

造血幹細胞の機能回復を目的としたエキソソーム創薬

井上大地

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

【研究の背景】

骨髄異形成症候群(Myelodysplastic syndrome, MDS)は高齢者に多く、造血幹細胞移植以外に根治療法のない難治疾患であり、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。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 MDS 研究を進めてきたが¹⁻⁴⁾、正常造血がどのような機構で抑制されるのかは十分に解明されていなかった。昨年度助成対象となった研究において、MDS のモデルマウスでは骨の菲薄化が進んでおり、MDS 細胞由来のエキソソームが間葉系幹細胞の骨芽細胞系列への分化を抑制し、本来有する正常な造血幹細胞の支持能が喪失することを見出した。すなわち MDS 細胞、エキソソーム、間葉系幹細胞の3者を繋ぐ新たな軸の可能性が示唆され、そのメディエーターが注目されている。

【目的】

MDS 細胞が残存する正常造血幹細胞を間接的に抑制する機構について、単一細胞レベルでのトランスクリプトーム解析や、エキソソームやそれに含有される microRNA(miRNA)の観点から明らかとして、エキソソーム創薬に向けた基礎的データを取得することを目的とする。

【方法】

Abcg2 過剰発現⁵⁾や NUP98-HOXD13 融合遺伝子⁶⁾による MDS モデルマウス由来の間葉系幹細胞を抽出し、10xGenomics が開発した single cell RNA-seq 技術を用いてクラスタリング解析を行い、正常造血下での間葉系幹細胞との相違を遺伝子発現レベルで検討した。また、MDS 細胞由来のエキソソームをヒト(38MDS 検体 vs8 正常対照群)、マウス両面から miRNA-array・miRNA-seq により網羅的に解析し、miRNA の標的となる遺伝子について探索した。

【結果】

一般的に骨髄内の間葉系幹細胞は表面抗原によって定義され、Cd45(-) Ter119(-) Cd31(-) Cd140a(+) Cd51(+)に代表される。まず、Abcg2 過剰発現、NUP98-HOXD13 融合遺伝子による MDS モデルマウスから上記定義に従って間葉系幹細胞を FACS によりソートして、正常骨髄由来の間葉系幹細胞と比較して、単一細胞レベルでの発現データを元に UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) 法によるクラスタリング解析を行った。興味深いことに、一般的に間葉系幹細胞として捕らえられている集団は予想以上に不均一性に富んでおり、より未分化な集団から osteoblast、chondrocyte、pericyte などに分化傾向を有する細胞まで様々なクラスターに分類されることが明らかとなった。さらに正常骨髄由来と MDS 由来では、これらのパターンが同一クラスターの中でも大きく異なっていた。例えば、osteolineage program はより正常間葉系幹細胞にエンリッチしており、MDS において間葉系幹細胞の骨芽細胞系列への分化が抑制されているというこれまでの我々の知見をサポートする結果が得られた。さらに、最も未分化な幹細胞分画においても、MDS 由来の間葉系幹細胞では Skeletal stem maker である Grem1、幹細胞性のマーカーである Lepr や Vcam1、ニッチ因子である Cxcl12、Kitl が対照群と

比較して顕著に低下しており、間葉系幹細胞の転写プログラムが脱制御されていることが示された。

この間葉系幹細胞の分化抑制について、すでに MDS 細胞から分泌されるエクソソームが主因子となることを昨年度の助成時に報告したが、そのエフェクターとしてエクソソーム miRNA に着眼をして網羅的解析を行った。マウス MDS 細胞由来のエクソソームに含有される miRNA は骨芽細胞への分化、間葉系幹細胞の生存や増殖に関連した遺伝子群を標的とすることが再現性をもって示された。この中の miRNA-128-3p を導入した MSC では ALP 活性が低下し、さらに共培養の実験系で正常造血幹細胞のコロニー形成能に対するサポート能の低下が認められた。さらに、ヒト検体を用いた miRNA 解析では、予想されたとおり 38MDS 検体と 8 正常対照群は異なるクラスターに分類され、MDS 細胞由来のエクソソームの特徴が裏付けられる結果となった。さらに、二つのマウスモデルとヒト検体の miRNA 標的パスウェイは半数程度重複しており、種を超えた MDS 細胞由来のエクソソーム・miRNA による間葉系幹細胞の制御機構が示唆された。

【考 察】

本研究において、長期にわたる障害を受けた MDS 幹細胞由来のエクソソームと miRNA を鍵として、代表的なニッチ細胞である間葉系幹細胞の脱制御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期待され、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が待たれる^{7,8)}。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

MDS と骨粗しょう症、クローン性造血と動脈硬化病変など、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さらに同定すること、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。

【参考・引用文献】

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 Asxl1 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. Inoue D, Polaski JT, Taylor J, Castel P, Chen S, Kobayashi S, Hogg SJ, Hayashi Y, Bello Pineda JM, Ettaib EM, Erickson C, Knorr K, Fukumoto M, Yamazaki H, Tanaka A, Fukui C, Lu XL, Durham BH, Liu B, Wang E, Mehta S, Zakheim D, Grippa R, Penson A, Chew GL, McCormick F, Bradley RK, Abdel-Wahab O. Minor intron retention drives clonal hematopoietic disorders and diverse cancer predisposition. *Nat Genetics*. 2021 53(5):707-718.
5. Kawabata KC, Hayashi Y, Inoue D, Meguro H, Sakurai H, Fukuyama T, Tanaka Y, Asada S, Fukushima T, Nagase R, Takeda R, Harada Y, Kitaura J, Goyama S, Harada H, Aburatani H, Kitamura T. High expression of ABCG2 induced

- by EZH2 disruption plays pivotal roles in MDS pathogenesis. *Leukemia*. 2018 Feb 32(2):419–428.
6. Balderman SR, Li AJ, Hoffman CM, Frisch BJ, Goodman AN, LaMere MW, Georger MA, Evans AG, Liesveld JL, Becker MW, Calvi LM. Targeting of the bone marrow microenvironment improves outcome in a murine model of myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2016, 127(5):616–25.
 7. 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.
 8. 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.