

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590223

研究課題名（和文） 生体内造血制御機構におけるストローマ細胞の機能解析

研究課題名（英文） A study for the role of bone marrow stromal cells in hematopoietic regulation

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（和文）：

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、畑いずれの欠陥も貧血等の原因となる。本研究では「畑」の最も重要な構成細胞であるストローマ細胞が、造血組織において種々の生理活性物質の産生を介して血球の産生を制御し、生体の恒常性を維持していることを明らかとした。さらにストローマ細胞を固相化した微粒子担体を用いて試験管内で三次元構造を持つ造血環境を作製し、生体内造血の再現可能な培養系を開発した。

研究成果の概要（英文）：

The proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells are regulated by bone marrow microenvironment. Stromal cells, as distinguished from hematopoietic cells, are an essential compartment of this microenvironment. In this study, the stromal cells are shown to regulate the proliferation and differentiation of hematopoietic cells through the mechanism by producing diffusible hematopoietic regulatory factors. Further, a novel in vitro three-dimensional (3D) hematopoietic culture system is developed, and the importance of stromal cells to regulate hematopoietic cell growth is also clarified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：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、造血微小環境、骨髄ストローマ細胞

## 1. 研究開始当初の背景

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、この異常はいわゆる「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)。さらにSAMの造血微小環境機能異常の一因として、ストローマ細胞からの造血因子産生異常が確認されている(Fukumoto T, Aizawa S et al. *Int Immunopharmacol* 6; 1847-58, 2006, Tsuboi I, Aizawa S et al. *J Appl Toxicol* 28; 797-805, 2008)。すなわちSAMを用いて正常マウスとの比較実験を行うことは、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に有用な手段と考えられる。

また複雑な造血現象解明の手段として、研

究者らは*in vitro*三次元造血細胞培養法を開発してきた。アクリルを基本素材とし、エポキシ基を含む親水性高分子をグラフト鎖に有する高分子微粒子担体を単離したストローマ細胞の足場とし、三次元立体構造を構成した培養系を作製することにより、より生体に近い造血現象の再現が可能となってきた。本培養系を用いて造血細胞増殖・分化に関わるストローマ細胞機能の詳細を解析するとともに、難治性造血器疾患に対する新規治療法としての人工骨髄の開発への応用も期待できると考える。

## 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造血微小環境の造血制御機構を明らかとすること、さらにストローマ細胞の移植実験等により障害ストローマを「正しく修復」することの可能性について検討し、新たな治療方法の開発の可能性を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究者が行ってきた*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、造血制御機構について液性因子の産生状況を中心にその機能解析を行う。さらにこれら研究成果を踏まえて*in vitro*での三次元立体培養系を開発することにより、人工骨髄開発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の造血組織におけるストローマ細胞の存在様式、機能発現について、組織学的に、あるいは単離したストローマ細胞を対象に造血因子産生能、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バイオストレス下における造血反応の低下が予測される。本研究ではバイオストレス下での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、ストローマ細胞の造血幹細胞に対する増殖支持機能の測定方法として、ストレス後の造血因子産生状況を継時的に観察することにより評価する。

### (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い、その有用性について検討する。

## 4. 研究成果

### (1) SAMにおけるストローマ細胞機能

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に起因することが明らかとなった(stromal cell impairment mice: SCI)。抗N-cadherin抗体を用いた免疫組織学的方法によりnon-SCI(young mouse)およびSCI(old mouse)の造血組織におけるストローマ細胞分布様式、存在密度について検討した結果、両者に明らかな相違は認めなかった。ただし恒常的造血においてSCIでは造血因子産生能が低下傾向にあることが明らかとなった。すなわち両者マウス造血組織において、ストローマ細胞の量的変化はほとんど認めないが、SCIでの質的機能低下が貧血等の原因となっていることが明らかとなった。

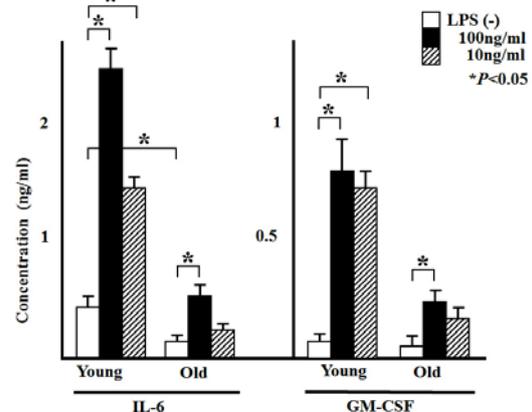
### (2) 急性反応時の造血状態の検討

#### ① lipopolysaccharide(LPS)を用いた検討

SCIではLPS投与により誘導された急性炎症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が明らかとなった(図1)。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。

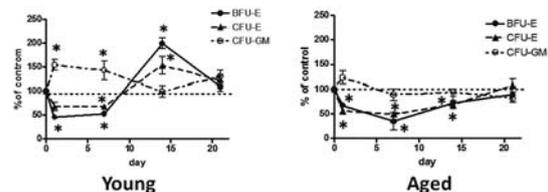
図1 LPS刺激後におけるストローマ細胞の造血因子産生能



#### ② ネオプテリンを用いた検討

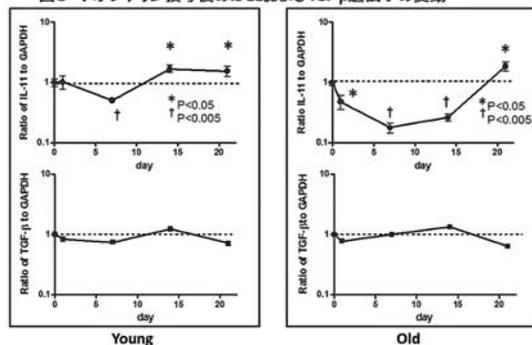
生体内で産生される炎症性反応物質であるネオプテリン投与後のSAMにおける造血反応について検討した。ネオプテリン投与後、骨髄での顆粒球・マクロファージ前駆細胞数(CFU-GM)は反応性に増加するが、赤血球系前駆細胞数(BFU-E、CFU-E)は低下を認めた(図2)。これら反応性変化はnon-SCIでは投与4週頃には定常状態に回復するのにに対し、SCIでは特に赤血球系細胞の回復が遅延した。

図2 ネオプテリン投与後の造血前駆細胞の変動



骨髄ストローマ細胞の造血因子産生を検討した結果、SCIでは造血促進因子であるIL-11の産生が抑制されており、この結果、特に赤血球造血回復が遅延していることが明らかとなった(図3)。

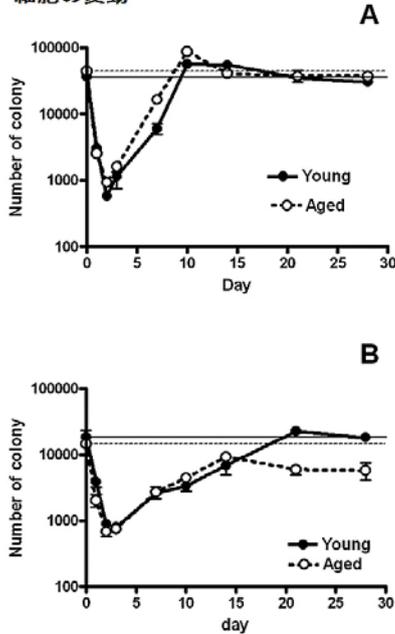
図3 ネオプテリン投与後のIL-11およびTGF-β遺伝子の変動



#### ③ 抗がん剤(5-FU)投与後の造血状態の検討

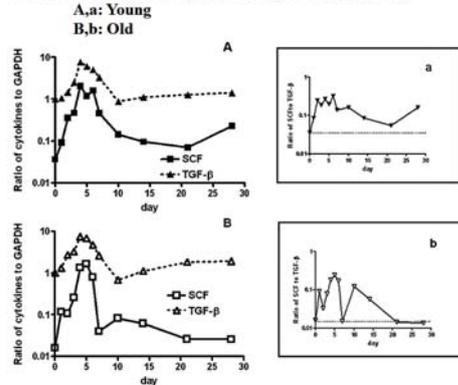
抗がん剤 5-FU 投与後の造血回復期におけるストローマ細胞機能について、SAM を用いて CFU-GM および肥満細胞前駆細胞 (CFU-mast) の変動をモデルに検討した。5-FU 投与後骨髄の CFU-GM、CFU-mast は減少するが、non-SCI では 2-3 週で投与前状態に回復する(図 4)。一方、SCI では CFU-GM

図4 5-FU投与後のCFU-GM(A)およびCFU-mast(B)細胞の変動



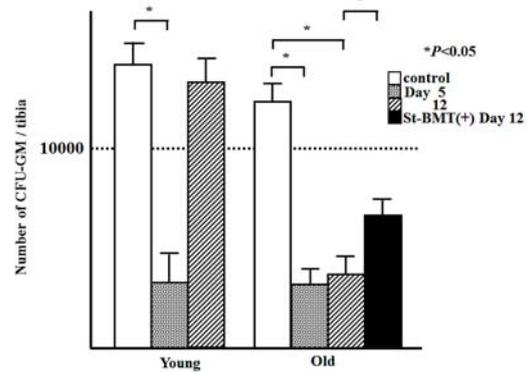
は同様の回復傾向を認めるが CFU-mast は低下状態の持続が認められた。骨髄ストローマ細胞における造血因子遺伝子発現を検討した結果、SCI では造血促進誘導作用を有する stem cell factor(SCF)と抑制作用を有する TGF-β産生のバランスが保持できていないことが明らかとなった(図 5)。これら結果は、ストローマ細胞機能が定常時の造血はもちろん、特に感染、抗がん剤による造血障害後等において、恒常性の維持のための反応性造血調整に極めて関与していることを示している。

図5 5-FU投与後のSCFおよびTGF-β遺伝子発現の変動



(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  
異常ストローマ細胞の機能修復を目的と

図6 ストローマ細胞を含めた骨髄移植実験

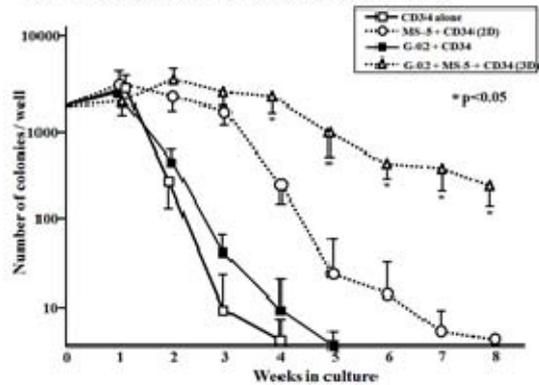


して、SCI マウスに対するストローマ細胞と造血幹細胞の同時移植実験を行った(図 6)。SCI に non-SCI 由来ストローマ細胞を移植することにより、造血幹細胞単独移植時と比較して造血細胞の回復促進効果が認められ、ストローマ細胞移植の有用性が確認された。

(4) 人工骨髄構築の可能性の検討

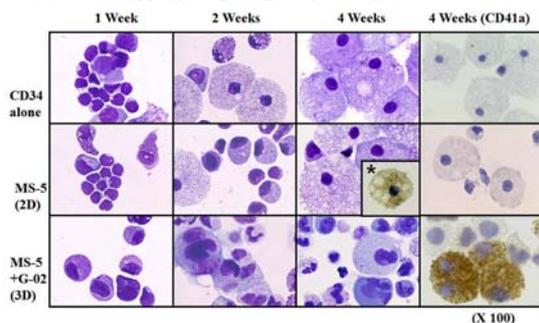
新規に作製した微粒子担体に骨髄由来ストローマ細胞を接着させたより生体に近い三次元培養系を開発し、同時に培養した造血細胞の増殖・分化について継続的に観察した。造血幹細胞は臍帯血由来 CD34 陽性細胞を使用し、培養 7 日ごとに培地交換するとともに、培養中の細胞数、前駆細胞数を測定し、ストローマ細胞非存在下、ストローマ細胞を含む

図7 三次元培養における造血前駆細胞数の経時的変動



従来の二次元培養と比較検討した。三次元培養では従来の培養法に比較し、8 週以上にわたり造血前駆細胞が維持されていることが確認された(図 7)。さらに培養中の造血細胞

図8 三次元培養上清中の造血細胞のサイトスピンの標本



(X 100)

についてサイトスピン標本を用いて形態学的に観察した結果、三次元培養では、未熟な造血細胞から顆粒球、巨核球を含む成熟した血球まで存在し、造血細胞の増殖・分化が、試験管内で効率よく再現されていることが明らかとなり、三次元培養法が人工骨髄開発のモデルとなる可能性が示唆された(図 8)。

#### (5) まとめ

本研究により造血微小環境構成因子であるストローマ細胞の機能の重要性が確認された。ストローマ細胞は恒常的造血、また反応性造血における造血制御機構において、造血因子産生などを介して中心的役割を担っており、その機能の破綻は貧血などの障害を発生させる要因となっていることが明らかとなった。またストローマ細胞移植などの方法により造血微小環境の正常化により、造血回復の可能性が示唆される結果を得た。一方、三次元培養法の開発により、今後人工骨髄の開発の可能性も示唆され、今後は造血器疾患への臨床応用も視野に、より安全、効率的な素材の開発も必要と考える。

#### 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 9 件)

1. Aisaki K., Tsuboi I., Harada T., Oshima H., Yamashita A., Hirabayashi Y., Kanno J., Inoue T., Aizawa S. Neopterin, inflammation-associated product, prolongs erythropoiesis suppression in aged SAMP1 mice due to senescent stromal-cell impairment. *Exp Biol Med* (査読有)237: 279-286, 2012
2. Uenogawa K., Hatta Y., Arima N., Hayakawa S., Sawada U., Aizawa S., Yamamoto T., Takeuchi J. Azacitidine induces demethylation of p16INK4a and inhibits growth in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Mol Med* (査読有)28: 835-839, 2011
3. Hokari T., Tsuboi I., Harada T., Oshima H., Hirabayashi Y., Kanno J., Inoue T., Aizawa S. Mast cell development and biostresses: different stromal responses in bone marrow and spleen after treatment of myeloablator, 5-fluorouracil, and inflammatory stressor, lipopolysaccharide. *Biol Pharma Bull* (査読有)34: 1533-1541, 2011
4. Hirabayashi Y., Hatta Y., Takeuchi J., Tsuboi I., Harada T., Ono K., Glomm WR., Yasuda M., Aizawa S. Novel

three-dimensional long-term bone-marrow culture system using polymer particles with grafted epoxy-polymer-chains supports the proliferation and differentiation of hematopoietic stem-cells. *Exp Biol Med* (査読有)236: 1342-1350, 2011

5. Yasuda M., Kunieda H., Ono K., Iwasaki T., Hiramoto M., Glomm WR., Hirabayashi Y., Aizawa S. Adhesive cell cultivation on polymer particle having grafted epoxy polymer chain. *Tissue Cell* (査読有)43: 115-124, 2011
6. Ohashi A., Sugawara Y., Mamada K., Harada Y., Sumi T., Anzai N., Aizawa S., Hasegawa H. Membrane transport of sepiapterin and dihydrobiopterin by equilibrative nucleoside transporters: A plausible gateway for the salvage pathway of tetrahydrobiopterin biosynthesis. *Mol Genet Metab* (査読有)102: 18-28, 2011
7. Tsuboi I., Harada T., Oshima H., Aizawa S. Effect of neopterin on splenic erythropoiesis in mice. (査読有) *Pteridines* 21: 7-10, 2010
8. Tsuboi I., Harada T., Hirabayashi Y., Kanno J., Inoue T., Aizawa S. Inflammatory biomarker, neopterin, predominantly enhances myelopoiesis, which suppresses erythropoiesis via activated stromal cells. *Immunobiology* (査読有)215: 348-355, 2010
9. Tsuboi I., Hokari T., Harada T., Yuda., Aizawa S. In vitro effect of neopterin on erythropoiesis in mice. *Pteridines* (査読有)20: 115-118, 2009

[学会発表] (計 12 件)

1. 原田智紀、壺井 功、大島秀規、原弘之、井上 達、相澤 信 高分子微粒子担体とMS-5 細胞を用いた三次元骨髄培養モデルにおける造血支持能 第 117 回日本解剖学会総会 平成 24 年 3 月 26 日 甲府
2. Tsuboi I., Harada T., Hirabayashi Y., Kanno J., Inoue T., Aizawa S. Age-related changes in erythropoietic response to neopterin in senescence accelerated mice 第 73 回日本血液学会学術集会 平成 23 年 10 月 14 日 名古屋
3. 相崎一雄、原田智紀、大島秀規、壺井 功、相澤 信 老化促進モデルマウスを用いた、炎症性貧血の加齢に伴う重症化の機序についての検討 第 506 回日大医学会例会 平成 23 年 9 月 10 日 東京

4. 壺井 功、原田智紀、平林容子、菅野 純、井上 達、相澤 信 炎症性貧血の加齢に伴う重症化の機序についての検討 第26回老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会 平成23年7月8日 岐阜
5. 原田智紀、壺井 功、大島秀規、原 弘之、井上 達、相澤 信 造血微小環境による肥満細胞造血の制御機構 第116回日本解剖学会総会 平成23年3月29日 横浜
6. Hirabayashi Y., Tsuboi I., Harada T., Hirabayashi Y., Kanno J., Inoue T., Hatta Y., Takeuchi J., Aizawa S. Effect of neopterin on erythropoiesis in mice 第721回日本血液学会学術集会 平成22年9月25日 横浜
7. Harada T., Tsuboi I., Hirabayashi Y., Oshima H., Hara H., Inoue T., Aizawa S. Hematopoietic response subjected to long-term hypoxic condition in mice International Hypoxia Symposium 平成23年2月15日 Lake Louise, Albert, Canada
8. 壺井 功、原田智紀、平林容子、菅野 純、井上 達、相澤 信 SAMP1:加齢に伴う造血間質細胞の機能低下により炎症時の肥満細胞造血反応は低下する 第25回老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会 平成22年7月9日 金沢
9. 原田智紀、壺井 功、大橋晶子、大島秀規、原 弘之、相澤 信 マウス骨髄の赤血球造血に対するネオプテリンの効果 第115回日本解剖学会総会 平成22年3月28日 盛岡
10. 壺井 功、原田智紀、平林容子、菅野 純、井上 達、相澤 信 放射線照射後の造血微小環境はサイトカインを介してB細胞造血を促進と顆粒球造血を抑制する 第71回日本血液学会学術集会 平成21年10月25日 京都
11. 壺井 功、原田智紀、平林容子、菅野 純、井上 達、相澤 信 放射線照射後のB細胞造血の促進と顆粒球造血の抑制は造血微小環境により制御される 第24回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会 平成21年7月10日 松本
12. 壺井 功、原田智紀、平林容子、菅野 純、井上 達、相澤 信 Myeloablation後のB細胞造血の回復は加齢による造血微小環境の機能低下により遅延する 第32回基礎老化学会 平成21年6月19日 横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://anat2.med.nihon-u.ac.jp/>

#### 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

##### (3)連携研究者

無し