

研究報告書

「組織修復における幹細胞-免疫システム関連機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 佐藤 卓

1. 研究のねらい

組織幹細胞は、生体組織の恒常性維持や損傷時の再生を司る重要な細胞であるため、その数や機能は個体の生涯にわたり厳密に保たれている。免疫系は、様々な病原体の感染から個体を保護するために必須のシステムであるが、その一方、最近免疫系に重要ないくつかのサイトカインやケモカインが、老化に伴って生じる組織幹細胞の機能低下に深く関わっていることが報告された(Nature. 2011,477:90.)。この事実は、生体防御の要である免疫因子が、実は組織幹細胞にとっては重大な「ストレス因子」であることを示唆している。従って、「免疫系」と「組織幹細胞システム」が共存する生体内においては、組織幹細胞がこの免疫ストレスを適切に回避するメカニズムが存在するはずである。しかしながら、この点についてはこれまでにほとんど明らかにされていない。私は、この免疫ストレス因子の一つとして、生体の抗ウイルス応答に重要なサイトカインである「インターフェロン(IFN)」に着目し、その組織幹細胞機能への影響について検討してきた。IFN は、感染のない状態でも生体内でごく微量に分泌されており、これは病原体感染時に効果的な免疫系の活性化に働くことが知られている(Nat Rev Mol Cell Biol. 2001,2:378.)。これまでに私は、この IFN シグナルの負の制御因子である Interferon regulatory factor-2 (IRF-2)を欠損するマウス(Irf2^{-/-}マウス)では、血液の供給源である造血幹細胞の造血再構築能が破綻することを報告してきた(Nat Med. 2009, 15:696; Blood. 2013,121:3267)。Irf2^{-/-}マウスの造血幹細胞では IFN シグナルが過剰となった結果、幹細胞性維持に必要な休止状態を保てなくなることが原因で幹細胞枯渇が生じていた。このように、IFN は造血幹細胞機能に影響を与える免疫ストレスの一つであり、造血幹細胞が IRF2 を介して IFN シグナルを適切に制御することが幹細胞性の維持には必須であると言える。そこで、これらの知見を踏まえ、本研究では、様々な組織幹細胞が持つ免疫ストレス回避機構について明らかにし、その破綻が組織恒常性維持や疾患発症にどのように関わるかを検討することを目的とした。

2. 研究成果

(1)概要

造血幹細胞にとって、生理レベルの IFN の作用は機能破綻を引き起こす重大な細胞ストレスである(Nat Med. 2009, 15:696; Blood. 2013,121:3267)。本研究では腸上皮幹細胞機能に与えるこの生理的 IFN ストレスの影響を Irf2^{-/-}マウスを用いて検討した。腸上皮幹細胞は、成体マウス腸陰窩底部に局在し、Lgr5 遺伝子を発現する細胞として検出される。Irf2^{-/-}マウスでは、同幹細胞がコントロールマウスに比べ 1/10にまで減少し、組織を再構築する幹細胞ポテンシャルも著しく低下していた。また、腸上皮細胞特異的 Irf2 欠損マウスの解析から IRF2 が腸上皮幹細胞にイントリンジックに働く、幹細胞性維持に必須の分子であることが判明し

た。さらに、網羅的遺伝子発現解析データから、IRF2 が失われることで幹細胞が前駆細胞様の遺伝子発現パターンを示すことが分かり、幹細胞機能低下の原因が幹細胞に異常分化が生じた結果であると考えられた。一方、マウスに IFN の誘導剤である poly(I:C) を少量ずつ繰り返し投与することで、IFN の作用を慢性的に受けた腸上皮幹細胞では、Irf2^{-/-}マウスの場合同様、著しい幹細胞性の低下が生じ、同時に異常分化の表現形を示した。以上の結果から、慢性的な IFN シグナルは確かに腸上皮幹細胞機能を低下させる免疫ストレスであり、おそらく IRF2 はこのようなストレスから腸上皮幹細胞を保護し、生涯それらの数と質を保つために働く重要な分子と考えられる。また、IRF2 は、IFN 誘導性の幹細胞機能低下を引き起こす分子の発現を恒常的に制御している可能性が想定されるため、現在その転写制御機構の詳細をエピゲノム解析によって検討中である。本研究をとおして、組織幹細胞維持における免疫ストレス調節機構の一端を明らかにできたが、炎症や免疫因子及びそれらがもたらす細胞内シグナルは多岐にわたることから、同様の調節機構は他にも存在すると考えられる。

(2) 詳細

研究テーマ A: 「Irf2 欠損マウスに認められる腸幹細胞減少メカニズムの解明」

生理的な IFN シグナルは組織幹細胞の幹細胞性低下をもたらす「免疫ストレス」の一つであり、これはおそらく造血幹細胞に限った現象ではなく、各組織の組織幹細胞に共通の作用が想定される。本研究では腸上皮幹細胞機能に与える生理的 IFN ストレスの影響を Irf2^{-/-}マウスを用いて検討した。腸上皮幹細胞は、幹細胞マーカーである Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5) 遺伝子を発現しており、またこの遺伝子をタグにした腸上皮幹細胞レポーターマウス (Lgr5-GFP-Ires-CreERT2 マウス) が利用可能である。Irf2^{-/-}マウスを背景とし、腸上皮幹細胞を可視化するマウスを作成し、同細胞分画の数を検討したところ、Irf2^{-/-}マウスではこれがコントロールマウスの 1/10 程度にまで減少していた。また、同レポーターマウスから幹細胞を精製しオルガノイド培養によりその幹細胞ポテンシャルを検討したところ、これも著しく低下していた。即ち、Irf2^{-/-}マウスでは、腸上皮幹細胞の数及び質のいずれもが減少、低下していると言える。また、本研究では独自に Irf2-fox マウスを作製し、腸上皮細胞特異的に Irf2 を欠損するマウスを樹立した。これらのマウスにおいても、トータルノックアウトマウスと同様の腸上皮幹細胞異常を認めたことから、IRF2 が腸上皮幹細胞にイントリンジックに働く、幹細胞性維持に必須の分子であることが判明した。また、これを反映し、Irf2^{-/-}マウスでは、小腸、大腸ともに腸上皮組織損傷後の再生が破綻していた (図 1)。このような Irf2^{-/-}マウスの幹細胞機能低下の原因に関連し、網羅的遺伝子発現解析から Irf2^{-/-}マウスの腸上皮幹細胞では、コントロールマウスの同細胞に比べ腸上皮幹細胞特異的遺伝子群の発現が有意に低下し、一方でより分化の進んだ前駆細胞遺伝子の発現が亢進していたことから、IRF2 が失われることで幹細胞が前駆細胞様に異常分化していることが考えられた (図 2)。

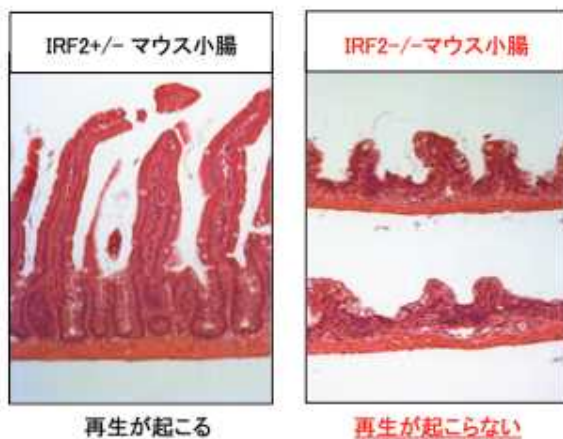


図1. IRF2^{-/-}マウスでは、腸上皮損傷後の再生が起こらない。図は抗がん剤 5フルオロウラシル投与によって破壊された腸上皮組織の再生後の様子。

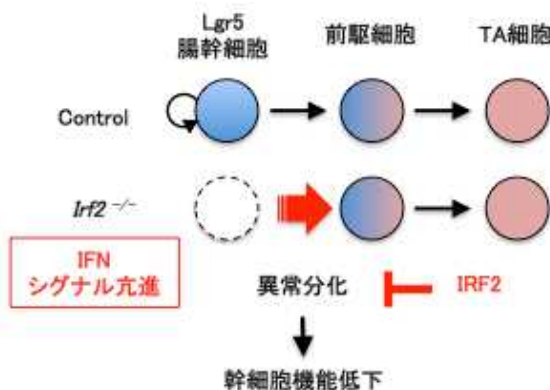


図2. IRF2^{-/-}マウスの腸上皮幹細胞に認められる異常分化 (本文参照)

そこで、IFN シグナルそのものが、腸上皮幹細胞機能低下をもたらすかを確認するために、IFN の誘導剤である poly(I:C) を、それぞれコントロール腸上皮幹細胞レポーターマウス及び IFN の作用しない IFN 受容体欠損 (Ifnar1^{-/-}) レポーターマウスに少量ずつ繰り返し投与し、IFN の作用を慢性的に受けた腸上皮幹細胞の幹細胞ポテンシャルについて検討した。その結果、予想された通り、IFN の作用は腸上皮幹細胞のオルガノド形成能を有意に低下させた。また、遺伝子発現解析から、Irf2^{-/-}マウスの場合同様、IFN の作用を受けた腸上皮幹細胞では腸上皮幹細胞特異的遺伝子群の発現低下と前駆細胞遺伝子の発現亢進が認められた。以上の結果から、慢性的な IFN シグナルは確かに腸上皮幹細胞機能を低下させる免疫ストレスであり、IRF2 はこのようなストレスから腸上皮幹細胞を保護し、長期にそれらの数と質を保つために働く重要な分子と考えられる。また、Irf2^{-/-}マウスの腸上皮幹細胞と、IFN

の作用を受けた同細胞で発現亢進する上位の遺伝子群は類似しており、データベース解析からこれらの多くは IFN 誘導性遺伝子であることを確認した。つまり、これらの遺伝子産物が両幹細胞の幹細胞機能低下に関わる直接の原因である可能性が高い。

これらの結果に基づけば、Irf2^{-/-}マウスの腸上皮幹細胞機能低下は、IFN シグナルを抑制することで回復すると考えられた。既知の細胞内 IFN シグナル経路は、I 型 IFN 受容体 (Ifnar1 遺伝子) と転写因子である STAT1 (Stat1 遺伝子) を同時に欠損することで完全に阻害されると考えられる (JAKSTAT. 2013;2:e27521.)。そこで、Irf2 と同時にこれらの遺伝子を欠損する三重欠損マウスを作製し、腸上皮幹細胞機能について解析した。しかしながら、このマウスの腸上皮幹細胞では、期待された IFN シグナルの抑制が認められず、よって当然のことながら腸上皮幹細胞機能も回復していなかった。この結果の要因としては、IRF2 が細胞外からの IFN シグナルに依存しないユニークな IFN 誘導性遺伝子の発現制御機能を担っている可能性を想定している。つまり、IRF2 が転写阻害因子として恒常的にゲノム上に会合し、幹細胞性を低下させるこれらの IFN 誘導性遺伝子発現を抑制している可能性が考えられる。IRF2 がどのように幹細胞維持に関わるかを明らかにする上では、同転写因子による恒常的な転写制御機構を明らかにする必要がある。

3. 今後の展開

研究テーマA:「Irf2 欠損マウスに認められる腸幹細胞減少メカニズムの解明」

IRF2 が定常時にも核内に発現局在する転写因子であることから、恒常的に幹細胞機能維持に影響を及ぼす遺伝子群(特に IFN 誘導性遺伝子)の転写制御に関わっている可能性が示唆される。現在、腸上皮幹細胞を対象とし IRF2 を標的とした Chip-シーケンスを行っており、得られたデータを遺伝子発現データと統合することでこの点を明らかにする。このメカニズムが明らかになれば、既に報告した造血幹細胞の結果と合わせ、免疫ストレスの調節が組織幹細胞維持に必須であるという概念を強く提唱できる。本研究については、さきがけ研究期間内に論文化の計画である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本さきがけ研究では、免疫系と組織幹細胞のシステム間の関係について研究を遂行してきた。研究期間内には、組織幹細胞が免疫・炎症因子の作用によって機能低下や異常を引き起こすことを裏付ける現象を新たに捉えることができ、この点では良かったが、いずれの研究も 2017 年 1 月時点で論文化に至っておらず、この点で到達目標に達しなかった。これについては、引き続き 2017 年 3 月までの論文化を目指す。研究体制は、必ずしも十分であったとは言いが、一方、予算の用途については、顕微鏡の購入や高額を受託解析に活用でき、研究の効率化を測ることができた。また、本研究では、組織幹細胞が定常的にどのような生体内環境ストレスにさらされているのか？また、それらにどのように対応し、幹細胞らしさを長期に保つのか？という、幹細胞生物学領域においてこれまでに明らかにされていないが重要な疑問について、その仕組みの一端を明らかにできた。今後、この新たな視点から組織幹細胞の生態の理解がさらに深まると考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、組織幹細胞が免疫ストレスによる機能低下を回避するメカニズムを解明することを目指した。その結果、免疫系のサイトカインであるインターフェロンが組織幹細胞である腸幹細胞の増殖を抑制していることを、インターフェロンシグナル制御因子(IRF-2)の欠損マウスあるいはインターフェロン誘導剤などを用いて、マウス腸管および腸上皮幹細胞のオルガノドにおいて確認している。さらに、種々の組織幹細胞に対するサイトカインの作用についての研究が行われ、その成果の発展にも期待される。このように様々な組織幹細胞が持つサイトカインやケモカインなどの免疫ストレスからの回避機構について明らかにすることにより、その破綻が組織恒常性維持や疾患発症にどのように関わるかを明らかにしていくことに繋がって行くと考えられる。

残念ながら、本さきがけ研究期間中に成果を論文にまとめることが出来なかったが、近い内に論文として発表することが見込まれ、今後の活躍が十分に期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

該当無し

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

該当無し