

令和元年6月7日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06232

研究課題名(和文) 骨髄造血の恒常性維持を担うニッチの動態と機能の解析

研究課題名(英文) Dynamism and functions of niches for hematopoietic stem/progenitor cells in bone marrow

研究代表者

尾松 芳樹 (OMATSU, Yoshiki)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80437277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,800,000円

研究成果の概要(和文)：全身を循環する血液細胞・免疫担当細胞のほとんど全ては骨にとり囲まれた造血組織である骨髄で産生されるが、そのもとになる造血幹細胞はごくわずかしがなく、骨髄に存在する特殊な微小環境(ニッチ)によって維持されている。本研究では、造血幹細胞ニッチを構成する主要な細胞であるCXCL12高産生細胞(CAR細胞)の機能発現と維持に必須の分子基盤として転写因子Foxc1に加えて新たにEbf3を同定した。Ebf3はCAR細胞のサイトカイン産生を増強し、また骨芽細胞への分化を抑制することによりCAR細胞のニッチ機能の獲得と維持を行い、骨髄環境の恒常性を維持していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄に存在するCXCL12高発現細胞(CAR細胞)は造血幹細胞および前駆細胞の維持に必須の微小環境(ニッチ)を構成する細胞であるが、本研究によりCAR細胞に転写因子Ebf3が特異的に高発現すること、Ebf3および近縁な遺伝子であるEbf1をCAR細胞で欠損させたマウスではCAR細胞が骨芽細胞へと分化し骨髄腔が骨で埋まってしまうことが明らかになった。

脊椎動物の造血組織はなぜ硬い骨に保護された空間(骨髄腔)に存在しているのか、またこの骨髄腔がどのようにして維持されているかという問題に対し、造血幹細胞ニッチに必須の分子機構が深く関与することが明らかとなったことは本研究成果の大きな意義である。

研究成果の概要(英文)：The special microenvironments, termed niches, with which hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) are in contact, have been thought to be required for the maintenance of HSPCs and the generation of blood cells in bone marrow. Recent findings demonstrate that CXCL12-abundant reticular (CAR) cells are the major cellular components of niches for HSPCs, which express specific transcription factor Foxc1 and cytokines, including CXCL12 and stem cell factor, essential for their niche functions.

In this study, we found that the transcription factor Ebf3 is also preferentially expressed in CAR cells and that Ebf3-expressing cells are self-renewing mesenchymal stem cells in adult marrow. When Ebf3 is deleted in CAR cells, HSC niche function is severely impaired, and bone marrow is osteosclerotic with increased bone in aged mice. Thus, HSPC cellular niches express Ebf3 that is required to create HSC niches, to inhibit their osteoblast differentiation, and to maintain spaces for HSPCs.

研究分野：免疫学・血液学・幹細胞生物学・発生学

キーワード：造血幹細胞 ニッチ 間葉系幹細胞 骨髄

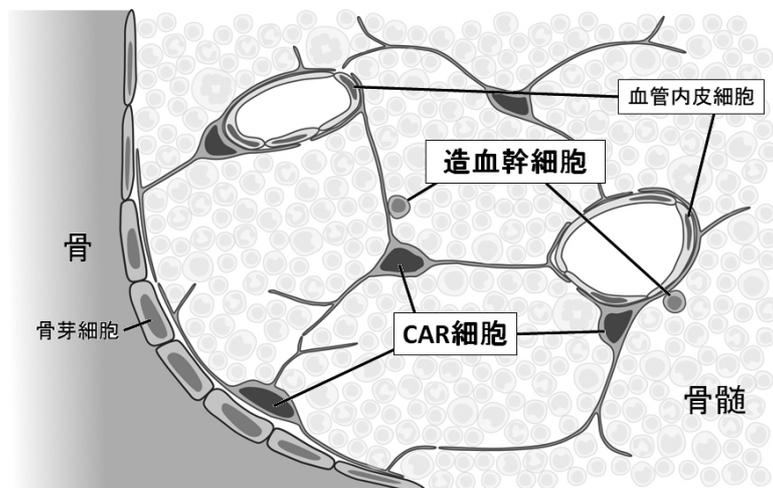
1. 研究開始当初の背景

成体の骨髄において、造血幹細胞は自己複製しながら前駆細胞を産生し、その前駆細胞は様々な血液細胞・免疫担当細胞を過不足なく供給し続ける。このような造血の恒常性は、ニッチ (niche) と呼ばれる特殊な微小環境によって維持されていると考えられている。

これまで造血幹細胞・前駆細胞ニッチを構成する細胞の候補として、骨芽細胞や血管内皮細胞など様々な細胞が報告されていたが、研究代表者らの研究グループでは CXCL12 高発現細胞網 (CAR 細胞) に着目して研究を行い、CAR 細胞をニッチの候補細胞として報告してきた。そこで研究代表者は、CAR 細胞のニッチとしての機能を直接証明するため、CAR 細胞を成体において選択的に欠損誘導できる遺伝子改変マウスを作製し解析を行った。その結果、CAR 細胞欠損誘導によって、骨髄内のサイトカイン (SCF・CXCL12) の量が著減するとともに B リンパ球・赤血球の前駆細胞数が著減し、造血幹細胞数も約半分にまで減少すること、さらに骨髄細胞の骨芽細胞や脂肪細胞への分化能が著減することが示された。以上より、CAR 細胞は造血幹細胞・前駆細胞の維持に必須のニッチの構成細胞であることが証明され、脂肪細胞および骨芽細胞への分化能を持つ間葉系前駆細胞であることが明らかとなった (Omatsu, *Immunity*, 2010)。

次に研究代表者は造血幹細胞・前駆細胞ニッチの形成の分子基盤の解明に取り組み、転写因子 Foxc1 が骨芽細胞など他の非血球分画の細胞と比較して CAR 細胞で特異的に高発現することを見出した。そこで Foxc1 の機能を解析するため Foxc1-flox マウスを入手し、Prx1-Cre マウスあるいは Lepr-Cre マウスと掛け合わせることで骨髄の全ての間葉系細胞あるいは CAR 細胞特異的に Foxc1 を欠損させたマウスを作製し解析を行った。その結果、造血幹細胞および B 細胞と赤血球の前駆細胞が著減すること、骨髄腔が正常な CAR 細胞に代わって脂肪細胞で満たされることが明らかになった。一方、少ないながら残存していた CAR 細胞では CXCL12 と SCF の発現が低下しており、脂肪細胞特異的遺伝子の発現が著増していた。以上より、Foxc1 は CXCL12 と SCF の発現量を増加させ CAR 細胞を成熟させるほか、CAR 細胞前駆細胞の脂肪細胞への分化を抑制することが示された。一方、タモキシフェン投与で Cre が作用する Ubc-CreERT2 マウスを用いて成体で Foxc1 を欠損させても、骨髄中の造血幹細胞および前駆細胞の著減が認められた。このことから Foxc1 は CAR 細胞のニッチ機能の維持にも必須であることが示された (Omatsu, *Nature*, 2014)。この研究によりニッチの形成と維持に必須の分子基盤が明らかになっただけでなく、ニッチに特化した細胞系列が存在することが分子レベルで示され、また脊椎動物ではじめて幹細胞ニッチの形成と維持の分子機構が明らかになった。

また近年、ニッチ系列の細胞に遺伝子欠損を引き起こすことで骨髄異形性を誘導できるとする報告や、ある種の白血病細胞はニッチに働きかけることでその性質を変化させ、正常な造血を妨げるとともに白血病幹細胞の生着を亢進させる可能性を示唆する報告などもなされていた。以上により、CAR 細胞の機能と動態の解明は造血の恒常性維持機構を理解する上で重要かつ不可欠な問題となっていた。



2. 研究の目的

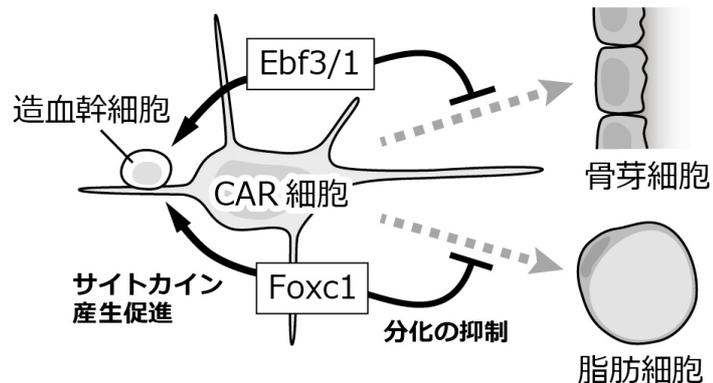
これまでの研究により CAR 細胞の形成と維持に必須の転写因子 Foxc1 が同定されたことから、その発現制御機構と下流の分子機構の詳細の解明を試みる。また CAR 細胞に特異的に高発現する Foxc1 以外の転写因子の探索を行い、その機能解析を行う。以上より CAR 細胞がどのようにして骨髄造血を担っているのか、また骨に囲まれた空間（骨髄腔）をどのようにして維持しているのかといった謎を分子レベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

マイクロアレイや次世代シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析により、CAR 細胞に特異的に高発現する転写因子を探索する。CAR 細胞と比較する対象としては骨芽細胞・血管内皮細胞・筋肉の間葉系細胞・血液細胞等を用いるだけでなく、CAR 細胞の前駆細胞と考えられる胎児期の未分化な四肢の軟骨膜周囲細胞もセルソーターによりソートし用いる。候補遺伝子は *in vitro* で培養細胞株や初代培養 CAR 細胞に強制発現させ、サイトカイン遺伝子の発現誘導活性等を解析しスクリーニングを行う。有望な候補遺伝子については flox マウスを作製あるいは入手し、CAR 細胞特異的遺伝子欠損マウスを解析することで *in vivo* におけるその遺伝子の機能解析を詳細に行う。

4. 研究成果

造血幹細胞・前駆細胞の主たるニッチ細胞である CAR 細胞に特異的に発現する Foxc1 以外の転写因子として新たに Ebf3 を同定した。そこでまずは Ebf3 発現細胞に薬剤で Cre リコンビナーゼを作用できる Ebf3-CreERT2 マウスの作製を行い、レポータマウスと交配することで CAR 細胞の細胞系譜解析を行った。解析の結果、ほとんど全ての CAR 細胞は長期（13 ヶ月）にわたってレポータ陽性であること、また骨芽細胞や骨髄内脂肪細胞もレポータ陽性になることが明らかになった。以上より CAR 細胞は長期に渡って自己複製し、分化細胞（骨芽細胞・脂肪細胞）を生み出す間葉系幹細胞であることが明らかになった。



次に CAR 細胞における Ebf3 の機能を解析するために、Ebf3 および近縁な遺伝子である Ebf1 について、コンディショナルノックアウトマウスを作製し解析を行った。その結果、CAR 細胞で Ebf1/3 を欠損させると骨髄が骨で埋め尽くされ、造血が著しく障害されることが明らかになった。以上より、Ebf3/1 は CAR 細胞の骨芽細胞への分化を抑制し、骨髄腔の維持と造血幹細胞ニッチの形成・維持に必須の転写因子であることが明らかになった (Seike, *Gene. Dev.*, 2018)。

本研究により、CAR 細胞の形成に必須の分子基盤がより詳細に明らかになった。この知見を発展・応用させることで、これまで不可能であった生体外での人工造血ニッチの構築が可能となったり、これを用いてより少数の造血幹細胞から効率良く骨髄移植を行う方法が樹立されることが期待される。また造血ニッチの障害は貧血や免疫不全などの疾患を引き起こす可能性があるため、難治性疾患の病因解明に繋がる可能性があり、大きな臨床的意義を持つ。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計4件）

- (1) Niches for hematopoietic stem cells and immune cell progenitors. Sugiyama T., Omatsu Y., Nagasawa T. *International Immunology*, 31(1):5-11, 2019, doi: 10.1093/intimm/dxy058, 査読有

- (2) Stem cell niche-specific Ebf3 maintains the bone marrow cavity. Seike M.^{*}, Omatsu Y.^{*}, Watanabe H., Kondoh G., Nagasawa T. *Genes & development*, 32(5-6):359-372, 2018, (^{*}; equally contributed) doi: 10.1101/gad.311068.117, 査読有

- (3) CAR細胞による造血幹細胞・前駆細胞の制御 尾松芳樹 *実験医学 増刊*, 34(17):34-39, 2016, 査読無

- (4) 造血幹細胞を維持する骨髄微小環境 尾松芳樹 *Clinical Calcium*, 26(5):19-24, 2016, 査読無

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。