

## 53. 炎症ストレスに起因したクローン造血の理解と制御

滝澤 仁

熊本大学 国際先端医学研究機構

Key words : 造血幹細胞, 炎症, 細胞クローン

### 緒言

老化に伴い加齢関連慢性疾患や癌が増加することが知られている。その原因として組織幹細胞への遺伝子変異の蓄積が一つとして考えられるが、幹細胞から癌化に至るプロセスでは内在性因子の変化だけでなく、環境因子の影響を受けることが数理モデルから予想されている。しかしながら、生物学的癌化プロセスにおける内在性・外因性因子の相対的寄与や時間的關係性については明らかとなっていない。

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。近年、白血病関連の遺伝子変異を持つものの、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。加齢に伴い、前白血病幹細胞の血中出現頻度やクローナル造血の頻度は高くなり、将来の白血病リスク、ひいては心血管系疾患や2型糖尿病といった、老化関連疾患のリスク因子となることが示された [1]。これらの知見は、クローナル造血から前白血病幹細胞の発症が一般的な老化のプロセスであり、臨床学的には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発生や拡大の機序については未だ明らかとなっていない。従い、白血病のリスク因子として知られるクローナル造血の起源とその発症・進展メカニズムを明らかにすることは、白血病の予測診断法や予防法の開発において有用な知見をもたらすものと期待される。

滝澤らは、細菌感染に伴う炎症は造血幹細胞の分裂を増長し、その細胞機能を低下させることを明らかにした [2]。さらに、疫学研究から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ことから [3, 4]、“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という仮説に至った。本研究では、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、細胞クローンをシングルセルレベルで検出できる高感度バーコード検出システムの立ち上げと、そのシステムを用いたクローナル造血モデルマウスの作製を進めた。

### 方法および結果

高感度ゲノムバーコード追跡システムを確立するため、次世代シーケンサーによるバーコード配列の検出法の構築とそのバーコード配列を持つトランスジェニックマウスの作製を行なった。

#### 1. 細胞クローンの検出を可能にする効率的ゲノムバーコード増幅法の確立

従来のクローン追跡技術は、細胞集団を固有の DNA バーコードで標識して次世代シーケンサーで挿入部位を同定することで、細胞クローンを識別する (図 1 の左)。しかしながら、細胞クローンの数を数えることができて、各細胞クローン集団のサイズを推定することは困難であった。本研究では、これまでレトロウイルスの検出に使われていた方法を応用して、各細胞の DNA を物理的に断片化させることで各細胞 DNA を識別することができ、この方法と前者のクローン識別を組み合わせることで、細胞クローンの数とサイズ双方を評価できる実験系を立ち上げた (図 1 の右および [5])。まず、蛍光色素と固有の DNA 配列 (バーコード配列) をのせたベクターとトランスポゼースの一つである Hyper Sleeping Beauty (HSB) を同時にマウス細胞株に導入し、ゲノムへのバーコード配列挿入を行った。細胞より抽出した DNA をソニケーションによりランダムに切断したのち Droplet Nested PCR により増幅し、シーケンシ

ングによりクローンの数とサイズを定量化した。遺伝子導入効率の異なる2種類のマウス細胞株を調べたところ、どちらも約500クローンを識別することが可能であり、かつ各クローンがほぼ同定でのクローンサイズを持つことを評価することができた(図2)。また、バーコード配列が宿主細胞のどこに挿入されたかを評価したところ、特定のゲノム領域に挿入することなく全ゲノム領域に渡って比較的ランダムに挿入されることを確認した(図3)。

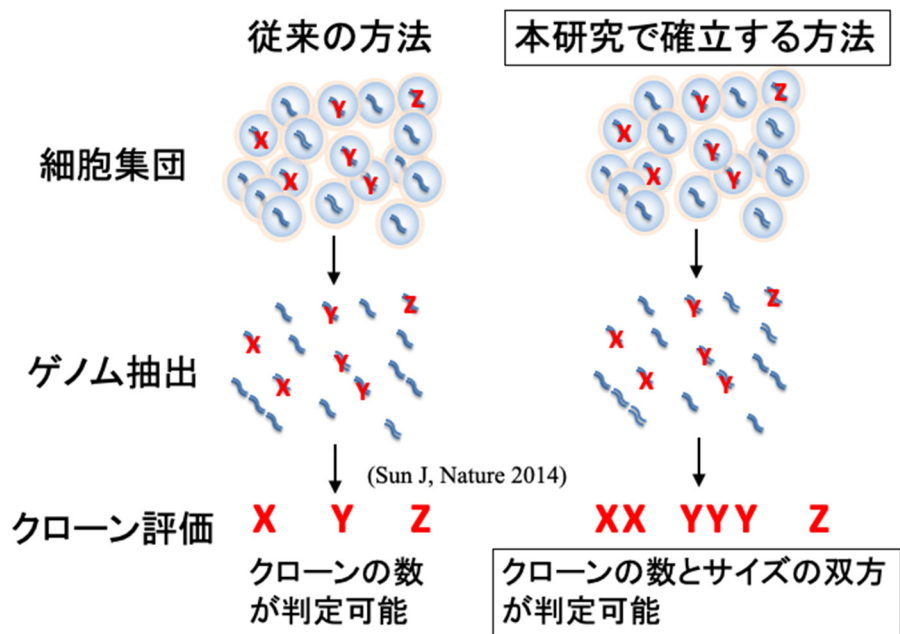


図1. クローン数とサイズの評価系の確立

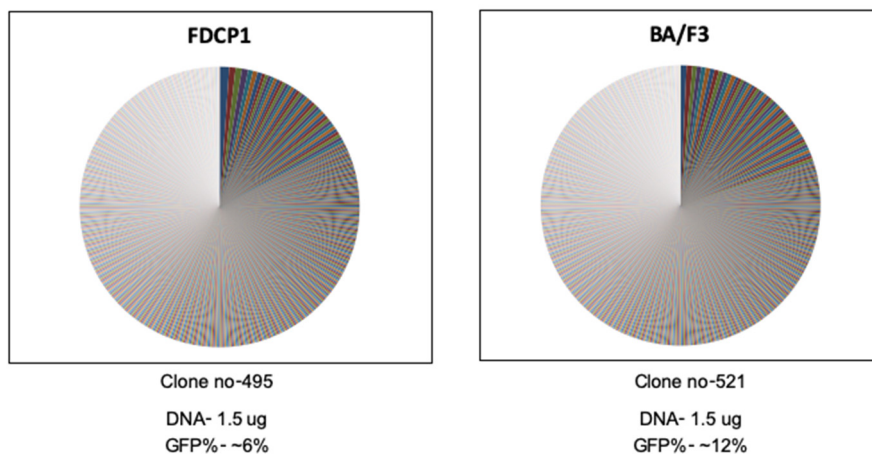


図2. 細胞株を用いたクローン数とサイズの評価

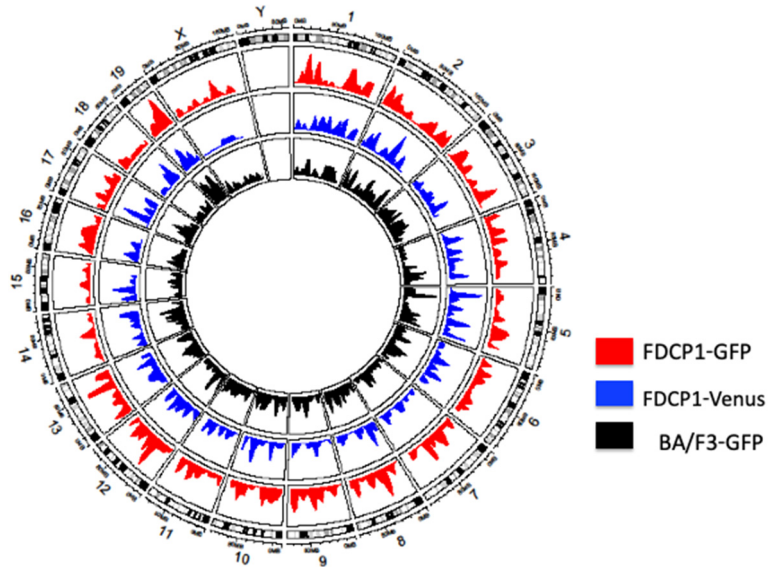


図3. バーコード配列のインテグレーション部位の評価

## 2. クローナル造血トレーサーマウスの作出

トランスポゼースの一つである Hyper Sleeping Beauty (HSB) を ROSA26 座に組み込み、Cre 発現・活性依存的に HSB を発現するマウスを作成した (図4の ROSA26-HSB)。強力なプロモーターに続き GFP を HSB の認識配列で挟み込んだカセット (CAG-GFP-IR) を胎胚に注入し、このカセットを不活型で複数コピーもつマウスも作製した (図4の poly-IR)。

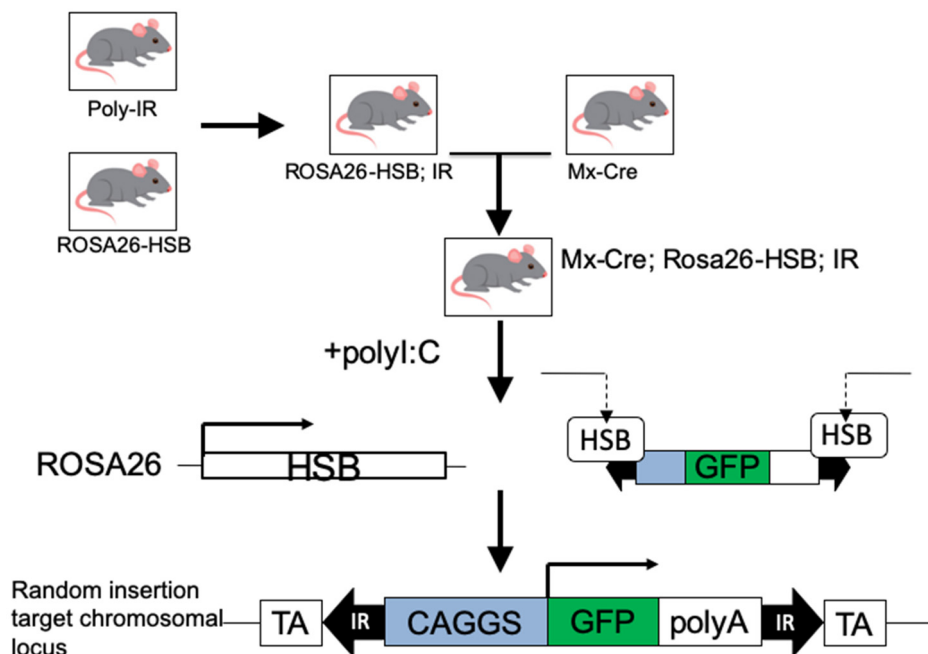


図4. クローン数とサイズの評価系の確立

## 考 察

炎症ストレスによる前白血病幹細胞クローンの発症および進展を探るため、各造血幹細胞クローンを追跡するシステムの構築が欠かせない。本研究では、固有のDNAバーコード配列をゲノムに挿入することで各細胞が標識されるトランスポゾンシステムを採用し、細胞株を用いてバーコード配列の検出法の確立を行った。その結果、 $10^5 \sim 10^6$ 細胞から抽出したDNAより500程度のクローンを検出することができ、さらにクローンの識別だけでなくクローンの数をカウントすることが可能となった。今後は、細胞数を減らしていき、より少ない細胞でのクローン検出を検討していく。

さらに、上記で用いた固有のDNAバーコード配列を持つマウスとCre発現依存的にhyper sleeping beauty (HSB)を発現するマウスを作製した。今後はこれらのマウスを交配し、さらにインターフェロン依存的にCreを発現するMx-Creマウスと掛け合わせることで、polyI:C (ウイルス由来分子)の投与によりHSBが活性化され、CAG-GFP-IRカセットが他の染色体座に挿入されてGFPを発現するマウスを作成することを予定している (図4)。

本研究では、炎症ストレスによる白血病の発症・進展メカニズムを検証するために必要な実験系の確立とモデルマウスの作出を行なった。今後は、作成したモデルマウスが予想通りの分子挙動を示し、各細胞クローンが固有に標識されるか確認作業を行う。同時に、クローン検出感度の改善と効率化を進め、炎症ストレスをクローナル造血トレーサーマウスに与えた際のクローン動態を解析していく。

## 共同研究者・謝辞

本研究では、熊本大学生命資源研究・支援センター、疾患モデル分野の荒木貴美先生との共同研究によるクローナル造血トレーサーマウスの作出を行なった。また、hyper sleeping beauty によって認識されるバーコード配列は現時点で最もトランスポゾン効率の良いベクターをドイツ・マックスベルブルック分子医学センターの Zsuzsanna Izsvak 博士から供与いただいた。

## 文 献

- 1) Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, Ebert BL. 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. Epub 2015 Apr 30.
- 2) Takizawa H, Fritsch K, Kovtonyuk LV, Saito Y, Yakkala C, Jacobs K, Ahuja AK, Lopes M, Hausmann A, Hardt WD, Gomariz Á, Nombela-Arrieta C, Manz MG. 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. Epub 2017 Jul 20.
- 3) Kristinsson SY, Björkholm M, Hultcrantz M, Derolf ÅR, Landgren O, Goldin LR. 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. Epub 2011 Jun 20.
- 4) Kristinsson SY, Landgren O, Samuelsson J, Björkholm M, Goldin LR. Autoimmunity and the risk of myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2010 Jul;95(7):1216-20. doi: 10.3324/haematol.2009.020412. Epub 2010 Jan 6.
- 5) Satou Y, Katsuya H, Fukuda A, Misawa N, Ito J, Uchiyama Y, Miyazato P, Islam S, Fassati A, Melamed A, Bangham CRM, Koyanagi Y, Sato K. Dynamics and mechanisms of clonal expansion of HIV-1-infected cells in a humanized mouse model. *Sci Rep*. 2017 Jul 31;7(1):6913. doi: 10.1038/s41598-017-07307-4. Erratum in: *Sci Rep*. 2018 Apr 25;8(1):6770.