

研究助成 2019 – がん領域 –

研究成果報告書（最終） < 概要 >

所 属	東京薬科大学 生命科学部 生命医科学科 腫瘍医科学研究室
氏 名	林 嘉宏
研 究 テーマ	新規に同定した線維化関連免疫細胞を標的とする骨髄線維化を伴う骨髄性血液がんの治療戦略

- 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- 概要の構成は自由とするが、研究目的、研究手法、研究成果などを、1 ページにまとめること。
(図表、写真などの貼付を含む)

【目的】

骨髄の線維化は、高齢社会に急増している骨髄異形成症候群（MDS）などの骨髄性血液がんを高頻度に認められ、治療抵抗性や予後不良と直結する。近年同定された様々な遺伝子変異に病態特異性はなく、その発症機序は未だ不明である。申請者は、これまでに、HIF1A シグナルが MDS の発症において中心的役割を担う病態生物学的因子であることを明らかにした（*Cancer Discovery* 2018）。MDS マウスおよび他の骨髄性腫瘍マウスを用いたその後の検討において、これらのモデルにおいて患者同様に骨髄線維化の進行がみられること、線維化発症の時期と一致して骨髄中にマクロファージ様細胞集団が出現することを確認した。本研究では、骨髄線維化の発症と関連して出現する新たなマクロファージ様細胞集団の制御機構と役割を明らかにすることを目的とした。

【研究手法と成果】

① 線維化関連マクロファージ様細胞の制御機構解明

骨髄線維化関連マクロファージ様細胞の制御機構を解明するため、Jak2V617F 変異を導入したマウス造血幹細胞・前駆細胞（HSC/Ps）を野生型マウスに移植（BMT）し、骨髄増殖性腫瘍モデルマウス（Jak2VF BMT マウス）を作製した。また、MDS モデルとして、CBL 変異・RUNX1 変異を導入したマウス（Aoyagi, Hayashi, et al. *Cancer Discovery* 2022）を作製した。これらのマウスでは、骨髄線維化の進展とあわせて、末梢血単球の Ly6C^{low} 画分割合の増加、骨髄マクロファージ画分内に線維化関連細胞集団（マーカー非公開）の出現を確認した。重度の骨髄線維化が進行する前のタイミングで、これらのマウス骨髄から、HSC/Ps、単球、およびマクロファージ画分をセルソーターで回収し、RNA シークエンス（RNA-Seq）による遺伝子発現解析を行った。発現変動遺伝子を抽出して解析したところ、骨髄線維化を来したマウスの HSC/Ps、単球、マクロファージ画分において Gene X の有意な発現亢進が確認された。Gene X の発現亢進は、骨髄線維化を伴う MDS 患者（MDS with bone marrow fibrosis, MDS-F）検体の遺伝子発現解析（自験例）や、原発性骨髄線維症患者検体の遺伝子発現データ（GSE53482）の解析でも確認された。

② 骨髄線維化関連細胞の誘導機序解明

骨髄線維化関連マクロファージ様細胞および骨髄線維化病態の誘導における Gene X の役割を調べるために、Gene X 欠損マウスから回収した HSC/Ps を用いて骨髄線維症マウス（Gene X-KO/Jak2VF BMT マウス）を作製した。Gene X-KO により、Jak2VF BMT マウスで増加していた Ly6C^{low} 単球および骨髄マクロファージ画分内の線維化関連細胞集団の割合が有意に減少し、骨髄線維化の進行が抑制されることがわかった。HSC/Ps の RNA-Seq により、Gene X-KO/Jak2VF BMT マウス細胞では、単球関連遺伝子、とりわけ、Ly6C^{low} 単球の分化成熟に重要な遺伝子群の発現が低下していることがわかった。そこで、末梢血 Ly6C^{low} 単球欠失マウスの HSC/Ps を用いて骨髄線維症マウスを作製したところ、骨髄マクロファージ画分内の線維化関連細胞集団の割合は、Gene X-KO/Jak2VF BMT マウスと同程度まで減少し、骨髄線維化の進展も抑制された。これらの結果から、骨髄線維化関連マクロファージ様細胞は、循環中の Ly6C^{low} 単球に由来すること、またその制御における Gene X の重要な役割が示唆された。

③ 患者検体・臨床情報を用いた解析・検討

MDS 患者 47 例の検討で、およそ 20% の症例においてグレード 2 以上の線維化が確認された。種々の臨床情報との多変量解析により、骨髄線維化グレード上昇と末梢血単球増加の有意な相関関係が確認された。骨髄線維化をきたした MDS 患者の骨髄病理標本を観察すると、骨髄線維化グレードとマーカー Y 陽性マクロファージ様細胞の増加が確認された。

本研究により、骨髄線維化を伴う複数の造血器腫瘍に共通してみられる骨髄線維化関連マクロファージ様細胞の由来、制御機構の一端が明らかとなった。現在、骨髄線維化関連マクロファージ様細胞の機能解析を進めている。また、単球・マクロファージ系の細胞表面抗原はマウスとヒトで異なるため、患者骨髄標本で確認されたマーカー Y 陽性マクロファージ様細胞が、マウスで同定した線維化関連細胞集団に相当するものであるかについての検証も進めている。これらを明らかにした上で、論文投稿を予定している。

研究助成 2019 –がん領域–

研究成果報告書（最終）＜発表実績/予定一覧＞

所	属	東京薬科大学 生命科学部 生命医科学科 腫瘍医科学研究室
氏	名	林 嘉宏

1. 論文発表実績	
	<ul style="list-style-type: none"> ● 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。 ● 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ● 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に<u>下線</u>を引く。 ● 国内外雑誌を問わない。 ● 印刷中は in press と記入、投稿中の論文はその旨を記載すること。なお学会のアブストラクトは含めない。 ● 欄が足りない場合は、増やして記入すること。
1	Aoyagi Y, <u>Hayashi Y (corresponding)</u> , Harada Y, Choi K, Matsunuma N, Sadato D, Maemoto Y, Ito A, Yanagi S, Starczynowski DT, Harada H. Mitochondrial Fragmentation Triggers Ineffective Hematopoiesis in Myelodysplastic Syndromes. Cancer Discovery . 12 (1):250-269, 2022
2	Targeting DNMT1 by demethylating agent OR-2100 increases tyrosine kinase inhibitors-sensitivity and depletes leukemic stem cells in chronic myeloid leukemia. Kamachi K, Ureshino H, Watanabe T, Yoshida N, Yamamoto Y, Kurahashi Y, Fukuda-Kurahashi Y, <u>Hayashi Y</u> , Hirai H, Yamashita S, Ushijima T, Okada S, Kimura S. Cancer letters . 526: 273-283, 2022
3	Ureshino H, Kurahashi Y, Watanabe T, Yamashita S, Kamachi K, Yamamoto Y, Fukuda-Kurahashi Y, Yoshida-Sakai N, Hattori N, <u>Hayashi Y</u> , Kawaguchi A, Tohyama K, Okada S, Harada H, Ushijima T, Kimura S. Silylation of Deoxynucleotide Analog Yields an Orally Available Drug with Antileukemia Effects. Molecular cancer therapeutics . 20(8):1412-1421, 2021
4	Ogawa K, Asano K, Yotsumoto S, Yamane T, Arita M, <u>Hayashi Y</u> , Harada H, Makino-Okamura C, Fukuyama H, Kondo K, Yamasoba T, Tanaka M. Conversion of neutrophils into atypical Ly6G+ SiglecF+ immune cells with neurosupportive potential in olfactory neuroepithelium. Journal of Leukocyte Biology . 109(3):481-496, 2020
5	Sato A, Kamio N, Yokota A, <u>Hayashi Y</u> , Tamura A, Miura Y, Maekawa T, Hirai H. C/EBPβ isoforms sequentially regulate regenerating mouse hematopoietic stem/progenitor cells. Blood Advances . 28;4(14):3343-3356, 2020
6	Harada Y, Shingai N, Ding Y, Sadato D, <u>Hayashi Y</u> , Yamaguchi M, Okuyama Y, Shimoyama T, Ohashi K, Harada H. Gene Rearrangements of MLL and RUNX1 Sporadically Occur in Normal CD34+ Cells Under Cytokine Stimulation. Cancer Science . 111(5):1851-1855, 2020

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ● 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ● 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ● 国内外を問わない。 ● 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2022/1/21-22	第 26 回造血腫瘍研究会. 林嘉宏, 青柳泰成, 松沼菜摘, 貞任大地, 原田結花, 原田浩徳. 過剰なミトコンドリア断片化に伴う炎症性シグナル経路の活性化が MDS 病態発症の引き金となる.
2	2021/9/30-10/2	第 80 回日本癌学会学術総会. Yasushige Aoyagi, Yoshihiro Hayashi, Natsumi Matsunuma, Daichi Sadato, Yuka Harada, and Hironori Harada. Targeting Overwhelming Mitochondrial Fragmentation in Myelodysplastic syndromes-related Bone Marrow Failure.
3	2021/9/23-25	第 83 回日本血液学会学術集会. Yoshihiro Hayashi, Yasushige Aoyagi, Natsumi Matsunuma, Daichi Sadato, Yuka Harada, and Hironori Harada. Excessive mitochondrial fragmentation as a fundamental trigger of ineffective hematopoiesis in MDS.
4	2021/1/23	第 25 回造血器腫瘍研究会. 林嘉宏, 青柳泰成, 小林大貴, 貞任大地, 原田結花, 原田浩徳. ミトコンドリア断片化による MDS 無効造血発症機序の解明.
5	2020/2/11-13	第 1 回日本癌学会若手の会. 林嘉宏, 青柳泰成, 原田浩徳. ミトコンドリアダイナミクス異常による骨髄不全症発症機序の解明.
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2022 年 10 月頃 投稿予定	未定（本研究内容について）
2		
3		
4		