

令和 3 年 8 月 22 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07182

研究課題名(和文)脾臓髄外造血制御とその破綻の分子機構解明と造血幹細胞培養系の確立

研究課題名(英文) Disruption of splenic extramedullary hematopoiesis leads to myeloproliferative disorders

研究代表者

小田 朗永(Oda, Akihisa)

奈良県立医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：80547703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脾臓髄外造血は感染や慢性炎症、白血病などの外的ストレスにより誘導される。これまでに申請者らは、脾臓間葉系前駆細胞におけるTlx1の発現制御がこの脾臓髄外造血を直接コントロールしている事を明らかにした。今回申請者らは、脾臓間葉系前駆細胞特異的にTlx1を過剰発現させた(すなわち脾臓髄外造血制御機構を破綻させた)マウスは、肝臓及び肺への単球の浸潤を伴う白血病様症状を呈する事を明らかにした。これまで脾臓髄外造血は慢性疾患(白血病、感染、貧血等)の二次的な病態であるとの認識であったが、脾臓髄外造血制御の破綻により脾臓微小環境が白血病ニッチへと変化し、病態悪化に直接的に関与している事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで脾臓髄外造血は慢性疾患の二次的な病態であるとの認識であったが、長期にわたる慢性的な脾臓髄外造血、すなわち脾臓髄外造血制御の破綻は、骨髄増殖疾患の発症に関与している事を明らかにした。またTlx1を発現上昇した脾臓微小環境は、造血制御因子の増加を伴う白血病ニッチへと変化し、白血病の病態悪化に直接的に関与している事を明らかにした。さらに明らかにするべきは、白血病細胞がTlx1発現を上昇させるシグナルを同定し、脾臓ニッチと骨髄造血ニッチとの間の相互作用メカニズムについて追求する事である。これらの研究を継続し完遂できる環境を再度得られる様に努力したい。

研究成果の概要(英文)：Splenic extramedullary hematopoiesis (EMH) is induced by infection, chronic inflammation, and leukemia. Previously, we showed that the regulation of Tlx1 expression in splenic mesenchymal progenitor cells directly regulates EMH. However, whether there are some specific pathophysiological roles of spleen microenvironment in hematopoietic malignancies are largely unknown. In this study, we found that mice that keep to overexpress Tlx1 specifically in splenic mesenchymal progenitor cells exhibited leukemia-like symptoms with monocyte infiltration into the liver and lungs. Although EMH in the spleen was previously thought to be a secondary pathological process in chronic diseases so far, we showed here that the splenic microenvironment can provide the suitable micro-environment (a leukemic niche) for leukemic cells by the upregulation of Tlx1, leading to leukemia development and bad prognosis.

研究分野：免疫学

キーワード：脾臓微小環境 Tlx1 脾臓髄外造血 骨髄性増殖疾患 白血病ニッチ 間葉系細胞

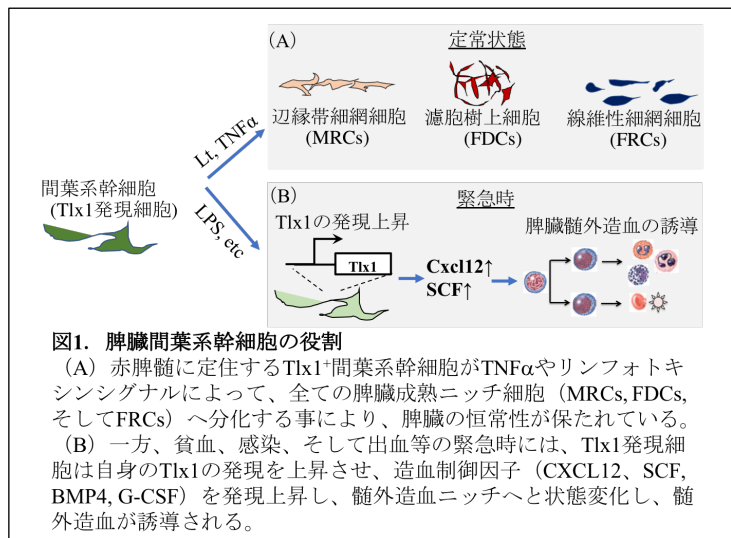
1. 研究開始当初の背景

申請者の前所属研究室（東京理科大学生命医科学研究所 後飯塚僚教授）は、脾臓原基形成に必須である転写因子である Tlx1 (T cell leukemia homeobox1) に着目し、Tlx1 を発現している細胞 (Tlx1+細胞) を追跡可能なレポーターマウスを作製した。Tlx1 の第一エキソンに CreER-ires-Venus カセットを導入する事により、Tlx1 発現細胞を Venus の蛍光及びタモキシフェン依存的に Cre 組換え酵素の活性を誘導可能なマウスである。申請者らはこの Tlx1creER-Venus マウスを用いて脾臓における Tlx1 発現細胞の局在や性状を明らかにしてきた。

Tlx1+細胞は脾臓にて CD45, Ter119, CD31 陰性の分画に検出され、CD51, CD105, PDGFRα/β, CD44 を細胞表面に発現する。そして Tlx1+細胞は *in vitro* で脂肪細胞、骨芽細胞ならびに軟骨芽細胞への分化能を有していることから間葉系幹細胞の特性を有している細胞集団であった。Tlx1+細胞の生体脾臓での役割を明らかにするために、胎児期、新生児期、そして成体期の Tlx1+細胞をマークし細胞系譜解析を行った。Tlx1+細胞は白脾髄 B 細胞領域を支持している濾胞樹状細胞、T 細胞領域を支持している線維性網状細胞、そして辺縁隊構造を維持している辺縁網状細胞への分化能を有し、これら脾臓微小環境を構成するストローマ細胞を絶えず供給する事で、脾臓全体の機能・構造の維持を支持していた (図 1-(A))。

一方で、炎症、出血、そして感染時等の緊急時には脾腫を伴う髄外造血が誘導される事が知られている。全身性感染モデルである LPS をマウスへ投与した時の Tlx1+細胞の動態について解析した所、Tlx1+細胞は赤脾髄から辺縁帯周囲に局在を変化させ、その場所で造血幹・前駆細胞と共局在していた。この時 Tlx1+細胞内では Tlx1 mRNA が増加している事を見出した。この Tlx1 発現量増加の意義を調べる為、Tlx1 発現細胞特異的に Tlx1 欠損可能な *Tlx1^{CreER-Venus/flox}* (CKO) マウスを作製し、タモキシフェン (Tx) 投与後 LPS を投与した所、CKO マウスにおいて脾臓髄外造血が完全に抑制された。これは Tlx1 の発現上昇に伴う Tlx1 発現細胞の増殖、CXCL12 や SCF 等の造血制御因子の発現上昇、そして辺縁帯周囲への局在変化が Tlx1 欠損によってキャンセルされている事に起因すると考えられる。脾臓髄外造血が Tlx1 発現上昇によるものなのかを調べるため、*Tlx1^{CreER-Venus}; Rosa26-Tlx1* (Tg) マウスを作製した。Tg マウスへ Tx によって Tlx1 過剰発現を誘導すると、Tlx1+細胞は増殖し、CXCL12、SCF、G-CSF、Angiopoietin 等の造血制御因子の発現を増加させ、さらに LPS 刺激時と同様に Tlx1 発現細胞は辺縁帯周囲に局在を変化させた。同時に造血幹・前駆細胞は、

骨髄から血中に動員され、脾臓へ優先的に移行し、増殖・分化を亢進した。さらに辺縁帯周囲で Tlx1 発現細胞と造血幹・前駆細胞は直接相互作用していた。従って、Tlx1 発現細胞で Tlx1 の発現を上昇させるだけで、脾腫を伴う脾臓髄外造血が誘導される事を明らかにした (図 1-(B))。



2. 研究の目的

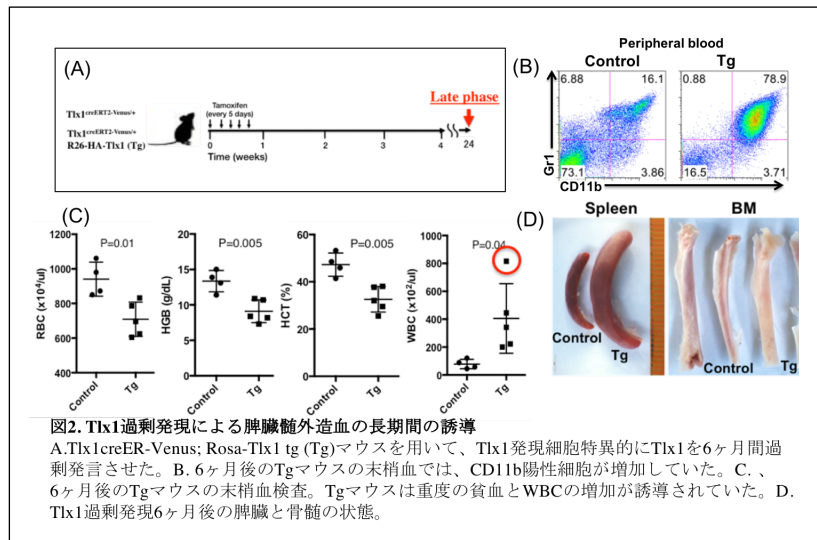
白血病などの骨髄増殖性疾患において、脾腫は二次的な病態として認識されている。そもそも脾腫や脾臓微小環境が、骨髄増殖性疾患に及ぼす影響についてはこれまで殆ど理解されていない。我々は $Tlx1^{CreER-Venus}; Rosa26-Tlx1$ (Tg) マウスを用いて $Tlx1$ 発現細胞特異的に $Tlx1$ 過剰発現を長期誘導した時の解析において、重度の貧血と末梢血中に自立増殖性を有する白血球が増加する事を観察した事から、本申請研究は、慢性的な脾臓髄外造血が白血病の発症と病態の進行に与える影響について検討する事を目的とした。

3. 研究の方法

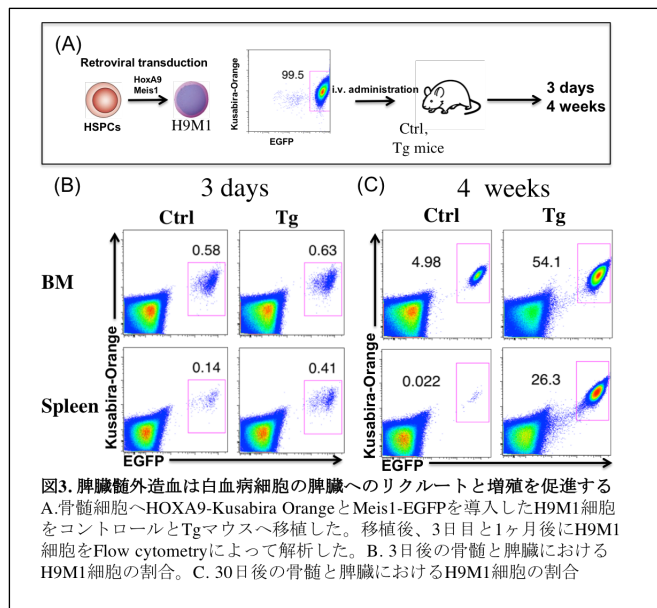
- (1) $Tlx1$ 発現細胞特異的に $Tlx1$ 過剰発現可能な $Tlx1^{CreER-Venus}; Rosa26-Tlx1$ (Tg) マウスへタモキシフェンを投与し、その6ヶ月後の脾臓、骨髄、そして末梢血の状態を解析した。
- (2) AML 白血病細胞株である H9M1 細胞をコントロールマウスと Tg マウスへ移植し、3日後と1ヶ月後の白血病の状態を解析した。さらに H9M1 細胞を移植したコントロールマウスと Tg マウスの生存について検討した。逆に、脾臓摘出をしたマウスへ H9M1 細胞を移植し、コントロールマウスと脾臓摘出マウスの生存についても検討した。
- (3) $Tlx1$ 発現細胞特異的に $Tlx1$ 過剰発現可能な $Tlx1^{CreER-Venus}; Rosa26-Tlx1$ (Tg) マウスへタモキシフェンを投与後直後の骨髄、及び脾臓の間葉系幹細胞における造血制御因子 (CXCL12, SCF) の遺伝子発現を解析した。

4. 研究成果

- (1) $Tlx1$ 発現細胞特異的に $Tlx1$ 過剰発現可能な $Tlx1^{CreER-Venus}; Rosa26-Tlx1$ (Tg) マウスへタモキシフェン投与6ヶ月後の解析において、我々は Tg マウスが骨髄性白血病様の表現型を呈することを見出した (図



2-A)。Tg マウスでは、重度の貧血と末梢血中の白血球数が増加しており (図 2-C)、脾腫と白色骨髄を呈していた (図 2-D)。HE 染色では、Tg マウス脾臓において、白脾髄の構造が壊れ、骨髄は巨核球と赤芽球の消失、肝臓に myeloid 系細胞の浸潤を確認した (Data not shown)。フローサイトメトリーによって、Tg マウスの末梢血中で増加している細胞は、異常な核を有する $CD11b$ 陽性の myeloid 系の細胞集団であった (図 2-B)。この長期 $Tlx1$ 過剰発現マウスの骨髄または脾臓細胞を別マウスへ移



植すると、移植マウスでも同様の表現型が再現された (Data not shown)。従って、慢性的な脾臓髄外造血、すなわち脾臓髄外造血制御の破綻によって、骨髄性増殖疾患が発症する事を明らかにした。

(2) 次に脾腫を伴う脾臓髄外造血と白血病細胞との関係について検討するため、骨髄細胞へ Meis1 と HOXA9 をレトロウイルス導入した AML 白血病細胞株である H9M1 細胞

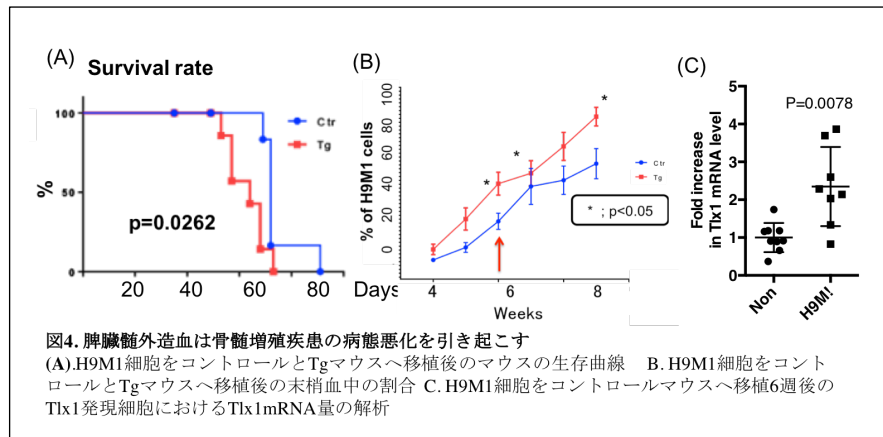


図4. 脾臓髄外造血は骨髄増殖疾患の病態悪化を引き起こす (A). H9M1細胞をコントロールとTgマウスへ移植後のマウスの生存曲線 B. H9M1細胞をコントロールとTgマウスへ移植後の末梢血中の割合 C. H9M1細胞をコントロールマウスへ移植6週後のTlx1発現細胞におけるTlx1 mRNA量の解析

細胞を使用し、コントロールマウスと Tg マウスへ移植した (図 3-A)。H9M1 細胞は、EGFP と mKusabira-Orange の蛍光によって正常細胞との区別が可能である。移植後 3 日目の解析において、H9M1 細胞はコントロール、Tg マウス共に同程度の頻度で骨髄にリクルートされている。一方で Tg マウス脾臓ではコントロールよりも有意に高い割合で H9M1 細胞がリクルートされていた (図 3-B)。H9M1 細胞移入後 30 日目の解析において、

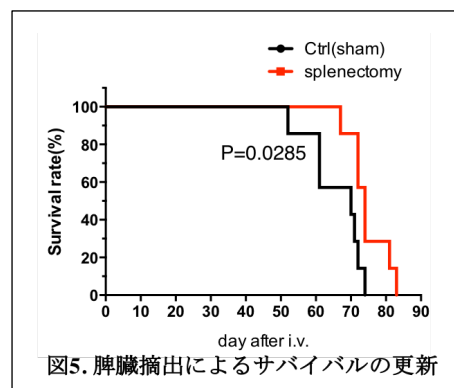


図5. 脾臓摘出によるサバイバルの更新

コントロールマウスでは骨髄のみで H9M1 細胞の増殖が確認できるのに対し、Tg マウスでは脾臓、さらに骨髄でも H9M1 細胞は有意に高い割合を示し (図 3-C)、血中にも流入していた。

さらに H9M1 細胞を移植した Tg マウスはコントロールと比較してサバイバルが有意に悪化した (図 4-A)。末梢血中の H9M1 細胞の割合に関しても、Tg マウスではコントロールよりも有意に増加しており、早期に白血病を発症していた (図 4-B)。しかし、6 週までに確認できる Tg マウスの有意な病態悪化は、6 週から 7 週にかけてのコントロールマウスの追い上げによって縮まっていた (図 4-B)。そこでコントロールマウスに着目し、移植後 6 週における Tlx1 発現細胞における Tlx1 発現を確認した所、Tlx1 の発現上昇が誘導されていた (図 4-C)。すなわち白血病進行の過程で、コントロールマウスにおいても、未知の機序によって脾臓 Tlx1 発現細胞における Tlx1 発現上昇が誘導されていた。興味深い事に、Tlx1 発現細胞における Tlx1 発現上昇に伴い CXCL12 と SCF の mRNA 量も増加しており (Data not shown)、コントロールマウスにおける病態悪化と相関していた。さらに脾臓摘出を施したマウスへ H9M1 細胞を移植した所、コントロールと比較して有意に死亡率が低下した。(図-5)。

(3) 次に脾臓髄外造血が骨髄微小環境へ与える影響について検討した。Tg マウスにおいて、Tlx1 過剰発現直後から、骨髄間葉系細胞における CXCL12 の発現が低下する事 (図 6-A)、同様に SCF に関しては、成体脾臓で高発現する事(図 6-B)を明らかにした。

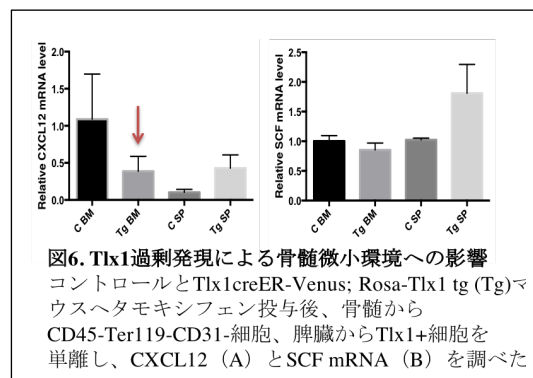


図6. Tlx1過剰発現による骨髄微小環境への影響 コントロールとTlx1creER-Venus; Rosa-Tlx1 tg (Tg)マウスへタモキシフェン投与後、骨髄からCD45-Ter119-CD31-細胞、脾臓からTlx1+細胞を単離し、CXCL12 (A)とSCF mRNA (B)を調べた

以上の結果より、脾臓髄外造血制御の破綻は骨髄増殖疾患発症に関与する事、そして脾腫を伴う脾臓微小環境は、白血病細胞株の脾臓へのリクルートと増殖を促進する白血病ニッチとなることで、直接的に病態の悪化に関与している事を明らかとした。さらなる検証が必要であるが、脾臓髄外造血は骨髄微小環境の造血制御因子産生へ影響を与えている様である。これは脾臓髄外造血が骨髄増殖疾患発症に関与する大きな手がかりとなると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ueno Yuta, Fujisaki Keiko, Hosoda Shoko, Amemiya Yusuke, Okazaki Shogo, Notsu Chihiro, Nishiyama Chiharu, Mabuchi Yo, Matsuzaki Yumi, Oda Akihisa, Goitsuka Ryo	4. 巻 9
2. 論文標題 Transcription factor Tlx1 marks a subset of lymphoid tissue organizer-like mesenchymal progenitor cells in the neonatal spleen	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56984-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Oda A, Ueno Y, Hosoda S, Amemiya Y, Notsu C, Tezuka T, Kasahara T, Nishiyama C, Goitsuka R	4. 巻 29
2. 論文標題 Niche-induced extramedullary hematopoiesis in the spleen is regulated by the transcription factor Tlx1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-26693-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小田朗永、野上恵嗣、北畠正大、伊藤利洋、嶋緑倫
2. 発表標題 血友病Aインヒビター産生における脾臓微小環境の関与
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Hara, Masahiro Kitabatake, Noriko Ouji-Sageshima, Shota Sonobe, Natsuko Imakita, Ryutaro Furukawa, Akihisa Oda, Toshihiro Ito
2. 発表標題 The contribution of histone-lysine N-methyltransferase Setdb2 in high mortality of secondary bacterial pneumonia via regulating cytokines and chemokines in macrophages.
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihisa Oda, Keiko Fujisaki, Yuta Ueno, Chiharu Nishiyama, Ryo Goitsuka
2. 発表標題 The spleen serves as a specific microenvironment that support development of B-1a cells and LAG-3+ CD138+ natural regulatory plasma cells.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shoko Hosoda, Keiko Fujisaki, Yuta Ueno, Chiharu Nishiyama, Hei Haniuda, Akihisa Oda, Daisuke Kitamura, Ryo Goitsuka
2. 発表標題 Transcription factor Tlx1 regulates a niche for innate-like B cells in the spleen.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuka Amemiya, Chiharu Nishiyama, Akihisa Oda, Takuro Nakamura, Ryo Goitsuka
2. 発表標題 Abnormality in the splenic microenvironment is involved in the malignant transformation of acute myeloid leukemia.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会,
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuta Ueno, Chiharu Nishiyama, Akihisa Oda, Ryo Goitsuka
2. 発表標題 Transcription factor Tlx1 is involved in the postnatal splenic architectural maintenance in a non-cell autonomous manner.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小田朗永
2. 発表標題 脾臓髓外造血制御の破綻は骨髄増殖性疾患の発症に關与する.
3. 学会等名 第83回 日本インターフェロン・サイトカイン学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上野湧太, 小田朗永, 西山千春, 後飯塚僚
2. 発表標題 三次元培養法を用いた脾臓 Lymphoid tissue organizer like細胞の解析
3. 学会等名 第83回日本インターフェロン・サイトカイン学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小田朗永, 雨宮祐輔, 後飯塚僚
2. 発表標題 骨髄増殖性疾患発症における脾臓微小環境の役割
3. 学会等名 第28回学術集会Kyoto T cell conference
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 小田朗永	4. 発行年 2019年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 脾臓髓外造血と生体造血ニッチの変遷	

1. 著者名 小田朗永、後飯塚僚	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 2
3. 書名 成体脾臓における髄外造血ニッチとその構成要素	

〔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
---------	---------