

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 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591241

研究課題名（和文） 新規リンパ球初期分化制御分子 SFRP1 の生理的機能と作用機序の解明

研究課題名（英文） Biological and functional analysis of SFRP1, a novel regulator on early process of lymphopoiesis

研究代表者

横田 貴史 (YOKOTA TAKAFUMI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60403200

研究成果の概要（和文）：

妊娠期のリンパ球造血抑制の分子機構の解明を目的に、骨髄間質細胞において estrogen 刺激で誘導される遺伝子を探索し、SFRP1 を同定した。SFRP1 は培養系において、造血幹細胞からの B リンパ球分化を抑制した。生体内での機能解析を目的に SFRP1 と SFRP5 の過剰発現マウスを作製し解析を行った。これらのマウスの末梢血では白血球数が有意に低く、特に B リンパ球数が著明に減少していた。生体での SFRP の恒常的な過剰発現は、リンパ球分化過程を多段階で抑制する事が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We reported that early lymphopoiesis is suspended during pregnant period and high-estrogen condition. By means of intensive analyses on the influence of estrogen on the hematopoietic microenvironment, we have found that soluble Frizzled-related protein 1 (SFRP1) acts as a mediator of estrogen action. In the present study, we have constructed transgenic mouse models of SFRP1 or other SFRP-related molecules to evaluate their biological significance in vivo. We have observed severe leukocytopenia, particularly decrease of B-lymphocytes, in SFRP over-expressing mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液免疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) 造血幹細胞から成熟リンパ球への分化過程とその制御機構を明らかにすることは、リンパ系腫瘍の「腫瘍幹細胞」の由来を考える上で必須であり、かつ特定の分子・遺伝子・細胞を標的とした先端医療への応用につな

がる。リンパ球初期分化に関しては、これまで多段階の前駆細胞が同定され、細胞の機能的な成熟がどのようなメカニズムで進行するのか明らかにされてきた。しかしその最も初期の段階、すなわち“どのように造血幹細胞からリンパ球への分化の方向付けがなさ

れるのか”は不明なままであった。

(2)申請者らは、妊娠期にリンパ球造血が顕著に抑制される現象に着目し、女性ホルモン estrogen の関与を明らかにした。また、新しい遺伝子改変マウスを利用して、リンパ球造血の比較的早期の段階が影響を受けることを明らかにした。観察された現象は、加齢やストレスに伴う免疫系の変化との関連も推測されたが、リンパ球造血抑制作用に関する詳細な分子メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

(1)本研究の根幹となる目的は、造血幹細胞からリンパ球系への初期分化について解析し、その生理的な過程と制御機構を解明することである。

(2) Estrogen によって骨髄間質細胞で誘導される分子を探索し、SFRP1 を同定した。その知見を進展させ、本研究では、リンパ球初期分化に置ける SFRP1 およびその関連分子の生理的機能と作用機序の解明に主眼を置いた。

3. 研究の方法

(1)SFRP1 および関連分子の過剰発現マウスを作製し、骨髄・脾臓・胸腺におけるリンパ球造血の変化を調べた。また骨髄に存在する早期リンパ球前駆細胞数の変化を調べた。

(2)作製した過剰発現マウスにおいて、分化異常を示した段階に焦点を当て、発現遺伝子の変容を調べた。

4. 研究成果

(1)生体内での SFRP1 およびその関連分子の機能を明らかにするため、SFRP1, SFRP5, DKK の過剰発現マウスのモデルを作製し、解析を行った。SFRP のマウスの末梢血解析では、白血球数が有意に低く、特に B リンパ球数が著明に減少していた (図 1)。予想外ではあるが、その抑制の程度は SFRP5 マウスの方が SFRP1 マウスよりも顕著であった。

(2)SFRP5 過剰発現マウスの脾臓は、生後 6-7 週の時点で既に野生型同胞と比較して明らかに小さく、細胞分画では B リンパ球が顕著に減少していた。その一方で、胸腺の大きさや T リンパ球数には大きな変化を認めなかった。

(3)骨髄を詳細に検討したところ、リンパ球系幹細胞分画とされる Lin⁻ ckit^{Lo} Scd1^{-Lo} IL7R⁺ 分画の有意な増加を認めた (図 2)。その一方で、preB 細胞分画以降の B リンパ球前駆細胞が著明に減少していた。さらに、Lin⁻

ckit^{Hi} Scd1⁺ CD150⁺ CD48⁻ の造血幹細胞分画および Lin⁻ ckit^{Hi} Scd1⁺ 造血幹/前駆細胞が、野生型同胞と比較して減少していた。これらのことから、SFRP 過剰状態では造血幹細胞の維持の障害とリンパ球前駆細胞の分化異常という 2 つの問題が生じていることが示唆された。

A

	WT	SFRP5 KI	P value
WBC (/μl)	4200 ± 550	2200 ± 170	<0.01
Mac1 ⁺ (%)	16.0 ± 1.6	28.4 ± 3.2	<0.01
B220 ⁺ (%)	56.3 ± 2.3	15.6 ± 3.6	<0.001
CD3 ⁺ (%)	27.0 ± 2.5	51.1 ± 3.3	<0.01
NK1.1 ⁺ (%)	9.2 ± 0.8	14.9 ± 1.9	<0.05
Mac1 ⁺ (/μl)	640 ± 90	610 ± 70	NS
B220 ⁺ (/μl)	2460 ± 400	370 ± 90	<0.001
CD3 ⁺ (/μl)	1100 ± 140	1100 ± 100	NS
NK1.1 ⁺ (/μl)	290 ± 10	330 ± 60	NS
RBC (x10 ⁶ /μl)	773 ± 21	828 ± 60	NS
Hb (g/dl)	11.7 ± 0.4	12.1 ± 1.0	NS
HCT (%)	43.0 ± 1.9	43.9 ± 3.8	NS
MCV (fL)	55.4 ± 1.0	53.1 ± 0.9	<0.01
MCH (pg)	15.1 ± 0.2	14.7 ± 0.3	<0.01
MCHC (g/dL)	27.3 ± 0.5	27.6 ± 0.4	NS
Plt (x10 ⁹ /μl)	103.0 ± 10.0	90.5 ± 15.4	NS

B

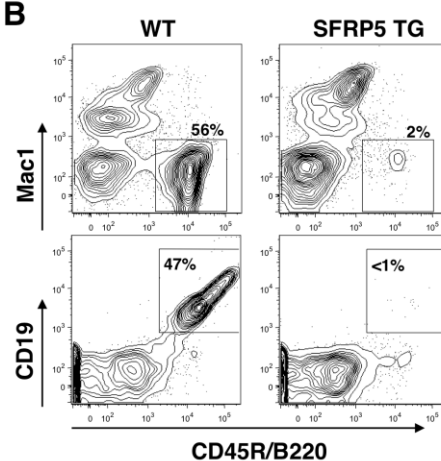


図 1 SFRP5過剰発現マウスの末梢血所見
A. 検血データと白血球分画 B. FACS

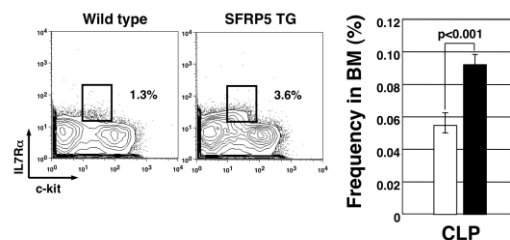


図2 骨髄中のcommon lymphoid progenitorの比率

(4) Top/gal レポーターマウスとの交配によって、これらの未分化な造血前駆細胞分画における Wnt シグナル系を解析した結果、活性

化している細胞集団の増加が認められた。以上の事から、SFRP の恒常的な過剰発現は、Wnt シグナルの調節を介して、造血細胞の初期分化に影響を与えていると考えられた。

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 6 件)

① Sudo T, Yokota T (13人中2番目), Oritani K (13人中3番目), Kanakura Y(13人中最後), et al. The endothelial antigen ESAM monitors hematopoietic stem cell status between quiescence and self-renewal. J. Immunol. (in press 2012) 査読有

② Saitoh N, Oritani K, Saito K, Yokota T, Ichii M, Sudo T, Fujita N, Nakajima K, Okada M, Kanakura Y. Identification of functional domains and novel binding partners of STIM proteins. J. Cell Biochem. 112:147-156, (2011) 査読有
DOI: 10.1002/jcb.22910

③ Ichii M, Oritani K, Yokota T, Schultz DC, Holter JL, Kanakura Y, Kincade PW. Stromal cell-free conditions favorable for human B lymphopoiesis in culture. J. Immunol. Methods 359:47-55, (2010) 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0012954

④ Ichii M, Oritani K, Yokota T, Zhang Q, Garrett KP, Kanakura Y, Kincade PW. The density of CD10 corresponds to commitment and progression in the human B lymphoid lineage. PLoS One. 5:e12954, (2010) 査読有
DOI: 10.1016/j.jim.2010.06.002

⑤ Yokota T, Oritani K, Butz S, Kokame K, Kincade PW, Miyata T, Vestweber D, Kanakura Y. The endothelial antigen ESAM marks primitive hematopoietic progenitors throughout life in mice. Blood 113:2914-2923 (2009) 査読有
DOI: 10.1182/blood-2008-07-167106

[学会発表] (計 8 件)

① Satoh Y, Yokota T, Kondo M, Kincade PW, Kouro T, Iida R, Kokame K, Miyata T, Sudo T, Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Kohwi-Shigematsu T, Kanakura Y. Satb1 Promotes Hematopoietic Stem Cell Differentiation Toward the Lymphoid Lineages.

The American Society of Hematology 53rd Annual meeting. 2011.12.12 San Diego, USA

② Sudo T, Yokota T, Sugiyama T, Ishida T, Satoh Y, Oritani K, Nagasawa T, Kanakura Y. The endothelial antigen ESAM monitors reversible conversion of hematopoietic stem cells between dormancy and self-renewal. The American Society of Hematology 53rd Annual meeting. 2011.12.11 San Diego, USA

③ Yokota T, Satoh Y, Kondo M, Kincade PW, Kouro T, Iida R, Sudo T, Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Kohwi-Shigematsu T, Kanakura Y. Satb1 directs hematopoietic stem cell differentiation toward the lymphoid lineages. 第 40 回日本免疫学会総会 2011.11.29 幕張

④ Satoh Y, Yokota T, Kondo M, Kokame K, Miyata T, Sudo T, Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Kanakura Y. SATB1 Induces Early Lymphocyte Differentiation From Primitive Hematopoietic Progenitors. 第 73 回日本血液学会総会 2011.10.15 名古屋

⑤ Satoh Y, Yokota T, Tanaka H, Kokame K, Miyata T, Matsumura I, Oritani K, Kanakura Y. A Chromatin Modifier SATB1 Promotes Lymphocyte Production From Primitive Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. The American Society of Hematology 52nd Annual meeting. 2010.12.6 Orlando, USA.

⑥ Li W, Wang H, Liu Q, Ishihara K, Yokota T, Gu J, Taniguchi N, Kondo A. Deletion of core fucosylation on pre-BCR down-regulates its functions. The 14th International Congress of Immunology. 2010.8.25 Kobe, Japan

⑦ Yokota T, Oritani K, Sudo T, Butz S, Kokame K, Kincade PW, Miyata T, Vestweber D, Kanakura Y. The endothelial antigen ESAM marks hematopoietic stem/progenitor cells throughout ontogeny in mice. 第 71 回日本血液学会総会 2009.10.24 京都

[図書] (計 2 件)

① Takafumi Yokota, Kenji Oritani, Stefan Butz, Stephan Ewers, Dietmar Vestweber, Yuzuru Kanakura.

Advances in Hematopoietic Stem Cell Research
(p77-88, 2012 InTech)
<http://www.intechweb.org>

② 横田貴史、織谷健司、金倉 讓

Annual Review 血液 2010

(p12-21, 2010 中外医学社)

<https://www.chugaiigaku.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 貴史 (YOKOTA TAKAFUMI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60403200

(2) 研究分担者

織谷 健司 (ORITANI KENJI)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70324762

金倉 讓 (KANAKURA YUZURU)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20177489