

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590262

研究課題名(和文)三次元解析による骨髄ストローマ細胞の造血制御機構の検討

研究課題名(英文) Regulation of hematopoiesis by bone marrow stromal cells in three-dimensional environment

研究代表者

相沢 信(AIZAWA, Shin)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：30202443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：造血現象は造血幹細胞という「種」が、造血微小環境という「畑」において育つ過程を示すものであり、種、畑いずれの欠陥も貧血等の原因となる。本研究では「畑」の最も重要な構成細胞であるストローマ細胞が、造血組織において造血因子等の種々の生理活性物質の産生を介して血球の産生を制御していることを明らかとした。この制御機構がバイオストレス下にはその状況を素早く認知し、反応することにより生体の恒常性が維持されていることを確認した。またストローマ細胞を固相化した微粒子担体を用いた試験管内三次元構造を持つ造血環境を作製し、ストローマ細胞と造血幹細胞が相互関係を保つことで造血現象が維持されていることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells are regulated by bone marrow microenvironment. Stromal cells, as distinguished from hematopoietic cells, are an essential compartment of this microenvironment. In this study, the stromal cells are shown to regulate the proliferation and differentiation of hematopoietic cells through the mechanism by producing various hematopoietic regulatory factors. Further, a novel in vitro three-dimensional (3D) hematopoietic culture system was developed. In this culture system, stromal cells in 3D culture are stable and regulate hematopoietic cell proliferation and differentiation "quietly" during the culture, resulting in the presence of stable, resting hematopoietic stem cells in 3D culture.

研究分野：造血組織

キーワード：細胞分化・組織形成 造血微小環境 骨髄ストローマ細胞 三次元培養 造血因子

## 1. 研究開始当初の背景

造血微小環境は、線維芽細胞、脂肪細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、マクロファージ等の細胞からなる造血幹細胞をとりまく様に存在する「ストローマ細胞」と総称される間質系細胞より構成され、造血幹細胞の増殖、分化を制御していると考えられている。本研究者は、ストローマ細胞の試験管内培養法を開発し、*in vitro*での造血現象の再現に成功し、造血現象におけるストローマ細胞機能について検討を重ねてきた(Aizawa S et al. *Exp Hematol* 22; 1994)。特に造血制御機構において、アポトーシス誘導を介した負の制御機構の存在を確認し、細胞膜結合型因子および低分子液性抑制因子の産生を介してストローマ細胞がその中心的役割を果たしていることを初めて報告し、機能的分子の分離に成功した(Aizawa S et al. *Exp Hematol* 28; 2000, Harada T, Aizawa S et al. *Oncol Reports* 14; 2005)。国内外においてもストローマ細胞機能については近年多数の報告があり、ストローマ細胞が産生する造血幹細胞の増殖、分化に関与する多くの造血因子が発見され、そのいくつかはすでに貧血等に対する治療薬として臨床応用が開始されている。しかしながらこれら造血因子は造血現象をあくまで断片的に支持しているにすぎず、事実、長期間にわたり人工的造血現象を再構築するまでには至らず、また維持される造血細胞も特定の系統の血球系に限定されている。この原因として、従来の研究のほとんどが *in vitro*で行われており、複雑な要素から成り立っている生体における造血現象の解明に対するアプローチがほとんど行われていなかったことが挙げられる。

近年、解明の手がかりとなるモデル動物が見出された。老化促進マウス (Senescence-accelerated mice: SAM) と呼ばれるマウスは、AKR系マウスの変異型であり正常マウスと比較してはるかに寿命が短い(約40-50週)特徴を有する。このマウスの造血系についての検討で、約30週齢頃より貧血症状が発現することが観察され、この異常は「種」である造血幹細胞自身には全く機能的障害は認められないものの、「畑」である造血微小環境機能に問題を有することが明らかとなった(Tsuboi I, Aizawa S et al. *Exp Bio Med* 229; 2004, Fukumoto T, Aizawa S et al. *Int Immunopharmacol* 6; 2006, Tsuboi I, Aizawa S et al. *J Appl Toxicol* 28; 2008)。本研究はSAMを用いて正常マウスとの比較実験を行うことにより、生体内でのストローマ細胞を介した造血制御機構の解明を、さらに異常造血微小環境の正常化(治療)の可能性を検討することを目的とする。

特に本研究者は、生体における造血組織を反映する三次元的 *in vitro* 培養法などストローマ細胞を研究するに適した実験モデルの開発に成功した(Yasuda M, Aizawa S et al.

*Tissue Cell* 43; 2011, Hirabayashi Y, Aizawa S et al. *Exp Biol Med* 2011)。これらの新規開発手段を用いて、*in vivo* および *in vitro* 両方向からアプローチすることにより、ストローマ細胞固有の機能の解析を行うこと、造血現象の実態を解明することが本研究の目的である。

## 2. 研究の目的

造血現象は造血幹細胞という「種」が、造血微小環境という「畑」において育つ過程を示すものであり、種、畑いずれの欠陥も結果的に貧血など造血器疾患の原因となる。本研究は「畑」である造血微小環境の構成要素としての「ストローマ細胞」に注目し、生体内(造血組織)における存在様式について、またこれら細胞が実際にどの様に造血幹細胞の増殖、分化に関わりを持って機能しているかを *in vivo*、さらに新規に開発した三次元培養法を用いた *in vitro* の両面から検討する。特に近年見出されたストローマ細胞機能に異常のあるSAMを用いて正常マウスと比較実験を行い、生体内組織、および三次元培養内でのストローマ細胞の構成様式、造血制御に関わる機能を解析することにより「正しい畑とは何か」という観点からストローマ細胞の意義について解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

多種の細胞より構成される「ストローマ細胞」は *in vitro* では培養皿底面に付着して発育する細胞として観察可能である。しかしながら生体内造血組織におけるこれら細胞の存在様式、また実際に造血幹細胞の増殖、分化にどのような関わりを持って機能しているかについては具体的な報告はない。本研究ではストローマ細胞に対する特異的抗体を用いた免疫組織学的検討を行い造血組織におけるストローマ細胞の分布様式についてSAMおよび正常マウスとの比較検討を行う。また造血因子産生等を指標として造血支持機能について比較検討を行う事によりストローマ細胞の機能評価を行う。さらにこれらの研究成果を踏まえて *in vitro* での三次元培養を行い、同様にストローマ細胞機能のより詳細を検討する。この際に恒常的造血状態においては造血因子産生が顕著でないことが予想されるため、炎症反応を惹起する菌体内毒素である lipopolysaccharide(LPS)、造血障害を引き起こす抗がん剤である5-Fluorouracil(5-FU)あるいは低酸素といったバイオストレス下における反応性を観察することにより、ストローマ細胞の造血制御機能について検討を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) SAMのストローマ細胞の特徴

SAMは若年期には正常の造血を認めるが(non-stromal cell impairment mice: non-SCI)、30週齢以降加齢と共に貧血等の血液学的異常所見を呈し、その原因としてストローマ細胞機能異常に起因することが明らかとなった(stromal cell impairment mice: SCI)。抗N-cadherin抗体を用いた免疫組織学的方法により non-SCI(young mouse)および SCI(old mouse)の造血組織におけるストローマ細胞分布様式、存在密度について検討した結果、両者に明らかな相違は認めなかった。またこれらストローマ細胞は抗Sca-1抗体で染色された造血幹細胞と密に接触しながら存在していることが確認された。単離したストローマ細胞のRT-PCR法によるmRNAの発現を検討した結果では、SCIでは測定したIL-6およびGM-CSF遺伝子発現が低下傾向にあることが明らかとなった。すなわち両者マウス造血組織において、ストローマ細胞の量的変化はほとんど認めないが、SCIでのサイトカイン産生等の質的機能低下が貧血等の原因となっていることが示唆された。

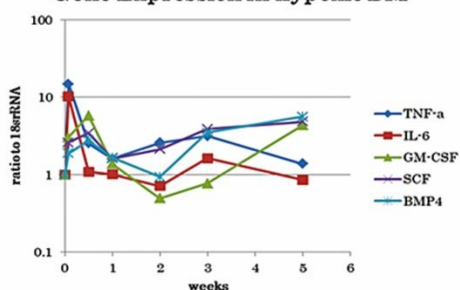
##### (2) ストローマ細胞による造血制御機構

本実験では恒常的造血での安定したストローマ細胞の機能の評価が困難であることより、低酸素下、LPSまたは5-FU投与マウスを用いて、赤血球、肥満細胞およびBリンパ球造血に関わるストローマ細胞の関与を検討した。

##### 赤血球造血とストローマ細胞

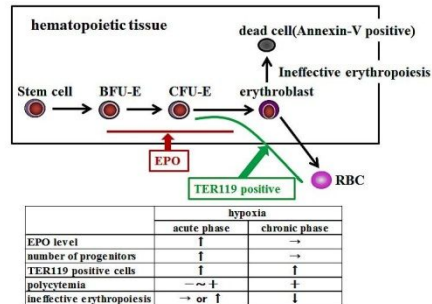
高地などの低酸素状態においては多血状態となって組織への酸素の供給を維持することにより生体の恒常性が維持されることが報告されている。低酸素ストレスになると腎臓を主体とする組織よりのerythropoietin(EPO)産生が亢進し、赤血球造血を促進する。しかしながらEPO産生亢進は一過性であり、長期の低酸素状態における多血状態のメカニズムを説明することは困難である。10%低酸素ストレス下のC57/BL6マウスを用いた検討で、ストローマ細胞のサイトカイン産生能をRT-PCR法を用いて検討した結果、ストローマ細胞よりのstem cell factor(SCF)およびbone morphogenetic protein(BMP)-4産生の亢進が認められ、これらを介して赤血球の成熟過程における無効造血が減少することより多

図1 Gene Expression in hypoxic BM



血が維持されていることが明らかとなった(図1)。図2にそのメカニズムの模式図を示す。ストローマ細胞は低酸素状態を感知し、サイトカイン産生を介して赤血球造血を制御していると考えられる。

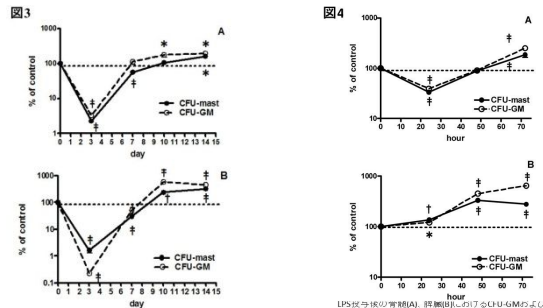
図2 Erythropoiesis in hematopoietic tissue



##### 肥満細胞造血とストローマ細胞

C3H/HeNマウスに抗がん剤として150mg/kgの5-FUあるいは5μg/bodyのLPSを経静脈的に投与後、経時的に末梢血の血液学的変化および骨髄、脾臓における肥満細胞前駆細胞(CFU-mast)数の変動を測定した。またマウスを安楽死させた後、骨髄、脾臓のストローマ細胞を分離し、RT-PCR法を用いて、種々のサイトカインのmRNA発現について検討を行った。

5-FU投与後マウスでは骨髄、脾臓ともに顆粒球・マクロファージ前駆細胞(CFU-GM)およびCFU-mast数の急激な減少が認められ、7日後には元のレベルに回復し、その後さらにovershootしているのが観察された(図3)。



5-FU投与後の骨髄(A)、脾臓(B)におけるCFU-GMおよびCFU-mast数の変動。両前駆細胞ともに急激な減少後に7日目には回復を認める。

LPS投与後の骨髄(A)、脾臓(B)におけるCFU-GMおよびCFU-mast数の変動。両前駆細胞ともに急激な減少後に70時間には回復を認める。

一方LPS投与マウスの骨髄では、両前駆細胞の減少は緩やかであるが、投与2-3日には元のレベルを超えて増加しているのが観察された(図4)。

5-FUおよびLPS投与後のストローマ細胞におけるサイトカイン遺伝子発現をRT-PCR法で測定した結果、5-FU投与後ではstem cell factor(SCF)発現の急激な増強を認めている(図5)。これら結果は骨髄、脾臓における肥満細胞造血が、抗がん剤や炎症性物質などの外的ストレスに対し、ストローマ細胞からのサイトカイン産生等により制御されていることを示している。

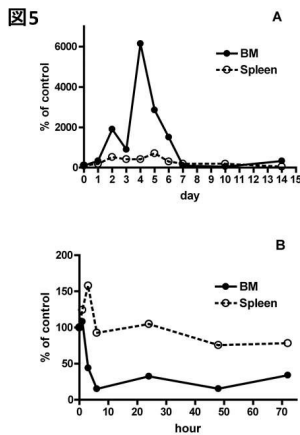


図5 5-FUおよびLPS投与後の骨髄、脾臓におけるSCF/TGFβサイトカイン遺伝子発現  
5-FU(A)およびLPS(B)投与後のSCF/TGFβ遺伝子発現を比率で示す。5-FU投与後ではSCFの遺伝子発現の急速な増強も認めるのに対し、LPS投与では反応は穏やかである。

一方、高齢者を想定した老化促進モデルマウス(SAM)を用いた同様の実験では、5-FU投与後にCFU-GM、CFU-mastともに急激な減少を認める。CFU-GMは若齢マウス同様に7-10日目頃には元の状態にまで回復が認められたが、CFU-mastは減少状態が遷延し、投与21日目でも元の状態の60-70%までしか回復していないのが観察された。またストローマ細胞からのSCF産生能も低下しており、agingと共にストローマ細胞機能も低下し、造血制御機構が不安定化している可能性が示唆された。

以上の結果より肥満細胞造血において、ストローマ細胞は造血因子産生を介して造血制御を行っており、感染や抗がん剤投与後等の急性ストレスに対して速やかな対応機構が存在している。またストレスの種類によってストローマ細胞の反応は異なり、殺細胞効果の強い5-FU投与後では高いサイトカイン産生が認められるのに対し、炎症性物質であるLPSに起因した造血抑制に対しては穏やかなサイトカイン産生となり、個体としてのホメオスタシスが維持されていると考えられる(図6)。

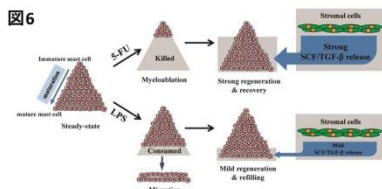


図6 5-FUおよびLPS投与後の骨髄、脾臓におけるストローマ細胞による肥満細胞造血  
殺細胞効果の強い5-FU投与後では高いサイトカイン産生が、炎症性物質であるLPSに起因した造血抑制に対しては穏やかなサイトカイン産生とストレスの種類に応じて異なる対応を行いながら肥満細胞造血制御を行っている。

### B細胞造血とストローマ細胞

B細胞造血においてもストローマ細胞による造血制御機構の存在が報告されている。特にストローマ細胞が産生するinterleukin(IL)-7は促進的に、TGF-βは抑制的に作用することが知られており、両者のバランスが保たれていることにより安定したB細胞造血が維持されている(図7)。本研究で

は炎症ストレス時のB細胞造血の制御について検討する目的で、LPS投与後マウスの造血動態について検討した。

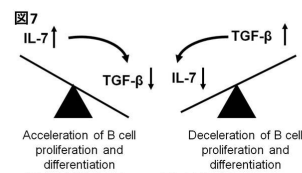


図7 B細胞造血を制御するストローマ由来サイトカイン  
B細胞造血では、ストローマ細胞由来のIL-7は促進的に、TGFβは抑制的に機能し、両者バランスにより制御されている。

C57BL/6Jマウスに5μg/bodyのLPSを経静脈的に投与後、経時的に末梢血の血液学的変化および骨髄、脾臓におけるB細胞前駆細胞(CFU-preB)数の変動を測定した。またマウスを安楽死させた後、骨髄、脾臓のストローマ細胞を分離し、RT-PCR法を用いて、種々のサイトカインのmRNA発現について検討を行った。LPS投与後に骨髄CFU-preB、CFU-GM数はともに減少する。CFU-GMが3日目頃より回復し、overshootするのに対し、CFU-preBの回復は遅延し、7日目頃ようやく元の状態まで復するのが観察された(図8)。脾臓に存在するCFU-preBは骨髄に比較してもともと少数であるが、LPS投与後も変動はわずかであり、CFU-GM数の変動と異なる動態であることが観察された。

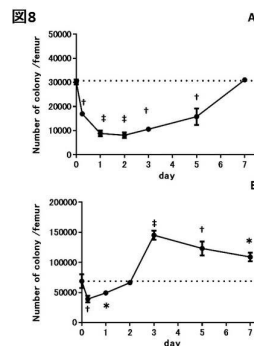


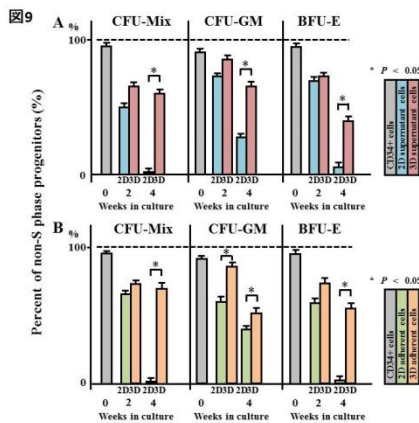
図8 LPS投与後の骨髄CFU-preBおよびCFU-GM数の変動  
CFU-preB(A)は投与直後より減少し、CFU-GM(B)が回復する3日目以降も引き続き減少している。

RT-PCR法によるストローマ細胞のサイトカイン産生についての検討では、IL-7、TGF-β共にLPS投与後の顕著な変動は認めなかった。しかしながらtumor necrosis factor(TNF)-α遺伝子発現は投与後の著しい増加を認めている。TNF-αはB細胞造血に対し抑制的作用を示すことが報告されており、骨髄での遷延するCFU-preBの減少は、TNF-αの産生亢進にもとづくものと考えられる。これら結果は炎症性ストレスとしてのLPS投与後において、サイトカイン産生等を含めてストローマ細胞を介したB細胞造血調節機構が機能し、生体の維持をつかさどっていることを示唆するものである。

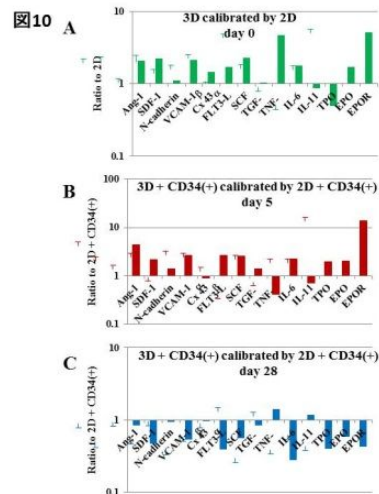
(3) 三次元培養によるストローマ細胞の解析  
新規に開発した微粒子担体に骨髄由来ストローマ細胞を接着させたより生体に近い三次元培養系を用いて造血細胞の増殖・分化について経時的に観察した。造血幹細胞は臍帯血由来CD34陽性細胞を使用し、培養7日ごとに培地交換するとともに、培養中の細胞数、前駆細胞数を測定し、ストローマ細胞非存在下、ストローマ細胞を含む従来の二次元培養

と比較検討した。三次元培養では従来の培養法に比較し、8週以上にわたり造血前駆細胞が維持されていることが確認された

本培養中の造血細胞動態を検討する目的で、Hydroxyurea (HU) cell suicide 法を用いて培養上清中あるいはストローマ細胞層に付着した種々の前駆細胞の細胞周期について測定した(図 9)。対照とした二次元培養では培養 2 週目、4 週目と上清中、付着細胞層中のほとんどの前駆細胞が細胞周期に入っているのに対し、三次元培養では培養 4 週目においても 5 割以上の前駆細胞が休止期(non-S 期)のままであり、必要とされる細胞のみが増殖・分化し、休止期細胞はストローマ細胞にコントロールされながら安定した状態で存在しているのが明らかとなった。



さらに培養中のストローマ細胞について、特に造血に關与する 14 種の造血因子の遺伝子発現について検討を行った(図 10)。なお選択した 12 種の遺伝子はいずれもストローマ細胞が発現、産生していることが報告されている。MS-5 単独培養における造血因子遺伝子発現では(図 10A)、三次元培養すると二次元に比較して検討した 14 種のうち IL-11 と TPO 以外の遺伝子発現が増強しており、ストローマ細胞が活性化しているのが確認された。ストローマ細胞培養に CD34 陽性細胞を加えた共培養において、同様に三次元、二次元培養でのストローマ細胞の遺伝子発現を比較すると、共培養 5 日後では三次元培養ストローマ細胞で 11 種の遺伝子発現が増強しているが(図 10B)、培養が安定してきた 28 日後では TNF- $\alpha$ 、IL-11 を除いて各遺伝子発現は低下しており(図 10C)、ストローマ細胞の造血因子産生が穏やかとなりながら造血細胞増殖、分化を支持していることが明らかとなった。これら結果は培養初期の段階では三次元培養におけるストローマ細胞は二次元培養との比較において、活性化して造血細胞増殖、分化を支持しているのに対し、造血細胞増殖、分化が安定するにともないストローマ細胞自身の造血因子産生等の機能も安定化することを意味すると考える。



#### (4) まとめ

本研究により造血微小環境構成因子であるストローマ細胞の機能の重要性が確認された。ストローマ細胞は恒常的造血、またバイオストレス下等における反応性造血における造血制御機構において、造血因子産生などを介して中心的役割を担っており、その機能の破綻は貧血などの障害を発生させる要因となっていることが明らかとなった。また SAM を用いた検討で、老化にともないストローマ細胞機能が低下し、それにより造血障害が発生する可能性が示唆された。さらに三次元培養を用いた検討で、ストローマ細胞は造血因子産生等の機序を介して造血細胞の増殖、分化を支持していること、さらに造血状況にともないストローマ細胞自身の機能が変化しながら支持機能を担っていることが確認された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Harada T., Tsuboi I., Hirabayashi Y., Kosaku K., Naito M., Hara H., Inoue T., Aizawa S. Decreased “ineffective erythropoiesis” preserves polycythemia in mice under long-term hypoxia. Clin Exp Med, 査読有, 15: 179-88, 2015
2. Taki M., Tsuboi I., Harada T., Naito M., Hara H., Inoue T., Aizawa S. Lipopolysaccharide reciprocally alters the positive and negative balance regulated by stromal cells between myelopoiesis and B lymphopoiesis in C57BL/6 mice. Biol Pharm Bull, 査読有, 37: 1872-1881, 2014
3. Hotta K., Nashimoto A., Yasumura E., Suzuki M., Azuma M., Iizumi Y., Shima D., Nabeshima R., Hiramoto M., Okada A., Sakata-Sogawa K., Tokunaga M., Ito T., Ando H., Sakamoto S., Kabe Y., Aizawa S., Imai T., Yamaguchi Y., Watanabe H., Handa H. Vesnarinone suppresses TNF $\alpha$

- mRNA expression by inhibiting valosin-containing protein. Mol Pharmacol, 査読有, 83: 930-938, 2013
4. Iriyama N., Yuan B., Yoshino Y., Hatta Y., Horikoshi A., Aizawa S., Takeuchi J., Toyoda H. Aquaporin 9, a promising predictor for the cytotoxic effects of arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cell lines and primary blasts. Oncol Rep, 査読有, 29: 2362-2368, 2013
  5. Ohashi A., Suetake Y., Saeki Y., Harada T., Aizawa S., Hasegawa H. Rapid clearance of supplemented tetrahydrobiopterin is driven by high-capacity transporters in kidney. Mol Genet Metab, 査読有, 105: 575-581, 2012
  6. Tsuboi I., Harada T., Hirabayashi Y., Kanno J., Inoue T., Aizawa S. Age-related decline of mast cell regeneration in senescence-accelerated mice (SAMP1) after chemical myeloablation due to senescent stromal cell impairment. Exp Bio Med, 査読有, 237: 1289-1297, 2012
  7. Iriyama N., Yuan B., Hatta Y., Horikoshi A., Yoshino Y., Toyoda H., Aizawa S., Takeuchi J. Granulocyte colony-stimulating factor potentiates differentiation induction by *all-trans* retinoic acid and arsenic trioxide and enhances arsenic uptake in the acute promyelocytic leukemia cell line HT93A. Oncol Rep, 査読有, 28: 1875-1882, 2012
  8. Aisaki K., Tsuboi I., Harada T., Oshima H., Yamashita A., Hirabayashi Y., Kanno J., Inoue T., Aizawa S. Neopterin, inflammation-associated product, prolongs erythropoiesis suppression in aged SAMP1 mice due to senescent stromal-cell impairment. Exp Biol Med, 査読有, 237: 279-286, 2012

〔学会発表〕(計 6件)

1. Harada T, Tsuboi I, Naito M, Kosaku K, Hara H, Aizawa S. : Preserved polycythemia in mice under long-term hypoxia 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2015年3月21~23日 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
2. 原田智紀、壺井 功、内藤美智子、古作和寛、原 弘之、井上 達、相沢 信 : 低酸素環境下飼育マウスの造血制御機構について 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2014年3月27~29日 自治医科大学(栃木県・下野市)

3. Harada T, Tsuboi I, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. : Age-related stromal cell impairment reduces mast cell regeneration in mice after myeloablation 第 75 回日本血液学会学術集会 2013年10月11日~13日 札幌市教育文化会館(北海道・札幌市)
4. 壺井 功、原田智紀、平林容子、菅野 純、井上 達、相沢 信 : SAMP1 : 加齢に伴う間質細胞の機能低下により 5-FU 投与後の肥満細胞造血反応は低下する 第 28 回老化促進モデルマウス研究協議会 2013年7月6~7日 愛知学院大学歯学・薬学図書館情報センター(愛知県・名古屋市)
5. 原田智紀、壺井 功、古作和寛、原 弘之、井上 達、相沢 信 : 加齢マウスにおけるストローマ細胞機能低下が肥満細胞造血に与える影響について 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2013年03月28~30日 香川国際会議場(愛媛県・高松市)
6. Harada T., Hokari T., Tsuboi I., Hirabayashi Y., Kanno J., Inoue T., Aizawa S. : Regulation of mast cell development by hematopoietic microenvironment in mice 第 74 回日本血液学会学術集会 2012年10月19~21日 京都国際会議場(京都府・京都市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

相沢 信 (AIZAWA, Shin)

日本大学・医学部・教授

研究者番号 : 30202443

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し