

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08820

研究課題名（和文）骨髄異形成症候群における無効造血環境形成の血球動態に基づく基礎的検討

研究課題名（英文）Involvement of neutrophil homing in MDS environment formation

研究代表者

色摩 弥生（Shikama, Yayoi）

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40291562

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄異形成症候群（MDS）患者の好中球では、Rca1、FDG4とDOCK8の発現が低下し、遊走能減弱に關与していた。MDS骨髄では、好中球前駆細胞は健康人よりも多く、homingした老化好中球を含む成熟好中球は少なかった。しかし、Homing好中球を貪食した単球から伝達されるCXCL12産生抑制シグナルが不十分のため、前駆細胞の髄外放出が抑えられているとの仮説を証明するには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MDS患者の最大の死因が無効造血であるが、そのメカニズムは不明である。老化血球のhomingを介する新たな無効造血メカニズムの仮説を立て、証明を試みた。好中球の遊走能を制御する三つの蛋白の発現低下、それらが実際の遊走能低下に關与していること、及びMDS骨髄内の成熟好中球の減少は検証できたものの、新しいメカニズムの証明には課題が残った。

研究成果の概要（英文）：Neutrophils from patients with myelodysplastic syndromes (MDS) had decreased expression of Rca1, FDG4, and DOCK8, which contributed to their reduced migratory ability; bone marrow from MDS had more neutrophil progenitors and fewer mature neutrophils, including homing aged neutrophils, than healthy controls. However, the hypothesis that the inhibitory signal for CXCL12 production provided by monocytes phagocytosing homing neutrophils is insufficient to inhibit the release of extramedullary progenitors was not fully supported.

研究分野：血液学、医学教育学

キーワード：骨髄異形成症候群 好中球 homing

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndromes: MDS) は、無効造血、血球異形成、白血病への移行を特徴とする。患者の約4割が白血病で死亡するが、5割近くは白血病化せず、重症感染症等骨髄不全により死亡する。無効造血とは、骨髄中では血球前駆細胞の過形成が認められるが、末梢血液中の血球は減少している現象である。従って予後の向上には無効造血の解除または制御する術を獲得する必要がある。しかし、TNF- α 等のアポトーシス誘導性サイトカインの産生亢進が無効造血の一因と考えられているが、成熟血球が減少しているにもかかわらず何故前駆細胞は過形成なのか説明がつかず、無効造血の分子メカニズムは未だ解明されてない。

近年、骨髄から末梢血液中に放出された成熟好中球は、骨髄へのhomingを制御するCXCL12の受容体CXCR4の増加とCD62Lの発現減少を伴って老化し、骨髄に戻ってマクロファージに貪食される。貪食したマクロファージからnicheのCXCL12産生細胞に抑制シグナルが送られ、前駆細胞を骨髄にとどめるCXCL12の減少に伴って造血幹細胞及び前駆細胞の髄外放出が促されることが報告された¹。CXCL12の受容体CXCR4からのシグナルはRac1を介するが、CXCR4またはRac1が欠如すると好中球のhomingと前駆細胞の髄外放出は見られなくなる¹。Rac1は、Cdc42とともに好中球のmobilityを制御するRho family蛋白である。

一方、申請者らは、MDS好中球でmiR-34aとmiR-155が過剰発現していることを見出して報告した²。これらのmiRNAは、遊走を制御するRac1とCdc42の活性化分子のFGD4とDOCK8を標的とし、その発現を抑制する。そこで、miR-34aとmiR-155の過剰発現に起因する好中球の遊走能低下がhomingも抑制し、骨髄内の造血環境の変化を招いて前駆細胞の髄外放出を抑制し、無効造血を呈している可能性があると考えた。

¹Casanova-Acebes, et al, Cell 153, 1025-1035, 2013.

²Shikama Y, et al, PLOS One 11(8): e0158527, 2016

2. 研究の目的

(1) Rac1の減少及びCdc42の活性化分子のFGD4とDOCK8の減少が好中球の遊走能及び老化好中球のhomingを抑制していることを明らかにする。

(2) Rac1の減少及びCdc42の活性化分子のFGD4とDOCK8の減少が好中球前駆細胞のどの段階で生じているかを明らかにする。

(3) (1)と(2)の結果生じる骨髄環境の変化を検出する。

3. 研究の方法

(1) 健常人とMDS患者の末梢血液から好中球を分離し、Rac1、FGD4、DOCK8の発現量をWestern blottingで定量比較した。3 μ m poreを通りぬけてIL-8またはfMLPの存在するチャンパーに移動する好中球量を測定することにより好中球の遊走能を評価し、Rac1、FGD4、DOCK8の発現量との関係を解析した。健常人とMDS患者の骨髄血を得て、主に芽球～骨髄球が含まれる低比重(<1.065)CD34+分画、主に骨髄球～後骨髄球が含まれる中比重(1.065<, <1.080)CD11b+/CD16-分画、桿状核球～分葉核球が含まれる高比重(>1.080)CD11b+/CD16+の成熟好中球分画及びCD16+/CD62^{LO}/CXCR4^{HI}老化好中球分画をflow cytometryで識別し、その割合を算出した。

(2) 全てのMDS患者でRac1、FGD4、DOCK8の減少が好中球前駆細胞のどの段階で生じているかを明らかにするために健常人及びMDS患者のホルマリン固定骨髄クロット標本で免疫染色を行った。

(3) (2)の骨髄標本を用いてCXCL12の免疫染色を試みた。

4. 研究成果

(1) 健常人とMDS患者各6名の末梢血からは純度92%以上で好中球を分離した。全ての患者で三つの蛋白発現が一樣に減少しているわけではなく、健常人とMDS患者の間に有意差が認められたのはDOCK8であった。FGD4、Rac1が健常人の発現量の平均-2SDよりも少ない患者は、それぞれ4、5名であった。Rac1、FGD4、DOCK8蛋白の発現量とfMLP及びIL-8に向かう遊走能との間には正の相関が認められた。患者骨髄中の前駆細胞(低比重CD34+、中比重CD11b+/CD16-細胞)が健常人に比べて多いにもかかわらず、老化好中球を含む成熟好中球(高比重CD11b+/CD16+細胞)の割合は健常人に比べて少ないことも確認した。

(2) 患者と健常人のホルマリン固定骨髄標本を用いてRac1、FGD4、DOCK8の免疫染色を試みた。Rac1は細胞全体が一樣に染色される結果となり、細胞の種類を特定するための他の表面抗原との二重染色から好中球前駆細胞における発現を評価することは困難であった。DOCK8

は、赤芽球系には染色されずマクロファージと好中球特有的に陽性となったが、健常人と MDS 患者の間の量的な差は検出することはできなかった。DOCK8 の量的な差は、Western blotting など定量的方法では検出できても免疫染色で検出できるほどドラスティックなものではないことが示唆された。FGD4 は、上皮系の細胞では陽性になったが、好中球で染色されなかった。染色条件を変えても現在好中球系細胞の陽性は得られておらず、Western blotting の結果と祖語のあるものとなった。

(3)CXCL12 は様々な細胞で陽性になったが、健常人と MDS 患者の間の差を検出するには至らなかった。

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	橋本 優子 (Hashimoto Yuko) (60305357)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
研究分担者	池添 隆之 (Ikezoe Takayuki) (80294833)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

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