

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16177

研究課題名(和文)造血制御におけるToll like receptor情報伝達経路の全容解明

研究課題名(英文)Hematopoiesis regulation by Toll like receptor signal pathway

研究代表者

郭 永梅(YONGMEI, GUO)

秋田大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20617386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：グラム陰性菌の細胞壁外膜成分であるリポ多糖体(lipopolysaccharide, LPS)は造血幹細胞に発現しているToll like receptor 4(TLR4)を介して、好中球系・単球系造血に正の制御を示した。TLR4シグナル経路活性化を介するインターロイキン-6(IL-6)の産生増加によって、好中球系転写因子C/EBP及び単球系転写因子PU.1の発現が増強される機序で、好中球系・単球系造血が促進されたことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトCD34+造血幹細胞を用いて、in vitroで病原微生物由来物質による造血幹細胞の分化増殖制御機構の存在を確認できた。IL-6は定常状態及び応急状態のいずれにおいても好中球造血に関与していること、C/EBPは感染時に造血幹細胞や前駆細胞の増幅に関与していることがマウスの系で観察され、我々の研究から、ヒトCD34+造血幹細胞においても確認できた。

細菌感染時、応急的な好中球増加や左方移動等、臨床的な常識を分子的機序で説明できた。

研究成果の概要(英文)：In our research, we demonstrated that lipopolysaccharide (LPS), a cell wall outer membrane component of Gram-negative bacteria, promoted neutrophil/monocytic hematopoiesis via Toll like receptor 4 (TLR4) expressed on hematopoietic stem cells. The production of interleukin-6 (IL-6) was increased through activating of TLR4 signal pathway and the expression of neutrophil transcription factor C/EBP and monocyte transcription factor PU.1 increased. Neutrophil/monocytic hematopoiesis was promoted by enhanced expression of C/EBP and PU.1.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血制御 LPS TLR4 CD34+造血幹細胞 好中球

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

#### 1. 研究開始当初の背景

宿主のパターン認識受容体 (pattern recognition receptors, PRRs) は、病原微生物由来の糖脂質、タンパク質、核酸などの様々な分子を共通した性質を持つパターンとして認識する。宿主は、PRRs によって病原微生物の侵入を感知し、I 型インターフェロンや炎症性サイトカイン等により感染初期の生体防御をする。近年、PRRs は造血幹細胞にも発現し、病原微生物由来物質による造血幹細胞の分化増殖制御機構の存在が示唆されてきた。我々はこれまでに、病原微生物由来物質 (ssDNA や dsRNA 等の核酸) は、PRRs の介在・非介在の両経路において、ヒト CD34<sup>+</sup> 造血幹細胞の増殖や分化を制御すること、その結果宿主の生体防御反応を抑制したり、自己免疫を誘導すること、を明らかにしてきた。

#### 2. 研究の目的

外界の病原微生物の侵入を感知する PRRs は造血幹細胞にも発現しているが、造血との関係は不明な点が多い。好中球は生体防御の最前線で病原微生物と戦う血液中の主要な細胞であり、細菌感染時、末梢血の好中球増加や左方移動が臨床的な常識ではあるが、その機序はまだ不明である。本研究は、グラム陰性菌の細胞壁外膜成分であるリポ多糖体 (lipopolysaccharide, LPS) を用いて、細菌感染による好中球造血制御を解析することを目的とした。

#### 3. 研究の方法

外界の病原微生物の侵入を感知する PRRs は造血幹細胞にも発現しているが、造血との関係は不明な点が多い。好中球は生体防御の最前線で病原微生物と戦う血液中の主要な細胞であり、細菌感染時、末梢血の好中球増加や左方移動が臨床的な常識ではあるが、その機序はまだ不明である。本研究は、グラム陰性菌の細胞壁外膜成分であるリポ多糖体 (lipopolysaccharide, LPS) を用いて、細菌感染による好中球造血制御を解析することを目的とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) PRRs 介在経路として、LPS

が PRRs の一種である Toll 様受容体 (Toll like receptor, TLR) の TLR4 を介して、CD34<sup>+</sup> 造血幹細胞から好中球への分化・増殖を促進したことを明らかにした。同時に単球系細胞も増加していた (図 1)。LPS は赤芽球系や巨核球系の造血には影響しなかった。

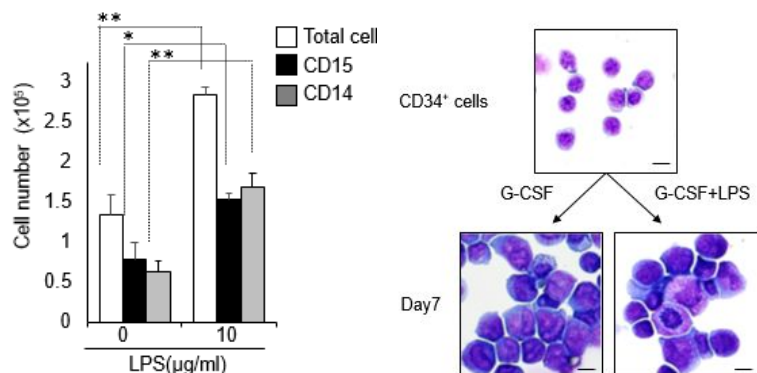


図 1 LPS による好中球・単球増加

(2) CD34<sup>+</sup> 造血幹細胞を含む各培養段階の細胞における TLR4 の発現、そして LPS 刺激による TLR4 の発現増強を確認した。また、TLR4 阻害剤または TLR4 シグナル経路下流の Myeloid differentiation primary response 88 (MYD88) 阻害剤、TGF-β-activated kinase 1 (TAK1) 阻害剤によって、LPS の細胞増殖作用が抑制された。更に TAK1 の下流にある mitogen-activated protein kinase (MAPK) 及び nuclear factor-κB (NF-κB) のリン酸化は LPS 刺激により増強され、そしてそれぞれの阻害剤を培養系に添加することによって、LPS の細胞増殖作用が抑制された。

(3) インターロイキン - 6 (IL-6) は様々な細胞によって産生され、自己免疫疾患や炎症性疾患の発症機序に関与することが知られている。IL-6 は顆粒球系造血への影響も報告されていた。本研究では、LPS 刺激により、IL-6 の産生が増加したことを明らかにした。また、IL-6 レセプター阻害剤によって、LPS の細胞増殖促進作用が抑制された (図 2)。

(4) 造血幹細胞から白血球系と赤血球・血小板系へ分化の分岐点では PU.1 と転写因子 GATA-1 が競合し、PU.1 が白血球系への分化を促進する。好中球

と単球・マクロファージ系の分岐点では C/EBP と競合し、PU.1 優位となった場合は単球・マクロファージ系への分化が促進される。また、緊急時の好中球造血に重要な役割を果たすものとして C/EBP が知られている。本研究では、LPS 刺激によって、PU.1 及び C/EBP 発現が増強されたことを明らかにした。

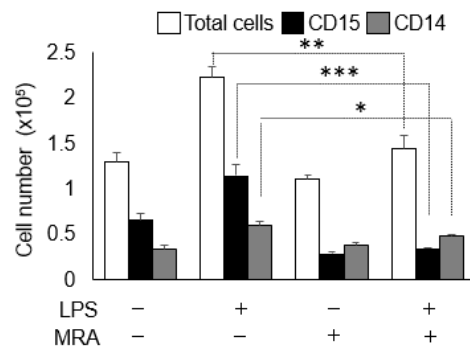


図 2 MRA: IL-6 レセプター阻害剤

以上より、LPS は TLR4 またその下流にある MAPK 及び NF- $\kappa$ B を介して、炎症性サイトカイン IL-6 の産生を促進し、さらに、好中球系の転写因子である C/EBP 及び単球系の転写因子である PU.1 の発現を増強させる機序で、好中球系・単球系への分化・増殖を促進することを明らかにした。

すでに報告したように、ssDNA 及び dsRNA が PRRs 非介在の経路でヒト造血幹・前駆細胞の増殖や分化に影響する。本研究は、細菌が人体に侵入された後、LPS 等細菌由来物質は PRRs を介する造血制御で宿主の生体防御反応を誘導することを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 佐々木優美、郭永梅等
2 . 発表標題 Granulocyte hematopoiesis regulated by lipopolysaccharide
3 . 学会等名 日本血液学会総会
4 . 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----