

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15465

研究課題名(和文)ダメージ関連分子による線維化制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of Fibrosis Regulation Mechanisms by Damage-Associated Molecular Patterns

研究代表者

半谷 匠 (Hangai, Sho)

東京大学・先端科学技術研究センター・客員研究員

研究者番号：50785350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：HMGB1は個体発生において重要な遺伝子であり、組織幹細胞の恒常性維持における役割が示唆されていたが、その詳細な機能は未解明であった。本研究ではHMGB1が造血幹細胞の増殖、機能維持に寄与することを初めて明らかにした。HMGB1は幹細胞性および細胞周期に関わる遺伝子群の発現制御、およびDNA損傷修復を介して造血幹細胞の恒常性維持に寄与していることが示唆された。さらにHMGB1は慢性骨髄性白血病マウスモデルにおいても、白血病幹細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HMGB1は細胞がダメージを受けた際に放出され炎症・免疫応答を惹起するdamage-associated molecular patternsの一つとして近年研究が進んでいたが、個体発生においても重要な役割を果たすことが示唆されていた。しかしながら詳細な機能は不明であり、特に組織幹細胞における役割については個体レベルでの解析は全くなされていなかった。本研究はHMGB1の造血幹細胞の恒常性維持における役割を初めて明らかにした点で画期的である。さらにHMGB1が慢性骨髄性白血病の病態形成において重要でありかつ治療標的となりうることを示した点で意義のあるものと言える。

研究成果の概要(英文)：HMGB1 is known to be an important gene in ontogeny process and has been suggested to play a role in tissue stem cell homeostasis. However, its detailed function has not been elucidated yet. In this study, we show that HMGB1 contributes to hematopoietic stem cell (HSC) homeostasis. Mechanistically, we propose that HMGB1 contributes to HSC homeostasis by regulating the expression of stemness- and cell cycle-related genes in addition to regulating DNA repair response pathway. Furthermore, HMGB1 was found to play an important role in the proliferation of leukemic stem cells in a mouse model of chronic myelogenous leukemia.

研究分野：免疫学

キーワード：ダメージ関連分子パターン 造血幹細胞 HMGB1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

組織の線維化は自己免疫疾患を始めとして、がんや感染症など様々な疾患で見られる難治性病態である。しかしながら線維化の発生・進展過程は未だ十分に解明されておらず、効果的な治療に乏しいのが現状である(文献 1)。その成因に関して、これまでの研究から上皮細胞に対する傷害および細胞死、これに引き続いて起こる炎症・免疫反応が初期の病態に重要とされている。しかしながら傷害を受け、あるいは死んだ細胞がどのように炎症・免疫系を惹起し、線維化を促進するかは殆ど明らかになっていない。ダメージ関連分子(Damage-associated molecular patterns; DAMPs)は細胞傷害および細胞死の際に放出される自己由来分子群であり、自然免疫受容体を介して炎症性サイトカイン誘導や炎症細胞の遊走促進など炎症・免疫反応を惹起する(文献 2)。したがって、細胞死と炎症を結び付ける存在として線維化の病態に重要な役割を果たす可能性が高く、近年注目されている(文献 3)。

### 2. 研究の目的

High-mobility group box 1 (HMGB1) は代表的な DAMP であり、Toll-like receptor 2 (TLR2) や TLR4 といった自然免疫受容体を介して炎症性サイトカインの誘導を行う。さらに HMGB1 は代表的な線維化マウスモデルである、bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis model モデル(以下 BLM モデル)において病態を増悪されることが示唆されているが詳細なメカニズムは不明であった。興味深いことに我々が独自に作成した HMGB1 ノックインマウスにおいては細胞外に放出された HMGB1 が好中球の遊走を促進することを見出しており、HMGB1 が好中球の動員を通じて線維化を増悪させている可能性が高い。また我々は HMGB1 コンディショナルノックアウトマウスについても、世界に先駆けて作成している。本研究ではこれら申請者が独自に作成した種々の遺伝子改変マウスを用い、「DAMPs 群は線維化の初期病態をいかに制御するか」という問いに答えることが目的である。また我々の作成した HMGB1 阻害剤を用いて、DAMPs が線維化の治療標的になりうるかについても明らかにしたい。

### 3. 研究の方法

本研究では当初、線維化の代表的なマウスモデルである BLM モデルを用いて DAMPs が線維化に及ぼす役割について検討する計画であった。しかしながら HMGB1 が惹起する炎症・線維化について予備的知見を得るために、種々の組織特異的 HMGB1 コンディショナルノックアウトマウスの解析を行ったところ、造血細胞特異的に HMGB1 を欠損させたマウス(以下 HMGB1 cKO マウス)において、野生型マウスと比較して骨髄中の細胞数の顕著な減少を認めた。HMGB1 の全身性欠損マウスは生後 24 時間以内に死亡することから、HMGB1 は個体発生において重要であることが知られていたが、各々の組織幹細胞における HMGB1 の役割は殆ど分かっていなかった。本知見は HMGB1 が造血幹細胞において重要な役割を果たしていることを示唆する、非常に重要なものと言える。そこで本研究ではこの予期しない、重要な結果を元に HMGB1 の造血幹細胞の恒常性維持および病的状態における役割を検討することとした。

本研究ではまず造血細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Vav1-Cre マウスおよび HMGB1 flox マウスを交配することで、造血細胞特異的に HMGB1 を欠損させたマウス(以下 HMGB1 cKO マウス)を作成した。HMGB1 の造血幹細胞の恒常性維持における役割を検討するために骨髄中の血球系細胞の各分化段階における細胞数をフローサイトメーターによって検討した。また、HMGB1 cKO マウスの造血幹細胞における影響をさらに検討するために競合的再構築アッセイを行い、末梢血および骨髄における各造血細胞のキメリズムを測定した。これらの実験により HMGB1 欠損造血幹細胞は骨髄再構築能を顕著に失っていることが明らかとなったため、次に HMGB1 欠損による造血能低下のメカニズムの解明に取り組んだ。具体的には野生型および HMGB1 cKO マウス由来造血幹細胞に対して、フローサイトメーターによる細胞死解析および細胞周期解析を行った。さらに HMGB1 欠損による造血能低下の分子メカニズムを検討するため、野生型および HMGB1 cKO マウス造血幹細胞に対して RNA-seq 解析を行った。最後に HMGB1 の造血幹細胞の病的状態における役割を検討するために、BCR-ABL キメラ遺伝子によるマウス慢性骨髄性白血病モデルの解析を行った。

### 4. 研究成果

HMGB1 cKO マウスでは野生型マウスと比較して骨髄中の細胞数の有意な減少を認めた(図 1)。フローサイトメーターを用いて骨髄における各分化段階の血球系細胞を解析したところ、HMGB1 cKO マウスにおいて長期造血幹細胞(long-term hematopoietic stem cell; LT-HSC)の有意な減少を認めた。また分化の進んだ multipotent progenitor (MPP)、common myeloid progenitor (CMP)、granulocyte monocyte progenitor (GMP)でも有意な減少を認めた。一方 megakaryocyte erythroid progenitor (MEP)、common lymphoid progenitor (CLP)では HMGB1 cKO マウスと野生型マウスにおいて有意な差は認められなかった。また LT-HSC をセルソーターにより単離しコロニーアッセイを行ったところ、HMGB1 cKO マウスでは顕著なコロニー形成低下を認めた。本結果は HMGB1 欠損により造血能の低下、特に LT-HSC の機能低下が惹起されることを示唆している。

HMGB1 欠損による造血幹細胞の機能低下をさらに検討するため、野生型マウスおよび HMGB1 cKO マウス骨髄細胞を用いて競合的再構築アッセイを行った。各々のマウス由来の骨髄細胞 (CD45.2 陽性) を CD45.1 を発現する C57BL/6 コンジェニックマウスから採取した骨髄細胞と混合し、9.5Gy の致死量放射線を照射したレシピエントマウスに尾静脈から移植した。移植後 16 週後において、キメリズムをフローサイトメーターによって解析したところ、末梢血においては HMGB1 cKO 骨髄由来細胞のキメリズムの顕著な低下が見られた (図 2)。また骨髄においても LT-HSC、MPP、CMP、GMP、MEP、CLP において顕著なキメリズム低下が見られた (図 2)。これらの結果により HMGB1 欠損により造血幹細胞の減少、機能低下が起こることが明らかとなった。

次に HMGB1 欠損による造血能低下のメカニズムの検討を行った。野生型マウスおよび HMGB1 cKO マウス由来 LT-HSC に対して、フローサイトメトリーにより細胞死および細胞周期解析を行った。細胞死解析においては、HMGB1 欠損 LT-HSC はアポトーシスの増加を示した (図 3)。また、細胞周期解析においては HMGB1 cKO マウス由来 LT-HSC は S/G2/M 期への蓄積が認められた。さらに野生型マウスおよび HMGB1 cKO マウス由来 LT-HSC をセルソーターにて分取し、RNA-seq 解析を行った。HMGB1 cKO マウス由来 LT-HSC は野生型と比較して LT-HSC 特異的遺伝子群および Notch シグナル遺伝子群の発現低下が認められた (図 4)。また、p57、p27 などのサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質の遺伝子発現低下、および *Ccne1* などのサイクリン遺伝子の発現上昇が認められた (図 4)。HMGB1 はクロマチン結合タンパクであり、DNA 損傷修復および転写制御に重要であることが知られている。従って HMGB1 cKO マウス由来 LT-HSC は、DNA 損傷の蓄積による細胞死の亢進、また幹細胞性および細胞周期に関わる遺伝子群の発現制御の異常により LT-HSC の減少、および機能低下を来しているものと考えられた。

次に慢性骨髄性白血病 (Chronic myelogenous leukemia; CML) における HMGB1 の役割について検討した。CML は造血幹細胞を起源とした白血病であり、9 番染色体にある ABL と 22 番染色体にある BCR が相互転座して形成される BCR-ABL 融合遺伝子が原因の一つとして知られている。これまでの報告から、HMGB1 は白血病細胞での高発現が認められており、腫瘍細胞の増殖や維持に保護的に働いていると考えられている。さらにヒト CML 由来細胞株である K567 で *Hmgb1* 遺伝子の発現をノックダウンすることによりアポトーシスの増加が示されていることから、HMGB1 は CML の病態形成に影響を及ぼすのではないかと考えられた。

そこで野生型マウスおよび HMGB1 cKO マウス由来骨髄細胞から c-Kit 陽性細胞をソートし、レトロウイルスを用いて BCR-ABL 遺伝子を導入し、得られた細胞を致死量の放射線を照射した C57BL/6 マウスに尾静脈内投与した。マウスの生存率を解析したところ、HMGB1 cKO マウス由来細胞を移植したマウスでは、野生型マウス由来細胞を移植したマウスと比較して、生存率の有意な延長を認めた (図 5)。さらに BCR-ABL 陽性白血病幹細胞をソートし、コロニーアッセイを行ったところ、HMGB1 cKO マウス由来の白血病幹細胞ではコロニー数の顕著な現象が見られた。これらの結果は HMGB1 は白血病幹細胞の増殖を促進することで CML の病態促進に寄与することを示唆するものと考えられた。

HMGB1 はこれまで個体発生や種々の組織幹細胞の恒常性維持に重要であることが示唆されていたが、個体レベルでの解析は殆どなされて

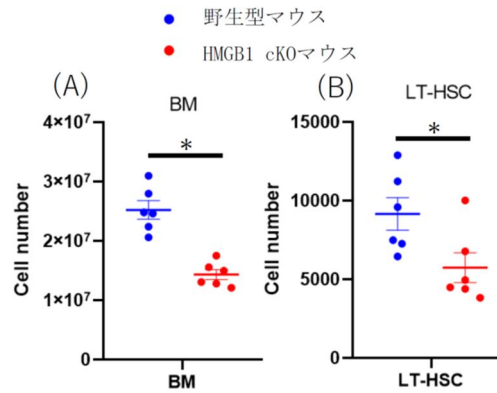


図 1 HMGB1 cKOマウス骨髄細胞の解析  
野生型マウスおよびHMGB1 cKOマウス骨髄中の (A) 骨髄有核細胞数および (B) LT-HSC 数を示す。

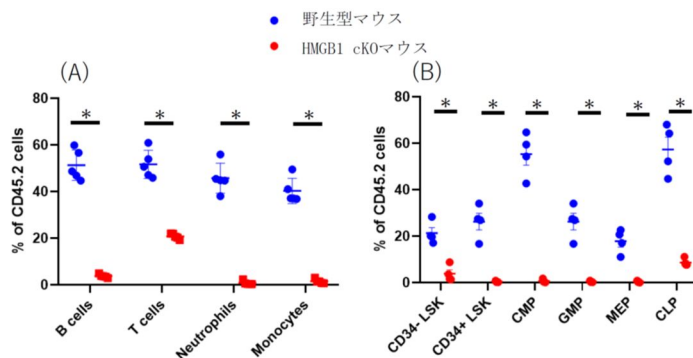


図 2 HMGB1 cKOマウスによる競合的再構築アッセイ  
野生型マウスおよびHMGB1 cKOマウス骨髄細胞による (A) 末梢血および (B) 骨髄におけるキメリズムをしめす。

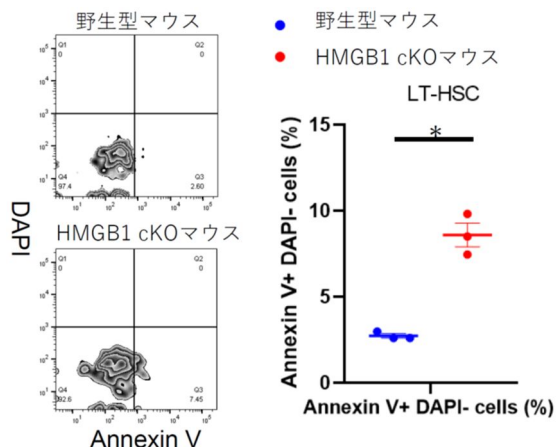


図 3 HMGB1 cKOマウス由来LT-HSCにおける細胞死の解析。  
Annexin V+DAPI+細胞はアポトーシス細胞を表す。

いなかった。本研究は HMGB1 による組織幹細胞研究に新たな知見を提供するとともに、HMGB1 による造血幹細胞恒常性維持機構をさらに解析することで造血幹細胞移植などへの臨床応用の可能になると考えられる。また、本研究が明らかにした HMGB1 による白血病幹細胞の役割をさらに解明することで HMGB1 を標的とした新たな白血病治療の開発にも繋がると言える。

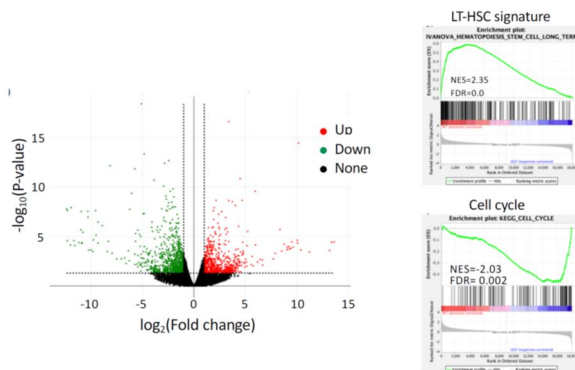


図 4 LT-HSCの遺伝子発現におけるHMGB1欠損の影響

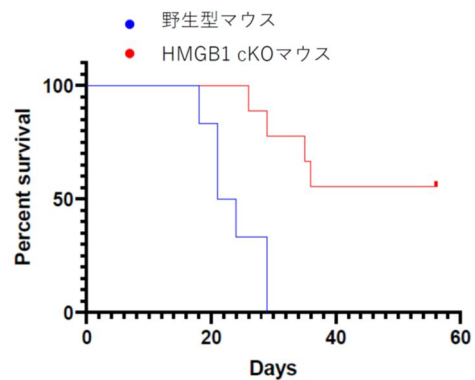


図 5 慢性骨髄性白血病へのHMGB1欠損の影響

## 引用文献

- Mora A, Rojas M, Pardo A, Selman M. Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(11):755-772.
- Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(2):95-112.
- Distler J, Györfi A, Ramanujam M, Whitfield M, Königshoff M, Lafyatis R. Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15(12):705-730.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hangai Sho, Kimura Yoshitaka, Taniguchi Tadatsugu, Yanai Hideyuki	4. 巻 112
2. 論文標題 Signal transducing innate receptors in tumor immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2578 ~ 2591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14848	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 Eto Shotaro, Yanai Hideyuki, Hangai Sho, Kato Daiki, Nishimura Ryohei, Nakagawa Takayuki	4. 巻 11
2. 論文標題 The impact of damage-associated molecules released from canine tumor cells on gene expression in macrophages	5. 発行年 2021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/s41598-021-87979-1	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 Hangai Sho, Kawamura Takeshi, Kimura Yoshitaka, Chang Ching-Yun, Hibino Sana, Yamamoto Daisuke, Nakai Yousuke, Tateishi Ryosuke, Oshima Masanobu, Oshima Hiroko, Kodama Tatsuhiko, Moriya Kyoji, Koike Kazuhiko, Yanai Hideyuki, Taniguchi Tadatsugu	4. 巻 22
2. 論文標題 Orchestration of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment by ubiquitous cellular protein TCTP released by tumor cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 947 ~ 957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-021-00967-5	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 Yanai Hideyuki, Hangai Sho, Taniguchi Tadatsugu	4. 巻 33
2. 論文標題 Damage-associated molecular patterns and Toll-like receptors in the tumor immune microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 841 ~ 846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab050	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 Nishio Junko, Negishi Hideo, Yasui-Kato Mika, Miki Shoji, Miyanaga Kazuhiko, Aoki Kotaro, Mizusawa Takuma, Ueno Masami, Ainai Akira, Muratani Masafumi, Hangai Sho, Yanai Hideyuki, Hasegawa Hideki, Ishii Yoshikazu, Tanji Yasunori, Taniguchi Tadatsugu	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification and characterization of a novel Enterococcus bacteriophage with potential to ameliorate murine colitis	5. 発行年 2021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/s41598-021-99602-4	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 Sana Hibino, Shotaro Eto, Sho Hangai, Keiko Endo, Sanae Ashitani, Maki Sugaya, Tsuyoshi Osawa, Tomoyoshi Soga, Tadatsugu Taniguchi, Hideyuki Yanai	4. 巻 -
2. 論文標題 Tumor cell-derived spermidine is an oncometabolite that suppress TCR clustering for intratumoral CD8+ T cell activation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) なし	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 半谷 匠
2. 発表標題 Translationally-controlled tumor protein (TCTP) released by tumor cells orchestrates dynamics of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 半谷 匠
2. 発表標題 TCTP released by tumor cells orchestrates dynamics of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ダメージを受けたがん細胞由来分子が 免疫応答の抑制により がんの増殖に寄与していることを発見  
<https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/release/20210709.html>

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