

「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22年度採択研究代表者

H24 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

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

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)。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、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報告された。一方、アデブバント投与による慢性炎症刺激は TNF $\alpha$  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、骨髄の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、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必須の役割を担うことを明らかにし、骨髄で “CXCL12 を高発現する細網細胞 (CAR 細胞)” が骨髄の CXCL12 と SCF の主たる産生細胞であり、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、慢性炎症において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。

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。この目的を達成するためには、慢性炎症に必須のシグナルをCAR細胞特異的に欠損させる系を樹立することが重要である。はじめに、CAR細胞で特異的に発現する遺伝子の検索を行い、その遺伝子の発現制御系によって、LoxP配列の間の遺伝子を欠損させるCre酵素遺伝子を特異的に発現することで、CAR細胞で目的の遺伝子の欠損を誘導できるマウスを検索した。昨年、米国のMorrisonらは、骨髄でSCFを高発現する細胞が、肥満を抑制するサイトカインであるレプチンの受容体(*lepr*)を高発現することを報告し、*lepr*が、骨髄でのSCFの主たる産生細胞であるCAR細胞で特異的に発現することが示唆された(Ding, L., et al. *Nature* 481: 457, 2012)。そこで、定量RT-PCRによるmRNA発現量の解析を行ったところ、*lepr*は、CAR細胞でのみ発現し、骨芽細胞とSca-1<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>(PaS)細胞、血管内皮細胞等の非血球細胞分画ではほとんど発現していなかった。また、細胞一個あたりの遺伝子発現解析では全てのCAR細胞で*lepr*が発現していた。次にLepr遺伝子座にCreを挿入したLepr-CreノックインマウスとCreによって蛍光蛋白EGFPが発現するloxP-EGFPマウスを交配すると、骨髄でCreが作用したEGFP陽性細胞は全てCAR細胞であり、CAR細胞の約92%でCreが作用したことが明らかになった。全てのCAR細胞でLeprが発現するが、Lepr-CreノックインマウスでCreが作用しないCAR細胞が少数存在することは、一般にCreの発現量はTgマウスよりノックインマウスで弱いこと、Creは十分量発現した細胞でのみ作用し遺伝子欠損を誘導するという事実で説明できる。一方、私たちは、CAR細胞の大部分が骨芽細胞の分化に必須のOsterixを発現することを既に報告している(Omatsu, Y., et al. *Immunity* 2010)。そこで、Osterixの骨芽細胞特異的プロモーターの下流にCreを結合した遺伝子を持つトランスジェニックマウスとloxP-EGFPマウスを交配したところ、骨髄でCreが作用したEGFP陽性細胞はCAR細胞と骨芽細胞であり、CAR細胞の約88%でCreが作用したことが明らかになった<sup>4)</sup>。更に、四肢の間葉系細胞で発現するPrx1転写因子のプロモーターの下流にCreを結合した遺伝子を持つトランスジェニックマウス(Prx1-Cre Tg)とloxP-EGFPマウスを交配すると、骨髄でCreが作用したEGFP陽性細胞はCAR細胞、骨芽細胞とPaS細胞であり、全てのCAR細胞でCreが作用したことが明らかになった<sup>4)</sup>。以上より全てのCAR細胞で目的の遺伝子を欠損させるためにはPrx1-Cre Tgマウス<sup>4)</sup>、大部分のCAR細胞でCAR細胞特異的に目的の遺伝子を欠損させるためにはLepr-Creノックインマウスが有効であることが明らかとなった。また、未知のCAR細胞特異的遺伝子の検索、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も進んでおり、慢性炎症におけるCAR細胞の役割とその分子機構の解明に向けた研究が着実に進んでいる。今後は、慢性炎症に必須のシグナル関連遺伝子のfloxマウス、慢性炎症のモデルマウスとの交配を行う予定である。将来、CAR細胞の機能を調節する新しい制御因子の同定を含め、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。

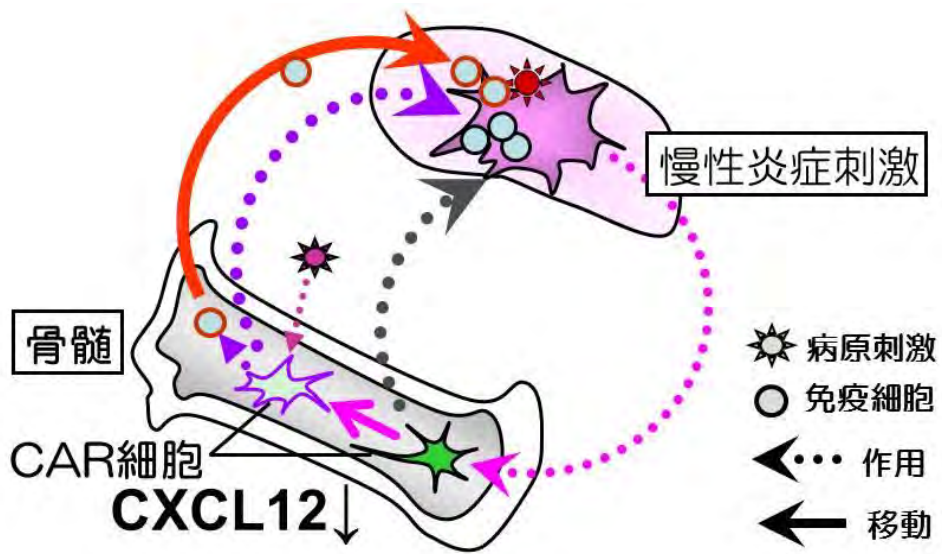


図1

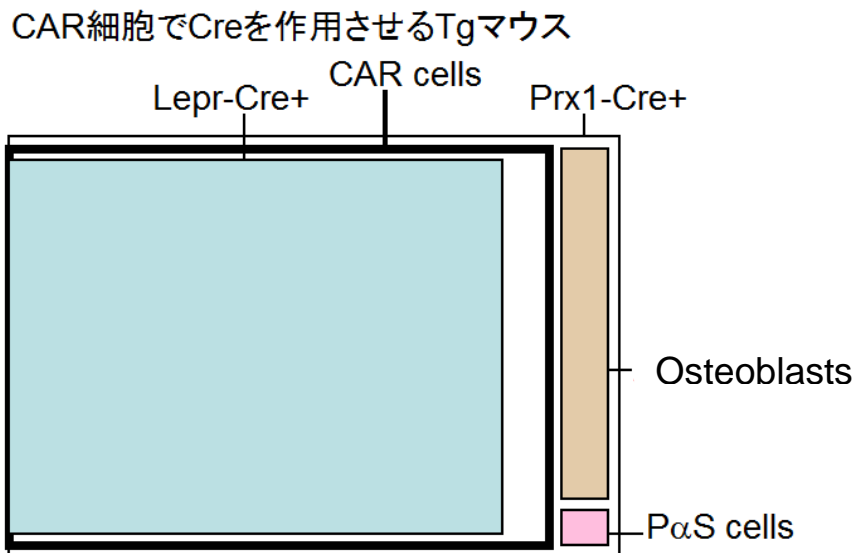


図2

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Takashima, S., Takehashi, M., Ogonuki, N., Morimoto, H., Nagasawa, T., Ogura, A., Shinohara, T.  
Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture.  
*Cell Stem Cell* 11; 567-578, 2012(DOI: 10.1016/j.stem.2012.06.011)
2. Sudo, T., Yokota, T., Oritani, K., Satoh, Y., Sugiyama, T., Ishida, T., Shibayama, H., Ezoe, S., Fujita, N., Tanaka, H., Maeda, T., Nagasawa, T., Kanakura, Y.  
The Endothelial Antigen ESAM Monitors Hematopoietic Stem Cell Status between Quiescence and Self-Renewal.  
*J. Immunol.* 189(1); 200-210, 2012 (DOI: 10.4049/jimmunol.1200056)
3. Nakamura-Ishizu, A., Okuno, Y., Omatsu, Y., Okabe, K., Morimoto, J., Uede, T., Nagasawa, T., Suda, T., Kubota, Y.  
Extracellular matrix protein tenascin-C is required in the bone marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration.  
*Blood* 119(23); 5429-5437, 2012 (DOI: 10.1182/blood-2011-11-393645)
4. Greenbaum, A., Hsu, Y.M., Day, R.B., Schuettpel,z L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., Link, D.C.  
CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance.  
*Nature* 495(7440); 227-230, 2013 (DOI: 10.1038/nature11926)

#### (3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)