

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 17 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25505005

研究課題名(和文) インターロイキン1 の皮膚線維芽細胞に対する影響に関する研究

研究課題名(英文) IL-1 beta induced vascular endothelial markers in HDF

研究代表者

白藤 尚毅 (Shirafuji, Naoki)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：00206301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄線維芽細胞へCD34を誘導する分子としてIL-1bを単離した。IL-1bをHDFをIL-1b添加iPS培地で培養後電気刺激を与えVEGF-A, BMP-4添加下培養するとCD31, CD41といった内皮細胞で発現が認められる分子が発現した。その後VEGF-A, EPO, anti-human VEGF-C Ab, anti-human TNF-alpha (a) Ab添加下培養するとCD34の発現が確認され、VEGF-A, SCF, FL, IL-6, IGF-IIを添加するとCD34, CD45, FLT3, GATA-2, SCLなどHSCで認められる分子の発現が確認された。

研究成果の概要(英文)：When an adult human dermal fibroblast (HDF) was cultured with interleukin (IL)-1-beta (b), vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, erythropoietin (EPO), anti-human VEGF-C antibody (Ab) and anti-human tumor necrosis factor (TNF)-alpha (a) Ab, hematopoiesis-related genes expressed; however, culturing cells were morphologically fibroblasts (56th ASH). We also reported that hemogenic endothelium-relating molecules expressed in HDF with poly (I:C) culture and an electrical stimulation (44th ISEH).

研究分野：造血幹細胞

キーワード：皮膚線維芽細胞 インターロイキン1ベータ 血管内皮前駆細胞 CD34 CD41 CD31 CD45

1. 研究開始当初の背景

骨髄間質系細胞は造血幹細胞 (HSC) の増殖環境を構成している場所 (niche) であるが、中胚葉性間質系細胞の幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) にも富み、また他臓器の幹細胞及び組織へも分化を示す細胞が同定されていることから、骨髄細胞を用いた他臓器(血管、心筋、神経細胞など)への *in vitro, in vivo* 系による分化誘導の報告や臨床治療試験の報告がなされており、再生医学として応用されている。この間質系細胞が一部の血液悪性腫瘍性疾患の増殖環境において非常に重要な位置を占めていることが報告されている。このような観察から、血液悪性腫瘍性疾患、特に急性白血病においても固形癌同様間質系細胞が作る微小環境の影響が細胞増殖に関与し、その治療においても重要な役割を担っていることが想定される。

正常な骨髄間質系細胞に関する新しい知見では、HSC が MSC を誘導し得、また MSC の特異的な分画は HSC と同様な分子発現を有するというものであり、CD146 が重要な働きをしていると報告されている。また、神経幹細胞で発現しているとされていた Nestin は HSC の産生部位である niche を構成する細胞においても発現しており、重要な働きを担っていると考えられている。その中で我々は血液悪性腫瘍細胞が間質系細胞に分化するという作業仮説を立て、*de novo* 白血病細胞を液体培養系で長期培養し細胞形態の変化を観察した。各種白血病細胞中、急性骨髄性白血病の一部並びに慢性骨髄性白血病由来細胞が 1 ヶ月程度で myo

-fibroblast 様形態に変化し、継代培養が可能であった。培養を繰り返すことで他細胞の混入を除去し、得た myofibroblast をサブクローニングした後 RNA を抽出し RT-PCR により白血病細胞由来細胞を選別、その細胞の DNA を調べたところやはり白血病細胞由来であることが判明した。各種白血病の培養前に確認されていたマーカー、fibroblast のマーカー並びに幹細胞のマーカーを免疫染色、RT-PCR で確認したところこの細胞は急性骨髄性白血病細胞の特性、fibroblast の特性及び幹細胞の特性が確認された。慢性骨髄性白血病細胞を用いた実験においても同様の観察結果が得られた。また、*in vivo* において NOD/SCID mouse に白血病細胞を移植したところ白血病細胞由来 myofibroblast が確認された。

次に、得られた白血病由来間質系 myofibroblast を NOD/SCID mouse に移植したところ、2 ヶ月後腹腔内並びに肝臓に芽球腫が形成された。CD56, CD146, Nestin 陽性であり、腫瘍形成細胞は紡錘形をした myo-fibroblast 類似の細胞の他、白血病細胞も観察された。すなわち間質系 myofibroblast と非付着性白血病細胞との相互形態変化を示唆していた。正常骨髄由来 myofibroblast を用いた移植実験においても同様な結果が得られ、発現抗原も CD56, CD146, Nestin 陽性であった。

以上の観察結果から、myo-fibroblast 細胞分画の一部から HSC が誘導される可能性を考え、ヒト末梢血リンパ球を PHA-P で刺激させた培養上清を myofibroblast と共培養した後形態を観察したと

ころ、一部の細胞で budding が生じ、骨髄芽球、赤芽球の誘導が確認された。また、CD34 分子の発現が確認された。何らかの活性が myo-fibroblast を HSC へと誘導したと考えられたため PHA-P 刺激リンパ球発現を用いて発現ライブラリーを作成し、COS7 細胞へ遺伝子導入後培養上清を正常 myo-fibroblast へ添加、2 週間培養後に RNA を抽出し CD34 の発現誘導の有無をマーカーとした発現クローニングを試み、ヒト IL-1 を単離した。

## 2 . 研究の目的

今回研究代表者は、単離された IL-18 の HDF に対する生物学的影響、特に造血細胞並びに骨髄 stroma への分化に関する研究を、骨髄由来 myofibroblast を用いた培養条件を参照として研究する。

1 ) 正常骨髄由来 myofibroblast を用いて IL-18 添加下で培養条件を変えながら HSC へ変化するかどうか観察する。

2 ) HDF を用いて 1 ) で用いた条件で培養を行い、CD34 の発現や CD45 の発現を観察する。そして HDF, IL-18 添加下培養中の HDF, CD34 陽性 HSC, 及び骨髄由来 myo-fibroblast の遺伝子発現の比較を行ない、特に発現が誘導されるサイトカイン、その受容体、並びに転写因子と情報伝達分子に着目し、他の添加すべきサイトカインを検討する。その条件下で HDF から HSC の誘導が生じるか in vitro でコロニー法、分化誘導などを用いて形態的、機能的に解析する。現在明らかになっている造血幹細胞の発生過程は、Hemogenic endothelium (HE) がま

ず血管内皮細胞の一部から発生、同細胞は CD41, CD106 を発現しており、SCF, IL-6, FLT3, VEGF-A の存在下 primitive, secondary HSC へと分化すると報告されている。HDF を HE へと分化させ、その後 HSC へと分化させる 2 段階の培養により HDF から HSC への誘導が可能であると思われる。

外在的な遺伝子導入を行わずに培養条件の変化のみで細胞の分化が誘導可能であるかどうか、この点が本研究の目的である。myofibroblast の一部を構成する細胞が IL-18 によって HSC へと誘導される可能性があり、詳細な観察を行い、また HDF においても HSC の誘導が確認できればその臨床応用において非常に応用範囲があり、有用であると考えられる。特に再生不良性貧血の移植療法や、化学療法後骨髄抑制が遷延している症例、一部の骨髄異形成症候群で汎血球減少が問題となっている症例に対する新たな治療法の開発に役立つものであると考えられる。また、生理的にも造血幹細胞が造血発生の新しい機序として ex vivo expansion などにも臨床応用が可能となり、非常に意義のある研究であると考えられる。

## 3 . 研究の方法

正常ヒト骨髄間質系 myofibroblast の中で IL-18 に反応するものを FACS を用いて選別する。その細胞群の表面抗原を調べ、特に CD146, CXCR4 など HSC と共通する抗原に着目しながらサブクローン数種類に分割し、IL-18 と共培養しながら CD34 の発現を観察し、誘導される分画を選別する。選別した後その細胞群で発現してい

る表面抗原や遺伝子を調べ、細胞の純化を試みる。knockout DMEM (低浸透圧、高 glucose) と 20% knockout serum replacement (KSR) 培地、並びに未分化 ES 細胞、iPSC 細胞培養用培地で条件をかえながら培養を続け、また各種増殖因子、抗体を添加することで至適な培養条件を解析する (形態変化、発現蛋白質、各種造血因子及びその受容体の発現)。そのもとで HDF を用いた実験を行う。無血清培地で IL-18 及び他の増殖因子と共培養し、形態変化、HSC で発現している遺伝子群の発現、各種造血因子、同受容体、その情報伝達系を司る分子の発現を観察する。また poly (I:C) による刺激や電気刺激による細胞の活性化を遺伝子発現、形態変化の面で観察し評価する。Poly (I:C) は細胞を未分化状態に脱分化させると報告されている。また、細胞刺激による脱分化に関する報告では、核移植において PEG などによる細胞融合に electric stimulation を併行させることで移植効率が非常に上昇するという報告があるためその効果を併行して観察した。HE で発現している CD31, CD41, CD34 分子の発現や、HSC で発現している SCL, GATA-1, CEBPa, PU-1 など各種遺伝子の発現を観察する。また、c-kit, FLT3, G-CSF receptor, EPO receptor, TPO receptor などの造血細胞の増殖因子受容体、その情報伝達系に關与する蛋白質の発現も観察し、発現誘導が認められたものに関してはその増殖因子を添加してサイトカイン依存性、細胞の形態、機能、表面抗原の解析を行う。その後造血因子添加コロニー法を用いて造血細胞コロニーの形成能を観察する。形態変化、表面抗原の変化並びに遺伝子変化を

観察し、*in vivo* NOD/SCID mouse を用いた移植実験を行なう。移植後骨髄で生成した細胞を用いて HSC の細胞生物学的特性を *in vitro* において評価する。

#### 4 . 研究成果

骨髄由来 myofibroblast を IL-18 添加 3 週間培養すると CD34, CD13, G-CSF receptor, VEGFR type-3, SCL などの発現が誘導され、その後 DMEM/F12 に 20% KSR で erythropoietin 及び IL-18 添加 2 週間培養すると GATA-1, CEBPa といった転写因子の発現亢進が確認された。myofibroblast では IL-18 添加によって VEGF-A の産生亢進が確認されているため、本 system を用いた HDF 培養時に VEGF-A 添加の有無による影響を観察した。20% KSR 添加 knock out DMEM に IL-18, VEGF-A 及び EPO 添加で培養すると CD34 の発現が認められた。この条件で human antiVEGF-C 抗体並びに human TNF-alfa 抗体を添加すると CD34 の発現が亢進した。しかし細胞形態は fibroblast 様であり、この状態の細胞を DMEM/F12 に 20% KSR 添加培地で造血幹細胞用の成長因子である SCF, IL-6, FL, EPO, TPO, G-CSF 並びに IGF-II と共培養する (HSC 培地) と CD45 の発現は軽度認められ SCL, GATA-1, CEBPa, PU-1 など各種遺伝子の発現も確認されたが形態的にはごく一部の細胞が non-adherent cell となっただけであった。本細胞を NOD/SCID マウスに 7.5 Gy 全身照射後移植してもヒト由来造血細胞の生着は認めなかった。

次に、poly (I:C) による刺激、並びに電気刺激の影響を観察した。HDF を 20% KSR 添加 knock out DMEM に poly (I:C) (30 ng/mL) 添加し 7 日間培養し、

その後細胞を 電気刺激バッファー (0.25 M d-sorbitol, 0.1 mM Ca-acetate, 0.5 mM Mg-acetate, 1 mg/mL fatty-acid-free BSA, 0.5 mM HEPES) に氷上 10 分孵置、電気刺激を 110 V から 540V (0.2 cm electrode, gap)で行い再度 k/o DMEM containing 20% KSR で培養、その後 IL-1-b, EPO, VEGF-A, VEGF-C 抗体並びに TNF-a 抗体を添加、または BMP-4 と VEGF-A を添加後 2 週間培養して HE への誘導の有無を分子発現で観察した。Poly (I:C) 添加によって Pax3 や DNMT3B、KLF4 といった未分化細胞で認められる遺伝子の発現亢進が確認された。HE 誘導培養では CD31, 34, 41 の発現が確認された。その後細胞を HSC 培地で培養すると SCL, GATA-2, CD34 及び CD45 といった抗原の発現が確認された。しかし形態的には HSC とは認められない細胞が大半であった。次に、新たに発売された iPSC (CERLENA) 培地を用いて同様の観察を行った。また、iPSC 培地での培養時培地のみ、Noggin 添加、IL-1β 添加による影響、並びに長期培養による変化を観察した。長期培養では 1 か月以上、1 日おきに培養液を交換しながら行った。iPSC buffer 単独と比較し、IL-1β 添加 iPSC buffer では CD31, 41 の発現が亢進した。また未分化細胞で転写亢進される分子の発現も確認された。2 週間以上培養すると VEGF-receptor type-1, type-2, 並びに VE-cadherin の発現が亢進し、HE 様の形態変化も確認できた。その後 HSC 培地で細胞を培養すると、1 割程度の細胞が non-adherent mononuclear cell となり、一部 cpbblestone appearance が確認された。それらの細胞では SCL, GATA-1, GATA-2 分子の発現が認められ CD45 分子も発現が確認された。現在

NOD/SCID マウスを用いた移植により human HDF から培養条件の変化のみで誘導した HE 並びに HSC 細胞がマウスで repopulate できるかどうか観察している。

#### 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 2 件)

Y. Oka, H. Tashiro, R. Sirasaki, T. Yamamoto, N. Akiyama, K. Kawasugi, N. Shirafuji, S. Fujimori. Hyperuricemia in hematologic malignancies is caused by an insufficient urinary excretion. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*. 33: 434-438, 2014

増悪時に E 抗原及び c 抗原の著しい減弱を認めた骨髄異形成症候群の 1 例

難波宏美、藤原孝記、金子強、永友ひとみ、蟹井はるか、笠井英利、大曾根和子、前島理恵子、富山秀和、脇本信博、白藤尚毅

*Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy*, Vol. 59. No. 6 59 ( 6 ) : 813–818, 2013

他に投稿中の論文 2 編、作成中の論文 2 編

[学会発表](計 13 件)

1) Y. Oka, H. Tashiro, N. Shirafuji et al. T cell receptor Vbeta repertoire plays an important role in graft-versus-leukemia effect to acute lymphocytic leukemia with *TCF3-PBX1*. 第 74 回日本血液学会総会、第 52 回日本臨床血液学会総会

2) T. Matsuo, R. Shirasaki, N. Shirafuji, et al. CD45 is induced to express in interleukin 1-beta-stimulated adult human dermal fibroblasts. 同学会

3) R. Sumiyoshi, T. Matsuo, N. Shirafuji, et al. Hemogenic endothelium-like changes were observed in an adult human dermal fibroblast with an

electrical stimulation. 76 回日本血液学会  
総会

- 4) T. Matsuo, R. Shirasaki, Y. Oka, N. Shirafuji. Inhibition of vascular endothelial growth factor-C induces the expression of fms-like tyrosine kinase 3 in interleukin 1-beta-stimulated adult human dermal fibroblasts. 11<sup>th</sup> Stem Cell Research Symposium
- 5) T. Matsuo, R. Shirasaki, Y. Oka, J. Ooi, N. Shirafuji. Neutralization of vascular endothelial growth factor-C induces the expression of fms-like tyrosine kinase-3 in interleukin 1-beta-stimulated adult human dermal fibroblasts. Haematologica 2013; 98 (S2). 18<sup>th</sup> EHA
- 6) T. Matsuo, R. Shirasaki, Y. Oka, K. Matsumoto, J. Ooi, N. Shirafuji. Adult human dermal fibroblasts was induced to express GATA-2 when they were cultured with interleukin 1-beta, erythropoietin, and anti-human vascular endothelial growth factor-C antibody. 19<sup>th</sup> EHA
- 7) K. Kawasugi, T. Yamamoto, N. Shirafuji, et al. Beneficial effect of anticoagulants in the management of patients with acute promyelocytic leukemia (APL): Results of a multicenter, retrospective epidemiologic study of the disseminated intravascular coagulation patients in Japan. 55<sup>th</sup> ASH meeting
- 8) R. Shirasaki, T. Matsuo, Y. Oka, J. Ooi, N. Shirafuji. Neutralization of vascular endothelial growth factor-A induced CD138 -expression in bone marrow cells from multiple myeloma patients.
- 9) Y. Oka, R. Shirasaki, T. Matsuo, H. Tashiro, J. Ooi, N. Shirafuji. T cell

receptor Vbeta repertoire plays an important role in graft-versus leukemia effect to acute lymphocytic leukemia with TCF3-PBX1.

- 10) T. Matsuo, R. Shirasaki, N. Shirafuji, et al. Hemogenic endothelium-like changes were derived to an adult human dermal fibroblast by electrical stimulation. 56<sup>th</sup> ASH meeting
- 11) T. Matsuo, R. Sumiyoshi, N. Shirafuji, et al. Hemogenic endothelium-like changes were observed in an adult human dermal fibroblast with poly (I:C) culture and an electrical stimulation. 44<sup>th</sup> ISEH Annual Meeting
- 12) K. Kawasugi, T. Yamamoto, N. Shirafuji, et al. Increased Levels of Histone in Human Plasma in Septic Patients with DIC. 57<sup>th</sup> ASH meeting
- 13) R. Sumiyoshi, T. Matsuo, N. Shirafuji, et al. Vascular endothelial cell-relating molecules expressed in an adult human dermal fibroblast when cultured with interleukin-1-beta. 21<sup>st</sup> EHA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕なし

6 . 研究組織  
( 1 ) 研究代表者 白藤 尚毅  
( SHIRAFUJI, Naoki )  
帝京大学・医学部・教授  
研究者番号 : 00206301