

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07073

研究課題名（和文）HMGA2高発現による骨髄異形成症候群の器質化肺炎誘導メカニズム解析

研究課題名（英文）A study on the mechanism of pulmonary tissue damage induced by high HMGA2 expression in myelodysplastic syndromes

研究代表者

小林 大貴（Kobayashi, Hiroki）

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：30528683

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）：骨髄異形成症候群（MDS）ではしばしば非感染性肺炎や自己免疫性疾患などの合併症を伴う。HMGA2は、造血器腫瘍において病態増悪因子として知られており、これまでに骨髄線維症やMDSなどで高発現の症例が報告されている。しかしながらHMGA2の高発現がどのようにMDS病態に関与するかはわかっていなかった。我々は臨床所見を反映する HMGA2 高発現 MDS モデル動物を作出し、当該モデル動物を解析した結果、HMGA2の過剰発現は血小板の活性化に寄与しており、活性化血小板は細胞死感受性が増加したMDSクローン由来の好中球と相互作用することで非感染性肺炎の発症に寄与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MDS患者におこる非感染性肺炎などの合併症は、生活の質を著しく低下させます。本研究をもとに血小板-好中球複合体形成を標的とした新たな治療法が開発されることで、患者の生活の質が向上する可能性があります。また治療が効率化されることで長期的には医療費の削減につながる可能性があります。

研究成果の概要（英文）：Myelodysplastic syndromes (MDS) often involve complications such as noninfectious pneumonia and autoimmune diseases. HMGA2 is known as a factor that exacerbates the pathology in hematopoietic neoplasms, and its high expression has been reported in cases of myelofibrosis and MDS. However, the involvement of HMGA2 overexpression in the pathogenesis of MDS was remained unclear. We generated an HMGA2 overexpression MDS model mice that reflects clinical findings. Analyses of this model revealed that HMGA2 overexpression contributes to platelet activation. Activated platelets interact with MDS clone-derived neutrophils, which exhibit increased susceptibility to cell death, thereby contributing to the development of noninfectious pneumonia.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：骨髄異形成症候群 HMGA2

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

### 1- (1) 骨髄異形成症候群

骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndromes, MDS) は造血幹細胞で生じた複数の遺伝子異常に起因して発症する難治性疾患であり、無効造血に伴う血球減少と異形成を大きな特徴とする。またしばしば非感染性肺炎や自己免疫性疾患などの合併症を伴う。この理由は、未熟な血球細胞が増殖して骨髄を埋め尽くす急性白血病とは異なり、MDS では造血幹前駆細胞の分化能が保持されており、異常クローン由来の血液・免疫系細胞が産生されているためと考えられている。MDS という病態を理解し、その治療法を開発するうえでは「遺伝子異常の組み合わせによって MDS の病態がどのように引き起こされるのか」ひとつひとつ解明していく必要があった。

### 1- (2) HMGA2 と MDS

遺伝子発現調節因子 High mobility group AT-hook 2 (*HMGA2*) は、造血器腫瘍において原疾患の病態増悪因子として知られており、これまでに骨髄線維症や MDS など高発現の症例が報告されている。しかしながら *HMGA2* の高発現が多様な表現型を呈する MDS の病態に及ぼす影響についてはよくわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

我々は *HMGA2* 高発現 が MDS の病態に与える影響を解析するため、MDS の基幹変異である *RUNX1* の変異遺伝子 (*RUNX1*<sup>S291fs</sup>) を導入したマウス造血幹細胞に *HMGA2* を過剰発現させ、骨髄移植法により *HMGA2* 高発現 MDS 疾患モデルマウスを作出した。その結果、移植後 6 ヶ月を過ぎるころには当該モデルマウスの個体はすべて死に至った。死因は気管支周囲への著しい免疫細胞浸潤、肺構造の崩壊による肺障害であった。翻って、自験 17 例 MDS 患者において、経過中に非感染性肺障害が見られた群では、見られなかった群に比べて有意に *HMGA2* の発現が亢進していることがわかった。すなわち *HMGA2* 高発現による免疫応答異常が MDS 患者でしばしば観察される非感染性肺障害の発症に関与することが想定された。そこで本研究では *HMGA2* 高発現による骨髄異形成症候群の免疫応答異常誘導メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

モデルマウスは C57BL/6 マウスの骨髄より取得した造血幹前駆細胞にレトロウイルスで *RUNX1*<sup>S291fs</sup> および *HMGA2* を導入し、その細胞を放射線照射した C57BL/6 マウスに対し経静脈で移植することで作製した。病態解析として血球数測定、生存観察、フローサイトメトリーによる血球細胞のプロファイリング、肺病理組織解析、RNA-seq による遺伝子発現解析を行った。遺伝学的介入には shRNA を用いた遺伝子ノックダウン実験を行った。

## 4. 研究成果

### 4- (1) 肺障害を引き起こす免疫細胞の特定

まずモデルマウスの気管支周辺に浸潤し、肺障害を引き起こす免疫細胞を特定するためフローサイトメトリー解析を行った結果、Ly6C<sup>low</sup> 単球および好中球で占められることがわかった。そこでモデルマウスの肺障害に Ly6C<sup>low</sup> 単球が関与するかを検証した。Ly6C<sup>low</sup> 単球への分化に必要な *Cebpb* のノックアウトマウス由来骨髄細胞に *RUNX1*<sup>S291fs</sup> および *HMGA2* を導入して骨髄移植することで *Cebpb*<sup>ΔΔ</sup>-*RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE マウスを作出し、経過を追って観察した結果、肺障害が改善しなかったことから肺障害の責任免疫細胞は探究ではなく好中球であることが強く示唆された。

### 4- (2) *RUNX1* 変異・*HMGA2* 高発現によって生じる遺伝子発現の特徴

*HMGA2* の過剰発現が MDS の造血幹前駆細胞に及ぼす影響を調べるため、*RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE マウスおよび他のマウス群から得られた造血幹前駆細胞の RNA-seq 解析を行った。Control、*RUNX1* 変異、*HMGA2* 高発現、*RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE の 4 つのグループ間で発現量が異なる遺伝子のうち、*S100a9*、*Lcn2*、*Mmp9*、*Cebpe* など好中球の分化成熟に関連する遺伝子は、*RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE および *HMGA2* 高発現マウスで減少していた。この特徴は、これらのマウス骨髄内で顆粒球集団が減少している所見と一致していた。一方、*Esam*、*Meis1*、*Hlf*、*Gata2* など、造血幹前駆細胞の増殖と適応度に関連する遺伝子は *RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE マウスで発現上昇しており、*HMGA2* の過剰発現が *RUNX1* 変異と組み合わせることで、造血幹前駆細胞の増殖と適応度を亢進させることを示唆した。さらに GeneSet Enrichment Analysis (GSEA) により、巨核球の発生と血小板の活性化に関連する *Selp*、*Mpl*、*Pf4* などの遺伝子が Control マウスに比べて *RUNX1* 変異および *HMGA2* 高発現マウスで強く発現しており、*RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE マウスではさ

らに強く発現上昇することが判明した。

また、各マウス群から得られた好中球の RNA-seq 解析も行った。Control マウスと比較して *RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE および *RUNX1* 変異マウスの両方で発現上昇する遺伝子は、白血球の遊走に関連するシグナル伝達経路において有意に濃縮されており、MDS クローン由来好中球の組織への遊走能亢進が示唆された。*RUNX1* 変異マウスが致命的な肺炎を発症しないことから、*HMGA2* が *RUNX1* 変異によって起こる遺伝子発現変化に対して相乗的な効果をもたらし、好中球に組織損傷能力を与えるという仮説を立てた。それに一致して、*RUNX1* 変異および Control マウスと比較して *RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE マウスで発現上昇する遺伝子群は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化と代謝に関連する経路で有意に濃縮されており、これらは好中球の細胞殺傷能力および細胞死に寄与すると考えられた。これらのデータを総合すると、MDS クローンにおける *HMGA2* 過剰発現が遺伝子発現を変化させることで、*RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE マウスで観察される致命的な病態を作り出すことが示唆された。

#### 4-1 (3) 活性化血小板と好中球の結合

血小板活性化シグナルに関連する遺伝子が、*RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE マウスの造血幹前駆細胞で有意に発現上昇していたことから、当該モデルにおいて血小板活性化が肺炎の発症に寄与していると仮説を立てた。主要な血小板活性化分子をコードする遺伝子の中で、P-セレクトチンをコードする *Selp* が最も高く発現しており、タンパク質レベルでの発現を確認したところ、*RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE マウスで P-セレクトチンを発現する血小板の頻度が有意に増加していることがわかった。P-セレクトチンは血小板-好中球の凝集を加速し、好中球を活性化することが知られている。そこで *RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE マウスで血小板-好中球複合体 (PNC) が形成されるかどうかを評価するために、肺に浸潤した血球細胞を分離し、フローサイトメトリー解析を行った。その結果、*RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE マウスの肺組織における CD41<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> 集団の頻度が増加していた。また PNC の存在は Ly6G および CD41 の免疫蛍光染色によっても確認できた。つぎに PNC 形成が好中球に与える影響を調べるために、*RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE および Control マウスから得られた肺に浸潤した好中球の細胞死感受性を評価した。その結果、*RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE マウスの肺に浸潤した好中球では、アネキシン V 陽性細胞の頻度が有意に増加しており、高頻度の PNC を含むこれらの好中球は、Control マウスの好中球よりも細胞死に陥りやすいことが示唆された。以上の結果は、*RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE マウスの造血幹前駆細胞由来の血小板と好中球が相互作用し、MDS における好中球の特徴を変化させることが示唆された。

#### 4-1 (4) P-selectin ノックダウンが *HMGA2* 高発現 MDS モデルマウス病態に与える影響

MDS 病態における PNC を標的とする治療効果を動物レベルで調査するため、*Selp* ノックダウン実験を行った。*RUNX1*<sup>S291fs</sup> および *HMGA2* を導入した造血幹前駆細胞に *Selp* を標的とした shRNA ベクターを導入し、放射線照射した C57BL/6 マウスに対し経静脈で移植することで *Selp* がノックダウンされた *RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE マウスを作製した。MDS 病態における肺損傷に対する *Selp* ノックダウンの効果を評価するために、慢性炎症を実験的に再現するために広く使用されている低用量リボ多糖 (LPS) を使用した。長期飼育で起こる肺損傷の場合と同様に、低用量 LPS 投与はコントロールマウスに比べて *RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE マウスで重度であったが、P-セレクトチンの遺伝学的抑制は、*RUNX1*<sup>S291fs</sup>/*HMGA2*-OE マウスにおける肺損傷の発症を有意に軽減することが明らかとなった。以上の結果より、P-セレクトチンを介した PNC 形成が、MDS 病態における好中球細胞死を介した肺組織損傷の重要な媒介因子となることがわかった。

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 1件）

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsunuma Natsumi, Hayashi Yoshihiro, Fukuda Marina, Yuki Kanako, Kamimura-Aoyagi Yasushige, Kobayashi Hiroki, Shingai Naoki, Harada Yuka, Harada Hironori | 4. 巻<br>1                     |
| 2. 論文標題<br>HMGA2 promotes platelet-neutrophil complex formation and pulmonary tissue damage in myelodysplastic syndromes   | 5. 発行年<br>2024年               |
| 3. 雑誌名<br>Blood Vessels, Thrombosis & Hemostasis   | 6. 最初と最後の頁<br>100014 ~ 100014 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bvth.2024.100014  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（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 |
|---------|---------|
|---------|---------|