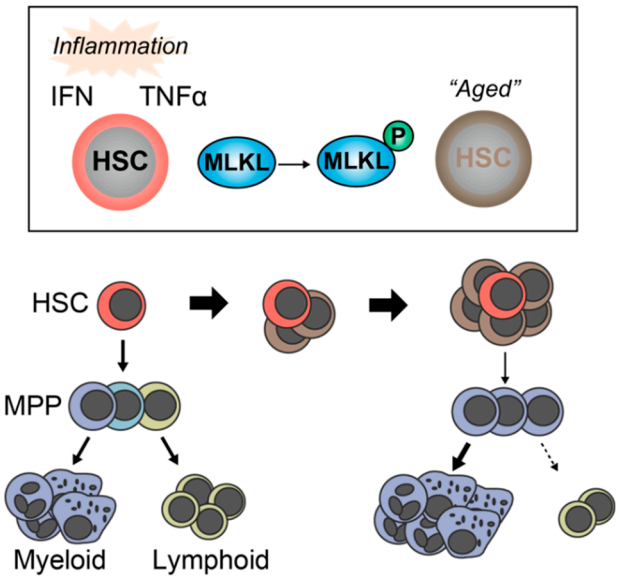
166　ネクロプトーシスを標的とした造血幹細胞の若返り戦略	山下　真幸

【目的】造血組織における老化は、貧血、免疫系の異常、クローン性造血及び造血器腫瘍の発症など、その影響は全身に波及する。そのため、造血組織の老化メカニズムの解明は個体老化の理解と介入を考える上で重要である。造血老化の重要な原因の一つとして、造血幹細胞の加齢性変化が挙げられる。造血幹細胞は自己複製能と分化多能性を併せ持ち、血液恒常性の維持および造血再生を担うが、加齢とともに自己複製の亢進、骨髄球系優位な分化など、造血幹細胞レベルでの変化が起きる。一方、造血幹細胞の機能は骨髄微小環境（ニッチ）に依存しているが、加齢に伴い骨髄内で慢性炎症が生じ、ニッチによる造血幹細胞支持能が変化する。造血幹細胞を取り巻くこれらの内因性・外因性変化の結果、老齢マウスでは造血幹細胞の数は増加するが、個々の造血幹細胞の再生能は低下する。しかしながら、造血幹細胞の加齢性変化の原因についてはまだ不明な点が多く、造血組織の「若返り」の方法も開発されていない。近年、慢性炎症の重要な発生源として、ダメージ関連分子パターンの放出を担うネクロプトーシスの関与が指摘されている。そこで筆者らは、ネクロプトーシスの実行因子である MLKL に着目し、*Mlkl* ノックアウト（*Mlkl* $^{-/-}$）マウスを用いて、炎症や造血老化モデルにおける MLKL の活性化が造血幹細胞の表現系に及ぼす影響を解析した。

【方法】野生型および *Mlkl* $^{-/-}$ マウスに炎症リガンド（poly I:C、LPS、TNF-α）を投与し、翌日に造血幹細胞をフローサイトメトリーで回収した。定量 PCR や Western blotting によって MLKL の発現量を評価するとともに、*in vitro* 増殖アッセイによって造血幹細胞の増殖能を評価した。また、野生型および *Mlkl* $^{-/-}$ マウスに 5-FU を投与することによって造血老化モデルを作製し、フローサイトメトリーによる造血解析および競合的移植を用いた造血幹細胞の機能解析を行った。

【結果】MLKL は造血幹細胞を含む未分化な造血細胞において選択的に発現しており、造血幹細胞の MLKL は poly I:C 投与によって活性化することが明らかになった。*Mlkl* $^{-/-}$ マウスを用いた検証の結果、poly I:C 刺激後に認められる造血幹細胞の機能低下は主に造血細胞の MLKL を介して誘導されることがわかり、MLKL の cell intrinsic な作用が機能抑制の主体であると考えられた。また、*Mlkl* $^{-/-}$ マウスを用いて造血老化モデルを作製すると、野生型でみられるような見かけの造血幹細胞数の増加や移植後の生着能低下、ミエロイド優位な分化といった造血幹細胞の老化様表現系が有意に抑制されることがわかった。これらの結果により、造血細胞における MLKL の活性化が造血幹細胞の老化様表現系の少なくとも一部を担う可能性が示唆され、MLKL の活性化を抑制するアプローチが造血老化の若返りに有効である可能性が示唆された。

MLKL は炎症により活性化し、造血幹細胞の加齢性変化を促進すると考えられる



166. ネクロプトーシスを標的とした造血幹細胞の若返り戦略

山下　真幸

東京大学 医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞分子医学分野

Key words：造血幹細胞，ネクロプトーシス，MLKL，慢性炎症，老化

緒　言

造血組織における老化は、貧血、免疫系の異常、クローン造血及び造血器腫瘍の発症など、造血システムの破綻をきたし、酸素供給低下や易感染性、心血管病リスクの増大など、その影響は全身に波及する。そのため、造血組織の老化メカニズムの解明は個体老化の理解と介入を考える上で重要である。造血組織の老化の重要な原因の一つとして、造血幹細胞の加齢性変化が挙げられる。造血幹細胞は自己複製能と分化多能性を併せ持ち、血液恒常性の維持および造血再生を担うが、加齢とともに自己複製の亢進、骨髄球系優位な分化など、造血幹細胞レベルでの変化が起きる。一方、造血幹細胞の機能は骨髄微小環境（ニッチ）に依存しているが、加齢に伴い骨髄内で慢性炎症が生じ、ニッチによる造血幹細胞支持能が変化する。造血幹細胞を取り巻くこれらの内因性・外因性変化の結果、老齢マウスでは造血幹細胞の数は増加するが、個々の造血幹細胞の再生能は低下する。しかしながら、造血幹細胞の加齢性変化の原因についてはまだ不明な点が多く、造血組織の「若返り」の方法も開発されていない。近年、慢性炎症の重要な発生源として、組織障害などで細胞外に放出されるダメージ関連分子パターン（DAMPs）の関与が指摘されている。さらに、DAMPs の放出は制御されたネクローシスの一種であるネクロプトーシスが深く関与することが知られている。そこで筆者らは、ネクロプトーシスの実行因子である MLKL に着目し、*Mlkl* ノックアウト（*Mlkl* $^{-/-}$）マウスを用いて、炎症や造血老化モデルにおける MLKL の活性化が造血幹細胞の表現系に及ぼす影響を解析した。その結果、造血細胞における MLKL の活性化が造血幹細胞の老化様表現系の少なくとも一部を担う可能性が示唆され、MLKL の活性化を抑制するアプローチが造血老化の若返りに有効である可能性が示唆された。

方　法

1. マウス

Mlkl $^{-/-}$ マウス（C57BL/6 の遺伝的背景）はドイツのケルン大学と MTA を締結のうえ供与を受けた。*Mlkl* $^{-/-}$ マウスは同腹子より得た野生型（*Mlkl* $^{+/+}$）マウスと比較した。炎症モデルとして、poly I:C 5 mg/kg を 1 回また隔日で 7 回腹腔内投与、LPS 0.4 mg/kg を 1 回腹腔内投与、または TNF-α 2 μg を 1 回静脈内投与し、最終投与翌日に解析した。また、造血老化モデルとして、150 mg/kg の 5-FU を 1 ヶ月毎に 3 回腹腔内投与し、最終投与 1 ヶ月後に解析した。動物実験は東京大学医科学研究所の動物実験委員会より承認を受けて行われた。

2. フローサイトメトリー

マウス大腿骨、脛骨、骨盤骨、上腕骨および胸骨より骨髄を採取し、溶血剤および Ficoll 液で単核球分離したのち、染色バッファー（2%FBS/PBS）で希釈された以下の標識抗体を用いて染色を行った。CD3e（145-2C11）、CD4（GK1.5）、CD5（53-7.3）、CD8a（53-6.7）、B220（RA3-6B2）Mac1（M1/70）Gr-1（RB6-8C5）Ter119（TER-119）、c-Kit（2B8）、Sca-1（D7）、CD150（TC15-12F12.2）、CD48（HM48-1）、Flk2（A2F10）、FcgR（93）、CD34（RAM34）EPCR（eBio1560）、CD41（MWReg30）。Lineage（Lin）マーカーには CD3e、CD4、CD5、CD8a、B220、Mac1、Gr-1 および Ter119 を用いた。染色後の細胞を Propidium Iodide を含む染色バッファーに懸濁したのち、FACS Celesta および FACS Aria IIIu（BD Bioscience）を用いてデータ取得および標的細胞の分取を行った。

3. 造血幹細胞の培養

フローサイトメーターを用いて分取された造血幹細胞（Lin^-／$Sca\text{-}1^+$／$c\text{-}Kit^+$／$Flk2^-$／$CD48^-$／$CD150^+$）を、造血幹細胞を効率良く増幅する培地として最近開発された polyvinyl alcohol を含む無血清培地［1］で 7 日間培養し、造血幹細胞の数をフローサイトメトリーによって評価した。

4. 造血幹細胞の移植

フローサイトメーターを用いて分取された造血幹細胞 250 個（$CD45.2^+$）を 2×10^5個の補助細胞（$CD45.1^+$）とともにレシピエントマウス（$CD45.1^+$）に移植し、末梢血のドナー由来細胞の割合を 1 ヶ月毎にフローサイトメトリーによって評価した。

結　果

1. 炎症モデルにおける *MLKL*$^{-/-}$ マウス造血幹細胞の解析

各種造血細胞における MLKL の発現量を定量 PCR で解析したところ、MLKL は成熟血球にはほとんど発現しておらず、造血幹細胞を含む未分化な造血細胞で発現が高いことがわかった（図 1a）。定常状態では MLKL は不活性化型であり、I 型インターフェロンや TNF-α などの炎症刺激を介して活性化されることが知られている［2］。実際、すでに報告されているように、*Mlkl* $^{-/-}$ マウスにおける定常状態での造血幹細胞数および機能は野生型と同等であった［3］。そこで、炎症環境下での *Mlkl* $^{-/-}$ マウス造血幹細胞の表現系を調べるために、さまざまな炎症性リガンドを投与したのちに造血幹細胞を採取し、その増殖能を *in vitro* で評価した。興味深いことに、poly I:C による炎症刺激後に造血幹細胞における MLKL の発現量はやや増加し、活性型の指標であるリン酸化 MLKL（p-MLKL）の発現は著しく増加していた（図 1b、c）。さらに、炎症刺激によって野生型の造血幹細胞の増殖は抑制されたが、poly I:C 投与および TNF-α 投与後において *Mlkl* $^{-/-}$ マウス由来の造血幹細胞では増殖能が有意に改善していた（図 1d）。この結果は、炎症刺激による MLKL の活性化が造血幹細胞の増殖能を抑制することを示唆する。しかし、このマウスでは全身で MLKL を欠損しているため、非造血組織での MLKL の活性化による二次的な影響を排除できない。MLKL は炎症反応の増幅に寄与する可能性も示唆されており、実際にマルチプレックス ELISA による解析の結果、poly I:C 投与後における骨髄中の IL-6、IL-10、IL-12、G-CSF、IFNγ、CXCL1 および CCL2 の濃度上昇が *Mlkl* $^{-/-}$ マウスで有意に抑制されていた。そこで、野生型マウスに *Mlkl* $^{-/-}$ マウス骨髄細胞を移植して造血細胞特異的 *Mlk* $^{-/-}$ マウスを作製し、このマウスに poly I:C を投与して造血幹細胞の増殖能を同様に評価した。その結果、poly I:C 投与後の造血特異的 *Mlkl* $^{-/-}$ マウスにおいても造血幹細胞の増殖能が有意に改善することがわかり、造血細胞における MLKL 活性化が造血幹細胞の増殖能抑制に重要であることが明らかになった（図 1e）。

2. 造血老化モデルにおける *MLKL* $^{-/-}$ マウス造血幹細胞の機能解析

抗がん剤の一種である 5-FU をマウスに連続投与することにより、造血老化の表現系を再現できることが知られている［4］。そこで、この *Mlkl* $^{-/-}$ マウスに 5-FU を連続投与し、造血老化表現系が再現されるかどうかを検討した（図 2a）。末梢血の解析では、5-FU 投与後の *Mlkl* $^{-/-}$ マウスにおける汎血球減少および血球再生は野生型と比べて有意な差は認めなかった。一方、3 回目の 5-FU 投与後 1 ヶ月時点での野生型マウス末梢血では既報通り骨髄球系優位の血球産生が見られたのに対し、*Mlkl* $^{-/-}$ マウスではリンパ球系細胞の産生が保たれていた（図 2b）。さらに、骨髄フローサイトメトリーの結果、野生型マウスでは 5-FU の連続投与によって造血幹細胞の数が顕著に増加するのに対し、*Mlkl* $^{-/-}$ マウスではその効果が減弱していた（図 2c）。これらのマウスから採取した同数の造血幹細胞をレシピエントマウスに競合的に移植したところ、5-FU 投与後の野生型造血幹細胞では骨髄再構築能の減弱およびミエロイド優位な血球分化という老化様の表現系を示したが、*Mlkl* $^{-/-}$ マウスではそれらが有意に改善していた（図 2d、e）。すなわち、5-FU によって誘導される造血幹細胞の老化様表現系が、MLKL の欠損で抑制されることが明らかとなった。

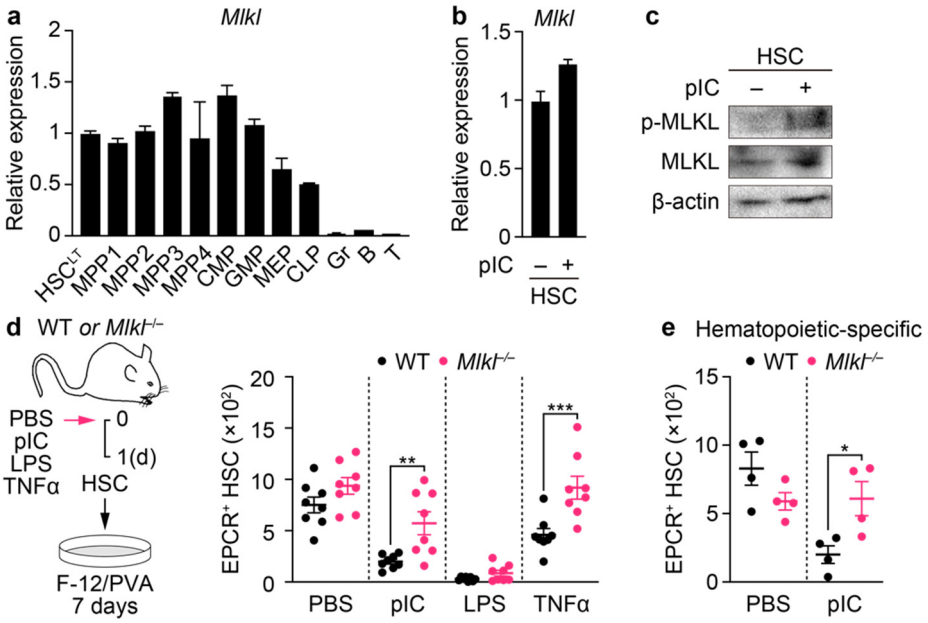


図 1. MLKL は炎症刺激によって活性化し造血幹細胞の増殖能を抑制する

a) 定量 RT-PCR を用いたマウス造血細胞における MLKL mRNA の発現量。未分化な造血細胞で発現が高く、成熟細胞ではほぼ発現が認められなかった。

b) 定量 RT-PCR を用いた poly I:C 1 回投与前後のマウス造血幹細胞における MLKL mRNA の発現量評価。poly I:C 投与後に MLKL の発現量が増加していた。

c) Western blotting を用いたマウス造血幹細胞での MLKL および p-MLKL タンパク量の評価。poly I:C 投与によって活性型である p-MLKL が造血幹細胞で増加していた。

d) 各種炎症リガンド 1 回投与後の造血幹細胞の *in vitro* 増殖アッセイ。poly I:C および TNF-α 投与後で認める造血幹細胞の増殖能低下は MLKL 欠損によって改善した。

e) poly I:C 反復投与後の造血細胞特異的 *Mlkl* $^{-/-}$ マウスより採取した造血幹細胞の *in vitro* 増殖アッセイ。poly I:C 投与後における造血幹細胞の増殖能低下には造血細胞側の MLKL が関与することが示唆された。

* $P<0.05$、** $P<0.01$、*** $P<0.001$（Student's t-test）（d、e）。

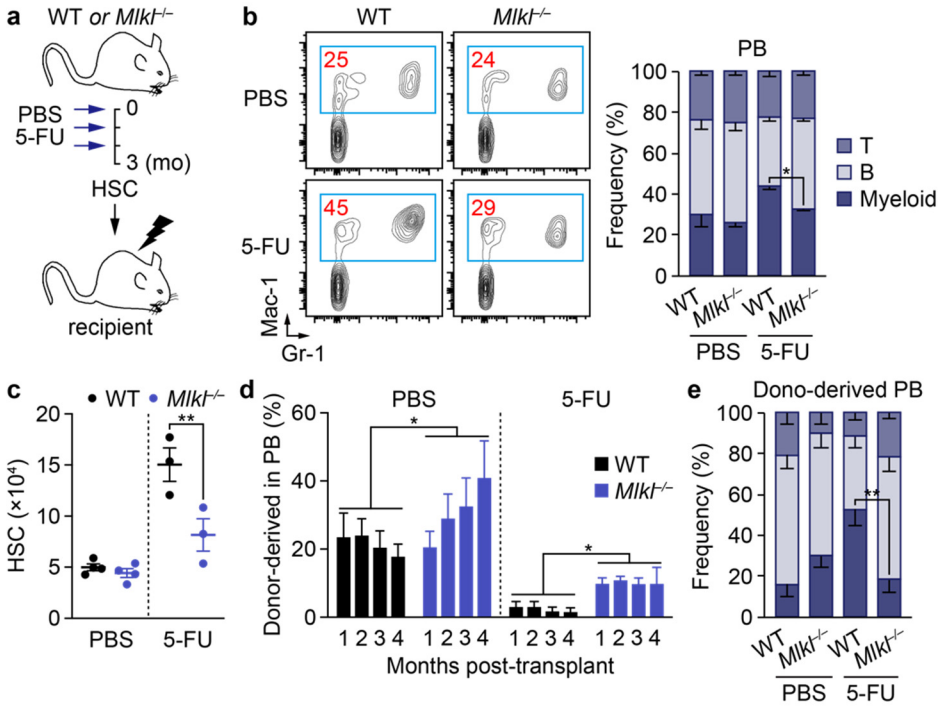


図 2. MLKL は造血老化モデルにおいて造血幹細胞の機能低下を促進する

a）5-FU 連続投与を用いた造血老化モデル実験の概略。

b）造血老化モデルにおける末梢血ミエロイド細胞の割合の評価。代表的なフローサイトメトリーパターン（左）およびミエロイド、B 細胞および T 細胞の割合（右）。5-FU 連続投与によって誘発されるミエロイド優位な造血が MLKL 欠損で緩和された。

c）造血老化モデルにおける骨髄造血幹細胞の絶対数。5-FU 連続投与後に誘導される見かけの造血幹細胞数の増加が MLKL 欠損で緩和された。

d）造血老化モデルマウスより採取した造血幹細胞を同数移植した際のレシピエントにおける末梢血ドナー由来細胞割合の推移。5-FU 連続投与によって誘発される造血幹細胞の生着能低下が MLKL 欠損によって緩和された。

e）造血老化モデル造血幹細胞移植後 4 ヶ月時点での末梢血ドナー由来細胞におけるミエロイド、B 細胞および T 細胞の割合。5-FU 連続投与によって誘発される造血幹細胞のミエロイドバイアスが MLKL 欠損によって緩和された。

* $P<0.05$、** $P<0.01$（one-way ANOVA）（c、d）。

考　察

本研究により、MLKL が炎症刺激に伴う造血幹細胞の機能抑制に重要な役割を担い、造血幹細胞の老化様表現系を促進することが明らかとなった。poly I:C の *in vivo* 投与は I 型インターフェロンを介して造血幹細胞の機能を抑制することが知られているが［5］、造血幹細胞における MLKL の活性化がその作用の少なくとも一部を担うことを筆者らの結果は示唆している。ネクロプトーシスは通常、アポトーシス実行因子であるカスパーゼが抑制された時に活性化する［2］。造血幹細胞では何らかの内因性因子によってカスパーゼが抑制されていることが知られており［6］、このため MLKL はカスパーゼ阻害剤なしに造血幹細胞で活性化できると考えられる。筆者らは造血幹細胞レベルでの細胞死が造血器腫瘍の発症予防に重要であることを報告しており［7］、造血幹細胞が MLKL を利用して悪性化を防いでいる可能性が考えられる。また、活性化した MLKL は細胞膜へと移行し、チャネル様の「穴」を形成することによって

ネクローシス様の細胞死を引き起こすが、MLKL の持つ細胞死以外の機能も最近注目されている［8］。従って、本研究でみられた造血幹細胞の機能低下が自身の細胞死によるものか、あるいは MLKL が持つ細胞死以外の機能によるものかについては今後更なる検証が必要であろう。インターフェロン応答は TNF-α応答とともに老齢マウス造血幹細胞において有意に増加する遺伝子シグネチャーの一つである。筆者らは TNF-α暴露後の造血幹細胞が MLKL を介して機能低下に至ることを見出しており［9］、加齢に伴う炎症刺激が MLKL を介して造血幹細胞の加齢性変化を促進する可能性が示唆される。今後、実際に加齢した造血幹細胞における MLKL の役割が明らかになれば、MLKL の活性化を標的とした造血老化の「若返り」の道が開けると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター幹細胞分子医学分野の岩間厚志教授、大学院生の楊金晶さんである。また、*Mlkl* $^{-/-}$ マウスをご供与いただいたケルン大学遺伝学研究所の Prof. Manolis Pasparakis、本研究を進めるにあたりご協力いただいた東邦大学の中野裕康教授、村井晋助教にこの場を借りて感謝申し上げたい。

文　献

1) Adam C Wilkinson, Reiko Ishida, Misako Kikuchi, Kazuhiro Sudo, Maiko Morita, Ralph Valentine Crisostomo , Ryo Yamamoto, Kyle M Loh, Yukio Nakamura, Motoo Watanabe, Hiromitsu Nakauchi, Satoshi Yamazaki. Long-term ex vivo haematopoietic-stem-cell expansion allows nonconditioned transplantation. Nature. 2019 Jul;571(7763):117-121. Epub 2019 May 29. PMID: 31142833　DOI: 10.1038/s41586-019-1244-x

2) Ricardo Weinlich, Andrew Oberst, Helen M Beere, Douglas R Green. Necroptosis in development, inflammation and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2017 Feb;18(2):127-136. Epub 2016 Dec 21. PMID: 27999438 DOI: 10.1038/nrm.2016.149

3) James M Murphy, Peter E Czabotar, Joanne M Hildebrand, Isabelle S Lucet, Jian-Guo Zhang, Silvia Alvarez-Diaz, Rowena Lewis, Najoua Lalaoui, Donald Metcalf, Andrew I Webb, Samuel N Young, Leila N Varghese, Gillian M Tannahill, Esme C Hatchell, Ian J Majewski, Toru Okamoto, Renwick C J Dobson, Douglas J Hilton, Jeffrey J Babon, Nicos A Nicola, Andreas Strasser, John Silke, Warren S Alexander. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. Immunity. 2013 Sep 19;39(3):443-53. Epub 2013 Sep 5. PMID: 24012422 DOI: 10.1016/j.immuni.2013.06.018

4) Isabel Beerman, Christoph Bock, Brian S Garrison, Zachary D Smith, Hongcang Gu, Alexander Meissner, Derrick J Rossi. Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. Cell Stem Cell. 2013 Apr 4;12(4):413-25. Epub 2013 Feb 14. PMID: 23415915 DOI: 10.1016/j.stem.2013.01.017

5) Marieke A G Essers, Sandra Offner, William E Blanco-Bose, Zoe Waibler, Ulrich Kalinke, Michel A Duchosal, Andreas Trumpp. Nature. 2009 Apr 16;458(7240):904-8. Epub 2009 Feb 11. PMID: 19212321 DOI: 10.1038/nature07815

6) Mary Mohrin, Emer Bourke, David Alexander, Matthew R Warr, Keegan Barry-Holson, Michelle M Le Beau, Ciaran G Morrison, Emmanuelle Passegué. Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. Cell Stem Cell. 2010 Aug 6;7(2):174-85. Epub 2010 Jul 8. PMID: 20619762 DOI: 10.1016/j.stem.2010.06.014

7) Masayuki Yamashita, Eriko Nitta, Toshio Suda. Aspp1 Preserves Hematopoietic Stem Cell Pool Integrity and Prevents Malignant Transformation. Cell Stem Cell. 2015 Jul 2;17(1):23-34. Epub 2015 Jun 25. PMID: 26119234 DOI: 10.1016/j.stem.2015.05.013

8) Seongmin Yoon, Andrew Kovalenko, Konstantin Bogdanov, David Wallach. MLKL, the Protein that Mediates Necroptosis, Also Regulates Endosomal Trafficking and Extracellular Vesicle Generation. Immunity. 2017 Jul 18;47(1):51-65.e7. Epub 2017 Jun 27. PMID: 28666573 DOI: 10.1016/j.immuni.2017.06.001

9) Masayuki Yamashita, Emmanuelle Passegué. TNF-α Coordinates Hematopoietic Stem Cell Survival and Myeloid Regeneration. Cell Stem Cell. 2019 Sep 5;25(3):357-372.e7. Epub 2019 Jun 20. PMID: 31230859 DOI: 10.1016/j.stem.2019.05.019