

博士論文(要約)

骨髓異形成症候群における
腫瘍細胞による骨髓微小環境の改変

林 康貴

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骨髄微小環境の改変

氏名 林 康貴

骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic Syndrome, MDS) は遺伝子異常をもつ造血幹細胞がクローン性に増殖する疾患であり、高頻度に急性骨髄性白血病 (Acute Myelogenous Leukemia, AML) に移行する。形態異常をもつ血球細胞を産生し、無効造血を起こすために末梢血において 1 系統以上での血球減少を示す。こうした病態には、遺伝子変異による造血幹細胞の異常によるものの他、骨髄間質細胞 (Mesenchymal Stem Cell, MSC) を始めとする骨髄微小環境の異常もまた寄与していると考えられている。

MDS 患者の MSC にはしばしば MDS 細胞とは異なる遺伝子異常が見つまっている。MSC の遺伝子異常は MDS や MPN (Myeloproliferative Neoplasm) 等の造血器腫瘍の病態を示すことが知られている。また造血器腫瘍細胞自身が骨髄微小環境に変化を引き起こしていることも報告されている。MDS 細胞が骨髄微小環境に異常を引き起こす機序が明らかになれば、微小環境を標的とした治療により病態の進展、治療後の維持、再発抑止が期待される。そこで、Abcg2 導入による MDS マウスモデルを用いた骨髄微小環境の解析を行った。

幹細胞マーカーとして知られる ABCG2 は MDS 患者において高発現しており、また EZH2 機能欠損変異による MDS モデルマウスの骨髄細胞においても高発現している。この Abcg2 を骨髄細胞に遺伝子導入することによっても MDS 様の病態を呈し、これを二次移植すると MDS/AML 様の病態を示す。この MDS/AML 細胞は MDS に見られるように増殖活性が低いにも関わらず、骨髄は低形成であった。

そこで MDS/AML マウスのレシピエント由来正常造血細胞について解析を行った。正常造血細胞は幹細胞/前駆細胞が数なく、アポトーシスを起こすなどして減少し、造血が抑制された状態であった。MDS/AML 細胞と c-Kit 陽性造血幹/前駆細胞の共培養での実験から、MDS/AML 細胞は直接造血幹/前駆細胞の増殖やアポトーシス、コロニー形成に影響を与えないことがわかった。これらは、MDS/AML における造血の抑制は骨髄微小環境の異常によることを示唆している。

次に MDS/AML マウスにおける骨髄微小環境について調べた。HE 染色組織標本より骨端線の幅が狭くなっていることが確認され、骨への影響が考えられた。そこでマイクロ CT による解析を行うと、海綿骨において骨梁が減少し、それを反映して

骨量の減少、骨表面積の減少、骨梁間隔の拡大が観察された。MDS/AML における骨量の減少が造骨の抑制によるものか、破骨の亢進によるものかを調べるため、カルセイン二重標識と TRAP 染色を行なった。通常 10 日の間隔でのカルセイン標識ではその間の造骨を反映して 2 本の蛍光の線が見られるが、MDS/AML マウスでは 2 本の蛍光線がほぼ重なり合っていた。骨髓における TRAP 陽性の破骨細胞に変化はなく、骨量の減少は造骨の抑制であることが示唆された。

造骨が抑制される原因として MSC の骨芽細胞への分化障害が考えられた。そこで骨髓中の MSC の解析を行なった。MSC の数に影響は見られなかったが、遺伝子発現解析の結果から骨芽細胞マーカーの発現低下が見られた。また骨芽細胞分化の早期に関与するとされる Osterix での蛍光免疫染色では、MDS/AML において Osterix 陽性細胞が減少しており、MSC の骨芽細胞分化障害が示唆された。MSC の遺伝子発現解析において、MSC を骨芽細胞に分化させることが知られている *Bmp4* の発現低下を認めた。BMP2、BMP4、BMP6 は MSC からの自己分泌により、骨芽細胞分化を促進することが知られている。また *Bmp4* 低次形成マウスでは造骨障害が起こることが報告されている。こうしたことから、MSC における *Bmp4* の発現低下が MSC の分化異常の原因の一端であると考えられた。

骨芽細胞分化が障害された MSC の病態への寄与を調べるため、MDS/AML マウスより採取した MSC を c-Kit 陽性造血幹/前駆細胞と共に二週間培養し、c-Kit 陽性造血幹/前駆細胞のコロニー形成能に与える影響を調べた。MDS/AML マウス由来の MSC と共培養した c-Kit 陽性造血幹/前駆細胞はコロニーをほとんど形成しなかったが、*Bmp4* や骨芽細胞分化誘導培地により MDS/AML マウスより採取した MSC の骨芽細胞分化を促すことで c-Kit 陽性造血幹/前駆細胞のコロニー形成が回復した。このことから、MDS/AML 細胞による MSC の骨芽細胞分化障害が MDS における病態の一因となり、これを解除することで造血障害が回復すると考えられた。そこで MDS/AML マウスに造骨を促進することが知られている PTH を投与し検討した。ジフテリア毒素受容体を発現させた *Abcg2*-MDS/AML 細胞を用いて、二次移植後 10 日目に MDS/AML 細胞をジフテリア毒素にて除去し、PTH を二週間投与した。PTH を投与しなかった群では骨髓細胞が減少したままで、造血障害や再発により死に至った。それに対し PTH を投与した群では骨髓細胞が正常マウスと同程度まで回復し、生存期間の延長が見られた。これらの結果から、MDS/AML 細胞による MSC の骨芽細胞分化障害によって起こる造骨障害が造血障害の一因となり、造骨を回復させることによって造血障害は改善し、治療後の再発の抑止になることが期待された。

実際の MDS 患者においても造骨障害が起こっているのかを、CT のデータから検討した。MDS 患者の骨髓における CT 値 50 以上の領域はコントロールに比較して小さい傾向にあった。骨粗鬆症における MDS の有病率が高いという報告もあり、このモデルにおいて見られた造骨抑制が MDS 患者の病態を反映していると考えられた。

MDS 患者の MSC における RNA-seq のデータを IGV にて検討したところ、*BMP4*、*BMP* シグナルの標的遺伝子の発現低下が観察され、人においても MSC での *BMP4* の発現低下が造骨抑制に関与していることが示唆された。

最後に MDS/AML 細胞が MSC に異常を起こし、造血支持能を失わせる原因について検討した。カルセイン二重標識の結果から造骨障害は移植後早期からであり、このことは MSC の異常が早期に起きていることを示している。移植後暫くの間、骨髓における MDS/AML 細胞の占める割合は極めて低いため、液性因子が原因であると考えられた。MSC に影響を与え、異常を引き起こすことが知られているサイトカインについて、*Abcg2*-MDS/AML 細胞における遺伝子発現は高くなかった。そのため細胞間のコミュニケーションに使用され、造血器腫瘍においても関与が示唆されている細胞外小胞について検討した。細胞外小胞のマーカーである *Cd63* と GFP の融合タンパクを発現させた *Abcg2*-MDS/AML 細胞を作成し二次移植すると、MSC において GFP 陽性細胞が検出された。このことは、*Abcg2*-MDS/AML 細胞の細胞外小胞が MSC に取り込まれていることを示しており、*Abcg2*-MDS/AML 細胞由来の細胞外小胞が MSC に影響を与えることで正常造血を抑制している可能性が示唆された。そこで *Abcg2*-MDS/AML 細胞由来の細胞外小胞と MSC の造血支持能との関連性について調べるため、MSC を MDS/AML 細胞由来の細胞外小胞と共培養したのち、*c-Kit* 陽性造血幹/前駆細胞と共に二週間培養、コロニー形成アッセイを行った。正常骨髓細胞由来の細胞外小胞や PBS に比べ、MDS/AML 細胞由来の細胞外小胞で処理した MSC と共培養した *c-Kit* 陽性造血幹/前駆細胞のコロニー形成能は低下していた。これらより、MDS における MSC の造血支持能の低下の原因として MDS/AML 細胞由来の細胞外小胞の寄与が示唆された。

本研究の結果から、MDS、MDS/AML 細胞は骨髓微小環境を構成する MSC を改変することにより造骨障害を引き起こしており、その原因に *BMP4* の発現低下が寄与していることが示唆された。また MDS/AML の MSC において骨芽細胞への分化を促すことで造血支持能が回復したことから、造骨促進により造血の回復や再発の抑制への効果が期待された。MSC の改変には MDS/AML 細胞から分泌される細胞外小胞が寄与していることが示唆され、今後は MSC を改変する細胞外小胞中の分子を探索し、治療標的となるかを検討する必要がある。