

## 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 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790533

研究課題名(和文) 造血幹細胞・前駆細胞ニッチの形成を調節する分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of hematopoietic stem and progenitor niche formation

研究代表者

尾松 芳樹 (OMATSU YOSHIKI)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：80437277

研究成果の概要(和文)：

骨髄に存在する造血幹細胞・前駆細胞の維持に必須の微小環境(ニッチ)である CAR 細胞(ケモカイン CXCL12 を高発現する細網細胞)に着目し、その形成を調節する分子基盤を解明するために、CAR 細胞特異的な遺伝子に注目し、その役割を明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、マイクロアレイや RT-PCR 法により CAR 細胞特異的に発現する遺伝子のうち CAR 細胞の形成およびニッチとしての機能に関与する可能性のある分子が複数同定された。現在は同定した複数の遺伝子について欠損マウスの作成を行い、その表現型の解析中である。

研究成果の概要(英文)：

We have shown that CXC chemokine ligand (CXCL)12-abundant reticular (CAR) cells have potential to differentiate into adipocytes and osteoblasts, and play an essential role in maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) in vivo, meeting the criteria for “niche”. However, the molecular basis of the formation of cellular niches remain unclear. In this study, we found several candidate genes that play essential roles for development and maintenance of CAR cells, using microarray and qRT-PCR analysis, and we generated conditional knock-out mice of these genes.

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	3400000	1020000	4420000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：サイトカイン・造血幹細胞ニッチ

## 1. 研究開始当初の背景

成体の骨髄において、造血幹細胞は自己複製しながら前駆細胞を産生し、その前駆細胞は赤血球・Bリンパ球・顆粒球・血小板などの様々な血液細胞を過不足なく供給し続け

る。このような造血の恒常性は、ニッチ(niche)と呼ばれる特殊な微小環境によって維持されていると考えられている。

これまで造血幹細胞・前駆細胞ニッチの候補として、骨芽細胞(Zhang ら, *Nature*, 2003) や血管内皮細胞(Kiel ら, *Cell*, 2005)などが報

告されていたが、申請者らの研究グループではケモカイン CXCL12 を高発現する細網細胞(CAR 細胞)に着目して研究を行い、CAR 細胞をニッチの候補細胞として報告してきた (Tokoyoda ら , *Immunity*, 2004; Sugiyama ら, *Immunity*, 2006).しかし、これらいずれの報告においても、造血幹細胞・前駆細胞が接着していることなどがその主な根拠となっており、ニッチとしての機能の直接的な証明には至っていなかった。

そこで申請者は、CAR 細胞を成体において選択的に欠損させることが可能となる遺伝子改変マウスを作製し解析を行った。その結果、CAR 細胞欠損誘導後 2 日目において骨芽細胞および血管内皮細胞に異常が認められないにもかかわらず、骨髄内の SCF, CXCL12 の量が著減するとともに B リンパ球・赤血球の前駆細胞数が著減し、造血幹細胞数も約半分にまで減少すること、さらに骨髄細胞の骨芽細胞や脂肪細胞への分化能が著減することが示された。以上より、CAR 細胞は造血幹細胞・前駆細胞の維持に必須のニッチの構成細胞であることが証明され、脂肪細胞および骨芽細胞への分化能を持つ間葉系前駆細胞であることが明らかとなった。ただし、CAR 細胞が半永久的に自己複製する間葉系幹細胞であるのか否かは不明である (Omatsu ら, *Immunity*, 2010)。

一方、申請者の報告と同様の時期に、nestin 陽性細胞が間葉系幹細胞であり、造血幹細胞特異的なニッチとして機能することが報告された (Méndez-Ferrer ら, *Nature*, 2010)。しかしこの論文では、nestin 陽性細胞のごく一部が自己複製能を持つこと、造血幹細胞の 60%のみが接着することが示されたにすぎず、CXCL12 を高発現すると記載されているにも関わらず CAR 細胞との異同が記載されていないので今後の検討が必要である。

## 2. 研究の目的

上述の様に必須の造血・免疫ニッチ細胞である CAR 細胞が、サイトカインの産生能や分化能において特別な間葉系前駆細胞であることが明らかとなったことにより、この細胞の機能の詳細と発生過程における形成機構の理解が生体の免疫系形成を理解する上で新しい重要な問題となった。そこで本研究ではその分子基盤を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) CAR 細胞の発生過程の解析

CAR 細胞は四肢などの間充織において骨軟骨形成に伴って形成されることが想定される。そこで胎生 10 日より成体に至る連続した発生段階の四肢を免疫組織学的に解析し、CAR 細胞がいつ、どこで発生するのかを明らかにする。CAR 細胞の同定には CXCL12-GFP ノックインマウス (Ara ら, *Immunity*, 2003) を用い、GFP だけでなく複数の間葉系細胞マーカーに対する抗体も併用して、CAR 細胞の発生過程を連続的に観察する。さらに各発生段階ごとに CAR 細胞を分離し、遺伝子発現の比較検討を行い、発生段階特異的に発現する遺伝子を同定する。既に作製された遺伝子欠損マウスが入手できる場合は、それを用いて CAR 細胞の発生についての解析を行う。それ以外の遺伝子については遺伝子欠損マウスを作製し、解析を行う。

### (2) CAR 細胞特異的に発現する遺伝子の同定とその役割の解析

CAR 細胞の系列決定や形成に必須の分子を同定するために、CAR 細胞特異的遺伝子を探索する。はじめに成体の CAR 細胞と、胎生期の肢芽間充織細胞や、骨芽細胞などの他の間葉系細胞での遺伝子の発現量を比較する。ところが、これまで成体から骨芽細胞を濃縮分離する方法は確立されていない。そこでまず細胞外マトリクスを除去する手法や骨芽細胞特異的細胞表面マーカーを検討すること等で骨芽細胞をより純化する方法を開発する。そして純化した CAR 細胞と肢芽間充織細胞や骨芽細胞から mRNA を抽出し、マイクロアレイや RT-PCR 法により発現遺伝子の比較解析を行い、CAR 細胞特異的に発現する遺伝子を同定する。同定された CAR 細胞特異的遺伝子のうち、必須の機能が期待できる転写因子やシグナル受容体等の遺伝子については、遺伝子欠損マウスを作製し、そのマウスの CAR 細胞の形成や造血・免疫系等について解析する。

### (3) CAR 細胞の培養や移植による解析

CAR 細胞の自己複製能や多分化能について解析するためには一個の CAR 細胞を培養する系の確立が重要である。しかし CAR 細胞を蛍光細胞分離装置を用いて分離すると、従来の骨髄細胞の培養条件ではほとんど培養することができない。そこで CAR 細胞に至適な培養条件の検討を行い、一細胞レベルでの CAR 細胞の培養系を確立する。培養法が樹立できれば培養による CAR 細胞の自己複製能や多分化能の解析を行い、各発生段階および成体の CAR 細胞が間葉系幹細胞であるのか否かを明らかにする。

また、培養が不可能であっても生体内では生存および増殖できる可能性を考慮し、純化した CAR 細胞をマウス骨髄内に移植し、ニッチの形成能や分化能を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) CAR 細胞の形成および機能を調節する分子機構の解明

CXCL12/GFP ノックインマウスを用いて CAR 細胞と、胎生期の肢芽間充織細胞や、骨芽細胞などの他の間葉系細胞での遺伝子の発現量を比較を行うに先立ち、細胞外マトリクスを除去する手法や骨芽細胞特異的細胞表面マーカーを検討すること等で骨芽細胞をより純化する方法を開発した。そして純化した CAR 細胞と肢芽間充織細胞や骨芽細胞から mRNA を抽出し、マイクロアレイや RT-PCR 法により発現遺伝子の比較解析を行い、CAR 細胞特異的に発現する遺伝子のうち CAR 細胞の形成およびニッチとしての機能に関与する可能性のある分子を複数同定した。現在は同定した複数の遺伝子について、欠損マウスの作成を行い、その表現型の解析中である。

### (2) CAR 細胞の培養による解析

CAR 細胞の自己複製能や多分化能について解析するためにはシングルセルレベルで CAR 細胞を培養する系の確立が重要であったが CAR 細胞を蛍光細胞分離装置を用いて分離すると、従来の骨髄細胞の培養条件ではほとんど培養することができなかつた。そこで CAR 細胞に至適な培養条件の検討を行い、少ない頻度ながらシングルセルレベルで CAR 細胞を培養する系が構築されつつある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計3件）

(1) Nakamura-Ishizu A., Okuno Y., Omatsu Y., Okabe K., Morimoto J., Uede T., Nagasawa T., Suda T., Kubota Y. (2012) Extracellular matrix protein tenascin-C is required in the bone marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration. *Blood*, 119(23), 5429–5437.  
doi: 10.1182/blood-2011-11-393645.

査読あり

(2) Nagasawa T., Omatsu Y., Sugiyama T. (2011) Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol.*, 32(7), 315-320.  
doi: 10.1016/j.it.2011.03.009.

査読あり

(3) Kubota Y., Takubo K., Hirashima M., Nagoshi N., Kishi K., Okuno Y., Nakamura-Ishizu A., Sano K., Murakami M., Ema M., Omatsu Y., Takahashi S., Nagasawa T., Shibuya M., Okano H., Suda T. (2011) Isolation and function of mouse tissue resident vascular precursors marked by myelin protein zero. *J. Exp. Med.*, 208(5), 949–960.  
doi: 10.1084/jem.20102187.

査読あり

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾松 芳樹 (OMATSU YOSHIKI)  
京都大学・再生医科学研究所・助教  
研究者番号：80437277

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし