

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08161

研究課題名(和文) 骨髄造血微小環境におけるストローマ細胞の構成様式と造血制御機能発現の検討

研究課題名(英文) Distribution and hematopoietic regulatory function of stromal cells in hematopoietic microenvironment

研究代表者

相沢 信(AIZAWA, shin)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：30202443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：造血現象を制御する、いわば造血の「畑」ともいえる造血微小環境において、その構成細胞であるストローマ細胞の役割について検討した。ストローマ細胞は恒常的造血、またストレス下の反応性造血において、サイトカイン産生、接着因子による情報伝達などの機序を介して造血細胞の増殖、分化を制御し、同時に造血細胞保護機能を有するなど造血現象の中心的役割を担っていることが、*in vivo*、*in vitro*の両面からの検証により明らかとなった。ストローマ細胞機能の量的、質的障害は、貧血など造血障害などの病的動態に深くかかわっていることが明らかとなり、今後の造血器障害治療の新たな展開の可能性を示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The hematopoiesis is regulated by stromal cells, as distinguished from hematopoietic cells in hematopoietic microenvironment. In this study, the stromal cells were shown as an essential compartment for regulating the proliferation and differentiation of hematopoietic cells by producing various cytokines and adhesion molecules. Furthermore, stromal cells protected the hematopoietic cells from biological stresses and keep the homeostasis of hematopoietic phenomena. These findings were verified by *in vivo* and *in vitro* examinations. The results showed the importance of stromal cells in hematopoietic microenvironment and the qualitative and quantitative impairment of stromal cells may result in the hematopoietic disorders.

研究分野：造血組織

キーワード：細胞分化・組織形成 造血微小環境 骨髄ストローマ細胞 三次元培養 造血因子 細胞周期 cytarabine M1マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

造血微小環境は、線維芽細胞、脂肪細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、マクロファージ等の細胞からなる造血幹細胞をとりまく様に複雑に存在する「ストローマ細胞」と総称される間質系細胞より構成され、造血幹細胞の増殖・分化を制御していると考えられている。これら細胞は個々の機能を発現するとともにお互いが関連しあいながら総合的に造血幹細胞に影響を与えていると推測されており、このような造血の場は「niche、ニッチェ」とも呼ばれている。しかしながら生体内で niche がどのように構成され、それぞれの細胞がどのような役割を担っているかについてはほとんど解明されていない。本研究者は、ストローマ細胞の試験管内培養法を開発し、in vitro での造血現象の再現に成功し、造血現象におけるストローマ細胞機能について検討を重ねてきた。特に造血制御機構において、アポトーシス誘導を介した負の制御機構の存在を確認し、細胞膜結合型因子および低分子液性抑制因子の産生を介してストローマ細胞がその中心的役割を果たしていることを初めて報告し、機能的分子の分離に成功した。ストローマ細胞機能については国内外においても多数の報告があり、ストローマ細胞が産生する造血幹細胞の増殖、分化に關与する多くの造血因子が発見され、そのいくつかはすでに貧血等に対する治療薬として臨床応用が開始されている。しかしながらこれら造血因子は造血現象をあくまで断片的に支持しているにすぎず、事実、長期間にわたり人工的造血現象を再構築するまでには至らず、また維持される造血細胞も特定の系統の血球系に限定されている。この原因として、従来の研究のほとんどが in vitro で行われており、複雑な要素から成り立っている生体における造血現象の解明に対するアプローチがほとんど行われていなかったことが挙げられる。

近年、解明の手がかりとなるモデル動物が見出された。老化促進マウス (Senescence-accelerated mice: SAM) と呼ばれるマウスは、AKR 系マウスの変異型であり正常マウスと比較してはるかに寿命が短い(約 40-50 週)特徴を有する。このマウスの造血系について検討した結果、約 30 週齢頃より貧血症状が発現することが観察され、この異常は「種」である造血幹細胞自身には全く機能的障害は認められないものの、「畑」である造血微小環境機能に問題を有することが明らかとなった。本研究は SAM を用いて正常マウスとの比較実験を行うことにより、生体内 niche におけるストローマ細胞の構成様式および造血制御機構を解析し、さらに異常造血微小環境の正常化(治療)の可能性を検討することを目的とする。

特に本研究者は、生体における造血組織を反映する三次元的 in vitro 培養法などストローマ細胞を研究するに適した実験モデルの

開発に成功した。これらの新規開発手段を用いて、in vivo および in vitro 両面からアプローチすることにより、ストローマ細胞固有の機能の解析、造血現象の実態の解明が可能となってきた。

2. 研究の目的

造血現象は造血幹細胞という「種」が、造血微小環境という「畑」において育つ過程を示すものであり、種、畑いずれの欠陥も結果的に貧血など造血器疾患の原因となる。本研究は「畑」である造血微小環境の構成要素としての「ストローマ細胞」に注目し、生体内(造血組織)における存在様式について、またこれら細胞が実際にどのように造血幹細胞の増殖、分化に関わりを持って機能しているかを in vivo 標本を用いて解析し、さらに新規に開発した三次元培養法を用いた in vitro の面からも検証することにより造血制御機構を解明し、「正しい畑を構築する」という観点から造血器疾患の新規治療法の開発を試みることを目的とする。

3. 研究の方法

多種の細胞より構成される「ストローマ細胞」は in vitro では培養皿底面に付着して発育する細胞として観察可能である。しかしながら生体内造血組織におけるこれら細胞の存在様式、また実際に造血幹細胞の増殖、分化にどのような関わりを持って機能しているかについては具体的な報告はない。本研究ではストローマ細胞に対する特異的抗体を用いた免疫組織学的検討を行い造血組織におけるストローマ細胞の分布様式について SAM および正常マウスとの比較検討を行う。また造血因子産生等を指標として造血支持機能について比較検討を行う事によりストローマ細胞の機能評価を行う。さらにこれらの研究成果を踏まえて in vitro での三次元培養を行い、同様にストローマ細胞機能のより詳細を検討する。この際に恒常的造血状態においては造血因子産生が顕著でないことが予想されるため、炎症反応を惹起する菌体外毒素である lipopolysaccharide(LPS)、造血障害を引き起こす抗がん剤である cytarabine といったバイオストレス下における反応性を観察することにより、ストローマ細胞の造血制御機能について検討を行う。なおこの際には、血球の分化マーカーを用いた造血細胞の分化、成熟制御への影響、さらに血球細胞の細胞周期にあたるストローマ細胞の影響について観察を行うことより、血球増殖、分化へのストローマ細胞の制御メカニズムについての詳細を具体的に検討する。

4. 研究成果

(1) SAM のストローマ細胞の特徴

SAM は若年期には正常の造血を認めるが (non-stromal cell impairment mice: non-SCI)、30 週齢以降加齢と共に貧血等の

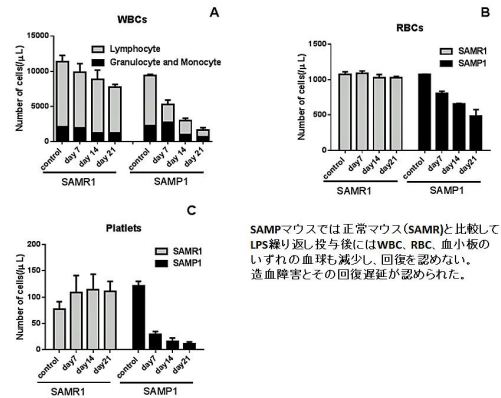
血液学的異常所見を呈し、その原因としてストローマ細胞機能異常に起因することが明らかとなった (stromal cell impairment mice: SCI)。本年度はストローマ細胞の主要な構成要素であるマクロファージの組織内分布について LPS 非刺激、刺激マウスを用いて in vivo での検討を行った。マクロファージは組織内でさらに機能分化することにより炎症性サイトカインなどにより刺激を受け Th1 型の免疫応答を誘導し、抗菌、抗ウイルス、抗腫瘍効果を発揮する M1 マクロファージと、寄生虫感染、血管新生、組織修復、免疫抑制効果に機能する M2 マクロファージとの機能的亜群が存在し、様々な病態形成にかかわっていることが知られている。SAM では正常マウスと比較して、もともと M1 あるいは M2 細胞として同定される分化、活性化したマクロファージの分布比率にアンバランスがあり、特に M1 細胞が有意に低下していることが判明した。さらに LPS 刺激後には両者マウス共に未分化マクロファージが増加するが、活性型への再分化が SAM では遅延していることが確認された。機能面でもマクロファージを含むストローマ細胞よりの血球分化誘導造血因子産生能は LPS 非刺激下、刺激下で共に低下しており、液性因子を介しての造血支持機能が低下していることが明らかとなった。従来 SAM ではストローマ細胞の機能異常により造血支持機能が低下しているとされていたが、より詳細に個々のストローマ構成細胞を観察することにより、造血支持機能を有する細胞分布にもアンバランスがあり、加えて LPS 刺激などのストレス時にはストローマ細胞自身の分化、成熟の過程において著大な変化が生じ、それに伴うように機能変化(造血支持機能の低下)が生じていることを示す結果が得られた。

(2) LPS 繰り返し投与時の造血反応とストローマ細胞

造血におけるストローマ細胞の役割をさらに明らかとするため、繰り返し LPS 投与ストレス時のマウス造血状態と、ストローマ細胞機能の変動について、SAM(SAMP マウス)と正常マウス(SAMR マウス)を比較検討した。25 μ g/mouse の LPS を 7 日毎に静脈内投与し、血液学的変動とストローマ細胞よりのサイトカイン産生能について検討した。

LPS 繰り返し投与後、正常である SAMR マウスの末梢血血球は、若干の変動は認めるもののほぼ一定の恒常性を有する。他方 SAMP マウスでは繰り返し LPS 投与により白血球、赤血球、血小板共に減少し、その回復も遅延している(図 1)。また SAMP 骨髄における未分化造血前駆細胞数を測定したところ、白血球系前駆細胞数は比較的保たれていたが、赤血球系、巨核球系前駆細胞数は有意に低下しており、未分化段階より造血障害が起きていることが明らかとなった。興味深いことに SAMP では繰り返し LPS 投与によ

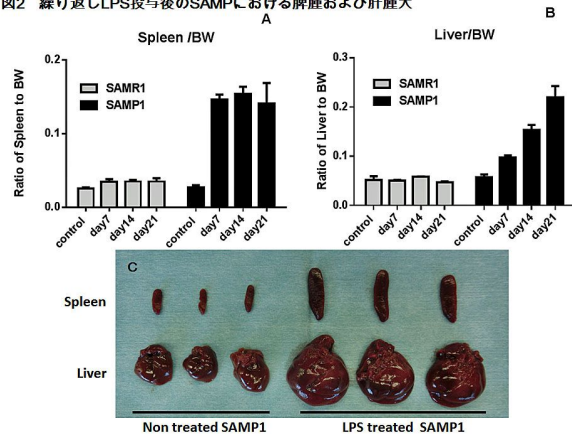
図 1



SAMPマウスでは正常マウス(SAMR)と比較してLPS繰り返し投与後にはWBC, RBC, 血小板のいずれの血球も減少し、回復を認めない。造血障害とその回復遅延が認められた。

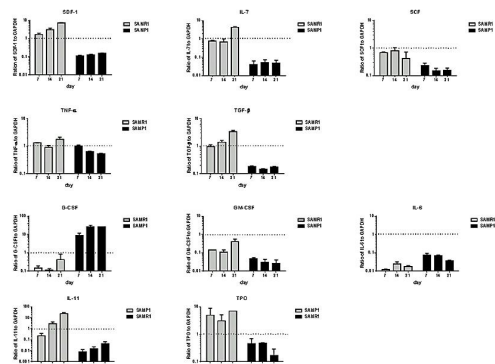
り著しい脾腫、肝腫大が認められ、マウスにおいては造血の場である脾臓の組織障害が引き起こされていることが観察された(図 2)。

図 2 繰り返しLPS投与後のSAMPにおける脾腫および肝腫大



さらにこのようなストレス下でのストローマ細胞からの造血サイトカインの産生能について mRNA 発現より検討した結果、未分化造血前駆細胞の変動と一致して、白血球系の制御サイトカインの産生能は比較的保たれていたが、赤血球系、巨核球系の造血制御サイトカインに加え、リンパ球系造血制御サイトカインの産生能が有意に低下していることが判明した(図 3)。これら結果より、SAMP ではストローマ細胞の存在形式と機能維持が造血の恒常性に深くかかわっていることが明らかとなった。

図 3 繰り返しLPS投与後のSAMPストローマ細胞よりの造血サイトカインの産生

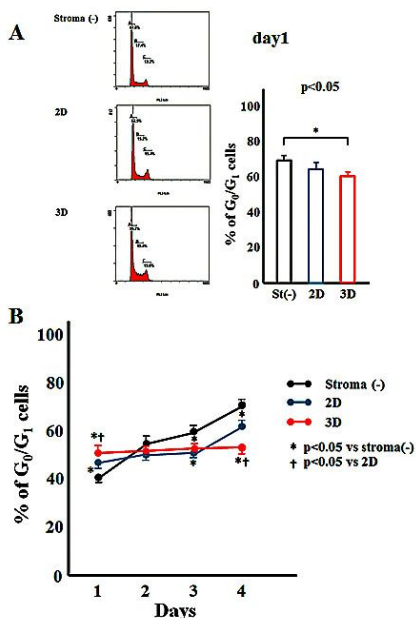


(3) ストローマ細胞による造血細胞周期の制御

ストローマ細胞の造血制御機構を検証するため、in vitro で新規に開発した三次元培

養法を用いて、ストローマ細胞と造血細胞の相互関係について解析を行った。この培養系においてはストローマ細胞としてマウス線維芽細胞株 MS-5 を、また造血細胞としてヒト由来 K562 細胞を使用した。三次元培養(3D 培養) はエポキシ鎖を有する微粒子担体を使用し、二次元平面培養(2D 培養) を対照として比較検討を行った。K562 細胞は特定の刺激因子非存在下でも自律的に増殖可能な細胞であるが、3D 培養でのストローマ細胞との共培養においては増殖が抑制される。この現象を明らかとするため K562 細胞の細胞周期の動態についてフローサイトメトリーで解析した。ストローマ細胞との非共培養時、2D 培養時には K562 細胞は培養開始後 60%以上の細胞が細胞周期に入り、活発な増殖状態であるのに対し、3D 培養時には逆に 50%以上の細胞が休止期細胞であった。またストローマ細胞との非共培養時、2D 培養時には K562 細胞の増殖、細胞数の増加に伴い休止期細胞割合は増加するのに対し、3D 培養では休止期細胞と細胞周期に入っている細胞は常に一定の割合で培養内に存在していることが確認された(図 4)。3D 培養と 2D 培養では同じストローマ細胞を使用しているにもかかわらず造血細胞である K562 に対しての制御が異なることのメカニズムについて、造血サイトカイン産生状態などの比較を行ったが、特定の因子を同定するには至らなかった。このことより 3D における細胞間作用には、三次元的物理的空間の存在、細胞間の接触状態など複数の因子が関与していることが推測された。同時にストローマ細胞には造血細胞に対して細胞周期をコントロールするシステムがあり、増殖、分化を一定に制御することより全体としての造血現象の恒常性を維持していることが示唆された。

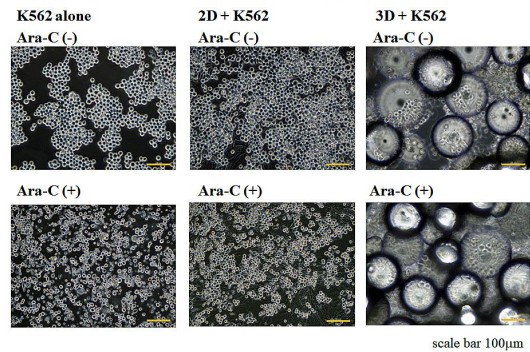
図4 三次元培養中のK562細胞周期



(4)ストローマ細胞の造血細胞保護機能
ストローマ細胞は単に造血細胞の増殖、分

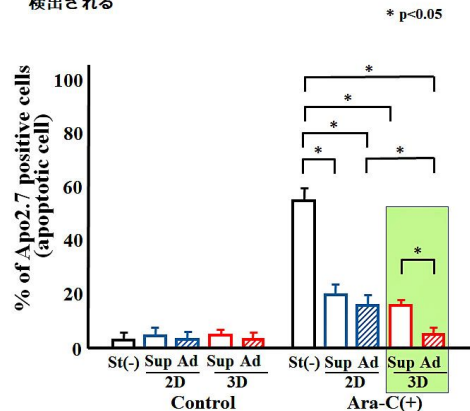
化の制御を行うのみならず、種々のストレスからの造血細胞保護機能を有することを報告してきた。本研究では三次元培養モデルを用いて、アポトーシス誘導による細胞死作用を有する抗がん薬として臨床で使用されている cytarabine(Ara-C)投与が造血細胞におよぼす影響を in vitro で検討した。K562 細胞は単独培養では浮遊細胞として増殖し、2D 培養では培養皿底面に拡がって付着したストローマ細胞上に接触しながら増殖する。3D 培養では立体的に構築されたストローマ細胞層に潜りこむような形で安定して存在する(図 5 上段)。ここに 1mg/mL の Ara-C を添加すると、アポトーシス機序を介してにより細胞死が誘導され、形態的には不整化と増殖抑制が観察される(単独および 2D 培養)。しかしながら 3D 培養では細胞死する K562 細胞比率は有意に低く、形態的観察でも Ara-C の影響が少ないことが明らかになった(図 5 下段)。

図5 共培養写真 MS-5 and K562 + Ara-C 1µg/ml 5 days (x20)



形態学変化とともにアポトーシス変化を起こした細胞が発現する APO2.7 タンパクを、抗体染色後にフローサイトメトリーを用いて検出すると、単独あるいは 2D 培養と比較して、3D 培養時には明らかにアポトーシス変化が減少していることが確認できた(図 6)。興味深いことに特にストローマ細胞に付着して存在する K562 細胞(Ad cell)は、三次元培養内で浮遊して存在する K562 細胞(Sup cell)に比較して有意にアポトーシス変化が少ないことが明らかとなった(図 6)。これら結果より、ストローマ細胞は造血細胞である K562 細胞と接触しながら、細胞周期をコン

図6 Ara-C処理5日目のAPO2.7陽性K562細胞比率
Ara-C処理により細胞死したK562細胞はAPO2.7陽性細胞として検出される



トロールするなどの機序を介してその細胞を安定化させ、増殖コントロールと共に保護作用としての機能を有していることが明らかとなった。

(5)まとめ

本研究により造血微小環境構成要素であるストローマ細胞の機能の重要性が明らかとなった。ストローマ細胞は恒常的造血、またストレス下の反応性造血において、サイトカイン産生などの機序を介して造血細胞の増殖、分化を制御し、同時に造血細胞保護機能を有するなど造血現象の中心的役割を担っている。今回の検討で、*in vivo*、*in vitro*の両面からの検証によりこれら作用が確認され、ストローマ細胞機能の量的、質的障害が、造血障害などの病的動態に深くかかわっていることが明らかとなり、今後の造血器障害治療の新たな展開の可能性を示唆するものと考えられる。

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 9 件)

Kosaku K., Harada T., Jike T., Tsuboi I., Aizawa S. Long-term hypoxic tolerance in murine cornea. *High Alt Med Biol* 査読有 19: 35-41 2018 DOI: 10.1089/ham.2017.0114

Ohashi A., Mamada K., Harada T., Naito M., Takahashi T., Aizawa S., Hasegawa H. Organic anion transporters, OAT1 and OAT3, are crucial biopterin transporters involved in bodily distribution of tetrahydrobiopterin and exclusion of its excess. *Mol Cell Biochem* 査読有 435: 97-108 2017 DOI: 10.1007/s11010-017-3060-7

Fukino N., Harada T., Tsuboi I., Fukui S., Yasuda M., Aizawa S. In vitro chemosensitivity study of human leukemic cells in a three-dimensional bone marrow culture system. *J Hematol Ther* 査読有 1: 7-15 2016 DOI: 10.14312/2397-8694.2016-3

Tsuboi I., Harada T., Hirabayashi Y., Kanno J., Aizawa S. Differential regulation of lympho-myelopoiesis by stromal cells in the early and late phases in BALB/c mice repeatedly exposed to lipopolysaccharide. *Biol Pharm Bull* 査読有 39: 1939-1947 2016 DOI: 10.1248/bpb.b16-00375

Ohashi A., Saeki Y., Harada T., Naito M., Takahashi T., Aizawa S., Hasegawa H. Tetrahydrobiopterin Supplementation: Elevation of Tissue Biopterin Levels Accompanied by a

Relative Increase in Dihydrobiopterin in the Blood and the Role of Probenecid-Sensitive Uptake in Scavenging Dihydrobiopterin in the Liver and Kidney of Rats. *PLoS One* 査読有 6: 11(10): e0164305. 2016 DOI: 10.1371/journal.pone.0164305.

Yoshikawa M., Masuda T., Kobayashi A., Senzaki K., Ozaki S., Aizawa S., Shiga T. Runx1 contributes to the functional switching of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) from neurite outgrowth promoting to suppressing in dorsal root ganglion. *Mol Cell Neurosci* 査読有 72: 114-122 2016 DOI: 10.1016/j.mcn.2016.02.001

Harada T., Hirabayashi Y., Hatta Y., Tsuboi I., Glomn WR., Yasuda M., Aizawa S. Kinetics of hematopoietic stem cells and supportive activities of stromal cells in a three-dimensional bone marrow culture system. *Growth Factors* 査読有 33: 347-355 2015 DOI: 10.3109/08977194.2015.1088534

Yoshikawa M., Hirabayashi M., Ito R., Ozaki S., Aizawa S., Masuda T., Senzaki K., Shiga T. Contribution of the Runx1 transcription factor to axonal pathfinding and muscle innervation by hypoglossal motoneurons. *Dev Neurobiol* 査読有 75: 1295-314 2015 DOI: 10.1002/dneu.22285

Harada T., Tsuboi I., Hirabayashi Y., Kosaku K., Naito M., Hara H., Inoue T., Aizawa S. Decreased “ineffective erythropoiesis” preserves polycythemia in mice under long-term hypoxia. *Clin Exp Med* 査読有 15: 179-188, 2015 DOI: 10.1007/s10238-014-0286-5

[学会発表](計 8 件)

原田智紀、壺井 功、内藤美智子、古作和寛、原 弘之、相澤 信 三次元培養法における白血病細胞の動態 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018.3.28-3.30 日本医科大学武蔵境校舎 (東京 武蔵野市)

原田智紀、壺井 功、内藤美智子、古作和寛、原 弘之、相澤 信 LPS 頻回投与における慢性炎症下の加齢様 B 細胞造血能低下について第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3.28-3.30 長崎大学坂本キャンパス (長崎 長崎市)

Moriya S., Kazama H., Hiramoto M., Aizawa S., Sunazuka T., Handa H., Miyazawa K. Mucrolides enhance bortezomycin-induced cytotoxicity in

myeloma cells co-cultured with stroma layer. 第 78 回日本血液学会学術集会 2016.10.13-15 パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)

壺井 功、原田智紀、平林容子、菅野 純、相澤 信 LPS 頻回投与による造血系の加齢様変化におけるストローマ細胞機能低下についての検討 第 39 回日本基礎老化学会大会 2016.5.27-28 伊勢原市民文化会館 (神奈川県 伊勢崎市)
原田智紀、壺井 功、内藤美智子、古作和寛、原 弘之、相澤 信 三次元骨髄培養モデルにおける造血支持特性 第 121 回日本解剖学会 総会・全国学術集会 2016. 3.28-30 ビックパレット福島 (福島 郡山市)

Harada T., Tsuboi I., Hirabayashi Y., Hirabayashi Y., Kanno J., Aizawa S. Mechanism for sustained polycythemia in mice under hypoxic condition. The 77th Annual meeting of the Japanese society of hematology 2015.10.16-18 石川県立音楽堂 (石川 金沢市)

Hirabayashi Y., Tsuboi I., Yoon B.I., Kanno J., Aizawa S. Role of connexin 32 in hematopoiesis: maintenance of cell capability to reconstitute bone marrow. The 77th Annual meeting of the Japanese society of hematology 2015.10.16-18 石川県立音楽堂 (石川 金沢市)

壺井 功、原田智紀、内藤美智子、原 弘之、平林容子、菅野 純、相澤 信. 老化促進モデルマウスを用いた加齢に伴う肥満細胞造血の変動についての検討. 第 38 回日本基礎老化学会 2015.6.13-14 パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

相沢 信 (AIZAWA, Shin)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：30202443

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者
無し

(4)研究協力者
無し