

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15359

研究課題名(和文) 骨髄赤芽球造血ニッチの解明

研究課題名(英文) Unraveling bone marrow erythropoiesis niche

研究代表者

千葉 滋 (Chiba, Shigeru)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60212049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子改変マウスを用いて、骨髄中で造血を助ける細胞について解析した。骨髄中の特定の非造血細胞(nestin発現細胞)において、細胞内の特定のシグナルシステムが働かないようにすることで、骨髄における赤血球造血が障害されることが明らかになった。この原因は、nestin発現骨髄非造血細胞に異常が生じた結果、骨髄局所においてマクロファージと呼ばれる赤血球造血を助ける細胞からインターロイキン6という物質が過剰に分泌されるようになり、これが赤血球造血に悪影響を及ぼすためであることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Cells that help blood production in the bone marrow were analyzed using genetically modified mice. It was demonstrated that erythrocyte production in the bone marrow is impaired if a specific signaling (NOTCH signaling) system is turned off in "nestin-expressing cells," one type of non-blood producing cells that are present in the bone marrow at a very low frequency. The mechanism for this observation was analyzed as follows: the abnormality in nestin-expressing bone marrow non-blood producing cells disturbs local environment and increases the secretion of a substance called interleukin 6 from "macrophages," which directly support erythrocyte production in the bone marrow. This causes adverse effect on erythropoietic production.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄ストローマ 赤芽球 nestin NOTCH Rbpj

1. 研究開始当初の背景

骨髄における造血では、造血幹細胞や造血前駆細胞のニッチ(居場所)が重要な機能を果たしていることが明らかにされている。ニッチ機能は、ストローマ細胞と総称される多彩な細胞によって担われている。骨髄ストローマ細胞のうち、nestinという細胞骨格を作る蛋白質を発現する非造血細胞は、造血幹細胞 niche 細胞として機能することが報告されている。しかし一方、nestin 発現骨髄ストローマ細胞がどのような機能を果たしているのかについては不明であった。申請者らは、タモキシフェンという、エストロゲン受容体結合物質を投与したときに、nestin 発現細胞でのみ、緑色蛍光タンパク質(GFP)を産生し、かつ *Rbpj* という遺伝子をノックアウトすることで“Notch シグナル”と呼ばれるシグナルが働かないようにしたマウス(ここでは Nestin-CreER/GFP-RbpjNull マウスとする)を作製した。そうしたところ、このマウスの骨髄が白色調になることを観察していた。このため、Nestin-CreER/GFP-RbpjNull マウスでは、赤血球造血に障害が生じているのではないかと仮説を立て、さらにこのマウスを用いて造血細胞のニッチの解析を進めることとした。

2. 研究の目的

Nestin-CreER/GFP-RbpjNull マウス、あるいは GFP 遺伝子は組み込まれていない Nestin-CreER/RbpjNull マウス、いずれかの骨髄の詳細、およびこれらのマウスの造血能を解析することにより、赤血球の産生障害の治療に資する基礎的なデータを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

[Nestin 発現/GFP 発現/Rbpj 欠失]

タモキシフェン投与後に、Nestin-CreER/GFP-RbpjNull マウスの骨髄や脾臓における、GFP 陽性細胞の存在と頻度を、顕微鏡観察下、およびフローサイトメトリー法で観察した。そして、GFP 陽性細胞をソーティング法で分取し、これらの細胞に nestin が発現しているかを RT-PCR 法で解析した。また、実際にこの細胞特異的に *Rbpj* 遺伝子が欠失しているかを、PCR 法で解析した。

[骨髄・脾臓組織の観察]

タモキシフェン投与後の、Nestin-CreER/RbpjNull マウスの骨髄や脾臓の肉眼像、および組織像を観察した。具体的にはまず、骨髄および脾臓の切片を Hematoxylin-Eosin (HE) 染色し、顕微鏡的観察を行った。続いて、同切片を用い、種々の抗体を用いて免疫染色を行った。

[フローサイトメトリー解析]

骨髄細胞や脾臓細胞を、蛍光色素付きの抗体を結合させて、フローサイトメトリー法で解析した。

[移植]

タモキシフェン投与後の Nestin-CreER/RbpjNull マウスの骨髄細胞を、致死量の放射線照射を施した野生型マウスに移植した。一方、野生型マウスの骨髄細胞を、タモキシフェン投与後に致死量の放射線照射を施した Nestin-CreER/RbpjNull マウスに移植した。

[赤芽球島再構成の観察]

タモキシフェン投与後、Nestin-CreER/RbpjNull マウスの骨髄からマクロファージを分離し、野生型マウス由来骨髄細胞と共存させ、再構成された赤芽球島を定量した。これを種々のコントロールと比較した。

[骨髄 nestin 発現細胞およびマクロファージにおける網羅的発現解析]

タモキシフェン投与後、Nestin-CreER/GFP-RbpjNull マウス由来骨髄 GFP 陽性細胞およびマクロファージから RNA を抽出し網羅的シークエンス解析を行った。

4. 研究成果

[Nestin 発現/GFP 発現/Rbpj 欠失]

タモキシフェン投与後、Nestin-CreER/GFP-RbpjNull マウス骨髄標本を抗 GFP 抗体で染色すると、ごく一部の細胞が染色された。一方、タモキシフェンを投与しない Nestin-CreER/GFP-RbpjNull マウス骨髄標本では、抗 GFP 抗体で染色される細胞は認められなかった。

タモキシフェン投与後、Nestin-CreER/GFP-RbpjNull マウス骨髄の CD45 陽性細胞(造血細胞)では、GFP を発現している細胞は認められなかった。一方、CD45 陰性細胞(非造血細胞)の約 0.1% が GFP を発現していた。一方、タモキシフェン投与前は、CD45 陰性細胞(非造血細胞)分画にも GFP 陽性細胞は認められなかった。

タモキシフェン投与後、Nestin-CreER/GFP-RbpjNull マウス骨髄一方、全骨髄細胞、CD45 陽性細胞、全 CD45 陰性細胞、GFP 陽性 CD45 陰性細胞のそれぞれの分画細胞から DNA を調整し、*Rbpj* 遺伝子の欠失状態を PCR 法で確認したところ、GFP 陽性 CD45 陰性細胞でのみ、*Rbpj* 遺伝子欠失が示された。したがって、Nestin-CreER/GFP-RbpjNull マウスおよび Nestin-CreER/RbpjNull マウスはいずれも、タモキシフェン投与後に、nestin プロモーターが働く細胞(概ね nestin 発現細胞と一致)において、*Rbpj* 遺伝子が欠失し、Notch シグナルが機能しなくなっていることが示された。

[骨髄・脾臓組織の観察]

タモキシフェン投与後の Nestin-CreER/RbpjNull マウスの骨髄は白色調を呈しており、一方脾臓が腫大していた。骨髄の細胞密度は野生型マウスと比べて明らかな差はなかった。免疫染色では、Ter119 陽性を示す、成熟した赤芽球が著減していた。一方、脾臓では細胞数全体が増えていると

もに、成熟赤芽球の割合が増加していた。血液中のヘモグロビン濃度はほぼ正常に保たれていた。このことから、骨髄では赤血球造血が障害されており、脾臓では代償性に赤血球造血が亢進していると考えられた。

[骨髄の赤芽球系造血細胞]

タモキシフェン投与後、Nestin-CreER/RbpjNull マウスの骨髄では、CD71 陽性 Ter119 陰性の未熟赤芽球がやや増加しており、CD71 陽性 Ter119 陽性の成熟赤芽球が著減していた。一方、Nestin-CreER/RbpjNull マウスの脾臓では、CD71 陽性 Ter119 陽性の成熟赤芽球の割合が増加しており、赤血球造血が亢進していると考えられた。

[移植]

タモキシフェン投与後の Nestin-CreER/RbpjNull マウスの骨髄細胞を移植した野生型マウスには、明らかな異常が認められなかった。一方、野生型マウスの骨髄細胞を移植したタモキシフェン投与 Nestin-CreER/RbpjNull マウスでは、タモキシフェンを投与しただけの Nestin-CreER/RbpjNull マウス同様、骨髄における成熟赤芽球の著減と、脾腫が認められた。

[赤芽球島再構成の観察]

タモキシフェン投与後の Nestin-CreER/RbpjNull マウスの骨髄マクロファージは、赤芽球島再構成能が障害されていた。

[骨髄 nestin 発現細胞およびマクロファージにおける網羅的発現解析]

タモキシフェン投与後の Nestin-CreER/RbpjNull マウスの骨髄から分離した GFP 陽性細胞では、特定のケモカインの発現が変化していた。また、マクロファージでは、インターロイキン6の発現が増加していた。

[研究成果のまとめ]

骨髄で nestin を発現するごく少数の非造血細胞に異常が生じた結果、骨髄局所においてマクロファージと呼ばれる赤血球造血を助ける細胞からインターロイキン6という物質が過剰に分泌されるようになり、これが骨髄の赤血球造血に悪影響を及ぼすためであることがわかった。一方、脾臓のマクロファージではインターロイキンの過剰産生が生じていなかった。

以上により、骨髄内の赤血球産生細胞のニッチについての有力な手がかりが得られた。

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2件)

1. Pierini A*, Nishikii H*, Baker J, Kimura T, Kwon H-S, Pan Y, Chen Y, Alvarez M, Strober W, Velardi A,

Shizuru JA, Wu JY, Chiba S, Negrin RS. Foxp3+ regulatory T cells maintain the bone marrow microenvironment for B cell lymphopoiesis. Nature Communications. in press

2. Kurita N, Goshō M, Yokoyama Y, Kato T, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Hasegawa Y, Uchida N, Takahashi S, Kouzai Y, Atsuta Y, Kurata M, Ichinohe T, Chiba S. A phase I/II trial of intrabone marrow cord blood transplantation and comparison of the hematological recovery with the Japanese nationwide database. Bone Marrow Transplant 2017;52(4):574-579
3. Nishikii H, Kim BS, Yokoyama Y, Chen Y, Baker J, Pierini A, Alvarez M, Mavers M, Maas-Bauer K, Pan Y, Chiba S, Negrin RS. DR3 signaling modulates the function of Foxp3+ regulatory T cells and the severity of acute graft-versus-host disease. Blood. 2016;128(24):2846-2858
4. Makishima H, Yoshizato T, Yoshida K, Sekeres MA, Radivoyevitch T, Suzuki H, Przychodzen B, Nagata Y, Meggendorfer M, Sanada M, Okuno Y, Hirsch C, Kuzmanovic T, Sato Y, Sato-Otsubo A, LaFramboise T, Hosono N, Shiraishi Y, Chiba K, Haferlach C, Kern W, Tanaka H, Shiozawa Y, Gómez-Seguí I, Husseinzadeh HD, Thota S, Guinta KM, Dienes B, Nakamaki T, Miyawaki S, Sauntharajah Y, Chiba S, Miyano S, Shih LY, Haferlach T, Ogawa S, Maciejewski JP. Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. Nature Genetics. 2017;49(2):204-212
5. Nishikii H, Kanazawa Y, Umemoto T, Goltsev Y, Matsuzaki Y, Matsushita K, Yamato M, Nolan GP, Negrin R, Chiba S. Unipotent megakaryopoietic pathway bridging hematopoietic stem cells and mature megakaryocytes. Stem Cells. 2015;33(7):2196-2207

[学会発表](計12件)

1. 錦井秀和, 木村隆治, 横山泰久, ロバートネグリン, 千葉 滋. Foxp3 陽性制御性 T 細胞は骨髄移植後の B 細胞分化に必要な造血環境を維持している. 第 39 回日本造血細胞移植学会. 2017.3.2-4. くにびきメッセ. 島根県松江市.
2. Luan Cao Sy, Naoshi Obara, Tatsuhiro Sakamoto, Takayasu Kato, Hidekazu Nishikii, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Shigeru Chiba. Abnormal Increase in a Distinct Subset of Nestin-Expressing Cells in the Bone Marrow of

- Myelodysplastic Syndromes. The American Society of Hematology 58th Annual Meeting and Exposition. 2016.12.3-6. San Diego, CA, USA
3. Tatsuhiro Sakamoto, Naoshi Obara, Takayasu Kato, Luan Cao Sy, Hidekazu Nishikii, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Satoru Takahashi, Shigeru Chiba. Notch Signaling in Bone Marrow Nestin-Expressing Cells Controls Balance of Erythropoiesis at the Bone Marrow and Spleen. The American Society of Hematology 58th Annual Meeting and Exposition. 2016.12.3-6. San Diego, CA, USA
 4. 坂本竜弘, 小原 直, 藤村亮介, 加藤貴康, Luan Cao Sy, 錦井秀和, 坂田(柳元)麻実子, 高橋 智, 千葉 滋. NOTCH signaling in bone marrow nestin-expressing cells is involved in regulating erythropoiesis. 第78回日本血液学会学術集会. 2016.10.13-15. パシフィコ横浜. 神奈川県横浜市.
 5. Luan Cao Sy, Naoshi Obara, Tatsuhiro Sakamoto, Takayasu Kato, Hidekazu Nishikii, Satoshi Ikeda, Keiko Suzuki, Shigeru Chiba. Localization and Characteristic of Nestin-expressing Cells in Human Bone Marrow and Their Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes. The 5th JCA-AACR Special Joint Conference. 2016.7.13-15. ヒルトン東京ベイホテル. 千葉県舞浜市.
 6. Luan Cao Sy, Naoshi Obara, Tatsuhiro Sakamoto, Takayasu Kato, Hidekazu Nishikii, Satoshi Ikeda, Keiko Suzuki, Shigeru Chiba. Localization of distinct subsets of nestin-expressing cells in human bone marrow and their abnormalities in myelodysplastic syndromes. The 14th Stem Cell Research Symposium. 2016.5.20-21. 淡路夢舞台. 兵庫県淡路市.
 7. Tatsuhiro Sakamoto, Naoshi Obara, Ryosuke Fujimura, Takayasu Kato, Luan Cao Sy, Hidekazu Nishikii, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Satoru Takahashi, Shigeru Chiba. NOTCH signaling pathway in bone marrow nestin-expressing cells controls balance of erythropoiesis between bone marrow and spleen. The 14th Stem Cell Research Symposium. 2016.5.20-21. 淡路夢舞台. 兵庫県淡路市.
 8. Hidekazu Nishikii, Antonio Pierini1, Yasuhisa Yokoyama, Takaharu Kimura, Shigeru Chiba, Robert S. Negrin. Foxp3 + Regulatory T Cells Maintain Bone Marrow Microenvironment for B Cell Differentiation From Hematopoietic Stem Cells. The 7th JSH International Symposium 2016. 2016.5.13-14. 淡路
 9. Hidekazu Nishikii, Byung-Su Kim, Yasuhisa Yokoyama, Jeanette Baker, Antonio Pierini, Maite Alvarez, Yuqiong Pan, Yan Chen, Dominik Schneidawind, Shigeru Chiba, Robert S. Negrin. Expanded CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells through DR3 Signaling Have a Distinct Immunophenotype and Abrogate the Lethal Acute-Graft and Host Disease after Allogeneic Transplantation. The American Society of Hematology 57th Annual Meeting and Exposition. 2015.12.5-8. Orlando, FL, USA
 10. Naoshi Obara, Tatsuhiro Sakamoto, Luan Cao Sy, Takayasu Kato, Sachie Suzuki, Naoki Kurita, Yasuhisa Yokoyama, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Yuichi Hasegawa, Shigeru Chiba. Abnormalities in nestin-expressing bone marrow stromal cells in MDS patients. 第77回日本血液学会学術集会. 2015.10.16-18. ANA クラウンプラザホテル金沢. 石川県金沢市.
 11. Naoshi Obara, Tatsuhiro Sakamoto, Cao Sy Luan, Takayasu Kato, Shigeru Chiba. Abnormalities in Nestin-expressing bone marrow stromal cells in patients with myelodysplastic syndrome. ISEH 44th Annual Scientific Meeting. 2015.9.17-19. 京都国際会議場. 京都府京都市.
 12. Hidekazu Nishikii, Yuly Goltsev, Yosuke Kanazawa, Yerumasa Umemoto, Yu Matsuzaki, Kenji Matsushita, Garry Nolan, Masayuki Yamato, Robert Negrin, Shigeru Chiba. Unipotent megakaryopoietic pathway bridging hematopoietic stem cells and megakaryocytes. ISEH 44th Annual Scientific Meeting. 2015.9.17-19. 京都国際会議場. 京都府京都市.
- 〔図書〕(計1件)
Sakata-Yanagimoto M, Chiba S. Notch2 signaling in mast cell development and distribution in the intestine. Methods in Molecular Biology Volume 1220, 2015
- 〔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：<http://www.ketsunai.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 滋 (CHIBA, Shigeru)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：60212049

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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

(4) 研究協力者

錦井 秀和 (NISHIKII, Hidekazu)
坂本 竜弘 (SAKAMOTO, Tatsuhiro)
Luan Cao Sy (Cao Sy, Luan)