

骨髓線維症における単球由来fibrocyteの役割及び
その制御についての検討

まえ かわ たか あき
前 川 隆 彰

(血液病学専攻)

防衛医科大学校

平成30年度

目 次

第1章 緒言	1 頁
第2章 Thrombopoietin (TPO) 受容体活性化によるfibrocyteの分化誘導及び骨髄線維化の惹起	
第1節 背景	3 頁
第2節 対象および方法	4 頁
第3節 結果	11 頁
第4節 考察	16 頁
第5節 小括	18 頁
第3章 抗SLAMF7抗体によるfibrocyteの分化抑制及び骨髄線維化の軽減	
第1節 背景	19 頁
第2節 対象および方法	20 頁
第3節 結果	23 頁
第4節 考察	27 頁
第5節 小括	28 頁

第4章 考察	29頁
第5章 結論	32頁
謝辭	33頁
略語一覽	34頁
引用文献	36頁
図表	42頁

第1章 緒言

原発性骨髄線維症、真性多血症後骨髄線維症や、本態性血小板血症後骨髄線維症などは骨髄線維化、巨核球の過形成、貧血及び脾腫を特徴とする疾患である。

原発性骨髄線維症患者のほとんどはドライバー変異として *JAK2* 遺伝子、*calreticulin (CALR)* 遺伝子、*myeloproliferative leukemia (MPL: thrombopoietin receptor)* 遺伝子のいずれかに変異を有しているが¹⁾、遺伝子変異と骨髄線維化の発症機序との関連についての詳細は不明である。これまで原発性骨髄線維症における骨髄線維化は、腫瘍化した巨核球が放出する transforming growth factor beta (TGF- β) のような線維形成誘導性の増殖因子が、間葉系間質細胞を刺激することによって発症すると考えられてきた²⁾。実際に動物モデルにおいて TGF- β 1 が骨髄線維化の発症に重要であることを証明する研究結果も報告されている³⁾。しかしながら、platelet-derived growth factor、tumor necrosis factor- α 及び TGF- β といった線維形成誘導性のサイトカインを抑制する抗線維化薬である pirfenidone は、骨髄線維症患者の治療において全く症状改善効果を示さなかった⁴⁾。この事実は、骨髄線維症の発症機序が TGF- β 単独によるものではないことを示唆しており、その機序については未だに不明な点が多い。

最近の知見として、原発性骨髄線維症の発症に fibrocyte の腫瘍性クローンが必須であり、fibrocyte の分化を抑制する serum amyloid P (SAP)⁵⁾の投与が、原発性骨髄線維症患者の造血幹細胞を移植されたマウスにおいて骨髄線維化と生存を著明に改善したという報告がある⁶⁾。fibrocyte とは、CD14 陽性単球分画から分化する

紡錘形の線維芽細胞様の血液細胞である⁷⁾。fibrocyte は様々な組織の線維化を伴う疾患において線維化の誘導に関与していることが報告されており、代表的なものとしては肺線維症⁸⁾、動脈硬化症及び虚血性心疾患⁹⁾、肝線維症¹⁰⁾、腎線維症¹¹⁾、自己免疫疾患¹²⁾、そして原発性骨髄線維症⁶⁾などが挙げられる。具体的には、bleomycin を用いた肺線維症マウスモデルにおいては、末梢血中での fibrocytes の増加に引き続いて肺内での fibrocytes の増加が認められ、その推移は肺の線維化の進行と相関することが報告されている。さらに、特発性肺線維症の患者においても末梢血中の fibrocytes が健常ドナーと比較して増加しており、病勢の悪化に伴い fibrocytes がより増加することや、予後予測の指標となることなども報告されている⁸⁾。また、胆管結紮法による肝線維化マウスモデルにおいて、肝の障害部位に骨髄由来の fibrocyte が集簇しており、肝線維化の発症機序への関与が示唆されている¹⁰⁾。fibrocyte は間質細胞に特徴的なマーカー (collagen I、procollagen 及び collagen III) 及び造血細胞のマーカー (CD45、CD34、CD11b 及び CD68) の両方を発現しているが、これらは全て非特異的なマーカーである^{7, 13, 14)}。培養時の特徴的な形態を除けば fibrocyte に特異的なマーカーが同定されていないため、末梢血中の fibrocyte やその前駆細胞を同定することは困難であり、これが fibrocyte の研究を行う上での障害の一つとなっていた。

今回私達は、fibrocyte が骨髄線維症の発症及び進行に関わる機序を解明すること、さらには fibrocyte を制御することにより新しい機序の骨髄線維症の治療法を開発することを目指し、本研究を行った。

第2章 Thrombopoietin (TPO) 受容体活性化による fibrocyte の分化誘導及び骨髄線維化の惹起

第1節 背景

原発性骨髄線維症、真性多血症、本態性血小板血症などの骨髄増殖性腫瘍の患者の多くは *JAK2* 変異、*CALR* 変異、*MPL* 変異などのドライバー変異を有しているが、これらの変異は骨髄増殖性腫瘍クローンの増殖や分化に寄与している TPO シグナル経路を活性化することが知られている¹⁵⁾。TPO は巨核球や血小板産生の主要な調節因子であるとともに、造血幹細胞の増殖を促進させる因子でもあると考えられている¹⁶⁾。一方で、TPO シグナル経路は骨髄線維化にも深く関わっていることが示唆されている。TPO を過剰発現させた造血幹細胞を移植されたマウスは骨髄線維化や脾腫といった症状を呈することが報告されている¹⁷⁾。また、TPO 受容体である *MPL* を恒常的に活性化する変異を導入したマウスでは骨髄線維化が認められ¹⁸⁾、TPO 受容体作動薬である romiplostim (Rom) の投与は、ラットや免疫性血小板減少性紫斑病患者において骨髄線維化を発症させることが報告されている¹⁹⁾。これまでのコンセンサスにおいては、TPO は巨核球から放出される TGF- β などの線維形成誘導性の増殖因子などを介し、間接的に骨髄線維化を誘導すると考えられてきた²⁰⁾。そのため、TPO が直接的に線維化を誘導する経路については十分な検討がなされていなかった。

これまでの研究から、TPO 及び fibrocyte はいずれも骨髄線維症の発症において

一定の役割を果たしていることが示唆されてきたが、この両者の関係性については明らかではなく、これを解明することを本研究の目的とした。

第2節 対象および方法

(1) マウスのfibrocyte細胞株の樹立

私はシミアンウイルス40温度感受性ラージT抗原トランスジェニックマウス (SV40T mouse; FACT, Sendai, Japan) を用いて²¹⁾、マウスのfibrocyte細胞株の樹立を試みた。このマウスはC57BL/6 (B6) マウスをベースに、全身のすべての組織に安定かつ均一に温度感受性SV40ラージT抗原 (SV40T) 遺伝子が組み込まれており、33°Cの環境下ではこの遺伝子が活性化することにより細胞が不死化し、腫瘍性増殖を続ける。その機序は、SV40T遺伝子が癌抑制遺伝子であるP53や、細胞増殖を調節する網膜芽腫遺伝子産物であるretinoblastoma遺伝子と結合することによる²²⁾。37°CではSV40T遺伝子は不安定になり、腫瘍性増殖は停止する。

防衛医科大学校動物実験施設により承認されたプロトコールに従い、10週齢の雌のSV40Tマウスを安楽死させたのち、脾臓及び大腿骨を採取した。脾臓の細胞は100- μ m セルストレイナー (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて既報に従い回収した²³⁾。骨髄の細胞は、大腿骨断端からシリンジによりRoswell Park Memorial Institute (RPMI) - 1640培地 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を注入し、洗い流すことで回収した。脾臓及び骨髄の細胞は既報に従いBD Pharm Lyse (BD Bioscience) を用いて溶血させたのち、50 ng/mlのマウス interleukin (IL)-13 (PeproTec, Rocky Hill,

CT, USA) 及び 25 ng/mlのマウス macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) を添加した2 mlのDulbecco's modified eagle medium (DMEM) 培地 (Wako, Osaka, Japan) に懸濁し、3.5 cmの温度感受性細胞培養ディッシュ (CellSeed, Tokyo, Japan) に移した²³⁾。その後37°C、5% CO₂環境下のインキュベーター内で5日間培養し、紡錘形のfibrocyteの分化を確認した。この時点でディッシュをphosphate-buffered saline (PBS) で洗浄し浮遊細胞を除去するとともに、再度DMEM培地を添加して33°Cの環境下で培養を継続した。この環境下ではSV40T遺伝子の活性化により細胞の腫瘍性増殖が開始される。その後2~3週間でfibrocyteのコロニーが形成され、温度感受性ディッシュを20°Cで30分間冷却することによりそのコロニーを剥離し回収した。さらに限界希釈法を用いてクローンを単離し、これを再度33°Cで培養・増殖させることにより細胞株を樹立した。最終的に2種類の脾臓由来の細胞株と、2種類の骨髄由来の細胞株を樹立した。

(2) Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によるfibrocyte細胞株のMPL発現の確認

樹立した4種類のマウスfibrocyte細胞株に対し、RT-PCR法を用いてマウスMPLのmRNA発現の有無を評価した。使用したプライマーペアの構造は以下の通りである (sense primer, 5'-CTACTGCTGCTAAAGTGGCA-3' ; anti-sense primer, 3'-TATCGGTAACCGTGGCCTTA-5')。分子量マーカーとしてはmolecular-weight size marker λ-EcoT14 I digest (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いた。

(3) fibrocyte細胞株の蛍光免疫組織染色

骨髄由来fibrocyte細胞株をカバーガラス上で培養し、2%パラホルムアルデヒドで固定したのち、3%ウシ胎児血清を添加したTris Buffered Saline with Tween 20 (TBST) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) を用いてブロッキングを行った。その後、一次抗体として抗collagen I 抗体 (Rockland, Gilbertsville, PA, USA) を添加し4℃で一晩染色したのち、二次抗体としてFITC標識抗ウサギIgG抗体 (BioLegend, San Diego, CA, USA) を添加し室温で2時間、さらにDAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を添加し室温で10分間染色した。染色後のスライドは洗浄ののちBZ-X700 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて検鏡された。

(4) マウスfibrocyte細胞株の培養アッセイ

マウスfibrocyte細胞株のサイトカインに対する反応性を評価するため、6ウェルプレート (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) に 1×10^5 cells / well の細胞濃度で骨髄由来fibrocyte細胞株を撒き、マウスIL-13、マウスM-CSF及びRomを様々な組み合わせで添加したのちに37℃で培養を行った。4日間培養したのち、分化したfibrocyte (細長い紡錘形と卵形の核を呈した付着細胞と定義した) の全細胞に占める割合を既報に従いウェル毎に計測した²⁴⁾。計測は1ウェル毎に5つの異なった弱視野の範囲で行った。

(5) TPO受容体作動薬による骨髄線維症マウスモデルの作成及びclodronate

liposomesによる単球除去の効果

10週齢の雌のB6マウス (CLEA Japan, Tokyo, Japan) をコントロール群 ($n = 10$) とRom群 ($n = 10$) に分け、Rom群にはRom 1 mg/kg を、コントロール群には生理食塩水を、day 1, day 8及びday 15に頸部の皮下に投与した。また、day 1, day 8, day 15及びday 22にtail cuttingもしくは心臓採血による全血算測定を行った。さらに、day 8、day 15またはday 22に安楽死させたのち脾臓及び両側大腿骨の採取を行った。脾臓については重量を測定し、脾臓及び骨髄の細胞については前述の方法で回収した。骨髄についてはhematoxylin-eosin (HE) 染色、塗銀染色及び抗alpha-smooth muscle actin (α -SMA抗体) (DAKO, Tokyo, Japan) による染色を行ったのち、組織学的評価を行った。

また、マクロファージの除去を行う目的で、マウスをコントロール群 ($n = 23$) とclodronate liposomes (CLs) 群 ($n = 21$) に分け、CLs群にはCLs 300 μ l/body を、コントロール群にはcontrol liposomes 300 μ l/body を、day -4、day -1、day 4、day 7、day 10及びday 14に腹腔内に投与した。これらのマウスに対し、同時にday 1, day 8及びday 15にRom 1mg/kg の皮下注射を行い、day 8、day 15もしくはday 22に安楽死させたのち血液、脾臓及び大腿骨の採取を行った。コントロール群 9匹及びCLs群 8匹はday 8、コントロール群 10匹及びCLs群 9匹はday 15、コントロール群 4匹及びCLs群 4匹はday 22に安楽死させた。使用したマウスの匹数についてはPower and Sample Size Calculation version 3.1.2, 2014 (Department of Biostatistics, Vanderbilt

University, Nashville, TN, USA) を用いて決定した。骨髄の線維化の評価については、European Consensus Criteriaに準拠した²⁵⁾。さらに、マウスから採取した脾臓の細胞 1×10^6 個をIL-13とM-CSFを添加したDMEM培地 3 ml中で培養し、day 7時点でのfibrocyteのコロニー形成数を測定した。

(6) 骨髄線維症患者及び健常者からの末梢血検体の採取

本研究については防衛医科大学校の倫理審査委員会の承諾を得たのちに行われた。2015年1月から2016年12月の間に当科で骨髄線維症と診断された患者のうち文書による同意が得られた 10名及び、同じく文書による同意が得られた健常ドナー 5名より末梢血 10 mlの提供を受けた。

(7) ヒトfibrocyteの培養アッセイ

Pancoll (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) を用いた比重遠心法により、健常ドナーの末梢血 3 mlより 5×10^6 個の末梢血単核球を回収した。また、RosetteSep human monocyte enrichment cocktail (STEMCELL Technology, Vancouver, BC, Canada) 及びMACS MicroBeads and Isolation Kits (Miltenyi Biotech, Bergish Gladbach, Germany) を用いて健常ドナー末梢血 30 mlより 2×10^5 個のCD45⁺ CD14⁺ CD16^{high} signaling lymphocyte activation molecule family 7 (SLAMF7)^{high} 及び同数のCD45⁺ CD14⁺ CD16^{low} SLAMF7^{low} の細胞分画をソーティングした。末梢血単核球及びソーティングした細胞分画はDMEM培地、もしくはRom 500 ng/mlを添加した

DMEM培地に懸濁し、6ウェルプレート上で37°C、5%CO₂の環境下で4日間培養し、上清を回収した後、再度培地を添加して16日間培養し、前述の方法でfibrocyteの割合を計測した。

さらに、健常ドナーの末梢血単核球をRom 500 ng/mlを加えたDMEM培地で培養し、そこに 5 nM (通常JAK1とJAK2のみが抑制される濃度²⁶⁾) もしくは 500 nM (JAK3も抑制される濃度²⁶⁾) のJAK阻害剤であるruxolitinib (Rux) を添加した。これについても4日目に上清を回収した後再度培地及びRom、Ruxを添加して培養し、day 8にfibrocyteの割合を計測した。

(8) フローサイトメトリーによる解析

骨髓由来マウスfibrocyte細胞株 1×10^6 個を 10 μ lのfluorescence activated cell sorting (FACS) buffer (PBSに2%ウシ胎児血清及び0.05% NaN₃を添加) に懸濁した後、0.5 μ lのanti-mouse CD16/CD32 (eBioscience, San Diego, CA, USA) を添加しFc受容体ブロッキングを行った。引き続き、APC標識抗CD45抗体 (Miltenyi Biotec)、PE標識抗CD34抗体 (BioLegend)、PC5標識抗F4/80抗体 (eBioscience)、PE標識抗CD11b抗体 (eBioscience)、V450標識抗CD14抗体 (BD Biosciences)、V450標識 (BD Biosciences) またはAF647標識抗SLAMF7抗体 (Bioss, Woburn, MA, USA) を添加したFACS buffer 10 μ lに懸濁し、氷上で30分インキュベートした後FACS buffer 500 μ lで2回洗浄した。染色後の細胞はBD FACS Aria III (BD Biosciences) を用いて4カラーで解析を行った。また、同じ細胞株を用い、一次抗体としてビオチン標識抗CD68

抗体 (Bio-Rad, Oxford, UK) で染色した後、二次抗体としてPE標識ストレプトアビジン (eBioscience) で染色した。さらに、同じ細胞株に対して、BD Perm/Wash (BD Biosciences) を用いて細胞の固定及び透過処理を行い、ウサギ抗マウスcollagen I抗体 (Abcam, Cambridge, UK) で細胞内染色した後、二次抗体としてFITC標識ロバ抗ウサギIgG抗体 (BioLegend) で染色した。

ヒトfibrocyteはヒト末梢血単核球から分化させた後、温度感受性細胞培養ディッシュ (CellSeed) を20°Cで30分冷却することにより回収した。1 × 10⁶ 個のヒトfibrocyteを 10 µlのFACS bufferに懸濁し、5 µlのヒトBD Fc block (BD Biosciences) を添加してFc受容体ブロッキングを行った。引き続き、PB標識抗CD45抗体 (BioLegend)、AF647標識抗CD34抗体 (BioLegend)、V450標識抗CD11b抗体 (BD Biosciences)、PE標識抗CD14抗体 (Beckman Coulter, Tokyo, Japan)、PB標識抗CD16抗体 (BD Biosciences)、FITC標識抗CD3抗体 (Beckman Coulter) またはAPC標識抗SLAMF7抗体 (Miltenyi Biotec) を添加したFACS buffer 10 µlに懸濁し、氷上で30分インキュベートした後FACS buffer 500 µlで2回洗浄した。染色後の細胞はBD FACS Aria III (BD Biosciences) を用いて4カラーで解析を行った。また、ヒトfibrocyteに対して、BD Perm/Wash (BD Biosciences) を用いて細胞の固定及び透過処理を行い、FITC標識抗collagen I抗体 (Millipore, Darmstadt, Germany)、またはマウス抗procollagen type I抗体 (Millipore) 及びFITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (Dako) で細胞内染色した。また、ヒト末梢血 1 ml中のCD45⁺ CD14⁺ CD16^{high} SLAMF7^{high} 単球の絶対数を計測するため、CountBright absolute counting beads (Thermo Fisher

Scientific) を用いた。

(9) 統計解析

結果については、特に記載がなければ3回の独立した実験から得られたデータの平均 ± 標準偏差として報告した。統計学的有意差については、unpaired *t*-testもしくはone-way analysis of variance with a Bonferroni correctionを用いて検定した。すべての*P*値は両側検定を用いて、0.05未満を統計学的に有意差があるとみなした。データの描出及び統計解析にはGraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いた。

第3節 結果

(1) マウスfibrocyte細胞株の樹立とその表面抗原の発現パターン

私達はSV40Tマウスの脾臓から2種類、骨髄から2種類、計4種類のfibrocyte細胞株を樹立した。この細胞株は通常マウスのfibrocyteの誘導因子として用いられているIL-13とM-CSFの投与下で²³⁾、33°Cで培養することにより、ほとんどの細胞が特徴的な紡錘形を維持しながらモノクローナルなコロニーを形成しつつ増殖する (図1a)。この条件下での骨髄由来fibrocyte細胞株の増殖曲線を図1bに示す。37°Cの条件下では細胞株の増殖は止まり、4割程度の細胞が紡錘形を呈する。フローサイトメトリーによる解析では、これらの細胞株は古典的なfibrocyteのマーカであるcollagen I、CD45、CD34、CD11b及びCD68を発現していた⁷⁾ (図1c)。加えて、マク

ロファージのマーカであるF4/80及びCD16も発現していたが、CD14は陰性であった。

(2) マウス fibrocyte 細胞株はMPLを発現し、MPLの活性化は*in vitro*でマウス fibrocyteの分化を促進する

RT-PCR法を施行した骨髄由来マウス fibrocyte 細胞株2種類及び脾臓由来マウス fibrocyte 細胞株2種類の全てにおいて、TPO受容体であるMPLに対応する148bpの mRNAがPCRにより確認された (図2a)。なお、ポジティブコントロールとして用いたマウス骨髄有核細胞においてもMPLのmRNAが確認され、ネガティブコントロールとして用いた滅菌水においてはMPLのmRNAが生成されなかった。この結果から、マウス fibrocyte 細胞株はMPLを発現していると考えられた。

また、骨髄由来マウス fibrocyte 細胞株にRomを添加した結果、IL-13及びM-CSFのみを添加した細胞株と比較し、より細長い紡錘形とより強いcollagen Iの発現を呈する成熟した fibrocyte への分化を認めた (図2b)。培地のみで培養した場合、細胞株のうち紡錘形を呈する細胞は20%程度に過ぎないが、1.5 µg/mlのRomを添加すると、IL-13及びM-CSFを添加した場合と同程度の分化が認められた (図2c)。また、1 ng/ml以上の濃度でマウスTPOを添加した場合においても fibrocyte の分化が促進された (図2d)。加えて、マウスの脾臓の細胞にIL-13及びM-CSFを添加することによって fibrocyte を誘導する系に、さらにRomを追加することにより fibrocyte のコロニー形成数が増加することを見出した (図2e)。これらの結果から、マウスの fibrocyte は

MPLを発現しており、少なくとも*in vitro*ではMPLの活性化によりfibrocyteへの分化が促進されると考えられた。

(3) TPO受容体作動薬はB6マウスに短期間で骨髄線維症様の病態を誘導する

骨髄線維症発症時のfibrocyteの変化について評価するために、私達はマウスの骨髄線維症モデルを作成することを試みた。マウスにおいてTPOを過剰発現させることによって骨髄線維化を誘導できるという報告はあるが、発症までに数か月以上を要するとされる²⁷⁾。一方で、TPO受容体作動薬であるRomの大量投与によりラットにおいて骨髄線維症を誘導できるという報告もあったが¹⁹⁾、同様の方法でマウスに骨髄線維症を誘導できる投与量や投与スケジュールについてはこれまでに報告がなかった。私達は、1 mg/kgのRomを週1回投与することにより、10週齢の雌のB6マウス全てに2から3週間以内に骨髄線維症の病態を誘導できることを見出した。3週間のRomの投与により全例で重度の骨髄線維化 (European Consensus Criteria²⁵⁾においてmyelofibrosis (MF) -2以上) が誘導され (図3a)、血小板の増加と同様に著明な脾腫も認められた (図3b)。この方法で私達はB6マウスに骨髄線維症の病態を誘導し、これらのマウスを骨髄線維症マウスモデルとして以降の研究に使用することとした。

(4) CLsはfibrocyteの前駆細胞を除去し、Rom誘導性骨髄線維症を軽減する

私達は前述したマウスモデルを用いて、*in vivo*でのfibrocyteの変化について評価

した。CLsはマクロファージの除去に有用な薬剤であり、RamosらはCLsの投与が真性多血症のモデルマウスにおいて脾腫などの病態を改善することを報告している²⁸⁾。本研究では、CLsはRomによって誘導された重度の骨髄線維化、脾腫及び貧血が軽減することを明らかにした (図4abc)。また、CLsの投与により、2週間のRom投与を行ったマウスの大腿骨において α -SMA陽性細胞の消失を認めた。CLsの骨髄線維化抑制作用は、1週間のRom及びCLsの投与を行ったマウスよりも、2週間もしくは3週間のRom及びCLsの投与を行ったマウスの集団においてより顕著であった (表1)。

7日間の培養によって 1×10^6 個の脾臓の細胞から形成されるfibrocyteのコロニー数については、Rom群でコントロール群より有意に増加していた一方で、Rom+CLs群ではむしろコントロール群より減少していた (図4d)。脾細胞のフローサイトメトリーによる解析では、Rom群においてコントロール群と比較してCD16⁺F4/80⁺CD68⁺マクロファージの増加を認めたが、CLsの追加によってこの効果は消失した (図4e)。これらの所見から、RomによるTPO受容体の活性化はマクロファージを増加させ、*in vivo*においてもfibrocyteの分化を促進していると考えられた。

さらに、Rom群のマウスでは重度の骨髄線維化が出現していないday 8の時点で既に脾腫の出現を認めており、この脾腫はCLsの投与により完全に消失していた。この結果から、TPO受容体の活性化は直接的に脾臓の単球やマクロファージに作用し、骨髄線維化とは独立した機序で脾臓の髓外造血を誘導していることが示唆された。

(5) ヒト fibrocyte も MPL を発現しており、Rom の JAK2/STAT 経路を介した刺激によって分化が促進される

マウス fibrocyte と異なり、ヒト fibrocyte はサイトカインの添加を必要とせず、末梢血単核球から容易に分化する²⁹⁾。私達はフローサイトメトリーでヒト fibrocyte が典型的な抗原 (collagen I、procollagen、CD45、CD34、CD11b) に加え、MPL を発現していることを見出した (図5a)。Rom の添加は *in vitro* においてヒト末梢血単核球からの fibrocyte の分化を促進した (図5b)。さらに、5 nM 及び 500 nM の Rux の添加は Rom による fibrocyte の分化促進作用を抑制したが、通常の fibrocyte の分化自体は抑制しなかった (図5c)。これらの所見から、ヒトにおける TPO 受容体活性化の fibrocyte 分化促進効果は JAK2/STAT 経路を介して作用していると考えられた。

(6) ヒト末梢血単核球中の SLAMF7^{high} CD16^{high} 単球は骨髄線維症患者において増加している

ヒト fibrocyte 前駆細胞を他の CD14 陽性単球と判別する方法として、私達はヒト fibrocyte の新しいマーカーの探索を試みた。これまでに total RNA を用いたマイクロアレイ解析の結果、マクロファージと比較してヒト fibrocyte は SLAMF7 (CD319 または CRACC と呼ばれる) を強く発現しているという報告がある²⁹⁾。本研究においても、フローサイトメトリーによる解析の結果、マウス fibrocyte 細胞株及びヒト fibrocyte の両方で SLAMF7 の高発現が認められた (図6a)。また、フローサイトメトリーによる解析を行い、ヒト末梢血単核球中の CD14 陽性単球を SLAMF7^{high}

CD16^{high} 分画とSLAMF7^{low} CD16^{low} 分画に分離した (図6b)。さらに、両方の分画を培養した結果SLAMF7^{high} CD16^{high} 分画においてSLAMF7^{low} CD16^{low} 分画よりも有意に高率にfibrocyteの出現が認められた (図6c)。次に、骨髄線維症患者 10名と健常ドナー 5名の末梢血中のSLAMF7^{high} CD16^{high} 分画の絶対数を計測した。患者群の疾患の内訳は原発性骨髄線維症 2名、二次性骨髄線維症 8名 (原疾患の内訳は真性多血症 1名、本態性血小板血症 2名、骨髄異形成症候群 1名、非ホジキンリンパ腫 1名、多発性骨髄腫 2名、急性リンパ性白血病 1名)であった。これらの患者のうち、3名はRuxによる治療を受けていた。解析の結果、末梢血中のSLAMF7^{high} CD16^{high} 分画の絶対数は健常ドナーと比較して、Ruxによる治療を受けていない骨髄線維症患者においては有意に増加していたが、Ruxによる治療を受けた患者においては増加を認めなかった (図6d)。SLAMF7^{high} CD16^{high} 単球分画においてfibrocyteの分化が高頻度に認められたこと、また骨髄線維化患者においてSLAMF7^{high} CD16^{high} 単球分画の増加が認められ、*in vitro*ではRomによるfibrocyteの分化促進作用を消失させるRuxの投与を受けた患者においてはこの分画の増加を認めなかったことなどから、この分画はfibrocyteの前駆細胞を含んでいる可能性があると考えられた。

第4節 考察

前述の通り、TGF-βと骨髄線維化の関連性については以前から報告されているが、TPOとTGF-β、もしくはfibrocyteとTGF-βとの関連性についての報告もある。その中

には、TPOが巨核球を刺激してTGF- β を産生させ骨髄線維化を促進するという報告や^{20,30)}、fibrocyteが創傷部位においてTGF- β に反応してcollagen Iを産生するといった報告がある¹⁴⁾。一方本研究では、TPOの直接的な作用によりfibrocyteの分化が起こり、その結果、骨髄線維症の発症が引き起こされることを示した。これらを総合して考えると、TPOとTGF- β はfibrocyteの分化や骨髄線維症の発症において協調的に作用していることが推測される。

一方で、骨髄増殖性腫瘍においてはJAK2^{V617F}、MPL、CALRといった遺伝子変異が同定されている。これらのドライバー変異は恒常的にMPL-JAK/STAT経路を活性化させることにより骨髄線維化の発症に関与していると考えられているが、その正確な過程については未だ十分に解明されていない²⁾。本研究において、JAK阻害剤のRuxは*in vitro*でMPL活性化に伴うfibrocyteの分化促進効果を消失させ、この結果からMPL活性化はJAK2/STAT経路を介してfibrocyteの分化を促進していることが示唆された。しかしその一方で、JAK2^{V617F}、MPL、CALRといった遺伝子変異を導入してJAK2/STAT経路を恒常的に活性化させたトランスジェニックマウスは常に骨髄線維症を引き起こすわけではなく¹⁸⁾、骨髄線維症の発症の鍵となる因子の解明については今後の重要な課題である。

本研究はRomによるTPO受容体活性化が直接的に単球やマクロファージからfibrocyteへの分化を促進することを示し、またマクロファージを除去することによって骨髄線維症の病態が改善することを証明した。これらの観察結果から、私は骨髄線維化が腫瘍性と反応性の2つの機序で引き起こされるのではないかと推測した。

すなわち、腫瘍性の機序においては遺伝子変異による恒常的なTPO受容体活性化が骨髄増殖性腫瘍クローン由来の単球からfibrocyteへの分化を促進し、骨髄線維症を引き起こすのではないかと考えた。実際に、骨髄線維症患者における*JAK2*及び*CALR*の遺伝子変異解析により、腫瘍化したfibrocyteの存在が既に報告されている⁶⁾。一方で、二次性の骨髄線維症においては、TPO濃度の上昇が正常な単球からfibrocyteへの分化を促進し、反応性に骨髄線維化が生じているのではないかと考えた。事実、骨髄線維症患者や³¹⁾、本態性血小板血症、真性多血症及び二次性血小板増加症の患者における血清中のTPO濃度の上昇が報告されている³²⁾。これらの仮説を証明するため、私は骨髄増殖性腫瘍患者の末梢血からfibrocyteを分化させ、その遺伝子解析を行い腫瘍化の程度を評価する研究を進めている。一方で、二次性骨髄性線維症患者の血清中のTPOやSAPなどのサイトカインについても解析を計画している。

第5節 小括

本研究はfibrocyteとTPO/MPLシグナル経路を結びつけ、骨髄線維症の発症機序の一部を解明した。この成果は、骨髄線維症の新たな治療法の開発につながり得るものと考えられた。

第3章 抗SLAMF7抗体によるfibrocyteの分化抑制及び骨髄線維化の軽減

第1節 背景

骨髄線維症の発症にはサイトカイン濃度の上昇や細胞間の相互作用、遺伝子変異など様々な機序が関与していると考えられている。最近の知見として、原発性骨髄線維症の発症に腫瘍化したfibrocyteが必須であり、fibrocyteの分化を抑制するSAPの投与がマウスの異種移植モデルにおいて骨髄線維化と生存を著明に改善したという報告がある⁶⁾。私達はRom誘導骨髄線維症マウスモデルを用いて、TPO受容体の活性化が直接的にfibrocyteの分化を促進し、骨髄線維症を進行させることを報告した³³⁾。さらに、total RNAを用いたマイクロアレイによる解析の結果から、ヒトfibrocyteではSLAMF7という抗原がマクロファージと比較して高発現していることが明らかになった²⁹⁾。Elotuzumab (Elo) は再発難治性の多発性骨髄腫の治療薬として臨床応用されている抗SLAMF7抗体薬であり、その有効性と人体への安全性は既に確認されている他、natural killer (NK) 細胞上のSLAMF7受容体とも結合して相乗効果を示すことが報告されている³⁴⁾。本研究では、Eloの骨髄線維症の治療薬としての有効性について検証するため、*in vitro*及び*in vivo*でEloがfibrocyteの分化に与える影響について評価した。

第2節 対象および方法

(1) 骨髄線維症患者及び健常者からの末梢血検体の採取

本研究については防衛医科大学校の倫理審査委員会の承諾を得たのちに行われた。2015年1月から2018年3月の間に当科で骨髄線維症と診断された患者のうち、文書による同意が得られた 24名 (Ruxの投与歴なし) 及び、同じく文書による同意が得られた健常ドナー 6名より末梢血 10 mlの提供を受けた。なお、NK細胞を純化する実験では同意の得られた健常ドナー 1名より末梢血 40mlの提供を受けた。

(2) フローサイトメトリーによる末梢血中のSLAMF7^{high} CD16⁻ 単球の解析

骨髄線維症患者及び健常ドナーの末梢血 1 mlより回収された末梢血単核球を10 µlのFACS bufferに懸濁し、5 µlのヒトBD Fc block (BD Biosciences) を添加してFc受容体ブロッキングを行った。引き続き、FITC標識抗CD14抗体 (Beckman Coulter)、PB標識抗CD16抗体 (BD Biosciences)、PE標識抗CD66b抗体 (Miltenyi Biotec)及びAPC標識抗SLAMF7抗体 (Miltenyi Biotec) を添加したFACS buffer 10 µlに懸濁し、氷上で30分インキュベートした後FACS buffer 500 µlで2回洗浄した。染色後の細胞はBD FACS Aria III (BD Biosciences) を用いて4カラーで解析を行った。

(3) fibrocyteの分化に対するElo及びNK細胞投与の効果

健常ドナーの末梢血より比重遠心法を用いて末梢血単核球を回収し、 3×10^6 cells/mlの濃度でDMEM培地に懸濁したのち、6ウェルプレート上で37°C、5%CO₂

の環境下で培養した。また、RossetteSep human NK cell enrichment cocktail (STEMCELL Technology) を用いて健常ドナー末梢血 40 mlより 6×10^6 個のNK細胞をソーティングした。その後day 4に上清を回収したのち、①培地のみ、②NK細胞、③Elo、④NK細胞 + Eloの4群に分けた。Eloの濃度は 1500 $\mu\text{g/ml}$ 、NK細胞の濃度は 2×10^5 cells/mlとした。day 8にも同様の処置を行い、day 8、day 9、day 10にfibrocyteの割合を計測した。

(4) fibrocyteの分化に対するEloの長期投与の効果

健常ドナーの末梢血より比重遠心法を用いて末梢血単核球を回収し、 3×10^6 cells/mlの濃度でDMEM培地に懸濁したのち、6ウェルプレート上で37°C、5%CO₂の環境下で培養した。培養開始の際に、①培地のみ、②Elo 50 $\mu\text{g/ml}$ 、③Elo 100 $\mu\text{g/ml}$ の3群に分けた。Eloの濃度については、100 $\mu\text{g/ml}$ は多発性骨髄腫患者に 10 mg/kgの投与量で週1回投与したときの血中濃度、50 $\mu\text{g/ml}$ は同じ投与量で2週に1回投与したときの血中濃度に準じて設定した³⁵⁾。その後、day 4に上清を回収したのち同じ組成の培地を添加し、以降は4日毎に同様の培地交換をday 28まで行った。また、培地交換時にfibrocyteの割合を計測した。

(5) fibrocyteの分化に対するEloと他の薬剤の相互作用

健常ドナーの末梢血より比重遠心法を用いて末梢血単核球を回収し、 3×10^6 cells/mlの濃度でDMEM培地に懸濁したのち、6ウェルプレート上で37°C、5%CO₂

の環境下で培養した。培養開始の際に、①Rom、②Rom + Elo、③Rom + Elo + Rux、④Rom + interferon alpha 2 (IFN α 2) の4群に分けた。Romの濃度は 500 ng/ml、Eloの濃度は100 μ g/ml、Ruxの濃度は 500 nM、IFN α 2の濃度は 10 ng/mlとした。その後、day 4に上清を回収したのち同じ組成の培地を添加し、day 8、day 9、day 10及びday 11にfibrocyteの割合を計測した。

(6) Humanised NOD/Shi-scid-IL2R γ nullマウス (hNOGマウス) を用いた骨髄線維症マウスモデルに対するElo投与の効果

EloはマウスのSLAMF7に対する反応性がないため、動物モデルを使用するためにはヒト造血細胞を移植した異種移植マウスを使用する必要がある。そのため本研究では、NOD/Shi-scidマウスにIL-2R γ 鎖ノックアウトマウスのIL-2R γ null遺伝子を戻し交配によって導入したNOGマウスに対し、ヒト臍帯血 (Allcells, Chicago, USA) を移植したhNOGマウス (In-Vivo Science, Tokyo, Japan) を使用した。hNOGマウスは8週齢のNOGマウスに 2.5 Gyの放射線照射を行ったのち、24時間後に 1×10^5 cells/bodyのヒト臍帯血を移植し、単球の生着が十分に認められる移植後20週まで飼育したのち本研究に用いられた³⁶⁾。

薬剤投与開始前にhNOGマウスをコントロール群 (n = 5) とElo群 (n = 7)に分け、コントロール群には生理食塩水 100 μ lを、Elo群には生理食塩水 100 μ lにElo 100 μ g/kgを溶解したものをday -7、day 1、day 8に静脈注射した。また、両群にday 1にRom 1 mg/kgを皮下注射した (図7)。全てのマウスはday 15に安楽死させたのち、

心臓採血と脾臓及び両側大腿骨の採取を行った。脾臓については重量を測定し、脾臓及び骨髄の細胞については前述の方法で回収した。骨髄についてはHE染色、塗銀染色及び抗 α -SMA抗体 (DAKO) による染色を行ったのち、組織学的評価を行った。

マウスの末梢血及び脾臓の細胞についてはフローサイトメトリーを用いて表面抗原の解析を行った。末梢血及び脾臓の細胞はBD Pharm Lyse (BD Bioscience) を用いて溶血させたのち10 μ lのFACS bufferに懸濁し、5 μ lのヒトBD Fc block (BD Biosciences) を添加してFc受容体ブロッキングを行った。引き続き、PE標識抗CD14抗体 (Beckman Coulter)、PB標識抗CD45抗体 (BioLegend) 及びAPC標識抗SLAMF7抗体 (Miltenyi Biotec) を添加したFACS buffer 10 μ lに懸濁し、氷上で30分インキュベートした後FACS buffer 500 μ lで2回洗浄した。染色後の細胞はBD FACS Aria III (BD Biosciences) を用いて解析した。

第3節 結果

(1) 骨髄線維症患者では健常ドナーと比較し末梢血中のSLAMF7^{high} CD16⁻ 単球の割合が増加している

フローサイトメトリーを用いて骨髄線維症患者及び健常ドナーの末梢血単核球の表面抗原解析を行い、CD14⁺ CD66b⁻ の分画を単球とみなした。この単球をSLAMF7とCD16で展開し、第2章と同様にSLAMF7^{high} CD16⁺ の単球分画の絶対数の解析を試みた。その際に、骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasm; MPN) を

除く骨髄線維症患者群 (non-MPN群) ではSLAMF7^{high} CD16⁺ の単球分画が増加していたが、骨髄増殖性腫瘍に伴う骨髄線維症患者群 (MPN群) においては、SLAMF7^{high} CD16⁻ の単球分画が著明に増加していることを見出した (図8a)。このCD14⁺ CD66b⁻ 単球中のSLAMF7^{high} CD16⁺ 分画とSLAMF7^{high} CD16⁻ 分画の絶対数について健常ドナー群 (n = 6) とRuxの投与歴のない骨髄線維症患者群 (non-MPN群 n=9、MPN群 n=15) で比較した。その結果、SLAMF7^{high} CD16⁺ 単球分画については、健常ドナー群と比較しnon-MPN群において有意な絶対数の増加を認めたが ($p < 0.05$)、MPN群では変化を認めなかった (図8b)。一方で、SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球分画については、健常ドナー群と比較しnon-MPN群とMPN群の両群において有意な絶対数の増加を認めた ($p < 0.01$) (図8c)。

(2) Eloはfibrocyteの分化を抑制し、NK細胞はその抑制作用を増強する

EloはIL-2及びTNF- α 経路を介してNK細胞の抗腫瘍作用を活性化することにより、多発性骨髄腫細胞に対する抗腫瘍効果を高めることが知られており³⁷⁾、Eloの効果に加えてNK細胞との相互作用についても評価した。ヒト末梢血単核球から分化したfibrocyteの割合について計測した結果、day 8、day 9、day 10の全ての時点において、①コントロール群と比較し、②NK細胞群では有意にfibrocyteの割合が増加しており、反対に③Elo群及び④Elo + NK細胞群では有意にfibrocyteの割合が減少していた ($p < 0.05$) (図9)。また、day 8及びday 9においては③Elo群と比較し、④Elo + NK細胞群において有意にfibrocyteの割合が減少していた。これらの結果から、Eloはin

*in vitro*においてヒト fibrocyteの分化を抑制し、NK細胞はその抑制作用を増強するが、NK細胞単独ではむしろfibrocyteの分化を促進することが示唆された。

(3) Eloは長期にわたり fibrocyteの分化を抑制する

Eloを現在臨床応用されている用法用量で投与した場合の患者の血中濃度に基づき、約1か月間*in vitro*で投与を続けたところ、ヒト末梢血単核球から分化する fibrocyteの割合は、②Elo 50 µg/ml群においても③Elo 100 µg/mlにおいても同様に①コントロール群と比較して有意に減少した ($p < 0.05$) (図10)。②Elo 50 µg/ml群と③Elo 100 µg/ml群の間でfibrocyteの割合に有意差は認めなかった。この結果から、Eloは持続的に投与することで長期間にわたってfibrocyteの分化を抑制できることが示唆された。

(4) fibrocyteの分化に対するEloと他の薬剤の相互作用

DMEMにRomを添加した培地を用いてヒト末梢血単核球を培養し、これらに対してEloの他、臨床で骨髄増殖性腫瘍の治療に用いられているRux及びIFN α 2を添加することにより、fibrocyteの分化に与える影響について評価した。その結果、分化したfibrocyteの割合はday 8、day 9、day 10、day 11の全ての時点で①Rom群と比較し、②Rom + Elo群、③Rom + Elo + Rux群及び④Rom + IFN α 2群において有意に減少していた ($p < 0.05$) (図11)。しかし、Ruxは*in vitro*でRomのfibrocyte分化促進作用を阻害するにも関わらず³³⁾、③Rom + Elo + Rux群でのfibrocyteの分化抑制効果は②Rom

+ Elo群と比べて有意に弱く ($p < 0.05$)、この結果からEloがRuxによって阻害されるようなシグナル伝達経路を介してfibrocyteの分化を抑制していることが示唆された。一方で、④Rom + IFN α 2群では最もfibrocyteの分化が抑制されていたが、同時に細胞毒性も最も強く、大半の細胞が死滅していた。

(5) Elo投与は骨髄線維症マウスモデルにおいて骨髄線維化及び脾腫を軽減する

本研究では異種移植を行ったhNOGマウスにRomを投与することにより作成した、ヒト造血細胞を持つ骨髄線維症マウスモデルを用いて、*in vivo*でのEloの効果について検証した。Eloの投与はRomによって誘導された骨髄全体に及ぶ重度の骨髄線維化を軽減したが、局所的に強い線維化の残存を認めた (表2、図12)。また、脾臓重量はElo群でコントロール群と比較し有意に軽く ($p < 0.01$)、Romによる脾腫の軽減が示唆された (図13a)。さらに、フローサイトメトリーによる解析では、Elo群においてコントロール群と比較し末梢血中及び脾臓細胞中のCD45⁺ CD14⁺ 単球のSLAMF7の発現強度が有意に低く ($p < 0.01$)、EloがSLAMF7を高発現した単球を選択的に除去していることを示唆していた(図13bc)。これらの所見から、EloはSLAMF7を高発現した単球を選択的に除去することにより、*in vivo*においてもfibrocyteの分化を抑制し骨髄線維化や脾腫を軽減することが示された。

第4節 考察

SLAMF7はCD319、CS1、19A24、novel Ly9、CRACCとも呼ばれる 66 kDaの糖蛋白で、SLAM superfamilyの一員である³⁸⁾。SLAMF7の発現は造血細胞に限定されており、形質細胞やNK細胞、CD8⁺ T細胞及び形質細胞様樹状細胞に発現している他、休止期のB細胞、CD4⁺ T細胞及び単球においてわずかに発現している³⁹⁾。一方でSLAMF7の発現は活性化したB細胞、CD4⁺ T細胞、単球由来樹状細胞及び単球において増加することが知られており⁴⁰⁾、このことからSLAMF7は免疫調節において何らかの役割を果たしていると考えられているが、その機能については未だ解明されていない点が多い。

私達は第2章でヒト及びマウスのfibrocyteの細胞表面にSLAMF7が高発現していることを示した。加えて、本研究で骨髄線維症患者の末梢血中の単球においてSLAMF7を高発現する分画が有意に増加していることを見出した。一方で、抗SLAMF7ヒト化モノクローナル抗体であるEloは既に多発性骨髄腫の治療薬として臨床応用されており、有効性と安全性が証明されている³⁴⁾。このことから、Eloが骨髄線維症の治療薬として使用できる可能性を考え、本研究ではEloの*in vitro*及び*in vivo*におけるfibrocyteに対する分化抑制効果及び骨髄線維症に対する症状改善効果について検証した。Eloは*in vitro*で 50 µg/ml以上の濃度においてヒト単球からfibrocyteへの長期的な分化抑制効果を示し、NK細胞の添加はその抑制効果を増強した。一方で、RuxはEloの作用をむしろ減弱し、Ruxで阻害されるシグナル伝達経路がEloの作用機序に関与していると考えられた。さらに、*in vivo*ではEloはヒト臍帯

血を移植した異種移植マウスを用いた骨髄線維症モデルに対し、骨髄線維化や脾腫の軽減作用を示した他、脾臓や末梢血中の単球のSLAMF7の発現も減弱させた。これらの結果から、EloはSLAMF7を高発現しているfibrocyteを選択的に除去し、骨髄線維症の病態を改善させ得る可能性が示唆された。

今後は、SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球分画をソーティングして、この分画の由来 (正常細胞由来か骨髄増殖性腫瘍クローン由来か) や、fibrocyteへの分化指向性 (SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球分画とその他の分画でどちらがfibrocyteへ分化する割合が多いか) などについて検証していく方針である。また、現在骨髄線維化の有無や程度については骨髄生検を施行する他に診断方法がないため、SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球分画の絶対数や割合を骨髄線維化の代替マーカーとして利用することで、末梢血所見から骨髄線維化の評価ができるような検査法の確立についても検討していく。

第5節 小括

健常ドナーと比較し、骨髄線維症患者において末梢血中のSLAMF7^{high} CD16⁻ 単球の割合は有意に増加していた。また、Eloは*in vitro*でfibrocyteの分化を有意に抑制し、その作用は何らかのシグナル伝達経路に依存しているものと考えられた。さらに、Eloを投与されたhNOGマウスの骨髄線維症モデルでは、骨髄線維化及び脾腫の軽減が認められた。

第4章 考察

近年、Verstovsekらはヒト fibrocyte の分化阻害剤である SAP を骨髄線維症患者の骨髄細胞を移植された異種移植マウスに対して投与することで、骨髄線維化の進行が抑制され、生存期間が有意に延長することを報告した⁶⁾。この結果は fibrocyte が骨髄線維化の発症機序の主要な部分を占めていることを示唆している。骨髄線維症患者に対する臨床試験において、SAP は35%の患者において1グレード以上の骨髄線維化の改善を示した⁴⁾。私達も fibrocyte と骨髄線維症の関係性に着目して研究を続けてきたが、この分野で研究を行う上で以下に記すようないくつかの問題に直面した。「紡錘形で線維芽細胞様の性質を持つ単球由来の fibrocyte」という概念は1994年にすでに Bucala らによって提唱されていたにも関わらず¹³⁾、単球やマクロファージから fibrocyte を区別する形態以外の決定的なマーカーは未だに存在していない。Pillingらはヒトの単球、マクロファージ、線維芽細胞及び fibrocyte を判別するためのマーカーを同定する目的で、免疫組織化学染色の手法を用いて100種類近いマーカーについて検証を行った。しかし、最終的には単球から fibrocyte への分化早期の有用な表面マーカーは見出せず、形態学的な変化(紡錘型を呈すること)が最も有用であるという結論に至った⁷⁾。また、最初の報告から20余年が経過しているにも関わらず未だに fibrocyte の効率的な分化、増殖方法は見つかっておらず、純度が高い fibrocyte を十分な量準備するのは非常に困難であった。しかしながら、私達は fibrocyte の研究を進める基礎として4種類マウス fibrocyte 細胞株を得ることができた。今後この細胞株に対して次世代シーケンシングなどの手法によ

る解析を加えることで、fibrocyte の特異的なマーカーや分化に関わる遺伝子などの解明を計画している。

一方、total RNA を用いたマイクロアレイによって、ヒトのマクロファージよりも fibrocyte においてより強く SLAMF7 が発現しているという報告があり²⁹⁾、本研究においてもヒト及びマウスの fibrocyte の細胞表面に SLAMF7 が高発現していることを示した。SLAMF7 は多発性骨髄腫の細胞表面に高頻度で発現している表面抗原であり、抗 SLAMF7 ヒト化モノクローナル抗体である Elo はすでに多発性骨髄腫の治療薬として臨床応用されており、有効性と安全性が証明されている³⁴⁾。具体的には、Elo は1週間もしくは2週間に1度の点滴静注として投与されており、Grade 2 以内の輸注反応とリンパ球減少を除けば重篤な有害事象は少なく、高齢者にも比較的安全に投与できる薬剤と考えられている。一方、原発性骨髄線維症に対する治療薬である Rux は内服投与の薬剤であるが、貧血などの有害事象に加え、急に投与を中断すると発熱などの離脱症状が出現することが知られており、また骨髄線維化そのものに対する短期的な治療効果は明らかではない。欧米では同疾患に対して interferon の皮下注射も用いられるが、長期投与によりうつ病、視力障害、間質性肺炎、甲状腺機能異常、耐糖能障害など様々な有害事象の発生が懸念され、やはり骨髄線維化に対する治療効果については確立していない。現在 fibrocyte を標的とした治療は抗線維化療法のトピックであり、第3章に示した研究では *in vitro* 及び *in vivo* での Elo の fibrocyte に対する分化抑制効果及び骨髄線維症に対する症状改善効果について検証した。結果として Elo は *in vitro* でヒト単球から fibrocyte

への分化抑制効果を示し、*in vivo* でヒト臍帯血を移植した異種移植マウスを用いた骨髄線維症モデルに対し脾腫や骨髄線維化の軽減作用を示した。また、骨髄線維症患者において健常ドナーと比較して SLAMF7 を高発現した単球の割合が増加していることを見出したが、その後研究を進めた結果、この SLAMF7 高発現単球の割合が *JAK2V617F* 陽性の MPN 患者において有意に上昇しており、その中でも骨髄線維化を伴う患者においてさらに高値を示すことを確認した。また、SLAMF7 高発現単球の割合は、患者の末梢血単核球中の *JAK2 allele burden* や、末梢血単核球から培養した fibrocyte の *JAK2 allele burden* と有意な相関を示した。さらに、SLAMF7 高発現単球をソーティングして *JAK2 allele burden* を測定したところ、その値は 90% 以上を超え、*JAK2V617F* 陽性の MPN 患者の SLAMF7 高発現単球は、そのほとんどが *JAK2V617F* が homozygous に陽性となった腫瘍クローンであることが示唆された。加えて、*JAK2V617F* 陽性 MPN 患者の SLAMF7 高発現単球は、同じ患者の SLAMF7 を高発現していない単球と比べて有意に fibrocyte に分化する傾向が強く、SLAMF7 高発現単球が腫瘍化した fibrocyte へと分化することにより、骨髄線維化の発症が助長されていることが示された。さらに、異種移植マウスモデルにおいて Elo の投与は SLAMF7 を高発現した単球分画を減少させたことから、次の段階として骨髄線維症患者に対する Elo の安全性及び有効性を検証する臨床研究を検討している。

第5章 結論

単球由来の fibrocyte が骨髄線維症発症に関わる機序について研究を行った。また、薬剤を用いた fibrocyte の除去もしくは分化抑制により骨髄線維症が軽減されることを証明した。本研究は、骨髄線維症の機序の解明及び新しい作用機序を介した治療開発に資するものと考ええる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究において御指導、御高閲を賜りました、防衛医科大学校内科学講座教授 木村文彦先生に深甚なる感謝の意を表します。また終始懇切に多大なる直接の御指導、御高閲を賜りました防衛医科大学校内科学講座講師 佐藤謙先生、同助教 大澤有紀子先生に感謝の意を表しますとともに、多岐にわたってご助力頂きました防衛医科大学校内科学講座の皆さまに謝意を表します。

本論文第2章の主旨はLeukemia. 2017; 31: 2709-2716.で発表した。

略語一覧

α -SMA: alpha-smooth muscle actin

B6: C57BL/6

BM: bone marrow

CALR: calreticulin

CLs: clodronate liposomes

DDW: deionized distilled water

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

Elo: elotuzumab

FACS: fluorescence activated cell sorting

HE: hematoxylin-eosin

hNOG: humanised NOD/Shi-scid-IL2R γ null

IFN: interferon

IL: interleukin

M-CSF: macrophage colony-stimulating factor

MF: myelofibrosis

MM: molecular marker

MPL: myeloproliferative leukemia

MPN: myeloproliferative neoplasm

NK: natural killer

PBS: phosphate-buffered saline

Rom: romiplostim

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

Rux: ruxolitinib

SAP: serum amyloid P

SLAMF7: signaling lymphocyte activation molecule family 7

TBST: Tris Buffered Saline with Tween 20

TGF- β : transforming growth factor beta

TPO: thrombopoietin

引用文献

1. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014;28(7):1472-7.
2. Zahr AA, Salama ME, Carreau N, Tremblay D, Verstovsek S, Mesa R, et al. Bone marrow fibrosis in myelofibrosis: pathogenesis, prognosis and targeted strategies. *Haematologica*. 2016;101(6):660-71.
3. Mascarenhas J, Li T, Sandy L, Newsom C, Petersen B, Godbold J, et al. Anti-transforming growth factor-beta therapy in patients with myelofibrosis. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(2):450-2.
4. Mesa RA, Tefferi A, Elliott MA, Hoagland HC, Call TG, Schroeder GS, et al. A phase II trial of pirfenidone (5-methyl-1-phenyl-2-[1H]-pyridone), a novel anti-fibrosing agent, in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 2001;114(1):111-3.
5. Pilling D, Buckley CD, Salmon M, Gomer RH. Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P. *J Immunol*. 2003;171(10):5537-46.
6. Verstovsek S, Manshour T, Pilling D, Bueso-Ramos CE, Newberry KJ, Prijic S, et al. Role of neoplastic monocyte-derived fibrocytes in primary myelofibrosis. *J Exp Med*. 2016;213(9):1723-40.
7. Pilling D, Fan T, Huang D, Kaul B, Gomer RH. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts.

PLoS One. 2009;4(10):e7475.

8. Mehrad B, Strieter RM. Fibrocytes and the pathogenesis of diffuse parenchymal lung disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(Suppl 1):S22.

9. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. The role of fibrocytes in fibrotic diseases of the lungs and heart. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011;4:2.

10. Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol*. 2006;45(3):429-38.

11. Reich B, Schmidbauer K, Rodriguez Gomez M, Johannes Hermann F, Gobel N, Bruhl H, et al. Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model. *Kidney Int*. 2013;84(1):78-89.

12. Reilkoff RA, Bucala R, Herzog EL. Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(6):427-35.

13. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med*. 1994;1(1):71-81.

14. Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol*. 2001;166(12):7556-62.

15. Hitchcock IS, Kaushansky K. Thrombopoietin from beginning to end. *Br J Haematol*. 2014;165(2):259-68.

16. Ku H, Yonemura Y, Kaushansky K, Ogawa M. Thrombopoietin, the ligand for the Mpl

- receptor, synergizes with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice. *Blood*. 1996;87(11):4544-51.
17. Villeval JL, Cohen-Solal K, Tulliez M, Giraudier S, Guichard J, Burstein SA, et al. High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood*. 1997;90(11):4369-83.
18. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):e270.
19. Kuter DJ, Mufti GJ, Bain BJ, Hasserjian RP, Davis W, Rutstein M. Evaluation of bone marrow reticulin formation in chronic immune thrombocytopenia patients treated with romiplostim. *Blood*. 2009;114(18):3748-56.
20. Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, Ishii T, Zhao Y, Hu W, et al. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2007;110(3):986-93.
21. Yanai N, Suzuki M, Obinata M. Hepatocyte cell lines established from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Exp Cell Res*. 1991;197(1):50-6.
22. Obinata M. Conditionally immortalized cell lines with differentiated functions established from temperature-sensitive T-antigen transgenic mice. *Genes Cells*. 1997;2(4):235-44.

23. Crawford JR, Pilling D, Gomer RH. Improved serum-free culture conditions for spleen-derived murine fibrocytes. *J Immunol Methods*. 2010;363(1):9-20.
24. Pilling D, Vakil V, Gomer RH. Improved serum-free culture conditions for the differentiation of human and murine fibrocytes. *J Immunol Methods*. 2009;351(1-2):62-70.
25. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005;90(8):1128-32.
26. Quintas-Cardama A, Vaddi K, Liu P, Manshouri T, Li J, Scherle PA, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115(15):3109-17.
27. Yan XQ, Lacey D, Fletcher F, Hartley C, McElroy P, Sun Y, et al. Chronic exposure to retroviral vector encoded MGDF (mpl-ligand) induces lineage-specific growth and differentiation of megakaryocytes in mice. *Blood*. 1995;86(11):4025-33.
28. Ramos P, Casu C, Gardenghi S, Breda L, Crielgaard BJ, Guy E, et al. Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and beta-thalassemia. *Nat Med*. 2013;19(4):437-45.
29. Hashimoto M, Nasser H, Bhuyan F, Kuse N, Satou Y, Harada S, et al. Fibrocytes differ from macrophages but can be infected with HIV-1. *J Immunol*. 2015;195(9):4341-50.
30. Chagraoui H, Komura E, Tulliez M, Giraudier S, Vainchenker W, Wendling F. Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood*.

2002;100(10):3495-503.

31. Wang JC, Chen C, Lou LH, Mora M. Blood thrombopoietin, IL-6 and IL-11 levels in patients with agnogenic myeloid metaplasia. *Leukemia*. 1997;11(11):1827-32.

32. Cerutti A, Custodi P, Duranti M, Noris P, Balduini CL. Thrombopoietin levels in patients with primary and reactive thrombocytosis. *Br J Haematol*. 1997;99(2):281-4.

33. Maekawa T, Osawa Y, Izumi T, Nagao S, Takano K, Okada Y, et al.

Myeloproliferative leukemia protein activation directly induces fibrocyte differentiation to cause myelofibrosis. *Leukemia*. 2017;31(12):2709-16.

34. Jakubowiak A, Offidani M, Pegourie B, De La Rubia J, Garderet L, Laribi K, et al.

Randomized phase 2 study: elotuzumab plus bortezomib/dexamethasone vs bortezomib/dexamethasone for relapsed/refractory MM. *Blood*. 2016;127(23):2833-40.

35. Gibiansky L, Passey C, Roy A, Bello A, Gupta M. Model-based pharmacokinetic analysis of elotuzumab in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2016;43(3):243-57.

36. Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, et al.

Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2Rgamma null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood*. 2007;109(1):212-8.

37. Balasa B, Yun R, Belmar NA, Fox M, Chao DT, Robbins MD, et al. Elotuzumab enhances natural killer cell activation and myeloma cell killing through interleukin-2 and

TNF-alpha pathways. *Cancer Immunol Immunother.* 2015;64(1):61-73.

38. Cannons JL, Tangye SG, Schwartzberg PL. SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:665-705.

39. Hsi ED, Steinle R, Balasa B, Szmania S, Draksharapu A, Shum BP, et al. CS1, a potential new therapeutic antibody target for the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2008;14(9):2775-84.

40. Tai YT, Dillon M, Song W, Leiba M, Li XF, Burger P, et al. Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu. *Blood.* 2008;112(4):1329-37.

41. Duffield JS, Lopher ML, Jr. PRM-151 (recombinant human serum amyloid P/pentraxin 2) for the treatment of fibrosis. *Drug News Perspect.* 2010;23(5):305-15.

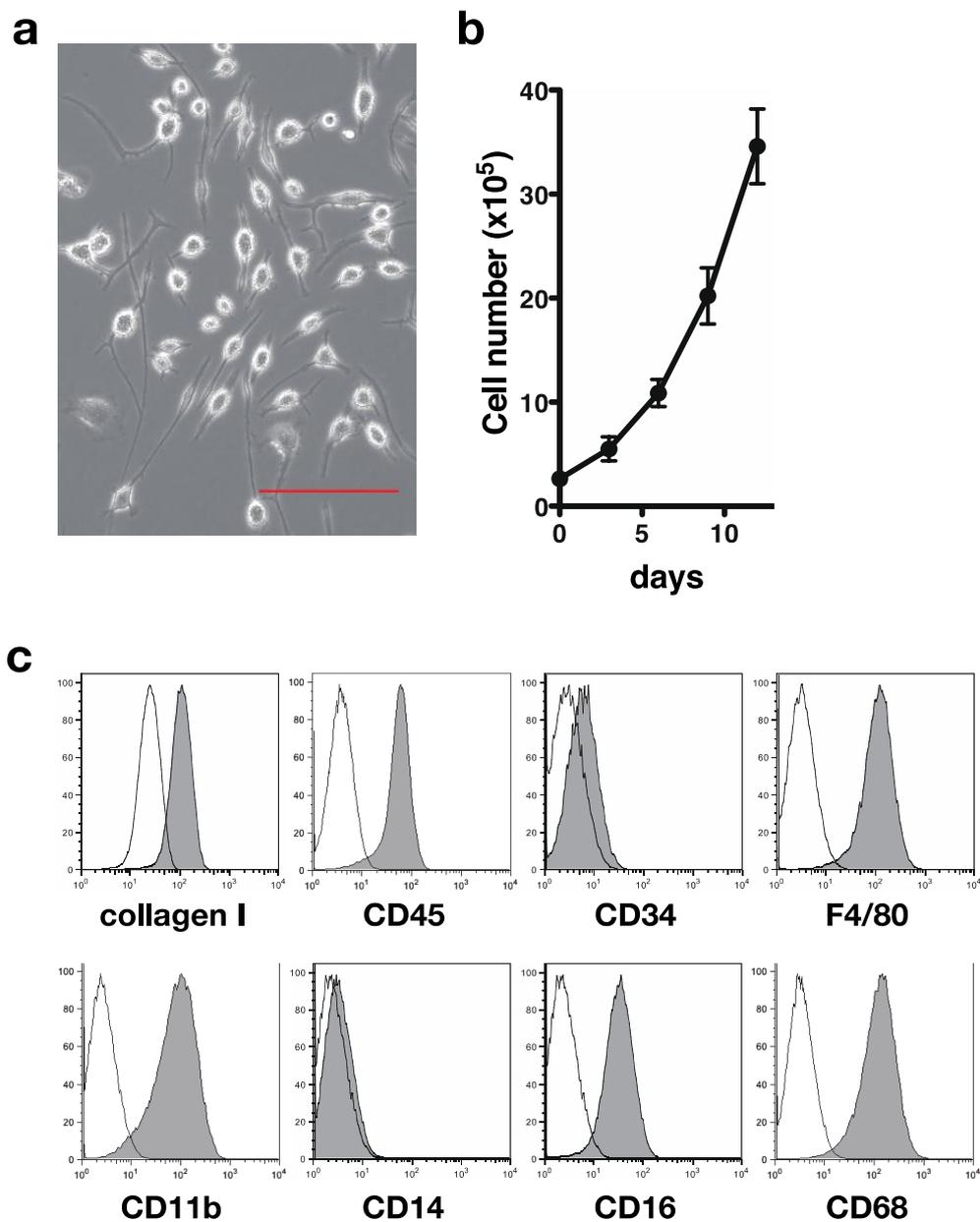


図1 マウスfibrocyte細胞株の樹立とその表面抗原の発現パターン。(a) マウスfibrocyte細胞株の位相差顕微鏡写真 (200倍、スケールバーは100 μm)。 (b) 細胞株の成長曲線。約3日で細胞数が2倍に増加する。(c) 細胞株の表面抗原解析結果。白抜きのヒストグラムはisotype control、灰色のヒストグラムは抗体で染色された細胞を示している。

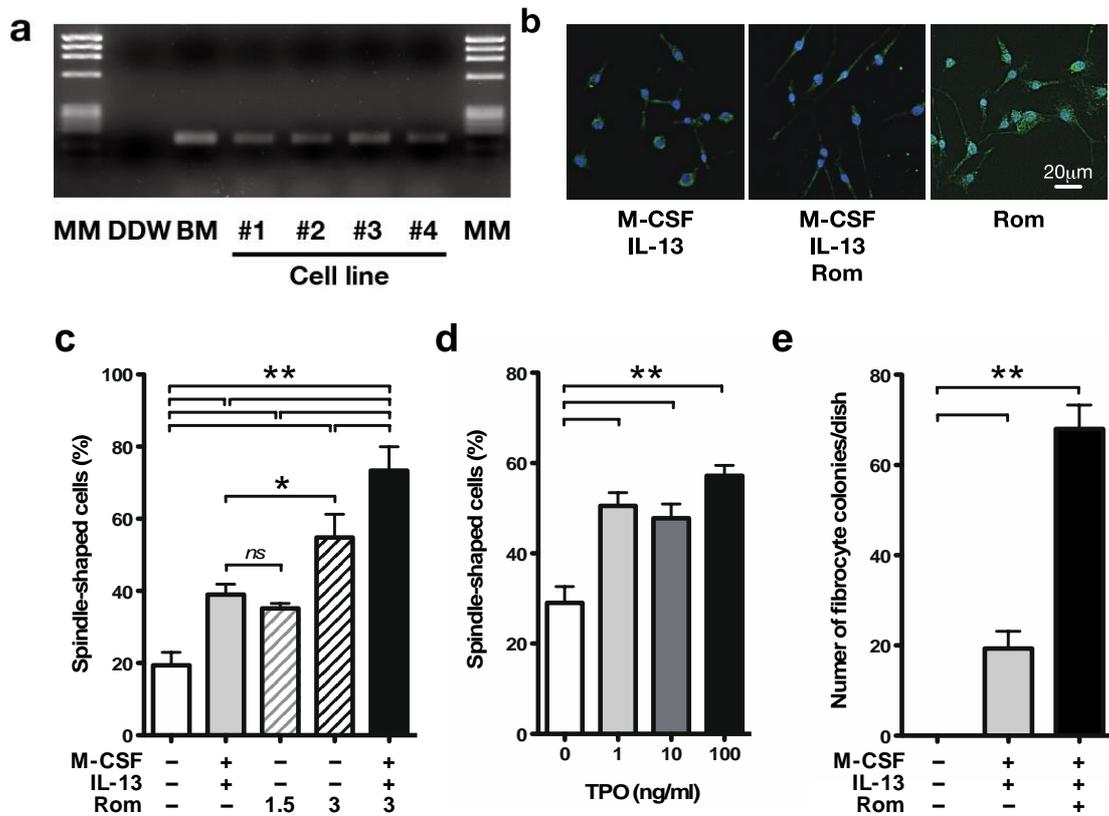


図2 マウス fibrocyte 細胞株の MPL 発現及び MPL の活性化による *in vitro* でマウス fibrocyte の分化促進。(a) RT-PCR の結果。骨髄造血細胞及び全てのマウス fibrocyte 細胞株において MPL の発現を認めた。(b) 蛍光免疫組織染色の結果。Rom の投与により fibrocyte の分化が促進され、collagen I の発現が増強された。(c) 細胞株の培養実験の結果。Rom の投与は分化して紡錘形を呈した fibrocyte の割合を増加させた。(d) 細胞株の培養実験の結果。マウス TPO の投与も Rom と同様に fibrocyte の分化を促進した。(e) マウス脾臓細胞の培養実験。Rom の投与により形成される fibrocyte のコロニー数が有意に増加した。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。MM, molecular marker; DDW, deionized distilled water; BM, bone marrow nuclear cell.

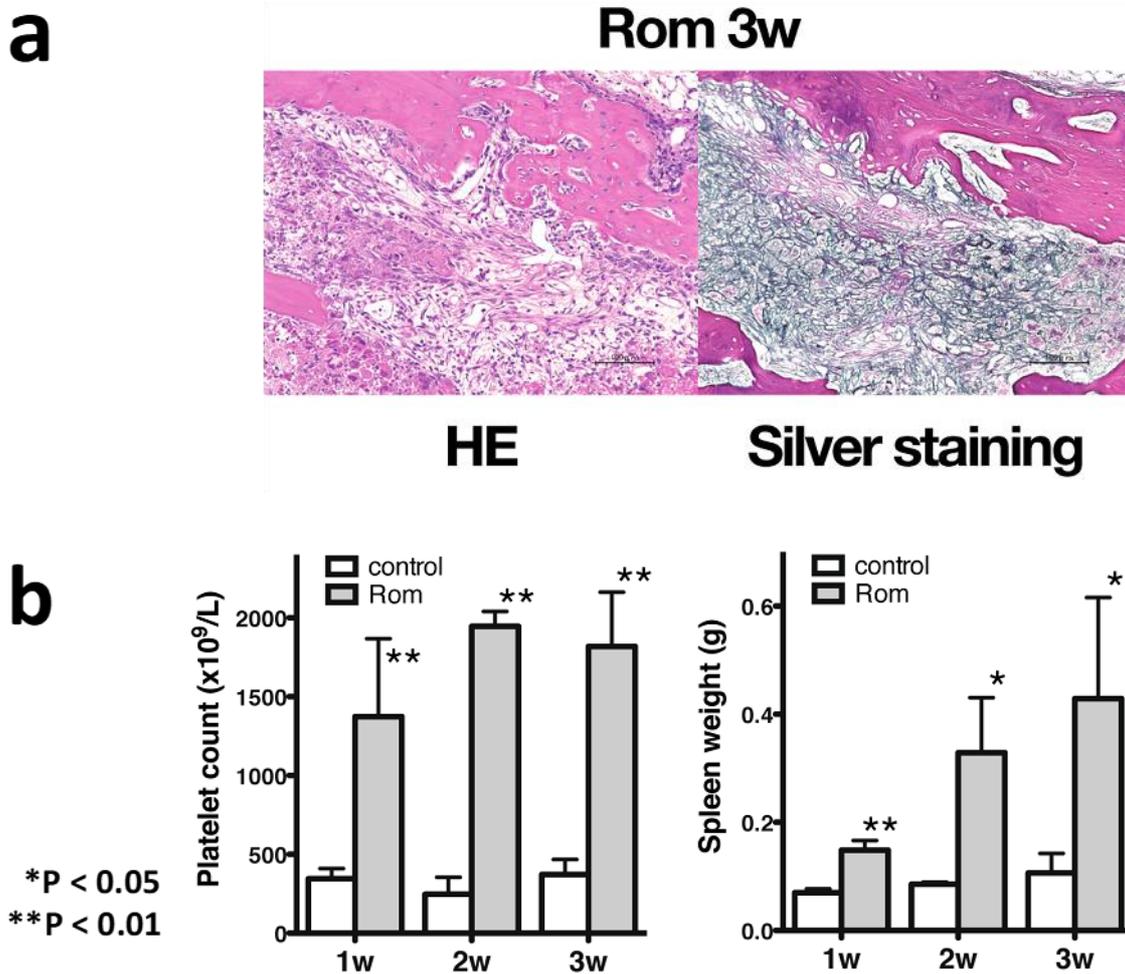


図3 TPO 受容体作動薬による骨髄線維症モデルマウスの作成。(a)骨髄線維症モデルマウスの大腿骨の組織像。HE 染色及び塗銀染色で著明な線維化が認められ、塗銀染色で黒色の細網線維、褐色の膠原線維の増生を認める。(b) モデルマウスの血小板数及び脾臓重量。Rom による血小板数の著明な増加が認められ、また Rom の投与回数に比例して脾臓重量の漸増、すなわち脾腫の増悪が認められる。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

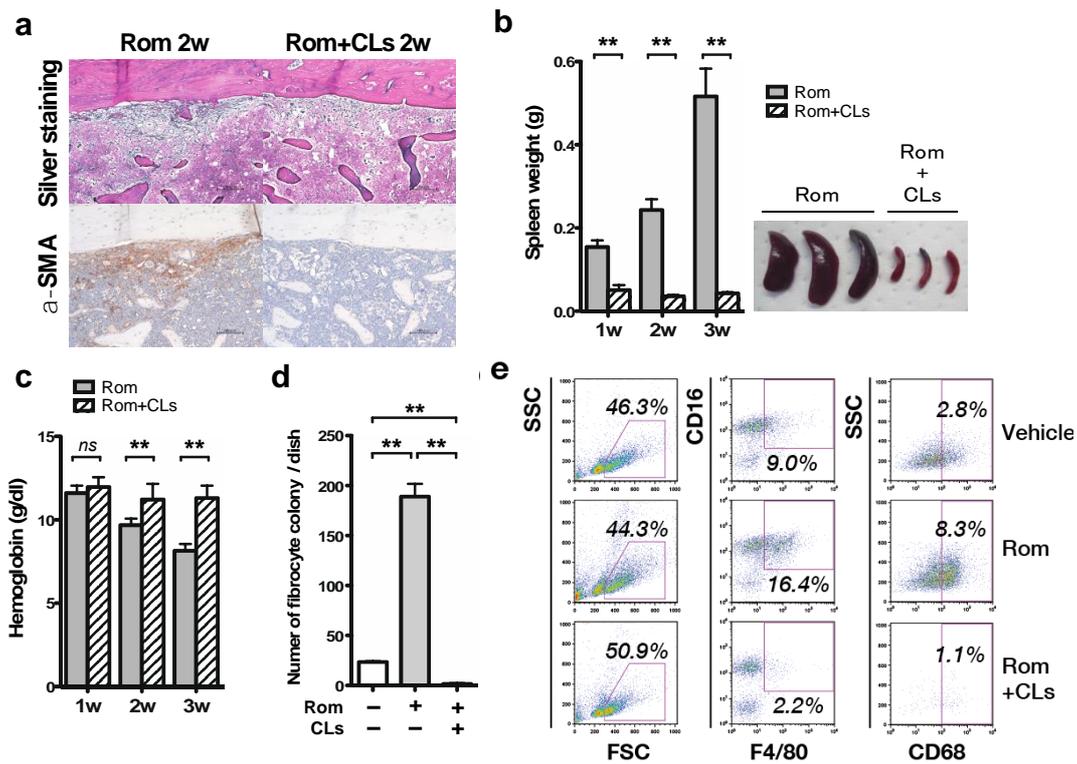


図4 CLsによるfibrocyte前駆細胞の除去及びRom誘導性骨髄線維症の軽減。
 (a) 骨髄線維症モデルマウスの大腿骨の組織像。CLsを投与した群では細網線維の密な交差がなく、 α -SMAの産生も認められない。(b) 骨髄線維症モデルマウスの脾臓重量。Rom投与後1週から3週まで全ての時点でCLs群では有意に脾腫の軽減が認められる。(c) 骨髄線維症モデルマウスの末梢血のヘモグロビン濃度。Rom投与後2週及び3週の時点でCLs群において有意に貧血の軽減が認められる。(d) マウス脾臓細胞から形成されたfibrocyteのコロニー数。コントロール群と比較しRom群では有意に多くのコロニーが形成されたが、Rom+CLs群ではほとんどコロニーが形成されず、コントロール群より有意に減少していた。(e) フローサイトメトリーによる脾臓中のマクロファージの表面抗原解析。コントロール群と比較しRom群ではCD16⁺ F4/80⁺ CD68⁺ マクロファージが増加していたが、Rom+CLs群ではむしろ減少していた。****** $p < 0.01$ 。

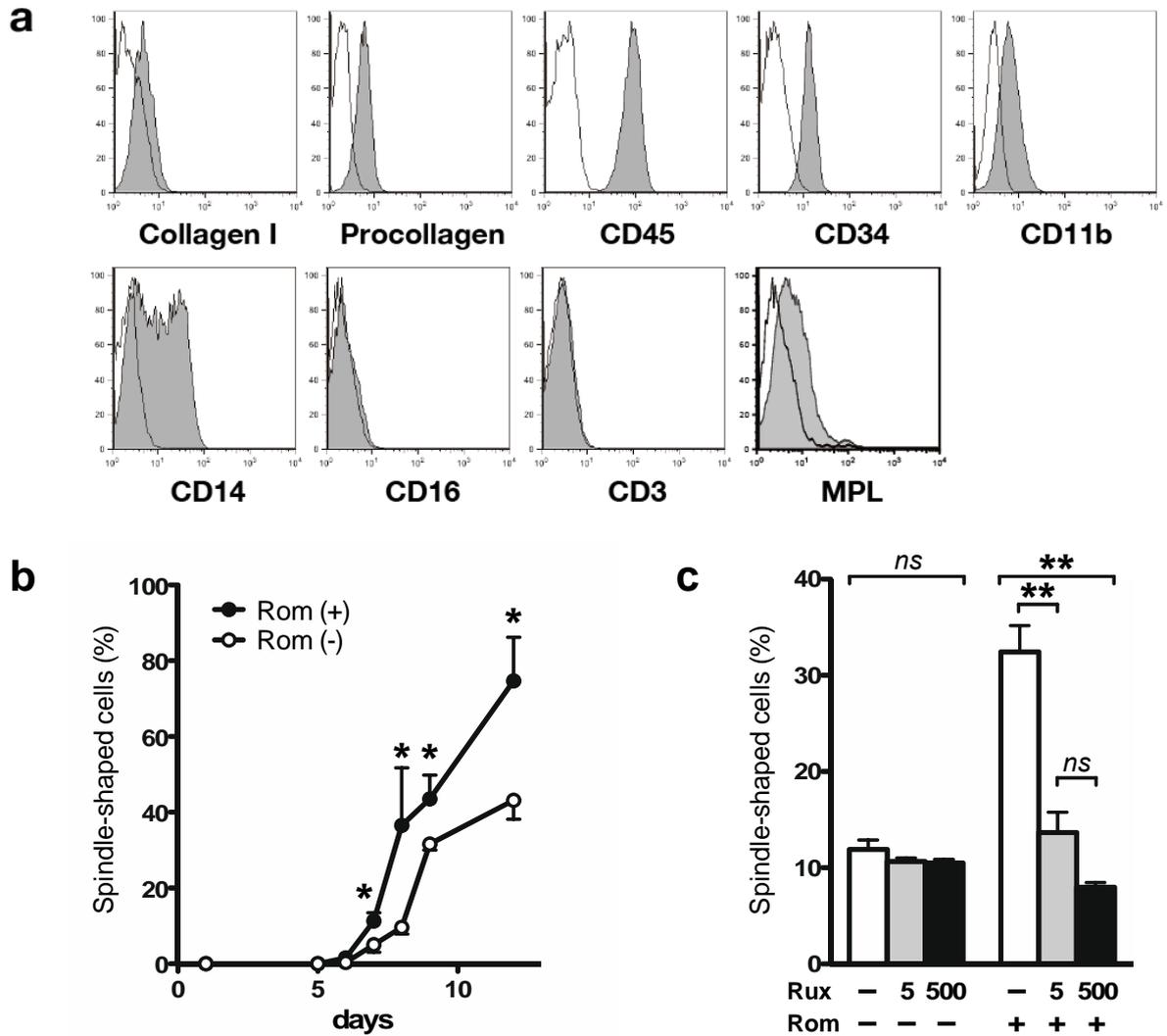


図5 ヒトfibrocyteの表面抗原及び培養アッセイ。(a) フローサイトメトリーによるヒトfibrocyteの表面抗原解析。fibrocyteの典型的な抗原 (collagen I、procollagen、CD45、CD34、CD11b)に加え、MPLの発現を確認した。(b) ヒト末梢血単核球の培養アッセイ。Romの添加によりヒトfibrocyteの分化が促進された。(c) ヒト末梢血単核球を薬剤投与下で8日間培養した結果。5 nM及び500 nMのRuxの添加はRomによるfibrocyteの分化促進作用を抑制したが、通常のfibrocyteの分化は抑制しなかった。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

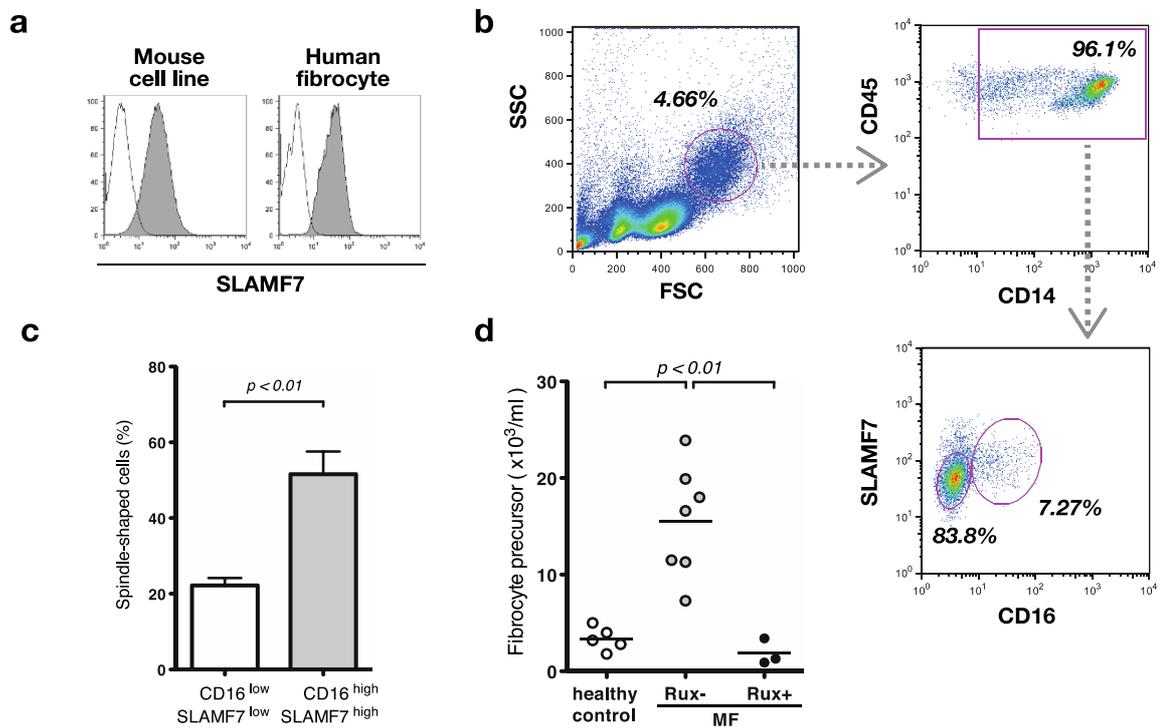


図6 ヒト末梢血単核球中の表面抗原解析及びSLAMF7^{high} CD16^{high} 単球分画の骨髓線維症患者における解析。(a) フローサイトメトリーによるマウス fibrocyte細胞株及びヒト fibrocyteの表面抗原解析。マウス fibrocyte細胞株及びヒト fibrocyteの両方でSLAMF7の高発現が認められた。(b)フローサイトメトリーによるヒト末梢血単核球中の表面抗原解析。CD14陽性単球をさらに SLAMF7^{high} CD16^{high} 分画とSLAMF7^{low} CD16^{low} 分画に分離した。(c) ソーティングしたヒト単球をRux投与下で16日間培養した結果。SLAMF7^{high} CD16^{high} 分画において、SLAMF7^{low} CD16^{low} 分画よりも有意に高率に fibrocyteの出現が認められた。(d) 骨髓線維症患者と健常ドナーの末梢血中の SLAMF7^{high} CD16^{high} 単球分画の解析。SLAMF7^{high} CD16^{high} 単球分画の絶対数は健常ドナーと比較し、Ruxによる治療を受けていない患者においては有意に増加していたが、Ruxによる治療を受けた患者においては増加を認めなかった。

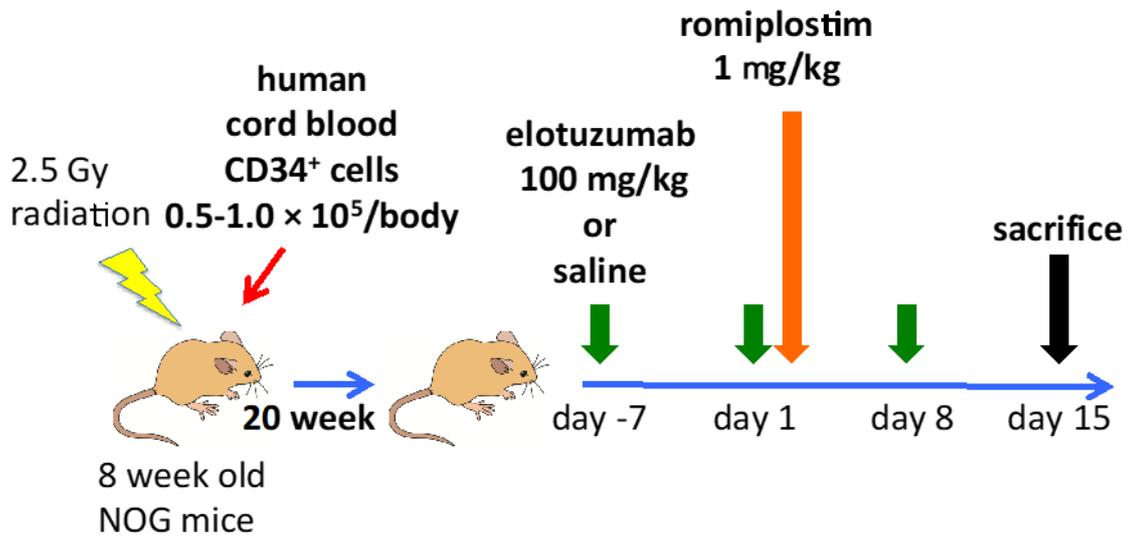


図7 NOG マウスに対するヒト臍帯血の移植プロトコール及び、本研究における Rom と Elo の投与スケジュール

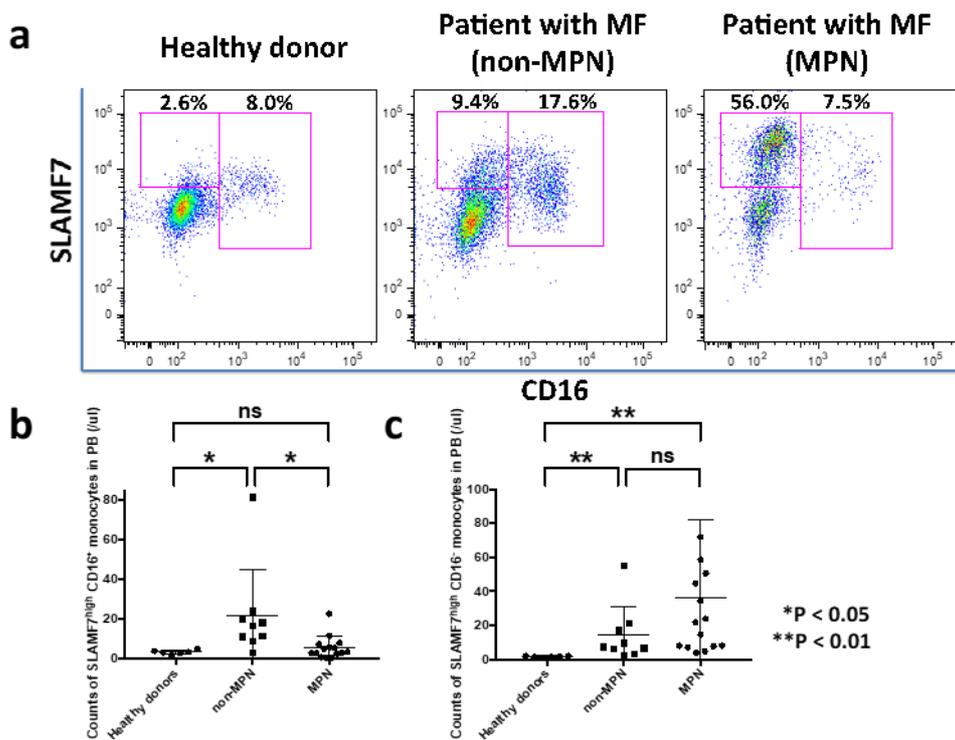


図8 健常ドナー及び骨髄線維症患者における末梢血単球中の表面抗原解析。

(a) フローサイトメトリーによる末梢血単核球の表面抗原解析。CD14⁺ CD66b⁻の分画を単球とみなし、SLAMF7とCD16で展開した。健常ドナー群と比較し、骨髄増殖性疾患を除く骨髄線維症患者群 (non-MPN群) でSLAMF7^{high} CD16⁺単球分画の増加を認め、骨髄増殖性腫瘍に伴う骨髄線維症患者群 (MPN群) でSLAMF7^{high} CD16⁻単球分画の増加を認めた。(b) SLAMF7^{high} CD16⁺単球分画の絶対数についての解析。健常ドナー群と比較しnon-MPN群で有意な増加を認めたが、MPN群では変化を認めなかった。(c) SLAMF7^{high} CD16⁻単球分画の絶対数についての解析。健常ドナー群と比較しnon-MPN群とMPN群両方で有意な増加を認めた。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。MF, myelofibrosis; MPN, myeloproliferative syndromes.

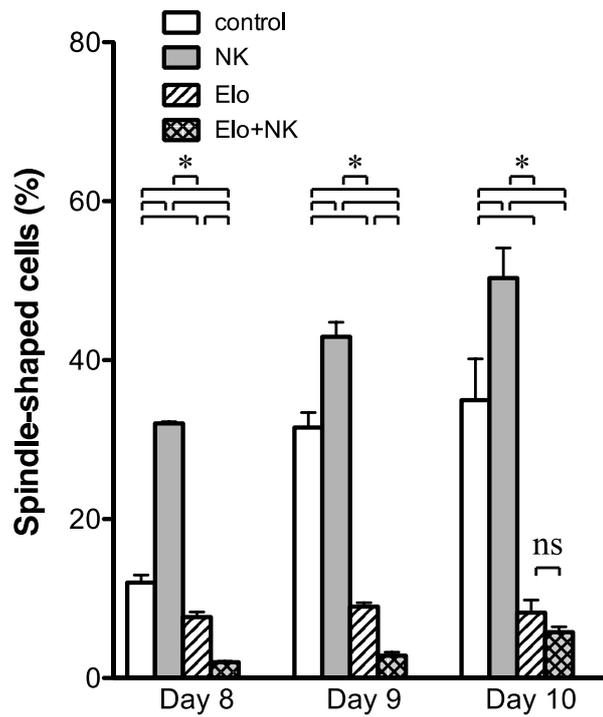


図9 Elo及びNK細胞投与下でのヒト末梢血単核球の培養アッセイ。day 8、day 9、day 10の全ての時点において、コントロール群と比較し、NK細胞群では有意にfibrocyteの割合が増加しており、反対にElo群及びElo + NK細胞群では有意にfibrocyteの割合が減少していた。また、day 8及びday 9においては③Elo群と比較し、Elo + NK細胞群において有意にfibrocyteの割合が減少していた。 $*p < 0.05$ 。

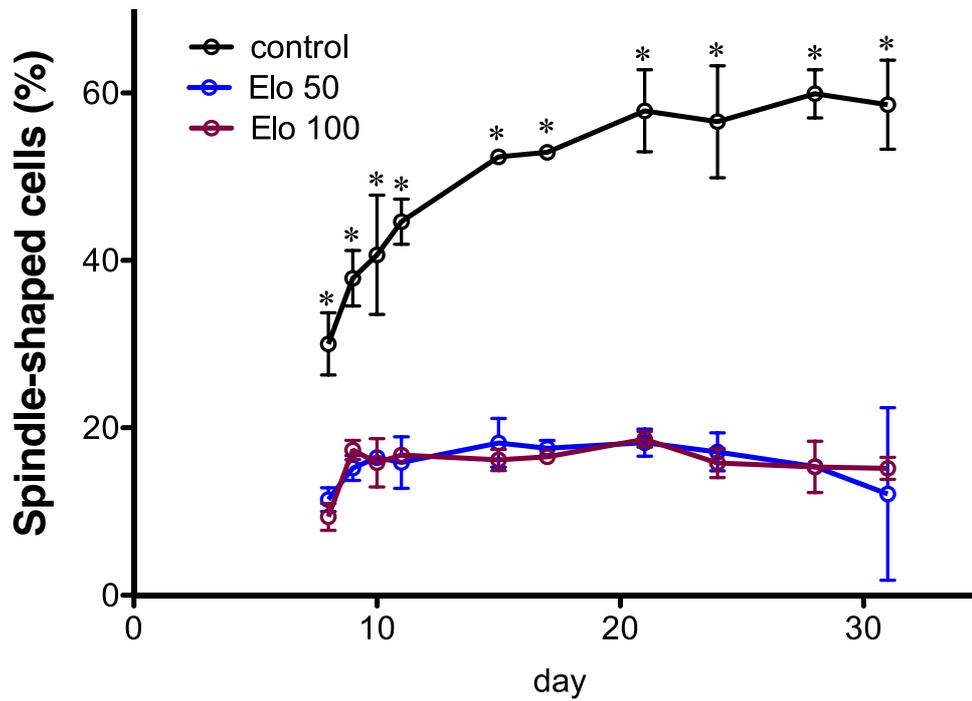


図10 Elo投与下でのヒト末梢血単核球の長期培養アッセイ。ヒト末梢血単核球から分化するfibrocyteの割合は、Elo 50 $\mu\text{g/ml}$ 群においてもElo 100 $\mu\text{g/ml}$ においてもコントロール群と比較して有意に減少した。Elo 50 $\mu\text{g/ml}$ 群とElo 100 $\mu\text{g/ml}$ 群の間でfibrocyteの割合に有意差は認めなかった。* $p < 0.05$ 。

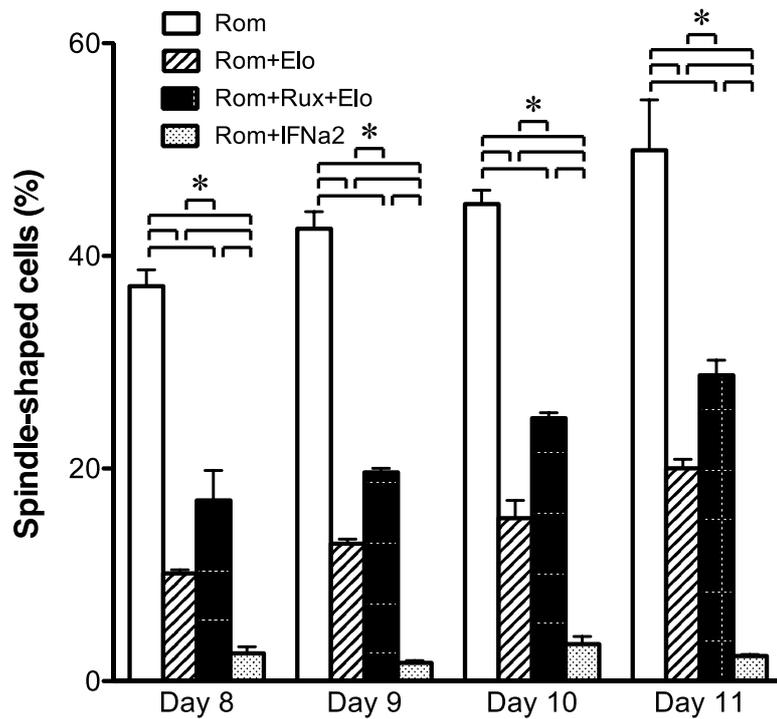


図11 Eloと他の薬剤の併用投与下におけるヒト末梢血単核球の培養アッセイ。分化したfibrocyteの割合はday 8、day 9、day 10、day 11の全ての時点でRom群と比較し、Rom + Elo群、Rom + Elo + Rux群及びRom + IFN α 2群のいずれにおいても有意に減少していた。一方、Rom + Elo + Rux群でのfibrocyteの分化抑制効果はRom + Elo群と比べて有意に弱かった。Rom + IFN α 2群では最もfibrocyteの分化が抑制されていたが、強い細胞毒性を認めた。* $p < 0.05$ 。

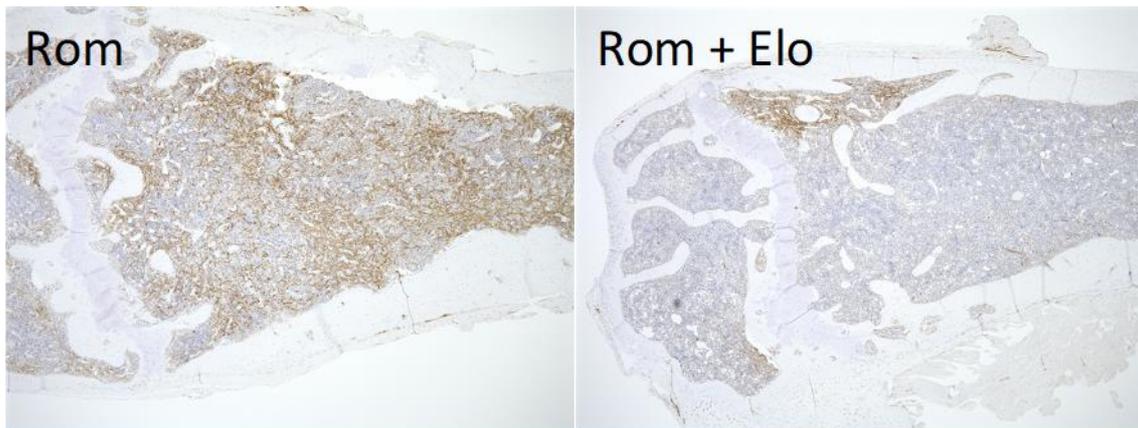


図 12 hNOG マウスを用いた骨髄線維症モデルの大腿骨の組織像 (α -SMA の免疫組織染色の結果)。(左) Rom 投与後のコントロール群の 1 例。骨髄間質がびまん性に α -SMA 発現陽性であり、褐色に染色されている。MF grade 3 と評価される。(右) Rom 投与後の Elo 投与群の 1 例。骨髄の一部に染色性がみられる。MF grade 2 と評価される。

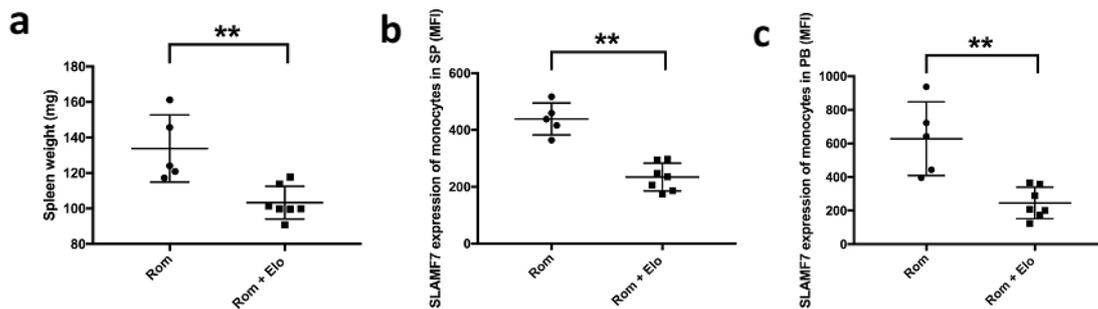


図 13 hNOG マウスを用いた骨髄線維症モデルの脾臓重量及び単球の SLAMF7 発現解析。(a) 骨髄線維症モデルマウスの脾臓重量。Elo 群の平均脾臓重量はコントロール群と比較し有意に減少していた。(b) フローサイトメトリーによる脾臓細胞の解析。Elo 群における脾臓細胞中の CD45⁺ CD14⁺ 単球の SLAMF7 の平均発現強度は、コントロール群と比較して有意に低下していた。(c) フローサイトメトリーによる末梢血の解析。末梢血中においても Elo 群における CD45⁺ CD14⁺ 単球の SLAMF7 の発現強度は、コントロール群と比較して有意に低下していた。 ** $p < 0.01$ 。

MF grade	Day 8*		Day 15*		Day 22*	
	CLs (-)	CLs (+)	CLs (-)	CLs (+)	CLs (-)	CLs (+)
	n = 9	n = 8	n = 10	n = 9	n = 4	n = 4
MF-0	0	4	0	2	0	0
MF-1	7	4	0	7	0	2
MF-2	2	0	9	0	0	2
MF-3	0	0	1	0	4	0

MF, myelofibrosis; Rom, romiplostim; CLs, clodronate liposomes

表1 CLsによるマクロファージ除去に伴うTPO受容体作動薬誘導性骨髄線維化の軽減。

MF grade	day15 after Rom administration	
	Elo (-)	Elo (+)
	n = 5	n = 7
MF-0	0	0
MF-1	0	0
MF-2	0	7
MF-3	5	0

MF, myelofibrosis; Rom, romiplostim; Elo, elotuzumab

表2 Eloによるfibrocyte分化抑制に伴うTPO受容体作動薬誘導性骨髄線維化の軽減