

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791093

研究課題名(和文) 髄外造血モデルを用いた新規ニッチ細胞の同定と性状解析

研究課題名(英文) Identification and Characterization of a Hematopoietic Stem Cell Niche in Spleen

研究代表者

水上 拓郎 (Mizukami, Takuo)

国立感染症研究所・その他部局等・室長

研究者番号：60415487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞の未分化性・多分化能の維持はニッチという微小環境によって制御されており、骨髄内では骨芽細胞が様々な機能を担っている。造血は脾臓などでも髄外造血という形で起こるが、髄外造血の維持機構については不明な点が多い。そこで我々は、実験的に髄外造血を起こすCFU-Spleenモデルと大理石病モデルを用い、髄外造血の脾臓の解析を行った。その結果、造血幹細胞(HSC)マーカーを示す細胞のいくつかは巨核球様の細胞(MLCs)に隣接している事を明らかにした。さらにこれらの細胞は造血ニッチ関連マーカーが陽性であり、分取し共培養することで、HSCの増殖を促進する事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： In adults, extrameduller hematopoiesis (EMH) can be induced by a hematological malignancy and some infectious diseases. However, the mechanism of HSCs regulation and niche cells at the EMH has not been well defined.

To reveal the mechanism of HSCs in the EMH, we utilized the c-fos knockout mouse (c-fos<sup>-/-</sup>) and CFU-S (colony forming unit-spleen) assay as an EMH model. First, to identify the main site of the HSC-niche in the EMH spleen, we performed HSC localization analysis using in situ hybridization of various HSC markers. Surprisingly, some CD34, Sca-1, c-kit, SCL/tal-1, and Tie-2 expressing cells were located near megakaryocyte like cells (MLCs). When we co-cultured HSCs with isolated MLCs, the numbers of HSC were significantly increased compare to with a liquid culture system. Taking these data together, we suggested that MLCs have the potential to support HSC proliferation.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：血液内科学 造血ニッチ 髄外造血 ATL

## 1. 研究開始当初の背景

溶血性貧血や、慢性低酸素症、肝硬変、感染症、悪性腫瘍などの影響によって一過性に脾臓や肝臓で髄外造血を呈する事が明らかとなっているが、髄外造血では (1) 一体どのような分子メカニズムで造血幹細胞の幹細胞特性が維持されているのか？ (2) どのような細胞が髄外造血ニッチを担っているか？ などについては不明な点が多い。そこで本研究課題では髄外造血モデルマウスおよび主に脾臓において増殖する悪性腫瘍に着目して、新規ニッチ細胞の同定、その特性解析を行う。

## 2. 研究の目的

造血幹細胞の持つ幹細胞特性は、細胞内在性のプログラムと微小環境 (すなわち造血ニッチ) によって制御されていると考えられてきた (Scofield et al., 1978)。近年、BrdU のラベル法を用いた研究により、N-cadherin 陽性 -catenin 陽性の骨芽細胞 (SNO cells) 一いわゆる Osteoblastic Niche が造血幹細胞ニッチとして関与している事が示され (Zang et al., 2003)、さらに Tie2/Ang シグナル (Arai et al., 2004)、TPO/Mpl シグナリング (Yoshihara et al., 2007) がこれらに重要な影響を与えている事が明らかとなった。一方で、CD150 をマーカーとして用いた場合、骨髄内の血管内皮細胞付近に造血幹細胞ニッチが存在する一いわゆる Vascular Niche という概念が提唱された (Kiel et al., 2005)。また同様に peri-vascular の細網細胞 (CAR 細胞) もこれらの Vascular Niche の形成に重要な役割を果たしている事が明らかとなった (Sugiyama et al., 2006)。ところが Xie らは 2009 年にその論文の中で殆どの血管内皮と骨芽細胞が 20um の近接範囲に存在し、Osteoblastic niche と Vascular Niche を分離して考える事は難しいことを示した。同論文では造血幹細胞の短時間の追跡実験により、骨芽細胞ニッチが HSC の自己複製に関与している事を示した。一方、AML などの腫瘍幹細胞 (LSC) の研究においても、AML-LSC は骨芽細胞ニッチに存在し、細胞周期が G0 期にあり、薬剤耐性を示すことが示された (Saito et al., 2010)。また骨芽細胞特異的に miRNA を制御する Dicer を破壊することで、MDS 様な病態、AML 様な病態が再現された (Raaijmakers et al., 2010)。このことは、骨芽細胞が造血幹細胞の維持のみならず、腫瘍幹細胞のニッチとしてもその制御に関与すると同時に、むしろ積極的に腫瘍へのシフトを促進する事を示し、骨芽細胞ニッチの新たな役割を提示したといえる。

通常、造血幹細胞は骨髄内で維持されるが、溶血性貧血や、慢性低酸素症、肝硬変、感染症、悪性腫瘍などの影響によって一過性に脾

臓や肝臓での造血が亢進し、髄外造血を呈する事が明らかとなっている。また発生学的にも、胎仔造血では造血幹細胞は肝臓や脾臓に位置しているが、それらのニッチ細胞については不明な点が多い。このように髄外造血が行われる場合においては、骨髄のような骨芽細胞は存在しないにも関わらず、(1) 一体どのような分子メカニズムで造血幹細胞が幹細胞特性を維持しているか、(2) 骨髄造血ニッチ細胞の代わりにどのような細胞が髄外造血ニッチを担っているかについては不明な点が多い。

そこで本研究課題では髄外造血モデルマウスおよび主に脾臓において増殖する悪性腫瘍に着目して、新規ニッチ細胞の同定、その特性解析を行う。我々の研究の独創性の高い点は、新規のニッチ細胞 (MLC ; 巨核球様細胞) を既に同定している事である。これに腫瘍モデルを組み合わせる事で MLC の多様な機能を明らかにする。髄外造血モデルを用いる事であらたなニッチ細胞の同定し、造血幹細胞の ex vivo 増幅への活用、腫瘍幹細胞をターゲットとした治療薬の開発方法等に応用可能であると考ええる。

## 3. 研究の方法

髄外造血モデルとして c-fos ノックアウトマウスおよび CFU-S 脾臓を用いて、髄外造血の脾臓切片を用い、Laser Capture Microdissection 法により MLC 細胞を分離し、FACS によって分取した低純度 MLC 分画、巨核球分画との網羅的遺伝子発現解析を行い、MLC に高発現している分子を同定し、MLC の発生メカニズムを明らかにする。また、造血ロードマップ上にある各種細胞分画 (HSC, LMPP, CLP, MEP, GMP および preMeg) を分取し、トレース実験を行い、MLC の起源を明らかにする。また ATL 腫瘍モデルを用い、腫瘍形成時に同様の MLC が認められるかを明らかにし、通常の髄外造血 MLC と悪性腫瘍 MLC の違いを網羅的遺伝子解析法で調べる。新規腫瘍ニッチ分子が同定されて場合、SiRNA 法などを用い、腫瘍形成能の検討を行う。

## 4. 研究成果

まず、大理石病モデルマウスでもある Fos KO マウスを解析した結果、骨髄腔は骨芽細胞によって占拠され、脾臓での造血が亢進し、赤脾髄が発達し、脾洞や脾索の形成が多数認められた。Tie2 や SCL/tal1 陽性の造血幹細胞は脾洞近傍に多数存在する事が明らかとなった。興味深い事に造血幹細胞の周囲には巨核球様細胞 (MLCs; Megakaryocyte-like cells) が多数認められ、Sca1、Spp1 陽性細胞の一部は MLC と接して存在している事が明らかとなった。MLC は CD41 や N-cadherin を

発現していたため、脾臓での造血維持において重要な役割を果たす事が示唆された。

そこでX線照射後の骨髄移植による一過性の脾臓での造血(CFU-S)においても同様の現象が認められるかを検討した。CFU-S1の脾臓には既に未分化なMLCが認められ、CFU-S4ではMLCが多数認められた。CFU-S8ではMLCがクラスターを形成し、Tie2, SCL/tal1, Sca1, Spp1陽性細胞もこのMLC近傍に存在し、また、MLC自体もSpp1, RANKL, SDF-1, N-Cadherinを発現している事が明らかとなった。Ly5.1を用いた移植実験から、これらのMLCの70~80%が移植細胞由来である事が明らかとなった。

これらの細胞をFACSによって分取し、HSCと今日培養した結果、2-3倍の増殖促進能を有する事が明らかとなった。また、組織切片上のMLCをレーザーキャプチャーマイクロダイゼクション法で分取し、DNAマイクロアレイ解析を行った結果、巨核球とは明らかに異なる遺伝子発現プロファイルを示している事が明らかとなった。

#### 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)

1. Mizukami T, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Araki K, Furuhashi K, Ishii KJ, Hamaguchi I, Yamaguchi K. System vaccinology for the evaluation of influenza vaccine safety by multiplex gene detection of novel biomarkers in a preclinical study and batch release test. *PLoS One*. 2014; *in press*.
2. Kasama Y, Mizukami T, Kusunoki H, Peveling-Oberhag J, Nishito Y, Ozawa M, Kohara M, Mizuochi T, Tsukiyama-Kohara K. B-cell-intrinsic hepatitis C virus expression leads to B-cell-lymphomagenesis and induction of NF- $\kappa$ B signalling. *PLoS One*. 2014; 9(3): e91373.
3. Takizawa K\*, Nakashima T\*, Mizukami T\*, Kuramitsu M, Endoh D, Kawauchi S, Sasaki K, Momose H, Kiba Y, Mizutani T, Furuta RA, Yamaguchi K, Hamaguchi I. Degenerate polymerase chain reaction strategy with DNA microarray for detection of multiple and various subtypes of virus during blood screening. *Transfusion*. 2013; 53: 2545-55.  
\*Equally First
4. Luc S, Luis TC, Boukarabila H, Macaulay IC, Buza-Vidas N, Bouriez-Jones T,

Lutteropp M, Woll PS, Loughran SJ, Mead AJ, Hultquist A, Brown J, Mizukami T, Matsuoka S, Ferry H, Anderson K, Duarte S, Atkinson D, Soneji S, Domanski A, Farley A, Sanjuan-Pla A, Carella C, Patient R, de Bruijn M, Enver T, Nerlov C, Blackburn C, Godin I, Jacobsen SE. The earliest thymic T cell progenitors sustain B cell and myeloid lineage potential. *Nat Immunol*. 2012; 13: 412-9.

5. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2012; 119: 2376-84.

〔雑誌論文〕(計5件)

〔学会発表〕(計5件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

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

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
水上拓郎(国立感染症研究所)  
研究者番号：60415487

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：