

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06846

研究課題名(和文)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支持機能

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：造血微小環境を構成する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。in vivo、in vitroの両面からの様々な検証によりこれら作用が確認され、ストローマ細胞、特にマクロファージの量的、質的機能障害が、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った。本研究により、血液細胞を育てる「正しい畑を構築する」という観点からの造血器障害治療に対する新たな展開の可能性が示唆される結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は造血を行ういわば「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様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の面からも検証したものである。これによりストローマ細胞による造血制御機構を解明し、「種」である造血細胞を育てるための「正しい畑を構築する」という観点から、今後人工骨髄の開発なども含めて白血病などの難治性造血器疾患に対する新規治療法の開発の可能性が示唆された研究である。

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, especially macrophages, in hematopoietic microenvironment and the qualitative and quantitative impairment of stromal cells may result in the hematopoietic disorders.

研究分野：造血発生学

キーワード：細胞・組織 老化促進マウス 骨髄ストローマ細胞 造血微小環境 マクロファージ 三次元骨髄培養  
サイトカイン 細胞周期

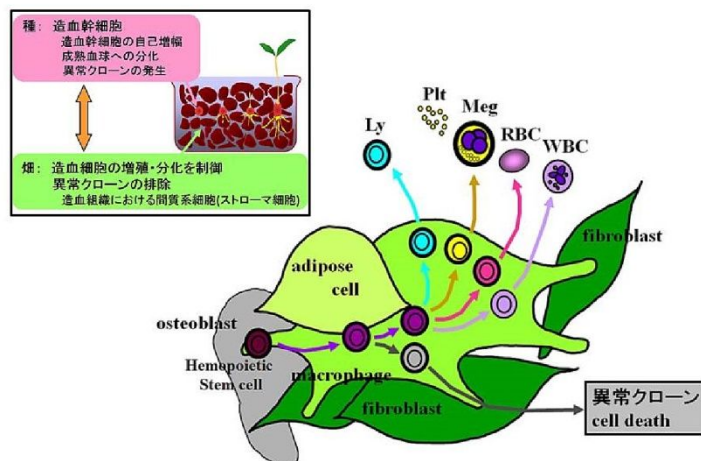
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

赤血球、白血球、血小板などのヒト血球細胞は寿命があり、常に新しい血球が産生されると共に古くなった血球は主に脾臓において処理され、恒常性が維持されている。このため成人では造血組織である骨髄で毎日数千億個の血液細胞が造血幹細胞より増殖・分化して産生されており、「造血現象」として理解されている。この造血現象は、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(図1)。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、種である造血細胞の増殖・分化を促進する(造血刺激)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により、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。

図1 造血のメカニズム(造血微小環境)

ストローマ細胞による造血幹細胞の増殖・分化と異常クローンの排除



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老化促進マウス(Senescence-accelerated mice: SAM)と呼ばれるモデルマウスが見つけた。このマウスは、AKR系マウスの変異型であり正常マウスに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。

### 2. 研究の目的

造血幹細胞(種)と畑である造血微小環境構成細胞(ストローマ細胞)間においては、お互いが関連しあいながら総合的に造血現象が維持されていると推測されている。本研究は特に「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SAMを用いて正常マウスと比較検討することによる in vivo 研究面より、さらに本研究者が新規に開発し、生体における造血現象を再現する三次元培養法を用いて in vitro 研究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 *in vitro*、*in vivo* 両面よりストローマ細胞の造血制御機序について検討を行った。

まず *in vitro* からのアプローチとしての三次元(3D)培養系においては、三次元構造構成の基礎となるエポキシ基を含む親水性高分子としてグラフト鎖を有する高分子微粒子担体：Pentaerythritol-triacrylate(PETA)-Ethylene glycol-di(methacrylate)(EGDMA) と Methacrylic-acid(MA)-glycidyl methacrylate(GMA) をグラフト共重合させた基本骨格の G-2 粒子(粒径約 200 $\mu$ m)を設計した。ストローマ細胞をこの高分子微粒子と共に培養すると、微粒子担体上にストローマ細胞が付着しながら発育し、粒子間を架橋しながら三次元プラットフォーム構造を構築する。さらにこの培養系に骨髓造血組織より分離した造血幹細胞を播種して共培養すると、ストローマ細胞が構成した三次元の「家」に潜りこむように幹細胞が定着し、増殖・分化をしながら恒常的な血球産生が再現されるのが観察される(図2)。しかしながら新鮮な骨髓資料を常に安定して入手することは困難であることより、ストローマ細胞としてマウス骨髓線維芽細胞株 MS-5 を、また造血細胞としてヒト骨髓由来 K562 細胞を使用して、同様の方法で三次元構成ストローマ細胞機能特性の検討も行った。K562 細胞は単独培養では浮遊細胞として増殖し、二次元(2D)平面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。このような培養系に対して、細胞の増殖・分化に重要なアミノ酸である arginine の非存在下培養、あるいは K562 細胞の強制分化誘導因子である butyrate を添加した培養系を作製し、このようなストレス環境を設定することによりストローマ細胞の造血細胞への制御機能、恒常性維持機能を 2D、3D 比較実験より検討した。

次に *in vivo* からのアプローチとして、本研究者らが見出したストローマ細胞機能異常を有する老化促進 SAM マウスと正常マウスとの比較実験を行うことにより、生体内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)の可能性を検討した。造血微小環境の *in vivo* での解析方法の一つとして、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検証を行った。この際に恒常的造血状態を観察すると共に、炎症誘導因子としての LPS 刺激に対する急性期造血反応を検討することにより、より造血制御機構がより正しく機能しているかを確認することができる。マクロファージには組織内で、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とに分化し、様々な病態形成にかかわっていることが知られている。本研究ではこれらマクロファージの亜群の分布状況と機能変化について免疫組織学的、あるいは造血因子産生等の機能の面などから検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 3D 培養系におけるストローマ細胞機能

MS-5 細胞をストローマ細胞として、K562 細胞を造血細胞として構築した培養モデルを用いて *in vitro* 実験を行った。Arginine 無添加、あるいは butyrate 添加による K562 細胞の強制分化誘導条件下で、2D、3D 共培養系におけるストローマ細胞の影響を検討した。arginine は K562 細胞の赤血球系への分化において必須のアミノ酸であり、arginine 無添加ではストローマ非存在下あるいは 2D 培養での培養時には K562 の分化は認めない。しかしながら 3D 培養時には arginine 無添加においても K562 細胞は分化が可能であることが明らかとなった(図3)。一方、arginine の存在下であれば butyrate 添加によりストローマ非存在下や 2D 培養でも K562 細胞の分化が誘導されるが、3D 培養では逆に分化誘導される K562 細胞比率は arginine 存在、非存在下にかかわらず一定していることが観察された(図3)。このことは、同じストローマ細胞(MS-5 細胞)であっても、3D 培養という生体に近い培養条件下ではストレスから造血細胞(K562 細胞)を

図2 高分子微粒子上に発育したストローマ細胞と造血幹細胞(CD34陽性細胞) ストローマ細胞は粒子間に架橋しながら三次元プラットフォーム構造を構築する。造血幹細胞はこのような三次元の「家」に定着し増殖分化をしながら恒常的な血球産生を行っている。

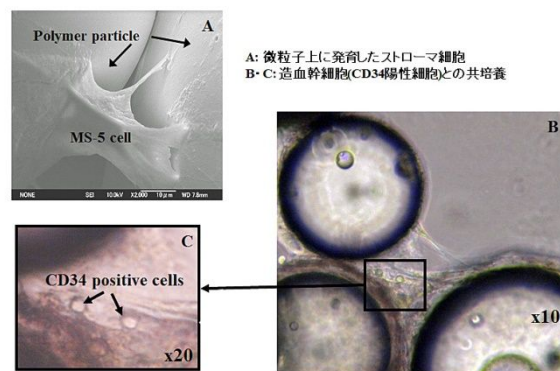


図3 K562細胞の赤血球系への分化

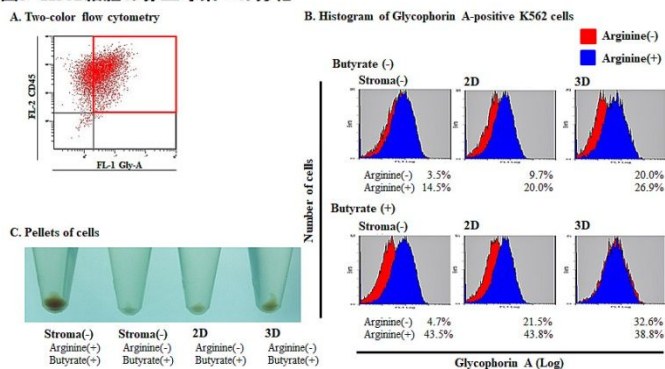
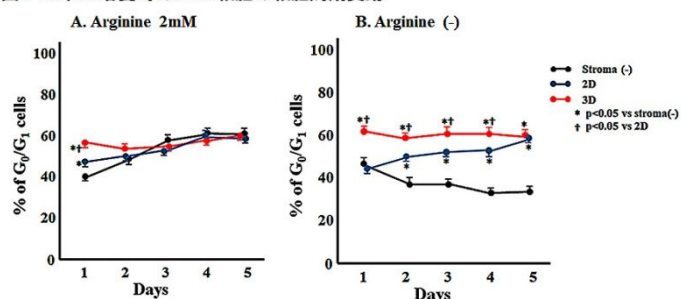
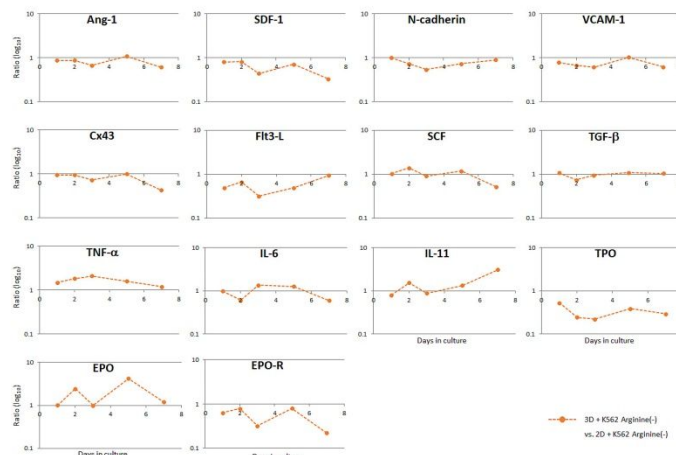


図4 2D、3D培養時のK562細胞の細胞周期変動



守るように、また常に一定して増殖・分化が行われるように制御していることを示すものと考えられる。事実、arginine 存在下、非存在下における K562 細胞の細胞周期を測定してみると、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 培養時では逆に 50%以上の細胞が休止期細胞であった。また 2D 培養時では 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)。2D、3D 培養におけるストローマ細胞機能の差について検討する目的で、サイトカイン産生機能について mRNA 発現を指標に測定した(図 5)。造血因子であり、K562 を含めて造血細胞分化に関係する 14 種のサイトカイン産生レベルを検討した結果、2D、3D 培養条件下でストローマ細胞の mRNA 発現状態に有意の差は認めなかった。これら結果より 3D 培養と 2D 培養では同じストローマ細胞を使用し、サイトカイン産生機能に明らかな差を認めないにもかかわらず造血細胞である K562 の増殖・分化に対しての制御が異なることは、三次元的物理的空間の存在、細胞間の接触状態など様々な複数の因子が関与していることが推測された。

図5 2D・3D培養系ストローマ(MS-5)よりのサイトカイン産生変化

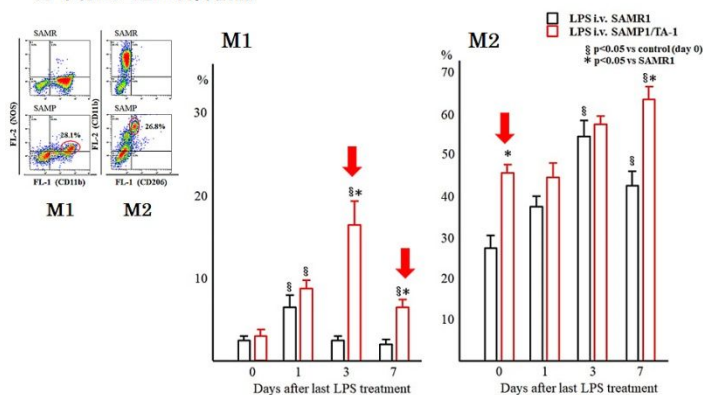


(2) in vivo におけるストローマ細胞の構成様式と機能

造血微小環境の構成様式を検討する目的で、骨髄内の M1、M2 マクロファージの分布について、恒常時と LPS 刺激によるストレス下での正常マウスと SAM とで比較観察を行った。

SAM では正常マウスと比較して、もともと M1 あるいは M2 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不均衡があり、特に M2 がもともと有意に増加していることが判明した(図 6)。さらに LPS 刺激後には正常マウスと比較して、SAM では M1 が増加した状態が遷延していることが明らかとなった。M2 は LPS 刺激後に正常マウスと比較して後れて有意の増加が認められるが、M1 の増加遷延状態に伴うように 7 日目でも増加傾向が続い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

図6 SMP1/TA-1における造血組織内でのM1,M2マクロファージの分布様式と造血制御機能

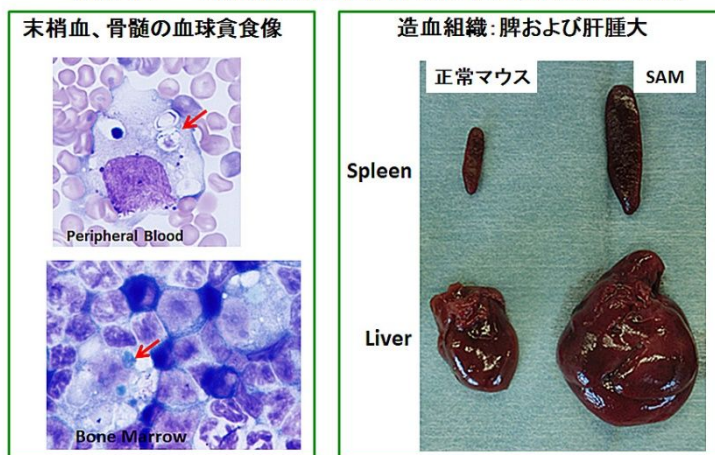


M1マクロファージの遷延とM2による抑制系の亢進 これらマクロファージの暴走によるサイトカインストームにより造血非制御状態化

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不均衡があり、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顕著な変化が生じ、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。

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、正常マウスと SAM を比較検討した。25μg/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 SAM 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。また SAM 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

図7 in vivo 個体に対しLPS 投与後のSAMの反応(造血破綻) hemophagocytic lymphohistiocytosis (過剰な炎症反応) 汎血球減少と無効造血 骨髄ストローマ細胞の無制御なサイトカイン産生(例:SDF1とTNFα)



末梢血、骨髄の血球貪食像

造血組織：脾および肝腫大

正常マウス SAM

Spleen

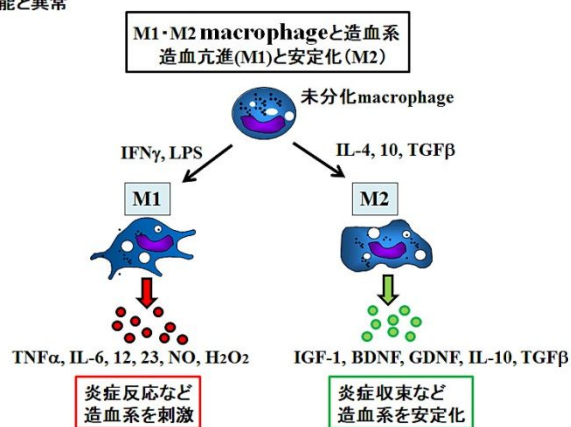
Liver

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SAMでは繰り返しLPS投与により著しい脾腫、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、さらに血球貪食が活性化されている所見が観察された(図7)。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。これら結果より、SAMではストローマ細胞の存在形式と機能維持が、サイトカイン産生等を介して造血の恒常性の維持に深くかかわっていることが明らかとなった。

本研究により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う重要な要素であることが確認された。特に *in vivo*、*in vitro* の両面からの様々な検証によりこれら作用の具体的一面が明らかとなり、ストローマ細胞、特に骨髄マクロファージ機能の量的、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初めて明らかとなった(図8)。このことは個々のストローマ細胞が固有の機能を持って造血制御を行っていることを初めて証明した結果でもある。

本研究成果をさらに発展させ、人工骨髄の作製も念頭に、ストローマ細胞非存在下でも培養が継続できるように、より機能的なバイオリアクターとしての高分子微粒子担体を開発するため、糖鎖、あるいはタンパクなどを粒子に付加する修飾方法、ナノサイズの微粒子作製方法の開発を試行中であり、今後の造血器障害治療の新たな展開の可能性について検討を行っている。

図8 stromal cell impairment mice (SAMP)の造血組織におけるM1・M2 macrophageの機能と異常



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuboi I., Harada T., Hirabayashi Y., Aizawa S.	4. 巻 104
2. 論文標題 Senescence-accelerated mice (SAMP1/TA-1) treated repeatedly with lipopolysaccharide develop a condition that resembles hemophagocytic lymphohistiocytosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 1995-2005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2018.209551.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hino H., Iriyama N., Kokuba H., Kazama H., Moriya S., Takano N., Hiramoto M., Aizawa S., Miyazawa K.	4. 巻 111
2. 論文標題 Abemaciclib induces atypical cell death in cancer cells characterized by formation of cytoplasmic vacuoles derived from lysosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 2132-2145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuboi I., Harada T., Hirabayashi Y., Aizawa S.	4. 巻 99
2. 論文標題 Dynamics of hematopoiesis is disrupted by impaired hematopoietic microenvironment in a mouse model of hemophagocytic lymphohistiocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Hematol	6. 最初と最後の頁 1515-1523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-020-04095-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Harada T., Tsuboi I., Utsunomiya M., Yasuda M., Aizawa S.	4. 巻 130
2. 論文標題 Kinetics of leukemic cells in 3D culture with stromal cells and with arginine deprivation stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biosci Bioeng	6. 最初と最後の頁 650-658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.07.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Harada T, Tsuboi I., Aizawa S
2. 発表標題 Chemosensitivity study in a model of simulated bone marrow: three-dimensional culture system
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田智紀、相澤信
2. 発表標題 造血制御システムの破綻と老化
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田智紀、壺井功、相澤信
2. 発表標題 LPS投与頻回により老化促進モデルマウス（SAMP1/TA-1）は血球貪食性リンパ組織球症様病態像を呈する
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田智紀、壺井功、日野浩嗣、内藤美智子、原弘之、相澤信
2. 発表標題 LPS投与による血球貪食性リンパ組織球症様病態像モデルマウス
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田智紀、壺井功、日野浩嗣、内藤美智子、原弘之、相澤信
2. 発表標題 Hematopoietic tissue is one of the organs that suffer lifethreatening damage in HLH
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関