

氏 名	荻 本 祐 也
国 籍 ・ 本 籍	愛知県
学 位 の 種 別	博士（薬学）
学 位 の 番 号	甲397
学位授与の日付	令和8年3月17日
学位授与の要件	名城大学学位規程第3条第3項該当
学位論文題目	ヒトB細胞急性リンパ芽球性白血病細胞株を用いた <i>IKZF1</i> 遺伝子欠失のモデル化による IKAROS アイソフォームの機能解析
論文審査委員	主 査 柳 澤 聖 副 査 村 田 富 保 副 査 築 山 郁 人

論文内容の要旨

急性リンパ性白血病（Acute Lymphoblastic Leukemia：ALL）は小児期に発症する悪性腫瘍の中で最も多くみられるが、化学療法の改善や予後因子に基づく層別化リスク分類の進歩、支持療法や造血幹細胞移植の進歩などにより、現在では5年生存率が90%を超えている。しかしながら、患者の約15~20%に再発が認められ、再発後の転帰は不良であるため、依然としてALLは小児におけるがん関連死の主な原因となっている。また、強力な多剤併用化学療法や造血幹細胞移植を含む治療が選択されるケースでは、根治したとしても晩期合併症によってQOLを損なう事例も多い。従って、適切な治療強度の化学療法を行うための正確なリスク層別化法と、難治性ALLに対する新たな治療アプローチの開発が望まれている。

近年、ALLの再発や治療抵抗性に関連する予後因子として、正常造血に関わるリンパ系転写因子IKAROSタンパク質（IK1）を規定する*IKZF1*遺伝子異常が注目されており、小児ALLでは15%、成人では40~50%の頻度で検出されることや、難治性であるフィラデルフィア染色体（Ph染色体;*BCR::ABL1*融合遺伝子を生じる転座）陽性例では80%以上で検出されることが報告されている。また、*IKZF1*遺伝子異常の約90%は欠失によって引き起こされ、主にB細胞性ALLで発生する。*IKZF1*遺伝子異常には複数のサブタイプが存在することが確認されており、IKAROSの機能を阻害するドミナントネガティブ(dominant negative：DN)アイソフォームIK6の高発現を引き起こす片アレルのエクソン4-7欠失や、IKAROSタンパク発現量が不足するハプロ不全(haploinsufficiency：HI)を引き起こす片

アレルの null 変異、IKAROS タンパク質の完全な喪失を引き起こす両アレルの null 変異などがある。これらの *IKZF1* 遺伝子異常によって、機能的には DN 型、HI 型、Null 型の 3 つのサブタイプに分類される。しかし、これらの欠失タイプの違いによって予後に差があるのか、また白血病細胞の細胞特性に差異があるのかどうかは十分に検討されていない。そこで本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いて臨床でみられる *IKZF1* 遺伝子の欠失をモデル化した複数の細胞株を樹立し、IK1 および IK6 の発現変化が白血病細胞特性に与える影響や、関連する分子の発現および活性状態を検討することで、*IKZF1* 遺伝子欠失タイプによる白血病の特性制御機構の解明を目指した。

第 1 章では、前述の *IKZF1* 遺伝子欠失モデル細胞株を樹立するため、*IKZF1* 遺伝子エクソン 4-7 のヘテロ接合性欠失により IK6 を高発現する Ph 染色体陽性ヒト B 細胞 ALL 細胞株 SUP-B15 を対象に、野生型 *IKZF1* 遺伝子とエクソン 4-7 欠失を有する対立遺伝子の両方をターゲットとするガイド RNA を作成し、Cas9 タンパク質と複合させたりボ核タンパク質複合体をエレクトロポレーションにより導入した。その後、限界希釈によるシングルセルクローニングを行い、単一のコロニーを形成したウェルから細胞を回収し、培養して得られたクローンの IK1 及び IK6 の発現をウエスタンブロット(WB)により確認した。その結果、エクソン 4-7 欠失により IK6 を発現する対立遺伝子のみノックアウトされた *IK1+/IK6*-細胞株 (IK6 ノックアウト; HI 型)、野生型 *IKZF1* 遺伝子のみノックアウトされた *IK1-/IK6+*細胞株 (IK1 ノックアウト)、及び両対立遺伝子がノックアウトされた *IK1-/IK6*-細胞株 (IK1/IK6 ノックアウト; Null 型) を得ることができた。本過程において、両対立遺伝子ともノックアウトされていない *IK1+/IK6+*細胞株 (親株; DN 型) は得られなかったため、ガイド RNA を除いた同様の条件でエレクトロポレーションを行い、シングルセルクローニングを行うことで得られたクローンを *IK1+/IK6+*細胞株として今後の実験に使用した。これらの細胞株における IK1 と IK6 の細胞内局在を共焦点顕微鏡によって確認したところ、IK1 と IK6 が同時に発現する場合、及び IK6 のみ発現する場合では核内と細胞質に散在していることが確認された。一方で、IK1 のみ発現する場合には主に核内に局在することが確認された。また、細胞分画法によって核内と細胞質における IK1 及び IK6 の発現量を解析したところ、IK6 の発現と比較して IK1 は核内において優先的に発現していることや、*IK1+/IK6*-細胞株では IK1 の核内でのタンパク発現量が *IK1+/IK6+*細胞株よりも多いことが認められた。この結果より、*IK1+/IK6*-細胞株は IK6 ノックアウトにより、IKAROS の転写因子としての機能が一部回復していることが示唆された。次に IKAROS がリンパ球の分化・成熟に関わる転写因子であることから、樹立した細胞株における分化度を、フローサイトメトリー (FCM) による細胞表面抗原解析や qRT-PCR による B 細胞の分化・成熟に関連する遺伝子の発現解析によって評価した。その結果、他の細胞株と比較して *IK1+/IK6*-細胞株では、最も未分化の幹細胞で最も高く発現し、分化するに従って徐々に失われていくことが知られている CD34 抗原の陽性率が顕著に低下していることが確認された。また、B 細胞の分化段階の 1 つである Pre-B 細胞の後期段階以降において発現が低下することで知られる *IL7Ra* や *IGLL1*、*VPREB1* の mRNA 発現レベルが低下していることが確認された。これらの結果から、*IK1+/IK6*-細胞株は Pre-B 細胞の後期段階以降の分化段階へ移行した可能性が示唆された。

第 2 章では、分化の亢進が示唆された *IK1+/IK6*-細胞株において、樹立時より他の細胞株と比較して増殖能が亢進していることが確認されていたため、各細胞株における増殖能の比較及び増殖制御に関わる分子の発現解析を進めた。最初に、ヨウ化プロピジウム (PI) を用いた核染色による細胞周期解析を

FCM によって行ったところ、*IK1+/IK6*細胞株において G0/G1 期（静止期）の割合の減少と S 期（DNA 合成期）の割合の上昇が認められた。次に、細胞周期調節因子のタンパク発現量を WB によって確認したところ、*IK1+/IK6*細胞株において G1 期から S 期への移行に関わる CDKN1A (p21) および CDKN1B (p27) の発現低下と、p21 の発現制御を通じて細胞周期を調節することで知られる TP53 (p53) の発現低下が認められた。これらの細胞周期調節因子の制御に関わるタンパク質の発現について WB によって確認したところ、細胞増殖の誘導に関わる転写因子である STAT5 のタンパク発現量と、その活性化体であるリン酸化 STAT5 (Y694)の増加が認められた。一方で、細胞増殖の抑制に関わる転写因子である FOXO1 のタンパク発現量の低下が認められた。さらに、STAT5 と FOXO1 の mRNA 発現レベルを qRT-PCR によって測定したところ、同様の結果が得られた。また、STAT5 や FOXO1 は細胞生存に関わる転写因子としても知られているため、アポトーシス関連タンパク質の発現変化を WB にて解析したところ、*IK1+/IK6*細胞株ではアポトーシスの指標である Cleaved Caspase3 や Cleaved PARP の発現低下が認められ、アポトーシス抵抗性が亢進していることが示された。これらの結果から、*IK1+/IK6*細胞株における増殖・生存能の亢進には、STAT5 の発現上昇と FOXO1 の発現低下が関与することが示唆された。

以上より、本研究では CRISPR/Cas9 システムを用いて樹立した *IKZF1* 遺伝子欠失モデル細胞株の解析によって、IKAROS の機能が一部回復した *IK1+/IK6*細胞株において分化度や増殖能・生存能が亢進することが明らかとなった。また、本研究で使用した SUP-B15 細胞株は Ph 染色体陽性であることから、BCR-ABL1 の基質である STAT5 の発現上昇が増殖・生存能の亢進に大きく寄与することが推測された。今後、IKAROS による STAT5 の発現制御機構の検討や、STAT5 やその上流に位置するチロシンキナーゼの阻害による影響の評価を進めることで、難治性である Ph 染色体陽性 ALL における *IKZF1* 遺伝子異常のサブタイプと STAT5 の発現との関連性が明らかとなり、*IKZF1* 遺伝子異常のサブタイプに基づく再発リスクの層別化法や最適な治療の選択法の開発などの個別化医療の実現に対する重要な知見につながると考える。