

抗酸化システム破綻による血液老化機構の解明

井上大地

大阪大学大学院医学系研究科 病理学講座がん病理学教室

【研究の背景】

加齢に伴う造血機能の変化、特に造血幹細胞(HSC)の機能不全は、血液老化の根幹を成す重要な医学的課題である。具体的には、加齢に伴い骨髄系細胞への分化偏向(myeloid skewing)、Bリンパ球に代表されるリンパ球の減少(B lymphocytopenia)、貧血、そしてHSC自体の再生能力(自己複製能)の低下が顕著となる。これらの血液老化現象の背景にある分子メカニズムとして、活性酸素種(ROS)の蓄積が長らく指摘されてきた。特に、老化HSC集団においてROSが蓄積した細胞群が増加すること、そしてこのROS high HSCが移植実験において再生能力の低下やリンパ球減少、骨髄系偏向といった老化様の表現型を再現することが報告されている。ROSは脂質、タンパク質、DNAに酸化的損傷を与え、細胞機能を破綻させる。特に近年、ROSによる脂質の過酸化(lipid peroxidation)が蓄積し、これが鉄依存的なプログラム細胞死である「フェロトーシス」を引き起こす機序が注目されている。本研究課題の核心は、このROS蓄積の上流、すなわち「抗酸化システム」の機能不全にある。セレン(セレンウム)は必須微量元素であり、セレンシステイン(Sec)の形で20種類以上の「セレンプロテイン(含セレンタンパク質)」と呼ばれる抗酸化酵素群の活性中心を構成する。これらセレンプロテインは、細胞のレドックスバランス(酸化還元平衡)維持に必須の役割を担う。代表的なセレンプロテインであるグルタチオンペルオキシダーゼ4(GPX4)は、脂質過酸化物を直接還元し、フェロトーシスを強力に抑制するマスター制御因子として知られる。血液老化におけるROSと脂質過酸化の関与は示唆されていたものの、その上流にあるセレンプロテイン・ネットワーク全体の機能破綻が血液老化の直接的な原因となりうるかは不明であった。我々は、老化ヒトHSCにおいて、GPX4を含む主要な抗酸化セレンプロテイン群のmRNA発現が、若年者HSCと比較して有意に低下しているという重要な知見を得た。これらを元に、抗酸化システムの破綻が、老化HSCにおける脂質過酸化の蓄積とそれに続く血液老化形質の誘導に直結しているのではないかという仮説の立案に至った。

【目 的】

本研究の目的は、研究背景で得られた「加齢に伴うセレンプロテイン発現の低下(抗酸化システムの破綻)」が、血液老化(HSC機能不全、Bリンパ球減少、骨髄系偏向)の直接的な原因であるという仮説を証明することにある。この目的を達成するため、セレンプロテインの合成に必須であるセレンシステインtRNAをコードする*Trsp*遺伝子に着目した。*Trsp*遺伝子の条件付きノックアウト(KO)マウス(すなわち、セレンプロテイン合成不全モデル)を作製・解析し、抗酸化システムの破綻が造血系に与える影響について、以下の4点を検証することを目的とした。

- 1) **HSC機能とB細胞分化への影響解明:** *Trsp* KOによるセレンプロテイン合成不全が、造血幹細胞(HSC)の幹細胞性(自己複製能)およびBリンパ球の分化・成熟に与える影響の網羅的解明。
- 2) **老化表現型との比較検証:** *Trsp* KOマウスが示す血液系表現型が、生理的な加齢マウスが示すHSC機能低下、B細胞減少、フェロトーシス脆弱性といった老化表現型を忠実に再現するかどうかの検証。
- 3) **分子機序の解明:** *Trsp* KOによって誘導される表現型が、脂質過酸化の蓄積とそれに続くフェロトーシスによって駆動されるかどうかの機序的解明。
- 4) **可逆性の検証:** フェロトーシス阻害剤(ビタミンEなど)による薬理的・食事的介入が、*Trsp* KOモデルおよび老化マウスの血液系表現型を改善・回復させるかどうかの検証。

【方 法】

本研究目的の達成のため、以下の実験手法を駆使した。

1. セレノプロテイン合成不全モデルの樹立:

セレンシステイン tRNA をコードする *Trsp* 遺伝子の両アレルに loxP 配列を挿入した *Trsp*^{lox/lox} マウスと、Cre リコンビナーゼ発現マウス (*Mx1-Cre* または R26-CreERT2) とを交配した。*Mx1-Cre* モデルでは pI-pC (ポリイノシン・ポリシチジル酸) 投与、R26-CreERT2 モデルではタモキシフェン投与により、時期誘導的に *Trsp* 遺伝子のノックアウト (KO) を実施した。*Trsp* KO による tRNA^{Sec} の枯渇、およびその結果としてのセレノプロテイン (GPX1/2、GPX4、SEPHS2 等) のタンパク質レベルでの発現消失を、Western Blot および質量分析 (LC-MS/MS) にて確認した。

2. 造血幹細胞 (HSC)・前駆細胞 (HSPC) の機能解析:

フローサイトメトリー (FACS) を用い、骨髄・脾臓・末梢血中の造血幹前駆細胞 HSPC 分画 (LT-HSC、ST-HSC、MPP2/3/4) および各系統の成熟細胞の網羅的解析を施行した。HSC の細胞周期 (静止期) の解析 (BrdU 取り込み、DAPI 染色による G0/G1、S、G2/M 期の定量) を行った。HSC の幹細胞性 (自己複製能) の厳密な評価のため、非競合的骨髄移植および、野生型 HSC (CD45.1⁺) と混合して移植する競合的骨髄移植を行い、さらに一次移植レシピエントの骨髄細胞を二次レシピエントへ移植する連続骨髄移植を実施した。

3. B 細胞分化段階の特異的解析:

FACS を用いて B 細胞分化ステージを同定 (Pre-pro-B, Pro-B, Pre-B, Immature B) した上で、B 細胞分化の機能的評価として、FACS 精製した Pre-B 細胞からのゲノム DNA 抽出と、免疫グロブリン重鎖 (Igh) V(D)J および軽鎖 (Igl) κ -J κ 遺伝子再構成の PCR による解析を行った。LSK 細胞の OP9 ストローマ細胞上での共培養と 4-OHT (*Trsp* KO 誘導) 添加による *in vitro* B 細胞分化アッセイを実施した。

4. 分子機序 (フェロトーシス) の検証:

脂質過酸化の特異的測定 (脂質過酸化プローブ: C11-BODIPY 581/591) および細胞質 ROS の測定 (CellROX プローブ) を用いた FACS 解析を行った。*Trsp* KO HSPC の *in vitro* 培養およびメチルセルロースコロニーアッセイ (M3434, M3630; StemCell Technologies) を行った。細胞死機序の同定のため、各種細胞死阻害剤 (フェロトーシス阻害剤: Ferostatin-1 (Fer-1)、 α -tocopherol (ビタミン E); アポトーシス阻害剤: Z-VAD; ネクロトーシス阻害剤: Nec-1s) の添加によるレスキュー実験を行った。*in vivo* での検証として、*Trsp* KO マウスへのビタミン E 欠乏食 (フェロトーシス増強) または高ビタミン E 食 (フェロトーシス抑制) の給餌、および造血系表現型の変動解析を実施した。

5. 網羅的遺伝子発現解析:

FACS 精製した HSPC (Lin⁻c-Kit⁺細胞) および B 細胞前駆細胞 (Pre-pro-B, Pre-B) を用いた Bulk RNA-seq 解析を行った。骨髄 Lin⁻c-Kit⁺細胞 (HSPC 全体) を用いた Single-cell RNA-seq (scRNA-seq) 解析を施行した。GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) による、NRF2 経路、老化 HSC シグネチャ、骨髄系・B 細胞系遺伝子セットなどのパスウェイ解析を行った。

6. 系統可塑性 (B-to-Myeloid Switch) の証明:

FACS 精製した *Trsp* KO マウスまたは生理的老化 WT マウスの Pro-B/Pre-B 細胞 (CD45.2⁺) を、レスキュー用の正常骨髄 (CD45.1⁺) と共に致死量放射線照射レシピエント (CD45.1⁺) へ移植した。移植後、レシピエント骨髄・末梢血におけるドナー (CD45.2⁺) 由来の骨髄系細胞 (CD11b⁺) の出現の有無を FACS で解析した。

【結 果】

1. *Trsp* KO マウスにおける血液老化様の基本表現型

Trsp KO マウス (pI-pC 処置後) は、セレノプロテイン (GPX1/2、GPX4 等) の顕著な発現低下と、それに伴う脂質過酸化物質 (4-HNE) の蓄積を確認した。表現型として、末梢血における B リンパ球の著明な減少 (B lymphocytopenia)、大球性貧血 (赤血球数減少、MCV 増加)、および脾腫 (代償的なストレス造血の亢進) を呈した。これらの表現型 (B 細胞減少、貧血) は、非競合的骨髄移植モデルにおいてもドナー HSC 由来細胞で再現され、HSC 内在的な (cell-autonomous) 異常であることを確認した。特に、高齢の *Trsp* KO マウス (81 週齢) において B 細胞の減少が加速し、対照群 (WT) と比較して相対的な骨髄系

細胞の割合増加(Myeloid skewing)が若年 KO マウスより顕著になること、すなわち老化と抗酸化システム破綻が協調して老化表現型を増悪させることを確認した。

2. HSC 幹細胞性の障害と細胞周期の異常

Trsp KO マウスの骨髄 HSPC 画分の解析の結果、長期 HSC (LT-HSC) の頻度に変化はないものの、短期 HSC (ST-HSC) が有意に増加していた。LT-HSC の細胞周期解析の結果、*Trsp* KO LT-HSC は、正常 HSC の根幹機能である G0/G1 期の静止状態から逸脱し、S 期および G2/M 期の細胞周期亢進を認めた。HSC の幹細胞性(自己複製能)を厳密に評価する競合的骨髄移植において、*Trsp* KO HSC は正常 HSC に対して顕著な競合的劣勢を示し、特に B 細胞 (B220⁺) および T 細胞 (CD3⁺) の産生が著しく低下した。さらに、連続骨髄移植において、*Trsp* KO 由来の HSPC および成熟血球(全系統)は、二次レシピエントにおいてほぼ完全に生着せず、長期自己複製能が枯渇していることを決定的に証明した。

3. HSPC における細胞死機序の同定(フェロトーシスの証明)

Trsp KO 骨髄細胞は、*in vitro* のメチルセルロース培養系において、骨髄系、赤芽球系、Pre-B 系のいずれのコロニーも形成する能力を完全に喪失していた。*Trsp* KO HSPC (Lin⁻細胞)の液層培養において、時間経過に伴って著明な細胞死と脂質過酸化(C11-BODIPY により評価)の亢進を確認した。この細胞死の機序を同定するため、各種細胞死阻害剤を用いた救済実験を実施した。その結果、アポトーシス阻害剤(Z-VAD)やネクロプトーシス阻害剤(Nec-1s)は、*Trsp* KO HSPC の細胞死を全く抑制できなかった。対照的に、フェロトーシス阻害剤である Ferrostatin-1 (Fer-1) および α -Tocopherol (ビタミン E) の添加によってのみ、用量依存的に細胞死が顕著に抑制され、生存率が回復した。さらに、Fer-1 および α -Tocopherol は、コロニー形成能も部分的に回復させた。これらの結果は、セレノプロテイン欠損による HSPC の細胞死の機序が、アポトーシスやネクロプトーシスではなく、特異的にフェロトーシスであることの強力な証拠と言える。

4. B 細胞分化における Pre-B 細胞段階での成熟ブロック

Trsp KO マウスにおける B 細胞減少の機序を解明するため、B 細胞分化ステージを詳細に解析した結果、分化の初期段階(Pre-pro-B, Pro-B)の頻度は正常であった。しかし、その直後の Pre-B 細胞および Immature B 細胞の割合が著しく減少しており、Pre-B 細胞への分化段階で重度の成熟ブロックが存在することを確認した。この成熟ブロックの機能的な裏付けとして、FACS 精製した *Trsp* KO Pre-B 細胞のゲノム DNA 解析の結果、B 細胞受容体の発現に必須である免疫グロブリン重鎖(Ig)の V(D)J 遺伝子再構成および軽鎖(Ig)の κ -J κ 再構成が著しく障害されていることが証明された。この B 細胞分化障害は、*Trsp* KO LSK 細胞を用いた *in vitro* B 細胞分化誘導系においても再現され、細胞内在的な(cell-autonomous)異常であることを再確認した。

5. B 細胞前駆細胞における系統可塑性(B-to-Myeloid Switch)

Trsp KO Pre-B 細胞における成熟障害の分子基盤を解明するため、RNA-seq 解析を実施。その結果、B 細胞分化に必須のマスター転写因子(*Pax5*, *Tcf3*, *Irf4* 等)の発現が軒並み著しく低下した。驚くべきことに、対照的に、骨髄系への分化を駆動する遺伝子群、特に骨髄系マスター転写因子である *Cebpa* の発現が、*Trsp* KO Pre-B 細胞において異所性に著しく亢進していた。この「B 細胞系譜における骨髄系遺伝子の異所性発現」が、単なる転写異常に留まらず、実際の細胞運命の転換(系統可塑性)を意味するかを検証するため、*Trsp* KO Pro-B/Pre-B 細胞を *in vivo* に移植する実験を実施した。その結果、移植された *Trsp* KO Pro-B/Pre-B 細胞は、B 細胞 (B220⁺) をほぼ産生しなかった一方、機能的な骨髄系細胞 (CD11b⁺) を有意に産生した。これは、セレノプロテインの欠損(抗酸化システムの破綻)が、B 細胞前駆細胞の運命を不安定化させ、骨髄系への系統転換(B-to-Myeloid Switch)を誘導するという、血液老化の全く新しいメカニズムの発見である。

6. 生理的老化と *Trsp* KO モデル(抗酸化システム破綻)の共通性

Trsp KO モデルが単なる人為的モデルではなく、生理的な老化のメカニズムを反映していることを検証した。第一に、RNA-seq の GSEA 解析において、*Trsp* KO HSPC および *Trsp* KO Pre-B 細胞の両方で、老化 HSC で発現が亢進する遺伝子群が有意に濃縮していた。*Trsp* KO モデルが転写レベルで老化 HSC のシグネチャを共有することの証明といえる。第二に、B 細胞における脂質過酸化の蓄積を認めた。*Trsp* KO B 細胞および Pre-B 細胞は、高齢マウスにおいて脂質過酸化(C11-BODIPY)の蓄積が若年マウスより顕著であり、老化と抗酸化システム破綻が脂質過酸化の面で協調すると考えられた。第三に、そして最も重要な点として、「B-to-Myeloid Switch」の検証を行った。生理的に老化させた野生型マウス(81 週齢)の Pro-B/Pre-B 細胞を移植したところ、*Trsp* KO 細胞と同様に、骨髄系細胞 (CD11b⁺) を産生する能力を獲得していることを確認した。これらの結果から、*Trsp* KO モデル(抗酸化システム破綻)が、HSC 機能低下、B 細胞成熟障害、脂質過酸化の蓄積(フェロトーシス脆弱性)、そして B-to-Myeloid Switch という複数の重要な特徴において、生理的な血液老化を忠実

に再現していることの強力なエビデンスを提示するものである。

7. フェロトーシス介入(ビタミン E)による表現型回復

Trsp KO モデルの老化様表現型が、フェロトーシスに依存することを *in vivo* で検証した。*Trsp* KO マウスにビタミン E 欠乏食(フェロトーシス増強)を給餌したところ、B 細胞減少、骨髄系細胞増加、赤芽球系異常が、通常食群に比べ有意に増悪した。逆に、高ビタミン E 食(フェロトーシス抑制)を給餌したところ、*Trsp* KO マウスの脾臓における B 細胞の頻度が有意に回復(レスキュー)した。さらに、高ビタミン E 食は、*Trsp* KO LT-HSC の異常な細胞周期の亢進(静止期からの逸脱)をも有意に抑制し、G0/G1 期に留まる細胞の割合を増加させた。これらの結果は、抗酸化システム破綻による血液老化様表現型が、*in vivo* においてフェロトーシスによって駆動されており、かつ、それが食事介入によって制御可能であることを示すものである。

【考 察】

本研究により、セレンプロテイン合成不全(*Trsp* KO)モデルが、HSC の幹細胞性維持と B 細胞の系統忠実性(lineage fidelity)の双方に不可欠であることが証明された。*Trsp* KO による抗酸化システムの破綻は、HSC の自己複製能低下(連続移植不全)、B 細胞分化障害(Pre-B ブロック)、そして B-to-Myeloid Switch(系統可塑性)といった、生理的な血液老化の核心的表現型を忠実に再現した。本研究の最大の成果は、これらの老化様表現型が、セレンプロテイン(特に GPX4 など)の欠損に伴う脂質過酸化の蓄積と、それに続くフェロトーシスへの脆弱性によって駆動されるという機序を解明した点にある。

特に、B 細胞系列(特に Pre-B 細胞)が、骨髄系細胞と比較して、この脂質過酸化ストレス(フェロトーシス)に対して著しく高い感受性を持つこと、これが *Trsp* KO および老化において骨髄系偏向と B 細胞減少が同時に起こる「系統特異性」のメカニズムである可能性を提示する結果となった。さらに、血液老化における「骨髄系偏向」と「リンパ球減少」の機序として、HSC の分化指向性の変化のみならず、B 細胞前駆細胞が骨髄系細胞へと運命転換(lineage switch)するという、これまで知られていなかったメカニズムの発見が挙げられる。*Trsp* KO(および老化)Pre-B 細胞における脂質過酸化ストレスが、B 細胞系譜の維持に必要な *Pax5* 等の発現を抑制し、同時に骨髄系転写因子 *Cebpa* の異所性発現を誘導するという、転写プログラムの根本的な書き換え(リプログラミング)を引き起こすことを示唆している。*Trsp* KO HSPC においては、代償的な抗酸化応答経路(NRF2)が活性化していた。しかし、この NRF2 による代償応答は、セレンプロテイン(特に GPX4)の脂質過酸化を直接消去する機能を代替できず、フェロトーシスを防ぐには不十分であった。生理的老化においても NRF2 の応答性自体が低下することが知られており、加齢と抗酸化システム破綻が組み合わさることで、NRF2 の代償機構が破綻し、フェロトーシスが顕在化することで老化表現型が加速する可能性も考えられる。以上、本研究は、「セレンプロテインによる抗酸化システムの破綻」と「血液老化の主要表現型(HSC 枯渇、B 細胞減少、系統転換)」とを、フェロトーシスという具体的な分子機序で初めて直結させた点に、独自性を有するものである。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究成果は、血液老化の機序解明と、その予防・治療法開発に大きく貢献するものである。第一に、加齢に伴う HSC 機能低下、B 細胞減少(免疫老化)、骨髄系偏向(炎症性疾患や MDS/AML のリスク)といった多様な血液老化の共通基盤として、脂質過酸化とフェロトーシスを同定したことの基礎医学的意義は極めて大きい。第二に、本研究の *Trsp* KO モデル(老化様モデル)において、フェロトーシス阻害剤であるビタミン E の *in vivo* 投与が、B 細胞減少や HSC 細胞周期異常といった老化様表現型を有意に改善したという実証結果は、臨床応用への強い根拠となる。これにより、ビタミン E(α -Tocopherol)やその他の安全な抗酸化剤(フェロトーシス阻害剤)を用いた食事介入や治療的介入が、ヒトにおける加齢に伴う血液系疾患(造血不全、易感染性、骨髄系腫瘍の発症リスク)の予防法または治療法となりうる可能性を具体的に提示した。本研究成果は、セレン摂取の重要性の再認識を促すと同時に、フェロトーシスを標的とした抗血液老化という新しい治療戦略開発の基盤となることが期待される。

【参考・引用文献】

Aoyama Y, Yamazaki H, Nishimura K, Nomura M, Shigehiro T, Suzuki T, Zang W, Tatara Y, Ito H, Hayashi Y, Koike Y, Fukumoto M, Tanaka A, Zhang Y, Saika W, Hasegawa C, Kasai S, Kong Y, Minakuchi Y, Itoh K, Yamamoto M, Toyokuni S, Toyoda A, Ikawa T, Takaori-Kondo A, **Inoue D**. Selenoprotein-mediated redox regulation shapes the cell fate of HSCs and mature lineages. *Blood*. 2025 Mar 13;145(11):1149-1163.