

学 位 論 文 要 旨

博士課程 甲・乙	第 号	氏 名	大園 芳範
<p>[論文題名]</p> <p>Neoplastic fibrocytes play an essential role in bone marrow fibrosis in Jak2V617F-induced primary myelofibrosis mice.</p> <p>腫瘍性の fibrocytes は Jak2V617F 骨髄線維症モデルマウスにおける骨髄線維化に中心的な役割を果たしている。</p> <p>Leukemia. 2020 May 29. doi: 10.1038/s41375-020-0880-3. Online ahead of print.</p> <p>[要 旨] 【背景】 原発性骨髄線維症 (Primary myelofibrosis; PMF) は骨髄系血球細胞のクローン性増殖、進行性の骨髄線維化、脾腫、貧血を特徴とする骨髄増殖性腫瘍である。骨髄線維化は従来、異常増殖した巨核球や血小板などから TGF-β1 などのサイトカインが過剰に産生されることで、間葉系間質細胞である myofibroblast が反応性に増殖することにより細胞外基質 (コラーゲンやフィブロネクチン) が蓄積する現象と考えられてきた。しかし、近年、単球由来の細胞である fibrocyte が骨髄線維化に関与するという知見が報告されてきたものの、結論は明らかにされていない。【目的】 骨髄線維症モデルマウスである <i>Jak2V617F</i> トランスジェニック (TG) マウスを用いて、骨髄線維化における血球に由来する腫瘍性 fibrocyte の役割を明らかにする。【方法】 <i>Jak2V617F</i> TG マウスと野生型マウスの骨髄細胞を培養して得られる紡錐形細胞が、fibrocyte であるかどうかを検討した (実験①)。次に、fibrocyte が発現する血球マーカーである CD45 を用いて fibrocyte の由来を調べた。<i>Jak2V617F</i> TG マウス (CD45.2) あるいは野生型マウス (CD45.1) と一緒に野生型マウス (CD45.1) の骨髄を野生型レシピエントマウス (CD45.1) に競合移植し、レシピエントマウスの骨髄中に fibrocyte が増えているか、またその fibrocyte がドナーとレシピエントのどちら由来であるかについて、CD45.1 と CD45.2 を区別して染色することにより検討した (実験②)。次いで、単球特異的に発現する CD11b のプロモーターの下流にジフテリアトキシンレセプター (diphtheria toxin receptor; DTR) を入れた TG マウスと <i>Jak2V617F</i> TG マウスを交配して <i>Jak2V617F</i>/CD11b-DTR TG マウスを作成した。このマウスでは骨髄を野生型マウスに移植し、DT を投与すると単球が除去される。単球を除去した際に骨髄および脾臓中の fibrocyte が減るかどうか、またそれにより骨髄および脾臓の線維化や脾腫が抑制されるか、さらに末梢血や骨髄中の造血幹細胞に及ぼす影響などについて検討した (実験③)。骨髄線維症の進展には TGF-β1 の関与が報告されているため、<i>Jak2V617F</i>/CD11b-DTR TG マウスの骨髄を移植したレシピエントマウスに DT を投与した群とコントロール群との間で血漿中の TGF-β1 濃度を比較した。また、<i>Jak2V617F</i> TG</p>			

マウスおよび野生型マウスの骨髄細胞の培養時に TGF- β 1 中和抗体を添加することで、単球から fibrocyte の分化が抑制されるかどうかを検討した(実験④)。【結果】(結果①)骨髄細胞の培養開始5日後に dish 内に多数の紡錐形細胞が観察された。この紡錐形細胞は野生型マウスよりも *Jak2V617F* TG マウスの骨髄細胞から多く出現した。さらにこの紡錐形細胞は血球系のマーカー (CD45, CD11b, CD34, CD16, CD68)、細胞外基質 (コラーゲン, フィブロネクチン, Vimentin, α -SMA)などは発現していたが、一方で間葉系のマーカー (CD90, Gli1, Leptin receptor)は発現しておらず、以上より紡錐形細胞は fibrocyte であると考えられた。(結果②)*Jak2V617F* TG マウスの骨髄を移植したレシピエントマウスにおいてのみ、骨髄および脾臓中に多数のコラーゲン、フィブロネクチン陽性細胞が見られ、その大部分はドナーの血球由来の fibrocyte であった。一方、myofibroblast は少数であった。(結果③)*Jak2V617F/CD11b-DTR* TG マウスの骨髄を移植したレシピエントマウスに DT を投与して単球除去したところ、骨髄および脾臓中の fibrocyte が著明に減少した。myofibroblast も減少したが、その程度はわずかであった。さらに DT 投与により単球を除去した群では骨髄線維化と脾腫が抑制され、貧血の改善も見られた。(結果④)*Jak2V617F/CD11b-DTR* TG マウスの骨髄を移植したレシピエントマウスの血漿中の TGF- β 1 濃度は野生型マウスの骨髄を移植したマウスの血中濃度の約 2 倍であったが、DT 投与により血漿中の TGF- β 1 濃度は正常化した。また、*Jak2V617F* TG マウスの骨髄細胞から培養した fibrocyte の蛍光免疫染色および real-time PCR の結果から、fibrocyte が TGF- β 1 を産生していることが示された。また、*Jak2V617F* TG マウスの骨髄細胞を培養した well に TGF- β 1 中和抗体を添加したところ、濃度依存性に単球から fibrocyte への分化が抑制された。【結論】以上の結果より、骨髄線維症モデルマウスにおいて骨髄線維化に最も寄与する細胞は、血球に由来する腫瘍性の fibrocyte であると考えられた。また、fibrocyte 自身も TGF- β 1 を産生し、単球から fibrocyte への分化には TGF- β 1 が必要であると考えられた。

【考察】本研究により骨髄線維化の主な原因細胞は、従来言われてきた間葉系幹細胞由来の myofibroblast ではなく、単球由来の腫瘍性 fibrocyte であることが示された。これはヒトでの知見 (Verstovsek S, et al. JEM 2016) と併せて、疾患概念を大きく変える成果である。JAK 阻害薬である Ruxolitinib は骨髄線維症患者に対して第一選択薬で用いられており、脾腫と自覚症状(全身倦怠感、腹部不快感、掻痒感)を改善するが、骨髄線維化や貧血の改善は認められない。本研究の結果は、fibrocyte を治療標的とすることで、従来の治療薬では改善が難しい骨髄線維化や貧血を改善し得る治療薬の開発が可能であることを示している。現在、単球から fibrocyte への分化ならびに fibrocyte の生存を阻害する化合物を同定するべく、化合物ライブラリを用いたスクリーニング実験を進めている。

備考 論文要旨は、和文にあつては 2, 000 字程度、英文にあつては 1, 200 語程度