

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08344

研究課題名(和文) 骨髄線維症におけるfibrocyteの線維化・髄外造血誘導機構の解析

研究課題名(英文) Mechanism of myelofibrosis and extramedullary hematopoiesis by fibrocytes

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄増殖性腫瘍(赤血球や白血球、血小板が異常に増加する血液の病気)では骨髄の線維化の進行が臨床的に問題となる。この過程においては血液細胞由来の線維細胞(fibrocyte)が重要な役割を果たしており、血液中の線維細胞の割合やIL-1レセプターアンタゴニスト(IL-1が受容体に結合するのを阻害する炎症阻害物質)の測定で骨髄の線維化が予測できることを明らかにした。さらに、線維細胞がCHI3L1という因子を分泌して線維芽細胞を刺激し骨髄中のコラーゲンを増加させていることを示した。

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は、骨髄の線維化の進行によって致命的になりうる難治性の血液疾患である。本研究では骨髄線維化における線維細胞(fibrocyte)の重要性とその役割をさらに明らかにするとともに、侵襲的な骨髄検査をすることなく、末梢血中の線維細胞の割合やIL-1レセプターアンタゴニストの測定によって骨髄の線維化を予測することが可能であることを明らかにした。さらに、線維細胞がCHI3L1の分泌を介して骨髄線維化を誘導していることから、これらを標的とすることで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)：Myeloproliferative neoplasms, blood cancer with excess production of red blood cells, white blood cells, and platelets, have a clinical issue with progressive bone marrow fibrosis. We revealed that fibrocytes, derived from blood cells, played an important role in this process, and proportion of fibrocytes in peripheral blood and serum IL-1ra level (inhibitor for IL-1 receptor) had a predictive value for bone marrow fibrosis. We also showed that fibrocytes secreted CHI3L1, which stimulated myofibroblasts to produce collagen in bone marrow.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 骨髄線維症 線維細胞 CHI3L1 IL-1レセプターアンタゴニスト

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

骨髄増殖性腫瘍 (MPN) における骨髄線維症は骨髄の線維化と髄外造血を特徴とする難治性病態で、その機序は完全には解明されていない。一方、fibrocyte はマクロファージと fibroblast 両方の性質を持つ単球由来の細胞で、造血前駆細胞のマーカーである CD45 と CD34 を発現しつつ、同時に細胞外基質蛋白も産生するという特徴を有する。fibrocyte と臓器線維化の関連は特発性肺線維症や喘息、心血管疾患、肺高血圧症、自己免疫疾患、腎性全身性線維症などの疾患で報告されてきた。骨髄線維症では、2016年8月に原発性骨髄線維症と fibrocyte の関連を裏付ける研究成果がはじめて報告された。我々は温度感受性 SV40T マウスから fibrocyte の細胞株を樹立し、その解析を通じてマウス及びヒトの fibrocyte がトロンボポエチンに反応して分化することを見出した。また、トロンボポエチン受容体作動薬であるロミプロスチムの大量投与による骨髄線維症モデルマウスの作成にも成功し、このモデルを用いてトロンボポエチン刺激が単球マクロファージから fibrocyte への分化を促進し、骨髄線維化や脾腫を誘導することを報告した (Leukemia 2017)。MPN のドライバー変異はいずれもトロンボポエチン受容体シグナル伝達系を活性化することから、腫瘍性クローンの fibrocyte への分化を促進し骨髄の線維化に寄与していると考えられた。しかしながら、fibrocyte が骨髄線維化や髄外造血を誘導する具体的機序については明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は fibrocyte を中心に骨髄線維症の病態を分子生物学的に解析することにある。fibrocyte はどのような分子メカニズムで線維化や髄外造血を誘導しているかを明らかにし、同時に骨髄線維化を予測するバイオマーカー、fibrocyte を標的にした治療法の可能性について探索した。

3. 研究の方法

(1) 2017年から2018年に当院でMPNと診断された58名の患者の末梢血を用いてフローサイトメトリー法により単核球中における SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球の割合を計測した。また、全患者の JAK2N617F、CALR、MPL の変異の有無について検索し、JAK2N617F 変異を伴う患者については JAK2 allele burden も計測した。SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球と SLAMF7^{low} CD16⁻ 単球を sorting し、JAK2N617F allele burden の計測と培養アッセイを行った。

(2) 2017年から2018年に当院でMPNと診断され血清の確保が可能であった52名の患者の血清を用いてELISA法によるCHI3L1の計測を行い、骨髄の線維化との関連を後方視的解析に解析した。ロミプロスチム投与によるマウス骨髄線維症モデルを用いて、ELISA法による血清中 Chi3l1 と RT-PCR 法による脾、骨髄組織内の Chi3l1 の定量的な評価を行った。さらに、野生型マウスと Chi3l1 ノックアウトマウスにおける骨髄線維化を比較し、同時に骨髄中における mRNA の評価を実施した。最後に、CHI3L1 がヒト fibroblast 細胞株 (HS-5) に及ぼす影響につき非接触系共培養実験によって評価した。

4. 研究成果

(1) 単球中の SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球の割合が骨髄線維化を伴う患者で上昇し、かつ JAK2N617F の存在と強い相関を認めたことから、単球分画の解析が骨髄線維化のスクリーニングに応用可能であることを示した (図1)。また、JAK2N617F 陽性患者における上述の分画の allele burden が SLAMF7^{low} CD16⁻ 単球の allele burden に比して高値であり、fibrocyte へ分化する割合も高かった (図2)。ヒト臍帯血を異種移植したマウスを用いてロミプロスチムで骨髄線維化誘導を行い、SLAMF7 が治療標的となりうることを示した (Blood 2019)。

図1

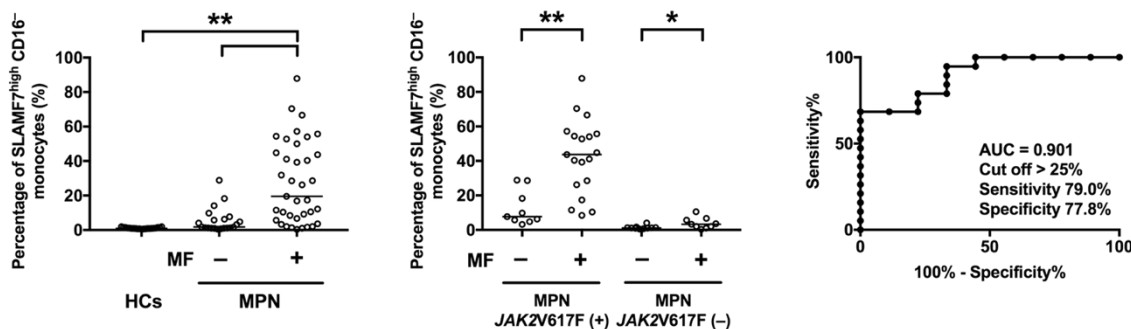
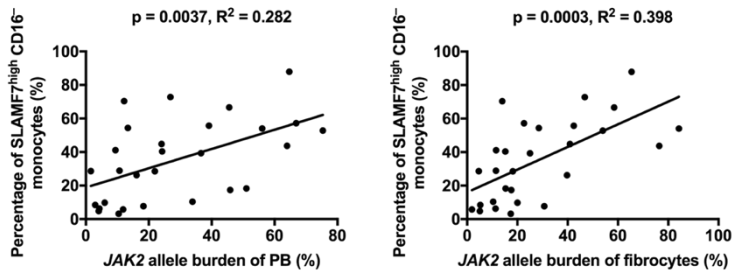


図 2



(2) サイトカインでは IL-1ra のレベルが *JAK2V617F* allele burden と fibrocyte 前駆細胞分画の割合と相関した (図 3)。さらに 600pg/ml 以上で骨髄の線維化を (図 4)、800pg/ml 以上で脾腫の有無をよく予測した (図 5)。

図 3

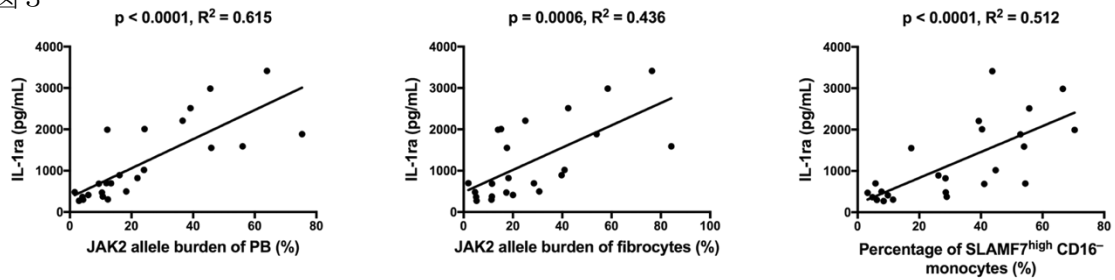


図 4

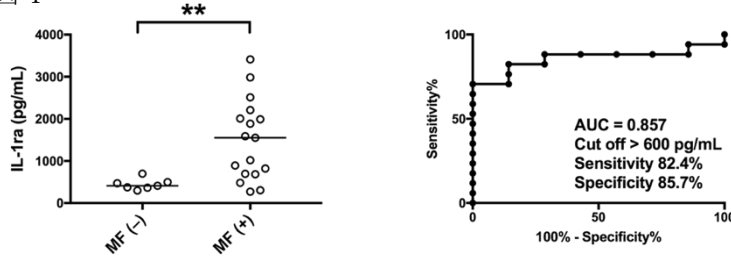
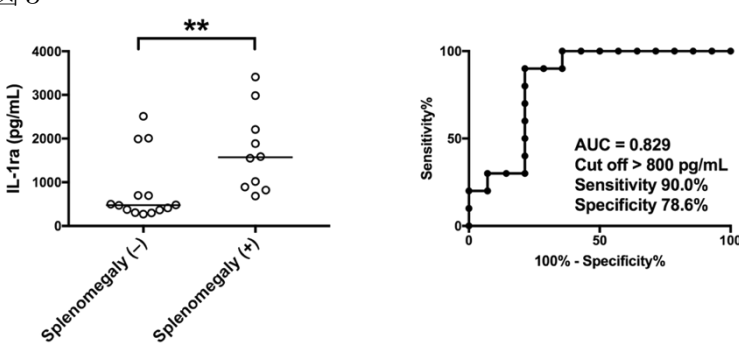


図 5



(3) ロジスティック回帰モデルによる多変量解析の結果、MPN 患者における脾腫の存在と血清 CHI3L1 値の上昇は骨髄線維化の程度を予測する独立した関連因子であった。ロミプロスチムを用いた骨髄線維症モデルマウスにおいて、RT-PCR 法で骨髄の *Chi3l1* mRNA の増加を確認し、clodronate liposome で単球系細胞を除去するとこの増加は消失した。野生型マウスと *Chi3l1* ノックアウトマウスにロミプロスチムを用いて骨髄線維化誘導を行ったところ、ノックアウトマウス群では有意に線維化の程度が軽減しており、骨髄組織の細胞外基質 (ECM) である *Col3a1* と *Acta2* の mRNA 発現も有意に低下していた。また、fibrocyte と HS-5 の非接触系共培養実験では、fibrocyte から分泌された CHI3L1 の濃度依存性に HS-5 株からの *COL1A1*、*COL3A1* の発現が亢進した (投稿中)。従って、CHI3L1 は骨髄線維症の新たな治療標的になり得ると考えられた。

(4) ロミプロスチム誘導骨髄線維化モデルマウスで、末梢血及び脾臓での造血幹細胞の増加を確認した。同時に MPN 患者末梢血中の CD34 陽性造血幹細胞比率が骨髄線維化とよく相関することを見出した。これらの実験を通じて、骨髄線維化を予測しうる複数のバイオマーカーを得ることができた。今後はこれらを整理し、感度・特異度の高い予測モデルを構築する。

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 0件）

1. 著者名 Takaaki Maekawa, Shoichiro Kato, Toshikuni Kawamura, ... Yukiko Osawa, ... Marito Araki, Makoto Makishima, Norio Komatsu, Fumihiko Kimura	4. 巻 134
2. 論文標題 Increased SLAMF7high monocytes in myelofibrosis patients harboring JAK2V617F provide a therapeutic target of elotuzumab	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 814 ~ 825
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2019000051	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8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Shoichiro Kato, Takaaki Maekawa, Hiraku Ogata, Yukiko Osawa, ... Ken Sato, ... Norio Komatsu, Fumihiko Kimura
2. 発表標題 Increase of SLAMF7high CD16negative monocytes in the peripheral blood of patients with myelofibrosis in correlation with the JAK2V617F mutation.
3. 学会等名 24th congress of EHA（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前川 隆彰, 加藤 章一郎, 小縣 開, 大澤 有紀子, ... 佐藤 謙, ... 小松 則夫, 木村 文彦
2. 発表標題 骨髓線維症患者の末梢血におけるJAK2V617F変異と関連したSLAMF7高発現単球の増加
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 章一郎, 前川 隆彰, 小縣 開, 大澤 有紀子, ... 佐藤 謙, ... 小松 則夫, 木村 文彦
2. 発表標題 Fibrocyteが産生するChi3l1は骨髓線維化の増悪因子であり治療標的となり得る
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Shoichiro Kato, Takaaki Maekawa, Hiraku Ogata, Yukiko Osawa, ... Ken Sato, ... Norio Komatsu, Fumihiko Kimura
2 . 発表標題 Chitinase 3-like 1 produced by fibrocytes promotes myelofibrosis
3 . 学会等名 61th Annual Meeting of the American Society of Hematology (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Takaaki Maekawa, Shoichiro Kato, Hiraku Ogata, Toshikuni Kawamura, Yukiko Osawa, Ayako Kobayashi, Shinichi Kobayashi, Fumihiko Kimura
2 . 発表標題 IL-1ra level in the serum is strongly correlated with the JAK2V617F Allele burden, myelofibrosis, splenomegaly and slamf7high CD16 - monocytes in the patients with myeloproliferative neoplasms
3 . 学会等名 25th congress of EHA (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Takaaki Maekawa, Shoichiro Kato, Yosuke Okada, Noriaki Tachi, Masahiro Teramoto, Toshikuni Kawamura, Yukiko Osawa, Shinichi Kobayashi, Ken Sato, Michihiro Hashimoto, Shinya Suzu, Kensuke Usuki, Soji Morishita, Marito Araki, Norio Komatsu, Fumihiko Kimura
2 . 発表標題 SLAMF7high CD16negative Monocytes Increase in Peripheral Blood of Patients with Myelofibrosis in Correlation with JAK2V617F Mutation
3 . 学会等名 60th Annual Meeting of the American Society of Hematology (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Takaaki Maekawa, Shoichiro Kato, Hiraku Ogata, Toshikuni Kawamura, Yukiko Osawa, Ayako Kobayashi, Shinichi Kobayashi, Fumihiko Kimura
2 . 発表標題 IL-1ra in the serum is correlated with the JAK2V617F allele burden, myelofibrosis, splenomegaly
3 . 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4 . 発表年 2020年

1. 発表者名 Takaaki Maekawa, Hiraku Ogata, Toshikuni Kawamura, Shoichiro Kato, Yukiko Osawa, Ayako Kobayashi, Shinichi Kobayashi, Fumihiko Kimura
2. 発表標題 The frequency of CD34+ cells per CD45+ cells in the peripheral blood enumerated by automated method is effective and universal as a non-invasive marker of myelofibrosis progressive in the patients with myeloproliferative neoplasms
3. 学会等名 26th congress of EHA (国際学会)
4. 発表年 2021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	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・内科学・助教) (82406)	
研究分担者	佐藤 謙 (Sato Ken) (20531297)	帝京大学・医学部・教授 (32643)	

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