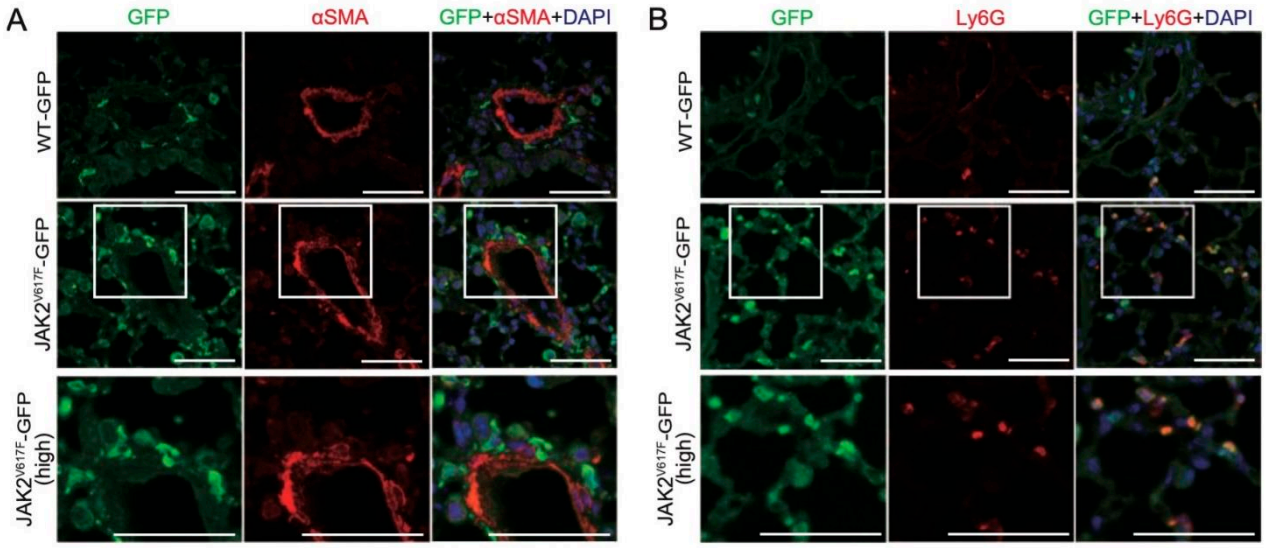
98　巨核球ニッチと髄外造血～骨髄増殖性腫瘍変異の役割	池田　和彦

【目的】骨髄増殖性腫瘍（MPN）は骨髄系細胞の増殖、髄外造血、動静脈の血管性合併症、急性白血病への進展などを呈する疾患群であり、本態は *JAK2* V617F などのドライバー変異による細胞増殖である。未確定の潜在能をもつクローン性造血（CHIP）は、MPN などの骨髄系腫瘍と共通した遺伝子変異が存在するものの、血液疾患を発症していない状態である。MPN と CHIP はともに急性白血病などへの進展や血管性の合併症を呈する。ここでは MPN 変異を有するクローン性造血において、造血幹細胞が髄外造血と血管性の合併症を促進する巨核球ニッチ-髄外造血による病態を想定し、*JAK2* V617F^{+}造血細胞の動態と血管性病変への関与について検討を行った。

【方法】*JAK2* V617F^{+}造血細胞の髄外組織への浸潤様態、マウスの臓器におよぼす影響を肺において検討した。さらに、造血巣から組織において、分化成熟の過程における *JAK2* V617F^{+}造血細胞の分子遺伝学的変化を解析した。

【結果】*JAK2* V617F トランスジェニックマウスおよびこれをドナーとした骨髄移植実験において、*JAK2* V617F^{+}造血細胞が肺の血管周囲に多数認められ、肺動脈中膜の肥厚を伴い、低酸素状態への曝露により肺高血圧症を呈した。それらの造血細胞は造血に関わる未分化な分画ではなく、好中球が主体であり、肺動脈の中膜は *JAK2* V617F^{-}の非造血細胞に由来していた。造血幹細胞から肺の好中球に至る各成熟段階において遺伝子発現を解析し、成熟に従って発現が増強する分子が見出され、その阻害実験により肺高血圧症の新規治療標的として有望である可能性が示唆された。*JAK2* V617F^{+}好中球は、肺動脈中膜のリモデリングに重要な役割を果たすものと考えられる。

骨髄移植レシピエントの *JAK2* V617F^{+}ドナー由来好中球と *JAK2* V617F^{-}レシピエント由来肺動脈中膜



98. 巨核球ニッチと髄外造血～骨髄増殖性腫瘍変異の役割

池田　和彦

福島県立医科大学 医学部 輸血・移植免疫学講座

Key words：骨髄増殖性腫瘍，クローン性造血，血管性病変，リモデリング，*JAK2*V617F

緒　言

骨髄増殖性腫瘍（myeloproliferative neoplasms、MPN）は、骨髄系細胞の増殖、髄外造血、血管性合併症、急性白血病への進展などを呈する疾患群である。MPN の血管性合併症として、心筋梗塞などの動脈血栓症、静脈血栓による肝静脈閉塞症や肺高血圧症が認められる。肝腫大や肺高血圧症の機序については、血栓症に加え臓器の間質における髄外造血も想定されている。MPN の本態は *JAK2* の V617F 変異や *CALR* の indel 変異などのドライバー変異による JAK-STAT 系の恒常的な活性化であり、これに epigenetics 関連遺伝子変異などの異常が加わることで病態が進展する［1］。MPN や骨髄異形成症候群（MDS）などの骨髄系腫瘍で認められるこれらの変異は、血液疾患を有さない集団にも高頻度に認められることが明らかになった。こうした未確定の潜在能をもつクローン性造血（clonal hematopoiesis of indeterminate potential、CHIP）では、造血器腫瘍への進展以上に心血管系疾患の発症リスクが高まる［2］。また、MPN を有さない肝静脈閉塞症では、肝静脈の内皮細胞にも *JAK2* V617F が存在し、クローン性増殖に関わる［3］。最近、骨髄系細胞への分化傾向を有し、巨核球を含む「巨核球ニッチ」に親和性が高い分画の造血幹細胞が報告され［4］、肺に造血前駆細胞分画が存在し、血小板産生に寄与することが示唆された［5］。

MPN の髄外造血巣には巨核球の増殖が見られることから、MPN や CHIP においても髄外造血巣や造血細胞の臓器浸潤が血栓症や血管性の合併症に関与する可能性が考慮される。我々は MPN モデルの *Hmga2* マウス、*JAK2*V617F マウス、*JAK2* V617F/*Hmga2* マウス、*Calr* 変異マウス（Minakawa et al, in preparation）、臨床検体を用い、ドライバー変異と epigenetics 関連遺伝子変異を含む MPN 変異による髄外造血や巨核球増殖を検討してきた［6～8］。一方、wild-type（WT）マウスの心筋梗塞巣で骨髄由来細胞が血管新生等に重要な役割を果たすことを報告した［9］。これらに基づき、MPN 変異を有するクローン性造血において造血幹細胞が髄外造血と血管性の合併症を促進する巨核球ニッチ-髄外造血による病態または骨髄由来のクローン性造血細胞が浸潤して血管性の合併症を引き起こす病態を想定した。ここでは *JAK2* V617F^{+}造血細胞の肺における動態と血管性病変への関与についての検討結果を述べる。

方　法

1.　*JAK2*V617F^{+}造血細胞の髄外組織への浸潤様態

*JAK2*V617F トランスジェニックマウス （JAK2^{V617F}マウス）、および JAK2^{V617F}マウスをドナーとして行った骨髄移植の WT レシピエントマウスを用い、末梢血、骨髄、肺における *JAK2* V617F^{+}造血細胞の動態を検討した。さらに GFP を発現する *JAK2*V617F/CAG-EGFP マウスをドナーとして骨髄移植を行い、組織内における細胞の由来を確認した。

2.　*JAK2*V617F^{+}造血細胞がマウスの臓器におよぼす影響

JAK2 V617F 陽性造血細胞が浸潤する肺において、病理組織学的、機能的な検討を行った。マウスに低酸素刺激（10% O_2）を行い、肺高血圧症の誘導を試みた。

3.　造血巣から組織における *JAK2*V617F^{+}造血細胞の分子遺伝学的変化

各成熟段階の造血細胞における遺伝子発現を RNA sequencing（RNAseq）により検討、さらにパスウエイ解析および gene set enrichment（GSE）解析を行った。

結　果

1. 肺動脈周囲に集簇する *JAK2*V617F^{+}造血細胞

白血球と血小板の増加など、MPN の表現型を示す JAK2^{V617F} マウスにおいて、肺組織の病理組織学的な検討を行ったところ、肺動脈周囲に著明な細胞浸潤を認めた。免疫染色によりそれらの細胞の主体が好中球であり、巨核球は稀であることが判明した。マクロファージや B 細胞についても JAK2^{V617F} マウスと WT マウスで差を認めなかった。また、造血前駆細胞を含む増殖期の細胞もほとんど見られなかった。JAK2^{V617F} マウスをドナーとして行った骨髄移植のレシピエントでは、ドナー細胞が 50%以上の比率で認められ、生着を確認できたが、血算は WT マウスと差が無く、CHIP を反映する状態であった。それにもかかわらず、JAK2^{V617F} レシピエントマウスの肺組織では、個体の JAK2^{V617F} マウスと同様、血管周囲に好中球の浸潤を認め、巨核球や造血幹細胞を含む、増殖期の細胞は稀であった。さらに、個体の JAK2^{V617F} マウスおよび JAK2^{V617F} レシピエントマウスともに、低酸素濃度下への曝露により肺血管周囲の好中球浸潤が増強され、肺動脈中膜の肥厚も認められた（図 1A）。

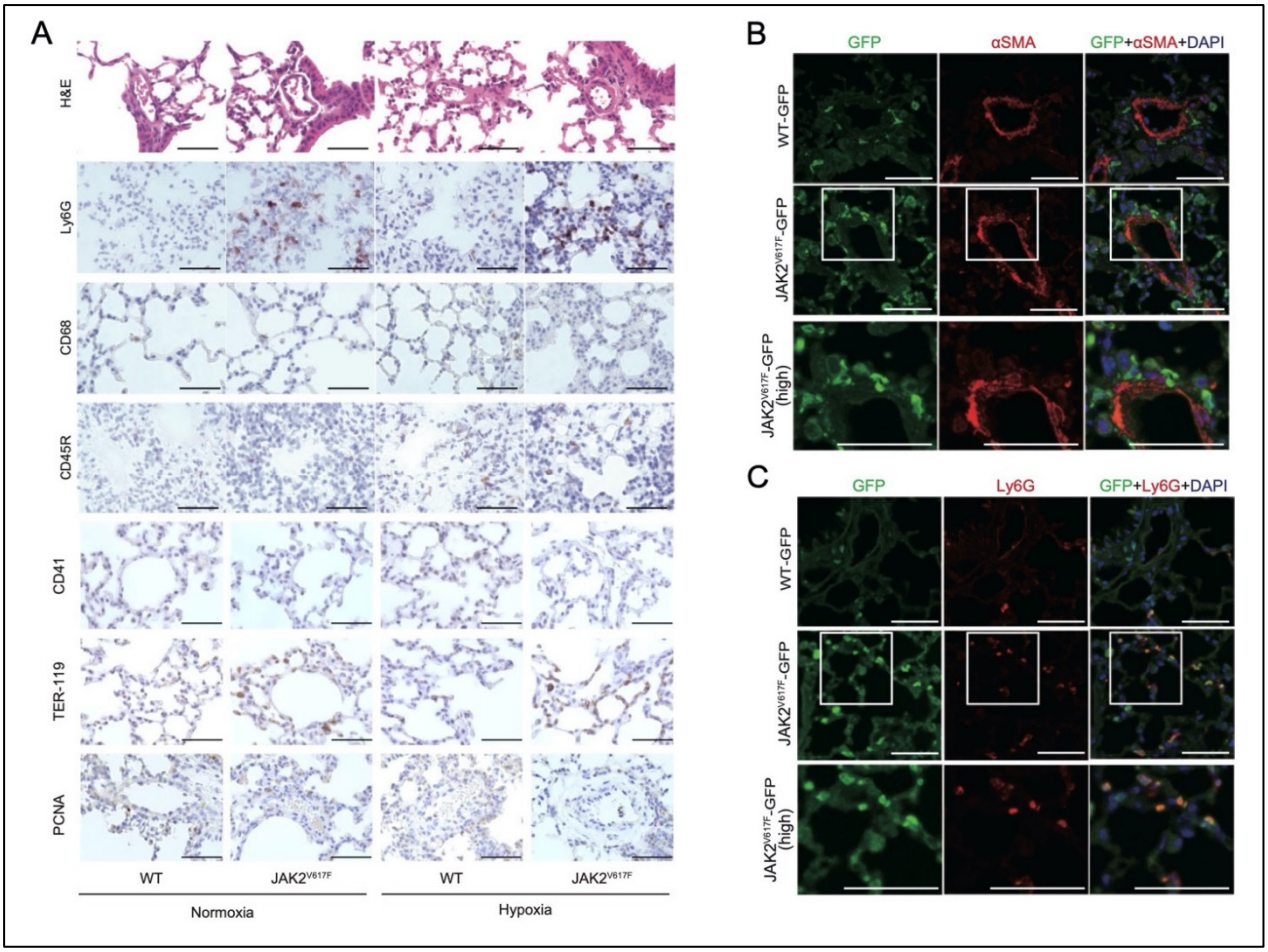


図 1. 肺動脈周囲へ集簇する *JAK2*V617F^{+}好中球と肥厚する肺動脈中膜

A） *JAK2* V617F トランスジェニックマウス（JAK2^{V617F} マウス）と野生型（WT）マウスの病理組織所見（スケールバー：50 μm）。Ly6G^{+}好中球が集族し、CD41^{+}巨核球や PCNA^{+}増殖期細胞は稀である。低酸素濃度下（Hypoxia、10%O_2）への曝露（2 週間）により、肺動脈中膜の肥厚が顕在化している。

B～C） *JAK2* V617F/CAG-EGFP マウスをドナーとした骨髄移植のレシピエントマウスにおける組織所見 （スケールバー：25 μm）。肺動脈中膜はαSMA 陽性、GFP 陰性であり（B）、好中球は Ly6G と GFP ともに陽性である（C）。

次いで *JAK2* V617F/CAG-EGFP マウスをドナーとした骨髄移植を行ったところ、レシピエントマウスにおいて、肺において増殖する好中球は *JAK2* V617F^{+}ドナー由来、肺動脈中膜は *JAK2* V617F^{-}のレシピエント由来であった（図 1B～C）。肺動脈周囲で増加した *JAK2* V617F^{+}好中球が、*JAK2* V617F^{-}平滑筋細胞による肺動脈中膜のリモデリングに関与する可能性が示唆された。

2. *JAK2*V617F 陽性造血細胞は肺高血圧症を誘導する

肺血管周囲への好中球浸潤と肺動脈中膜肥厚がみられ（図 1）、MPN では高頻度に肺高血圧を伴う知見が存在することから［10］、肺動脈圧を検討することとした。JAK2^{V617F} マウスおよび移植後の JAK2^{V617F} レシピエントマウスともに、低酸素濃度下に曝露することにより顕著な肺高血圧を呈した（図 2）。

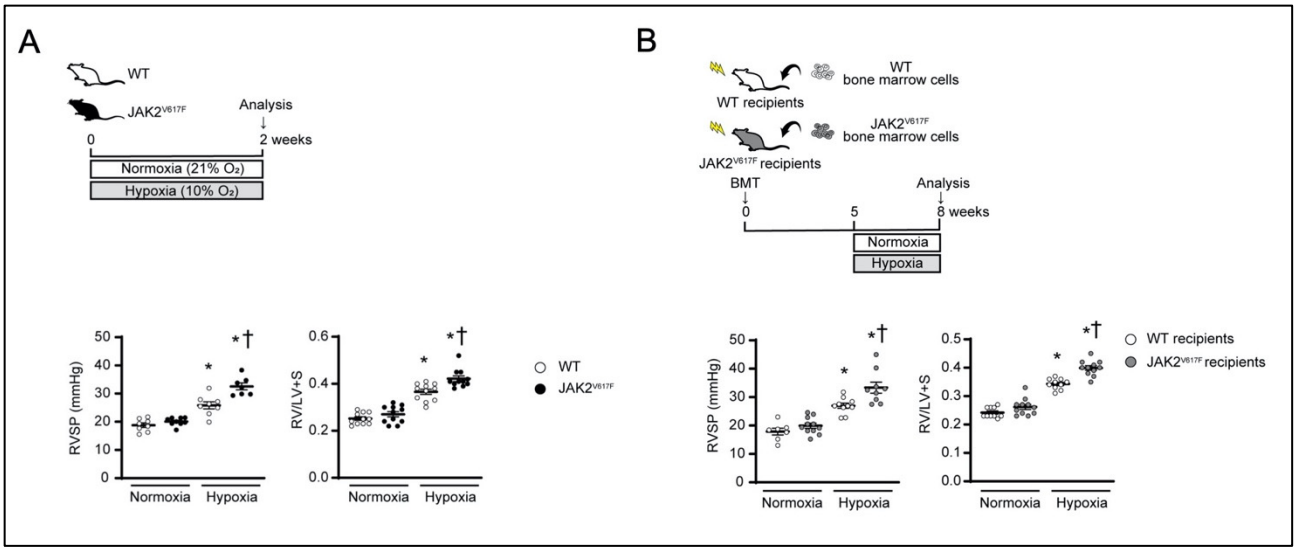


図 2. *JAK2*V617F^{+}造血細胞存在下における肺高血圧症の誘導

A) WT マウスと JAK2^{V617F}マウスを正常酸素濃度下（Normoxia、21% O_2）および低酸素濃度下（10% O_2）に 2 週間曝露したところ、低酸素下の JAK2^{V617F} マウスにおいて有意に右心圧［Right ventricular（RV）systolic pressure（RVSP）］および右室肥大［RV weight divided by the left ventricle weight including the septum（RV／LV＋S）］が増強していた（n＝7～11）。

B) 致死的な放射線（9 Gy）を照射した WT レシピエントマウスに WT マウス由来（WT recipients）または JAK2^{V617F} マウス由来（JAK2^{V617F} recipients）骨髄細胞を輸注して、生着まで 5 週間観察後、3 週間正常酸素濃度下または低酸素濃度下に曝露したところ、JAK2^{V617F} recipients において右心圧、右心肥大が増強していた（n＝7～11）。

一元配置分散分析と Tukey の多重比較法を用いて各群を比較した。*P＜0.05（対応する正常酸素濃度下の群に対する比較）、†P＜0.05（対応する JAK2^{V617F} と WT の比較）。

3. 肺血管リモデリングにおける好中球の役割

ここまでの結果から、肺中膜周囲に浸潤した骨髄由来の好中球が肺動脈のリモデリングを惹起し、肺高血圧症を引き起こしているとの仮説を立てた。そこで、好中球の分化・成熟に伴い増強する分子あるいはシグナル伝達経路などが何らかの役割を果たしている可能性を考慮し、骨髄における造血幹/前駆細胞（hematopoietic stem/progenitor cells, HSPC）分画の LSK（lineage^{-}Sca1^{+}Kit^{+}）細胞と骨髄球系の Ly6G^{+}細胞、末梢血および肺組織の Ly6G^{+}好中球の遺伝子発現プロファイルを RNAseq で解析した。その発現変化した遺伝子の重複パターンおよび各細胞のパスウエイに基づくヒエラルキー解析から、HSPC から骨髄球系細胞、末梢血および肺の好中球への分化・成熟に伴いシグナル伝達も変化することが示唆された（図 3A～B）。GSE 解析では、好中球系における全ての分化段階で JAK-STAT 系が亢進していたが、個々の遺伝子発現量は成熟段階により変化していた（図 3C）。その中で肺の好中球において最も発現が増強していた分子 X について、低酸素刺激を負荷した *JAK2* V617F マウスにおいてこれを阻害したところ、肺高血圧を完全に予防できた（図 3D）（Kimishima et al, in revision）。

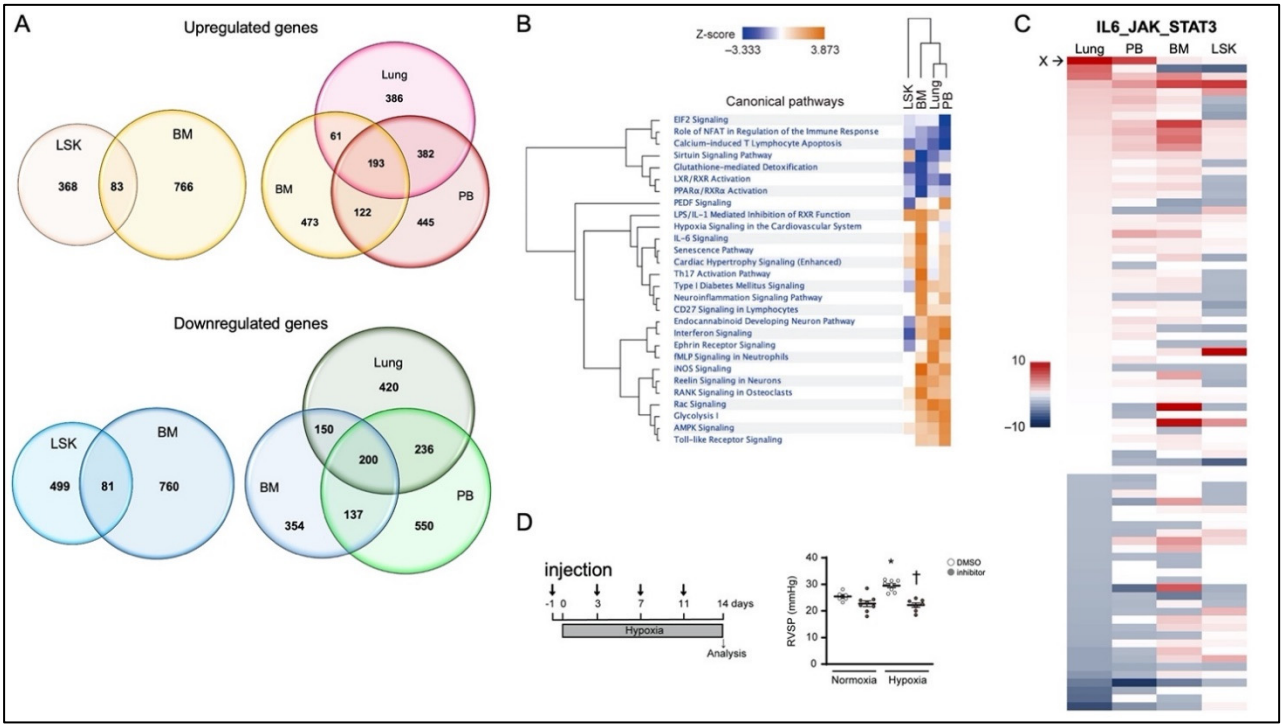


図 3. RNAseq による遺伝子発現解析

骨髄（BM）の造血幹／前駆細胞分画の LSK（lineage$^-$Sca1$^+$Kit$^+$）細胞および Ly6G$^+$骨髄球系細胞、末梢血（PB）および肺（Lung）の Ly6G$^+$好中球の遺伝子発現を解析した。

A） 各分画の細胞について、WT マウスにおける発現量と比較して JAK2^{V617F}マウスにおいて upregulate または downregulate されている（>1.5-fold） 遺伝子数をベン図で示している。

B） IPA（キアゲン社）によるパスウエイ解析。|z| >2.58 のパスウエイを示している。

C） GSE 解析の結果、IL6_JAK_STAT3 の遺伝子セットが全ての分化成熟段階の細胞で enrich されていた［肺好中球 NES（Normalized enrichment score）＝1.30、FDR（false discovery rate ＝0.089；末梢血好中球 NES＝1.52、FDR＝0.020；骨髄 Ly6G$^+$細胞 NES＝2.14、FDR＝0；LSK 細胞 NES＝1.58、FDR＝0.017）。分子 X については、全ての分化成熟段階で JAK2V617F マウスでの発現が認められ、特に肺好中球における発現は遺伝子セット中で最も高かった。

D） 分子 X の阻害剤（inhibitor）を JAK2^{V617F}マウスに投与したところ（↓）、低酸素濃度への曝露下の右心圧上昇が予防された。コントロール群（DMSO 投与群）は右室圧の上昇がみられた。一元配置分散分析と Tukey の多重比較法を用いて各群を比較した。*P＜0.05（対応する正常酸素濃度下の群に対する比較）、†P＜0.05（対応する阻害剤投与群と DMSO 投与コントロール群の比較）。

考　察

我々は、肺において造血幹細胞・前駆細胞と巨核球が存在し、血小板産生もされうること、巨核球ニッチを示唆する報告がなされたことから、髄外造血が盛んな MPN の肺においてもこうした機序が働くものと予測して研究を始めたものの、少なくとも肺高血圧症については、好中球が骨髄から分化成熟してから血管周囲に浸潤することにより引き起こされており、MPN の肺における巨核球を含めた造血の増強は明らかではなかった。しかし、MPN や CHIP による血管性合併症として肺高血圧症の機序の一端が明らかになり、新たな治療標的を見出すに至った。なお、*Calr* 変異マウスについては、*JAK2* V617F-Tg マウスよりも軽度だが、肺高血圧症ならびに肺組織への造血細胞浸潤を認めている （Yokokawa et al, in preparation）。MPN やクローン性造血による合併症や造血器腫瘍への進展の機序がさらに明らかになることを期待している。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、福島県立医科大学循環器内科学講座の三阪智史先生、君島勇輔先生、横川哲郎先生、竹石恭知先生、福島県立医科大学輸血・移植免疫学講座の皆川敬治先生であり、ここに感謝申し上げます。

文　献

1) Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. Blood. 2017;129(6):667-679. doi: 10.1182/blood-2016-10-695940. PubMed PMID: 28028029.
2) Bejar R. CHIP, ICUS, CCUS and other four-letter words. Leukemia. 2017;31(9):1869-1871. doi: 10.1038/leu.2017.181. PMID: 28592887.
3) Zhan H, Lin CHS, Segal Y, Kaushansky K. The JAK2V617F-bearing vascular niche promotes clonal expansion in myeloproliferative neoplasms. Leukemia. 2018;32(2):462-469. doi: 10.1038/leu.2017.233. PMID: 28744010.
4) Pinho S, Marchand T, Yang E, Wei Q, Nerlov C, Frenette PS. Lineage-Biased Hematopoietic Stem Cells Are Regulated by Distinct Niches. Dev Cell. 2018;44(5):634-641.e4. doi: 10.1016/j.devcel.2018.01.016. PMID: 29456137.
5) Lefrançais E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, Thornton EE, Headley MB, David T, Coughlin SR, Krummel MF, Leavitt AD, Passegué E, Looney MR. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. Nature. 2017;544(7648):105-109. doi: 10.1038/nature21706. PubMed PMID: 28329764.
6) Ikeda K, Mason PJ, Bessler M. 3'UTR-truncated Hmga2 cDNA causes MPN-like hematopoiesis by conferring a clonal growth advantage at the level of HSC in mice. Blood. 2011;117(22):5860-9. doi: 10.1182/blood-2011-02-334425. PMID: 21460244.
7) Ueda K, Ikeda K, Ikezoe T, Harada-Shirado K, Ogawa K, Hashimoto Y, Sano T, Ohkawara H, Kimura S, Shichishima-Nakamura A, Nakamura Y, Shikama Y, Mori T, Mason PJ, Bessler M, Morishita S, Komatsu N, Shide K, Shimoda K, Koide S, Aoyama K, Oshima M, Iwama A, Takeishi Y. Hmga2 collaborates with JAK2V617F in the development of myeloproliferative neoplasms. Blood Adv. 2017;1(15):1001-1015. doi: 10.1182/bloodadvances.2017004457. PubMed PMID: 29296743.
8) Harada-Shirado K, Ikeda K, Ogawa K, Ohkawara H, Kimura H, Kai T, Noji H, Morishita S, Komatsu N, Takeishi Y. Dysregulation of the MIRLET7/HMGA2 axis with methylation of the CDKN2A promoter in myeloproliferative neoplasms. Br J Haematol. 2015;168(3):338-49. doi: 10.1111/bjh.13129. PMID: 25236537.
9) Shimizu T, Suzuki S, Sato A, Nakamura Y, Ikeda K, Saitoh S, Misaka S, Shishido T, Kubota I, Takeishi Y. Cardio-protective effects of pentraxin 3 produced from bone marrow-derived cells against ischemia/reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol. 2015;89(Pt B):306-13. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.10.013. PMID: 26470821.
10) Cortelezzi A, Gritti G, Del Papa N, Pasquini MC, Calori R, Gianelli U, Cortiana M, Parati G, Onida F, Sozzi F, Vener C, Bianchi P, Deliliers GL. Pulmonary arterial hypertension in primary myelofibrosis is common and associated with an altered angiogenic status. Leukemia. 2008;22(3):646-9. DOI: 10.1038/sj.leu.2404943. PMID: 17851555.