

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02842

研究課題名(和文) 感染記憶がもたらす造血幹細胞の機能障害と疾患発症の分子基盤解明

研究課題名(英文) Infection stresses promote the pathogenesis of myelodysplastic syndrome

研究代表者

指田 吾郎 (Sashida, Goro)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授

研究者番号：70349447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群(MDS)は、造血幹細胞より発生するクローン性腫瘍であり造血不全状態となる高齢者に好発する予後不良ながんである。本研究では、老化に伴うMDS発症機構を理解するために、感染ストレスを负荷したDNA脱メチル化酵素・TET2変異MDSモデルを新たに作製した。この生体MDSモデルを用いて、感染ストレスによって惹起されたエピゲノム変化が記憶・継承されて、TET2変異を生じたクローナル造血からMDS発症に至る分子基盤を解析した。さらに、エピゲノム変化が進展して機能障害が生じたMDS幹細胞を対象として、若年期のエピゲノム状態に初期化する試みを計画した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢が慢性疾患やがんの発症をもたらすと信じられているが、複雑な生体内の生物学的応答のうちで、何が老化に伴ってがんになる原因であるかは不明である。本研究が進展することで、加齢幹細胞また前がん幹細胞が、感染罹患で生じたエピゲノム変化を蓄積・継承してMDS発症に至る分子基盤を理解できる。

研究成果の概要(英文)：Myelodysplastic syndrome (MDS) is a clonal hematopoietic stem cell disease of aged adults characterized by impaired hematopoiesis and predisposition to acute myeloid leukemia.

By utilizing our infection stress-induced Tet2-deficient MDS model, we will understand the mechanism of how hematopoietic stem cells promote the initiation and propagation of MDS due to stem cells heterogeneity in epigenetic changes and impaired homeostasis in hematopoietic and non-hematopoietic tissues upon the insults of infection stresses. Lastly, we will clarify the molecular mechanism of pathogenesis of MDS and give a rationale for novel therapeutic strategy for the prevention of and eradication of MDS cells.

研究分野：医学

キーワード：骨髄異形成症候群 感染症 クローン造血 ゲノム変異 エピゲノム クロマチン

### 1. 研究開始当初の背景

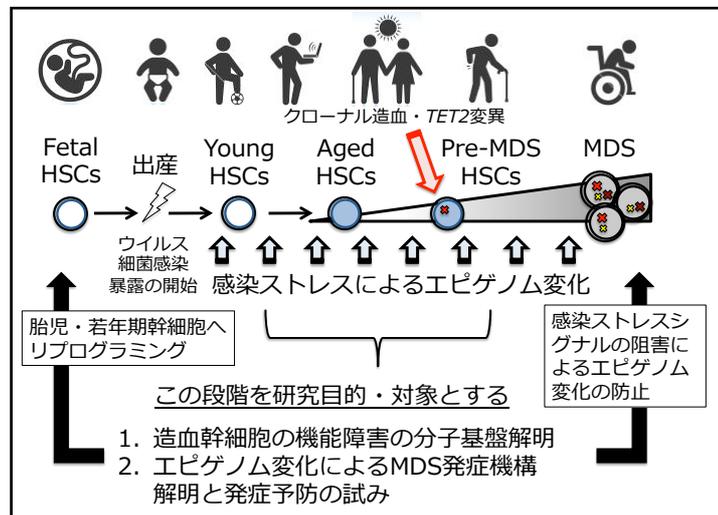
老化とは、感染など様々なストレスによる臓器・個体レベルの生体内ネットワークの恒常性破綻であり、臓器機能低下やがんなどの疾患発症を促進する。ただし、複雑な生物学的応答のもとで、がん発症に至る分子基盤は明白でない。高齢者に好発する骨髄異形成症候群(MDS)は造血幹細胞より発生するクローナル造血器腫瘍であり、造血不全を生じる予後不良ながんである。

申請者は、老化に伴うがん発症機構を理解するために、MDS発症過程を模して感染ストレスを負荷したDNA脱メチル化酵素・TET2変異マウスモデルを新たに作製した。本研究では、感染ストレスによって惹起されたエピゲノム変化が記憶・継承されて、造血機能障害を来すとともに、TET2変異を生じたクローナル造血からMDS発症に至る分子基盤を解析した。さらに、エピゲノム変化が進展して機能障害が生じたMDS幹細胞を対象として、若年期幹細胞のエピゲノム状態に初期化する試みを実施した。以上、感染記憶による造血幹細胞の機能障害とMDS発症の分子基盤を解析して、エピゲノム初期化によるMDS発症予防を試みた。

### 2. 研究の目的

加齢は造血を含めた臓器機能の低下や老化関連疾患の発症を促進するが、生体内の複雑な生物学的応答のもとで、がんを発症させる分子メカニズムは明白でない。また、疫学データは老化とがんであるMDS発症との関連を強く支持するが、加齢に伴った環境ストレスによる造血不全とMDS発症との因果関係は不明である。近年注目されている高齢者にみられる遺伝子変異を伴ったクローナル造血では、MDS患者で高頻度に認めるTET2やDNMT3Aなどエピジェネティック制御遺伝子変異が最初のゲノム変異(いわゆる founder mutation)である。実験マウスでは、Tet2欠損とDnmt3a欠損は共に造血幹細胞の自己複製能・増殖活性を亢進させる。従って、クローナル造血は、老化による造血機能低下を補うために選択されたとも言える。

こうした知見から、クローナル造血は、遺伝子変異の生じる前の感染ストレスによるエピゲノム変化と協調することで、MDSを発症させる仮説をたてた(右図参照)。



### 3. 研究の方法

(1) 準備状況：この仮説を証明するために、ウイルス/細菌感染を模擬するpIpC/LPSを暴露したTet2欠損/野生型造血細胞キメラマウスを作製して解析した。pIpC/LPS暴露野生型幹細胞は増殖活性が障害され、血球産生能が有意に低下した。この造血機能障害の形質は、直接感染ストレスを与えないレシピエントマウスに認めており、エピジェネテクスそのものと言える。一方、Tet2欠損幹細胞はpIpC/LPSに抵抗性で自己複製能が亢進して、結果的にMDSを発症した。従って、短期でも十分な感染ストレスは造血幹細胞を不可逆的に障害するが、クローナル造血・Tet2欠損が生ずると幹細胞機能が回復して、結果的にMDS発症を促進した(未発表データ)。

(2) 課題1：本研究では、こうして確立したpIpC/LPS暴露Tet2欠損MDS発症モデルを用いて、感染ストレスによるエピゲノム変化が蓄積・継承されて幹細胞機能を低下させ、加齢幹細胞からMDSが発症する分子メカニズムを解析する。

(3) 課題2：MDS発症を促進する細胞内因性変化・エピゲノム変化を防ぐ目的で、感染ストレスシグナルと下流制御因子を遺伝学的・化学的に阻害する。pIpCとLPS受容体のTlr3 KO/Tlr4 KOマウス、TLRシグナルに不可欠なMyd88/Trif DKOマウスを用いて、Tlr3/Tet2 DKO、Tlr4/Tet2 DKO、Myd88/Trif/Tet2 TKOマウスを交配作製する。

(4) 課題3：感染を記憶して不可逆的に障害された加齢・MDS幹細胞を、正常な造血機能を有する若年期幹細胞様のエピゲノム状態に初期化(reprogramming)する試みを実施する。

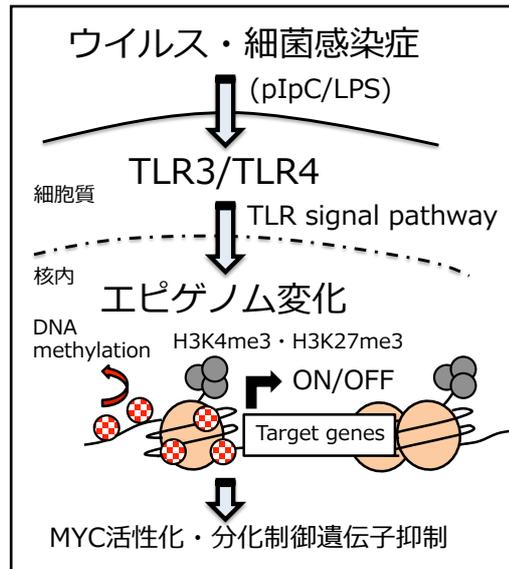
以上、感染記憶による造血機能障害とMDS発症の分子基盤を解明して、エピゲノム初期化によ

るMDS発症予防を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 課題1: 感染ストレスによる造血幹細胞の機能障害とMDS発症機構の解明

始めに、感染症罹患によるMDS発症促進効果を解明するために、CD45.2+8週齢マウスにpIpC/LPS またPBSを1か月間投与・休薬した後に、Tet2wt/wt;Cre-ERTまたはTet2flox/flox;Cre-ERT 骨髄細胞を採取して、CD45.1+野生型骨髄細胞と致死量放射線照射したCD45.1+野生型レシピエントマウスへ競合移植した。クローナル造血を再現するために、移植後1か月で腹腔内Tamoxifen投与によってTet2を欠損させた。実際、pIpC/LPS暴露された野生型細胞移植マウスでは幹細胞機能が低下して、PBS投与野生型(WT-PBS)と比較して末梢血キメリズムが有意に低下した(未発表データ)。一方、Tet2欠損細胞はpIpC/LPSに抵抗性で顆粒球細胞の相対的増加を認めるだけでなく、結果的に貧血と異形成のあるMDSを発症した。さらに、pIpC/LPS暴露されたTet2欠損骨髄細胞を連続移植すると、幹細胞は有意に維持・増殖した。従って、短期間でも十分な感染ストレスによって”感染を記憶”した野生型幹細胞は造血機能が低下するが、Tet2欠損が生じた前がん幹細胞は増殖活性を保つとともに、MDS発症を促進することが分かった(右図参照)。

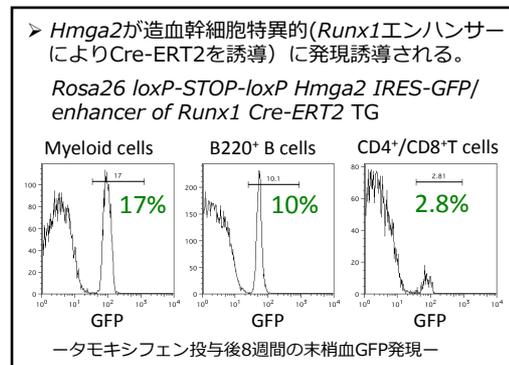


(2) 課題2: 感染ストレスによるエピゲノム変化の分子基盤解明とMDS病態進展抑制の検証  
pIpC/LPSによる幹細胞機能の障害がToll-like receptor (TLR)に依存しているかを証明するために、pIpCとLPS受容体のTlr3 KO/Tlr4 KOマウス、TLRシグナルに不可欠なMyd88/Trif DKOマウスを用いて、Tlr3/Tet2 DKO、Tlr4/Tet2 DKO、Myd88/Trif/Tet2 TKOマウスを交配作製した。課題1と同様に、pIpC/LPSを1か月投与後に、骨髄細胞を移植してTet2を欠損させ、TLR欠損によって、pIpC/LPSによるMDS発症が抑制されるかを検証した。現在、その結果をもとに下流シグナルも含めて、MDS発症の機序を解析している。以上、造血幹細胞がMDSに形質転換する際に、こういったエピゲノム変化が生じるのかを遺伝学的に解析した。

##### (3) 課題3: 幹細胞を標的としたリプログラミングによる機能回復とMDS発症予防の検証

最後に、エピゲノム変化を来して不可逆的に障害された加齢・MDS幹細胞の機能回復を試みた。この目的のため、若年期幹細胞のエピゲノム状態に初期化するべく、クロマチン伸張因子Hmga2を発現誘導できるHmga2 IRES-GFPノックインマウスを新たに作製した(右図参照)。造血幹細胞に有意に発現誘導が可能である。このマウスでは、その幹細胞機能は亢進するが、造血器腫瘍は全く発症しない(未発表データ)。

今後、この研究で得られた知見と、こうした遺伝子改変マウスを用いて、ストレス暴露後の造血機能回復とMDS発症予防効果を検証する予定である。



(4) 総括: 加齢が慢性疾患やがんの発症をもたらすと信じられているが、複雑な生体内の生物学的応答のうちで、何が老化に伴ってがんになる原因であるかは不明である。本研究成果をもとに、加齢幹細胞また前がん幹細胞が、感染罹患で生じたエピゲノム変化を蓄積・継承してMDS発症に至る分子基盤を、引き続き検証する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bai Jie, Yokomizo-Nakano Takako, Kubota Sho, Sun Yuqi, Kanai Akinori, Iimori Mihoko, Harada Hironori, Iwama Atsushi, Sashida Goro	4. 巻 40
2. 論文標題 Overexpression of Hmga2 activates Igf2bp2 and remodels transcriptional program of Tet2-deficient stem cells in myeloid transformation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 1531 ~ 1541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-020-01629-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokomizo-Nakano Takako, Kubota Sho, Bai Jie, Hamashima Ai, Morii Mariko, Sun Yuqi, Katagiri Seiichiro, Iimori Mihoko, Kanai Akinori, Tanaka Daiki, Oshima Motohiko, Harada Yuka, Ohyashiki Kazuma, Iwama Atsushi, Harada Hironori, Osato Motomi, Sashida Goro	4. 巻 80
2. 論文標題 Overexpression of RUNX3 Represses RUNX1 to Drive Transformation of Myelodysplastic Syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2523 ~ 2536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-3167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sashida Goro, Oshima Motohiko, Iwama Atsushi	4. 巻 110
2. 論文標題 Deregulated Polycomb functions in myeloproliferative neoplasms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 170 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02600-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kubota Sho, Tokunaga Kenji, Umezu Tomohiro, Yokomizo-Nakano Takako, Sun Yuqi, Oshima Motohiko, Tan Kar Tong, Yang Henry, Kanai Akinori, Iwanaga Eisaku, Asou Norio, Maeda Takahiro, Nakagata Naomi, Iwama Atsushi, Ohyashiki Kazuma, Osato Motomi, Sashida Goro	4. 巻 10
2. 論文標題 Lineage-specific RUNX2 super-enhancer activates MYC and promotes the development of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09710-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Balogh Peter, Adelman Emmalee R., Pluvinage John V., Capaldo Brian J., Freeman Katie C., Singh Sandeep, Elagib Kamaleldin E., Nakamura Yukio, Kurita Ryo, Sashida Goro, Zunder Eli R., Li Hui, Gru Alejandro A., Price Elizabeth A., Schrier Stanley L., Weissman Irving L., Figueroa Maria E., Pang Wendy W., Goldfarb Adam N.	4. 巻 105
2. 論文標題 RUNX3 levels in human hematopoietic progenitors are regulated by aging and dictate erythroid-myeloid balance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 905 ~ 913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2018.208918	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tenjin Yuki, Kudoh Shinji, Kubota Sho, Yamada Tatsuya, Matsuo Akira, Sato Younosuke, Ichimura Takaya, Kohrogi Hirotsugu, Sashida Goro, Sakagami Takuro, Ito Takaaki	4. 巻 99
2. 論文標題 Asc11-induced Wnt11 regulates neuroendocrine differentiation, cell proliferation, and E-cadherin expression in small-cell lung cancer and Wnt11 regulates small-cell lung cancer biology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1622 ~ 1635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0277-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuan Jew Win, Su Anselm Ting, Tay Siow Phing, Fong Isabel Lim, Kubota Sho, Su 'ut Lela, Osato Motomi, Sashida Goro	4. 巻 111
2. 論文標題 Low prevalence of the BCR?ABL1 fusion gene in a normal population in southern Sarawak	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 217 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02768-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang C, Oshima M, Sato D, Matsui H, Kubota S, Aoyama K, Nakajima-Takagi Y, Koide S, Matsubayashi J, Mochizuki-Kashio M, Nakano-Yokomizo T, Bai J, Nagao T, Kanai A, Iwama A, Sashida G.	4. 巻 128
2. 論文標題 Ezh2 loss propagates hypermethylation at T-cell differentiation-regulating genes to promote leukemic transformation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Invest	6. 最初と最後の頁 3872-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI94645.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hayashi Y, Zhang Y, Yokota A, Yan X, Liu J, Choi K, Li B, Sashida G, et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 Pathobiologic Pseudohypoxia as a Putative Mechanism Underlying Myelodysplastic Syndromes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 1438-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2159-8290.CD-17-1203.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Aoyama K, Oshima M, Koide S, Suzuki E, Mochizuki-Kashio M, Kato Y, Tara S, Shinoda D, Hiura N, Nakajima-Takagi Y, Sashida G, Iwama A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Ezh1 Targets Bivalent Genes to Maintain Self-Renewing Stem Cells in Ezh2-Insufficient Myelodysplastic Syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 161-174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2018.10.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Goro Sashida
2. 発表標題 Understanding of Trisomy 8 hematopoietic stem cell function by using a new in vivo Trisomy 8 model
3. 学会等名 分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Goro Sashida, Takako Yokomizo, Sho Kubota, Ai Hamashima, Akinori Kanai, Atsushi Iwama, Hitoshi Takizawa, Hirotaka Matsui
2. 発表標題 Infection-induced epigenetic remodeling facilitates the transformation of pre-leukemic stem cells
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sho Kubota, Yuqi Sun, Jie Bai, Takako Yokomizo, Mariko Morii, Motomi Osato, Kimi Araki, Goro Sashida
2. 発表標題 HMGA2 regulates hematopoietic stem cell fate decisions in the stress hematopoiesis
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takako Yokomizo, Sho Kubota, Atsushi Iwama, Hironori Harada, Motomi Osato, Goro Sashida
2. 発表標題 RUNX3 over-expression impedes RUNX1 function and promotes the development of myelodysplastic syndrome
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayaka Maeda, Sho Kubota, Takako Yokomizo, Mihoko Iimori, Kimi Araki, Motomi Osato, Goro Sashida
2. 発表標題 Stress and aging impair the transcriptome of MLL-AF9 stem cells and impede the leukemic transformation
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mariko Morii, Sho Kubota, Takako Yokomizo-Nakano, Masayoshi Tasaki, Kimi Araki, Goro Sashida
2. 発表標題 Loss of Tif1 suppressed the development of BCR-ABL-induced leukemia.
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuqi Sun, Sho Kubota, Jie Bai, Takako Yokomizo-Nakano, Mariko Morii, Kimi Araki, Motomi Osato, Goro Sashida
2. 発表標題 HSCs-specific induction of Hmga2 ensures the enhanced self-renewal property.
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jie Bai, Takako Yokomizo, Sho Kubota, Atsushi Iwama, Hironori Harada, Goro Sashida
2. 発表標題 Hmga2 promotes the development of MDS/MPN in the absence of Tet2
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2018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
研究協力者	横溝 貴子  (Yokomizo Takako)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Cincinnati Children's Hospital			
シンガポール	National University of Singapore			