

造血幹細胞の分化方向性を制御する分子機構

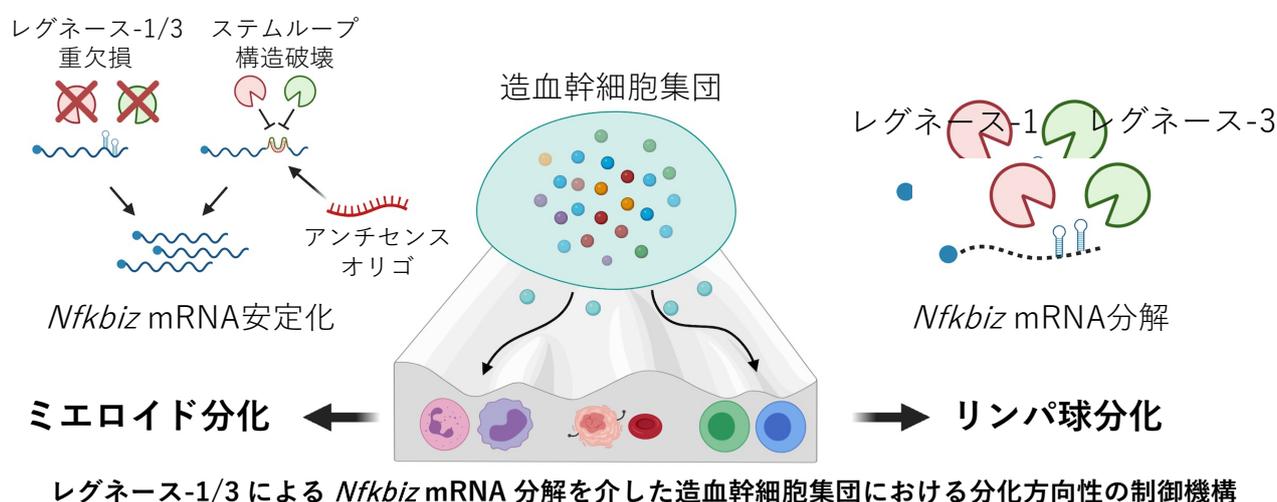
—mRNA 分解機構が司る新たな細胞運命決定機構の発見—

概要

私たちの骨の中には、全ての血球成分の源である造血幹細胞と呼ばれる細胞が存在しており、日々血液の産生に貢献しています。このような造血幹細胞は、白血球（リンパ球や顆粒球など）、赤血球や血小板といったさまざまな種類の血球を産生する潜在的な能力（多能性）を有する同じような細胞群であると考えられてきましたが、近年、一つ一つの造血幹細胞には、ある特定の細胞を多く生み出す傾向が存在することが明らかになってきました。しかしながら、このような造血の偏りが分子レベルでどのように制御されているのか、についてはほとんどわかっていませんでした。京都大学大学院医学研究科の植畑拓也 助教、山田信之輔 同博士課程学生、竹内理 同教授らの研究グループは、炎症応答や免疫細胞の活性化を抑制する RNA 分解酵素として知られているレグネース-1 と、機能未知であったファミリー分子レグネース-3 が、*Nfkbiz* をコードするメッセンジャーRNA を RNA 分解の標的とし *Nfkbiz* 発現量を調節することで、造血幹細胞による造血の方向性を制御することを明らかにしました。

本研究は、如何に造血幹細胞の細胞運命が決定するのかという問いに対して、新たな細胞運命決定機構を同定したものです。骨髄疾患や慢性炎症で認められる造血異常の背景にあるメカニズムと関連する可能性があり、今後の研究が期待されます。

本成果は、2023年11月3日に米国の国際学術誌「*Blood*」にオンライン掲載されました。



1. 背景

骨髄での造血において、造血幹細胞 (hematopoietic stem cell, HSC) は全ての血球成分を再構築することが可能な幹細胞であり、生涯造血に貢献することが知られています。しかし近年、マウスを用いた研究により、造血幹細胞はほとんど細胞分裂をせず静止状態にあり、そのごく一部が多能性造血前駆細胞 (multipotent progenitor, MPP) へ分化し、日々の血球細胞の産生に大きく寄与することがわかってきました。一方で、HSC や MPP を含む造血幹細胞集団は「多能性」を有しており、これによりリンパ球系細胞 (注 1)、ミエロイド系細胞 (注 2)、血小板や赤血球といった細胞をバランスよく産生していると考えられてきました。しかし、最近の個々の HSC を詳細に解析した研究によると、HSC は最終的な細胞運命決定の前にすでにどのタイプの細胞になるのか、ある程度決まった分化指向性が備わっていることが、少しずつ明らかになってきました。このことから、HSC は分化の方向性に関して非常に不均一な集団であり、それゆえ造血分化とは均一な分化段階を経て進むというよりは、むしろ連続性を持って節目なく起こるものであるというモデルが提唱されています。しかしながら、このような造血モデルにおいて血球細胞の分化方向性がいつ、どのように決定するのかという問いに対して、明確な分子メカニズムはほとんどわかっていませんでした。

メッセンジャーRNA (mRNA) 分解酵素であるレグネース-1 は、主に免疫細胞において炎症応答や活性化を抑制するブレーキとして機能していることが知られています。レグネース-1 には、他に 3 つのファミリー分子が存在しており (レグネース-2, 3, 4)、その中でレグネース-3 は主にミエロイド系細胞に高発現するものの炎症応答にはほとんど関与せず、また標的となる mRNA に関して明らかではありませんでした。レグネース-1/3 はいずれも、リポポリサッカライド (LPS) (注 3) などの炎症シグナルにより発現が制御されており、何らかの重複した役割が想定されるものの、生体内における意義や共通の標的遺伝子に関しては全く不明でした。

2. 研究手法・成果

本研究では、生体内におけるレグネース-1/3 の機能を解析するためにレグネース-1/3 重欠損マウスを作製しました。私たちを含め、これまでの研究において、レグネース-1 単独欠損マウスは数ヶ月で死亡し、レグネース-3 単独欠損マウスは長期間生存することがわかっていました。しかし、レグネース-1/3 重欠損マウスは生後 24 時間以内に全例死亡するという予想外の結果となりました。主要臓器に異常は認められず、胎生 15.5 日目の胎仔肝臓における造血を解析したところ、B 細胞の減少とともにミエロイド系細胞の増加が認められました。そこで、野生型とレグネース-1/3 重欠損細胞の混合胎仔肝細胞移植による骨髄造血を解析したところ、胎生期と同様、レグネース-1/3 重欠損細胞は顕著な B 細胞の減少とミエロイド系細胞の増加が認められました。この B 細胞分化障害は lymphoid-primed multipotent progenitor (LMPP) や common lymphoid progenitor (CLP) といったリンパ球初期分化段階ですでに観察され、さらに骨髄 B 細胞や胸腺 T 細胞においても深刻な分化障害を認めました。また同移植マウスにおいて、野生型とレグネース-1/3 重欠損細胞の間に細胞死や細胞増殖の変化が認められないことから、レグネース-1/3 を介した遺伝子発現調節が分化方向性を制御していることが示唆されました。次に、同移植マウスから Lineage⁻Sca1⁺Kit⁺ (LSK) によって定義される未分化な細胞集団を野生型とレグネース-1/3 重欠損細胞をそれぞれ回収し、1 細胞 RNA シークエンス解析 (注 4) を行ったところ、レグネース-1/3 重欠損細胞は野生型と比較し、リンパ球系分化の減少と対照的に、ミエロイド系や血小板・赤血球系分化の増加が観察されました。さらに、1 細胞 RNA シークエンスで得られた遺伝子発現データを詳細に解析したところ、レグネース-1/3 重欠損細胞ではミエロイド分化に特徴的な遺伝子群の他に、機能未知な Nfkbiz が発現増加を示していることがわかりました。Nfkbiz を含め、レグネース-1/3 重欠損細胞で発現増加を示した遺伝子に関して、MPP 培養系を用いて強制発現し B 細胞分化を促したところ、Nfkbiz は

顕著な B 細胞分化障害を引き起こすことが明らかになりました。そこで、レグネース-1/3 重欠損によって引き起こされる骨髄分化障害の原因が *Nfkbiz* の発現上昇にあるか検証するため、レグネース-1/3 と *Nfkbiz* の三重欠損マウスを作製し骨髄造血を解析したところ、*Nfkbiz* 遺伝的欠如によりレグネース-1/3 重欠損で認められた骨髄造血変化が劇的に改善することを見出しました。*Nfkbiz* はクロマチン制御にも関与することから、これらマウスの初期 MPP+HSC 集団 (Fit3⁺CD48⁻LSK) を用いて 1 細胞 Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC) シークエンス解析 (注 5) を行いました。その結果、レグネース-1/3 重欠損細胞は野生型と比較し大きくクロマチン状態が変化しており、部分的にミエロイド関連遺伝子座のアクセシビリティが増加していること、そして、このクロマチン変化が *Nfkbiz* 欠損により劇的に回復することを明らかにしました。ここで、私たちがこれまでに報告していたレグネース-1 の UV crosslinking immunoprecipitation (CLIP) シークエンス (注 6) データに加え、新たにレグネース-3 の解析を行い、レグネース-1/3 がピリミジン-プリン-ピリミジンループ (注 7) を有する共通のステムループ構造を認識すること、さらに *Nfkbiz* mRNA における結合モチーフが 3'非翻訳領域に存在する 2 つの近接したウリジン-アデニン-ウリジンをループに有するステムループ構造であることを同定しました。最後に、アンチセンスオリゴ核酸を用いてこのステムループ構造を破壊することでレグネース-1/3 による *Nfkbiz* mRNA の分解を抑制、HSC において *Nfkbiz* の発現誘導を可能にしました。その結果、インターロイキン(IL)-1 β や腫瘍壊死因子(TNF)によって誘導される HSC のミエロイド分化を著しく加速させることを見出しました。

以上の結果から、“レグネース-1 とレグネース-3 による *Nfkbiz* mRNA 分解”が、造血幹細胞における分化方向性の調節機構として機能していることを解明しました。

3. 波及効果、今後の予定

Nfkbiz の機能は成熟した免疫細胞では良く知られていましたが、造血幹細胞ではどのような働きがあるのか解明されていませんでした。レグネース-1/3、及び *Nfkbiz* は、LPS や IL-1 β により活性化する炎症シグナルを介して発現制御されることから、感染症に伴う骨髄造血のミエロイド産生増加、あるいは老化現象におけるインフラメージング (注 8) に伴うミエロイド造血に関与している可能性があります。今後、炎症造血適応におけるミエロイド造血や骨髄疾患との関連について研究を進めていきたいと考えています。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業 18H05278, 23H00402 (研究開発代表者: 竹内 理)、18K15185 (研究開発代表者: 植畑 拓也)、日本医療研究開発機構 (AMED) JP20gm4010002, JP21ae0121030, JP23ama221327 (研究開発代表者: 竹内 理)

<用語解説>

[注 1] リンパ球系細胞 … B リンパ球と T リンパ球を含む。

[注 2] ミエロイド系細胞 … 単球/マクロファージと顆粒球を含む。骨髄系細胞とも言われる。

[注 3] リポポリサッカライド (LPS) … 主に大腸菌やサルモネラ菌などのグラム陰性菌の細胞壁を構成する成分の一つであり、免疫細胞に対して強い免疫反応を誘導する。

[注 4] 1 細胞 RNA シークエンス解析 … 単一の細胞に由来する mRNA を用いて網羅的に遺伝子発現解析を行う技術。

[注 5] 1 細胞 Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC) シークエンス解析 … 単一の細胞に由来

するゲノム DNA を用いて、クロマチン状態におけるオープン領域を網羅的に同定する技術。

[注 6] UV crosslinking immunoprecipitation (CLIP)シーケンス … 特定の RNA 結合タンパク質が結合する RNA を網羅的に解析する手法。紫外線照射により RNA とタンパク質間相互作用の架橋後、免疫沈降によって得られた RNA を次世代シーケンサーにより網羅的に解析することで、RNA 結合様式を同定することが可能となる。

[注 7] ピリミジン-プリン-ピリミジンループ … ステムループ構造のループを構成する 3 つの塩基配列。RNA ではピリミジン塩基はシトシンとウラシル、プリン塩基はアデニンとグアニンを指す。

[注 8] インフラメーjing … 近年、老化やそれに伴う病態に、炎症が密接に関与していることが示唆されていることから、炎症 (inflammation) と老化 (aging) に由来する造語が生まれた。

<研究者のコメント>

レグネース-1 とレグネース-3 の研究を進めていく中で、骨髄造血の分化方向性を制御する Nfkbiz という新たな鍵分子に出会うことができました。Nfkbiz はレグネース-1/3 の機能を説明する上で最も重要な標的遺伝子と考えられ、本研究で見出した「レグネース-1/3-Nfkbiz mRNA 分解制御軸」は骨髄造血分化の分子基盤として、骨髄疾患の新たな治療標的となる可能性があります。(植畑拓也)

<論文タイトルと著者>

タイトル：Regulation of lymphoid-myeloid lineage bias through Regnase-1/3-mediated control of Nfkbiz
(Regnase-1/3 による Nfkbiz 発現調節を介したリンパ球-ミエロイド分化系譜バイアスの制御)

著者：Takuya Uehata, Shinnosuke Yamada, Daisuke Ori, Alexis Vandenbon, Amir Giladi, Adam Jelinski, Yasuhiro Murakawa, Hitomi Watanabe, Kazuhiro Takeuchi, Kazunori Toratani, Takashi Mino, Hisanori Kiryu, Daron M. Standley, Tohru Tsujimura, Tomokatsu Ikawa, Gen Kondoh, Markus Landthaler, Hiroshi Kawamoto, Hans-Reimer Rodewald, Ido Amit, Ryo Yamamoto, Masaki Miyazaki, Osamu Takeuchi

掲載誌：Blood DOI：10.1182/blood.2023020903.