

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08430

研究課題名（和文）リンパ系腫瘍における骨髄線維化誘導機構の解析

研究課題名（英文）Mechanism of secondary myelofibrosis in lymphoid malignancy

研究代表者

木村 文彦（Kimura, Fumihiko）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科学・教授

研究者番号：50536216

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：原発性骨髄線維症のような骨髄増殖性腫瘍では骨髄の線維化機序について様々な解析が加えられてきた。一方、多発性骨髄腫や悪性リンパ腫のようなリンパ系造血器悪性腫瘍においても骨髄の線維化を合併すると骨髄抑制の増悪などを引き起こし予後に悪い影響を及ぼす。この骨髄の線維化には血液細胞由来の線維細胞が重要な役割を果たしており、骨髄腫細胞からはIL-7、CCL22が産生され、これらが線維細胞を刺激して骨髄線維化を誘導していると考えられた。さらに、原発性骨髄線維症およびリンパ系腫瘍の両方に治療薬として開発されている薬剤のスクリーニングを行い、いくつかの薬剤で線維化細胞の誘導が抑制されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血球の増加を特徴とする骨髄増殖性腫瘍では、骨髄の線維化の進行が致命的となりうる。一方、多発性骨髄腫や悪性リンパ腫のようなリンパ系造血器悪性腫瘍でも骨髄の線維化を合併することがあり、臨床経過に悪影響を及ぼすと考えられる。本研究ではこれらリンパ系腫瘍における骨髄線維化誘導機序について線維細胞を中心に明らかにするとともに、線維化誘導を抑制する薬剤のスクリーニングを行った。リンパ系腫瘍における骨髄線維化を軽減する治療法の開発につながると思われる。

研究成果の概要（英文）：In myeloproliferative neoplasms such as primary myelofibrosis, various analyses have been conducted on the mechanism of bone marrow fibrosis. In lymphoid hematopoietic malignancies such as multiple myeloma and malignant lymphoma, bone marrow fibrosis also leads to increased bone marrow suppression and adversely affects prognosis. Fibrocytes derived from hematopoietic cells play an important role in this secondary myelofibrosis. We revealed that myeloma cells produce IL-7 and CCL22, which stimulate fibrocytes and induce bone marrow fibrosis. Furthermore, by screening drugs developed as treatments for both primary myelofibrosis and lymphoid tumors, we found that several drugs can inhibit the induction of fibrocytes.

研究分野：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫 悪性リンパ腫 骨髄線維症 サイトカイン ケモカイン

## 1. 研究開始当初の背景

原発性骨髄線維症を含む骨髄増殖性腫瘍においては骨髄の線維化は予後を規定する重要な要素であり、その病態には様々な解析が加えられ、治療薬の開発も行われてきている。一方、骨髄増殖性腫瘍以外の造血器悪性腫瘍においても骨髄線維化の合併は予後不良の要因となっているが、具体的な線維化誘導機序は不明で、その対処法も確立していない。

我々は単球由来の **fibrocyte** に着目して骨髄増殖性腫瘍における骨髄線維化機序を解析し、線維化進展を抑制する方法について検討を加えてきた。**fibrocyte** はコラーゲンのような間質細胞マーカーと **CD34** などの造血細胞マーカーの両方を持った紡錘形の単球由来細胞で、種々の臓器の線維化病態に関与すると報告されている。骨髄増殖性腫瘍 (MPN) の骨髄線維化における **fibrocyte** の役割についてヒト臨床検体、マウスモデルなどを使って研究を進めてきた結果、**fibrocyte** は MPN で活性化されるトロンボポエチン (TPO) シグナル伝達系で分化が促進され、MPN の骨髄線維化に必要で、**SLAMF7** がその表面マーカーになること、さらにこれを分子標的として治療に応用できることを明らかにした (Leukemia 2017;31:2709, Blood 2019;134:814)。その過程で、骨髄線維化症例 10 例の末梢血中に **CD16<sup>high</sup>SLAMF7<sup>high</sup>** の **fibrocyte** 前駆細胞分画が増加することを見出している (Leukemia 2017)。この中には MPN の症例の他に非ホジキンリンパ腫・多発性骨髄腫・骨髄異形成症候群・急性リンパ性白血病に伴う 2 次性骨髄線維症が含まれており、MPL 以外の骨髄線維化例でも末梢血中の **fibrocyte** 前駆細胞は増加していた。MPL では造血幹細胞の遺伝子変異により TPO シグナル伝達系が活性化され、MPL クローン由来の **fibrocyte** が増加し骨髄の線維化に深く関わっていると考えられる。しかしながら、MPN 以外の造血器悪性腫瘍、特にリンパ系腫瘍における **fibrocyte** の誘導機序、骨髄線維化の機序は明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

**fibrocyte** を中心にしてこれらリンパ系腫瘍における骨髄線維化誘導機構を解明する。2 次性骨髄線維症を促進する具体的な治療標的を同定し、その機構を断ち切ることで、それぞれの疾患の治療と組み合わせて骨髄線維化併発例の予後を改善することが可能になると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) リンパ系腫瘍細胞株のうち **fibrocyte** 誘導能をもつ細胞株の同定

**Fibrocyte** の培養には通常 DMEM を用いるが、リンパ系腫瘍細胞株は主に RPMI 1640 が用いられる。まずは RPMI 1640 と DMEM を混合して **fibrocyte** を培養し形態学的に評価する系を確立した。次に細胞株の培養上清と DMEM を混合する系を確立するため、培養条件が同じリンパ系腫瘍細胞株を複数入手した。予備実験を行い、5 株

(IM-9、KMS-12-BM、KMS-11、KMM-1、LICR-LON-HMy2) を実験に用いた。細胞株を RPMI 1640 で培養し、対数増殖期における培養上清を保存した。それらの培養上清と DMEM を 1:1 の割合で混合して fibrocyte を培養した。9 日目における fibrocyte の割合を顕微鏡下で測定し、fibrocyte 誘導能をもつ細胞株を同定した。

### (2) fibrocyte 誘導能をもつ細胞株の分泌する因子の評価

収集した細胞株の mRNA の RNA-seq を行い fibrocyte 誘導能の有無で遺伝子発現の差異を比較した。また培養上清中に fibrocyte の分化誘導に関連する蛋白が増加しているかを調べるため、LEGENDplex を用いて複数のサイトカイン・ケモカイン (IL-1RA、IL-4、IL-6、IL-7、IL-12p70、IL-13、IL-18、CXCL1、CCL2、CCL4、CCL22、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、M-CSF) を測定した。

リンパ系腫瘍の臨床検体 (血清、血算および骨髓線維化の臨床情報) を 80 例集積した。骨髓腫および一部のリンパ腫の患者血清について LEGENDplex で上記の項目を測定した。

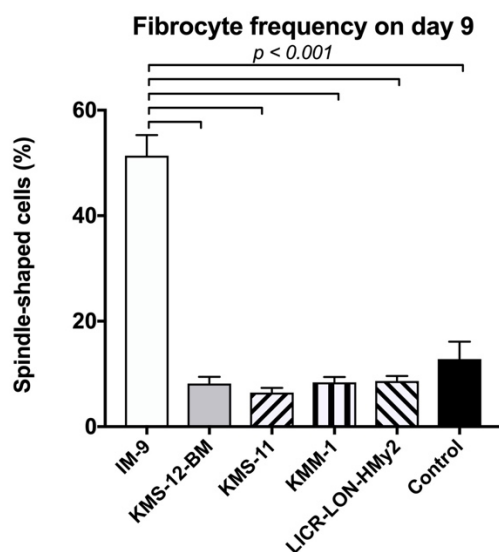
### (3) 薬剤による fibrocyte 誘導活性の抑制

原発性骨髓線維症およびリンパ系腫瘍の両方に治療薬として開発されている薬剤

(A~E) で、IM-9 による fibrocyte 誘導活性の影響を打ち消すことができるかを検討した。IM-9 の培養上清と D-MEM で培養する系に、DMSO に溶解した薬剤 A~E を投与した。薬剤の対象群には DMSO を用い、培養上清の対象には RPMI を用いた。

## 4. 研究成果

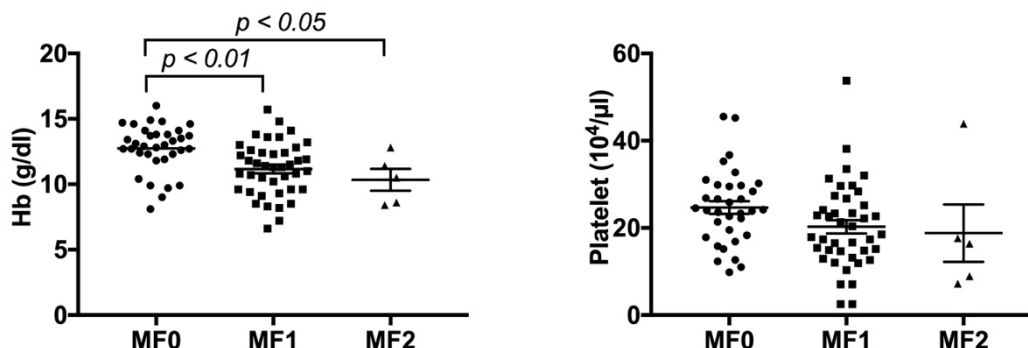
(1) fibrocyte 誘導能を持つ細胞株 1 株 (IM-9) と、ほとんど持たない細胞株 4 株を同定した。



(2) RNA-seq 解析では、誘導能を持つ IM-9 でその他の細胞株と比較して TIMP1、IL-7、CCL22 などの発現が上昇していた。

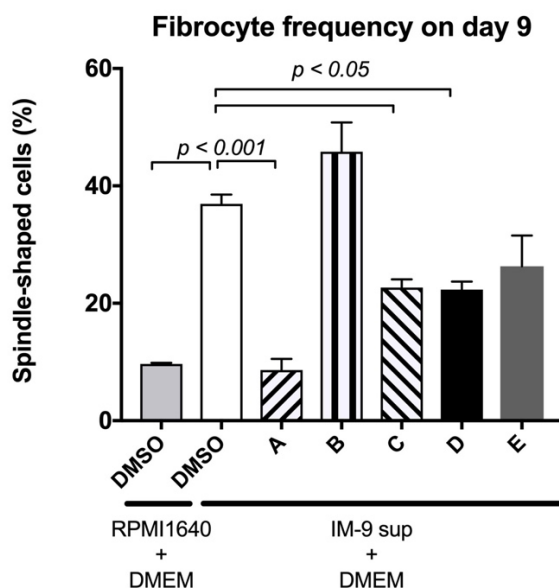
(3) LEGENDplex 解析では、誘導能を持つ IM-9 で培養上清中の IL-7、CCL22、CCL2、M-CSF の増加が認められた。

(4) 臨床検体では、骨髄の線維化に伴いヘモグロビンの低下が観察された。



(5) 多発性骨髄腫と一部のリンパ腫の症例の血清中サイトカイン・ケモカインを LEGENDplex で測定した。CCL22 は MF-2 の線維化症例で MF-1 の症例よりも有意に上昇していた。IL-7 も線維化の進行に伴い上昇する傾向が示唆されたが、症例数が少なく統計学的有意差は認めなかった。残りのリンパ腫の症例について ELISA での測定を計画している。

(6) 原発性骨髄線維症およびリンパ系腫瘍の両方に治療薬として開発されている薬剤 (A~E) のうち、IM-9 の培養上清による fibrocyte 誘導効果は薬剤 A、C、D で低減した。



以上より、リンパ系腫瘍においては IL-7、CCL22 が fibrocyte を介した骨髄線維化機序に関係している可能性があり、それらは開発中の薬剤で改善することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 (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	大澤 有紀子  (Osawa Yukiko)  (00816928)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科学・助教)    (82406)	
研究分担者	小林 真一  (Kobayashi Shinichi)  (50724655)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科学・講師)    (82406)	

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