

白血病-神経-血管連関解明と局所的末梢神経制御による新規治療法の開発

浅田 騰

岡山大学病院 血液・腫瘍内科

【研究の背景】

白血病の病態には、血液細胞自体への遺伝学的異常に加え、非血液細胞により構成される微小環境である“白血病ニッチ”による腫瘍化の促進、白血病維持機構が重要であることがわかっている。自律神経系は造血制御に深く関わり、交感神経や感覚神経シグナルが造血幹細胞ニッチ機能を調節することが明らかにされている¹⁻³⁾。また、加齢による骨髄内の交感神経シグナル減弱が、造血幹細胞ニッチに加齢性の変化を惹起し、結果として造血幹細胞の老化につながることが報告されている⁴⁾。一方で、白血病ニッチにおいては、骨髄内の交感神経シグナルが重要であることが報告されているが⁵⁾、これらの知見は、薬剤の全身投与やカテコラミン受容体全身欠損マウスでの検討結果であり、局所組織での特異的かつ有効な末梢神経による制御機構が十分に評価されていない可能性がある。

【目 的】

本研究では、自律神経や感覚神経などの末梢神経に着眼し、これらを局所的に制御することで、骨髄内あるいは骨髄外臓器での白血病微小環境調節を行う新たな治療戦略の開発を目指す。

【方 法】

1. マウス急性白血病モデルの作製

Fluorescence activated cell sorting (FACS) cell sorter (FACS Aria3, BD)にて、マウス造血幹細胞を含む lineage marker(-)Sca-1(+)c-kit(+)分画を分取し、pMIG-FLAG-MLL-AF9(GFP)を試験内で導入する。GFP 陽性分画を選択分取し、放射線照射したマウスに静脈内注射して生体内で白血病細胞を増殖させる。白血病を発症したマウスから骨髄細胞を採取し、凍結保存する。上記で作製した細胞をマウスに静脈内注射することで3-4週後に急性骨髄性白血病を発症させる。

2. 神経、血管、微小環境可視化マウスの作製

生体内で末梢神経、血管、ニッチ細胞を可視化するために以下のマウスを作製する。交感神経: Th-creER/tdTomato, 感覚神経: NaV1.8-Cre/tdTomato, 血管: VE-cadherin-CreER/tdTomato, 骨髄ニッチ細胞: Leptin receptor-Cre/tdTomato, Myh11-CreER/tdTomato, Nestin-GFP transgenic.

3. 骨髄内微小環境細胞イメージング

2.で作製したマウスに PBS、4% paraformaldehyde (PFA)を用いた灌流固定後に大腿骨を摘出し、30% Sucrose/PBS による脱水処理をし SCEM (Section lab)包埋剤に凍結包埋した。河本法で 20 μ m の凍結切片を作製し、各種抗体を用いて蛍光免疫染色を行なった。画像取得には共焦点顕微鏡 (CarlZeiss, LSM780)を用いた。

【結 果】

神経、血管、微小環境可視化マウスの骨髄内イメージングにより、いずれのマウスにおいても骨髄中の各種ニッチ細胞を鮮明に捉えることができ、骨髄内に分布する神経線維などとの位置関係の解析も可能であることを確認している。また、骨髄内末梢神経イメージングでは、抗 tyrosine hydroxylase 抗体による交感神経染色と感覚神経メディエーターである calcitonin gene-related peptide に対する抗体を用いてイメージングを行い、これらの神経は骨髄内に広く分布しており、交感神経は動脈周囲に螺旋状に巻きつくように走行し、感覚神経はより直線的に動脈に沿う形式で走行することが観察された。

急性白血病モデルマウスにおける FACS による骨髄ニッチ細胞定量解析では、白血病細胞輸注から 3-4 週での骨髄におけるニッチ細胞の変化を捉えている。

【考 察】

急性白血病における骨髄内微小環境の変化はまだ完全には解明されていない。白血病病態における末梢神経機能のこれまでの解析は、薬剤の全身投与やカテコラミン受容体全身欠損マウスでの検討結果であり、局所組織での特異的かつ有効な末梢神経による制御機構が十分に評価されていない可能性がある。本研究では、マウスの骨髄に逆行性 AAV ベクターを注射することで、骨髄に分布する末梢神経を局所的に操作(刺激あるいは抑制)し、局所での白血病細胞の動態変化を骨髄内イメージングを用いて観察する実験を予定している。同時に FACS 等による白血病細胞の定量的解析を行い、神経操作による治療効果を検証する予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により、白血病の病態解明と新規治療開発が可能となれば、難治性悪性腫瘍である白血病治療成績の向上につながり、臨床医学へ大きく貢献する。

【参考・引用文献】

- 1) Asada, N., Katayama, Y., Sato, M., Minagawa, K., Wakahashi, K., Kawano, H., Kawano, Y., Sada, A., Ikeda, K., Matsui, T., and Tanimoto, M. (2013). Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Stem Cell* 12, 737-747.
- 2) Katayama, Y., Battista, M., Kao, W.M., Hidalgo, A., Peired, A.J., Thomas, S.A., and Frenette, P.S. (2006). Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 124, 407-421.
- 3) Gao, X., Zhang, D., Xu, C., Li, H., Caron, K.M., and Frenette, P.S. (2021). Nociceptive nerves regulate haematopoietic stem cell mobilization. *Nature* 589, 591-596.
- 4) Maryanovich, M., Zahalka, A.H., Pierce, H., Pinho, S., Nakahara, F., Asada, N., Wei, Q., Wang, X., Ciero, P., Xu, J., et al. (2018). Adrenergic nerve degeneration in bone marrow drives aging of the hematopoietic stem cell niche. *Nat Med* 24, 782-791.
- 5) Hanoun, M., Zhang, D., Mizoguchi, T., Pinho, S., Pierce, H., Kunisaki, Y., Lacombe, J., Armstrong, S.A., Duhrsen, U., and Frenette, P.S. (2014). Acute myelogenous leukemia-induced sympathetic neuropathy promotes malignancy in an altered hematopoietic stem cell niche. *Cell Stem Cell* 15, 365-375.