

博士論文

Cytoprotective autophagy maintains leukemia-initiating
cells in murine myeloid leukemia

(細胞保護的オートファジーはマウス骨髄性白血病
幹細胞を維持する)

住友嘉樹

タイトル：

Cytoprotective autophagy maintains leukemia-initiating cells in murine myeloid leukemia

(細胞保護的オートファジーはマウス骨髄性白血病幹細胞を維持する)

所属：内科学専攻 血液・腫瘍病態学

指導教員：黒川峰夫 教授

住友嘉樹

目次

目次	2
要旨	3
序文	4
方法	12
結果	24
考察	64
参考文献	71
謝辞	85

要旨

急性骨髄性白血病の根治のためには、再発や治療抵抗性の原因となりうる白血病幹細胞の生物学的理解が不可欠である。細胞内分解経路の一つであるオートファジーは種々のがんや幹細胞との関連が指摘されていることから、マウスモデルを用いて急性骨髄性白血病におけるオートファジーの役割を解析した。その結果、オートファジーは骨髄において、白血病幹細胞の維持に必要であることが明らかとなった。加えて、末梢血においては細胞の分化段階にかかわらず白血病細胞の生存がオートファジーに依存していることが判明した。また、シタラビンによる治療効果をオートファジーの欠損が増強することが示された。

序文

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) は骨髄に存在する造血幹前駆細胞のゲノムに異常が生じることで、分化能を失った血球が腫瘍性に増殖し、正常な造血機能が失われる疾患である¹。AML においては染色体異常等により予後が分類される。inv(16)や t(8:21)といった染色体異常をもつ AML は標準的な化学療法に対する反応性がよく、一部の症例では抗がん剤による治療のみで長期の生存が期待できる。また、t(15:17)を持つ症例では、レチノイン酸や亜ヒ酸により腫瘍細胞の分化誘導が可能であり、予後良好群として位置づけられる。一方で、その他の AML は標準的な化学療法へ反応して寛解が得られたとしても高頻度に再発することが多く、根治のためには造血幹細胞移植が必要となる場合が多い。治療後の再発の原因として、leukemia-initiating cell (LIC) の存在が指摘されている。LIC は白血病細胞中に低頻度で存在する自己複製能を持った未分化性の高い細胞集団であり、細胞周期を静止期に維持しており化学療法への耐性を有している²。また、骨髄内でも未分化性の維持に適した骨髄ニッチと呼ばれる場所に位置しており、抗がん剤の送達性や骨髄ニッチ構成細胞との相互作用が薬剤耐性の維持に関与しているとも考えられている³。したがって、化学療法によって大多数の白血病細胞が除去されたとしても、一部残存した LIC によって白血病が再構築され、再発を引き起こすと考えられている。従って、LIC を駆

逐することが可能となれば、AML の治療後再発を抑制し、治療成績を向上させることができるかと期待される。AML の LIC を標的とした治療として、LIC に選択的に発現している表面抗原に対する抗体を用いた治療法が試されている。

CD33 抗体を用いた drug antibody conjugate である Gemtuzumab ozogamicin は AML に対する有効性を検証する臨床試験が行われ一部の地域では上市されているが⁴、安全域の狭さが指摘されており十分に臨床的ニーズを満たしているとはいえない。他にも CD44, CD47, CD123, CLL-1 等が LIC で選択的に発現している抗原であることが明らかになっており、それらの抗体の臨床応用にむけた研究が進められてきた⁵⁻⁸。また、異なるアプローチとして、AML の原因と考えられる遺伝子の機能を直接的に阻害することで、LIC も含めた白血病細胞を除去するという手法が試されている。正常核型 AML で高頻度に生じている FLT3-ITD および IDH1/2 変異等、低分子化合物による阻害が比較的容易な原因遺伝子については、それぞれ選択的阻害剤が創製され、臨床試験で有効性が検証されている段階にある^{9,10}。しかしながら、現在の医薬技術では阻害が困難な原因遺伝子を持つ AML も多数存在し、それらについては直接的な原因遺伝子以外を治療標的として LIC の除去を実現する必要がある。そのため、LIC の生物学的性質を理解し、正常造血幹細胞ではあまり重要ではないが LIC の機能に必須である細胞内経路を見出すことが重要であると考えられる。

マクロオートファジー（以下、オートファジー）は細胞内の分子や細胞小器官をリソソームへ輸送し分解する経路である^{11,12}。オートファジーは細胞内の過剰なミトコンドリアやタンパク質凝集体を分解することで細胞内の恒常性を維持していることが知られている^{13,14}。この機能により、オートファジーは神経細胞においてタンパク質分解を介して凝集体の形成を抑制することで神経変性疾患の発症を予防していることが判明している¹⁵。また、オートファジーは飢餓状態において、細胞内のタンパク質を分解することでアミノ酸を供給し、細胞の生存を支持している¹¹。生理的には、卵が受精してから着床するまでの期間や、出生直後の胎児における栄養供給がオートファジーによって担われていることが明らかとなっている^{16,17}。オートファジーによる基質の分解は、複雑な膜の形成と融合を介して行われる。細胞質に存在する分解基質は、細胞質に形成された隔離膜と呼ばれる膜構造によって包み込まれ、二重の膜を持つ小胞の中に位置する状態となる。隔離膜が基質を包み込むことで形成された二重膜構造を持つ小胞はオートファゴソームと呼ばれる。オートファゴソームはその後リソソームと融合し、オートファゴソームの内側の膜が分解されることで、オートファゴソーム内膜内に位置していた基質がリソソームの加水分解酵素と接触して分解され、アミノ酸等の分解産物は細胞質へ輸送される¹¹。オートファゴソームの特徴として microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) が膜上に共有結合している

点があげられる¹⁸。LC3 は細胞質に存在するタンパク質で、autophagy-related 5 (ATG5) や ATG7 等の一群のタンパク質がユビキチンにおける E1, E2, E3 のように機能して隔離膜の構成成分である phosphatidylethanolamine に LC3 を共有結合する¹⁹。LC3 の隔離膜への結合はオートファジーの進行に必須であり、LC3 の膜への結合がオートファジーの活性の指標として用いられている^{11,17,20}。

これまでの研究から、がんの発症や進展にオートファジーは多面的に関与していることが判明している^{21,22}。まず、各種のオートファジー関連遺伝子のノックアウトマウスによる解析から、オートファジーは正常組織においてがん抑制的に機能していることが明らかになってきた。オートファジーを促進するシグナル伝達に関係する *Becn1* のヘテロノックアウトマウスはさまざまな組織で腫瘍が発症することが示され、ヒトのがんでは BECN1 の発現が低下していることが示されている²³。BECN1 はエンドサイトーシス等のオートファジー以外にも重要なタンパク質であるため、オートファジーのがん抑制的な機能には一部疑問があったが、後に *Atg5* のモザイクノックアウトマウスや肝臓特異的 *Atg7* ノックアウトマウスを用いた結果から、オートファジーの抑制によって肝臓に良性の腫瘍が形成されることが明らかになっている²⁴。また、造血系においても、*Atg7* を造血細胞特異的にノックアウトしたマウスは造血幹細胞の消失とともに骨髓系腫瘍を発症することが示されている²⁵。これらの知見から、正常組織にお

けるオートファジー活性の低下は細胞内の恒常性維持機構を破綻させ、がんの発症を促進することが示唆されている。一方で、がん細胞は高い細胞分裂能を有しており、かつ一般的に腫瘍内は血管新生が滞っていることが多く、がん細胞はさまざまな栄養や酸素が不足した環境におかれていると推測される。オートファジーはそのような代謝的なストレス状態にあるがん細胞を保護する機能を担っているとも考えられている²⁶。実際に、膵臓がんにおいてはステージの進行とともにオートファジー関連遺伝子の発現が増加することが示されており、さらに、膵臓がん細胞株は培養条件下においてもオートファジーの活性が高く、オートファジー阻害に対する感受性が高いことが明らかになっている²⁷。造血器腫瘍においても、慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia: CML) モデルマウスにおいてオートファジーに必須な遺伝子である *Atg3* を欠損することにより造腫瘍能が失われることが判明している²⁸。以上のことから一般に、成立したがんに対しては、オートファジーは細胞を保護する役割を担っていると考えられる。しかし、すべてのモデルでオートファジーががん細胞保護的に機能しているわけではないことが近年になって判明してきた。例えば、*Tp53* 欠損および活性化型 *Kras* 変異を持つマウス膵臓がんモデルにおいては *Atg5* あるいは *Atg7* の欠損は腫瘍の進展を促進することが示されている²⁹。また、変異型 EGFR により BECN1 の機能が抑制され、オートファジーの機能が抑制されることが肺がんの

増殖を促進することが、ヒト肺がん細胞株を用いた研究により明らかとなった³⁰。以上のことから、オートファジーのがんにおける役割は一様でなく、がんの発症、進展における時期およびドライバー変異の性質等によるがん細胞および腫瘍環境の状態によって異なっていることが示唆されている。

がん細胞は、さまざまな治療によってストレスにさらされるが、その際にオートファジーが果たす役割についても研究がなされている。特定の条件において生じる細胞死の際に、細胞内のオートファジーがきわめて高い活性を示すことが知られていた。その時、オートファジー関連遺伝子の機能を阻害すると細胞死が生じなくなることが示されており、オートファジーはプログラム細胞死の一つの機序として認識されている^{31,32}。このオートファジーによる細胞死は **autophagic cell death** と呼ばれる。しかしながら、オートファジーは細胞死の機序の一つではあるものの、一般に、抗がん剤によって誘導される細胞死はオートファジーに依存しておらず、むしろオートファジーは治療によって生じる細胞内の各種ストレスを緩和することで、アポトーシスを抑制していると考えられている。実際に、各種の抗がん剤や放射線照射にオートファジー阻害剤を併用することにより、抗がん剤や放射線照射によるアポトーシス誘導効果を増強し、治療効果を高めることができることが造血器腫瘍を含む各種のがん細胞株を用いた研究により示されている^{22,33,34}。

以上に示した通り、オートファジーの阻害によって、ある種の条件を満たすがんににおいては、がんの進展を抑制し、また抗がん剤や放射線照射による治療効果を高めることが期待される。そのため、リソソーム内 pH を上昇させることでオートファジーによる基質の分解を阻害する薬剤である chloroquine (CQ) およびその誘導体の、各種固形がんや CML の既存治療との併用効果を検証するための臨床試験が実施されている³⁵。しかしながら、前臨床のマウスモデルにおいてオートファジー阻害による効果は時としてがん促進的であり、オートファジー阻害に治療効果があるかどうかを予測可能な腫瘍の特徴は一般的には明らかになっていない。そのため、ドライバー変異や腫瘍環境といった観点で臨床予測性の高いがんモデルを用いて、各種腫瘍においてオートファジー阻害の効果を検証することがオートファジー阻害の臨床的に有用性があるという可能性を見極めるために重要であると考えられる。

AML におけるオートファジーの役割は、抗がん剤暴露時の耐性の観点から研究されてきた。mTOR 経路はオートファジーの活性を抑制するシグナル伝達経路であるが、mTOR1/2 阻害剤への投与によって活性化したオートファジーが、mTOR1/2 阻害による細胞死誘導効果を抑制しており、mTOR1/2 阻害剤とオートファジー阻害剤の併用により薬効が増強されることが、AML 細胞株および AML 患者由来細胞を用いた研究によって示されている³⁶。また、AML で高頻度にみ

られる融合遺伝子である AML1-ETO を有する細胞株において、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤がオートファジーを活性化し、HDAC 阻害剤と CQ とを併用することで薬効が増強されることが示されている³⁷。さらに、AraC 処理によりオートファジーが活性化し、AraC によるアポトーシス誘導がオートファジー阻害剤によって増強されることが AML 細胞株を用いて示されている³⁸⁻⁴⁰。これらのことから、培養系においては、オートファジーは AML において各種の抗がん剤への耐性を促進していることが示されている。しかしながら、オートファジーの活性および機能は細胞周辺の物理的あるいは生物学的な環境に強く依存すると考えられており、実際の AML 患者の生体内でも培養条件下と同様にオートファジーが抗がん剤への耐性を促進しているかどうかは詳細に検討されていない。加えて、AML の治療においては、再発の原因となる LIC を除去することが極めて重要であるが、細胞株を用いた研究では LIC におけるオートファジーの役割を解明することはできず、白血病進展時の LIC の維持や抗がん剤暴露時におけるオートファジーの役割は明らかになっていない。

本研究では、*in vivo* の AML の病態、特に LIC の維持および薬剤耐性にオートファジーが与える影響を解析するため、MLL-ENL あるいは BCR-ABL/NUP98-HOXA9 誘導性のマウス白血病モデルを用いた解析を実施した。

方法

マウスの飼育、交配

Atg5 遺伝子の第三エクソン両端に loxP サイトが挿入された *Atg5^{lox/lox}* マウス¹⁵、*Atg7* 遺伝子の exon13 と exon14 との間のイントロンに loxP サイトが挿入された *Atg7^{lox/lox}* マウス²⁰ および LC3 と GFP の融合タンパク質を CAG プロモーター制御によりほぼ全身の臓器で発現する *GFP-LC3* マウス⁴¹ は RIKEN BRC（日本、筑波）より入手した。ubiquitin C プロモーター制御により *Cre-ER^{T2}* を発現する *Cre-ER^{T2}* マウス⁴² は JAX（Bar Harbor, USA）より入手した。*Atg5^{lox/lox}* あるいは *Atg7^{lox/lox}* マウスを *Cre-ER^{T2}* マウスと交配し、得られた *Atg5^{lox/wt}:Cre-ER^{T2}* マウスおよび *Atg7^{lox/wt}:Cre-ER^{T2}* マウスをそれぞれ *Atg5^{lox/lox}* マウスあるいは *Atg7^{lox/lox}* マウスと交配することで、*Atg5^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* マウスおよび *Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* マウスを得た。ジェノタイピングは表 1 に示したプライマーを用いて実施した。野生型の C57BL/6J（8 - 12 週齢）および CD45.1 を発現する C57BL/6-Ly5.1 マウス（8-12 週齢）は三協ラボサービス（日本、東京）より購入した。これらのマウスは東京大学疾患生命工学センターのガイドラインに従い飼育され、すべての動物実験は、東京大学の動物実験委員会により承認された手法により実施された。

白血病モデルマウス作製

白血病モデルマウスは先行研究で用いられている手法を参考に作製した^{43,44}。具体的には、レトロウイルスベクターである MSCV-MLL-ENL-IRES-GFP、MSCV-MLL-ENL-IRES-Puro⁴³、pGCDNsam-BCR-ABL1-IRES-GFP および pGCDNsam-NUP98-HOXA9-IRES-KusabiraOrange を Plat-E 細胞⁴⁵ へ polyethylenimine⁴⁶ を用いてトランスフェクションし、16 時間後に培地を交換した。24 時間後の培養上清を 0.45 μ m のフィルターでろ過することでウイルス上清を得た。野生型マウス、*Cre-ER^{T2}* マウス、*GFP-LC3* マウス、*Atg7^{flox/flox}* マウス、*Atg5^{flox/wt}:Cre-ER^{T2}* マウス および *Atg7^{flox/wt}:Cre-ER^{T2}* マウスの骨髄より単核球を回収し、anti-CD117 (c-Kit) および AutoMacs (Miltenyi) を用いて c-Kit 陽性細胞をソートし、20% fetal bovine serum、1% penicillin streptomycin, 50 ng/mL recombinant human Interleukin (IL) -6, 50 ng/mL recombinant human TPO, 100 ng/mL mouse SCF および 20 ng/mL mouse Flt3L を含む MEM α (ナカライテスク: 日本、東京) に懸濁し、37°C 5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。レトロネクチン (タカラバイオ: 日本、大津) を添加し一晩静置した 6 ウェル浮遊培養用プレートに 2% bovine serum albumin を含む PBS で処理した後、ウイルス上清を加えて 2,000G で 2 時間遠心した。ウイルス上清を除去し、PBS で洗浄後、c-Kit 陽性骨髄細胞をプレートに加えて 48 時間培養した。培養後の細胞はフローサイトメーターにより遺伝子導入効率を確認し

た。MSCV-MLL-ENL-IRES-GFP の導入効率は 5-15%程度、pGCDNsam-BCR-ABL1-IRES-GFP の導入効率は 15-30%程度、pGCDNsam-NUP98-HOXA9-IRES-KusabiraOrange の導入効率は 5%程度であった。得られた細胞を致死量放射線照射 (9.5 Gy) した雌 C56BL/6 マウスへ尾静脈より移植した。白血病を発症したマウスは安楽死後に骨髄あるいは脾臓より単核球を回収し、凍結保存した。また、凍結保存した白血病細胞 5×10^4 を 5.25 Gy の放射線を照射した C57BL/6 へ移植することで、白血病二次移植マウスを作製した。

マウスジェノタイピング

尾の先端あるいは骨髄単核球からゲノム DNA を抽出し、polymerase chain reaction (PCR)によりジェノタイプを確認した。PCRは合計 10 μ L の反応系で実施し、鋳型としておよそ 10 ng のゲノム DNA を用い、表 1 に示すプライマーを終濃度 0.3 μ M で使用した。Atg5 の野生型アレルと flox アレルの区別には exon3-1, check2 および short2 のプライマーセットを用いた。Atg5 の flox アレルと deleted アレルの区別には 5L2, check2 および short2 のプライマーセットを用いた。Atg7 の野生型アレルと flox アレルの区別には Hind_Fw と Pst_Rv のプライマーセットを用いた。Atg7 の flox アレルと deleted アレルの区別には Hind_Fw と Atg7_Rv2 のプライマーセットを用いた。polymerase として KOD Fx neo (TOYOBO)

を用い、94°C 2 分間の加熱処理の後、98°C 10 秒間、55 °C 30 秒間、68 °C 2 分間の処理を 30 回繰り返すことで DNA の増幅を行った。得られた PCR 産物は 1% アガロースゲルで泳動した後、エチジウムブロマイドにより染色し、トランスイルミネーターにより蛍光を検出した。

表 1、マウスジェノタイピング用プライマー

Target	Name	Sequence
Atg5	exon3-1	5'-GAATATGAAGGCACACCCCTGAAATG-3'
	check 2	5'-ACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGG-3'
	short 2	5'-GTACTGCATAATGGTTTAACTCTTGC-3'
	5L2	5'-CAGGGAATGGTGTCTCCCAC-3'
Atg7	Hind-Fw	5'-TGGCTGCTACTTCTGCAATGATGT-3'
	Pst-Rv	5'-CAGGACAGAGACCATCAGCTCCAC-3'
	Atg7_Rv2	5'-TTAGCACAGGGAACAGCGCTCATGG-3'
GFP-LC3	GFP (LC3)	5'-TCCTGCTGGAGTTCGTGACCG-3'
	LC3*rc3	5'-TTGCGAATTCTCAGCCGTCTTCATCTCTCTCGC-3'
CRE-ER ^{T2}	oIMR1084	5'-GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC -3'
	oIMR1085	5'-GTGAAACAGCATTGCTGTCACCTT-3'

マウスジェノタイピングに用いたプライマーの名称および DNA 配列を表 1 に記す。

薬剤投与

in vivo での *Atg5* あるいは *Atg7* の欠損のため、peanut oil (Sigma, St. Louis, USA) に溶解した tamoxifen (TAM, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) 1 mg/head を 1 日 1 回、5 日間、マウス腹腔内へ投与した。白血病マウスモデルにおいては、移植後 7 日目から 11 日目に投与した。AraC (東京化学工業：日本、東京) は PBS に溶解し、1 mg/head で 1 日 1 回、マウス腹腔内へ投与した。

マウス白血病細胞の取得

マウス骨髄細胞は以下の方法で取得した。マウスを安楽死後、脛骨、大腿骨および腸骨から骨髄を取り出し、セルストレイナーにより細胞を分離した。得られた細胞は 3.5 mL の PBS に懸濁し、15 mL 遠心管に入れた 3.5 mL の Histopaque-1083 (Sigma) 上に重層した。1,800 rpm、20 分間の遠心後、単核球を含む層を回収し各種の実験に使用した。骨髄に含まれる細胞数は両足の脛骨、大腿骨および腸骨由来の骨髄を、単核球分離後に血球計算盤により測定することで計測した。マウス末梢血は、安楽死後に心採血することで得た。得られた末梢血は、PBS で希釈し、骨髄細胞と同様に Histopaque-1083 上に重層して遠心して、単核球を得た。赤血球が多く含まれる場合は、塩化アンモニウムを含む溶液に 5 分間懸濁することで、赤血球を溶血して除去した。骨髄由来細胞との比較を実施する場合には、

骨髓由来細胞にも同様の処理を行った。

フローサイトメトリー

分離した単核球は、3% FCS/PBS で希釈した抗体で染色した。用いた抗体のリストを表 2 に示す。細胞は染色後、3% FCS/PBS で洗浄し解析した。アポトーシス解析は、染色後の細胞を annexin-V-APC (BioLegend, San Diego, USA) および DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と反応させて実施した。ミトコンドリア活性は MitoTrackerOrange CMTMRos (Life Technologies, Waltham, USA) により、活性酸素種は CellRox DeepRed (Life Technologies) により定量した。表面抗原を染色した 2×10^5 の細胞を洗浄後、1/2000 倍希釈した MitoTracker あるいは 1/500 倍希釈した CellRox を含む $1 \times \text{HBSS}$ に懸濁し、 37°C で 15 分静置した。染色後の細胞は、LSRII (BD Biosciences, San Jose, USA) により解析し、BD FACSAria (BD Biosciences) を用いて分取した。データ解析は FlowJo software (TreeStar, Ashland, USA) により行った。

表 1、フローサイトメトリー用抗体

Epitope	Clone	Fluorophore	Dilution	Supplier
Gr-1	RB6-8C5	Biotin	1:200	BioLegend
		Biotin	1:200	BioLegend
CD11b	M1/70	APC	1:200	BioLegend
		PE	1:200	BD Biosciences
B220	RA3-6B2	Biotin	1:200	BioLegend
TER-119	TER-119	Biotin	1:200	BioLegend
CD3ε	145-2C11	Biotin	1:200	BioLegend
CD4	GK1.5	Biotin	1:200	BioLegend
CD8a	53-6.7	Biotin	1:200	BioLegend
CD127	A7R34	Biotin	1:200	BioLegend
Sca-1	E13-161.7	PerCP-Cy5.5	1:200	BioLegend
		APC	1:200	BioLegend
c-kit	2B8	PE-Cy7	1:200	BD Biosciences
CD45.1	A20	PerCP-Cy5.5	1:200	TONBO biosciences
CD45.2	104	PE	1:200	BioLegend
CD16/32	93	PE	1:200	BioLegend

CD34	RAM34	Alexa Fluor647	1:25	BD Biosciences
		APC-Cy7	1:200	BioLegend
streptavidin		PerCP-Cy5.5	1:200	BioLegend

フローサイトメトリーに用いた抗体のクローン名および標識色素、希釈、メーカー名を記す

コロニー形成アッセイ

白血病マウスより GFP 陽性細胞を分取し、1% penicillin streptomycin を含む 1.2 mL の Methocult GF M3434 (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) に $1-3 \times 10^3$ cells となるよう懸濁し、35 mm ディッシュに播種した。5 から 7 日後に形成されたコロニー数を計測した。

Limiting dilution 解析

vehicle あるいは TAM 投与された白血病細胞マウスから GFP 陽性細胞を分取し、3, 30, 300 および 3000 細胞を 5.25 Gy の放射線照射された C57BL/6 マウスへ移植した。ホーミング能の解析として、移植 16 時間後の骨髄単核球を回収し、GFP のキメラ率を測定した。

SDS-PAGE, ウェスタンブロット

細胞を $1 \times$ Laemmli Sample Buffer へ溶解し、100 °C で 5 分間加熱することでサンプルを調整した。5 から 15 μ g のタンパク質をゲルへロードし、20 mA で 60 分間泳動した。LC3A 用として 15% アクリルアミドゲルを、その他のタンパク質用として 10% アクリルアミドゲルを使用した。泳動後のゲルは 125 mA、120 分間通電して PVDF 膜へ転写した。5% skim milk を含む TBS-T によりブロッキング

グを 30 分間行った後、5% skim milk/TBS-T で希釈した一次抗体と 4 °C で一晚反応させた。一次抗体として、ATG5 (rabbit, 1:1000, #8540) , ATG7 (rabbit, 1:1000, #8558) , LC3A (rabbit, 1:1000, #4599) , および β -actin (rabbit, 1:2000, #4967) を用いた。TBS-T により 5 分間 3 回の洗浄を行った後、5% skim milk/TBS-T で希釈した二次抗体と室温で 45 分間反応させた。二次抗体として、HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:2000, #7074) を用いた。抗体はすべて Cell Signaling (Danvers, USA) より購入した。二次抗体との反応後、TBS-T により 5 分間 3 回の洗浄を行った後、化学発光試薬と反応させ、化学発光を LAS3000 (GE : Buckinghamshire, England) により検出した。化学発光試薬として、Immunostar Zeta あるいは Immunostar LD (和光 : 日本、大阪) を用いた。

ライト・ギムザ染色

白血病マウス由来骨髄細胞をスライドガラス状に塗布し、ライト液により 1 分間染色した。スライドガラスをリン酸バッファーで洗浄後、ギムザ液により 10 分間染色した。水によりスライドガラスを洗浄し、細胞の形態を顕微鏡で観察した。

電子顕微鏡

MLL-ENL 白血病マウスの骨髄および末梢血から分取した c-Kit⁺CD11b⁺細胞を 2% paraformaldehyde および 2% glutaraldehyde を含む 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) に懸濁し、4 °C で 10 分間静置することで固定した。標本の作製と画像の撮影は東海電子顕微鏡解析 (日本、名古屋) にて実施された。

統計解析

箱ひげ図においては、箱の下辺および上辺はそれぞれデータの第 1 四分位数および第 3 四分位数を示し、箱の中央線は中央値を示す。ひげは中央値より四分位間 1.5 倍の範囲に存在するデータの最大値あるいは最小値を示す。また、点は個別のデータを示す。2 群間の有意差は別途記載のない限り、unpaired two-tailed Student's t-test により検定した。LIC の頻度は Poisson distribution により評価した。生存曲線の検定には log-rank test を用いた。P 値が 0.05 未満の場合に有意であると判定した。データ解析は R (<http://www.R-project.org>) を用いて実施した。

結果

オートファジー欠損によりマウス MLL-ENL 白血病の進行が遅れる

AML の進展におけるオートファジーの重要性を明らかにするため、*Atg5* あるいは *Atg7* を白血病細胞において誘導性に欠損可能なマウス MLL-ENL モデルを以下の方法で作製した。まず、*Atg5^{lox/lox}* マウスあるいは *Atg7^{lox/lox}* マウスを *Cre-ER^{T2}* マウスと交配して作製した *Atg5^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* あるいは *Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* のジェノタイプを持つマウスからそれぞれ骨髄細胞を分取し、レトロウイルスベクターにより MLL-ENL-GFP を導入し、致死量放射線照射をうけた野生型マウスへ移植した。MLL-ENL-GFP 陽性の細胞を移植されたマウスは 2 から 3 週間で骨髄性白血病を発症し、白血病マウスの骨髄および脾臓から得られた細胞を別の野生型マウスへ二次移植した場合、移植を受けたマウスは一次移植と類似した性質をもつ白血病を発症した。*Atg5^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* あるいは *Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* のジェノタイプを持つ MLL-ENL 白血病細胞を二次移植マウスへ移植することで白血病を発症させたマウスを、それぞれ以下、*Atg5^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスあるいは *Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスと呼ぶ。*Atg5^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスあるいは *Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスに tamoxifen (TAM) を投与することで、マウス骨髄中に存在する白血病細胞内において、loxP 配列に挟まれたゲノム上の領域が高効率に除去されることが genomic PCR により確認された

(図 1-A-C)。さらに、TAM の投与により *Atg5^{flx/flx}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスにおいては ATG5 の、*Atg7^{flx/flx}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスにおいては ATG7 のタンパク質発現が減少することがウェスタンブロットにより確認された(図 1-D)。以下、TAM の投与により白血病細胞において ATG5 あるいは ATG7 の発現が低下しているマウスをそれぞれ *Atg5^{Δ/Δ}* 白血病マウスあるいは *Atg7^{Δ/Δ}* 白血病マウスと記載する。LC3A は隔離膜の形成の際に ATG5 や ATG7 の働きにより膜上の phosphatidylethanolamine に共有結合するタンパク質であり、非膜結合型 LC3A (LC3A-I) と膜結合型 LC3A (LC3A-II) では SDS-PAGE 上で移動度が異なることが知られている。ウェスタンブロットによって検出された LC3A-II シグナル強度はオートファジー活性の指標として広く用いられている¹¹。TAM 投与により、*Atg5^{flx/flx}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスおよび *Atg7^{flx/flx}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスいずれにおいても、LC3A-II の量が顕著に低下しており、TAM による ATG5 あるいは ATG7 の発現低下の結果、オートファジー活性が抑制されていることが確認された(図 1-D)。次に、オートファジー活性の抑制が白血病マウスの生存に与える影響を調べたところ、*Atg5^{flx/flx}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスおよび *Atg7^{flx/flx}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスは TAM 投与によって生存が有意に延長することが明らかとなった (*Atg5^{Δ/Δ}*: median = 29 days vs. *Atg5^{flx/flx}*: median = 25 days; *Atg7^{Δ/Δ}*: median = 23 days vs. *Atg7^{flx/flx}*: median = 20 days) (図 1-E,F)。同時に、TAM 投与によっ

て *Atg7^{flx/flx}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスの骨髄の細胞数が減少していることが明らかとなった (図 1-G)。この時、骨髄における GFP 陽性の白血病細胞のキメラ率や脾臓重量については有意な差は検出できなかった (図 1-H,I)。

以上から、TAM 投与によってオートファジーの活性を白血病細胞中で抑制することが可能なマウスモデルを作製し、MLL-ENL 白血病マウスモデルにおいてオートファジー活性を抑制すると、白血病の進行が抑制されることが明らかとなった。

図 1

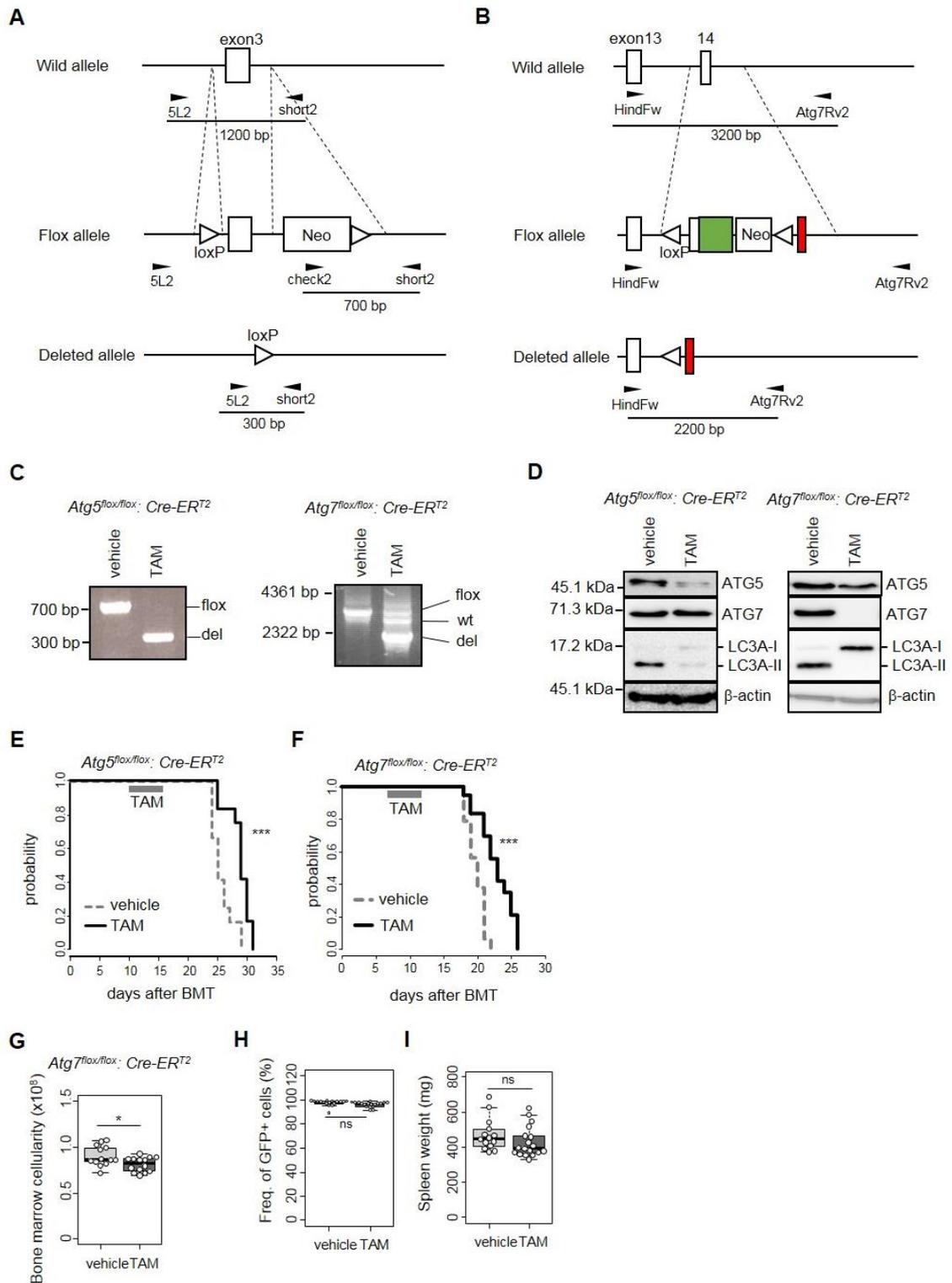


図 1 オートファジー欠損によりマウス MLL-ENL 白血病の進行が遅れる
 (A) *Atg5* のターゲティングおよびジェノタイピングの模式図。黒矢尻はプライマーの位置を示す。(B) *Atg7* のターゲティングおよびジェノタイピングの模

式図。黒矢尻はプライマーの位置を、緑の四角は *Atg7* cDNA のうち 1786-2097 番目のアミノ酸に相当する配列を、赤の四角は *Atg7* cDNA のうち 1669-1698 番目のアミノ酸に相当する配列に終止コドンが付加したものをそれぞれ示す。

(C) TAM 投与 7 日後の *Atg5^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスおよび *Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスより骨髄単核球を回収し、ゲノム PCR により各遺伝子の loxP 配列で挟まれた領域が欠失していることを確認した。(D) TAM 投与 7 日後の *Atg5^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスおよび *Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスより骨髄単核球を回収し、ウェスタンブロットにより ATG5, ATG7, LC3A の発現を解析した。β-actin はローディングコントロールとして用いた。(E) *Atg5^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスの生存曲線 (各群 n = 12)。p 値は log-rank test により計算した。(F) *Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスの生存曲線 (各群 = 15)。p 値は log-rank test により計算した。(G) TAM 投与 7 日後の *Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスの骨髄の細胞数を計測した (各群 n = 13)。箱ひげ図においては、箱の下辺および上辺はそれぞれデータの第 1 四分位数および第 3 四分位数を示し、ひげは中央値より四分位間 1.5 倍の範囲に存在するデータの最大値あるいは最小値を示す。また、点は個別のデータを示す。(H) TAM 投与 7 日後の *Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスの骨髄単核球における GFP 陽性率をフローサイトメーターで定量した (vehicle 群 n = 13, TAM 群 n = 18)。(I) TAM 投与 7 日後の *Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスの脾臓重量 (vehicle 群 n = 14, TAM 群 n = 18)。*P < 0.05, ***P < 0.001, ns: not significant。ウェスタンブロットを除くすべてのデータは、一回当たり 1 から 4 匹のマウスを用い、独立した 3 回以上の実験の結果を示している。

Atg7 の欠失は細胞死を伴って leukemia-initiating cells (LIC) を減少させる

より詳細に MLL-ENL 白血病マウスにおけるオートファジーの役割を調べるために、白血病モデルマウスにおける LIC の頻度を測定した。MLL-ENL マウスモデルにおいては、LIC は lineage⁻c-Kit⁺Sca1⁻CD34⁺CD16/32⁺ (L-GMP 分画) および lineage⁻c-Kit⁺ (LK 分画) に濃縮していることが明らかとなっている^{47,48}。

Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2} 白血病マウスより骨髓単核球を取得しフローサイトメトリーにより解析したところ、vehicle 群と比較して TAM 群では LK および L-GMP の頻度が有意に減少していた (図 2-A-C)。また、*Atg5^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスに TAM を投与した場合でも同様に LK および L-GMP 分画の頻度が減少する結果が得られた (図 2-D, E)。以上から、MLL-ENL 白血病マウスモデルにおいて LIC の維持にオートファジーの活性が必要であることが示唆された。*Atg5^{Δ/Δ}* MLL-ENL マウスと *Atg7^{Δ/Δ}* MLL-ENL マウスの生存および LIC の維持に関する表現型が同様であったことから、以後の解析は一部を除き *Atg7^{Δ/Δ}* MLL-ENL マウスに絞って実施した。

正常造血幹細胞においてオートファジーは、ミトコンドリアを分解することでミトコンドリア量を低く維持し、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の産生を抑制することで、幹細胞性を維持していることが示されている^{25,49}。MLL-ENL 白血病の LIC でも同様にオートファジーがミトコンドリア分解と ROS の

産生抑制に関与するかどうかを検討した。*Atg7^{flox/flox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスに TAM を投与した後、LIC におけるミトコンドリア活性を MitoTracker Orange に より定量したところ、LK 分画において vehicle 群と比較してミトコンドリア活 性が高い細胞集団の頻度が増加していた (図 2-F, G)。一方、同一のマウス骨髄 内において、lineage⁺で定義される比較的分化した細胞群においては、*Atg7* の欠 損はミトコンドリア活性には影響を及ぼさないことが判明した (図 2-F, G)。ROS の産生についても同様に、CellRox DeepRed により *Atg7^{flox/flox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マ ウス骨髄における ROS 産生を定量したところ、LK 分画においてのみ TAM 投与 によって ROS を多く産生している細胞集団の頻度が増加していたが、lineage⁺分 画においては TAM 投与による ROS 産生増加は検出できなかった (図 2-H, I)。 以上のことから、オートファジーは MLL-ENL 白血病マウスにおいて、LIC にお いてミトコンドリア分解および ROS 産生の抑制を行っていることが明らかとな った。

次に、オートファジー活性の低下が MLL-ENL 白血病マウスの LIC の生存お よび細胞周期に与える影響を検証した。*Atg7^{flox/flox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスの骨髄 単核球を annexin-V および DAPI により染色してアポトーシスの状態を解析した ところ、TAM を投与されたマウスの LK 分画において、annexin-V⁺DAPI⁺で示さ れる細胞死を起こしている細胞の頻度が、vehicle 群と比較して増加しているこ

とが示された (図 2-J, K)。この時、lineage+分画では細胞死の増加は確認されなかった (図 2-J, K)。Atg5^{Δ/Δ} MLL-ENL マウスでも同様に、vehicle 群と比較して LK 分画のみで細胞死が増加していることが判明した (図 2-J, L)。

以上のことから、オートファジーは MLL-ENL 白血病マウスの LIC において、ミトコンドリア活性の抑制および ROS 産生抑制に必要であることが明らかとなった。加えて、LIC の生存を保護することで LIC の頻度を維持していることが示された。

図2

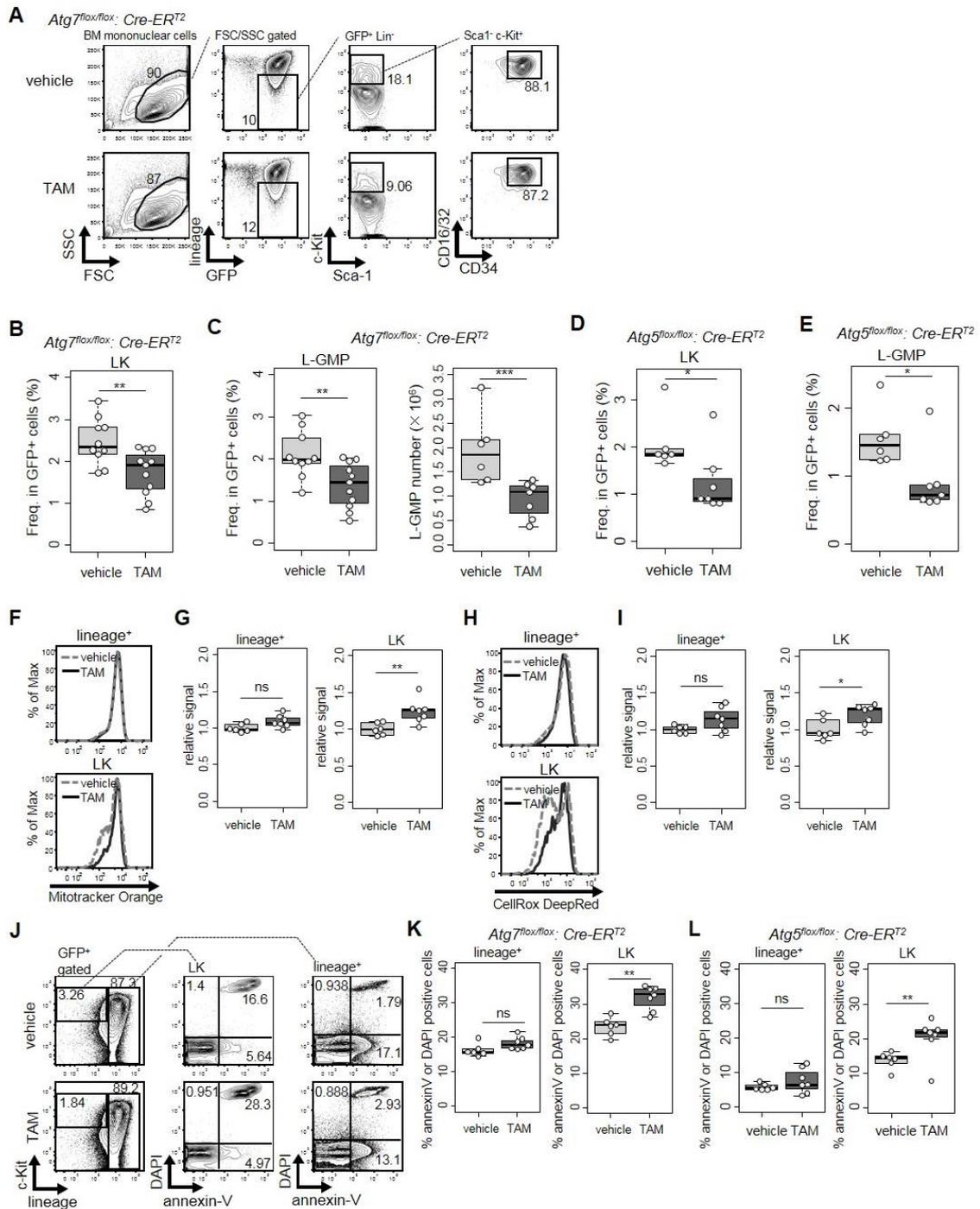


図2 *Atg7* の欠失は細胞死を伴って leukemia-initiating cells (LIC) を減少させる
 (A) vehicle あるいは TAM の投与 7 日後における *Atg7^{lox/lox}* ML-ENL 白血病マウス骨髄中の L-GMP (GFP⁺Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺CD34⁺CD16/32⁺) および LK (GFP⁺Lin⁻c-Kit⁺) のフローサイトメトリー解析の典型例。(B) *Atg7^{lox/lox}* ML-ENL 白血病マウス骨髄中における LK 分画の頻度の定量値をプロットした。vehicle 群, n = 10; TAM 群, n = 11。(C) *Atg7^{lox/lox}* ML-ENL 白血病マウス骨髄中における L-GMP の

頻度 (vehicle 群, n = 10; TAM 群, n = 11) および両足骨髄に含まれる L-GMP の数 (vehicle 群, n = 6; TAM 群, n = 7) をプロットした。(D, E) *Atg5^{flox/flox}* ML-ENL 白血病マウス骨髄中における LK 分画 (D) および L-GMP 分画 (E) の頻度の定量値をプロットした。vehicle 群, n = 6 : TAM 群, n = 7。(F) vehicle あるいは TAM の投与 7 日後の *Atg7^{flox/flox}* ML-ENL 白血病マウス骨髄中 LK 分画および lineage⁺ 分画での Mitotracker Orange 染色の典型例。(G) *Atg7^{flox/flox}* ML-ENL 白血病マウスの骨髄中 LK 分画および lineage⁺ 分画における Mitotracker Orange シグナル値をプロットした。シグナル値として、それぞれのサンプルの geometrical mean fluorescence intensity (MFI) を vehicle 群の MFI の平均値で割った値を用いた。vehicle 群, n = 6 : TAM 群, n = 7。(H) vehicle あるいは TAM の投与 7 日後の *Atg7^{flox/flox}* ML-ENL 白血病マウス骨髄中 LK 分画および lineage⁺ 分画での CellRox DeepRed 染色の典型例。(I) *Atg7^{flox/flox}* ML-ENL 白血病マウスの骨髄中 LK 分画および lineage⁺ 分画における CellRox DeepRed シグナル値をプロットした。シグナル値として、それぞれのサンプルの MFI を vehicle 群の MFI の平均値で割った値を用いた。vehicle 群, n = 6 : TAM 群, n = 7。(J) vehicle あるいは TAM の投与 7 日後の *Atg7^{flox/flox}* ML-ENL 白血病マウス骨髄中 LK 分画および lineage⁺ 分画での Annexin V および DAPI 染色の典型例。(K, L) *Atg7^{flox/flox}* ML-ENL 白血病マウス (J) および *Atg5^{flox/flox}* ML-ENL 白血病マウス (K) の骨髄中の LK 分画および lineage⁺ 分画における annexin-V 陽性あるいは DAPI 陽性細胞の頻度をプロットした。vehicle 群, n = 6 : TAM 群, n = 7。*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ns: not significant。結果はすべて、それぞれ 1 から 4 匹のマウスを用いて行われた独立した 3 回以上の実験で得られたデータを総合したものである。

TAM および Cre-ER の活性化それ自身は MLL 白血病マウスの生存および LIC の頻度に影響を与えない

Cre-ER を持たないマウスへの TAM 投与により正常造血幹細胞の増殖能が亢進すること、JAK2 活性化型変異を持つ骨髄増殖性腫瘍モデルマウスにおいて TAM の投与が腫瘍細胞の細胞死を誘導すること、および MLL-AF9 マウス白血病モデルにおいて TAM の投与が抗がん剤による治療効果を高めることが示されており、TAM 自身が遺伝子発現を変化させる等により造血系細胞の生存、機能に影響を及ぼすことが知られている⁵⁰。加えて、Cre-ER の活性化は、ゲノム上に存在する loxP 様の配列を切断することで、特に未分化な造血系細胞に対して細胞障害活性を有することが示されている⁵¹。これらの TAM-Cre-ER 系を用いることにより生じる人工的な影響を検証し、オートファジー欠損による影響を評価するために、Cre-ER を持たない *Atg7^{lox/lox}* ML-ENL 白血病マウス (*Atg7^{lox/lox}:Cre* 白血病マウス) および Cre-ER を持つ *Atg5* および *Atg7* 野生型のマウス (Cre-ER 白血病マウス) を用いた検証を実施した。まず、*Atg5^{lox/lox}:Cre* 白血病マウスおよび *Atg7^{lox/lox}:Cre* 白血病マウスに TAM を投与して生存期間へ及ぼす影響を調べたが、いずれのマウスモデルにおいても TAM の投与による生存期間の延長は確認されなかった (図 3-A, B)。また、TAM を投与された *Atg7^{lox/lox}:Cre* 白血病マウスにおいて、L-GMP の頻度が減少することはなかった

(図 3-C)。次に、Cre-ER の活性化による影響を検証するため Cre-ER 白血病マウスに TAM を投与して Cre-ER の活性化を誘導したが、L-GMP の頻度減少は確認されなかった (図 3-D)。

以上のことから、*Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスおよび *Atg5^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスに TAM を投与した際に観察された表現型は、TAM 自身あるいは Cre-ER の活性化によって引き起こされたものではなく、オートファジーの活性低下によって引き起こされたものであることが確認された。

図3

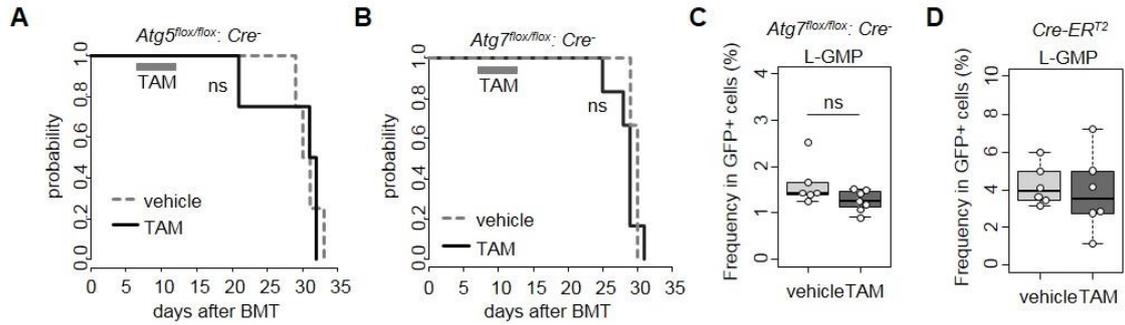


図3 TAM および Cre-ER の活性化それ自身は MLL 白血病マウスの生存および LIC の頻度に影響を与えない (A, B) vehicle あるいは TAM 投与を受けた *Atg5^{lox/lox};* Cre⁻ 白血病マウス (A) および *Atg7^{lox/lox};* Cre⁻ 白血病マウス (B) の生存曲線。各群それぞれ4から6匹のマウスを使用。P 値は log-rank test により計算した。(C) *Atg7^{lox/lox};* Cre⁻ 白血病マウス骨髄中における L-GMP 分画の頻度の定量値をプロットした。vehicle 群, n=6 : TAM 群, n=7。(D) Cre-ER 白血病マウス骨髄中における L-GMP 分画の頻度の定量値をプロットした。vehicle 群, n=6 : TAM 群, n=6, ns: not significant。

Atg7 を欠損した MLL-ENL LIC は造白血病能が低下した

LIC の機能的側面におけるオートファジーの役割をさらに詳細に検証するため、*Atg7^{Δ/Δ}* MLL-ENL マウス由来の LIC の白血病再構築能をコロニー形成アッセイおよび三次移植における造白血病能により評価した (図 4-A)。TAM を投与した *Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウス由来の骨髄 GFP 陽性細胞をセルソーターで分取して半固形培地上へ播種したところ、vehicle 投与群と比較して *in vitro* のコロニー形成能が低下していることが判明した (図 4-B)。次に、*in vivo* における造白血病能評価のため、二次移植において TAM を投与した *Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウス由来の骨髄 GFP 陽性細胞の三次移植を実施した。まず、移植直後の骨髄へのホーミング能にオートファジーの欠損は影響を与えないことを、移植 16 時間後の骨髄における GFP 陽性細胞の頻度が二次移植における TAM 投与によって変化しないことを確認した (図 4-C, D)。次に、二次移植において vehicle あるいは TAM を投与した *Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウス由来の骨髄 GFP 陽性細胞を、移植細胞数を 3 個から 3000 個の間で変化させながら移植し、各移植細胞数において白血病が再構築されるマウスの割合を測定することにより、骨髄 GFP 陽性細胞中の LIC の頻度を推定した。その結果、Atg7 の欠損により LIC の頻度が有意に減少することが示された (*Atg7^{lox/lox}* vs. *Atg7^{Δ/Δ}*, 1:46 vs. 1:301) (図 4-E, F)。

以上のことから、オートファジーは MLL-ENL 白血病において、機能的な LIC の維持に必要であることが示唆された。

図4

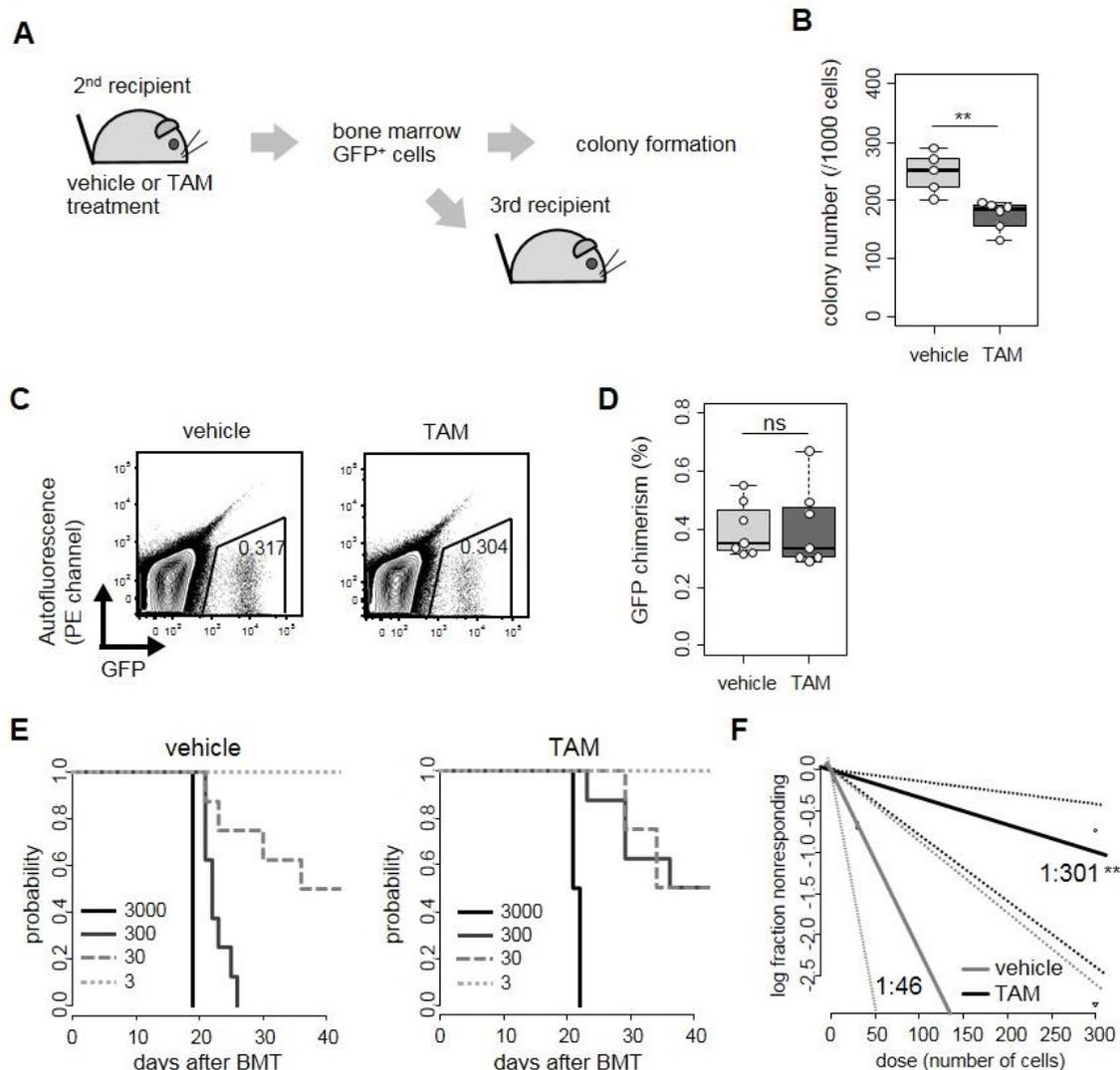


図4 *Atg7* を欠損した MLL-ENL LIC は造白血病能が低下した

(A) LIC の機能評価を目的とした実験の概要図。(B) vehicle あるいは TAM を投与した *Atg7^{lox/lox}* MLL-ENL マウスの骨髄より GFP 陽性細胞を分取し、1,000 個の細胞を *in vitro* で半固形培地に播種して 1 週間後に生じたコロニー数を計測し、プロットした。vehicle 群, n=5: TAM 群, n=6。(C) vehicle あるいは TAM を投与した *Atg7^{lox/lox}* MLL-ENL マウスの骨髄由来 GFP 陽性細胞を 3 次レシピエントマウスへ移植し、16 時間後の骨髄における GFP 陽性率をフローサイトメーターで解析した典型例。(D) 移植 16 時間後の骨髄 GFP 細胞頻度の定量値。各群 n=7。(E) vehicle あるいは TAM を投与した *Atg7^{lox/lox}* MLL-ENL マウスの骨髄より GFP 陽性細胞を分取し、3, 30, 300 あるいは 3000 個ずつ 3 次レシピエントマウスへ移植した際の生存曲線。各群 4 から 8 匹のマウスを使用した。(F) 移植細胞数ごとに、移植 6 週間後のマウスの生存率をプロットした。Poisson statistical

analysis により白血病マウス骨髄中の LIC の頻度を推定したところ、vehicle 群では 1:46 (95%信頼区間 1:18 - 115), TAM 群では 1:301 (95%信頼区間 1:126-718) であり、 $P = 0.0002$ であった。 ** $P < 0.01$, ns: not significant.

MLL-ENL 白血病において、末梢血白血病細胞はオートファジーに依存して生存している

次に末梢血白血病細胞に着目して解析を行ったところ、*Atg5^{ΔΔ}* および *Atg7^{ΔΔ}* MLL-ENL 白血病マウスにおいて、末梢血の白血球数は **vehicle** 群と比較して顕著に減少していることが判明した (図 5-A)。骨髄における白血病細胞数はオートファジー欠損によって大きな影響を受けないことから (図 1-E)、末梢血と骨髄の環境の違いが白血病細胞のオートファジーに対する依存性を変化させているという仮説を立てた。そこで、*Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスおよび *Atg5^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスに TAM を投与した際のアポトーシス誘導の程度に骨髄由来白血病細胞と末梢血由来白血病細胞で違いがあるかどうかを検証した。末梢血と骨髄での白血病細胞の分化段階の違いによるバイアスをなくするため、末梢血あるいは骨髄から取得した白血病細胞を **c-Kit** および **CD11b** により染色し、**c-Kit** 陽性分画と **c-Kit** 陰性分画のそれぞれで比較を行った (図 5-B)。その結果、TAM による *Atg5* および *Atg7* の欠損は、**c-Kit** の発現にかかわらず、末梢血においてのみアポトーシスを誘導し、骨髄における **c-Kit** 陽性あるいは **c-Kit** 陰性の細胞の大多数には影響を与えないことが判明した (図 5-C-E)。次に、末梢血における LIC のオートファジーへの依存性を検証するため、TAM を投与した *Atg7^{lox/lox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスの末梢血から **GFP** 陽性白血病細胞を分取

し、*in vitro* および *in vivo* における LIC の機能を評価した。その結果、*Atg7^{Δ/Δ}* MLL-ENL 白血病マウスの末梢血白血病細胞は *in vitro* でのコロニー形成能が *vehicle* 投与群と比較して有意に低下していることが判明した (図 5-F)。さらに、TAM を投与された *Atg7^{flox/flox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスの末梢血白血病細胞を野生型マウスへ移植すると、*vehicle* 群を投与されたものと比較して白血病発症までの期間が有意に延長することが示され (図 5-G)、MLL-ENL 白血病マウスの末梢血に存在する LIC の機能はオートファジーに依存していることが示唆された。

以上のことから、MLL-ENL 白血病マウスにおいて、末梢血に存在する白血病細胞は骨髄白血病細胞と異なり、分化段階にかかわらずオートファジーに依存して生存していることが判明した。

図5

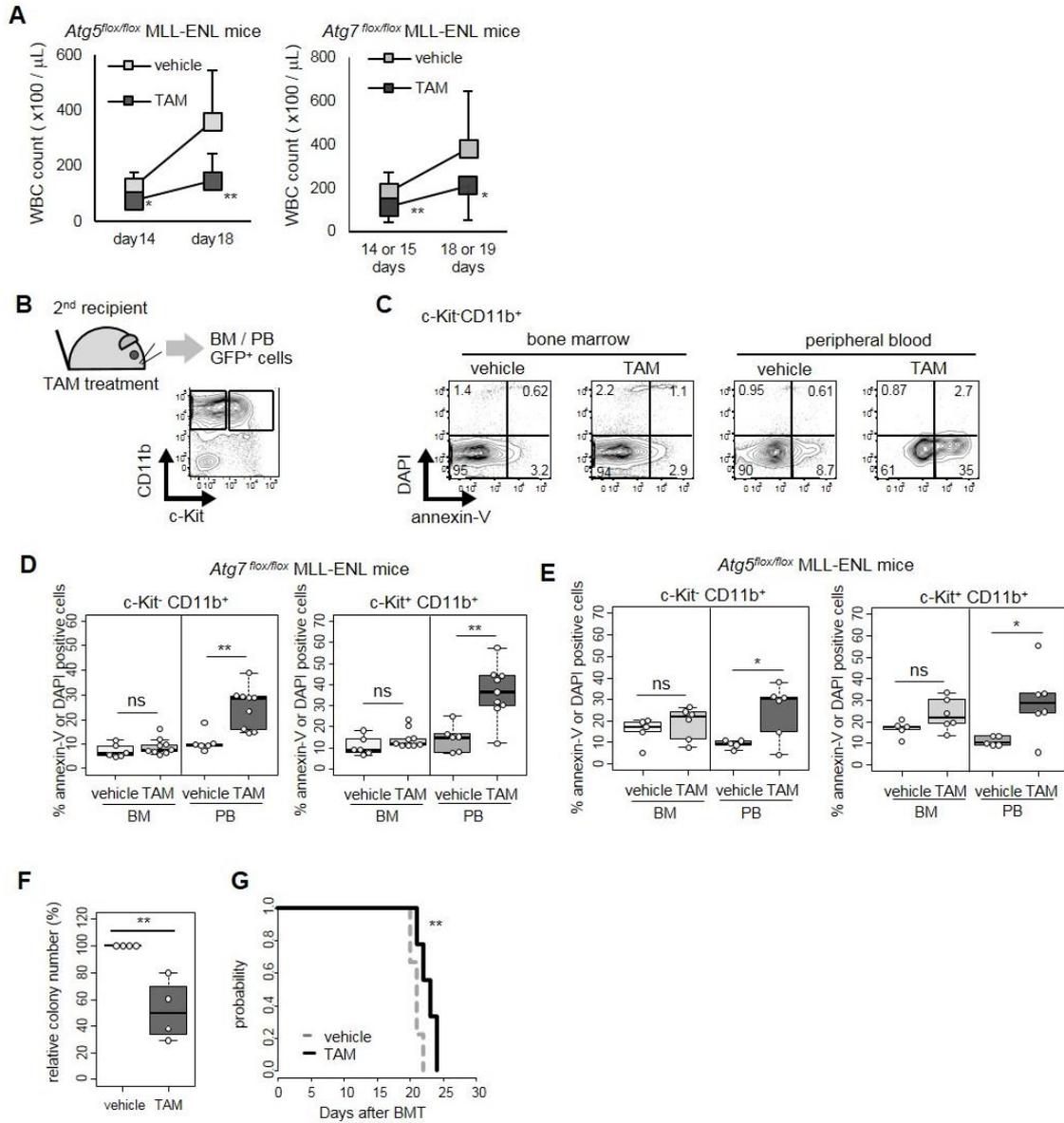


図5 MLL-ENL 白血病において、末梢血白血病細胞はオートファジーに依存して生存している (A) *Atg5^{Δ/Δ}* MLL-ENL 白血病マウスおよび *Atg7^{Δ/Δ}* MLL-ENL 白血病マウスの末梢血白血球数を移植後図に示された時点で計測し、プロットした (mean±SD)。各群7匹以上のマウスを用いた。P値は Welch's t-test により計算した。(B) MLL-ENL 白血病マウスの末梢血における c-Kit および CD11b 染色の典型例。c-Kit の陰性と陽性でそれぞれ解析を行った。(C) vehicle あるいは TAM を投与された *Atg7^{fl/fl}* MLL-ENL 白血病マウスの骨髄あるいは末梢血中の c-Kit⁺CD11b⁺細胞での annexin-V および DAPI 染色の典型例。(D) *Atg7^{fl/fl}* MLL-ENL 白血病マウスの骨髄あるいは末梢血中の annexin-V 陽性あるいは DAPI 陽性の分画の頻度をプロットした。各群6から9匹のマウスを用いた。(E) *Atg5^{fl/fl}* MLL-

ENL 白血病マウスの骨髄あるいは末梢血中の annexin-V 陽性あるいは DAPI 陽性の分画の頻度をプロットした。各群 6 から 9 匹のマウスを用いた。(F) GFP⁺細胞を vehicle あるいは TAM を投与した *Atg7^{lox/lox}* MLL-ENL 白血病マウスの末梢血より分取し、半固形培地へ播種して生じたコロニー数の相対値をプロットした。各群 n = 4。(G) GFP⁺細胞を vehicle あるいは TAM を投与した *Atg7^{lox/lox}* MLL-ENL 白血病マウスの末梢血より分取し、野生型マウスへ移植した際の生存曲線。各群 9 匹のマウスを使用し、P 値は log-rank test により計算した。*P < 0.05, **P < 0.01, ns: not significant。結果はすべて、それぞれ 1 から 4 匹のマウスを用いて行われた独立した 3 回以上の実験で得られたデータを総合したものである。

TAM 投与あるいは Cre-ER の活性化それ自身は末梢血白血病細胞の生存に影響しない

TAM 投与それ自身が末梢血白血病細胞に与える影響を検証するため、*Atg5^{flx/flx}:Cre* 白血病マウスあるいは *Atg7^{flx/flx}:Cre* 白血病マウスへ TAM を投与し、末梢血の白血病細胞の表現型を解析した。その結果、*Atg5^{flx/flx}:Cre* 白血病マウスあるいは *Atg7^{flx/flx}:Cre* 白血病マウスへ TAM の投与を行った場合は末梢血の白血球数が減少しないことが明らかとなった (図 6-A, B)。さらに、*Atg5^{flx/flx}:Cre* 白血病マウスあるいは *Atg7^{flx/flx}:Cre* 白血病マウスにおいては、TAM の投与を行っても末梢血中白血病細胞でのアポトーシスの誘導が起こらないことが判明した (図 6-C, D)。次に、Cre-ER の活性化が末梢血白血病細胞に与える影響を検証したところ、Cre-ER 白血病マウスにおいて TAM の投与は末梢血白血病細胞のアポトーシスを誘導しないことが示された (図 6-E)。

以上のことから、*Atg7^{flx/flx}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスおよび *Atg5^{flx/flx}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスに TAM を投与した際に観察された末梢血細胞の減少とアポトーシスの増加は、TAM や Cre-ER による人工的な影響ではなく、オートファジーの活性低下によるものであることが確認された。

図6

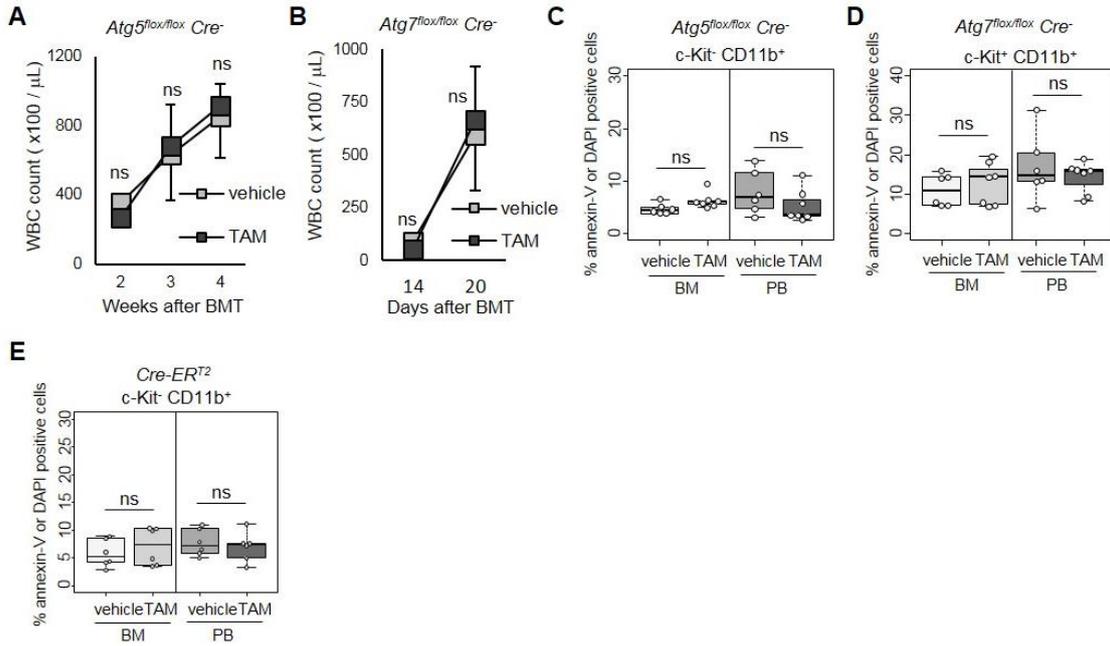


図6 TAM投与あるいはCre-ERの活性化それ自身は末梢血白血病細胞の生存に影響しない (A, B) *Atg5^{flox/flox}:Cre⁻*白血病マウス (A) あるいは *Atg7^{flox/flox}:Cre⁻*白血病マウス (B) に vehicle あるいは TAM を投与した後、移植後の図に示す時点で末梢血白血病細胞数を計測し、プロットした (mean \pm SD)。各群4から12匹のマウスを使用した。(C, D) vehicle あるいは TAM の投与7日後における *Atg5^{flox/flox}:Cre⁻*白血病マウス (C) あるいは *Atg7^{flox/flox}:Cre⁻*白血病マウス (D) の骨髄あるいは末梢血中の c-Kit⁻CD11b⁺細胞における annexin-V 陽性または DAPI 陽性細胞の頻度をプロットした。各群6から7匹のマウスを使用した。(E) vehicle あるいは TAM を投与された Cre-ER 白血病マウスの骨髄あるいは末梢血中の c-Kit⁻CD11b⁺細胞における annexin-V 陽性または DAPI 陽性細胞の頻度をプロットした。各群6匹のマウスを使用した。ns: not significant。

白血病細胞では末梢血中においてオートファゴソーム数の増加がみられる

末梢血白血病細胞で確認されたオートファジーへの依存性が、オートファジーの活性化を伴っているかを検証するため、末梢血の白血病細胞におけるオートファジーの活性を調べた。そのために、まず、**MLL-ENL** 白血病マウスの骨髄および末梢血から **c-Kit** 陰性 **CD11b** 陽性の白血病細胞を分取し、ウェスタンブロットにより **LC3A** の **phosphatidylethanolamine (PE)** の結合を定量した。その結果、末梢血中の白血病細胞では骨髄中の白血病細胞と比較して **LC3-II** のシグナルが高いことが示され (図 7-A, B)、末梢血の白血病細胞中には骨髄の白血病細胞中と比較してより多くのオートファゴソームが存在していることが示唆された。その結果をより直接的に確認するため、**MLL-ENL** 白血病マウスから分取した末梢血白血病細胞と骨髄白血病細胞を電子顕微鏡により撮影し、断面上にオートファゴソーム数を計測した。その結果、末梢血白血病細胞は骨髄中の白血病細胞と比較して、一細胞あたりのオートファゴソーム数が多いことが明らかとなった (図 7-C, D)。次に、オートファジー活性をより詳細に解析するため、**GFP-LC3** トランジェニックマウスを用いた検証を実施した⁴¹。**GFP-LC3** はオートファジーにより分解される基質であり、オートファジーの活性化に伴って **GFP** の発現強度が低下することが知られている⁵²。**GFP-LC3** トランスジェニックマウス (**CD45.2** を発現) を用いて **MLL-ENL** 白血病マウスモデルを作製して骨髄単

核球を回収し、放射線照射を行った CD45.1 を発現する正常マウスへ二次移植を行った。二次移植マウスにおいて、骨髄および末梢血中の CD45.2 を発現する白血病細胞における GFP-LC3 の発現強度を比較した。その結果、c-Kit 陽性 CD11b 陽性および c-Kit 陰性 CD11b 陽性の両分画において、GFP-LC3 の発現強度は末梢血由来白血病細胞の方が骨髄由来細胞と比較して低かった (図 7-E-G)。

これらの結果から、MLL-ENL マウス白血病モデルにおいて、末梢血中に存在する白血病細胞内には骨髄の白血病細胞内と比較して、より多数のオートファゴソームが存在していることが示された。かつ、GFP-LC3 を用いた検証の結果から、末梢血白血病細胞中ではオートファジーの過程が停止しているわけではなく、むしろ基質の分解が亢進していることが示された。以上の結果は、末梢血白血病細胞においてオートファジーが活性化しているという考えを支持するものである。

図7

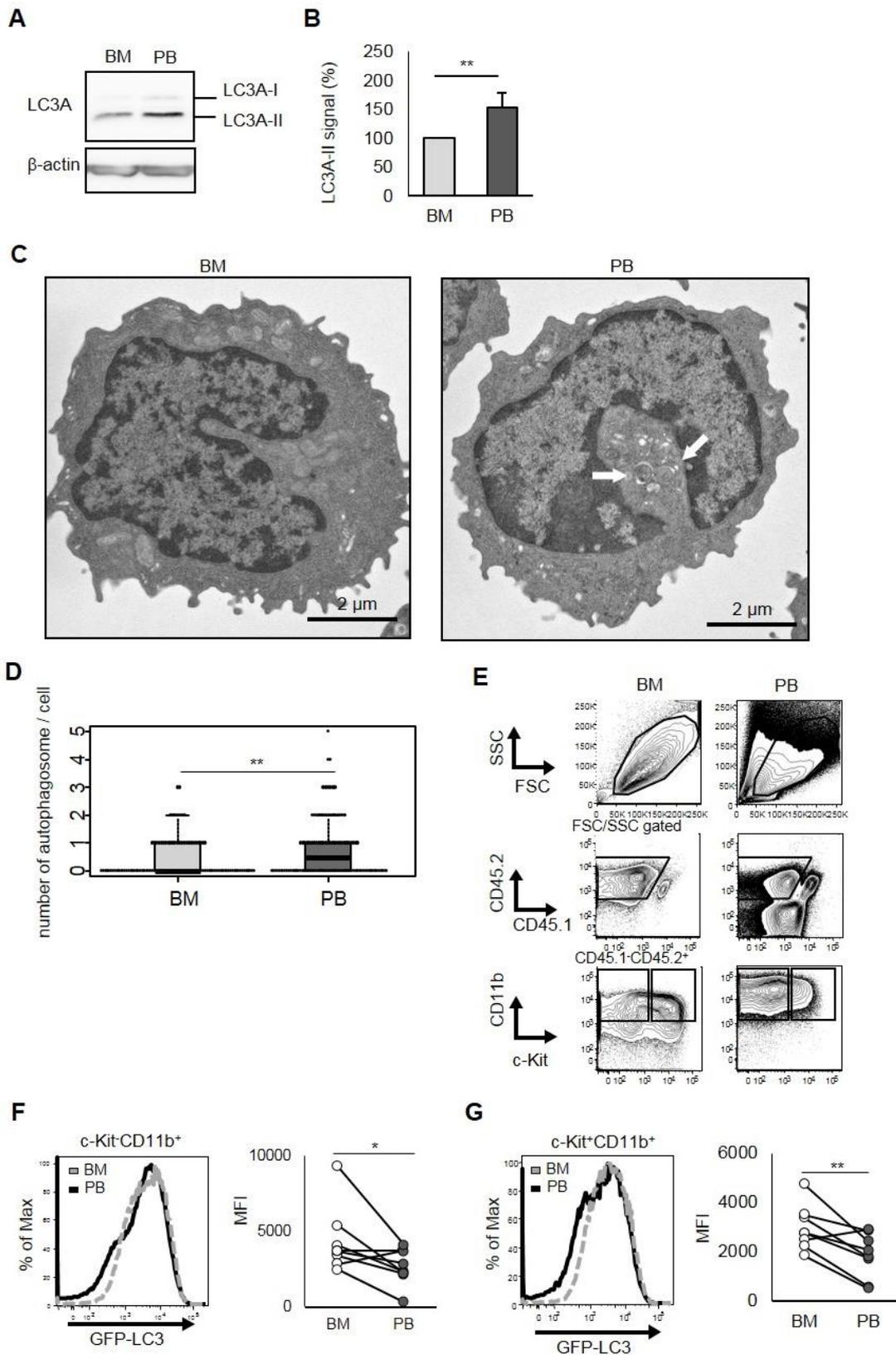


図7 白血病細胞では末梢血中においてオートファゴソーム数の増加がみられる

(A) MLL-ENL 白血病マウスの骨髄および末梢血の c-Kit⁺CD11b⁺細胞を分取し、ウェスタンブロットにより LC3A-I および LC3A-II の発現を解析した典型例。

(B) MLL 白血病マウスの骨髄および末梢血 c-Kit⁺CD11b⁺細胞における LC3A-II シグナルの相対値をプロットした。相対値は、各サンプルにおける LC3A-II シグナル値を β -actin のシグナル値で割った値の、同一回の実験における骨髄サンプル値に対する比率として計算した (n = 5, mean \pm SD)。(C) MLL-ENL 白血病マウスの骨髄および末梢血の c-Kit⁺CD11b⁺細胞の電子顕微鏡解析の典型例。透過型電子顕微鏡 JEM-1400Plus (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) により撮影し、デジタル画像は CCD camera (VELETA; Olympus Soft Imaging Solutions, Germany) により得られた。白矢印はオートファゴソームを示す。(D) 2 匹のマウスより得られた 100 細胞の電子顕微鏡画像に存在するオートファゴソームを計測し、細胞あたりに含まれるオートファゴソーム数をプロットした。P 値は Wilcoxon rank sum test により計算した。(E) GFP-LC3 MLL-ENL 白血病マウスの骨髄および末梢血の CD11b/c-Kit 染色の典型例。(F, G) GFP-LC3 MLL-ENL 白血病マウスの骨髄および末梢血の CD11b⁺c-Kit⁻ (F) および CD11b⁺c-Kit⁺ (G) 細胞における GFP-LC3 シグナルのヒストグラムの典型例と定量値。GFP-LC3 の定量は geometric mean fluorescent intensity を用いた。各群 8 匹のマウスを用いた。P 値は Student's paired t-test により計算した。*P < 0.05, **P < 0.01。結果はすべて、それぞれ 1 から 3 匹のマウスを用いて行われた独立した 3 回以上の実験で得られたデータを総合したものである。

末梢血でのオートファゴソーム数増加は細胞非自律的に起こる

末梢血白血病細胞で見られたオートファゴソーム数の増加および GFP-LC3 の発現低下が細胞自律的かどうかを検証するために、分取した骨髄および末梢血由来の白血病細胞の *ex vivo* 培養を実施した。その結果、分取直後の解析では末梢血白血病細胞において LC3A-II の発現が骨髄由来細胞と比較して亢進していることが確認されたが、*ex vivo* 培養により末梢血由来と骨髄由来の細胞間で LC3A-II の発現に差がなくなることが確認された (図 8-A)。加えて、*GFP-LC3* MLL-ENL 二次移植マウスの末梢血白血病細胞を別のマウスへ三次移植した場合、移植後に構築された白血病においても、末梢血白血病細胞は骨髄白血病細胞よりも低い GFP-LC3 発現を示すことが明らかとなった (図 8-B, C)。すなわち、二次移植マウスにおいて末梢血で GFP-LC3 の発現が低下していた白血病細胞は、三次移植マウスの骨髄へ移動すると GFP-LC3 の発現が回復することが示唆された。

以上のことから、末梢血白血病細胞でみられたオートファゴソーム数増加は細胞非自律的であり、末梢血環境が白血病細胞内のオートファゴソーム数を増加させていることが示唆された。

図8

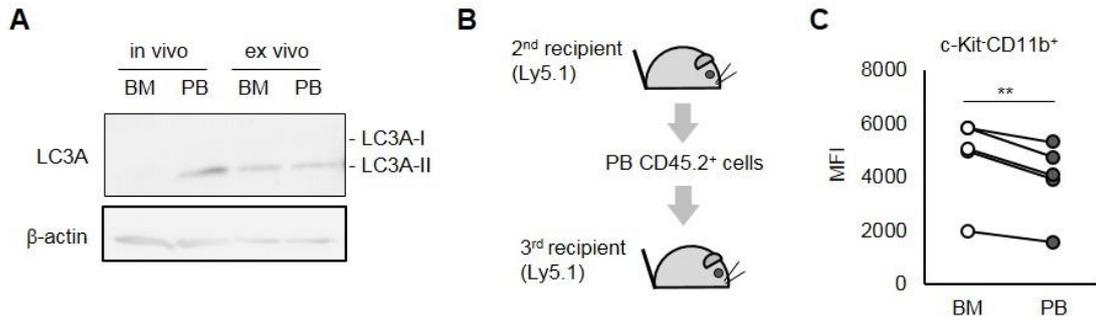


図8 末梢血でのオートファゴソーム数増加は細胞非自律的に起こる (A) MLL-ENL 白血病マウスの骨髄および末梢血より c-Kit⁺CD11b⁺細胞を分取し、2時間の培養後に回収してLC3Aのウェスタンブロットを行った結果の典型例。(B) GFP-LC3 白血病マウスの末梢血より白血病細胞を分取し、野生型3次レシピエントマウスへ移植した。(C) GFP-LC3 白血病マウスの末梢血細胞を移植したマウスの骨髄および末梢血 c-Kit⁺CD11b⁺細胞におけるGFP-LC3発現をフローサイトメトリーにより定量し、MFIをプロットした (n = 5)。P値はStudent's paired t-testにより計算した。**P < 0.01。結果はすべて、それぞれ1から3匹のマウスを用いて行われた独立した3回以上の実験で得られたデータを総合したものである。

分化した正常骨髄球系細胞は末梢血中においてオートファジーへの依存性を示さない

正常造血において、オートファジーはミトコンドリア除去を介した赤血球の成熟や T 細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが先行研究により示されている⁵³⁻⁵⁶。マウス MLL 白血病においては、末梢血白血病細胞はオートファジーへの高い依存性を示すことが本研究により判明したため、正常の骨髄球系細胞が末梢血中でオートファジーへ依存しているかどうかを検証した。そのため、MLL-ENL 白血病ではない *Atg7^{flx/flx}; Cre-ER^{T2}* マウス（非白血病マウス）へ TAM を投与して *Atg7* を欠損させ、表現型を解析することで検証した（図 9-A）。非白血病マウスへ TAM を投与したところ、白血病マウスとは異なり、白血球数の減少は確認できなかった（図 9-B）。加えて、白血病マウスで見られたような末梢血の *c-Kit⁺CD11b⁺* 細胞におけるアポトーシスの増加も、正常マウスでは確認できなかった（図 9-C）。なお、骨髄の *c-Kit⁺CD11b⁺* 細胞においても *Atg7* の欠損によるアポトーシスへの影響は確認されなかった（図 9-C）。これらのことから、末梢血の正常骨髄球系細胞の生存は、MLL-ENL 白血病の場合とは異なり、オートファジーに依存しないことが明らかとなった。

次に、末梢血中の正常骨髄球系細胞におけるオートファジーの活性を LC3A のウェスタンブロットおよび GFP-LC3 のフローサイトメトリーにより測定した。

その結果、野生型マウスにおける *c-Kit* 陰性 *CD11b* 陽性細胞は、*MLL-ENL* 白血病マウスの場合とは対照的に、末梢血において骨髄の同一分画と比較して *LC3A-II* の発現が低かった (図 9-D)。また、白血病でない *GFP-LC3* マウスの末梢血と骨髄の細胞で *GFP-LC3* の発現を、骨髄移植を行わない状態で比較したところ、*c-Kit*⁻*CD11b*⁺ においては骨髄と末梢血で有意な *GFP-LC3* 発現量の差はなく、*c-Kit*⁺*CD11b*⁺ では末梢血由来細胞の方が *GFP-LC3* の発現は高かった (図 9-E)。これらのことから、*MLL-ENL* 白血病マウスの場合とは異なり、正常骨髄球系細胞は末梢血中でオートファジーを活性化しているということはないことが示された。

以上のことから、正常マウスにおいては末梢血の骨髄球系細胞は少なくとも短期間の生存はオートファジーに依存しておらず、末梢血での高いオートファジー依存性は *MLL-ENL* 白血病細胞に特異的なものであることが判明した。

図9

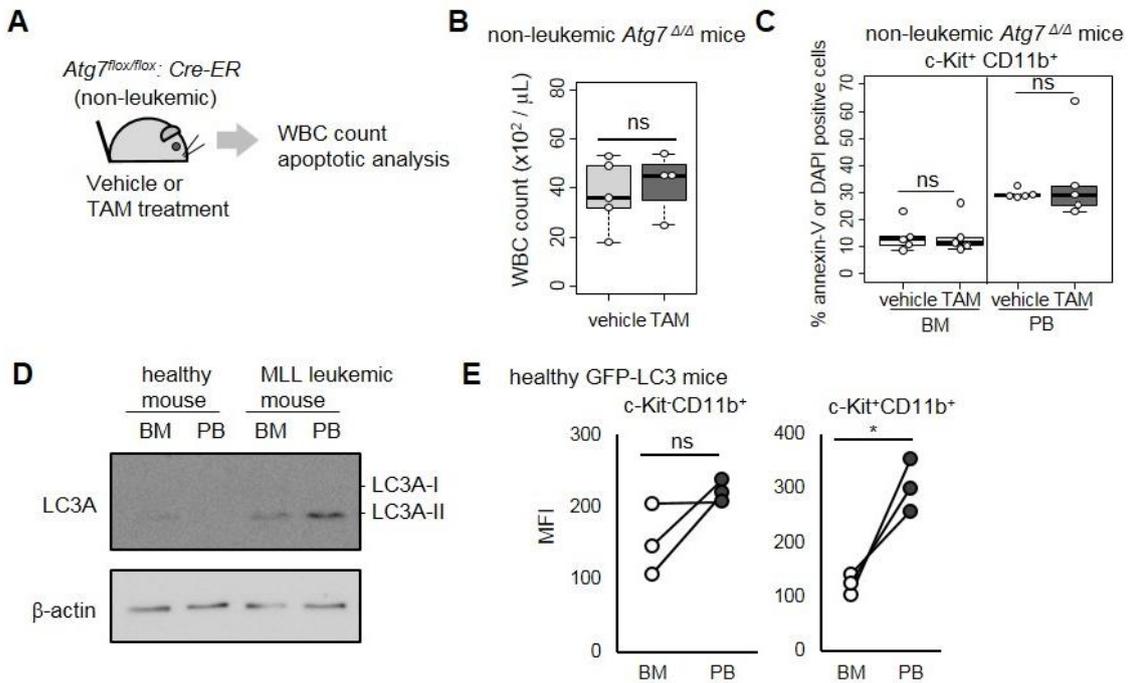


図 9 分化した正常骨髄球系細胞は末梢血中에서도オートファジーへの依存性を示さない (A) MLL-ENL を持たない *Atg7^{flox/flox}; Cre-ER^{T2}* マウスによる実験の概要図。(B) vehicle あるいは TAM を投与 7 日後の非白血病マウス (non-leukemic) マウスから末梢血を回収し、白血球数を計測した。vehicle 群, n = 5; TAM 群, n = 4。(C) vehicle あるいは TAM を投与 7 日後の非白血病マウスから骨髄および末梢血を回収し、*c-Kit⁺CD11b⁺* 分画における annexin-V あるいは DAPI 陽性細胞の頻度をフローサイトメーターにより計測した (各群 n = 5)。(D) 正常野生型マウスおよび MLL-ENL 白血病マウスの *c-Kit⁺CD11b⁺* 分画を骨髄および末梢血から回収し、LC3A のウェスタンブロット解析をおこなった典型例。(E) MLL-ENL をもたない *GFP-LC3* マウスの骨髄および末梢血での、*c-Kit⁺CD11b⁺* および *c-Kit⁺CD11b⁺* 分画での GFP-LC3 発現をフローサイトメーターにより測定し、MFI をプロットした (n = 3)。P 値は Student's paired t-test により計算した。*P < 0.05, ns: not significant。結果はすべて、それぞれ 1 から 4 匹のマウスを用いて行われた独立した 2 回以上の実験で得られたデータを総合したものである。

マウス CML 急性転化モデルにおけるオートファジーの役割

MLL-ENL 白血病以外の骨髄系腫瘍におけるオートファジーの役割を検証するため、BCR-ABL および NUP98-HOXA9 の導入によって作製されたマウス CML 急性転化 (CML-BC) モデルを用いた⁵⁷。MLL-ENL モデルと同様に、*Atg7^{flox/flox}:Cre-ER^{T2}* マウスから採取した骨髄造血前駆細胞へレトロウイルスベクターを用いて BCR-ABL および NUP98-HOXA9 を導入し、得られた細胞を野生型マウスへ移植することで CML-BC を発症させた。CML-BC マウスの骨髄および脾臓の白血病細胞を野生型マウスへ二次移植し (*Atg7^{flox/flox}:Cre-ER^{T2}* CML-BC マウス)、TAM を投与することで *Atg7* を欠損させ表現型を解析した。*Atg7^{flox/flox}:Cre-ER^{T2}* CML-BC マウスへ TAM を投与した結果、vehicle 投与マウスと比較して骨髄および脾臓における白血病細胞数に大きな影響はなかったが (図 10-A,B)、生存期間の有意な延長がみられた (図 10-C)。さらに、*Atg7* を欠損することにより、CML-BC マウスモデルにおける LIC である LK 細胞の骨髄中での頻度が減少することが示された (図 10-D, E)⁵⁸。さらに、*Atg7* の欠損によって末梢血中の白血球数が減少し、末梢血中のみでアポトーシスが亢進することが判明した (図 10-F, G)。なお、死亡時あるいは瀕死時の CML-BC マウスの骨髄は *Atg7* の欠損にかかわらず、芽球で占められており、マウスは白血病により死亡していることが示唆された (図 10-H)。

以上のことから、CML-BC マウスモデルにおいてもオートファジーは CML-BC の進展、LIC の維持および末梢血白血病細胞の生存をサポートしていることが判明した。加えて、オートファジーの骨髄における LIC の維持と末梢血細胞の保護という役割は MLL-ENL 白血病に限定されるものではなく、他の骨髄系腫瘍でも同様であることが示唆された。

図10

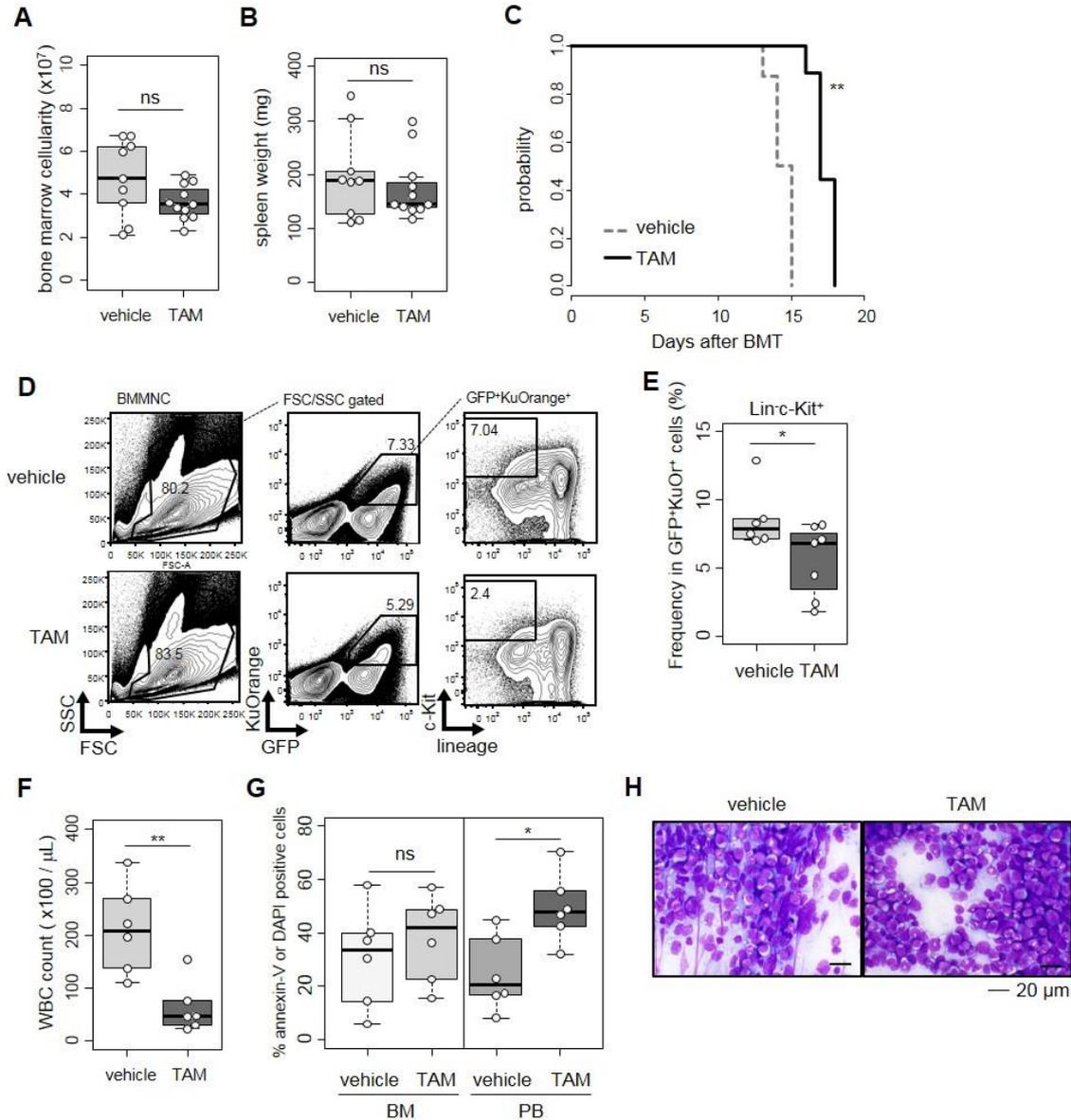


図 10 マウス CML 急性転化モデルにおけるオートファジーの役割 (A, B) vehicle あるいは TAM 投与された *Atg7^{flox/flox}: Cre-ER^{T2}* CML-BC マウスの骨髄中単核球細胞数 (A) および脾臓重量 (B) を測定しプロットした。vehicle 群, n = 9; TAM 群, n = 11. (C) vehicle あるいは TAM 投与された *Atg7^{flox/flox}: Cre-ER^{T2}* CML-BC マウスの生存曲線 (各群 n = 9)。P 値は log-rank test により計算した。(D) *Atg7^{flox/flox}: Cre-ER^{T2}* CML-BC マウスの骨髄中 LIC ($GFP^+KusabiraOrange^+Lineage^-c-Kit^+$) 分画の典型的なフローサイトメトリー解析結果。(E) vehicle あるいは TAM を投与された *Atg7^{flox/flox}: Cre-ER^{T2}* CML-BC マウスの骨髄中 LIC 頻度を定量しプロットした。vehicle 群, n = 6; TAM 群, n = 7. (F) vehicle あるいは TAM を投与された *Atg7^{flox/flox}: Cre-ER^{T2}* CML-BC マウスの末梢血白血球数を、移植 14 日後に

計測しプロットした (各群 n = 6)。 (G) vehicle あるいは TAM を投与された *Atg7^{flox/flox}: Cre-ER^{T2}* CML-BC マウスの骨髄および末梢血中の c-Kit⁺CD11b⁺陽性細胞における annexin-V あるいは DAPI 陽性細胞の頻度をフローサイトメーターにより定量しプロットした (各群 n=6)。 (H) 死亡あるいは瀕死の *Atg7^{flox/flox}: Cre-ER^{T2}* CML-BC マウスの骨髄の典型的なライト・ギムザ染色像。 *P < 0.05, **P < 0.01, ns: not significant。 結果はすべて、それぞれ 2 から 3 匹のマウスを用いて行われた独立した 3 回以上の実験で得られたデータを総合したものである。

マウスモデルにおいてオートファジー阻害は AraC の治療効果を増強する

in vitro の培養条件においては、AML の薬剤耐性におけるオートファジーの重要性が示されているものの、*in vivo* でのオートファジーと薬剤耐性の関係はこれまで調べられていなかった。そこで、MLL-ENL 白血病マウスを用いて、オートファジーの不活性化が AML 治療に頻用されるシタラビン (AraC) の薬効へ及ぼす影響を解析した。最初に、AraC を投与された MLL-ENL 白血病マウスにおける骨髄における GFP-LC3 の発現を解析したところ、L-GMP においてのみ GFP-LC3 の発現低下が確認され、一方で lineage 陽性細胞においては GFP-LC3 の発現に変化がなかった (図 11-A-C)。このことは、AraC 投与により LIC においてのみオートファジーの活性が増加したことを示唆している。次に、AraC 投与および *Atg7* の欠損の組み合わせが白血病マウスの生存に与える影響を、*Atg7^{fllox/fllox}:Cre-ER^{T2}* 白血病マウスへ TAM および AraC を併用することにより解析した。その結果、AraC を投与された *Atg7* 欠損白血病マウスは、AraC 投与単独あるいは *Atg7* 欠損単独群と比較して有意に生存が延長されることが確認され、*Atg7* の欠損は AraC による治療効果を増強することが示唆された (図 11-D)。同時に、AraC 投与および *Atg7* の欠損は骨髄における白血病細胞数の減少に相加的に作用した (図 11-E)。加えて、*Atg7* の欠損は AraC による LIC の頻度および絶対数の減少効果を高めた (図 11-F)。次に、末梢血の白血病細胞に AraC および

TAM の併用が与える影響を調べた。その結果、末梢血の白血球数については AraC 投与単独で顕著な減少効果が認められたため *Atg7* 欠損による上乗せ効果は確認できなかったが (図 11-G)、アポトーシスの増加については AraC 投与および *Atg7* 欠損は相加効果がみられた (図 11-H)。なお、AraC 投与マウスおよび *Atg7* 欠損マウスの骨髄を瀕死時あるいは死亡時に回収し、ライト・ギムザ染色を行ったところ、骨髄は芽球で占められており、これらのマウスが白血病で死亡していることが示唆された (図 11-I)。

以上のことから、*Atg7* の欠損は AraC による MLL-ENL 白血病マウスの生存延長、骨髄の白血病細胞減少、LIC の頻度減少、および末梢血白血病細胞の細胞死という治療効果を高めることが判明し、MLL-ENL 白血病マウスの AraC に対する感受性にオートファジーが関係していることが明らかとなった。

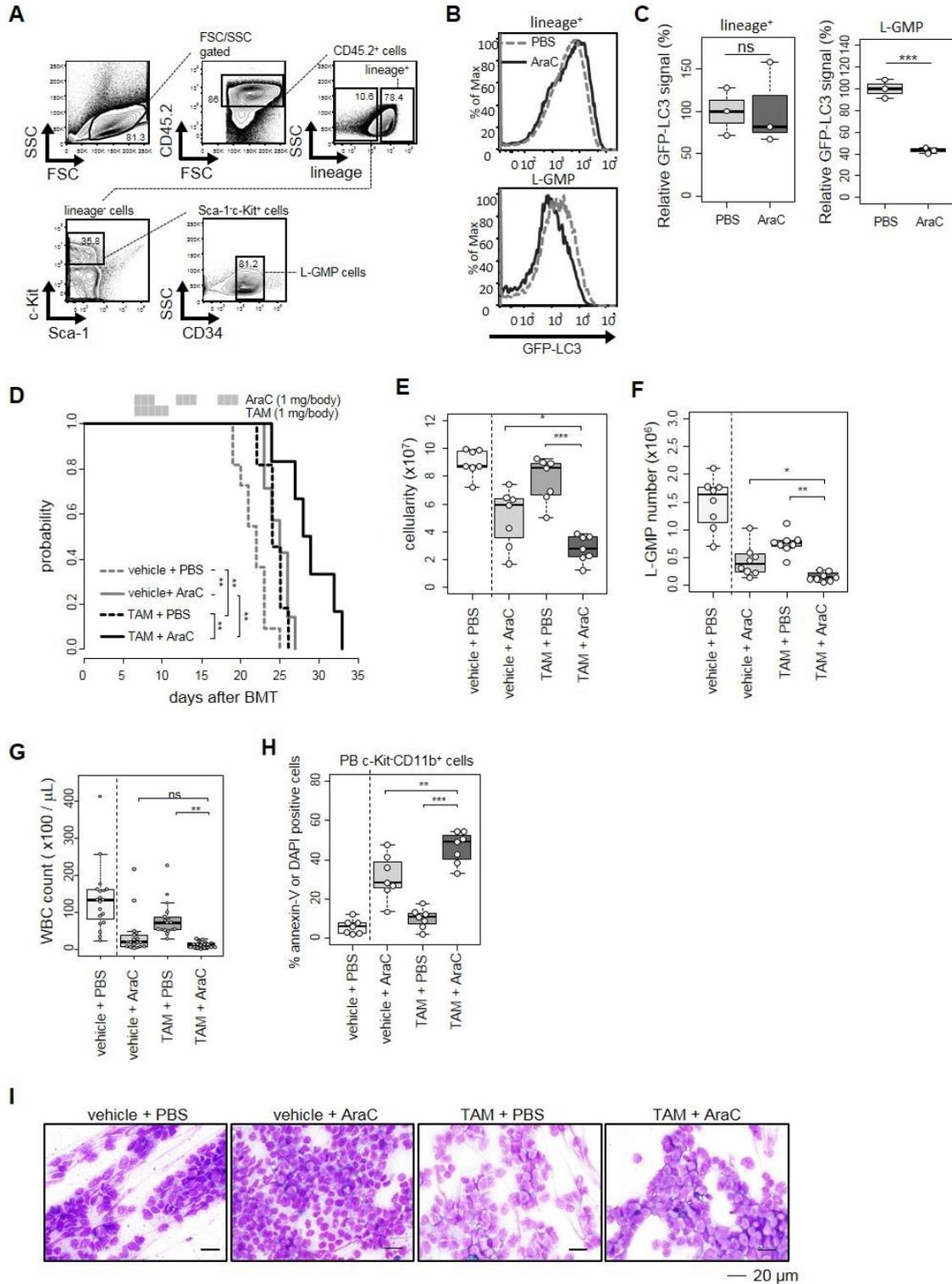


図 11 マウスモデルにおいてオートファジー阻害は AraC の治療効果を増強する (A) GFP-LC3 白血病マウスモデルの骨髄における lineage⁺および L-GMP (lineage⁻c-Kit⁺Sca-1⁻CD34⁺) のフローサイトメトリー解析のゲーティング方法。(B) PBS あるいは AraC を投与された GFP-LC3 MLL-ENL 白血病マウスの GFP-LC3 発現解析結果の典型例。(C) PBS あるいは AraC を投与された GFP-LC3 MLL-ENL 白血病マウスの lineage⁺および L-GMP 細胞における GFP-LC3 シグナルの定量値。各分画における MFI をプロットした (各群 n=3)。(D) PBS あるいは AraC に加えて vehicle あるいは TAM を投与された *Atg7^{lox/lox}* MLL-ENL マウスの生存曲線。各群 6-11 匹のマウスを使用した。P 値は log-rank test により計算した。(E) PBS あるいは AraC に加えて vehicle あるいは TAM を投与された *Atg7^{lox/lox}* MLL-ENL マウスの骨髄における細胞数をプロットした。各群 6-7 匹のマウスを使用した。(F) PBS あるいは AraC に加えて vehicle あるいは TAM を投与された *Atg7^{lox/lox}* MLL-ENL マウスの骨髄における L-GMP 分画の細胞数を計算した。L-GMP 細胞数は骨髄における GFP 陽性 L-GMP 細胞の頻度をフローサイトメーターにより計測し、骨髄細胞数と乗ずることにより計算した。各群 6-7 匹のマウスを使用した。(G) PBS あるいは AraC に加えて vehicle あるいは TAM を投与された *Atg7^{lox/lox}* MLL-ENL マウスの末梢血白血球数を計測し、プロットした。各群 17-19 匹のマウスを使用した。(H) PBS あるいは AraC に加えて vehicle あるいは TAM を投与された *Atg7^{lox/lox}* MLL-ENL マウスの末梢血における c-Kit⁻CD11b⁺分画での annexin-V あるいは DAPI 陽性細胞の頻度をフローサイトメーターで測定し、プロットした。各群 6-7 匹のマウスを使用した。(I) 死亡あるいは瀕死の *Atg7^{lox/lox}* MLL-ENL マウスの骨髄の典型的なライト・ギムザ染色像。複数群間の比較は、分散分析および Holm's step-down method により行った。*P<0.05, **P<0.01, *** P<0.001, ns: not significant。結果はすべて、それぞれ 2 から 3 匹のマウスを用いて行われた独立した 2 回以上の実験で得られたデータを総合したものである。

考察

本研究では、白血病モデルマウスを用いて骨髄性白血病におけるオートファジーの役割を解析し、その結果オートファジーが白血病マウス骨髄においてミトコンドリアの分解により酸化ストレスを抑制することで機能的な LIC を維持し、白血病の進展に重要な役割を果たしていることが判明した。骨髄においてはオートファジーの役割は LIC に限られていたが、末梢血においては分化段階によらず大多数の白血病細胞においてオートファゴソームの増加が確認され、細胞の生存がオートファジーに依存していることが判明した。加えて、オートファジーの不活性化により AraC の治療効果を増強できることが明らかになった。

本研究では、AML の LIC におけるオートファジーの役割を、マウスモデルを用いた *in vivo* 解析を行うことによってはじめて明らかにした。複数の先行研究において AML 細胞株をオートファジー阻害剤で処理しても顕著な増殖抑制がみられないことが示されており^{36,39}、本研究で得られた知見と一致しないように思われるが、オートファジーへの活性や依存性は一般に細胞がおかれた環境に強く影響されるものであり、*in vitro* の培養条件下では観察されにくいものであると考えられる。その点において本研究は *in vivo* 解析を行うことで初めてオートファジーの LIC における役割を明らかにすることができたと考えられる。しかしながら、骨髄において LIC の維持にどのような機序でオートファジーが貢

献し、なぜ LIC のみがオートファジーに依存しているかという点については、本研究でその全貌を明らかにするには至らなかった。正常造血幹細胞は、血球前駆細胞と比較して、ミトコンドリアの量を低レベルに維持し、低酸素環境にある骨髄ニッチにおいて解糖系による代謝を利用していることが示されている⁵⁹。白血病細胞中にはミトコンドリアが正常血球と比較して多く存在しているという報告もあるが⁶⁰、LIC は比較的分化した白血病細胞と比較してミトコンドリア量を低く保つことで幹細胞性を維持している可能性があり、したがって、LIC のみがオートファジーの不活性化によるミトコンドリア蓄積に対して感受性を示したという仮説が考えられる。本研究では、オートファジーが不活性化することにより LIC 中にミトコンドリアが蓄積し、ROS が産生されることを示した。このことは、上記仮説を支持するものではあるが、ミトコンドリアの蓄積の抑制もしくは ROS 産生の抑制が、オートファジー抑制による LIC 維持の破綻をどの程度説明できるのかは現在のところ明らかになっていない。ミトコンドリア蓄積および ROS 産生が直接的に LIC の維持に影響するかどうかを検証していくことが今後の課題である。

白血病において、末梢血中に存在する白血病細胞は骨髄よりあふれ出した機能を持たない細胞であると考えられている。本研究により、MLL-ENL マウス白血病モデルにおいて、末梢血の白血病細胞が白血病再構築能を保持しており、

その活性の一部はオートファジーに依存していることが判明した。末梢血では白血病細胞の生存はオートファジーに依存していることが示されたが、その原因は酸素分圧、サイトカイン濃度や他の細胞との接着等の環境的な要因が骨髄と末梢血とで異なることであると考えられる。近年 G-CSF により末梢血中へ動員された造血幹細胞においてもオートファジーが活性化されており、末梢血中での生存はオートファジーに依存することが示されている⁶¹。これらのことから、通常骨髄中にしか存在しないような白血病細胞あるいは動員された造血幹細胞のような未分化な細胞は、末梢血環境で細胞に生じるストレスに対処できず、オートファジーへの依存性を示すのではないかと推測できる。

本研究では、末梢血白血病細胞におけるオートファゴソームの増加が、電子顕微鏡解析およびウェスタンブロットにより確認された。同時に、オートファジー基質の分解が末梢血白血病細胞にて亢進していることが、GFP-LC3 の定量により明らかとなった。これらのデータは末梢血白血病細胞中でオートファジーの活性化が起こっていることを支持するものの、GFP-LC3 の転写活性およびオートファジー以外の分解経路の寄与が細胞集団によって異なる可能性が指摘されており、異なる細胞同士で GFP-LC3 の発現を比較することは難しいと考えられる。本研究では骨髄と末梢血中で c-Kit⁻CD11b⁺あるいは c-Kit⁺CD11b⁺といった免疫表現型を持つ細胞集団が同一であると想定し解析を実施しているが、これ

らの集団内に複数の細胞集団が含まれる可能性は否定できず、末梢血においてオートファジーの活性化が生じているかどうかを厳密に示すためにはさらなる解析が必要である⁶²。より詳細にオートファジー活性化メカニズムを検証することで、AMLにおける分化段階や環境因子によるオートファジー依存性の違いを深く理解できると考えられる。

以前から、オートファジーとヒストン脱メチル化阻害剤、mTOR 阻害剤、AraC等のさまざまな抗がん薬に対する抵抗性との関係が AML 細胞株を用いた *in vitro* の研究により指摘されてきたものの³⁶⁻⁴⁰、オートファジーの活性、機能は細胞周囲の環境に強く依存するものであると考えられ、*in vivo* でのオートファジーの役割を解析することには重要な意味があった。本研究により、AraC は *in vivo* において LIC においてオートファジーを活性化し、Atg7 の欠損は AraC の薬効を増強することが明らかとなった。マウス白血病モデルにおいて AraC 以外の抗がん剤の薬効が Atg7 の欠損により増強されるかどうかは明らかにされておらず、オートファジー阻害による薬効増強が AraC の細胞障害の機序に関連しているものであるかどうかは今後の解析が待たれる。細胞培養系においては AraC と同様にダウノルビシンやエトポシド等の処理でオートファジーが活性化され、オートファジー阻害によって感受性が増大することが示されており³⁹、これらの薬剤の薬効が *in vivo* においてもオートファジー阻害により増強される可能性

が考えられる。

本研究ではオートファジーは LIC の維持、末梢血白血病細胞の生存および薬剤耐性の点で AML に保護的に働いていることが示されたが、オートファジー阻害が AML 治療に臨床的に役立つかどうかを判断するためには、いくつかの課題が存在している。一つは、*Atg5* または *Atg7* の欠損による白血病マウスの延命効果が、有意ではあるものの顕著ではないという点である。今回の研究では極めて進行が速いマウス白血病モデルを用いたため、オートファジー抑制による延命効果を十分に評価できていないと考えられる。ヒト AML 移植免疫不全マウス等の、よりヒトの AML に近いモデルを用いてオートファジー阻害の効果を検討することで、オートファジー阻害による延命効果の臨床上の重要性を検証できると考えられる。二点目として、正常造血幹細胞の幹細胞性の維持にもオートファジーが重要であることが示されており^{49,54,63}、オートファジー阻害を行うと血液毒性につながる可能性が懸念される。しかしながら、先行研究で見られている正常造血幹細胞の障害はオートファジー欠損後 6-9 週程度で発現している。一方で、白血病マウスモデルにおいてはオートファジー欠損後 1 週間以内に LIC が減少することが本研究では示されており、LIC は正常造血幹細胞よりもオートファジー依存性が高いことが推測され、臨床的には安全域が存在する可能性がある。なお、本研究で用いた白血病マウスモデルにおいては、*Atg5* および *Atg7* は

ドナーマウス由来の造血系細胞のみで欠損しており、全身でのオートファジー阻害の影響を解析できていない点は注意が必要である。オートファジー阻害の安全性については、今後さらなる解析が必要である。三点目として、先行研究により、*Atg5* のヘテロ欠損は MLL-ENL 導入骨髄移植モデルにおいて造白血病能を亢進させることが示されている点があげられる⁶⁴。同報告では、MLL-ENL の導入により作製した白血病細胞株で *Atg5* をホモ欠損すると顕著な細胞死が生じることも示されている。これらの結果を総合すると、オートファジーの完全な欠損は腫瘍細胞の生存や自己複製能を阻害するが、オートファジーの部分的な阻害は逆に MLL-ENL 白血病の悪性度を高めることを示していると考えられる。従って、オートファジー阻害により治療効果を発揮するためには、非常に高い有効性をもつ低分子阻害剤が必要な可能性がある。

上述のような課題は存在するが、オートファジー阻害は白血病の治療において魅力的なコンセプトである。オートファジー欠損は白血病細胞の総数にはあまり影響しないが LIC を減少させる効果が確認されており、従来の AraC やアントラサイクリン系薬剤等の腫瘍量を減少させる薬剤と併用を行うことにより、治療後の再発を抑制する効果を発揮することが期待できる。加えて、末梢血での高いオートファジー依存性を考えると、plerixafor 等の骨髄から末梢血へ細胞を動員する薬剤を用いて白血病細胞のオートファジー依存性を亢進させたうえで、

オートファジー阻害剤により障害するといった治療が効果的である可能性が考えられる。

以上より、本研究ではマウス白血病モデルを用いることにより、オートファジーの *in vivo* での機能を解析し、臨床の骨髄性腫瘍を反映した腫瘍環境条件においてオートファジーが LIC の維持、末梢血での白血病細胞の生存および AraC 耐性を促進していることを明らかにした。LIC の生物学的性質の理解という観点からは、LIC がなぜオートファジーに依存しているのかをより詳細に解析する必要があると考えられる。また、白血病の病態の理解という観点からは、末梢血と骨髄での細胞の性質の相違をもたらす分子生物学的な機序の解明が、興味深い課題であると考えられる。また、オートファジー阻害が AML の治療に有用であるかどうかを明らかにすることが最も重要な課題であり、そのために、よりヒト AML を反映したモデルにおける治療効果の検証や、LIC 維持におけるオートファジーの役割解明、オートファジー阻害の安全域の問題、オートファジー選択的な阻害剤の創製等に取り組んでいく必要があると考えられる。

参考文献

1. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;341(14):1051-1062. doi:10.1056/NEJM199909303411407.
2. Dick JE. Acute myeloid leukemia stem cells. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol 1044. ; 2005:1-5. doi:10.1196/annals.1349.001.
3. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: Current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*. 2009;114(6):1150-1157. doi:10.1182/blood-2009-01-202606.
4. Sievers EL, Larson RA, Stadtmauer EA, Estey E, Löwenberg B, Dombret H, Karanes C, Theobald M, Bennett JM, Sherman ML, Berger MS, Eten CB, Loken MR, Van Dongen JJM, Bernstein ID, Appelbaum FR. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol*. 2001;19(13):3244-3254. doi:10.1080/1042819021000016078.
5. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*. 2006;12(10):1167-1174. doi:10.1038/nm1483.
6. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD, van Rooijen

- N, Weissman IL. CD47 Is an Adverse Prognostic Factor and Therapeutic Antibody Target on Human Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Cell*. 2009;138(2):286-299. doi:10.1016/j.cell.2009.05.045.
7. Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, Busfield SJ, Peoppl AG, Wilkinson L, Guthridge MA, Thomas D, Barry EF, Boyd A, Gearing DP, Vairo G, Lopez AF, Dick JE, Lock RB. Monoclonal Antibody-Mediated Targeting of CD123, IL-3 Receptor α Chain, Eliminates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2009;5(1):31-42. doi:10.1016/j.stem.2009.04.018.
8. Van Rhenen A, Van Dongen GAMS, Kelder A Le, Rombouts EJ, Feller N, Moshaver B, Walsum MS Van, Zweegman S, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ. The novel AML stem cell-associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood*. 2007;110(7):2659-2666. doi:10.1182/blood-2007-03-083048.
9. Grunwald MR, Levis MJ. FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: A review of their efficacy and mechanisms of resistance. *Int J Hematol*. 2013;97(6):683-694. doi:10.1007/s12185-013-1334-8.
10. Shafer D, Grant S. Update on rational targeted therapy in AML. *Blood Reviews*. 2016.

11. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 2007;21(22):2861-2873. doi:10.1101/gad.1599207.
12. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009;43:67-93. doi:10.1146/annurev-genet-102808-114910.
13. Choi AMK, Ryter SW, Levine B. Autophagy in Human Health and Disease. *N Engl J Med.* 2013;368(7):651-662. doi:10.1056/NEJMra1205406.
14. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008;451(7182):1069-1075. doi:10.1038/nature06639.
15. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* 2006;441(7095):885-889. doi:10.1038/nature04724.
16. Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science.* 2008;321(5885):117-120. doi:10.1126/science.1154822.
17. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi

- Y, Tokuhsa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 2004;432(7020):1032-1036.
18. Kabeya Y. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*. 2000;19(21):5720-5728. doi:10.1093/emboj/19.21.5720.
19. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 2000;408(6811):488-492. doi:10.1038/35044114.
20. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol*. 2005;169(3):425-434. doi:10.1083/jcb.200412022.
21. Cheong H, Lu C, Lindsten T, Thompson CB. Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat Biotechnol*. 2012;30(7):671-678. doi:10.1038/nbt.2285.
22. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(12):961-967. doi:10.1038/nrc2254.

23. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 1999;402(6762):672-676. doi:10.1038/45257.
24. Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K, Mizushima N. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev*. 2011;25(8):795-800. doi:10.1101/gad.2016211.
25. Mortensen M, Soilleux EJ, Djordjevic G, Tripp R, Lutteropp M, Sadighi-Akha E, Stranks AJ, Glanville J, Knight S, Jacobsen S-EW, Kranc KR, Simon AK. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med*. 2011;208(3):455-467. doi:10.1084/jem.20101145.
26. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(6):401-410. doi:10.1038/nrc3262.
27. Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H, Bause A, Li Y, Stommel JM, Dell'antonio G, Mautner J, Tonon G, Haigis M, Shirihai OS, Doglioni C, Bardeesy N, Kimmelman AC. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev*. 2011;25(7):717-729. doi:10.1101/gad.2016111.
28. Altman BJ, Jacobs SR, Mason EF, Michalek RD, MacIntyre AN, Coloff JL, Ilkayeva O, Jia W, He Y-WW, Rathmell JC. Autophagy is essential to suppress

- cell stress and to allow BCR-Abl-mediated leukemogenesis. *Oncogene*. 2011;30(16):1855-1867. doi:10.1038/onc.2010.561.
29. Rosenfeldt MT, O'Prey J, Morton JP, Nixon C, MacKay G, Mrowinska A, Au A, Rai TS, Zheng L, Ridgway R, Adams PD, Anderson KI, Gottlieb E, Sansom OJ, Ryan KM. P53 Status Determines the Role of Autophagy in Pancreatic Tumour Development. *Nature*. 2013;504(7479):296-300. doi:10.1038/nature12865.
30. Wei Y, Zou Z, Becker N, Anderson M, Sumpter R, Xiao G, Kinch L, Koduru P, Christudass CS, Veltri RW, Grishin N V., Peyton M, Minna J, Bhagat G, Levine B. EGFR-mediated beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance. *Cell*. 2013;154(6):1269-1284. doi:10.1016/j.cell.2013.08.015.
31. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(12):1004-1010. doi:10.1038/nrm2529.
32. Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(2):81-94. doi:10.1038/nrm3735.
33. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, Thomas-Tikhonenko A, Thompson CB. Autophagy inhibition enhances therapy-induced

- apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest.* 2007;117(2):326-336. doi:10.1172/JCI28833.
34. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, Helgason GV, Soliera AR, Ronchetti M, Galavotti S, Young KW, Selmi T, Yacobi R, Van Etten RA, Donato N, Hunter A, Dinsdale D, Tirrò E, Vigneri P, Nicotera P, Dyer MJ, Holyoake T, Salomoni P, Calabretta B. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest.* 2009;119(5):1109-1123. doi:10.1172/JCI35660.
35. Sehgal A, R, König H, Johnson DE, Tang D, Amaravadi RK, Boyiadzis M, Lotze MT. You eat what you are: autophagy inhibition as a therapeutic strategy in leukemia. *Leukemia.* 2014;29(3):517-525. doi:10.1038/leu.2014.349.
36. Altman JK, Szilard A, Goussetis DJ, Sassano A, Colamonici M, Gounaris E, Frankfurt O, Giles FJ, Eklund EA, Beauchamp EM, Platanias LC. Autophagy is a survival mechanism of acute myelogenous leukemia precursors during dual mTORC2/mTORC1 targeting. *Clin Cancer Res.* 2014;20(9):2400-2409. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3218.
37. Torgersen ML, Engedal N, Bøe SO, Hokland P, Simonsen A. Targeting autophagy potentiates the apoptotic effect of histone deacetylase inhibitors in

- t(8;21) AML cells. *Blood*. 2013;122(14):2467-2476. doi:10.1182/blood-2013-05-500629.
38. Bosnjak M, Ristic B, Arsikin K, Mircic A, Suzin-Zivkovic V, Perovic V, Bogdanovic A, Paunovic V, Markovic I, Bumbasirevic V, Trajkovic V, Harhaji-Trajkovic L. Inhibition of mTOR-dependent autophagy sensitizes leukemic cells to cytarabine-induced apoptotic death. *PLoS One*. 2014;9(4):e94374. doi:10.1371/journal.pone.0094374.
39. Palmeira-Dos-Santos C, Pereira GJS, Barbosa CM V, Jurkiewicz A, Smaili SS, Bincoletto C. Comparative study of autophagy inhibition by 3MA and CQ on Cytarabine-induced death of leukaemia cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014;140(6):909-920. doi:10.1007/s00432-014-1640-4.
40. Zhao X, Liu J, Peng M, Liu J, Chen F. BMP4 is Involved in the Chemoresistance of Myeloid Leukemia Cells Through Regulating Autophagy-Apoptosis Balance. *Cancer Invest*. 2013;31(8):555-562. doi:10.3109/07357907.2013.834925.
41. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell*. 2004;15(3):1101-1111. doi:10.1091/mbc.E03-09-0704

42. Ruzankina Y, Pinzon-Guzman C, Asare A, Ong T, Pontano L, Cotsarelis G, Zediak VP, Velez M, Bhandoola A, Brown EJ. Deletion of the Developmentally Essential Gene ATR in Adult Mice Leads to Age-Related Phenotypes and Stem Cell Loss. *Cell Stem Cell*. 2007;1(1):113-126. doi:10.1016/j.stem.2007.03.002.
43. Arai S, Yoshimi A, Shimabe M, Ichikawa M, Nakagawa M, Imai Y, Goyama S, Kurokawa M. Evi-1 is a transcriptional target of MLL oncoproteins in hematopoietic stem cells. *Blood*. 2010;117(23):6304-6315. doi:10.1182/blood-2009-07-234310.
44. Takeshita M, Ichikawa M, Nitta E, Goyama S, Asai T, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M. AML1-Evi-1 specifically transforms hematopoietic stem cells through fusion of the entire Evi-1 sequence to AML1. *Leukemia*. 2008;22(6):1241-1249. doi:10.1038/leu.2008.53.
45. Kitamura T, Koshino Y, Shibata F, Oki T, Nakajima H, Nosaka T, Kumagai H. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: Powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol*. 2003;31(11):1007-1014. doi:10.1016/j.exphem.2003.07.005.
46. Reed SE, Staley EM, Mayginnes JP, Pintel DJ, Tullis GE. Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means

- of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol Methods*. 2006;138(1-2):85-98. doi:10.1016/j.jviromet.2006.07.024.
47. Krivtsov A V., Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG, Golub TR, Armstrong SA. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL–AF9. *Nature*. 2006;442(7104):818-822. doi:10.1038/nature04980.
48. Somervaille T, Cleary M. Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid. *Cancer Cell*. 2006;4:257-268. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610806002765>.
49. Liu F, Lee JY, Wei H, Tanabe O, Engel JD, Morrison SJ, Guan JL. FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells. *Blood*. 2010;116(23):4806-4814. doi:10.1182/blood-2010-06-288589.
50. Sánchez-Aguilera A, Arranz L, Martín-Pérez D, García-García A, Stavropoulou V, Kubovcakova L, Isern J, Martín-Salamanca S, Langa X, Skoda RC, Schwaller J, Méndez-Ferrer S. Estrogen signaling selectively induces apoptosis of hematopoietic progenitors and myeloid neoplasms without harming steady-state hematopoiesis. *Cell Stem Cell*. 2014;15(6):791-804. doi:10.1016/j.stem.2014.11.002.

51. Higashi AY, Ikawa T, Muramatsu M, Economides AN, Niwa A, Okuda T, Murphy AJ, Rojas J, Heike T, Nakahata T, Kawamoto H, Kita T, Yanagita M. Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreERT2. *J Immunol.* 2009;182:5633-5640. doi:10.4049/jimmunol.0802413.
52. Shvets E, Fass E, Elazar Z. Utilizing flow cytometry to monitor autophagy in living mammalian cells. *Autophagy.* 2008;4(5):621-628. doi:5939 [pii] ET - 2008/04/01.
53. Guan JL, Simon AK, Prescott M, Menendez J a., Liu F, Wang F, Wang C, Wolvetang E, Vazquez-Martin A, Zhang J. Autophagy in stem cells. *Autophagy.* 2013;9(6):830-849. doi:10.4161/auto.24132.
54. Mortensen M, Ferguson DJP, Edelmann M, Kessler B, Morten KJ, Komatsu M, Simon a K. Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(2):832-837. doi:10.1073/pnas.0913170107.
55. Pua HH, Dzhagalov I, Chuck M, Mizushima N, He Y-W. A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *J Exp Med.* 2007;204(1):25-31. doi:10.1084/jem.20061303.

56. Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, Schumacher A, Prchal JT, Chen M, Wang J. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature*. 2008;454(7201):232-235. doi:10.1038/nature07006.
57. Dash AB, Williams IR, Kutok JL, Tomasson MH, Anastasiadou E, Lindahl K, Li S, Van Etten R a, Borrow J, Housman D, Druker B, Gilliland DG. A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(11):7622-7627. doi:10.1073/pnas.102583199.
58. Sato T, Goyama S, Kataoka K, Nasu R, Tsuruta-Kishino T, Kagoya Y, Nukina A, Kumagai K, Kubota N, Nakagawa M, Arai S, Yoshimi A, Honda H, Kadowaki T, Kurokawa M. Evi1 defines leukemia-initiating capacity and tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia. *Oncogene*. 2014;33(42):5028-5038. doi:10.1038/onc.2014.108.
59. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, Schneider JW, Zhang CC, Sadek HA. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. 2010;7(3):380-390. doi:10.1016/j.stem.2010.07.011.
60. Skrtic M, Sriskanthadevan S, Jhas B, Gebbia M, Wang X, Wang Z, Hurren R,

- Jitkova Y, Gronda M, Maclean N, Lai CK, Eberhard Y, Bartoszko J, Spagnuolo P, Rutledge AC, Datti A, Ketela T, Moffat J, Robinson BH, Cameron JH, Wrana J, Eaves CJ, Minden MD, Wang JCY, Dick JE, Humphries K, Nislow C, Giaever G, Schimmer AD. Inhibition of Mitochondrial Translation as a Therapeutic Strategy for Human Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*. 2011;20(5):674-688. doi:DOI 10.1016/j.ccr.2011.10.015.
61. Leveque-El Mouttie L, Vu T, Lineburg KE, Kuns RD, Bagger FO, Teal BE, Lor M, Boyle GM, Bruedigam C, Mintern JD, Hill GR, MacDonald KPA, Lane SW. Autophagy is required for stem cell mobilization by G-CSF. *Blood*. 2015;125(19):2933-2936. doi:10.1182/blood-2014-03-562660.
62. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, Adhihetty PJ, Adler SG, Agam G, Agarwal R, Aghi MK, Agnello M, Agostinis P, Aguilar PV, Aguirre-Ghiso J, Airoidi EM, Ait-Si-Ali S, Akemat ZS. Guidelines for use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356.
63. Warr MR, Binnewies M, Flach J, Reynaud D, Garg T, Malhotra R, Debnath J, Passequé E. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic

stem cells. *Nature*. 2013;494(7437):323-327. doi:10.1038/nature11895.

64. Watson A, Riffelmacher T, Stranks a, Williams O, De Boer J, Cain K, MacFarlane M, McGouran J, Kessler B, Khandwala S, Chowdhury O, Puleston D, Phadwal K, Mortensen M, Ferguson D, Soilleux E, Woll P, Jacobsen S, Simon A. Autophagy limits proliferation and glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia. *Cell Death Discov*. 2015;1(June):15008. doi:10.1038/cddiscovery.2015.8.

謝辞

本研究を遂行し、学位論文をまとめるにあたり非常に多くのご支援とご指導を賜りました指導教官である東京大学医学部附属病院血液・腫瘍内科 黒川峰夫教授に深く感謝しております。研究全般にわたりまして多大なご支援、ご指導を賜りました東京大学医学部附属病院血液・腫瘍内科の片岡圭亮博士、佐藤智彦博士、古屋淳史博士に深く感謝しております。本研究の遂行においてご協力、ご助言いただきました東京大学医学部附属病院血液・腫瘍内科の森田剣博士、鶴田貴子博士に心より感謝申し上げます。東京大学医学部附属病院血液・腫瘍内科の植本文恵様、遠山瑠美様には本研究の遂行において多大なご助力をいただき、深く感謝いたします。

本研究を遂行する機会を与えて下さり、また温かいご支援を賜りました協和発酵キリン株式会社の中西聡様、國里篤志様、小池正道様、高橋健様、元木一宏様、甲斐正之様、中村和靖様に厚く御礼申し上げます。

Atg7 コンディショナルノックアウトマウスの寄託に関しまして、新潟大学大学院医歯学総合研究科の小松雅明教授に深く感謝いたします。*Atg5* コンディショナルノックアウトマウスおよび **GFP-LC3** マウスの寄託に関しまして、東京大学大学院医学系研究科の水島昇教授に深く感謝いたします。**plat-E** パッケージ

ジング細胞の提供をして下さりました東京大学医科学研究所先端医療研究センターの北村俊夫教授に心からお礼申し上げます。MLL-ENL cDNA を提供して下さいました三重大学大学院医学系研究科の野阪哲哉教授、小埜良一講師に心からお礼申し上げます。NUP98-HOXA9 cDNA を提供して下さいましたがん研究所の中村卓郎博士に心からお礼申し上げます。