

令和 2 年 5 月 10 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09901

研究課題名(和文) iPS細胞由来巨核球細胞および疾患特異的M蛋白を用いたPOEMS症候群の病態解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of POEMS syndrome with immortalized megakaryocyte progenitor cell lines

研究代表者

武内 正博 (Takeuchi, Masahiro)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50466702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アナグレリドがPOEMS症候群のVEGFを抑制するという報告があるため巨核球細胞株のimMKCLとアナグレリドの関係を中心に検討を行った。アナグレリドによる血小板産生抑制および巨核球の成熟抑制作用を再現することに成功した。その後、アポトーシスの有無、細胞周期の解析やRNA sequenceを行い、巨核球のapoptosisは誘導せずに細胞周期を制御していること、また、複数の遺伝子の発現を制御して血小板産生を抑制していることを明らかにすることが出来た。POEMS症候群に関連した遺伝子の一つであるVEGFの発現に関してはアナグレリドの投与前後で変化を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞由来巨核球細胞を用いて、作用機序の明らかでなかったアナグレリドの作用機序の一端を明らかにすることが出来た。これは将来、本態性血小板血症の治療薬の開発につながっていく可能性がある。また、本研究により、これまで単離が困難で研究が進みにくかった巨核球に関する研究を行う際にiPS細胞由来巨核球細胞を用いることで、より詳細な解析が行えることを明らかにすることが出来た。今後、巨核球が病態に関与していることが想定されているPOEMS症候群を始めとする疾患の研究に寄与することが出来るものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although anagrelide is a widely used therapeutic agent for patients with essential thrombocythemia, the exact mechanism of action is unclear. Immortalized megakaryocyte progenitor cell lines (imMKCLs) were established from human induced pluripotent stem (iPS) cells. Both undifferentiated and differentiated imMKCLs were treated with several different concentrations of anagrelide and followed by mRNA sequencing and some assaying procedures. We successfully reproduced the platelets-lowering effect of anagrelide by using imMKCLs from human iPS cells which could generate functional platelets in vitro. We also demonstrated that anagrelide inhibits the proliferation in undifferentiated imMKCLs through specifically suppressing the megakaryogenesis and platelet-formation related genes, and the maturation in differentiated imMKCLs through the altering of cell cycle related genes.

研究分野：血液学

キーワード：巨核球の機能解析 POEMS症候群 アナグレリド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

POEMS 症候群(Crow-Fukase 症候群, 高月病)は、plasma cell dyscrasia を基盤に、多発神経炎による末梢神経障害、臓器腫大、浮腫・胸腹水、皮膚症状(剛毛、色素沈着、血管腫)、骨硬化性骨病変、モノクローナル蛋白(M 蛋白)血症などを呈する全身性疾患であり、稀ではあるが、本邦で比較的頻度の高い疾患である。多彩な症状の中で、特に末梢神経障害が患者の ADL を著しく障害し、末期には四肢麻痺、多臓器不全に至る予後不良な疾患である。近年、多発性骨髄腫に準じて自家末梢血幹細胞移植、サリドマイドなどの新規薬剤により末梢神経障害を改善して ADL を改善し、生命予後も改善しうることが明らかとなってきた(Kuwabara S, Nakaseko C et al. Cochrane Database Syst Rev 2012)。

1996 年に本症候群患者血清中で血管内皮増殖因子(VEGF)が異常高値であることが報告されて以来、VEGF が多彩な症状を惹起していることが推定されている(Watanabe et al. Lancet 1996)。当初、VEGF はモノクローナル形質細胞が産生していると考えられていたが、一方で VEGF は本患者の血小板に高濃度に蓄積されて生理的な刺激により放出されることが判明している(Hashiguchi et al. Muscle Nerve 2000)。さらに POEMS 症候群では、M 蛋白軽鎖はほぼ全例で 型であるという、他の形質細胞腫瘍では見られない極めてユニークな特徴を有する。

申請者らは千葉大学神経内科と協力してこれまで世界的に見ても多数例の POEMS 症候群患者を治療するとともに、臨床検体を用いて以下の事実を明らかにしてきた。

自家移植やサリドマイド治療により血清 VEGF 値は有意に低下し、重篤な末梢神経障害等の臨床症状、生存期間を改善させる。(Kuwabara et al. Neurology, 2006,他多数)

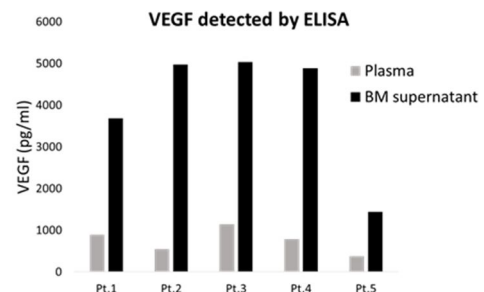
型再構成軽鎖は全例 V 1 subfamily に属し、しかも IGLV1-40 と IGLV1-44 というわずか 2 種類の特定の germline 遺伝子に由来する(Abe D et al. Blood 2008)。

VEGF は血清中よりも骨髄液中に高濃度に存在する(未発表データ。右図)

しかし、VEGF がどの細胞で産生されるか、また、その制御機構はまだ明らかではない。

申請者らは、VEGF の産生部位として骨髄内の形質細胞、ストローマ細胞、巨核球などを想定しているが、血小板中に VEGF が多量に含まれている事や、

POEMS 症候群と診断がつく前に本態性血小板血症の治療薬である Anagrelide (アグリリン®)を投与された症例で、Anagrelide 投与下では血清 VEGF が低値であったが Anagrelide 中止後に血清 VEGF が異常高値を示し POEMS 症候群の診断がついたとする報告を認めることから(2016 年日本血液学会総会にて城島らにより発表)、巨核球が VEGF の重要な産生源ではないかと想定している。また、非常に偏った germline 由来の M 蛋白が原因となっている事から、この M 蛋白が巨核球に直接アゴニストとして作用して VEGF の産生を亢進させているという仮説を考え、実証する方法を検討した。



## 2. 研究の目的

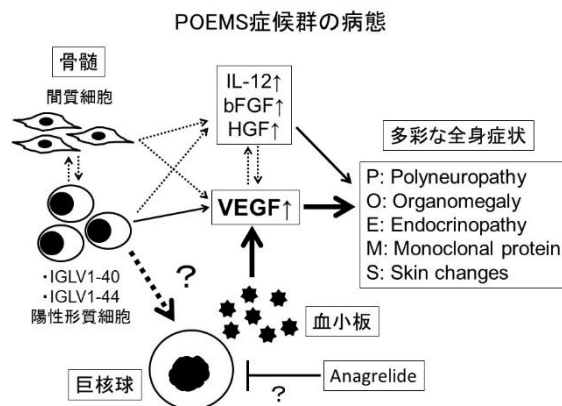
POEMS 症候群の発症機序のうち、最も核心部分と考えられる M 蛋白と巨核球の関係を重点的に明らかとし、さらに、巨核球もしくは血小板において VEGF の増加をもたらす状態を再現できた場合、Anagrelide によってその抑制ができるか検証し、そのメカニズムを明らかにする。(右図)

具体的には、以下の点を明らかとする予定である。

a) POEMS 患者由来の M 蛋白を巨核球に作用させて VEGF 産生が亢進するか。亢進する場合、シグナル経路を明らかとする。

b) M 蛋白と結合する蛋白の同定

c) Anagrelide による VEGF 産生抑制効果の有無の解析。産生抑制効果があれば、その機序の解析。



### 3. 研究の方法

1. POEMS 症候群患者骨髄検体より形質細胞を single cell sort し、cDNA ライブラリーを作成。そこから RT-PCR 法を用いて免疫グロブリンの可変部領域を増幅し、得られた可変部領域の遺伝子断片を抗体発現ベクターに組み込み、培養細胞株 (293 細胞) へ遺伝子導入して抗体を産生させる。これによって POEMS 症候群の形質細胞が産生する抗体を得ることができる。

2. imMKCL と POEMS 症候群患者由来の抗体を反応させて、VEGF の産生亢進が起きるか確認する。VEGF の産生が亢進していた場合は、抗体の作用部位の解析、細胞内シグナル経路の解析を行う。

3. Anagrelide を用いて imMKCL における VEGF 産生抑制効果の有無を確認する。

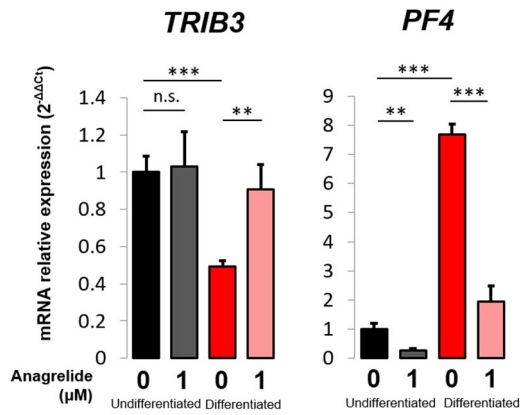
### 4. 研究成果

POEMS 症候群患者および多発性骨髄腫患者の骨髄中の形質細胞を Single cell sorting した上で、cDNA ライブラリー作成を行った。その結果、免疫グロブリン軽鎖および重鎖の配列が相同な複数の細胞が検出され、特に POEMS 症候群患者においては既報の特定の軽鎖が認められたことから、POEMS 症候群の腫瘍クローン由来の配列と推定し、重鎖および軽鎖のクローニングを行った。その後、腫瘍クローン由来の重鎖および軽鎖を元に 293T 細胞内で抗体の産生を行い、その精製を行った。精製された抗体と各種細胞株を用い、フローサイトメトリーやウェスタンブロッティング法で抗体の認識する抗原のスクリーニングを行い、抗体が認識する候補蛋白として蛋白質 A を同定した。その作用や POEMS 症候群の病態における意義については現在も検討中である。

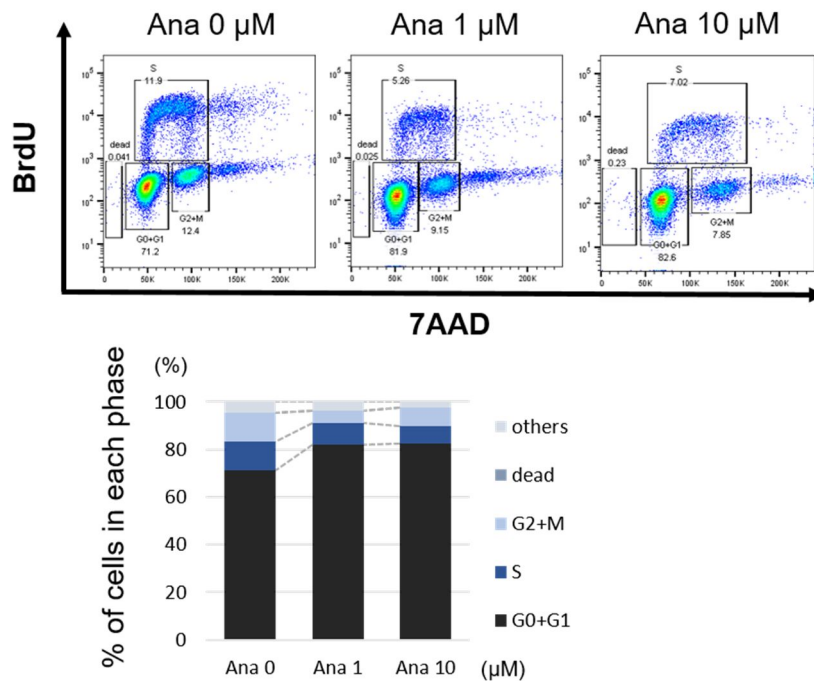
また、imMKCL による血小板産生については、共同研究者と連携し、feeder free の方法を用いて血小板産生を行うことに成功した。その後、Anagrelide による血小板産生抑制がどのように起きているかを確認するためにアポトーシスの有無、細胞周期の解析や RNA sequence を行った。Anagrelide の投与を行うことで imMKCL においても血小板産生抑制が起こることを明らかにし (図 3)、既報で Anagrelide によって発現が低下するとされる PF4 などの遺伝子発現は低下していることが確認でき (図 4)、また、アポトーシスは誘導しないこと (図 5)、細胞周期に関連する遺伝子群の発現を変化させていること (図 6) を確認できた。

	Undifferentiated (Non platelets producing)	Differentiated (Platelets producing)	
Anagrelide	Day2	Day2	Day6
OFF			
ON			

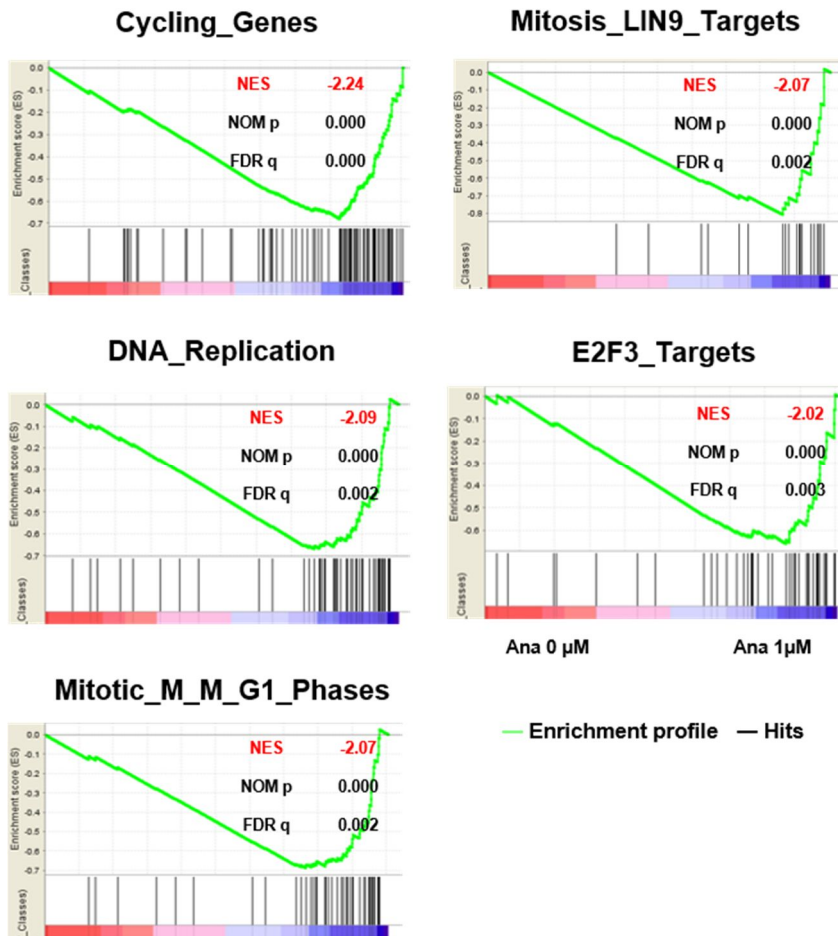
( 3 )



( 4 )



( 5 )



( 図 6 )

POEMS 症候群に関連した遺伝子の一つである VEGF の発現に関しては Anagrelide の投与前後で変化を認めなかったが、定常状態での評価であったことから病的に VEGF の産生亢進を起こしている状況での検討については今後の検討課題である。

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 Takaishi Koji, Takeuchi Masahiro, Tsukamoto Shokichi, Takayama Naoya, Oshima Motohiko, Kimura Kenji, Isshiki Yusuke, Kayamori Kensuke, Hino Yutaro, Oshima-Hasegawa Nagisa, Mimura Naoya, Ohwada Chikako, Iseki Tohru, Nakamura Sou, Eto Koji, Iwama Atsushi, Yokote Koutaro, Nakaseko Chiaki, Sakaida Emiko	4. 巻 105
2. 論文標題 Suppressive effects of anagrelide on cell cycle progression and the maturation of megakaryocyte progenitor cell lines in human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 e216 ~ e220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2018.214841	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koji Takaishi, Masahiro Takeuchi, Shokichi Tsukamoto, Naoya Takayama, Motohiko Oshima, Yusuke Isshiki, Kensuke Kayamori, Naoya Mimura, Chikako Ohwada, Tohru Iseki, Sou Nakamura, Koji Eto, Atsushi Iwama, Koutaro Yokote, Chiaki Nakaseko and Emiko Sakaida
2. 発表標題 Anagrelide Inhibits Proliferation and Platelet Generation in Immortalized Megakaryocyte Progenitor Cell Lines Established from Human Induced Pluripotent Stem Cells
3. 学会等名 2018 American Society of Hematology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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
連携研究者	中世古 知昭  (Nakaseko Chiaki)  (30323398)	国際医療福祉大学・医学部・教授   (32206)	
連携研究者	三村 尚也  (Mimura Naoya)  (00422220)	千葉大学・医学部附属病院・助教   (12501)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	堺田 恵美子 (Sakaida Emiko) (60422218)	千葉大学・医学部・准教授  (12501)	
連携研究者	大和田 千桂子 (Ohwada Chikako) (80436352)	千葉大学・医学部附属病院・講師  (12501)	
連携研究者	岩間 厚志 (Iwama Atsushi) (70244126)	東京大学・医科学研究所・教授  (12601)	
連携研究者	高山 直也 (Takayama Naoya) (10584229)	千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師  (12501)	
連携研究者	中村 壮 (Nakamura Sou) (50769833)	京都大学・iPS細胞研究所・助教  (14301)	
連携研究者	築地 信 (Tsuiji Makoto) (90302611)	星薬科大学・薬学部・准教授  (32676)	