

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04859

研究課題名(和文) 幹細胞ニッチの機能破綻による発癌機構の解明

研究課題名(英文) Roles of functionally disrupted niches on hematological malignancy

研究代表者

国崎 祐哉 (Kunisaki, Yuya)

九州大学・病院・講師

研究者番号：80737099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎生期肝臓においてportal vesselsとその周囲の間葉系幹前駆細胞がニッチを形成していることを明らかにした。また、マウス成体にて細動脈ニッチ、骨髓洞ニッチから造血幹細胞の維持に必須と報告されているサイトカインであるCXCL12を特異的に欠損させるマウスモデルを作成、同じサイトカインでも欠損させる細胞によって造血幹細胞に与える影響が異なっていることを見出し、ニッチの骨髓内局在の重要性を示唆する結果が得られた。幹細胞の静止状態と増殖が異なる環境により支持されている、すなわち癌を特異的に支持する骨髓環境の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study report that selected microenvironment exists and highlights the possibility of heterogeneity among mesenchymal niche cells. Recently, cellular heterogeneity within a tumor has been highlighted and among aggressively proliferating tumor cells, a small fraction is found in quiescent status, causing refractoriness to anti-cancer therapy and relapsed diseases. Even in cancer cells that appear to proliferate in an unlimited manner, environmental cues are believed to control their cell cycle status, quiescence or proliferation. Therefore, "decision" whether symmetric or asymmetric division is essential for leukemia to survive. The anatomical and functional interactions between hematopoietic cells or leukemia and their microenvironments are essential to efficiently control normal and pathological hematopoiesis. This study suggests that identification of the niches may add new concept as "anti-cancer niche" to cancer therapy.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞 白血病幹細胞 間葉系幹細胞 造血微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞の機能は、微小環境 (ニッチ) からの特異的なシグナルによって、厳格な制御を受けている。細胞分裂周期の制御に関わる遺伝子欠損マウスモデルを用いた研究結果より、無秩序な増殖は、造血幹細胞の枯渇を引き起こすと考えられている (Orford and Scadden, *Nat Rev Genet* 2008)。細胞周期静止状態は、幹細胞を外部的ストレス刺激から保守するために重要な特徴の一つであり、腫瘍化を引き起こす可能性のある遺伝子変異の獲得を回避する手段であるとも、考えられている (Lobo et al. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007)。これまでの多くの研究により、様々な種類の細胞が、造血幹細胞ニッチ構成細胞として、同定されている。初期の報告では、造血幹細胞は、骨内膜下に多く認められることより、骨芽細胞が造血幹細胞ニッチであると考えられていた (骨芽細胞性ニッチ) (Arai et al. *Cell* 2004, Zhang et al. *Nature* 2003)。一方、他の研究においては、造血幹細胞は、骨髄血管 (骨髄洞) 周囲に多く認められると報告され、また、CXCL12-abundant reticular (CAR) 細胞、ネスチン陽性間葉系幹細胞、レプチン受容体陽性細胞など血管周囲の間質細胞の重要性も示唆されている (血管性ニッチ) (Kiel et al. *Cell* 2005, Sugiyama et al. *Immunity* 2006, Mendez-Ferrer et al. *Nature* 2010, Ding et al. *Nature* 2012)。これらの研究結果より、我々の造血幹細胞機能制御における理解は、飛躍的な発展を遂げているものの、それぞれの異なるニッチが、どのように造血幹細胞の機能を制御しているかは、不明であった。骨髄ニッチの構造と造血幹細胞との関連を解析した先駆的な研究は、マウスの頭蓋骨骨髄を可視化する intravital microscopy によるものであった (Sipkins et al. *Nature* 2005)。この技術は、マウス生体内で、骨髄の構造と血液細胞の動きを 3 次元的に real time で観察することのできる画期的なものである。しかしながら、観察する細胞を採取、体外で蛍光標識し、再び移植しなければならず、厳密な意味で生理的条件下ではなく、また、頭蓋骨髄では、その解剖学的な近接性から、血管性ニッチと骨芽細胞性ニッチを十分に空間的にわけて観察することが、困難であった。また、従来行われていた数ミクロンの厚みしかない骨髄スライド切片では、造血幹細胞と骨髄構造の位置関係を 3 次元的に解析することは困難である。これらの問題点を解決し、骨髄間質の構造と造血幹細胞の分布をより詳細に解析するために、共焦点顕微鏡を用いた骨髄の 3 次元イメージング技術を確立した。この新技術は組織深度 100  $\mu\text{m}$  までの連続断面を取得するこの新技術は組織深度 100  $\mu\text{m}$  までの連続断面を取得することが可能であり、造血幹細胞とその微小環境 (骨髄の血管、間質の構造) との距離の 3 次元的な解析だけでなく、実際に取得した画像上で、

コンピューターシミュレーションを行うことにより、両者間の位置的な関連の有意性の検討までを可能とするものである。申請者らは、この新技術を用いて、骨髄血管は、細動脈と骨髄洞という 2 種類の血管から成り立っており、それぞれが、造血幹細胞の静止状態の維持 (細動脈性ニッチ)、細胞増殖 (骨髄洞性ニッチ) という異なる機能を支持していることを世界で初めて明らかにした (Kunisaki et al. *Nature* 2013)。造血幹細胞ニッチの構成細胞を同定するための研究は、近年、日本に限らず世界中で、精力的に行われており、前述の研究を初めとした多くの研究結果により、我々の造血幹細胞機能制御における理解は、飛躍的な発展を遂げている。造血幹細胞を取り囲む骨髄環境はとて複雑であり、包括的かつ先入観にとらわれない分析が必要とされ、この技術は正常造血幹細胞のみならず、血液腫瘍細胞 (白血病) ニッチの同定にも有用であると考えられた。

## 2. 研究の目的

先の研究において、申請者らは、この異なる血管性ニッチ周囲に存在する血管周囲ストローマ細胞は、異なる表面マーカーを発現すること (細動脈ニッチ; NG2、骨髄洞ニッチ; レプチン受容体) を明らかにした。更に、*Osx-cre<sup>ER</sup>* マウス系統を用いた lineage tracing により、マウス新生児段階の *Osx* 発現細胞は、骨前駆細胞だけでなく、骨髄のネスチン、レプチン受容体発現細胞にも分化することを明らかにした (Mizoguchi et al. *Dev. Cell* 2014)。骨髄ニッチを構成するストローマ細胞にも、分化階層があると予想される。それぞれの細胞の Lineage tracing により、骨髄における造血幹細胞ニッチを構成するストローマ細胞をより詳細に分類し、その分化を階層化し、それぞれの細胞の造血幹細胞機能制御における役割を明らかにすることが、本申請課題の目的のひとつである。興味深いことに、NG2 陽性細胞は、レプチン受容体陽性細胞を含む他のストローマ細胞と比較して、より多くの細胞が静止状態にあることを見いだしている (Kunisaki et al. *Nature* 2013)。更に、白血病細胞がこれらストローマ細胞の増殖、分化を促すことにより、白血病細胞に有利な骨髄環境を形成することも示されている (Schepers et al. *Cell Stem Cell* 2013, Hanoun et al. *Cell Stem Cell* 2014)。これらの結果が示すように、骨髄ニッチ構成細胞を含むストローマ細胞の、解剖学的、機能的理解は、正常造血だけでなく、造血器腫瘍の発症機構の解明にも、役立つと予想される。そこで本申請課題では、申請者らが発見した NG2 陽性細動脈性ニッチ細胞の静止状態の破綻が、ニッチとしての機能をどのように変化させ、造血幹細胞の機能にどのように影響を与えるか、また骨髄増殖性疾患など造血器腫瘍の発生との関連も合わせて、分析、検討を行っていく。

### 3. 研究の方法

#### (1) 造血を支持する骨髄間質細胞分化の階層化と機能解析

ネスチン陽性細胞は、マウス骨髄において、間葉系幹細胞活性をもち、造血幹細胞ニッチの重要な一要素として分離された細胞である (Mendez-Ferrer et al. Nature 2010)。Osterix (Osx) は、骨前駆細胞の系統特異的なマーカーと考えられていたが、申請者らは、Osx-cre<sup>ER</sup> マウス系統を用いた lineage tracing により、マウス新生児段階の Osx 発現細胞は、骨前駆細胞だけでなく、骨髄のネスチン、レプチン受容体発現細胞にも分化することを明らかにした (Mizoguchi et al. Dev. Cell 2014)。骨髄間質細胞の分化の樹形図も造血細胞同様に複雑であると予想されるが、それを証明する包括的な知見は未だ得られていない。本研究項目では、それぞれの間質細胞の lineage-tracing を行い、これらの間質細胞を詳細に分類し、その分化の階層化を行う。予備実験として、まず初めに、常時発現型 NG2-cre/loxp-Tomato/Nes-GFP マウスを樹立し、その骨髄間質の解析を FACS と新イメージング技術を用いて行ったところ NG2-cre/loxp-Tomato により、骨髄内のほぼ 100% のネスチン GFP 陽性間質細胞がラベルされ、ネスチン GFP 陽性細胞は、NG2-cre 発現細胞由来であることが示唆された。更に、定常状態においては、タモキシフェン誘導型 NG2-cre<sup>ERTM</sup>/loxp-Tomato の発現は、細動脈周囲に限局しているのに対して、放射線照射 4 週間後には、骨髄洞周囲にも認められるようになった。これらの実験結果は、細動脈周囲 NG2 陽性細胞が、骨髄洞周囲のレプチン受容体陽性細胞に分化する能力を持つことを示唆している。これらの予備実験結果は、骨髄間質細胞にも分化の階層があることを裏付け、この研究課題の妥当性を示している。今後は、タモキシフェン誘導型 NG2-cre<sup>ERTM</sup>/loxp-Tomato によるより長期的な lineage-tracing や骨及び骨髄再生のモデルとして脛骨の骨折モデルを用いて、NG2-cre<sup>ERTM</sup> 及び NG2-cre で標識されるストローマ細胞の骨及び骨髄の再生機構における役割を評価した。

#### (2) 白血病細胞による造血幹細胞ニッチの機能変化

成年期の骨髄においてネスチン陽性細胞（特に細動脈性ネスチン高発現細胞）の多くは、細胞周期静止状態にある。出生後 3 週齢までは、ほとんどの造血幹細胞は、活発に増殖している状態にあり、4 週齢には静止状態となる。予備実験において、生後 1~2 週齢の骨髄では、成年期と比較すると、より多くのネスチン GFP 陽性細胞も、細胞周期が回っている状態であった。また、1 週齢のマウス骨髄にて、細動脈性ネスチン高発現細胞と造血幹細胞の関係を、骨髄ホールマウントイメージング技術を用いて分析したところ、約 75%

の造血幹細胞は、細動脈より 20 μm 以内の範囲に位置し、その多く（約 60%）は、Ki-67 陽性と細胞周期が回っている状態にあり、ニッチの増殖が、造血幹細胞の増殖と相関している可能性を示していた。1 週齢と成年期（10 週齢）の骨髄ネスチン細胞の比較により、PTEN (phosphatase and tensin homolog) の発現が発達過程で有意に増加することが認められた。PTEN は、様々な機能を持つ phosphatase で、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt 経路を抑制することがよく知られている。PTEN 欠損状態において、過剰に活性化した Akt が細胞増殖を促進、またアポトーシスを抑制することにより、細胞生存、増殖を促すと考えられている。NG2-cre<sup>ERTM</sup>/Pten<sup>flox/flox</sup>/Nes-GFP トリプルトランスジェニックマウス系統を作成、確立した。成年期マウス（5-7 週齢）でタモキシフェン（1mgx2 回/日/週 5 回、隔週計 3 週間投与）による遺伝子欠損誘導を開始した。3 ヶ月の時点で、末梢、骨髄造血細胞に明らかな変化は認められなかったが、骨髄ホールマウントイメージングにて、細動脈周囲のネスチン高発現細胞の増加を認め、PTEN 欠損により、このニッチ細胞に変化を起こしうることが示唆された。

更に、PTEN 欠損誘導後 6 ヶ月の時点で、この増加は、更に著明となり、末梢血、脾臓における造血幹細胞及び骨髄球系細胞の著明な増加を認めた。更なる病態進行を、調べるためにこの NG2-cre<sup>ERTM</sup>/Pten<sup>flox/flox</sup>/Nes-GFP マウスを、タモキシフェンの追加投与を行わず、1 年の時点で解析を行ったところ、末梢血白血球は、著明に増加し、巨大脾腫を呈し、Gr-1 陽性 Mac1 陽性骨髄球系細胞の有意な増殖を認めた。また、組織学的に、骨髄、脾臓に加え肝臓でも、成熟及び未成熟骨髄球の広範な浸潤を認め、非常に侵襲度の高い（悪性度の高い）病態への進展と考えられた。これらの予備実験結果は、ニッチ細胞の静止状態は、ニッチ細胞の遺伝子変異からの保守だけではなく、その機能にも、重要であり、その破綻により、造血幹細胞の静止状態の破綻、無秩序な増殖、更には、骨髄増殖性腫瘍を引き起こす骨髄環境への変化を起こしうことを示し、本研究課題、仮説の信憑性、重要性を非常に強く裏付けるものであった。

本研究においては、白血病モデルマウスを用いて、造血幹細胞の病的な増殖や静止状態を支持する骨髄環境の同定を、シーケンスやイメージング技術により解析した。

### 4. 研究成果

急性白血病のマウスモデルである MLL-AF9 モデルマウス骨髄より分離した間葉系幹細胞は、CXCL12、SCF といったニッチ因子の遺伝子発現がしており、その正常造血幹細胞支持能は低下していると考えられた。また、同マウスの骨髄の三次元イメージング技術を用いた解析において、骨や骨髄の血管及び神経

の構造に変化が認められた。以上より白血病細胞は、構造的にも、機能的にも骨髄環境を再構築することで、正常造血を抑制し、腫瘍の進展に優位な環境を形成していることが示唆された。

次に、正常造血幹細胞の静止状態と増殖を支持するニッチの相違を特定するために成人骨髄と胎児肝臓より Nestin-GFP 陽性間葉系幹細胞を分離し、RNA シーケンスを行いその遺伝子発現について比較した。その結果、解析した遺伝子の 90%以上はその発現に違いが認められず、胎児肝臓と成体骨髄においてニッチを形成する間葉系幹細胞は相同性が高いことが明らかとなった。両細胞間で発現の異なる遺伝子を詳細に解析し、細胞周期や増殖に関わる遺伝子群においてその発現に相違が認められた。以上の結果より、間葉系幹細胞は、成体骨髄では静止状態で、胎児肝臓では増殖して存在しており、造血幹細胞の増殖との間に、正の相関が見出された(図 1)。

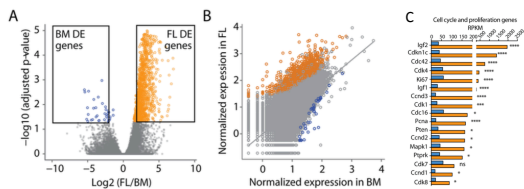


図 1 成体骨髄由来及び胎児肝臓由来間葉系幹細胞の遺伝子発現比較 (Kahn et al. Science より抜粋) 成体骨髄由来及び胎児肝臓由来の Nestin-GFP で標識される間葉系幹細胞を分離し、その遺伝子発現を RNA シーケンスにて比較した。大部分の遺伝子発現パターンは、類似していたが (A, B)、細胞増殖に関する遺伝子は胎児由来のもので高発現していた (C)。

同様の解析を行い骨髄間葉系幹細胞も遺伝子やタンパクの発現パターンにより分類することができ、更にこれらは異なるサイトカインを産生していることを世界で初めて明らかにした。これらの細動脈及び骨髄洞ニッチを構成する間葉系幹細胞が異なるサイトカインの産生を介して造血幹細胞を制御するというメカニズムを解明した(図 2)。

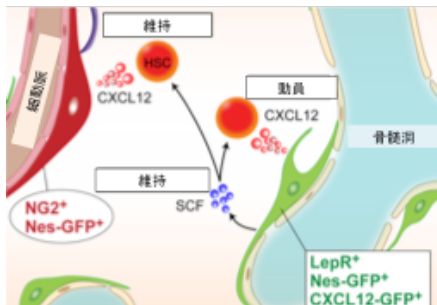


図 2 「造血幹細胞ニッチ」を構成する間葉系幹細胞は、その分布と発現タンパクより NG2 陽性細胞とレプチン受容体陽性細胞に大別される。これらの細胞は各々が CXCL12、SCF (Stem cell factor) とサイトカインを産生し異なる「すみか」を形成している (Asada et al. Nature Cell Biology より抜粋)

レーザースピニングディスク共焦点顕微鏡や

解析機能を更に充実させ、骨髄のイメージングや 3 次元再構築に必要なソフトウェアのアップグレードを完了し、より高速で、解像度の高い撮影や動画の作成が可能となっている(図 3)。

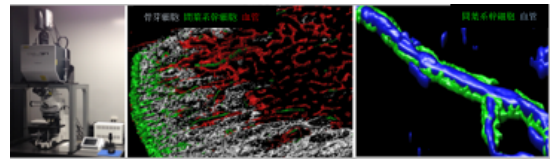


図 3 レーザースピニング共焦点顕微鏡を用いた骨髄 3 次元イメージング技術 左:スピニングディスク共焦点顕微鏡、中:マウス脛骨の 3 次元再構築画像、右:骨髄血管と裏打ちする間葉系幹細胞

更に、シングルセル RNA シーケンスを行うための画期的な方法である Drop-seq 技術を世界で初めて報告した McCarroll ラボ (Macosko et al. Cell 2015) と共同研究を行っている Dr. Patrick Stumpf (Southampton 大学) の協力を得て、本装置のセットアップを行った。解析のための次世代シーケンサー Next-seq (Illumina) も使用可能となり、また解析サーバーへのアクセスも得られ、予備実験にて条件検討が終了し、 $1 \times 10^4$  細胞のシングルセル RNA シーケンス解析が可能となっている。Drop-seq とは、微小流路を用いて、mRNA を細胞毎に異なるオリゴバーコードで標識するシステムで、シーケンスの際に各々の mRNA の由来細胞が特定できるシステムである。申請者は、本システムを用いて、骨病変を来す代表的な造血器腫瘍である多発性骨髄腫モデルマウスの骨芽細胞と間葉系幹前駆細胞のシングルセル遺伝子発現解析を行い、t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (tSNE) 解析法にて、両細胞が別々の集団として識別される結果を得ている。更に、骨芽細胞、間葉系幹前駆細胞内においても複数の亜集団が見られ、1 細胞当たりの解析遺伝子数を増やすことでより明確化することが期待される(図 4A)。また、Similarity Metric 解析を行ったところ、骨髄腫の骨髄浸潤が進行するにつれ、骨芽細胞よりむしろ間

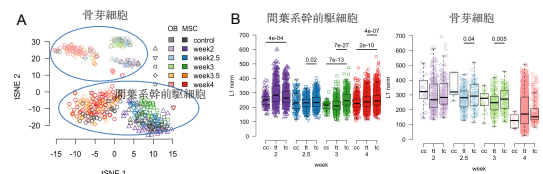


図 4 マウス骨髄間葉系細胞のシングルセル解析 骨髄腫を発症したマウス(図 5)より分離した骨芽細胞、間葉系幹前駆細胞のシングルセル解析。A: tSNE 解析により両細胞は分離され、更に細分化が可能である。B: Similarity metric 解析により骨髄腫の進行に伴って骨芽細胞より間葉系幹前駆細胞に有意な変化が認められた。

葉系幹前駆細胞に有意な変化が認められている(図 4B)。これらの結果は、シングルセル解析が未知の

造血器腫瘍における骨髓微小環境の変化の  
同定に有用であることを証明している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に  
は下線)

[雑誌論文] (計5件)

- 1- Miyawaki K, Iwasaki H, Jiromaru T, Kusumoto H, Yurino A, Sugio T, Uehara Y, Odawara J, Daitoku S, Kunisaki Y, Mori Y, Arinobu Y, Tsuzuki H, Kikushige Y, Iino T, Kato K, Takenaka K, Miyamoto T, Maeda T, Akashi K. Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis. **Blood**. 2017 Jan 8;351(6269):176-80. doi: 10.1182/blood-2016-09-741611.
- 2- Asada N, Kunisaki Y, Pierce H, Wang Z, Fernandez NF, Birbair A, Ma'ayan A, Frenette PS. Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. **Nat Cell Biol**. 2017 Mar;19(3):214-223. doi: 10.1038/ncb3475.
- 3- Yurino A, Takenaka K, Yamauchi T, Nunomura T, Uehara Y, Jinnouchi F, Miyawaki K, Kikushige Y, Kato K, Miyamoto T, Iwasaki H, Kunisaki Y, Akashi K. Enhanced Reconstitution of Human Erythropoiesis and Thrombopoiesis in an Immunodeficient Mouse Model with Kit(Wv) Mutations. **Stem Cell Reports**. 2016 Sep 13;7(3):425-38. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.07.002.
- 4- Khan JA, Mendelson A, Kunisaki Y, Birbrair A, Kou Y, Arnal-Estapé A, Pinho S, Ciero P, Nakahara F, Ma'ayan A, Bergman A, Merad M, Frenette PS. Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels. **Science**. 2016 Jan 8;351(6269):176-80. doi: 10.1126/science.aad0084.
- 5- Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, Burk RD, Kunisaki Y, Jang JE, Scheiermann C, Merad M, Frenette PS. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. **Nature**. 2015 Sep 24;525(7570):528-32. doi: 10.1038/nature15367.

[学会発表] (計9件)

- 1- 國崎 祐哉 間葉系幹細胞による造血幹細胞制御機構 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会(長崎)3月29日(2017)
- 2- 國崎 祐哉 骨髓微小環境のイメージング 第31回日本整形外科学会基礎学術集会(福岡)10月13日(2016)
- 3- 國崎 祐哉 間葉系幹細胞による造血幹細胞制御機構 第60回日本リウマチ学

会総会・学術集会(横浜)4月21日(2016)

- 4- 國崎 祐哉 血管性ニッチによる造血幹細胞制御機構 第18回癌と骨病変研究会(東京)11月13日(2015)
- 5- 國崎 祐哉 造血幹細胞ニッチ 第77回日本血液学会学術集会(金沢)10月18日(2015)
- 6- 國崎 祐哉, 上原 康史, 赤司 浩一 加齢による骨髓環境の変化とその造血幹細胞機能への影響 第77回日本血液学会学術集会(金沢)10月17日(2015)
- 7- Yuya Kunisaki "Imaging of the bone marrow and hematopoietic stem cells The International Society of Experimental Hematology 44th Annual Scientific Meeting(京都)9月17日(2015)
- 8- 國崎 祐哉 骨髓微小環境による造血幹細胞制御機構 第39回阿蘇シンポジウム(熊本)7月31日(2015)
- 9- 國崎 祐哉 血管性ニッチによる造血幹細胞制御機構 第33回日本骨代謝学会学術集会(東京)7月24日(2015)

[図書] (計5件)

- 1- 國崎 祐哉 髓外造血を支持する傍血管性ニッチ 血液内科 73 382-387(2016)
- 2- 國崎 祐哉 造血幹細胞ニッチと造血異常 実験医学 37 140-144(2016)
- 3- Kunisaki Y. Cancer stem cells and the niches *Nihon Rinsho* 73 1315-1320(2015)
- 4- Kunisaki Y. Distinct vascular niches determine hematopoietic stem cell fate *Rinsho Ketsueki* 56 606-613(2015)
- 5- Kunisaki Y. Cancer stem cells and the niches *Nihon Rinsho* 73 1315-1320(2015)

[その他]

ホームページ等

<https://scr.wp.med.kyushu-u.ac.jp>

<http://www.lnai.med.kyushu-u.ac.jp>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

國崎 祐哉 (KUNISAKI, Yuya)

九州大学・病院・講師

研究者番号: 80737099