

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15364

研究課題名(和文) 生体イメージングを用いた神経による造血幹細胞ニッチ制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms by which sympathetic nerves regulate functions of hematopoietic stem cell niches by in vivo imaging techniques

研究代表者

国崎 祐哉 (Kunisaki, Yuya)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：80737099

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)：オプトジェネティクスとは、光受容体を組織特異的に発現させるシステムであり、より低侵襲的な神経刺激により、血管内皮細胞内、細胞間のシグナル伝達の可視化が可能である。本技術とマウス頭蓋骨髄生体イメージング技術を組み合わせることにより、またex vivo 3次元イメージング技術により、神経刺激が、細動脈から骨髓洞へどのように伝わるかを分析することで、交感神経により骨髓機能がどのように制御を受けているかの解析を試みた。間葉系幹細胞を特異的に標識するNestin-GFPマウス系統にMLL-AF9細胞を骨髓移植するマウス急性白血病モデルを用いて、白血病細胞がニッチ細胞にどのような変化を来すか解析した。

研究成果の概要(英文)：We propose to stimulate peripheral sympathetic nerves with a novel optogenetic model, and investigate the transmission of neural signals in the BM by imaging the release of intracellular Ca²⁺ in different stromal cell populations with multi-channel fluorescent intravital microscopy. Calcium (Ca²⁺) is a universal second messenger regulating essential cellular signaling events in many tissues and cell types. Ca²⁺ flux in a cellular level can be imaged in vivo using an enhanced green fluorescent protein (EGFP) based, genetically encoded Ca²⁺ indicator, GCaMP3, which provides highest signal-to-noise ratio (SNR) up to date. In this study, using genetic mouse models that express GCaMP in endothelial cells (VE-cadherinERT2), we will establish the imaging system to visualize signal transmissions in the bone marrow endothelial cells under sympathetic stimulation using optogenetic approaches combined with BM multichannel fluorescence intravital microscopy (MFIM).

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞 骨髓微小環境 がん幹細胞 生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞の機能は、微小環境(ニッチ)からのシグナルによって、厳格な制御を受けている。これまでの多くの研究により、骨芽細胞、ストローマ細胞などを始めとした様々な種類の細胞が、造血幹細胞ニッチ構成細胞として同定されている。交感神経もその一つであり、交感神経アドレナリン受容体を介した刺激は、造血幹細胞の骨髄からの動員を制御しており(Katayama Cell 2006、Mendez-Ferrer Nature 2010)、また、交感神経線維を覆う Schwann 細胞は、造血幹細胞の静止状態の維持に重要な役割を果たしていること(Yamazaki Cell 2011)が報告されている。加えて、申請者らは、交感神経を介した刺激が、骨髄洞血管内皮の接着因子の発現レベルを調節することにより、造血幹細胞への骨髄への移入をも制御していることを、マウス頭蓋骨髄の生体イメージング技術を用いて明らかにした(Kunisaki Immunity 2012)。

更に、レーザー共焦点顕微鏡を用いた骨髄の3次元イメージング法を開発し、骨髄の血管は、細動脈と骨髄洞という2種類の血管によって構成され、細動脈は静止状態の維持、骨髄洞は増殖やトラフィッキングというような造血幹細胞の異なる機能を支持しており、更に、これらの血管は異なる種類の血管周囲細胞(細動脈: NG2/NG2-cre^{ERTM}、骨髄洞: レプチン受容体/Lepr-cre)によって解剖学的かつ機能的に区別されることを明らかにした(図1;Kunisaki Nature 2013)。

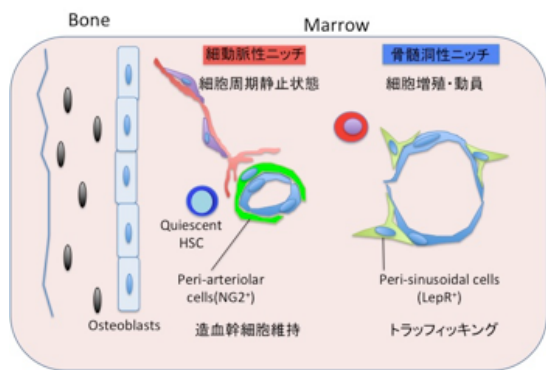


図1 骨髄造血幹細胞ニッチモデル 骨髄血管は骨内膜下におおく存在する細動脈と骨髄全体に分布する骨髄洞という2種類の血管で構成されている。細動脈と骨髄洞を核とした構造(ニッチ)は、それぞれ造血幹細胞の静止状態(細動脈性ニッチ)、増殖(骨髄洞性ニッチ)といった異なる機能を制御している。

骨髄血管は骨内膜下におおく存在する細動脈と骨髄全体に分布する骨髄洞という2種類の血管で構成されている。細動脈と骨髄洞を核とした構造(ニッチ)は、それぞれ造血幹細胞の静止状態(細動脈性ニッチ)、増殖(骨髄洞性ニッチ)といった異なる機能を制御している。

興味深いことに、細動脈のみが解剖学的に交感神経支配を受けており、骨髄洞は、直接的な神経支配を受けておらず(Kunisaki Nature 2013)、交感神経からの刺激が、どのような経路、細胞を介して骨髄洞の機能を制御してい

るかは、不明であった。

2. 研究の目的

申請者は、以前の研究で、骨髄の血管は、細動脈と骨髄洞という2種類の血管によって構成され、細動脈は静止状態の維持、骨髄洞は増殖やトラフィッキングというような造血幹細胞の異なる機能を支持していることを明らかにした。これまでに、交感神経刺激が造血幹細胞動態(静止状態及び動員や生着)に影響を与えることが報告されており、両血管の機能は密な神経支配を受けていることが予想された。しかしながら、骨髄3次元イメージングによる解析によると、細動脈のみが解剖学的に交感神経支配を受け、骨髄洞は、直接的な神経支配を受けておらず、神経刺激がどのような経路で骨髄洞の機能を制御するかは不明である。本申請課題は、オプトジェネティクス技術を用いて、骨髄内における神経刺激伝達を可視化することにより、どのような経路、細胞を介して、交感神経刺激が細動脈から骨髄洞へ伝達し、骨髄の機能をどのように制御しているかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

オプトジェネティクスモデルを用いて末梢交感神経を刺激し、マルチカラー蛍光生体イメージングにて細胞内 Ca⁺⁺の放出を可視化することにより骨髄における神経伝達経路を明らかにすることを目的とする。Ca⁺⁺波の検出は、遺伝的に組み込まれた Ca⁺⁺インディケーター(GCaMP3)を使用する。交感神経特異的に光受容体を発現する tyrosine hydroxylase (TH)-cre/Rosa-Chnne1rhodopsin2 (Chr2)-tdTomato^{f1/stop/f1}と血管内皮特異的(VE-cadherin-cre^{ERT2})、血管周囲細胞特異的(NG2-cre^{ERTM}、Lepr-cre) Rosa-GCaMP3^{f1/stop/f1} マウス系統を樹立し、それぞれのマウス系統を組み合わせることで、光による神経刺激によって、どのような細胞で Ca⁺⁺放出が起こるか、どのような細胞間で伝達が起こるかを検証する。

始めに、骨髄間質の構造と造血幹細胞の分布をより詳細に解析するために、我々はスピニングディスク共焦点顕微鏡を用いた骨髄の3次元イメージング技術を確立した(図2)。

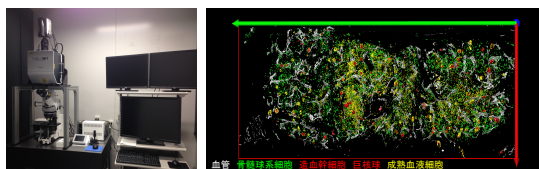


図2 レーザースピニングディスク共焦点顕微鏡による3次元イメージング レーザースピニングディスク共焦点顕微鏡(左)とマウス胸骨骨髄の3次元再構築画像

更に、MLL-AF9 細胞を骨髄移植したマウス急性白血病モデルを用いて、その正常造血幹細胞に対する数的、機能的影響を解析した。次に、間葉系幹細胞を特異的に標識する Nestin-

GFP マウス系統に MLL-AF9 細胞を骨髄移植することで、白血病細胞がニッチ細胞に構造的にどのような変化を来すか、正常造血幹細胞との位置関係がどのように変化するか、我々が確立したスピニングディスク共焦点顕微鏡を用いた骨髄のホールマウントイメージングにより形態学的に解析した。また、FACS ソーティングにて純化したニッチ細胞における、造血幹細胞の維持に必要な因子の発現の変化について、定量的 PCR を用いて機能的な解析を行い、造血幹細胞機能との関連を分析した。

また、成人骨髄の造血幹細胞の多くは、静止状態で存在するのに対して、胎児肝臓においては著しく増殖していることが知られている。そこで成人骨髄と胎児肝臓における微小環境を比較することで、造血幹細胞の静止状態と増殖を決定する外的因子の特定を試みた。

4. 研究成果

急性白血病のマウスモデルである MLL-AF9 モデルマウス骨髄より分離した間葉系幹細胞は、CXCL12、SCF といったニッチ因子の遺伝子発現がしており、その正常造血幹細胞支持能は低下していると考えられた。また、同マウスの骨髄の三次元イメージング技術を用いた解析において、骨や骨髄の血管及び神経の構造に変化が認められた。以上より白血病細胞は、構造的にも、機能的にも骨髄環境を再構築することで、正常造血を抑制し、腫瘍の進展に優位な環境を形成していることが示唆された。

次に、正常造血幹細胞の静止状態と増殖を支持するニッチの相違を特定するために成人骨髄と胎児肝臓より Nestin-GFP 陽性間葉系幹細胞を分離し、RNA シーケンスを行いその遺伝子発現について比較した。その結果、解析した遺伝子の 90%以上はその発現に違いが認められず、胎児肝臓と成体骨髄においてニッチを形成する間葉系幹細胞は相同性が高いことが明らかとなった。両細胞間で発現の異なる遺伝子を詳細に解析し、細胞周期や増殖に関わる遺伝子群においてその発現に相違が認められた。以上の結果より、間葉系幹細胞は、成体骨髄では静止状態で、胎児肝臓では増殖して存在しており、造血幹細胞の増殖との間に、正の相関が見出された (図 3)。

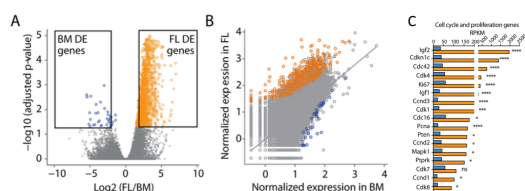


図 3 成体骨髄由来及び胎児肝臓由来間葉系幹細胞の遺伝子発現比較 (発表論文 4 より引用) 成体骨髄由来及び胎児肝臓由来の Nestin-GFP で標識される間葉系幹細胞を分離し、その遺伝子発現を RNA シーケンスにて比較した。大部分の遺伝子発現パターンは、類似していたが (A, B)、細胞増殖に関する遺伝子は胎児由来のもので高発現していた (C)。

更に、図 1 に示した顕微鏡を用いて、細胞間シグナル伝達を可視化するために、必要なマウス生体骨髄イメージングの装置 (Intravital microscopy)、技術を確立した (図 4)。

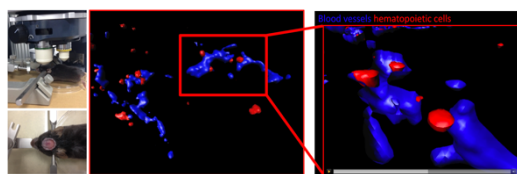


図 4 マウス頭蓋骨髄生体イメージング マウス頭蓋骨髄における血球と血管の相互作用を動的に観察することが可能である。この技術を用いて今後白血病とその環境との相互作用を動的に観察する。

今後の研究計画

本年度は、イメージング技術及び遺伝子解析の結果より、造血幹細胞ニッチを構成する細胞の詳細な解析を行い、ニッチ内情報伝達を担うと予想される細胞を同定することができた。遺伝子解析法の設備、準備が予想よりも早く整ったため、当初平成 28 年度に行う予定にしていた計画 (2) 骨髄内における神経-血管シグナル伝達を担う細胞及び分子の同定を本年度行う形となった。よって平成 28 年度は、この結果をもとに、本年度の研究によって明らかとなった細胞を標的としたオプトジェネティックマウスモデルの作成及び、その解析による計画 (1) 骨髄における神経-血管内皮・ストローマ細胞シグナル伝達の可視化の実現を目指す。

具体的には、Intravital microscopy を用いて、血管やストローマ細胞における細胞内の Ca^{2+} 放出を可視化することにより、細胞内、細胞間のシグナル伝達を可視化することが可能となっている。本年度計画により同定されたニッチ細胞を標的とする遺伝子改変マウス NG2-cre、レプチン受容体-cre マウスと Rosa-GCaMP3^{f1/stop/f1} を交配、更に TH-cre / Rosa-ChR2-tdTomato^{f1/stop/f1} と掛け合わせることに、光刺激による神経刺激後の、ニッチ細胞内カルシウムシグナルの伝達、変化の観察に挑戦する。

この研究によって得られた結果や新しい概念は、造血幹細胞及び造血器腫瘍に留まらず、他の臓器の幹細胞や固形腫瘍の発症機構の研究へも応用され、更に癌細胞ニッチを標的とした新しい癌治療法の開発の基礎を築く研究となることが期待される。

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 5 件)

- 1- Miyawaki K, Iwasaki H, Jiromaru T, Kusumoto H, Yurino A, Sugio T, Uehara Y, Odawara J, Daitoku S, Kunisaki Y, Mori Y, Arinobu Y, Tsuzuki H,

- Kikushige Y, Iino T, Kato K, Takenaka K, Miyamoto T, Maeda T, Akashi K. Blood. 2017 Mar 23 AOL.
- 2- Asada N, Kunisaki Y, Pierce H, Wang Z, Fernandez NF, Birbair A, Ma'ayan A, Frenette PS. Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. **Nat Cell Biol.** 2017 Mar;19(3):214-223.
- 3- Yurino A, Takenaka K, Yamauchi T, Nunomura T, Uehara Y, Jinnouchi F, Miyawaki K, Kikushige Y, Kato K, Miyamoto T, Iwasaki H, Kunisaki Y, Akashi K. Enhanced Reconstitution of Human Erythropoiesis and Thrombopoiesis in an Immunodeficient Mouse Model with Kit(Wv) Mutations. **Stem Cell Reports.** 2016 Sep 13;7(3):425-38.
- 4- Khan JA, Mendelson A, Kunisaki Y, Birbrair A, Kou Y, Arnal-Estapé A, Pinho S, Ciero P, Nakahara F, Ma'ayan A, Bergman A, Merad M, Frenette PS. Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels. **Science.** 2016 Jan 8;351(6269):176-80.
- 5- Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, Burk RD, Kunisaki Y, Jang JE, Scheiermann C, Merad M, Frenette PS. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. **Nature.** 2015 Sep 24;525(7570):528-32.

[学会発表] (計9件)

- 1- 國崎 祐哉 間葉系幹細胞による造血幹細胞制御機構 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会(長崎)3月29日(2017)
- 2- 國崎 祐哉 骨髄微小環境のイメージング 第31回日本整形外科学会基礎学術集会(福岡)10月13日(2016)
- 3- 國崎 祐哉 間葉系幹細胞による造血幹細胞制御機構 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会(横浜)4月21日(2016)
- 4- 國崎 祐哉 血管性ニッチによる造血幹細胞制御機構 第18回癌と骨病変研究会(東京)11月13日(2015)
- 5- 國崎 祐哉 造血幹細胞ニッチ 第77回日本血液学会学術集会(金沢)10月18日(2015)
- 6- 國崎 祐哉, 上原 康史, 赤司 浩一 加齢による骨髄環境の変化とその造血幹細胞機能への影響 第77回日本血液学会学術集会(金沢)10月17日(2015)
- 7- Yuya Kunisaki "Imaging of the bone marrow and hematopoietic stem cells The International Society of Experimental Hematology 44th Annual Scientific Meeting(京都)9月17日(2015)
- 8- 國崎 祐哉 骨髄微小環境による造血幹

細胞制御機構 第39回阿蘇シンポジウム(熊本)7月31日(2015)

- 9- 國崎 祐哉 血管性ニッチによる造血幹細胞制御機構 第33回日本骨代謝学会学術集会(東京)7月24日(2015)

[図書] (計4件)

- 1- 國崎 祐哉 髓外造血を支持する傍血管性ニッチ 血液内科 73 382-387(2016)
- 2- 國崎 祐哉 造血幹細胞ニッチと造血異常 実験医学 37 140-144(2016)
- 3- Kunisaki Y. Cancer stem cells and the niches Nihon Rinsho 73 1315-1320(2015)
- 4- Kunisaki Y. Distinct vascular niches determine hematopoietic stem cell fate Rinsho Ketsueki 56 606-613(2015)
- 5- Kunisaki Y. Cancer stem cells and the niches Nihon Rinsho 73 1315-1320(2015)

[その他]

ホームページ等

<https://scr.wp.med.kyushu-u.ac.jp>

<http://www.inai.med.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國崎 祐哉 (KUNISAKI, Yuya)

九州大学大学院医学研究院・応用幹細胞医科学部門 がん幹細胞医学分野・助教

研究者番号 : 80737099