

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16114

研究課題名(和文) 前処置環境から受ける骨髄移植生着シグナル解明による生着促進法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of key signals for successful engraftment of transplanted bone marrow cells

研究代表者

数藤 孝雄 (Sudo, Takao)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：80631184

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)：骨髄にホーミングした造血幹・前駆細胞について網羅的遺伝子発現解析を行った結果として、抗癌剤5-FU投与後環境が、造血幹・前駆細胞の細胞周期を活性化させる遺伝子群の発現を上昇させることが明らかとなった。上流解析によって、骨髄抑制後環境が増殖因子を産生していることが示唆された。更に、ノックアウトマウスを用いた解析によって、増殖因子の産生機序としてIL-33及びその下流分子であるMyD88が重要な働きをしていることを示した。本研究のこれまでの結果から、抗癌剤によるストレス負荷によって、骨髄環境が変化し、造血幹・前駆細胞に活性化シグナルを供給し、それが骨髄機能回復に寄与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、「抗癌剤投与後の骨髄機能の回復はどのような機序で起こるのか」という疑問の一端を解決した。本研究結果は、骨髄移植の際に、骨髄を破壊する前処置が造血幹細胞の生着に促進的に働くこと理由を説明するモデルとも捉えられる。

本研究から得られた結果は、今後造血幹細胞移植ソースとしての造血幹細胞を体外増幅する際に必要な情報をもたらす、という点で意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The cell-cycle status of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) becomes activated following chemotherapy-induced stress, thereby promoting bone marrow (BM) regeneration; however, the underlying molecular mechanism remains elusive. In this study, we show that injured BM environments support the recovery of HSPCs from 5-fluorouracil (5-FU)-induced stress by secreting growth factors. Mechanistically, IL-33 released from chemo-sensitive BM cells activates MyD88-mediated secretion of growth factors. Thus, injured BM environments may function by 'sensing' the damaged BM spaces and subsequently supporting hematopoietic recovery under stress conditions.

研究分野：血液学

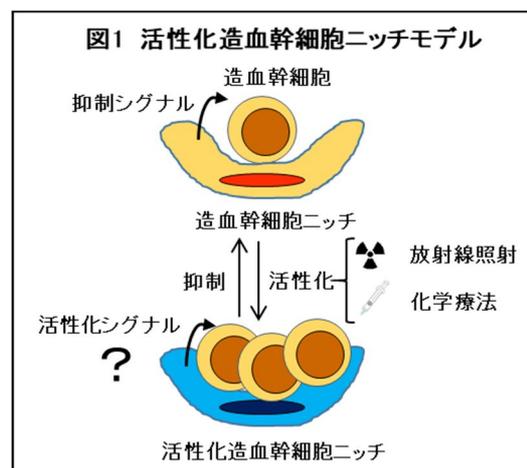
キーワード：造血幹細胞 造血幹細胞ニッチ 生体イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は定常状態においてはそのほとんどが静止状態にあり、分裂頻度は極めて低い。その維持・調節のために、造血幹細胞を取り巻く“造血幹細胞ニッチ”と呼ばれる特有の微小環境に存在すると考えられている。一方、化学療法や放射線照射などによる骨髄抑制を受けた後には、減少した血球を補うべく細胞周期が活性化し、盛んに分裂するようになる。また、放射線照射や化学療法による骨髄移植前処置は移植造血幹細胞の生着を促進することはよく知られている。ここで疑問なのは、骨髄抑制後環境のうち、一体何が造血幹細胞を活性化させているのかという点である(図1)。生着細胞は移植後特有のニッチから生存・増殖シグナルを受けている可能性も考えられる。申請者はこれまでに、造血幹細胞の活性化時に発現上昇する因子に着目した研究を行い、活性化マーカー及びその発現意義に関する成果を発表してきた(Sudo et al./ *J Immunol.*2012, Sudo et al. *PLoS One.*2016)。申請者は造血幹細胞活性化機構について継続した研究を行っている。

一方で申請者は、造血幹細胞の動きや局在を明らかにするために生体イメージングの重要性を強く感じてきた。二光子励起顕微鏡を用いれば、生きたマウスの骨や骨髄内を観察することができる。更に、それらを経時的に長時間解析することが可能である(Ishii et al. *Nature.*2009, Lo Celco et al. *Nature.*2009)。近年、造血幹細胞を可視化できるレポーターマウスが開発された。レポーターマウスの登場と生体イメージング技術の向上により、移植された造血幹細胞がどのような機序で生着するのかという疑問の解明や、骨髄抑制後造血回復の仕組みについての解明が期待される。



2. 研究の目的

本研究の目的は、放射線照射や化学療法といった移植前処置による骨髄ストレス後に、微小環境(ニッチ)が、定常状態と比較してどのように変化し、どのような活性化シグナルを移植された造血幹細胞に送るのかを解明することである。

更に、造血幹細胞を特異的に標識できるレポーターマウスの解析によって、造血幹細胞の骨髄内での動態や局在を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

コントロール、及び抗癌剤の1種である5-FUによる前処置後のレシipientマウスに、別のマウス(CAG-EGFPマウス)骨髄から採取した造血幹・前駆細胞を移植した。移植1日後に、各レシipientマウス骨髄内にホーミングした細胞をセルソーターにて分取し、RNA-Seq法を用いて網羅的な遺伝子発現比較を行った。得られた変動遺伝子リストを、専用解析ソフトを用いて解析した。上流解析を行うことにより、ホーミングした造血幹細胞が、骨髄抑制後環境からどのようなシグナルを享受しているのかを調べた。更に得られた候補シグナルを除去した再、抗癌剤に対する反応がどう変わるかを、ノックアウトマウスを用いて検討した。

また、生理的な造血幹細胞を可視化するために造血幹細胞を特異的に標識することができる遺伝子改変動物(Fgd5-mCherryマウス; Gazit et al. *JEM.* 2014)を用いての生体イメージングを試み

た。

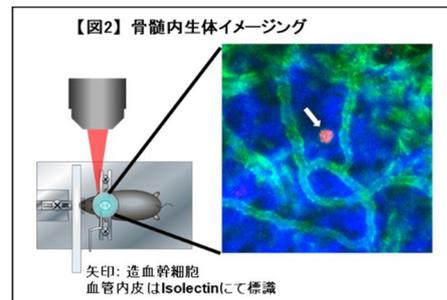
4 . 研究成果

造血幹・前駆細胞は骨髄抑制後環境から受ける増殖シグナルの同定

骨髄にホーミングした造血幹・前駆細胞について網羅的遺伝子発現解析を行った結果として、抗癌剤 5-FU 投与後環境が、造血幹・前駆細胞の細胞周期を活性化させる多くの遺伝子群の発現を上昇させることが明らかとなった。上流解析を行うことによって、骨髄抑制後環境が増殖因子を産生していることが示唆された。実際、5-FU 投与後の骨髄を調べたところ、増殖因子の一種が蛋白レベルで増加していることが確認された。野生型マウス、及び増殖因子を欠損したマウスに高用量の 5-FU を投与すると、野生型マウスは全て長期生存したのに対して、増殖因子欠損マウスは骨髄回復前に全て死亡した。更に、増殖因子の産生機序として IL-33 及びその下流分子である MyD88 が重要な働きをしていることを示した。本研究のこれまでの結果から、抗癌剤によるストレス負荷によって、骨髄環境が変化し、造血幹・前駆細胞に活性化シグナルを供給し、それが骨髄機能回復に寄与することが示された。

生理的な造血幹細胞の骨髄内での動態と局在

本研究の予備実験として造血幹細胞を特異的に標識することができる遺伝子改変動物 (Fgd5-mCherry マウス; Gazit et al. *JEM*. 2014) を用いての生体イメージングを試みた。骨髄細胞が Fgd5-mCherry マウス由来となる骨髄キメラマウスを作成し、頭頂骨骨髄中に存在する定常状態 HSC の生体イメージングに世界で初めて成功した (図 2)。解析ソフトを用いて、各々の造血幹細胞の移動速度や、骨膜及び血管内皮との距離を測定することに成功した。結果として、造血幹細胞は一定の速度で運動していることや 90%以上が血管周囲領域に存在していることが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishizawa S, Kikuta J, Seno S, Kajiki M, Tsujita R, Mizuno H, Sudo T, Ao T, Matsuda H, Ishii M.	4. 巻 143
2. 論文標題 Thrombomodulin induces anti-inflammatory effects by inhibiting the rolling adhesion of leukocytes in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 17-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2020.01.001	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 Ueda T, Yokota T, Okuzaki D, Uno Y, Mashimo T, Kubota Y, Sudo T, Ishibashi T, Shingai Y, Doi Y, Ozawa T, Nakai R, Tanimura A, Ichii M, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule Contributes to the Development of Definitive Hematopoiesis in the Fetal Liver	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 992-1005
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2019.11.002.	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 Hasegawa T, Kikuta J, Sudo T, Matsuura Y, Matsui T, Simmons S, Ebina K, Hirao M, Okuzaki D, Yoshida Y, Hirao A, Kalinichenko VV, Yamaoka K, Takeuchi T, Ishii M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Immunol.	6. 最初と最後の頁 1631-1643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-019-0526-7	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 Ao T, Kikuta J, Sudo T, Uchida Y, Kobayashi K, Ishii M.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Local sympathetic neurons promote neutrophil egress from the bone marrow at the onset of acute inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Immunol.	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） 10.1093/intimm/dxaa025.	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 数藤 孝雄、石井 優
2. 発表標題 5-FUによるストレス後骨髓環境が 造血幹・前駆細胞の増殖を促進する
3. 学会等名 第29回日本サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takao Sudo, Masaru Ishii
2. 発表標題 Stressed microenvironments support hematopoietic recovery through cytokine production
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takao Sudo, Masaru Ishii
2. 発表標題 Stressed bone marrow environments accelerate hematopoietic recovery through cytokine
3. 学会等名 17th International Congress of Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉澤 亮輔、数藤 孝雄、石井 優
2. 発表標題 Dynamic analysis of Hematopoietic stem cells and their niches using bone marrow imaging techniques
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----