

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19136

研究課題名(和文)脾臓微小環境における Tlx1 発現間葉系細胞の役割

研究課題名(英文)The role of the mesenchymal cells expressing Tlx1 in the adult spleen

研究代表者

小田 朗永(Akihisa, Oda)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・助教

研究者番号：80547703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脾臓微小環境は、濾胞樹状細胞(FDC)、辺縁細網細胞(MRC)、線維性細網細胞(FRC)から構成される。しかし脾臓間葉系ストローマ細胞の起源や、維持機構については明らかとなっていない。申請者らは脾臓形成マスター制御因子であるTlx1発現細胞及びその子孫細胞を追跡可能な新規レポーターマウス、Tlx1-CreERT2-IRES2-Venusマウスを作製し、脾臓Tlx1発現細胞の細胞系譜解析を行った。その結果、濾胞樹状細胞、線維性細網細胞、辺縁帯細網細胞および赤脾髄線維芽細胞などの成熟間葉系細胞は、Tlx1発現細胞を起源とすることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Spleen microenvironment is composed of various stromal components, such as follicular dendritic cells (FDCs), fibroblastic reticular cells (FRCs), and marginal reticular cells (MRCs). These stromal cells serve as an essential niche for various functions of the spleen. However, it remains obscure how the stromal microenvironment is maintained throughout life. We generated a reporter mouse in which the CreERT2-Ires2-Venus cassette was knocked into the Tlx1 gene locus, with the Rosa26-tdTomato allele. A majority of Tlx1+ cells was localized in the red pulp, and these cells did not express the splenic mature stromal cell markers. To explore the relation of Tlx1+ cells to mature stromal cells, we treated the mice with tamoxifen at the various stages and then examined their fate. The tdTomato+ cells were observed inside the white pulp, which include FDCs, FRCs and MRCs in the every stages of the spleen. Thus, we showed that Tlx1+ cells serve as a source of mature stromal cells.

研究分野：免疫学

キーワード：Tlx1 間葉系幹細胞 FDC FRC MRC 脾臓

1. 研究開始当初の背景

脾臓は、赤脾髄、白脾髄、辺縁帯から構成される。これら脾臓の構造と機能を支持しているのが間葉系ストローマ細胞であり、濾胞樹状細胞 (Follicular Dendritic Cells; FDC)、辺縁細網細胞 (Marginal Reticular Cells; MRC)、線維性細網細胞 (Fibroblastic Reticular Cells; FRC)、さらに赤脾髄繊維芽細胞に分類される。これら脾臓の構造と機能を支持している間葉系ストローマ細胞の重要性が近年次々と明らかとなり注目を集めている。しかしながら、脾臓に存在する間葉系ストローマ細胞が生涯に渡り生体でどの様に分化し、維持されているのかについては明らかとなっていない。

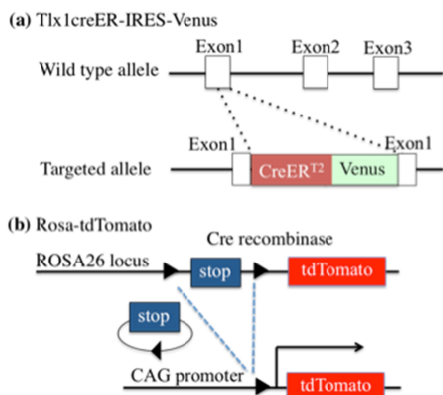
2. 研究の目的

申請者らは、脾臓形成マスター制御因子であり、脾臓間葉系幹細胞マーカーである Tlx1 発現細胞を追跡可能な新規レポーターマウス; Tlx1-CreER^{T2}-IRES2-Venus マウスを作製し (図 1-a)、脾臓 Tlx1 発現細胞の生体レベルでの局在、性状及び分化能の解明、胎児期及び成体脾臓における Tlx1 発現細胞の役割の解明、成体脾臓における間葉系幹細胞の同定、それらの生理学的特性や分化能を明らかにする事によって、脾臓器官形成及びその維持に関わる脾臓微小環境を細胞レベルで明らかにする事を目的としている。

3. 研究の方法

Tlx1-CreER^{T2}-IRES2-Venus マウスは、Tlx1 発現細胞を Venus の蛍光によって追跡でき、同時にタモキシフェンによる Cre 組換え酵素の活性化を誘導できる事を特徴としている。Venus 陽性細胞は、解析時点での Tlx1 の発現をマークしているのみであり、かつて Tlx1 を発現していた細胞 (Tlx1 発現細胞由来の子孫細胞など) を追跡する事はできない。そこで、本マウスを Cre 組換え酵素の発現により蛍光蛋白 tdTomato を発現する Rosa26-tdTomato マウス (図 1-b) と交配し、Tlx1-CreER^{T2}-IRES2-Venus; Rosa26-stop-tdTomato マウスを作製する。

図1. Tlx1creER-IRES-Venus; Rosa26-tdTomatoマウスの作製



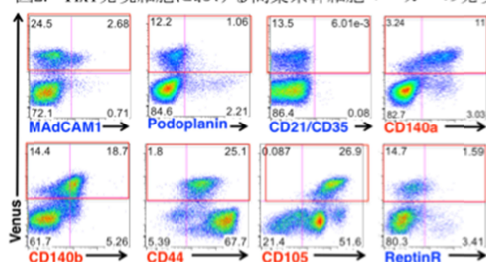
本マウスへ時期特異的にタモキシフェンを投与する事で、投与時に Tlx1 を発現していた細胞 (Venus 陰性 tdTomato 陽性) と現 Tlx1 発現細胞 (Venus 陽性 tdTomato 陽性) を明確に区別する事ができる。これらの細胞が、脾臓微小環境を構成する FRC (GP38⁺)、FDC (CD35⁺)、MRC (MAdCAM1⁺)、Red pulp fibroblast (ERTR7⁺)細胞への分化を、免疫組織化学染色やフローサイトメトリーを用いて解析を行う。

4. 研究成果

(1)脾臓 Tlx1 発現細胞の間葉系幹・前駆細胞としての性状と機能

Tlx1 発現細胞の性状を 1 週齢 Tlx1CreER-Venus マウスを用いて Venus 蛍光を指標とし細胞表面抗原の発現パターンについて検討を行った。1 週齢の脾臓において、Venus 陽性細胞は、CD45.2, Ter119 (造血細胞系列マーカー) が陰性であり、CD31 (血管・リンパ管内皮細胞マーカー) 陰性の細胞分画に検出された。従って非血液系・非内皮系細胞の細胞群であることが示された。さらに、Tlx1 発現細胞は CD16/CD32, CD21/35 陰性、podoplanin 陰性であり、一部が MAdCAM-1 陽性であるものの、その殆どが陰性であることから、これまでに同定されている成熟間葉系細胞、即ち FDC, FRC, または MRC とは異なる細胞集団であることが判明した。さらに、骨髄間葉系前駆細胞マーカーの発現について解析した結果、CD105 陽性、PDGFR α / β (CD140a/b) 陽性、CD44 陽性、Leptin 受容体陰性であった。Leptin 受容体の発現以外は、骨髄の間葉系幹・前駆細胞と類似した表現型を示すことが明らかになった (図 2)。

図2. Tlx1 発現細胞における間葉系幹細胞マーカーの発現



さらに PDGFR α ⁺ Sca-1^{dull} 細胞分画に濃縮される Venus 陽性細胞は *in vitro* で脂肪細胞、骨芽細胞ならびに軟骨芽細胞分化用の培地を用いて 2 週間培養した結果、骨髄 P α S 細胞と同様、oil red O 陽性の脂肪細胞、alkaline phosphatase 陽性の骨芽細胞、toluidine blue 陽性の軟骨芽細胞への分化能を有することが明らかになった。以上の結果を総合すると、脾臓 Tlx1 発現細胞は間葉系幹細胞マーカーを細胞表面に発現し、さらに間葉系幹細胞の能力を持つ細胞集団である事が明らかとなった (図 3)。

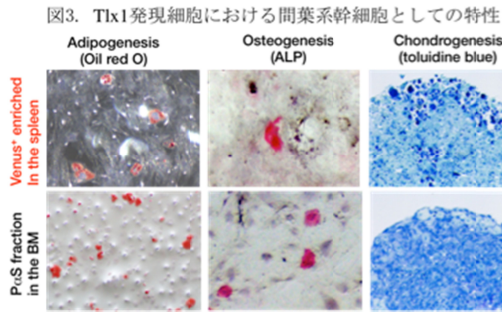
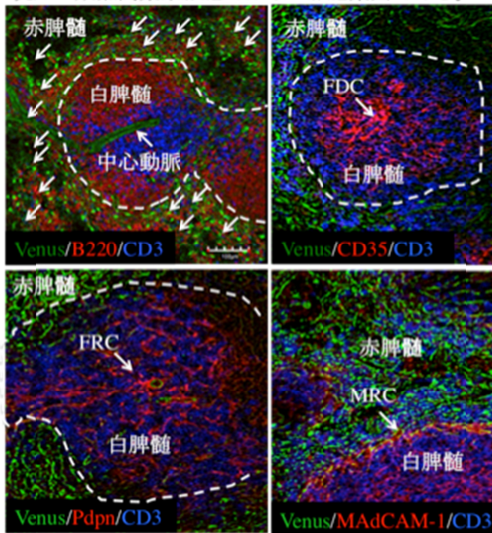


図3. Tlx1発現細胞における間葉系幹細胞としての特性

(2)脾臓における Tlx1 発現細胞の局在
4 週齢の Tlx1-CreER^{T2}-IRES2-Venus マウス脾臓における Tlx1 発現細胞の局在について免疫組織学的染色法にて解析を行った。Venus 陽性細胞は赤脾髄領域や濾胞周囲、中心動脈周囲に散在して局在していた (図 4)。フローサイトメトリー解析の結果と同様に、Venus 陽性細胞は FRC マーカーである Podoplanin 陰性であり、FDC マーカーである CD35 陰性の細胞集団であった。さらに、Venus 陽性細胞は一部 MAdCAM-1 陽性細胞と共局在していた。これらの結果は、MRC は Venus⁺Madcam1⁺MRC と Venus⁻Madcam⁺MRC 細胞の 2 つのサブセットに分類可能である事を意味する。そして図 2 の結果と一致して、既知の成熟間葉系細胞ではなく、間葉系前駆細胞として赤脾髄と中心動脈で維持されている細胞集団であった (図 4)。さらに、中心動脈周囲に局在する Venus 陽性細胞は、血管周皮細胞のマーカーである NG2 ならびに血管平滑筋細胞のマーカーである α -SMA 陽性であり、血管内皮細胞のマーカーである CD31 は陰性であることから、血管内皮細胞を取り囲むペリサイトと総称される血管周皮・平滑筋細胞であることが明らかになった。

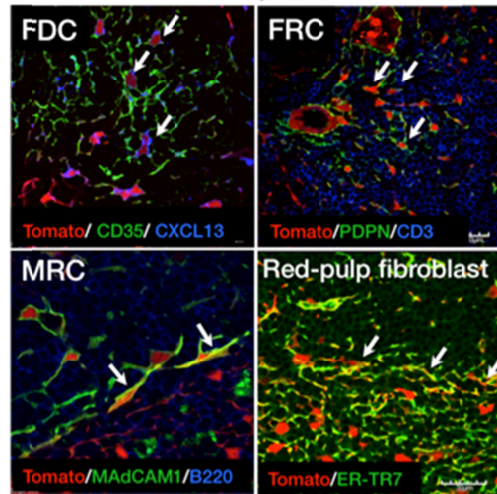
図4. Tlx1発現細胞は中心動脈、赤脾髄に散在し、既知の成熟間葉系細胞ではない細胞集団である。



(3) 成体脾臓微小環境形成における Tlx1 発現細胞の寄与
胎仔期、新生仔期、そして成体期の Tlx1 発現

細胞の脾臓微小環境形成への寄与について、胎齢 12.5 日、生後 1 週齢、及び 4 週齢の Tlx1CreERT2-Venus/+; Rosa26-tdTomato マウスにタモキシフェン投与し、Tlx1 発現細胞をマークした。その 2 ヶ月後、それぞれの脾臓における分化について免疫組織学的に解析した。様々な間葉系細胞マーカーと共染色したところ、中心動脈周囲の T 細胞領域に局在する Podoplanin 陽性の線維性細網細胞の一部が tdTomato 陽性であり、B 細胞領域に局在する CD35 陽性の濾胞樹状細胞も、その一部は tdTomato を発現していた。そして ER-TR7 を発現する赤脾髄線維芽細胞の一部においても Tlx1 発現細胞の子孫細胞である Venus 陰性 tdTomato 陽性の細胞が認められた。さらに MAdCAM-1 を発現する辺縁帯細網細胞の一部は成体でも Venus 陽性であるが、Venus 陰性 tdTomato 陽性の細胞が多く検出された。

図5. Tlx1発現細胞は成熟間葉系細胞の前駆細胞である。(Tx@1wk→8wks)

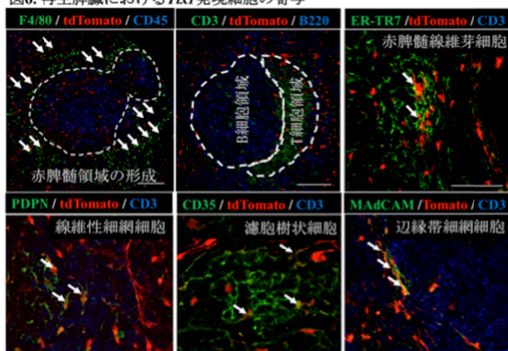


成体期の全てのステージで、Tlx1 を発現した細胞は、脾臓微小環境を構成する赤脾髄線維芽細胞、線維性細網細胞、濾胞樹状細胞、辺縁帯細網細胞などの全ての成熟間葉系細胞へ分化することが明らかとなった。

(4)脾臓再生における Tlx1 発現細胞の寄与
脾臓再生時における Tlx1 発現細胞の寄与について、胎齢 12.5 日の Tlx1CreERT2-Venus/+ ; Rosa26-tdTomato マウスをタモキシフェン処理し、胎齢 19.5 日に脾臓を摘出し、脾臓被膜のみを野生型 C57BL/6 ホストマウスの腎被膜下へ移植した。移植 5 週後に腎臓被膜下に再生した再生脾臓について免疫組織学的に解析した。成体脾臓の構造と同様に、F4/80 陽性のマクロファージが局在する赤脾髄領域と T/B 細胞から成る白脾髄領域の形成が観察された。この再構築された移植片における Tlx1 発現細胞の寄与について解析した結果、線維性細網細胞、濾胞樹状細胞、辺縁帯細網細胞などのいずれの脾臓成熟間葉系細胞においても tdTomato の発現が観察され (図 6)、一部の血管内皮細胞にお

いても検出された。したがって、被膜からの脾臓微小環境の再生においても胎仔期 *Tlx1* 発現細胞は様々な間葉系細胞に分化することによって、その形成に関与することが明らかになった。

図6. 再生脾臓における *Tlx1* 発現細胞の寄与



従って、*Tlx1* 発現細胞は脾臓微小環境を形成する全ての成熟間葉系細胞へ分化する能力を有していることが明らかになった。さらに、*Tlx1* 発現細胞は胎仔期、新生仔期、成体で維持されている細胞であり、成熟間葉系細胞への分化能はいずれの時期でも検出された。また、脾臓微小環境の再生においても *Tlx1* 発現細胞から成熟間葉系細胞へ分化することが明らかになった。

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 1件)

1. Kentaro Yoshioka, Akihisa Oda, Chihiro Notsu, Takafumi Ohtsuka, Yasuhiro Kawai, Sadafumi Suzuki, Takuro Nakamura, Yo Mabuchi, Yumi Matsuzaki, Ryo Goitsuka: Loss of Homeodomain Transcription Factor *Prep1* Perturbs Adult Hematopoiesis in The Bone Marrow. *Plos One*, (査読あり) 2015, 10 (8), e0136107, DOI: 10.1371/journal.pone.0136107

[学会発表](計 13件)

1. Akihisa Oda, and Ryo Goitsuka: The cell components of perifollicular hematopoietic nich in the spleen. 7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference, 2017年3月13-17日、京都大学芝蘭会館(京都)・京都市

2. Akihisa Oda, Toshiki Tezuka, Toru Kasahara, Yuta Ueno, Chiharu Nishiyama, and Ryo Goitsuka: Interdependent roles of *Tlx1*-expressing mesenchymals cells and macrophages in extramedullary hematopoiesis in the spleen. 第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月5-7日 沖縄コンベンションセンター(沖縄)・那覇市

3. Akihisa Oda, Toru Kasahara, and Ryo Goitsuka: Mesenchymal cells expressing

Tlx1 serve as an extramedullary niche in the spleen. International Congress of Immunology 2016, 2016年8月21-26日、Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia

4. Akihisa Oda, Chihiro Notsu, and Ryo Goitsuka: Overexpression of *Tlx1 in situ* causes extramedullary hematopoiesis in the adult spleen. 第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月18-20日、札幌コンベンションセンター(北海道)・札幌

5. Akihisa Oda, Ryo Nakahara, Chihiro Notsu, Toru Kasahara, and Ryo Goitsuka: Contribution of *Tlx1*-expressing mesenchymal cells to splenic microenvironment formation during organogenesis and regeneration. Venice Thymus Meeting 2015, 2015年4月9-13日、Venice International University, Italy

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：
[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

- (1)研究代表者
小田朗永(Akihisa Oda)
東京理科大学・生命医科学研究所・助教
研究者番号：80547703
- (2)研究分担者
()
研究者番号：
- (3)連携研究者
()
研究者番号：
- (4)研究協力者
()