

令和元年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09866

研究課題名(和文) 血球産生型血管内皮による造血促進作用の解明

研究課題名(英文) Roles of bone marrow specific endothelial cells in the process of engraftment after hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

高橋 聡 (Takahashi, Satoshi)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：60226834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、研究代表者らは、造血微小環境の構成因子である血管内皮系細胞が、骨髄造血において果たす具体的な役割とその動態、そして他系統細胞との相互作用、またこれらを通じた血管内皮細胞を端緒とした造血系細胞産生の促進機構の一端を明らかにした。さらに、血管内皮細胞から分泌供給される複数の生理活性物質、アンジオクリン分子群に造血促進作用が存在することを明らかにした。代表者らは、研究成果を通じて、将来的に、臍帯血移植の重要な副作用である生着不全の病態について、血管内皮系細胞の関与を精査することの意義に加え、臍帯血移植の補助療法として、血管内皮系細胞との共移植の可能性についても、ある程度示唆したと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果を通じて、現行の臍帯血移植の最大の問題点である生着不全の病態での血管内皮系細胞の関与を明確化することによって、臍帯血移植において血管内皮系細胞との共移植の可能性について検討するための基盤的な情報を得ることができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：We could show that endothelial lineage cells which are one of the hematopoietic niche components play a key role in hematopoiesis in the bone marrow through the interaction with other lineage cells like mesenchymal stromal cell, mesenchymal stem cell and hematopoietic stem cell. A new concept in the hematology field is that of angiocrine factors that under pathophysiological conditions are released from endothelial cells so-called bone marrow specific endothelial cells and can promote hematopoiesis in bone marrow through a directly or indirectly mechanism. Therefore, we suggest that an abnormal function of endothelial lineage cells induces or exacerbates graft failure after hematopoietic stem cell transplantation represented by cord blood transplantation. Based on our study, we could present important data for the discussion about the clinical utility of cotransplantation with hematopoietic stem cells and endothelial lineage cells as a treatment of graft failure in the near future.

研究分野：血液腫瘍内科

キーワード：血液免疫学 血管内皮造血転換 造血幹細胞 増血促進 細胞・組織 シグナル伝達 生体分子 アンジオクリン因子

## 1. 研究開始当初の背景

以前より、脊椎動物-マウスの胎生10.5日目頃から、背側大動脈腹側に位置する血管内皮細胞から造血幹細胞が発生する現象が知られている。造血細胞に分化可能な血管内皮細胞、つまり血球産生型血管内皮の存在については、造血発生分野では、広く認知されており、近年のライプマイニングの技術により、胚体内の血球産生型血管内皮細胞が、背側大動脈腹側、及び頭部に存在することが明らかとなっている。こうした現象は、Endothelial hematopoietic transition(血管内皮造血転換)と呼ばれており、最近になってVEカドヘリンとCD41aという2種類のマーカー遺伝子を導入したヒトES細胞について、血管内皮細胞、造血細胞のfate-mappingをライブ観察により行った検討では、early stageにおける血球産生型血管内皮は赤血球系・巨核球系前駆細胞へ、一方late stageにおける血球産生型血管内皮は骨髄球系前駆細胞へ分化するとの報告があった。また一方で、現在、血管内皮細胞の最も有力なマーカーであるVEカドヘリン陽性の血管内皮から造血幹細胞が産生される過程に、転写因子Runx1が必要であることが示された。この他、発生過程における血管内皮からの造血幹細胞産生を支持する転写因子として、HoxA3は、Runx1発現の抑制を通じた血管内皮細胞形質の維持(Iacovino M. et al. Nat Cell Biol. 13:72-78. 2011)、Runx1の共役因子CBF $\beta$ も、造血幹細胞の発生、その後の造血細胞の分化にも必須の因子であることが報告された。

研究代表者らは、造血幹細胞移植の黎明期から移植医療に従事しており、所属施設は、1998年にわが国で初めて成人患者に対する臍帯血グラフトを用いた同種移植を成功させて以来、10年間の累積で約200例の臍帯血移植を行ってきた。近年、臍帯血移植の移植成績は、着実な向上を遂げており、有効性、安全性の面でも、造血幹細胞移植の選択肢として確立しているが、その副作用の中で、移植細胞数の不足に基づくともされている生着不全の占める割合が多く、今後の臨床普及の推進上、克服すべき重要課題と考えられている。代表者らは、2005年から2006年にかけての基盤研究C「臍帯血移植後の免疫動態に基づいたウイルス特異的細胞性免疫療法の開発」、2007年から2009年までの「移植後T細胞の白血病特異的免疫反応の増強による新しい臍帯血移植法の開発」及び2009年からの「白血病増殖及び臍帯血移植生着過程における造血ニッチ構成細胞の機能解析」等の遂行過程において、造血幹細胞移植によって移植された幹細胞を含む造血系細胞とニッチとの相互作用の面から、この問題に取り組んできた。近年、ニッチ構成分子としても注目されている間葉系幹細胞については、移植片対宿主病に対する細胞療法での有用性が確立されつつあり、造血幹細胞との共移植の治験が、世界的に進められている状況にあり、代表者らも国内のプロトコル策定に時間を割いている。

分担者らは、これまでの研究で、骨髄中の血管周囲に、造血幹細胞の至適微小環境(ニッチ)、いわゆる「Vascular niche-血管ニッチ」が存在し、骨芽細胞周囲に存在する「骨内膜ニッチ」と共に、造血幹細胞の性状変化に応じた局在の可能性、さらに血管内皮細胞の造血幹細胞のニッチ構成分子としての重要性、造血制御機構への関与を報告した。その後の研究で、協力者でもある米国コーネル大学のRafiiらは、血管内皮細胞が、AktとMAPキナーゼとの活性化バランスによるアンジオクライン因子の発現調節により、造血幹細胞動態を制御していること、さらに血管内皮細胞が、臍帯血由来の造血幹細胞や造血前駆細胞のニッチ細胞として機能していること等を報告した。さらに、最近、ヒト由来の臍帯血静脈由来の血管内皮細胞にRunx1やFosb等の転写因子を遺伝子導入することにより、細胞リプログラミングを誘導し、造血系細胞を産生させることにも成功している。これらの事実は、造血幹細胞の生体内動態が、血管内皮細胞との相互作用によって制御されていることを示唆している。

## 2. 研究の目的

臍帯血移植をはじめとする造血幹細胞移植における生着不全の発症については、同種移植の代表的な副作用である移植片対宿主病(GVHD)と比較しても、有効な予防策、治療法の確立は遅れており、予防策としては、とにかく一定値以上の移植細胞数を確保すること、そして発症後の対策としては、再移植以外に無いとされている。こうした現状は、移植細胞の生着機構の詳細について未だ不明な点が多いこと、そして複数臍帯血移植の普及既存の概念から少し離れた新しい病態へのアプローチの必要性を示唆している。代表者らは、これまでの研究を通じた、造血幹細胞動態におけるニッチの重要性の追認から、ニッチ構成分子である血管内皮細胞に、その発生段階から、造血幹細胞産生能が潜在していることに注目した。本研究では、造血幹細胞移植モデルや、共同研究グループで開発されたウイルスベクターを使用した血管内皮細胞長期培養技術等を駆使し、造血微小環境の構成因子である血管内皮系細胞が、骨髄造血において果たす具体的な役割とその動態、そして他系統細胞との相互作用、またこれらを通じた血管内皮細胞を端緒とした造血系細胞産生の促進、また成体内の血管内皮造血転換を確認することを主たる目的とする。そして、生着不全病態に対する新しいアプローチとして、血管内皮造血転換の誘導、ないしは造血幹細胞と血管内皮細胞との共移植療法の可能性、及びこれらの有用性を生体内外の基礎実験から明らかにすること、また結果として生着不全病態の一端を解明することまでを目的の範疇とする。

### 3. 研究の方法

平成 28 年度から平成 29 年度にかけては、造血における血管内皮系細胞、また造血幹細胞移植における血管内皮細胞の機能解明を進めるため、血管内皮特異的に発現するアンジオクリン因子に注目し、これらの遺伝子欠損マウスその他、分子生物学的方法による遺伝子発現調節、さらには green fluorescent protein(GFP)遺伝子改変マウスの骨髓細胞を用いた造血幹細胞移植モデルを使用し、血管内皮系、造血系あるいは間葉系細胞表面マーカー陽性の細胞群を共移植する群を設け、造血幹細胞移植生着における有意性、また移植細胞の生着促進に対する有効性を確認する実験を進める。この系においては、生着の有無にかかわらず各種パラメーターを解析すると共に、血液線維素溶解系(線溶系)因子や、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)等の各種蛋白分解酵素群、接着分子、血管内皮特異抗原、血球系マーカーの発現等について免疫学的特殊染色を施行し、各種臓器組織中の血管新生、血管内皮細胞と血管周囲—血管ニッチ細胞の性状、骨髓内外の各種 MMP あるいは線溶系因子活性等について精査することにより、マウス生体内外の造血幹細胞移植における血管内皮細胞の機能解明を進める。また、平成 29 年度までにヒト臍帯由来血管内皮細胞及びマウス血管内皮細胞株、あるいは GFP マウス骨髓細胞中の血管内皮系細胞表面マーカー陽性の細胞群、さらにはこれらの細胞への E4ORF1 遺伝子導入群を用いた生体外実験系を確立し、これらを利用し、各種ウィルスベクターを使用したアンジオクリン因子、サイトカイン、ケモカインをはじめとする生体因子の強制発現系、ないしは様々なストレス条件下での血管内皮細胞、そして造血系細胞、造血・血管ニッチ細胞の動態、そして内皮造血転換の誘導とその確認を試みる。さらには、造血幹細胞移植モデルを使用し、マウス生体内における内皮造血転換の誘導とその確認を進めていくこととする。また平成 29 年度から平成 30 年度にかけて、これまでの研究成果を中心に、学会発表や総説の発表を通じた、情報発信を積極的に行っていくことを計画している。

### 4. 研究成果

本研究は、造血微小環境の構成因子である血管内皮系細胞が、骨髓造血において果たす具体的な役割とその動態、他系統細胞との相互作用等を解明することを主な目的とし、最終的に血球産生型血管内皮の性状解析までをその目的の範疇としている。今年度までの研究で、研究代表者らは、組織型プラスミノゲンアクチベータ(tPA)等の血液線維素溶解系因子や、膜型マトリックスメタロプロテアーゼを含むプロテアーゼ、またepidermal growth factor like-domain 7(Egfl7)等の血管新生因子、成長因子によって構成される血管内皮細胞由来のアンジオクリン因子群と、造血幹細胞、炎症性細胞を含む造血系細胞、間葉系細胞から分泌・産生される各種サイトカイン、増殖因子との相補的な発現、産生調節を通じて、血管内皮系細胞と造血幹細胞、そして間葉系幹細胞との間で密接な相互作用を有し、血管内皮細胞を中心とした造血制御機構の存在を示唆した。また今年度の研究で、代表者らは、胸腺中の血管内皮から分泌される Egfl7 が、造血系細胞の増殖シグナルである Flt3/Flt3 ligand の活性化を通じ、T 細胞の成熟・分化、増殖を制御し、免疫系細胞の動態に直接的に関与していることを明らかにした。加えて代表者らは、疾患動物モデルの解析を通じて、tPA とその受容体の一つである low density lipoprotein related protein-1(LRP1)シグナルによる細胞増殖制御機構について論文報告した。また、骨髓における組織特異的血管内皮細胞の性状解析を進めることにより、造血管を構成する血管内皮における血球産生能について精査中である。

これらの研究と並行し、代表者らは、これまでの研究成果を基礎とした血管内皮系細胞を利用した造血系細胞増幅、造血管再構築促進プログラムの臨床応用の基盤形成に着手している。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20 件)

1. Salama Y, Shiou-Yuh Lin, Dhahri D, Hattori K, and Heissig B. The fibrinolytic factor tPA drives LRP1-mediated melanoma growth and metastasis. *FASEB J*. 33: 3465-3480, (2019)
2. Maeda Y, Ugai T, Kondo E, Ikegame K, Murata M, Uchida N, Miyamoto T, Takahashi S, Ohashi K, Nakamae H, Fukuda T, Onizuka M, Eto T, Ota S, Hirokawa M, Ichinohe T, Atsuta Y, Kanda Y, Kanda J. HLA discrepancy between graft and host rather than that graft and first donor impact the second transplant outcome. *Haematologica*. Dec.6 2018. doi.10.3324/haematol.2018.204438. [Epub ahead of print]
3. Kawamura K, Nakasone H, Kurosawa S, Yoshimura K, Misaki Y, Gomyo A, Hayakawa J, Tamaki M, Akahoshi Y, Kusuda M, Kameda K, Wada H, Ishihara Y, Sato M, Terasako-Saito K, Kikuchi M, Kimura SI, Tanihara A, Kako S, Kanamori H, Mori T, Takahashi S, Taniguchi S, Atsuta Y, Kanda Y. Refractory Graft-Versus-Host Disease-Free, Relapse-Free Survival as an Accurate and Easy-to- Calculate Endpoint to Assess the Long-Term Transplant Success. *Biol Blood Marrow Transplant*. 24(7) 1521-1526, 2018 doi.10.1016/j.bbmt.2018.02.004.
4. Nakasone H, Tabuchi K, Uchida N, Ohno Y, Matsuhashi Y, Takahashi S, Onishi Y, Onizuka M, Kobayashi H, Fukuda T, Ichinohe T, Takanashi M, Kato K, Atsuta Y, Yabe H, Kanda Y.

Which is more important for the selection of cord blood units for haematopoietic cell transplantation: the number of CD34-positive cells or total nucleated cells? *Br J Haematol.* 4, 2018. doi.10.1111/bjh.15418 Epub 2018 May 29. Epub

5. Konuma Takaaki, Kato Seiko, Oiwa-Monna Maki, Tanoue Susumu, Ogawa Miho, Isobe Masamichi, Tojo Arinobu, Takahashi Satoshi Cryopreserved CD34 + Cell Dose, but Not Total Nucleated Cell Dose, Influences Hematopoietic Recovery and Extensive Chronic Graft-versus-Host Disease after Single-Unit Cord Blood Transplantation in Adult Patients *Biol Blood Marrow Transplant* 23 : 1142~1150 2017.10.1016/j.bbmt.2017.03.036
6. Tanoue S, Konuma T, Takahashi S, Watanabe E, Sato N, Watanabe N, Isobe M, Kato S, Ooi J, Tojo A Long-term persistent donor?recipient mixed chimerism without disease recurrence after myeloablative single-unit cord blood transplantation in adult acute myeloid leukemia following myelodysplastic syndrome *Leukemia & Lymphoma* 58: 2973~2975,2017 doi.10.1080/10428194.2017.1318440
7. Tanoue S, Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Isobe M, Tojo A, Takahashi S Severe infusion-related toxicity after a second unrelated cord blood transplantation *Cytotherapy* 19: 1013~1014 ,2017 doi. 10.1016/j.jcyt.2017.05.004
8. Kurosawa S, O, Yamaguchi T, Yanagisawa A, Fukuda T, Kanamori H, Mori T, Takahashi S, Kondo T, Kohno A, Miyamura K, Umemoto Y, Teshima T, Taniguchi S, Yamashita T, Inamoto Y, Kanda Y, Okamoto S, Atsuta Y. Quality of Life after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation According to Affected Organ and Severity of Chronic Graft-versus-Host Disease *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 23: 1749~1758,2017 doi. 10.1016/j.bbmt.2017.06.011
9. Isobe Ma, Konuma T, Abe-Wada Y, Hirata K, Ogami K, Kato S, Oiwa- Monna M, Tanoue S, Nagamura-Inoue T, Takahashi S, Tojo A. Alloimmune hemolysis due to major RhE incompatibility after unrelated cord blood transplantation *Leukemia & Lymphoma* 59: 1000~1003 ,2017 doi. 10.1080/10428194.2017.1352095
10. Salama Y, Hattori K, and Heissig B. The angiogenic factor Eglf1 alters thymogenesis by activating Flt3 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 490: 209-216, (2017)
11. Shimazu H, Munakata S, Tashiro Y, Salama Y, Eiamboonsert S, Ohta Y, Onoda H, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Heissig B and Hattori K. Pharmacological targeting of plasmin prevents lethality and tissue damage in a murine model of macrophage activation syndrome. *Blood.* 130: 59-72, (2017)
12. Eiamboonsert S, Salama Y, Watarai H, Dhahri D, Tsuda Y, Okada Y, Hattori K, and Heissig B. The role of plasmin in the pathogenesis of murine multiple myeloma. *Biochem Biophys Res Commun.* 488: 387-392, (2017)
13. Honjo K, Munakata S, Tashiro Y, Salama Y, Shimazu H, Dhahri D, Eiamboonsert S, Ichimura A, Dan T, Myata T, Takeda K, Sakamoto K, Hattori K and Heissig B. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates macrophage-dependent postoperative adhesion by enhancing EGF-HER1 signaling in mice. *FASEB J.* 31: 2625-2637, (2017)
14. 服部浩一 : 炎症性腸疾患と線溶系、日本血栓止血学会雑誌 Vol .28 No.5 : 618-622, 2017
15. Ishida T, Takahashi S, Lai CY, Nojima M, Yamamoto R, Takeuchi E, Takeuchi Y, Higashihara M, Nakauchi H, Otsu M. ultiple allogeneic progenitors in combination function as a unit to support early transient hematopoiesis in transplantation. *J Exp Med.* Aug.22:213(9) : 1865-80 ,2016. doi: 10.1084/jem.20151493. Epub 2016 Aug 8.
16. Kanda J, Morishima Y, Terakura S, Wake A, Uchida N, Takahashi S, Ono Y, Onishi Y, Kanamori H, Aotsuka N, Ozawa Y, Ogawa H, Sakura T, Ohashi K, Ichinohe T, Kato K, Atsuta Y, Teshima T, Murata M. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia.* Mar 31(3) : 663-668 doi: 10.1038/leu.2016.288.Epub 2016 Oct 17.
17. Dhahri D, Sato-Kusubata K, Ohki-Koizumi M, Nishida C, Tashiro Y, Munakata S, Shimazu H, Salama Y, Eiamboonser S, Nakauchi H, Hattori K and Heissig B. The fibrinolytic pathway expands the murine bone marrow mesenchymal stem/stromal cells through a crosstalk with endothelial cells. *Blood.* 128: 1063-1075, (2016)
18. Heissig B, Eiamboonsert S, Salama Y, Shimazu H, Dhahri D, Munakata S Tashiro Y and Hattori K. Cancer therapy targeting the fibrinolytic system *Advanced Drug Delivery Rev* 99: 172-179, (2016)
19. 服部浩一 : 新着論文 要約と解説 New Arrival & Comments Cox TR, Rumney RM, Schoof EM, et al: The hypoxic cancer secretome induces pre- metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature* 522: 106-110, 2015、Olive-骨代謝病と生活習慣病の連関、メディカルレビュー社、VOL.6-No3 29-32、2016
20. 服部浩一 本庄薫平 : マトリックスメタロプロテイナーゼによるがん転移制御 医学のあゆみ、医歯薬出版、 VOL.257-No12 1223-1228、 2016

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 服部浩一、高橋聡 Heissig Beate. アンジオクラインシステムによる組織修復とリモデリング制御機構. 第 18 回日本再生医療学会総会, 神戸国際会議場, 神戸市 2019.3.22 口演
2. Hattori K: HSC expansion and mobilization from bone marrow niche. : JOINT WORK SHOP NORWAY AND JAPAN IN REGENERATIVE MEDICINE. 4 June, 2018 at Aurora Hall of Royal Norwegian Embassy , Tokyo
3. Hattori K, Takahashi S and Heissig B: Angiocrine system regulates macrophage -dependent aberrant tissue repair and remodeling. 第 80 回日本血液学会学術集会、大阪国際会議場, 大阪 2018.10.12 口演
4. 服部浩一、Heissig Beate、高橋聡. アンジオクラインシステムによる GVHD 病態制御機構の解明. 第 10 回日本血液疾患免疫療法学会学術集会, 東京大学伊藤謝恩ホール、東京、2018.9.22 口演
5. 服部浩一、高橋聡、Heissig Beate. アンジオクライン因子による間葉系幹細胞動態制御機構 第 17 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜、横浜市 2018.3.21 口演
6. Shimazu H, Tashiro Y, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K: Functional analysis of the fibrinolytic system in the pathogenesis of hemophagocytic syndrome. 第79回日本血液学会学術集会、東京国際フォーラム, 東京、2017. 10.21
7. Hattori K, Takahashi S and Heissig B: Angiocrine factors expand mesenchymal stromal cells n bone marrow niche. 第 79 回日本血液学会学術集会、東京国際フォーラム, 東京 2017.10.20
8. Shimazu H, Munakata S, Tashiro Y, Salama Y, Eiamboonser S, Ohta Y, Onoda H, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Heissig B and Hattori K. Pharmacological targeting of plasmin prevents lethality and tissue damage in a murine model of macrophage activation syndrome. 第 13 回麒麟塾, 東京 2017.7.1
9. Shimazu H, Tashiro Y, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K: Roles of plasmin for the progression of HPS/MAS in mice 第78回日本血液学会学術集会、パシフィコ横浜、横浜市、2016. 10.13
10. 宗像慎也、植山孝恵、牧野有里香、本庄薫平、青木 順、高橋里奈、丹羽浩一郎、石山隼、杉本起一、神山博彦、高橋玄、小見山博光、小島豊、五藤倫敏、冨木裕一、坂本一博、ペアテハイジツヒ、服部 浩一：炎症性腸疾患におけるプロテアーゼの機能解明. 第116回日本外科学会定期学術集会、大阪国際会議場、大阪市、2016年4月14日

〔図書〕(計 4 件)

1. 多田昇弘、田中光一、大塚正人、平原 潔、服部浩一 (全著者数 87 名、59 番目) : 第 6 章 炎症・免疫疾患領域における最新メカニズムと創薬への応用 9 節 炎症性疾患の最新メカニズム, 動物 / 疾患モデルの 作製技術・病態解析・評価手法、技術情報協会, 251-260, 2017
2. 服部浩一 炎症性腸疾患と線溶系. 日本血栓止血学会雑誌 総 75 ページ, 2017
3. 高橋 聡 V.造血細胞移植 3.臍帯血移植. P284-289. 血液疾患最新の治療 南江堂、編集 小澤敬也・中尾眞二・松村到、 P284-289 2017
4. 高橋 聡 X.白血病学(下)-最新の基礎、臨床研究 白血病治療の副作用・合併症対策と支持療法 2. 造血 幹細胞移植の副作用と対策. (5)生着不全とその対策.. 日本臨床 74 巻 増刊号, 10(2016.12.20) P386-392. 2016

〔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 :  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：服部 浩一  
ローマ字氏名：KOICHI HATTORI  
所属研究機関名：順天堂大学  
部局名：大学院医学研究科  
職名：特任先任准教授  
研究者番号（8桁）：10360116

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。