

## 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：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790054

研究課題名（和文） 樹状細胞による造血幹細胞の制御機構の解析

研究課題名（英文） Regulation of hematopoietic stem cell activation by dendritic cells

研究代表者

四元 聡志（YOTSUMOTO SATOSHI）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教

研究者番号：30318191

研究成果の概要（和文）：。申請者は、ウイルス感染時に生産される I 型および II 型 IFN 依存的に HSC が活性化し、細胞周期の進展および静止が観察されること、この活性化には、樹状細胞や NK 細胞以外の IFN 生産細胞も関与する可能性を明らかとした。また、IFN は、HSC の末梢への動員阻止やウイルス感染防御に重要な役割を果たしていることも明らかとした。

研究成果の概要（英文）： We here showed that type I and II IFN directly activated HSC and induced cell cycle entry and quiescence in HSC during virus infection. The IFN-mediated HSC activation was dependent on not only DC and NK cells, but also other IFN-producing cells. Moreover, IFN is important for inhibition of HSC mobilization and induction of HSC-autonomous immunity by IFN-induced proteins against intracellular virus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1200000	360000	1560000
2011 年度	1800000	540000	2340000
年度			
年度			
年度			
総計	3000000	900000	3900000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：造血幹細胞、樹状細胞、インターフェロン、細胞周期、ウイルス感染

## 1. 研究開始当初の背景

樹状細胞（Dendritic cells:DC）は、ウイルス感染時の免疫応答の始動に必須の抗原

提示細胞と働くだけではなく、ウイルス特有のパターン分子(pathogen-associated molecular: PAMPs)を認識して IFN- $\alpha$ などの

炎症性サイトカインを生産、ウイルスに対する自然および獲得免疫の成立に重要な役割を担っている。一方、HSCは、主に骨髄に存在し、あらゆる血球系細胞（白血球、赤血球、血小板）に分化可能な幹細胞であり、HSCが生体内の状況に応じて分化、自己複製

(HSC自体に分裂)を調整し必要な血球系細胞を供給し続けている。HSCの多くは細胞周期が停止し、増殖しない静止期に留まっている。HSCが、分化・自己複製のために静止期から細胞周期に入る活性化機構についてはいまだ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

当研究室では、PAMPsである二本鎖RNA (poly(I:C), pIC)により誘導されるIFN- $\alpha$ が静止期にあるマウスHSCにin vivoで直接作用し、細胞周期を進展させ、活性化を誘導することを報告した (*Nat Med.* 2009, 15(6):696-700)。DCは、細胞内に存在するDNAやRNAセンサーによりPAMPs(ウイルスDNAおよびRNA)を感知し、IFN- $\alpha$ などの炎症性サイトカインを多量に生産することがよく知られている。これらのことから、申請者は、ウイルス感染時にDCが炎症性サイトカインを介して静止期にあるHSCの細胞周期を進展させ、HSCを起点とした造血システムの制御に重要な役割を果たしているのか検討を行った。

## 3. 研究の方法

(1)マウス骨髄HSCの細胞周期に関しては、DNAまたはRNAウイルス感染後、あるいはPAMPs投与後、RNA合成のために重要なKi67の発現しているHSCの割合をフローサイトメトリーを用いて検討した。

(2)DCの関与については、cDCを除去するためにCD11c-DTR-GFPマウスにジフテリアアトキシン(DT)を投与し、また、pDCを除去するために抗mPDCA-1抗体の投与し検討した。

(3)ウイルス感染時にDCから生産されるどのサイトカインがHSCの細胞周期の進展に重要であるかは、サイトカイン受容体欠損マウスを用いて検討した。

## 4. 研究成果

**1. ウイルス感染時のHSCの活性化:** 定常状態では骨髄細胞のLinage-CD150+CD48<sup>-</sup>分画のさらにc-Kit+Sca-1<sup>+</sup>分画に濃縮されているHSCが、マウスにDNAおよびRNAウイルス(LCMV, HSV-1, Vaccinia virus, Influenza virus)を感染させる、または、pICを投与した場合、HSCの表面マーカーが変動しLinage-CD150+CD48<sup>-</sup>分画のc-Kit+Sca-1<sup>+</sup>、またはc-Kit+Sca-1<sup>bright</sup>の2分画に存在すること(図1A)、

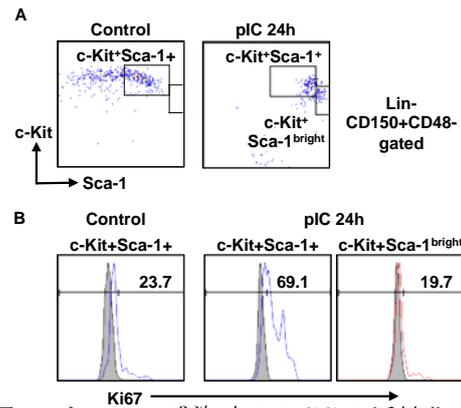


図1. ウイルス感染時のHSCの活性化

また、2分画のHSC細胞周期は、c-Kit+Sca-1<sup>+</sup>分画では著しい進展が認められるが、c-Kit+Sca-1<sup>bright</sup>分画ではほとんどが静止していることが明らかとなった(図1B)。

pIC投与後の2分画のHSCをそれぞれマウスに移植し長期骨髄再構築能を検討したところ、2分画ともに再構築能は認められたものの、定常状態のHSCと比較して低下した。以上の結果から、ウイルス感染時、あるいは、pICの投与によりHSCが活性化(細胞周期が進展あるいは静止する)ことが明らかとなった。

**2. IおよびII型IFN依存性:** LCMV感染により観察されるWT HSCの活性化(細胞周期の進展および静止)はIFNAR1<sup>-/-</sup>IFNGR1<sup>-/-</sup>HSCでは認められなかった(図2)。一方、IFNAR1<sup>-/-</sup>HSCまたはIFNGR1<sup>-/-</sup>HSCでは、野生型HSCと同程度の活性化であった。以上の結果から、ウイルス感染時に認められるHSCの活性化は、IおよびII型IFN両方に依存して起こる事が明らかとなった。

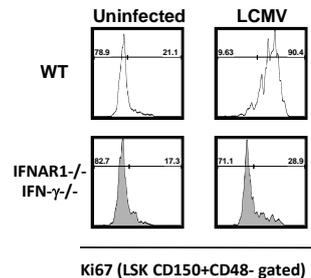


図2. IおよびII型IFN依存性

**3. HSCの細胞周期進展におけるDCの関与:** IFN依存性HSCの細胞周期の進展にI型IFNの主な生産細胞の一つである従来型DC (conventional DC, cDC)と形質細胞様DC (plasmacytoid DC, pDC)が関与するかについて、CD11c-DTR-GFPマウスにジフ

テリアトキシンおよび抗 mPDCA-1 抗体を投与し、それぞれ cDC および pDC を *in vivo* で選択的に除去し検討したところ、予想に反して、DC 除去後も HSC の細胞周期の進展は観察された(図 3)。

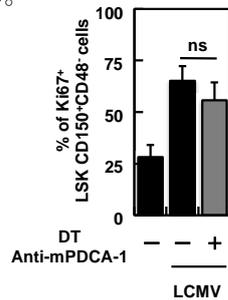


図 3. HSC の活性化における DC の関与

そこで、抗 AsialoGM1 抗体も加え II 型 IFN の主な生産細胞である NK 細胞も除去したが、まだ、HSC の細胞周期の進展は観察された。以上の結果から、ウイルス感染時の I および II 型 IFN 依存的 HSC の活性化に、DC や NK 細胞だけではなく、他の IFN 生産細胞も関与する可能性が考えられた。

**4. IFN が HSC に作用する生物学的意義：**多様な細胞から生産される IFN が HSC を活性化する生物学的意義を明らかにする目的で以下の 3 点の検討を行った。

① HSC mobilization の阻害：IFNAR1-/- IFN-γ-/- HSC (LSKCD150+CD48- 細胞) は、野生型 HSC と比較し、脾臓への mobilization が亢進している事が明らかとなった。この mobilization は、LCMV 感染によってさらに顕著に誘導された。この結果に比例して、脾臓における Colony 形成細胞数の増加も認められた(図 4)。以上の結果から、IFN 依存性シグナルは、HSC (前駆細胞も含め) の末梢への mobilization の阻止に重要な役割を果たしている可能性が明らかとなった。

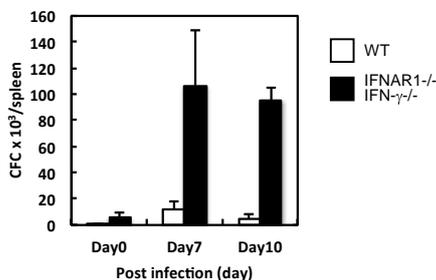


図 4. HSC mobilization の阻害

② HSC 細胞周期静止の維持機構：ウイルス感染時、細胞周期が静止している HSC が存在していることを明らかにした。この結果から、IFN が作用しても、静止期状態の HSC

が一定数必ず残る可能性が考えられた。

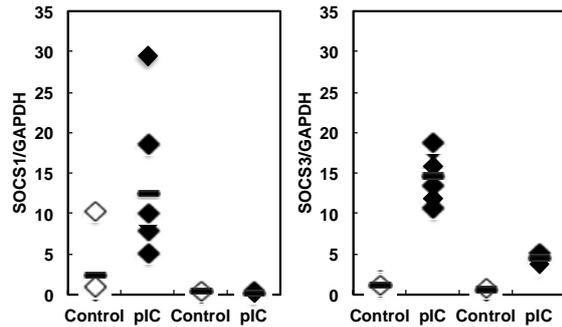


図 5. HSC 細胞周期静止の維持機構

そこで、この静止期維持機構を明らかにする目的で、IFN のネガティブフィードバック因子である Suppressor of cytokine signaling 1/3 (SOCS1/3) の関与に着目し検討したところ、pIC 投与により IFN シグナル依存的に HSC に SOCS1/3 mRNA 発現を誘導することが明らかとなった(図 5)。今後は、SOCS1/3 欠損マウスを用いて、ウイルス感染時の HSC 細胞周期静止の維持における IFN 依存的 SOCS1/3 発現上昇の重要性に関して検討を行う予定である。

③ ウイルス感染防御：HSC 自体へのウイルス感染は、末梢へ感染細胞を生み出してしまうとともに、感染した HSC が免疫系の標的となるという大きな問題が生じる。IFN は、NK 細胞によるウイルス感染細胞の排除促進や抗ウイルス作用を持つ遺伝子を活性化することが知られている。そこで、HSC へのウイルス感染における IFN 依存性シグナルの重要性を検討した。野生型マウスに LCMV を感染させ、4 日後、LSK 細胞における LCMV 感染を検討したところまったく認められなかった。また、抗 NK1.1 抗体を投与し、NK 細胞除去を行っても LSK 細胞における LCMV 感染は認められなかった。野生型 HSC は、ウイルス感染 12 時間後に抗ウイルスタンパク質である OAS1a および PKR mRNA の発現上昇が認められた。一方、IFNAR1-/- IFN-γ-/- LSK および LSK SP 細胞では顕著な LCMV 感染が認められた。以上の結果から、IFN 依存性シグナルは、抗ウイルスタンパク質の発現を介して HSC 自体へのウイルス感染を回避するために重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 小内伸幸 大八木秀明 佐藤卓 四元聡志 澤

田賢一 樗木俊聡 炎症性単球由来樹状細胞は血球貪食依存的に IL-10 を生産し、過剰な免疫反応を抑制する 第 40 回日本免疫学会学術集会 千葉 2011.11.27

2. 佐藤卓 四元聡志 樗木俊聡 Novel interferon(IFN)-based pretransplantaion conditioning in the treatment of congenital metabolic disorder 第 40 回日本免疫学会学術集会 千葉 2011.11.28

〔図書〕(計 1 件)

四元聡志, 樗木俊聡 (分担)  
免疫の事典「IL-15」2011 年 朝倉書店

〔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：