

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860322

研究課題名(和文) IL-7産生ストローマ細胞が形成する骨髄微小環境の機能解明

研究課題名(英文) Analysis of IL-7 niche in bone marrow

研究代表者

原 崇裕 (Hara, Takahiro)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：90512301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：異物から生体を守る免疫システムにおいて、B細胞は必須の役割を果たしている。しかしながら、B細胞の形成を支持する骨髄IL-7産生性ストローマ細胞は同定されていない。本研究では、造血幹細胞ニッチの役割を果たすCAR細胞にはIL-7産生性の分画が含まれており、このCAR細胞分画が産生するIL-7がB前駆細胞の分化・増殖にとって必須であることを明らかにした。また、かつてB細胞の形成に寄与すると推測されていた骨芽細胞由来IL-7は、生体においては必要ではないことも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells (HSCs) give rise to all types of blood cells including B lymphocytes. HSCs self-renew in bone marrow niches formed by CAR cells and sinusoidal endothelial cells. It has been predicted that interleukin-7 (IL-7)-dependent B lymphopoiesis is supported by osteoblasts in endosteal region, because in vitro differentiated osteoblasts have the potential to produce IL-7. However, very little is understood about the identity of IL-7-expressing cells in vivo. Here, we show that IL-7-expressing cells form a large subset of CAR cells. Conditional IL-7 deletion in CAR cells dramatically reduced pro B cells and pre B cells, whereas IL-7 deletion in osteoblasts has no effect on B lymphopoiesis. Our studies demonstrate that HSC maintenance and B cell lineage differentiation are distinct cell lineage decisions controlled by HSC niches.

研究分野：免疫学

キーワード：骨髄 ストローマ細胞 IL-7

1. 研究開始当初の背景

異物から生体を守る免疫システムにおいて、B細胞およびT細胞は必須の役割を果たしており、これら細胞の分化・増殖には、サイトカイン IL-7 が必要である。しかしながら、IL-7 タンパクの発現量レベルは非常に低く、抗体による検出が困難なため、どの細胞から IL-7 が産生され、各組織においてどのような局所機能を果たしているのか知られていなかった。

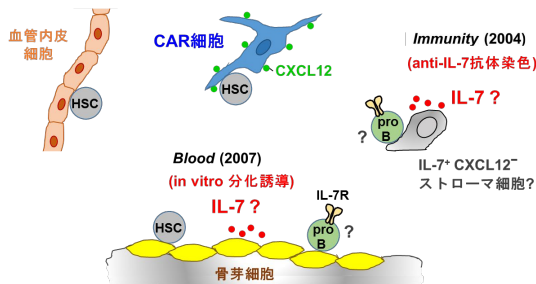
そこで我々は IL-7 産生細胞を同定するため、IL-7 遺伝子の第一エクソンを GFP に置き換えた IL-7-GFP ノックインマウスを作製した。その結果、胸腺、リンパ節、腸管などの様々な組織において、IL-7 を産生するストローマ細胞を検出することに成功した。また、標的細胞特異的に IL-7 を欠損させるコンディショナル・ノックアウト・マウス(IL-7cKOマウス)を用い、胸腺や肝臓においてT細胞に対する IL-7 の局所機能を明らかにしてきた。

一方で骨髄に関しては、造血を調節する微小環境の実体が長年明らかでなかったことから、骨髄組織の支持基盤となるストローマ細胞を同定し、その機能を解析することが求められている。骨髄のストローマ細胞には、ケモカイン CXCL12 を発現する CAR 細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞などがあり、造血幹細胞ニッチとして働くことが知られている。一方、抗 IL-7 抗体で骨髄を染色した過去の論文によれば、骨髄腔には CAR 細胞とは異なる IL-7 産生ストローマ細胞が存在するとされている。また、試験管内で分化誘導した骨芽細胞が IL-7 を産生するとの報告もある。そのため、これらの間葉系細胞が B 細胞分化のニッチではないかと推測されていたが、それは生体では未だ証明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、IL-7 を産生する骨髄ストローマ細胞が B 細胞分化を制御する機構を明らかにし、骨髄微小環境の仕組みを機能的に解明することを目的とした。そこで、骨髄内の IL-7 産生ストローマ細胞を網羅的に同定し、IL-7 の局所機能の解明を目指した。

骨髄微小環境とIL-7



研究の目的

B細胞分化のニッチとして機能する骨髄IL-7産生細胞の探索

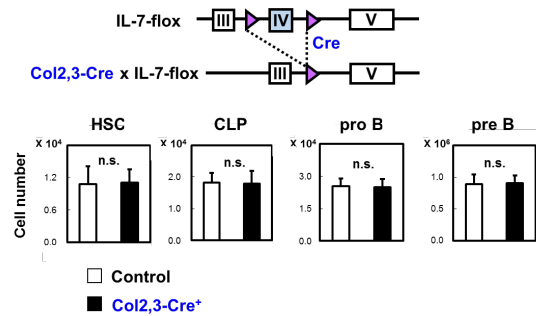
3. 研究の方法

- (1) 骨芽細胞由来 IL-7 欠損マウスを作製し、骨髄 B 前駆細胞の FACS 解析を行う。
- (2) IL-7-GFP ノックインマウスの骨髄腔を蛍光顕微鏡にて解析し、IL-7 産生性の間葉系細胞を網羅的に同定する。
- (3) 各種の間葉系細胞（骨芽細胞以外）に由来する IL-7 を欠損させたマウスを作製し、骨髄 B 前駆細胞の FACS 解析を行う。
- (4) 骨髄切片を用いて、B 前駆細胞やストローマ細胞を抗体染色し可視化する。蛍光顕微鏡で各細胞の接触頻度を調べることにより、B 前駆細胞のニッチを同定する。

4. 研究成果

- (1) 骨芽細胞で Cre を発現する Col2,3-Cre マウスを IL-7floxed マウスと交配し、骨芽細胞から IL-7 を欠損させた。このマウスの骨髄では、B 前駆細胞の絶対数には変化が見られなかったため、生体では骨芽細胞が産生する IL-7 は B 細胞分化に必須ではないことが判明した。

骨芽細胞由来IL-7の局所機能

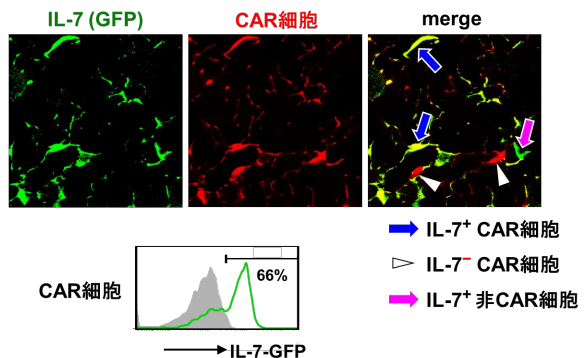


> 骨芽細胞が産生するIL-7はB細胞分化に必須ではない

- (2) 次に、IL-7-GFP ノックインマウスの骨髄切片を作製し蛍光顕微鏡で観察することによって、骨髄腔に存在する IL-7 産生細胞の同定を試みた。

CAR細胞におけるIL-7の発現

IL-7-GFP KIマウス 骨髄切片

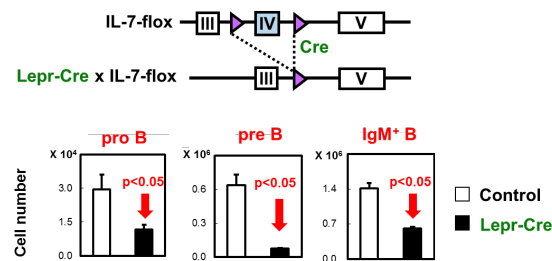


CAR細胞はIL-7陽性とIL-7陰性の集団に分けられる

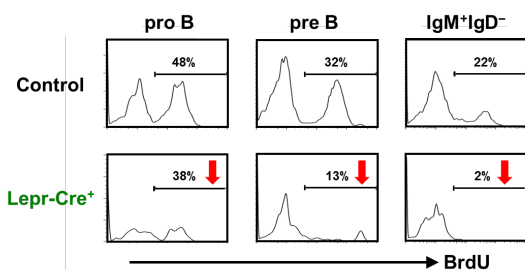
骨髄腔には IL-7-GFP 陽性細胞が散在している。この画像を CAR 細胞の画像と比較した結果、過去の報告とは異なり、多くの IL-7-GFP 陽性が CAR 細胞とオーバーラップすることが判明した。また、CAR 細胞には IL-7-GFP 陰性のもも存在しており、CAR 細胞の 66% が IL-7 を産生することも明らかとなった。また、確かに CAR 細胞ではない IL-7 産生細胞も存在していたが、その数は非常に僅かであった。

(3) そこで、CAR 細胞で Cre を発現する Leptin レセプター Cre マウスを IL-7flox マウスと交配し、CAR 細胞から IL-7 を欠損させた。このマウスの骨髄では、pro B 以降の各分化段階で絶対数が顕著に減少していた。従って、CAR 細胞が産生する IL-7 は B 細胞分化にとって重要であることが明らかとなった。更に、このマウスでは B 細胞の各分化段階で BrdU 取り込みの低下が見られたことから、CAR 細胞由来 IL-7 は B 前駆細胞の増殖に重要であることが判明した。

CAR細胞由来IL-7の局所機能



CAR細胞由来IL-7欠損マウスでは
骨髄のB前駆細胞が著減する



CAR細胞が産生するIL-7はB前駆細胞の
増殖に必要である

我々の以前の研究では、特定の骨髄血管内皮細胞も IL-7 を発現していることを見出している。また、内皮細胞から IL-7 を欠損させたマウスの解析では、骨髄 B 前駆細胞が部分的ではあるが有意な減少を示すことも明らかにしている。本研究成果により、血管内皮細胞に由来する IL-7 は部分的に B 細胞分化に寄与しており、実際には CAR 細胞が産

生する IL-7 が B 細胞分化にとって最も重要な役割を果たしていることが明らかとなった。現在、B 前駆細胞と IL-7 産生性ストローマ細胞との接触について解析が進行中である。CAR 細胞は造血幹細胞ニッチとして働くだけでなく、一部の IL-7 産生性 CAR 細胞分画は B 細胞分化に重要なニッチとしての機能も果たすと考えられる。今後は、骨髄内の他のリンパ球に与える CAR 細胞由来 IL-7 の影響や、骨芽細胞等に由来する低発現量の IL-7 の局所機能を解析することで、骨髄微小環境の研究を更に発展させることが期待される。

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 7件)

Kenta Shinoda, Kiyoshi Hirahara, Tomohisa Iinuma, Tomomi Ichikawa, Akane S. Suzuki, Kaoru Sugaya, Damon J. Tumes, Heizaburo Yamamoto, Takahiro Hara, Shizue Tani-ichi, Koichi Ikuta, Yoshitaka Okamoto, and Toshinori Nakayama

“Thy1+IL-7+ lymphatic endothelial cells in iBALT provide a survival niche for memory T-helper cells in allergic airway inflammation”

Proc Natl Acad Sci U S A.

2016 May 17; 113(20):E2842-51.

doi: 10.1073/pnas.1512600113. 査読有

Akifumi Abe, Shizue Tani-ichi, Soichiro Shitara, Guangwei Cui, Hisataka Yamada, Hitoshi Miyachi, Satsuki Kitano, Takahiro Hara, Ryo Abe, Yasunobu Yoshikai, and Koichi Ikuta

“An Enhancer of the IL-7 Receptor γ -Chain Locus Controls IL-7 Receptor Expression and Maintenance of Peripheral T Cells”

The Journal of Immunology

2015 Oct 1; 195(7):3129-38.

doi: 10.4049/jimmunol.1302447. 査読有

Keisuke Wagatsuma, Shizue Tani-ichi, Bingfei Liang, Soichiro Shitara, Ko Ishihara, Manabu Abe, Hitoshi Miyachi, Satsuki Kitano, Takahiro Hara, Masanobu Nanno, Hiromichi Ishikawa, Kenji Sakimura, Mitsuyoshi Nakao, Hiroshi Kimura, and Koichi Ikuta

“STAT5 Orchestrates Local Epigenetic Changes for Chromatin Accessibility and Rearrangements by Direct Binding to the TCR Locus”

The Journal of Immunology

2015 Aug 15; 195(4):1804-14.

doi: 10.4049/jimmunol.1302456. 査読有

Guangwei Cui, Takahiro Hara, Szandor Simmons, Keisuke Wagatsuma, Akifumi Abe, Hitoshi Miyachi, Satsuki Kitano, Masaru Ishii, Shizue Tani-ichi, and Koichi Ikuta
“ Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo ”
Proc Natl Acad Sci U S A.
2014 Feb 4; 111(5):1915-20.
doi: 10.1073/pnas.1318281111. 査読有

Motokazu Tsuneto, Ekaterina Kajikhina, Katharina Seiler, Andreas Reimer, Julia Tornack, Corinne Bouquet, Szandor Simmons, Marko Knoll, Ingrid Wolf, Koji Tokoyoda, Anja Hauser, Takahiro Hara, Shizue Tani-ichi, Koichi Ikuta, Joachim R. Grün, Andreas Grützkau, Niklas Engels, Jürgen Wienands, Yuki Yanagisawa, Kazuo Ohnishi, and Fritz Melchers
“ Environments of B cell development ”
Immunol Lett.
2014 Jan-Feb; 157(1-2):60-3.
doi: 10.1016/j.imlet.2013.11.011. 査読有

生田宏一、原 崇裕、谷一靖江
肝臓 IL-7 の新たな機能
感染・炎症・免疫 第 43 巻 第 4 号
2014 p.61-p.63 査読なし

谷一靖江、原 崇裕、生田宏一
T細胞における IL-7レセプターの転写制御と機能
臨床免疫・アレルギー科 第 61 巻 第 4 号
2014 p.450-p.456 査読なし

〔学会発表〕(計 3件)

Hara Takahiro
“ Identification of IL-7 and IL-15 niche in lymphoid organs ”
招待講演 Plenary Lecture
The 56th Annual Meeting and International Symposium of Korean Society of Life Science
(韓国、Changwon convention center)
2015年8月27日

Hara Takahiro, Ikuta Koichi.
“ Identification and characterization of IL-7 niche in gut-associated lymphoid tissues ”
第 44 回 日本免疫学会総会・学術集会
(札幌コンベンションセンター)
2015年11月19日

Hara Takahiro, Cui Guangwei, Ikuta Koichi.
“ Distribution and function of IL-7- and

IL-15-expressing cells in intestines ”
第 43 回 日本免疫学会総会・学術集会
(国立京都国際会館)
2014年12月12日

〔図書〕(計 0件)

〔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：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/ikut a.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者
原 崇裕 (HARA, Takahiro)
京都大学・ウイルス研究所・助教
研究者番号： 90512301

(2)研究分担者
無し

(3)連携研究者
無し