

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659482

研究課題名（和文） 骨髄異形成症候群の病態解析—骨髄と神経ネットワーク

研究課題名（英文） Pathophysiology of myelodyspoastic syndrome - network between bone marrow and nervus system

研究代表者

千葉 滋 (CHIBA SHIGERU)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60212049

研究成果の概要（和文）：正常ヒト骨髄において、血管内皮細胞とは独立の、方錐形をしたネスチン陽性細胞が、血管壁を構成する細胞の一部として観察された。一方、骨髄異形成症候群患者骨髄ではこのような構造が破壊されていた。また、ネスチンを発現する細胞で Notch シグナルが低下するように作製したマウスでは、胎生期造血に異常が観察されたことから、ネスチンを発現する造血支持細胞における Notch シグナルが造血に重要な役割を演じていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In normal human bone marrow, spindle-shaped nestin-expressing cells, distinct from endothelial cells, were shown as the vascular vessel wall-constituting cells. In contrast, such a structure was disarranged in the bone marrow of myelodyspoastic syndrome patients. We further found abnormalities in fetal liver hematopoiesis in mice with knocked-down Notch signaling in cells expressing nestin, implying important roles of Notch signaling in nestin-expressing stromal cells in hematopoiesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：血液内科学

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：ネスチン、骨髄異形成症候群

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨髄異形成症候群（MDS）における正常造血障害：MDS は異常造血細胞のクローン性増殖性疾患であり汎血球減少を伴う。血球減少は、正常造血が抑制される一方で、クローン性造血細胞が無効造血を行うことによる。正常造血抑制には、骨髄環境の異常が関与していることが示唆されているが、その詳細は不明であった。

(2) 骨髄における神経外胚葉系細胞の役割とその異常による造血障害の可能性：骨髄中で、

神経外胚葉関連と考えられるネスチン陽性のストローマ細胞の存在が確認されており、造血幹細胞ニッチを形成していることが報告されている。一方、神経外胚葉系由来と考えられるグリア細胞繊維性酸性タンパク質（GFAP）陽性細胞が、造血幹細胞の細胞周期を休止期にとどめる役割を果たすことも報告されている。これらの細胞に焦点を当てることで、骨髄環境異常による造血障害の機序を知る手がかりが得られるかもしれない、と考えられた。

2. 研究の目的

- (1) MDS 患者骨髄におけるネスチン陽性あるいは GFAP 陽性の神経外胚葉由来の造血支持細胞 (NGC) に異常が生じているか、生じているとすればどのような異常が生じているかを調べる。
- (2) もし NGC が障害を受けている証拠が得られれば、MDS クローン細胞に由来する NGC 障害因子を同定する。
- (3) ネスチン発現造血支持細胞において Notch シグナル活性が低下するマウスを作製し、このマウスにおける造血障害を観察する。

3. 研究の方法

(1) MDS および骨髄浸潤陰性の悪性リンパ腫 (コントロール) 骨髄生検検体を用いた、ネスチン陽性細胞の解剖学的解析：筑波大学附属病院病理部で保存されている、MDS および骨髄浸潤陰性であることが明確な悪性リンパ腫の骨髄生検検体について、ネスチン、血管内皮細胞マーカー等を中心とする免疫染色を行った。抗ネスチン抗体は、脳腫瘍などの病理診断のために病理部で日常的に染色しているものを用いた。また、非脱灰標本も染色するため、新たに採取する骨髄生検検体の一部から凍結切片を作製して免疫染色に用いた。

(2) ネスチンプロモーター下で Cre を発現する Nestin-Cre マウス、及び タモキシフェン誘導によりネスチンプロモーター下で Cre を発現する Nestin-CreERT2 マウス (京都大学・影山博士より供与) を、Cre 作動下に GFP を発現するトランスジェニックマウスと交配した (それぞれ Nestin-CreGFP マウス、Nestin-CreERT2GFP マウス) 。Nestin-CreGFP マウス骨髄の免疫染色を行い、ヒトにおけるネスチン陽性細胞と、マウスにおける GFP 陽性細胞との解剖学的解析結果を比較した。また、これらのマウスは、(3) のマウス作製に使用した。

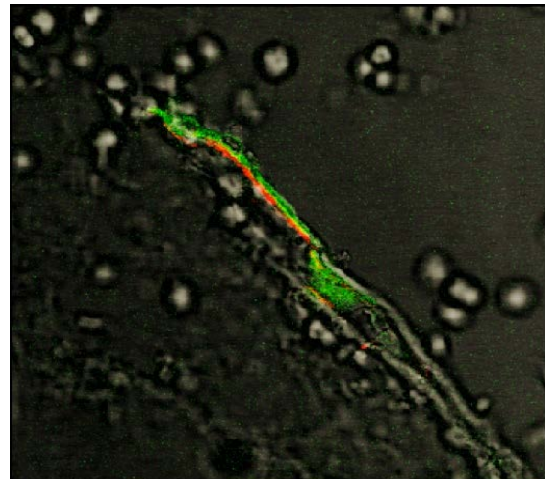
(3) Nestin-CreGFP マウス、及び Nestin-CreERT2GFP マウスと RBP-J κ flox/flox マウス (京都大学・本庶博士より供与) を交配し、ネスチンプロモーター下、あるいはタモキシフェン誘導によりネスチンプロモーター下で RBP-J κ を欠損するマウス (Nestin-CreGFP・RBP-J κ flox/flox マウス、Nestin-CreERT2GFP・RBP-J κ flox/flox マウス) を作製した。これらのマウスは、移植実験にも利用できるよう C57Bl/6 バックグラウンドにした。Nestin-CreGFP・RBP-J κ flox/flox マウスは、胎生第 19 日目までに死亡したため、胎仔の病理学的解析及び胎仔肝の造血細胞及び造血支持細胞を解析した。Nestin-CreERT2GFP・RBP-J κ flox/flox マウスは生後 4-8 週に達した時点でタモキシフェン

を投与し、経時的に造血能を観察した。

4. 研究成果

(1) ヒトコントロール骨髄及び MDS 患者由来骨髄における、ネスチン陽性細胞の解剖学的解析：コントロール骨髄では、少数の紡錘形を呈する細胞がネスチン陽性細胞として同定された。ネスチン陽性細胞は、血管壁を構成細胞として描出されたが、CD34 あるいは CD31 陽性の血管内皮細胞とは明確に異なり、血管内皮細胞と隣接して血管壁を構成している様子が観察された (図 1)。一方、MDS 患者骨髄では、類縁形のネスチン陽性細胞が多数観察された。MDS 患者骨髄では、紡錘形のネスチン陽性細胞は減少しており、特に血管内皮細胞と隣接しながら血管壁を構成している像が観察されず、ネスチン陽性細胞を含む解剖学的組織構築が破壊されている可能性が示唆された。以上の観察結果は、MDS における造血支持細胞の異常を具体的に可視化したという点で、極めて新規である。

(図 1) コントロール (骨髄浸潤のない悪性リンパ腫患者) 骨髄におけるネスチン陽性細胞と血管内皮細胞との相互関係 (CD31 [赤]、ネスチン [緑])



(2) Nestin-CreGFP マウス骨髄において、少数の紡錘形細胞が GFP 陽性を呈した。コントロールヒト骨髄におけるネスチン染色と同様、血管内皮細胞とは GFP が陰性であり、GFP 陽性の紡錘形細胞と CD34 陽性の血管内皮細胞とは、隣接しながら血管壁を構築していた。以上から、ヒト・マウスのいずれでも、正常骨髄において血管内皮細胞と隣接する紡錘形の細胞がネスチンを発現していることが明らかになった。ネスチン陽性造血支持細胞が造血幹細胞ニッチとして機能することが過去に報告されていることから、今回の研究により骨髄の造血幹細胞ニッチが具体的に可視化されたものと考えられる。

(3) Nestin-CreGFP・RBP-J κ flox/flox マウス及び Nestin-CreERT2GFP・RBP-J κ flox/flox マ

ウスの解析: Nestin-CreGFP・RBP-J κ flox/flox マウスは胎生 16 日目以降に致死であった。死亡したマウスは脳に著明な出血を来していた。また、造血障害を示唆する体表所見を呈していた。胎生 12-14 日目の胎仔肝由来の細胞を半固形培地で培養した結果、コロニー形成性能はコントロールマウスと差がなく、障害を受けていないことが明らかになった。一方、ネスチン陽性細胞は主に CD45 陰性の非造血細胞分画に認められた。ストローマ細胞が含まれる CD45 陽性細胞の中でも特に p75 陽性細胞では GFP 発現率が高く、ネスチン陽性細胞は p75 陽性細胞分画に濃縮されていた。このため、p75 陽性細胞をフローサイトメトリーで分離し、網羅的発現解析を行った。この結果は現在解析を継続している。一方、Nestin-CreERT2GFP・RBP-J κ flox/flox マウスは、タモキシフェン投与依存性に一部の骨髄細胞で RBP-J κ 遺伝子が欠失しており、目的とするマウスが得られたものと考えられた。このマウスの造血能は現在解析を継続している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- (1) Kamada Y, Sakata-Yanagimoto M, Sanada M, Sato-Otsubo A, Enami T, Suzukawa K, Kurita N, Nishikii H, Yokoyama Y, Okoshi Y, Hasegawa Y, Ogawa S, Chiba S. Identification of unbalanced genome copy number abnormalities in patients with multiple myeloma by single-nucleotide polymorphism genotyping microarray analysis. *Int J Hematol*. 96(4):492-500, Oct, 2012 査読有 (doi: 10.1007/s12185-012-1171-1)
- (2) Sakata-Yanagimoto M, Chiba S. Notch2 and Immune Function. *Curr Top Microbiol Immunol* 360:151-161, Jun, 2012 査読有 (doi: 10.1007/82_2012_235)
- (3) Sekine C, Koyanagi A, Koyama N, Hozumi K, Chiba S, Yagita H. Differential regulation of osteoclastogenesis by Notch2/Delta-like 1 and Notch1/Jagged1 axes. *Arthritis Res Ther* 14(2):R45, Mar, 2012 (doi:10.1186/ar3758)
- (4) Iwahashi S, Maekawa Y, Nishida J, Ishifune C, Kitamura A, Arimochi H, Kataoka K, Chiba S, Shimada M, Yasutomo K. Notch2 regulates the development of marginal zone B cells through Fos. *Biochem Biophys Res Commun* 418(4):701-707, Feb 24, 2012 査読有 (doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.082)
- (5) Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Miyake Y, Takagi J, Sakata-Yanagimoto M, Iwanari H, Osawa S, Morohashi Y, Li T, Wong PC, Chiba S, Kodama T, Hamakubo T, Tomita T, Iwatsubo T. Neutralization of the γ -secretase activity by monoclonal antibody

against extracellular domain of nicastrin. *Oncogene* 31(6):787-798, Feb 9, 2012 査読有 (doi: 10.1038/onc.2011.265)

- (6) Nishikii H, Nakamura N, Kondo Y, Okoshi Y, Suzukawa K, Hasegawa Y, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto S, Enami T, Noguchi M, Chiba S. Treatment outcome of adult Burkitt lymphoma in Japanese patients with modified LMB protocol: a single center retrospective analysis. *J Clin Exp Hematopathol* 51(2):109-114, Nov, 2011 査読有 (10.3960/jslrt.51.109)
- (7) Yoshida K, Sanada M, Shiraiishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 査読有 478(7367):64-69, Oct 6, 2011 (10.1038/nature10496)
- (8) Kusakabe M, Hasegawa K, Hamada M, Nakamura M, Ohsumi T, Suzuki H, Mai TT, Kudo T, Uchida K, Ninomiya H, Chiba S, Takahashi S. c-Maf plays a crucial role for the definitive erythropoiesis that accompanies erythroblastic island formation in the fetal liver. *Blood* 118(5):1374-1385, Aug 4, 2011 査読有 (10.1182/blood-2010-08-300400)
- (9) Sakurai N, Maeda M, Lee SU, Ishikawa Y, Li M, Williams JC, Wang L, Su L, Suzuki M, Saito TI, Chiba S, Casola S, Yagita H, Teruya-Feldstein J, Tsuzuki S, Bhatia R, Maeda T. The LRF transcription factor regulates mature B cell development and the germinal center response in mice. *J Clin Invest* 査読有 121(7):2583-2598, Jul 1, 2011 (10.1172/JCI45682)

[学会発表] (計 8 件)

- (1) Benjamin Kasenda., et al. First-Line Treatment and Outcome of Elderly Patients with Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL) - A Systematic Review and Individual Patient Data Meta-Analysis. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting and Exposition. 2012 年 12 月 8-11 日. Georgia World Congress Center. Atlanta, USA
- (2) Ayana Kon, et al. Recurrent Mutations of Multiple Components of Cohesin Complex in Myeloid Neoplasms. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting and Exposition. 2012 年 12 月 8-11 日. Georgia

- World Congress Center. Atlanta, USA
- (3) Naoki Kurita, et al. Soluble Recombinant Thrombomodulin Is a Potentially Promising Agent without Causing Severe Hemorrhagic Events for Hematological Malignancy-Induced Disseminated Intravascular Coagulation. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting and Exposition. 2012 年 12 月 8-11 日. Georgia World Congress Center. Atlanta, USA
 - (4) Hidekazu Nishikii, et a. Implication of the Distinct Differentiation Pathway of Megakaryocytes From Hematopoietic Stem Cells in the Mouse Bone Marrow. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting and Exposition. 2012 年 12 月 8-11 日. Georgia World Congress Center. Atlanta, USA
 - (5) Takayasu Kato, et al. Transcription Factor Hes1 Functions As a Tumor Suppressor in MLL-Associated Acute Leukemia. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting and Exposition. 2012 年 12 月 8-11 日. Georgia World Congress Center. Atlanta, USA
 - (6) Hideharu Muto, et al. Reduced Tet2 Function Contributes to Development of Peripheral T-Cell Lymphoma with Follicular Helper T-Cell-Like Features in Mice. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting and Exposition. 2012 年 12 月 8-11 日. Georgia World Congress Center. Atlanta, USA
 - (7) Kohei Hosokawa, et al. Detection of PNH-type cells using high-resolution flow cytometry: Interim analysis of OPTIMA study. 第 74 回日本血液学会学術集会. 京都国際会議場. 京都 平成 24 年 10 月 19 日～21 日
 - (8) Kenichi Yoshida, et al. Spectrum of gene mutations in myelodysplastic syndromes revealed by whole-exome sequencing. 第 74 回日本血液学会学術集会. 京都国際会議場. 京都 平成 24 年 10 月 19 日～21 日

[図書] (計 3 件)

- (1) 錦井秀和, 他、医薬ジャーナル社、造血幹細胞移植の基礎と臨床(改訂版)、2012、pp35-40
- (2) 小原直, 他、文光堂、Medical Practice 「実地医家のための臨床検査のすすめかた・評価のしかた」、2012、pp283-289
- (3) 千葉滋、最新医学社、最新医学別冊(新しい診断と治療の ABC[72];血液 8)、2011、pp95-100

[その他]
ホームページ
<http://www.ketsunai.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 滋 (CHIBA SHIGERU)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：60212049