

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17395

研究課題名（和文）ネクロプトーシスを介した造血幹細胞の老化と造血腫瘍発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Understanding the role of necroptosis in hematopoietic stem cell aging and malignant transformation

研究代表者

山下 真幸（Yamashita, Masayuki）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80588038

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）：造血組織が老化する要因として、造血幹細胞の加齢性変化が挙げられる。我々は制御されたネクロトーシスとして近年同定されたネクロプトーシスに着目し、その実行因子であるMLKLのノックアウトマウスを用いて、炎症や加齢に伴う造血幹細胞の機能低下にMLKLが果たす役割を解析した。その結果、MLKLの活性化が造血幹細胞の加齢性変化および骨髄異形成症候群（MDS）の無効造血を促進していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢とともに造血幹細胞の機能が低下する仕組みについてはこれまで不明な点が多かったが、本研究によってその分子メカニズムの一端が明らかになった。ネクロプトーシス経路を標的とすることで造血幹細胞の加齢性変化を抑制できれば、造血組織の老化や加齢関連疾患の進行を制御する新しい治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Age-related functional decline in hematopoietic stem cells (HSCs) is one of the main reasons why the hematopoietic system ages. In this study, we investigated the role of necroptosis, a form of programmed necrosis whose molecular machinery has recently been identified, in HSC functional decline upon inflammation and aging. By analyzing mutant mice deficient for the necroptosis effector MLKL, we found that activation of MLKL drives age-related functional decline in HSCs and disease progression of myelodysplastic syndrome (MDS). Our results identify MLKL as a key mediator of age-related functional attrition in HSCs and ineffective hematopoiesis in MDS, and pave the way for developing new strategies to control aging and age-related diseases in the hematopoietic system.

研究分野：幹細胞医学

キーワード：造血幹細胞 ネクロプトーシス MLKL 慢性炎症 老化 骨髄異形成症候群 ダメージ関連分子パターン ミトコンドリア

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

造血組織における老化は、貧血、免疫系の異常、クローン性造血及び造血器腫瘍の発症など、その影響は全身に波及する。造血老化の重要な原因の一つとして、造血幹細胞の加齢性変化が挙げられる。造血幹細胞は自己複製能と分化多能性を併せ持ち、血液恒常性の維持および造血再生を担うが、加齢とともに再生能力の低下、骨髄球系優位な分化など、造血幹細胞レベルでの変化が起きる。一方、造血幹細胞の機能は骨髄微小環境(ニッチ)に依存しているが、加齢に伴い骨髄内で慢性炎症が生じ、ニッチによる造血幹細胞支持能が変化する。造血幹細胞を取り巻くこれらの内因性・外因性変化の結果、老齢マウスでは機能不全に陥った造血幹細胞が骨髄内に蓄積する。しかしながら、このような造血幹細胞の加齢性変化の仕組みについてはまだ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

近年、慢性炎症の重要な発生源として、ダメージ関連分子パターンの放出を担うネクロプトーシスの関与が指摘されている。さらに、ネクロプトーシス経路はさまざまな炎症刺激の下流で活性化しうることがわかってきている。そこで筆者らは、ネクロプトーシスの実行因子である MLKL に着目し、*Mkl1* ノックアウト (*Mkl1*<sup>-/-</sup>) マウスを用いて、炎症や造血老化モデルにおける MLKL の活性化が造血幹細胞の表現系に及ぼす影響を解析するとともに、加齢関連造血器腫瘍である骨髄異形成症候群 (MDS) への MLKL の関与についてマウスモデルを用いて検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス

*Mkl1*<sup>-/-</sup> マウス (C57BL/6 の遺伝的背景) はドイツのケルン大学と MTA を締結のうえ供与を受けた。*Mkl1*<sup>-/-</sup> マウスは同腹子より得た野生型 (*Mkl1*<sup>+/+</sup>) マウスと比較した。炎症モデルとして、poly I:C 5 mg/kg を 1 回また隔日で 7 回腹腔内投与し、最終投与翌日に解析した。また、造血老化モデルとして、150 mg/kg の 5-FU を 1 ヶ月毎に 3 回腹腔内投与し、最終投与 1 ヶ月後に解析した。動物実験は東京大学医科学研究所の動物実験委員会より承認を受けて行われた。

#### (2) フローサイトメトリー

マウス大腿骨、脛骨、骨盤骨、上腕骨および胸骨より骨髄を採取し、溶血剤および FicoII 液で単核球分離したのち、染色バッファー (2% FBS/PBS) で希釈された以下の標識抗体を用いて染色を行った。CD3e (145-2C11), CD4 (GK1.5), CD5 (53-7.3), CD8a (53-6.7), B220 (RA3-6B2), Mac1 (M1/70), Gr-1 (RB6-8C5), Ter119 (TER-119), c-Kit (2B8), Sca-1 (D7), CD150 (TC15-12F12.2), CD48 (HM48-1), Fli2 (A2F10), FcγR (93), CD34 (RAM34), EPOR (eBio1560), CD41 (MWRReg30)。Lineage (Lin) マーカーには CD3e, CD4, CD5, CD8a, B220, Mac1, Gr-1 および Ter119 を用いた。染色後の細胞を Propidium Iodide を含む染色バッファーに懸濁したのち、FACS Celesta および FACS Aria IIIu (BD Bioscience) を用いてデータ取得および標的細胞の分取を行った。

#### (3) 造血幹細胞の培養

フローサイトメーターを用いて分取された造血幹細胞 (*Lin*<sup>-</sup>/*Sca-1*<sup>+</sup>/*c-Kit*<sup>+</sup>/*Fli2*<sup>-</sup>/*CD48*<sup>-</sup>/*CD150*<sup>+</sup>) を、造血幹細胞を効率良く増幅する培地として最近開発された polyvinyl alcohol を含む無血清培地で 7 日間培養し、造血幹細胞の数をフローサイトメトリーによって評価した。

#### (4) 造血幹細胞の移植

フローサイトメーターを用いて分取された造血幹細胞 250 個 (*CD45.2*<sup>+</sup>) を  $2 \times 10^5$  個の補助細胞 (*CD45.1*<sup>+</sup>) とともにレシピエントマウス (*CD45.1*<sup>+</sup>) に移植し、末梢血のドナー由来細胞の割合を 1 ヶ月毎にフローサイトメトリーによって評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 炎症モデルにおける *MLKL*<sup>-/-</sup> マウス造血幹細胞の解析

MLKL が造血幹細胞の炎症ストレス応答に果たす役割を明らかにするため、野生型および *Mkl1*<sup>-/-</sup> マウスに炎症性リガンドである poly I:C を投与したのち、翌日に造血幹細胞をフローサイトメトリーで分取し、定量 PCR や Western blotting によって MLKL の発現量や活性化状態を評価した。その結果、MLKL は造血幹細胞を含む未分化な造血細胞において選択的に発現し、炎症環

境では MLKL が造血幹細胞で活性化することがわかった。さらに、*Mkl1*<sup>-/-</sup>骨髄キメラマウスを用いた検証の結果、poly I:C 投与後に認められる造血幹細胞の機能低下は主に造血細胞の MLKL を介して誘導されることがわかり、MLKL の cell intrinsic な作用が機能抑制の主体であると考えられた。興味深いことに、Annexin V を用いた解析の結果、造血幹細胞における細胞死の頻度は poly I:C 投与後の野生型マウスと *Mkl1*<sup>-/-</sup>マウスで変化がなく、活性化 MLKL は細胞死以外の機能によって造血幹細胞の機能抑制を引き起こす可能性が示唆された。

## (2) 造血老化モデルにおける *MLKL*<sup>-/-</sup>マウス造血幹細胞の機能解析

骨髄内の慢性炎症は造血幹細胞の加齢性変化に重要な役割を果たす。そこで、MLKL が造血幹細胞の加齢性変化に及ぼす影響を明らかにするため、野生型および *Mkl1*<sup>-/-</sup>マウスに抗がん剤の一種 5-FU の反復投与を行い、造血老化モデルを作成した。その結果、野生型で見られるような移植後の骨髄再構築能低下、ミエロイド優位な分化といった造血幹細胞の老化様表現系が *Mkl1*<sup>-/-</sup>マウスでは有意に抑制されていた。実際に、18ヶ月齢に加齢した *Mkl1*<sup>-/-</sup>マウス造血幹細胞の機能を骨髄移植によって解析したところ、野生型で見られるような移植後の骨髄再構築能低下やミエロイドバイアスが改善しており、MLKL が造血幹細胞の加齢性変化の少なくとも一端を担うことがわかった。重要なことに、野生型と *Mkl1*<sup>-/-</sup>マウス骨髄における炎症性サイトカインの濃度を Multiplex ELISA で定量したところ、加齢依存的な炎症状態には差がなく、MLKL は骨髄の炎症そのものには影響を与えないと考えられた。さらに、電子顕微鏡による観察や蛍光プローブによる解析の結果、加齢依存的なミトコンドリアの形態変化や膜電位低下が *Mkl1*<sup>-/-</sup>造血幹細胞で有意に改善しており(図1)、MLKL の cell intrinsic な作用が造血幹細胞のミトコンドリアを傷害する可能性が示唆された。

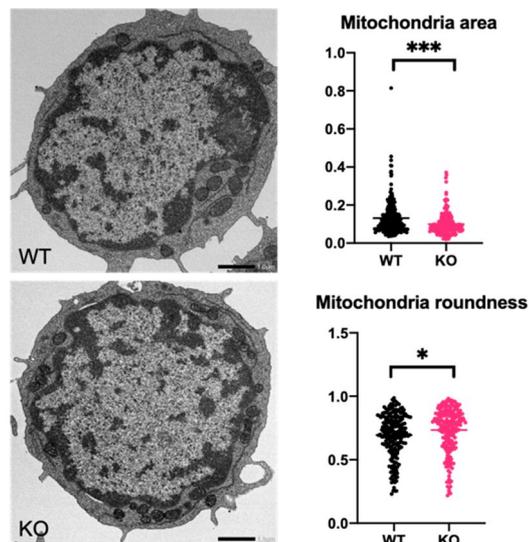


図1. 野生型(WT)および *Mkl1*<sup>-/-</sup>(KO) 造血幹細胞の電子顕微鏡写真とミトコンドリアの解析。

## (3) MDS モデルにおける MLKL の役割の検討

造血幹細胞の加齢性変化と MDS の発症は密接に関わっている。そこで、レトロウイルスベクターによって野生型および *Mkl1*<sup>-/-</sup>造血幹細胞に RUNX1 変異体を高発現させ、致死量放射線照射したレシピエントマウスに移植し骨髄異形成症候群マウスモデルを作成した。その結果、*Mkl1*<sup>-/-</sup>造血幹細胞を移植された群では RUNX1 変異体による MDS 発症が有意に抑制されており、MLKL は MDS の病態促進にも重要な役割を果たすことが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yamashita M, Dellorusso PV, Olson OC, Passegue E	4. 巻 20
2. 論文標題 Dysregulated haematopoietic stem cell behaviour in myeloid leukaemogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Reviews Cancer	6. 最初と最後の頁 365-382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41568-020-0260-3	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 Yamashita M, Suda T	4. 巻 105
2. 論文標題 Low-dose X-rays leave scars on human hematopoietic stem and progenitor cells: the role of reactive oxygen species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 1986-1988
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2020.254292	査読の有無 無
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 Yang C, Yamashita M, Suda T	4. 巻 2
2. 論文標題 A Novel Function of Sphingolipid Signaling via S1PR3 in Hematopoietic and Leukemic Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 3-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2643-3230.BCD-20-0200	査読の有無 無
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 Kayamori K, Nagai Y, Zhong C, Kaito S, Shinoda D, Koide S, Kuribayashi W, Oshima M, Nakajima-Takagi Y, Yamashita M, Mimura N, Becker HJ, Izawa K, Yamazaki S, Iwano S, Miyawaki A, Ito R, Tohyama K, Lennox W, Sheedy J, Weetall M, Sakaida E, Yokote K, Iwama A	4. 巻 5
2. 論文標題 DHODH inhibition synergizes with DNA-demethylating agents in the treatment of myelodysplastic syndromes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 438-450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2020001461	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 Kuribayashi W, Oshima M, Itokawa N, Koide S, Nakajima-Takagi Y, Yamashita M, Yamazaki S, Rahmutulla B, Miura F, Ito T, Kaneda A, Iwama A	4. 巻 218
2. 論文標題 Limited rejuvenation of aged hematopoietic stem cells in young bone marrow niche	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20192283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20192283	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 Yamashita M, Iwama A	4. 巻 23
2. 論文標題 Aging and Clonal Behavior of Hematopoietic Stem Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 1948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23041948	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
---------	---------