

論文の内容の要旨

論文題目 骨髄異形成症候群における、腫瘍細胞による正常顆粒球の分化抑制効果の解析
氏名 徳重 淳二

骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndromes: MDS) は造血幹細胞の質的異常から造血系が異常クローンに置換される後天性造血障害であり、一系統以上の血球減少、形態学的異形成、急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia: AML) への進展を特徴とする、不均一な疾患群である。低リスク MDS は腫瘍細胞の増殖傾向は比較的弱く造血不全が主体であり、特に顆粒球減少に伴う重篤な細菌感染症は臨床上大きな問題となる。

低リスク MDS では高リスク MDS と異なり腫瘍細胞の増殖性は弱いにもかかわらず正常造血は高度に抑制される。低リスク MDS において腫瘍細胞のアポトーシス亢進および分化障害を認めることは以前から知られており、この結果骨髄での無効造血を来し、血球減少に陥ると考えられてきた。アポトーシス亢進、分化障害の機序について様々な検討が行われ、MDS 造血幹細胞自体の増殖関連遺伝子変異やエピゲノム制御分子の異常、骨髄微小環境の傷害や免疫学的機序など複数のメカニズムが関与していることが明らかになっている。しかし近年、低リスク MDS においても病初期から正常造血細胞は駆逐され、異常クローンに置換されていることが報告された。

AML の発症過程において、MDS の原因となるような遺伝子変異を獲得した前白血病性造血幹細胞が正常造血幹細胞に対し増殖優位性を持つというモデルが提唱されており、低リスク MDS において病初期からの正常造血細胞が減少する機序として、AML と同様に MDS 造血幹細胞が正常造血幹細胞に対し増殖アドバンテージを持つ可能性が考えられる。しかし前白血病性造血幹細胞の増殖優位性は実験的には証明されておらず、少なくともこれだけでは低リスク MDS における正常造血細胞の減少には不十分である可能性が高い。その他に、変質した骨髄微小環境のために正常造血が選択的に抑制されること、MDS 細胞が正常造血に直接作用することなどが仮説として考えられるが、現時点では不明である。

MDS 患者の造血幹細胞を用いた、公開されている遺伝子発現アレイのデータを用いて Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行うと、MDS 造血幹細胞で発現が変化する遺伝子群として、アポトーシス関連遺伝子群のほか細胞・細胞相互作用に関する遺伝子群が上位にランクされる。これらの事実から、私は MDS 細胞が細胞間相互作用により正常造血、特にその分化に影響を与える可能性を着想した。

今回私は低リスク MDS のモデルとして用いられる *NHD13* トランスジェニックマウス

(*NHD13* Tg マウス) および C57BL/6 マウスの骨髄細胞に *NHD13* 融合遺伝子をレトロウイルスベクターで導入して不死化させた MDS モデル細胞 (NHD 細胞) を用いて MDS 細胞と正常造血幹細胞の競合移植、共培養を行い、正常造血幹細胞の顆粒球分化、遺伝子発現の変化を解析し、MDS 細胞側の原因遺伝子を検索した。

NHD 細胞と CD45.1 マウスの造血幹細胞濃縮分画である Lineage⁻ Sca1⁺ c-kit⁺細胞(KSL 細胞)を間葉系細胞 OP9 細胞上で 96 時間共培養し、フローサイトメトリー(FCM)を用いて顆粒球分化を測定した。NHD 細胞は正常 KSL 細胞と比較し増殖能は低く、また NHD 細胞と共培養した正常 KSL 細胞の増殖抑制は観測されなかった。一方 NHD 細胞と共培養した正常 KSL 細胞は正常細胞同士で共培養したコントロール群と比較し、Gr-1、CD11b 陽性の成熟顆粒球への分化が抑制された。

次に、*in vivo* での NHD 細胞の分化抑制効果を検証するため、致死量放射線照射した正常レシピエントマウスに同数の *NHD13* Tg マウスおよび正常 CD45.1 陽性マウス由来の KSL 細胞を競合移植した。移植後 8 週時点でキメラマウスの末梢血の白血球、ヘモグロビン、血小板数には有意差を認めなかった。正常造血細胞の成熟顆粒球分化を解析するため、FCM を用いて CD45.1 陽性細胞の Gr-1、CD11b 陽性率を比較したところ、*NHD13* Tg マウスとのキメラマウスでは骨髄中の CD45.1 陽性細胞の Gr-1、CD11b 陽性率が低下しており、*NHD13* Tg マウスの細胞との共存により正常細胞の顆粒球系分化が抑制されることが示唆された。

次に、MDS 細胞により分化抑制を受けた正常細胞で発現が上昇している遺伝子を抽出するため、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現網羅的解析を行った。*NHD13* Tg マウスと競合移植された正常顆粒球系前駆細胞 (テスト細胞)では、成熟顆粒球の分子マーカーである myeloperoxidase の発現が低下していた。またテスト細胞で発現が上昇している遺伝子を抽出し、パスウェイ解析を行ったところ、TNF シグナリングパスウェイや VEGF シグナリングパスウェイを含む複数のパスウェイが抽出された。既報において TNF、VEGF が MDS の発症に関与していることは知られており、リコンビナントサイトカインを添加して正常造血幹細胞を培養することで各パスウェイを刺激し、正常 KSL 細胞の分化が抑制されるか検証したが、VEGF 添加時および TNF 添加時ともに、培養後の成熟顆粒球分化に有意差を認めなかった。一方テスト細胞では複数の Zinc finger 型転写因子および転写関連遺伝子の発現が低下していた。顆粒球前駆細胞から成熟顆粒球への分化促進に関する詳細な分子機構は不明な点が多く、未知の転写制御因子による分化抑制機構が存在する可能性を含め今後の検討課題と考えられる。

次に、分化抑制に NHD 細胞の分泌する液性因子が関与しているか検証するため、トラ

ンスウェルを用いて液性因子の透過性を保ちつつ NHD 細胞との直接接触を防いだ状態で共培養を行うと、正常 KSL 細胞の成熟顆粒球分化は抑制されなかった。さらに、NHD 細胞と正常細胞の共培養後の培養上清を回収し、培地に混合して正常 KSL 細胞を培養しても、成熟顆粒球分化抑制を認めなかった。以上から、NHD 細胞による分化抑制には直接接触が必須であることが示唆された。

次に、公開されている網羅的遺伝子発現解析データから分化抑制に関与する原因遺伝子の抽出を試みた。NHD13 Tg マウスで発現が上昇していること、細胞膜状に発現していること、MDS 患者の顆粒球系前駆細胞で発現が上昇していることを全て満たす 5 種類の遺伝子を抽出し、shRNA を用いて NHD 細胞からノックダウンすることで、共培養時の正常造血細胞の分化抑制が緩和されるか検討した。各遺伝子の shRNA レトロウイルスベクターを作成して 1 種類ずつ NHD 細胞に感染させ、正常 KSL 細胞と共培養を行ったが、正常 KSL 細胞の顆粒球分化抑制は緩和されなかった。現在新規の網羅的遺伝子発現解析データから候補遺伝子を抽出し、ノックダウンによる分化抑制緩和効果の検討を進めている。

MDS における正常造血抑制はサイトカイン、ニッチを含む様々な機構が複雑に相互作用していることが明らかになりつつある。本研究の共培養、競合移植を用いた解析により、MDS 細胞が直接的に正常造血幹細胞の分化を抑制する作用をもつことが示唆された。また今回観察された分化抑制について、サイトカインなど液性因子を介したのではなく、細胞同士の直接接触による抑制機構が存在する可能性を示した。競合移植実験においては MDS 細胞が増殖優位性を持たないにも関わらず正常細胞の分化を抑制した結果、個体全体での顆粒球減少を来たしており、キメリズムが低いなどの相違点はあるものの、少なくとも一部は低リスク MDS の病態を再現していると考えられる。また *in vitro* の共培養実験は培養期間が短く、経時的に顆粒球分化を来たす培養系での分化速度の差を観測しており生理的でない面もあるが、*in vivo* の移植実験同様に MDS 細胞の増殖能は低いにもかかわらず正常細胞の分化抑制を認めており、低リスク MDS の病態を一定程度再現していると考えられる。

MDS における造血抑制の機序は様々な面から解析がなされているが、本研究は正常細胞側の発現変動遺伝子や分化抑制機構を解析した初めての報告である。MDS における分化抑制の機序を明らかにすることは新たな治療戦略を考える上で非常に重要であり、更に前白血病状態でもある MDS における正常造血細胞の解析は、造血器腫瘍全般の病態解明に寄与することが期待される。