

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22118006

研究課題名（和文）肝臓における造血細胞の運命決定に関わる環境因子の解析

研究課題名（英文）Studies on microenvironment that regulates hematopoietic cells

研究代表者

宮島 篤（Miyajima, Atsushi）

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：50135232

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 129,500,000 円

研究成果の概要（和文）：成体肝臓は代謝の中心的な器官で生体の恒常性維持に必須の役割を果たすが、各種の免疫細胞を多数擁する免疫応答の場でもある。また、肝臓は胎生期における主要な造血組織であるが、造血の場は出生後には骨髄に移行する。本研究では、胎児肝臓および成体骨髄における造血環境および成体肝臓における炎症反応/再生の機構を解析した。マウス胎児肝臓の辺縁部が赤血球造血のニッチとして機能することを明らかにした。Oncostatin Mが骨髄の間葉系幹細胞の分化能と造血支持能を制御している様子を明らかにした。IL-4により誘導されるNK細胞集団の存在や肝障害による線維化におけるM2マクロファージの機能を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The liver is a central organ for homeostasis by playing a major role for metabolism and also a tissue for immune response by holding various immune cells. In fetus, the liver functions as a major hematopoietic tissue, while hematopoiesis occurs in the bone marrow in adult. In this study, we studied the environment that supports hematopoiesis in fetal liver and adult bone marrow and showed that the periphery of fetal liver functions as a niche for erythropoiesis and that Oncostatin M plays an important role for bone marrow hematopoiesis by regulating differentiation of bone marrow mesenchymal cells to adipocytes and osteoblasts. We also studied inflammation and regeneration of the liver and showed that M2 macrophages play a role for liver fibrosis induced by injury and that overexpression of IL-4 in the liver induced a novel class of NK cells with strong cytotoxic activity.

研究分野：細胞生物学

キーワード：造血 免疫 肝臓 間葉系幹細胞 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

成体型の造血幹細胞はマウスでは胎生 8.5 日に大動脈 / 生殖隆起 / 中腎 (AGM) 領域および胎盤で発生し、胎生中期の肝臓に移行して大量の血球を産生する。肝臓は、胎生期における最大の造血組織であるが、造血の場は出生後には骨髄に移行し、出生後に急激に代謝器官として分化成熟する。成体において、肝臓は、代謝、解毒、血清タンパク質の産生など生体の恒常性維持に必須の臓器であるが、体内マクロファージの 70~80% が肝臓に存在し、さらに各種の免疫細胞も多数擁することから、主要な免疫応答の場でもある。しかし、免疫応答器官としての肝臓については十分研究が進んでいない。

本研究開始前に、我々は細胞膜タンパク質の発現を指標に肝臓を構成する各種の細胞を分離・培養するシステムを開発していた。また、オンコスタチン M (OSM) およびその受容体 (OSMR) のノックアウトマウスの解析から、OSM が骨髄や胎児肝臓での造血環境に強い作用を示すことを見だしていた。

そこで本研究では、こうした成果を踏まえて、骨髄および肝臓における血液細胞の産生・分化における環境に焦点を当てた研究を行うこととした。

2. 研究の目的

1) 胎児肝臓の造血支持機構

造血幹細胞は胎児肝臓で劇的に増幅して大量の血液細胞を産生するが、とりわけ大量の赤血球が産生される。胎児肝臓を構成する細胞群が造血環境を形成していると考えられる。造血支持細胞を明らかにするために、マウス胎児肝臓から細胞を分離して、サイトカイン等の発現を調べるとともに、分離した細胞造血支持機能を検討した。さらに、免疫組織化学的に、血球と肝臓構成細胞との位置関係を検討した。

2) 骨髄の造血支持機構

生後、造血の場は骨髄へと移行する。OSMR KO マウスや OSM KO マウスの成体では貧血、血小板の減少および骨髄における造血能の低下が認められることや、骨髄における脂肪髄化も認められていた。脂肪髄化は突発性再生不良性貧血骨髄においても見られる現象であり、OSM は脂肪細胞の分化を *in vitro* で強力に抑制するサイトカインであることや、OSM の発現は骨髄で高いことなどから、OSM シグナルを介した造血環境の制御が再生不良性貧血発症に関わる可能性が考えられた。そこで、OSM による骨髄造血環境の制御を明らかにすることで骨髄における造血機構の理解を深めることを目指した。

3) 成体肝臓における免疫系細胞の解析

成体の肝臓には生体全体のマクロファージの実に 70~80% が存在すると考えられている。また、ピット細胞と呼ばれる NK 細胞が存在する。しかし、肝臓におけるこれら免疫系細胞の性状および機能の解析は十分進んでいなかった。そこで、正常肝および障害肝におけるそれら細胞の性状や機能の解析を行った。

3. 研究の方法

1) 胎児肝臓の造血支持機構

マウス胎児肝臓細胞をセルソーターを使って、各細胞種に分画し、サイトカインの発現および *in vitro* での造血支持能を検討した。複数の未分化血液細胞マーカーおよび肝臓細胞マーカーで免疫染色することで、胎児肝臓内での造血細胞の分化状態と存在部位を特定し、造血ニッチに関する位置情報を得た。

2) 骨髄の造血支持機構

OSM KO および OSMR KO マウスを用いて、OSM の脂肪髄化と造血環境の関連を中心に解析を進めた。5-FU などの薬剤を頻回投与することで骨髄内の血液前駆細胞に障害を与え、脂

肪髄化の進行と造血環境の変化を骨髄の組織染色や末梢血の解析により検証した。また、加齢による造血能の低下と骨髄環境の変化についても検討した。骨髄の造血能にのみ焦点を当てた解析では、脾臓を摘出したマウスを用いて末梢血の組成解析を行った。

骨髄間葉幹細胞(MSC)による造血支持能を *in vitro* で検証した。OSM による MSC の脂肪細胞および骨芽細胞への分化に対する作用を検討した。

OSM を放射線照射後のマウスに投与することで造血環境を保全できるか否かを検証した。

3) 成体肝臓における免疫系細胞の解析

正常時および炎症時における肝臓のマクロファージ、樹状細胞、NK 細胞などを分離してその遺伝子発現を比較し、炎症に伴う動態を調べた。肝炎誘導方法としては、ヒトの病態により近い脂肪肝、線維化を伴うモデルを検討し解析に用いた。

Hydrodynamic tail vein injection 法により肝臓で各種のサイトカインを一過性に発現させて、これらの細胞に対する作用を調べた。

4. 研究成果

1) 胎児肝臓の造血支持機構

マウス胎児肝臓における造血ニッチの解析を行った。SCF, TPO など未分化造血細胞に作用するサイトカインは DLK1 陽性の肝芽細胞で強い発現が認められたが、免疫染色により、EPO は肝辺縁部の p75NTR 陽性細胞が強く発現することが示された。c-Kit 陽性の未分化造血細胞は肝臓全体に存在していたが、未分化赤芽球は肝中心部に多く、肝辺縁部では TER119 陽性のより分化の進んだ赤芽球が多く認められた。このことから、肝辺縁部の p75NTR 陽性細胞が赤芽球分化に寄与することが強く示唆された。

2) 骨髄の造血支持機構

OSM 受容体欠損マウス (OSMR KO) の解析か

ら OSM が骨髄造血環境に寄与する可能性が示されていた。一方、OSM が脂肪細胞への分化を強く抑制することも報告している。そこで本研究では、OSM が骨髄中で間葉系幹細胞 (MSC) に作用し、脂肪細胞分化を抑制することで、造血ニッチ細胞の一つとされている骨芽細胞への分化を促進し、造血環境の形成と維持に関わる可能性を検討した。

成体マウス骨髄から造血環境に寄与するとされる MSC を調製し、OSM 添加あるいは非添加の条件下で脂肪細胞へ誘導培養した。OSM 添加条件下では脂肪細胞が認められず、Adipsin と Perilipin の発現も、OSM 添加により発現が強く抑制されていた。以上の結果より、OSM は骨髄 MSC の脂肪細胞分化を強く抑制することが示された。

また、OSM は骨芽細胞分化を促進する一方で終末分化は抑制することが明らかとなった。OSM により誘導された未成熟骨芽細胞は高い造血支持能を有し、造血環境の維持に寄与することが示された。更に、OSM の投与は、骨髄傷害後の造血の回復へ治療効果を有する可能性が示された。

X 線照射による骨髄移植モデルにおいて OSM を頻回投与した結果、コントロール群で

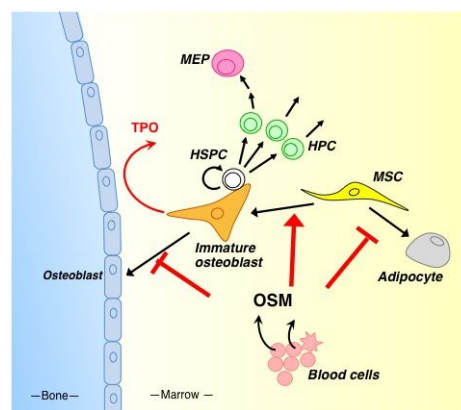


Figure 1. 骨髄造血環境におけるOSM作用のモデル

OSM, oncostatin M
HSPC, hematopoietic stem/progenitor cell
HPC, hematopoietic progenitor cell
MEP, megakaryocyte-erythroid progenitor cell
TPO, thrombopoietin

は骨髄内に脂肪細胞の著しい蓄積が認められる一方で、OSM 投与群の骨髄は、脂肪細胞は極めて少ないことが示された。更に、OSM 投与群では、白血球数、血小板数、及び赤血球数が有意に高く、骨髄傷害からの造血能の回復が早いことが示唆された。以上の結果から、OSM 投与により、脂肪髄化の進行が抑制され、骨髄造血能の回復を早期に誘導できる可能性が示された。

3) 成体肝臓における免疫系細胞の解析

肝臓における Th1 / Th2 バランス制御、とりわけ Th2 応答機構については不明な部分が多い。そこで、Th2 応答のイニシエーターである IL-4 の役割を明らかにする目的で、hydrodynamic tail vein injection 法を用いて IL-4 を肝臓で過剰発現させた結果、特殊な NK 細胞が劇的に増加することを見出した。この IL-4 応答性に活性化した NK 細胞は、通常の NK 細胞に比して、細胞傷害活性および IL-12 刺激に応じた IFN-g 産生能が有意に高かった。また、定常状態の成熟 NK 細胞を IL-15 と共に IL-4 を加えて培養したところ、細胞傷害活性および IL-12 応答性 IFN-g 産生能が上昇することが観察された。NK 細胞は元来 Th1 応答のエフェクター細胞と考えられてきたが、本研究の結果により、IL-4 の過剰発現は NK 細胞の活性化を促すことが明らかとなり、NK 細胞を介した未知の肝臓免疫制御機構の存在が示唆された。

現在までに、線維形成時に肝在住マクロファージであるクッパー細胞を除去すると線維化が抑制される一方、線維治癒時にクッパー細胞を除去すると線維の溶解が遅れるという一見相容れない報告がなされている (JCI 2005)。マクロファージには異なる活性化状態があるが、肝線維化における M2 マクロファージ単独での役割は明らかにならなかった。

最近、組織常在型の M2 様マクロファージが著減する Tribbles 1 (Trb1) ノックアウトマ

ウスが報告された (Nature 2013)。Tribbles (Trb) は、C/EBP 転写因子等を負に制御することにより M2 マクロファージの分化を抑制している。そこで、このマウスを用い、肝線維化形成における M2 様マクロファージ欠損の影響を検討した。四塩化炭素頻回投与により肝臓の線維化を誘導した結果、Trb1 ノックアウトマウスでは、コラーゲンの蓄積が減少した。これらのマウス肝では線維化関連遺伝子の発現には変化が見られなかったが、コラーゲンを溶解する Matrix metalloproteinases (MMPs) の発現亢進が見られた。MMPs は M1 マクロファージのマーカーとしても知られており、Trb1 ノックアウトマウス肝臓では、M2 様マクロファージを欠損し M1 に偏ることでコラーゲンの溶解が進みやすい状況になっていると考えられる。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 20 件 査読有り)

1. *Miyajima A., *Tanaka M., and *Itoh T. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration and reprogramming. *Cell Stem Cell* 14. 561-574, 2014. . doi: 10.1021/ja505941b
2. Omi A, *Enomoto Y., Kiniwa T, Miyata N and *Miyajima A. Mature resting Ly6Chigh natural killer cells can be reactivated by IL-15. *Eur. J. Immunology*. Sep;44(9):2638-47. 2015. doi: 10.1002/eji.201444570
3. Sato F, Miyaoka Y, Miyajima A and *Tanaka M. Oncostatin M maintains the hematopoietic microenvironment in the bone marrow by affecting adipogenesis and osteoblastogenesis. *PLoS One* 2014 Dec 31;9(12):e116209. doi: 10.1371/journal.pone.0116209
4. *Itoh T. and Miyajima A. Cellular Basis of Liver Regeneration. *Hepatology* 59, 1617-1626, 2014. doi: 10.1002/hep.26753
5. Inagaki F., Tanaka M., Inagaki N., Yagai T.,

- Sato Y., Sekiguchi K., Oyaizu N., Kokudo N., and *Miyajima A. Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 751-756, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.076
6. Takase H., Itoh T., Wang T., Koji T., Akira S., Takikawa Y., and *Miyajima A. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes and Development* 27, 169-181, 2013. doi: 10.1101/gad.204776.112
 7. Hirose Y., Saijou E., Sugano Y., Takeshita F., Nishimura S., Nonaka H., Chen Y.-R., Sekine K., Kido T., Nakamura T., Kato S., Kanke T., Nakamura K., Nagai R., Ochiya T. and *Miyajima A. Inhibition of Stabilin-2 elevates the circulating hyaluronic acid level and prevents tumor metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 4263-4268, 2012. doi:10.1038/nrc3254
 8. *Tanimizu N., Kikkawa Y., Mitaka T. and Miyajima A. α 1- and α 5-Containing laminins regulate the development of bile ducts via β 1-integrin signals. *J. Biol. Chem.* 287□□28586□28597, 2012. doi: 10.1074/jbc.M112.350488
 9. Tanaka M., Itoh T., Tanimizu N. and *Miyajima A. Liver stem/progenitor cells: Their characteristics and regulatory mechanisms. *J. Biochem.* 149, 231-239, 2011. doi: 10.1074/jbc.M112.350488
 10. Tsukahara Y., Tanaka M. and *Miyajima A. TROP2 expressed in the trunk of the ureteric duct regulates branching morphogenesis during kidney development. *PLoS One* 6, e28607,2011. doi:10.1371/journal.pone.0028607
- [学会発表](計 36 件)
1. 松田道隆、田中稔、宮島篤 Mechanism of liver fibrosis induced by Oncostatin M, FASEB Summer Research Conferences / Liver Biology, Keystone Resort (U.S.A.) 2014/7/6-11
 2. 三浦泰史、田中稔、吉川大和、合田亘人、宮島篤. Lutheran の発現を指標とした肝幹/前駆細胞の性状解析、第 21 回 肝細胞研究会東京医科歯科大学 (東京都) 2014/6/27
 3. Itoh T., Ino S, and Miyajima A. Notch signaling promotes proliferation of adult liver progenitor cells and progenitor-dependent liver regeneration, FASEB Summer Research Conferences, Keystone Resort (U.S.A.) 2014/7/8
 4. Kaneko K, Itoh T., Miyajima A. Novel visualization method reveals connection of adult liver progenitor cells to biliary trees in various liver injuries, FASEB Summer Research Conferences / Keystone Resort (U.S.A.) 2014/7/8
 5. 木庭乾、榎本豊、尾見歩惟、宮島篤 Overexpression of IL-4 augments NK cell activities in vivo、第 43 回日本免疫学会学術集会、国立京都国際会館 (京都市) 2014/12/10
 6. 西條栄子、松田道隆、榎本豊、田中稔、宮島篤. 肝繊維化に置ける M2 様マクロファージの役割、第 87 回日本生化学会大会、国立京都国際会館、2014/10/18
 7. 佐藤郁、田中稔、宮島篤、Role of Oncostatin M in the bone marrow microenvironment for hematopoiesis、日本血液学会、札幌、2013/10/11
 8. 西條栄子、松田道隆、榎本豊、田中稔、宮島篤、肝線維化における肝臓 M2 様マクロファージの役割、第 20 回肝細胞研究会。大阪、2013/9/27.
 9. Yagai T, Tanaka M and Miyajima A. Function of Semaphorin 3E in liver fibrosis and regeneration. 第 20 回肝細胞研究会。大阪、2013/9/27.

10. Miyajima A., Liver stem cells in development and regeneration, Asia Pacific Association of Study of Liver Disease, Singapore, June 8, 2013
10. Omi A, Kiniwa T, Enomoto Y and Miyajima A. Two subsets of mature mouse NK cells based on the expression of Ly6C, 第78回日本インターフェロン・サイトカイン学会/第21回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム 合同学術集会, 東京, 2013/5/20.
11. Omi A, Kiniwa T, Enomoto Y and Miyajima A. Expression of Ly6C defines two subsets of mature mouse NK cells, 15th International Congress of Immunology, Milano, 2013/8/27.
12. Omi A, Kiniwa T, Enomoto Y, Miyajima A. Expression of Ly6C defines two subsets of mature NK cells, 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張, 2013/12/11.
13. 田中稔, 谷貝知樹, 宮島篤, 肝細胞死から見た肝障害後の再生および線維化の制御機構, 第86回日本生化学会, 横浜, 2013/9/11.
14. 佐藤郁, 田中稔, 宮島篤. オンコスタチン M による骨髓造血環境の制御機構の解明. 第85回日本生化学会大会, 福岡, 2012年12月16日.
15. 田中稔, 小森 忠祐, 森川吉博, 仙波恵美子, 宮島篤. オンコスタチン M はマクロファージの M1/M2 バランスに作用しインスリン抵抗性を改善する. 第85回日本生化学会, 福岡, 2012年12月16日.
16. 西條栄子, 内木隆寛, 宮島篤. 肝臓の発生および代謝機能獲得における Tribbles 遺伝子の役割. 第35回分子生物学会, 福岡, 2012年12月12日

〔図書〕(計 0 件)
該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
該当なし

取得状況(計 0 件)
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
宮島 篤 (ミヤジマ アツシ)
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号: 50135232

(2) 研究分担者
該当者なし ()

(3) 連携研究者

田中 稔 (タナカ ミノル)
国際医療研究センター・研究所・室長

研究者番号: 80321909

伊藤 暢 (イトウ トオル)
東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号: 50396917

榎本 豊 (エノモト ユタカ)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号: 20608210

西條 栄子 (サイジョウ エイコ)
東京大学・分子細胞生物学研究所・技術専門職員

研究者番号: 60376647