

「感染ストレスによる造血幹細胞クローン競合のゆらぎと腫瘍化の理解」

国立大学法人 熊本大学 国際先端医学研究機構 特別招聘教授

滝澤 仁

要旨

近年のヒトシーケンス解析において、加齢に伴い、血液の源泉である造血幹細胞に遺伝子変異が蓄積し、特定クローンの出現（クローナル造血）から白血病化に至る、CHIP(clonal hematopoiesis of indeterminate potential)が提唱された。しかしながら、前白血病幹細胞の起源および加齢に伴う発生・拡大の機序については全く不明である。疫学研究から、高齢者に好発する難治性のクローン性造血器腫瘍である骨髄異形成症候群（MDS）発症と感染症罹患が有意に相関することが示され、感染や炎症などの環境ストレスががん発症に関与することが予想された。本研究では、生涯にわたるウイルス・細菌感染を代表とする感染ストレスが造血制御や造血幹細胞クローンの白血病化に与える影響を、モデルマウスを用いて明らかにし、がん予防と治療法の基礎的知見を得ることを目的とする。

背景・目的

生涯造血は骨髄内で細胞分裂静止期にある造血幹細胞によって維持される。この造血幹細胞への遺伝的変異の蓄積、それに伴うクローナル造血への進展および拡大が白血病化の大きな要因と考えられており [1]、近年、健常高齢者の血中に、白血病関連の遺伝子変異をもつものの、白血病化する前の造血幹細胞、いわゆる“前白血病幹細胞”の存在が示された。また、前白血病幹細胞の出現頻度が将来の加齢関連疾患の重要なリスク因子であることが見つかった [2, 3]。これらの知見は、クローナル造血や前白血病幹細胞の出現が一般的な老化プロセスであり、白血病が予測可能かつ予防可能な疾患であることを示唆する。しかしながら、前白血病幹細胞の起源、および、加齢に伴う発生・拡大の機序については解明されていない。申請者らは、細菌感染が直接、造血幹細胞を刺激してその分裂を促進し、その細胞機能を低下させることを示した [4, 5]。この結果を、

疫学研究から示唆される感染症の罹患歴と MDS 発症との有意な相関性 [6, 7] と考え合わせると、“前白血病幹細胞”のクローン出現や進化には免疫応答や炎症反応などの骨髄内環境変化が深く関与していることが予想される (図 1)。本研究では、感染に伴う炎症ストレスがクローナル造血を促進するという挑戦的な仮説を検証するために、細胞クローナリティーを追跡できるクローナル造血

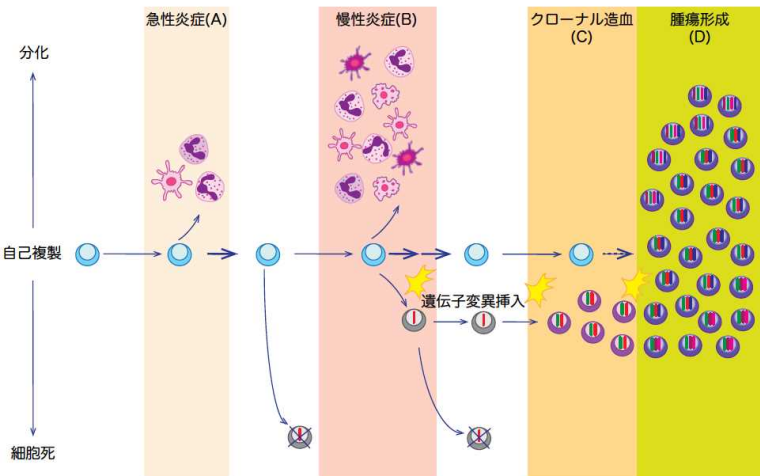


図 1 炎症による造血制御とその変容

トレーサーマウスや骨髄異形成症候群 (MDS) を発症する独自のモデルマウスを用いて、クローナル造血の起源となる造血幹細胞クローン間の競合と選択における感染ストレスの役割および腫瘍化の分子メカニズムを明らかにする。

方法

炎症マウスモデル

野生型 (C57BL6) または各遺伝子欠損マウスは熊本大学の動物実験委員会の承認のもとに維持・管理され、実験に使用された。腸炎モデルの誘導は各マウスに 1.5-2.5% DSS (Dextran Sulfate Sodium) を飲料水に混ぜて、1 週間の投飲を行った。IL-1 受容体に対する阻害剤 (Kineret, Swedish Orphan Biovitrum AB) 37ug を毎日、2 週間に渡って腹腔投与した。

MDS マウスモデル

腸内細菌培養

嫌気的条件下で培養された各種腸内細菌はソニケーションに破碎されたのち、超遠心機により膜画分を含むペレットを調整した。そのペレットのタンパク質量を測定し、タンパク質 15ug 相当のペレット懸濁液をマウス腹腔に投与することで細菌感染を模擬したモデルとした。コントロールとして、200ug LPS, 200ug Pam3CSK4 (いずれも Invivogen) を使用した。

フローサイトメトリー

マウスの骨髄から細胞を採取し、単一細胞に懸濁したのち、以下の抗体で細胞表面の抗原を染色した成熟血液・免疫細胞の解析には、抗B220抗体, 抗CD3e抗体, 抗F4/80抗体, 抗Ly6G抗体, 抗Ly6C抗体, 抗CD11b抗体, 抗CD45.1抗体, 抗CD45.2抗体を使用した。未熟な造血細胞の解析には、細胞系列(Lin) 標識抗体(抗NK1.1抗体, 抗CD11b抗体, 抗Ter119抗体, 抗Gr-1抗体, 抗CD4抗体, 抗CD8a抗体, 抗CD3e抗体, 抗B220抗体), 抗IL-7Ra抗体, 抗c-Kit抗体, 抗Sca-1抗体, 抗CD34抗体, 抗Flt3抗体, 抗CD150抗体, 抗CD48抗体, 抗CD16/32抗体を使用した。細胞のソーティングおよび解析はFACS Aria II (BD) またはFACS Symphony/Canto (BD) で行った。

統計処理

2 群間の比較は Student-*t* 検定を行って評価した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

結果

腸炎に対する腸内細菌を介した造血制御

クローン病に代表される炎症性腸疾患は日本でも年々増加する難治性自己免疫疾患である。マウスでは Dextran sulfate sodium (DSS) という薬剤の飲水で腸炎を起こすことができる。DSS 投与開始から 8 日目までに、骨髄の造血幹細胞や前駆細胞が顕著に増加した (図 2)。その活性化シグナルは腸炎後に体内

に流入する腸内細菌叢で、中でもとりわけ、*Bacteroides* 類が腸炎と共に増加し、造血幹細胞および前駆細胞に発現する Toll 様受容体を活性化した。その後、一部の前駆細胞 (MPP2/3) が腸管関連リンパ節の一つで炎症の場である腸間膜リンパ節に移行し、Ly6C/G 陽性細胞へと分化した。この反応は *Bacteroides* 類に特異的な現象で、他のグラム陰性細菌では前駆細胞 (MPP) の腸管膜への遊走は起こらなかった (図 3)。

興味深いことに、この Ly6C/G 陽性細胞は、抗炎症性因子を高発現しており、その細胞集団の除去や遊走阻害は腸疾患の炎症及び組織破壊が亢進した。逆に、細胞集団の養子移植は組織修復を促進することから、Ly6C/G 陽性細胞は組織修復に特化した細胞集団であることが示された。炎症性腸疾患患者から摘出した腸間膜リンパ節でも造血幹細胞・前駆細胞の増加および骨髓球系細胞の分化が観察されており (data not shown)、マウスだけでなくヒトでも起こりうる機序であることが示唆された (Sezaki M, et al., EMBO J 2022)。

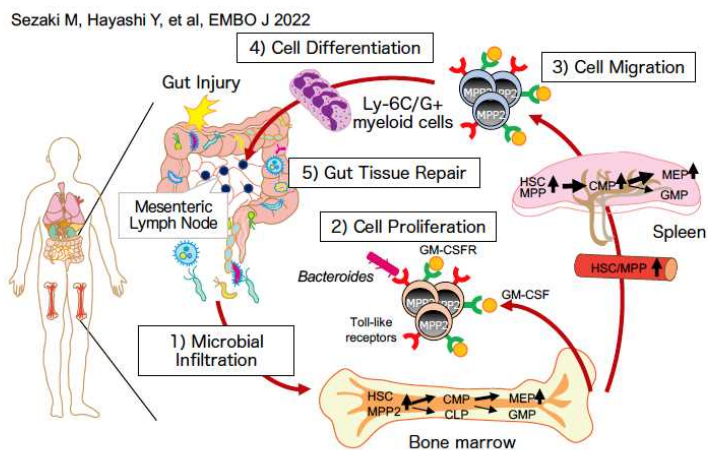


図2 腸管-骨髓コミュニケーション：腸内細菌シグナルを介した造血による腸管組織修復機構

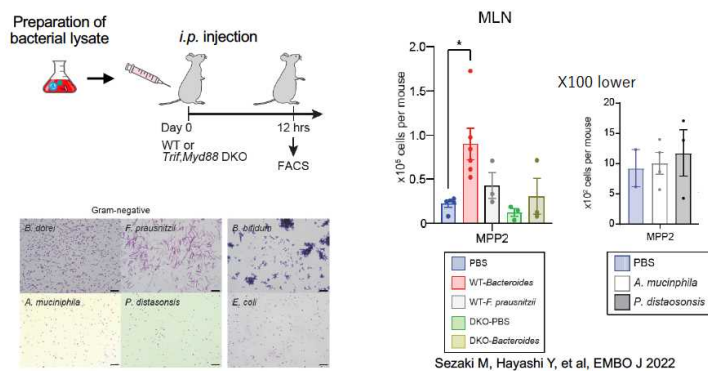


図3 *Bacteroides* 類は自然免疫シグナルを介して造血前駆細胞 (MPP) の腸管膜リンパ節への遊走を誘導する

腸内細菌による髄外造血誘導機構

DSS 処置後に増加する腸内細菌の一つに *Akkermansia muciniphila* (*A.m.*) があった。*A.m.* は、ヒト腸内細菌叢の 1-5% を構成し、腸管バリア機能や炎症性腸疾患などの決定因子として知られる。*A.m.* の生菌または膜画分を野生型マウスに感染させたところ、1 回投与にかかわらず 2 週間して脾臓を伴う髄外造血を誘導することを発見した。通常の細菌感染でも髄外造血は起こるが、1 週間以内に収束するため、*A.m.* に特異的な非常にゆっくりと進行する反応と考えられた。同じくグラム陰性桿菌の *Bacteroides* 類やグラム陰性・陽性菌の細胞壁の主要構成成分 (LPS, Pam3CSK4) を投与しても、長期的髄外造血は起こらなかった。そこで、LPS, Pam3CSK4 の受容体である TLR4/2 欠損マウスに *A.m.* を投与したと

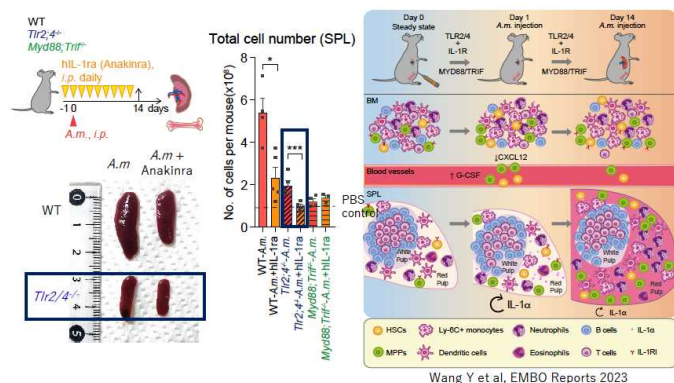


図4 *Akkermansia Muciniphila* によって誘導され髄外造血を伴う脾腫は IL-1R and TLR シグナルの協調的作用を介する。

ころ、脾腫が 87%軽減された (図 4)。一方、自然免疫シグナルを欠損する *Myd88/Trif* 欠損マウスでは脾腫が完全にキャンセルされた。残存反応に関与する自然免疫シグナルを調べるために、脾臓の細胞溶解液または湿潤液を用いて炎症性サイトカインアレイを行った。その結果、*IL-1a* の発現が各欠損マウスでみられる脾腫反応と綺麗に相関した。そこで、*IL-1a* 欠損マウスに投与を行い、60%程度の軽減が見られ、*TLR4/2* 欠損に加え *IL-1* 受容体に対するアンタゴニストで処置したところ完全にキャンセルされた。これらの結果は、*A.m.*によって誘導される脾腫が *TLR4/2* と *IL-1a* シグナルの協調的作用を介していることを示唆している (Wang Y et al., EMBO Rep 2023)。

感染ストレスに起因した MDS 発症と進展の分子基盤

骨髄異形成症候群 (MDS) は、造血幹細胞から発生するクローン性造血器腫瘍である。大規模なヒト疫学研究によって、感染症と自己免疫疾患は MDS 発症のリスクであることが知られていたが、その分子メカニズムは不明のままであった。始めに、感染ストレスによる MDS 発症マウスのモデルを作成した (図 5)。MDS 幹細胞のエピゲノム解析によって、*ELF* 転写因子の機能亢進と転写因子ネットワークの活性化を見出した。骨髄異形成症候群

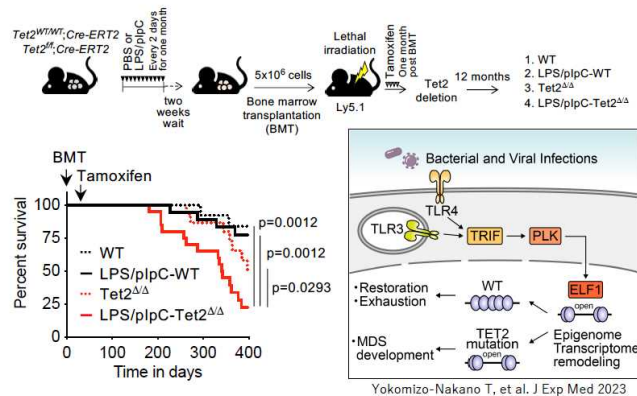


図 5 感染刺激によるストレスは正常造血幹細胞に MDS 発症を規定するエピゲノム変化を起こす。

の発症機序の課題に関して、昨年に引き続き、感染ストレスによって、クロマチン構造制御・エピゲノム変化を起こす MDS 幹細胞に特異的な転写因子の機能的役割を検証した。現在までの *plpC/LPS* 投与 MDS 幹細胞の RNA-seq、ATAC-seq、Bisulfate-seq、H3K27ac CUT&Tag によるオミックス解析から、感染ストレスに暴露された直後にはよく知られた *TLR-NF-kB* 転写因子経路が活性化しているが、中長期的には、がんの増殖に深く関連する転写因子・経路の活性化に加えて、自然免疫の制御機能が知られる *Elf1* 転写因子の活性化がわかった。*Elf1* 転写因子の発現と機能の亢進が、MDS 幹細胞の選択と MDS 発症を促進することがわかった (Yokomizo-Nakano T, et al. J Exp Med 2023)。*Tlr3/4-Trif-Plk-Elf1* 経路の遺伝学的・化学的阻害によって、MDS 幹細胞に得意的なエピゲノム変化が消失することがわかり、今度の MDS 予防・治療標的としての可能性が示唆された。

考察

本研究では、身体に共存する腸内細菌が造血にどのような影響を与えるのかに注目して研究を行った。その結果、腸炎に伴う腸内細菌叢の流入は骨髄造血を活性化し、損傷組織を修復する方向に造血応答を変化させることを発見した。特に、その反応は全ての腸内細菌によって担われているわけではなく、*Bacteroides* 属に特異的な応答であることが分かった。今後は、腸炎を制御する好中球細胞の詳細な機能、腸炎治療に対する応用の可能性について引き続き、研究を継続していく。また、腸炎の際に増加する菌種の一つ、*Akkermancia* 属は生菌かどうかに関わらず、非常にゆっくりとした髄外造血を誘導し、*TLR* と *IL-1* 受容体シグナルの協調的作用に依存することを見つけた。さらに、持続的な慢性炎症や膠

原病に限らず、日常的に起こる感染ストレスが正常造血幹細胞にエピゲノム変化を引き起こし、その結果、骨髄異形成症候群の発症を促進することを見出した。

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 [8]。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 [9]。実際、老化に伴い骨髄内に流入する腸内細菌が IL-1 産生を誘導し、血液幹細胞の機能制御や老化に関与していることも突き止めている [10]。また、自己免疫疾患や感染に伴う慢性炎症と造血器腫瘍発症の間に強い相関性がある [6, 7]。これらの事実を考え合わせると、白血病化のリスク要因であるクローナル造血への進展および拡大には、腸内細菌環境、および免疫応答や炎症反応などの骨髄内環境の変化が深く関与していることが予想される。

幹細胞研究を牽引してきた造血の分野では、20 年以上も前に急性骨髄性白血病の癌幹細胞分画が同定され遺伝子変異解析もよく進んでいるが、白血病の根絶は未だに実現していない。また、加齢が慢性疾患やがんの発症をもたらす危険因子であることが知られているが、複雑な生体内の生物学的応答のうちで、がんの発症を決定する老化因子は明白でない。本研究の結果は、感染症罹患によるエピゲノム変化を蓄積・継承した前がん幹細胞の起源と MDS 発症に至る分子基盤に迫る成果であり、様々な感染症に対する新たなワクチン戦略、老化に伴い増加する炎症関連疾患の制御と治療、腸内細菌叢の適切な制御による健康維持・疾患予防・治療技術を創出するだけでなく、白血病を含む癌や慢性炎症疾患における幹細胞の機能変容機序の解明やその変容プロセスへの介入による新たな先制医療や抗老化医療の確立に繋がると期待される。

共同研究者

指田 吾郎 熊本大学国際先端医学研究機構・特別招聘教授
高橋 康一 MD Anderson Cancer Center, Assistant Professor

引用論文

- [1] Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S et al., Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015 Jul 2;126(1):9-16. doi: 10.1182/blood-2015-03-631747.
- [2] Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE et al., Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 2014 Dec 25;371(26):2477-87. doi: 10.1056/NEJMoa1409405.
- [3] Jaiswal S, Pierre Fontanillas P, Flannick J, et al., Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014 Dec 25;371(26):2488-98. doi: 10.1056/NEJMoa1408617.
- [4] Takizawa H, Regoes RR, Boddupalli CS, et al., Dynamic variation in cycling of hematopoietic stem cells in steady state and inflammation. *J Exp Med*. 2011 Feb 14;208(2):273-84. doi: 10.1084/jem.20101643.

- [5] Takizawa H, Fritsch K, Kovtonyuk LV, et al., Pathogen-Induced TLR4-TRIF Innate Immune Signaling in Hematopoietic Stem Cells Promotes Proliferation but Reduces Competitive Fitness. *Cell Stem Cell*. 2017 Aug 3;21(2):225-240.e5. doi: 10.1016/j.stem.2017.06.013.
- [6] Kristinsson SY, Björkholm M, Hulterantz M, et al., Chronic immune stimulation might act as a trigger for the development of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2011 Jul 20;29(21):2897-903. doi: 10.1200/JCO.2011.34.8540.
- [7] Kristinsson SY, Landgren O, Samuelsson J, et al., Autoimmunity and the risk of myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2010 Jul;95(7):1216-20. doi: 10.3324/haematol.2009.020412.
- [8] Ferrucci L, Semba RD, Guralnik JM, et al., Proinflammatory state, hepcidin, and anemia in older persons. *Blood*. 2010 May 6;115(18):3810-6. doi: 10.1182/blood-2009-02-201087.
- [9] Kovtonyuk LV, Fritsch K, Feng X, et al., Inflamm-Aging of Hematopoiesis, Hematopoietic Stem Cells, and the Bone Marrow Microenvironment. *Front Immunol*. 2016 Nov 14;7:502. doi: 10.3389/fimmu.2016.00502.
- [10] Kovtonyuk LV, Caiado F, Garcia-Martin S, et al., IL-1 mediates microbiome-induced inflammaging of hematopoietic stem cells in mice. *Blood*. 2022 Jan 6;139(1):44-58. doi: 10.1182/blood.2021011570.

助成研究に関連した発表論文

#は筆頭著者、*は責任筆者。

1. Sezaki M#, Hayashi Y#, Nakato G, Wang Y, Nakata S, Biswas S, Morishima T, Fakruddin M, Moon J, Ahn S, Kim P, Miyamoto Y, Baba H, Fukuda S, **Takizawa H***. Hematopoietic stem and progenitor cells integrate microbial signals to promote post-inflammation gut tissue repair. *EMBO J*, 2022 Oct 18:e110712. doi: 10.15252/embj.2022110712. *correspondence. (IF: 13.783)
2. Wang Y, Morishima T, Sezaki M, Sato R, Nakato G, Fukuda S, Kobiyama K, Ishii KJ, Li Y, **Takizawa H***. Akkermansia muciniphila induces slow extramedullary hematopoiesis via cooperative IL-1R/TLR signals. *EMBO Rep*, 2023 Dec 6;24(12):e57485. doi: 10.15252/embr.202357485. Epub 2023 Oct 23. (IF: 7.7)
3. Yokomizo-Nakano T#, Hamashima A, Kubota S, Bai J, Sorin S, Sun Y, Kikuchi K, Morii M, Iimori M, Kanai A, Iwama A, Kurotaki D, **Takizawa H**, Matsui H, **Sashida G***. Exposure to microbial products followed by loss of Tet2 promotes myelodysplastic syndrome via remodeling HSCs *J Exp Med* 2023 Jul 3;220(7):e20220962. doi: 10.1084/jem.20220962. Epub 2023 Apr 18. (IF:15.3)