

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890112

研究課題名(和文) Wnt / decorin 経路を介した造血幹細胞制御の解明

研究課題名(英文) The regulation of human hematopoiesis by Wnt/decorin pathway

研究代表者

一井 倫子 (ICHII, Michiko)

大阪大学・大学院医学(系)研究科(研究院)・寄附講座助教

研究者番号：30633010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円、(間接経費) 690,000 円

研究成果の概要(和文)：骨髄内での血液細胞産生は、造血幹・前駆細胞を取り囲む微小環境に強い影響を受けている。本研究では、Wntによって微小環境内に産生されるデコリンが、ヒト造血幹細胞の維持に働いている事を明らかにした。また、ヒト骨近傍領域に存在する未知の細胞分画を発見し、解析を行った。この細胞は血管内皮前駆細胞と考えられ、ヒト造血幹細胞を制御する新たな微小環境細胞の可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In adult bone marrow, it is believed that the specialized microenvironments regulate self-renewal or differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC). However, our knowledge has been limited especially about the significant species differences in hematopoiesis between mice and humans.

In this study, we found extracellular matrix protein, decorin, which is up-regulated by Wnt3a in mesenchymal stem cells, could maintain stemness phenotype of human HSC. Furthermore, we studied bone-associated cells in the trabecular areas of human marrow, released from femoral heads after collagenase treatment. We found there were two distinct populations according to CD34 and ESAM expression levels in CD34+CD38- cells. CD31+ Flk-1+ endothelial cells were generated after a 5 week long-term culture from CD34hi ESAMhi subset, indicating the unknown cells might be endothelial stem/progenitors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：造血微小環境

1. 研究開始当初の背景

赤血球・白血球・血小板といった大量の血液細胞が、一生涯を通じて安定的に供給されるには、骨髄内の造血幹細胞が維持されることが必須である。血液の枯渇を防ぐために、造血幹細胞の自己複製と各系統血球細胞への分化は、厳密かつ複雑に制御されており、そのメカニズムの一つとして、近年、造血微小環境(niche)の役割が注目されている。造血幹/前駆細胞(hematopoietic stem/progenitor cells; HSPC)は骨髄内にそれぞれ局在しており、その周囲に存在する様々な細胞や環境因子が、幹細胞維持あるいは各系統への分化に強い影響を与えている。

申請者は以前より、Wnt シグナルによる、造血幹細胞の自己複製とリンパ球系への初期分化の制御機構について注目し、研究に取り組んできた。その過程で、Wnt が造血微小環境を介した間接的作用を持つことを見出した(Ichii et al. Blood. 2012)。すなわち、ノックアウト・マウスおよび培養実験によって、Wnt3a がプロテオグリカンファミリー蛋白 decorin(デコリン)の niche 内での産生を制御する事で、B リンパ球初期分化の阻害・造血幹細胞特性の維持に作用している事を明らかにしたのである。デコリン蛋白は、多発性骨髄腫の増殖抑制作用が報告されており、患者骨髄内間葉系前駆細胞での発現が抑制されている事がわかっている。これらの知見は、デコリン蛋白が HSPC や造血器腫瘍の造血微小環境因子として重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト骨髄内造血微小環境での幹細胞維持・分化において、Wnt/デコリン経路がどのような役割を果たしているのかを明らかにすることである。

(1) 生体内または培養系のヒト造血微小環境モデルの確立

HSPC の自己複製や分化のメカニズムの知見は、ほとんどがマウスを用いた研究から得られている。ヒトにおける再検証は、疾患の理解や治療への応用の観点から非常に重要であるにも関わらず、実験技術上の問題が、それを妨げていた。特に、ヒト骨/骨髄微小環境解析は、ほとんど行われてこなかった。その理由は、まず、骨髄穿刺により得られる吸引細胞や臍帯血を処理して造血幹細胞を単離する事に比べ、間葉系細胞など niche 側の細胞を回収する事が困難であることが挙げられる。また、生体モデルについても免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移植した系が使われるのみで、niche がヒト化された移植マウスの確立は困難であったからである。申請者は、

以前、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞が、臍帯血由来造血幹細胞からの B リンパ球分化を支持する能力に優れている事を報告した(Ichii et al. Exp.Hematol. 2008)。さらに本研究では、ヒト大腿骨頭から単離可能な間葉系細胞・造血幹細胞を用いて、新たな生体内および培養系のヒト造血微小環境モデルを確立したいと考えた。

また、マウス実験による研究からは、HSC は骨膜近傍領域に局在するとされている。もしヒトも同様ならば、大腿骨頭周辺の骨髄には、HSC niche エリアが多く含まれている可能性がある。そこで、大腿骨頭内骨髄より回収した細胞を解析する事で、間葉系細胞以外のヒトにおける niche 細胞を新たに発見する事を試みたいと考えた。

(2) Wnt/デコリン経路の作用解析

申請者らは、Wnt3a を強制発現したマウス・ストローマ細胞株を用いて、Wnt シグナルが、ヒト HSPC においても B リンパ球初期分化抑制・幹細胞維持に働く事を示した(Ichii et al. Blood. 2012)。しかしながら、上述した理由から、ヒトにおける Wnt/デコリン経路のメカニズム解析は、未だ十分ではない。本研究では、(1)に記したヒト由来骨髄微小環境モデルとなる実験系を確立し、Wnt シグナルによって造血微小環境に発現を誘導されたデコリン蛋白がどのように造血幹細胞を制御しているかを、より詳細に明らかにしたい。さらに、造血器腫瘍における役割についても検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 生体内または培養系でのヒト造血微小環境モデルの確立

大腿骨頭から採取した間葉系細胞を用いた、生体内または培養系モデルを確立する。具体的には、コラゲナーゼ処理によって溶出した間葉系細胞から、間葉系幹細胞・骨芽細胞を CD146、CD105、CD271 などの発現をマーカーとしてフローサイトメトリー法により単離する。これらを培養支持細胞として、ヒト造血幹細胞の共培養系を確立する。また、近年、免疫不全マウスにヒト間葉系幹細胞を異所性に移植する方法が報告された(Sacchetti et al. Cell. 2007)。申請者らは、この移植モデルに造血幹細胞移植を併用する事で、免疫不全マウス内に、ヒトの間葉系細胞内にヒトの造血を再構築したモデルの確立を試みる。具体的には、大腿骨頭から単離した CD45⁻CD146⁺CD271⁺細胞(間葉系幹細胞とされる細胞集団)を、キャリアーと共に 2Gy 放射線照射後の NOD/SCID 免疫不全マウスの皮下に移植する。並行して、尾静脈から CD34⁺CD38⁻造血幹細胞の移植も行い、8-12 週以降に解析を行う。

また、大腿骨頭内骨髄より回収した細胞を

解析する事で、ヒトにおける niche 細胞を新たに解明する事も試みる。

(2) Wnt/デコリン経路の作用解析

Wnt シグナルによって造血微小環境内に産生誘導されたデコリン蛋白が、どのように造血幹細胞維持に関与しているのかについて検討するため、デコリンを強制発現またはノックダウンしたストローマ細胞株、リコンビナント蛋白を添加した造血幹/前駆細胞の培養系を用いて、造血幹細胞の分化傾向と自己複製能を評価する。同様の実験を、造血器腫瘍細胞を用いて行う。上述(1)の実験計画により生体内モデルが確立できれば、デコリンを過剰発現した間葉系細胞を移植し、生体内での機能について解析を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト造血微小環境モデルの確立と新たな niche 細胞の発見

最初に、ヒト大腿骨頭より造血微小環境側の細胞をいかに効率よく回収できるかの検討を行った。検体は、倫理委員会の承認の下、大阪大学附属病院整形外科で大腿骨頭置換術を行う患者より摘出された骨頭を用いた。種々の条件を検討した結果、4型コラゲナーゼを用いた処理条件を決定できた。この処理により CD45⁻CD271⁺間葉系幹細胞を多量に単離する事が可能となる事が分かった(図1)。ヒト大腿骨頭由来の間葉系幹細胞は、培養での増殖能力は安定していたが、免疫不全マウスに皮下移植を行った系での生着は不良であった。組織標本の解析ではごく微量の生着は確認されており、移植時のキャリアーの選択が重要であると考えられた。

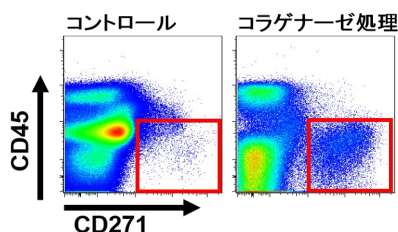


図1) コラゲナーゼ処理により間葉系幹細胞を効率よく回収できる。

また、コラゲナーゼ処理によって得られる様々な細胞成分を解析したところ、CD34、ESAM を高発現する未知の細胞が単離されることを見出した。CD34、ESAM は造血幹細胞と血管内皮細胞の2系統において表面抗原マーカーとされている。この未知の細胞群はほとんどが静止期に入っているが、長期培養が可能であり、5週間培養後には CD31 陽性の血管内皮系細胞への分化誘導が可能であることが分かった。血管内皮系細胞は、骨髄の造血幹細胞の維持・分化制御に大きな役割を

果たしている事が分かっている。この ESAM 陽性細胞が、ヒト骨髄の造血微小環境を形成する未知の細胞分画である可能性が考えられた。

(2) 造血微小環境における Wnt/デコリン経路の作用解析

本研究では、造血微小環境内の Wnt/デコリン蛋白経路の役割を明らかにすることを目的の一つに設定した。そのためにまず、レトロウイルスベクターを用いて、デコリンを過剰発現した間葉系細胞を作成した。Wnt 蛋白 (Wnt3a、Wnt5a、Dkk1) を強制発現したマウス・ストローマ細胞株 (OP9) に加えて、デコリンを強制発現した細胞株を確立する事で、各蛋白間での機能比較が可能となった。また、いずれの細胞株も継代可能な状態に安定化されており、デコリン発現を制御した間葉系細胞を用いた培養系での解析方法を、安定した実験系として確立する事が出来た。

これらの細胞株を用いて造血幹細胞の共培養を行った。マウス HSPC (Lin⁻Sca1⁺cKit^{Hi}; LSK) を7日間培養しフローサイトメトリー法にて解析を行ったところ、デコリンを過剰発現した OP9 細胞上で培養すると、HSC の性質 (LSK 発現パターン) がより長く維持される事が分かった(図2)。この結果により、デコリン蛋白が幹細胞を維持する能力を持っている事が再確認された。この実験はマウスだけでなくヒト造血幹細胞を用いて行い、デコリン蛋白がヒト造血においても同様の作用を持つ事が示された。

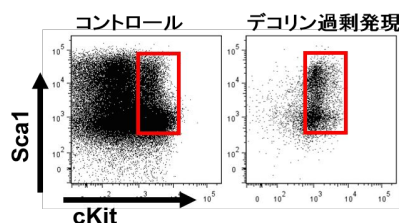


図2) デコリンは、幹細胞を維持する方向に働く。

さらに、造血器腫瘍における Wnt/デコリン経路の機能についても検討した。当初は急性白血病を用いた解析を行う予定であったが、検体入手の問題から、多発性骨髄腫を用いた検討に変更した。骨髄腫細胞株 RPMI8226 をデコリンまたは Wnt3a を過剰発現した OP9 上で培養すると、その増殖が強く抑制される事がわかった(図3左)。ストローマ細胞無し条件下で、リコンビナント・デコリン蛋白を添加した培養でも同様の結果が得られた事から、デコリン蛋白が直接的に骨髄腫細胞の増殖を制御していると考えられた(図3右)。

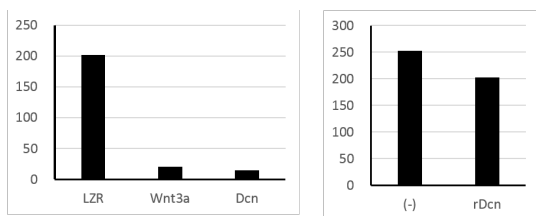


図3) デコリンにより、多発性骨髄腫の増殖が抑制される。
(左: 過剰発現OP9細胞の共培養 右: リコンビナント・デコリン蛋白添加)

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3件)

Ichii M, Oritani K, Kanakura Y. The utility of flow cytometry in evaluating prognostic factors of multiple myeloma. *Cytometry Research*. 23(2):1-6, 2013 (査読有)

一井倫子、織谷健司、金倉譲、多発性骨髄腫における正常造血、血液内科 第66巻特別増刊号、2013、pp372-377

Yokota T, Sudo T, Ishibashi T, Doi Y, **Ichii M**, Oritani K, Kanakura Y. Complementary regulation of early B-lymphoid differentiation by genetic and epigenetic mechanisms. *Int J Hematol*. 98(4): 382-389, 2013 (査読有)

[学会発表](計1件)

Ichii M, Oritani K, Yokota T, Ishibashi T, Sudo T, Fujita N, Kincade PW, Kanakura Y. Analysis of human endosteal HSC niche; a novel CD34^{high} ESAM^{high} subset is adjacent to trabecular areas of human bone marrow. 18th Congress of European Hematology Association. June 13-16, 2013. Sweden.

[図書](計1件)

一井倫子 他、中外医学社 Annual Review 血液 2013、244(pp9-15)、2013

[その他]

ホームページ等

<http://www.hematology.pro/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

一井 倫子 (ICHII, Michiko)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座 助教

研究者番号：30633010