

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09466

研究課題名(和文) 白血病幹細胞におけるオートファジーの機能的意義の解明と白血病治療への応用の検討

研究課題名(英文) A study on the functional significance of autophagy in leukemic stem cells.

研究代表者

渡谷 久美(中崎久美)(Watadani, Kumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70550432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞内タンパク質や細胞小器官の分解を担う機構であり、種々の固形腫瘍がオートファジーに依存した増殖を示していることが判明している。一方で、急性骨髄性白血病の病態、特に再発の主要な原因と考えられている白血病幹細胞の機能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。マウスモデルにより白血病の進展および幹細胞の維持にオートファジーが必須であることが見出されており、ヒトの白血病細胞についても細胞増殖とオートファジーの関係について検討し、オートファジーに関連すると考えられる遺伝子の発現について、白血病幹細胞分画とそれ以外の白血病細胞分画において遺伝子発現に変化がないか検討した。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a mechanism responsible for decomposition of intracellular proteins and organelles, and it has been found that various solid tumors show autophagy-dependent proliferation. On the other hand, the role of autophagy in the pathology of acute myeloid leukemia, in particular the function of leukemia stem cells considered to be the major cause of recurrence has not been elucidated.

Autophagy was found to be essential for development of leukemia and maintenance of stem cells by a mouse model. Regarding the human leukemia cells as well, we examined the relationship between cell proliferation and autophagy, and investigated whether there is a change in gene expression in leukemic stem cell fraction and other leukemic cell fractions on expression of genes considered to be related to autophagy.

研究分野：急性骨髄性白血病

キーワード：autophagy

1. 研究開始当初の背景

本研究は、白血病幹細胞におけるオートファジーの役割を理解し、オートファジーを標的とした白血病治療の可能性を示すことを目指したものである。

白血病の根治のためには、白血病幹細胞を根絶する必要がある。

急性骨髄性白血病は米国、欧州、日本あわせて毎年約28,000人が罹患する疾患である。多くの症例では化学療法が奏功し寛解に至るものの高い割合で再発し、5年生存率は若年者で40-50%、高齢者で10%以下と予後不良であることから(Genes Cancer 2011; 2: 95-107)、急性骨髄性白血病の再発を妨げる治療法の開発には大きな社会的ニーズが存在する。近年、白血病をはじめとする複数の悪性腫瘍においてがん幹細胞の存在が確認されつつあり、多くの悪性腫瘍で極少数の自己複製能を持つがん幹細胞を頂点とする幹細胞システムが形成されていると考えられている (Semin Cancer Biol 2010; 20: 71-76)。白血病幹細胞は抗がん剤に対して抵抗性を示すことから再発の主要な原因と考えられており、白血病幹細胞の根絶することで再発率を低下させることができると考えられている。そのため、白血病幹細胞を標的とした新たな治療戦略の創出が望まれる。

オートファジーはがん治療の標的候補として有望である。

オートファジーは、細胞を構成する蛋白質や細胞内小器官などの自己成分をリソソームで分解・再利用する為の仕組みであり(Cell 2011; 147: 728)、近年様々な疾患の発症・進行に寄与することが示唆されている。

オートファジーのがんにおける役割はがん種や細胞の性質により異なると考えられる。

オートファジーは造血幹細胞の維持に必要である

オートファジーに必須の遺伝子である ATG7 を欠失するマウスでは、造血幹細胞の自己複

製能の低下を認め、逆に骨髄増殖性腫瘍と類似する病態を起し死に至ることが報告されている(J Exp Med 2011; 208: 455)。また、同様に、オートファジーの開始に重要な FIP200 を胎生期に欠失マウスでも同様の病態を呈する(PNAS 2010; 107: 832)。加えて造血幹細胞は、骨髄前駆細胞とは異なり、代謝ストレスにさらされた際に FOXO3A による転写制御を介してオートファジーが誘導されることが明らかにされている(Nature 2013; 494: 323)。これらの報告から、オートファジーは造血幹細胞の維持および骨髄性増殖性腫瘍の発症に重要な役割を果たすことが示唆される。

急性骨髄性白血病、白血病幹細胞におけるオートファジーの重要性は不明である

急性骨髄性白血病においては、白血病の発症・維持におけるオートファジーの寄与を解析した報告はなく、その重要性は明らかにされていないが、これまでに当該研究者が所属する研究室では既に末梢血中の急性骨髄性白血病細胞の生存にオートファジーが重要な役割を果たしていることを示した。また、治療に伴うオートファジーの役割については、オートファジーが治療抵抗性に寄与するという報告と、治療による細胞障害に必要であるという報告が混在しており (Blood 2012; 119: 6089, Blood 2012; 120: 858, Cell Death Differ 2008; 15: 1712)、オートファジーを阻害することが急性骨髄性白血病の治療に有効かどうかは不明である。加えて、白血病幹細胞におけるオートファジーの重要性は未だ明らかにされおらず、本研究での解析を目指している。

2. 研究の目的

白血病幹細胞は抗がん剤に対して抵抗性を示すことから白血病再発の主要な原因と考えられており、白血病治療の為に白血病幹細胞の根絶が必要である。オートファジーは、細胞を構成する蛋白質や細胞内小器官などの自己成分をリソソームで分解・再利用するため

の仕組みであり、近年様々な疾患、特にがん
とオートファジーの関係は注目されているが、
白血病幹細胞などのがん幹細胞において果
たす役割は明らかではない。その為本研究で
は、1)白血病マウスモデルを利用し、オート
ファジー機構の構成分子である Atg5 ならびに
Atg7 を誘導的に欠失させることにより、白血
病幹細胞におけるオートファジーの活性化状
態や機能的意義を明らかにすること、2)オ
ートファジー阻害薬を用いて、これを標的
とした白血病治療の可能性を検討すること
を目的とする。

オートファジーは種々のがんの進展に必要
な点および造血幹細胞の維持に必要な点
から、白血病幹細胞は定常状態また治療
時にオートファジーに高度に依存している
ことが推測され、オートファジーを阻害す
ることにより白血病幹細胞を障害できる
ことが期待される。そのため、本研究では
ヒト白血病を反映したマウスモデルにお
いてオートファジーの役割を解析すること
を目的とする。

3. 研究の方法

白血病の進展におけるオートファジーの必
要性を検証する為、オートファジーに不可
欠な分子である ATG7 欠失マウスを用い
て白血病モデルを作製し、オートファジー
欠損が白血病発症や生存期間に与える影
響を解析し、2次移植により白血病発症
能も評価する。同時に白血病幹細胞にお
ける細胞周期・アポトーシス・ミトコン
ドリア量、ストレス応答遺伝子の遺伝子
発現を評価する。また申請者の所属する
研究室ですでに特定の白血病遺伝子の導
入により白血病幹細胞におけるオート
ファジー活性が増加することを見出して
いた(Blood 2016; 128: 1264)。これを利用
し、オートファジー活性を可視化可能な
GFP-LC3 マウスを用いて、マウス白血
病モデルを作成し、白血病幹細胞分画
におけるオートファジーの活性化状態
を観察する。上記の白血病マウスモデル

において、オートファジー機構に影響を
与える低分子化合物を投与し、白血病
に対する治療効果を検討する。

4. 研究成果

急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia,
AML)マウスモデルを用いて、AML の進展
および幹細胞の維持にオートファジーが
必須であることを見出した。

具体的には、オートファジーに必須な遺
伝子である Atg7 のコンディショナルノ
ックアウトマウスの骨髄を採取し、AML
の原因となる融合遺伝子 MLL-ENL を
導入してマウスへ移植することで、Atg7
を欠損させることのできるマウス AML
モデルを作製した。当マウスモデルにお
いて AML を発症後に Atg7 を欠損すると
マウスの生存が延長することから、AML
の進展における Atg7 の重要性が個体
レベルで明らかとなった。さらに詳細な
解析を実施し、Atg7 の欠損により白血
病幹細胞の頻度・機能が低下している
ことが示された。同じくオートファジー
に必須な遺伝子である Atg5 をマウス
AML モデルにて欠損させた場合も、マ
ウスの生存延長および白血病幹細胞頻
度の低下が生じており、上記の知見は
オートファジー一般に適応できること
が示唆された。

オートファジーの活性を測定する目的
で、オートファジーによって分解され
るタンパク質 GFP-LC3 を発現するト
ランスジェニックマウスを用いてマウス
AML モデルを作製し、解析を実施した。
その結果、AML 幹細胞は正常造血幹
前駆細胞と比較して GFP-LC3 の発現
が顕著に低いことが明らかとなった。
このことは、白血病幹細胞においてオ
ートファジーの活性化が起こっている
ことを示唆するものである。さらに、
オートファジーによる白血病幹細胞維
持の機序解析として、ミトコンドリア
および活性酸素種の定量を実施した
ところ、Atg7 を欠損

した白血病幹細胞においてミトコンドリアの蓄積と活性酸素種の増加が観察され、同時に細胞死の亢進が示された。

AML 骨髄検体を用いて、オートファジーを誘導し、細胞の増殖に与える影響について解析した。単核球分離し、CD34 陽性・陰性を分別し、リソソームとオートファゴソームの融合を阻害することでオートファジーの経路を阻害する目的でクロロキンを投与した。Cyto-ID オートファジー検出キットを用いた flux assay を行ったが、CD34 陽性・陰性で有意差は得られなかった。CD34 分画をさらに CD38 陽性・陰性で区別し、クロロキンと、V 型 ATPase 特異的阻害剤(Bafilomycin A1)を添加し培養、細胞増殖への影響を検討したが。細胞増殖に対する差は検出されなかった。

次に、急性骨髄性白血病患者骨髄保存検体における CD34 陽性 CD38 陽性細胞・CD34 陽性 CD38 陰性細胞の遺伝子発現量について、オートファジーに関連することが示唆される遺伝子、細胞周期やシグナル伝達に関わる遺伝子などについて mRNA 発現量を比較した。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡谷 久美 (中崎 久美) (Watadani, Kumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 70550432