

平成 21 年 4 月 24 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591110

研究課題名（和文） リンパ球初期分化制御分子の同定と機能解析

研究課題名（英文） Identification and functional analysis of molecules which regulate the earliest events in lymphopoiesis

研究代表者

横田 貴史 (YOKOTA TAKAFUMI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60403200

研究成果の概要：

妊娠および性ステロイドホルモンであるエストロジェンは、リンパ球分化の極めて初期の段階を抑制することを明らかにした。そのメカニズムとして、エストロジェンが骨髄造血環境を構築する間質細胞に作用し、Wnt シグナルの調節分子として知られる soluble Frizzled-related protein 1 (sFRP1)の分泌を亢進させること、さらにはsFRP1が未分化な造血前駆細胞に作用してリンパ球への分化を抑制することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 造血幹細胞がどのような過程を経てさまざまな役割を持つ血球細胞に分化するのか明らかにすることは、造血器腫瘍の「腫瘍幹細胞」の由来を考える上で必須であり、特定の分子・遺伝子・細胞を標的とした先端医療への応用につながる。リンパ球造血に関しては、これまで造血幹細胞の下流に位置する多段階の前駆細胞が同定され、細胞の機能的な成熟がどのようなメカニズムで進行するのか明らかにされてきた。しかしその最も初期の段階、すなわち”いつどのように造血幹

細胞からリンパ球への分化決定がなされるのか”は、不明なままであった。

(2) 申請者らは女性ホルモン estrogen が成獣マウスの B リンパ球造血を抑制すること、リンパ球造血の比較的早期の段階が影響を受けることを明らかにしていた。その現象は、加齢やストレスに伴う造血機能の変化との関連も推測され、興味を持たれていたが、estrogen のリンパ球造血抑制作用に関する詳細なメカニズムは不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の根幹となる目的は、造血幹細胞からリンパ球系への初期分化について解析し、その生理的な過程と制御機構を解明することであった。

(2) 新しく開発された遺伝子改変マウスである Rag1/GFP knock-in mouse を用いて、妊娠および estrogen がリンパ球初期分化のどの段階を抑制するか精緻な解析を行うことを第1の目的とした。

(3) Estrogen がリンパ球造血を抑制する分子生物学的なメカニズムの解明を第2の目標とした

## 3. 研究の方法

(1) Rag1/GFP knock-in mouse を用い、妊娠期および estrogen 投与後のマウスの骨髄・脾臓・胸腺におけるリンパ球造血の変化を調べた。骨髄造血幹細胞分画 (Lineage<sup>-</sup> Scal<sup>+</sup> ckit<sup>hi</sup>; LSK 分画) に存在する Rag1 陽性早期リンパ球前駆細胞数の変化を調べた。

(2) リンパ球造血を効率良く支持する骨髄間質細胞 (Adult MSC) と支持しない骨髄間質細胞 (Fetal MC) の2種類の細胞を作製した。これらの細胞の発現遺伝子を differential-display PCR 法にて比較し、さらに estrogen にて発現量の変化することを指標に、リンパ球造血に関与する候補遺伝子を選別した。

(3) Estrogen receptor 欠損マウスの骨髄から樹立した間質細胞と野生型マウスの骨髄から樹立した間質細胞を、estrogen 存在化・非存在化で培養し、発現量に変化する遺伝子を microarray にて検索した。

(4) 上記の方法で分泌蛋白を中心に候補遺伝子を絞り込んだ。得られた候補遺伝子の正常または妊娠期のマウス骨髄における発現を、免疫染色法と半定量的 PCR 法にて検討した。

(5) 得られた候補遺伝子を間質細胞に導入、またはヒト免疫グロブリンとの融合遺伝子を作製して分泌蛋白として精製し、各種リンパ球培養系に添加して作用を調べた。

(6) 得られた候補遺伝子が正常造血前駆細胞においてどのようなシグナル伝達系を活性化するか検討した。

## 4. 研究成果

(1) 妊娠期および estrogen 投与後のマウスの骨髄では、LSK分画に存在する Rag1 陽性早期リンパ球前駆細胞が著明に減少した。その機序

として、生体内での局在の変化や分化誘導は否定的であった。

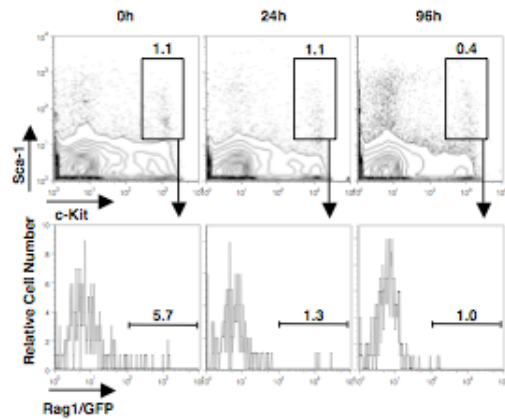


図1 Estrogen投与後のRag1陽性早期リンパ球前駆細胞

(2) 間質細胞における estrogen 誘導発現遺伝子として Wnt の細胞外調節分子である sFRP1 を同定した。sFRP1 はリンパ球支持能を持たない間質細胞 (Fetal MC) で発現が高かったことから、リンパ球造血に対する抑制分子として作用する可能性が推測された。

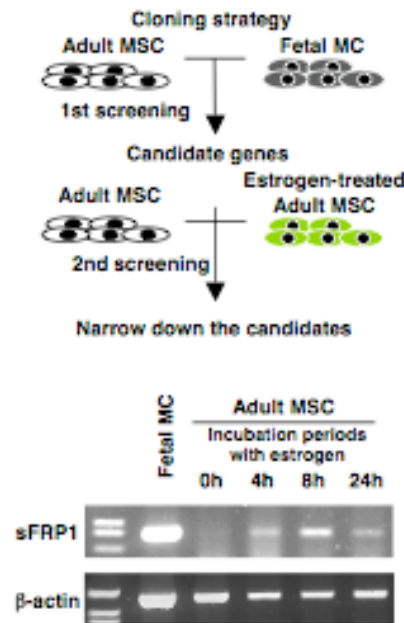


図2 Estrogen誘導遺伝子sFRP1の同定

(3) Estrogen receptor alpha 欠損マウスおよび estrogen receptor beta 欠損マウスの解析から、estrogen のリンパ球造血抑制作用には receptor alpha が必須であり beta は関与していないと考えられた。Estrogen receptor alpha 欠損マウスの骨髄から樹立した間質細胞と野生型マウスの骨髄から樹立した間質細胞を比較した結果、sFRP の誘導には receptor alpha が必須であることが分かった。

(4) 正常骨髄の免疫染色にて、骨組織表面に存在する間質細胞や血管内皮細胞にsFRP1の発現を認めた。妊娠期およびestrogen投与後のマウスの骨髄ではその発現が上昇した。

(5) リンパ球培養実験にてsFRP1は、造血幹細胞分画からのBリンパ球産生を濃度依存性に抑制した。骨髄赤芽球系細胞のコロニー形成には影響しなかった。

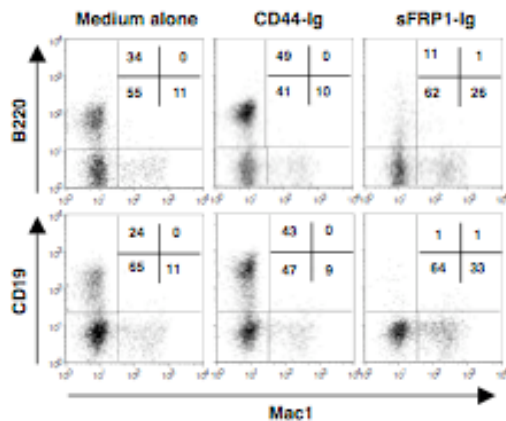


図3 SFRP1はBリンパ球の発育を抑制する

(6) Wnt3aもリンパ球培養にて抑制作用を示し、sFRP1はそれに対して特定の濃度において拮抗作用を示した。しかしsFRP1は外来性のWnt非存在下でもリンパ球産生を抑制したことから、Wnt非依存的に造血幹細胞レベルの細胞に作用すると考えられた。

(7) LSK細胞をsFRP1存在化で培養したところ、b-catenin系の活性化が免疫組織染色およびウエスタンブロット法で確認された。

(8) マウス骨髄から造血幹細胞分画、早期リンパ球前駆細胞分画、共通リンパ球前駆細胞分画、共通骨髄前駆細胞分画をソーティングし、Wntに対するreceptorであるFrizzledの発現を調べた。その発現は、血球の分化とともに急速に減弱することが明らかとなった。

本研究課題の成果は、哺乳類の妊娠期に母体のリンパ球造血が極めて初期の段階で抑制されるという事実を改めて証明した。さらにそのメカニズムとして、近年発生や発癌などいろいろな分野で注目されているWntシグナルの活性化の関与を示した。SFRP1はこれまでWntの作用阻害分子と考えられていたが、濃度や標的細胞によってそれ単独でWntシグナルを活性化できる可能性が示唆された。以上の知見は、リンパ球造血制御機構における新たなメカニズムを提唱したのみならず、Wntシグナル調節機構に対しても定説の修正の必要性

を示唆するものであったため、2007年の米国血液学会において口演発表とtravel awardを得た。現在本課題をさらに発展させ、生体内でのsFRP1の機能を明らかにすることを目的に、sFRP1過剰発現マウスを作製し解析を行っている。今後は、sFRP1によるWntシグナルの調節異常が、リンパ球系の発癌に関与するのか、加齢による免疫系の機能低下とどのように関連しているのか解析したいと考えている。

## 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4件)

- ① Yokota T, Oritani K, Butz S, Kokame K, Kincade PW, Miyata T, Vestweber D, Kanakura Y. The endothelial antigen ESAM marks primitive hematopoietic progenitors throughout life in mice. *Blood* 113:2914-2923 (2009) 査読有
- ② Yokota T, Oritani K, Garrett KP, Kouro T, Nishida M, Takahashi I, Ichii M, Satoh Y, Kincade PW, Kanakura Y. Soluble Frizzled-related protein 1 is estrogen inducible in bone marrow stromal cells and suppresses the earliest events in lymphopoiesis. *The Journal of Immunology* 181:6061-6072 (2008) 査読有
- ③ Ichii M, Oritani K, Yokota T, Nishida M, Takahashi I, Shirogane T, Ezoe S, Saitoh N, Tanigawa R, Kincade PW, Kanakura Y. Regulation of human B lymphopoiesis by the transforming growth factor-beta superfamily in a newly established coculture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment. *Experimental Hematology*. 36:587-597 (2008) 査読有
- ④ Li W, Ishihara K, Yokota T, Nakagawa T, Koyama N, Jin J, Mizuno-Horikawa Y, Wang X, Miyoshi E, Taniguchi N, Kondo A. Reduced alpha4beta1 integrin/VCAM-1 interactions lead to impaired pre-B cell repopulation in alpha 1,6-fucosyltransferase deficient mice. *Glycobiology*. 18:114-124 (2008) 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① Yokota T, Oritani K, Butz S, Kokame K, Kincade PW, Miyata T, Vestweber D, Kanakura Y. The endothelial antigen ESAM marks hematopoietic stem cells throughout life in mice. *The American Society of Hematology 50th Annual meeting*. 2008.12.6-9, San Francisco, USA

- ② 横田貴史 新規造血幹細胞表面抗原の同定 第14回血液科学セミナー  
2008.11.15-16, 東京
- ③ 横田貴史 造血幹細胞とリンパ球初期分化 第6回先端医療フォーラム  
2008.10.24, 岡山
- ④ 横田貴史、織谷健司、小亀浩市、宮田敏行、金倉 讓 新規造血幹細胞表面マーカーESAM1の同定 第6回幹細胞シンポジウム  
2008.5.16-17, 東京
- ⑤ Yokota T, Oritani K, Garrett KP, Kouro T, Nishida M, Takahashi I, Ichii M, Matsumura I, Kincade PW, Kanakura Y. SFRP1 is estrogen inducible in bone marrow stromal cells and suppresses the earliest events in lymphopoiesis. The American Society of Hematology 49th Annual meeting. 2007.12.8-11, Atlanta, USA
- ⑥ Yokota T, Oritani K, Kouro T, Ichii M, Kincade PW, Kanakura Y. SFRP1 is estrogen inducible in bone marrow stromal cells and suppresses the earliest events in lymphopoiesis. 第37回日本免疫学会総会 2007.11.20-22, 東京
- ⑦ 横田貴史、織谷健司、Paul W. Kincade、高橋 功、一井倫子、松村 到、金倉 讓 Estrogenが誘導する骨髄間質細胞分泌蛋白sFRP1はリンパ球初期分化を負に制御する 第69回日本血液学会総会 2007.10.11-13, 横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横田 貴史 (YOKOTA TAKAFUMI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：60403200

### (2) 研究分担者

織谷 健司 (ORITANI KENJI)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：70324762  
金倉 讓 (KANAKURA YUZURU)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20177489