

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590196
 研究課題名 (和文) 生体における造血微小環境の構成様式と機能発現の検討
 研究課題名 (英文) A study for the constitution and the hematopoietic regulatory mechanism of bone marrow microenvironment in vivo
 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

研究成果の概要：

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等の原因となる。本研究では「畑」である造血微小環境に遺伝的欠陥を有するマウスをモデルとし、畑の最も重要な構成細胞であるストローマ細胞が、種々の生理活性物質を産生することにより血球の産生を制御していることを明らかとした。さらに病的ストローマ細胞を正常細胞に置換する等の方法、すなわち「畑を耕す」ことにより異常造血状態を回復させる技術の開発に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	420,000	3,020,000

研究分野：造血発生学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：細胞分化・組織形成

1. 研究開始当初の背景

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。この造血微小環境は、造血刺激(促進)機能を有する一方で、異常クローンの排除といった監視機構を含めた造血抑制機能を有し、促進、抑制両者がバランスよく機能することにより、正しい造血現象が維持されていることが理

解されるようになった。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ように存在する「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。近年、培養技術の進歩、また遺伝子操作技術の進歩によりストローマ細胞の試験管内での培養が可能となり、造血微小環境を構成するそれぞれの細胞を分離、独

立して培養し、その機能の詳細が検討されている。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(Aizawa S et al. *Exp Hematol* 22; 482-7, 1994)。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(Aizawa S et al. *Exp Hematol* 28; 148-55, 2000, Harada T, Aizawa S et al. *Oncol Reports* 14; 501-5, 2005)。国内外においてもストローマ細胞機能については多数の報告があり、ストローマ細胞が産生する造血幹細胞の増殖、分化に関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。ことにストローマ細胞を研究するに適した実験モデル動物が存在しなかったことが解明を遅らせてきた原因と考えられる。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系マウスの変異型として見出され、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の検討した結果、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(Tsuboi I, Aizawa S et al. *Exp Bio Med* 229; 494-502, 2004)。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、生体内でのストローマ細胞を介した造血制御機構の解明を、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。

2. 研究の目的

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。この原因として、組織として造血組織を観察するにあたり、複数の細胞からなるストローマ細胞をそれぞれ認識するためのよいマーカーがなく、あくまで古典的な形態学的手法に頼らざるを得なかったこと、また造血微小環境機能に相違を認め、生体として比較検討することの可能な良い実験動物が得られなかったことが挙げられる。本研究はSAMを用いて正常マウスと比較検討することにより下記の点を明らかとすることを目的とする。

①造血組織におけるストローマ構成細胞の分布、および造血幹細胞を含めた血球系細胞との細胞間の相互関係解析

造血組織(骨髄、脾臓)におけるストローマ細胞の存在様式、また造血細胞増殖・分化に対する機能を *in vivo* で検討する。

②ストローマ構成細胞の造血因子産生能の検討

造血因子産生能などを介したストローマ細胞の造血支持機能を評価する。この実験においては恒常的状態と同時に、lipopolysaccharide(LPS)等の投与により、ストローマ細胞機能がより活性化している造血モデルを作製し比較検討することで、造血支持機能の実態が明らかとなることが予想される。

③ストローマ細胞の移植によるSAM造血能の回復

正常ストローマ細胞をSAMに移植することにより、造血能力が回復できるかを検討する。この際、移植するストローマ細胞を選択、修飾することにより、造血支持に必要な細胞が具体的に同定されることが考えられる。

④人工骨髄開発の可能性の検討

ストローマ細胞を含めた造血微小環境の構成に明らかにすることより、造血細胞増殖・分化を可能とする人工骨髄開発の可能性を検討する。

3. 研究の方法

本研究者が行なってきた *in vitro*でのストローマ構成細胞の特異性の検討結果を応用し、ストローマ障害モデルマウス(SAM)と正常マウスを比較検討することより、生体におけるストローマ細胞の構成様式、また障害ストローマを「正しく修復」することの可能性について検討する。

(1)SAM 造血異常とストローマ細胞機能異常

の検討

SAM の造血幹細胞増殖・分化過程をコロニー形成法あるいは分化マーカーに対する特異抗体を用いて検討し、増殖・分化異常のメカニズムを解析する。さらに組織学的に、あるいは単離したストローマ細胞に対して、造血因子産生能、接着因子発現能を検討し、ストローマ細胞機能異常を評価する。

(2)急性反応時の造血状態の検討

SAM において、恒常的造血時に比較して感染あるいは抗癌剤投与後などにおける造血亢進反応の低下が予測される。本研究ではLPS 投与に対する SAM ストローマ細胞の反応性を in vitro、in vivo で観察する。これについては、ストローマ細胞自身の増殖変化を fibroblast コロニー形成試験により、あるいは造血幹細胞に対する増殖支持機能の測定により評価する。さらに骨髄移植モデルを用いてストローマ障害時の移植細胞の増殖・分化の動態について検討する。

(3)ストローマ細胞移植モデルマウスによる SAM 造血機能の回復の検討

正常マウス骨髄由来ストローマ細胞を分離し、これを SAM に移植することにより造血機能が回復するか検討する。ストローマ細胞分離は特異的のマーカーを用いて行ない、試験管内で増殖誘導させた細胞を移植実験に供する。

(4)人工骨髄構築の可能性の検討

より有効な造血幹細胞増幅を目的に人工骨髄構築の可能性を検討する。このために従来と異なり、ストローマ細胞が付着、増殖可能な担体を作製し、三次元的培養方法を開発する。将来的な臨床応用も視野に、安全性の面からアクリルを基材とした立体型の担体開発を行なう。

4. 研究成果

(1)造血微小環境異常マウス (SAM) の造血状態の解析

①SAM 骨髄における造血異常とストローマ細胞の関係について

Senescence-accelerated mice (SAM) を用いた検討より、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することが知られ、その原因としてストローマ細胞機能異常が明らかとなった (stromal cell impairment mice: SCI)。さらに恒常的造血

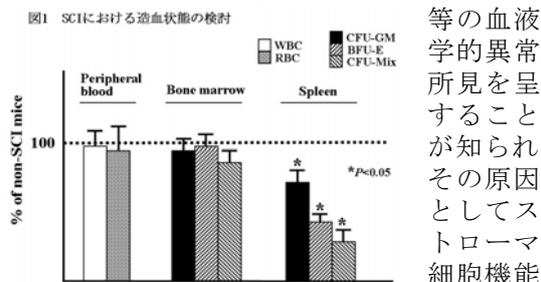


図1 SCIにおける造血状態の検討

では SCI においても末梢血細胞数や骨髄の造血細胞数にほとんど差は認められず、骨髄造血細胞数は保持されていたが、脾臓においては造血細胞数の低下、またストローマ構成細胞の機能低下が観察された (図 1)。

②急性反応時の造血状態の検討

lipopolysaccharide (LPS) を用いた検討で、SCI では感染時の急性炎症等における骨髄での造血反応性が低下しており、この原因はス

トローマ細胞の造血幹細胞増殖、各血球分化に対する造血因子産生を介した支持機能の低下によること

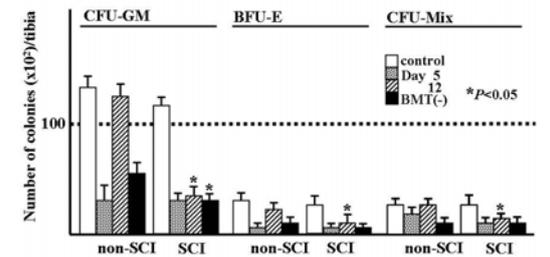
となった (図 2)。この SCI 由来ストローマ細胞の造血因子産生機能低下は、遺伝子発現および蛋白合成の両面で低下が確認された。免疫組織学的解析でも、急性反応期の脾臓においては、赤脾髄および皮膜下における内皮細胞あるいはマクロファージを中心に構成される造血細胞増殖を示すコロニー集団の低形成が観察された。

(2)骨髄移植後の造血機能回復におけるストローマ細胞の支持機能

①放射線照射マウスへの骨髄移植による造血回復におけるストローマ細胞機能の検討

7Gy 照射マウスに骨髄細胞を移植し、造血機能の回復について検討した結果、SCI では骨髄再構築は不良であり、その原因としてストローマ細胞よりの造血因子産生の低下、さらに接着因子を介した造血幹細胞の定着不全によることが明らかとなった (図 3)。

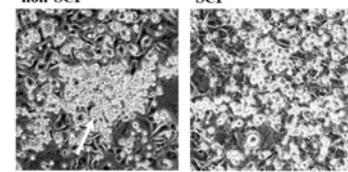
図3 Number of colonies in bone marrow after BMT



②in vitro でのストローマ細胞の造血支持

ストローマ細胞の造血支持機能を検討する目的で、in vitro で SCI および non-SCI 由来ストローマ細胞を分離培養し、造血幹細胞

図4 SCI, non-SCIストローマ細胞によるin vitroでの造血支持現象



との共培養により造血支持機能を観察した(図4)。SCI由来ストローマ細胞では、non-SCI由来ストローマ細胞で矢印に示す造血細胞集団の形成は認めない。

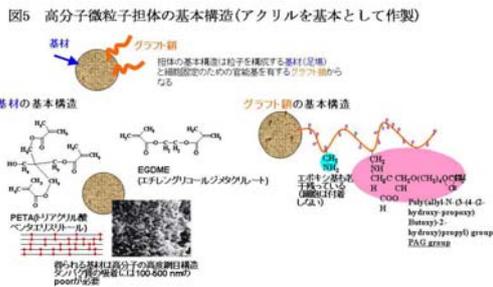
③正常ストローマ細胞移植による造血機能回復の検討

上記実験で得られた造血細胞集団を、ストローマ細胞と共に放射線照射SCIマウスに移植を行なった。その結果造血細胞のみの移植では回復できなかったSCIにおいて、ストローマ細胞を同時移植することで造血回復が認められ、新規治療法としてストローマ細胞移植の技術開発の重要性が示唆された。

(3)人工骨髄開発のための造血微小環境構築の可能性についての検討

①人工造血微小環境の開発

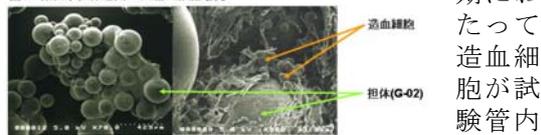
ストローマ細胞機能の検討を基に、人工骨髄開発を目的に、造血微小環境の試験管内構築を試みた。このため造血支持機能を有する人工造血微小環境として、アクリルを基本とした図5に示す高分子微粒子担体を合成した。



②高分子微粒子担体を用いた造血細胞培養

新規に作製した微粒子担体に骨髄由来ストローマ細胞を接着させた培養系を開発し、同時に培養した造血細胞の増殖・分化について経時的に観察した。その結果、造血細胞は図6に示すようにストローマ細胞が付着した担体の隙間に潜り込むようにして増殖し、長期にわたって造血細胞が試験管内

図6 微粒子担体を用いた造血細胞培養



で維持されていることが確認された。

(4)まとめと展望

①今回の研究により、造血細胞増殖・分化にストローマ細胞などより構成される造血微小環境が重要な役割を果たしていることが確認された。

②ストローマ細胞は造血因子産生、細胞間の直接接触を介して造血細胞増殖・分化を制御している。

③造血組織においてストローマ細胞は造血細胞を取り囲むように存在し、造血細胞巣が形成される。

④ SCI マウスではストローマ細胞の特に造血因子産生能が低下していることより造血

異常、貧血状態を発生している。

⑤正常ストローマ細胞を移植することによりSCIの造血異常の回復に成功した。

⑥以上より人工骨髄開発のためには正しい造血微小環境を作成する必要がある。

⑦本研究で開発した高分子微粒子担体を応用することにより、人工的造血微小環境開発の可能性が示唆された。今後は臨床応用も視野に、より安全、効率的な培養素材の開発が必要と考える。

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 10 件)

1. Tsuboi I., Hirabayashi Y., Harada T., Hiramoto M., Kanno J., Inoue T., Aizawa S. Predominant regulation of B-cell lineage, instead of myeloid lineage, of the bone marrow after 1 Gy whole-body irradiation in mice: Role of differential cytokine expression between B-cell stimulation by IL10, Flt3 ligand and IL7 and myeloid suppression by GM-CSF and SCF. *Rad Res* (査読有)170; 15-22, 2008
2. Tsuboi I., Hirabayashi Y., Harada T., Koshinaga M., Kawamata T., Kanno J., Inoue T., Aizawa S. Role of hematopoietic microenvironment in prolonged impairment of Bcell regeneration in age-related stromal-cell-impaired (SCI) SAMP1 mouse: Effects of a single dose of 5-fluorouracil. *J Appl Toxicol* (査読有) 28; 797-805, 2008
3. Maruyama D., Watanabe T., Heike Y., Nagase K., Takahashi N., Yamasaki S., Waki F., Kobayashi Y., Aizawa S., Tobinai K. Stromal cells in bone marrow play important roles in pro-inflammatory cytokine secretion causing fever following bortezomib administration in patients with multiple myeloma. *Int J Hematol* (査読有) 88; 396-402, 2008
4. Minami A., Tsuboi I., Harada T., Fukumoto T., Hiramoto M., Koshinaga M., Hirabayashi Y., Kanno J., Inoue T., Aizawa S. Inflammatory biomarker, neopterin, suppresses B-lymphopoiesis for possible facilitation of granulocyte responses, which is

- severely altered in age-related stromal-cell-impaired mice, SCI/SAM. *Exp Bio Med* (査読有) 232; 134-145, 2007
5. Nakamura T., Maeda T., Kobayashi D., Sugiura S., Aizawa S., Yabuuchi H., Tamai I. Decreased proliferation and erythroid differentiation of K562 cells by depression of OCTN1 (SLC22A4) transporter gene by sRNA. *Pharm Res* (査読有) 24; 1628-1635, 2007
 6. Harada T., Tsuboi I., Yuda M., Wakasugi K., Aizawa S. In vitro effect of neopterin on splenic mast cell development in senescence accelerated mice (SAM). *Pteridines* (査読有) 18; 101-105, 2007
 7. Aisaki K., Aizawa S., Fujii H., Kanno J., Kanno H. Glycolytic inhibition by mutation of pyruvate kinase gene increases oxidative stress and causes apoptosis of a pyruvate kinase deficient cell lines. *Exp Hematol* (査読有) 35; 1190-1200, 2007
 8. Kanno H., Utsugisawa T., Aizawa S., Koizumi T., Aisaki K., Hamada T., Ogura H., Fujii H. Transgenic rescue of hemolytic anemia due to red blood cell pyruvate deficiency. *Haematologica* (査読有) 92; 731-737, 2007
 9. Kanbe E., Hata Y., Tsuboi I., Harada T., Koshinaga M., Inoue T., Aizawa S. Effects of neopterin on the hematopoietic microenvironment of senescence-accelerated mice (SAM). *Biol Pharma Bull* (査読有) 29; 43-48, 2006
 10. Fukumoto T., Tsuboi I., Harada T., Hiramoto M., Minami A., Koshinaga M., Hirabayashi Y., Kanno J., Inoue T., Aizawa S. Inflammatory biomarker, neopterin enlarges splenic mast-cell-progenitor pool: prominent impairment of responses in age-related stromal cell-impairment mouse SCI/SAM. *Int Immunopharmacol* (査読有) 6; 1847-1858, 2006
- [学会発表] (計 16 件)
1. 原田 智紀、壺井 功、大島 秀規、相澤 信 放射線照射後の造血微小環境はサイトカイン産生を介してB細胞造血の回復を促進する 第114回日本解剖学会総会 岡山 2009. 3
 2. 湯田 幸、相澤 信、原田智紀、壺井 功、平林幸生、八田善弘、竹内 仁、安田昌弘 高分子微粒子担体へのストローマ細胞の三次元的固定化とその造血支持特性 第70回日本血液学会 京都 2008. 10
 3. 壺井 功、原田智紀、平林容子、菅野 純、井上 達、相澤 信 加齢に伴う造血微小環境の機能低下は 5-fluorouracil投与後のB細胞産生を遅延さす 第70回日本血液学会 京都 2008. 10
 4. 原田智紀、壺井 功、大島秀規、越永守道、若杉和倫、相澤 信 赤血球造血に対するネオプテリンの効果 日本プテリジンカンファレンス、サイトカイン・ネオプテリン研究会 第4回連合研究発表会 東京 2008. 7
 5. 壺井 功、原田智紀、平林容子、菅野 純、井上 達、相澤 信 SAMP1 加齢に伴う造血微小環境の機能低下は 5-fluorouracil投与後のB細胞産生を遅延さす第23回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会 京都 2008. 7
 6. 壺井 功、平林容子、原田智紀、児玉幸夫、菅野 純、井上 達、相澤 信 加齢に伴う造血微小環境の機能低下は抗癌剤後のB細胞造血を遅延させる 第35回日本トキシコロジー学会 東京 2008. 6
 7. 原田智紀、壺井 功、大島秀規、越永守道、相澤 信 加齢に伴う造血微小環境の機能低下は抗癌剤投与後のB細胞産生を遅延さす。第113回日本解剖学会総会 大分 2008. 3
 8. 壺井 功、原田智紀、平林容子、菅野 純、井上 達、相澤 信 ネオプテリンのストローマ細胞を介する肥満細胞造血制御 第69回日本血液学会総会 横浜 2007. 10
 9. 原田智紀 壺井 功 大島秀規 越永守道 相澤 信 肥満細胞造血に対するネオプテリンの効果 日本プテリジンカンファレンス、サイトカイン・ネオプテリン研究会 第3回連合研究発表会 東京 2007. 7
 10. 壺井 功、原田智紀、平林容子、菅野 純、井上 達、相澤 信 SAM-P1 加齢に伴いB細胞造血は造血間質細胞のIL-7 と TGF- β の産生低下により抑制的平衡状態へ移行する 第22回老化促進モデルマウス研究協議会 酒田 2007. 7
 11. 壺井 功、原田智紀、平林容子、菅野 純、井上 達、相澤 信 加齢に伴う造血間

- 質細胞の機能低下による炎症時の肥満細胞造血反応は低下する 第30回日本基礎老化学会総会 札幌 2007. 6
12. 原田智紀、壺井 功、越永守道、相澤 信
ネオプテリンの肥満細胞造血に対する影響 第112回日本解剖学会総会 大阪 2007. 3
 13. 原田智紀、神戸栄美子、八田善弘、壺井功、相澤 信、前田智司、玉井郁巳
造血細胞分化における有機カチオントランスポーターOCTN1 発現と意義 第68回 日本血液学会 福岡 2006. 10
 14. 南明宏、原田智紀、壺井 功、相澤 信
ネオプテリンはストローマ細胞のサイトカイン産生を介してB細胞造血を抑制する 第471回日大医学会例会 東京 2006. 9
 15. 福元俊孝、原田智紀、壺井 功、相澤 信
ネオプテリンはストローマ細胞のサイトカイン産生を介して脾臓の肥満前駆細胞の貯蔵プールを増大させる 第471回日大医学会例会 東京 2006. 9
 16. 原田智紀、壺井 功、相澤 信
ネオプテリンはストローマ細胞のサイトカイン産生を介してB細胞造血を抑制する 日本プテリジンカンファレンス、サイトカイン・ネオプテリン研究会 第2回連合研究発表会 東京 2006. 7

(3)連携研究者
無し

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：造血幹細胞の培養方法

発明者：相沢 信、原田 智紀、安田 昌弘

権利者：公立大学法人大阪府立大学、学校法人日本大学

種類：特許

番号：2009-074133

出願年月日：平成 21 年 3 月 25 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ情報：

<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/KA/0004682/profile.html>

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