

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06688

研究課題名(和文)造血幹細胞ニッチの遺伝子発現ネットワークの構築および維持機構の解明

研究課題名(英文)Gene regulatory network in cellular niches for hematopoietic stem cells

研究代表者

尾松 芳樹(Omatsu, Yoshiki)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：80437277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄造血を維持する必須の微小環境(ニッチ)の中心的な細胞であるCAR細胞(ケモカインCXCL12を高発現する細網細胞)の発生および機能維持に必須の転写因子がいくつか同定されたが、遺伝子発現ネットワークの全容解明には至っていない。本研究ではCAR細胞に発現する転写因子等の遺伝子の条件的遺伝子欠損マウスを新規に作製し解析した。その中で、転写因子Runx1/2欠損マウスにおいて骨髄が著しく線維化することを見出し、CAR細胞の遺伝子発現ネットワークの変化や骨髄造血の低下等を認め、Runx1/2が線維化を抑制するという造血幹細胞ニッチの維持に必須の分子機構を新たに明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、CAR細胞に特異的に発現しその線維化を抑制することによって造血幹細胞の維持に必須の役割を果たす転写因子が同定された。この転写因子はそれぞれ造血幹細胞と骨芽細胞の発生に必須の遺伝子(Runx1とRunx2)としてよく知られていたものであったが、CAR細胞における線維芽細胞への変化を抑制するという機能が新たに解明された。また骨髄線維症においてはCAR細胞でRunx1/2の発現が低下することがその進展に関与すると推測されたため、Runx1/2遺伝子が疾患における新たな治療や診断の標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have identified some transcription factors essential for the development and functional maintenance of CAR cells (CXCL12-abundant reticular cells) that construct niches for hematopoietic stem cells in bone marrow. However, the mechanisms how the gene regulatory network of CAR cells is established and maintained has not been fully understood. In this study, we identified several novel transcriptional regulators that are highly expressed in CAR cells and may have important rolls for niche function, and generated conditional knockout mice. In these mice, Runx1/2 conditional knockout mice displayed severe fibrosis and hematopoietic defects in bone marrow. Thus, HSC cellular niches require Runx1 or Runx2 to prevent their fibrotic conversion and maintain HSCs and hematopoiesis in adults.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 ニッチ 間葉系細胞 転写因子 骨髄

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞を維持するニッチ（特別な微小環境）に関するこれまでの研究により、CAR 細胞（CXCL12 を高発現する細網細胞）が造血幹細胞ニッチを構成する中心的な細胞であること、特異的な転写因子の発現によって特徴づけられる骨髄特有の間葉系細胞であることが明らかになった。一方近年、腸管や肺などの組織においても組織幹細胞を維持するニッチとして機能する間葉系細胞の存在が報告されてきた。これらのことから、間葉系細胞というこれまでほとんど詳細が明らかでなかった細胞種の多様性と重要性がより注目されるようになってきた。

## 2. 研究の目的

骨髄に存在する CAR 細胞が造血幹細胞ニッチを構成する中心的な細胞であることが明らかにされ、骨髄以外の他の組織（腸管、肺）においても組織幹細胞のニッチとして機能する間葉系細胞が報告されたが、これらの間葉系細胞に共通する分子機構の存在や、発現する転写因子の相互関係、遺伝子発現ネットワークの形成・維持機構などは十分明らかでない。そこで本研究ではこれらの問題に取り組み、CAR 細胞に発現する転写因子を中心とした遺伝子発現ネットワークに着目し、その形成や維持に必須の新たな分子機構の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) CAR 細胞の発生に必須の遺伝子の探索

骨髄の発生過程において、胎児期の軟骨原器の周囲の軟骨膜に出現する転写因子 osterix (Osx) 陽性の間葉系細胞が、軟骨中央部より侵入し骨芽細胞と CAR 細胞を生み出すと考えられている。そこで、Osx-GFP マウス胎児を用いてシングルセルレベルでの次世代シーケンス (NGS) 解析等を行い CAR 細胞への運命決定に関与する遺伝子の候補を探索する。

### (2) 病態モデルマウス等を用いた CAR 細胞の維持に必須の遺伝子の探索

白血病・炎症などの病態モデルマウスにおいて、正常造血の障害が生じることと並行して CAR 細胞の遺伝子発現ネットワークが大きく変化することが明らかになった。そこで定常状態の CAR 細胞と病態モデルマウス等の CAR 細胞における遺伝子発現ネットワークの比較解析を行い、CAR 細胞の維持に関与する遺伝子の候補を探索する。

### (3) 候補遺伝子の欠損マウスを用いた機能解析

(1)(2)の探索によって得られた候補遺伝子重要と考えられた新規候補遺伝子について、Foxc1 や Ebf3/1 等の既知の転写因子と共に培養細胞に強制発現させる等の *in vitro* 機能解析を行うと共に、*in vivo* での機能解析のために遺伝子欠損マウスを作製し解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 転写因子 Runx1 と Runx2 の CAR 細胞における役割の解明

造血幹細胞の発生に必須の転写因子 Runx1 と骨芽細胞の発生に必須の転写因子 Runx2 が、CAR 細胞において高発現していることを見出した。CAR 細胞は骨芽細胞と近縁であるため、Runx2 を発現していることは以前より判明していたが、Runx1 を血液細胞よりも高発現していることは意外であった。これら Runx 転写因子の CAR 細胞における機能は不明であったため、Runx1 および Runx2 の flox マウスを作製・入手し、四肢の間葉系細胞や CAR 細胞特異的に遺伝子欠損させたマウスを作製し解析した。

まず、Runx1 および Runx2 をそれぞれ単独で欠損させたマウスを解析したところ、CAR 細胞の形成や維持にほとんど異常を認めなかった。次に、Runx1 と Runx2 の両方を CAR 細胞特異的に欠損させたマウスを解析したところ、骨髄の血液細胞が著減し、造血幹細胞、前駆細胞および分化細胞が

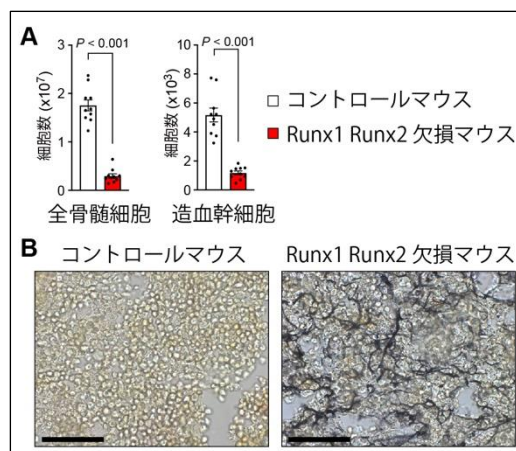


図1 Runx1 と Runx2 を CAR 細胞で欠損させたマウスでは骨髄が著しく線維化し造血が障害された。(A)骨髄細胞数と造血幹細胞数。(B)骨髄組織の鍍銀染色像。

著減していた (図 1A)。そこで、組織学的解析を行ったところ、骨髄の著しい線維化 (III 型コラーゲンや好銀繊維の増加) が認められた (図 1B)。

次に Runx1 または Runx2 を、培養した CAR 細胞に強制発現させると III 型コラーゲン等の線維化関連遺伝子の発現が低下することが明らかになった。また骨髄の線維化に関与すると考えられる PDGF リガンドを培養 CAR 細胞に添加したところ、Runx1 および Runx2 の発現低下を認めた。さらに Foxc1 を強制発現させると Runx1 の発現が上昇することも明らかになった。

最後に、骨髄細胞でトロンボポエチン遺伝子を強制発現させた骨髄線維症モデルマウスを作製し解析したところ、CAR 細胞の Runx1 と Runx2 の発現が低下していた。

以上より、転写因子 Runx1 と Runx2 が CAR 細胞の線維化を抑制し、造血幹細胞ニッチを維持していることが明らかになった (図 2)。

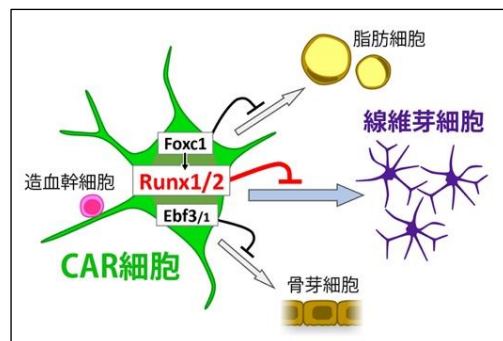


図 2 CAR 細胞に発現する転写因子とその機能  
Runx1/2 は CAR 細胞の線維芽細胞への分化を抑制する。

### (2) 転写因子 Cebpa と Cebpd の CAR 細胞における役割の解明

これまでの研究により、転写因子 Ebf3 と Ebf1 が CAR 細胞の骨芽細胞への分化を抑制し、骨髄腔を維持していることが明らかになった。その際、Ebf3/1 の下流で機能することが示唆された転写因子 Cebpa の CAR 細胞における機能を明らかにするために、CAR 細胞特異的 Cebpa 欠損マウスを作製し解析した。その結果、Ebf3/1 欠損マウスと同様に海綿骨の増加を認めたが、その表現系は比較的弱く、Cebpa 欠損を他の遺伝子が補っている可能性が考えられた。そこで CAR 細胞に発現する Cebp 転写因子ファミリー分子のうち、発現量が高く、Cebpa と発現パターンの類似性があった Cebpd に着目した。Cebpa と Cebpd を同時に欠損させたマウスでは海綿骨の著しい増加を認めた。今後 CAR 細胞の骨分化抑制機構を明らかにするため、より詳細な分子機構の解析を進める。

### (3) CAR 細胞の変質に関与する可能性のある転写調節因子の同定

本研究により、白血病や炎症によって CAR 細胞で発現の上昇する機能不明の遺伝子が複数同定された。この中で転写調節因子と考えられる遺伝子については造血幹細胞ニッチの変質に関与する可能性が考えられたため、その役割を解明するために flox マウスを作製した。今後この遺伝子を CAR 細胞特異的に欠損させたマウスを作製し、白血病や炎症によって引き起こされる CAR 細胞の変質や造血を解析する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Omatsu Yoshiki, Aiba Shota, Maeta Tomonori, Higaki Kei, Aoki Kazunari, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Nishimura Riko, Takeda Shu, Chung Ung-il, Nagasawa Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Runx1 and Runx2 inhibit fibrotic conversion of cellular niches for hematopoietic stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30266-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa Toshinori, Jorg David J., Watanabe Hitomi, Mizuno Seiya, Han Seungmin, Ikeda Tatsuro, Omatsu Yoshiki, Nishimura Keiko, Fujita Miyako, Takahashi Satoru, Kondoh Gen, Simons Benjamin D., Yoshida Shosei, Nagasawa Takashi	4. 巻 37
2. 論文標題 A multistate stem cell dynamics maintains homeostasis in mouse spermatogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109875 ~ 109875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Omatsu Yoshiki, Higaki Kei, Nagasawa Takashi	4. 巻 434
2. 論文標題 Cellular Niches for Hematopoietic Stem Cells and Lympho-Hematopoiesis in Bone Marrow During Homeostasis and Blood Cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr. Top. Microbiol. Immunol .	6. 最初と最後の頁 33 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-86016-5_2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omatsu Yoshiki, Nagasawa Takashi	4. 巻 33
2. 論文標題 Identification of microenvironmental niches for hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors - bone marrow fibroblastic reticular cells with salient features	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 821 ~ 826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 尾松芳樹
2. 発表標題 Niches for hematopoietic stem cells in bone marrow
3. 学会等名 Virtual Immunology 2021, AAI (アメリカ免疫学会) Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾松芳樹
2. 発表標題 骨髓造血幹細胞ニッチを構成する間葉系幹細胞
3. 学会等名 第42回 日本炎症・再生医学会学術集会, シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾松芳樹
2. 発表標題 造血幹・前駆細胞ニッチを構成するCAR細胞は骨芽細胞と骨髓脂肪細胞を供給する間葉系幹細胞である
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会, シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------