

平成22年 5月31日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005年度～2009年度

課題番号：17082002

研究課題名（和文）ケモカイン CXCL12 及び CXCL12 発現細胞による生理的細胞外環境の形成

研究課題名（英文）The role of chemokine CXCL12 and CXCL12 abundant reticular cells in formation of microenvironmental niches for hematopoiesis

研究代表者

長澤 丘司 (NAGASAWA TAKASHI)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：80281690

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞は、すべての血液細胞を生産にわたり産生し、骨の中心部の骨髄で維持されている。造血幹細胞や造血は、局在場所であるニッチと呼ばれる特別な微小環境によって制御されていると推定されているがニッチの実体は不明である。私たちは、ケモカイン CXCL12 とその受容体 CXCR4 が、造血幹細胞の維持と B リンパ球の産生に必須であることを明らかにし、CXCL12 を高発現する CAR 細胞がこれらの細胞のニッチであることを示唆した。CAR 細胞は造血幹細胞・前駆細胞と接着する長い突起を持ち、細胞突起による信号の供給という新しい細胞間相互作用を担っている可能性がある。この成果は、幹細胞・前駆細胞を制御する細胞外環境の理解を大きく進めることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The special microenvironments known as niches, where hematopoietic stem cells (HSCs) and hematopoietic cells reside are thought to supply the requisite factors and play an essential role in their maintenance and regulation. It has been reported previously that HSCs reside near bone surfaces and/or near the vasculature and that a population of osteoblasts and/or endothelial cells might function as niches for HSCs; however, their functions and molecular regulatory mechanism remain unclear. The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 are essential for colonization of bone marrow by HSCs during ontogeny and development of B cells. In this project, we have shown that the induced deletion of CXCR4 in adult mice results in severe reduction of HSC numbers. In addition, most HSCs were found in contact with the processes of a small population of non-hematopoietic cells expressing high amounts of CXCL12, termed CXCL12-abundant reticular (CAR) cells, some of which surrounded sinusoidal endothelial cells or were located near the endosteum. CAR cells are scattered throughout bone marrow and have long processes. These findings indicate that CXCL12-CXCR4 signaling plays an essential role in maintaining the HSC pool, and suggest that CAR cells are a key component of HSC niches in bone marrow.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	59,800,000	0	59,800,000
2006年度	30,600,000	0	30,600,000
2007年度	40,400,000	0	40,400,000
2008年度	36,120,000	0	36,120,000
2009年度	30,600,000	0	30,600,000
総計	197,520,000	0	197,520,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：(1) ケモカイン (2) 骨髄 (3) 造血幹細胞 (4) Bリンパ球 (5) ニッチ

1. 研究開始当初の背景

リンパ球を含む十種類以上のすべての血液細胞は、生涯にわたり骨髄で造血幹細胞より造血前駆細胞を経て産生され、造血幹細胞や造血前駆細胞の増殖や分化は、ニッチ(niche)と呼ばれる特別な微小環境で維持・調節されていると推測されている。ニッチは細胞外環境による組織形成・維持のしくみを理解するために重要な研究対象であるが、造血幹細胞ニッチを含め、その実体は長年不明であった。2000年、ハエの生殖腺の生殖幹細胞を維持するニッチを形成する細胞(Cap細胞)がはじめて同定され、幹細胞とニッチ細胞の相互作用に細胞間接着分子であるEカドヘリンが必須であることが明らかにされた。哺乳類では、2003年、米国のLiらが造血幹細胞が骨辺縁に局在し、骨表面の骨を形成する骨芽細胞の一種で、細胞間接着分子Nカドヘリンを高発現するSNO細胞が造血幹細胞ニッチを形成すると報告し注目された(Zhang et al., Nature 2003)。しかし、この報告での造血幹細胞の組織学的観察法は十分とは言えなかった(Kiel et al., Nature 2007)。一方、Morrisonらは、造血幹細胞の免疫染色による可視化に成功し、造血幹細胞の多くは骨髄腔内で網の目のように分布する洞様毛細血管の周囲に存在すると報告した(Kiel et al., Cell 2005)。しかし、いずれの報告においても、各ニッチ細胞の機能が直接証明されておらず、造血幹細胞や前駆細胞に必須のニッチよりのシグナルも十分明らかでない。

2. 研究の目的

骨髄は、多種類の血液細胞を継続して産生し、器官形成を制御する細胞外環境の研究対象として最も適した系のひとつである。私たちは、これまで、ケモカインCXCL12がBリンパ球の生成、発生過程における造血幹細胞を含む血球のホーミング、成体骨髄での造血幹細胞の維持に必須であることを明らかにした。更に骨髄内のBリンパ球のニッチ細胞の候補としてCXCL12を高発現する細網細胞(CAR細胞)を同定した。本研究では、造血臓器の細胞外環境の本態を明らかにするため、CAR細胞の細胞外環境構成成分としての機能、これらの細胞が形成する機能的細胞外環境の分子基盤、その中におけるCXCL12の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

CXCL12欠損マウスとCXCR4欠損マウスは胎生致死であるため、CXCL12-CXCR4シグナルの生理的機能は不明である。そこでCXCL12の生理的受容体であるCXCR4を成体で欠損させるマウスを作製し、その骨髄での造血幹細胞を含む血球細胞の細胞数と局在を解析した。また、CXCL12遺伝子座にGFP遺伝子を挿入したマウス(CXCL12/GFPノックインマウス)を用いて、成体骨髄でのCXCL12の生理的な発現細胞を可視化し、造血幹細胞を含む造血細胞の局在を解析した。

4. 研究成果

造血幹細胞はすべての血液細胞を産生する重要な造血細胞であるため、造血幹細胞に注目しCAR細胞(CXCL12を高発現する細網細胞であるCAR細胞が造血のニッチを形成する可能性について検討した。私たちはMxCre/loxPシステムによる誘導性遺伝子欠損マウスを用いて、成体骨髄の造血幹細胞におけるCXCL12-CXCR4シグナルの役割を解析した。誘導性CXCR4遺伝子欠損マウスの成体骨髄では、造血幹細胞、Bリンパ球、形質細胞様樹状細胞(pDC)の細胞数が著明に減少していたことから、CXCL12-CXCR4シグナルは、これらの血球の産生・維持に必須であることが明らかになった。

次にCXCL12の生理的な発現細胞を可視化することができるCXCL12/GFPノックインマウスを用いた組織学的解析を行った。洞様毛細血管の大部分はCAR細胞に取り囲まれており、Morrisonらの方法を用いて造血幹細胞を観察すると、造血幹細胞分画の約90%がCAR細胞の細胞突起と接着していた。洞様毛細血管周囲では、血管内皮細胞の外側をCAR細胞が取り囲みその外側に造血幹細胞分画の細胞が接着していた。

以上より、CXCL12-CXCR4シグナルは、成体骨髄において、造血幹細胞数の維持に必須であることが明らかとなり、CXCL12を高発現するCAR細胞が造血幹細胞ニッチの本質的な構成細胞である可能性が示唆された。CAR細胞は造血幹細胞と接着する長い突起を持ち、細胞突起による幹細胞へのサイトカインの供給という新しい細胞間相互作用を担っている可能性がある。現在、CAR細胞を特異的に欠損するマウスの作製を行い、CAR細胞の造

血幹細胞・前駆細胞における生理的役割を検討している。私たちの研究により、米国で明らかになった SCF, TPO に加え造血幹細胞の維持に必須のサイトカイン(CXCL12) が明らかになり、長年不明であった骨髄で造血を支持する微小環境を形成する細胞が新しく同定された。CAR 細胞は、近くその機能が解明されることが見込まれる。この知見は、幹細胞・前駆細胞の維持・増殖・分化を制御する生体内の細胞外環境の理解を大きく進め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 12 件)

- ① Janas, ML., Varano, G., Gudmundsson, K., Noda, M., Nagasawa, T., Turner, M., Thymic development beyond b-selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4., *J. Exp. Med.*, 査読有、Vol.207, No.1, 2010, pp.247-61
- ② Tanaka, D.H., Yanagida, M., Zhu, Y., Mikami, S., Nagasawa, T., Miyazaki, J., Yanagawa, Y., Obata, K., Murakami, F., Random walk behavior of migrating cortical interneurons in the marginal zone: time-laps analysis in flat-mount cortex., *J. Neurosci.*, 査読有、2009、Vol.29, No.5, pp.1300-1311
- ③ Zhu, Y., Matsumoto, T., Mikami, S., Nagasawa, T., Murakami, F., SDF-1/CXCR4 signalling regulates two distinct processes of precerebellar neuron and its deletion leads to abnormal pontine nuclei formation., *Development*, 査読有、Vol.136, No.11, 2009, pp.1919-1928
- ④ Nagasawa, T., New niches for B cell., *Nat. Immunol.*, 査読無、Vol.9, 2008, pp.345-346
- ⑤ Kohara, H., Omatsu, Y., Sugiyama, T., Noda, M., Fujii, N. and Nagasawa, T., Development of plasmacytoid dendritic cells requires CXCL12-CXCR4 chemokine signaling., *Blood*, 査読有、Vol.110, No.13, 2007, pp.4153-4160
- ⑥ Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T., Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches., *Immunity*, 査読有、Vol.25, No.6, 2006,

pp.977-988

- ⑦ Nagasawa, T., Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development., *Nat. Rev. Immunol.*, 査読有、2006、Vol.6, No.2, pp.107-116
- ⑧ Foudi, A., Jarrier, P., Zhang, Y., Wittner, M., Geay, JF., Lecluse, Y., Nagasawa, T., Vainchenker, W., and Louache, F., Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment in CXCR4/-chimeric mice., *Blood*, 査読有、Vol.107, No.6, 2006, pp.2243-2251
- ⑨ Lieberam, I., Agalliu, D., Nagasawa, T., Ericson, J., and Jessell, TM., A CXCL12-CXCR4 chemokine signaling pathway defines the initial trajectory of mammalian motor axons., *Neuron*, 査読有、Vol.47, No.5, 2005, pp.667-679

[学会発表] (計 14 件)

- ① Nagasawa, T., “The chemokine CXCL12 and bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells”, The 2nd international symposium of WPI-IFReC, (2009. 03. 12. Osaka University, Osaka, Japan)
- ② Nagasawa, T., “Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and the chemokine CXCL12”, 第 7 1 回 日本血液学会学術集会 ASH-JSH Joint Symposium: Hematopoietic stem cell niche (2009. 10. 24. Kyoto, Japan)
- ③ Nagasawa, T., “The chemokine CXCL12 and bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells”, Annual Symposium in Immunology in honor of Prof. Michael Sela. (2008. 12. 14. Rehovot, Israel)
- ④ Nagasawa, T., “CXCL12 and bone marrow niches for hematopoietic stem cells and lymphocytes”, 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, Symposium: Osteoimmunology. (2008. 9. 25. Yokohama, Japan)
- ⑤ Nagasawa, T., “CXCL12-CXCR4 chemokine signaling and niches for hematopoietic stem cells (HSCs) and B lymphocytes”, 第 3 7 回 日本免疫学会 シンポジウム (2007.11.21. Tokyo, Japan)
- ⑥ Nagasawa, T., “Roles of CXCL12 in controlling HSC and B lymphocyte behavior during development”, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB

- Congress (2006. 6. 18-23. Kyoto, Japan)
- ⑦ Nagasawa, T., “The chemokine CXCL12 and regulation of HSC and B lymphocyte development in the bone marrow niche”, The 1st International Conference on Osteoimmunology : Interactions of the Immune and Skeletal Systems (2006. 5. 28-6 .2. Crete, Greece)
- ⑧ Nagasawa, T., “CXCL12 and regulation of HSC and B lymphocyte behavior during development”, Gordon Research Conference on Immunochemistry and Immunobiology (2005. 8. 7-12. Oxford, United Kingdom)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 造血幹細胞誘導剤組成物
発明者 : 長澤 丘司
権利者 : 京都大学
種類 : 特許
番号 : 特願 2009-209437
出願年月日 : 2009 年 9 月 10 日
国内外の別 : 国内

○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

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/se03/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長澤 丘司 (NAGASAWA TAKASHI)
京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号 : 80281690

(2) 研究分担者

なし

研究者番号 :

(3) 連携研究者
なし

研究者番号 :

