

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590500

研究課題名（和文） 成獣マウスにおける胸腺前 T 前駆細胞の同定

研究課題名（英文） Identification of prethymic T cell progenitors in adult mice

研究代表者

桂 義元 (KATSURA YOSHIMOTO)

日本大学・医学部・兼任講師

研究者番号：90027095

研究成果の概要： $\gamma$ 線を照射し、骨髄細胞を移植して1週間後のマウスの脾臓中に、多数のT前駆細胞が存在する事が明らかになった。このT前駆細胞はわれわれが胎児肝臓中に同定していたものと同じく、ナチュラルキラー細胞と樹状細胞もつくる。一方、成体胸腺中の最も初期の細胞も同じ性質を示す事が示された。これらの結果は、T系列とB系列は独立に、ミエロイド系列と関連して分化するというわれわれのミエロイド基本型モデルを実証するものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：T細胞, 分化, 造血幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、造血幹細胞 (Hematopoietic Stem Cell; HSC) からT細胞への分化プロセスの初期段階、とくにT細胞系列特異的前駆細胞が作られるメカニズムを明らかにすることを目的とする。申請者は、20年以上にわたってT細胞初期分化の研究を続けており、この間さまざまな新しい実験法を開発しつつ国内外の研究をリードしてきた。特に1996年に開発した Multi-Lineage Progenitor Assay (MLP アッセイ) を用いた一連の研究では、T前駆細胞の検出と同定に初めて成功し、さらにHSCから各系列への分化プロセスは、

一般に考えられていたものとは根本的に異なっていることを明らかにした。

一般には、HSC からT, B系列共通前駆細胞 (Common Lymphoid Progenitor ; CLP) がつくられ、このCLPからT前駆細胞とB前駆細胞が作られると考えられていた。一方申請者が明らかにしたことは、そもそもCLPという段階は存在せず、HSCからはミエロイド/赤血球 (M/E) 前駆細胞、ミエロイド/B細胞 (M/B) 前駆細胞、およびミエロイド/T細胞 (M/T) 前駆細胞というコミットメント段階を経てE, B, T系列特異的な前駆細胞が作られるということである (Katsura, 2002, Nature

Rev. Immunol. 2:127)。このことは、造血系のあらゆる細胞は食細胞から進化した経緯を反映しているものと考えられた。

申請者らが提唱した分化モデルは、近年国内外で広く認められるようになってきた。しかしながら、CLP モデルが行きわたっているアメリカの研究者を中心に、申請者らの分化モデルの適用範囲を胎児の造血とT細胞分化に限定しようという動きがある。申請者らの研究は主に胎児マウスを用いて行ったのに対して、CLP モデル提唱者らは成獣マウスを用いて実験を行っている。胎児造血には、primitive hematopoiesis と呼ばれるごく初期の造血と definitive hematopoiesis と呼ばれる比較的後期の造血があるが、私達が研究対象としてきたのは後者であり、成獣の造血と同種のものである。すなわち、単なる実験材料の違いでT、B細胞分化のプロセスが胎児と成獣で異なるという主張がなされていた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、成獣においても、胎児で示したように、ミエロイド系列を基盤としたT、Bリンパ球の進化過程を反映するプロセスで造血とT細胞分化が起こることを示すことである。

骨髄中には多様な前駆細胞群があり、これらをフローサイトメーター (FACS) で分離してマウスへ移入すれば、その多くがT細胞をつくる。系列決定の途中にある前駆細胞なのだから、T細胞分化能を保有していればT細胞をつくるのは当然である。この種の研究は従来から多く行なわれているが、いずれも胸腺へ移行してT細胞をつくる細胞を同定したものとしては認められていない。すなわち、この問題を解き明かす確実な手段は無いのである。本研究では、従来の方法とは異なる研究法を試みる。

## 3. 研究の方法

成獣でT前駆細胞を同定し、その性質を胎児のものと比較検討する。とくに、HSCからT、B系列への系列決定の過程では、M/T、M/B段階を経由するという胎児造血で明らかになった分化プロセスが、成獣骨髄HSCからの分化においても踏襲されるかということに重点をおく。幹細胞/前駆細胞の検出は、すべて clonal assay すなわち前駆細胞を1個ずつ培養する方法で行う。すべてをMLPアッセイで行うのが理想であるが、それでは多大な労力と多額の費用がかかる。そこで以下のような方式で行う。

### (1) B系列、ミエロイド系列への分化能：

Bおよびミエロイド系列の分化増殖を支持するストローマ細胞 TSt-4 を用いる。前駆細胞

として FACS でソーティングした細胞群の細胞を、1個ずつ TSt-4 の単層培養上で培養する。生成した細胞は FACS にて検定する。

### (2) T系列への分化能：

TSt-4 に Notch ligand DLL1 遺伝子を導入した TSt-4/DLL1 は、T細胞への分化を支持する。このストローマ細胞の単層培養を用いて、個々の前駆細胞のT系列への分化能を検定する。

### (3) MLP アッセイ：

上記2種類の培養法によって重要と判定された細胞群については、MLPアッセイを用いてT、B、ミエロイド系列への分化能を調べる。必要に応じて、赤血球、NKあるいはDCへの分化能も併せて調べる。

## 4. 研究成果

(1) 骨髄細胞を移入したマウスの骨髄および脾臓におけるドナー由来細胞の出現：

9Gy照射したB6マウス(Ly5.2)に $1.5 \times 10^7$ 個のB6Ly5.1マウスの骨髄細胞を静注移入した。日を追って骨髄(femurとtibia)および脾臓の細胞を採取し、フローサイトメータ(FACS)にて解析した。4日目頃から細胞の回収が可能となり、回収細胞数はその後急速に増加する。14日目には、正常マウスの値に匹敵するまでに回復する。この間の細胞数は、骨髄と脾臓でほぼ同数である。しかしながら、 $c\text{-kit}^+$  Sca-1<sup>+</sup>細胞(幹細胞から初期前期細胞に属する細胞)は、脾臓に圧倒的に多い。すなわち、造血は脾臓中で始まる。

T前駆細胞が属する $c\text{-kit}^+$  Sca-1<sup>lo</sup>IL-7R<sup>+</sup>(IL-7R<sup>+</sup>)細胞も脾臓中に先に出現する。4-7日目にはIL-7R<sup>+</sup>細胞は骨髄中にはごくわずかで、多くは脾臓中に存在している。

骨髄を移入後4、7、10日目の胸腺中の細胞をFACS解析すると、7-10日目には少数ながらドナー由来のT細胞が検出される。このT細胞をつくり出す前駆細胞がどのような細胞なのか、またどのような経緯で胸腺へ移行したのかを明らかにすることが、本研究の主要な目標である。

(2) 前駆細胞のクローナルアッセイによる解析：

9Gy照射して骨髄移植したマウスの骨髄と脾臓の細胞を解析した。実験には主に7日目のマウスを用いた。7日目の骨髄と脾臓をそれぞれXB-7BM、XB-7Sと呼ぶ事にする。

骨髄、脾臓中のIL- $\text{kit}^+$ Scal<sup>hi</sup>IL-7R<sup>-</sup>(IL-7R<sup>-</sup>)およびIC-7R<sup>+</sup>分画の細胞を、1個ずつストローマ細胞と共に培養してアッセイした。先ず、比較対象とする正常マウスの骨髄と脾臓であるが、多能前駆細胞、ミエロイド前駆細胞、B前駆細胞、T前駆細胞のいずれも骨髄中に

圧倒的に多い。これは骨髄が本来の造血器官なのだから当然の事である。XB-7BMとXB-7Sを比較すると、完全に逆転して、前駆細胞の大多数はXB-7S中にある。特にXB-7S中のIL-7R<sup>+</sup>分画では、前駆細胞の多くはT前駆細胞である。なお、IL-7R<sup>+</sup>分画中には多能前駆細胞は存在しない。これらの結果はXB-7S中にT前駆細胞活性が高いという、われわれの以前の研究結果をクローナルアッセイによって確認できたことを示している。一部の実験はMLPアッセイでも行っており、XB-7S中にT前駆細胞が多いというデータを確認することができた。

(3) IL-7R<sup>+</sup>細胞が胸腺へ移行する：  
骨髄よりIL-7R<sup>-</sup>細胞群とIL-7R<sup>+</sup>細胞群を分離し、その12,000個および6,000個(1.5×10<sup>7</sup>の骨髄細胞に含まれる数)を照射マウスに静注移入した。IL-7R<sup>+</sup>細胞を移入した群では、7日目には胸腺中にドナー由来T細胞の生成がはっきりとみられた。ただしこの群では、脾臓中にはドナー由来細胞はほとんど検出されない。一方、IL-7R<sup>-</sup>細胞を移入した群は2つのタイプに分かれた。1つは胸腺中で少数のT細胞がつけられている群、他の1つはT細胞生成がほとんどみられない群である。前者では脾臓中にIL-7R<sup>+</sup>細胞が出現しているのに対して、後者ではその出現がみられなかった。

これらの結果は、IL-7R<sup>+</sup>に含まれるT前駆細胞が胸腺移行前につくられること、さらにこれらのT前駆細胞が胸腺へ移行してT細胞をつくることを強く示唆している。IL-7R<sup>+</sup>群にはB前駆細胞も含まれており、これらを分離する方法は現在のところないので、T前駆細胞だけを移入する実験はできない。しかし一連の研究結果から、胸腺へ移行するのはT前駆細胞であると結論することは可能である。

なお、このT前駆細胞はNK細胞と樹状細胞(DC)も合わせてつくることができる。その性質も含めて骨髄中のT前駆細胞は、以前にわれわれが明らかにした胎児肝臓中のT前駆細胞と同じであると言うことができる。

(4) 成体胸腺中の最も初期の前駆細胞の分化能：

成体胸腺中の最初期の前駆細胞は、骨髄から移行した直後の前駆細胞と考えることができる。この前駆細胞はB細胞をつくることはできないが、T細胞の他にNKとDCをつくることを、われわれは以前に報告している。今回は、この最初期の前駆細胞を1個ずつTSt-4/DLL1と共に培養する事によって、T細胞、NK細胞、DCの他にマクロファージもつくことを明らかにした。

(5) 本研究によって実証されたミエロイド基

本型モデルに関する考察：

これら一連の研究は、T系列細胞はB系列細胞とは独立に、ミエロイド系列と関連して分化することを明確に示したものである。造血のプロセスは、従来は図1に示すプロセスで進行すると考えられてきた(古典モデル)。われわれは、マウス胎児を用いた一連の研究で、これは正しくなく、図2に示すようなプロセスで進行することを明らかにした(ミエロイド基本型モデル)。

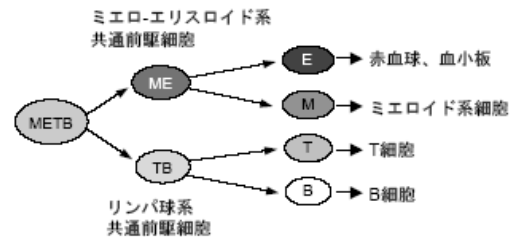


図1 古典的造血モデル。E、M、T、Bは、それぞれエリスロイド、ミエロイド、T、B、系列への分化能を示している。

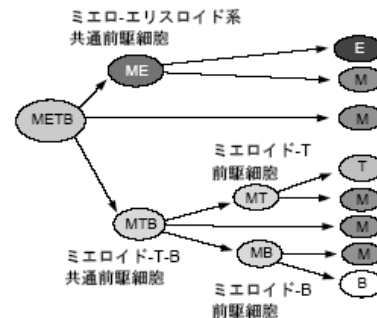


図2 ミエロイド基本型モデル。

ミエロイド基本型モデルは、古典モデルを一部修正したにすぎないのではないかと意見もある。しかし、これらは根本的に異なるものである。古典的モデルの基本骨格を使う限り、内包する問題点は解消されない。「リンパ球系列」という概念は、系列間の真の類縁性を覆い隠し、データの解釈に混乱をもたらしているのである。この十数年の間に得られた血液学上の知見の中でも、古典的モデルのコンセプトに従って解釈されたために理解が停滞していた例は多い。そのような例を紹介しよう。

T細胞とB細胞は、抗原を特異的に認識するという共通点は有するが、その本質的な属性を考えると遠縁であることが理解できる。すなわち、T細胞はキラー細胞的な性質が基本であり、B細胞は食細胞の一種といっただいほど食細胞的な性質を有している。B細胞は抗原レセプターに結合した異物を捕食するし、さらにマクロファージと同じようにT細胞に対して抗原提示を行ないT細胞を活性化するのである。また、培養しているうちにB細胞がマクロファージに変化するという報

告は古くから数多くみられる。このような B 細胞とマクロファージの近縁性については、従来から多くの研究者が気づいていた。にもかかわらず、造血モデルを考えるときにその近縁性が考慮されることが殆どなかったのは、古典的モデルの呪縛があったからと思われる。

白血病は血液細胞が制御をはずれて増殖する病気であるが、その中には異なる系列の表現型を重ねて有するタイプがある。そうしたもののの中では、ミエロイド-B 型とミエロイド-T 型が多く、T-B 型はほとんどみられない。古典的モデルではこのような系列決定状態に対応する前駆細胞段階がないので、この種の白血病がどの分化段階の細胞に由来するかは長らく不明であった。最近では、混合型白血病の起源は、ミエロイド基本型モデルにもとづいて考察されるようになってきている。

抗原提示細胞の一つに樹状細胞がある。マクロファージの持つ機能のうちの、T 細胞に抗原を提示する機能を特化させたような細胞である。すなわち、普通に考えればミエロイド系に含めるべき細胞である。18 年前、T 前駆細胞からつくられる樹状細胞があることが報告された。当時は古典的モデル以外の考え方はなかったもので、この T 前駆細胞由来の樹状細胞は「リンパ球系樹状細胞」と呼ばれた。これはリンパ球系ミエロイド細胞と近いのに近く、古典的モデルの概念に則しているにもかかわらず古典的モデルと相容れない表現になってしまっている。ミエロイド基本型モデルに照らせば、樹状細胞が T 前駆細胞から生成することは何の問題もない。細胞分化の研究においては、ときに進化という視点で俯瞰したスケールの考察が必要であるが、この点でも、ミエロイド基本型モデルは種々の知見をよく反映している。これは重要なポイントなので、次に少し詳しく述べる。

進化の過程で、T 細胞系列と B 細胞系列はいつ分岐したのだろうか。進化におけるリンパ球の出発点は、遺伝子再構成による抗原レセプターの多様性創出機構を獲得した時点とすることができる。もしもこの出発点が、T 細胞とも B 細胞ともつかない中間的な性質をもった原始的リンパ球だったなら、T 細胞と B 細胞は進化的には近縁ということができよう。化石からはリンパ球を取り出して調べることはできない。しかし、系統発生的に古い生物を調べることにより、進化の過程をさかのぼって考察することはできる。リンパ球を有する最も下等な生き物は、サメやエイなどの軟骨魚類である。残念ながらというか、驚くべきことに、軟骨魚類では T 細胞と B 細胞による免疫システムはすでにほぼ完成しているのである。一方、軟骨魚類よりも進化的

に古い無顎類（ヤツメウナギなど）や、すべての無脊椎動物においては、T 細胞、B 細胞に相当する細胞はまったくみられない。このように無顎類と軟骨魚類の間に劇的に獲得免疫が発達した背景には、この時期にトランスポゾンの感染というイベントにより遺伝子再構成の仕組みが取り込まれたからと考えられている。この段階の生物が生き残っていないので、このとき T 細胞と B 細胞がどのようにつくり出されたかについては仮説をたてて考察を進める以外にない。

実は、もうひとつの重要な知見がある。それは、T 細胞と B 細胞をもたない無顎類や、さらに下等な棘皮動物（ウニなど）のような無脊椎動物でも、すでに食細胞とキラー細胞は有しているということである。キラー細胞は、哺乳類でもナチュラルキラー細胞として残っている。

これらの知見をもとに、T 細胞と B 細胞の起源を考察してみよう。系統発生上の最初の血液細胞は食細胞であったと考えられる。ヘモグロビンを運ぶ細胞（赤血球）と、細胞を殺す活性をもつ細胞（キラー細胞）への機能分化は無脊椎動物の段階で起こり、やがて脊椎動物が生じた。約 5 億年前、無顎類と軟骨魚類の中間の段階に位置する 1 匹の魚の生殖細胞において、ひとつの免疫グロブリンファミリー遺伝子（抗体や抗原レセプターの遺伝子の祖先）のエクソン部分にトランスポゾンが感染し、エクソンが 2 つの断片に引き離された。このたった一度のミクロな出来事が脊椎動物のその後の大躍進の原動力になる。この感染遺伝子を受け継いだ個体においては、この遺伝子が発現する時にトランスポゾンは自らを切り出して飛び出し、結果として離れていた遺伝子断片はつなぎもどされることになる。すなわち、遺伝子再構成が起こる。やがてエクソンの断片が多数複製によりつくられ、遺伝子再構成により多様性をもつことになった。こうして原始的抗原レセプターができたと考えられる。

すでにこの時点でキラー細胞と食細胞という異なる系列の細胞はできあがっていたから、そのキラー細胞と食細胞が、それぞれこの感染遺伝子を使うようになった。これが原始的な T 細胞と B 細胞の誕生である。このあと、ゲノム全体の倍数化というイベントが何度か起こり、抗原レセプター遺伝子は複数セットつくられ、それぞれが T 細胞受容体遺伝子と免疫グロブリン（抗体）遺伝子になった。このようなシナリオでみると、系統発生における T 系列と B 系列の分岐点は、遺伝子再構成システムの獲得よりもはるか昔の、食細胞とキラー細胞が分極した時点ということになり、T 細胞と B 細胞は近縁ではないとする個体発生上の研究結果とよく合う。進化の仮説を検証するのは一般には難しいが、最近、

カエルや魚のB細胞はマクロファージと同様の強い貪食能を有するという報告がなされた。この知見は、B細胞はマクロファージに由来するという私達の説を強く支持するものである。

上記の論考は、血液細胞の細胞種の起源に関してパラダイムの転換をもたらすものである。古典的造血モデルに提示される「リンパ球系列」という概念から離れられない血液学者や免疫学者も、まだ決して少なくない。リンパ球という形態に基づく用語が使われ続けるのはいたしかたないとしても、リンパ系共通前駆細胞という用語は教科書の造血モデルから取り除きたいものである。造血過程の正しい理解は、血液学・免疫学の研究をより良い方向へ導くであろう。その成果は血液学に限らず、広く細胞分化研究の牽引役として貢献するものと期待している。

#### 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 4 件)

- ① Wada H, Masuda K, Satoh R, Kakugawa K, Ikawa T, Katsura Y, Kawamoto H : Adult T-cell progenitors retain myeloidpotential. Nature, 452, 768-772, 2008, 有
- ② 河本宏、桂義元、T前駆細胞の発生：T細胞系列のアイデンティティ。メディカルバイオ、5、32-38、2008、無
- ③ Masuda K, Kakugawa K, Nakayama T, Minato M, Katsura Y, Kawamoto H : T cell lineage determination precedes the initiation of TCRbeta gene rearrangement. Journal of Haematology, 179, 3699-3706, 2007, 有
- ④ Kato M, Masuda K, Kakugawa K, Kawamoto H, Mugishima H, Katsura Y : Quantification of Progenitors capable of generating T cell In human cord blood. European Journal of Haematology, 80(2), 151-159, 2007, 有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 佐藤留美、桂義元、Ewijk W.v.、河本宏 Thymic cortical epithelial cells are generated in two separate waves. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、(特定非営利活動法人 日本免疫学会)、東京、11月 (2007)

- ② 佐藤留美、桂義元、Ewijk W.v.、河本宏 胸腺皮質の修復再生機構、第17回Kyoto cell Conference (第17回KTCC事務局)、京都、6月 (2007)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

桂 義元 (KATSURA YOSHIMOTO)

日本大学医学部・兼任講師

研究者番号：90027095

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし