

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461408

研究課題名(和文)造血不全におけるNestin陽性造血支持細胞の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of Nestin expressing cells in bone marrow

研究代表者

小原 直(Obara, Naoshi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70422178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：造血支持細胞は多数の種類が知られつつあるが、その分子基盤については不明な点が多い。また、造血支持細胞の異常が造血不全疾患の病態の一部を形成している可能性もある。

Nestin発現造血支持細胞の分子基盤を解明する目的でNestin-CreERT2-RBP-J flox/flox (CKO)マウスを解析した。CKOマウスは脾腫と貧血を呈していた。CKOマウスでは骨髄中の成熟赤芽球が減少し、未熟なCD71+Ter119-赤芽球が増加していた。これらの結果から、骨髄中のNestin陽性造血支持細胞でのNotchシグナルは赤血球造血に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow stromal cells that express nestin are proposed to play a fundamental role in hematopoiesis. However, the molecular mechanism operating in nestin-expressing cells to support hematopoiesis remain to be clarified. To approach this issue, we established The nestin-CreERT2-RBP-J flox/flox (CKO) mice. The CKO mice showed mild anemia, and marked splenomegaly. Mature erythroblasts in the bone marrow of CKO mice decreased, but oppositely increased in the spleen compared to the wild type. Immature erythroid cells increased in bone marrow of CKO mice compared to the wild type. These results showed that if Notch signaling in nestin-expressing cells is knocked out, erythropoiesis in the bone marrow decreases, and be compensated by the spleen. Our results indicate that nestin-expressing hematopoietic-supporting cells are important to support erythropoiesis and select hematopoietic tissues. Furthermore, we think that Notch signaling is involved in regulating erythropoiesis.

研究分野：血液学

キーワード：造血支持細胞 Nestin 造血不全

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨髄異形成症候群 (MDS) における正常造血障害: MDS は異常造血細胞のクローン性増殖性疾患であり汎血球減少を伴う。血球減少は、正常造血が抑制される一方で、クローン性造血細胞が無効造血を行うことによる。正常造血抑制には、骨髄環境の異常が関与していることが示唆されているが、その詳細は不明であった。

(2) 骨髄における神経外胚葉形細胞の役割とその異常による造血障害の可能性: 骨髄中で、神経外胚葉関連と考えられるネスチン陽性のストローマ細胞の存在が確認されており、造血幹細胞ニッチを形成していることが報告されている。一方、神経外胚葉形由来と考えられるグリア細胞繊維性酸性タンパク質 (GFAP) 陽性細胞が、造血幹細胞の細胞周期を休止期にとどめる役割を果たすことも報告されている。これらの細胞に焦点を当てることで、骨髄環境異常による造血障害の機序を知る手がかりが得られるかもしれない、と考えられた。

2. 研究の目的

- (1) MDS 患者骨髄におけるネスチン陽性あるいは GFAP 陽性の神経外胚葉由来の造血支持細胞 (NGC) に異常が生じているか、生じているとすればどのような異常が生じているかを調べる。
- (2) もし NGC が障害を受けている証拠が得られれば、MDS クローン細胞に由来する NGC 障害因子を同定する。
- (3) ネスチン発現造血支持細胞において Notch シグナル活性が低下するマウスを作製し、このマウスにおける造血障害を観察する。

3. 研究の方法

(1) MDS および骨髄浸潤陰性の悪性リンパ腫 (コントロール) 骨髄生検検体を用いた、ネスチン陽性細胞の解剖学的解析: 筑波大学附属病院病理部で保存されている、MDS および骨髄浸潤陰性であることが明確な悪性リンパ腫の骨髄生検検体について、ネスチン、血管内皮細胞マーカー等を中心とする免疫染色を行った。抗体は、脳腫瘍などの病理診断のために病理部で日常的に染色しているものを用いた。

(2) ネスチンプロモーター下で Cre を発現する Nestin-Cre マウス、及び タモキシフェン誘導によりネスチンプロモーター下で Cre を発現する Nestin-CreERT2 マウス (京都大学・影山博士より供与) を、Cre 作動下に GFP を発現するトランスジェニックマウスと交配した (それぞれ Nestin-CreGFP マウス、Nestin-CreERT2GFP マウス)。Nestin-CreGFP マウス骨髄の免疫染色を行い、ヒトにおけるネスチン陽性細胞と、マウスにおける GFP 陽

性細胞との解剖学的解析結果を比較した。

(2) Nestin-CreERT2GFP マウスと RBP-J^{flox/flox} マウス (京都大学・本庶博士より供与) を交配し、タモキシフェン誘導によりネスチンプロモーター下で RBP-J を欠損するマウス (Nestin-CreERT2GFP・RBP-J^{flox/flox} マウス) を作製した。これらのマウスは、移植実験にも利用できるような C57Bl/6 バックグラウンドにした。Nestin-CreERT2GFP・RBP-J^{flox/flox} マウスは生後 4-8 週に達した時点でタモキシフェンを投与し、経時的に造血能を観察した。タモキシフェンは 8 週間週 5 日腹腔内注射し、解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒトコントロール骨髄及び MDS 患者由来骨髄における、ネスチン陽性細胞の解剖学的解析: コントロール骨髄では、少数の紡錘形を呈する細胞がネスチン陽性細胞として同定された。ネスチン陽性細胞は、血管壁を構成細胞として描出されたが、CD34 あるいは CD31 陽性の血管内皮細胞とは明確に異なり、血管内皮細胞と隣接して血管壁を構成している様子が観察された。一方、MDS 患者骨髄では、血管壁構成とは関連しないネスチン陽性細胞が多数観察された。ネスチン陽性細胞を含む解剖学的組織構築が破壊されている可能性が示唆された。以上の観察結果は、MDS における造血支持細胞の異常を具体的に可視化したという点で、極めて新規である。今後は、網羅的遺伝子解析を行い、分子基盤について解析を行う予定である。

(2) Nestin-CreERT2GFP・RBP-J^{flox/flox} マウスの解析: タモキシフェンを 8 週投与後に造血能を解析した。CKO マウスは野生型と比較し、軽度の貧血と脾腫をみとめた。白血球数や血小板数については差を認めなかった。造血細胞をフローサイトメトリーで解析すると、CKO マウス骨髄では CD71-Ter119+成熟赤芽球が減少し、CD71+Ter119-の比較的未熟な赤芽球が増加していた。造血幹細胞数や割合については野生型と比較し、差を認めなかった。造血幹細胞を半固形培地で培養した結果、コロニー形成性能はコントロールマウスと差がなく、障害を受けていないことが明らかになった。一方で脾臓では成熟赤芽球が増加しており、CKO マウスでは骨髄赤血球造血・分化が障害され、脾臓で代償していることが示唆された。純粋に骨髄造血を解析するためにマウスを生後 6 週で脾摘し、タモキシフェンを投与後に骨髄造血について解析した。予想に反し、脾摘後のマウス骨髄では成熟赤芽球・未分化赤芽球とも野生型と比較して差を認めなかった。このことは、造血組織は造血微小環境に応じて柔軟に造血組織を変化させていることが考えられる。

これらの結果から、骨髄中の Nestin 陽性造血支持細胞での Notch シグナルは赤血球造血に重要であることが示唆された。また、

Nestin-CreERT2GFP・RBP-J^{flox/flox} マウスは造血組織の移動・髄外造血の病態解明に役立つと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

- (1) Sakata-Yanagimoto M, Yokoyama Y, Muto H, Obara N, Kurita N, Kato T, Hasegawa Y, Miyazaki Y, Kurokawa M, Chiba S. A nationwide survey of co-occurrence of malignant lymphomas and myelodysplastic syndromes/myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol.* 2016 Apr;95(5):829-30. 査読有 (doi: 10.1007/s00277-016-2612-3.)
- (2) Muroi K, Sakata-Yanagimoto M, Sato T, Yokoyama Y, Maie K, Kurita N, Obara N, Hasegawa Y, Noguchi M, Chiba S. Late occurrence of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorder in a patient with follicular lymphoma treated with bendamustine and rituximab. *Ann Hematol.* 2015 Dec;94(12):2061-2. 査読有 (doi: 10.1007/s00277-015-2463-3.)
- (3) Ninomiya H, Obara N, Niiori-Onishi A, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Hasegawa Y, Chiba S. Improvement of Renal Function by Long-Term Sustained Eculizumab Treatment in a Patient with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Case Rep Hematol.* 2015;2015:673195. 査読有 (doi:10.1155/2015/673195.)
- (4) Kyogoku C, Seki M, Ogawa S, Miyamoto K, Ito Y, Kurita N, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Obara N, Hasegawa Y, Fujishima F, Ichinohasama R, Nakamura S, Chiba S. Complete Remission in Systemic Skin Interdigitating Dendritic Cell Sarcoma after ABVD Chemotherapy. *J Clin Exp Hematop.* 2015;55(1):33-7. 査読有 (doi: 10.3960/jslrt.55.33.)
- (5) Otsu K, Seki M, Ogawa S, Miyamoto K, Ito Y, Sakata A, Kurita N, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Obara N, Hasegawa Y, Chiba S. Multiple myeloma recurring as small intestinal polyposis after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Rinsho Ketsueki.* 2015 Apr;56(4):400-5. 査読有 (doi: 10.11406/rinketsu.56.400.)
- (6) Ogawa S, Yokoyama Y, Suzukawa K, Nanmoku T, Kurita N, Seki M, Maie K, Suyama T, Takaiwa N, Sakata-Yanagimoto M, Obara N, Hasegawa Y, Chiba S. Identification of a fusion gene composed of a Hippo pathway gene MST2 and a common translocation partner ETV6 in a recurrent translocation t(8;12)(q22;p13) in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2015 Aug;94(8):1431-3. 査読有 (doi:10.1007/s00277-015-2391-2)
- (7) Nin S, Seki M, Maie K, Kuroda A, Miyamoto K, Ogawa S, Ito Y, Kurita N, Yokoyama Y, Sakata Yanagimoto M, Obara N, Hasegawa Y, Ogino Y, Ito T, Chiba S. Acute painful crisis in a female Nigerian patient with sickle cell disease. *Rinsho Ketsueki.* 2015 Jan;56(1):30-4. 査読有 (doi: 10.11406/rinketsu.56.30.)
- (8) Nguyen TB, Sakata-Yanagimoto M, Nakamoto-Matsubara R, Enami T, Ito Y, Kobayashi T, Obara N, Hasegawa Y, Chiba S. Double somatic mosaic mutations in TET2 and DNMT3A--origin of peripheral T cell lymphoma in a case. *Ann Hematol.* 2015 Jul;94(7):1221-3. 査読有 (doi: 10.1007/s00277-015-2332-0.)
- (9) Kato T, Sakata-Yanagimoto M, Nishikii H, Ueno M, Miyake Y, Yokoyama Y, Asabe Y, Kamada Y, Muto H, Obara N, Suzukawa K, Hasegawa Y, Kitabayashi I, Uchida K, Hirao A, Yagita H, Kageyama R, Chiba S. Hes1 suppresses acute myeloid leukemia development through FLT3 repression. *Leukemia.* 2015 Mar;29(3):576-85. 査読有 (doi: 10.1038/leu.2014.281. Epub 2014 Sep 19.)
- (10) Muto H, Sakata-Yanagimoto M, Nagae G, Shiozawa Y, Miyake Y, Yoshida K, Enami T, Kamada Y, Kato T, Uchida K, Nanmoku T, Obara N, Suzukawa K, Sanada M, Nakamura N, Aburatani H, Ogawa S, Chiba S. Reduced TET2 function leads to T-cell lymphoma with follicular helper T-cell-like features in mice. *Blood Cancer J.* 2014 Dec 12;4:e264. 査読有 (doi:10.1038/bcj.2014.83.)
- (11) Nakamoto-Matsubara R, Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Yanagimoto S, Shiozawa Y, Nanmoku T, Satomi K, Muto H, Obara N, Kato T, Kurita N, Yokoyama Y, Izutsu K, Ota Y, Sanada M, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Kitabayashi I, Takeuchi K, Nakamura N, Ogawa S, Chiba S. Detection of the G17V RHOA mutation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related lymphomas using quantitative allele-specific PCR. *PLoS One.* 2014 Oct 13;9(10):e109714. 査読有 (doi:10.1371/journal.pone.0109714. eCollection 2014.)
- (12) Suyama T, Obara N, Kawai K, Yamada K, Kusakabe M, Kurita N, Nishikii H, Yokoyama Y, Suzukawa K, Hasegawa Y, Noguchi M, Chiba S. Acute myeloid leukemia possibly originating from the same clone of testicular germ cell tumor. *Rinsho Ketsueki.* 2013 Aug;54 査読有 (8):764-8.

- (13) Sakamoto T, Obara N, Kurita N, Sakata-Yanagimoto M, Nishikii H, Yokoyama Y, Suzukawa K, Hasegawa Y, Chiba S. Effectiveness and safety of rabbit anti-thymocyte globulin in Japanese patients with aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2013 Sep;98(3):319-22. 査読有 (doi: 10.1007/s12185-013-1418-5. Epub 2013 Aug 21.)
- (14) Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koefler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet*. 2013 Oct;45(10):1232-7. 査読有 (doi: 10.1038/ng.2731. Epub 2013 Aug 18.)
- (15) Kurita N, Obara N, Fukuda K, Nishikii H, Sato S, Inagawa S, Kurokawa T, Owada Y, Ninomiya H, Chiba S. Perisurgical induction of eculizumab in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: its inhibition of surgery-triggered hemolysis and the consequence of subsequent discontinuation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2013 Sep;24(6):658-62. 査読有 (doi: 10.1097/MBC.0b013e328360d057)

〔学会発表〕(計 8 件)

- (1) Naoshi Obara, et al. Abnormalities in nestin-expressing bone marrow stromal cells in myelodysplastic syndrome. The 6th JSH International Symposium 2015 (招待講演) 2015 年 5 月 22-23 日. 軽井沢プリンスホテル (長野).
- (2) Naoshi Obara, et al. Abnormalities in nestin-expressing bone marrow stromal cells in myelodysplastic syndrome. International society for experimental Hematology 44th Annual Scientific meeting. 2015 年 9 月 17-18 日. 国立京都国際会館 (京都).
- (3) Tatsuhiro Sakamoto (2 番目), et al. NOTCH signaling pathway in bone marrow nestin-expressing cells controls balance of erythropoiesis between bone marrow and spleen. 幹細胞シンポジウム. 2016 年 5 月 20-21 日. 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫).
- (4) Cao Sy Luan (2 番目), et al. Localization and Characteristic of Nestin-expressing Cells in Human Bone

Marrow and Their Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes. 幹細胞シンポジウム. 2016 年 5 月 20-21 日. 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫).

- (5) Naoshi Obara, et al. The Interim analysis of prospective observational study with PNH-type cells in Japanese patients with bone marrow failure syndrome(The OPTIMA STUDY). The 20th Congress of the European Hematology Association, 2015 年 6 月 11-14 日. Vienna, Austria.
- (6) Naoshi Obara, et a. Localization of nestin-expressing cells in bone marrow and the role of Notch signaling in nestin-expressing stromal cells in hematopoiesis. 日本血液学会総会. 014 年 10 月 31 日-11 月 2 日. 大阪国際会議場 (大阪).
- (7) Naoshi Obara, et al. Baseline assessment of PNH-type cells in patients wit bone marrow failure(The OPTIMA study). The American Society of Hematology 54th Annual Meeting and Exposition. 2013 年 12 月 6-10 日. New Orlns, USA.
- (8) Yuji Yonemura (6 番目), et al. The OPTIMA update: baseline assessment of PNH-type cells in patients with bone marrow failure. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting and Exposition. 日本血液学会. 2014 年 10 月 31 日-11 月 2 日. 大阪国際会議場(大阪).

〔図書〕(計 7 件)

- (1) 小原 直、医薬ジャーナル社、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH)、2015、239(36-43).
- (2) 小原直、文光堂、ヘモグロビン産生異常、血液・造血器・リンパ系、2015、385(206-210).
- (3) 小原直、文光堂、再生不良性貧血、血液・造血器・リンパ系、2015、385(206-210).
- (4) 小原直、他、中外医学社、真性赤血球増多症の治療、EBM 血液疾患の治療、2014、555(178-183).
- (5) 小原 直、日本臨床、Imerslund-Grasbeck 症候群、血液症候群 (第 2 版) 2013、535(77-78).
- (6) 小原 直、日本臨床、ホルムイミノトランスフェラーゼ欠損症、血液症候群 (第 2 版) 2013、535(88-90).
- (7) 小原 直、日本臨床、若年性悪性貧血、血液症候群 (第 2 版)、2013、535(74-76).

〔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
<http://www.ketsunai.com>

6．研究組織

(1)研究代表者

小原 直 (OBARA NAOSHI)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：70422178