

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03486

研究課題名(和文)造血制御による疾患治療を目指した感染特異的造血機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of infection-induced hematopoiesis to develop therapy for infection and inflammation

研究代表者

金山 剛士 (Kanayama, Masashi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：80811223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：造血系は血液細胞の供給を介して恒常性の維持に寄与する。定常状態における造血メカニズムは詳細が明らかにされてきた一方で、感染症や炎症といった生体ストレス環境下における造血機構については不明な点が多い。本研究では、従来より広範に使用されてきた造血前駆細胞の同定法は、生体ストレス環境下における解析結果を大きく歪曲する危険性があることを指摘し、生体ストレス存在下でも造血系の解析が可能な造血前駆細胞の同定法を独自に開発した。また、この解析法を用いることで、従来法では不可能であった感染症や炎症における造血応答を同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで広く使用されてきた従来の造血前駆細胞同定法が、ストレス造血応答の解析には使用できないことを指摘するとともに、感染や炎症においても使用可能な新たな造血前駆細胞同定法を独自に樹立し、その有用性を証明した。この成果は、今後新たなストレス造血応答機構を発見するために非常に有用であるのに加え、過去のストレス造血応答に関連する研究報告を再検証する機会を与えるという意味において、免疫学や血液学に大きな影響を及ぼすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hematopoiesis is important for maintenance of homeostasis through supplying blood cells. Although hematopoiesis at steady state has been well understood, hematopoiesis induced by infection and inflammation has not been fully elucidated. In this study, we found that conventional method to identify hematopoietic progenitor cells does not work to analyze hematopoiesis upon biological stresses and newly generated a method which allows identification of hematopoietic progenitors even under infection and inflammation. By using this novel method, we identified hematopoietic responses against infection/inflammation which cannot be identified by using the conventional method.

研究分野：免疫学、血液学

キーワード：造血 感染 炎症 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

造血系は免疫細胞を産生し全身に供給するためのシステムであり、免疫的恒常性や炎症などの病態に強く関与している。とりわけ単球や好中球といった自然免疫を担うミエロイド細胞は感染初期において増産され、生体防御の中核を成す細胞群である。一方、感染に伴うミエロイド系細胞の産生亢進は、過剰な炎症や赤血球の産生低下を招くなど、場合によっては敗血症性ショックのような深刻なダメージの元凶となる。そのため、感染のような病態に対する造血応答を適切にコントロールすることが出来れば感染・炎症の治療に寄与すると期待される。しかしながら、定常状態の造血機構については詳細が明らかにされてきた一方、炎症や感染といった病的状況下で引き起こされる造血機構に関しては未解明な部分が多く残されている。

造血前駆細胞は造血幹細胞や多能性前駆細胞といった「上流」の細胞と、そこから分化した「下流」の細胞に大別できる。感染初期の造血系では、「上流」の造血前駆細胞の識別に必須の細胞表面マーカーである Sca-1 の発現分布が変化し、これが感染誘導性の造血応答研究を妨げる一因となっている。Sca-1 はインターフェロンや腫瘍壊死因子により発現が誘導される分子であり (*Front Immunol.* 2013; 4: 204) リポポリサッカライド (LPS) の投与や盲腸結紮穿孔モデルなどで播種性の感染を再現すると、本来 Sca-1 陰性の「下流」の造血前駆細胞でも発現が確認され、「上流」と「下流」の造血前駆細胞群を識別することが出来なくなる (図 1)。このため、感染によって誘導される詳細な造血応答機構の解析にはこの問題の解決が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、感染症のような病態でも使用可能な造血前駆細胞の同定法を確立し、その有用性を証明するとともに、それを用いることで、炎症や感染症における病態特異的な造血応答を同定する。

3. 研究の方法

野生型マウスに定常状態、および LPS 投与や盲腸結紮穿孔モデルを用いて感染症誘導性の造血応答を惹起した後、Biolegend Legend Screen kit 等を用いて細胞表面分子の発現を網羅的に調べることで、Sca-1 の代替マーカーとして使用できる分子を探索した。その結果、CD86 を「炎症・感染症でも使用できる Sca-1 の代替マーカー候補」として同定し、CD86 陽性、あるいは CD86 陰性造血前駆細胞の機能的解析や他の細胞表面分子の発現パターンなどの表現型解析を行った。さらに、移植やレポーターマウスを用いて CD86 陰性細胞をトレーシングし、炎症や感染症で CD86 の発現亢進が起こるか確認した。また、感染症や炎症における Sca-1 の発現変化はインターフェロンによって誘導されるため (*J Exp Med.* 2014, 211(2):245-262) インターフェロン依存的シグナルによる Sca-1 の発現亢進が抑制されるマウス (*Stat1* ノックアウトマウス) やインターフェロンの発現亢進が弱いチオグリコレート誘導性の炎症モデルを用いて、Sca-1 の発現変動が無い状況下では、感染時でも CD86 と Sca-1 の同定する細胞群が同一か検討した。

CD86 を用いた造血前駆細胞同定法の有用性を証明するために、この方法を用いて各造血前駆細胞数や分化能、骨髄再構築能などの変動を調べることで、感染に対する造血応答を解析した。

4. 研究成果

1) 感染・炎症に対する造血応答解析に適した造血前駆細胞同定法の開発

移植や Sca-1 陰性造血前駆細胞のトレーシング実験により、Sca-1 が感染症や炎症では造血応答の解析結果に大きな誤謬をもたらすことを *in vivo* の実験系により明らかにした。定常状態、および LPS 投与後の造血前駆細胞において、網羅的な細胞表面分子の解析を行い、Sca-1 の代替マーカーとして CD86 を新たに同定した。さらに、CD86 は感染・炎症時の発現変動が少なく、CD86 を用いた造血前駆細胞の同定法が、Sca-1 を用いた従来法と異なり、感染・炎症でも使用可能であることを証明した。これにより、感染・炎症における造血応答解析に適した造血前駆細胞の同定法を確立できた (図 1)。

2) 造血前駆細胞の新規同定法を用いた感染症に対する造血応答の解析

CD86 を用いた新たな造血前駆細胞同定法を用いて、LPS 投与や盲腸結紮穿孔モデルによって誘導される造血応答を解析した。その結果、従来法での解析は、上流の造血幹前駆細胞の細胞数が過大評価され、下流のミエロイド系前駆細胞の細胞数が過小評価されることが分かった。さらに、敗血症誘導後に赤血球やその前駆細胞が一過的に増加し、その後急激に減少していくことを確認した。従来法では、赤血球前駆細胞数は敗血症誘導直後から減少するのみであり、この結果は従来法では同定できない造血前駆細胞のダイナミクスを観察することに成功したことを示している (図 1)。この一過的に骨髄で増加する赤血球は、溶血や細胞死に耐性が高いことも分かった。

また、過去の報告では、敗血症誘導後の造血幹前駆細胞の骨髄再構築能が顕著に減少することが報告されている (*Stem Cell Reports*, 2016, 6(6):940-956)。しかし、この報告では Sca-1 の

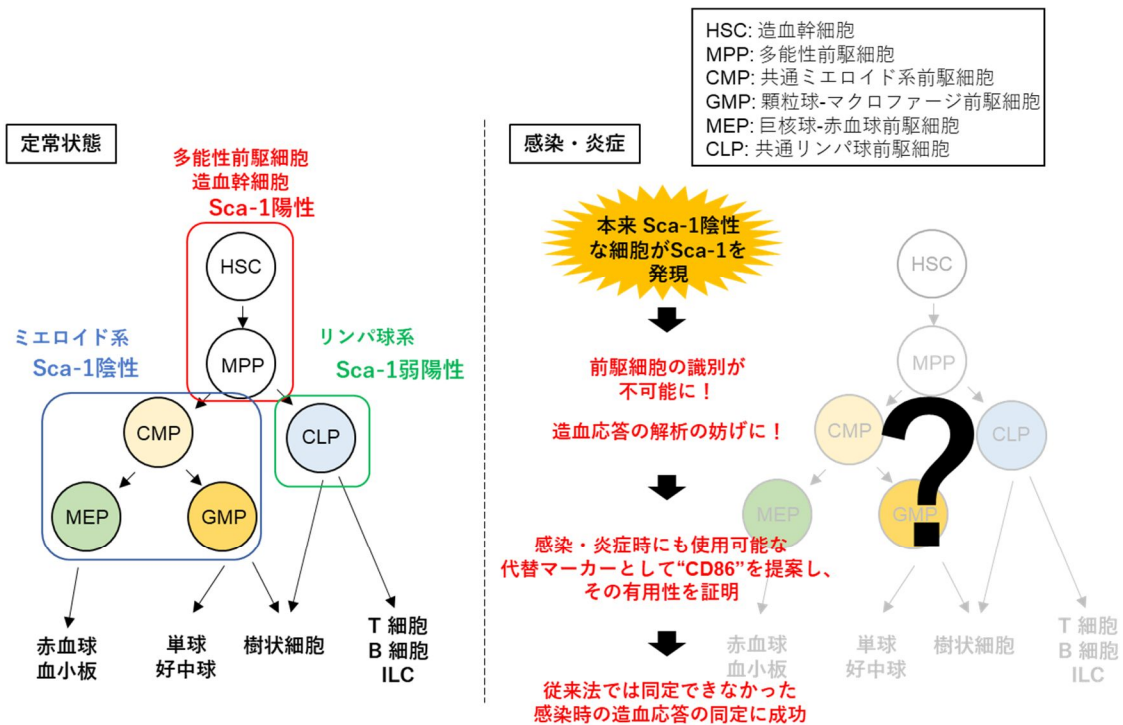


図1 本研究における研究成果

発現に基づいた方法で造血幹前駆細胞が同定されており、より下流の前駆細胞が大量に混入したために起こった誤謬であることが強く推察された。そこで、CD86を用いた新たな同定法で造血幹前駆細胞を同定・単離し、放射線照射したレシピエントマウスに移植して骨髄再構築能を検証した。その結果、Sca-1を用いた場合は、過去の報告通り、骨髄再構築能に顕著な低下が認められるものの、CD86を用いて実験を行った場合は、造血幹前駆細胞の骨髄再構築能が敗血症誘導後も定常時と同等程度に維持されていることを発見した。このように、本研究で樹立された新たな解析法は過去の報告の信頼性の検証にも使用できることを証明した(図1)。

インターフェロン依存的なシグナル伝達に重要なSTAT1の欠損マウスでは、LPS投与によるSca-1の発現亢進が抑制される。また、チオグリコレートの腹腔内投与による炎症ではインターフェロンの産生が少なくSca-1の発現亢進も観察されない。そこで、これらの条件下でSca-1の発現に基づいた従来法とCD86の発現に基づいた新たな解析法を比較したところ、Sca-1の発現亢進が起きない上記の条件下では、新解析法と従来法で類似の解析結果が導かれることが分かった。これらの実験結果は、新規解析法の信頼性を高め、改めて造血応答研究におけるその必要性を示している。

このように、本研究により樹立した造血前駆細胞の新たな同定法は、感染・炎症のような生体ストレス誘導性の造血応答を解析する上で必須の技術となるだけでなく、これまで従来法を用いて示されてきた過去の報告を再検証する機会を与えるという意味で非常に重要性が高いと考えられる(図1)。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masashi Kanayama, Yuta Izumi, Yasuharu Yamauchi, Shoko Kuroda, Takaei Shin, Shun Ishikawa, Taku Sato, Mihoko Kajita and Toshiaki Ohteki	4. 巻 136
2. 論文標題 CD86-based analysis enables observation of bona fide hematopoietic responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1144-1154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2020004923	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masashi Kanayama, Ohteki Toshiaki
2. 発表標題 CD86-based analysis enables identification of hematopoietic progenitors under biological stresses which upregulate interferon
3. 学会等名 8th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masashi Kanayama, Ohteki Toshiaki
2. 発表標題 Analysis with an alternative marker for Sca-1 revealed bona fide hematopoietic responses during infection
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 Masashi Kanayama, Ohteki Toshiaki
2. 発表標題 Analysis with an alternative marker for Sca-1 revealed unexpected hematopoietic responses during infection
3. 学会等名 第17回 幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金山剛士、泉湧太、樺木俊聡
2. 発表標題 CD86-based analysis enables observation of bona fide hematopoietic responses
3. 学会等名 第16回麒麟塾（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 金山剛士、樺木俊聡	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 129
3. 書名 実験医学2021年3月号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>1) 東京医科歯科大学プレスリリース「感染や炎症時、真の造血応答を観察できる新規解析法を開発」 https://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20200522_1.pdf</p> <p>2) 科研費研究成果トピックス「造血応答を介した生体ストレス順応機構の解明」 https://www.jsps.go.jp/j-grantsinaid/37_topics/data/00154-12602-80811223.pdf</p> <p>3) 生体防御学分野ホームページ https://www.tmd.ac.jp/mri/bre/gyoseki.html</p> <p>4) プレス通知資料「感染や炎症時、真の造血応答を観察できる新規解析法を開発」 http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20200522_1.pdf</p> <p>5) 科学新聞 2020年6月5日 記事掲載</p>

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
研究協力者	樺木 俊聡 (Ohteki Toshiaki)		

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
研究協力者	佐藤 卓 (Sato Taku)		
研究協力者	梶田 美穂子 (Kajita Mihoko)		

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