

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17411

研究課題名（和文）ミトコンドリアダイナミクス制御異常による骨髄不全症発症の分子基盤解明

研究課題名（英文）Dysregulated mitochondrial dynamics as an underlying mechanism of MDS bone marrow failure

研究代表者

林 嘉宏 (Hayashi, Yoshihiro)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：30802590

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、新規に樹立した骨髄異形成症候群（MDS）モデルマウスの解析から見出したミトコンドリアのダイナミクス制御異常に着目し、MDS細胞におけるミトコンドリア断片化が腫瘍細胞の運命制御や疾患病態に与える影響を解析した。その結果、分裂促進因子DRP1の活性化に伴いMDS細胞のミトコンドリア断片化が促進され、それが引き金となって炎症性シグナル経路および細胞死（アポトーシスやパイロトーシス）関連遺伝子群の活性化、細胞分化障害、異形成、血球減少が生じることを突きとめた。これらの病態はDRP1阻害により顕著に改善したことから、ミトコンドリア異常がMDSにおける新規治療標的となり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MDSは造血幹細胞の異常に起因して発症し、超高齢社会において急増している難治性血液がんである。多種多様な遺伝子変異が同定される一方で、炎症性シグナル経路の活性化、無効造血、血球減少を特徴とするMDSの病態発症機序は依然としてよくわかっていない。本研究により、MDS細胞におけるミトコンドリア形態異常の存在とその機序の一端、病態発症における中心的役割が明らかとなった。これらは、今後のミトコンドリア断片化促進機序を標的とした治療法開発、多くのMDS患者にとって有効な新規治療戦略の構築に資する成果と言える。

研究成果の概要（英文）：Myelodysplastic syndromes (MDS) are one of the most complex hematopoietic malignancies characterized by ineffective hematopoiesis in which clonal progenitor expansion coexists with impaired myelopoiesis and excessive cell death. Chronic inflammation caused by dysregulated inflammatory and innate immune signaling is also a characteristic hallmark of MDS pathogenesis.

In this study, by analyzing novel MDS mouse model that could faithfully recapitulate MDS clinical phenotypes and distinct gene expression signature, we identified that excessive mitochondrial fragmentation in MDS clone functions as a fundamental trigger of MDS pathogenesis. DRP1-dependent excessive mitochondrial fragmentation could cause inflammatory signaling activation in MDS clone and a variety of clinically relevant MDS phenotypes and gene expression signature in MDS mice. Targeting aberrant mitochondrial dynamics will be a potential therapeutic option in MDS.

研究分野：腫瘍学

キーワード：骨髄異形成症候群 ミトコンドリア断片化 自然免疫応答 細胞死 DRP1

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (MDS) は加齢とともに発症率が増加する難治性血液がんである。社会の高齢化を背景に患者数は急増している。近年、次世代シーケンス技術により MDS 発症に関わる遺伝子異常がほぼ同定されたが、その病態発症機序はまだ完全には解明されていない。半数近くの MDS 症例で、付加的な遺伝子変異による急性白血病への移行がみられることから、MDS は単に前白血病状態の病態と言われてきた。しかし、近年の MDS 領域における国内外の基礎・臨床研究の進歩から、MDS の病態が単に幹細胞レベルの異常、芽球の増減のみから説明できず、異常クローン由来の腫瘍性免疫細胞や正常クローン由来細胞も巻き込んだ、より複雑な病態であることが明らかとなってきた。

MDS 病態の本質は、異常クローンの腫瘍性増殖と細胞死が共存することによって生じる骨髄不全症 (無効造血) である。これに伴い、正常クローンの抑制、汎血球減少、造血細胞の異形成、免疫異常など多様な病態を呈する。汎血球減少では易感染状態が問題となる他、進行性の貧血のため、定期的な赤血球輸血が不可欠となる。これは全身組織への鉄沈着、臓器機能不全、免疫力低下といった新たな問題を生じ、患者 QOL、疾患予後のさらなる低下につながる。また、炎症性免疫亢進は無効赤血球造血進行の外的要因にもなる。しかし、この MDS 病態の本質である骨髄不全症の発症機序は、遺伝子変異の全容が明らかとなった現在も尚わかっていない。Total cell kill コンセプトに基づく白血病治療に準じた抗がん剤治療は骨髄不全症がベースの高齢患者層には実施が困難である。また、選択的治療の標的となる分子機序、細胞生物学的因子も不明である。MDS の病態を解明するために様々な疾患マウスモデルが作製され、申請者らを含め複数のグループから報告されてきたが、MDS 病態のごく一部の表現型のみを再現するに留まるものや急性白血病に移行するもの、発症までに長期間を要するものが多く、MDS 骨髄不全症の病態発症機序の解明や治療標的の探索、薬効評価に適したモデルの報告はこれまでになかった。

申請者は、骨髄不全症を主病態とする低リスク MDS 患者において共存関係が見出された *CBL*-exon 8/9 欠失変異と *RUNX1* 変異に着目し、これらの変異体を遺伝子導入した骨髄細胞を野生型マウスに骨髄移植してモデルマウスを作製した。予備的検討により、この新規モデルマウスでは、前駆細胞集団の拡大、骨髄系細胞の分化障害、汎血球減少、異形成などの MDS 骨髄不全症病態が短期間 (2 か月) で忠実に再現されることがわかった。また、RNA シーケンス解析の結果、MDS マウスの造血幹細胞・前駆細胞 (HSPCs) では、骨髄不全症を伴う MDS 患者に特徴的な遺伝子発現パターンが誘導されていることがわかった。さらに、ミトコンドリア関連遺伝子群の制御異常、ミトコンドリアの断片化、活性酸素種レベルの著明な上昇がみられた。

当該領域における学術的背景と申請者の予備的検討結果に基づき、本研究を立案、遂行した。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が新規に樹立した MDS 骨髄不全症モデルの解析から見出したミトコンドリアのダイナミクス制御異常に着目し、造血幹細胞・前駆細胞におけるミトコンドリア断片化が細胞の運命制御 (分化・増殖、細胞死) に与える影響を詳細に解析することにより、MDS 骨髄不全症の発症機序を明らかにしていくことを目的とした。

3. 研究の方法

a) 新規 MDS 骨髄不全症モデルマウス造血細胞におけるミトコンドリア機能の評価

予備的検討で、MDS 骨髄不全症マウスの HSPCs におけるミトコンドリア関連遺伝子群の有意な発現異常、ミトコンドリアの断片化、ミトコンドリア量の減少を確認していた。そこで、実際のミトコンドリア機能を評価するため、マウスから回収した HSPCs において、蛍光プローブを用いたミトコンドリア膜電位の評価、細胞外フラックスアナライザーを用いた酸素消費速度測定を行った。

b) ミトコンドリアダイナミクス制御異常が生じる機序の検討

ミトコンドリア断片化において中心的な役割を果たす因子として dynamin-related protein 1 (DRP1) が知られている。MDS 骨髄不全症マウスの HSPCs におけるミトコンドリアダイナミクス制御異常の機序を明らかにするため、Drp1 の発現レベルおよびリン酸化レベルをウェスタンブロッティング法を用いて調べた。また、DRP1 選択的阻害剤 (mdivi-1) を *in vivo* 投与した MDS 骨髄不全症マウスから HSPCs を回収し、ミトコンドリアダイナミクス制御異常への効果を評価した。

c) ミトコンドリアダイナミクス制御異常と ROS 過剰産生の関連性評価

予備的検討により、MDS 骨髄不全症マウスの HSPCs における ROS レベルの著しい上昇を確認していた。ミトコンドリアダイナミクス制御異常の ROS レベル上昇への関与を検証するため、mdivi-1 を *in vivo* 投与した MDS 骨髄不全症マウスの HSPCs における ROS 産生レベルを蛍光発生プローブおよびフローサイトメトリーを用いて測定した。

d) ミトコンドリアダイナミクス制御異常、ROS 過剰産生と細胞死の関連性評価

予備的検討により、MDS 骨髄不全症マウスの骨髄は腫瘍クローン由来の異形成を伴う骨髄系細胞で占拠されるが、総骨髄細胞数は有意に減少する（無効造血）ことを確認していた。これは実際の MDS 患者でも広くみられる現象であり、何らかの機序に伴う細胞死の亢進を示唆している。ミトコンドリアダイナミクス制御異常および細胞内 ROS レベルの上昇は、いずれも細胞死の引き金となり得る。そこで、MDS 骨髄不全症マウス骨髄細胞の各分化・成熟段階における細胞死の形態を明らかにするため、骨髄細胞のフローサイトメトリー、セルソーターで回収した細胞サンプルのウエスタンブロッティング法による細胞死（アポトーシス、ネクロトーシス、オートファジー、パイロトーシス）関連タンパク測定を行った。

e) MDS におけるミトコンドリアダイナミクス制御異常を標的とした治療の可能性評価

Mdivi-1、ROS 除去剤を MDS 骨髄不全症マウスに *in vivo* 投与し、末梢血における汎血球減少、骨髄無効造血・異形成などの MDS 表現型および生存期間に及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

まず、ミトコンドリア機能を評価するため、MDS マウスから回収した HSPCs において、蛍光プローブを用いたミトコンドリア膜電位を評価したところ、膜電位の低下はみられなかった。また、同一細胞数の HSPCs を細胞外フラックスアナライザーで解析すると、基礎呼吸や ATP 産生能がコントロールマウスよりも軽度上昇していた。これらの結果から、ミトコンドリアの過剰な断片化が、膜電位低下以外の機序で生じている可能性が示唆された。また、ミトコンドリア関連遺伝子群の著しい発現亢進とフラックスアナライザーの結果からは、腫瘍クローン内において、断片化し細胞当たりの総量も減少したミトコンドリアに対する代償機転が働いている可能性が示唆された。

ミトコンドリア断片化において中心的な役割を果たす因子として DRP1 が知られている。ミトコンドリア断片化機序を明らかにするため、Drp1 発現およびリン酸化レベルをウエスタンブロッティング法で調べたところ、MDS マウスの HSPCs における Drp1 および S616-pDrp1 発現レベルはコントロールマウスに比べて有意に上昇していた。DRP1 選択的阻害剤 (mdivi-1) を MDS マウスに投与したところ、ミトコンドリア断片化の減弱、ROS レベルの低下、骨髄系細胞分化障害と血球減少の改善が確認された。これらの結果から、MDS マウスの HSPCs で生じているミトコンドリアの過剰な断片化に DRP1 を介した機序が関与していること、それが ROS 産生や MDS 無効造血発症の引き金となっていることが示唆された。DRP1 の活性化制御に関わる複数のシグナル経路 (mTOR シグナル経路や HIF1A シグナル経路、Wnt/ β カテニンシグナル経路など) の存在がこれまでに報告されている。RNA-Seq 解析により、申請者の MDS モデルでは、CBL および RUNX1 変異の協調作用による mTOR シグナル経路活性化が生じていることが明らかとなった。MDS マウスの HSPCs を Rapamycin で処理したところ、DRP1 の活性化レベルが著しく低下することを確認した。

次に、MDS クローンで生じている細胞死機序について評価するため、腫瘍クローンの HSPCs および骨髄系成熟細胞の RNA-Seq データを解析したところ、種々の細胞死関連遺伝子群の発現レベル亢進がみられた。タンパクレベルでは、アポトーシス亢進は確認されなかったが、パイロトーシスの亢進を示唆する所見 (活性型 Caspase-1 の発現上昇) が確認された。ただし、他の細胞死機序も複合的に関与している可能性が考えられ、検討継続が必要である。

最後に、MDS モデルマウスにおける mdivi-1 の *in vivo* 投与により、ミトコンドリア断片化の MDS 病態における意義を評価した。腫瘍クローンにおける炎症性シグナル経路関連遺伝子群の発現、細胞質中 ROS レベルの顕著な上昇は、ミトコンドリア分裂抑制 (mdivi-1 投与) により有意に低下することが確認された。ミトコンドリア断片化を抑制した MDS マウスの血中では、上昇していた種々の炎症性サイトカイン・ケモカインレベルの顕著な低下も確認された。それに伴い、骨髄系細胞の減少や分化障害、末梢血中の白血球減少が解消された。N-Acetyl-L-cysteine (NAC) 投与により ROS を阻害すると、細胞質中 ROS レベルは mdivi-1 投与時と同等以上に低下した。しかし、mdivi-1 投与時にみられたような MDS 病態の改善は確認できなかった。この結果から、ミトコンドリア断片化に伴ない放出される ROS 以外の物質が DAMPs となり、炎症性シグナル経路活性化の誘因となる可能性が示唆された。

本研究の成果は、Cancer Discovery 誌 (Cancer Discov. (2022) 12 (1): 250–269) に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aoyagi Yasushige, Hayashi Yoshihiro, Harada Yuka, Choi Kwangmin, Matsunuma Natsumi, Sadato Daichi, Maemoto Yuki, Ito Akihiro, Yanagi Shigeru, Starczynowski Daniel T., Harada Hironori	4. 巻 12
2. 論文標題 Mitochondrial Fragmentation Triggers Ineffective Hematopoiesis in Myelodysplastic Syndromes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 250 ~ 269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2159-8290.CD-21-0032	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 該当する

1. 著者名 Hayashi Yoshihiro, Harada Yuka, Harada Hironori	4. 巻 36
2. 論文標題 Myeloid neoplasms and clonal hematopoiesis from the RUNX1 perspective	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1203 ~ 1214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-022-01548-7	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林 嘉宏、青柳 泰成、松沼 菜摘、貞任 大地、原田 結花、原田 浩徳
2. 発表標題 過剰なミトコンドリア断片化に伴う炎症性シグナル経路の活性化がMDS病態発症の引き金となる
3. 学会等名 第26回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hayashi Y, Aoyagi Y, Matsunuma N, Sadato D, Harada Y, Harada H
2. 発表標題 Excessive mitochondrial fragmentation as a fundamental trigger of ineffective hematopoiesis in MDS
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hayashi Y, Aoyagi Y, Matsunuma N, Sadato D, Harada Y, Harada H
2. 発表標題 Targeting Overwhelming Mitochondrial Fragmentation in Myelodysplastic syndromes-related Bone Marrow Failure
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 嘉宏、青柳 泰成、小林 大貴、貞任 大地、原田 結花、原田 浩徳
2. 発表標題 ミトコンドリア断片化によるMDS無効造血発症機序の解明
3. 学会等名 第25回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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