

## 特発性再生不良性貧血における HLA 欠失現象を利用した造血分化制御機構の解明

片桐孝和

金沢大学医薬保健研究域 保健学系 病態検査学講座

### 【研究の背景】

特発性再生不良性貧血(AA)においてはその患者の多くが免疫抑制療法により改善することから、造血幹細胞に対する免疫学的な攻撃が原因と考えられているが、実際の病態についてはほとんど明らかにされていない。これまでの網羅的 SNP アレイとフローサイトメトリー (FCM) を用いた研究で、AA 患者の約 15% では、HLA の片側が LOH (Loss of heterozygosity) により欠失した白血球が存在することを明らかにした (Katagiri T. et al. Blood)。このような HLA 発現の欠失は、患者末梢血液中の全系統の白血球に加えて、骨髄 CD34 陽性細胞においてもみられることから、これらは 6pLOH を起こした造血幹細胞由来と考えられた。

### 【目 的】

従来、造血幹細胞に多様性があることは動物モデル (マウス) では報告されているが、ヒトではクローナルマーカがないために検証自体が不可能であった。今回、6pLOH をマーカーとして、造血前駆細胞の遺伝子発現プロファイルと比較することにより、ヒト造血幹細胞の増殖・分化を制御する重要な分子を同定するとともに、ヒト造血における分化制御機構を解明することを目的として、本研究を実施した。

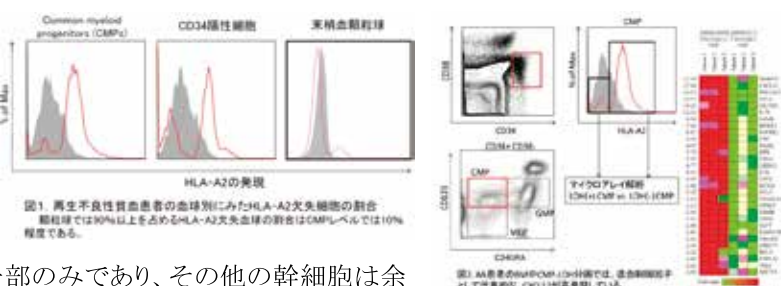
### 【方 法】

1. 6pLOH 陽性 AA 患者で、骨髄造血 (前駆) 細胞における HLA 欠失細胞の割合を FCM を用いて検討した。
2. HLA 発現欠失 CMP 分画と正常 CMP 分画および MEP、GMP 分画を FACS Aria II によりソーティングし、RNA を抽出した。
3. cDNA マイクロアレイにより、各分画における遺伝子発現のプロファイルと比較し、Heat-map において発現に差がみられた遺伝子を抽出し、細胞増殖やアポトーシスに関連した分子を同定した。
4. 3 により同定された関連分子の発現を、6pLOH 陽性患者の骨髄細胞にて検討した。
5. *ex vivo* でコロニーアッセイおよび細胞周期解析を実施し、特定分画の細胞集団についての増殖能力を検討した。
6. 3 において同定された関連分子について、マウスにおける発現解析を実施した。

### 【結 果】

6pLOH 陽性寛解期 AA 例では、6pLOH の割合が、顆粒球全体の 90% 以上を占めているにも関わらず、骨髄 CD34+細胞では 40% であり、さらに未熟な CD34+細胞分画の CMPs ではわずか 10% に過ぎないことを明らかにした (図 1)。

この所見は、CD34+細胞より未分化な造血幹細胞では、実際の造血に寄与している幹細胞は一部のみであり、その他の幹細胞は余



剰な細胞として静止期の状態で存在していることを示唆していると考えた。この 6pLOH という表現型を利用することにより、造血に寄与する CMPs と「眠っている」CMPs との間で遺伝子発現プロファイルを比較すれば、余剰ヒト幹細胞に特有の遺伝子群を同定できる可能性があると考え、これらの CMP 分画の細胞をソーティングし、遺伝子発現群を比較した。その結果、造血を支持していない 6pLOH 陰性(正常)CMPs では CXCL12 の高発現が認められた(図 2)。CXCL12 は造血幹細胞自身が発現し、そのレセプターである CXCR4 を介してオートクラインに造血幹細胞の動員や分化を調節していることから、各分画の CXCR4 発現を調べたところ、驚いたことに、造血を支持している 6pLOH 陽性 CMPs のほとんどは CXCR4 陰性であるのに対して、6pLOH 陰性 CMPs の大部分は CXCR4 陽性であった(図 3)。また、健康人と様々な血液疾患患者を対象に、骨髄中 CMPs、GMPs、MEPs における CXCR4 の発現を解析したところ、いずれにおいても CXCR4 は、明らかに CMPs において高発現していた(図 4)。

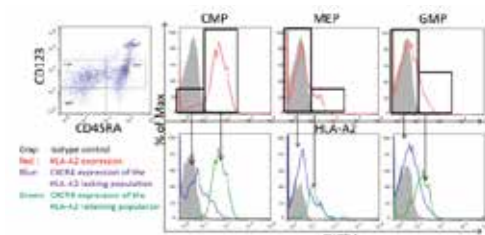


図3 6pLOH陽性AA症例のCMPにおいて高発現しているCXCL12のレセプターであるCXCR4の発現

また、骨髄 CD34 陽性細胞における CXCR4 陽性および陰性分画をソーティングし、*ex vivo* でコロニーアッセイを実施した。その結果、CXCR4 陰性分画から、より多く造血コロニーを形成する傾向が得られた(図 5)。一方、細胞の増殖能力について、Ki-67 を用いて cell cycle を解析した結果、CD34+CD38+CXCR4 陽性分画で、増殖活性が高いことを明らかにした(図 6)。この点は、bulk の CD34+CD38+分画で解析したために、これまでの解析結果と矛盾したデータとなった可能性があるため、CMPs 分画で追試する必要があると考えている。

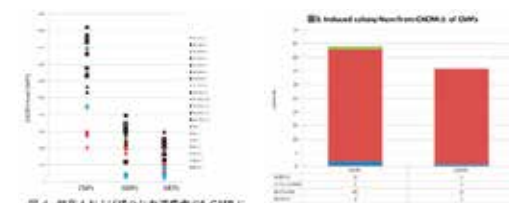


図4 健康人および様々な血液疾患患者でもCMPにおけるCXCR4は高発現している。

また、BRGS マウスにおいて、LSK を含む様々な造血幹細胞および造血前駆細胞において CXCR4 の発現を確認したが、マウス自体においては造血に伴う CXCR4 の発現に明らかな挙動は確認できなかった(図 7)。

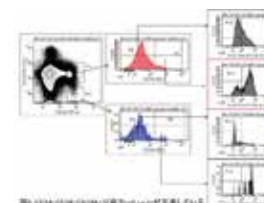


図7 マウスHSCおよびUHSPCにおけるCXCR4発現解析

機能解析として、骨髄 Lin-CD34+CD38+CD123+CD45RA-細胞(CMPs)において CXCR4+細胞とCXCR4-細胞をセルソーターで単離し、免疫不全マウスへ骨髄内移植を実施する段階まで進んだが、免疫不全マウス(BRGS マウス)の繁殖が予想通り進まなかった。原因として感染症が考えられたため、その対応としてサルファ剤を添加して、感染症による死亡リスクを低下させた。その結果、マウスの繁殖が進み、臍帯血由来の CD34 陽性造血幹細胞移植による、ヒト造血の再構築が確認された。今後、6pLOH 陽性患者由来の骨髄を用いて、同様の移植実験により CXCR4 陰性分画の造血支持の能力を検討する予定である。

## 【考 察】

ヒト造血は、約2万個の静止期幹細胞の中から選ばれた400個程度の活性化幹細胞によって維持されていると考えられている。造血幹細胞が減少する AA においても、長年輸血が必要であった例の造血が突然回復したり、トロンボポエチンレセプター作動薬によって永続的な寛解が得られたりする例があることから、難治性骨髄不全患者においても、造血支持能力のある幹細胞が潜在している可能性が考えられていた。しかし、これまでそのような余剰の幹細胞が存在している証拠は存在しなかった。

今回の研究により、6pLOH という、正常幹細胞の一つのマーカーを利用することにより、造血幹細胞に近い CMPs の中でも、実際に造血に寄与している細胞はごく一部の CXCR4 陰性細胞であり、ほとんどの CXCR4 陽性細胞は dormant な状態にあることを初めて見出した。このことから、ヒト造血の分化を制御している因子の一つが、CXCL12 のレセプターである CXCR4 であり、この CXCR4 の発現をさらに制御するサイトカインやリガンドを同定することが、今後の研究課題として考察された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

AA や低リスク骨髄異形成症候群(MDS)のような難治性の骨髄不全を改善させるためには、造血に寄与することなく静止期に留まっている造血幹細胞を造血に動員する必要がある。本研究では、寛解期の AA 患者骨髄中の common myeloid progenitors (CMPs) において、ケモカインレセプターの CXCR4 発現が、造血に寄与していない余剰 CMPs のマーカーであることを初めて明らかにした。この結果をもとに、造血を制御している CXCR4 陽性 CMPs を造血に動員することができれば、難治性骨髄不全患者に対する新規治療法の開発に極めて大きく進展すると思われる。

【参考・引用文献】

1. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia.  
Katagiri T, Sato-Otsubo A, Kashiwase K, Morishima S, Sato Y, Mori Y, Kato M, Sanada M, Morishima Y, Hosokawa K, Sasaki Y, Ohtake S, Ogawa S, Nakao S; Japan Marrow Donor Program.  
Blood. 2011 Dec 15;118(25):6601-9.
2. Immunologically escaped hematopoiesis caused by HLA allelic loss in patients with aplastic anemia.  
Katagiri T, Nakao S.  
Rinsho Ketsueki. 2012 Jul;53(7):651-7.