

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07073

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群の発症メカニズムに与える活性酸素(ROS)の影響

研究課題名(英文) An analysis for development of myelodysplastic syndrome and influence of ROS

研究代表者

鬼塚 真仁 (ONIZUKA, Makoto)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：80366012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞におけるミトコンドリア機能異常および活性酸素蓄積の影響を明らかにすべく、Sdhc変異マウスを用いて解析を行った。変異マウスの骨髄はより早期に老化し、造血再構築能が障害された。移植ストレスを与えると活性酸素をより蓄積し、リン酸化p-38や-H2AXが高発現した。全エクソン解析すると、変異マウス由来の造血細胞は新たに複数の遺伝子変異を獲得しており、移植によって生じた活性酸素蓄積によって新たにクローン造血を発症し、骨髄異形成症候群発症の母体になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発症年齢中央値が69歳である骨髄異形成症候群は、高齢化が顕著な世界各国において、今後症例数が多くなると見込まれている。今回、マウスモデルにおいてミトコンドリア機能異常から、加齢や複製ストレスによってROS-p38シグナル活性化とDNA損傷がより起こり、これが変異マウスの造血幹細胞に老化や遺伝子変異をもたらすことを明らかにしている。このマウスモデルは特定の遺伝子に限定されないクローン造血を引き起こすと考えられ、骨髄異形成症候群発症の母体となると推測された。今後クローン造血、骨髄異形成症候群の研究に応用していくことができると期待される。骨髄異形成症候群の発症メカニズムにせまる研究である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the effects of a conditional Sdhc missense mutation, which results in the production of excessive reactive oxygen species (ROS), on HSC maintenance and differentiation. Although 3-month-old Sdhc mutant mice (Sdhc-mut) exhibited similar peripheral blood cell counts to wildtype mice (WT), 24-month-old Sdhc-mut showed myeloid skew, anemia, and thrombocytosis. In the competitive repopulation assay, the young Sdhc-mut BM, compared with WT, exhibited 5-fold lower donor chimerism and myeloid-skewed hematopoiesis. Serial transplantation revealed the exhaustion of the mutant-derived cell population. After transplantation, Sdhc-mut HSCs exhibited accumulation of excessive ROS and H2AX foci. Whole exon sequencing showed a significant increase in SNV and indel mutation in recipient mice of Sdhc-mut BM. These results indicate that MCII dysfunction and accumulation of ROS drives HSC aging, leading to the development of clonal hematopoiesis.

研究分野：造血幹細胞移植、血液腫瘍内科学、造血幹細胞と加齢

キーワード：骨髄異形成症候群 酸化ストレス Sdhc-mut マウス 全エクソンシーケンス ミトコンドリア comp lex II

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は休止期に維持されており、代謝を解糖系に依存していることがわかっている。しかし、一方でミトコンドリアが造血幹細胞の維持に大きく関与している可能性が指摘されている。造血幹細胞のミトコンドリア複合体に注目した研究によると、電子伝達系の因子の中でも複合体 II は幹細胞に豊富にみられる一方、複合体 I はほとんどみられず、複合体 II が重要な代謝調節因子であると推測される。さらに、造血幹細胞に遺伝子変異が生じることで発症する骨髄異形成症候群においても、ミトコンドリア機能に影響を及ぼす遺伝子変異が起こることがわかっており、ミトコンドリア機能と老化、癌化は密接な関連があると考えられる。以前、我々はテトラサイクリン誘導性に複合体 II のサブユニットである Sdhc にミスセンス変異を起こすトランスジェニックマウスを樹立している。このマウスではユビキノン結合部位における点変異は複合体 II とユビキノンの結合不和をもたらし、TCA サイクルでうまく伝達されなかった電子がリークし、過剰な活性酸素の発生および「電子伝達系の障害を引き起こす。そこで、このトランスジェニックマウスを用いて、ミトコンドリア複合体 II の機能異常およびそれに続く活性酸素蓄積が造血幹細胞機能に与える影響について検証した。

2. 研究の目的

本研究は、ミトコンドリア複合体 II の SDHC に点変異を持ち、ミトコンドリア機能異常および活性酸素過剰産生を起こす遺伝子改変マウス(mev-1)を用い、老化モデルおよび造血幹細胞移植モデルを用いてミトコンドリア複合体 II の機能異常とそれに引き続く活性酸素蓄積が造血幹細胞の機能に与える影響、また変異原性に与える影響を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) poly(I:C)モデル

野生型マウスおよび mev-1 に poly(I:C)を腹腔内注射し、投与後 48 時間で骨髄細胞をサンプリングし、造血幹細胞における活性酸素蓄積や DNA 障害について比較した。活性酸素蓄積は mitoSOX を用いて評価した。

(2) 老化モデル

野生型および mev-1 を 2 年間経時的に末梢血、骨髄を評価した。末梢血は頬から採血を行い、骨髄は麻酔下に腓骨から 27G 針を用いて吸引して採取した。血算はシスメックスを用いて測定し、血球表面抗原はフローサイトメトリーを用いて評価した。活性酸素蓄積は mitoSOX、膜電位はテトラメチルローダミンメチルエステル(TMRM)、ミトコンドリア容量は mitotracker を用いて測定した。

(3) 1:1 競合移植モデル

Ly5.1(CD45.1)をレシピエントとして、致死量放射線照射後に野生型マウスもしくは mev-1(CD45.1)および competitor として Ly5.1(CD45.1)の骨髄細胞を 1:1 で混合して移植した。末梢血を 4 週間ごとに採取し、キメリズムを評価した。また、移植 16 週間後に骨髄をサンプリングし、骨髄内の造血幹細胞割合やミトコンドリア状態を評価した。さらに、この 16 週後の骨髄を別の Ly5.1 レシピエントマウスに継代移植し、長期造血再構築能を評価した。

(4) 置換移植モデル

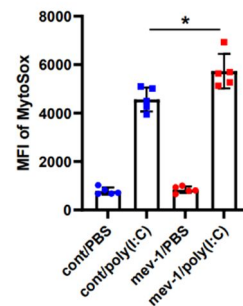
Ly5.1(CD45.1)をレシピエントとして、致死量放射線照射後に野生型マウスもしくは mev-1(CD45.1)どちらかの骨髄細胞のみを移植した。末梢血を 4 週間ごとに採取し、白血球数やヘモグロビン値を評価した。移植 16 週間後に骨髄をサンプリングし、骨髄内の造血幹細胞割合やミトコンドリア状態、造血幹細胞における活性酸素蓄積や DNA 障害の程度を評価した。DNA 障害は comet assay および H2AX 染色を用いて比較した。また、この 16 週後の骨髄を別の Ly5.1 レシピエントマウスに継代移植し、長期造血再構築能を評価した。さらに、ドナーの骨髄細胞から抽出した DNA および、移植後骨髄細胞から抽出した DNA を用いて全エクソン解析を行い、移植ストレスによって生じた新たな遺伝子変異について評価をした。

4. 研究成果

(1) まず、TLR3 アゴニストであり、炎症性サイトカインやケモカインを産生させる polyIC に対する反応について、野生型と変異マウスで比較した。幹細胞の約半数が polyIC 投与後に cell cycle に入り、この現象は野生型と mev-1 で同様にみられた。しかしながら、変異マウスで

はより多くの活性酸素蓄積がみられた(図1)。このことから、変異マウスはミトコンドリアが活性化する状況において、より活性酸素を産生することが示された。

図1(左). Poly(I:C)後の CD34⁺Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺分画における活性酸素蓄積



- (2) 次に、野生型と変異マウスで末梢血と骨髄を2年間に渡り経年評価した。3か月齢の若年変異マウスは軽度貧血を呈したが、他大きな差を認めなかった。しかし、24か月齢において変異マウスは貧血に加えて白血球減少、myeloid割合の増加、血小板増多がみられた。また、変異マウスの骨髄は CD34⁺Lin⁻Sca-1⁺ckit⁺の幹細胞分画の割合が高く(図2)、リンパ球系プロジェニターの割合が低かった。変異マウスの造血幹細胞ではより活性酸素蓄積がみられた。これらの結果から、変異マウスがより早期から老化造血を呈していることが示唆された。

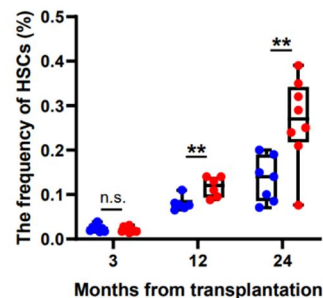


図2. CD34⁺Lin⁻Sca-1⁺ckit⁺の造血幹細胞分画の割合

- (3) 次に、変異もしくは野生マウス由来の骨髄と competitor cell を1:1で混ぜ、致死量放射線照射した別のマウスに移植し、造血再構築を評価した。変異マウス由来の骨髄のキメリズムは有意に低く、また myeloid に傾いた造血を呈した(図3)。変異マウス由来の骨髄は造血幹細胞におけるキメリズムが低く、長期造血再構築能を評価するために継代移植を行ったところ、変異マウス由来の骨髄はより早期に exhaustion した(図4)。これらの結果から、複製ストレスが変異マウス由来の骨髄に加齢性変化をもたらし、幹細胞の自己複製能を障害したと考えられた。

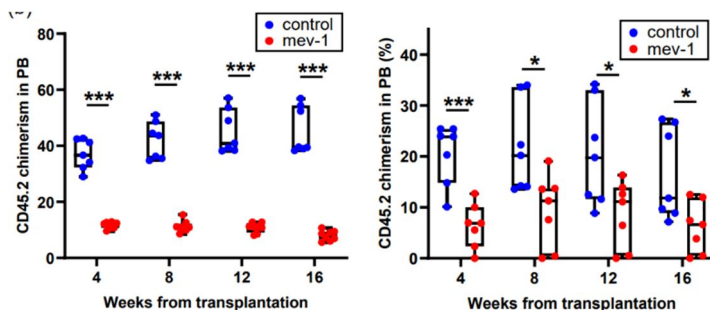


図3(左). キメリズムの時系列

図4(右). 継代移植後のキメリズム時系列

- (4) 次に、変異マウス由来骨髄細胞と野生型由来骨髄細胞の複製ストレス感受性の差を個体間で比較するために致死量放射線を照射したマウスに変異もしくは野生型マウス由来の骨髄のいずれかを置換移植した。野生型由来の骨髄は WBC 低下と myeloid に傾いた造血を呈し、貧血や血小板増多がみられた。16週後の骨髄をサンプリングしたところ、変異マウスにおいて造血幹細胞の割合は有意に低く、より多くの活性酸素を蓄積していた(図5)。さらに、活性酸素シグナルの下流にあるリン酸化 p38 や、DNA 障害の指標である H2AX (図6) も変異マウスの幹細胞でより発現していた。コメットアッセイで評価しても、やはり DNA 障害は mev-1 においてより顕著であった。この幹細胞を competitor cell とともに別のマウスに移植すると、変異マウスの幹細胞はまったく造血を再構築できなかった。これらの結果から、移植ストレスによって変異マウスの造血幹細胞が老化し、この一端を ROS-p38 シグナルが担っている可能性が考えられた。

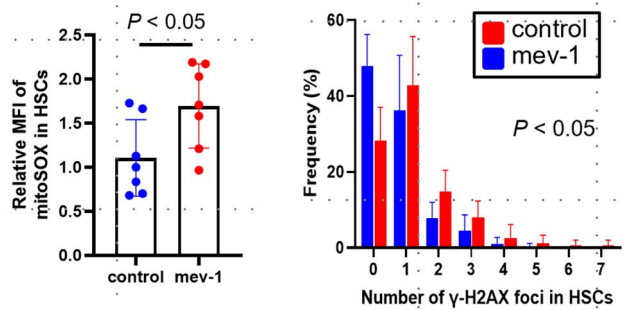


図 5(左). 造血幹細胞における活性酸素蓄積

図6(右). 造血幹細胞における DNA 障害を H2AX 免疫染色で評価した

最後に、この置換移植したマウスの骨髄細胞から DNA を抽出し、全エクソンシーケンスを行った。変異マウスの骨髄では Dpys15 など、あらたな遺伝子変異を伴ったクローン造血がみられており、あらたな遺伝子変異の数は有意に mev-1 由来の移植で多かった。これらの結果から、変異マウス由来の骨髄が BMT ストレスによって遺伝子変異を獲得し、異形成を伴った末梢血を呈していることが示された。

これらの結果から、この複合体 II の機能異常を呈するマウスにおいては、加齢や複製ストレスによって ROS-p38 シグナル活性化と DNA 損傷がより起こり、これが変異マウスの造血幹細胞に老化や遺伝子変異をもたらすと考えられた (図 7)。このマウスモデルは特定の遺伝子に限定されないクローン造血を引き起こすと考えられ、骨髄異形成症候群発症の母体となると推測された。今後クローン造血、骨髄異形成症候群の研究に応用していくことができると期待される。

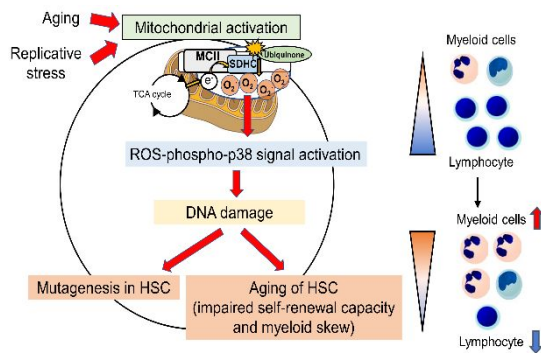


図 7. 本研究のサマリー。ミトコンドリアにおける複合体 II の異常は、活性酸素蓄積を引き起こし、さらに造血幹細胞の老化、DNA 障害、遺伝子変異獲得につながる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	八幡 崇 (YAHATA Takashi) (10398753)	東海大学・医学部・准教授 (32644)	
研究分担者	石井 恭正 (ISHII Tkamasa) (20548680)	東海大学・医学部・准教授 (32644)	

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