

90. 白血病を進展させる骨髄腫瘍血管の変遷機構の解明

木戸屋 浩康

福井大学 学術研究院 医学系部門 血管統御学分野

Key words : 腫瘍血管, アンジオクラインファクター, 白血病, 血管内皮細胞

緒言

本研究では、白血病の進展における骨髄微小環境に着目し、特に固形がんの治療においては一般的な治療標的となっている腫瘍血管の解析を進めることで、革新的な白血病の治療方法の開発を目指した。白血病には抗がん剤が効果を示すことから臨床では併用化学療法が行われており、完全寛解および治癒が期待できるようになっている。しかしながら、治療後の患者の多くに再発が認められ、その場合は抗がん剤の効果が減弱して治療が困難となる。そのため、白血病の治療においては寛解後の再発の抑制および、再発後の治療法の開発が課題となっている [1]。白血病は「血液のがん」であるが、血液の恒常性は造血幹細胞を中心としたシステムによって維持されている。造血幹細胞は骨髄微小環境によって構築されるニッチと呼ばれる特殊な微小環境によって分化や増殖が制御されており、白血病の進展過程においてもニッチが何らかの役割を担っている可能性が高い [2]。ニッチの実態は骨髄血管であることが近年の研究から明らかになりつつあるが、白血病の進展と骨髄血管の関連については未解明である。本研究では、白血病に対する新たな治療戦略として腫瘍骨髄血管ニッチの制御という概念を提唱し、白血病マウスモデルを用いた解析を進めた。

方法および結果

1. 白血病モデルマウスを用いた骨髄血管の解析

本研究では急性骨髄性白血病を自然発症する *Regnase-1* 遺伝子欠失マウスを用いて解析を進めた。*Regnase-1* は RNase 領域と、CCCH 型 Zinc finger 領域を持つ RNA 分解酵素で、標的とする mRNA の 3' UTR に存在する Stem-loop 領域を介して mRNA を分解する働きを持つ分子である [3, 4]。血球細胞系特異的に Cre を発現する *Vav1-Cre* マウスを用いることで血球細胞系特異的に *Regnase-1* を欠損するマウス (*Vav1-Cre : Regnase-1^{fllox/fllox}*) を作製すると、成長に伴って徐々に体重の減少が認められ、生後 8 週から 12 週頃にはほぼ全てが死亡する。その死因について解析を進めると、著しいリンパ節腫脹と脾腫および、末梢血中に特徴的な芽球の出現が認められるなど AML 様の症状を呈していることが明らかとなった。また、通常では生体内で増殖することがない長期造血幹細胞 (Lineage 陰性、cKit 陽性、Sca1 陽性、CD34 陰性、Flt3 陰性) が、著しく増加していることが明らかとなった [5]。このような白血病を自然発症するマウスモデル (*Vav1-Cre : Regnase-1^{fllox/fllox}*) を用いて、白血病における骨髄血管の構造的および機能的な変化の解析を進めた。マウスが白血病を発症した後に大腿骨を回収して組織切片を作製し、血管内皮細胞のマーカーである CD31 と Endomucin に対する蛍光免疫染色を行うと、白血病の発症に伴って骨髄中の血管数の増加や血管構造の異常が起きており、いわゆる「腫瘍血管化」が起きていることが確認できた。特に活性化した血管内皮細胞に特異的に発現する Endomucin が大多数の血管において高発現しており、血管内皮細胞に大きな特性変化が起きていることが明らかとなった [6]。このような白血病に伴う骨髄血管の変化は、*Regnase-1* 遺伝子欠失マウスにおいて特異的に起きる現象ではなく、MML-AF9 細胞もしくは H9M1 細胞を C57BL/6 マウスへ移植することによって作製した白血病モデルマウスにおいても同様に確認された。これらの結果から、白血病の発症・進展により、骨髄微小環境の変化が誘導され、その結果として骨髄血管も異常化していることが示された。

2. 白血病の進展における異常骨髄血管の役割

次に、白血病の進展に伴って構造的に異常化した骨髄血管が、機能的にも白血病の進展に影響を与えているかの検討を進めた。一般的に固形がんの進展に伴って形成される腫瘍血管は、がん組織に酸素と栄養を供給することでがんの増殖を支えているが、非固形がんである白血病ではがん組織が拡大化していくことがないため、腫瘍血管が固形がんとは異なる役割を担っていると考えられる。注目したのはアンジオクリンファクターと呼ばれる血管から産生され周辺組織に作用する分子群である。骨髄の血管ニッチでは、血管がアンジオクリンファクターを産生することで造血幹細胞の分化や増殖を制御しており、造血系の恒常性維持に働くことが知られている。我々は、白血病細胞が骨髄血管の異常化を導き、異常化した血管から産生されるアンジオクリンファクターが白血病の進展・再発に働くのではと考えて以下の解析を進めた。

白血病マウスの異常化した骨髄血管から特異的に産生されるアンジオクリンファクターを同定するため、*Regnase-1* 遺伝子欠失マウスの骨髄から血管内皮細胞を回収して RNA-seq 解析を進めた。その結果、多くの遺伝子発現が有意に変化していることが明らかとなり、その中でも細胞外に分泌される、もしくは細胞膜に発現する分子を選定した。得られた候補遺伝子について、骨髄血管内皮細胞に対する RT-PCR による遺伝子発現解析や、骨髄組織切片に対する特異的抗体による免疫染色を行うことで 2 つの候補分子 (AF1 と AF2) を選定した。これらのアンジオクリンファクターの白血病進展への影響を検討するため flox マウスを作製し (AF1^{flox/flox} および AF2^{flox/flox})、血管内皮細胞にて特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウス (VEcadherin-Cre) をかけ合わせて血管内皮細胞にて特異的に遺伝子を欠損するマウスを作製した (VEcadherin-Cre : AF1^{flox/flox} および VECadherin-Cre : AF2^{flox/flox}) [7]。このアンジオクリンファクター欠損マウスに、*Regnase-1* 遺伝子欠失マウスの造血細胞を移植することで白血病を誘導したところ、造血細胞の異常増殖やリンパ節腫脹および脾腫の抑制が認められた。さらに、生存期間も有意に延長することが確認され、これらの結果から、アンジオクリンファクターである AF1 と AF2 が白血病の治療標的となりうることが示された。また、ヒト白血病細胞に AF1 および AF2 タンパクを添加することで増殖が誘導されることも確認でき、これらのアンジオクリンファクターが白血病の治療標的となる可能性が示された。

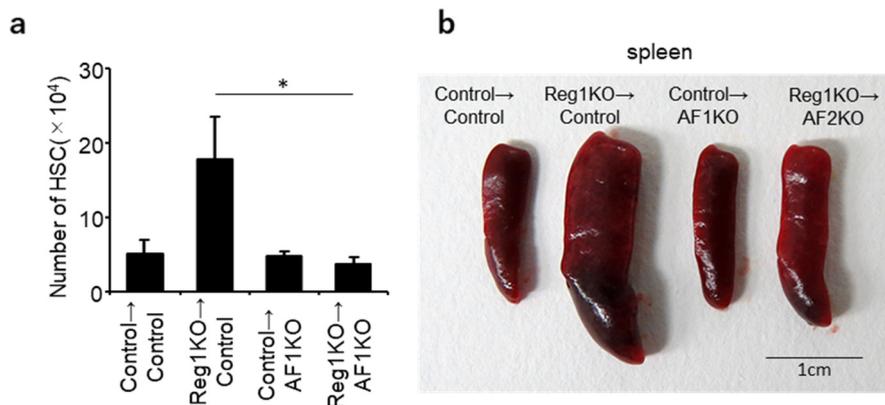


図 1. AF1 の欠損マウスでは白血病の進展を抑制される

- Reg1* KO 白血病細胞の移植では移植した造血幹細胞の異常増殖と脾腫が認められるが (*Reg1* KO → Control 群)、血管内皮細胞にて AF1 を欠損するマウス (*Reg1* KO → AF1KO 群) ではそれが抑制されている。得られた結果は student's t-test によって検定した (* p < 0.05)。
- 白血病の進展による脾臓の肥大化も同様に抑制される (スケールバー : 1 cm)。

3. 骨髄血管の異常化を誘導する分子機構の解析

白血病における骨髄血管の異常化を抑制することが白血病の治療に繋がるのではと考え、血管異常化を誘導する分子機構の解明に向けた研究を行った。白血病骨髄血管の異常化の誘導機構について検討するため、白血病モデルマウスの骨髄からは、血管内皮細胞を回収して RNA-seq 解析を行った。このデータを基にして血管内皮細胞にて活性化しているシグナルをインフォマティクス解析にて探索したところ、BVF によるシグナルが関与する可能性を見出した。そこで、BVF によるシグナルが骨髄血管の異常化に関与しているかについて、白血病モデルマウスを用いて解析して検証を進めた。血管内皮細胞にて BVF 受容体を欠損するマウス (VEcad-Cre : BVFR^{flox/flox}) にて白血病を誘導すると、骨髄血管の異常化と白血病の進展が抑制され、骨髄血管内皮細胞におけるアンジオクリンファクター (AF1 と AF2) の発現低下が確認された。また、白血病骨髄における BVF の産生源を探索するため、骨髄組織中の各種細胞を回収して遺伝子発現解析を行ったところ、骨髄間質細胞が BVF を主に発現することを発見した。そこで、骨髄間質細胞にて BVF を欠損するマウス (LeptR-Cre : BVF^{flox/flox}) を作製して白血病を発症させたところ、白血球の異常増殖が抑制されるという結果が得られた。これらの結果から、白血病の骨髄微小環境では骨髄間質細胞からの BVF の産生が誘導されることで骨髄血管が異常化して AF1 と AF2 の産生が引き起こされ、その結果として白血病が進展することが示された。そのため、骨髄間質細胞や BVF シグナルを阻害することで、骨髄血管の異常化を抑制する治療法の可能性が示された。

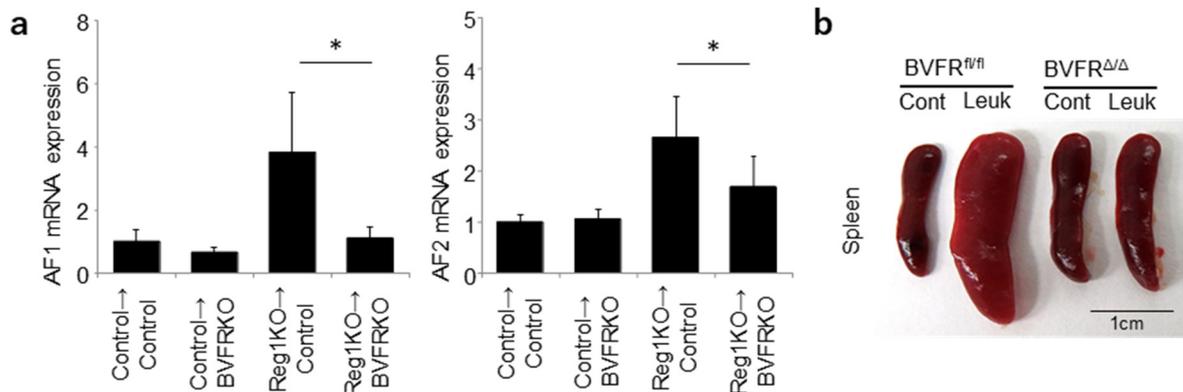


図2. *BVFR* 遺伝子欠損マウスでの白血病モデルの解析

- Reg1KO* の白血病細胞を移植すると血管内皮細胞の AF1 と AF2 の発現上昇が認められるが (*Reg1KO*→Control 群)、*BVFR* を欠損するマウス (*Reg1KO*→*BVFRKO* 群) では抑制されている。得られた結果は student's t-test によって検定した (* $p < 0.05$)。
- 白血病の進展による脾臓の肥大化も同様に抑制される (スケールバー : 1 cm)。

考 察

かつては「不治の病」とされていた白血病は、抗がん剤や分子標的療法の発達に伴い、今では治療可能な病となりつつある。しかしながら、寛解状態へ治療した後に生じる高い再発率のリスクは、依然、白血病患者に不安と恐怖を与えている。そのため、再発のメカニズムを明らかにし、根治を達成することが、白血病治療の現場から強く望まれている。本研究の結果から、がん細胞自身を標的とした治療に加え、進展や再発の要因として潜在する骨髄腫瘍血管やアンジオクリンファクターを制御することによる白血病の治療法の可能性が示された。しかしながら、本研究ではマウス白血病モデルを主に用いて解析を進めており、白血病の骨髄における血管の変化や異常なアンジオクリンファクターの産生がヒト白血病でも同様に起きているか検証を進める必要がある。今後、さらなる解析が進むことで、骨髄腫瘍血管やアンジオクリンファクターを標的とした治療薬の開発へと繋がることを期待する。

謝 辞

本研究は、公益財団法人上原記念生命科学財団からの助成を賜りましたことで大きく進展させることができました。研究へのご理解とご協力を厚く感謝申し上げます。なお、本研究成果は現在投稿準備中です。

文 献

- 1) Kreidieh F, Abou Dalle I, Moukalled N, El-Cheikh J, Brissot E, Mohty M, Bazarbachi A. Relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia: an overview of prevention and treatment. *Int J Hematol.* 2022 Sep;116(3):330-340. doi: 10.1007/s12185-022-03416-7. Epub 2022 Jul 16. PMID: 35841458
- 2) Comazzetto S, Shen B, Morrison SJ. Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow. *Dev Cell.* 2021 Jul 12;56(13):1848-1860. doi: 10.1016/j.devcel.2021.05.018. Epub 2021 Jun 18. PMID: 34146467
- 3) Matsushita K, Takeuchi O, Standley DM, Kumagai Y, Kawagoe T, Miyake T, Satoh T, Kato H, Tsujimura T, Nakamura H, Akira S. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature.* 2009 Apr 30;458(7242):1185-90. doi: 10.1038/nature07924. Epub 2009 Mar 25. PMID: 19322177
- 4) Iwasaki H, Takeuchi O, Teraguchi S, Matsushita K, Uehata T, Kuniyoshi K, Satoh T, Saitoh T, Matsushita M, Standley DM, Akira S. The I κ B kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1. *Nat Immunol.* 2011 Oct 30;12(12):1167-75. doi: 10.1038/ni.2137. PMID: 22037600
- 5) Kidoya H, Muramatsu F, Shimamura T, Jia W, Satoh T, Hayashi Y, Naito H, Kunisaki Y, Arai F, Seki M, Suzuki Y, Osawa T, Akira S, Takakura N. Regnase-1-mediated post-transcriptional regulation is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis. *Nat Commun.* 2019 Mar 6;10(1):1072. doi: 10.1038/s41467-019-09028-w. PMID: 30842549
- 6) Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, Schajnovitz A, Ramasamy SK, Kusumbe AP, Ledergor G, Jung Y, Milo I, Poulos MG, Kalinkovich A, Ludin A, Kollet O, Shakhar G, Butler JM, Rafii S, Adams RH, Scadden DT, Lin CP, Lapidot T. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature.* 2016 Apr 21;532(7599):323-8. doi: 10.1038/nature17624. Epub 2016 Apr 13. PMID: 27074509
- 7) Okabe K, Kobayashi S, Yamada T, Kurihara T, Tai-Nagara I, Miyamoto T, Mukoyama YS, Sato TN, Suda T, Ema M, Kubota Y. Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. *Cell.* 2014 Oct 23;159(3):584-96. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.025. PMID: 25417109