

ビタミンDを標的とした骨髄増殖性腫瘍の病態解明

神戸大学医学部附属病院血液内科

片山 義雄

1. はじめに

JAK2V617F 変異に代表される骨髄増殖性腫瘍は、その経過上骨髄線維症を発症し、巨大脾腫を呈するようになる。興味深いことに、進行した骨髄線維症はしばしば骨梁の増加に代表される骨硬化症を合併することがよく知られている。また、造血環境の異常と認識されているにもかかわらず、同種骨髄移植で比較的良好な治療成績が得られており、正常な血球の移植で改善する不思議な病態である。JAK 阻害剤が臨床応用され始めたが、線維化の改善は顕著ではなく、生命予後の大幅な延長には至っていない。病態の理解が乏しいために、骨髄内で起こっている事を理論的に標的とした治療法がない。多くの患者が高齢のため骨髄移植ができず、白血病化して死に至る。

最近我々は、ビタミンD受容体遺伝子欠損(VDR^{-/-})マウスで、骨髄中の造血幹細胞の位置取りの制御が正常に行われなことを報告した(参考文献)。この研究の派生として、VDR^{-/-}マウスをレシピエントとし野生型の骨髄を移植すると長期造血維持能を担う造血幹細胞のみが選択的に失われ、同時に大腿骨遠位端を中心とした激的な骨髄線維症と著明な骨梁増加を来すモデルを開発した。現在までの研究で、これは、ビタミンD受容体を持った野生型造血幹細胞が、ビタミンD濃度が異常に高い環境に曝されることで病原性マクロファージへと強制分化され、これが骨芽細胞系列の細胞を異常に活性化させコラーゲン線維を産生させることで骨髄線維症を発症する病態と考えている。

本研究では、このモデルの病態仮説を確認し、この理論と、実臨床での骨髄線維症のトリガーとなる JAK2V617F 遺伝子変異マウスの病態をリンクさせ、この難治性腫瘍の真の病態を明らかにするだけでなく、1) ビタミンD経路、2) マクロファージ、の2つの標的にアプローチすることで、実際の臨床応用に非常に近い新規治療法の開発を行うことを目的とする。

2. 方法

ビタミンDに注目した治療法の開発

・VDR^{-/-}マウスをレシピエントとして野生型の骨髄を移植して骨髄線維症を発症させるモデル(基本モデル)において、低ビタミンD食で飼育することで骨髄線維症の発症を予防できる予備データにつき再現性を確認しnを増やし、通常食では数ヶ月内に全てのマウスが骨髄不全死するところ、生存曲線に改善があるか検討する。また改善が一部であれば、死亡原因が骨髄線維症の改善がないためであるのか、それ以外の理由であるのか(骨髄線維症は改善するが生存曲線は完全には回復しない場合)について検討する。

・VDR^{-/-}マウスと JAK2V617F Tg マウスを交配し、VDR を欠損した JAK2V617F Tg マウスを作製し、これを普通食で飼育することによる病勢進展様式を検討する。更に、このマウスの骨髄を野生型マウスに移植、ないしは野生型骨髄をこの2重遺伝子改変マウスに移植する reciprocal transplantation モデル(もし血球側ではなく環境側に JAK2 遺伝子変異があることによって骨髄線維症が発症する場合)において、普通食で飼育することによる病態進展様式を検証する。

・未分化造血細胞における VDR mRNA 発現が高いかどうかを、野生型マウス骨髄血球での CD45+Lineage-c-kit+ (LK), Lineage-Sca-1+c-kit+ (LSK), Lineage+ 細胞分画をそれぞれソートし、real-time PCR 法で VDR mRNA 発現レベルを比較検討する。

マクロファージに注目した治療法の評価

・上記基本モデルの骨髄における一見線維芽細胞の単一集団に見える組織は、異常マクロファージ(α SMA 陽性 F4/80 陽性)と前骨芽細胞(osterix 陽性)の入り交じったヘテロな集団であることを捉えている。これらが、ドナー造血幹細胞から強制分化したマクロファージ(ドナー由来)とそれに刺激されて増殖した前骨芽細胞(レシピエント由来)にあたることを、緑の蛍光で細胞のトレースができる EGFP Tg マウスの骨髄から造血幹細胞も含んだ未分化

造血細胞 CD45+Lineage-c-kit+細胞をソートし、これを VDR-/-マウスに移植することで、緑の蛍光を持ったマクロファージとそうでない細胞の組織中の分布を調べる事により検討する。

・上記が確認できれば、前骨芽細胞の増勢を促すシグナルはドナー造血幹細胞由来マクロファージということになり、このマクロファージを標的とした治療、すなわち、基本モデルにおいて移植後クロドロネートリポゾームを様々なスケジュールで投与し、骨髄線維症の発症を抑制できるか検討する。

・JAK2V617F Tg マウスにクロドロネートリポゾームを投与し、骨髄線維症や骨髄増殖性疾患としての血球増加などの重症度を検討する。

3. 結果

ビタミン D に注目した治療法の開発

・VDR-/- マウスをレシピエントとして野性型の骨髄を移植して骨髄線維症を発症させるモデル(基本モデル)において、低ビタミン D 食で飼育した。これにより、生存率は部分的に改善し、約半数で長期生存が得られるようになった(図 1)。これら長期生存マウスでは骨髄線維症は起こっておらず(図 1)、骨髄での造血巣は正常であった。死亡したマウスの骨髄でも骨髄線維症は起こっておらず、死亡原因は造血不全ではないと思われた(原因については現在検討中)。

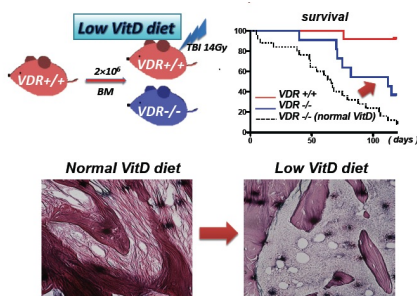


図 1. 低ビタミン D 食での骨髄線維症発症予防
(生存曲線:VDR+/+ n=12, VDR-/- n=11, VDR-/- (normal VitD) n=25)

・VDR-/-マウスと JAK2V617F Tg マウスを交配し、VDR を欠損した JAK2V617F Tg マウスを作製した。これを普通食で飼育することによる病勢進展様式の検討には、一年近い長期経過観察が必要なため、このマウスの骨髄を野性型マウスに移植するモデルを中心に検討を行った。コントロールとして JAK2V617F Tg マウスの骨髄を野性型マウスに移植した場合には、2ヶ月程度で、強い骨髄線維症を引き起こしたが、VDR を欠損した JAK2V617F Tg マウスの骨髄を野性型マウスに移植した場合には、殆ど骨髄線維症は起こらなかった (n=1)。予想通りの結果ではあるものの、今後、同様の結果が再現性を持って得られるかどうか検討を重ねる必要がある。

JAK2V617F Tg マウスの骨髄を野性型マウスに移植することにより骨髄線維症が起こることより、骨髄線維症の発症には環境側ではなく血球側の JAK2 変異が十分条件である事が判明し、reciprocal transplantation での環境側のみでの JAK2 変異を持ったマウスの作製は研究期間内に行っていない。

・未分化造血細胞における VDR mRNA 発現が高いかどうかを、野性型マウス骨髄血球での Lineage+ (Lin+), Lineage-Sca-1-c-kit+ (Sca-1-LK), Lineage-Sca-1+c-kit+ (LSK)細胞分画をそれぞれソートし、real-time PCR 法で VDR mRNA 発現レベルを比較検討した。分化血球 (Lin+) では非常に発現が弱い VDR mRNA であるが、造血幹細胞を含む未分化血球分画は特異的に非常に高い VDR mRNA を発現していた(図 2)。このことは、移植された野性型骨髄に含まれる VDR を高発現した造血幹細胞が、VDR-/-マウス中の非常に高い濃度のビタミン D に暴露される事により、骨髄線維症発症の引き金になる病原性マクロファージに強制分化した可能性を強く示唆している。

VDR mRNA expression

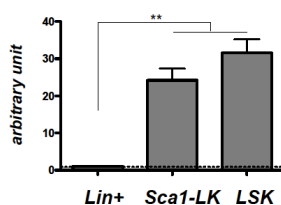


図 2. 骨髄未分化血球での VDR mRNA 発現レベル (n=3)

マクロファージに注目した治療法の評価

・基本モデルの骨髄における一見線維芽細胞の単一集団に見える組織が、ドナー造血幹細胞から強制分化したマクロファージ(ドナー由来)とそれに刺激されて増殖した前骨芽細胞(レシピエント由来)にあたることを、緑の蛍光で細胞のトレースができるEGFP Tg マウスの骨髄から造血幹細胞も含んだ未分化造血細胞CD45+Lineage-c-kit+細胞をソートし、これをVDR^{-/-}マウスに移植することで、緑の蛍光を持ったマクロファージとそうでない細胞の組織中の分布を調べる事により検討した。この状態でも骨髄線維症は同様に発症し、ドナー未分化血球由来(緑蛍光陽性)かつF4/80 陽性のマクロファージと、レシピエント由来(緑蛍光陰性)かつosterix 陽性の前骨芽細胞が交互に入り組んだ状態であることが明らかとなった。

・上記が確認できれば、前骨芽細胞の増勢を促すシグナルはドナー造血幹細胞由来マクロファージということになり、このマクロファージを標的とした治療、すなわち、基本モデルにおいて移植後クロドロネートリボゾームを、移植後3日目に骨髄のマクロファージを除去できる量(使用しているクロドロネートリボゾームで100uL)一回投与のみで骨髄線維症の発症を抑制できた(図3)。ただ、この条件では時々マウスが死亡することがあり、現在放射線照射量やクロドロネートリボゾームの投与量やスケジュールを調整中である。予定していたJAK2V617F Tg マウスにクロドロネートリボゾームを投与し、骨髄線維症や骨髄増殖性疾患としての血球増加などの重症度を検討する計画は、現在進行中である。

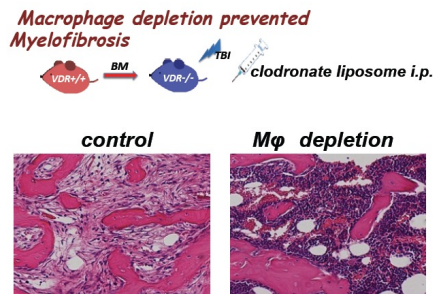


図3. マクロファージ除去による骨髄線維症発症阻止

4. 考察

以上より、基本モデルにおける骨髄線維症発症は、造血幹細胞がVDRからのシグナルにより、in vivo 骨梁付近の何らかの因子の補助も受けながら病原性マクロファージに強制分化し、これらがホストの骨芽細胞を異常に活性化させることにより生じることがほぼ確定した。また、このことより、ビタミンDシグナルやマクロファージを標的とした治療により、骨髄線維症が改善、ないしは発症を予防できる可能性が強く示唆され、ヒトでのJAK2V617F遺伝子変異をもとに発症する場合にも同様の理論が成立する可能性が高いと考えられた。本研究成果は、骨髄線維症の発症メカニズムをサイトカインや巨核球に原因を求めた一般的な血液内科領域の教科書の記載を覆す、ないしは新たな病態解釈を加える礎と考えられる。一部実験結果の再現性の確認をしつつ、ヒト骨髄線維症の骨髄生検組織におけるマクロファージと前骨芽細胞の関与についての検討に現在研究を広げているところである。

5. 参考文献

Kawamori Y, Katayama Y, Asada N, Minagawa K, Sato M, Okamura A, Shimoyama M, Nakagawa K, Okano T, Tanimoto M, Kato S, Matsui T. Role for vitamin D receptor in the neuronal control of the hematopoietic stem cell niche. *Blood* 116: 5528-5535, 2010.
(本研究開始のきっかけとなった論文)

本報告書に記載された研究内容は論文として未発表