

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461450

研究課題名(和文) 抗炎症性分泌蛋白Sfrp5のBリンパ球抑制機序と胎児母体間免疫寛容への関与

研究課題名(英文) Anti-inflammatory sFRP5 inhibits early B-lymphopoiesis in vivo

研究代表者

福島 健太郎 (Fukushima, Kentaro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・招聘教員

研究者番号：70546879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠は骨髄におけるBリンパ球の分化の早期の段階を抑制し、同様の現象をエストロゲンの投与で誘導することが出来た。エストロゲンによって間質細胞で誘導される蛋白としてSFRP5を同定した。SFRP5を過剰発現するマウスを作製し解析を行ったところ、Bリンパ球造血が顕著に抑制され、特に骨髄中のリンパ球系共通前駆細胞の段階で分化障害を引き起こした。そのメカニズムとして、SFRP5は多くの遺伝子発現に影響を与え、特にNotchシグナル系の活性化が造血幹細胞・リンパ球系前駆細胞の分化に影響を与えている可能性が示唆された。さらにSFRP5欠損マウスでは、妊娠やエストロゲンが誘導するBリンパ球抑制に変化を生じた。

研究成果の概要(英文)：Mammals have evolved to protect their offspring during early fetal development. Although fetuses represent mismatched allografts because of paternal genes, they develop with remarkable speed by obtaining optimal nutrition through the placenta. Thus, elaborate mechanisms induce tolerance of maternal immune system. We found that estrogen-induced Frizzled-related proteins (sFRPs), particularly sFRP5, suppress B-lymphopoiesis in vivo. Mice overexpressing sFRP5 had fewer B-lymphocytes in the peripheral blood and spleen. High levels of sFRP5 inhibited early B-cell differentiation in the bone marrow (BM), resulting in the accumulation of cells with a common lymphoid progenitor (CLP) phenotype. Conversely, sFRP5 deficiency reduced the number of hematopoietic stem cells and primitive lymphoid progenitors in the BM, particularly when estrogen was administered. Furthermore, a significant reduction in CLPs and B-lineage-committed progenitors was observed in the BM of sfrp5-null pregnant females.

研究分野：血液内科学

キーワード：免疫寛容 リンパ球造血

1. 研究開始当初の背景

申請者の研究室と共同研究グループは、約20年間にわたり、リンパ球分化の制御機構に関する研究に取り組んできた。本研究計画に繋がる学術的背景として、

(1) 妊娠期の母体において、顆粒球・赤血球の産生は保たれるが、T細胞・B細胞ともにリンパ球産生が著明に抑制されることを見出した。さらにこの現象には、妊娠期に高濃度になる女性ホルモンが関与しており、特にエストロゲンが濃度依存的に骨髄でのリンパ球産生を抑制することを明らかにした。

(2) エストロゲンが、リンパ球前駆細胞への直接作用のみならず、造血環境を構築する骨髄間質細胞への作用を介して、Bリンパ球産生を抑制することを示した。また、骨髄内におけるリンパ球分化の極めて初期段階が抑制されることを見出した。

(3) エストロゲンの骨髄間質細胞を介した作用に着目し、リンパ球造血に影響を与える分泌蛋白としてどのようなものが誘導されるのか探索した。その結果、Wntシグナルの調節分子 Sfrp が、エストロゲン刺激後の骨髄間質細胞において高発現することを見出した。さらに Sfrp-humanFc 融合蛋白を作製し、リンパ球前駆細胞への *in vitro* での直接作用を検討したところ、造血幹細胞分画からのBリンパ球産生を顕著に抑制することを見出した。

2. 研究の目的

哺乳動物にとって妊娠は、非自己の組織が体内に長期間存在する異常な状態である。その維持のために母体は自らの免疫系を大きく変容させる。これまでの研究で私達は、女性ホルモンによって誘導される Soluble frizzled-related proteins (Sfrp) が、免疫系で中心的な役割を担うリンパ球の分化・増殖を、*in vitro* において抑制することを見出した。Sfrp は抗炎症作用を持つ分泌蛋白として注目されているが、生体の免疫系における機能の詳細は不明である。そこで本研究では、過剰発現マウスと欠損マウスを用いて、生体における Sfrp の機能解析を行い、母体胎児間免疫寛容への関与と作用機序を明らかにする。さらにその知見に基づいて、免疫機能を調節する新たな手法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) Sfrp 過剰発現マウスの作製と解析

高濃度の Sfrp が長期間にわたって生体内で発現する実験系が必要と考えられたため、次の方法で生体での過剰発現系を作製し、造血・免疫組織を中心に解析する。

Ig promoter 制御下で目的遺伝子が誘導される vector に Sfrp cDNA をサブクローニングする。

作製した vector を電気閃光法にてマウス ES 細胞株に導入する。

遺伝子導入した ES 細胞株を B リンパ球欠損マウス受精卵に注入し、キメラ個体を作製する。

キメラ率の高いマウスを純系野生型マウスと交配し、改変遺伝子を生殖細胞系列に導入する。

このシステムで作製されたノックイン過剰発現マウスでは、液性免疫系の成熟に伴って目的蛋白が過剰分泌されるため、胎生期の器官発生には影響を与えず、生後3週目以降に安定した高発現状態になる。

(2) Sfrp ノックアウトマウスの解析

Sfrp ノックアウトマウスは Sfrp1・Sfrp5 ともに理化学研究所で作製されている。これらのマウスを入手し、骨髄および胸腺を解析し、Sfrp が定常状態でどの程度リンパ球造血に影響を与えているかを明らかにする。さらに妊娠期や女性ホルモン投与時のリンパ球造血の変動を解析し、母体胎児間の免疫寛容における Sfrp の役割を明らかにする。

4. 研究成果

SFRP1 と SFRP5 の2種類の過剰発現マウスを作製して解析したところ、どちらのマウスも野生型と比較してBリンパ球が有意に減少したが、特に SFRP5 過剰発現の方が SFRP1 よりも顕著なBリンパ球減少と脾臓の縮小をきたした(図1)。

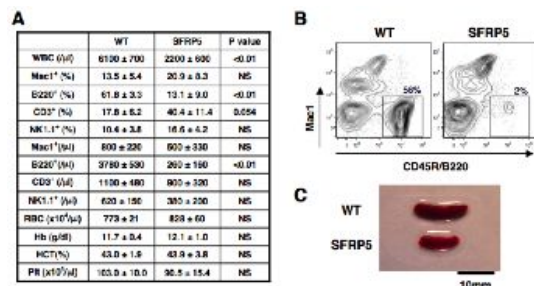


図1 Sfrp5 過剰発現マウスの解析結果 (A. 末梢血 B. 末梢血の flow cytometry C. 脾臓)

この現象の分子メカニズムを明らかにする目的で、SFRP5 過剰発現マウスの骨髄からリンパ系共通幹細胞を高純度で分離し、それらの遺伝子発現の特徴を野生型マウスと比較検討した。その結果、SFRP5 過剰発現マウスのリンパ系共通幹細胞では Notch シグナルが活性化していることが分かった。

さらにその知見の裏付けを得るため、SFRP5 ノックアウトマウスを用いた検討を行った。興味深いことに SFRP5 ノックアウトマウスの骨髄中に含まれる造血幹細胞やリンパ系共通幹細胞は、エストロゲンに対する感

受性が野生型よりも高かった。また、エストロゲン刺激後の遺伝子発現を検討した結果、Notch シグナルの下流に存在する遺伝子の発現に変化が認められた。しかし、SFRP5 ノックアウトマウスを妊娠させて骨髄での造血機能を評価した結果では、野生型の妊娠マウスと比較して優位な変化を認めなかった。その原因として、妊娠期の SFRP5 ノックアウトマウスの骨髄における他の SFRP ファミリーの変化を調べたところ、SFRP1-4 のすべてにおいて発現の上昇が認められた。このことから SFRP5 ノックアウトマウスでは、他の SFRP 分子による代替機能が働いていると考えられた。

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 18 件)

Sudo T, Yokota T, Okuzaki D, Ueda T, Ichii M, Ishibashi T, Isono T, Habuchi Y, Oritani K, Kanakura Y. Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule Expression in Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Is Essential for Erythropoiesis Recovery after Bone Marrow Injury. PLoS One. 11(4):e0154189. (2016) DOI:10.1371/journal.pone.0154189. 査読有

Yokota T, Kanakura Y. Genetic abnormalities associated with acute lymphoblastic leukemia. Cancer Sci. Mar 14 (2016) DOI: 10.1111/cas.12927. 査読有

Ishibashi T, Yokota T, Tanaka H, Ichii M, Sudo T, Satoh Y, Doi Y, Ueda T, Tanimura A, Hamanaka Y, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. ESAM is a novel human hematopoietic stem cell marker associated with a subset of human leukemias. Exp Hematol. 44(4):269-281 (2016) DOI: 10.1016/j.exphem.2015.12.010. 査読有

Sata H, Shibayama H, Maeda I, Habuchi Y, Nakatani E, Fukushima K, Fujita J, Ezoe S, Tadokoro S, Maeda T, Mizuki M, Kosugi S, Nakagawa M, Ueda S, Iida M, Tokumine Y, Azenishi Y, Mitsui H, Oritani K, Kanakura Y. Quantitative polymerase chain reaction analysis with allele-specific oligonucleotide primers for individual IgH VDJ regions to evaluate tumor burden in myeloma patients. Exp Hematol. 43(5):374-381. (2015) DOI: 10.1016/j.exphem.2015.01.002. 査読有

Fujita N, Ichii M, Maeda T, Saitoh N, Yokota T, Yamawaki K, Kakitani M, Tomizuka K, Oritani K, Kanakura Y. Identification of osteoblast stimulating factor 5 as a negative regulator in the B-lymphopoietic niche. Exp Hematol. 43(11):963-973. (2015). DOI: 10.1016/j.exphem.2015.07.002. 査読有

Sudo T, Yokota T, Kanakura Y. Role of endothelial antigen ESAM in activated hematopoietic stem cells. Rinsho Ketsueki. 56(5):464-474. (2015) DOI: 10.11406/rinketsu.56.464. 査読有

Yokota T, Oritani K, Sudo T, Ishibashi T, Doi Y, Habuchi Y, Ichii M, Fukushima K, Okuzaki D, Tomizuka K, Yamawaki K, Kakitani M, Shimono A, Morii E, Kincade PW, Kanakura Y. Estrogen-inducible sFRP5 inhibits early B-lymphopoiesis in vivo, but not during pregnancy. Eur J Immunol. 45:1390-1401(2015) DOI: 10.1002/eji.201444939. 査読有

横田豊史、金倉 謙 リンパ球への分化と転写制御 臨床免疫・アレルギー科 62(2):227-232 (2014) 査読無

Tanimura A, Shibayama H, Hamanaka Y, Fujita N, Ishibashi T, Sudo T, Yokota T, Ezoe S, Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Kanakura Y. The anti-apoptotic gene Anamorsin is essential for both autonomous and extrinsic regulation of murine fetal liver hematopoiesis. Exp Hematol.42:410-422 (2014) DOI: 10.1016/j.exphem.2014.01.002. 査読有

Fujita N, Oritani K, Ichii M, Yokota T, Saitoh N, Okuzaki D, Sekine Y, Kon S, Muromoto R, Saitoh K, Yoshimura A, Matsuda T, Kanakura Y. Signal-transducing adaptor protein-2 regulates macrophage migration into inflammatory sites during dextran sodium sulfate induced colitis. Eur J Immunol.44:1791-1801 (2014) DOI: 10.1002/eji.201344239. 査読有

Rai S, Tanaka H, Suzuki M, Ogoh H, Taniguchi Y, Morita Y, Shimada T, Tanimura A, Matsui K, Yokota T, Oritani K, Tanabe K, Watanabe T, Kanakura Y, Matsumura I. Clathrin assembly protein CALM plays a critical role in KIT signaling by regulating its cellular transport from early to late endosomes in hematopoietic cells. PLoS One 9(10):e109441 (2014) DOI:

10.1371/journal.pone.0109441. 査読有

Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, Kallies A, Nutt SL, Sakaguchi S, Takeda K, Kurosaki T, Baba Y. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 41:1040-1051, (2014) 査読有

Yokota T. Guest editorial: molecular mechanisms of lymphocyte development: recent findings. *Int J Hematol.* 100:218-219 (2014) DOI: 10.1007/s12185-014-1645-4. 査読無

Yokota T, Kanakura Y. Role of tissue-specific AT-rich DNA sequence-binding proteins in lymphocyte differentiation. *Int J Hematol.* 100:238-245 (2014) DOI: 10.1007/s12185-014-1602-2. 査読有

Satoh Y, Yokota T, Sudo T, Kondo M, Lai A, Kincade PW, Kouro T, Iida R, Kokame K, Miyata T, Habuchi Y, Matsui K, Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Kohwi-Shigematsu T, Kanakura Y. The Satb1 Protein Directs Hematopoietic Stem Cell Differentiation toward Lymphoid Lineages. *Immunity* 38:1105-1115 (2013) DOI: 10.1016/j.immuni.2013.05.014. 査読有

Zhang Q, Iida R, Yokota T, Kincade PW. Early events in lymphopoiesis: an update. *Current Opinion in Hematology* 20:265-272 (2013) DOI: 10.1097/MOH.0b013e3283612628. 査読無

Maeda T, Hosen N, Fukushima K, Tsuboi A, Morimoto S, Matsui T, Sata H, Fujita J, Hasegawa K, Nishida S, Nakata J, Nakae Y, Takashima S, Nakajima H, Fujiki F, Tatsumi N, Kondo T, Hino M, Oji Y, Oka Y, Kanakura Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. Maintenance of complete remission after allogeneic stem cell transplantation in leukemia patients treated with Wilms tumor 1 peptide vaccine. *Blood Cancer J.* 3:e130. (2013) DOI: 10.1038/bcj.2013.29. 査読有

Yokota T, Sudo T, Ishibashi T, Doi Y, Ichii M, Oritani K, Kanakura Y. Complementary regulation of early B-lymphoid differentiation by genetic and epigenetic mechanisms. *Int J Hematol.*

98:382-389 (2013) DOI: 10.1007/s12185-013-1424-7. 査読有

[学会発表](計 12件)
The 44th Annual Scientific Meeting of International Society of Exoerimental Hematology (ISEH)
Ishibashi T, Yokota T, Tanaka H, Ichii M, Sudo T, Satoh Y, Doi Y, Tanimura A, Hamanaka Y, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. Endothelial cell-selective adhesion molecule is a novel human hematopoietic stem cell marker associated with a subset of human leukemias. 2015.9.17-19 (発表日 9.18), Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.

The American Society of Hematology 57th Annual Meeting
Ishibashi T, Yokota T, Tanaka H, Ichii M, Sudo T, Satoh Y, Doi Y, Tanimura A, Hamanaka Y, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. ESAM is a novel human hematopoietic stem cell marker associated with a subset of human leukemias. 2015.12.5-8 (発表日 12.5), The Orange County Convention Center, Orlando, FL, USA.

The American Society of Hematology 57th Annual Meeting
Doi Y, Yokota T, Ishibashi T, Satoh Y, Ichii M, Tanimura A, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. SATB1 expression marks lymphoid-lineage-biased hematopoietic stem cells in mouse bone marrow. 2015.12.5-8 (発表日 12.6), The Orange County Convention Center, Orlando, FL, USA.

第76回日本血液学会学術集会
石橋知彦, 横田貴史, 一井倫子, 数藤孝雄, 佐藤友亮, 土居由貴子, 藤田奈津子, 長手泰宏, 濱中有理, 松井敬子, 谷村 朗, 齋藤則充, 江副幸子, 柴山浩彦, 織谷健司, 金倉 讓
Endothelial antigen ESAM marks human hematopoietic stem/progenitor cells in diverse sources. 2014.10.31-11.2 (発表日 10.31), 大阪国際会議場 (大阪市)

第76回日本血液学会学術集会
土居由貴子, 横田貴史, 谷村 朗, 齋藤則充, 一井倫子, 江副幸子, 柴山浩彦, 織谷健司, 金倉 讓
Functional analysis of a chromatin-remodeling protein in early lymphoid differentiation. 2014.10.31-11.2 (発表日 11.1) 大阪国際会議場 (大阪市)

第 76 回日本血液学会学術集会
数藤孝雄, 横田貴史, 杉山立樹, 奥崎大介,
一井倫子, 石橋知彦, 磯野友美, 羽瀧洋子,
織谷健司, 長澤丘司, 金倉 讓
ESAM on hematopoietic cells is essential
for recovery of erythropoiesis after bone
marrow injury.
2014.10.31-11.2 (発表日 11. 1), 大阪国際会
議場 (大阪市)

The American Society of Hematology
56th Annual Meeting
Ishibashi T, Yokota T, Satoh Y, Sudo T, Doi
Y, Fujita N, Nagate Y, Hamanaka Y,
Matsui K, Tanimura A, Ichii M, Saitoh N,
Ezoe S, Shibayama H, Oritani K,
Kanakura Y.
MS4A3 Marks Early Myeloid
Differentiation in Human Hematopoiesis
2014.12.6-9 (発表日 12.8), Moscone Center,
San Francisco, USA

第 75 回日本血液学会学術集会
Yokota T, Oritani K, Sudo T, Ishibashi T,
Doi Y, Ichii M, Tomizuka K, Yamawaki K,
Shimono A, Kanakura Y.
SFRP5 inhibits early B-lymphopoiesis and
modulates estrogen-induced changes in the
immune system. 2013.10.11-13 (発表日
10.11), ロイトン札幌 (札幌市)

第 75 回日本血液学会学術集会
Ishibashi T, Yokota T, Satoh Y, Sudo T,
Ichii M, Shibayama H, Ezoe S, Tanimura A,
Fujita N, Matsui K, Hamanaka Y, Doi Y,
Oritani K, Kanakura Y.
Expression of MS4A3 marks early
myeloid-lineage differentiation in human
hematopoietis. 2013.10.11-13 (発表日
10.12), ロイトン札幌 (札幌市)

第 75 回日本血液学会学術集会
Sudo T, Yokota T, Oritani K, Ichii M,
Ishibashi T, Fujita N, Kanakura Y.
YA new HSC marker ESAM is necessary
for erythroid cell recovery after bone
marrow injury. 2013.10.11-13 (発表日
10.12), ロイトン札幌 (札幌市)

The American Society of Hematology
55th Annual Meeting
Yokota T, Oritani K, Sudo T, Ishibashi T,
Doi Y, Habuchi Y, Ichii M, Okuzaki D,
Tomizuka K, Yamawaki K, Kakitani M,
Shimono A, Morii E, Kincade PW,
Kanakura Y.
SFRP5 inhibits early stages of B-cell
differentiation and modulates
estrogen-related changes in the immune
system.

2013.12.6-10 (発表日 12.8), Ernest N.
Morial Convention Center, New Orleans,
Louisiana, USA

The American Society of Hematology
55th Annual Meeting
Ishibashi T, Yokota T, Ichii M, Satoh Y,
Sudo T, Fujita S, Doi Y, Fujita N, Nagate Y,
Hamanaka Y, Matsui K, Tanimura A,
Saitoh N, Ezoe S, Shibayama H, Kincade
PW, Oritani K, Kanakura Y.
Endothelial Cell-Selective Adhesion
Molecule Marks Human Hematopoietic
Stem Cells Regardless Of The HSC
Sources. 2013.12.6-10 (発表日 12.8),
Ernest N. Morial Convention Center, New
Orleans, Louisiana, USA.

〔図書〕(計 2 件)

1. 横田貴史 「リンパ球の発生・分化と老化」
Annual Review 血液 2015 中外医学社 286
pages (p10-26) (2015) 査読無

2. Sudo T, Yokota T, Ishibashi T, Ichii M,
Doi Y, Oritani K, Kanakura Y. Canonical
HSC Markers and Recent Achievements.
“ Stem Cell Biology in Normal Life and
Diseases ” Chapter 4, 194 pages (p51-64)
Intech Open Access Publisher (2013) 査読
有

〔その他〕

ホームページ; <http://www.hematology.pro>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 健太郎 (FUKUSHIMA, Kentaro)
大阪大学・大学院医学系研究科・招聘教員
研究者番号: 70546879

(2) 研究分担者

横田 貴史 (YOKOTA, Takafumi)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 60403200

織谷 健司 (ORITANI, Kenji)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 70324762

金倉 讓 (KANAKURA, Yuzuru)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 20177489