

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292194

研究課題名(和文)脾臓間葉系幹細胞の同定ならびに再生治療への応用基盤の確立

研究課題名(英文) Phenotypical and functional characterization of mesenchymal stem cells in the spleen

研究代表者

後飯塚 僚 (GOITSUKA, RYO)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：50301552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：脾臓の器官形成に必須の転写因子であるTlx1の発現を指標にして脾臓間葉系細胞について解析した結果、Tlx1発現細胞は脾臓の中心動脈周囲の血管周皮細胞ならびに濾胞周囲の赤脾髄領域に局在し、線維性細胞、濾胞樹状細胞、辺縁帯細胞などの成熟間葉系細胞とは異なり、CD140 やCD105などの骨髄間葉系幹細胞と類似した表現型を示すことを明らかにした。さらに、本細胞は、in vitroの培養系で脂肪細胞、骨芽細胞ならびに軟骨細胞へ分化するだけでなく、生体において脾臓を構成する殆どの成熟間葉系細胞に分化する能力を有することから、脾臓独自の間葉系前駆細胞であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tlx1 is a transcription factor essential for spleen organogenesis, and is preferentially expressed in cultured mesenchymal stem cells derived from postnatal spleen. To characterize mesenchymal stem cells in the spleen, we generated a reporter mouse line in which the CreER-Venus cassette was knocked into the Tlx1 gene locus, with the ROSA26-tdTomato allele, which enables both visualization of Tlx1+ cells by Venus and their lineage-tracing by tdTomato. A majority of Tlx1+ cells was localized in the red pulp, and these cells did not express mature stromal cell markers, but express mesenchymal stem markers. Tlx1+ cells have an ability to differentiate into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes in vitro, and are capable to differentiate nearly all of the mesenchymal cell components of the spleen. Thus, these findings indicate that the Tlx1+ cells function as a spleen-selective mesenchymal stem/progenitor cells, participating in the homeostatic maintenance of the adult spleen.

研究分野：統合動物科学

キーワード：間葉系細胞 幹細胞 脾臓 発生 再生 微小環境 免疫 分化

### 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は3つの主要な間葉系細胞系列(脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞)に分化できる細胞集団であり、再生医療への幅広い応用が期待されている。脾臓は、老化した赤血球の排除や髄外造血の場である赤脾髄、リンパ濾胞、T細胞領域からなる白脾髄、その間に存在する辺縁帯ならび脾膜・脾柱という形態学的にも機能的にも異なる領域から構成されるが、脾臓に間葉系幹細胞が存在することを明確に示した報告は現在まで存在しない。ただ、1)脾臓初期発生に重要なホメオドメイン転写因子である *Tlx1* を発現し、3種の間葉系細胞系列に分化できる細胞集団が存在すること、2) I型糖尿病を発症した NOD マウスに脾臓間葉系細胞を移植すると血糖値が有意に減少すること、などが報告されており、脾臓にも間葉系幹細胞が存在することが示唆されている。また、近年、新生仔脾臓の被膜のみを腎被膜下に移植することにより、白脾髄、赤脾髄からなる機能的な脾臓を再生できることが報告され、脾臓被膜下に間葉系幹細胞が存在する可能性が指摘されている。

### 2. 研究の目的

間葉系幹細胞は、ES細胞や iPS細胞などの胚性幹細胞と同様、近年、再生医療への応用が期待されている多能性幹細胞である。しかしながら、様々な組織由来の間葉系幹細胞の性状解析は培養系を用いて行われているのみであり、その生体組織における局在や生理学的機能については殆ど未解明のままである。本研究では、脾臓器官形成におけるマスター制御因子である *Tlx1* 発現細胞の分化・機能を追跡できる新規レポーターマウスを用いて、*Tlx1* 発現細胞の分化能、組織移行ならびに疾患組織修復能の観点から生体レベルで解析を行い、成体脾臓における間葉系幹細胞の同定・単離法を開発し、再生医療への応用基盤の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

*Tlx1* 遺伝子発現下で薬剤誘導的に Cre 組換え酵素が活性化し、かつ蛍光蛋白 Venus で発現細胞をモニターできる新規レポーターマウスを、Cre-loxP システムによる生体レベルでの細胞系譜追跡、特異的細胞除去ならびに遺伝子欠損に応用することで、*Tlx1* を発現する脾臓間葉系細胞の幹細胞としての特性・機能を、移植組織への移行・定着、組織における局在・分化ならびに疾患モデルの組織修復能の観点から解析する。また、培養系を用いた脾臓間葉系細胞の分化能・性状解析を生体レベルの解析に組み合わせることで、脾臓間葉系幹細胞の性状や機能をより詳細に解析する。

### 4. 研究成果

(1) *Tlx1* 発現細胞は CD45/Ter119/CD31 陰性の間葉系細胞であり、骨髄、リンパ節には認め

られず、脾臓にのみ存在する細胞であり、加齢に伴って発現強度ならびに細胞数とも減少する傾向を示した。

(2) 脾臓における *Tlx1* 発現細胞は、線維性細胞網細胞(gp38 陽性)、濾胞樹状細胞(FDC-M1,CD35 陽性)、赤脾髄線維芽細胞(ER-TR7 陽性)などの成熟ストローマ細胞マーカーを発現せず、一部が辺縁帯細胞網細胞(MAdCAM-1 陽性)であるが、大部分は LT $\beta$ R, PDGFR $\alpha/\beta$ , CD105 陽性, Sca-1 弱陽性の間葉系細胞であった。また、中心動脈周囲の血管周囲細胞も *Tlx1* 陽性であることから、未熟な間葉系細胞と考えられた。

(3) *Tlx1*-CreER-Venus;Rosa-tdTomato マウスを用いて、胎仔期ならびに新生仔脾臓に存在する *Tlx1* 発現細胞の細胞系譜追跡を行った結果、胎仔期(E12.5)ならびに新生仔(D5)脾臓の *Tlx1* 発現細胞は、成体において線維性細胞網細胞、濾胞樹状細胞、辺縁帯細胞網細胞ならびに赤脾髄線維芽細胞に分化することが明らかになった。

(4) 脾臓被膜の腎臓被膜下への移植による脾臓再生系において、*Tlx1* 発現細胞は線維性細胞網細胞、濾胞樹状細胞、辺縁帯細胞網細胞ならびに赤脾髄線維芽細胞へ分化することから、発生過程と同様、再生過程においても脾臓の様々なストローマ細胞へ分化する能力を有していることが明らかになった。

(5) *Tlx1*-CreER-Venus;Rosa-DTR マウスを用いて、ジフテリア毒素誘導的に成体脾臓から *Tlx1* 発現細胞を除去した結果、赤脾髄領域の減少ならびに CD71/Ter119 陽性の赤芽球の減少が認められたことから、*Tlx1* 発現細胞は成体赤脾髄における erythropoiesis に関与することが示唆された。

(6) *Tlx1*-CreER-Venus;Rosa-tdTomato アレルを有する妊娠マウスにタモキシフェンを投与し、E12.5 の脾臓原基の細胞運命を追跡した結果、*Tlx1* 欠損マウスでは本来脾臓を形成すべき細胞が脾臓に局在した。これらの細胞はアミラーゼ、インスリン、上皮細胞マーカーを発現せず、Vimentin, Desmin を発現する脾臓間葉系細胞であることが判明した。

(7) 新生仔脾臓の *Tlx1* 発現細胞は *in vitro* で脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞へ分化することが明らかになり、間葉系幹細胞としての特性を有することが明らかになった。

### 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)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Yokoyama, T., Nakatake, M., Kuwata, T.,

- Goitsuka, R., Tsutsumi, S., Aburatani, H., Valk, P. J. M., Delwel, R. and Nakamura, T.: Tranactivation of *Styl1/Slp1* by *Meis1* promotes CXCL12/CXCR4 signaling and myeloid leukemogenesis in vivo. *J. Clin. Invest.* 126:1664-1678. doi: 10.1172/JCI81516. (2016) (査読有)
- ② Yoshioka, K., Oda, A., Notsu, C., Ohtsuka, T., Kawai, Y., Suzuki, S., Nakamura, T., Mabuchi, Y., Matsuzaki, Y., and Goitsuka, R. Loss of the homeodomain transcription factor *Prep1* perturbs adult hematopoiesis in the bone marrow. *PLOS ONE*, **10**, e0136107. doi: 10.1371/journal.pone.0136107. (2015) (査読有)
- ③ Seki, Y., Kikuchi, Y., Yoshimoto, R., Aburai, K., Kanai, Y., Ruike, T., Iwabata, K., Goitsuka, R., Sugawara, F., Abe, M., and Sakaguchi, K.: Promotion of crystalline cellulose degradation by expansins from *Oryza sativa*. *Planta*, **241**, 83-93 (2015) doi: 10.1007/s00425-014-2163-6. (査読有)
- ④ Tashiro, Y., Murakami, A., Goitsuka, R., Shimizu, T., Kishimoto, H., and Azuma, T.: An asymmetric antibody repertoire is shaped between plasmablasts and plasma cells after secondary immunization with (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl chicken gamma-globulin. *Int. Immunol.*, **27**:609-620 (2015). doi: 10.1093/intimm/dxv040. (査読有)
- ⑤ Nakahara, R., Kawai, Y., Oda, A., Nishimura, M., Murakami, A., Azuma, T., Kaifu, T. and Goitsuka, R.: Generation of a *Tlx1*<sup>CreER-Venus</sup> knock-in mouse strain for the study of spleen development. *Genesis*, **52**, 916-923 (2014) doi: 10.1002/dvg.22829. (査読有)
- ⑥ Okumura, K., Saito, M., Aoto, Y., Hachiya, T., Sakakibara, Y., Katsuragi, Y., Hirose, S., Kominami, R., Goitsuka, R., Nakamura, T. and Wakabayashi, Y.: *Meis1* regulates epidermal stem cells and is required for skin tumorigenesis. *PLOS ONE*, **9**, e102111. (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0102111. (査読有)
- ⑦ Ariki, R., Morikawa, S., Mabuchi, Y., Suzuki, S., Nakatake, M., Yoshioka, K., Hidano, S., Nakauchi, H., Matsuzaki, Y., Nakamura, T. and Goitsuka, R. Homeodomain transcription factor *Meis1* is a critical regulator of adult bone marrow hematopoiesis. *PLOS ONE*, **9**, e87646. (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0087646. (査読有)
- ⑧ Hirayama T., Asano, Y., Iida, H., Watanabe, T., Nakamura, T. and Goitsuka, R. *Meis1* is required for the maintenance of postnatal thymic epithelial cells. *PLOS ONE*, **9**, e89885. (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0089885. (査読有)
- 〔学会発表〕(計 20 件)
- ① 後飯塚僚: 髄外造血ニッチとしての脾臓微小環境の形成機構、福岡大学医学部再生医学研究所セミナー、福岡大学(福岡)、2016年2月24日
- ② Akihisa Oda, Chihiro Notsu, and Ryo Goitsuka: Overexpression of *Tlx1 in situ* causes extramedullary hematopoiesis in the adult spleen. 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター、札幌、2015年11月18-20日
- ③ Toru Kasahara, Akihisa Oda, and Ryo Goitsuka: Transcription factor *Tlx1* regulates cell migration of the spleno-pancreatic mesenchyme in spleen organogenesis. 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター、札幌、2015年11月18-20日
- ④ Chihiro Notsu, Akihisa Oda, and Ryo Goitsuka: Maintenance of the white pulp architecture in the postnatal spleen requires *Meis1* expression in mesenchymal progenitor cells. 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター、札幌、2015年11月18-20日
- ⑤ Katsumoto, T., Yamagata, K., Ogawara, Y., Nakamura, T., Goitsuka, R., and Kitabayashi, I.: Endogenous *MOZ* is essential for *MOZ-TIF2*-induced *Meis1* upregulation and AML development. 第77回日本血液学会学術集会、ホテル日航金沢、金沢、2015年10月16-18日
- ⑥ Kasahara, T., Oda, A., and Goitsuka, R.: Cell fate mapping of embryonic spleen primordium cells expressing the transcription factor *Tlx1*. 第24回日本バイオイメージング学会学術集会、東京理科大学葛飾キャンパス、東京、2015年9月26-28日
- ⑦ 小田朗永、笠原透、野津智尋、後飯塚僚: ホメオドメイン転写因子 *Tlx1* は赤脾髄における赤芽球・マクロファージの維持に参与する、第25回学術集会 Kyoto T cell Conference、芝蘭会館、京都、2015年5月15-16日
- ⑧ 笠原透、中原亮、野津智尋、小田朗永、後飯塚僚: ホメオドメイン転写因子 *Tlx1* は脾臓原基間葉系細胞の分化運命を規定する、第25回学術集会 Kyoto T cell Conference、芝蘭会館、京都、2015年5月15-16日
- ⑨ Akihisa Oda, Ryo Nakahara, Chihiro Notsu, Toru Kasahara, and Ryo Goitsuka: Contribution of *Tlx1*-expressing mesenchymal cells to splenic microenvironment formation during organogenesis and regeneration. Venice Thymus Meeting 2015, Venice International University, Italy, 2015年4月9-13日
- ⑩ Akihisa Oda, Ryo Nakahara, Chihiro Notsu, Toru Kasahara, and Ryo Goitsuka: The role of postnatal mesenchymal cell population retaining a potential to give rise to various types of mature stromal cells in the spleen. 第43回日本免疫学会学術集会、国立京

- 都国際会館、2014年12月10-12日
- ⑪ Ryo Nakahara, Chihiro Notsu, Akihisa Oda, and Ryo Goitsuka: Contribution of Tlx1-expressing mesenchymal cells to splenic microenvironment formation during organogenesis and regeneration. 第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014年11月25-27日
- ⑫ 後飯塚僚:脾臓の微小環境を構成する間葉系細胞の起源と機能.第157回日本獣医学会学術集会、北海道大学高等教育推進機構、2014年9月9-12日
- ⑬ 小田朗永、野津智尋、中原亮、後飯塚僚:成体脾臓微小環境の維持における Tlx1 発現間葉系細胞の役割. 第24回学術集会 Kyoto T cell conference, 京都平安ホテル, 2014年5月16-17日
- ⑭ Nakahara, R., Oda, A. and Notsu, C., and Goitsuka, R. Homeodomain transcription factor Tlx1 marks a unique population of postnatal spleen mesenchymal cells.第42回日本免疫学会学術集会、幕張メッセ、2013年12月11-13日
- ⑮ Nakahara, R., Oda, A. and Notsu, C., and Goitsuka, R. Perivascular mural cells in the postnatal spleen express homeodomain transcription factor Tlx1. 第36回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場、2013年12月3-6日
- ⑯ Notsu, C., Oda, A., Nakahara, R. and Goitsuka, R. Mesenchymal progenitor-like cells in the neonatal spleen identified by homeodomain transcription factor Tlx1. 第36回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場、2013年12月
- ⑰ Oda, A., Notsu, C., Nakahara, R. and Goitsuka, R. Developmental regulation of the splenic microenvironment by mesenchymal cells expressing homeodomain transcription factor Tlx1. 第36回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場、2013年12月3-6日
- ⑱ Goitsuka, R., Nakahara, R., Oda, A. and Notsu, C. Differentiation potentials of mesenchymal cells expressing the homeodomain transcription factor Tlx1 in embryonic and postnatal spleen. 4<sup>th</sup> Workshop of Synthetic Immunology (chair and speaker), Rakuyu Kaikan, Kyoto University, Kyoto 2013年11月16日
- ⑲ Goitsuka, R. A new mouse line for dissecting the lineage relationship and functions of mesenchymal cell components consisting of the spleen microenvironment. International Workshop on T Lymphocytes (chair and speaker), Shiran Kaikan, Kyoto University, Kyoto 2013年6月3-7日
- ⑳ Nakahara, R., Kawai, Y., Hirayama, T., and Goitsuka, R. Homeodomain transcription factor Tlx1 marks a unique population of postnatal spleen mesenchymal cells. International Workshop on T Lymphocytes, Shiran Kaikan, Kyoto University, Kyoto 2013年6月3-7日

[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

<http://www.ribs.tus.ac.jp/laboratories/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後飯塚 僚 (GOITSUKA RYO)

東京理科大学・生命医科学研究所・教授

研究者番号: 50301552

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松崎有未 (MATSUZAKI YUMI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 50338183

河合 康洋 (KAWAI YASUHIRO)

国立感染症研究所・動物管理室・研究員

研究者番号: 00416281