



Autophagy is required for cell survival under
L-asparaginase-induced metabolic stress in acute
lymphoblastic leukemia cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-06-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高橋, 寛吉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3200

博士(医学) 高橋 寛吉

論文題目

Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells

(オートファジーは急性リンパ性白血病細胞において L-アスパラギナーゼ誘導性代謝ストレス下での細胞生存に必要である)

論文の内容の要旨

[はじめに]

急性リンパ性白血病(ALL)では、これまで多剤併用化学療法により治療成績の改善が図られてきた。しかしながら難治例や再発例における長期生存割合は30~40%と頭打ちであり、依然予後不良な疾患である。L-アスパラギナーゼ(L-asp)はタンパク質合成に必須のアスパラギンを枯渇させることにより細胞死を誘導し、ALL治療のキードラッグとなっている。L-asp に対して低感受性を示す患者では治療成績が有意に低下することが報告されており、そのメカニズムの解明と克服は ALL 治療の大きな課題となっている。一方、オートファジーはリソソームによる細胞内成分の自食分解系であり、主な役割としてアミノ酸欠乏時にオートファジーが活性化してアミノ酸を供給すること(アミノ酸供給)、傷害を受けたミトコンドリアなどの細胞内小器官をクリアランスし正常な状態を保つこと(恒常性維持)の二つが知られている。様々ながんにおいてオートファジー研究が進んでいるが、ALL 細胞におけるオートファジーの役割は未解明な点が多い。そこで本研究では ALL 細胞における L-asp 投与時のオートファジー機能やオートファジー阻害薬併用時の効果の有無および分子メカニズムを検討した。

[材料ならびに方法]

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞遺伝(稲澤譲治研究室)との共同研究を行った。ALL 細胞株や試薬、実験動物は市販のものをを用い、ALL 臨床検体、動物実験は浜松医科大学(承認番号24-284)、東京医科歯科大学(承認番号2010-5-2)の倫理委員会の承認を得て行った。

[結果]

ALL 細胞における L-asp 投与時の分子動態を調べるため、マイクロアレイ解析、細胞外フラックスアナライザー解析を行った。L-asp 投与時には解糖系、クエン酸回路、酸化リン酸化の活性低下が認められ、代謝機能が著しく減弱するとともにミトコンドリア機能が障害されていた。次に L-asp 投与下でオートファジーが誘導されることをウェスタンブロット、蛍光免疫染色法、電子顕微鏡を用いて確認した。この L-asp 誘導性オートファジーの機能を調べるため、まず液体クロマトグラフィー質量分析法を用いて細胞内アミノ酸濃度を測定した。リソソーム阻害によりオートファジーを抑制するクロロキンを L-asp に併用したが、L-asp 関連アミノ酸の細胞内濃度の変化は認められなかった。そこでミトコンドリア膜電位を測定すると、L-asp とクロロキンの併用時に障害性ミトコ

ンドリアを有する細胞の割合が増加し、かつ障害性ミトコンドリアから産生される活性酸素も有意に増加していた。以上より、L-asp 誘導性オートファジーが恒常性維持において重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、オートファジー阻害下 ALL 細胞において、L-asp の殺細胞効果の増強ならびにアポトーシス細胞死誘導が惹起されることを確認した。L-asp とクロロキンの併用効果は L-asp 耐性 ALL 細胞株においても認められた。また ALL 細胞移植モデルマウスを用いた解析では L-asp とクロロキンの併用群で有意に生存期間の延長を認め、動物実験においても L-asp とオートファジー阻害薬による併用療法の有効性が示された。次に、この併用療法効果における分子メカニズムを解明するにあたり、活性酸素の蓄積に着目した。活性酸素阻害薬を投与すると L-asp とクロロキンの併用効果がキャンセルされた。また活性酸素の過剰な蓄積が DNA ダメージを惹起し p53 タンパク質発現が誘導されること、この p53 は活性酸素を更に発生させるような環境を作り「活性酸素-p53 ループ」が形成され、最終的に p53 を介したアポトーシス細胞死が誘導されることも明らかにできた。p53 をコードする遺伝子 TP53 の変異を有する ALL 細胞では L-asp とクロロキンの併用効果を認めなかったが、これらの細胞にアデノウイルスを用いて野生型 p53 を発現させると併用効果を認めた。以上より、L-asp とオートファジー阻害薬の併用療法において p53 が重要な役割を果たすことを明らかにした。

[考察]

本研究により、L-asp 投与下 ALL 細胞では、オートファジーは障害性ミトコンドリア除去と活性酸素蓄積の抑制による恒常性維持において細胞生存に寄与するとともに、L-asp とオートファジー阻害薬の併用療法の効果の発現には正常な p53 が必須であることを明らかにした。小児 ALL においては変異 TP53 の出現頻度は 6~8% であり、大部分の患者において本併用療法が有効であると考えられる。

[結論]

L-asp とオートファジー阻害薬の併用療法は p53 を介した細胞死誘導の惹起による相乗効果を発揮する。TP53 遺伝子の変異解析は本併用療法を行うべき患者層別化に有用なコンパニオン診断としても期待され、その活用は小児 ALL におけるプレシジョン医療の発展に寄与するものと考えられる。