

## 論文の内容の要旨

論文題目 細菌由来 cyclic-di-GMP が造血幹細胞と造血微小環境に与える影響の解析

小林 央

造血幹細胞 (Hematopoietic stem cell, HSC) は自己複製能と多分化能を有し、骨髄において生涯にわたって個体の造血を維持する<sup>1</sup>。HSCは定常状態では細胞周期が大部分静止期に維持されている一方、細胞傷害性因子、放射線照射、感染ストレスといった刺激に応答して再び細胞周期に入り、分化した血球細胞を産生する。細菌、ウイルス、真菌といった外来の病原体が全身性の感染を起こすと末梢の免疫細胞は速やかに消費されるため十分な数の白血球産生が必要となる。造血幹・前駆細胞

(Hematopoietic stem progenitor cell, HSPC) は末梢の免疫細胞を供給するのに重要な役割を果たしているが、感染ストレスに対する HSPC がどのように応答するかについては十分に解明されているとは言えない。本研究において私は、真正細菌のセカンドメッセンジャーである bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (cyclic-di-GMP, 以下 c-di-GMP) が HSPC の増殖を制御する可能性について検討した。c-di-GMP は STING に結合することで下流にシグナルを伝えることが知られている。

c-di-GMP/STING シグナル経路が細菌感染に対する宿主の防御機構として機能していることが推測されるが、その HSPC における役割はこれまで調べられていないことから、c-di-GMP の HSPC に対する役割を本研究において調べた。まず、HSPC が敗血症状態においてどのように振る舞うのか調べるためにマウスを用いて盲腸結紮穿孔モデルを作成し、腹腔内細菌感染症を再現した。その結果、HSPC は全身感染症に対して応答し、細胞増殖を誘導して骨髄の多能性幹細胞 (MPP) 分画を増加させる一方、代償的に HSC は減少させた。続いて、細菌の構成要素の 1 つである c-di-GMP の効果を調べるために、純化した c-di-GMP をマウスに直接投与し、HSPC の応答を調べたところ、分化した血球細胞を減少させ、MPP 分画の代償的な増加を促す一方で HSC 分画については減少させた。この観察結果は CeLP で認められた HSPC 分画の動態とよく合致していた。次に私は c-di-GMP が HSC の機能に与える影響について競合的骨髄再構築能を用いて解析したところ、c-di-GMP によって HSC の骨髄再構築能が低下していることが確認された。それは HSC の細胞周期の亢進を伴っており、それにより HSPC 全体の細胞数の増加に寄与していることが明らかとなった。さらに c-di-GMP による HSPC の変化を調べるために、

HSPC の遊走能の評価を行ったところ脾臓で、機能的な MPP 分画の増加が FACS 解析、脾細胞の移植実験より確認され、c-di-GMP は HSPC の遊走をも促すことを明らかにした。STING 欠損マウスを用いて上記の実験を繰り返したところ、c-di-GMP の HSPC への効果は完全に消失し、c-di-GMP の HSPC への作用は STING に完全に依存していることが確認された。その一方 Irf3 欠損マウスおよび Irf3/Irf7 欠損マウスを用いた実験から、STING の下流は部分的に Irf3/Irf7 に依存しているものの、HSC の減少および脾臓への遊走について特にこれらの分子が無関係であることが明らかとなり、これまで知られていた経路以外の活性化が c-di-GMP の HSPC への効果につながっていることが示唆された。次に c-di-GMP/STING シグナリングが造血幹細胞に細胞自律的に影響するのか非細胞自律的に影響するのか調べるため、STING 欠損マウス由来骨髄細胞で骨髄細胞を置き換えたマウス (STING KO キメラマウス) を用いたところ、骨髄の MPP 分画の増加について非造血細胞自律的な STING シグナルが必要な一方、HSC の減少と HSPC の脾臓への遊走には造血細胞自律的な STING が必要であることが示唆された。そこで、さらに造血細胞非自律的な HSPC の活性化経路を調べることにした。非細胞自律的な経路の代表として、骨髄微小環境が挙げられる。HSC はニッチと呼ばれる骨髄微小環境によって自己複製と分化のバランスが決定されることが知られているが、c-di-GMP により骨髄中の PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> CD51<sup>+</sup> 間葉系幹細胞 (MSC)、血管内皮細胞を始めとする各種ニッチ細胞が著減した。さらに、KitL, CXCL12, アンジオポエチン 1 (Angpt1) および VCAM-1 といった各種 HSC 支持因子の発現の変化を、特に HSC の維持に重要と考えられている MSC および血管内皮細胞について調べたところ、いずれの発現も c-di-GMP 投与により減少しており、機能的にも骨髄ニッチは HSC 非支持的になり HSPC の遊走および HSC の分化を促していると考えられた。このほか、全身性に G-CSF の血清濃度が上昇しており、このようなサイトカインも c-di-GMP の HSPC への効果に影響を与えていると考えられた。以上述べた通り、本研究において私は c-di-GMP は HSPC の増殖、遊走および骨髄微小環境の変化を協調して引き起こすことを見出した。c-di-GMP およびその下流シグナルの研究は感染における病態生理と HSPC のダイナミクスとの関係を結びつける上で重要な意味を持つことになるだろう。