

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）（令和3（2021）採択分）

研究期間：2021～2023

課題番号：21KK0150

研究課題名（和文）効率的な生体防御を目指した血液幹細胞の免疫記憶の解明とその制御

研究課題名（英文）Modulation of immune memory in blood stem cell toward effective host defense

研究代表者

滝澤 仁 (Takizawa, Hitoshi)

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：10630866

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,600,000円

研究成果の概要（和文）：血液幹細胞は一生を通じて血液と免疫を作り出す源泉となる細胞であり、骨髄内で自分自身を作り出す自己複製能と様々な細胞へと分化する多分化能を持つ。本研究計画では自然免疫シグナルが高齢血液幹細胞に免疫記憶を誘導し、感染症や炎症に対してより応答性のある血液・免疫系を構築するという“幹細胞の免疫能再活性化（プライミング）”という仮説を検証した。得られた結果から1次刺激の種類に応じて造血幹細胞にメモリー様のエピゲノム変化によって感染や炎症などの2次刺激に対する応答性が変化することが示唆された。今後は、自然免疫記憶の責任遺伝子の同定と、それらの制御による血液・免疫能を増強する方法論を確立していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然免疫応答は、本来は生体防御のために免疫細胞に賦与されたもので、造血幹細胞などの未熟な造血細胞でもTLR機能が見つかり感染時の造血産生に重要である。本研究では、Bacteroides属の菌体成分が腸炎後の組織修復に寄与する好中球を誘導するユニークな性質を見出した（特許取得済み）。本菌体成分はグラム陰性菌由来分子のリポ多糖（LPS）と比べて、造血幹細胞の機能を障害することも強い炎症を起こすこともなく、造血幹細胞にエピゲノム変化を誘導できる優位性を有することが示された。今後は、プライミングを誘導する分子やシグナルを同定し次第、ワクチン開発や薬剤製品化につなげていきたい。

研究成果の概要（英文）：Hematopoietic stem cells are cells that serve as a source for producing blood and immune systems throughout life. They have the ability to self-replicate within the bone marrow and differentiate into various cells. In this research project, we have tested the hypothesis of "immunomodulation (priming) of stem cell immunity," which involves inducing immune memory in aged hematopoietic stem cells through natural immune signals to construct a more responsive blood and immune system against infections and inflammation. The results obtained in this study strongly suggest that epigenetic changes resembling memory occur in hematopoietic stem cells and alters their responsiveness to secondary stimuli such as infection and inflammation. The future focus will be on identifying responsible genes for natural immune memory and establishing methodologies to enhance blood and immune function through their control.

研究分野：血液学

キーワード：造血幹細胞

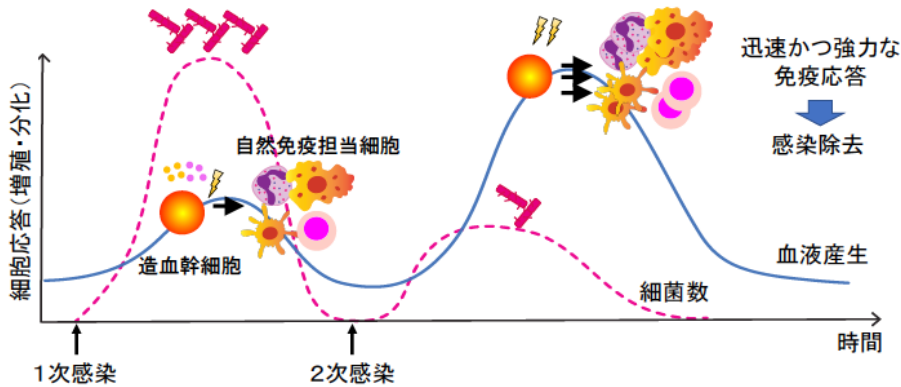
様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

成体骨髄は血液産生の際であり、感染や炎症の際にほとんど免疫応答が起こらない免疫特権臓器の一つであり、長命である血液幹細胞および免疫記憶細胞を維持するのに有利な環境を形成すると考えられてきた。しかしながら、近年、感染や炎症などの際には、骨髄でも実に活発かつ多様な免疫応答や炎症反応が起こり、血液の源泉である血液幹細胞や骨髄微小環境の機能特性に大きな影響を及ぼすことが分かりつつある(Takizawa H et al, Blood 2012)。自然免疫認識受容体である Toll 様受容体 (TLR)の発現が血液幹細胞に見つかり(Nagai et al, Immunity 2006)、骨髄に流入する細菌由来の菌体成分が自然免疫シグナルを介して血液幹細胞を直接活性化して増殖、分化、遊走を制御すること、2度目の再刺激では1回目よりも迅速に分裂及び分化を誘導することが報告された(Sezaki M, et al, Front Immunol 2020)。また、NK 細胞やマクロファージなどの自然免疫細胞に最初の活性化後に高い免疫反応性を獲得する“Trained immunity (免疫記憶)”が見つかり(Netea G et al, Science 2016)、自然免疫シグナルの活性化が起こる血液幹細胞も免疫記憶の形成が十分可能であると考えられる。さらには、血液以外の組織幹細胞で見つかった、炎症に対してより高い適応性を獲得する炎症記憶(Shruti N et al, Nature 2017)や種々の血液ガンで徐々に明らかになりつつある、エピゲノム変化を起因とした血液幹細胞のガン化メカニズムは、血液幹細胞でのエピゲノム変化が定着可能であることを支持する。

しかしながら、老化が進むにつれ、血液幹細胞の自己複製能は低下し、同時に分化能も B や T 細胞などの獲得免疫担当細胞の産生より、マクロファージや樹状細胞などの自然免疫担当細胞を多く産生する方向に偏る。これを一因として、獲得免疫よりも自然免疫優位な生体防御にシフトし、コロナウイルスのような感染症に対して易感染性や高い致死性を示すために(Kovtonyuk LV, Takizawa H et al, Front. Immunol. 2016)、いかにして老化した血液幹細胞の機能を回復させ自然免疫を強化するかが、高齢個体の生体防御の維持及び改善に向けた鍵となる。従って、長寿の血液幹細胞に免疫記憶を誘導し、幹細胞から分化した自然免疫担当細胞の免疫機能を高めることができれば、老化が進行しても感染や炎症に対して、より抵抗性および持続性のある免疫システムを構築できると考え(図1)、本研究では問1) 血液幹細胞は免疫記憶を形成し、高い免疫応答性を獲得できるか?、問2) もしそうであれば、その分子基盤は何か? の2つの問いを設定し、研究を推進していく。

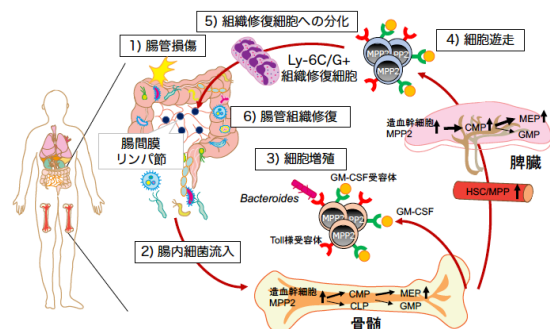
図1 感染に対する血液幹細胞と免疫記憶と感染防御（概念図）



2. 研究の目的

代表者らは、細菌感染モデルを用いて、細菌細胞壁の構成成分であるリポ多糖 (LPS) が自然免疫受容体である TLR4を直接活性化して細胞分裂の静止期にある血液幹細胞の増殖と分化を誘導することを報告してきた (Takizawa H et al, JEM 2011; Cell Stem Cell 2017)。また、細菌は外来性の病原菌だけでなく常在菌として体に共生することから腸管炎症に対する血液応答に注目し、腸管炎症の際に体内に流入する腸内細菌の一種、Bacteroides が自然免疫シグナルを介して骨髄の血液幹細胞の増殖を誘導すること、一部の血液幹細胞が炎症局所である腸間膜リンパ節へと遊走し、炎症を抑え組織修復に寄与する自然免疫細胞を産生することを見出した (Sezaki M, et al, EMBO J 2022 と図2)。これらの結果は、細菌による刺激は骨髄の血液幹細胞を活性化し、感染や組織修復に対応する細胞へと分化して恒常性維持のために生体反応を制御する能力を持つことを示唆している。各細菌成分が持つ自然免疫シグナル

図2 自然免疫シグナルを介した造血制御と組織修復



【2 国際共同研究の研究目的、研究方法など（つづき）】

活性化能力を利用して、感染や組織侵襲に対してより応答性または抵抗性のある“血液幹細胞の免疫記憶”を誘導するアイデアに至った。

感染時のみならず、自然老化でも IL-6 や IL-1 など種々の炎症性因子の発現が上昇する(Ferucci L. et al, Blood 2006)。また、免疫・血液系の老化変化には炎症応答で見られる反応と多くの共通点があることから、炎症を老化現象の一因と捉える”炎症性老化”という概念が確立されつつある (Kovtonyuk LV, Takizawa H et al, Front Immunol 2016)。本代表者らの最新研究でも、老化に伴い骨髄内で発現上昇する自然免疫シグナルが血液幹細胞の機能老化に関与していることを突き止めた (Kovtonyuk LV, Takizawa H et al, Blood 2022)。幹細胞老化の本質は細胞クローンごとの機能的差異が拡大することであり、血液幹細胞の老化解析には細胞集団の不均一性や細胞クローン間の機能的差異を知るためシングルセル解析技術が欠かせない。

本研究ではその仮説に基づき、自然免疫シグナル活性化が血液幹細胞に免疫記憶を誘導する、“免疫記憶”の生成と維持の分子基盤を明らかにする。また、高齢血液幹細胞の免疫能再活性化(プライミング)により、感染に対する免疫応答の強化と抵抗性獲得を目指す。

3. 研究の方法

以上の問いを紐解くために以下の2つの目的を設定して、研究を推進した。

- 目的1) 自然免疫シグナル活性化によって誘導される造血幹細胞の炎症記憶
- 目的2) 統合シングルセル解析の確立と炎症記憶制御因子の同定

4. 研究成果

目的1) 自然免疫シグナル活性化によって誘導される造血幹細胞の炎症記憶

野生型マウスへ PBS (コントロール)、LPS (細菌)、Bacteroides (腸内細菌、以下 Bac と省略) の微生物由来因子を投与して TLR シグナルを1次刺激する。その後、定常状態に戻った1~6ヶ月後に2次刺激(感染、腸管・皮膚障害)を行い、個体解析(生存率、組織解析など)、免疫応答(サイトカイン産生、細菌数など)、造血幹細胞及び分化細胞の表現型解析(細胞表面マーカー)や細胞機能解析(増殖、分化、アポトーシス)を行う(図3)。予備の実験において、四週間前に Bac または LPS 刺激したマウスは盲腸結紮による敗血症モデルで誘導される低体温症およびその後の致死率を有意に改善した(図4右上)。また、DSS 薬剤投与による腸管障害に対しても、下痢を伴う体重低下および組織障害を有意に改善した(図4右下)。Bac/LPS 投与16時間後の血清中に含まれる炎症性サイトカインを調べたところ、LPS 刺激群ではほとんどすべてのサイトカインが上昇した一方、Bac 刺激群では全く見られなかった(図5)。LPS は IFN 経路を活性化し免疫寛容を誘導することから、2つの刺激は別々のメカニズムで感染や組織障害に対する抵抗性を示していることが示唆される。腸管障害に伴い体内に流入する腸内細菌叢や腸管組織、免疫細胞の機能解析を行う。皮膚機能障害モデルとして IMQ (TLR7 against) 塗布で乾癬を誘導する。

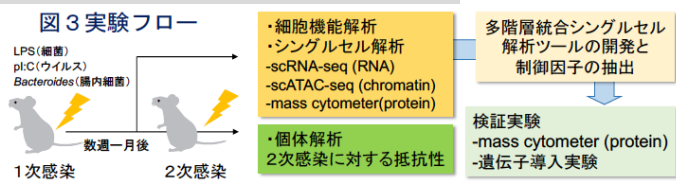


図3 実験フロー

図4 自然免疫プライミングによる感染および組織損傷への抵抗性獲得

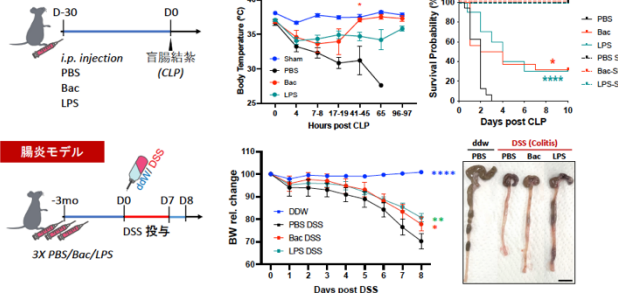
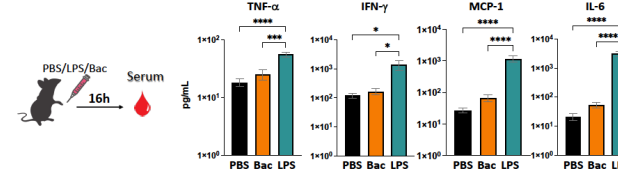


図5 Bac 1次刺激はLPSと異なり、炎症性サイトカイン産生を誘導しない



ほとんどすべてのサイトカインが上昇した一方、Bac 刺激群では全く見られなかった(図5)。LPS は IFN 経路を活性化し免疫寛容を誘導することから、2つの刺激は別々のメカニズムで感染や組織障害に対する抵抗性を示していることが示唆される。腸管障害に伴い体内に流入する腸内細菌叢や腸管組織、免疫細胞の機能解析を行う。皮膚機能障害モデルとして IMQ (TLR7 against) 塗布で乾癬を誘導する。

【2 国際共同研究の研究目的、研究方法など (つづき)】

腸管障害後(8日目)の骨髄では、Bac 1次刺激した群で有意に造血幹細胞の増殖が増加した(図6)。プライミングされた造血幹細胞から分化した細胞が感染や組織障害に関与しているか調べるために、RFP陽性の造血幹細胞(Bac刺激あり/なし)をTLR2;4DKOマウスに養子移植し(放射線なし)、各2次刺激後に損傷組織で分化しているRFP陽性好中球の割合をトレースする。感染または組織障害マウスの骨髄より好中球を精製し、機能(ROS放出、食食能、免疫機能分子発現)を評価する(研究協力・若橋博士)。予備的実験において、腸管障害マウスの骨髄および炎症直下である粘膜固有層リンパ節の成熟細胞を評価したところ、申請者らが以前に報告した組織修復に特化した好中球がBac刺激した群でコントロール群に比して増加しており、大腸菌の取り込みによる食食能も亢進していた(図7上)。皮膚障害モデルでも骨髄の造血幹細胞を含む分画(HSPC)が増殖しており、皮膚ではランゲルハンス細胞が減少している一方で好中球分画が増加していたため(図7下)、今後、1次刺激有無条件下で精査する。

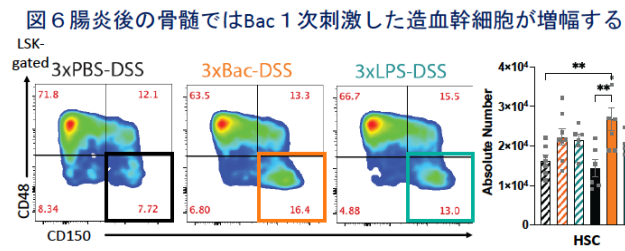
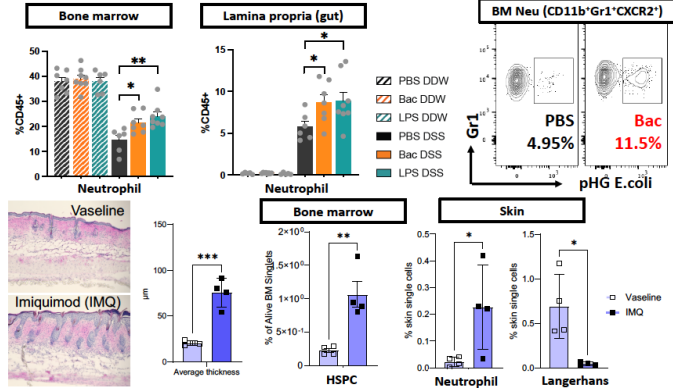


図6 腸炎後の骨髄ではBac 1次刺激した造血幹細胞が増幅する

腸炎モデル

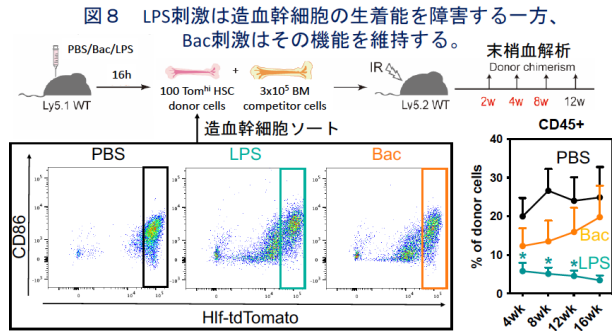
乾燥モデル



皮膚障害モデルでも骨髄の造血幹細胞を含む分画(HSPC)が増殖しており、皮膚ではランゲルハンス細胞が減少している一方で好中球分画が増加していたため(図7下)、今後、1次刺激有無条件下で精査する。

目的2) 炎症記憶制御因子の同定

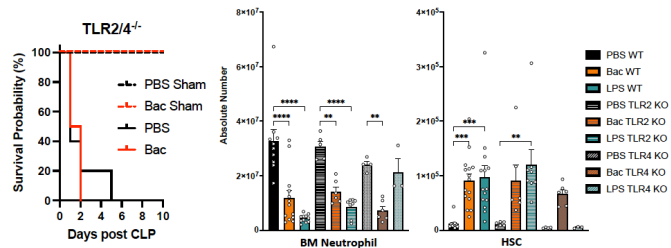
炎症刺激は造血幹細胞の同定に使用する細胞表面タンパク質の発現を変化させるため、造血幹細胞を赤色蛍光タンパク質(RFP)で標識できるマウスを使用する(Yokomizo, J. Exp. Med. 2019)。単離した造血幹細胞を骨髄移植により機能評価したところ、刺激前後で造血幹細胞はRFP陽性分画に検出された(図8)。Bac刺激群はコントロール群と同程度の生着率を示す一方、LPS群は顕著に低い生着率を示し、LPS刺激が造血幹細胞の機能を障害していることが示唆された(図8)。刺激16時間(急性期)後と1ヶ月後(慢性期)の骨髄よりRFP陽性造血幹細胞を調整し、CyTOF、シングルセルRNA/ATACseq、cut&runを行う。



刺激16時間(急性期)後と1ヶ月後(慢性期)の骨髄よりRFP陽性造血幹細胞を調整し、CyTOF、シングルセルRNA/ATACseq、cut&runを行う。

Bacteroidesの菌体成分のうち、開発項目1で観察されるプライミング効果に重要な自然免疫認識受容体を種々の自然免疫シグナル欠損マウスを用いて同定する。全ての自然免疫シグナルはTrif/Myd88アダプタータンパク質を介してシグナル伝達するため、Trif;Myd88ダブル欠損(DKO)マウスに敗血症を誘導してプライミング効果をみたところ、野生型で見られたBac/LPSの効果が完全にキャンセルされPBSと同様に死亡した。LPSはToll様受容体(TLR)-4のリガンドであるため、次にTLR2;4DKOマウスに敗血症を誘導してプライミング効果のキャンセルを認めた(図9左)。一方、TLR2またはTLR4単独欠損(KO)マウスのBac/LPSへの応答性を骨髄細胞(好中球、造血幹細胞(HSC))の増殖で評価したところ、LPSへの応答はTLR4KOマウスにのみなくなり、Bacへの応答は両方のマウスでも残っており(図9右グラフ)、Bac刺激によるプライミング効果にはTLR2/4共に必須であることが示唆された。

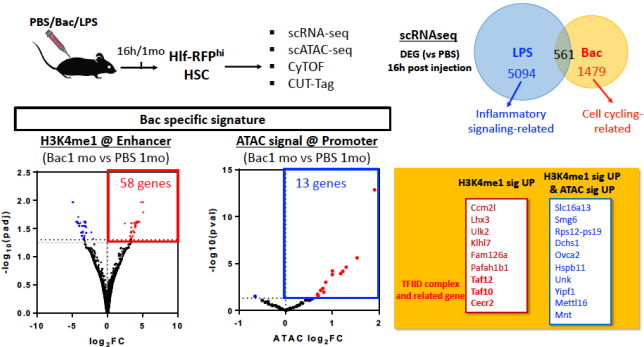
図9 造血幹細胞プライミングはTLR2とTLR4シグナルの両方に依存する



【2 国際共同研究の研究目的、研究方法など（つづき）】

前年度に得られたデータの解析を進め、刺激後1ヶ月以上でもクロマチン開閉やヒストン修飾が維持される遺伝子群を造血幹細胞プライミングを司る遺伝子として絞り込む（シンガポール A*STAR、R. Huber 博士との共同研究）。予備的データ解析から、RNA 発現変化では LPS と Bac 刺激で共通して変化する遺伝子発現が見られるが、そのほとんどは一方に特異的な遺伝子群であった（図10右上）。Bac に特異的なエピゲノム制御を理解するために、刺激4週間後のエンハンサー領域の H3K4me1 解析を行い、58 遺伝子が抽出され、そのうちプロモーター領域がオープンになっているものが Saga 複合体を形成する Taf 遺伝子を含む 13 遺伝子見つかった（図10右下）。これらの候補遺伝子についてバルク細胞を再度調整し、qPCR や ChIPseq で確認する。また、分化した好中球についても分子解析(cut&run, ATAC)を進め、造血幹細胞の候補遺伝子との関連を精査する。共通項が見つければ、それらの遺伝子群を次年度に重点的に解析する。自然免疫応答は、本来は生体防御のために免疫細胞に賦与されたものであるが、造血幹細胞などの未熟な造血細胞でも TLR 機能が見つかると感染時の造血産生に重要であることが分かってきた。しかしながら、生涯造血を維持すべき造血幹細胞が幹細胞枯渇や機能不全に繋がりにかねない自然免疫シグナルを有する生物学的意義は分かっていない。本研究では、*Bacteroides* 属の菌体成分が腸炎後の組織修復に寄与する好中球を誘導するユニークな性質を見出した（特許取得済み）。本菌体成分はグラム陰性菌由来分子のリポ多糖 (LPS) と比べて、造血幹細胞の機能を障害することも強い炎症を起こすこともなく、造血幹細胞にエピゲノム変化を誘導できる優位性を有することが示された。今後は、プライミングを誘導する分子やシグナルを同定し次第、ワクチン開発や薬剤製品化につなげていきたい。

図10 造血幹細胞プライミングを司る候補遺伝子群



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ho Nicole Pui-Yu, Takizawa Hitoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Inflammation Regulates Haematopoietic Stem Cells and Their Niche	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1125 ~ 1125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23031125	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nicole Pui-Yu Ho, Alban Johansson, Hitoshi Takizawa
2. 発表標題 Formation of microbial signal-induced innate immune memory in hematopoietic stem cells
3. 学会等名 The 19th Stem Cell Research Symposium
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ https://ircms.kumamoto-u.ac.jp/members/pis/hitoshi_takizawa/ 幹細胞ストレス研究室 https://ircms.kumamoto-u.ac.jp/research/hitoshi_takizawa/

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
研究分担者	HO Pui-Yu (HO Pui-Yu) (40888385)	熊本大学・国際先端医学研究機構・特定事業研究員 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	山下 真幸 (YAMASHITA Masayuki) (80588038)	東京大学・医科学研究所・助教 (12601)	
研究分担者	河合 麻友 (徳舛麻友) (KAWAI Mayu) (50942687)	熊本大学・国際先端医学研究機構・特定事業研究員 (17401)	

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