

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790486

研究課題名(和文) 血液細胞分化経路におけるミエロイド-B前駆細胞段階の存在の検証

研究課題名(英文) Validation of the presence of myeloid-B progenitor stage towards to B cells on the differentiation pathway of hematopoiesis

研究代表者

増田 喬子 (MASUDA, KYOKO)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：40565777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、造血過程においてエリスロイド細胞，T細胞，B細胞への系列決定過程において，それぞれにミエロイド系への分化能が保持されるというミエロイド基本型モデルを提唱してきた．本研究ではこのモデルにおいて，ミエロイド-B前駆細胞の存在を検証することを目的とした．ストローマ細胞との共培養系を用いた検証結果より，プロB細胞ではもはや他系列への分化能は失われていたが，プレプロB細胞ではT細胞への分化能はほぼ失っているがミエロイド系列への分化能はまだ保持していることが示された．この結果はB細胞への系列決定過程においてミエロイド-B前駆細胞段階の存在を実証するものである．

研究成果の概要(英文)：We have proposed a model of hematopoiesis in which myeloid potential is retained a long with the developmental pathway towards to T, B and erythroid lineages. In this project, we aimed to validate the presence of myeloid-B progenitors on the way from multipotent progenitors towards to B cells using co-culture system with stromal cells. We found that pre-pro B cells still retain the myeloid potential while hardly maintaining T cell potential, and that proB cells terminate the differentiation potential to other lineages. These results substantiate that the myeloid-B progenitor stage exist on the differentiation pathway towards to B cells. This project has been successfully achieved.

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：免疫

キーワード：免疫学 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

造血における系列決定過程を解明するためには、造血幹細胞から単能性前駆細胞に至る分化経路地図が必須である。造血における造血前駆細胞の系列決定の過程については、いくつかのモデルが提唱されている。一般的には初めの分岐点でミエロイド系と赤血球系の共通前駆細胞と、T細胞とB細胞の共通前駆細胞に分岐するモデルが信じられてきた。一方、申請者らのグループは、独自に開発したクローナル培養法 (MLP assay: multi-lineage progenitor assay) を用いて、造血における系列決定過程を明らかにしてきた (Kawamoto et al, Int Immunol, 1997; Immunity, 2000)。得られた知見に基づいて、ミエロイド基本型モデルを提唱した (2001, Katsura and Kawamoto, Int Rev Immunol, Kawamoto, Trends Immunol, 2006)。従来のモデルでは造血幹細胞からの最初の分岐で T-B 共通前駆細胞 (common lymphoid progenitors: CLP) とそれ以外の系列の前駆細胞 (common myelo-erythroid progenitors: CMEP) に分けられるとされていた (図 1A) が、申請者らが提唱するモデルでは、ミエロイド系への分化能がエリスロイド、T、B 系列にそれぞれ保持される (図 1B)。2008年にミエロイド-T 前駆細胞の存在を実証した (Wada et al, Nature, 2008)。

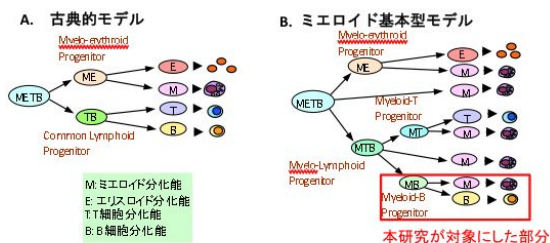


図1. 造血における分化経路モデル

2. 研究の目的

ミエロイド基本型モデルにおいて、ミエロイド-T 前駆細胞の存在は実証したが、一方ミエロイド-B 前駆細胞については未だに議論が分かれている。従って、本研究では

B細胞へ向かう分化経路上に M-B 前駆細胞というステージがあるかどうかという点を検証することを目的とした。具体的には胎仔肝臓/骨髄から各分化段階の B 前駆細胞を取り出し、クローナルアッセイによって分化能を測定する。

3. 研究の方法

マウス胎仔肝臓からいろいろな分化段階の B 前駆細胞を単離する。造血幹細胞、ミエロリンフォイド前駆細胞、プレプロ B 細胞、プロ B 細胞などを用いる。これらの細胞をいろいろなクローナルアッセイで解析し、分化能を明らかにする。クローナルアッセイは、ストローマ細胞を用いた共培養系を用いて行う。ストローマ細胞としては、PA6 (ミエロイド系細胞だけ誘導)、TSt-4 (ミエロイド系細胞と B 細胞を誘導)、TSt-4/DLL1 (TSt-4 にノッチリガンドの DLL1 を導入したもの、ミエロイド系細胞と B 細胞を誘導) を用いる。

4. 研究成果

まず胎仔期におけるミエロイド-B 前駆細胞について検証を行った。マウス胎仔肝臓からいろいろな各分化段階の前駆細胞を単離し、クローナルアッセイを行った。多能前駆細胞 (Lin⁻c-kit⁺Sca-1⁺細胞) は T, B, ミエロイド系を支持する中立的な培養環境 (MLP アッセイ) では全ての系列を作り、T, ミエロイド系を支持するが B 系を抑制する環境 (TSt-4/DLL1 細胞との共培養) では T とミエロイドを生成した (図 2)。

一方プレプロ B 細胞 (Lin⁻c-kit^{lo}IL-7R⁺PIR-B220⁻細胞) は MLP アッセイでは B 細胞のみを生成したが、TSt-4/DLL1 細胞との共培養系ではミエロイド細胞だけを生成した。プロ B 細胞 (Lin⁻c-kit^{lo}IL-7R⁺PIR-B220⁺細胞) はどちらの培養系でも B 細胞だけを生成した。

これらの結果より、T 細胞の分化能を消失した後もミエロイド-B という分化能を有する段階があることが明らかとなった。一方、成体における造血において胎生期と同

様であると考えられ得る結果が得られたが、B細胞に関しては胎生期と成体では生成されるB細胞の種類が異なるという報告もあり、この点を鑑みた上で確証のある結果を得るためには、さらに詳細な解析が必要と考えている。本研究において得られた結果はミエロイド基本型モデルを支持するものであり、造血における系列決定の理解を深めるのに大きく貢献したと思われる。本研究は計画通りの進展があったと考えている。

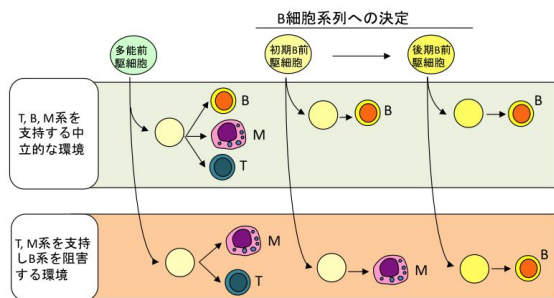


図2. 本研究によって得られた結果

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 2件)

1. Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, Ikawa T, Shimizu K, Fujii S, Koseki H, Kawamoto H (2013) Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8⁺ T cells. Cell Stem Cell 12(1): 31-36 (査読有)
2. Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S (2012) Process for immune defect ant chromosomal translocation during early thymocyte development lacking ATM. Blood 120(4): 789-799 (査読有)

[学会発表](計 9件)

1. 増田 喬子
“Regeneration of antigen specific T cells using iPS cell technology: A novel strategy of cancer immunotherapy”
The Third Bizan Immunology Symposium at The University of Tokushima
2014年2月13日, 徳島

2. 増田 喬子
「胸腺周囲の間葉系細胞に発現する Hoxa3 は胸腺の胸部への移住に必須である」
胸腺研究会

2014年2月8日, 東京

3. 増田 喬子
「T細胞分化を支えるストローマ細胞：その発生から臨床応用まで」
京滋免疫血液研究会
2013年12月19日, 京都

4. 増田 喬子
「iPS細胞技術を用いたがん抗原特異的キラーT細胞の再生」
血液科学セミナー
2013年11月10日, 東京

5. 増田 喬子
「HLA ハプロタイプホモドナーからヘテロへの移植における免疫反応の検証と制御法の開発」
再生医療実現化ネットワーク
拠点事業 夏のワークショップ
2013年9月3日, 浜松

6. 増田 喬子
” Regeneration of human melanoma antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8⁺ T cells ”
24th International Congress of Immunology
2013年8月24日, ミラノ

7. 増田 喬子
「iPS細胞技術を用いたがん抗原特異的T細胞の再生」
新学術領域「免疫四次元空間」第1回サマースクール
2013年7月13日, 徳島

8. 増田 喬子
” Generation of iPS cells from mouse and human B cells ”
第41回日本免疫学会
2012年12月7日, 神戸

9. 増田 喬子
“Regeneration of antigen specific T and B cells using iPS cell technology”
3rd synthetic Immunology
2012年5月19日, 京都

[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

増田 喬子 (MASUDA KYOKO)

研究者番号：40565777

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし