

令和 4 年 5 月 24 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：19K08837

研究課題名(和文) 骨髄微小環境(ニッチ)による造血幹細胞プールの再生機構

研究課題名(英文) Maintenance and regeneration of hematopoietic stem cell pool by bone marrow niches.

研究代表者

杉山 立樹 (Sugiyama, Tatsuki)

大阪大学・生命機能研究科・招へい研究員

研究者番号：10456791

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)：成体を循環するほとんど全ての血液細胞は造血幹細胞(HSC)から産生され、そのHSCは骨髄に存在する特別な微小環境(ニッチ)によって維持されている。これまでの研究により、CAR細胞(CXCL12高発現細網細胞)がHSCニッチの中心的な細胞であることが明らかになった。本研究では、従来不明であったマウスCAR細胞に対応するヒトの細胞(ヒトCAR細胞)を単一細胞レベルで同定した。さらに血液疾患におけるヒトCAR細胞の変化をフローサイトメトリーや組織学的解析を用いて評価する方法を確立し、慢性骨髄性白血病(CML)ではその重症度に比例してCAR細胞の遺伝子発現パターンが変化していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マウスにおいて造血幹細胞ニッチを構成する中心的な細胞であるCAR細胞(CXCL12高発現細網細胞)に対応する細胞の存在がヒトにおいても明らかにされた。ヒトCAR細胞は主要な造血サイトカイン・必須の転写因子の発現や細胞分化能においてマウスCAR細胞と多くの点で類似していた。また種々の血液疾患におけるヒトCAR細胞の変化を解析し、慢性骨髄性白血病ではその重症度に比例してCAR細胞の遺伝子発現パターンが変化することも明らかにした。これにより、ヒトCAR細胞を中心とした造血ニッチ細胞が、造血障害の程度や予後の予測等の診断や治療の重要な標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Most lineages of blood cells are generated from hematopoietic stem cells (HSCs) in bone marrow throughout adult life. In bone marrow, HSCs require and contact the special microenvironments, termed niches for their maintenance. Recent studies have demonstrated that CXCL12-abundant reticular (CAR) cells are the major cellular component of niches for HSCs and lymphoid progenitors. In this study, we identified the human counterpart of CAR cells, expressed high levels of CXCL12, SCF, FOXC1 and EBF3 and had the potential to differentiate into adipocytes and osteoblasts. We also showed that CAR cells sorted from residual bone marrow aspirates of chronic myeloid leukemia patients expressed reduced levels of CXCL12, SCF, FOXC1 and EBF3 in correlation with increased leukemic burden.

研究分野：造血幹細胞ニッチ

キーワード：骨髄 造血幹細胞 ニッチ CXCL12 CAR細胞

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）の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が明らかになった。一方で、同種造血幹細胞移植で移植された少数の造血幹細胞は、放射線照射などの前処置で造血幹細胞が枯渇した骨髄に生着し、急速に増殖し造血幹細胞プールを再生するが、これらのメカニズムの多くは不明である。また、ヒトの造血器腫瘍の根治治療において骨髄移植が実施されているが、ヒトの造血幹細胞ニッチに関する知見は多くなく、ヒト骨髄に CAR 細胞と同等の性質を持つ細胞が存在しているかは不明であった。

2. 研究の目的

骨髄再構築における造血幹細胞の局在、ニッチの構成細胞や、造血幹細胞を増幅するシグナルは、いずれも明らかではない。さらに、放射線照射等の前処置により CAR 細胞は脂肪細胞へ分化することから、CAR 細胞由来の脂肪細胞が造血幹細胞を増幅するニッチを形成する可能性が考えられるが不明である。またヒト骨髄において CAR 細胞と同等の性質を持つ細胞が存在するか否かも不明である。そこで本研究では、骨髄の再構築過程において造血幹細胞が局在するニッチを明らかにし、ニッチが造血幹細胞を増幅するメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨髄再構築において造血幹細胞が局在するニッチの解明

造血幹細胞分画のみを蛍光タンパクの発現により可視化できるようにした遺伝子改変マウスの骨髄細胞を死量放射線照射したマウスに移植し、経時的に骨髄内の造血幹細胞の局在と数の変化を測定し、増幅している造血幹細胞が接着した細胞（ニッチの候補細胞）を同定する。

(2) 骨髄再構築におけるニッチに必須の分子の探索

移植された造血幹細胞との接着を認めたニッチの候補細胞や、その他の非血球系および血液系細胞をセルソーターで分取し、次世代シーケンス等で網羅的遺伝子発現解析を行う。サイトカインや増殖因子、接着因子、機能不明の膜蛋白質、転写因子に注目して比較検討し、ニッチの候補細胞で特異的に高発現する候補遺伝子を探索する。

(3) ヒト CAR 細胞の同定と性状解析

骨髄移植は造血器腫瘍の根治を目指す治療であるが、ヒト造血幹細胞ニッチの知見は不十分であるため、ヒト骨髄を用いて非血液細胞の解析を行い、マウス CAR 細胞と同等の性質を持つ細胞が存在するか否かを解明する。

4. 研究成果

(1) ヒト CAR 細胞の同定

ヒトの造血幹細胞ニッチに関する知見は不十分であったため、ヒト骨髄サンプルを用いて非血液細胞を解析し、マウス CAR 細胞に対応する細胞の存在を検討した。まず、mRNA の発現を単一細胞レベルでフローサイトメーターによって測定できる PrimeFlow 技術を駆使し、CXCL12 を高発現する細胞分画がヒト骨髄に存在することを見出した。この細胞はマウスと同様に LEPR, KITLG, FOXC1, EBF3 を高発現していた。また免疫組織学的解析により、この細胞が CD271 陽性 EBF3 陽性の長い細胞突起を持つ細網細胞であることも示された。さらにこの細胞は培養により脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞へと分化可能であることも示された。以上より、従来不明であった CAR 細胞に対応するヒトの細胞（ヒト CAR 細胞）の存在を明らかにした（図 1）。

さらに、健常者だけでなく種々の血液疾患におけるヒト CAR 細胞の解析を行い、慢性骨髄性白血病（CML）ではその重症度に比例して CAR 細胞の遺伝子発現パターンが変化していることを明らかにした。

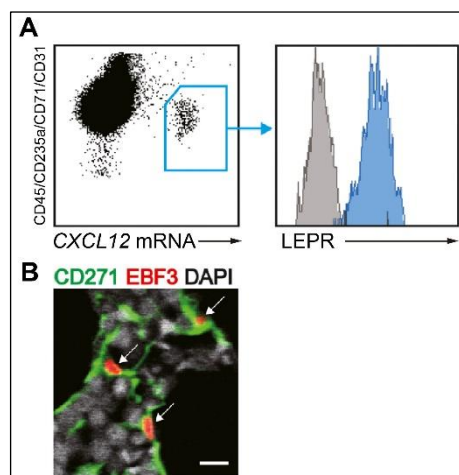


図 1 ヒト CAR 細胞の同定
フローサイトメーターによる解析(A)と組織学的解析(B)等によってヒト CAR 細胞を同定した。

(2) CAR 細胞の産生する CXCL12 造血幹細胞の数と局在に与える影響の可視化

これまでの研究により、CAR 細胞の産生する CXCL12-CXCR4 シグナルは造血幹細胞の骨髄へのホーミングと幹細胞プールの維持に必須であることが明らかになっている。しかし、CXCL12 が生体の CAR 細胞特異的に欠損誘導された時の造血幹細胞の局在の変化や数的・質的变化については不明であった。

そこで CXCL12 遺伝子を欠損誘導可能かつ CXCL12 遺伝子が残存した CXCL12 発現細胞を赤色蛍光色素 tdTomato で可視化するマウス (floxed-CXCL12-IRES-tdTomato) を作製した。このマウスと CAR 細胞特異的 Cre 発現マウス (Ebf3-CreERT2 マウス) を交配し、得られたマウスに適量のタモキシフェンを投与することによって様々な割合の CAR 細胞で CXCL12 を欠損させると共に CXCL12 を欠損していない CAR 細胞のみを可視化することが可能となった。

解析の結果、殆どの CAR 細胞で CXCL12 を欠損させると HSC 数が減少したが、半分程度の CAR 細胞で CXCL12 が欠損した場合には HSC 数は変化せず、いずれの場合においても造血幹細胞は CXCL12 を欠損していない CAR 細胞に有意に近接して存在していた。このことは造血幹細胞が骨髄内で CXCL12 を発現する CAR 細胞に依存し局在を変化させ得ることを示す結果であり、造血幹細胞の恒常性維持機構の一端が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aoki Kazunari, Kurashige Masako, Ichii Michiko, Higaki Kei, Sugiyama Tatsuki, Kaito Takashi, Ando Wataru, Sugano Nobuhiko, Sakai Takashi, Shibayama Hirohiko, Takaori Kondo Akifumi, Morii Eiichi, Kanakura Yuzuru, Nagasawa Takashi, HANDAI Clinical Blood Club	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of CXCL12 abundant reticular cells in human adult bone marrow	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.17396	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------