

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17378

研究課題名(和文)造血幹細胞を増殖させるニッチシグナルの同定

研究課題名(英文) Identification of niche signals for proliferation of hematopoietic stem cells

研究代表者

数藤 孝雄 (Sudo, Takao)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80631184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤治療の副作用として白血球などの血球細胞は減少する。骨髄内では生き残った造血幹・前駆細胞が盛んに分裂し、血球回復を促す機構が存在しているが、その詳しいメカニズムは分かっていなかった。

本研究において、骨髄に存在する免疫細胞の一種である2型自然リンパ球(ILC2)が増殖因子GM-CSFを分泌することによって、抗がん剤投与後の骨髄回復に寄与していることを示した。ILC2は、骨髄傷害により放出されるIL-33を感知して反応し、MyD88を介して活性化し、骨髄再生を促進していることが分かった。

本研究成果は抗がん剤治療後の白血球減少症の治療法開発に役立つと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体は元々、抗がん剤で傷ついた骨髄を再生させる能力があるが、その回復機構がどのような機序で発動するのはよくわかっていなかった。

本研究はその再生メカニズムの一つを明らかにした。更にILC2の細胞医薬としての可能性を示した。

本研究成果は、造血幹細胞を体外で増幅させる方法の開発や、抗がん剤治療後の白血球減少症の治療法開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chemotherapy has a damaging effect on hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) in bone marrow (BM). However, once chemotherapy ends, HSPCs regenerate, a process that has remained unknown. In this study, we show that BM-resident group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) support the recovery of HSPCs from chemotherapy-induced stress by secreting granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF).

Mechanistically, IL-33 released from chemo-sensitive cells activates MyD88-mediated secretion of GM-CSF in ILC2. ILC2s may function by sensing the damaged BM spaces and subsequently support hematopoietic recovery under stress conditions.

Thus, we clarify the essential mechanism of hematopoietic recovery after bone marrow injury. These results will provide clues for better adjunct therapy aimed at early hematopoietic recovery.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞 ニッチ 生体イメージング 自然リンパ球

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

造血幹・前駆細胞（以下 HSPC）の特徴は自己複製能と多分化能を有することであるが、その維持・調節において、HSPC を取り巻く造血微小環境（ニッチ）が重要な働きをすることが示されている。骨髄内のニッチ因子は HSPC 近傍に存在し、HSPC の未分化性及び多分化性を維持するシグナルを供給していることが想定される。これまでに骨芽細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞などがニッチ細胞の候補として報告されてきた。更に stem cell factor (SCF)、CXCL12、thrombopoietin (TPO) などがニッチ細胞から分泌される分子として同定されている。しかしながら、今なお個々の HSPC をシングルセルレベルで捉えて「細胞のダイナミクス」と「ニッチシグナル」との関係を明らかにする研究はなされていなかった。これまで HSPC の可視化には骨の切片や whole mount 骨髄の免疫組織染色を用いて為されてきたため、「動き」に関する情報は得られなかった。また、HSPC の発現遺伝子を調べる際には骨髄からソーティングが行われるが、その場合は個々の細胞の「位置」に関する情報が失われる。HSPC は細胞周期が静止している (G0 期) ものと回転しているもの (S/G2/M 期) が存在することから、決して単一の集団ではないと考えられる。生体が化学療法薬や放射線照射によって骨髄抑制ストレス刺激が加わると、減少した血球を補うべく HSPC は盛んに増殖するが、その詳細なメカニズムは不明であった。HSPC を増殖させる周囲環境からのシグナルや、そのシグナルを惹起するメカニズムについての知見を得ることは、造血ホメオスタシスを理解する上で極めて重要なことである。

2. 研究の目的

本研究では、生体イメージング系を活用して、生きたマウス骨髄内における HSPC の動態及び時空間的位置関係を明らかにすることを目的とした。さらにイメージングで得られた情報をもとに、HSPC の発現遺伝子を網羅的に解析することにより、ストレス後 HSPC の増殖機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗癌剤 5-FU を投与したマウスと投与していないコントロールマウスに、別のマウスから採取した HSPC を移植し、生体イメージング技術を用いて骨髄内の HSPC の動きや位置に関する情報を取得し、解析を行った。

(2) 抗癌剤 5-FU を投与したマウスと投与していないコントロールマウスに、別のマウスから採取した HSPC を移植し、骨髄にホーミングした HSPC を回収した。これら細胞から RNA を抽出して RNA-seq 法を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。

(3) RNA-seq 法で得られたデータについて上流解析を行うことによって、ストレス後環境から HSPC が受ける候補シグナルを抽出した。

(4) 候補シグナルのうち、最も変動の高い因子についての詳細な解析を行った。具体的には 5-

FU 投与前後の遺伝子発現変化についての検討や、遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析を行うことによって、ストレス後造血において必須のシグナルを同定した。

(5) ストレス後造血シグナル因子を分泌する細胞集団を、1 細胞 RNA-seq 解析を行うことによって同定した。さらにシグナル因子を分泌する細胞を培養し、5-FU 投与後のマウスに移植することによって骨髄抑制からの回復が早まるか否かについての検討を行った。

4. 研究成果

(1) 骨髄抑制後環境にホーミングした HSPC の動態

抗癌剤 5-FU を投与したマウスに移植された骨髄内 HSPC は、コントロールと比較して有意に移動スピードが低下していた。また、5-FU を投与したマウスに移植された HSPC は骨髄内の血管近傍に存在していた。このことから、5-FU 後骨髄環境が HSPC の動態に影響を与える何らかのシグナルを送っていることが示唆された。

(2) 骨髄抑制環境にホーミングした HSPC の遺伝子発現変化

5-FU 投与したマウス、及びコントロールの骨髄にホーミングした HSPC を回収し、RNA-seq 法を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。2 群間の比較において、1000 余りの遺伝子が有意に 2 倍以上変動していた。特に細胞周期や細胞増殖に関する遺伝子群が、5-FU 投与群において上昇していることを見出した。

(3) HSPC 増殖シグナルの同定

RNA-seq 法で得られた変動遺伝子について上流解析を行ったところ、HSPC を増殖させる候補シグナルとして GM-CSF、HGF、ANGPT2、VEGF が抽出された。中でも GM-CSF は最も大きく活性化していた。

(4) GM-CSF の骨髄抑制後回復における役割

コントロール、及び 5-FU 投与後の骨髄細胞を回収し、RT-PCR 法や ELISA 法を用いた解析を行うことによって、5-FU 投与後に GM-CSF 発現が上昇することを見出した。骨髄抑制後に GM-CSF の果たす役割を示すために、GM-CSF ノックアウトマウスを用いた解析を行った。5-FU 投与後の GM-CSF ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、骨髄細胞数が有意に低下していた。更に、高用量の 5-FU を投与すると、GM-CSF は致死となった。これらの結果から、GM-CSF は骨髄抑制後の造血回復に必須の役割を果たしていることを明らかにした。

(5) 1 細胞解析を用いた GM-CSF 発現細胞の同定

5-FU 投与後のマウス骨髄細胞を 1 細胞 RNA-seq 法を用いて解析することによって、GM-CSF 発現細胞の探索を行った。結果として、骨髄内に存在する 2 型自然リンパ球 (ILC2) が GM-CSF を高発現することを見出した。更に、IL-33 及び下流の MyD88 が GM-CSF 発現に重要な因子であることを明らかにした。

(6) ILC2 の細胞医薬としての可能性

骨髄から ILC2 を回収して、*in vitro* で増幅した後に、5-FU 投与マウスに投与した。結果とし

て、野生型マウス由来 ILC2 を投与した群において骨髄抑制からの回復が促進されることを確認した。この結果から、移植された ILC2 は骨髄内で GM-CSF 等の因子を分泌し、骨髄回復に寄与する可能性が考えられた。

以上の結果を通して、本研究によって骨髄傷害後の血球回復メカニズムを同定した (図)。

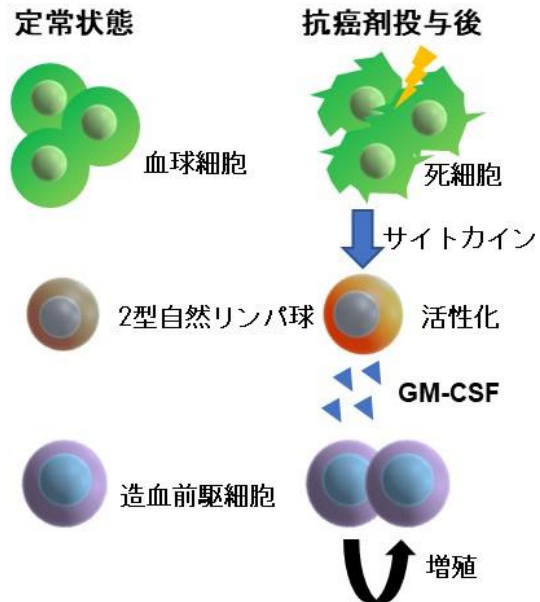


図. 抗癌剤投与後の骨髄回復メカニズム
抗癌剤投与後に2型自然リンパ球は死細胞が放出するサイトカインを認識し、GM-CSFを分泌して血球回復に寄与する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shingai Y, Yokota T, Okuzaki D, Sudo T, Ishibashi T, Doi Y, Ueda T, Ozawa T, Nakai R, Tanimura A, Ichii M, Shibayama H, Kanakura Y, Hosen N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Autonomous TGF signaling induces phenotypic variation in human acute myeloid leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.3348	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 Sudo Takao, Motomura Yasutaka, Okuzaki Daisuke, Hasegawa Tetsuo, Yokota Takafumi, Kikuta Junichi, Ao Tomoka, Mizuno Hiroki, Matsui Takahiro, Motooka Daisuke, Yoshizawa Ryosuke, Nagasawa Takashi, Kanakura Yuzuru, Moro Kazuyo, Ishii Masaru	4. 巻 218
2. 論文標題 Group 2 innate lymphoid cells support hematopoietic recovery under stress conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20200817	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 Matsui Takahiro, Tamoto Ryo, Iwasa Akio, Mimura Masafumi, Taniguchi Seiji, Hasegawa Tetsuo, Sudo Takao, Mizuno Hiroki, Kikuta Junichi, Onoyama Ichiro, Okugawa Kaoru, Shiomi Mayu, Matsuzaki Shinya, Morii Eiichi, Kimura Tadashi, Kato Kiyoko, Kiyota Yasujiro, Ishii Masaru	4. 巻 80
2. 論文標題 Nonlinear Optics with Near-Infrared Excitation Enable Real-Time Quantitative Diagnosis of Human Cervical Cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3745 ~ 3754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-20-0348	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 Morimatsu Maho, Yamashita Erika, Seno Shigeto, Sudo Takao, Kikuta Junichi, Mizuno Hiroki, Okuzaki Daisuke, Motooka Daisuke, Ishii Masaru	4. 巻 40
2. 論文標題 Migration arrest of chemoresistant leukemia cells mediated by MRTF-SRF pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-020-00127-6	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 -

1. 著者名 Nishizawa Shino, Kikuta Junichi, Seno Shigeto, Kajiki Masahiro, Tsujita Ryuichi, Mizuno Hiroki, Sudo Takao, Ao Tomoka, Matsuda Hideo, Ishii Masaru	4. 巻 143
2. 論文標題 Thrombomodulin induces anti-inflammatory effects by inhibiting the rolling adhesion of leukocytes in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 17~22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.01.001	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 Ao Tomoka, Kikuta Junichi, Sudo Takao, Uchida Yutaka, Kobayashi Kenta, Ishii Masaru	4. 巻 32
2. 論文標題 Local sympathetic neurons promote neutrophil egress from the bone marrow at the onset of acute inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 727~736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa025	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 Hasegawa Tetsuo, Kikuta Junichi, Sudo Takao, Yamashita Erika, Seno Shigeto, Takeuchi Tsutomu, Ishii Masaru	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of an intravital imaging system for the synovial tissue reveals the dynamics of CTLA-4 Ig in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70488-y	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------