

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 籠谷 勇紀

本研究は、急性骨髄性白血病の白血病幹細胞に対する新規治療標的の同定を目的として、特に転写因子 NF- $\kappa$ B に焦点を当て、白血病マウスモデルを用いて白血病幹細胞における NF- $\kappa$ B 経路の活性、活性化メカニズム、同経路を修飾した際の白血病進行に及ぼす影響を解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. 急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML)において特徴的に見られる融合遺伝子をレトロウイルスによりマウスの骨髄細胞に導入し、放射線照射マウスに移植する実験系を用いて、3種類の AML マウスモデルを作成した (MLL-ENL, MOZ-TIF2, BCR-ABL+Nup98-HoxA9)。各モデルで白血病幹細胞 (leukemia-initiating cell: LIC) に富む分画、ほとんど含まない分画(non-LIC)を limiting dilution transplantation assay により同定し、各細胞集団において主要な NF- $\kappa$ B サブユニットである p65 の細胞内局在を観察したところ、いずれのモデルにおいても LIC で p65 の著明な核内移行が観察された。これに対し、正常骨髄における造血幹細胞 (hematopoietic stem cell: HSC)、前駆細胞、白血病細胞における non-LIC では p65 が主に細胞質に偏在しており、LIC における特異的な NF- $\kappa$ B 経路の活性化が示された。
2. LIC、HSC の遺伝子発現プロファイルを網羅的に比較し、LIC において *TNF* の発現が亢進していることを見出した。TNF- $\alpha$  に対する中和抗体を加えると LIC における p65 の核内移行が有意に減弱したことから、LIC が TNF- $\alpha$  の autocrine 作用により NF- $\kappa$ B 活性を維持していることを示した。逆に白血病細胞に I $\kappa$ B $\alpha$  の dominant negative mutant を導入して NF- $\kappa$ B 活性を抑制することで、LIC の *TNF* の発現が減少したことから、同細胞において NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$  によるポジティブフィードバック回路が働いていることが示された。
3. LIC に TNF- $\alpha$  に対する shRNA, また I $\kappa$ B $\alpha$  の dominant negative mutant を導入したところ、in vitro において白血病細胞の増殖能、コロニー形成能の低下、また in vivo の系においても放射線照射マウスに移植した際に有意な白血病発症の遅延・生存の延長を認めたことから、LIC における NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$  によるポジティブフィードバック回路が白血病進行に重要な役割を担うことが示された。
4. LIC, non-LIC の比較においてプロテアソーム活性が LIC で顕著に高く、これにより LIC での I $\kappa$ B $\alpha$  の分解能の亢進、TNF- $\alpha$  の刺激下における NF- $\kappa$ B のより顕著な核内移行が見られることが考えられた。またこの所見と合致して、LIC は non-LIC と比較しプロテアソーム阻害剤に対しより強い感受性を示した。
5. 白血病細胞に I $\kappa$ B $\alpha$  に対する shRNA を導入し、NF- $\kappa$ B 活性を強制的に亢進させたところ

ろ、白血病骨髄中の LIC 分画割合が有意に増加し、またこの白血病骨髄細胞中の LIC frequency を limiting dilution transplantation assay により同定したところ、コントロールと比較して有意に増加していた。従って NF- $\kappa$ B 活性の亢進により白血病幹細胞分画の増大が起こることが示された。

6. AML 患者検体を用いて、NF- $\kappa$ B 活性、TNF- $\alpha$ 分泌能を解析した。多くの症例で正常 HSC と比較し、LIC (CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>分画で定義)における NF- $\kappa$ B の活性化、TNF- $\alpha$ 分泌能の亢進が観察され、また症例ごとの比較において両者は正の相関を示したことから、ヒト AML 細胞中の LIC においても NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$ のポジティブフィードバック回路が働いていることが示唆された。

以上、本論文は急性骨髄性白血病の白血病幹細胞が TNF- $\alpha$ の自己分泌、高いプロテアソーム活性を介して NF- $\kappa$ B 経路の恒常的活性化を維持していることを明らかにした。本研究はこれまで未知であった急性骨髄性白血病における NF- $\kappa$ B 経路の活性化機構の解明に加え、マウスモデルを用いた *in vivo* の系で NF- $\kappa$ B 経路の抑制が白血病進行抑制に有効であることを示しており、同疾患の新規治療法の開発に対しても重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。