

令和元年5月27日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06882

研究課題名(和文) 血管周囲造血幹細胞ニッチに着眼した、骨髄GVHD発症機構の解明と新規治療法の探索

研究課題名(英文) Research for the elucidation of the mechanism of bone marrow GVHD focused on perivascular hematopoietic stem cell niche.

研究代表者

浅田 騰 (Asada, Noboru)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：70803055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：C3H/HeJをドナー、C57BL/6をレシピエントとした急性GVHDモデルと、血管周囲ニッチ細胞をラベルできるNestin-GFPマウスを使ったGVHDモデルを作製した。移植後21日では、同種移植群で骨髄造血幹細胞数が有意に少なく、同種免疫反応により造血幹細胞の回復が障害されることが示唆された。また、同種移植群で血管周囲ニッチ細胞が有意に減少しており、Nestin-GFPマウスを使ったモデルマウスでも、Nestin-GFP+のニッチ細胞の減少を骨髄イメージングにて確認した。今回の検討により、骨髄移植後の急性免疫反応により血管周囲ニッチ細胞も著明に傷害されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、造血幹細胞ニッチとして注目されている血管周囲ニッチに着目し、さらには血管周囲ニッチを、動脈周囲ニッチと静脈周囲ニッチに分けて解析し、それぞれのニッチ細胞の役割を解明することに新規性がある。また、これまでのGVHD治療は、免疫担当細胞をターゲットとしたものが中心であるが、本研究により、血管ニッチを標準とした新たな治療手段開発への糸口となることが期待される。さらに、骨髄GVHDの造血幹細胞ニッチ傷害のメカニズムが解明されれば、骨髄GVHDだけでなく再生不良性貧血などの、造血幹細胞ニッチをふくめた微小環境の異常に起因していると思われる、他の病態解明にも発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：An acute GVHD mice model was created using C3H/HeJ as a donor and either C57BL/6 or Nestin-GFP transgenic mice that can label perivascular niche cells as a recipient. Analysis of bone marrow at 21 days after transplantation indicates that the number of HSCs is significantly smaller in the allogeneic (allo) group than in the syngeneic (syn) group, suggesting that recovery of HSCs is impaired by the alloimmune response after transplantation. The number of perivascular niche cells were also significantly reduced in the allo group compared to the syn group. Moreover, the perivascular Nestin-GFP+ cells were also impaired the same as the GVHD model using wild-type mice. The decrease of niche cells was confirmed by analysis by both FACS and imaging. The present study revealed that the acute immune response after bone marrow transplantation also significantly damages perivascular niche cells.

研究分野：造血幹細胞ニッチ

キーワード：造血幹細胞ニッチ GVHD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植は移植片による抗腫瘍効果により血液悪性疾患を治癒せしめる根治療法として広く受け入れられている。ドナー由来細胞により宿主臓器が攻撃されるGVHDでは、血球減少と骨髄での造血機能抑制をみることがあり、最近では骨髄自体がGVHDの標的臓器となることが考えられている(Shono, Blood 2013; Szyska, Front Immunol 2016)。これまでの研究で、GVHDではドナー由来のT細胞が、骨髄内の血球細胞だけでなく、造血幹細胞の機能を支える微小環境である“造血幹細胞ニッチ”をも標的とすることが報告されている。しかしながら、近年の造血幹細胞ニッチ研究の進歩により、骨髄内の様々な細胞群がニッチとして働くことが明らかになってきており、新たに見つかったニッチ細胞の骨髄GVHDの病態への関与は未だ検討されていない。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでに、定常状態において骨髄内の動脈周囲の pericyte と静脈洞周囲のストローマ細胞がそれぞれ異なる機序で、全ての血液のもととなる造血幹細胞を制御する“ニッチ細胞”として機能していることを見出した。これらの結果から本研究では、二つの血管周囲ニッチ、すなわち動脈周囲ニッチと静脈周囲ニッチに着目し、GVHDによる造血幹細胞傷害の発症メカニズムを解明し、新しい治療戦略の糸口を発見することを目標とする。

3. 研究の方法

GVHDが造血幹細胞自体に与える影響を解析するため、野生型マウスを用いて急性GVHDモデルマウスを作成し、造血幹細胞への影響を経時的に解析する。次に二種類の血管周囲ニッチへの影響を解析するため、動脈ニッチモデルとしてNestin-GFPマウス、Myh11-CreERT2; loxp-tdTomatoマウスを、静脈ニッチモデルとしてLepR-Cre; tdTomatoマウスをレシピエントとしたGVHDマウスを作成する。各マウスでGFPあるいはtdTomatoによりラベルされたニッチ細胞を、数的、形態学的、細胞機能的と多方面より解析し、GVHDが各ニッチ細胞に与える影響を検討する。これに加えて、コントロールマウスの各ニッチ細胞との遺伝子発現解析を比較することにより病態メカニズムの同定を行い、治療ターゲットとなりうる機構を炙り出す。

急性GVHDモデルマウスでの造血幹細胞の解析：

急性GVHDモデルとしてC3H/HeJ C57BL/6モデルを作成する。

定量解析：Lineage marker-Sca-1+c-kit+CD48-CD150+で定義する造血幹細胞をFACSを用いた数的解析を行う。

機能解析：FACSを用いた細胞周期解析(Ki67)を行う。

ニッチ細胞の解析：

野生型マウスを用いた急性GVHDモデルマウスで、血管周囲ニッチの成分である、血管内皮細胞、血管周囲ストローマ細胞の数的、機能的解析を行う。

定量解析：以下の骨髄内ニッチ細胞をFACSにて定量解析する。

- ・ CD45-TER119-CD31+の血管内皮細胞
- ・ CD45-TER119-CD31-CD51+PDGFR +の血管周囲ニッチ

骨髄ストローマ細胞のうち、CD51+PDGFR +細胞がNestin-GFP+の血管周囲

ニッチと相同性を持つことが知られている(Pinho, J Exp Med 2013)。

形態解析：胸骨whole-mount組織あるいは、組織切片標本を作製し、ニッチ細胞の形態的、位置的变化を検討する。

遺伝子改変マウスを用いた GVHD マウスモデルの作成と解析

動脈周囲ニッチ

- Myh11-CreERT2; loxp-tdtomato

Myh11-CreERT2 は骨髄の動脈周囲ストローマ細胞を特異的にラベルする(Asada, Nat Cell Biol 2017)。

- Nestin-GFP

Nestin-GFP は骨髄内の動脈周囲ニッチと静脈周囲ニッチの両方をマークする。

GFP の発現強度でNestin-GFP^{bright} とNestin-GFP^{dim}に区別され、Nestin-GFP^{bright} は動脈周囲ニッチを、Nestin-GFP^{dim} は静脈周囲ニッチをそれぞれラベルする(Kunisaki, Nature 2013)。

静脈周囲ニッチ

- LepR-Cre; loxp-tdtomato

LepR-Cre は骨髄静脈洞の周囲に位置するストローマ細胞をマークし、静脈周囲ニッチを構成する(Ding, Nature 2012)。

- Nestin-GFP

Nestin-GFP^{dim} は静脈周囲ニッチをラベルし、LepR-Cre によりマークされる細胞と高い相同性を示す(Asada, Nat Cell Biol 2017)。

定量解析：以下の骨髄内ニッチ細胞をFACS にて定量解析する。

動脈周囲ニッチ; CD45-TER119-CD31-Myh11-CreERT2/tdTomato+ あるいは

CD45-TER119-CD31-Nestin-GFP^{bright}

静脈周囲ニッチ; CD45-TER119-CD31-LepR-Cre/tdTomato+ あるいは

CD45-TER119-CD31-Nestin-GFP^{dim}

形態解析：胸骨whole-mount 組織あるいは、組織切片標本を作製し、ニッチ細胞の形態的、位置的变化を検討する。

4 . 研究成果

急性GVHDモデルマウスとしてC3H/HeJをドナー、C57BL/6をレシピエントとして用いる骨髄移植モデルを作製した。移植後の末梢血の解析では、移植後21日の時点で、同種移植群で白血球数(syn vs allo; 5450 ± 661.9 vs 3327 ± 350.6 / μL , $p=0.009$, $n=10-11$)、ヘモグロビン濃度(syn vs allo; 13.35 ± 0.29 vs 11.15 ± 0.61 g/dL, $p=0.0054$, $n=10-11$)ともに有意に低かった。また、移植後21日の時点での骨髄の解析では、造血幹細胞数は同系移植群に比べ同種移植群で有意に少なく(syn vs allo; 415 ± 135.3 vs 65.36 ± 20.18 / femur, $p=0.041$, $n=7-9$)、移植後の同種免疫反応により造血幹細胞の回復が障害されていることが示唆された。骨髄内の造血幹細胞ニッチの解析では、CD31+血管内皮細胞(syn vs allo; 6639 ± 595.7 vs 3432 ± 547.1 / femur, $p=0.041$, $n=5$)、CD45⁻, TER119⁻, CD31⁻, CD51⁺, CD140a⁺の血管周囲ニッチ細胞(syn vs allo; 6990 ± 1934 vs 1156 ± 304.3 / femur, $p=0.0176$, $n=5$)とも同種移植群で同系移植群に比較し有意に減少していた。

次に血管周囲ニッチ細胞をGFPでラベルできるマウスであるNestin-GFP transgenicマウスをレシピエントとして、同種移植群と同系移植群の両者のモデルを作製し、骨髄血管周囲ニッチ細胞数を解析した。FACSによる定量解析では、野生型マウスのGVHDモデルと同様、CD45⁻, TER119⁻, CD31⁻, Nestin-GFP⁺の血管周囲ニッチ細胞が同種移植群で有意に少なかった(syn vs allo;

17995 ± 3586 vs 7877 ± 1735 / femur, p=0.0387, n=3-4)。また、骨髄イメージングによる解析でも同種移植群でNest in-GFP陽性の血管周囲細胞が有意に減少していることを確認している。これらの結果から、同種免疫反応により造血幹細胞のみならず、血管周囲のニッチ細胞も著名に障害を受けることが明らかとなった。さらに、血管周囲ニッチ細胞を、動脈周囲ニッチと静脈周囲ニッチに分けて解析するため、現在、動脈周囲ニッチをラベルするMyh11-CreERT2; loxp-tdtomatoマウスと静脈周囲ニッチをラベルするLepR-Cre; loxp-tdtomatoを用いたGVHDモデルを作製し解析を進めている。我々の今回の検討によって、骨髄移植後の急性免疫反応により、血管周囲のニッチ細胞も著明に傷害されることが明らかになった。今後、傷害を受けた骨髄内ニッチの画像的な解析あるいは遺伝子発現解析を行い、傷害メカニズムを明らかにしていく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：前田嘉信
ローマ字氏名：(MAEDA, yoshinobu)

研究協力者氏名：松岡賢市
ローマ字氏名：(MATSUOKA, ken-ichi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。