

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16107

研究課題名（和文）赤芽球造血における骨髄微小環境の役割

研究課題名（英文）Role of bone marrow microenvironment for erythropoiesis

研究代表者

坂本 竜弘（Sakamoto, Tatsuhiro）

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：60815398

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）：これまで骨髄における造血を支持する骨髄微小環境において各血球系統特異的な微小環境は明らかになっていなかった。本研究により骨髄微小環境構成細胞の一種であるNestin発現細胞特異的にNotchシグナルが欠損させた遺伝子改変マウスの骨髄で赤芽球造血が特異的に障害されることを示した。また機序として、骨髄中の赤芽球島形成が障害され、赤芽球島を構成するマクロファージにおいてIL-6が過剰産生されていることを発見し、赤芽球島の形成障害及び赤芽球造血の障害が抗IL-6抗体の投与により改善することを示し、Stem Cell誌に論文を投稿し、掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで骨髄における造血を支持する骨髄微小環境において各血球系統特異的な微小環境は明らかになっていなかった。本研究により骨髄微小環境構成細胞の一種であるNestin発現細胞特異的にNotchシグナルが欠損させた遺伝子改変マウスの骨髄で赤芽球造血が特異的に障害され、骨髄中の赤芽球島形成が障害され、赤芽球島を構成するマクロファージにおいてIL-6が過剰産生されていること、生体内における骨髄での赤芽球造血の障害が抗IL-6レセプター抗体の投与により改善することを示した。赤芽球造血障害を起こす再生不良性貧血や骨髄異形成症候群などにおける病態解明、新規治療法の開発の端緒となる知見が得られたと考えている。

研究成果の概要（英文）：The BM microenvironment supporting the hematopoiesis of each lineage has not remained unclear. In this research, we found that the Nestin-expressing cells in the bone marrow (BM) supported erythropoiesis in the BM specifically. The disruption of Notch signaling in Nestin-expressing cells impaired erythroid differentiation in the BM of the genetically modified mice. Additionally, in the BM of these mice, the erythroid-island-forming abilities of the macrophages were impaired. IL-6 hyperproduction was detected in these macrophages, and the anti-IL-6 receptor antibody could revert the impairment of erythropoiesis in the BM.

研究分野：血液学

キーワード：骨髄微小環境 赤血球造血 Nestin陽性細胞 Notchシグナル IL-6 局所炎症

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群や再生不良性貧血に代表される造血不全症候群は原因不明の難治性疾患であり、長期の輸血による臓器障害や感染症により致命的となりうる疾患である。また造血不全症候群の発症・進行に血液細胞だけでなく Nestin 陽性細胞を含む造血微小環境構成細胞が関与するという報告がされており、治療標的となる可能性がある (Arranz L, et al. Nature 2014. Sen S, et al. Blood 2011.)。

他方、これまでの研究において造血制御機構が徐々に明らかになり、血液細胞である造血幹細胞を支持する非血液細胞で構成される造血微小環境(造血幹細胞ニッチ)の重要性が報告されている。造血幹細胞ニッチの構成細胞として様々な細胞が相補的に働く可能性が示唆されており、例としては骨芽細胞、破骨細胞、血管内皮細胞、CXCL12 強陽性細網細胞(CAR細胞)などが報告されている。さらに神経幹細胞マーカーの一つである Nestin を発現する細胞が骨髄内に存在し、造血幹細胞にとって重要な微小環境構成細胞である可能性が示された (Ferrer S, et al. Nature 2010. Asada N, et al. Nature Cell Biol. 2017.)。造血幹細胞以外の赤血球系前駆細胞、顆粒球系前駆細胞、リンパ球系前駆細胞、巨核球系前駆細胞を支持する造血微小環境についての報告は乏しく、各系統に特異的な造血支持細胞の同定に関してはほとんど進んでいなかった。

2. 研究の目的

赤芽球造血における Nestin 陽性造血支持細胞の役割を明らかにし、それにより各系統に独自の造血微小環境が存在することを示し、造血制御機構の全解明の一端となるような知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

Nestin 発現細胞特異的に Notch シグナルが欠損させた遺伝子改変マウスを作成し、骨髄における表現型をフローサイトメトリー、免疫染色、遺伝子発現解析を行った。また骨髄中からマクロファージを分取し、赤血球系細胞と共培養させ赤芽球島の再構築を観察することによりマクロファージの赤芽球島形成能を評価した。

また以下で示すように遺伝子改変マウスの骨髄マクロファージで高発現していた IL-6 について抗 IL-6 レセプター抗体を用いて *in vivo* 及び *in vitro* 双方において赤芽球島形成能及び骨髄における赤芽球分化を解析した。

4. 研究成果

A) Nestin 陽性細胞における Notch シグナルの欠失は骨髄において赤芽球特異的な分化障害を引き起こす

この遺伝子改変マウスの骨髄では、赤芽球造血が特異的に障害され、CD71+Ter119-の未熟な赤芽球分画の割合の増加と CD71+Ter119+の成熟赤芽球の減少を呈した(図1、図2)。このマウスから採取した骨髄細胞を致死量の放射線を照射した野生型マウスに移植したところ、赤芽球造血の障害は出現しなかった。野生型マウスから採取した骨髄細胞を致死量の放射線を照射した遺伝子改変マウスに移植したところ赤芽球造血の障害が再現され、赤芽球分化障害が、血液細胞に由来するものではなく、微小環境に由来するものであることが示された。この結果より Nestin 陽性造血支持細胞が Notch シグナルを介しておもに赤血球造血分化を制御していると考えられた。

図1. Nestin陽性細胞におけるNotch signalの欠失は骨髄での成熟赤芽球分画を減少させる。

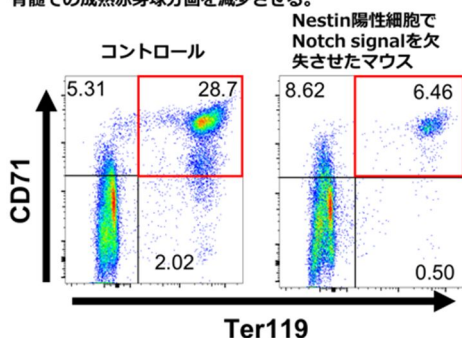
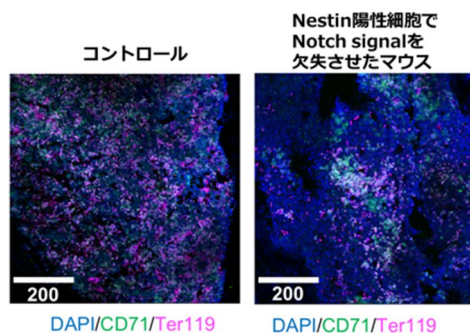


図2. Nestin陽性細胞におけるNotch signalの欠失は骨髄での成熟赤芽球分画を減少させる。



B) Nestin 陽性細胞における Notch シグナルの欠失により、骨髄マクロファージにおける IL-6 発現が亢進し、赤芽球島再形成能が低下する。

次にこの遺伝子改変マウスの骨髄における赤芽球分化障害が起こる機序について検討した。赤芽球に特異的な造血機構としてマクロファージを中心として赤芽球がその周囲を取り囲む赤芽球島が存在することは以前より知られており、この知見より遺伝子改変マウスの骨髄からフローサイトメトリーを用いてマクロファージを分取し解析を行った。

遺伝子改変マウスより採取したマクロファージを赤血球と共培養し、蛍光免疫染色で形成された赤芽球島を評価した。遺伝子改変マウスから採取したマクロファージは対照群のマウスから採取したマクロファージと比較して有意に赤芽球島の形成能が低下していたヒトにおいて慢性炎症により貧血が起こる症候性貧血という病態の存在から、マクロファージにおける炎症性サイトカインをコードする遺伝子について qPCR を用いて mRNA 発現の比較を行った。炎症性サイトカインのうち IL-6 の遺伝子発現が上昇しているという結果が得られた。

C) in vivoにおける骨髄での赤芽球分化の障害は抗 IL-6 レセプター抗体により改善する。

遺伝子改変マウスでみられた赤芽球分化障害が真に IL-6 過剰産生によるものであるかを立証するため、*in vitro* 及び *in vivo* で抗 IL-6 レセプター抗体を用いて IL-6 の作用を阻害する実験を行った。*in vitro* においては抗 IL-6 レセプター抗体の存在下でマクロファージと赤血球の共培養を行い、赤芽球島形成能を評価した。抗 IL-6 レセプター抗体非存在下では遺伝子改変マウスから採取したマクロファージの赤芽球島形成能は低下していたが、抗 IL-6 レセプター抗体の存在下では有意差が消失した。

次に *in vivo* における作用を検証するためマウスに抗 IL-6 レセプター抗体を静脈投与し、解

析を行った。遺伝子改変マウスで観察されていた骨髄での赤芽球分化障害は抗 IL-6 レセプター抗体投与により完全に消失した。

これらの結果より、Nestin 陽性細胞における Notch シグナルの欠失は骨髄中の赤芽球島を形成するマクロファージにおける IL-6 の産生過剰を引き起こし、赤芽球島の形成能を低下させることで骨髄の赤血球造血を障害すると考えられた(図 3, T Sakamoto, et al. Stem cells. 2019 より引用)。

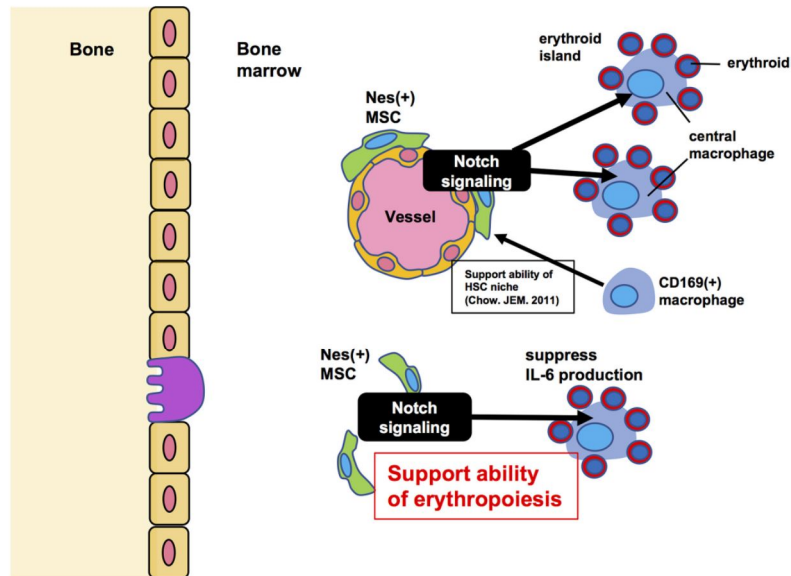


図3. 研究で得られた知見のまとめ (T Sakamoto, et al. Stem cells 2019より引用)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11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 Kurita Naoki, Sakamoto Tatsuhiro, Kato Takayasu, Kusakabe Manabu, Yokoyama Yasuhisa, Nishikii Hidekazu, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Obara Naoshi, Hasegawa Yuichi, Chiba Shigeru	4. 巻 100
2. 論文標題 Early administration of cyclosporine may reduce the incidence of cytokine release syndrome after HLA-haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation with post-transplant cyclophosphamide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 1295 ~ 1301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00277-021-04439-6	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 横島 健一、長谷川 雄一、千葉 滋、小原 直、坂本 竜弘、加藤 貴康、日下部 学、錦井 秀和、栗田 尚樹、横山 泰久、坂田（柳元） 麻実子	4. 巻 61
2. 論文標題 初回治療としてHLA半合致血縁ドナーから同種造血幹細胞移植を施行した劇症型再生不良性貧血	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1464 ~ 1468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.61.1464	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 Fukumoto Kota, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Fujisawa Manabu, Sakamoto Tatsuhiro, Miyoshi Hiroaki, Suehara Yasuhito, Nguyen Tran B., Suma Sakurako, Yanagimoto Shintaro, Shiraishi Yuichi, Chiba Kenichi, Bouska Alyssa, Kataoka Keisuke, Ogawa Seishi, Iqbal Javeed, Ohshima Koichi, Chiba Shigeru	4. 巻 136
2. 論文標題 VAV1 mutations contribute to development of T-cell neoplasms in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 3018 ~ 3032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2020006513	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 石塚 幹太郎、錦井 秀和、横山 泰久、坂田（柳元） 麻実子、長谷川 雄一、品川 篤司、千葉 滋、小原 直、周山 拓也、松岡 亮太、丸山 ゆみ子、坂本 竜弘、日下部 学、加藤 貴康、栗田 尚樹	4. 巻 61
2. 論文標題 地固め療法中に骨髄壊死を発症したフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ芽球性白血病	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 462 ~ 467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.61.462	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 Sakamoto Tatsuhiro, Obara Naoshi, Nishikii Hidekazu, Kato Takayasu, Cao-Sy Luan, Fujimura Ryosuke, Yagita Hideo, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Takahashi Satoru, Chiba Shigeru	4. 巻 37
2. 論文標題 Notch Signaling in Nestin-Expressing Cells in the Bone Marrow Maintains Erythropoiesis via Macrophage Integrity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 STEM CELLS	6. 最初と最後の頁 924 ~ 936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.3011	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 Cao-Sy Luan, Obara Naoshi, Sakamoto Tatsuhiro, Kato Takayasu, Hattori Keiichiro, Sakashita Shingo, Nannya Yasuhito, Ogawa Seishi, Harada Hironori, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Nishikii Hidekazu, Chiba Shigeru	4. 巻 109
2. 論文標題 Prominence of nestin-expressing Schwann cells in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes with severe fibrosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 309 ~ 318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-02576-9	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 Nishikii Hidekazu, Kurita Naoki, Shinagawa Atsushi, Sakamoto Tatsuhiro, Kusakabe Manabu, Yokoyama Yasuhisa, Kato Takayasu, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Obara Naoshi, Hasegawa Yuichi, Nakamura Naoya, Chiba Shigeru	4. 巻 2019
2. 論文標題 Durable Leukemic Remission and Autologous Marrow Recovery with Random Chromosomal Abnormalities after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Chronic Lymphocytic Leukemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Reports in Hematology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/9710790	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 Kurita Naoki, Sakamoto Tatsuhiro, Kato Takayasu, Kusakabe Manabu, Yokoyama Yasuhisa, Nishikii Hidekazu, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Obara Naoshi, Hasegawa Yuichi, Chiba Shigeru	4. 巻 173
2. 論文標題 The prognosis of disseminated intravascular coagulation associated with hematologic malignancy and its response to recombinant human thrombomodulin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 57 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2018.11.014	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 Miki Kosuke, Obara Naoshi, Makishima Kenichi, Sakamoto Tatsuhiro, Kusakabe Manabu, Kato Takayasu, Kurita Naoki, Nishikii Hidekazu, Yokoyama Yasuhisa, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Hasegawa Yuichi, Chiba Shigeru	4. 巻 2018
2. 論文標題 An Unprecedented Case of p190 BCR-ABL Chronic Myeloid Leukemia Diagnosed during Treatment for Multiple Myeloma: A Case Report and Review of the Literature	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Reports in Hematology	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/7863943	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 Makishima Kenichi, Obara Naoshi, Ishitsuka Kantaro, Sukegawa Shinichiro, Suma Sakurako, Kiyoki Yusuke, Baba Naoko, Sakamoto Tatsuhiro, Kato Takayasu, Kusakabe Manabu, Nishikii Hidekazu, Kurita Naoki, Yokoyama Yasuhisa, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Hasegawa Yuichi, Chiba Shigeru	4. 巻 98
2. 論文標題 High efficacy of eculizumab treatment for fulminant hemolytic anemia in primary cold agglutinin disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 1031~1032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-018-3521-4	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 Suehara Yasuhito, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Hattori Keiichiro, 、 、 、 Sakamoto Tatsuhiro, 、 、 、 、 Chiba Shigeru	4. 巻 103
2. 論文標題 Liquid biopsy for the identification of intravascular large B-cell lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 e241~e244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2017.178830	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Tatsuhiro Sakamoto
2. 発表標題 Notch signaling in nestin-expressing bone marrow stromal cells supports erythropoietic niche
3. 学会等名 The 10th JSH INTERNATIONAL SYMPOSIUM (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuhiko Sakamoto , Naoshi Obara , Hidekazu Nishikii , Takayasu Kato , Ryosuke Fujimura , Luan Cao Sy , Mamiko Sakata-Yanagimoto , Satoru Takahashi , Shigeru Chiba
2. 発表標題 BONE MARROW ERYTHROPOIETIC DEFECT ACCOMPANYING EXTRAMEDULLARY HEMATOPOIESIS IS MIMICKED BY DOWNREGULATION OF NOTCH SIGNALING IN SPECIFIC MICROENVIRONMENT.
3. 学会等名 23rd Congress of EHA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuhiko Sakamoto , Naoshi Obara , Hidekazu Nishikii , Takayasu Kato , Ryosuke Fujimura , Luan Cao Sy , Mamiko Sakata-Yanagimoto , Satoru Takahashi , Shigeru Chiba
2. 発表標題 Bone Marrow Erythropoiesis is Maintained by Notch Signaling in Specific Bone Marrow Microenvironment
3. 学会等名 The 9th JSH International Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuhiko Sakamoto , Naoshi Obara , Hidekazu Nishikii , Takayasu Kato , Ryosuke Fujimura , Luan Cao Sy , Mamiko Sakata-Yanagimoto , Satoru Takahashi , Shigeru Chiba
2. 発表標題 Impairment of bone marrow erythropoiesis is induced by disruption of Notch signaling in specific bone marrow microenvironment
3. 学会等名 The 16th Stem Cell Research Symposium
4. 発表年 2018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
---------	---------