

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893186

研究課題名(和文)好中球系系統特異的前駆細胞の同定と分化機構の解明

研究課題名(英文) Identification of neutrophil lineage-committed progenitors and their developmental mechanism

研究代表者

森 康雄 (Mori, Yasuo)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90573345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はマウス顆粒球系・単球系前駆細胞(GMP)をVcam-1とM-CSFRの発現パターンにより3つの亜分画にわけた事に成功した。これらの純化した亜分画による機能解析の結果、Vcam-1hiM-CSFR-GMPはその分化能力が好中球系に極めて限定的であることが確認され、マウス好中球系系統特異的前駆細胞(NeuP)と定義した。同分画を用いた網羅的遺伝子解析の結果、GMPより好中球特異的な遺伝子(G-CSFR, Gfi-1)の発現上昇と単球系関連転写因子(Irf8, Klf4)の発現低下を伴い、好中球への系統決定がなされるという分化機構を解明した。

研究成果の概要(英文)：We, for the first time, could subdivide granulocyte/macrophage progenitor (GMP) population based on the expression pattern of Vcam-1 and M-CSFR: a fraction (10-20%) of GMPs expressed high level of Vcam-1. We found Vcam-1hiM-CSFR- GMPs, both on a single cell level and as a population, robustly generated neutrophils but no other lineages in vitro. In vivo transplantation assays also showed that Vcam-1hiM-CSFR- GMPs completely lacked monocyte/macrophage producing potential. Thus, we termed Vcam-1hiM-CSFR- GMPs as the NPs. Gene expression analyses revealed that Vcam-1hiM-CSFR- GMPs upregulated neutrophil-related genes (e.g., Gfi-1, G-CSFR) and downregulated monocyte/macrophage-related genes (e.g., Irf8, Klf4), clearly reflecting their differentiation potential. This newly classified population might be a useful tool for understanding the molecular mechanisms of physiological/pathological neutrophil development.

研究分野：血液学

キーワード：好中球 前駆細胞 分化 系統決定 転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 好中球数の減少は宿主を易感染状態へと誘い、臨床的に極めて深刻な状況をもたらす。一方で、過剰な好中球増加や機能亢進もまた様々な臓器障害の原因となる(急性呼吸窮迫症候群、炎症性腸疾患、関節リウマチなど)ため、好中球の恒常性は厳密な制御が要求される。特定の細胞への分化メカニズムを解明するためには、系統特異的前駆細胞の同定が最もシンプルかつ有効な手段となるが、好中球特異的前駆細胞は未だ純化に至っていない。

(2) 我々はマウス・ヒト造血系においてマルチカラーFACSを用い、その骨髄中に common lymphoid progenitor (CLP)、common myeloid progenitor (CMP)、granulocyte/macrophage progenitor (GMP)、megakaryocyte/erythrocyte progenitor (MEP)といった前駆細胞群の単離に成功しており(Cell 91, 661-72, 1997; Nature 404, 193-7, 2000; PNAS 99,11872-7,2002)、世界的に血球分化のスタンダードモデルとして認知されている。さらに、マウス GMP の下流に eosinophil lineage-committed progenitor (EoP)、basophil/mast cell progenitor (BMCP)、basophil lineage-committed progenitor (BaP)、mast cell progenitor (MCP)を (J Exp Med 201, 1891-7, 2005; PNAS 102, 18105-10, 2005)、ヒト CMP の下流に EoP を (J Exp Med 206, 183-93, 2009)同定した。

(3) この技術を応用して、マウス GMP 中の M-CSFR 陰性分画内に VCAM-1 を発現する好中球前駆細胞分画 (neutrophil lineage-committed progenitor; NP) 候補集団を見出した。

2. 研究の目的

(マウス)

純化した NP 候補分画を用いて、in vitro での分化能を確認するとともに、致死量放射線照射マウスに同系移植を行い、in vivo 分化能を検証する。NP 分画を含む骨髄球系前駆細胞群の遺伝子発現パターンをマイクロアレイで網羅的に解析し、これまでに報告のある転写因子等の発現を確認するとともに NP 段階で誘導・抑制される遺伝子群の pick-up を行い、分化メカニズムを明らかにする。可能であれば抽出された遺伝子群のうち特に発現変化の大きい遺伝子に関して、過剰発現・ノックダウン等の機能解析を進める。

(ヒト)

マウス NP 候補分画純化に用いたを我々がヒト単球系前駆細胞に発現していると報告した Tim-3(Cell Stem Cell 7,708-17,2010)などと組み合わせることで、マルチカラーFACS 解析により、ヒト NP 候補分画を絞り

込む。同分画を我々のグループが樹立した新規免疫不全マウス(C57/BL6 バックグランドで Rag2および IL2rg を欠損したマウスに NOD 型 Sirpa 変異を導入した B6.Rag2^{nu1}IL2rg^{nu1} NOD-Sirpa ライン; BRGS)に異種移植し、より生理的条件に近い状態での分化能を評価する。ヒト NP が純化可能となればマイクロアレイでの遺伝子解析へと進み、将来的に好中球がその病態に關与する疾患群の治療標的因子を同定するための基盤確立を目的とする。

3. 研究の方法

(マウス)

純化したマウス NP 候補細胞集団を液体培養し、分化成熟した細胞について FACS での表面抗原解析、光学顕微鏡による形態観察を行う。サイトカイン条件を変化させ、分化に与えるインパクトを評価する。Gr-1/CD11b を好中球のマーカーとして、CD11c/HLA-DR を樹状細胞のマーカーとして、M-CSFR をマクロファージのマーカーとして用いる。その他、IL-5Ra、FceRIa をそれぞれ好酸球、好塩基球/肥満細胞のマーカーとする。コントロールとして、M-CSFR 陽性 VCAM-1 陰性細胞分画、M-CSFR 陰性 VCAM-1 陰性細胞分画も同時にアッセイする。

Actin-GFP マウスより純化した GMP 垂分画を同系野生型マウス由来の造血幹細胞とともに、致死量放射線照射した野生型マウスに輸注し、経時的に末梢血・骨髄・脾臓組織を採取し、ドナー由来細胞 (GFP 陽性) の分化系統を確認する。我々の仮説が正しければ、GFP 陽性細胞が好中球にのみ認められる結果となる。

イルミナ社のマイクロアレイを用いて、M-CSFR 陰性 VCAM-1 陽性マウス GMP の遺伝子発現パターンを網羅的に解析する。比較対照としては、VCAM-1 陰性 GMP 分画および CMP 分画を用いる。好中球・単球への分化に關与する既知の転写因子・サイトカイン受容体などの発現を検証するとともに、M-CSFR 陰性 VCAM-1 陽性 GMP で発現量の変化が大きく、機能が明らかでない分子を pick-up し、レンチウイルスを用いた過剰発現系や miRNA を用いたノックダウンの系で、その機能を明らかにしていく。

4. 研究成果

マウス正常骨髄細胞を解析すると GMP 分画のおよそ 10-20%に VCAM-1 が発現していることが確認された。VCAM-1 は単球・マクロファージ系細胞の分化に必須のサイトカインである M-CSF の受容体(M-CSFR)と相互排他的に発現していることから、好中球特異的前駆細胞 (NP) の細胞表面マーカーである可能性が高いと考えられた。

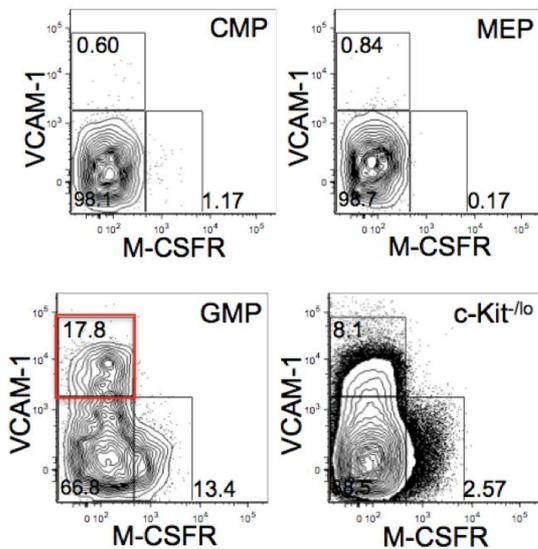
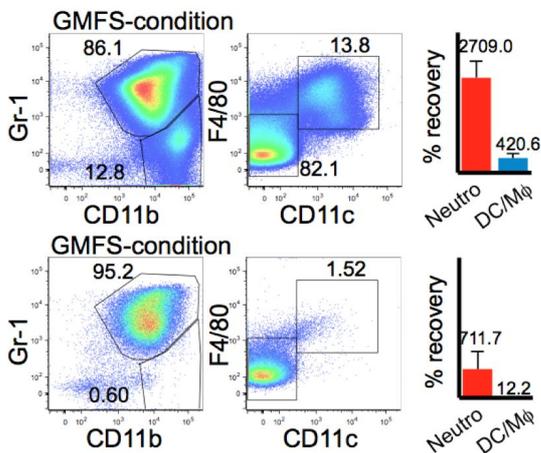


図 1. マウス骨髄球系前駆細胞における VCAM-1 の発現

FACS で分離したこれらの GMP 亜分画、 $VCAM-1^{-/lo}M-CSFR^{-}$ GMP($VCAM-1^{-/lo}$)、 $VCAM-1^{hi}M-CSFR^{-}$ GMP($VCAM-1^{hi}$)、 $VCAM-1^{-/lo}M-CSFR^{+}$ GMP($M-CSFR^{+}$)を用いて in vitro での分化能を比較検討した。好中球および樹状細胞(DC)/マクロファージの両者に分化可能なサイトカイン条件下(GM-CSF, FL, SCF 添加: GMFS condition)で、 $VCAM-1^{-/lo}$ 分画が好中球・DC/マクロファージをともに産生するのにに対し、 $VCAM-1^{hi}$ 分画の分化能は好中球に限定的であった(図 2)。メチルセルロース培地を用いた単一細胞コロニーアッセイ法においても同様の結果が確認された。すなわち、 $VCAM-1^{-/lo}$ 分画および $M-CSFR^{+}$ 分画が好中球コロニー(CFU-G)・マクロファージコロニー(CFU-M)に加えて両者の混在する CFU-GM を形成する一方で、 $VCAM-1^{hi}$ 分画はほぼ CFU-G のみを形成した。これらの結果から $VCAM-1^{hi}GMP$ 分画が NP と定義された。

図 2 . GMP 亜分画の in vitro 分化能



次いで、GMP 亜分画の in vivo 分化能を評価した。Actin-GFP マウス由来の $VCAM-1^{-/lo}$ 、

$VCAM-1^{hi}$ 分画をそれぞれ 10000~100000 細胞 sort し、放射線照射後の C57BL/6J マウスに移植した。Day5 の末梢血・骨髄中に、少数のドナーキメリズム(GFP 陽性細胞)が確認され、 $VCAM-1^{hi}$ 分画は好中球に skew した分化能を示した(図 3)。

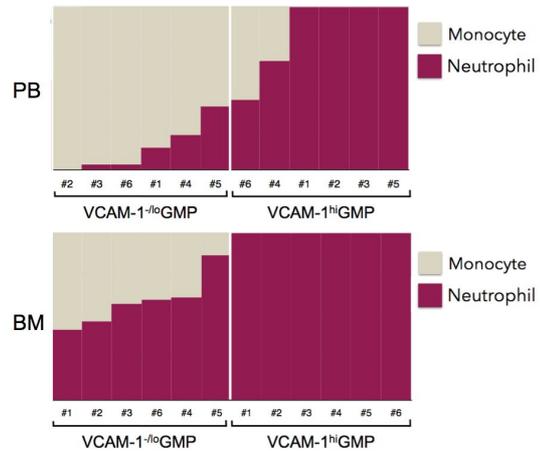


図 3. $VCAM-1^{hi}GMP(NP)$ の in vivo 分化能

最後に、好中球へのコミットメント(系統決定)メカニズムを明らかにするため、遺伝子発現パターンをマイクロアレイで比較し、好中球・単球系関連のいくつかの遺伝子を pick-up して qPCR での解析を追加した。 $VCAM-1^{-/lo}$ 分画から $VCAM-1^{hi}$ 分画へと分化が進むにつれ、好中球関連遺伝子(G-CSFR, Gfi1)の発現は upregulate される一方で、単球系関連遺伝子(Irf8, Klf4)の発現は downregulate されていた(図 4)。

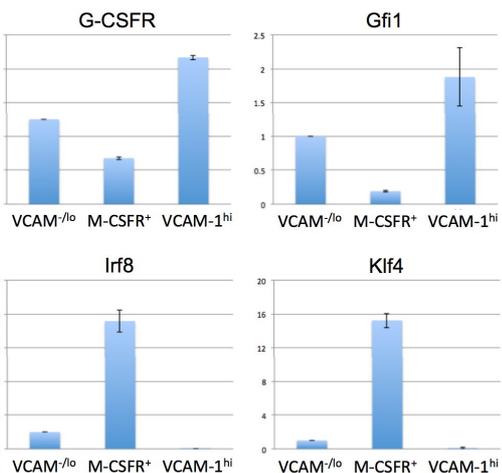


図 4. 系統関連遺伝子発現の変化

本研究により、マウス GMP 中に存在する $VCAM-1^{hi}M-CSFR^{-}$ 分画が好中球系にコミットした NP であることが明らかとなった。この事は逆に、オリジナルの GMP が少なくとも NP を含む雑多な細胞集団であることを示しており、真に bi-potent な GMP は $VCAM-1^{-/lo}$ 分画にのみ存在することを示している。

新たな知見を反映したマウス骨髄球系細胞の分化モデル図を図5に示す。

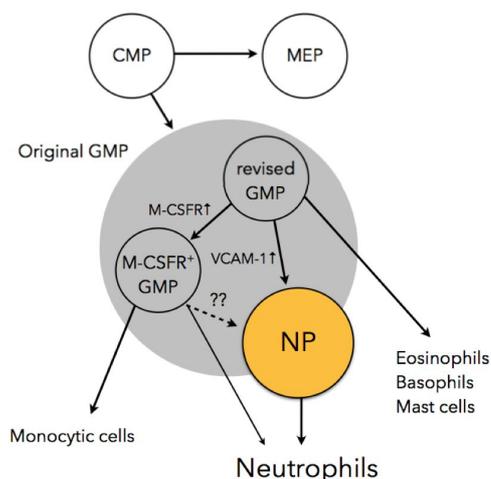


図5. マウス骨髄球系細胞の分化模式図
VCAM-1^{-/-}の定義を加えた系統バイアスのない revised GMP から好中球へコミットした NP と単球系分化に skew した M-CSFR⁺ GMP が分化してくる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Mori Y, Chen JY, Pluvinage JV, Seita J, Weissman IL. Prospective isolation of human erythroid lineage-committed progenitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有 112(31),2015,9638-43

Ho CC, Guo N, Sockolosky JT, Ring AM, Weiskopf K, Ozkan E, **Mori Y**, Weissman IL, Garcia KC. "Velcro" engineering of high affinity CD47 ectodomain as signal regulatory protein α (SIRP α) antagonists that enhance antibody-dependent cellular phagocytosis. J Biol Chem. 査読有 290(20),2015,12650-63

Takashima S, Eto T, Shiratsuchi M, Hidaka M, **Mori Y**, Kato K, Kamezaki K, Oku S, Henzan H, Takase K, Matsushima T, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Akashi K, Teshima T. The use of oral beclomethasone dipropionate in the treatment of gastrointestinal graft-versus-host disease: the experience of the Fukuoka blood and marrow transplantation (BMT) group. Intern Med. 査読有 53(12), 2014, 1315-20

Kuriyama T, Kato K, Sakamoto K, Hayashi M, Takashima S, **Mori Y**, Takenaka K, Iwasaki H, Teshima T, Harada N, Nagafuji K, Miyamoto T, Akashi K. Cord blood transplantation following reduced-intensity conditioning for

adult-onset inherited hemophagocytic lymphohistiocytosis. Intern Med.

査読有 55(6),2016,667-71

Sugio T, Kato K, Aoki T, Ohta T, Saito N, Yoshida S, Kawano I, Henzan H, Kadowaki M, Takase K, Muta T, Miyawaki K, Yamauchi T, Shima T, Takashima S, **Mori Y**, Yoshimoto G, Kamezaki K, Takenaka K, Iwasaki H, Ogawa R, Ohno Y, Eto T, Kamimura T, Miyamoto T, Akashi K. Mogamulizumab treatment prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation induces severe acute graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant. 査読有 2016 May21[Epub ahead of print].

Mori Y, Akashi K, Weissman IL.

Identification of human erythroid lineage-committed progenitors. Rinsho Ketsueki 査読有 57(5),2016,585-91.

〔学会発表〕(計 1 件)

Jiromaru T, Mori Y, Miyawaki K, Miyanishi M, Seita J, Akashi K, Weissman IL. Prospective isolation of mouse neutrophil lineage-committed progenitors. 2015 日本血液学会(金沢)

〔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.1nai.med.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 康雄 (MORI, Yasuo)

九州大学病院 血液・腫瘍内科 助教

研究者番号：90573345

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

宮脇 恒太 (MIYAWAKI, Kohta)