

「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」
平成 23 年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告

長澤 丘司

京都大学再生医科学研究所・教授

炎症の慢性化における造血幹細胞・前駆細胞ニッチの役割とその制御

§1. 研究実施体制

(1)「長澤」グループ

① 研究代表者:長澤 丘司 (京都大学再生医科学研究所、教授)

② 研究項目

・炎症の慢性化における骨髄の CAR 細胞の役割と作用機構を明らかにし、その作用を調節する新しい機能分子を同定する。

§2. 研究実施内容

慢性炎症では、炎症局所での病原体や傷害の持続が注目され研究が進められている。しかし、炎症の主役となる好中球、マクロファージ、リンパ球等の免疫担当細胞を産生し動員するのは骨髄であり、骨髄も慢性炎症の発症や持続に重要な役割を担っていると考えられる。例えば、免疫担当細胞は骨髄で、造血幹細胞から前駆細胞を経て産生されることから、骨髄が炎症局所からの末梢循環系を介したシグナルや、病原体、異常代謝産物によって変化し、炎症を誘導する細胞の産生・動員が継続され、局所の炎症が持続する可能性がある。したがって、慢性炎症の病態の理解と治療法を大きく進めるためには、骨髄という新しい視点を加えることが重要である。

例えば、最近、がんの浸潤、転移にも、がん細胞からのシグナルによって骨髄から動員される骨髄球系の細胞による慢性炎症が重要な役割を果たしているという考えが注目されている (Mantovani, A., et al. *Nature* 454: 434, 2008)。この場合、局所を標的とした治療のみでは必ずしも有効でなく、骨髄での炎症持続機構を抑制することによって、炎症の慢性化が阻止できる可能性がある。骨髄の造血幹細胞・前駆細胞は少数しか存在しないことから、その解析が困難であったが、近年、フローサイトメトリーを用いた解析技術の発展等によりその理解が進みつつある。慢性炎症と骨髄に関しては、慢性炎症刺激で末梢血中の免疫担当細胞数の増加と整合して造血前駆細胞の増殖が促進すること、好中球やマクロファージなどの骨髄球系細胞の造血が促進している一方で、リンパ球前駆細胞の産生が抑制されることが報告された (Ueda, Y., et al. *J. Exp. Med.* 201: 1771, 2005; Nagai, Y., et al. *Immunity* 24: 801, 2006)。次いで、造血幹細胞については、ウイルス感染によって産生される I 型インターフェロン (Essers, MA., et al. *Nature* 458: 904, 2009) や慢性細菌感染刺激 (Baldrige, MT., et al. *Nature* 465: 793, 2010) によって、大部分が静止期にあり増殖していない造血幹細胞が活性化され細胞周期に入ることが最近報告された。一方、アデユバント投与による慢性炎症刺激は TNF α を介して骨髄の CXCL12, SCF を著減させること (Ueda, Y., et al. *J. Exp. Med.* 199: 47, 2004; Ueda, Y., et al. *J. Exp. Med.* 201: 1771, 2005)、慢性炎症によって病変が進行する関節リウマチのモデルマウスである SKG マウス (Sakaguchi, N., et al. *Nature* 426: 454, 2003) や KRNxG7 マウス (Kouskoff, V., et al. *Cell* 87: 811, 1996) において、造血と骨髄の微小環境に CXCL12 の減少を含む顕著な異常が確認された (Ma, Y., et al. *Blood* 114: 4402, 2009; Hashimoto, M., et al. *J. Exp. Med.* 207: 1135, 2010)。しかし、これらの慢性炎症における骨髄の機能を担う細胞やその役割、作用機構は明らかでない。その理由として、骨髄という複雑な三次元空間の中で免疫担当細胞の産生に中心的な役割を担う場であると推測されてきたニッチと呼ばれる特別な微小環境の実体や機能が長年明らかでなかったことがある。私たちは、細胞運動の制御で知られるケモカインファミリーに属する CXCL12 とその受容体 CXCR4 が免疫担当細胞の産生に中心的な役割を担うサイトカインであることを明らかにし、骨髄で “CXCL12 を高発現する長い突起を持った細網細胞 (CAR 細胞)” が健常時の造血幹細胞・前駆細胞に必須のニッチ細胞であることを証明した (Tokoyoda, K., et al. *Immunity* 2004; Sugiyama, T., et al. *Immunity* 2006; Nagasawa, T. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; Nagasawa, T. *Nat. Immunol.* 2008; Omatsu, Y., et al.

Immunity 2010)。CAR 細胞が造血に必須のニッチであるという知見は、慢性炎症刺激や関節リウマチマウスなどの慢性炎症における骨髄で観察される造血や微小環境の異常や炎症の慢性化に CAR 細胞が重要な役割を果たす可能性を提起する(Nagasawa, T., Omatsu, Y., Sugiyama, T. *Trends Immunol.* 32: 315-320, 2011; Sugiyama, T., Nagasawa, T. *Immunity* 34: 463-465, 2011; Sugiyama, T., Nagasawa, T. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 2012 (in press))。

そこで私たちは、慢性炎症刺激や関節リウマチ等の慢性炎症疾患に注目して、その病態進行における造血幹細胞・前駆細胞の変化と CAR 細胞の変化と役割および作用機構を解明し、その機能を調節する新しい制御因子の同定に挑んでいる。H23 年度、CXCL12 遺伝子座に GFP 蛍光遺伝子を置換し CXCL12 高発現細胞 (CAR 細胞) を可視化できる CXCL12-GFP ノックインマウスに慢性細菌感染や慢性ウイルス感染を模倣する合成二重鎖核酸投与、LPS 投与、IFN-g 投与、G-CSF 投与、アデュバント投与を行い、経時的に骨髄の造血幹細胞、各系列の前駆細胞の細胞数と細胞周期、CAR 細胞の細胞数、免疫担当細胞と CAR 細胞との相互作用を解析した。一方、CAR 細胞で特異的に発現する遺伝子の検索を行い、薬剤によって CAR 細胞特異的に遺伝子欠損を誘導できるマウスの作製を進めた。欠損させる遺伝子座の前後に挿入した LoxP 配列を認識して遺伝子を欠損させる Cre 酵素遺伝子を特異的に発現するマウスを作製するため、遺伝子挿入細胞を選択するための薬剤耐性遺伝子を含むターゲティングベクターを作製し、ES 細胞にトランスフェクとして薬剤耐性の有無によりスクリーニングすることにより、相同組み換え ES 細胞を得た。更に、BALB/c 遺伝子背景の SKG マウスは、慢性関節リウマチ患者の約 2.5% に認められる T 細胞の Zap70 の 1 塩基変異を持ち、ヒトの病態を反映する優れた慢性関節炎モデルとして知られることから SKG 変異を CXCL12-GFP ノックインマウスに導入した CAR 細胞の解析が可能な慢性炎症モデルマウスの作製を進めた。

以上より、私たちは、骨髄の可視化、分離可能な CAR 細胞に注目し、壮年期と老年期とを比較しながら慢性炎症の発症と炎症の慢性化における幹細胞・前駆細胞ニッチの役割と作用の分子機構を解明することに向けて着実に研究を進めている。今後、CAR 細胞の機能を調節する新しい制御因子の同定をも想定して、骨髄ニッチ細胞というこれまでの研究と異なる視点から慢性炎症の発症・持続機構を解明することにより、ニッチの機能を調節する新しい治療方法の開発への分子基盤が確立されることが期待できる。

