

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461447

研究課題名(和文) ヒトリンパ球系分化の包括的解析と骨髄リンパ球ニッチの役割の解明

研究課題名(英文) Role of bone marrow niche in human early lymphopoiesis

研究代表者

大石 晃嗣 (Ohishi, Kohshi)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00397506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト造血前駆細胞を不死化ストローマ細胞と共培養し、ストローマ細胞が産生するSDF-1の作用や、LFA-1を介したストローマ細胞との接着の役割を、中和抗体を用いて行った。その結果、ストローマ細胞と接着した状態での造血前駆細胞からのT・Bリンパ球系前駆細胞への分化の制御にはSDF-1は必須であるが、ストローマ細胞と接着していない状態でのTリンパ球系細胞分化には関与しないこと、ストローマ細胞上での初期Tリンパ球系細胞への分化にはLFA-1を介したストローマ細胞との接着が重要であることなどが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：By using coculture system with telomerized human bone marrow stromal cells, we found that stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) is critical for stromal cell contact-induced early T- and B-lymphoid differentiation from human hematopoietic precursors but dispensable for early T-cell generation without contact with stromal cells and that LFA-1-mediated interaction with stromal cells is important for early T-lymphoid differentiation.

研究分野：血液、輸血

キーワード：ストローマ細胞 SDF-1 LFA-1 リンパ球分化

1. 研究開始当初の背景

ヒトリンパ球系細胞分化が骨髄環境でどのように制御されているかは明らかにされていない。マウスにおいては、骨芽球系細胞やCAR(CXCL12-abundant reticular cells)細胞がリンパ球系細胞の支持・制御に関係しており、これらの細胞が産生するSDF-1がBリンパ球系細胞を始めとするリンパ球系細胞分化に必須であることがノックアウトマウスなどの研究から明らかにされている¹⁾。しかし、ヒトリンパ球系細胞分化における役割や、詳細なメカニズムは明らかにされていない。

我々は不死化ヒト骨髄ストローマ細胞が、ヒト造血前駆細胞からT/NKリンパ球系細胞(CD7⁺CD45RA⁺)やBリンパ球系細胞(CD10⁺CD19⁺CD45RA⁺)への分化を支持することを報告してきた²⁾。そこで、本培養系を用いてSDF-1やストローマ細胞との接着のヒト初期リンパ球系細胞分化における役割について研究することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト初期リンパ球系細胞分化におけるストローマ細胞の役割を明らかにすることである。特にストローマ細胞が産生するstromal cell-derived factor 1(SDF-1)の役割と、LFA-1等を介したストローマ細胞との接着の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト臍帯血 CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻未分化造血前駆細胞、あるいはストローマ細胞上で2週間培養して得られたCD45RA⁺CD7⁺CD10⁻Tリンパ球系前駆細胞あるいはCD45RA⁺CD7⁻CD10⁺Bリンパ球系前駆細胞を分離し、造血因子(SCF, Flt3L, TPO)存在下で、不死化ヒト骨髄ストローマ細胞上あるいはストローマ細胞の培養上清(ストローマ細胞と非接着状態)と共に培養した。SDF-1とCXCR4受容体との結合をブロックする抗CXCR4ブロッキング抗体、あるいはLFA-1とICAM ligandとの結合をブロックする抗LFA-1ブロッキング抗体を添加して、SDF-1あるいはLFA-1を介した接着の役割について検討した。

4. 研究成果

(1) CXCR4 および LFA-1 の発現：

CXCR4は、CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻未分化造血前駆細胞(HPC)での発現は低いものの、CD34⁺CD38⁻CD45RA⁺CD10⁺CD7⁺リンパ球系前駆細胞において発現が高かった。CD10⁺CD19⁺proB細胞においては、CXCR4の発現はさらに増強したが(図1)、LFA-1の発現はむしろ低下した(図2)。一方、ストローマ細胞のほとんどが、SDF-1を発現していた。

また、ストローマ細胞は、ICAM-1、ICAM-2を発現しているものの、ICAM-3やICAM-4は発現していなかった。造血前駆細胞もICAM-1、ICAM-2、ICAM-3を発現していた。

図1. 造血前駆細胞におけるCXCR4の発現

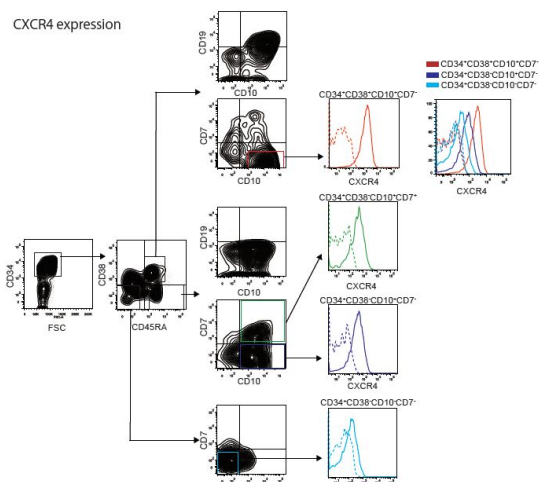
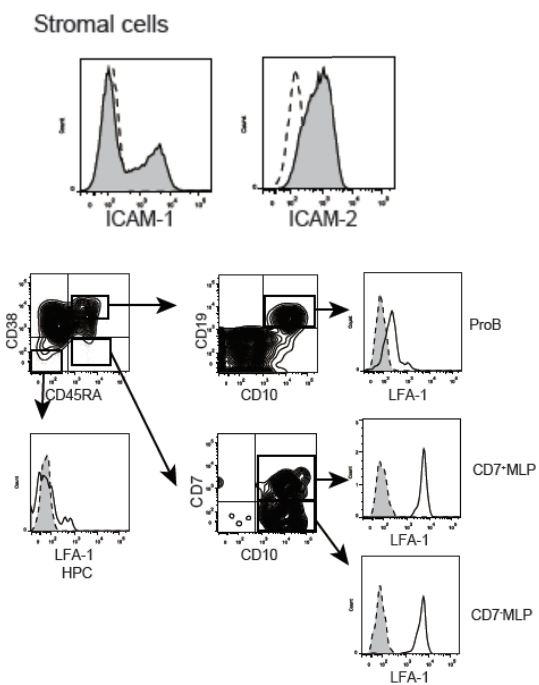


図2. ストローマ細胞でのICAM-1, -2の発現と造血前駆細胞でのLFA-1の発現

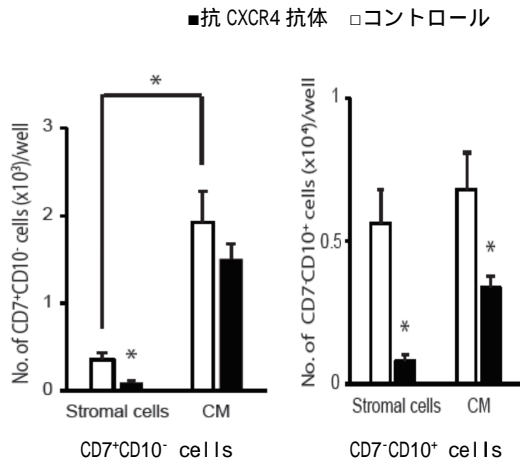


(2) 抗CXCR4ブロッキング抗体の作用：

HPCをストローマ細胞と共培養し、SDF-1とCXCR4受容体との結合を阻害する抗CXCR4ブロッキング抗体を添加したところ、HPCからCD7⁺CD10⁻TおよびCD10⁺CD19⁻Bリンパ球系細胞への分化、およびCD10⁺CD19⁺Bリンパ球系細胞からCD10⁺CD19⁺proB細胞への分化を抑制した。

ストローマ細胞の培養上清(CM)を含むコントロール培地では、ストローマ細胞との共培養に比べて、より多くのCD7⁺CD10⁻CD45RA⁻Tリンパ球系細胞が生成されたが、抗CXCR4抗体はHPCからのCD7⁺CD10⁻T前駆細胞の生成には影響はみられなかった(図3)。一方、抗CXCR4抗体は、CMにおいてもCD7⁺CD10⁺およびCD7⁻CD10⁺リンパ球系細胞からのBリンパ球系細胞分化を抑制した(図3)。

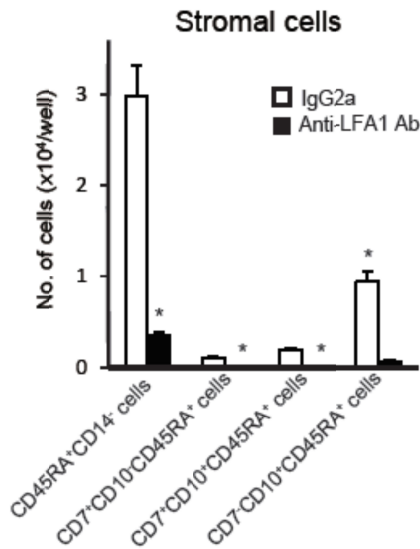
図3. 抗 CXCR4 抗体のストローマ細胞上あるいは CM での HPC から CD7+CD10-T 前駆細胞の生成への作用



(3) 抗 LFA-1 抗体の作用 :

抗 LFA-1 ブロッキング抗体の添加は、抗 CXCR4 抗体と同様に、ストローマ細胞上での HPC からの CD7+T および CD10+B リンパ球系細胞への分化を抑制した。しかし、CD10+CD19- から CD10+CD19+proB 細胞への分化には影響を及ぼさなかった。また、CM での培養におけるリンパ球系細胞分化への作用はみられなかった (図 4)。

図4. 抗 LFA-1 抗体のストローマ細胞上あるいは CM での HPC への作用



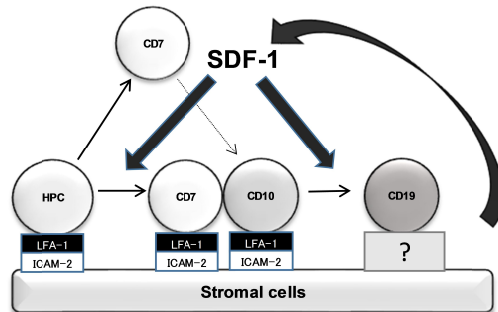
(4) 抗 ICAM-2 抗体の作用 :

ストローマ細胞との共培養系に抗 ICAM-1 抗体および抗 ICAM-2 ブロッキング抗体を添加すると、抗 ICAM-2 抗体を添加した時のみ、HPC から CD7+ および CD10+ リンパ球系細胞への分化が抑制されるというデータを得つつある。

まとめと展望 :

以上より、SDF-1 は、ストローマ細胞上での造血前駆細胞からの T・B リンパ球系前駆細胞への分化の制御において必須であるが、ストローマ非接着下での初期 T リンパ球系細胞分化には関与しないこと、初期の T リンパ球系細胞分化には、LFA-1 を介したストローマ細胞との接着が重要であることが明らかとなった。これらのデータから、ヒト初期リンパ球系細胞を支持するニッチには、ICAM-2 と SDF-1 の両方を発現し未分化造血前駆細胞から初期の T および B リンパ球系細胞分化を支持する細胞と、SDF-1 のみ発現する細胞があり、T リンパ球系および B リンパ球系細胞分化に関与しているという仮説を立て、現在研究を続けている (図 5)。

図5. SDF-1 および LFA-1 を介した細胞接着のヒト初期リンパ球系細胞分化での役割



<引用文献>

- 1) Nagasawa. CXCL12/SDF-1 and CXCR4. Front Immunol. 6:301, 2015
- 2) Nakamori Y, et al. Human bone marrow stromal cells simultaneously support B and T/NK lineage development from human haematopoietic progenitors: a principal role for flt3 ligand in lymphopoiesis. Br J Haematol. 157:674-86. 2012

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Liu B, Ohishi K, Orito Y, Nakamori Y, Nishikawa H, Ino K, Suzuki K, Matsumoto T, Masuya M, Hamada H, Mineno J, Ono R, Nosaka T, Shiku H, Katayama N. Manipulation of human early T lymphopoiesis by coculture on human bone marrow stromal cells: Potential

utility for adoptive immunotherapy.
Exp Hematol. 41(4):367-76, 2013.
Sugimoto Y, Sada A, Shimokariya Y,
Monma F, Ohishi K, Masuya M, Nobori T,
Matsui T, Katayama N. A novel
FOXP1-PDGFRA fusion gene in
myeloproliferative neoplasm with
eosinophilia.
Cancer Genet. 208(10):508-12,2015.
Kageyama S, Ikeda H, Miyahara Y, Imai
N, Ishihara M, Saito K, Sugino S, Ueda
S, Ishikawa T, Kokura S, Naota H,
Ohishi K, Shiraiishi T, Inoue N, Tanabe
M, Kidokoro T, Yoshioka H, Tomura D,
Nukaya I, Mineno J, Takesako K,
Katayama N, Shiku H. Adoptive Transfer
of MAGE-A4 T-cell Receptor
Gene-Transduced Lymphocytes in
Patients with Recurrent Esophageal
Cancer. Clin Cancer Res.
21(10):2268-77, 2015.
Zhang J, Ramadan AM, Griesenauer B, Li
W, Turner MJ, Liu C, Kapur R, Hanenberg
H, Blazar BR, Tawara I, Paczesny S. ST2
blockade reduces sST2-producing T
cells while maintaining protective
mST2-expressing T cells during
graft-versus-host disease.
Sci Transl Med.7(308):308ra160, 2015.

〔学会発表〕(計 3 件)

Hirohito Minami, Kohshi Ohishi,
Masahiro Masuya, Naoyuki Katayama.
LFA-1-Mediated Adhesion to ICAM-2 Is
Critical for Stromal Cell-Dependent
Early T-Lymphoid Differentiation from
Human Hematopoietic Precursors.
American Society of Hematology Annual
Meeting. Dec 6, 2016 Orland, Florida,
USA.
Hirohito Minami, Kohshi Ohishi,
Masahiro Masuya, Naoyuki Katayama
Stromal cell-derived factor-1 plays
important roles in the regulation of
human early B- and T/NK-lineage
lymphoid differentiation in different
manners
European Hematology Association. June
12, 2015.Vienna, Austria.
Hirohito Minami, Kohshi Ohishi,
Masahiro Masuya, Naoyuki Katayama
SDF-1 is involved in human early B- and
T/NK-lineage lymphoid
differentiation in a different manner.
2015年10月16日-18.
日本血液学会 石川県立音楽堂 (金沢、
石川県)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 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

大石晃嗣 (Ohishi Kohshi)
三重大学医学部附属病院・准教授
研究者番号： 397506

(2) 研究分担者

俵 功 (Tawara Isao)
三重大学医学部附属病院・助教
研究者番号： 378380

(3) 連携研究者

野阪哲哉 (Nosaka Tetsuya)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号： 30218309