

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08764

研究課題名(和文) 骨髄線維症の線維化解除メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of fibrosis release in myelofibrosis

研究代表者

大澤 有紀子(Osawa, Yukiko)

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)

研究者番号：00816928

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)：TPO受容体作動薬で誘導した骨髄線維症(MF)モデルマウスを用いて、線維化解除の機序を調べた。MFは投与後11～13日目に極期に達し、18日目に消失していた。継時的な大腿骨標本及び骨髄細胞の解析から、解除期にはコラーゲンの分解酵素であるMMP-9発現が上昇し、好中球が産生していることを示唆できた。別のMFモデルであるJAK2V617F Tgマウスでは骨髄や末梢血におけるMMP-9の発現やタンパク量が上昇していたが、骨髄増殖性疾患患者の血清においてはTIMP-1フリーなMMP-9は有意な上昇を認めなかった。以上から好中球が産生するMMP-9が骨髄線維化の解除に寄与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の骨髄線維症の治療では、JAK-STAT経路を抑制するJAK2阻害薬Ruxolitinibの投与によって多少の線維化進展の抑制は得られるものの、線維化の程度が改善する例はごく一部に留まる。また、根治療法である造血幹細胞移植においても生着不全などのリスクが高く移植関連死亡が多いのが現状である。本研究は骨髄線維症に対して線維化解除メカニズムの観点からアプローチし、線維化解除への関与が示唆される細胞や分子を同定し、モデルマウスおよび疾患患者における発現の動態を明らかにした。本成果を基に線維化解除の促進が可能になれば、既存治療や移植療法と組み合わせることで治療成績の改善に寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Using a mouse model of myelofibrosis (MF) induced with TPO receptor agonist, we investigated the mechanism of fibrosis release. MF reached the extreme stage on days 11-13 after treatment and disappeared on day 18 in this model. Sequential analysis of femur specimens and bone marrow cells indicated that MMP-9 expression, a collagen-degrading enzyme, was upregulated during the releasing phase. Immunofluorescence of femur specimens exhibited co-localization of MMP-9 and a specific neutrophil marker, suggesting that neutrophils produced MMP-9. In another MF model, JAK2V617F Tg mice, MMP-9 expression and protein levels in bone marrow and peripheral blood were elevated, but TIMP-1-free MMP-9 was not significantly elevated in serum from patients with myeloproliferative disorders. These results indicate that MMP-9 produced by neutrophils may contribute to the release of myelofibrosis.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄線維症 線維化解除 MMP-9 好中球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原発性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の造血器悪性腫瘍で、JAK2V617F 変異・MPL 変異・CALR 変異のいずれかがドライバー変異となって発症する。これらの変異はいずれもトロンボポエチン (TPO) シグナル伝達系を活性化することから、骨髄の線維化機序は TPO が刺激する巨核球を中心に解析されている。

一方我々は単球に由来する fibrocyte に着目し、TPO 受容体作動薬を用いたマウスモデルでは、TPO 刺激が単球から fibrocyte への分化を誘導し、この fibrocyte が骨髄の線維化に重要な役割を果たしていることを明らかにしている (Leukemia 2017;31:2709)。また、fibrocyte は chitinase 3-like 1 (CHI3L1) を産生し、これが myofibroblast を刺激して I 型および III 型コラーゲンの産生を増強、骨髄線維化につながることを見出している(投稿準備中)。

骨髄線維症の唯一の根治療法は同種造血幹細胞移植で、生着後に骨髄の線維化が解消することが知られている。移植により腫瘍性クローン由来の fibrocyte が消失することが重要と考えられるが、増加した骨髄の膠原線維の分解機序は不明な点が多い。予備実験では、破骨細胞及びマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が関与する可能性を得ていることから、本研究では具体的な治療標的となる分解機序の関与する細胞や酵素を同定し、新規治療法の開発につなげることを目標とする。

2. 研究の目的

TPO 受容体作動薬の一つであるロミプロスチム (Rom) で作成した骨髄線維症モデルマウス (Rom 誘導 MF マウス) を用いて、投与中止後に線維化が解除される機序を解明する。また線維化解除を促進する細胞や分子を同定し、これらを標的にした治療法の開発をめざす。

3. 研究の方法

(1) 骨髄線維化の継時的変化および遺伝子プロファイルの評価 : C57BL/6 マウスに Rom を不連続 2 回投与して骨髄線維症モデルマウスを作成した後、経時的に大腿骨の組織標本作製し、HE 染色、鍍銀染色、マッソントリクローム染色を行った。組織標本の画像を数値化するために、連結画像による全体像を対象として、線維化部位の面積、細網線維の形状等を定量評価した。また脾臓の重量測定、末梢血の血算測定を行った。

さらに線維化解除の過程にあるマウス骨髄を用いて RNA シーケンスを行い、変動を示した遺伝子や遺伝子群を抽出した。

(2) 破骨細胞の関与 : 破骨細胞やマクロファージに対する殺細胞作用を示すクロドロン酸リポソームを Rom 誘導 MF マウスに投与して破骨細胞を除去し、線維化の解除が遅延するか評価した。また破骨細胞の分化や機能を抑制するマウス抗 RANKL 抗体を投与し、線維化解除の遅延を評価した。

(3) マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の関与 : コラーゲンの分解酵素である MMP

ファミリーの挙動を評価するために、Rom 誘導 MF マウスから経時的に骨髓細胞を採取し、RQ-PCR を行った。また大腿骨の組織標本の免疫組織染色を行い、MMP-9 を産生する細胞の同定を行った。

(4) JAK2V617F Tg マウスおよび骨髓増殖性疾患患者における MMP-9 発現の評価：別の骨髓線維症モデルである JAK2V617F Tg マウスの骨髓及び末梢血白血球や骨髓増殖性疾患患者の末梢血好中球における MMP-9 の発現を RQ-PCR で評価した。またマウス血漿や患者血清を用いて MMP-9 のタンパク量を ELISA 法で評価した。

4 . 研究成果

(1) Rom 誘導性の骨髓線維化は 11 ~ 13 日目に極期に達し、18 日目には消失した。11 日目に巨核球数と白血球数、13 日目に脾臓の重量がピークを迎えた。18 日目になると白血球数はほぼ正常値に戻ったが、脾臓の重量は Rom2 回投与直後の重量にとどまった。血小板は測定期間を通して高値を示し測定不能だった。線維化解除の機序は、線維化のピーク前後から 18 日目にかけて活性化されると考えられる。

(2) Rom 投与後 15 日目の骨髓細胞を RNA シーケンスおよびエンリッチメント解析した結果、破骨細胞の分化に関わる遺伝子群を抽出できた。そこで Rom 誘導 MF マウスにクロドロン酸リポソーム及び抗 RANKL 抗体を投与したところ、単球由来の破骨細胞は除去できたが、線維化解除の経過には影響を与えなかった。NOG マウスでも同様の結果だった。Rom 誘導 MF マウスの場合、線維化解除における破骨細胞の重要性は見出せなかった。

(3) 前述の RNA シーケンスでは *Mmp-2, 8, 9* の発現上昇を認めた。またエンリッチメント解析では、好中球の脱顆粒に関わる遺伝子群が抽出された。そこで線維化および解除の過程における MMP-2, 8, 9 及び生理的阻害物質である TIMP-1 の経時的な変化を調べるために、骨髓細胞を RQ-PCR 解析したところ、*Timp-1* mRNA の発現は線維化の過程に一致して 11 日目に最大となる一方で、*Mmp-9* mRNA の発現量は 13 日目で最大になり、線維化解除の経過と一致して変動していた。

骨髓における MMP-9 産生細胞を同定するために解除期の大腿骨標本を観察すると、分葉核球が増加していた。さらに免疫組織染色では MMP-9 とマウス好中球の特異的表面抗原 Gr-1 の共局在も明らかになった。

(4) 別の骨髓線維症モデルマウスである JAK2V617F Tg マウスでは WT と比較して骨髓および末梢血白血球における *Mmp-9* の発現量が増加していた。また骨髓増殖性疾患患者の末梢血好中球についても増加する傾向を示した。一方で患者血清では MMP-9 のタンパク量が増加する傾向にあったが、TIMP-1 フリーな MMP-9 については健常人と比較して有意な差を認めなかった。

以上の結果から、好中球から産生された MMP-9 がコラーゲンを分解し、骨髓線維化の解除に寄与している可能性を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiraku Ogata, Toshikuni Kawamura, Shoichiro Kato, Takaaki Maekawa, Noriaki Tachi, Yukiko Osawa, Shinichi Kobayashi, Fumihiko Kimura
2. 発表標題 MMP-9 produced by neutrophil ameliorates TPO-R agonist induced myelofibrosis
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022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	木村 文彦 (Kimura Fumihiko) (50536216)	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 (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
---------	---------