

造血器疾患における造血ニッチ解析

錦井秀和

筑波大学医学医療系 血液内科

【研究の背景】

近年、様々な非造血系造血支持細胞から構成される造血ニッチ細胞の変化が造血器疾患の発生母地になっている事が示され、ヒト造血器疾患におけるニッチ細胞の役割が注目されている。特に造血環境異常が著しい骨髄異型性症候群/骨髄増殖性疾患(MDS/MPN)または骨髄線維症では、造血環境異常が直接的に造血不全に関わっている可能性がある。

【目 的】

本研究では、患者検体とマウス急性骨髄性白血病モデルを用いて、造血ニッチ細胞の遺伝子発現・造血環境の3次元構造を明らかにし、ヒト造血器悪性腫瘍の発生母地としての骨髄ニッチ細胞の役割・正常造血細胞の支持組織としての骨髄ニッチ細胞の機能的変化を明らかにすることにより、新規治療ターゲットを模索する。

【方 法】

筑波大学附属病院血液内科で診断された、骨髄線維化を有する骨髄異形成症候群(MDS-with Fibrosis, MDS-F)21例、原発性骨髄線維症、骨髄線維症を有する骨髄増殖性疾患(myeloproliferative neoplasm with fibrosis, MPN-F)10例の骨髄生検検体を、倫理委員会の承認の下、通常のヘマトキシリン-エオジン染色に加え、Tyramide signal amplification (TSA)法によるMulticolor imagingにより、骨髄中の血管内皮、間葉系細胞、神経系細胞の可視化を行った。観察は、スペクトラムアナライザ- (Mantra Quantitative Pathology Workstation, Perkin Elmer) または共焦点顕微鏡 (Leica TCS SP5/SP8, Leica microsystems) により行った。診断目的で採取された骨髄浸潤のない悪性リンパ腫患者の検体17例を正常コントロール、線維化のないMDS検体26例も対照として用いた。

【結 果】

1. ヒト骨髄組織は多様な非造血細胞の相互ネットワークにより造血支持が行われている。

マウスの実験結果から間質細胞や血管内皮細胞、神経系細胞、骨芽細胞などの非造血系の細胞が個体の造血維持に深く関わる造血幹細胞 (Hematopoietic stem cells, HSC) の未分化性の維持または正常な血球分化に重要な役割を担っていることが明らかとなっているが、ヒト造血組織については十分な理解は得られていない。TSA 法とスペクトルアナライザ- による観察を行うことで、複数の非造血系細胞で構成されるヒト骨髄ニッチの可視化を試みた。まず、我々はマウスで造血幹細胞ニッチ (HSC niche) の重要な構成細胞である報告されている CXCL12 陽性細胞の局在を評価した。ヒト骨髄における CXCL12 の発現は、S100 陽性傍血管間質細胞、一部の CD34 陽性血管内皮細胞、脂肪細胞に分布しており、過去の遺伝子改変マウスの解析結果と類似した結果が得られた。CXCL12 は、HSC をニッチに Homing させるために必須のケモカインであることから、これらの結果はマウス・ヒトに共通する HSC 維持機構が骨髄内には存在していることを示唆している。

次に我々は、他の HSC ニッチ構成細胞として報告のある、Nestin 間葉系細胞、GFAP 陽性シュワン細胞、NGFR 陽性間葉系幹細胞などの神経間葉系細胞の局在に注目した。前述した CXCL12 発現細胞などと比較すると、これらの細胞は骨髄

中では非常に低頻度ながらヒト骨髄組織にも存在していることが確認されたが、マウスの所見と異なり、ヒト骨髄では Nestin 陽性細胞は CD34 陽性 SMA 陽性血管組織の内側または外側にのみ局在していた。一方 NGFR 陽性間葉系細胞の一部は CXCL12 陽性であり、ヒト骨髄において、骨髄内の CXCL12 の主要なソースは間葉系幹細胞・脂肪細胞を含む非造血細胞であることが明らかとなった。次に、GFAP 陽性シュワン細胞に注目して画像解析を行ったところ、非常に頻度は低いものの GFAP 陽性細胞もヒト骨髄で確認された。GFAP 陽性細胞は神経線維マーカーである NFH 陽性神経束を取り囲むように局在しており機能的にもシュワン細胞として役割を担っていることが示唆された。以上の結果よりヒト骨髄組織では、一部は少なくともマウスと共通の非造血細胞により骨髄微小環境が構成されていることが明らかとなった。

2. 造血器腫瘍患者の骨髄では骨髄微小環境の再構成が行われている。

次に、造血器腫瘍の中でも骨髄環境の異常を呈しやすいと想定される、MDS-F、または MPN-F の骨髄環境の評価を行った。線維化のない MDS の骨髄では CD34 陽性血管内皮細胞と CXCL12 陽性間葉系細胞の有意な増加を認めていたが、Nestin 陽性間葉系細胞や GFAP 陽性シュワン細胞の頻度は、正常骨髄と比較して有意な変化は見られなかった。しかし、興味深いことに、MDS-F の骨髄では CD34 陽性血管内皮細胞、CXCL12 陽性間葉系細胞の増加に加え GFAP 陽性細胞の有意な増多を認め、この GFAP 陽性細胞は Nestin も共発現している通常骨髄組織では認めない異常シュワン細胞と考えられた。このような細胞は同じ骨髄線維化を呈する MPN-F の検体では確認できず、MDS クローン増殖に伴う変化であると考えられ、現在その詳細を解析中である。

【考 察】

近年のシーケンス技術の向上により造血器疾患の病態解析は飛躍的に発達し、加齢に伴う正常造血幹細胞における遺伝子変異の蓄積が骨髄異形成症候群などの造血器腫瘍の発症に深く関与することが明らかとなってきたが、その発生母地としての骨髄環境の変化はヒト骨髄において詳細は解析されていない。マウスモデルでは骨髄環境変化がゲノム不安定を誘導して、造血器腫瘍を誘導することが実験的に示されている。複数の細胞成分で構成されている骨髄環境がヒト造血器腫瘍の発症にどのように関与するかという命題は、造血器腫瘍の病態理解に重要である。ヒト造血環境の解析は、今まで数種類の免疫染色による解析結果で解析されてきたが、複数のコンポーネントを網羅的に解析するには限界があったため、本研究ではスペクトラムアナライザーと TSA 法を組み合わせることで多重染色によるヒト造血環境の可視化に成功した。

本研究結果から CXCL12 産生細胞は正常骨髄ではマウスと同様傍血管領域に存在しており、GFAP 陽性細胞も NFH 陽性神経線維を取り囲むように局在しており、シュワン細胞として機能していると考えられ、ヒトとマウス骨髄では共通したニッチ細胞が機能していることが明らかとなった。一方、MDS サンプルでは、CXCL12 陽性細胞の明らかな増加を認め、さらに MDS-F 骨髄では、CXCL12 陽性細胞のみならず、GFAP 陽性 Nestin 陽性異常シュワン細胞が顕著に増加することが明らかとなった。マウスの実験結果では骨髄中 GFAP 陽性シュワン細胞は正常造血幹細胞の静止期維持に必須の役割の TGF- β の活性化型転換に役割を担っていると考えられている為、MDS-F でみられる異常シュワン細胞は MDS における正常造血障害の一因となっている可能性がある。現在腫瘍クローン由来の炎症性サイトカイン等が造血ニッチの異常の原因となっている可能性を考え、腫瘍細胞側の遺伝子変化との相関を解析中である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

多様かつ複雑な病態を有する骨髄異形成症候群の新規治療はアザシチジンなどの脱メチル化薬、BCL-2 阻害薬のようなアポトーシス誘導剤などを中心とした腫瘍細胞をターゲットとした治療戦略が多く、造血環境側をターゲットとした治療戦略は少ない。MDS-F 症例は、造血抑制が強く治療も難渋する症例が多い為、本研究結果から造血ニッチをターゲットとした治療戦略を提案したいと考えている。

【参考・引用文献】

1. Cao-Sy L et al. Int J Hematol.2019(3):309. Prominence of nestin-expressing Schwann cells in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes with severe fibrosis.

2. Cao-Sy L et al. Blood.2019 124(Supple 1):2976.Distinct Bone Marrow Microenvironment Abnoimalitiesin MDS and MPN with Fibrosis.