

機関番号：11401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591144

研究課題名 (和文) 樹状細胞による造血制御

研究課題名 (英文) Regulation of hematopoiesis by dendritic cells

研究代表者

澤田 賢一 (SAWADA KENICHI)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90226069

研究成果の概要 (和文)：樹状細胞は、様々なサイトカイン産生を介してリンパ球の制御を行ない免疫系のホメオスタシスを維持している。その破綻は易感染性や過剰反応、自己免疫疾患などの免疫異常を引き起こす。造血幹細胞の分化や増殖にも関与すると推定されるが詳細は不明に留まっていた。本研究によって、ヒト樹状細胞による自己血球の貪食のメカニズムと意義、また微生物由来の核酸 (DNA や RNA) が造血に及ぼす影響の一端が明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：Dendritic cells (DCs) maintain the homeostasis of immunologic system by regulating lymphocyte functions through the production of various cytokines. The collapse of this regulatory system promotes immunologic disorders such as compromised infection, overresponse to immunologic stimuli and autoimmune diseases. DCs might influence differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells, however, a large part has remained unclear. This study, at least in part, revealed the mechanism and the physiological role of DCs phagocytosing self-hematopoietic cells and the influence of microbe-derived nucleic acid such as DNA and RNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：樹状細胞、造血幹細胞、自然免疫、トール様受容体、血球貪食症候群

1. 研究開始当初の背景

(1) DCs はアポトーシスに陥った細胞成分を貪食し、インターフェロン (IFN) α/β を産生するとともに、ある条件下では B 細胞の分化と機能を制御して自己免疫疾患の発症を引き起こすと推定されている。また、DCs によって増殖刺激を与えられた T リンパ球は IFN α/β , IFN γ , 腫瘍壊死因子 (TNF)- α , インターロイキン (IL)-1, IL-6, IL-10, IL-12 など

どのサイトカイン産生を行ないそれぞれの機能を獲得していく。DCs によって産生されるサイトカインの中でも特に IFN- α は骨髄系細胞 (赤芽球系、巨核球系、顆粒球系細胞) の強力な抑制因子であり、TNF- α は同じく骨髄系細胞を抑制するとともに DCs の分化を誘導する。さらに、DCs はアポトーシスを起こした自己造血細胞を貪食する。従って、DCs が産生するサイトカイン (特に IFN- α と TNF-

α) と自己造血細胞の貪食は、造血幹細胞の分化と増殖に深く関与していると推定された。

(2) また、DCs の主要なパターン認識受容体であるトール様受容体 (TLR) 4 や TLR7/8 による造血幹・前駆細胞の分化誘導がそれぞれマウスとヒトで報告されたが、造血幹細胞の TLR 発現に関する研究は端緒にすぎたばかりであった。ヒトとマウスで DCs の性状は異なる。従って、動物実験によって洞察を得つつも、ヒトに応用する場合には、ヒト正常細胞を用いた研究が必要であると考えられた。

(3) 申請者は、造血不全疾患の病態解析の過程を通して種々のヒト造血幹・前駆細胞 (CD34⁺細胞) の純化法を開発してきた。さらに純化造血幹細胞の系特異的分化誘導システムを確立して、ヒト正常造血前駆細胞の生化学的解析を可能にしてきた。その過程で TNF-α と造血因子を用いて造血前駆細胞と DCs を同時に誘導する系を作成した。驚くべきことに、DCs は TNF-α による刺激後 3 日前後という極めて早期に発生し、アポトーシスに陥った自己造血前駆細胞を貪食するとともに自己 T リンパ球の増殖を誘導しつつ様々なサイトカインを産生していた (Blood 107:1366, 2006)。

(4) 以上の研究結果から、DCs が産生するサイトカインのフィードバックによる造血幹細胞の分化・増殖制御が強く推定された。また、DCs による自己造血前駆細胞の貪食は、TLR3, TLR7/8, TLR9 などの細胞内レセプターを介して特定の受動免疫にシフトする可能性が考えられた。さらに、TLRs 自体による造血制御の可能性も推定された。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、ヒト造血幹細胞由来 DCs が免疫系のみならず造血系をも制御していることを明らかにし、造血における DCs の機能について新たなパラダイムを提唱することを目的とする。

(2) 本研究によりヒト造血幹細胞由来 DCs による新しい造血制御機構が解明されれば、免疫システムと造血システムを結ぶ新たな機構が明らかとなる可能性が期待される。

3. 研究の方法

(1) ヒト造血幹細胞由来樹状細胞 (DCs) による造血制御機構を明らかにする目的で、純化ヒト造血幹細胞から TNF-α を用いて DCs を誘導した。

(2) DCs のサイトカイン産生と DCs による

自己細胞貪食の病態生理学的意義を解析した。

(3) ヒト造血幹細胞に対する種々の TLR リガンド分子による分化・増殖制御の可能性を検討した。また、血球系列特異的に関与する TLRs の有無を検討した。

(4) 血球貪食症候群 (hemophagocytic syndrome, HPS) に対する有効な治療法を探るために、抗 TNF-α 抗体や遊離型 TNF 受容体が *in vitro* での HPS システムを抑制できるか否かを検討した。

(5) ワイルドタイプのマウスを用いて HPS 動物モデルを作成し、その発症機序と治療法について検討した。

4. 研究成果

(1) 好中球分化誘導系における HPS システムの構築とその病態生理学的意義

ヒト純化造血幹細胞から顆粒球コロニー刺激因子を用いて好中球特異的分化誘導システムを作製した (図 1A)。ここに TNF-α が存在すると樹状細胞による自己好中球の貪食が起こることを世界で初めて証明した (図 1B)。樹状細胞による自己血球の貪食は免疫寛容の誘導に関与していることが示唆された (発表論文: Saito Y et al. Int J Hematol. 88, 2008, 64-72.)。

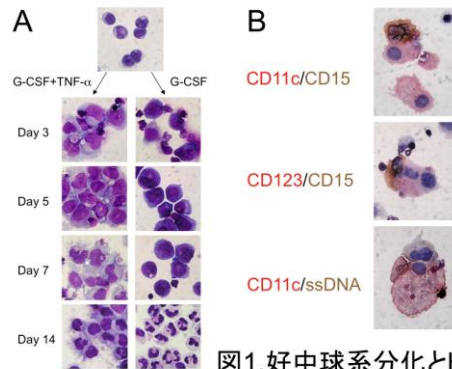


図1.好中球系分化とHPS

(2) 抗 TNF 製剤による HPS 阻害 (*in vitro*)

ヒト純化造血幹細胞の赤芽球系特異的分化誘導系に TNF-α を添加することで自己赤芽球を DCs が貪食する HPS *in vitro* モデルを作製した。このモデルにおいて見られる DCs による自己赤芽球系前駆細胞の貪食が、infliximab や etanercept などの抗 TNF-α 製剤によって抑制できるか否かを検討した。その結果、infliximab や etanercept は濃度依存性に *in vitro* における HPS を抑制することを証明した (図 2A-D)。本研究により、抗 TNF-α 療法が HPS に有効であることが初めて実験的に示されたことは二次性 HPS の治療法

を考える上で極めて有意義であると考えられた (Guo, YM et al. Int J Hematol. 91, 2010, 61-68.)。

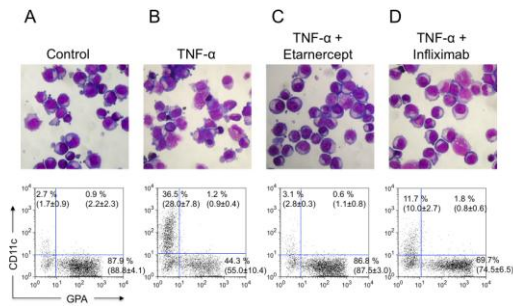


図2. 抗TNF製剤によるHPS阻害(in vitro)

(3) 赤芽球系前駆細胞を特異的に抑制するDNA配列の発見

ヒト造血幹細胞に対する種々のTLRリガンド分子による分化・増殖制御を検討した結果の一つとして、トール様受容体9 (TLR9)のリガンドである1本鎖DNA (oligo-deoxynucleotide, ODN)が配列依存的に赤芽球系前駆細胞の増殖と分化を選択的に抑制することを発見した。興味深いことに、赤芽球癆を惹起する1本鎖DNAウイルス、パルボウイルス B19 もまた同じ配列を有していた (図3)。

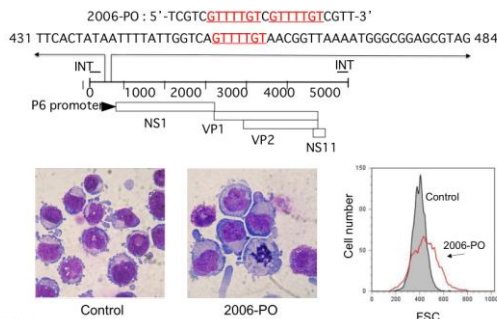


図3. TLR9リガンドとヒトパルボウイルスB19共通配列による赤芽球系前駆細胞の選択的増殖抑制と巨大化

このDNA配列は細胞周期の遅延や細胞死を誘導するとともにエリスロポエチン受容体 (EPOR)のdown regulationを介して赤芽球系を選択的に抑制していた (発表論文: Blood. 115:4569-4579, 2010)。図に示すごとく、GTTTGT配列がEPOR遺伝子へ相補的に結合することによって、EPOR mRNAの発現を抑制しているのではないかと推定している。

従来、最近やウイルス感染によって血球数が増減することは知られていたが、本研究はウイルス由来DNAによって造血制御が行なわれていることを示す初めての報告となった。

本研究は内外から高く評価され、第72回日本血液学会総会のプレナリーに選択され

るとともに、日本血液学会 (JSH)による2010年EHA (ヨーロッパ血液連合)総会 (バルセロナ)出席のためのトラベルアワードを獲得した。また、2010年米国血液学会総会の教育講演において、当該年度の優れた業績として紹介された (ASH 2010, Educational Program Book 281-286)。本研究は現在、RNAを含む核酸による造血制御としてさらに知見を重ねつつある。

(4) 血球貪食症候群 (HPS) マウスモデルの作成と病態解析、治療法の開発

ワイルドタイプマウスにTLRリガンドをとよすることによりHPSモデルマウスを作成することに成功した (図4)。貪食細胞は単球由来の樹状細胞であった。貪食に関わるfind me signalやeat me signalを検討した。また、自己血球を貪食することの病態生理学的意義や治療法について解析した。現在投稿中である。

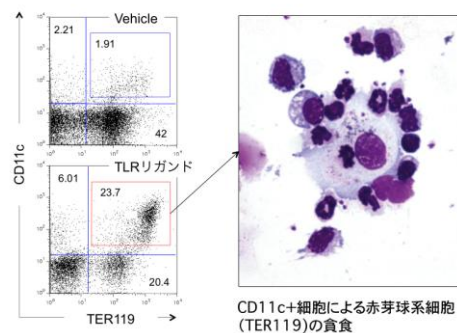


図4. TLRリガンドによるHPSモデルマウスの樹立と解析

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5件)

- Guo YM, Ishii K, Hirokawa M, Tagawa H, Ohyagi H, Michishita Y, Ubukawa K, Yamashita J, Ohteki T, Onai N, Kawakami K, Xiao W, Sawada K. CpG-ODN 2006 and human parvovirus B19 genome consensus sequences selectively inhibit growth and development of erythroid progenitor cells. Blood. 査読有、115, 2010, 4569-4579.
- Guo YM, Hirokawa M, Takahashi N, Fujishima M, Fujishima N, Komatsuda A, Tagawa H, Ohyagi H, Michishita Y, Ubukawa K, Hebiguchi M, Xiao W, Sawada K. Delayed addition of tumor necrosis factor (TNF) antagonists inhibits the generation of CD11c⁺ dendritic cells derived from CD34⁺ cells exposed to

- TNF-alpha. Int J Hematol. 査読有、91, 2010, 61-68.
- ③ Yamanaka Y, Tagawa H, Takahashi N, Watanabe A, Guo YM, Iwamoto K, Yamashita J, Saitoh H, Kameoka Y, Shimizu N, Ichinohasama R, Sawada K. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. Blood. 査読有、114, 2009, 3265-3275.
- ④ Inomata M, Tagawa H, Guo YM, Kameoka Y, Takahashi N, Sawada K. MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. Blood. 査読有、113, 2009, 396-402.
- ⑤ Saito Y, Guo YM, Hirokawa M, Saito K, Komatsuda A, Takahashi N, Fujishima M, Fujishima N, Yamashita J, Sawada K. Phagocytosis of co-developing neutrophil progenitors by dendritic cells in a culture of human CD34(+) cells with granulocyte colony-stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha. Int J Hematol. 査読有、88, 2008, 64-72.

[学会発表] (計8件)

- ① Ohyagi H, Onai N, Guo Y-M, Takahashi N, Hirokawa M, Sawada K, Ohteki T. Prevention of Hemophagocytosis by TNF- α and IL-6 Blockade in TLR9- and Nod1- Ligand Induced Hemophagocytic Syndrome. Saturday, December 5, 2009, 51th Annual Scientific Meeting of The American Society of Hematology, New Orleans, Louisiana, USA, December 5-8, 2009
- ② Tagawa H, Yamanaka Y, Watanabe A, Takahashi N, Sawada K. Aberrant Overexpressions of MicroRNA-21 and MicroRNA-155 Activate AKT Signaling Via Downregulation of Tumor Suppressors in NK-Cell Lymphoma/Leukemia. 51th Annual Scientific Meeting of The American Society of Hematology, New Orleans, Louisiana, USA, December 5, 2009
- ③ Takahashi N, Miura M, Scott SA, Sawada K. ABCG2 C. 421C>A Is Associated with Higher Trough Imatinib Plasma Levels in Patients with Chronic Myeloid Leukemia. 51th Annual Scientific Meeting of The American Society of Hematology, New Orleans, Louisiana,

- USA, December 6, 2009
- ④ YM Guo ,K Ishii ,M Hirokawa ,H Tagawa ,H Ohyagi ,Y Michishita ,K Ubukawa ,J Yamashita ,T Ohteki ,N Onai ,K Kawakami ,W Xiao ,K Sawada. CPG-ODN 2006 AND HUMAN PARVOVIRUS B19 GENOME CONSENSUS SEQUENCES SELECTIVELY INHIBIT GROWTH AND DEVELOPMENT OF ERYTHROID PROGENITOR CELLS. 15th Congress of the European Hematology Association Barcelona, Spain, 2010. June.11, 2010
- ⑤ Ohyagi H, Onai N, Guo YM, Takahashi N, Hirokawa M, Sawada K, Ohteki T. Establishment of a murine hemophagocytic syndrome model by administration of CpG and Nod1 ligand. 39th The International Society of Experimental Hematology, Melbourne, Victoria, Australia, September 16, 2010
- ⑥ Ohyagi H, Onai N, Guo YM, Takahashi N, Hirokawa M, Sawada K, Ohteki T. : Establishment of a murine hemophagocytic syndrome model by administration of CpG and Mod1 ligand. 第72回日本血液学会学術集会, 横浜, 9.24-26, 2010
- ⑦ Guo YM, Ishii K, Hirokawa M, Tagawa H, Ohyagi H, Michishita Y, Ubukawa K, Yamashita J, Ohteki T, Onai N, Kawakami K, Xiao W, Sawada K. : CpG-ODN 2006 and parvovirus B19 genome consensus sequences selectively inhibit erythroid growth. 第72回日本血液学会学術集会, 横浜, 9.24-26, 2010
- ⑧ Tagawa, H., Yamanaka, Y., Takahashi, N., Y, M, Guo., Ichinohasama, R., Shimizu, N., Sawada, K. : Aberrant over expressions of microRNAs activate AKT signaling in NK/T cell lymphoma/leukemia. 71回日本血液学会学術集会, 京都, 10.23-25, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 賢一 (KENICHI SAWADA)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90226069

(2) 連携研究者

樗木 俊聡 (OHTEKI TOSHIKI)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所
先端分子医学研究部門・教授
研究者番号：50233200