

# 論文内容の要旨

論文題目 「造血幹細胞 JAK-STAT シグナル異常活性化に起因する

骨髄増殖性腫瘍モデルマウスの作製と病態解析」

氏名 清水崇史

## 【背景】

造血器の腫瘍性疾患である白血病は、血液細胞が癌化することにより、分化抑制を伴いながら限りなく増殖を続けるようになった状態と考えられる。これに対し、骨髄増殖性腫瘍(Myeloproliferative Neoplasms: MPNs)は、骨髄内において血球細胞増殖を示すものの分化障害を伴わない腫瘍性疾患である。MPNsは、真性多血症(Polycythemia Vera :PV)、本態性血小板増多症(Essential Thrombocythemia :ET)、原発性骨髄線維症(Primary Myelofibrosis :PMF)の三疾患を含む造血器疾患群の総称であり、その疾患の特徴として、一ないし多系統の骨髄球系列(顆粒球系、赤芽球系、巨核球系及び肥満細胞系)細胞の増加を認めると共に、単クローン性の正常造血を示すことから、全ての血液細胞の源である造血幹細胞レベルでの遺伝子異常に起因する疾患と考えられている。

近年の研究から、MPNs患者の大半に非受容体型チロシンキナーゼ JAK2 の活性型変異体(JAK2V617F)が検出され、本変異が PV 症例における約 95%、ET,PMF 症例における約 50%に検出されることが明らかになった(1)。更に、PV, PMF 症例の多くは両側アレルに JAK2 変異を保有する(ホモ型)のに対し、ET 症例において JAK2 変異を検出するケースの大半は、片側アレルのみの変異(ヘテロ型)であることが示された(2)。本事実に加え、JAK2V617F 変異体を発現するトランスジェニックマウスの研究から、JAK2 変異体を高発現する個体は PV 様の表現系を示し、JAK2 変異体の発現量が低い個体は ET 様の表現系を示すことが明らかになり、血球細胞における JAK2V617F 変異体の発現量が PV 及び ET の疾患病型を規定することが示唆された(3)。しかしながら、JAK2V617F を用いた研究において、移植後 10 カ月近い期間を経て二次性の骨髄線維化を来す報告はあるものの、短期間で典型的 PMF 病態を呈するモデルマウスは未だ報告されていない。

血球細胞において活性化した JAK2 は、下流因子である STAT family をリン酸化(活性化)することで標的遺伝子の発現制御を行っている。この際 STAT family は、JAK/STAT pathway における負の制御因子である CIS / SOCS family の発現を介し、サイトカイン受容体及び JAK2 のキナーゼ活性を抑制することで、シグナル伝達の適切な制御(シグナル遮断)を行っている。近年の報告から、JAK2V617F 変異体を発現する血液細胞は、サイトカイン非依存的な細胞増殖を示すものの、CIS/SOCS family を介した負のフィードバック制御を受けており、下流因子である STAT5A のリン酸化状態は最大値に達していない事が報告されている(4)。以上の知見を踏まえ、

我々はJAK2下流因子の一つであるSTAT5Aの恒常的活性化変異体を造血幹細胞に遺伝子導入することで、CIS/SOCS familyを介する負のフィードバック制御に影響されず、より強いSTAT5A活性化に起因するPMF病態が惹起されると仮説を立てた。

## 【本研究の目的】

PMFは希少疾患であり、その病態や治療法に関して不明な点を多く残す一方で、適切なモデルマウスが存在しない。そこで、ヒトPMF臨床像に即したモデルマウスを作製し、その病態解析から疾患の本質を明らかにし、診療及び治療戦略に有用な知見を得る事を目的に研究を行った。

## 【実験手法】

本研究では恒常的活性化型STAT5AとしてSTAT5A 1\*6変異体を用いた。STAT5A 1\*6変異体は、DNA結合領域(H299R)及び転写活性化領域(S711F)の2アミノ酸置換変異体であり、持続的なリン酸化に起因する転写活性の増強が確認されている(5)。我々は、STAT5A 1\*6変異体を造血幹細胞に遺伝子導入した後、骨髓破壊的造血幹細胞移植を行う実験系によりPMFマウスの作製を試みた。まず初めに、C57BL/6 (B6)-Ly5.1成体マウス骨髓より、高度に純化した造血幹細胞(CD34<sup>low</sup>/c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>分画: CD34<sup>+</sup>KSL細胞)をフローサイトメーターにより分取した。分取した造血幹細胞はin vitro培養下で、レトロウイルスを用い種々の遺伝子群(JAK2 WT, JAK2 V617F, STAT5A WT, STAT5A 1\*6)の遺伝子導入を行った。本レトロウイルスベクターにはIRES-EGFP配列が組み込まれている為、遺伝子導入された細胞をGFP蛍光によりモニターすることが可能である。遺伝子導入造血幹細胞は、競合細胞(B6-Ly5.1/5.2 骨髓細胞)と共に致死量放射線照射したレシピエントマウス(B6-Ly5.2)に骨髓破壊的造血幹細胞移植を施し、移植後4週目より末梢血及び病理解析を行った。この際、全白血球細胞に発現しているCD45分子のアロタイプ(Ly5.1 or Ly5.1/5.2)を識別することで、ドナー造血幹細胞(Ly5.1)由来もしくは競合細胞(Ly5.1/5.2)由来の血液細胞である事を判別できる。更に、全血液細胞におけるドナー造血幹細胞由来GFP陽性細胞の割合(キメリズム)から、遺伝子導入造血幹細胞の造血寄与率及び分化傾向を経時的に解析した(Fig.1 上段)。

## 【結果及び考察】

### 1. STAT5A 1\*6 遺伝子導入造血幹細胞移植によるPMFモデルの作製と評価

JAK2V617Fを遺伝子導入した造血幹細胞を移植したマウスの約半数(57%)は、移植後12週目までに末梢血における顕著な顆粒球系細胞の増殖傾向に代表されるMPNs表現系を示すと共に、赤血球増加、血小板増加に代表されるPV,ET様病態を呈し、PMF病態は呈さなかった。

一方、STAT5A 1\*6を遺伝子導入した造血幹細胞を移植したマウスの大半(93%)は、移植後8週目までにキメリズムの有意な上昇傾向と共に、顕著な顆粒球系細胞の増殖傾向に代表されるMPNs表現系を示した。更に、MPNsマウスの約94%は、PV,ET様病態を呈することなく、血小板減少、白赤芽球症、涙滴赤血球症に代表されるPMF病態を呈する事が明らかになった。この一方で、MPNsマウスの極一部(約6%)は、軽度のPV様病態を呈しつつ、MF病態へと移行する事が示唆された。続いて、病理解析結果から、本系により作製されたPMF病態を呈するマウスは、移植後4~8週という短期間で脾腫(髄外造血)を伴う重度の骨髓線維化を呈することが明らかになり、その病理像(骨髓線維化、骨髓における顆粒球系細胞及び異型巨核球の増加、脾腫、末梢血における顆粒球系細胞増加、白赤芽球症、涙滴及び破碎赤血球の出現、貧血、血小板減少など)は、WHO分類第4版が定めるヒトPMF症例に極めて酷似していることからPMFモデルと

しての高い有用性が示された(Fig.1 下段)。更に本 PMF モデルマウスでは、致死性の肺胞性出血を惹起する血小板減少が観察されたと共に、PMF マウス終末期の骨髄は、明瞭な細網線維に加えコラーゲン線維の増加、骨硬化が観察されることから本モデルが PMF 病態における中期から終末期(fibrotic phase, MF-1 ~ 3)までを模倣した advanced PMF モデルとしての有用性をも証明した。

## 2. PMF 発症機序の解明

本法にて作製した PMF マウスの骨髄切片において免疫染色を行った結果、CD41 陽性の小型(異型)巨核球の増殖が確認され、本細胞が主たる骨髄線維化因子である TGF- $\beta$  を産生していることを明らかにした。更に、この小型巨核球は PMF マウス骨髄内においてのみ観察され、STAT5A 1\*6 の発現量に比例して増殖していることが確認された。そこで、STAT5A により発現誘導される巨核球分化に関与する遺伝子として c-myc に着目し、その発現量を確認した結果、STAT5A 1\*6 発現が強い CD41 陽性細胞(GFP 陽性小型巨核球)においてのみ、有意な c-myc 発現量増加が確認された。過去の報告より、c-myc の発現上昇は巨核球・赤血球系前駆細胞において、巨核球分化を促すと同時に、巨核球の成熟(多核化)を阻害することが知られており(6)、PMF マウスにおける巨核球・赤血球系前駆細胞においても同様の分子機構が働いていると推察できる。つまり、PMF マウス骨髄内では、STAT5A 1\*6 造血幹細胞を起源とする骨髄系列細胞の異常増殖が起こった後、増殖した巨核球・赤血球系前駆細胞において STAT5A 1\*6 活性に起因する c-myc 発現上昇により、巨核球分化の促進と成熟阻害が起こった結果、小型(異型)巨核球が出現し、TGF- $\beta$  産生に起因する骨髄線維化及び血小板減少が惹起されると推察される。

## 3. PMF 病態及び疾患特性の解明

幹細胞疾患である MPNs において、疾患の起源となる MPNs initiating cell の性状解析を行う為、JAK2V617F 造血幹細胞由来 PV マウス及び STAT5A 1\*6 造血幹細胞由来 PMF マウスの全骨髄細胞を継代移植した結果、二次移植マウスにおいて JAK2V617F 造血幹細胞に起因する PV 病態は再構築されたものの、STAT5A 1\*6 造血幹細胞由来 PMF 病態は再現されず、骨髄の線維化も観察されなかった。また、PMF マウス(一次移植マウス)で観察された、STAT5A 1\*6 造血幹細胞特有の高い骨髄再構築能(キメリズム)も消失していることから、STAT5A 1\*6 造血幹細胞は一過性の強い増殖を示し、PMF initiating cell として機能するものの、最終的には過剰な細胞増殖に伴い疲弊する事で細胞内因性に幹細胞機能を失う事が示された。更に PMF 二次移植マウスの解析から、PMF マウス骨髄内においては、STAT5A 1\*6 造血幹細胞のみならず、残存する競合細胞由来の正常造血幹細胞までもが疲弊しており、幹細胞特性が著しく低下していることが明らかになった。つまり、造血幹細胞における STAT5A 異常活性化に起因する骨髄線維症を発症すると、線維化に伴う骨髄内微小環境の著しい変化により、残存する正常造血幹細胞が幹細胞としての機能を維持できず細胞外因性に疲弊する事が示唆された。以上の結果は、PMF 病態の特性が全造血幹細胞の疲弊に伴う”spent-phase of hematopoiesis”であることを強く示唆していると考えられる。

## 4. MPNs バイオマーカーとしての活性化 STAT5A の有用性

PMF 病態には、初期(prefibrotic phase)から終末期(fibrotic phase)へ向け段階的に進行することが知られている。そこで、PMF マウス末梢血中の各種細胞群における STAT5A 1\*6 発現量を定量解析した結果、顆粒球系細胞における STAT5A 1\*6 発現量と PMF 進行度の間に相関性があることが示された。本結果は、活性化 STAT5A(リン酸化 STAT5A)を定量解析することで、ヒト PMF におけるサロゲートバイオマーカーとして活用できる可能性を示唆している。

また、STAT5A 1\*6 造血幹細胞を移植した MPNs マウスの大半は、PMF 病態を呈するのに対

し、極一部の MPNs マウスは PV 様病態を呈した経緯から、血液細胞内における STAT5A 1\*6 の発現量が MPNs 病型を決定づける可能性が示唆された。以上の知見は、ET,PV,PMF という三疾患が血球細胞における STAT5A 活性化という共通分子基盤の上に成り立ち、STAT5A が最も強く活性化された際に PMF 病態を呈する可能性を示唆していると考えられる。

### 【総括】

PMF は比較的稀な疾患であり、病態や治療法に関して不明な点が多い。本研究ではヒト PMF 症例に酷似した PMF モデルマウスの作製に成功し、その詳細な解析から、PMF 発症機序、病態及び疾患特性の解明に成功した。以上の結果は、本 PMF モデルマウスの有用性を示すと共に、本モデルマウスが PMF における新規治療法の開発等にも貢献できる可能性を示したと考えられる。その一方で、末梢血中の顆粒球系細胞における活性化 STAT5A が PMF 進行度を示すバイオマーカーと成り得る可能性を示したことから、現在明確な診断基準を有さない PMF に対し、分子基盤に基づくサロゲートバイオマーカーの可能性も示したと考えている。

本研究を通し、造血幹細胞における強い STAT5A 活性が PMF 病態を引き起こすことは明らかになったものの、MPNs 病型選択における STAT5A の関連性については不明瞭な点を多く残している。我々のデータの一部は、STAT5A 活性化強度という観点において PMF が PV の上位に存在する可能性を示唆するものの、STAT5A 1\*6 発現強度の差異により PV,PMF 病型の選択が行われることは証明していない。以上の知見を踏まえ、STAT5A の活性化強度と MPNs 病型選択の関係性については、今後詳細な検討が必要な課題と考えている。

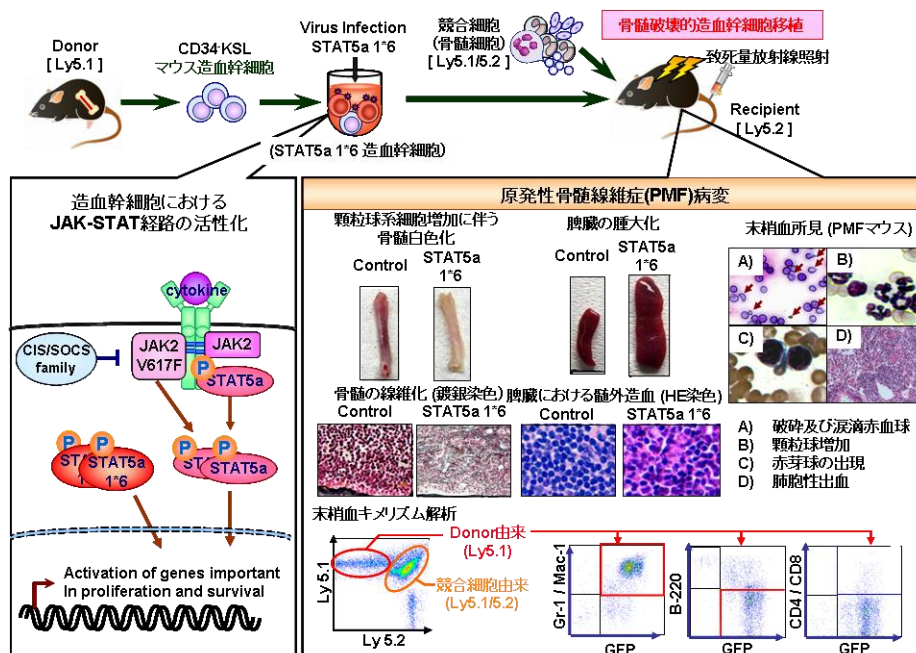


Fig.1 STAT5a 1\*6造血幹細胞移植による骨髄線維症モデルマウス作製法及び病態解析結果

### 【参考文献】

1. C. James *et al.*, *Nature* **434**, 1144 (Apr 28, 2005).
2. C. A. Smith, G. Fan, *Hum Pathol* **39**, 795 (Jun, 2008).
3. K. Shide *et al.*, *Leukemia* **22**, 87 (Jan, 2008).
4. H. Quantmeier *et al.*, *Leukemia* **22**, 2169 (Dec, 2008).
5. M. Onishi *et al.*, *Mol Cell Biol* **18**, 3871 (Jul, 1998).
6. A. Thompson *et al.*, *J Biol Chem* **271**, 22976 (Sep 20, 1996).