

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16091

研究課題名(和文)腸管炎症が引き起こす造血ストレスの理解とその制御

研究課題名(英文)Understanding the impact of gut inflammation-induced stress on hematopoiesis

研究代表者

林 慶和 (Hayashi, Yoshikazu)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特任助教

研究者番号：00801078

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)：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管炎症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おいて造血幹・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ことから、腸炎によるHSPCの炎症局所への遊走が示唆された。TRIF/Myd88欠損マウスを用いて解析したところ、腸炎下でも骨髄やリンパ節におけるHSPCの増加を認めなかったことから、これらの造血応答がTLRシグナルによって制御されていることが示唆された。

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近年ホットな研究領域であり、老化に伴い増加する炎症疾患との関連性だけでなく生体防御や組織損傷・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。本研究では炎症反応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管炎症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した。腸内細菌関連分子を新たな造血制御因子として捉えており、造血における新たなバイオロジー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 the mesenteric lymph node, which is an inflammatory site. Acute colitis did not expand HSPCs of TRIF/Myd88-deficient mice in BM or MLN, indicating that HSPC expansion upon colitis is regulated via TLR signaling.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 多能性前駆細胞 腸管炎症 腸内細菌 自然免疫 TLRシグナル

## 1. 研究開始当初の背景

造血は生涯にわたり骨髄にわずかに存在し、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。造血幹細胞の増殖・分化障害は、腫瘍や造血不良につながる恐れがあるため、造血幹細胞は恒常性維持機構のもと遺伝的に保存され、厳密に機能制御されなければならない。定常状態では、造血幹細胞は細胞周期の静止期に存在するため、恒常的な血液産生は造血幹細胞よりも増殖能が高くより分化した前駆細胞によって維持されている。その一方で、ウイルスや細菌感染時に、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・消費されるのに伴い、骨髄においても非細胞分裂期にある造血幹・前駆細胞 (HSPC) が活性化されることが分かってきた。そして、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) が骨髄内の造血幹細胞を直接活性化し、増殖ストレスを誘導して造血幹細胞の機能を損傷させることが明らかとなった (Takizawa, Cell Stem Cell 2017)。われわれの体内には 40 兆個以上の細菌が口腔、皮膚、消化管などに常在菌として共生しており、その中でも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菌誘導性の造血幹細胞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、腸管炎症により腸内細菌が体内に浸潤することで、骨髄における造血応答に何らかの影響を及ぼすことが考えられる。本研究では、この仮説に基づき、腸管炎症モデルマウスを用いて、腸管炎症が造血に与える影響について検討を行う。

## 2. 研究の目的

本研究では、先行研究から得られた知見を発展させ、造血制御との関連が全く分かっていない腸管炎症に着目し、腸管炎症が造血幹細胞に及ぼす影響、あるいは腸内細菌や腸内細菌関連分子による造血制御について分子レベルで明らかにする。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) 腸管炎症が造血応答に及ぼす影響

目的2) 腸管炎症下において造血応答を制御する腸内細菌の同定

目的3) 腸管炎症下における造血制御に関する分化メカニズムの解明

## 3. 研究の方法

### 1) 腸管炎症が造血応答に及ぼす影響

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、3次元組織イメージング、生体内イメージングなどを用いて、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。その際、当研究室では造血幹・前駆細胞特異的に赤色蛍光蛋白質を発現する Hlf-tdTomato マウスを所有しており (Yokomizo, JEM 2019)、それを用いて HSPC 局在解析を行った。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。

### 2) 腸管炎症下において造血応答を制御する腸内細菌の同定

抗菌薬投与により腸内細菌を減少させたマウスに対して腸管炎症を惹起させ造血応答の変化についてフローサイトメトリーを用いて明らかにした。その際、マウスから腸内要物を採取し 16S メタ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。

### 3) 腸管炎症下における造血制御に関する分化メカニズムの解明

腸管炎症を起こしたマウス由来の HSPC について RNA シークエンス (RNA-seq) 解析を行い、遺伝子発現変化を調べ、候補となる分子メカニズムについて探索した。RNA-seq にて得られた候補となる分子について、qPCR で遺伝子変化について確認すると同時に、フローサイトメトリー

あるいは ELISA を用いてタンパク質レベルでの変化についても解析した。さらに、当研究室で所有している TLR シグナルを欠損させた TRIF/Myd88 欠損マウスを用いて、腸管炎症下における造血応答に対する自然免疫シグナルの関与について検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### 1) 腸管炎症が造血応答に及ぼす影響

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造血幹細胞 (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) が有意に増加することが分かった。さらに、骨髄のみならず炎症の場である腸間膜リンパ節においても、MPP が有意に増加していた。組織イメージング、生体内イメージングを行ったところ、急性腸炎下では骨髄、腸間膜リンパ節ともに、CD31 陽性血管内皮細胞に HSPC が近接して増加しており、MPP が血流を介して骨髄から腸間膜リンパ節へ遊走している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い、骨髄、腸間膜リンパ節における MPP の機能について解析したところ、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の分化バイアスを顆粒球系にシフトさせ、さらに腸間膜リンパ節で増加した MPP についても分化能を保持していることが示唆された。

##### 2) 腸管炎症下において造血応答を制御する腸内細菌の同定

ネオマイシン、メトロニダゾール、バンコマイシン、ネオマイシンの抗菌薬のうちそれぞれ 1 種類のみを 1 ヶ月以上投与し、抗菌スペクトラム特異的に腸内細菌叢を減少させたマウスを作成し、それらの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、ネオマイシン (NM)、メトロニダゾール投与下において、急性腸炎下における骨髄および腸間膜リンパ節における MPP の増加が促進され、一方でバンコマイシン、アンピシリン投与下では骨髄、腸間膜リンパ節における MPP の増加が起こらなかった。さらにこれらのマウスの腸内要物を採取し 16S メタゲノム解析を行い腸内細菌叢について解析を行ったところ、バンコマイシン、アンピシリン投与マウスでは、*Bacteroides* が全く検出されなかった。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、これらの反応は野生型マウスにコントロール群として用意した *Bacteroides* とは異なるグラム陰性菌の 1 つである *Faecalibacterium* を投与した場合には起こらなかった。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ことが示唆された。

##### 3) 腸管炎症下における造血制御に関する分化メカニズムの解明

分子メカニズムを解明するために、骨髄と腸間膜リンパ節における MPP の遺伝子発現について RNA-seq により解析したところ、急性腸炎下では骨髄と腸間膜リンパ節における GM-CSF 受容体の遺伝子発現が上昇しており、フローサイトメトリー解析によりタンパク質レベルでも GM-CSF 受容体の発現レベルが上昇していることが確認された。ELISA を用いてリガンドレベルについても解析したところ、急性腸炎下では骨髄および腸間膜リンパ節における GM-CSF の発現量が有意に増加していた。さらに腸間膜リンパ節における成熟細胞について解析を行ったところ、急性腸炎下では、Gr-1 陽性細胞および F4/80 陽性マクロファージ・単球が有意に増加していた。これらの結果から、腸間膜リンパ節において増加した MPP が GM-CSF シグナルによって Gr-1 陽性細胞および F4/80 陽性マクロファージ・単球へと分化していることが示唆された。実際、野生型マウスから採取した MPP に試験管内で *Bacteroides* を添加したところ、GM-CSF 受容体の発現レベルが上昇していることを確認することができた。次に TRIF/Myd88 欠損マウスを用いて、腸管炎症下における造血応答に対する自然免疫シグナルの関与について検討したところ、急性腸炎下で認められた骨髄および腸間膜リンパ節における MPP の増加が TRIF/Myd88 欠損マウスでは認められなかった。また、*Bacteroides* 細胞膜溶解液を野生型マウスに投与した際には骨髄および腸間膜リンパ節において MPP が増加し、腸間膜リンパ節における Gr-1 陽性細胞の増加を認めたが、これらの反応が TRIF/Myd88 欠損マウスでは認められなかった。したがってこれらの結果から、急性腸炎下で確認された骨髄および腸間膜リンパ節における MPP の増加が TLR シグナルによって制御されていることが示唆され、とくに腸内細菌のうち *Bacteroides* によって TLR シグナルを介した MPP の増加および Gr-1 陽性細胞への分化が誘導されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Hayashi Yoshikazu, Sezaki Maiko, Takizawa Hitoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Development of the hematopoietic system: Role of inflammatory factors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 e341 ~ e341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/wdev.341	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 滝澤 仁、林 慶和	4. 巻 59
2. 論文標題 炎症と造血	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1955 ~ 1961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.59.1955	査読の有無 無
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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Hayashi Y, Sezaki M, Sheoran S, Morishima T, Nakato G, Fukuda S, Takizawa H.
2. 発表標題 Microbial signal instructs early hematopoiesis upon intestinal tissue damage
3. 学会等名 48th Annual Scientific Meeting of International Society of Experimental Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi Y, Takizawa H, Sezaki M, Sheoran S, Morishima T, Nakato G, Biswas S, Fukuda S.
2. 発表標題 Early hematopoiesis translates microbial signals to intestinal tissue repair
3. 学会等名 24th Congress of the European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi Y, Sheoran S, Morishima T, Nakato G, Fukuda S, Takizawa H.
2. 発表標題 Acute gut inflammation orchestrates early hematopoiesis via innate immune signaling
3. 学会等名 17th Stem Cell Research Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi Y, Fukuda S, Takizawa H
2. 発表標題 Gut microbiota orchestrates early hematopoiesis upon gut inflammation
3. 学会等名 The 48th Japanese Society for Immunology 2019/ (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi Y
2. 発表標題 Microbial signal regulates crosstalk between bone marrow and other organs in early hematopoiesis
3. 学会等名 The 3rd KU - KAIST Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi Y, Sezaki M, Nakato G, Sheoran S, Morishima T, Fukuda S, Takizawa H.
2. 発表標題 自然免疫シグナルは腸管炎症下における造血応答を制御する
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi Y, Hitoshi T
2. 発表標題 Acute gut inflammation shifts early hematopoiesis toward myelopoiesis
3. 学会等名 16th Stem Cell Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林慶和、瀬崎真衣子、滝澤仁
2. 発表標題 腸管炎症は造血幹前駆細胞に対して分化バイアスを引き起こす
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----