

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17381

研究課題名(和文)腸内細菌シグナルによって制御される多臓器連関造血応答の理解とその制御

研究課題名(英文)Understanding the cross-organ communication on hematopoiesis regulated via gut microbiota signaling

研究代表者

林 慶和 (Hayashi, Yoshikazu)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：00801078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸管炎症により腸内細菌が体内に浸潤することで、造血応答に何らかの影響を及ぼすのではないかと考え、腸炎が造血に与える影響について検討を行った。デキストラン硫酸ナトリウム投与による腸炎モデルマウスを用いて造血応答を解析したところ、急性腸炎下では骨髄にて造血幹・前駆細胞(HSPC)が増加した。さらに、腸間膜リンパ節においても増加していたため、腸炎によるHSPCの炎症局所への遊走が示唆された。HSPCが骨髄球に分化し組織修復に寄与していることが分かり、この一連の応答が腸内細菌によって制御されることを明らかにした。

本研究課題から得られた知見は骨髄と末梢組織における多臓器連関応答の存在を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

“炎症と造血”は造血分野において注目されている領域であり、老化に伴い増加する炎症疾患との関連だけでなく生体防御や組織修復における機能の観点からも注目を集めている分野である。本研究では炎症の起こる場である血液の幹細胞(造血幹細胞)をモデルとして、これまで明らかにされてこなかった腸炎下における腸内細菌依存的な造血応答制御を分子レベルで明らかにするとともに、腸管関連組織で増加した前駆細胞ならびに骨髄球が最終的には組織修復に参与することを明らかにした。

本研究課題から得られた研究成果は造血における新たな概念を提示したという点において、基礎医学への貢献は大きく学術的意義ならびに社会的意義の高い研究である。

研究成果の概要(英文)：The previous report has shown that gram negative bacterial infection directly activates innate immune signaling in the dormant hematopoietic stem cells (HSCs) to induce proliferation and proliferative stress, eventually leading to functional impairment. Given as many commensal bacteria as human cells in our body, we hypothesized that microbial infiltration upon colitis might affect early hematopoiesis in bone marrow (BM).

Then we tested this by employing dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis mouse model. Acute colitis expanded the hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) in BM and directs them to inflamed mesenteric lymph nodes for differentiation into myeloid cells specialized in gut tissue repair.

These findings establish cross-organ communication between the BM and distant inflamed sites.

研究分野：細胞生物学

キーワード：造血幹前駆細胞 腸内細菌 自然免疫 組織修復

1. 研究開始当初の背景

生涯を通じた血液産生(造血)は骨髄に存在し、自己複製能と多分化能をもつ造血幹細胞(HSC)によって維持されている。血液細胞のすべてがHSCから作られており、HSCの自己複製、あるいは成熟細胞への分化というステップは、恒常性維持機構のもと、厳密に機能制御されている。成熟細胞への分化過程において、HSCは骨髄球系あるいはリンパ球系などのいくつかの分化系列に規定された多能性前駆細胞(MPP)へと分化することが知られているが、その詳細なメカニズムはよく分かっていない。ウイルスや細菌感染時には、末梢組織において感染防御の第一線を担う免疫細胞が活性化されるのに伴い、造血幹前駆細胞(HSPC)も活性化される。その一方で、細菌自体がHSPCを直接活性化させていることも明らかになってきている。実際、先行研究において、グラム陰性菌構成成分であるリポ多糖(LPS)が骨髄内のHSCを直接刺激し、Toll様受容体4(TLR4)シグナルを介して増殖ストレスを誘導し、その結果としてHSCの機能を損傷することが報告された(Takizawa, Cell Stem Cell 2017)。

われわれの体内には40兆個以上の細菌が常在菌として共生しており、近年、特に腸内細菌が様々な免疫や疾患に関与していることが明らかになりつつある。これまでの先行研究で明らかになってきたグラム陰性細菌誘導性のHSC機能変容と体内に共生する細菌叢の多様性を考え合わせると、腸内細菌が骨髄におけるHSCあるいは造血応答に何らかの影響を与えることが予想される。そこで、本研究では腸内細菌が腸から離れた臓器である骨髄における造血応答、あるいは炎症局所である腸管組織における造血応答を制御しているのか、さらに臓器間における造血応答の相互作用はあるのかという問いを軸に『腸内細菌による多臓器連関造血応答』という仮説をたて、検討を行った。

2. 研究の目的

本研究では、『腸内細菌による多臓器連関造血応答』という仮説をもとに腸管炎症モデルマウスを作成し、腸内細菌シグナルが造血応答に与える影響について検討を行い、分子メカニズムを詳細に解明することを目的とした。そこで下記の3つの研究目的を設定し、腸管炎症下における骨髄での造血応答を明らかにするとともに原因となる腸内細菌の同定ならびにそれらの造血制御に関する分子メカニズムについて解明するよう取り組んだ。

目的1) 造血幹細胞分化・遊走を制御する分子メカニズムおよび腸内細菌成分の同定

目的2) 腸内細菌によって惹起される造血応答の組織修復における役割

目的3) ヒト炎症性腸疾患サンプルあるいは老化マウスでの検証

3. 研究の方法

1) 造血幹細胞分化・遊走を制御する分子メカニズムおよび腸内細菌成分の同定

本研究ではデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)経口投与による腸炎モデルマウスを作製し、腸管炎症に対する造血応答について解析を行った。具体的な実験手法としては、フローサイトメトリー、組織イメージングを用いて、炎症に暴露された造血幹細胞の表現型や組織局在について解析を行った。さらにHSPCの機能については試験管内コロニーアッセイを用いて評価した。原因腸内細菌成分を同定するために、抗菌薬を投与し腸内細菌叢を変化させたマウスに腸管炎症を惹起し、腸内細菌叢の変化による造血応答の変化を確認した。その際、マウスから腸内要物を採取し16Sゲノム解析を行い腸内細菌叢について解析を行った。さらに、これらの結果から腸管炎症における造血応答を制御している腸内細菌を同定し、その細菌由来の細胞膜溶解液を作成し、腸管炎症を起こしていない野生型マウスに投与することで、腸管炎症で見られた造血応答を再現できるか検討した。

2) 腸内細菌によって惹起される造血応答の組織修復における役割

PTX を投与し骨髄から腸間膜リンパ節への HSPC の遊走を阻害させることで、腸管炎症への影響を確認した。体重変動ならびに組織学的評価を用いて、HSPC が腸管炎症においてどのような役割を担っているのか検討を行った。さらに、HSPC から分化した Ly6C+/G+細胞を採取し、qPCR を用いて骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) 関連遺伝子あるいは抗炎症 M2 マクロファージ関連遺伝子の発現レベルについて確認した。最後に、腸間膜リンパ節で増加した骨髄球を採取し、腸管炎症を惹起したマウスに移植し、腸管炎症の症状を軽減させるか検討を行った。

目的 3) ヒト炎症性腸疾患サンプルあるいは老化マウスでの検証

老齢マウスの腸間膜リンパ節を採取し、フローサイトメトリー解析にて、腸管炎症で惹起された一連の造血応答が老化マウスでも確認されるか検討を行った。さらに、マウスモデルだけでなくヒト腸管炎症においても、これまでに明らかにした一連の造血応答と同様の現象が観察されるか検討するため、炎症性腸疾患患者から摘出された腸管膜リンパ節を採取し、HSPC、あるいは成熟細胞についてフローサイトメトリーを用いて解析した。

4. 研究成果

1) 造血幹細胞分化・遊走を制御する分子メカニズムおよび腸内細菌成分の同定

DSS 投与により腸管炎症を惹起させ、骨髄における造血応答について解析を行ったところ、急性腸炎下では骨髄において HSC および造血幹前駆細胞の 1 つである多能性前駆細胞 MPP が有意に増加し、腸間膜リンパ節においても、MPP が有意に増加した。組織イメージングを行ったところ、急性腸炎下では腸間膜リンパ節において、CD31 陽性血管内皮細胞に HSPC が近接しており、MPP が血流を介して骨髄から腸間膜リンパ節へ遊走した可能性が示唆された。また、試験管内コロニーアッセイを行ったところ、骨髄、腸間膜リンパ節どちらにおいても、急性腸炎下において顆粒球系コロニーが有意に増加しており、急性腸炎は造血幹前駆細胞が顆粒球系に分化することが示唆された。次に、抗菌薬を長期間投与し腸内細菌叢を変化させたマウスに腸管炎症を惹起させ DSS に対する造血応答について解析した。その結果、*Bacteroides* の割合が増加したマウスにおいて一連の造血応答が増強された。そこで、*Bacteroides* 細胞膜溶解液を作成し、腸管炎症を起こしていない野生型マウスに投与したところ、*Bacteroides* の腹腔内投与により骨髄および腸間膜リンパ節における MPP の増加を認めた。したがって、*Bacteroides* が骨髄および腸間膜リンパ節における MPP の増加を引き起こしている可能性が示唆された。

2) 腸内細菌によって惹起される造血応答の組織修復における役割

PTX を投与し骨髄から腸間膜リンパ節への HSPC の遊走を阻害させることで、腸管炎症への影響を確認した。体重変動を経時的に測定したところ、PTX を投与した腸炎惹起マウスにおいて体重減少が有意に増悪した。また組織学的に評価を行ったところ、PTX を投与した腸炎惹起マウスでは、PTX を投与していない腸炎マウスに比べ、組織学的スコアが有意に増加し、腸管炎症が増悪していることが示唆された。さらに、腸間膜リンパ節の Ly6C+/G+細胞を採取し、qPCR を用いて骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) 関連遺伝子あるいは抗炎症 M2 マクロファージ関連遺伝子の発現レベルについて確認したところ、*Cd163*, *Nos2* などの抗炎症に働く遺伝子群の発現レベルが亢進していた。次に Gr-1 中和抗体を用いて腸間膜リンパ節の Ly6C+/G+細胞を除去したところ、腸管炎症が有意に増悪し、さらにこれらの細胞を腸管炎症惹起マウスに移植したところ、臨床スコアならびに腸管の委縮が有意に軽減した。これらの結果から、腸間膜リンパ節において増加した顆粒球が急性腸炎において組織修復に寄与していることが示唆された。

目的 3) ヒト炎症性腸疾患サンプルあるいは老化マウスでの検証

老齢マウスの腸間膜リンパ節を採取し、フローサイトメトリー解析にて、腸管炎症で惹起された一連の造血応答が老化マウスでも確認されるか検討を行った。老化マウスの腸間膜リンパ節において、腸管炎症を惹起したマウス同様に MPP ならびに顆粒球が有意に増加していた。さらに、ヒト炎症性腸疾患患者の腸間膜リンパ節を採取し、フローサイトメトリーにて解析を行った。炎症箇所付近に近接したリンパ節と炎症箇所から離れたリンパ節とで比較検討を行ったところ、炎症箇所に近いリンパ節において有意に MPP の増加を認めた。これらの結果から、マウスのみならず、ヒトの腸管炎症においても腸間膜リンパ節において MPP が増加している可能性が示唆された。さらに、腸炎のみならず、腸間膜リンパ節における造血応答が老化とも関連する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sezaki Maiko, Hayashi Yoshikazu, Wang Yuxin, Johansson Alban, Umemoto Terumasa, Takizawa Hitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Immuno-Modulation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 585367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.585367	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 該当する
1. 著者名 林 慶和、滝澤 仁	4. 巻 61
2. 論文標題 自然免疫シグナルを介した造血制御とその変容	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 651～656
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.61.651	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 Hayashi Yoshikazu, Kimura Soi, Yano Ena, Yoshimoto Shohei, Saeki Ayaka, Yasukochi Atsushi, Hatakeyama Yuji, Moriyama Masafumi, Nakamura Seiji, Jimi Eijiro, Kawakubo-Yasukochi Tomoyo	4. 巻 1870
2. 論文標題 Id4 modulates salivary gland homeostasis and its expression is downregulated in IgG4-related disease via miR-486-5p	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 119404～119404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2022.119404	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 Sezaki Maiko, Hayashi Yoshikazu, Nakato Gaku, Wang Yuxin, Nakata Sayuri, Biswas Subinoy, Morishima Tatsuya, Fakruddin Md, Moon Jieun, Ahn Soyeon, Kim Pilhan, Miyamoto Yuji, Baba Hideo, Fukuda Shinji, Takizawa Hitoshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Hematopoietic stem and progenitor cells integrate microbial signals to promote post inflammation gut tissue repair	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e110712
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2022110712	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Maiko Sezaki, Yoshikazu Hayashi, Gaku Nakato, Subinoy Biswas, Tatsuya Morishima, Jieun Moon, Soyeon Ahn, Pilhan Kim, Yuji Miyamoto, Hideo Baba, Shinji Fukuda and Hitoshi Takizawa
2. 発表標題 Hematopoietic stem and progenitor cells integrate microbial signals to enhance gut tissue repair
3. 学会等名 18th Stem Cell Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 慶和
2. 発表標題 慢性炎症は造血幹細胞の骨髄再構築能を低下させる
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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