

高齢者における造血・骨の機能回復に向けた新規治療法の探索

神戸医療産業都市推進機構先端医療研究センター 血液・腫瘍研究部

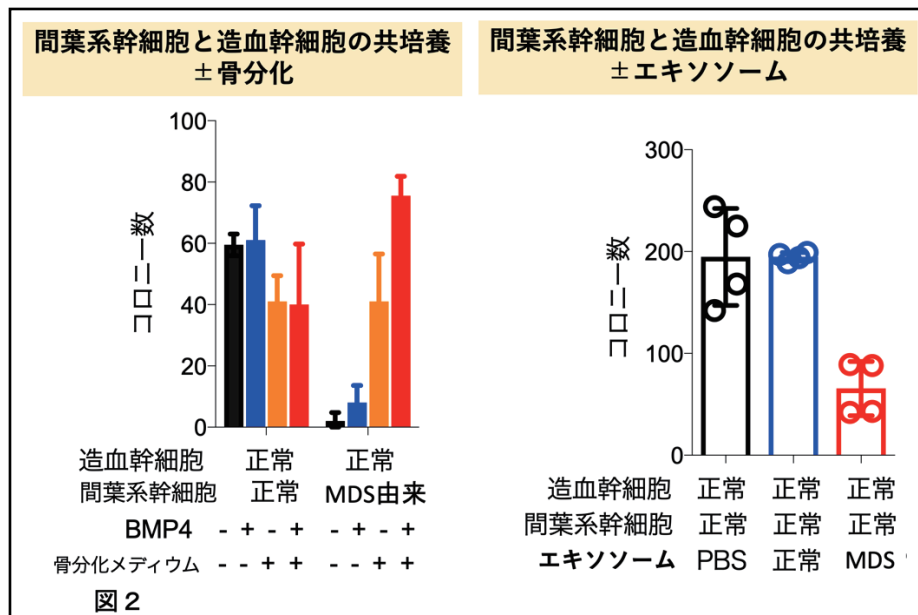
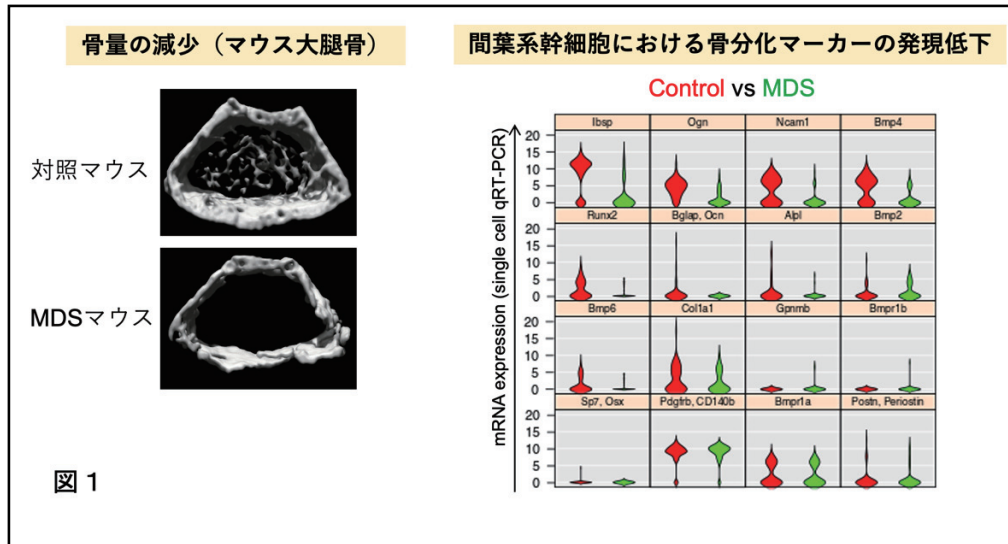
上席研究員 井上 大地

はじめに

造血幹細胞の遺伝子変異、形態異常を伴う血球減少、白血病への進展を特徴とする骨髄異形成症候群（MDS）は高齢者に多く、幹細胞移植以外に根治療法のない難治疾患であるが、治療関連合併症により多くのMDS患者は移植療法の対象となりにくい。そのため、造血不全による輸血依存に陥ることが多いもののMDS患者において正常造血を回復させることは極めて困難であると言わざるを得ない。これまでに我々は造血幹細胞自身の遺伝子変異に着眼して、エピゲノム異常やスプライシング異常を中心に研究を進めてきたが⁽¹⁻³⁾、MDS幹細胞がどのようにして正常造血を抑制するのかは十分に解明されていない。造血を司る骨髄は多細胞系であり、間葉系細胞、骨、血管、神経、免疫細胞など多様な骨髄微小環境が造血維持に関わっている。特に骨細胞による正常造血幹細胞のサポート機能に着眼しているが、MDSのモデルマウスでは、骨の菲薄化が進んでおり、ヒトMDSでも同様の傾向が認められる。詳細な解析により、MDS幹細胞が細胞外小胞（エキソソーム）を介して間接的に間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を抑制していること、分化抑制にMDS幹細胞由来のエキソソームが必要十分であること、骨形成を促進すると造血機能も回復することが我々の研究で明らかとなった（未発表データ）。これらの知見からMDSの病態において、変異を有する造血幹細胞そのものを駆逐することはできなくても、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化抑制を解除することができれば、残存する非クローン性造血幹細胞由来の造血機能を回復させることができると考え、高齢者の造血・骨ネットワークを対象とした治療応用の基盤となるデータの蓄積を進めている。

結 果

長期間のストレス下造血を反映する我々のMDSマウスモデルでは、野生型の造血幹細胞との競合的移植実験において、末梢血・骨髄ともに顕著なキメリズムの低下を認めた。しかし、造血幹細胞分画に限局するとキメリズムは低下しておらずMDS幹細胞が微小環境のサポートを得て維持される現象を捉えることができた（以下すべて未発表データ）。様々なMDSマウスモデルを検討した結果、大多数を占める非クローン性の正常造血幹細胞・前駆細胞の質的低下を認めたが、正常幹細胞とMDS幹細胞を共培養しても正常クローン由来のコロニー形成能や増殖能は不変であり、間接的な作用が示唆された。一方でMDSのモデルマウスでは骨皮質・骨端線の菲薄化・骨量の低下等（図1左）が認められ、骨髄微小環境側の主因



子として骨に着眼し⁽⁴⁾、MDS幹細胞による骨形成能の低下が正常造血を負に制御すると仮説を立てた。単一細胞RNAシーケンス (scRNA-seq) により、MDSマウスの間葉系幹細胞では*Runx2*や*Bglap*といった骨芽細胞マーカーが低下し骨芽細胞の減少を認めた (図1右)。MDS患者では成熟骨芽細胞が減少すること、骨粗鬆症はMDS発症のリスクとなることがすでに報告されており⁽⁵⁾、我々の患者コホートでもMDS患者で骨量の減少を認めた。これらの結果を裏付けるように、正常造血幹細胞はMDSモデル由来の間葉系幹細胞との共培養下でコロニー形成能が著しく障害されたが、*Bmp4*を含む骨芽細胞への分化を促進する条件下で完全にレスキューされた (図2左)。さらに、*in vivo*でも骨芽細胞への分化を促進するPTH (1-34) 製剤の投与で正常造血の改善がみられた。興味深いことに、異常な造血幹細胞由来の細胞外小胞 (主にエクソソーム) が間葉系幹細胞に取り込まれており、*in vitro*において骨芽細胞への分化抑制はこの細胞外小胞のみで十分であった。驚くべきことに、MDS由

来の細胞外小胞のみでコロニー形成の低下（図2右）、*in vivo*でも骨の菲薄化とそれに付随する造血能の低下が認められ我々の仮説が裏付けられた。ヒトMDSにおいても骨量の低下、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化障害、骨芽細胞への強制分化による*in vitro*での造血能の回復が認められた。さらに、エクソソーム内のmicro RNA (miRNA)の網羅的解析により、骨分化を抑制するmiRNA群を同定し、ヒト検体中のmiRNAマイクロアレイの結果と合わせて複数の鍵となるmiRNAに対して治療対象としての妥当性の評価を行っている。

考 察

本研究において、長期にわたる障害を受けたMDS幹細胞由来の細胞外小胞(エクソソーム)を鍵として、代表的なニッチ細胞である間葉系幹細胞を介した新しい造血抑制メカニズムを解き明かすことに成功した。この成果をもとに、造血幹細胞に由来するエクソソームが骨髄内の多細胞システムを制御するという新たな考えに基づき、その機構を解き明かしエクソソーム創薬への基盤となることが期待される。クローン性造血が骨髄以外のあらゆる機能低下の原因となっていることを鑑みれば、本研究は造血幹細胞を出発点とするものの、その成果は骨粗鬆症による骨折の予防や、加齢に伴う貧血や免疫機能の改善、炎症を伴う脂質代謝を背景とする動脈硬化性病変（脳梗塞・心筋梗塞など）の予防といった健康寿命に直結するものばかりである。造血幹細胞を中心として多細胞間のクロストークが明らかとなれば理論的裏づけをもとに臨床応用可能であり、生活の質を大きく改善することが期待される。また、エクソソームが標的細胞に取り込まれる上で必須の表面タンパクや脱制御されているパスウェイを同定すること、標的へのドラッグデリバリーを開発することは新領域の医療シーズに直接つながるものと考えている。とりわけ、エクソソーム創薬の技術革新は、高齢者に共通してみられる各臓器の機能低下や造血器疾患に止まらず様々な生命現象の脱制御に応用できる普遍的なツールとなる可能性を含んでいると言える。

要 約

骨髄内の造血幹細胞は多様なストレス環境に晒されながら間葉系幹細胞など骨髄ニッチのサポートを得て量的・質的に維持されている。しかし、多様なストレスを経た結果、質的に老化した細胞やクローン性造血幹細胞の産生が認められ、造血機能の低下だけでなく骨粗鬆症・動脈硬化症などとの関連が報告されている。これまでの研究で造血幹細胞が骨分化を促進させ骨髄ニッチ環境に造血をサポートさせる適応機構を解明しつつあるが、興味深いことに、長期間のストレスの結果生じた骨髄異形成症候群（MDS）などのクローン性造血幹細胞ではこの機構が破綻しており、骨芽細胞による造血支持能の低下や骨の菲薄化を認めた。さらに、異常な造血幹細胞由来の細胞外小胞(主にエクソソーム)が間葉系幹細胞に取り込まれ、骨芽細胞への分化を抑制し造血支持能が失われることを突き止め、造血幹細胞がエクソソ-

ムをエフェクターとして骨髄ニッチ環境の代償・修復機構を調節することを実証した。さらにエクソソーム内において重要な調節因子となる microRNA を明らかにしつつあり、今後エクソソーム創薬と核酸医薬を用いた細胞外小胞ネットワークを標的とした治療応用につながるものと期待される。

文 献

1. Inoue D, Chew GL, Liu B, Michel BC, Pangallo J, D'Avino AR, Hitchman T, North K, Lee SC, Bitner L, Ariele B, Moore AR, Yoshimi A, Hoyos LE, Cho H, Penson A, Lu SX, Taylor J, Chen Y, Kadoch C, Abdel-Wahab O, Bradley RK. Spliceosomal disruption of the non-canonical BAF complex in cancer. *Nature*. 2019 Oct;574 (7778) :432-436.
2. Nagase R, Inoue D (co-first and Corresponding author) , Pastore A, Fujino T, Hou HA, Yamasaki N, Goyama S, Saika M, Kanai A, Sera Y, Horikawa S, Ota Y, Asada S, Hayashi Y, Kawabata KC, Takeda R, Tien HF, Honda H, Abdel-Wahab O, Kitamura T. Expression of mutant Asx11 perturbs hematopoiesis and promotes susceptibility to leukemic transformation. *J Exp Med*. 2018, 215 (6) , 1729-1747.
3. Inoue D, Bradley RK, Abdel-Wahab O. Spliceosomal gene mutations in myelodysplasia: molecular links to clonal abnormalities of hematopoiesis. *Genes Dev*. 2016, 30 (9) , 989-1001.
4. Asada N, Katayama Y, Sato M, Minagawa K, Wakahashi K, Kawano H, Kawano Y, Sada A, Ikeda K, Matsui T, Tanimoto M. Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Stem Cell*. 2013, 12 (6) , 737-747.
5. Weidner H, Rauner M, Trautmann F, Schmitt J, Balaian E, Mies A, Helas S, Baschant U, Khandanpour C, Bornhäuser M, Hofbauer LC, Platzbecker U. Myelodysplastic syndromes and bone loss in mice and men. *Leukemia*. 2017, 31 (4) , 1003-1007.