

令和 3 年 6 月 26 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08316

研究課題名(和文)造血器腫瘍における造血ニッチ細胞の遺伝子・機能異常解析

研究課題名(英文)Analyses of hematopoietic niche in hematologic malignancy

研究代表者

錦井 秀和(Nishikii, Hidekazu)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30512834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：造血器腫瘍における骨髓環境異常を明らかにするために、MLL-AF9融合遺伝子導入白血病マウスで正常造血システムが破綻する過程を詳細に解析を行った。その結果白血病骨髓環境では単純な腫瘍細胞増殖に伴う正常造血巣の減少のみならず、正常造血システムの機能異常を誘導していることが示唆された。遺伝子発現解析の結果、1.残存正常造血幹細胞の機能は腫瘍細胞の増殖につれて造血幹細胞機能は数的・機能的に低下していく。2.白血病細胞は複数の炎症・老化誘導サイトカインを分泌しており、造血ニッチ細胞の機能障害が誘導されていることが明らかとなった。現在その詳細を解析中でAMLの造血不全の治療標的を探索している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白血病における臓器障害の本態である正常造血システムの破綻は、腫瘍細胞の増殖による正常造血の場の機械的な現象が主な原因と考えられてきたが、本研究結果はむしろ正常造血システムの機能異常が直接的な造血異常に関わっていることを直接的に示している。この研究結果から単純な殺細胞性の抗がん剤治療から正常造血システムの機能維持を目的とした新規治療戦略の構築を目指している。

研究成果の概要(英文)：To clarify how bone marrow environments are affected in hematopoietic malignancies, we established leukemic mice by introducing MLL-AF9 gene, and analyzed the detailed process which the normal hematopoietic system disrupts in the leukemic bone marrow environment. Residual hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells, perivascular stromal cells, and vascular endothelial cells were isolated from these mice and gene expression analysis was performed. The results showed that hematopoietic stem cell function was abrogated during the proliferation of leukemic cells. Further, leukemic cells secrete multiple inflammatory and aging-inducing cytokines, resulting in the dysfunction of hematopoietic niche cells, which might be the cause of normal hematopoietic disorders in the leukemic environment. We are currently seeking the therapeutic targets for hematopoietic defect in leukemic environments.

研究分野：造血システム・造血幹細胞

キーワード：造血幹細胞ニッチ 造血幹細胞 急性骨髄性白血病

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)では骨髄内の腫瘍細胞の増殖に伴う正常造血システムの破綻の結果、成熟血液細胞の減少すなわち汎血球減少がおきる。特に AML における血小板減少症は致命的な出血合併症の原因となりうるが、正常造血システムの破綻は白血病細胞の増殖に伴う正常造血巣の量的減少のためと考えられてきた。しかし、過去の報告では骨髄中の AML 細胞の頻度と血球減少の程度は必ずしも相関があるわけではないことが示されており、AML における正常造血システム破綻の原因は未だ不明な点がある。一方、正常造血幹細胞を含む造血システムは骨髄内の複数の非造血系細胞(間質細胞、血管内皮細胞、交感神経等)により複雑なネットワークが構成された造血ニッチ細胞とのクロストークにより維持されており、複数の報告から造血器腫瘍では造血ニッチの機能変化が生じていることが示唆されている。

2. 研究の目的

AML における造血不全症は正常造血システムの機能異常が原因であると仮説を立て、特に血小板減少症に焦点を絞り、造血幹細胞-巨核球-血小板分化経路とそれを支持する造血ニッチ細胞(間葉系幹細胞、傍血管間質細胞、血管内皮細胞)の機能的変化を明らかにするとともに AML の造血不全症の新規治療戦略の構築を目的として、MLL-AF9 融合遺伝子を導入した AML マウスモデルを用いて残存正常造血システムの機能異常を解析した。

3. 研究の方法

野生型 C57BL6 マウス骨髄より Lin 陰性 cKit 陽性造血前駆細胞を採取し、レトロウイルスを用いて MLL-AF9 融合遺伝子を導入した後、致死量の放射線を照射したマウスに移植を行うことにより MLL-AF9 AML マウスモデルを作成した(一次移植)。一次移植を行った AML マウスは移植前に照射した放射線により正常造血システムの障害が起きている可能性が懸念され残存正常造血細胞の機能的変化を詳細に解析することが困難と考えられる。そこで、serial transplant を行い白血病発症能力を高めた腫瘍細胞を移植することで、放射線を用いずに AML を発症させることができるより自然発症に近い AML モデルマウスを作製した(二次移植)。得られた AML マウスから、経時的に末梢血、骨髄細胞・造血ニッチ細胞を単離し、機能解析及び遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

①MLL-AF9 AML マウスでは腫瘍細胞の骨髄内増殖以前に造血障害を呈する。

まず、末梢血の血算を経時に計測したところ、赤血球数と比較して、AML マウスの血小板数は、白血病細胞が増殖し白血球数が増加していく前の発症早期の段階で減少していくことが明らかとなった。一方で残存している正常白血球の構成をフローサイトメトリーで解析すると一過性に Gr-1/CD11b 陽性 Myeloid 系の細胞の増加を認めた(図 1)。この現象は腫瘍細胞が骨髄内を占拠する以前に生じていることから、AML 骨髄における正常造血障害は単純な腫瘍細胞の増殖に伴う物理的な正常造血巣の減少に起因するものではなく、残存正常造血幹細胞の多分化能を含む機能異常が原因となっている可能性が考えられた。

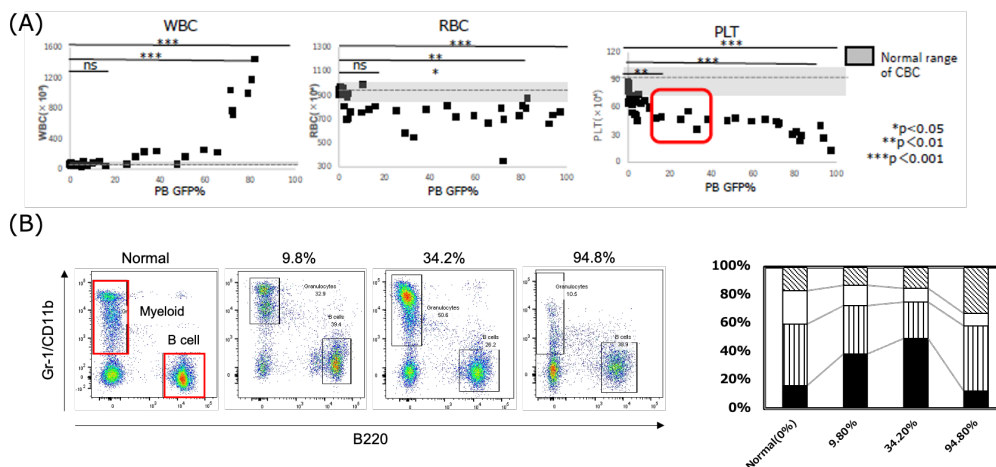


図 1. MLL-AF9 AML マウスの残存正常造血能の評価

A. MLL-AF9 AML マウスの血算の測定結果。GFP 陽性 AML 細胞の増殖が比較的軽度の段階で血小板数減少に転じる。B. GFP 陰性残存白血球のフローサイトメトリーによる解析結果。

②MLL-AF9 AML マウスの残存する造血幹細胞・前駆細胞は一過性に Megakaryocyte-myeloid biased phenotype を呈した後、枯渇する。

次に AML マウスから骨髓細胞を採取し解析を行なった。興味深いことに、残存造血幹細胞が多く含まれている GFP 陰性 cKit 陽性 Sca1 陽性 Lin 陰性 (LSK) 分画の頻度はむしろ増加しており、LSK 分画の中で巨核球・Myeloid 系列へ偏った細胞集団であると報告されている CD41 陽性細胞の頻度が一過性に増加した後、最終的に GFP 陽性 AML 細胞が増加するにつれ LSK 分画が枯渇していくことが明らかとなった(図2)。また CD41 陽性 LSK 分画をフローサイトメトリーで分取し、細胞あたりの巨核球分化能を含む多分化能を評価すると、明らかに AML マウスの残存正常細胞由来 CD41 陽性 LSK 細胞はコロニー形成能・巨核球形成能が亢進していることが明らかとなり、残存正常造血幹細胞の巨核球分化能はむしろ血小板減少に呼応して、代償的に亢進している可能性が示唆された。遺伝子発現解析でも MLL-AF9 AML マウスに残存する LSK 細胞における巨核球関連遺伝子発現は有意に上昇しており、白血病細胞の骨髓内増殖における環境変化が、残存正常 HSC の機能的異常をもたらしていることが明らかとなった。一方巨核球の多核化は障害されており、AML の血小板減少は巨核球成熟障害が原因になっていることが考えられた。

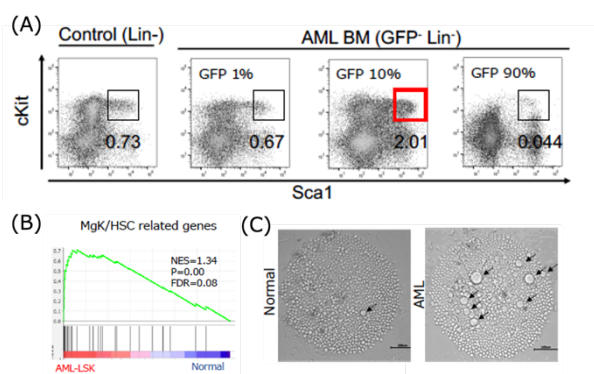


図2. MLL-AF9 AML マウスの残存造血幹細胞の解析. A. MLL-AF9 AML マウスより GFP 陰性残存正常造血細胞のうち、LSK 分画の頻度は腫瘍増殖につれて一過性に増加する. B. GSEA 解析の結果、巨核球分化関連遺伝子の有意な発現上昇を残存 LSK 細胞で認める. C. AML マウス由来 CD34-CD41+LSK 細胞(右)は正常 CD34-CD41+LSK 細胞(左)と比較し巨核球分化能が亢進している。

③MLL-AF9 AML マウスでは造血ニッチ細胞の造血支持能の低下を認める。

造血幹細胞を含む正常造血システムは、造血ニッチ細胞の造血支持能により維持されている。正常マウスまたは MLL-AF9 AML マウスより間葉系幹細胞 (CD45-TER119-CD31-Sca1+PDGFRa+分画)、傍血管間質細胞 (CD45-TER119-CD31-ICAM1+分画)、血管内皮細胞 (CD45-TER119-CD31+ICAM1+分画) を単離し、遺伝子発現解析を行なった。傍血管間質細胞は過去に造血支持に必須の役割を有すると報告されている CAR cell (CXCL12-abundant reticular cell)・SCF 分泌 LepR 陽性とほぼ同一の細胞と考えられたが、AML マウス骨髓由来傍血管間質細胞の造血支持因子の発現は有意に低下していた。腫瘍細胞の増殖に伴うストレスが、正常造血ニッチ・正常造血幹細胞の機能低下・枯渇をもたらしていることが示唆され(図3)、現在その詳細を解析中である。

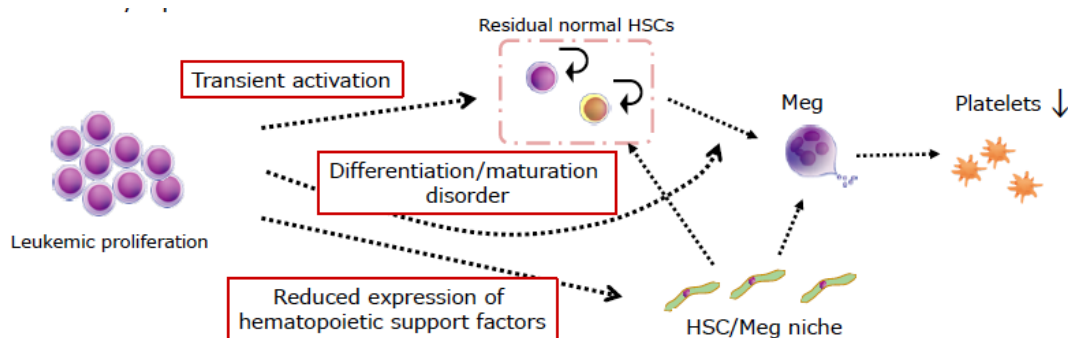


図3. 腫瘍細胞と正常造血システムのクロストーク

腫瘍細胞の骨髓内増殖は造血ニッチ細胞の造血支持能の障害を誘導するとともに造血幹細胞の機能障害をもたらしている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sakamoto T, Obara N, Nishikii H, Kato T, Cao-Sy L, Fujimura R, Yagita H, Sakata-Yanagimoto M, Takahashi S, Chiba S	4. 巻 37
2. 論文標題 Notch Signaling in Nestin-Expressing Cells in the Bone Marrow Maintains Erythropoiesis via Macrophage Integrity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 STEM CELLS	6. 最初と最後の頁 924-936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.3011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Cao-Sy L, Obara N, Sakamoto T, Kato T, Hattori K, Sakashita S, Nannya Y, Ogawa S, Harada H, Sakata-Yanagimoto M, Nishikii H, Chiba S	4. 巻 109
2. 論文標題 Prominence of nestin-expressing Schwann cells in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes with severe fibrosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 309-318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-018-02576-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakamoto T, Obara N, Nishikii H, Kato T, Luan CS, Fujimura R, Yagita H, Sakata-Yanagimoto M, Takahashi S, Chiba S.	4. 巻 37
2. 論文標題 Notch signaling in Nestin-expressing cells in the bone marrow maintains erythropoiesis via macrophage integrity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 924-936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.3011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishikii H, Kurita N, Kusakabe M, Yokoyama Y, Kato T, Sakata-Yanagimoto M, Obara N, Hasegawa Y, Chiba S.	4. 巻 60
2. 論文標題 Successful management of primary immune thrombocytopenia with romiplostim during open heart surgery in a hemodialysis patient	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.60.28.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishikii H, Kurita N, Shinagawa A, Sakamoto T, Kusakabe M, Yokoyama Y, Kato T, Sakata-Yanagimoto M, Obara N, Hasegawa Y, Nakamura N, Chiba S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Durable Leukemic Remission and Autologous Marrow Recovery with Random Chromosomal Abnormalities after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Chronic Lymphocytic Leukemia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Reports in Hematology	6. 最初と最後の頁 9710790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/9710790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Cao-Sy L, Obara N, Sakamoto T, Kato T, Hattori K, Sakashita S, Nannya Y, Ogawa S, Harada H, Sakata-Yanagimoto M, Nishikii H, Chiba S.	4. 巻 209
2. 論文標題 Prominence of nestin-expressing Schwann cells in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes with severe fibrosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-02576-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Luan Cao-Sy, Yoshiaki Takahoko, Naoshi Obara, Tatsuhiro Sakamoto, Takayasu Kato, Keiichiro Hattori, Ryota Matsuoka, Shingo Sakashita, Yasuhito Nannya, Hideki Makishima, Seishi Ogawa, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Hidekazu Nishikii, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Distinct bone marrow microenvironment abnormalities in MDS and MPN with fibrosis
3. 学会等名 Annual Meeting of American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Luan Cao-Sy, Yoshiaki Takahoko, Naoshi Obara, Tatsuhiro Sakamoto, Takayasu Kato, Keiichiro Hattori, Ryota Matsuoka, Shingo Sakashita, Yasuhito Nannya, Hideki Makishima, Seishi Ogawa, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Hidekazu Nishikii, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Distinct Schwann cell abnormalities in MDS and MPN bone marrow with fibrosis
3. 学会等名 日本血液学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学血液内科ホームページ  
http://www.ketsunai.com

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 貴康  (Kato Takayasu)  (20646591)	筑波大学・医学医療系・講師   (12102)	
研究分担者	日下部 学  (Kusakabe Manabu)  (40804381)	筑波大学・医学医療系・講師   (12102)	
研究分担者	小原 直  (Obara Naoshi)  (70422178)	筑波大学・医学医療系・教授   (12102)	
研究分担者	横山 泰久  (Yokoyama Yasuhisa)  (70512820)	筑波大学・医学医療系・講師   (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------