

## 論文の内容の要旨

論文題目：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)

氏名：住友嘉樹

### 背景、目的

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) は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。AML で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再発する可能性が高く、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。治療後の再発原因として、白血病細胞集団中に leukemia-initiating cell (LIC) と呼ばれる未分化で薬剤抵抗性を有する一群が存在することが考えられており、LIC の生物学的な性質を理解することで、LIC を除去することにより AML の治療後再発を抑制することが可能になると期待される。

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。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おり、飢餓状態においては、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。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。酵母の遺伝学を用いた研究をきっかけとして autophagy-related 5 (ATG5) や ATG7 を含むオートファジーの進行に必須な一群の遺伝子が同定されている。

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。各種のオートファジー関連遺伝子 (*Becn1, Atg5, Atg7*) 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判明した。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、一度成立したがん組織においては、オートファジーは代謝的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考えられている。しかし、すべてのがんにおいて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オートファジーの機能が異なっていることが示唆されている。加えて、オートファジーは細胞内のストレスを緩

和して細胞の生存を保つ働きを有しており、抗がん剤や放射線照射等の治療によって生じる細胞内の各種ストレスを緩和しがん細胞を保護していることが先行研究により明らかとなっている。

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。一方で、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。従って、ヒトのがんを反映したモデルにおいてオートファジーの役割を評価することが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、主に抗がん剤暴露時の耐性の観点から研究され、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環境に強く依存すると考えられ、実際の AML 患者の生体内でも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。そこで、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、マウス白血病モデルにおいて *Atg5* あるいは *Atg7* をノックアウトすることで、オートファジーが白血病の病態に及ぼす影響を解析した。

## 結果、考察

### 1、オートファジーは MLL-ENL 白血病マウスモデルにおいて機能的な LIC を維持し白血病の進展を支持する

*Atg5* および *Atg7* を tamoxifen (TAM) 誘導性にノックアウト可能な MLL-ENL 白血病マウスモデルを作製した。*Atg5* および *Atg7* の欠損は白血病マウスの生存を延長することが確認された。その時、*Atg5* および *Atg7* の欠損により骨髄中の LIC の頻度が減少しており、細胞死の亢進を伴っていることが確認された。加えて、*Atg7* の欠損により LIC 中でミトコンドリアの蓄積と活性酸素種 (ROS) の増加が確認された。これらの表現型は LIC のみで観察され、比較的分化した白血病細胞では観察されなかった。次に、*Atg7* を欠損した白血病細胞の白血病再構築能を限界希釈移植法により調べたところ、*Atg7* を欠損することにより、白血病細胞中に存在する機能的

な LIC の頻度が低下することが明らかとなった。以上のことから、MLL-ENL 白血病マウスモデルにおいて、オートファジーは骨髄中に存在する機能的な LIC の維持に、ミトコンドリアの分解による ROS 産生抑制を介して寄与していることが示唆された。

## 2、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した

*Atg5* および *Atg7* を欠損した MLL-ENL 白血病マウスは、骨髄中の総白血球細胞数が大きく減少しない一方で、末梢血の白血球数が顕著に減少することが判明した。末梢血の環境が白血病細胞のオートファジーへの依存性を高めていると考え、*Atg5* および *Atg7* を欠損した MLL-ENL 白血病マウスの末梢血におけるアポトーシスを解析した。その結果、オートファジー欠損により末梢血白血病細胞でアポトーシスが亢進することが明らかとなった。一方、骨髄中の白血病細胞はオートファジー欠損により影響を受けなかった。さらに、末梢血白血病細胞におけるオートファジー活性を解析したところ、末梢血白血病細胞は骨髄白血病細胞と比較して、オートファジーの活性化マーカーである LC3A-II の発現量が高く、また、電子顕微鏡による観察の結果、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。加えて、オートファジーの分解基質である GFP-LC3 を用いた解析の結果、末梢血白血病細胞は骨髄白血病細胞と比較して GFP-LC3 の発現が低く、オートファジーによる分解の亢進が示唆された。また、末梢血白血病細胞と骨髄白血病細胞をそれぞれ *ex vivo* で培養すると LC3A-II の発現量に差がなくなることから、末梢血でのオートファゴソーム数の変化は細胞非自律的な機序で引き起こされていることが判明した。以上から、末梢血と骨髄の環境の違いにより末梢血白血病細胞においてオートファジーへの依存度が増大していることが示唆された。なお、正常の骨髄球系細胞では末梢血でのオートファジーへの依存度の増大は確認されず、白血球細胞に特異的な現象であることが判明した。

## 3、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促進する

MLL-ENL 以外の白血病モデルでのオートファジーの役割を検討するため、BCR-ABL および NUP98-HOXA9 誘導性の CML-BC モデルマウスにおいて *Atg7* を欠損させ、表現型を解析した。その結果、*Atg7* の欠損によりマウスの生存が延長し、また、骨髄中の LIC の頻度が減少することが判明した。加えて、*Atg7* の欠損により末梢血白血病細胞がアポトーシスを起こすことが明らかとなった。以上のことから、CML-BC 白血病モデルマウスにおいてもオートファジーは白血病の進展、LIC の維持および末梢血白血病細胞の生存を促進していることが示された。

## 4、オートファジーの欠損は MLL-ENL 白血病マウスモデルにおいてシタラビンによる治療効果を増強した

MLL-ENL 白血病モデルマウスにおけるオートファジーの薬剤耐性への関与を解明するため、MLL-ENL 白血病モ

デルマウスにおいて AML の標準治療薬であるシタラビン (AraC) を投与し、オートファジーの活性を GFP-LC3 により測定した。その結果、AraC の投与により LIC においてのみ GFP-LC3 の発現低下が観察された。このことは、AraC 投与によって LIC のみでオートファジーが活性化していることを示すと考えられる。次に、AraC の投与と同時に *Atg7* を欠損させ、その影響を解析した。その結果、AraC 投与による白血病細胞数の減少、LIC の頻度低下および生存延長効果が *Atg7* の欠損により増強されることが明らかとなった。また、末梢血白血病細胞において、AraC 投与によるアポトーシスの誘導効果が *Atg7* の欠損により増強されることが示された。以上から、オートファジーは MLL-ENL 白血病マウスモデルにおいて AraC への治療抵抗性を促進していることが示された。

本研究ではオートファジーによる白血病の進展、LIC の維持および薬剤抵抗性の促進作用が、白血病モデルマウスを用いた解析により明らかとなった。オートファジーの阻害がヒト AML に対して有効であるかについては、よりヒト AML に近いモデルを用いた薬効評価や、正常造血幹細胞やその他の正常組織に対する安全性の検証を今後実施していく必要があるものの、本研究の結果からオートファジー阻害は AML の治療において有望なコンセプトであると考えられる。