mutation, because it can induce specific mutations via homologous recombination (HR) repair in cells with intact endogenous HR pathway. Here we used CRISPR/Cas9 to introduce the T315I mutation into the Ph+ lymphoid leukemia cell line KOPN55bi, which appeared to have an active HR pathway based on its resistance to a poly (ADP-Ribose) polymerase 1 inhibitor.

Method:

Single guide RNA targeting at codon 315 and single strand oligodeoxynucleotide containing ACT to ATT nucleotide transition at codon 315 were electroporated with recombinant Cas9 protein. Dasatinib-resistant sublines were obtained after one month selection with the therapeutic concentration of dasatinib, leading to T315I mutation acquisition through HR.

Result:

T315I-acquired sublines were highly resistant to imatinib and second-generation TKIs but moderately sensitive to the therapeutic concentration of ponatinib.

Conclusion:

This authentic human model is helpful for developing new therapeutic strategies overcoming TKI resistance in Ph⁺ ALL due to T315I mutation.

論文審査結果の要旨

1. 学位論文研究テーマの学術的意義

BCR::ABL-1 融合遺伝子は、慢性骨髄性白血病 (CML) や急性リンパ性白血病(ALL)を引き起こす代表的ながん遺伝子である。近年、分子標的薬が開発されその予後は劇的に改善しているが、ときにさらなる遺伝子変異の獲得により耐性をきたす例も存在し、臨床上の大きな課題となっている。本学位論文では、この BCR::ABL-1 の付加的な遺伝子変異獲得に注目し研究が進められている。特に、もっとも多くの分子標的薬に対し耐性を示す ABLT315I 変異を取り上げ、より生理的な条件での細胞生物学的なモデルの構築がテーマとされている。

変異型 BCR::ABL1 を有する細胞株の樹立として、従来ではウィルスの遺伝子発現コンポーネントを活用した plasmid により変異型遺伝子を細胞に導入する方法、あるいは薬剤存在下での長期間培養により、耐性株を選択するなどの方法がとられてきた。これに対して、本研究では CRISPR/Cas9 システムを活用し、直接的に ABLT315I 変異を導入する試みがなされている。申請者らは、慎重に導入に適する細胞株を選択することにより、ABLT315I 変異を導入した複数の細胞株を樹立している。また、これらの細胞株では他の要因による耐性獲得機序を認めないことも確認されている。導入された変異が生物学的に活性をもつことについては、シグナル伝達分子の活性化や、薬剤感受性試験を用いて確認されている。

2. 学位論文及び研究の争点, 問題点, 疑問点, 新しい視点等

本学位論文では、細胞へのがん遺伝子導入の方法として CRISPR/Cas9 システムを用いている点について、新規性が評価される。従来型の plasmid やウィルスベクターを用いた場合には、ゲノム内のどの領域に組み込まれるかがランダムであることや、ウィルス由来のプロモーターによりがん遺伝子が発現されるため、しばしば過剰発現をきたすこと、また非翻訳領域による制御から逸脱することなので課題が指摘されてきた。本研究は CRISPR/Cas9 システムを用いることにより、これらの課題を克服できることを示した意義があると判断される。また、効率的にこのシステムを活用できる細胞株の条件についても詳細に検討がなされており、今後このシステムを腫瘍細胞に導入するさいの基盤的な情報として活用することも期待できる。

一方、今回のモデルはあくまでも細胞株レベルであり、薬理学的な応用のためにはモデル動物の構築が必要ではないかとも議論される。また、ABLT315I 変異についてはすでに多くの解析がなされ、その耐性克服のための分子標的薬も登場しており、現段階でのこの領域への貢献は限定的ではないかと考えられる。

3.実験及びデータの信頼性

本研究は、細胞株を用いた解析であり、CRIPSR/Cas9 システムを用いた変異導入の過程およびその結果について明確に示されている。また、変異導入株については、AlmarBlue 方や細胞増殖曲線解析、またウェスタンブロット方によるシグナル伝達分子の活性化への影響が調べられているが、提示されているデータは明瞭でかつ統計的な処理もなされるなど信頼性は高いと判断された。

4. 学位論文の改善点

論文そのものは、すでに peer review journal(International Journal of Hematology)にも掲載されており、実験データの追加や加筆は必要ないと判断する。学位論文としては、今後の展開として、このシステムを用いてどのように研究を発展させるかについての展望についても言及するとより良いのではないかと判断された。