

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：84503

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21622

研究課題名（和文）細胞外小胞を介した造血機能低下ネットワークの解明と治療応用

研究課題名（英文）Elucidation of hematopoietic dysfunction via extracellular vesicles and its therapeutic application

研究代表者

井上 大地（Inoue, Daichi）

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・研究員（副センター長・部長クラス）

研究者番号：80735746

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに申請者は、骨髄異形成症候群（MDS）においてMDS細胞から放出される細胞外小胞（EVs）が骨髄間葉系幹細胞（MSC）の骨芽細胞系列への分化障害を介して造血不全を引き起こすことを明らかにした。そこで本研究ではMDS由来EVsの生体内での挙動から標的細胞や内包する機能分子の解析を行い、EVsを標的とした治療応用をめざした。蛍光標識によるトラッキングからMSCは主要な標的細胞であり、単一細胞解析から顕著な変動を示し病態の中心となる亜集団を同定した。また内包する機能分子としてmiRNAの網羅的解析を実施しMSCの生存・増殖や骨芽細胞分化に関するシグナル経路が主要な標的となることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な悪性腫瘍において、腫瘍微小環境や転移巣の構築因子として細胞外小胞（EVs）の役割が注目されている。本研究では骨髄異形成症候群（MDS）において、MDS細胞由来EVsがMSCを主要な標的とし、骨芽細胞分化障害を介して造血不全を引き起こすことを明らかにした。またEVsが内包するmiRNAが主要な役割を果たすことを報告した。これらの知見は、EVsの制御により骨髄環境を改善することが、造血不全の解除につながることを示している。骨髄移植以外に根治療法が無い一方で罹患者の多くが高齢のために移植療法の対象外であるMDSにおいて、造血障害を改善する新しい治療の選択肢なり得ると期待できる。

研究成果の概要（英文）：We previously showed that extracellular vesicles (EVs) released from tumor cells suppress osteolineage differentiation of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) and cause hematopoietic failure in myelodysplastic syndrome (MDS). In this study, to achieve therapeutic applications targeting EVs, we analyzed the in vivo behavior of EVs from tumor cells and the functional molecules they contain. Fluorescence tracking of tumor cells-derived EVs revealed that MSCs are the main target cells, and single-cell analysis of target cells (=MSCs) identified a key subpopulation in pathology of MDS. We also conducted comprehensive analysis of miRNAs as key functional molecules in EVs, and identified that miRNAs significantly upregulated in MDS-EVs target pathways linked to cell survival, proliferation, and MSC differentiation.

研究分野：血液内科学

キーワード：細胞外小胞

1. 研究開始当初の背景

様々な悪性腫瘍において、腫瘍微小環境や転移巣の構築因子として細胞外小胞 (Extracellular Vesicles, EVs) の役割が注目されている。EVs は脂質二重膜からなる微細な小胞で、細胞間コミュニケーションのツールとして働くことが知られている。細胞から分泌された EVs は、miRNAs をはじめとする様々な機能分子を内包し、受容細胞へと送達することでメディエーターとしての役割を果たすと考えられる。従って腫瘍由来 EVs は魅力的な治療標的であり、様々な阻害剤の開発が進められている。

加齢を背景とした骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic Syndrome, MDS) は造血幹細胞の遺伝子変異に起因し、正常造血が阻害され無効造血を呈する悪性腫瘍であるが、なぜ細胞自律的な増殖優位性を有さない腫瘍クローンが正常造血を抑制できるのか十分に解明されていなかった。申請者らはこれまでの研究において、MDS では腫瘍細胞が産生する EVs が骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem/Stromal Cells, MSC) の骨芽細胞系列への分化障害を介して造血不全を惹起することを明らかにした。この知見は骨髄環境の改善が造血抑制の解除につながることを示している。MDS は骨髄移植以外に根治療法のない難治疾患であるが、罹患者の多くは高齢者のため移植療法の対象となりにくい。その結果、造血不全による輸血依存に陥ることとなる。そのため骨髄環境に異常を引き起こす腫瘍由来 EVs を制御できれば、MDS の治療に大きく貢献することが期待される。

2. 研究の目的

骨髄異形成症候群や白血病による造血幹細胞の機能低下は血液細胞の質的・量的変化だけでなく、骨の脆弱性・動脈硬化など全身組織の異常を導くことが明らかとなりつつある。しかし、腫瘍性の造血幹細胞がどのような細胞間コミュニケーションを介して他の細胞を制御し正常細胞の機能低下をもたらすのかは全く解明されていない。本研究では、腫瘍性造血幹細胞が分泌する EVs を中心に、MSC・骨芽細胞など骨髄内でのクロストークに着眼して多細胞間での機能低下の機構を解明する。特にそれらの調節機構やエフェクターとしての骨・間葉系細胞での応答機構までの特異的な細胞間コミュニケーションを担う分子群の探索と機能評価を *in vitro*、*in vivo* 両面で行い、造血・骨への制御機構の科学的根拠を得て創薬へとつなげることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では MDS 細胞由来 EVs の挙動から標的細胞を明らかにし、標的細胞と EVs 及び内包する機能分子の解析を通じて、腫瘍細胞と骨髄微小環境間の細胞間コミュニケーション及びそれを担う分子の探索を進める。まず MDS 細胞に EVs マーカーとして知られる CD63 と蛍光色素の融合遺伝子を導入することにより、マウス移植モデルを用いて生体内における EVs の挙動、分布を検討する。これにより腫瘍細胞が異常を引き起こす標的細胞の分画を明確にする。次に EVs の標的細胞について単一細胞 RNA シークエンスを行うことで、機能異常の原因となる脱制御遺伝子の同定、亜集団構成変化の描出、病態の中心となる集団の特定を行う。さらに EVs が内包する機能分子として miRNAs に着目し、網羅的発現解析から鍵となる miRNAs の特定や標的シグナル経路の解析に取り組む。

4. 研究成果

本研究では、まず MDS 細胞由来 EVs の標的細胞を明らかにするため、CD63-GFP 融合遺伝子を導入した MDS 細胞を移植したレシピエントマウスをモデルとして使用し、その骨髄をフローサイトメーターにて解析を行った。造血細胞に比べると、MSC や血管内皮細胞で EVs を取り込んだ細胞 (GFP⁺細胞) が高頻度に検出された。このことから、MDS 細胞由来 EVs は MSC や内皮細胞といった造血支持細胞へ取り込まれやすいと考えられる。

これまでのモデルマウスを用いた解析から MDS では MSC の骨芽細胞系列への分化が抑制されており、骨形成の低下に伴う顕著な骨量の減少が確認されている。こうした骨代謝の異常は、ヒト MDS 患者においても病理検体や CT 検査データを用いた解析により確認できた。そこで、MDS 細胞由来 EVs の主要な標的である MSC において骨芽細胞への分化プログラムを評価し、造血不全の鍵を握る MSC 亜集団構成の変化を明らかにするため、表面抗原で定義された MSC を用いて単一細胞 RNA シークエンス解析を実施した。MSC はマーカー遺伝子の発現や分化系列とその段階により、骨芽細胞系列や線維芽細胞等の亜集団に分類され、MDS マウスでは骨芽細胞系列亜集団が著しく減少していた。特に、Leptin receptor 遺伝子の高発現 (LepR-high) を特徴とする亜集団において顕著な差異が認められた。MDS 由来の LepR-high MSC 亜集団では骨格系幹細胞マーカーの発現が低下しており、その機能を損なうことで骨芽細胞系列亜集団の減少が引き起こされていると考えられた。その一方で MSC 自体の数や多分化能は維持されており、MDS 環境下で分化障害は起こるものの、MSC の能力は保たれていると考えられた。

次に骨芽細胞系列への分化障害を起こした MSC と造血不全の関係を明らかにするため、各亜集団におけるニッチ因子発現の変化を調べた。興味深いことに MDS 由来の LepR-high MSC 亜集団では骨芽細胞分化抑制だけでなく、CXCL12 や SCF などの主要なニッチ因子の発現低下が見られた。また MSC と正常造血幹前駆細胞 (Hematopoietic Stem Progenitor Cell, HSPC) の共培養実験の結果から、MSC の骨芽細胞系列へのコミットメントが造血支持能の回復に不可欠であることが確認された。

続いて MDS 由来 EVs が MSC に異常を起こすメカニズムを詳細に解析するため、EVs 中に内包される機能分子として miRNA に着目し、網羅的発現解析を行った。興味深いことに、2 種類の MDS モデルマウスと 38 検体の MDS 患者由来 EV において高発現する miRNA 群は、多くのシグナルパスウェイを共通して標的としており、その中には MSC の生存・増殖や骨芽細胞分化に関わるものを多く含まれていた。これらの結果は、MDS 細胞から放出される EVs に含まれる miRNA が、MSC に異常を生じ造血不全を引き起こす上で主要な役割を担っていることを示唆している。

以上の通り本研究は MDS 細胞由来 EVs が MSC を主要な標的とし、内包する miRNA 群を介して骨芽細胞系列への分化を障害することで正常造血を抑制することを示した。また LepR-high MSC 亜集団が病態の鍵となっており、その分化抑制の解除が造血不全からの回復に必要なことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hayashi Y, Inoue D, et al.	4. 巻 VOLUME 39, ISSUE 6
2. 論文標題 MDS cells impair osteolineage differentiation of MSCs via extracellular vesicles to suppress normal hematopoiesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110805
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110805	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3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井上大地
2. 発表標題 The Blood-Bone Association in Normal and Malignant Hematopoiesis
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 康貴
2. 発表標題 Impaired Osteoblastic Differentiation of MSCs Suppresses Normal Hematopoiesis in MDS.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林康貴
2. 発表標題 Impaired Osteoblastic Differentiation of MSCs Suppresses Normal Hematopoiesis in MDS
3. 学会等名 The 62nd ASH Annual Meeting and Exposition（国際学会）
4. 発表年 2020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
---------	---------