

骨髓線維症における線維化誘導機序と
治療標的の研究

か とう しょう いち ろう
加 藤 章 一 郎
(血液病学専攻)

防衛医科大学校

令和元年度

目 次

第1章 緒言	1 頁
第2章 骨髓線維症患者における末梢血SLAMF7高発現CD16陰性単球の割合と <i>JAK2V617F</i> 変異との関連	
第1節 背景	4 頁
第2節 対象および方法	5 頁
第3節 結果	9 頁
第4節 考察	10 頁
第5節 小括	12 頁
第3章 fibrocytesが産生するCHI3L1と骨髓線維化との関連	
第1節 背景	13 頁
第2節 対象および方法	14 頁
第3節 結果	21 頁
第4節 考察	25 頁
第5節 小括	29 頁

第4章 考察	30頁
第5章 結論	32頁
謝辞	33頁
略語一覽	34頁
引用文献	36頁
図表	44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、本態性血小板血症後骨髄線維症は骨髄線維化、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大半はドライバー変異として Janus Activating Kinase 2 (*JAK2*) 遺伝子、*calreticulin* (*CALR*) 遺伝子、*myeloproliferative leukemia* (*MPL*) 遺伝子のいずれかに変異を有しており¹⁾、これらの変異が骨髄増殖性腫瘍クローンの分化や増殖における重要な役割を担う thrombopoietin (TPO) シグナル伝達経路を活性化させることが知られている²⁾。チロシンキナーゼである *JAK2* は、erythropoietin (EPO) 受容体 EPOR や TPO 受容体 MPL といったサイトカイン受容体の細胞内ドメインに結合しており、受容体にサイトカインが結合した際に活性化状態となり下流のシグナル伝達分子を介してシグナルを細胞内へ伝達していく役割を担う。そして V617F 変異による構造変化により、キナーゼの恒常的な活性化を惹起すると考えられている³⁾。*CALR* は分子シャペロンをコードしている遺伝子だが、変異型 *CALR* は *MPL* と相互作用し、下流の *JAK2* を恒常的に活性化することが知られている⁴⁾。*MPL* は TPO 受容体として本経路に関わっており、巨核球と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す作用が知られている⁵⁾。また、TPO シグナル伝達経路は骨髄の線維化との関連が明らかになっており、TPO を過剰発現させた骨髄細胞を移植したマウスにおいて骨髄線維化や脾腫などの症状をきたすこと⁶⁾、*MPL* を恒常的に活性化する *MPLW515L* のような変異を導入したマウスで骨髄線維化が生じることなどが報告されている⁷⁾。なお、

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が⁸⁾、我々は Rom 1 mg/kg を週に 1 回投与することで C57BL/6J (B6) マウスに骨髄線維症様の症状が出現することを見出し、骨髄線維症の病態を解明するための重要なモデルの 1 つと捉えてきた⁹⁾。

骨髄線維症の発症には様々な病理学的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 fibrocyte の腫瘍性クローンの存在が重要であり、fibrocyte の分化を抑制する serum amyloid P (SAP) 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率を著明に改善したという報告がある^{10, 11)}。fibrocyte とは CD14 陽性の単球分画から派生する紡錘形で fibroblast 様の細胞である¹²⁾。fibrocyte は組織における進行性の線維化を特徴とする疾患において線維化の進展に大きく関与しており、代表的な疾患として肺線維症¹³⁾、肝線維症¹⁴⁾、腎線維症¹⁵⁾、強皮症¹⁶⁾などがあげられる。近年我々は前述したマウスにおける Rom 投与による骨髄線維症モデルと fibrocyte の関係を調べることで、fibrocyte の分化が TPO 受容体である MPL の活性化によって直接引き起こされ、その結果として骨髄線維化が進行することを見出した⁹⁾。さらに、マクロファージや単球を除去することで骨髄線維化や脾腫が有意に改善することを明らかにした⁹⁾。一方で、fibrocyte による骨髄線維化や脾腫の形成にどのような機序が存在するのかは不明な点が多く、これまで線維化形成の主役とされてきた fibroblast との関連性も明らかになっていない。

今回我々は fibrocyte の新たな性質と機能を解明する目的で、DNA マイクロアレイ法と RNA シークエンス法を用いてヒト fibrocyte の遺伝子発現プロファイルの解析を行った。DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現プロファイルにおいては、マクロファージと比較して signaling lymphocytic activation molecule-F7 (SLAMF7) のシグナルが上昇しており、マウスの fibrocyte 細胞株や培養されたヒト fibrocyte の細胞表面においても SLAMF7 が強く発現していることが確認された^{9, 17)}。また、RNA シークエンス法で fibrocyte の各分化段階における発現遺伝子の変化を調査したところ、chitinase 3 like 1 (CHI3L1) が fibrocyte の分化に伴って発現増強することが確認された。

本研究では、fibrocyte における SLAMF7 と CHI3L1 が骨髄線維症の発症及び進行に関わる機序を明らかにし、新たな検査手法や治療標的を確立することを目的とした。

第2章 骨髄線維症患者における末梢血 SLAMF7 高発現 CD16 陰性単球の割合と JAK2V617F 変異との関連

第1節 背景

前述したとおり、total RNA を用いたマイクロアレイ解析の結果から、ヒト fibrocyte では SLAMF7 抗原がマクロファージと比較して高発現していることを明らかにした。また、少数例の検討ではあったが、SLAMF7 高発現 CD16 陰性単球 (SLAMF7^{high} CD16⁻単球) が骨髄線維化を伴う患者の末梢血において上昇していることを発見した。加えて、Elotuzumab (Elo) は再発難治性の多発性骨髄腫に対する治療薬として既に患者に投与されているが¹⁸⁾、我々は Elo が in vitro におけるヒト fibrocyte の分化を抑制し、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の骨髄線維化を改善させることを発見した¹⁹⁾。我々はこれらの実験結果から、SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球は fibrocyte の活性化を反映した細胞集団であり、同時に Elo の治療ターゲットとなり得ることを見出した。一方で、SLAMF7 が fibrocyte の細胞表面に発現することの意義は明らかになっていない。

そのため、本章の研究では、骨髄線維化における SLAMF7 発現上昇の病的意義を明らかにする目的で、健常人ドナーおよび骨髄増殖性腫瘍 (MPN : myeloproliferative neoplasm) 患者の末梢血中の SLAMF7^{high} CD16⁻単球の割合を測定し、骨髄線維化の有無、遺伝子変異、基礎疾患、治療、脾腫などとの関連を解

析した。また、十分量の検体が確保可能な患者においては SLAMF7^{high} CD16⁻単球の sorting を行うことで、その詳細な性質を明らかにする方針とした。

第2節 対象および方法

(1) 骨髄増殖性腫瘍患者およ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 (受付番号 2154)。2017 年から 2018 年の間に 2016 WHO classification and diagnostic criteria²⁰⁾に基づいて MPN と診断され、文書による同意が得られた 58 名を対象とした (表 1)。骨髄線維化の評価については European consensus criteria²¹⁾に基づいて病理医によって診断された。本研究において、MF-0 と診断した患者は骨髄線維化を伴わない MPN (MPN without MF) と定義し、MF-1, 2, および 3 と診断した患者は骨髄線維化を伴う MPN (MPN with MF) と定義した。MPN 患者の内訳は MPN with MF が 37 名、MPN without MF が 21 名であり、原病別では真性赤血球増加症 (PV : polycythemia vera) が 23 名、本態性血小板血症 (ET : essential thrombocythemia) が 23 名、特発性骨髄線維症 (PMF : primary myelofibrosis) が 12 名であった。また、MPN 患者が保有する各変異遺伝子は *JAK2V617F* が 28 名、*CALR* が 9 名、*MPL* が 1 名、上述のいずれの変異も保有しない患者 (triple negative) が 20 名であった。後述する血液細胞の評価のため、58 名全ての患者と 21 名の健常人のボランティアから末梢血の検体を採取した。検体採取時において、19 名の患者が Hydroxyurea、1 名の患者が Anagrelide、2 名の患者が Ruxolitinib によって

それぞれ加療中であった。

(2) 末梢血単核球の採取およびヒト fibrocyte の培養

Pancoll (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) を用いた比重遠心法により、MPN 患者および健常ドナーの末梢血 1 ml より末梢血単核球を回収した。また、*JAK2V617F* 変異を伴うことが判明した患者においては、後述する fibrocyte の遺伝子変異解析も行った。fibrocyte は、末梢血 3 ml より 5×10^6 個の末梢血単核球を回収し、L-glutamine、20% fetal bovine serum、penicillin streptomycin を加えた Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 培地 (Wako, Osaka, Japan) に懸濁し、6 ウェルプレート上で 37°C、5%CO₂ の環境下で 8 日間培養したものを使用した。なお、DMEM 培地は 4 日に 1 回の間隔で交換した。

(3) *JAK2V617F*、*MPLW515K/L*、*CALR* の遺伝子変異の解析

JAK2V617F、*MPLW515K/L*、*CALR* の遺伝子変異の解析のため、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用して前述の末梢血および fibrocyte からゲノム DNA を採取した。最初に *JAK2V617F* の変異アレル量 (allele burden) を ABC-PCR 法を用いて測定した²²⁾。この際、allele burden が 10%を下回っていた場合はより正確な手法である allele-specific PCR 法 (AS-PCR) を用いた²³⁾。*MPLW515K/L* の変異は dual amplification-refractory mutation system PCR (DARMS-PCR) と呼ばれる allele-specific PCR 法と、それに引き続くキャピラリー

電気泳動法を用いて同定した²⁴⁾。*CALR*の変異はDNA断片解析を用いて解析した²⁵⁾。

(4) フローサイトメトリーによる末梢血中のSLAMF7^{high} CD16⁻単球の解析とソーティング

MPN患者及び健常ドナーの末梢血 1 mlよりパンコール (PAN-Biotech) を用いて比重遠心法を行い末梢血単核球を回収した。10 µlのfluorescence activated cell sorting (FACS) bufferに懸濁し、5 µlのヒトBD Fc block (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を添加してFc受容体ブロッキングを行った。引き続き、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗CD14抗体 (Beckman Coulter, Tokyo, Japan)、pacific blue (PB) 標識抗CD16抗体 (BD Biosciences)、phycoerythrin (PE) 標識抗CD66b抗体 (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) 及びallophycocyanin (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。単球分画の中でCD14⁺ CD66b⁻の分画にゲートをかけ、さらにSLAMF7^{high} CD16⁻ 単球の分画を特定した (図1)。

また、我々はSH800 cell sorter (Sony Biotechnology, Tokyo, Japan) を用いることで、7名の*JAK2V617F*変異陽性患者の20mlの血液検体からSLAMF7^{high} CD16⁻ 単球とSLAMF7^{low} CD16⁻単球のソーティングを行った。採取した細胞はそれぞれ*JAK2V617F* allele burdenの測定を行った。瀉血を行う必要があり十分量の血液量が

採取できた2名の検体には後述する fibrocyte の培養アッセイを加えた。

(5) ソーティングしたヒト fibrocyte の培養アッセイ

ソーティングした細胞は1 ウェルあたり 2×10^5 個ずつ 3 ml の培地に懸濁し、6 ウェルプレート上で 37°C、5%CO₂ の環境下で培養した。培地は前述した DMEM 培地 (Wako) に 2 mM L-glutamine (nacalai tesque, Kyoto, Japan) 、20% fetal bovine serum (CORNING, Corning, NY, USA) 、100 U/ml penicillin – 100 µg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を加えたものを使用した。4 日間に1 度培地の交換を行いながら 16 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ウェル毎に計測した²⁶⁾。

(6) 統計解析

群間比較は、Fisher の正確検定および Mann-Whitney 検定で行った。3 群以上の群間比較は Kruskal Wallis test 解析後に、Steel-Dwass test で群間比較し、Bonferroni 補正を行った。また、2 因子の相関関係に関してはピアソンの積立相関係数を用いて検定し、同時に線形回帰分析を行った。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 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) 、および JMP version 12.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いた。

第3節 結果

(1) 骨髄線維化を伴う患者における末梢血中のSLAMF7^{high} CD16⁻単球の上昇

患者はMPN without MFの群とMPN with MFの2群に分類した。各群の末梢血中におけるSLAMF7^{high} CD16⁻単球割合の中央値、それぞれ健常ドナー (n = 21) が0.94%、MPN without MF (n = 21) が3.23%、MPN with MF (n = 37) が16.90%であった。健常ドナーとMPN without MFの群に比較して、MPN with MFの群ではSLAMF7^{high} CD16⁻単球の割合が有意に増加していた ($P < 0.01$) (図2a)。また、MPN患者の各変異遺伝子間 (*JAK2V617F*, *CALR*, *MPL* + triple negative) で比較したサブグループ解析においては、*CALR*変異 (n = 9) と*MPL*変異+ triple negative (n = 21) の群に比較して、*JAK2V617F*変異 (n = 28) で有意にSLAMF7^{high} CD16⁻単球の割合が増加していた (中央値 : *JAK2V617F* 28.75% vs. *CALR* 3.26% vs. *MPL* + triple negative 1.72%, $P < 0.01$) (図2b)。加えて、*JAK2*変異を伴うMPN患者間の比較においては、MPN without MF (n = 9) の群に比較して、MPN with MF (n = 19) の群で有意にSLAMF7^{high} CD16⁻単球の割合が増加していた (中央値 : 7.74% vs. 43.70%, $P < 0.01$)。同様に、*JAK2*変異を伴わないMPN患者間の比較においても、MPN without MF (n = 12) の群に比較して、MPN with MF (n = 18) の群で有意にSLAMF7^{high} CD16⁻単球の割合が増加していた (中央値 : 1.24% vs. 4.32%, $P < 0.05$) (図3a)。線維化を伴う患者と伴わない患者の間の差は*JAK2V617F*変異を伴う患者において顕著であった (図3a)。次に、*JAK2V617F*変異を伴う患者において骨髄線維化を予測可能にするSLAMF7^{high} CD16⁻単球割合のカットオフ値を設定する目的でreceiver operating characteristic

(ROC) 曲線を作成した。その結果、SLAMF7^{high} CD16⁻単球割合のカットオフ値を25%とした際のAUCが0.901となり、線維化発症を予測する際の感度、特異度がそれぞれ79.0%、77.8%であった (図3b)。

(2) SLAMF7^{high} CD16⁻単球とJAK2V617F allele burdenの関係

末梢血単核球のJAK2V617F allele burden (n = 28) はSLAMF7^{high} CD16⁻単球割合との間に正の相関関係を認め (Pearson's correlation coefficient, $r = 0.531$, linear regression analysis, $p = 0.0037$) (図4a)、fibrocyteのJAK2V617F allele burden (n = 28)はSLAMF7^{high} CD16⁻単球割合との間に更に強い正の相関関係を認めた (Pearson's correlation coefficient, $r = 0.631$, linear regression analysis, $p = 0.0003$) (図4b)。

また、ソーティングで単離したJAK2V617F変異を伴う患者7名の単球分画の解析 (図5a) において、SLAMF7^{high} CD16⁻単球のJAK2V617F allele burdenはSLAMF7^{low} CD16⁻単球に比較して有意に上昇していた ($P < 0.05$) (図5b)。2名の患者においては単離したSLAMF7^{high} CD16⁻単球とSLAMF7^{low} CD16⁻単球の培養アッセイを行ったが、SLAMF7^{high} CD16⁻単球が有意にfibrocyteへ分化することが明らかになった ($P < 0.05$) (図5c)。

第4節 考察

SLAMF7はSLAM superfamilyに属する66kDaの糖タンパクの1種である²⁷⁾。

SLAMF7を発現するのは血液細胞に限定されており、CD8陽性T細胞、形質細胞、

形質細胞様樹状細胞や休止期のNK細胞に発現し、微弱ではあるがCD4陽性T細胞、休止期のB細胞や単球にも発現している²⁸⁾。また、CD4陽性T細胞、B細胞、単球由来樹状細胞、単球などが活性化された際にSLAMF7の発現の増加が認められ²⁹⁾、人体の免疫調節に何らかの役割を果たしていることが示唆されているが、その機能については未だ不明な点が多い。

本研究において、我々はSLAMF7^{high} CD16⁻単球分画に注目し、各患者背景との解析を行うことで様々な事実を明らかにした。MPN with MFはMPN without MFに比較してSLAMF7^{high} CD16⁻単球が有意に上昇していることを発見し、この現象はJAK2V617F変異を伴う患者において特に顕著であった。この点に関し、ROC曲線を用いて詳細に解析した結果、末梢血単核球中のSLAMF7^{high} CD16⁻単球の割合を計測することは、JAK2V617F変異陽性患者の場合、線維化の程度を予測する指標として非常に有用であることが判明した。また、JAK2V617F変異陽性患者では、JAK2 allele burdenの測定結果から、SLAMF7^{high} CD16⁻単球の割合は、患者末梢血単核球やfibrocyteのJAK2 allele burdenと強い相関があることが明らかになった。加えて、今回我々はSLAMF7^{high} CD16⁻単球とSLAMF7^{low} CD16⁻単球をそれぞれsortingし培養することで、SLAMF7^{high} CD16⁻単球は、JAK2V617F変異陽性の腫瘍クローンが濃縮された集団であることを明らかにした。この事実は、SLAMF7^{high} CD16⁻単球がEloをはじめとした線維化抑制効果を期待される薬剤の標的となり得ることを示唆している。

近年、線維化を伴うMPNでは線維化を伴わないMPNに比較して末梢血中の

JAK2V617F allele burdenが増加しているとの報告が散見されている^{25, 30-32)}。加えて、*JAK2V617F*変異を認めるMPNの患者において、homozygous*JAK2V617F*変異を認める症例ではheterozygousに認める症例よりも骨髄線維症へ進展する確率が高いとする報告もある³¹⁾。よって、今回の我々の発見は、*JAK2V617F* allele burdenの上昇がSLAMF7^{high} CD16⁻単球の増加を通じて骨髄線維化を促進させることを示唆するものと考えられる。そして、SLAMF7^{high} CD16⁻単球の解析は骨髄線維化の有無に極めて密接に関連する一方で、骨髄生検に比較して侵襲性が低いことから、骨髄生検に変わる非侵襲性マーカーとしての診断応用を目指した前方視的な検討も望まれる。また、今後Eloの臨床試験を実現していく際には、適切な候補者を選定する上で最重要の検査項目の1つとなり得ると期待させる。

第5節 小括

健常ドナーや骨髄線維化を伴わない MPN 患者と比較し、骨髄線維化を伴う MPN 患者において末梢血単核球中の SLAMF7^{high} CD16⁻単球の割合は有意に増加していた。末梢血や fibrocyte の SLAMF7^{high} CD16⁻単球を計測することは、*JAK2V617F* 変異を伴う患者の allele burden の上昇や骨髄線維化の程度を予測する良好な指標となることが明らかになった。加えて、SLAMF7^{high} CD16⁻単球分画は allele burden 高値の腫瘍性クローンが濃縮した細胞集団であり、Elo の治療候補者を抽出する指標として非常に有用であることを見出した。

第3章 fibrocyteが産生するCHI3L1と骨髄線維化の関連

第1節 背景

従来、原発性骨髄線維症における骨髄の線維化は、腫瘍化した巨核球や活性化した間葉系間質細胞によって放出されるTGF- β などの線維化促進因子によって引き起こされるものと考えられてきた³³⁾。しかし、pirfenidoneはTGF- β 等の線維化形成に関わるサイトカインを阻害する抗線維化薬であるが、第II相臨床試験において骨髄線維症患者に対する有効性を認めなかった³⁴⁾。このことから、骨髄線維症の発症機序は必ずしもTGF- β を介するものではないことが示唆された。

一方で、我々は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、単球や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マウスで明らかにした⁹⁾。また、ヒト由来のfibrocyteの分化を抑制する作用をもつSAPの投与によって35%の骨髄線維症患者の線維化のgradeを平均1ポイント以上改善させたという報告が他グループによりなされた³⁵⁾。これらの事実は単球、もしくはそこから分化するfibrocyteが骨髄線維症における治療対象と成り得ることを示唆している。しかしながら、fibrocyteが骨髄線維化に際してどのような機能的役割を果たすのかは未だ明らかになっていない。

今回我々は詳細なfibrocyteの機能を明らかにする目的で、fibrocyteの分化に伴う遺伝子発現プロファイルの変化をRNAシーケンス法を用いて評価した。その過程

で、単球よりもfibrocyteで発現が顕著に増強し、fibrocyteの分化に関わる遺伝子の候補としてChitinase 3 like 1 (CHI3L1) を同定した。CHI3L1はキチナーゼ様タンパクの一種で好中球好中球、マクロファージなど多くの種類の細胞で発現していることが知られる。本研究では、培養したヒトfibrocyteやRom投与による骨髄線維症モデルマウスを用いることで、CHI3L1の骨髄線維化への関与をin vitro、in vivoの観点から詳細に検討した。

第2節 対象および研究方法

(1) 骨髄増殖性腫瘍患者および健常者からの末梢血検体の採取

本研究は防衛医科大学校の第2章第2節(1)と同様の研究計画のもとに行われており、MPN患者の血清CHI3L1の測定を行うため、血清の確保が可能であったMPN患者52名を対象とした。骨髄線維化の評価についてはEuropean consensus criteria²¹⁾に準じて病理医によって行われた。本研究において、MF-0と診断した患者はMPN without MF、MF-1, 2, 3と診断した患者はMPN with MFと定義した。さらに、ヒトfibrocyteの細胞培養を行う目的で、健常人のボランティア4名から末梢血を採取した。

(2) ヒトfibrocyteおよびHS-5の細胞培養

Pancoll (PAN-Biotech) を用いた比重遠心法により健常ドナーの末梢血10 mlより末梢血単核球を回収した。単核球はL-glutamine、20% fetal bovine serum、

penicillin-streptomycin を加えた DMEM 培地 (Wako) で 37°C、5%CO₂ 下で培養した。DMEM 培地は 4 日に 1 回の間隔で交換した。ヒト線維芽細胞の細胞株である HS-5 (ATCC, Manassas, VA, USA)³⁶⁾ は、10% fetal bovine serum、penicillin streptomycin を加えた DMEM 培地 (ATCC) で 37°C、5%CO₂ 下で培養した。

(3) ヒト単球および fibrocyte の RNA シークエンス

分化に伴う発現遺伝子プロファイルの変化を確認するため、前述した末梢血単核球を DMEM で培養開始し、1 日後、8 日後および 11 日後にディッシュに残存している付着細胞をそれぞれ monocyte、fibrocyte (day 9)、fibrocyte (day 12) とした。RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて、メーカーの使用書通りに各細胞から全 RNA を抽出した。RNA の変性および混濁の有無は 1%アガロースゲルを用いた電気泳動法で確認し、その上で RNA Nano 6000 Assay Kit of the Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で品質を評価した。シークエンスライブラリーは NEBNext Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, Ipswich, MA, USA) を用いてメーカーの推奨通りに作製し、最終的な PCR 産物を精製した後に、Agilent Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies) で精度確認を行った。シークエンスは HiSeq4000 (Illumina, San Diego, USA) で 150bp ペアエンドリードで行った。RNA シークエンスデータの統計解析は CLC Genomics Workbench 11.0 (QIAGEN) を用いて行い、その際に必要となるリファレンスゲノムとアノテーションデータはいずれも Ensembl

(<http://asia.ensembl.org/info/data/ftp/index.html>) からそれぞれダウンロードし、インポートした。発現変動遺伝子解析は3群間で各ペア毎の検定を行い、false discovery rate (FDR) が 0.05 未満、log2-fold が 2 以上の遺伝子を抽出した。ヒートマップの作成に際しては、発現変動遺伝子解析で作成した発現比較データの中から fragments per kilobase of exon per million reads mapped (FPKM) が 1 を上回る遺伝子を抽出し、そこから変動率の高い 25 種の遺伝子を抽出して作図を行った。

(4) マクロファージおよび fibrocyte におけるマイクロアレイ解析

Hashimoto らが行ったマイクロアレイ解析において、マクロファージと fibrocyte の発現遺伝子プロファイルを比較していることから¹⁷⁾、NCBI GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) でレポジトリデータを用いて両細胞の CHI3L1 発現量を解析した。GEO accession は GSE71290、Data base は GPL570、CHI3L1 の ID は 209395_at であった。

(5) ヒト fibrocyte における CHI3L1 の発現の確認

前述の方法で培養開始した健常ドナーのヒト fibrocyte を、day 4、day 7、day 10 にそれぞれ 0.25%トリプシン EDTA (Wako, Osaka, Japan) で処理し、6 穴プレート上に 1.0×10^5 cells/ml 個ずつ撒いた。48 時間後の細胞をそれぞれ fibrocyte (day 6)、fibrocyte (day 9)、fibrocyte (day 12) とし、培養上清とシャーレに残存する細胞を後述する Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法と quantitative

polymerase chain reaction (qPCR) 法で評価するためそれぞれ回収した。

(6) CHI3L1 のルミネックスアッセイ

52 名の MPN 患者の血清は解析直前まで -20°C の冷凍庫で保存された。血清中の CHI3L1 濃度は Human Luminex Assays (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を用いてメーカーの仕様書に従って測定した。

(7) TPO 受容体作動薬による骨髄線維症マウスモデルの作成

8 週齢の雌の B6 マウス (CLEA Japan, Tokyo, Japan) をコントロール群 ($n = 16$) と Romiplostim (Kyowa Hakko Kirin, Tokyo, Japan) 投与群 (Rom 群、 $n = 16$)に分け、さらにそれぞれを 1 回投与群 ($n = 4$)、2 回投与群 ($n = 8$)、3 回投与群 ($n = 4$)に分類した。コントロール群には生理食塩水を、Rom 群には Rom 1 mg/kg を day 1、day 8 および day 15 に皮下注射した。また、day 8、day 15 および day 22 にイソフルランによる全身麻酔下で tail cutting もしくは心臓採血を行い血清を採取した。その後にそれぞれ安楽死させたのち、2 回投与群の 8 匹ずつについては脾臓、両側脛骨、および両側大腿骨の採取を行った。脾臓の細胞は $40\ \mu\text{m}$ 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³⁷⁾。両側脛骨は、脛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、洗い流すことで骨髄の細胞を回収した。両側大腿骨は 10%中性緩衝ホルマリン液による固定を 24 時間行った

後に、モールス液（22.5% ぎ酸および 10%クエン酸ナトリウム）による脱灰処理を 24 時間行った。パラフィン包埋の後に hematoxylin-eosin (HE) 染色、鍍銀染色および抗 alpha-smooth muscle actin (α -SMA 抗体) (DAKO, Tokyo, Japan) による染色を行い、組織学的評価を行った。骨髄線維化の評価については、European consensus criteria に準拠した²¹⁾。採取した血清は後述する ELISA に、脾臓およ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、後述する qPCR 法にそれぞれ使用した。

(8) Clodronate liposome による単球除去

単球および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 = 6)、Rom 群 (n = 8) および Rom + clodronate liposomes (Formumax, Sunnyvale, CA, USA) (CLs) 群 (n = 6) の 3 群に分けた。Rom 群と Rom + CLs 群には day 1 と day 8 にそれぞれ Rom 1 mg/kg の皮下注射を行った。さらに、Rom + CLs 群には CLs 200 μ l/body を day -1 に、CLs 100 μ l/body を day 3、day 7、day 11、day 14 に腹腔内に投与した。その際、コントロール群と Rom 群には同量の control liposomes (Formumax) を腹腔内に投与した。これらのマウスは day15 に安楽死させたのち、前述の方法で両側脛骨と大腿骨の採取および処理を行った。

(9) 野生型マウス (B6) と *Chi3l1* ノックアウトマウスにおける骨髄線維化誘導実験

骨髄線維化における *Chi3l1* の影響を確認する目的で、野生型マウス (n = 19) と *Chi3l1* ノックアウトマウス (n = 21) に Rom 1 mg/kg を皮下注射して骨髄線維化を誘導した。野生型群 15 匹、ノックアウト群 15 匹はそれぞれ day 1 と day 8 に Rom の投与を行い、day 15 に安楽死させて前述の方法で両側脛骨と大腿骨の採取および処理を行った。野生型群 4 匹、ノックアウト群 6 匹はそれぞれ day 1、day 8、および day 15 に Rom の投与を行い、day 22 に安楽死させて前述の方法で両側大腿骨の採取および処理を行った。

(10) fibrocyte 培養上清の HS-5 への添加実験

前述の方法で培養開始した健常ドナーのヒト fibrocyte を、day 4、day 7、day 10 にそれぞれ 0.25%トリプシン EDTA (Wako) で処理した後に、 2.0×10^5 cells ずつ 6 ウェルプレート上で HS-5 培養用の DMEM 培地 (10% fetal bovine serum、penicillin streptomycin 入り) を用いて培養開始した。48 時間後にそれぞれ day 6、day 9、day 12 時点の fibrocyte の培養上清として回収した。一方で、メーカーの仕様書に従って HS-5 を 2.0×10^5 cells ずつ 6 ウェルプレート上で 24 時間培養した後に、メディアウムを上述の fibrocyte の培養上清に置換した。Day 12 の fibrocyte の培養上清を使用した HS-5 については、中和抗体である抗 CHI3L1 抗体 (Merck Millipore, Burlington, MA, USA)³⁸⁾が HS-5 に及ぼす影響を確認するため 2 ウェルを用意した。抗 CHI3L1 抗体を使用しない day 6、day 9、day 12 のプレートには陰性コントロールとして IgG κ (Beckman Coulter)を、day 12 の抗 CHI3L1 抗体を使用するプレート

には同抗体をそれぞれ 10 µg/ml の濃度になるよう投与した。48 時間後に培養上清を除去した後に、細胞の溶解液を使用して後述する qPCR 法を行った。

(1 1) ヒト fibrocyte の培養上清、およびマウス血清の ELISA 法

前述の方法で回収したヒト fibrocyte の培養上清は Human Chitinase 3-like 1 Quantikine ELISA Kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて、メーカーの仕様書に従って解析した。マウス血清については Mouse Chitinase 3-like 1 Quantikine ELISA Kit (R&D systems) を用いて、メーカーの仕様書に従って解析した。

(1 2) ヒトおよびマウスの qPCR 法

前述の各実験で回収したヒト fibrocyte、マウス脾臓、マウス骨髄、HS-5 を RNeasy Mini Kit (QIAGEN) で総 RNA 抽出を行い、続いて SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で cDNA 合成を行った。これを鋳型として qPCR 法を行い、ヒト fibrocyte については *CHI3L1* を、マウス脾臓については *Chi3l1* の発現を、マウス骨髄については *Chi3l1*、*Coll1a1*、*Col3a1*、*Acta2*、*Fn1*、*Il13r α 2*、*Ptgdr2* の発現を評価した。HS-5 については *COL1A1*、*COL3A1* の発現を評価した。装置は Lightcycler 480 (Roche, Basel, Switzerland) を使用し、CYBR green を用いたインターカレーター法 (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche) で行った。内部標準としてのハウスキーピング遺伝子は *GAPDH*

(ヒト) および *Gapdh* (マウス) を使用し、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法で定量評価を行った。なお、使用したプライマーペアの配列は表 2 の通りである。

(13) 統計解析

(1) の 52 名の MPN 患者の統計解析は後方視的に記述疫学的手法で行われた。群間比較は、Fisher の正確検定、Mann-Whitney 検定で行った。多変量解析は、ロジスティック回帰分析にてステップワイズ法を用いて行った。その他の実験の統計解析は、2 群間の比較は Mann-Whitney 検定で、3 群以上の群間比較は Kruskal-Wallis test 解析後に Steel-Dwass test で群間比較し Bonferroni 補正を行った。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 7.0 (GraphPad Software) 、および JMP version 12.0 (SAS Institute Inc.) を用いた。

第 3 節 結果

(1) CHI3L1 mRNA は fibrocyte の分化と共に発現が増強する

骨髓線維化が生じる過程における fibrocyte の役割を同定するため、fibrocyte の分化の程度で 3 種類の細胞を調整し、RNA シークエンスを行った。前述の方法で発現変動遺伝子解析とヒートマップの作成を行い (図 6a) 、これらの解析の結果、単球よりも fibrocyte で発現が顕著に増強する遺伝子として 13 種類を同定した。さらに、fibrocyte の分化と共に発現増強が確認された遺伝子の 1 つとして CHI3L1 が同定され

た。また、マクロファージと fibrocyte の発現遺伝子プロファイルをマイクロアレイで比較している¹⁷⁾既報のデータを解析したところ、マクロファージとの比較においても CHI3L1 は明らかに高発現であることが確認された (図6b)。次に、RQ-PCR法と ELISA法を用いて細胞数を揃えた条件で mRNA とタンパクの発現を確認したところ、fibrocyte においては時間経過と共に CHI3L1 の発現が増強する傾向が明らかになった (図7)。これらの所見から、RNA シークエンスやマイクロアレイの結果のみならず、fibrocyte の分化に伴い CHI3L1 の mRNA 発現およびタンパク分泌が増加することが示された。

(2) MPN 患者の血清 CHI3L1 の上昇は骨髄線維化の程度を予測する独立した関連因子である

骨髄線維化と血清 CHI3L1 の関連の有無を調べるため、MPN と診断され、かつ骨髄生検における線維化の評価が行われている 52 名 (女性 46.3%) の患者について後方視的な解析を行った (表3)。ヘモグロビン、白血球、血小板の中央値はそれぞれ 13.3 g/dL、 $11.9 \times 10^9 / L$ 、 $56.6 \times 10^9 / L$ であった。遺伝子変異については JAK2V617F が 55.6%、CALR が 14.8%、MPL が 1.9%、triple negative が 27.7% にそれぞれ認められ、診断名は PV が 40.7%、ET が 42.6%、PMF が 16.7% であった。治療は Hydroxyurea が 28.8%、Anagrelide が 1.9%、Ruxolitinib が 3.7% の患者に施行されていた。触知可能な脾腫は 25.0% の患者に確認された。表中の各項目において、MPN without MF 群と MPN with MF 群の間で有意な差を認めたものとして脾腫、血清 LDH 値、血清 CHI3L1 値の

3項目が該当し、その他の項目については両群間で有意な差は認めなかった。また、 P 値が0.1を下回る項目を対象にステップワイズ法で多変量解析を加えたところ、脾腫 ($P < 0.001$)とCHI3L1 ($P = 0.039$) が抽出された。次に、PV、ET、PMFを疾患ごとに線維化の有無で分類すると、pre-PMFとPMFの間にのみ有意な差が認められた (図8a)。また、線維化をgrade毎に分類すると、グレードが上がるに従って血清CHI3L1値が上昇する傾向が明らかになった (図8b)。さらに、骨髄線維化の存在を疑う血清CHI3L1値のカットオフ値を得るためROC曲線の作成を行ったところ、resulting area under the curve (AUC) は0.707であり、カットオフ値を34.4 ng/ μ lに定めた際の感度が63.6%、特異度が76.2%という結果であった (図9)。これらの結果は、血清CHI3L1が骨髄線維化における独立した関連因子であると共に、脾腫と共に評価することで骨髄線維化の存在を予測する有用な指標になり得ることが示唆された。

(3) Romによる骨髄線維症モデルマウスにおいて骨髄中の*Chi3l1* mRNAは増加する

マウスにおいて、骨髄線維化が生じた際の血清、および脾臓や骨髄などの局所における*Chi3l1*の動態を把握するため、我々は前述したRom投与による骨髄線維症モデルを使用した (図10a)。その結果、Romの投与回数に従って血清CHI3L1値が有意に上昇することが明らかとなった ($P < 0.05$) (図10b)。またday 15に犠牲死させたマウスの脾臓と骨髄中におけるmRNAをreal-time PCR法でcontrol群と比較したと

ころ、脾臓では明らかな変化を認めない一方で、骨髄では*Chi3l1*の発現が有意に上昇していた ($P < 0.01$) (図10c,d)。次に、マクロファージ、単球消失時の骨髄におけるmRNAの発現を評価するため、control群、Rom + control liposome群、Rom + CLs群の骨髄を比較した (図11a)。Rom + CLs群においてはRom + control liposome群に比べて鍍銀染色にて明らかな細網線維の減少を認めた (図11b)。次いでreal-time PCR法による骨髄細胞中の比較では、Rom + CLs群において*Chi3l1*のmRNA発現がcontrol群と同程度まで低下していた (図11c)。これらの結果から、Romを用いた骨髄線維化マウスモデルにおいても、骨髄線維化と血清、あるいは骨髄中の*Chi3l1*発現の間に正の相関関係が存在することが示唆された。また、マクロファージや単球における*Chi3l1*の発現は乏しいことから、本実験において認めたCLs投与に伴う*Chi3l1*発現量の低下はfibrocyte減少に起因するものである可能性が高いと考えられた。

(4) *Chi3l1*のノックアウトによりRomによって生じる骨髄線維化が軽減する

骨髄線維化が生じる際のCHI3L1の機能的役割を明らかにするため、我々は*Chi3l1*ノックアウトマウスを用いてRomによる線維化誘導実験を行った。day 15に犠牲死させたマウスのヘモグロビン値、血小板数、脾臓重量を比較したところ、野生型群とノックアウト群各15匹において、両群間で有意な差は認めなかった (図12a, b, c)。一方で、大腿骨の骨髄病理標本の観察においては、野生型群と比較し、ノックアウト群におけるMF gradeが有意に改善し、 α -SMAの発現も低下していた (表4、図13)。

また、骨髄中の細胞外基質のmRNAを計測したところ、ノックアウト群で有意に *Col3a1* と *Acta2* の発現が低下しており ($P < 0.05$)、同時に測定した *Colla1* と *Fnl1* については有意な変化は認めなかった (図14)。Chi3l1の受容体として報告のある *Il-13r α 2* と *Ptgdr2* についても測定を行ったが^{39) 40)}、こちらも有意な変化は認めなかった。これらの結果から、CHI3L1が骨髄線維化を誘導する上で重要な役割を担っており、結果としてコラーゲンなどの細胞外基質産生を促進していると考えられた。

(5) CHI3L1はfibroblastを介した細胞外基質産生の調節に関わっている

細胞外基質の産生を担う fibroblast に対してCHI3L1が及ぼす影響を検討するため、我々はfibroblastの細胞株であるHS-5を用いた実験を行った (図15a)。fibrocyteから分泌されるCHI3L1濃度はその培養時間に依存して上昇することを利用し、day 3、day 6、day 12の3種類の上清を用いてHS-5をそれぞれ48時間培養し、HS-5のmRNAの比較を行った。その結果、day 3やday 6の上清で培養したHS-5に比較してday 12の上清で培養したHS-5は有意に *Colla1* と *Col3a1* の発現上昇を認めた ($P < 0.05$) (図15b,c)。加えて、CHI3L1に対する中和抗体の添加によりday12におけるそれらの発現はday 6と同程度まで減少した。このことから、CHI3L1はfibroblastを介したコラーゲンなどの細胞外基質産生の調節に関わっていることが強く示唆された。

第3節 考察

Fibrocyteの機能を詳細に理解するために、今回我々はヒトfibrocyteの各分化段階のRNAを用いてRNAシーケンスによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、fibrocyteの分化に伴ってCHI3L1の発現が顕著に増強していることを見出した。

CHI3L1はキチン様の水溶性タンパクの1種である。キチナーゼとキチナーゼ様タンパク (CLPs)は共に糖質加水分解酵素ファミリー18に属しており、キチナーゼはキチンを開裂させる酵素活性を所持する一方で、CLPsはその活性を所持していない⁴¹⁾。CHI3L1はCLPsの1種であり、ヒトにおいてはYKL-40、マウスにおいてはBRP-39という名称で主に称される。内因性のキチンやその合成は哺乳類で行われていないにも関わらず、CHI3L1は種々の臓器に発現していることが知られており、その産生も好中球、マクロファージ、軟骨細胞、滑膜細胞、平滑筋細胞、上皮細胞、腫瘍細胞など多くの種類の細胞で認められる⁴²⁻⁴⁴⁾。炎症、細胞外組織のリモデリング、臓器の線維化などとの関わりが指摘されている他、Th2細胞による獲得免疫反応の重要な調節因子であるとの報告もある⁴⁴⁻⁴⁷⁾。また、骨髄増殖性腫瘍 (MPN) においても、PMFの患者はPVやETの患者と比較して血中のCHI3L1値が有意に増加していたとの報告が存在する⁴⁸⁾。

これらの知見に基づき、我々はfibrocyteで高発現するCHI3L1が骨髄線維化の発症機序においても明確な役割を担っているとの仮説を立てた。この仮説を検証するため、MPNと診断された患者におけるCHI3L1測定の意義についての後方視的解析、およびRomを用いた骨髄線維症モデルにおける実験を行い、CHI3L1と骨髄線維症

の関連を見出すことに成功した。さらに、HS-5というヒト骨髄由来のfibroblastの細胞株³⁶⁾に対するfibrocyte培養上清の添加実験も行い、fibrocyteとfibroblastの関連についても検討を加えた。

これまで多数の報告により、免疫組織化学的に臓器中のマクロファージにCHI3L1が発現していることが証明されており、CHI3L1はマクロファージへの分化を証明するマーカーの1つともとらえられてきた^{49,50)}。そのため、CHI3L1を介した線維化反応の中心にはマクロファージが存在すると考えるのが一般的かもしれない。

一方で、今回の我々の研究はfibrocyteと単球におけるRNAシーケンスを用いた発現遺伝子の比較、およびfibrocyteとマクロファージにおけるマイクロアレイ法を用いた遺伝子発現プロファイルの比較においてCHI3L1の発現差があることに端を発し、fibrocyteとCHI3L1発現の関連に着目して実施された。今回のTPO受容体作動薬を用いた骨髄線維症モデルにおいては、CHI3L1の主な供給源となっているのはfibrocyteであると考えられる結果を得た。また、CLsを投与した骨髄線維症モデルにおいて線維化の改善と共に骨髄中のChi3l1のmRNA発現が低下していたことも、fibrocyteとCHI3L1の関わりを支持する所見の一つといえる。

CHI3L1の主な産生細胞を特定する際の1つの障壁として、fibrocyteの発現するマーカーの多様性が挙げられる。fibrocyteは培養時のその特徴的な形態で識別が容易な細胞であるが、間質細胞に特徴的なマーカー (collagen I、procollagenおよびcollagen III) および造血細胞のマーカー (CD45、CD34、CD11b、およびCD68) の

両方を発現している^{12, 51, 52)}。これらは全て非特異的なマーカーであり、病理組織標本上はマクロファージとの区別は困難であることから、線維化へのマクロファージの関与を示した一部は、我々が言及するfibrocyteと同様の性質を持つ細胞がマクロファージとして報告された可能性もある。

各臓器の線維化においてCHI3L1の関与が報告されているが、その詳細な分子生物学的機序は未だ明らかになっていない。Heらは酵母を用いたツーハイブリッド法でCHI3L1の受容体が主にマクロファージの細胞膜に局在して発現するinterleukin-13 receptor α 2 (IL-13R α 2) であり、これを介してマクロファージのmitogen-activated protein kinaseシグナルやAktシグナルの経路を活性化させ、結果的にアポトーシス、TGF- β 1産生などを引き起こすことを報告した³⁹⁾。しかし、IL-13R α 2遺伝子をノックアウトしてもTGF- β 1の産生抑制は限定的であったことから、CHI3L1を起点とする反応は単独の経路で説明できるものではないことを示唆している³⁹⁾。一方で、腎臓の虚血再灌流マウスモデルにおいてCHI3L1がmyofibroblastの活性化を促し腎臓の線維化が生じるというMontgomeryらの報告や⁴⁰⁾、特発性肺線維症マウスモデルにおいてCHI3L1がfibroblastの増殖やmyofibroblastへの形質変換をもたらすというZhouらの報告がある⁵³⁾。これらの報告を参考にCHI3L1含有メディアウムによるfibroblastの培養実験を行ったところ、我々はCHI3L1がfibroblastの細胞外基質産生の調節に直接関わっていることを示唆する所見を得ることができた。

骨髄の線維化についてはCHI3L1の役割に言及した報告は極めて少ない。唯一確認できたBjornらの報告ではPMFの患者の血清CHI3L1がPVやETの患者と比較して

有意に増加していたことを指摘しているものの⁴⁸⁾、*JAK2V617F*変異をはじめとした遺伝子変異の存在や骨髄線維化の有無や程度について言及されていない。したがって、骨髄線維化という病態にCHI3L1が関与することをヒト、マウスの両面から指摘したのは本研究が初となる。

最後に、本研究が抱える今後の課題として、従来の骨髄線維症の発症機序として挙げられる巨核球やTGF- β などとの関連についても追求すべき点が挙げられる。また、骨髄線維症モデルマウスについても、Romを用いたモデル単独での評価となっていることから、複数のモデルマウスを用いた確認も必要と考えられる。これらの課題を解決した上で、従来pan-chitinase inhibitorとして報告されてきたカフェイン、あるいはその他のinhibitorの候補となる薬物を用いて、CHI3L1を標的とした治療対策を検討していくことが求められる。

第5節 小括

当院のMPN患者52名を対象に行った後方視的解析において、血清CHI3L1は骨髄線維化における独立した関連因子であることが示された。また、*Chi3l1*のノックアウトマウスやヒトfibroblastの細胞株を用いた実験の結果から、CHI3L1がfibroblastからの細胞外基質産生を調節し、骨髄線維化の進行を促す重要な因子であることが明らかになった。

第4章 考察

2014年から国内でも*JAK2*阻害薬がPMFの治療薬として発売開始となったが、全身倦怠感や脾腫の改善は得られる一方で、骨髄線維化の改善や、汎血球減少からの造血回復が得られる例は乏しい。依然として根治的治療は骨髄移植のみという状況であり、骨髄線維化の機序の解明とそれに対応する分子標的治療の開発は急務である。

近年の報告や我々の研究成果でfibrocyteが骨髄線維症における治療標的と成り得ることを示唆していることから、我々はDNAマイクロアレイ法とRNAシーケンス法といった網羅的遺伝子解析を通じてfibrocyteが発現する標的分子の検索を行う方針とした。その結果、SLAMF7とCHI3L1に注目するに至り、骨髄線維化に関わる一連の研究成果を得ることができた。

SLAMF7をターゲットとしたEloに関しては、NOGマウスを用いてヒト細胞を移植したキメラマウスにおいて骨髄線維化と脾腫の明らかな改善を認めており、ヒトに対する効果も十分に期待される。また、今回得られた統計学的解析の結果から、SLAMF7^{high} CD16⁻単球の割合が*JAK2V617F*のallele burdenを反映することが示唆された。そのため、SLAMF7^{high} CD16⁻単球割合は、Eloを使用する患者選定に際しての有用な指標となることも明らかになった。今後はEloの安全性及び有効性を検証する臨床試験の実現に向けた更なる調整と検討が求められる。

CHI3L1に関しても、ノックアウトマウスを用いた実験で線維化の改善が認められ、CHI3L1が骨髄線維化の誘導に重要な役割を果たす可能性が示されたことから、

今後CHI3L1を標的とした治療の開発に進展していく可能性が存在する。また、自施設における後方視的な解析であるものの、血中のCHI3L1の測定が骨髄線維化を伴う患者をスクリーニングする上で有用であることが示唆されたため、検査項目として確立する展望も期待出来る。一方で、Chitinase inhibitorの合成と動物モデルにおける有効性に関わる報告は数例認めるものの^{54,55)}、臨床試験にまで発展させた報告は皆無であることから、今後は適切なCHI3L1阻害薬の検討を主体とした基礎実験の蓄積が求められる。

第5章 結論

fibrocyte が骨髄線維症に関わる機序について研究を行った。その結果、fibrocyte における SLAMF7 と CHI3L1 が骨髄線維症の発症及び進行に際して重要な役割を担っていることを明らかにした。今後は新たな診断マーカーや治療標的としての展開が期待される。

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を賜りました防衛医科大学校内科学講座助教 大澤有紀子先生、部隊医学実験隊 前川隆彰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、免疫微生物学講座の皆さまに謝意を表します。

略語一覧

α -SMA: alpha-smooth muscle actin

B6: C57BL/6

BM: bone marrow

CALR: calreticulin

CHI3L1: chitinase 3-like 1

CLs: clodronate liposomes

DDW: deionized distilled water

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

Elo: elotuzumab

ET: essential thrombocythemia

FACS: fluorescence activated cell sorting

HE: hematoxylin-eosin

IL: interleukin

JAK2: Janus activating kinase 2

MF: myelofibrosis

MM: molecular marker

MPL: myeloproliferative leukemia

MPN: myeloproliferative neoplasm

PBS: phosphate-buffered saline

PMF: primary myelofibrosis

qPCR: quantitative polymerase chain reaction

Rom: romiplostim

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SAP: serum amyloid P

SLAMF7: signaling lymphocyte activation molecule family 7

TGF- β : transforming growth factor beta

TPO: thrombopoietin

引用文献

1. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014; 28: 1472-7.
2. Hitchcock IS and Kaushansky K. Thrombopoietin from beginning to end. *Br J Haematol*. 2014; 165: 259-68.
3. Skoda RC, Duek A and Grisouard J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Exp Hematol*. 2015; 43: 599-608.
4. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016; 127: 1307-16.
5. Ku H, Yonemura Y, Kaushansky K and 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: 4544-51.
6. Villeval JL, Cohen-Solal K, Tulliez M, et al. High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood*. 1997; 90: 4369-83.
7. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006; 3: e270.

8. Kuter DJ, Mufti GJ, Bain BJ, Hasserjian RP, Davis W and Rutstein M. Evaluation of bone marrow reticulin formation in chronic immune thrombocytopenia patients treated with romiplostim. *Blood*. 2009; 114: 3748-56.
9. Maekawa T, Osawa Y, Izumi T, et al. Myeloproliferative leukemia protein activation directly induces fibrocyte differentiation to cause myelofibrosis. *Leukemia*. 2017; 31: 2709-16.
10. Pilling D, Buckley CD, Salmon M and Gomer RH. Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P. *J Immunol*. 2003; 171: 5537-46.
11. Verstovsek S, Manshouri T, Pilling D, et al. Role of neoplastic monocyte-derived fibrocytes in primary myelofibrosis. *J Exp Med*. 2016; 213: 1723-40.
12. Pilling D, Fan T, Huang D, Kaul B and Gomer RH. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS One*. 2009; 4: e7475.
13. Mehrad B and Strieter RM. Fibrocytes and the pathogenesis of diffuse parenchymal lung disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012; 5: S22.
14. Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol*. 2006; 45: 429-38.
15. Reich B, Schmidbauer K, Rodriguez Gomez M, et al. Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model. *Kidney Int*. 2013; 84: 78-89.
16. Reilkoff RA, Bucala R and Herzog EL. Fibrocytes: emerging effector cells in

chronic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11: 427-35.

17. Hashimoto M, Nasser H, Bhuyan F, et al. Fibrocytes Differ from Macrophages but Can Be Infected with HIV-1. *J Immunol*. 2015; 195: 4341-50.

18. Jakubowiak A, Offidani M, Pegourie B, et al. Randomized phase 2 study: elotuzumab plus bortezomib/dexamethasone vs bortezomib/dexamethasone for relapsed/refractory MM. *Blood*. 2016; 127: 2833-40.

19. Maekawa T, Kato S, Kawamura T, et al. Increased SLAMF7^{high} monocytes in myelofibrosis patients harboring JAK2V617F provide a therapeutic target of elotuzumab. *Blood*. 2019; 134: 814-25.

20. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127: 2391-405.

21. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J and Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005; 90: 1128-32.

22. Morishita S, Komatsu N, Kirito K, et al. Alternately binding probe competitive PCR as a simple, cost-effective, and accurate quantification method for JAK2V617F allele burden in myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res*. 2011; 35: 1632-6.

23. Rapado I, Albizua E, Ayala R, et al. Validity test study of JAK2 V617F and allele burden quantification in the diagnosis of myeloproliferative diseases. *Ann Hematol*. 2008;

87: 741-9.

24. Takei H, Morishita S, Araki M, et al. Detection of MPLW515L/K mutations and determination of allele frequencies with a single-tube PCR assay. *PLoS One*. 2014; 9: e104958.
25. Shirane S, Araki M, Morishita S, et al. JAK2, CALR, and MPL mutation spectrum in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2015; 100: e46-8.
26. Pilling D, Vakil V and Gomer RH. Improved serum-free culture conditions for the differentiation of human and murine fibrocytes. *J Immunol Methods*. 2009; 351: 62-70.
27. Cannons JL, Tangye SG and Schwartzberg PL. SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29: 665-705.
28. Hsi ED, Steinle R, Balasa B, et al. CS1, a potential new therapeutic antibody target for the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 2775-84.
29. Tai YT, Dillon M, Song W, 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: 1329-37.
30. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014; 123: 1544-51.
31. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A and Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a

critical reappraisal. *Leukemia*. 2008; 22: 1299-307.

32. Misawa K, Yasuda H, Araki M, et al. Mutational subtypes of JAK2 and CALR correlate with different clinical features in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol*. 2018; 107: 673-80.

33. Zahr AA, Salama ME, Carreau N, et al. Bone marrow fibrosis in myelofibrosis: pathogenesis, prognosis and targeted strategies. *Haematologica*. 2016; 101: 660-71.

34. Mesa RA, Tefferi A, Elliott MA, 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: 111-3.

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

36. Roecklein BA and Torok-Storb B. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. *Blood*. 1995; 85: 997-1005.

37. Crawford JR, Pilling D and Gomer RH. Improved serum-free culture conditions for spleen-derived murine fibrocytes. *J Immunol Methods*. 2010; 363: 9-20.

38. Faibish M, Francescone R, Bentley B, Yan W and Shao R. A YKL-40-neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers. *Mol Cancer Ther*. 2011; 10: 742-51.

39. He CH, Lee CG, Dela Cruz CS, et al. Chitinase 3-like 1 regulates cellular and

tissue responses via IL-13 receptor alpha2. *Cell Rep.* 2013; 4: 830-41.

40. Montgomery TA, Xu L, Mason S, et al. Breast Regression Protein-39/Chitinase 3-Like 1 Promotes Renal Fibrosis after Kidney Injury via Activation of Myofibroblasts. *J Am Soc Nephrol.* 2017; 28: 3218-26.
41. Lee CG, Da Silva CA, Dela Cruz CS, et al. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu Rev Physiol.* 2011; 73: 479-501.
42. Funkhouser JD and Aronson NN, Jr. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evol Biol.* 2007; 7: 96.
43. Bussink AP, Speijer D, Aerts JM and Boot RG. Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics.* 2007; 177: 959-70.
44. Lee CG, Hartl D, Lee GR, et al. Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *J Exp Med.* 2009; 206: 1149-66.
45. Johansen JS. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. *Dan Med Bull.* 2006; 53: 172-209.
46. Knudsen LS, Ostergaard M, Baslund B, et al. Plasma IL-6, plasma VEGF, and serum YKL-40: relationship with disease activity and radiographic progression in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab and methotrexate. *Scand J Rheumatol.* 2006; 35: 489-91.

47. Recklies AD, White C and Ling H. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem J.* 2002; 365: 119-26.
48. Bjorn ME, Andersen CL, Jensen MK and Hasselbalch HC. Circulating YKL-40 in myelofibrosis a potential novel biomarker of disease activity and the inflammatory state. *Eur J Haematol.* 2014; 93: 224-8.
49. Rehli M, Niller HH, Ammon C, et al. Transcriptional regulation of CHI3L1, a marker gene for late stages of macrophage differentiation. *J Biol Chem.* 2003; 278: 44058-67.
50. Rehli M, Krause SW and Andreesen R. Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation. *Genomics.* 1997; 43: 221-5.
51. Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R and Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol.* 2001; 166: 7556-62.
52. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M and Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med.* 1994; 1: 71-81.
53. Zhou Y, Peng H, Sun H, et al. Chitinase 3-like 1 suppresses injury and promotes fibroproliferative responses in Mammalian lung fibrosis. *Sci Transl Med.* 2014; 6: 240ra76.
54. Hirose T, Sunazuka T and Omura S. Recent development of two chitinase

inhibitors, Argifin and Argadin, produced by soil microorganisms. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010; 86: 85-102.

55. Mazur M, Olczak J, Olejniczak S, et al. Targeting Acidic Mammalian chitinase Is Effective in Animal Model of Asthma. *J Med Chem.* 2018; 61: 695-710.

表 1 健康ドナーおよび骨髄増殖性腫瘍患者の患者背景

variables	Number of patients (%)		
	Healthy controls (n = 21)	MPN MF(-) (n = 21)	MPN MF(+) (n = 37)
Age (years), median (range)	41 (30-61)	69 (24-85)	72 (40-86)
Gender			
Male	5 (23.8%)	8 (38.1%)	19 (51.4%)
Female	16 (76.2%)	13 (61.9%)	18 (48.6%)
Genetic mutation			
JAK2	ND	9 (42.9%)	19 (51.4%)
CALR	ND	2 (9.5%)	7 (18.9%)
MPL	ND	0 (0.0%)	1 (2.7%)
Triple negative	ND	10 (47.6%)	10 (27.0%)
Primary disease			
PV		9 (42.9%)	14 (37.8%)
ET		11 (52.4%)	12 (32.4%)
PMF		1 (4.8%)	11 (29.7%)
Medication			
Hydroxyurea		7 (33.3%)	8 (21.6%)
Anagrelide		0 (0.0%)	1 (2.7%)
Ruxolitinib		0 (0.0%)	2 (4.3%)
No medication		14 (66.7%)	26 (70.3%)
Splenomegaly			
Present		0 (0.0%)	16 (43.2%)
Absent		21 (100.0%)	21 (56.8%)

略語: CALR, calreticulin; JAK2, Janus Activating Kinase 2; MF, myelofibrosis; MPL, myeloproliferative leukemia; MPN, myeloproliferative neoplasm; ND, not done

表 2 使用プライマー配列表

ヒト		sequence (5'-3')
<i>CHI3L1</i>	forward	GATGTGACGCTCTACGGCAT
	reverse	TGATGAAAGTCCGGCGACTC
<i>COL1A1</i>	forward	GAGGGCCAAGACGAAGACATC
	reverse	CAGATCACGTCATCGCACAAAC
<i>COL3A1</i>	forward	TTGAAGGAGGATGTTCCCATCT
	reverse	ACAGACACATATTTGGCATGGTT
<i>GAPDH</i>	forward	TCTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC
	reverse	AGTTAAAAGCAGCCCTGGTGA
マウス		sequence (5'-3')
<i>Chi3l1</i>	forward	CCAACACTGAGAGACGCACT
	reverse	GGCTGGACCTCCTTTGTGAA
<i>Colla1</i>	forward	GACGCATGGCCAAGAAGACA
	reverse	CCTCGGGTTTCCACGTCTC
<i>Col3a1</i>	forward	CTGTAACATGGAAACTGGGGAAA
	reverse	CCATAGCTGAACTGAAAACCACC
<i>Acta2</i>	forward	CCCAGACATCAGGGAGTAATGG
	reverse	TCTATCGATACTTCAGCGTCA
<i>Fn1</i>	forward	ATGTGGACCCTCCTGATAGT
	reverse	GCCCAGTGATTTTCAGCAAAGG
<i>Il13ra2</i>	forward	ACCGAAATGTTGATAGCGACAG
	reverse	ACAATGCTCTGACAAATGCGTA
<i>Ptgdr2</i>	forward	CTCAGTCCTGCTGCTTTCAGA
	reverse	GACTGATCGGGTGTGCTGAT
<i>Gapdh</i>	forward	TGGAGAAACCTGCCAAGTATGAT
	reverse	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGA

表 3 骨髓増殖性腫瘍患者の患者背景と解析結果

Variables	Number of patients (%)		P value	
	MPN MF(-) (n = 21)	MPN MF(+) (n = 31)	Univariate	Multivariate
Age (years); median (range)	65 (24-85)	69 (40-86)	0.361	
Gender			0.305	
Male	8 (38.1%)	19 (61.3%)		
Female	13 (61.9%)	12 (38.7%)		
Hemoglobin, g/dL; median (range)	14.1 (11.1-17.8)	12.7 (6.0-18.8)	0.088	
Leukocytes, $\times 10^9/L$; median (range)	8.6 (5.5-17.5)	14.0 (2.8-60.3)	0.09	
Platelets, $\times 10^9/L$; median (range)	57.6 (17.0-130.7)	56.1 (6.5-176.7)	0.888	
Genetic mutation			0.903	
JAK2	12 (57.1%)	17 (54.8%)		
CALR	2 (9.5%)	6 (19.4%)		
MPL	0 (0.0%)	1 (3.2%)		
Triple negative	7 (33.3%)	7 (22.6%)		
Primary disease			0.189	
PV	9 (42.9%)	12 (38.7%)		
ET	11 (52.4%)	11 (35.5%)		
PMF	1 (4.8%)	8 (25.8%)		
Medication				
Hydroxyurea	7 (33.3%)	8 (32.3%)	0.394	
Anagrelide	0 (0.0%)	1 (3.2%)	1	
Ruxolitinib	0 (0.0%)	2 (6.5%)	0.52	
No medication	14 (66.7%)	20 (64.5%)	0.891	
Splenomegaly	0 (0.0%)	13 (41.9%)	<0.001	<0.001
LDH, U/L; median (range)	212.7 (149-291)	381.9 (149-1945)	0.046	
CRP, mg/dL; median (range)	0.36 (0.3-1.0)	1.37 (0.3-20.1)	0.357	
CHI3L1, pg/nL; median (range)	30 (4.7-108.3)	71.0 (6.0-187.1)	0.024	0.04

略語: CALR, calreticulin; CHI3L1, chitinase 3 like 1; JAK2, Janus activating kinase 2; MF, myelofibrosis; MPL, myeloproliferative leukemia; MPN, myeloproliferative neoplasm

群間比較は、Fisher 検定、Mann-Whitney 検定で行い、多変量解析はロジスティック回帰分析にてステップワイズ法を用いて行った。

MPN without MF 群と MPN with MF 群の間で有意な差を認めたものとして脾腫、血清 LDH 値、血清 CHI3L1 値の 3 項目が該当した。多変量解析として P 値 0.05 を基準としたロジスティック回帰モデルを作成したところ、脾腫 ($P < 0.001$)と CHI3L1 ($P = 0.040$)が抽出された。

表 4 野生型マウスと *Chi3ll* ノックアウトマウスに対する骨髄線維化誘導後の MF grade の比較

MF grade	Number of patients			
	Day15**		Day22*	
	WT (n = 15)	KO (n = 15)	WT (n = 4)	KO (n = 6)
MF-0	0	2	0	1
MF-1	0	8	0	4
MF-2	14	5	4	1
MF-3	1	0	0	0

略語: KO, knock out; MF, myelofibrosis; WT, wild type

MF grade の統計学的有意差は Mann-Whitney 検定で行った。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 。

ノックアウトマウス群では明らかな線維化の低減が認められた。

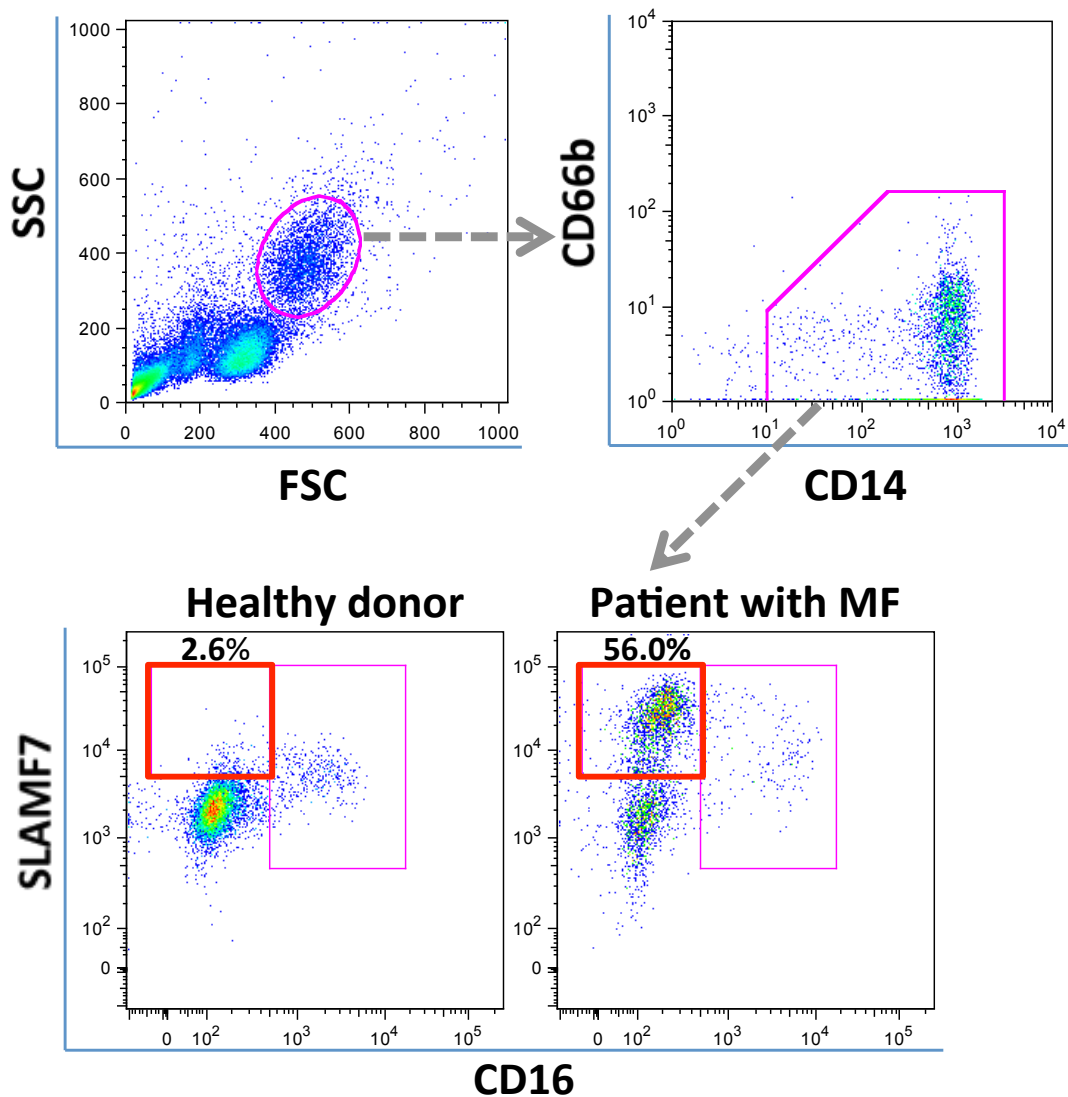


図 1 健常ドナーおよび骨髄線維症患者における末梢血単球中の表面抗原解析。CD14⁺ CD66b⁻の分画を単球とみなし、SLAMF7 と CD16 で展開した。骨髄線維化を伴う MPN の患者 (Patient with MF) で、SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球分画の著明な増加を認めた。

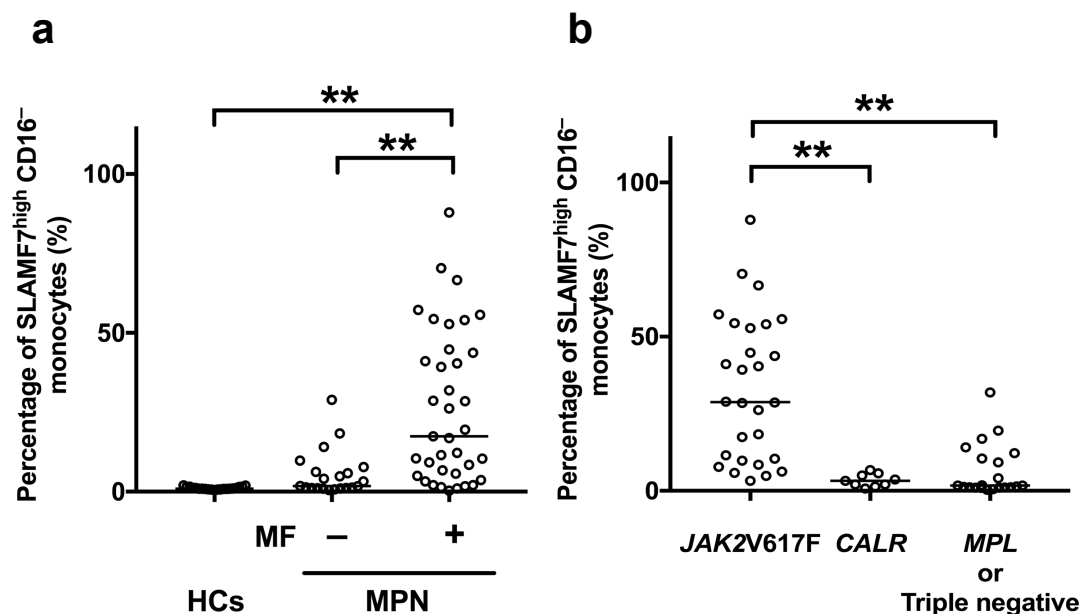


図2 末梢血中の SLAMF7^{high} CD16⁻単球分画と各種患者背景との関連。(a) 健常ドナー (n = 21)、MPN without MF (n = 21)、および MPN with MF (n = 37) の各群における SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球分画の比較。健常ドナーと MPN without MF の群に比較して、MPN with MF の群では SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球の割合が有意に増加していた。(b) MPN 患者の各変異遺伝子間 (*JAK2V617F*、*CALR*、および *MPL* + triple negative) で比較したサブグループ解析。*CALR* 群 (n = 9) と *MPL*+ triple negative 群 (n = 21) に比較して、*JAK2V617F* 群 (n = 28) で有意に SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球の割合が増加していた。**P* < 0.05、***P* < 0.01。

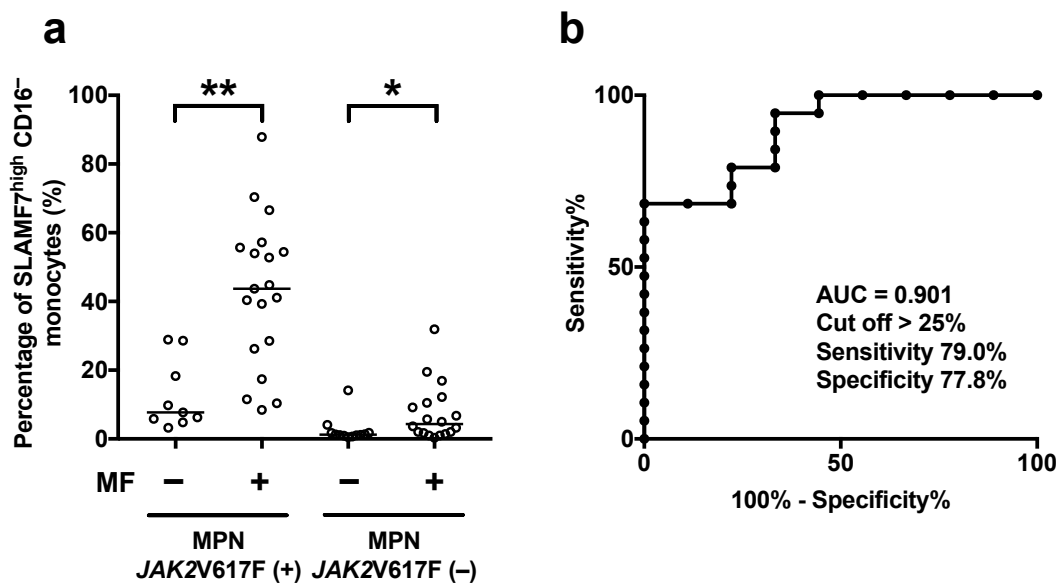


図 3 *JAK2V617F* 変異の有無によるサブグループ解析。(a) 末梢血中の *SLAMF7*^{high} *CD16*⁻ 単球分画を *JAK2V617F* 変異の有無と骨髄線維化の有無で分類して比較した。変異の有無に関わらず骨髄線維化があると *SLAMF7*^{high} *CD16*⁻ 単球分画は有意に増加していたが、*JAK2* 変異を伴う患者でより顕著であった。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 。(b) *JAK2V617F* 変異を伴う MPN の患者において、線維化の有無と *SLAMF7*^{high} *CD16*⁻ 単球分画割合の 2 変数を用いて ROC 曲線を作成した。*SLAMF7*^{high} *CD16*⁻ 単球割合のカットオフ値を 25%とした際の AUC が 0.901 となり、線維化発症を予測する際の感度、特異度がそれぞれ 79.0%、77.8%であった。

略語: ROC, receiver operating characteristic

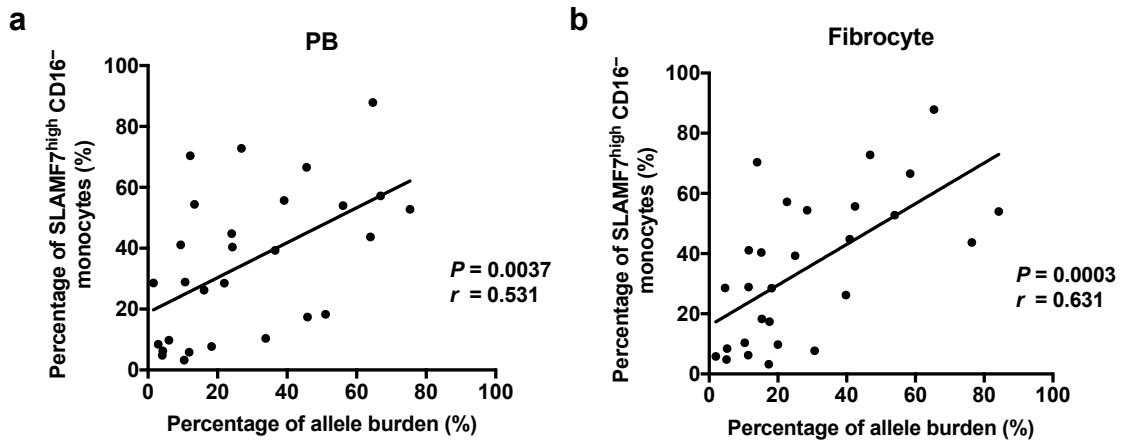


図 4 SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球と *JAK2* allele burden の相関。(a) 末梢血中の SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球割合と末梢血単核球中の *JAK2* allele burden の間には正の相関が認められた ($r = 0.531$, $P = 0.0037$)。(b) SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球と fibrocytes 中の *JAK2* allele burden の間には正の相関が認められた ($r = 0.631$, $P = 0.0003$)。
略語: PB, peripheral blood

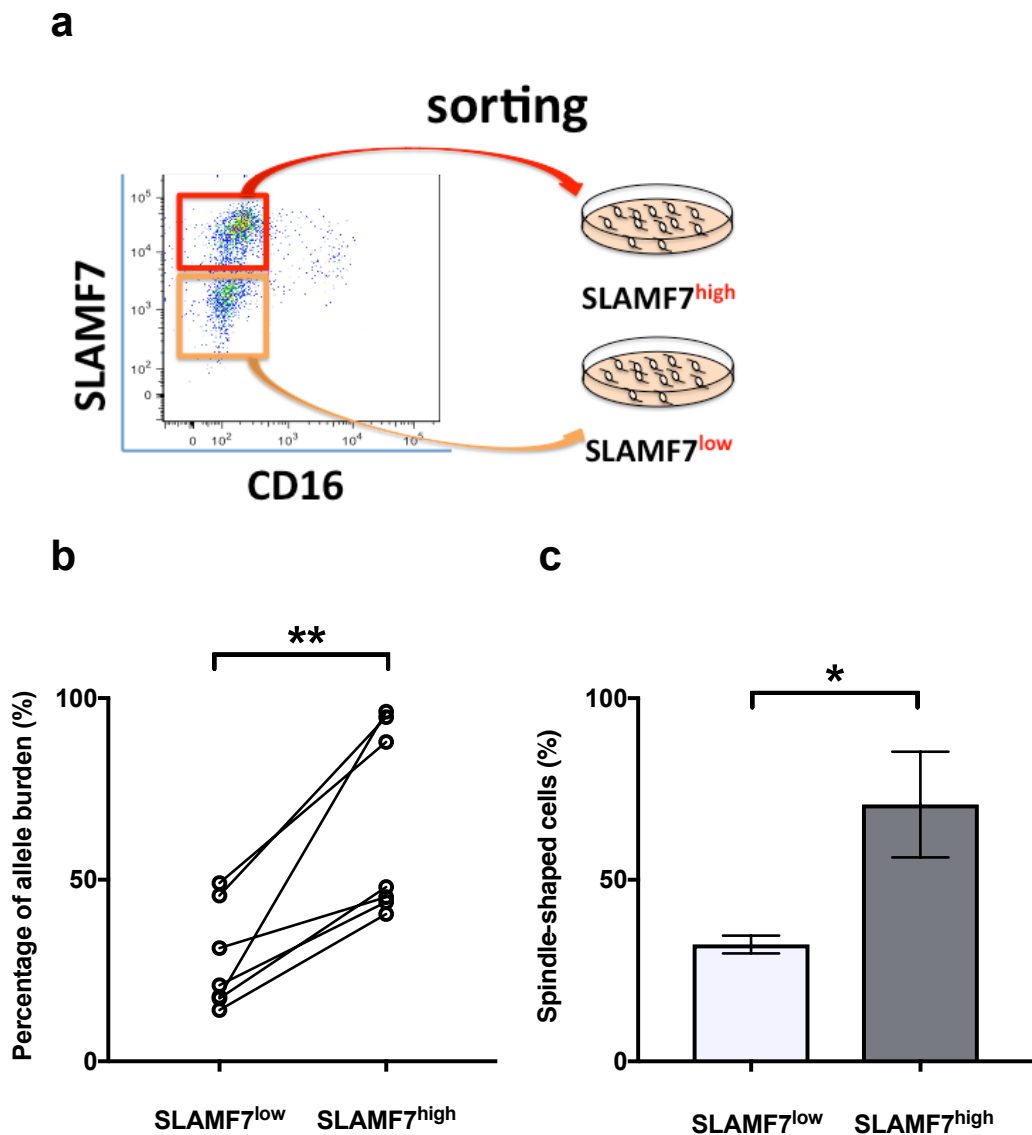


図5 SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球と SLAMF7^{low} CD16⁻ 単球のソーティング実験。
 (a) ソーティング実験の簡単なシェーマ説明。(b) 両分画の *JAK2V617F* allele burden の比較。SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球の allele burden は SLAMF7^{low} CD16⁻ 単球に比較して有意に上昇していた。(c) ソーティングした SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球と SLAMF7^{low} CD16⁻ 単球の培養アッセイ。SLAMF7^{low} CD16⁻ 単球に比較して SLAMF7^{high} CD16⁻ 単球は有意に fibrocytes へ分化した率が高かった。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

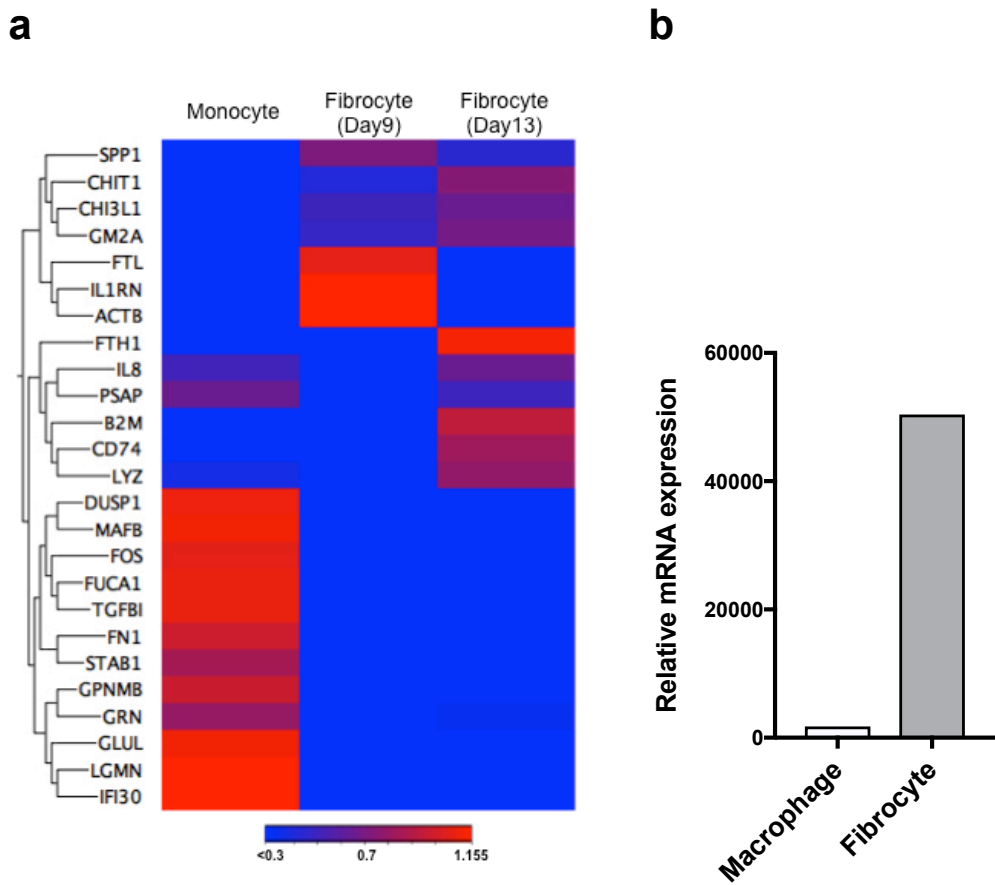


図 6 網羅的遺伝子発現解析結果。(a) ヒト単球および fibrocyte の RNA シークエンス解析結果。fibrocyte の分化と共に発現増強が確認された遺伝子の 1 つとして、CHI3L1 が同定された。(b) マクロファージと fibrocyte における CHI3L1 の発現解析結果。Hashimoto らが 2015 年に公表したマイクロアレイ解析を用いて、マクロファージと fibrocyte における CHI3L1 の発現量を比較した結果、明らかに fibrocyte における CHI3L1 発現が上昇していた。

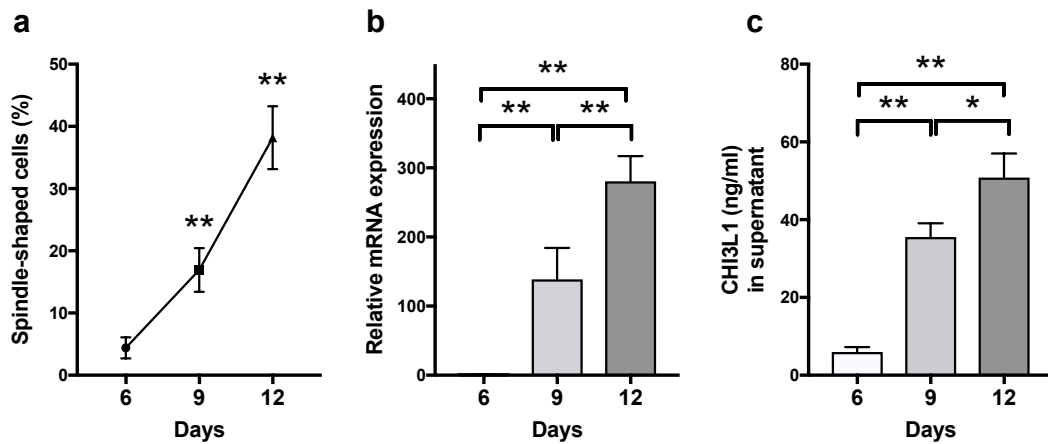


図7 ヒト fibrocyte における CHI3L1 の定量評価。(a) ヒト fibrocyte の培養アッセイ。時間経過と共に単球から fibrocyte への分化が認められた。(b) real-time PCR 法による fibrocyte の CHI3L1 mRNA の発現定量。時間経過と共に有意に CHI3L1 mRNA の発現が増加した。内在性コントロールとして GAPDH を使用した。(c) ELISA 法による fibrocyte の培養上清中の CHI3L1 タンパク定量。fibrocyte の mRNA と同様、時間経過と共に有意に上清中への CHI3L1 分泌の増加を認めた。
* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

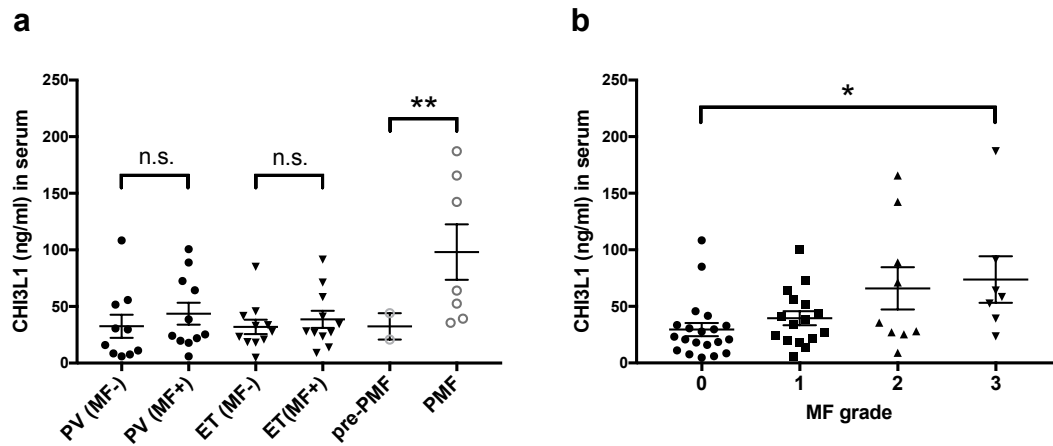


図8 血清 CHI3L1 と各種患者背景との関連。(a) PV、ET、PMF を疾患ごとに線維化の有無で分類すると、pre-PMF と PMF との間にも有意な差が認められた。(b) 線維化を各 grade 毎に分類すると、グレードが上がるに従って血清 CHI3L1 値が上昇する傾向が認められた。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

略語: ET, essential thrombocythemia; MF, myelofibrosis; PMF, primary myelofibrosis; PV, polycythemia vera

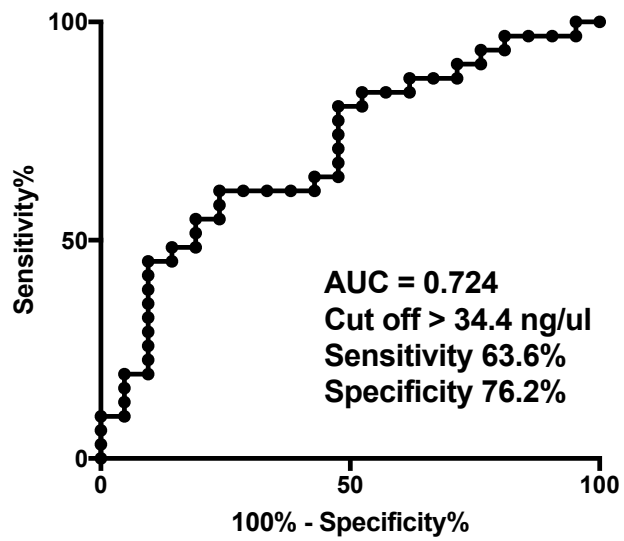
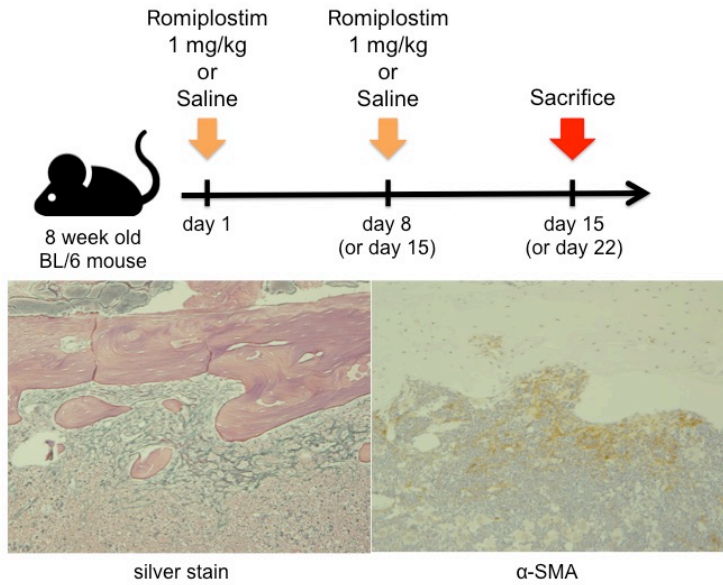
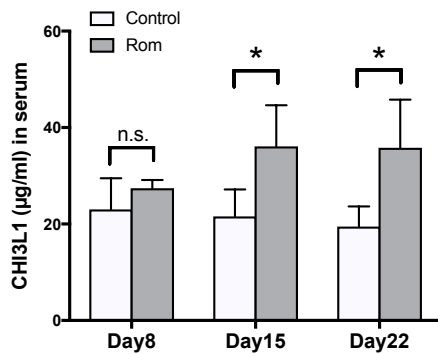


図9 線維化の有無と血清 CHI3L1 値の2変数を用いて作成したROC曲線。血清 CHI3L1 のカットオフ値を 34.4 ng/μl とした際の AUC が 0.724 となり、線維化の有無を予測する際の感度、特異度がそれぞれ 63.6%、76.2%であった。

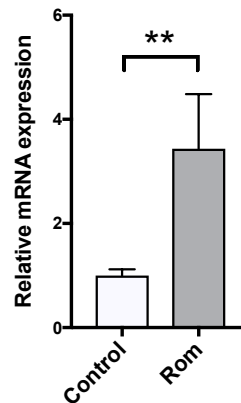
a



b



c



d

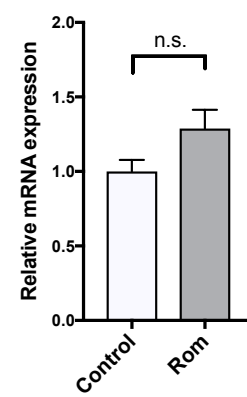


図 10 TPO 受容体作動薬による骨髄線維症モデルマウスの作成と血清、骨髄、脾臓における *Chi3L1* の定量評価。(a) Rom の投与スケジュールと骨髄線維症モデルマウスの大腿骨の組織像。鍍銀染色で黒色の細網線維の増生を認めた。(b) モデルマウスの血清 *Chi3L1* 値。Rom を 2 回、あるいは 3 回投与したマウスはコントロール群に比較して有意に血清 *Chi3L1* 値の上昇を認めた。(c) real-time PCR 法による骨髄細胞中の *Chi3L1* mRNA の発現定量。コントロール群に比較して Rom 群は有意に *Chi3L1* mRNA 発現の増加を認めた。(d) real-time PCR 法による脾臓細胞中の *Chi3L1* mRNA の発現定量。コントロール群と Rom 群で有意な差は認めなかった。内在性コントロールとして *Gapdh* を使用した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

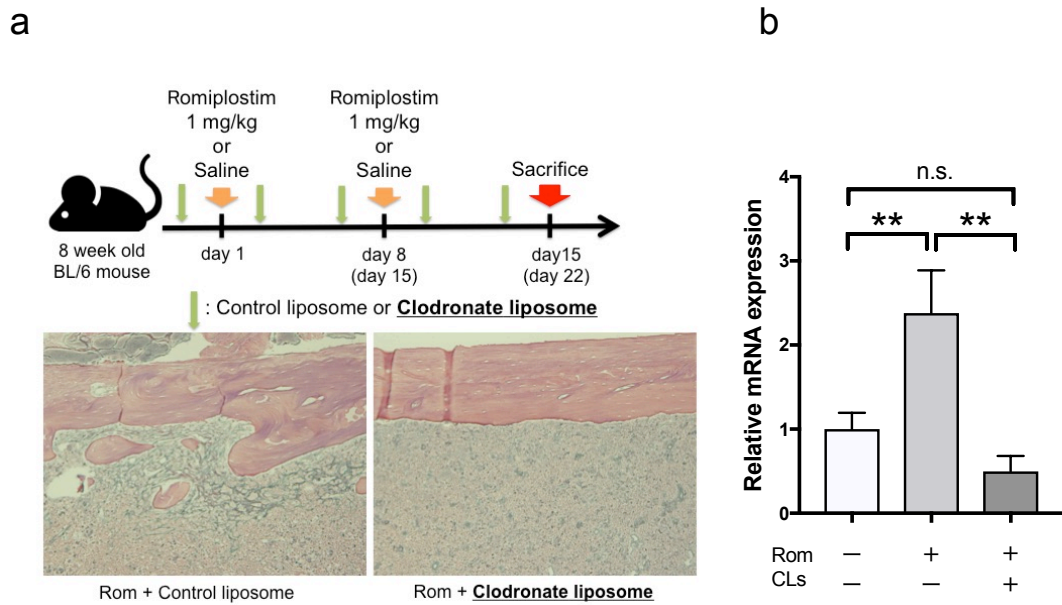


図 11 TPO 受容体作動薬による骨髄線維症モデルマウスの作成と Clodroliposome (CLs) による単球除去。(a) Rom および CLs の投与スケジュールと骨髄線維症モデルマウスの大腿骨の組織像。CLs 投与群では鍍銀染色で明らかな細網線維の減少を認めた。(b) real-time PCR 法による骨髄細胞中の *Chi311* mRNA の発現定量。Rom + CLs 群においてはコントロール群と同程度に骨髄中の *Chi311* の mRNA が低下した。内在性コントロールとして *Gapdh* を使用した。
** $P < 0.01$ 。

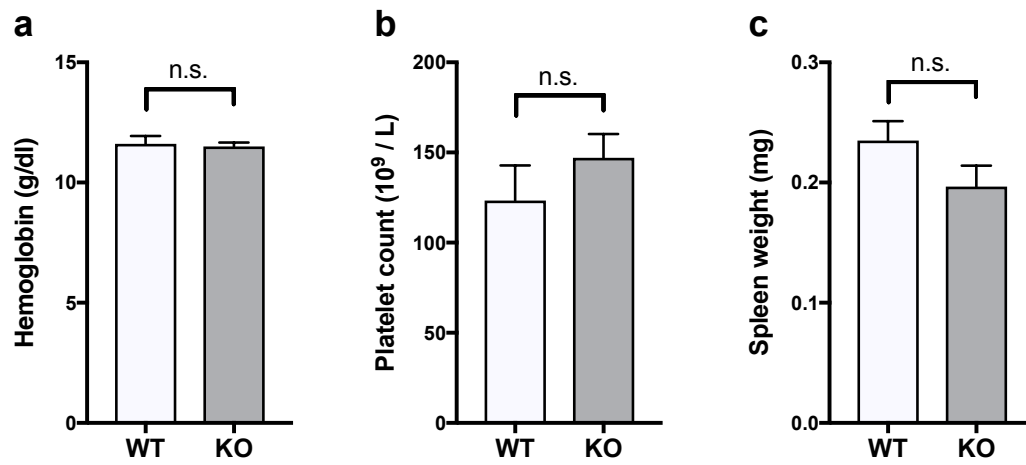


図12 野生型マウスと *Chi3l1* ノックアウトマウスに対する骨髄線維化誘導後のヘモグロビン (a)、血小板 (b)、および脾臓重量 (c)の比較。両群間で有意な差は認めなかった。

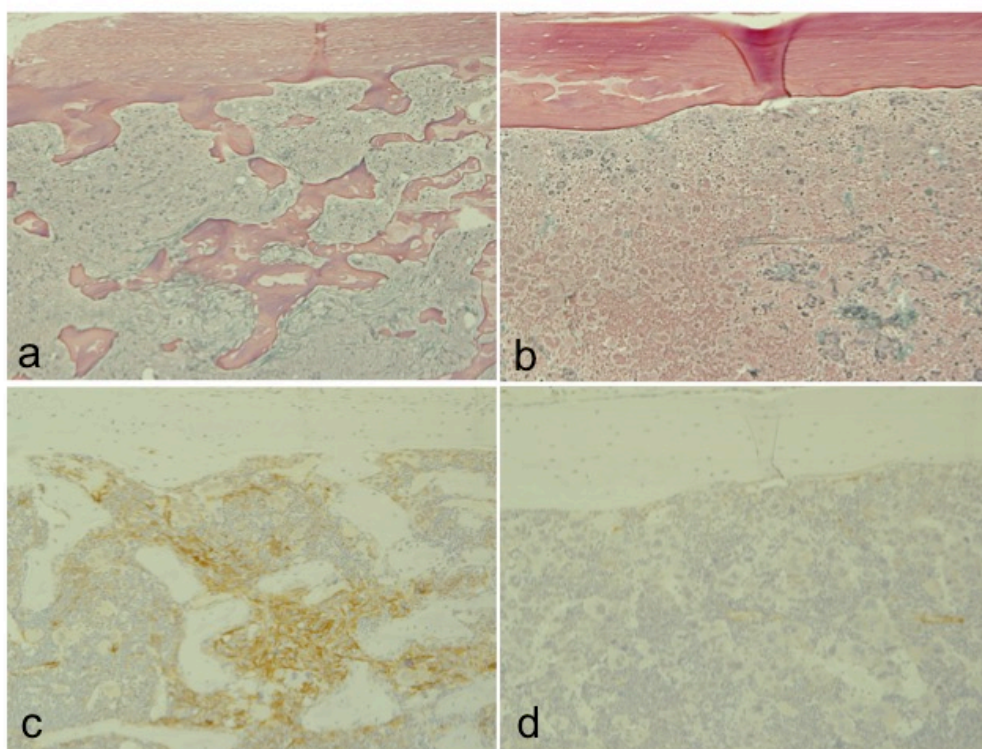


図13 野生型マウスと *Chi3l1* ノックアウトマウスに対する骨髄線維化誘導後の大腿骨の組織像。(a,b) 鍍銀染色。野生型群 (a) と比較し、ノックアウト群 (b) では鍍銀染色にて明らかな細網線維の密な交錯を認めない。(c,d) α -SMA (α -smooth muscle actin) の免疫組織染色。野生型群 (c)と比較し、ノックアウト群 (d) では α -SMA の発現も低下していた。

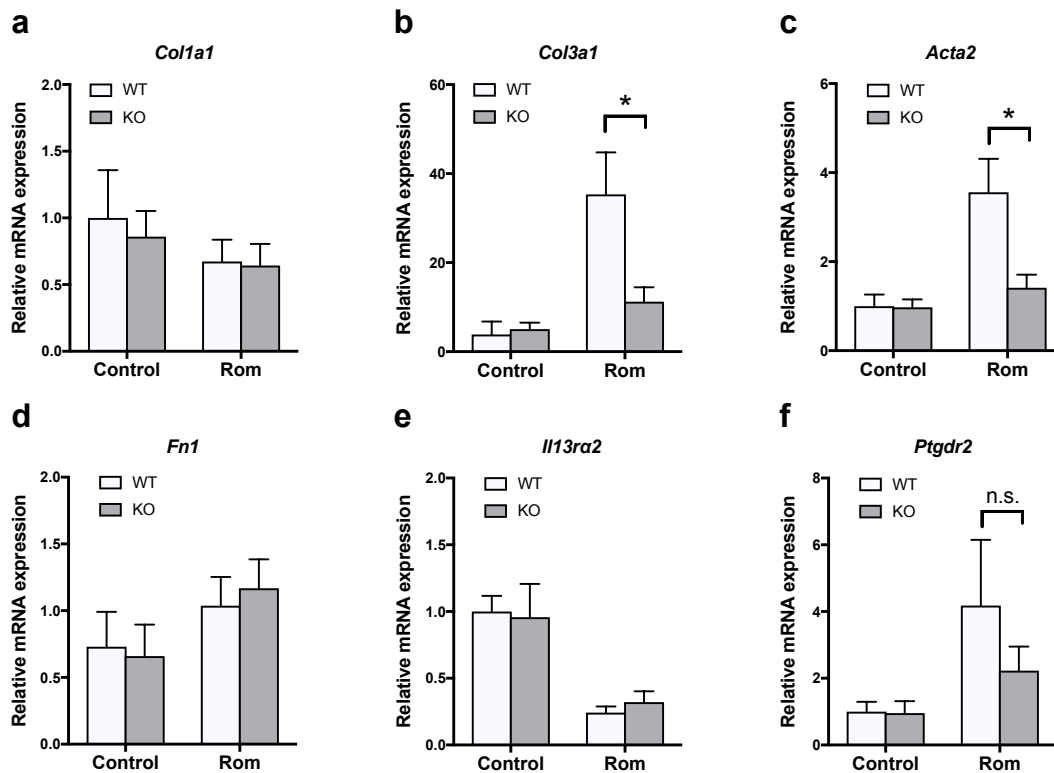
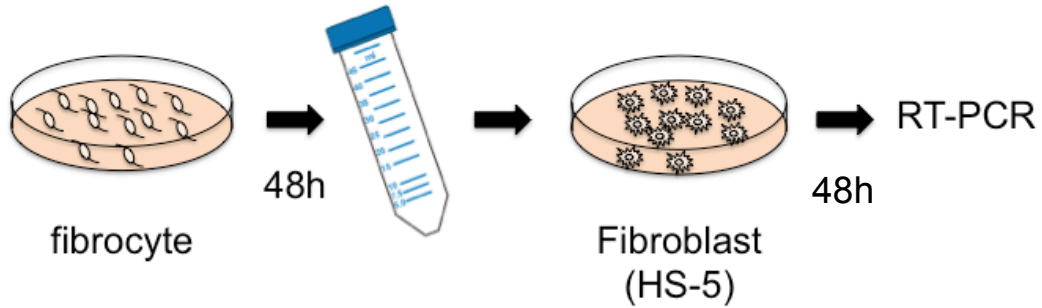


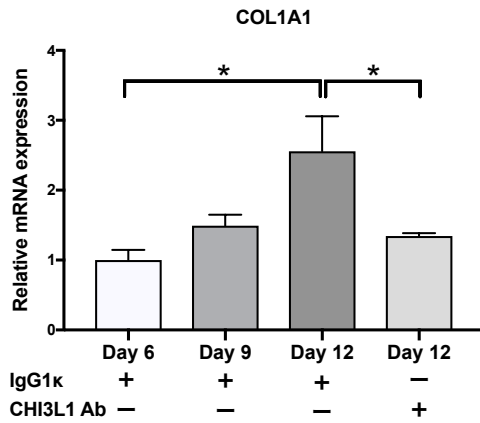
図 14 野生型マウスと *Chi3l1* ノックアウトマウスに対する骨髄線維化誘導後の骨髄 mRNA の変化。 *Colla1* (a) 、 *Col3a1* (b) 、 *Acta2* (c) 、 *Fn1* (d) 、 *Il13ra2*(e) 、 *Ptgdr2* (f) について、real time PCR 法でそれぞれの発現を定量的に評価した。*Col3a1* と *Acta2* はノックアウトマウスにおける Rom 投与後の発現が有意に抑制されていた。*Colla1*、*Fn1*、*Il13ra2*、*Ptgdr2* においては両マウス群で差はみられなかった。内在性コントロールとして *Gapdh* を使用した。* $P < 0.05$ 。

略語: KO, knock out; WT, wild type

a



b



c

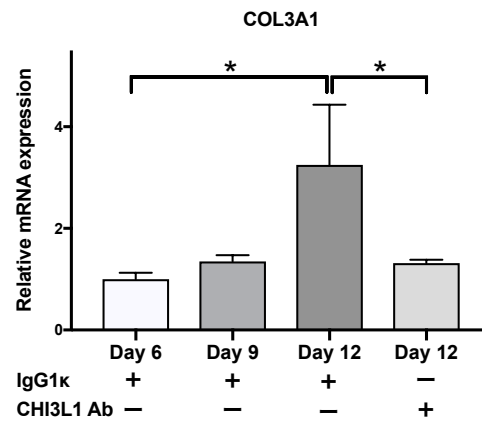


図 15 fibrocyte の培養上清とヒト線維芽細胞細胞株 (HS-5) を用いた細胞間非接触型共培養。(a) fibrocyte 培養細胞の上清 (Day6、Day9、Day12 の 3 種類)を用いて Fibroblast 細胞株 HS-5 をそれぞれ 48h 培養し、RT-PCR 法にて *COL1A1*、*COL3A1* の発現を比較検討した。(b,c) Day 6 と Day 9 の上清で培養した HS-5 に比較して Day 12 の上清で培養した HS-5 は有意に *COL1A1* と *COL3A1* の発現上昇を認めた。加えて、CHI3L1 に対する中和抗体を投与した Day 12 の HS-5 においてはその発現が day 6 の HS-5 と同程度まで減弱していた。内在性コントロールとして *Gapdh* を使用した。* $P < 0.05$ 。