

ミトコンドリア断片化に伴う血液がん病態形成の分子基盤解明

1. 研究の目的

骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic Syndrome, MDS) は加齢とともに増加する難治性血液がんである。進行性の貧血や血小板減少に伴う輸血依存、白血球減少や免疫異常に伴う易感染状態、全身臓器の機能障害など多彩な症状を特徴とし、生命予後は総じて不良である。大規模な遺伝子変異解析研究により全容が明らかになりつつある一方、その病態発症機序の解明は十分には進んでいない。

腫瘍クローン拡大と細胞死の共存に伴う骨髄不全症は、MDS 病態の本質である。半数近くの MDS 症例で急性白血病移行がみられることから、単に前白血病状態と言われてきた。しかし、我々の研究成果も含め、MDS の病態が単に幹細胞レベルの異常、芽球の増減のみから説明できず、異常クローン由来の免疫細胞や間葉系細胞なども巻き込んだ、より複雑なものであることがわかってきた。とりわけ、自然免疫系の制御異常に伴う非感染性慢性炎症は病態形成における中心的機構として注目されている。自然免疫系制御異常に伴う炎症性シグナル経路の活性化や、それによって引き起こされるパイロトーシスなどの炎症性細胞死が生じていることが明らかになった。細胞死に伴って細胞外に放出される細胞内成分は DAMPs となり、自然免疫系シグナル経路の活性化を加速させる。さらに、自然免疫系の制御異常が腫瘍細胞のクローン優位性獲得にも寄与することが明らかとなり、MDS 病態における慢性炎症と無効造血のポジティブフィードバック機構の存在とその分子基盤が明らかになりつつある。しかし、こうした持続的な非感染性炎症がどのような機序を介して生じているかについては明らかにされていない。

我々は、MDS 病態における慢性炎症と骨髄不全発症に関わる分子基盤を解明するために、新規に樹立した MDS モデルマウスおよび多数例の血液がん患者検体の解析から、MDS 幹細胞・前駆細胞において過剰なミトコンドリアの断片化が生じていることを世界で初めて見出した (Aoyagi, et al. Cancer Discovery 2022)。過剰なミトコンドリア断片化を伴う細胞は、MDS 患者全般で遺伝子変異プロファイルの違いによらず高頻度でみられた。ミトコンドリア分裂の選択的阻害により、炎症性シグナル経路の活性化、無効造血、異形成の病態が著しく改善されたことから、過剰なミトコンドリア断片化が MDS 病態形成の引き金となる細胞現象であることが示唆された。すなわち、ミトコンドリアの断片化が、多様かつ疾患特異性のない複雑な遺伝子型に関わらず、多くの MDS 患者において共通の治療標的となり得ることがわかった。

本研究は、過剰なミトコンドリアの断片化が炎症性シグナル経路の活性化を誘導する分子基盤を明らかにし、それらを標的とする新規治療戦略の構築を目指す。

2. 研究の計画

(1) ミトコンドリア断片化機序の全容解明

ミトコンドリアの分裂過程で中心的な役割を果たす分子として DRP1 が知られている。これまでに、MDS モデルマウスおよび患者細胞で DRP1 の発現レベルおよび S616 リン酸化 (活性型) レベルの亢進を確認している。また、S616 リン酸化には mTOR シグナル経路の活性化が部分的に関与していることを明らかにしている。DRP1 は様々な翻訳後修飾によりその活性が制御され、それぞれの修飾機序には複数のシグナル経路の関与が報告されている。その他にも、DRP1 制御に関わる様々な他のシグナル経路 (Toll-like 受容体、Wnt/ β カテニン、HIF1A シグナルなど) の活性化が MDS 患者で報告されている。そこで、MDS マウスの腫瘍クローン細胞と種々のシグナル経路阻害を用いて、DRP1 翻訳後修飾に関わるタンパクの定量とミトコンドリア動態の変化、腫瘍クローンにおける遺伝子発現変化を調べる。これにより、ミトコンドリア断片化機序の分子基盤解明を明らかにする。

(2) ミトコンドリア断片化に伴って生じる炎症性シグナル誘導因子の同定

断片化を含めミトコンドリアに生じる異常に伴って、ミトコンドリア内の様々な成分が細胞質内に放出される。電子伝達系で産生される ROS の他に、mtDNA や RNA、ATP などはいずれも DAMPs として自然免疫系シグナル経路の活性化に寄与する。そこで、ミトコンドリアの過剰な断片化に伴う炎症性シグナル経路活性化の機序を明らかにするため、MDS クローンの細胞質中で増加しているミトコンドリア由来成分を以下の方法で調べる。さらに、ミトコン

ドリア分裂阻害剤 (mdivi-1 など) 投与後でもこれらのレベルを測定し、過剰な断片化との関連性を明らかにする。

- ① **ROS** : 全般的な酸化ストレス、ミトコンドリア内部のスーパーオキシドを検出する蛍光発色プローブを用いて、フローサイトメトリーにより測定する。
 - ② **DNA/RNA** : MDS クローン細胞質中のミトコンドリア由来の核酸を、特異的なプローブを用いた *in situ hybridization* により検出・定量する。
 - ③ **ATP** : 骨髄細胞から抽出した ATP をルシフェラーゼ発光法で定量する。
- (3) **ミトコンドリア断片化に伴う細胞および細胞外への影響**

ミトコンドリア断片化と炎症性シグナル経路活性化に伴い、MDSクローンは骨髄内で優位性を獲得する一方、分化成熟過程では細胞死の亢進がみられることがわかっている。細胞死に伴って全身循環中に放出されるROSやミトコンドリア由来DAMPs、細胞由来DAMPsは、細胞膜表面に発現するTLRsのリガンドとなり、TLRsシグナル経路の活性化を促し得る。そこで、断片化の結果生じる炎症性細胞死の種類、細胞死が顕著におこる細胞系統と分化ステージ、細胞死に伴って循環中に放出されるミトコンドリア由来DAMPsをはじめとする細胞内成分を調べ、MDSクローンにおけるミトコンドリア異常が細胞外に及ぼす影響を明らかにする。さらに、ミトコンドリア分裂阻害剤投与後のMDSマウスからも同様にサンプルを回収して測定し、過剰な断片化との関連性を明らかにする。

- ① **細胞死の解析** : 様々な系統・分化段階の骨髄細胞を用いて、種々の細胞死に関わるタンパクの発現を調べる。また、各細胞死に対する選択的阻害剤を添加して培養し、死細胞割合の変化を観察する。
- ② **Cell-free DNA/RNAの解析** : 血漿からcell-free DNA/RNAを抽出・精製し定量する。

(4) **患者サンプルでの検証**

MDSモデルマウスで得たミトコンドリアの断片化は、多数例の患者検体でも確認され、MDS症例に特徴的な所見であることがわかっている。そこで、患者検体を用いて検証する。マウスモデルと同様の手法により、DRP1の翻訳後修飾関連タンパクの定量、細胞質内のROSおよびミトコンドリア由来DAMPsの測定を行う。

(5) **MDSモデルマウスにおける前臨床試験**

- ①モデルマウスの解析および患者サンプルでの検証によって得た知見に基づき、非感染性慢性炎症の原因となるミトコンドリア由来成分の *in vivo* 阻害実験を行う。炎症性シグナル経路の活性化や無効造血、血球減少、異形成などのMDS表現型に及ぼす影響を調べる。
- ②炎症性シグナル経路の活性化に引き続いて生じる細胞死に伴って、様々な細胞内成分が細胞外に放出される。各細胞死機序の *in vivo* 阻害実験を行い、過剰な細胞死の抑制に伴う影響を検討する。

3. 研究の成果

(1) **ミトコンドリア断片化機序の全容解明**

- ①**TLRシグナル経路の阻害** : MDSでは、TLR2/4を介してその下流のMyd88やIRAKが活性化することが知られている。TLR2阻害剤とTLR4阻害剤の併用投与を行ったが、MDSマウスに断片化の改善はみられなかった。この結果から、この経路の活性化がDRP1の活性化、それに続く断片化には寄与していないことがわかった。
- ②**Wnt-βカテニンシグナルの阻害** : Wnt-βカテニンシグナルもMDS患者で活性化していることが知られている。Wnt-βカテニンシグナル阻害剤を投与したところ、断片化の改善が認められた。DRP1S616のリン酸化レベルは、阻害剤の投与により抑制されていた。Wnt-βカテニンシグナルの活性化がDRP1活性化機序の1つであることを示唆された。

(2) **ミトコンドリア断片化に伴って生じる炎症性シグナル誘導因子の同定**

- ①**ROSの定量** : c-Kit+細胞の細胞質中およびミトコンドリア中のROSが有意に増加していた。さらに、断片化をMdivi-1の投与によって阻害すると、細胞質中のROS量が有意に減少した。一方で、ミトコンドリア内のROS産生量はMdivi-1の投与によって変化しなかった。これらの結果は、ミトコンドリア中のROSが断片化に伴って細胞質中に放出されていることが示唆された。
- ②**ミトコンドリア由来核酸の定量** : 細胞質中に存在するミトコンドリア由来核酸を検出するために、c-Kit+細胞を回収し、膜透過処理と遠心分離を組み合わせると核とミトコンドリア

を除去したのち、得られた細胞質画分から DNA を精製し、mtDNA 量を評価した。MDS マウスの細胞質中では mtDNA 量が増加していた。また、Mdivi-1 を投与によって、細胞質中のミトコンドリア DNA 量は正常マウスと同程度まで減少した。ミトコンドリアの分裂に伴って mtDNA が放出されていることがわかった。細胞質中の遊離 DNA は、cGAS によって認識されると STING の局在変化が生じ、TBK1 がリン酸化・活性化し、最終的にインターフェロン刺激遺伝子の発現が亢進して炎症性細胞死が誘導される。c-Kit⁺細胞における TBK1 のリン酸化レベルは亢進しており、Mdivi-1 を投与によりリン酸化レベルが正常マウスと同程度まで抑制された。以上の結果から、断片化に伴って mtDNA が細胞質中に遊離し、自然免疫シグナルの活性化が誘導されると考えられた。

4. 研究の反省・考察

(1) ミトコンドリア断片化機序の全容解明

TLR シグナル経路の活性化が、DRP1 の活性化とそれに続くミトコンドリアの断片化に寄与しないことがわかった。しかし、下流の IRAK や MyD88 が恒常的に活性化していた場合、両剤の併用では TLR シグナル経路の活性化は阻害できない。IRAK および MyD88 の恒常的活性化も視野に入れ、今後それらに対する選択的阻害剤の投与も検討していく必要がある。一方で、Wnt- β カテニンシグナル経路の活性化は、DRP1 の活性化およびミトコンドリア断片化に寄与していることが明らかになった。

(2) ミトコンドリア断片化に伴って生じる炎症性シグナル誘導因子の同定

断片化に伴って ROS や mtDNA が細胞質中に放出されていることが明らかになった。また、DNA センシング経路の活性化が認められたことから、mtDNA が炎症性シグナル経路の活性化に寄与している。一方で、mtDNA がミトコンドリアから放出される機序はまだわかっていない。mtDNA がミトコンドリア外に放出される機序の1つとして、DRP1 と BAX の相互作用によってミトコンドリア膜に形成される孔を介した機序が知られている。MDS クローンでは DRP1 が活性化しており、BAX の遺伝子発現亢進していることから、この相互作用による孔形成がミトコンドリアで生じているかについて検証する。また、Mdivi-1 は活性化 DRP1 のミトコンドリア膜上への集積を防ぐため、単に断片化阻害効果だけではなくミトコンドリア膜上の放出孔の形成を抑制している可能性も考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Hayashi Y, Harada Y, Harada H. Myeloid neoplasms and clonal hematopoiesis from the RUNX1 perspective. *Leukemia*. 2022 May;36(5):1203-1214.
- ② Miyazaki Y, Kiguchi T, Sato S, Usuki K, Ishiyama K, Ito Y, Suzuki T, Taguchi J, Chiba S, Dobashi N, Tomita A, Harada H, Handa H, Horiike S, Maeda T, Matsuda M, Ichikawa M, Hata T, Honda S, Iyama S, Suzushima H, Moriuchi Y, Kurokawa T, Yokota K, Ohtake S, Yamauchi T, Matsumura I, Kiyoi H, Naoe T. Japan Adult Leukemia Study Group. Prospective comparison of 5- and 7-day administration of azacitidine for myelodysplastic syndromes: a JALSG MDS212 trial. *Int J Hematol*. 2022 Aug;116(2):228-238.
- ③ Toya T, Harada H, Harada Y, Doki N. Adult-onset hereditary myeloid malignancy and allogeneic stem cell transplantation. *Front Oncol*. 2022 Sep 16; 12:997530.
- ④ Takase S, Hiroshima T, Shirai F, Maemoto Y, Nakata A, Arata M, Matsuoka S, Sonoda T, Niwa H, Sato S, Umehara T, Shirouzu M, Nishigaya Y, Sumiya T, Hashimoto N, Namie R, Usui M, Ohishi T, Ohba SI, Kawada M, Hayashi Y, Harada H, Yamaguchi T, Shinkai Y, Nakamura Y, Yoshida M, Ito A. A specific G9a inhibitor unveils BGLT3 lncRNA as a universal mediator of chemically induced fetal globin gene expression. *Nat Commun*. 2023 Jan 12;14(1):23.
- ⑤ Konishi T, Sadato D, Toya T, Hirama C, Kishida Y, Nagata A, Yamada Y, Shingai N, Shimizu H, Najima Y, Kobayashi T, Haraguchi K, Okuyama Y, Harada H, Ohashi K, Harada Y, Doki N. Impact of gene alterations on clinical outcome in young adults with myelodysplastic syndromes. *Sci Rep*. 2023 Feb 14;13(1):2641.

- ⑥Ikeda N, Kubota H, Suzuki R, Morita M, Yoshimura A, Osada Y, Kishida K, Kitamura D, Iwata A, Yotsumoto S, Kurotaki D, Nishimura K, Nishiyama A, Tamura T, Kamatani T, Tsunoda T, Murakawa M, Asahina Y, Hayashi Y, Harada H, Harada Y, Yokota A, Hirai H, Seki T, Kuwahara M, Yamashita M, Shichino S, Tanaka M, Asano K. The early neutrophil-committed progenitors aberrantly differentiate into immunoregulatory monocytes during emergency myelopoiesis. *Cell Rep.* 2023 Mar 28;42(3):112165.
- ⑦Ito N, Takahashi T, Shiiba I, Nagashima S, Inatome R, Yanagi S. MITOL regulates phosphatidic acid-binding activity of RMDN3/PTPIP51. *J Biochem.* 2022 May 11;171(5):529-541
- ⑧Tokuyama T, Uosaki H, Sugiura A, Nishitai G, Takeda K, Nagashima S, Shiiba I, Ito N, Amo T, Mohri S, Nishimura A, Nishida M, Konno A, Hirai H, Ishido S, Yoshizawa T, Shindo T, Takada S, Kinugawa S, Inatome R, Yanagi S. Protective roles of MITOL against myocardial senescence and ischemic injury partly via Drpl regulation. *iScience.* 2022 Jun 11;25(7):104582.
- ⑨Zecchini V, Paupe V, Herranz-Montoya I, Janssen J, Wortel IMN, Morris JL, Ferguson A, Chowdury SR, Segarra-Mondejar M, Costa ASH, Pereira GC, Tronci L, Young T, Nikitopoulou E, Yang M, Bihary D, Caicci F, Nagashima S, Speed A, Bokea K, Baig Z, Samarajiwa S, Tran M, Mitchell T, Johnson M, Prudent J, Frezza C. Fumarate induces vesicular release of mtDNA to drive innate immunity. *Nature.* 2023 Mar;615(7952):499-506.
- (2) 口頭発表
- ①松沼菜摘, 林 嘉宏, 青柳泰成, 新谷直樹, 原田結花, 原田浩徳. HMGA2 promotes the platelet-neutrophil complexes formation and causes organizing pneumonia in myelodysplastic syndromes. 第81回日本癌学会学術総会, 2022/9/29, 横浜.
- ②林 嘉宏, 松沼菜摘, 青柳泰成, 新谷直樹, 原田結花, 原田浩徳. HMGA2-mediated platelet activation promotes neutrophil death and causes organizing pneumonia in MDS. 第84回日本血液学会学術集会, 2022/10/14, 福岡.
- ③青柳泰成, 林 嘉宏, 松沼菜摘, 小林大貴, 原田結花, 原田浩徳. ミトコンドリア動態異常に着目したクローン性造血およびMDSの新規診断法開発. 第27回造血器腫瘍研究会, 2023/1/20, 広島.
- ④林 嘉宏, 原田浩徳. 骨髄異形成症候群におけるミトコンドリア動態異常. 第21回日本ミトコンドリア学会年会, 2023/03/17, 東京.
- ⑤長島 駿. ミトコンドリアダイナミクスの制御機構と生体内における役割. 第740回北里医学会招待学術講演会, 2023/3/29, 東京.
- (3) 出版物
- ①原田浩徳. 骨髄異形成症候群. 血液疾患診療ハンドブック. 神田善伸編, pp243-249, 中外医学社, 東京, 2022.
- ②原田結花, 原田浩徳. 加齢とクローン性造血. EBM血液疾患の治療. 木崎昌弘, 鈴木律朗, 神田善伸, 大森司, 山崎宏人, pp95-97, 中外医学社, 東京, 2022.
- ③原田結花, 原田浩徳. 薬剤による血球異常. 日本医師会雑誌特集号「血液疾患のすべて」151(特別号1):89-91, 2022.
- ④原田結花, 原田浩徳. DLBCLや寛解期AMLに対する経口azacitidineの効果. 血液内科85(5):740-746, 2022.
- ⑤林嘉宏, 原田浩徳. ミトコンドリア異常による骨髄異形成症候群発症機構. 実験医学41(5):132-137, 2023.