

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19439

研究課題名（和文）造血幹前駆細胞による免疫特権領域誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文）Induction mechanism of the immune privileged site by hematopoietic stem and progenitor cells

研究代表者

榑木 俊聡（Ohteki, Toshiaki）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：50233200

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は、本来マクロファージ等に特徴的に発現している表面分子（MHCクラスII、F4/80、CD80、CD86、PD-L1等）が造血幹細胞（HSC）にも発現していることを見出した。この知見に基づき、HSCが、死細胞断片上に発現するホスファチジルセリン（PS）を認識して貪食することをex vivo、in vivoの実験系で示した。さらにHSCが死細胞断片を認識・貪食することによって、HSC自身の増殖・生存が促される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの研究成果は、HSCが周辺の死細胞断片を認識・貪食することによって、HSC自身の増殖・生存を加速させる可能性を提示している。今後、定常状態だけでなく、死細胞がより多く生じる炎症、放射線照射、抗がん剤投与など、生体ストレス応答時のHSCの解析を行うことで、これまで知らせていなかったHSC自身による造血系恒常性維持機構が明らかになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We found that surface molecules that are originally expressed on macrophages (MHC class II, F4/80, CD80, CD86, PD-L1 etc.) are also expressed on hematopoietic stem cells (HSCs). Based on this finding, we demonstrated that HSCs phagocytosed dead cell fragments by recognizing phosphatidylserine (PS) expressed on them ex vivo and in vivo. Furthermore, it was suggested that HSCs may accelerate their proliferation and/or survival by recognizing PS.

研究分野：免疫学、組織幹細胞学

キーワード：造血幹細胞（HSC） 貪食 死細胞 ホスファチジルセリン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血液は個体の生存に必要な不可欠であり、呼吸・栄養・感染防御・体温調節・代謝などの機能を持つ。造血幹細胞 (hematopoietic stem cell, HSC) は、血液を構成するあらゆる種類の血液細胞を生み出す源の細胞であり、骨髄ニッチに局在し幹細胞性 (自己複製能と多分化能) を維持している。大部分が細胞周期上休止期にあるが、一部の HSC が緩やかに増殖しながら“非対称分裂”を行い自己複製と同時に前駆細胞を生み出し、前駆細胞はさらに白血球・赤血球・血小板に分化することで血液を維持している。骨髄細胞を lineage markers (Lin)、Sca-1、cKit に対する抗体で染色すると、long term (LT)-HSC、short term (ST)-HSC や多能性前駆細胞 (multipotent progenitor, MPP) は Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>cKit<sup>+</sup> (LSK) 分画に濃縮される (図1)。すなわち、LSK は血液の源の細胞が濃縮されており、LSK の損失は生命の危機につながるため厳密な保護監視システムが必要になる。興味深いことに、同種異系 (allogeneic) LSK を単離して放射線未照射マウスに移植すると、自己 (syngeneic) LSK を移植した場合と遜色なく1ヶ月間生着すること、その際、移植した非自己 (allogeneic) LSK 周辺に、免疫応答を抑制する調節性 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) が集積しており、Treg を除去すると非自己 LSK が拒絶される (Nature 474, 216-9 (2011))。造血の要となる非自己 LSK が宿主免疫系によって拒絶されるのを Treg が抑制していることを示唆しているが、Treg の誘導・集積機構は不明である。近年、マクロファージ研究は長足の進歩を遂げた。マクロファージの機能は異物排除や感染防御といった抗原提示細胞としての役割に加えて、創傷治癒などの組織恒常性維持を含む広範な生命現象に及ぶことが明らかになっている。

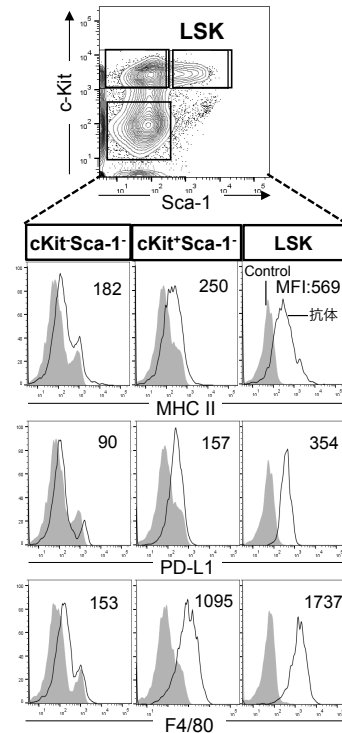


図1 LSKにおけるマクロファージマーカーの高発現

### 2. 研究の目的

これらの研究背景の下、申請者は、本来マクロファージに特徴的な表面分子 (F4/80, MHC クラス II, CD80, CD86, PD-L1/2) が LSK に発現していることを見出している (図1)。さらに貪食細胞除去の目的で使われる clodronate-liposome 投与により LSK が 1/3 程度に減少することなど、予想外かつ興味深い知見を得ている (未発表データ)。本研究では、LSK 上にマクロファージマーカーが発現する生物学的意義の解明を目的とする。特に、LSK のエンドサイトーシスや抗原提示能の解析を行い、LSK が積極的かつ自主的に Treg を誘導して免疫系からの攻撃、免疫応答による排除を回避するための“免疫特権領域”を構築している可能性を追求する。

### 3. 研究の方法

#### (1) LT-HSC による *ex vivo* 死細胞断片貪食

タモキシフェンを投与した Rosa26-*lsl*-tdTomato; Rosa26-CreERT2 マウス (全身で tdTomato (tdT) を発現) から脾細胞を採取し、スタウロスポリン (1  $\mu$ M) の存在下で 16 時間培養することにより tdT<sup>+</sup>アポトーシス細胞を得た。同 tdT<sup>+</sup>アポトーシス細胞と CAG-EGFP マウスから精製した LSK 細胞 (EGFP を発現) との比率が 10 : 1 となるように混合して、Stem cell factor (SCF) と Thrombopoietin (TPO) (各々 50 ng/ml) の存在下で 5 時間培養した。培養後、フローサイトメトリーにより EGFP<sup>+</sup>LT-HSC を分取し、共焦点レーザー顕微鏡により tdT<sup>+</sup>死細胞断片貪食の有無を観察した。必要に応じてサイトカラシン D (1  $\mu$ M) または Annexin V (5  $\mu$ g/ml) を添加して貪食阻害を行った。

#### (2) LT-HSC による *in vivo* 死細胞断片貪食

タモキシフェンを投与した Rosa26-*lsl*-tdTomato; Rosa26-CreERT2 マウスの骨髄細胞 (5 x 10<sup>6</sup>) と、CAG-EGFP マウスの骨髄細胞 (5 x 10<sup>6</sup>) を 1:1 の割合で混合して、11 Gy 放射線照射を行った B6. SJL マウスに移植した。3ヶ月後、同骨髄キメラマウスから tdT<sup>+</sup>LT-HSC 及び EGFP<sup>+</sup>LT-HSC を分取し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### (3) LT-HSC の培養

ホスファチジルセリン (PS) またはホスファチジルコリン (PC) のエタノール溶液 (5  $\mu$ g/ml) を 96 穴平底プレートに 100  $\mu$ l ずつ入れた後、室温でエタノールを蒸発させてコーティングした。PBS で洗浄したのち、10% FBS、1% ペニシリン/ストレプトマイシン、SCF、TPO (50 ng/ml) を含む IMDM を用いて LT-HSC (500 cells/well) を 7 日間培養後、細胞数をカウントした。

#### (4) qRT-PCR

RNeasy Mini Kit を用いて各細胞分画から mRNA を調整した。SuperScript III 逆転写酵素により cDNA に変換し、Light Cycler 480 及び SYBR Green I Master を用いて PCR を行い遺伝子発現レベルを比較した。得られた値は *Actb* の発現量で標準化した。

(5) LT-HSCによる抗原提示機能の解析

C57BL/6 マウスにLPS (5 mg/kg) を投与して24時間後、同マウス骨髄からLT-HSC (CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>LSK) を、脾臓から樹状細胞 (CD11c<sup>hi</sup>B220<sup>+</sup>) を分取した。一方、OVA 抗原特異的なT細胞レセプター (TCR) を発現するOT-II マウスの脾臓からCD4<sup>+</sup>T細胞を分取し、CFSEでラベル後に18 Gyの放射線照射を行いLT-HSCの分化・増殖を抑制した。その後、LT-HSCまたは樹状細胞 (1 x 10<sup>4</sup>個) とT細胞 (3 x 10<sup>4</sup>個) を、OVAペプチド (15 μg/ml) の存在下で3日間共培養した。必要に応じて共刺激分子CD86の阻害抗体 (10 μg/ml, clone: P03) を添加した。培養後、フローサイトメトリーを用いてT細胞の増殖に伴うCFSEの減弱を評価した。

4. 研究成果

(1) HSCによる死細胞断片食食の証拠

野生型マウス由来のHSCとtdTomato (tdT) を発現するアポトーシス脾細胞を共培養して、共焦点顕微鏡及びFCMで観察したところ、HSCがアポトーシス小体 (ApoBD) を食食しtdT<sup>+</sup>となることが判明した (図2)。このHSCによる食食は、cytochalasin D (Cyto D) やPS結合タンパク質annexin Vの添加によって抑制された (図2)。さらに以下の2つの*in vivo*モデルを用いて、HSCによる死細胞断片食食を検証した。第一に、tdT<sup>+</sup>骨髄細胞とGFP<sup>+</sup>骨髄細胞を1:1の割合で野生型マウスに移植して骨髄キメラマウスを作製した。その結果、tdT<sup>+</sup>ApoBDを取り込んだGFP<sup>+</sup>HSC、GFP<sup>+</sup>ApoBDを取り込んだtdT<sup>+</sup>HSCが検出された (図3)。第二に、HSCを含まないミエロイド系細胞系列で選択的にtdTが発現するマウス (LysM-Cre;Rosa26-1sl1-tdT) を作製・観察したところ、tdT<sup>+</sup>ApoBDを取り込んだHSCが効率良く検出された。この系は、放射線照射や骨髄移植を行っていないため、生理的な状態でもHSCにより死細胞断片が食食されていることが示唆された。

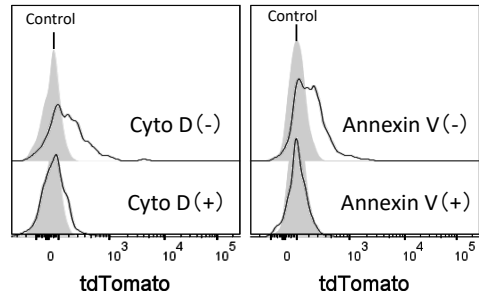


図2 HSCによる*ex vivo*死細胞断片食食

(2) HSCによる死細胞断片食食の生理学的な意義

(1)で示唆されたHSCによる死細胞断片食食現象が生理学的にどのような意義を持つのかを解明することは重要である。HSCはPS依存的に死細胞断片を食食するが、このPSの認識がHSCに与える影響を*ex vivo*の系を用いて検討したところ、コントロールであるPCとの比較において、PSの存在下ではHSCから産生される細胞の数が有意に増加した (図4)。今後、分裂期にあるHSCの割合をDAPIとKi-67染色を用いて、また、PSシグナルが長期間入り続けた際のHSC正常変化への影響をHSCの長期培養法 (*Nature* 2019, 571:117) を用いて、各々評価する予定である。

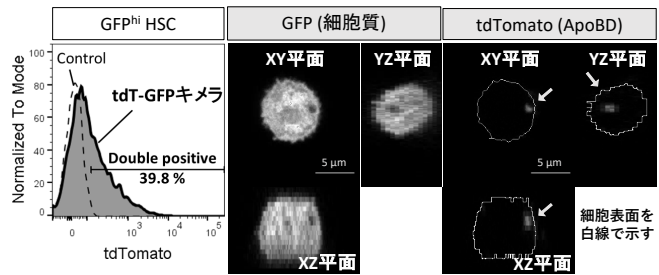


図3 HSCによる*in vivo*死細胞断片食食\_\_骨髄キメラマウス

さらに、HSCによる死細胞断片の認識が*in vivo*造血系に与える影響を検討するためには、HSC上に発現するPS受容体を同定し、同受容体KOマウスを作製・解析する必要がある。この目的のため、遺伝子発現データベースにアクセスしてHSCで高発現しているPS受容体の抽出を行い、Xを候補分子として同定した。Xの発現はLT-HSCで最も高く、次いでST-HSC、多能性前駆細胞 (MPPs) の順であった (図5)。現在、X KOマウス受精卵からの個体作製を進めており、X KO HSCの食食能や、定常状態における各造血前駆細胞や成熟血液細胞の数を比較検討するとともに、死細胞がより多く生じる急性炎症 (LPSの投与) 時や放射線照射時、抗がん剤 (5-FU) 投与時におけるKOマウスの表現型、さらには連続骨髄移植により、X KO HSCの幹細胞性を総合的に評価する。

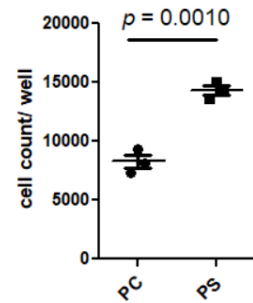


図4 死細胞断片認識によるHSC増殖分化能の亢進

(3) HSCによる抗原提示機能

LT-HSCはMHCクラスIIを発現していたため、抗原提示機能の有無を検討した。LPS投与野生型マウスからMHCクラスIIを高発現するHSCを精製して、*ex vivo*でOVAペプチドと同抗原特異的TCRを発現しているOT-II

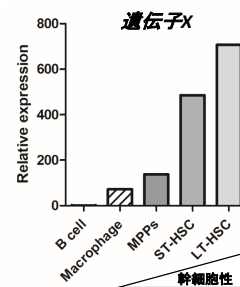
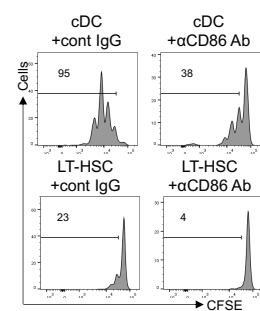


図5 HSCにおける遺伝子X高発現

II 細胞と共に培養した。その結果、樹状細胞との比較において、微弱な OT-II 細胞の分裂増殖が誘導され、共刺激分子 CD86 に対するブロッキング抗体により同増殖が完全に抑制された (図 6)。今後、OVA 蛋白を用いてさらなる検討が必要ではあるものの、この結果は、HSC の抗原提示能は低く、死細胞断片食食の意義は抗原提示以外に重きがあることが推測された。X KO マウスの解析を待ちたい。

本研究開始当初は、HSC が自身を保護するため積極的に Treg を誘導して免疫特権領域を構築する可能性を予測したが、これまでの成果は、HSC が周辺の死細胞断片を認識・食食することによって、HSC 自身の増殖・分化を加速させる可能性を提示している。今後、定常状態だけでなく、死細胞がより多く生じる急性炎症、放射線照射、抗がん剤投与など、生体ストレス応答時における意義を解明することで、これまで知らせていなかった HSC 自身による造血系恒常性維持機構が明らかになることが期待される。



**図6 HSCの抗原提示機能**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立大学法人東京医科歯科大学難治疾患研究所生体防御学分野ホームページ  
<http://www.tmd.ac.jp/mri/bre/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	金山 剛士  (Kanayama Masashi)  (80811223)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教    (12602)	