

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07604

研究課題名(和文) 自然免疫系を構築する骨微小環境の新規同定

研究課題名(英文) Identification of the bone microenvironment that constructs the innate immune system

研究代表者

原 崇裕 (Hara, Takahiro)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：90512301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫を担当する免疫細胞には様々な種類があり、感染免疫応答・抗腫瘍免疫・炎症性疾患などの病態において重要な役割を果たしている。しかしながら、種々の自然免疫細胞の分化・維持・応答を支える骨髄微小環境(ニッチ)に多様性があるかどうか明らかではない。期間全体を通じて実施した研究から、複数の自然免疫細胞が骨髄内部で固有の存在領域を形成しており、骨髄には自然免疫細胞を支持する「機能的に区画化された微小環境」があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

定常状態においては、骨髄ストローマ細胞がその種類によって異なる自然免疫細胞を支持していることが示唆された。また、慢性炎症疾患などの病態モデルにおいては、自然免疫細胞の誘引・繫留に關与する分子の機能が阻害され、自然免疫細胞の骨髄内での挙動や末梢への動員に変化が起きた。病態時において、骨髄ストローマ細胞の性質が変容する結果が得られたことから、骨髄ストローマ細胞は慢性炎症疾患の治療標的となり得る。

研究成果の概要(英文)：There are various types of immune cells responsible for innate immunity, and they play an important role in pathological conditions such as infectious immune response, antitumor immunity, and inflammatory diseases. However, it is not clear whether there is diversity in the bone marrow microenvironment that supports the differentiation, maintenance, and response of various innate immune cells. In this study, we found that multiple innate immune cells form a unique positioning within the bone marrow, and that the bone marrow has a "functionally compartmentalized microenvironment" that supports the innate immune cells.

研究分野：免疫学

キーワード：骨髄 ストローマ細胞 微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

免疫システムにおいて、Bリンパ球およびTリンパ球は、獲得免疫を担当する重要な細胞種であり、これら細胞の分化・維持には、サイトカイン IL-7が必要である。しかしながら、IL-7 タンパクの発現レベルは非常に低く検出が困難なため、「どこで、どのようにしてリンパ球分化が起こるのか」については、確かな報告がなかった。

我々はこれまでに、IL-7産生細胞を同定するため、IL-7遺伝子の第一エキソンをGFPに置き換えた IL-7-GFP ノックインマウスを作製した。その結果、胸腺、リンパ節、腸管などの様々な組織において IL-7 を産生するストローマ細胞を検出することに成功し、種々のストローマ細胞がサイトカインの産生様式で再分類できることを明らかにした(Hara et al. *Journal of Immunology* 2012)。また、細胞特異的 IL-7 欠損マウスを用いて、胸腺や腸管におけるリンパ球分化に対する IL-7 産生ストローマ細胞の局所機能を明らかにしてきた(Shitara, Hara# et al. *Journal of Immunology* 2013. # Co-first author)。

特に骨髄に関しては、造血を調節する微小環境の実体が長年明らかでなかったことから、骨髄組織の支持基盤となるストローマ細胞を同定し、免疫細胞の分化に及ぼす影響を明らかにすることが課題となっている。骨髄のストローマ細胞には、CAR 細胞(ケモカイン CXCL12 高発現細胞)、血管内皮細胞、骨芽細胞だけでなく様々な種類のストローマ細胞が存在しているが、そのなかでも CAR 細胞や血管内皮細胞は造血幹細胞ニッチとして働くことが知られている。一方、抗 IL-7 抗体で骨髄を染色した過去の報告では、CXCL12 と IL-7 の産生は相互排他的であり、CAR 細胞とは全く異なる別の骨髄間葉系細胞が IL-7 を産生すると考えられていた(Tokoyoda et al. *Immunity* 2004)。また、試験管内で分化誘導した骨芽細胞が IL-7 を産生するとの報告もある(Zhu et al. *Blood* 2007)。そのため、これらの間葉系細胞が Bリンパ球分化のニッチではないかと推測されていたが、それは生体では未だ証明されていなかった。

そこで我々は、IL-7-GFP ノックインマウスおよび細胞特異的 IL-7 欠損マウスを用いて、Bリンパ球分化に寄与する IL-7 産生性の骨髄ストローマ細胞を探索し、「どこで、どのようにしてリンパ球分化が起きるのか」を明らかにする研究を行ってきた。まず、骨芽細胞の IL-7 を欠損させたマウスの骨髄では B 前駆細胞の絶対数が不変であることから、生体では骨芽細胞に由来する IL-7 は Bリンパ球分化に必須ではないことが判明した。次に、骨髄腔に存在する IL-7 産生細胞の同定を試みた結果、過去の報告とは異なり、多くの IL-7 産生ストローマ細胞が CAR 細胞とオーバーラップすることを見出した。そして、CAR 細胞は IL-7 産生型と IL-7 非産生型に細分化され、CAR 細胞の約 60%が IL-7 産生型であることを発見した。実際、CAR 細胞の IL-7 を欠損させたマウスの骨髄では、Bリンパ球にコミットした CLP(リンパ系共通前駆細胞)が著減していた。従って、CAR 細胞が産生する IL-7 は Bリンパ球の初期分化にとって重要であることが判明した。また、特定の骨髄血管内皮細胞も IL-7 を発現しており、内皮細胞の IL-7 を欠損させたマウスでは Bリンパ球分化の後期段階が有意に抑制された。従って、IL-7 産生型の CAR 細胞および内皮細胞が、Bリンパ球分化に必須のニッチ機能を果たしていることが明らかとなった(Gomes, Hara\* et al. *Immunity* 2016. \* Corresponding author)。

しかしながら、リンパ球分化を支持する微小環境には、未だ多くの疑問が残されている。その一つは、自然免疫を担当する細胞をサポートするストローマ細胞の実体が不明であることである。

## 2．研究の目的

自然免疫を担当する免疫細胞には様々な種類（自然リンパ球、NK細胞、NKT細胞、T細胞など）があり、これらの自然免疫細胞は、感染免疫応答・抗腫瘍免疫・炎症性疾患などの病態において重要な役割を果たしている。しかしながら、各々の自然免疫細胞の分化・維持・応答を支持する固有の骨髄ニッチが存在するのか不明であり、骨髄ストローマ細胞の多様性については詳細が不明である。

本研究では、骨髄ストローマ細胞がその種類によって異なる自然免疫細胞をサポートしており、骨髄微小環境が機能的・解剖学的に小分画に分かれるかどうかを探究する。また、各々のニッチ小区画（compartment）を構成する骨髄ストローマ細胞が、正常時および病態時に果たす機能（維持・リザーバー・感染による動員）を調べることを目的とする。

## 3．研究の方法

定常状態の骨髄の観察を行い、自然免疫細胞の存在領域を調べ、これらの自然免疫細胞と近接する骨髄ストローマ細胞（ニッチ構成細胞）の種類を探索する。また、自然免疫細胞の誘引・繫留に関与する分子を網羅的に探索する。そして、これらの分子の機能を阻害したときの、自然免疫細胞の挙動に変化を調べる。更に、慢性炎症疾患などの病態モデルマウスを用いて、病態時における骨髄ストローマ細胞の性質の変容を解析する。

## 4．研究成果

まず骨切片の蛍光顕微鏡観察から、定常状態の骨髄内部では、複数の自然免疫細胞および前駆細胞が固有の存在領域（ニッチ小区画）を形成していることが明らかになった。また、これらの自然免疫細胞と近接し、相互作用する骨髄ストローマ細胞（ニッチ構成細胞）の種類を探索する実験を行った。さらに、自然免疫細胞の誘引・繫留に関与する分子を明らかにするため、ニッチ構成ストローマ細胞が発現する機能タンパク質を探索した結果、複数の候補分子（液性因子や接着因子など）を特定することが出来た。

また、これらの分子の機能を薬剤で阻害したときに、骨髄内における自然免疫細胞の分化や維持に影響を及ぼすことが明らかとなった。そして、慢性炎症疾患などの病態モデルマウスにおいても、これらの分子の機能が阻害され、自然免疫細胞の骨髄内での挙動や末梢への動員に変化が起こることが判明した。また、自然免疫細胞のニッチ小区画（compartment）を構成するストローマ細胞を、フローサイトメトリーによって亜集団として分取できる細胞表面マーカーの特定を行った。

これらの結果から、定常状態においては、骨髄ストローマ細胞がその種類によって異なる自然免疫細胞をサポートしていることが示され、骨髄には自然免疫細胞の分化・維持・応答を支持する「機能的に区画化された微小環境」があることが示唆された。さらに、病態時における骨髄ストローマ細胞の性質変容に関する知見が得られた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Mukohira H, Hara T, Abe S, Tani-Ichi S, Sehara-Fujisawa A, Nagasawa T, Tobe K, Ikuta K.	4. 巻 31
2. 論文標題 Mesenchymal stromal cells in bone marrow express adiponectin and are efficiently targeted by an adiponectin promoter-driven Cre transgene.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 729-742
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz042.	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 Zhu Y, Cui G, Miyauchi E, Nakanishi Y, Mukohira H, Shimba A, Abe S, Tani-Ichi S, Hara T, Nakase H, Chiba T, Sehara-Fujisawa A, Seno H, Ohno H, Ikuta K.	4. 巻 32
2. 論文標題 Intestinal epithelial cell-derived IL-15 determines local maintenance and maturation of intraepithelial lymphocytes in the intestine.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 307-319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz082.	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 Cui G, Shimba A, Ma G, Takahara K, Tani-Ichi S, Zhu Y, Asahi T, Abe A, Miyachi H, Kitano S, Hara T, Yasunaga JI, Suwanai H, Yamada H, Matsuoka M, Ueki K, Yoshikai Y, Ikuta K.	4. 巻 204
2. 論文標題 IL-7R-Dependent Phosphatidylinositol 3-Kinase Competes with the STAT5 Signal to Modulate T Cell Development and Homeostasis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 844-857
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900456.	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 Tani-Ichi S, Wagatsuma K, Hara T, Cui G, Abe S, Miyachi H, Kitano S, Ikuta K.	4. 巻 204
2. 論文標題 Innate-like CD27+CD45RBhigh T Cells Require TCR Signaling for Homeostasis in Peripheral Lymphoid Organs.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2671-2684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1801243.	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 Ikuta K, Hara T, Abe S, Asahi T, Takami D, Cui G	4. 巻 434
2. 論文標題 The roles of IL-7 and IL-15 in niches for lymphocyte progenitors and immune cells in lymphoid organs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr. Top. Microbiol. Immunol.	6. 最初と最後の頁 83-101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-86016-5_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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Koichi Ikuta, Guangwei Cui, Shinya Abe, Takuma Asahi, Takahiro Hara
2. 発表標題 The cytokine-producing immune microenvironment for innate lymphocytes
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会学術集会 (アクトシティ浜松)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shizue Tani-ichi, Hisa Mukohira, Takahiro Hara, Koichi Ikuta
2. 発表標題 Function of IL-7R in regulatory T cells
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会学術集会 (アクトシティ浜松)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Abe, Aki Ejima, Akihiro Shimba, Mizuki Mori, Guangwei Cui, Takuma Asahi, Daichi Takami, Takahiro Hara, Shizue Tani-ichi, Koichi Ikuta
2. 発表標題 Estrogens suppress T cell production by a TEC-dependent mechanism
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会学術集会 (アクトシティ浜松)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daichi Takami, Shinya Abe, Akihiro Shimba, Takuma Asahi, Yuanbo Zhu, Aki Ejima, Shizue Tani-ichi, Takahiro Hara, Guangwei Cui, Koichi Ikuta
2. 発表標題 Role of local IL-7 in maintenance of lung ILC2s
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会学術集会 (アクトシティ浜松)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部真也、原崇裕、崔広為、生田宏一
2. 発表標題 NK細胞の分化を支持するIL-15産生性骨髄微小環境の解明
3. 学会等名 第29回 Kyoto T Cell Conference (芝蘭会館)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Hara
2. 発表標題 Identification of the gut microenvironment by the cytokine reporter mice
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学 医生物学研究所  
<https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/>  
 ウイルス感染研究部門 免疫制御分野  
<https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/laboratory/lab07/>

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
---------	---------