

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03810

研究課題名（和文）神経操作と生体イメージングによる白血病-神経-循環連関の解明

研究課題名（英文）Leukemia-neuro-circulatory coupling by neural manipulation and in vivo imaging

研究代表者

浅田 騰（Asada, Noboru）

岡山大学・大学病院・研究准教授

研究者番号：70803055

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄内の血管、血管周囲間質細胞を可視化できる遺伝子改変マウスに蛍光蛋白（GFP）を発現する白血病細胞を注射することにより、白血病と骨髄微小環境を可視化できるマウス白血病モデルを作製し、骨髄中の末梢神経線維や血管、間質細胞などの骨髄微小環境を、共焦点顕微鏡を用いたイメージング解析で解析し、白血病による骨髄内の末梢神経活動および微小環境の変化を明らかにした。また、骨髄間質細胞に高発現する神経伝達物質受容体の存在を特定し、白血病での役割を解析している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、急性白血病による骨髄内の末梢神経シグナル、ならびに、血管の周囲に存在しすべての造血細胞の元となる造血幹細胞を支持する骨髄ニッチ細胞の変容が明らかとなり、白血病がこれらの細胞群に与える影響の理解が進んだ。また、本研究結果は、難治性血液腫瘍である急性白血病の新たな治療法開発のための糸口となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：By injecting leukemia cells expressing green fluorescent protein (GFP) into genetically modified mice capable of visualizing blood vessels and perivascular stromal cells, a murine leukemia model was created that allows for the visualization of leukemia and the bone marrow microenvironment. We have analyzed the bone marrow microenvironment, including peripheral nerve fibers, blood vessels and stromal cells, in the bone marrow of these mice by imaging analysis using confocal microscopy and have revealed changes in peripheral nerve activity and microenvironment in the bone marrow due to leukemia. We have also identified the presence of highly expressed neurotransmitter receptors in bone marrow stromal cells and analyzed their role in leukemia.

研究分野：骨髄微小環境

キーワード：急性白血病 末梢神経シグナル 骨髄微小環境

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

白血病は、高齢者はもとより、若年者の悪性腫瘍の中で最も頻度が高いがんであり、治療成績の改善が強く望まれる。申請者は臨床医として、白血病を中心とした血液がん患者の診療にあたり、血液がん治療の成績改善を目指して研究を行っている。

白血球細胞は主に骨髄内で増殖するが、血液細胞の腫瘍であるため血管を介して全身を循環する。実際に、白血球は骨髄以外の末梢臓器でいわゆる“髄外病変”を形成し、初発時に髄外病変を伴うものは、治療に抵抗性であり再発率も高いことが知られている。また、治療中に骨髄の中の白血球細胞は消失しているものの、骨髄外の病変が悪化する例が存在する。すなわち、白血球は末梢臓器において骨髄内とは異なる機構で制御され、治療から逃れている可能性がある。しかしながら、末梢臓器における白血球動態は、増殖機構や微小環境との相互作用を含めて未だ不明である。これらを解明することで、治療成績の改善に繋がる可能性がある。一方で、自律神経はあらゆる臓器に分布し、平常時には臓器機能の調節を行ないホメオスタシス維持に貢献するが、がん組織にも自律神経が豊富に分布しており、がん組織内の自律神経シグナルががん細胞の増殖や進展を調節することが報告されている。そこで本研究では、生体内 2 光子イメージング等の先端イメージング技術により、骨髄内ならびに骨髄外末梢臓器での白血球動態を解明し、さらに、システム神経エンジニアリング技術を用いて自律神経シグナル調節を行うことで、白血球-神経-循環連関の解明を行うこととした。

### 2. 研究の目的

本研究は、白血球細胞の動態およびその神経・循環系との連関を、骨髄および末梢臓器において解明することを目的とした。蛍光標識を持った白血球細胞 (MLL-AF9-GFP あるいは DsRed マウス白血球細胞) と、神経、血管、骨髄ニッチ細胞が可視化できる遺伝子改変動物を用いて、2 光子顕微鏡による生体内ライブイメージングおよび組織クリアリングを併用したホールマウント組織の共焦点顕微鏡による骨髄 3 次元イメージングにより、白血球細胞が骨髄から末梢臓器 (肝臓、肺、脾臓、皮膚、腸管等) へと進展する際の動態を動的および静的に解析する。また、白血球組織における局所的な神経シグナル制御のために、AAV ウイルスベクターを用いた局所組織での自律神経 (交感神経、副交感神経) 活動をコントロール (刺激あるいは抑制) し、骨髄および末梢臓器における白血球細胞ならびに白血球ニッチの変化を解析する。これにより、神経と白血球の連関を解明することを目指す。

### 3. 研究の方法

白血球細胞、微小環境の可視化を可能とするため、以下のモデルマウスを作製する。

①白血球可視化マウスモデルの作製：マウス造血幹細胞分画に pMIG-FLAG-MLL-AF9 (GFP) あるいは pMIR-FLAG-MLL-AF9 (DsRed) を *in vitro* で導入、培養した後に、GFP (あるいは DsRed) 陽性分画を選択分取し、放射線照射したマウスに静脈内注射あるいは骨髄腔内注射をして白血球細胞が光る急性骨髄性白血球モデルを作製する。

②神経、血管、微小環境可視化マウスの作製：生体内で神経、血管、ニッチ細胞を可視化するために以下の遺伝子改変マウスを作製し、これらの可視化マウスに①で作製した可視化白血球を静脈内注射あるいは骨髄内注射し、白血球動態可視化モデルを作製する。

交感神経: Th-Cre/tdTomato, 感覚神経: Nav1.6-Cre/tdTomato, 血管: VE-cadherin-CreER/tdTomato, 骨髄ニッチ細胞: LeptinR-Cre/tdTomato, Myh11-CreER/tdTomato, Nestin-GFP.

上記で作製した白血球可視化マウスで各進展時期 (骨髄播種期、全身進展期) の骨髄内白血球細胞動態を観察する。固定組織 (ホールマウント組織、クリアリング技術を使用) イメージングを用いた骨髄内イメージングを用いて白血球細胞と微小環境 (交感神経、感覚神経、ニッチ細胞、血管内皮細胞) との相互関係を解析し、白血球による骨髄内の神経変化を視覚的に捉える。また、同時に骨髄内での神経活動の機能的解析として骨髄細胞外液中の神経メディエーター測定を行う。

次に、組織での局所的な神経シグナル制御を行うために、逆行性 AAV ベクターを用いた骨髄中神経シグナル制御を行い、骨髄中の白血球動態や微小環境 (ニッチ細胞、血管内皮細胞、末梢神経) の機能を画像的、機能的に解析に評価する。

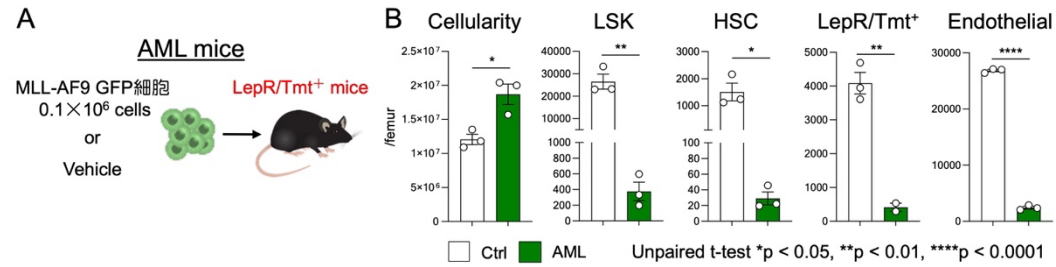
### 4. 研究成果

#### 1. 白血球可視化マウスモデルの作製

Fluorescence activated cell sorting (FACS) を用いた cell sorter (FACS Aria3, BD) にて、マウス造血幹細胞を含む Lineage marker (-) Sca-1 (+) c-kit (+) 分画を分取し、マウス白血球を引き起こす pMIG-FLAG-MLL-AF9 (GFP) を試験管内で導入し培養後に GFP 陽性分画を選択分取し、放射線照射したマウスに静脈内注射して生体内で白血球細胞を増殖させた。白血球を発症したマウスから骨髄細胞を採取し凍結保存しておいたものを無処置のマウスに静脈内注射することで 3-

4週後に急性骨髄性白血病を発症させた。AMLによる造血幹細胞(HSC)ならびに骨髄微小環境への影響を解析するため、LepR-Cre/tdTomatoマウスにAML細胞を接種した白血病モデルの骨髄をFACSで解析した。骨髄中のHSC、LepR/tdTomato<sup>+</sup>ニッチ細胞、血管内皮細胞はいずれも白血病により著しく減少することがわかった(図1)。

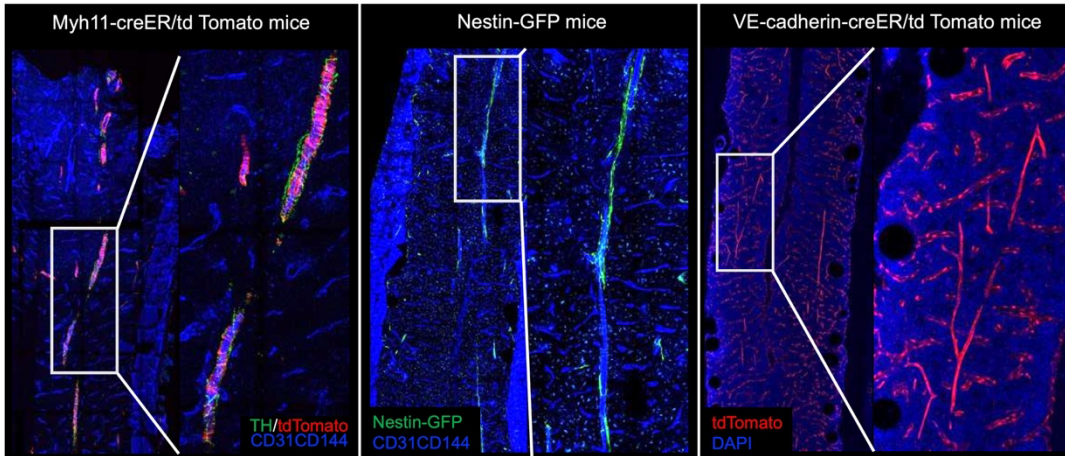
図1. 白血病マウスの作製と骨髄解析



## 2. 骨髄内微小環境細胞イメージング

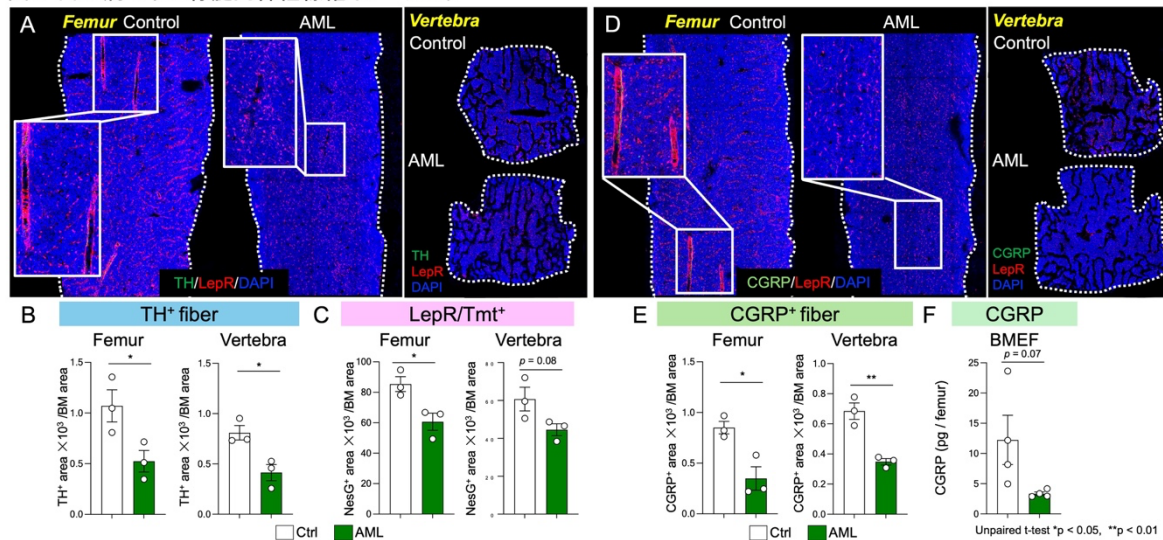
生体内で骨髄微小環境を構成する、神経、血管、間質細胞(ニッチ細胞)を可視化するために以下の遺伝子改変マウスを作製し、骨髄内微小環境イメージングを行った。骨髄内で造血幹細胞の活動に必須であるニッチ細胞の代表とされる血管周囲の間質細胞を可視化できる遺伝子改変マウスとしてNestin-GFP transgenicマウス、LepR-Cre/tdTomatoマウス、Myh11Cre-ER/tdTomatoマウスを用いた。また、間質細胞と同様に、造血幹細胞ニッチとしての機能を有し、同時に白血病進展の際に重要な役割をもつ骨髄血管内皮細胞を可視化できる遺伝子改変マウスとしてVE-cadherin-CreER/tdTomatoマウスの骨髄イメージングを行った(図2)。

図2. マウス骨髄内血管/間質細胞イメージング



次に、白血病による骨髄内のニッチ細胞ならびに末梢神経活動の変容を解析するため、LepR-Cre/tdTomato白血病マウスの骨髄凍結切片を用いた蛍光免疫染色にて骨髄中の交感神経線維(TH: tyrosine hydroxylase)と感覚神経線維(CGRP: calcitonin gene-related peptide)を定量的に解析した。解析は長管骨である大腿骨と扁平骨である椎体の両方で施行し、白血病マウスではいずれにおいても交感神経線維が著しく減少することがわかった(図3A, B)。また、同時に

図3. 白血病マウス骨髄内神経線維イメージング



LepR/tdTomato<sup>+</sup>ニッチ細胞の定量を画像解析で行なったところ、FACS解析の結果と一致して、

白血病マウスにおいてニッチ細胞が減少していた (図 3C)。さらに、感覚神経線維も交感神経と同様で、白血病マウスでは骨髄内で著明に減少することが明らかになった (図 3 D, E)。感覚神経神経については、骨髄細胞外液中の CGRP の蛋白量を測定し、実際に骨髄中での CGRP 濃度が低下することが判明した (図 3F)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 浅田 騰	4. 巻 63
2. 論文標題 末梢神経系による造血制御と腫瘍制御	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 991-998
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.63.991.	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 Kitamura W, Asada N, Naoi Y, Abe M, Fujiwara H, Ennishi D, Nishimori H, Fujii K, Fujii N, Matsuoka KI, Yoshino T, Maeda Y.	4. 巻 202
2. 論文標題 Bone marrow microenvironment disruption and sustained inflammation with prolonged haematologic toxicity after CAR T-cell therapy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Br J Haematol.	6. 最初と最後の頁 294-307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.18747	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 Asada N, Katayama Y.	4. 巻 41
2. 論文標題 A mysterious triangle of blood, bones, and nerves.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Bone Miner Metab.	6. 最初と最後の頁 404-414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-023-01402-5	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2件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Noboru Asada
2. 発表標題 3. Neural regulation of normal and malignant hematopoiesis in bone marrow microenvironment
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会・第65回日本神経化学会大会・第32回日本神経回路学会大会（Neuro 2022）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅田 騰
2. 発表標題 末梢神経系による造血調節と腫瘍制御
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022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
研究分担者	檜山 武史  (Hiyama Takeshi)  (90360338)	鳥取大学・医学部・教授    (15101)	

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
---------	---------