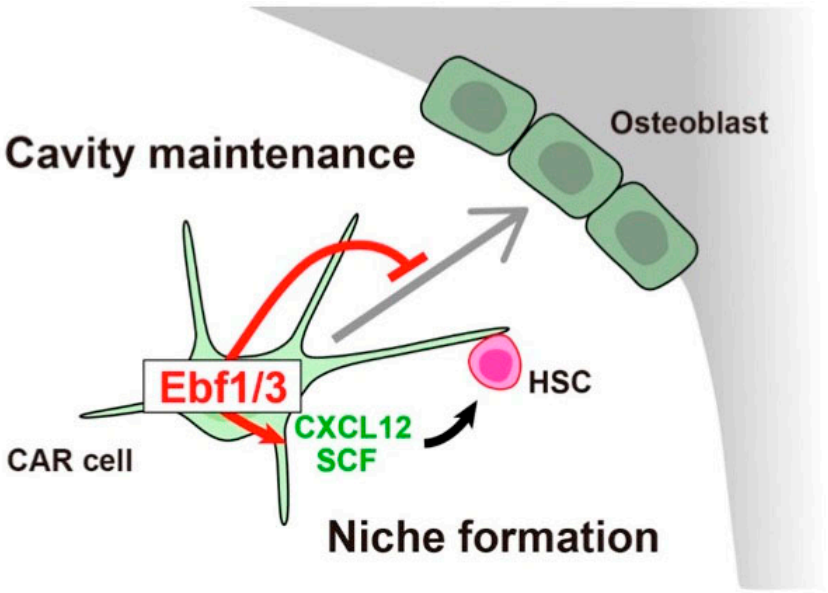
55　微小環境（ニッチ）による免疫細胞の産生・維持機構	長澤　丘司

【目的】骨髄で造血幹細胞や造血前駆細胞が接着し、その維持に必須の限局した微小環境はニッチ（niche）と呼ばれる。私たちは、造血幹細胞の維持、免疫担当細胞の産生に必須である CXCL12 を高発現する長い細胞突起を持った間葉系細胞（CAR 細胞）が CXCL12 と SCF の主たる産生細胞で、造血幹細胞・前駆細胞ニッチを構成することを証明した。また、転写因子 Foxc1 が CAR 細胞特異的に発現し、造血幹細胞・前駆細胞ニッチの形成と維持に必須であることを明らかにしたが、Foxc1、CXCL12、SCF のみで CAR 細胞による造血支持の機構を説明できず、未知の分子機構の解明を研究目的とした。

【方法】成体の CAR 細胞で Foxc1 の欠損により発現量が変化する遺伝子のうち転写因子に注目し、生体での役割を検討した。

【結果】転写因子 Ebf3 が CAR 細胞で特異的に発現することを明らかにし、Ebf3 発現細胞を一過性に標識できるマウスを作製し、CAR 細胞が骨髄の間葉系幹細胞であることを証明した。次に、CAR 細胞特異的 Ebf3 欠損マウスを解析したところ、26 週令で造血幹・前駆細胞数が約半分に減少し、90 週令では、骨髄で骨棘が著増し、重度の大理石病症状を呈していた。半減した骨髄腔に残存した CAR 細胞は、骨芽細胞への分化が亢進しており、骨髄腔あたりの造血幹・前駆細数が著減し、造血幹・前駆細胞ニッチが障害されていた。以上より、CAR 細胞特異的に発現する Ebf3 が、老齢マウスにおいて CAR 細胞の骨芽細胞への分化の抑制と、造血幹・前駆細胞ニッチの維持に必須であることが明らかになった。これより、CAR 細胞は、造血幹・前駆細胞ニッチの維持に必須の２つの転写因子（Foxc1、Ebf3）を特異的に高発現する骨髄特有の間葉系幹細胞であることが示された。

Ebf3 は CAR 細胞特異的に発現し、造血幹細胞・免疫細胞ニッチを維持し、
CAR 細胞の骨芽細胞への分化を抑制する



Seike, M. *et al.*, *Genes Dev* 2018

55. 微小環境（ニッチ）による免疫細胞の産生・維持機構

長澤　丘司

大阪大学 大学院生命機能研究科 幹細胞・免疫発生研究室

Key words：bone marrow，hematopoietic stem cell，niche，bone，ebf

緒　言

骨髄は、その微小環境によって造血幹細胞を維持し、生体防御を担う免疫担当細胞を含む白血球、赤血球、血小板等10 種類以上の血液細胞を適切な細胞数産生し続ける他、形質細胞を含む免疫記憶リンパ球をも維持しているが、その分子機構の理解は十分でなく、試験管内で再現できない。骨髄で造血幹細胞や造血前駆細胞が接着し、その維持に必須の限局した微小環境はニッチ（niche）と呼ばれ、注目されてきたが、その実体や機能は、長年明らかでなかった。

2003 年に骨芽細胞が造血幹細胞ニッチを構成すると報告され、定説になりつつあったが、骨芽細胞特異的に細胞死を誘導しても造血幹細胞や免疫担当細胞は減少しないこと［1, 2］、最新の組織学的解析で造血幹細胞は骨芽細胞と有意に接着または近接しない［3］等の知見より、その根拠が十分でなくなっている。

一方、私たちは、ケモカイン CXCL12 が造血幹細胞、共通リンパ球前駆細胞（CLP）の維持と B 細胞、形質細胞様樹状細胞（pDC）、NK 細胞の産生に必須であることを明らかにし、骨髄で“CXCL12 を高発現する突起を持った細網細胞（CAR 細胞）”を同定した。更に、CAR 細胞が CXCL12 と SCF（造血幹細胞と赤血球前駆細胞の維持に必須）の主たる産生細胞で、造血幹細胞・前駆細胞ニッチを構成する脂肪・骨芽細胞前駆細胞であることを証明した［4, 5］。

また、最近、転写因子 Foxc1 が CAR 細胞特異的に発現し、造血幹細胞・前駆細胞ニッチの形成と維持に必須であることを明らかにした［6］。Foxc1 欠損マウスの骨髄では、造血幹細胞、共通リンパ球前駆細胞、B 前駆細胞、成熟 B 細胞、pDC が著減する。欠損マウスの CAR 細胞での CXCL12 と SCF の発現量は低下するが、造血幹細胞や共通リンパ球前駆細胞を維持できる量（約 20%～40%）残存し、これのみで Foxc1 欠損によって造血が著減する表現系を説明できない。そこで、Foxc1 の作用機構の解析を基盤にすることによって、微小環境（ニッチ）が造血幹細胞と免疫担当細胞を維持・産生する未知の分子機構を解明することを研究目的とした。その結果、CAR 細胞特異的に発現する転写因子 Ebf3 が、老齢マウスにおいて CAR 細胞の骨芽細胞への分化の抑制と、造血幹・前駆細胞ニッチの維持に必須であることが明らかになった［7］。

方　法

Foxc1 を発生過程より全ての CAR 細胞で欠損する Prx1-Cre-Foxc1$^{flox/flox}$ マウスでは、3 週齢で、造血幹細胞、共通リンパ球前駆細胞、B 前駆細胞、成熟 B 細胞、pDC が著減し、大部分の CAR 細胞が脂肪細胞に分化する。しかし、Foxc1 の欠損を成体で誘導した Ubc-Cre-Foxc1$^{flox/flox}$ マウスでは、大部分の CAR 細胞は、脂肪細胞に分化しないにもかかわらず、造血幹細胞、共通リンパ球前駆細胞、B 前駆細胞、成熟 B 細胞、pDC が著減する。私たちは、成体で CAR 細胞特異的に Foxc1 の欠損を誘導できる Ubc-Cre；Foxc1$^{flox/flox}$ マウスの CAR 細胞（CD45^{-}Ter119^{-}CD31^{-}Sca-1^{-}PDGFRβ^{+}）と骨芽細胞をフローサイトメトリーで分離し、遺伝子発現量を野生型マウスと比較した。発現量の差が大きい遺伝子のうち、転写因子に注目し、定量 RT-PCR によって、骨髄の非血液細胞分画、すなわち CAR 細胞、内皮細胞、Sca-1 陽性 PαS 細胞（CD45^{-}Ter119^{-}CD31^{-}Sca-1^{+}PDGFRα^{+}細胞）、骨芽細胞での発現量を比較した。CAR 細胞での発現の特異性が高い分子について、flox マウスを作製し、LepR-Cre ノックインマウスとの交配により CAR 細胞特異的遺伝子欠損マウスを作製し、当該分子の生体骨髄での役割を明らかにした。

結果および考察

Foxc1 の欠損により転写因子 Ebf3 の発現が低下していた。Ebf3 は、定量 RT-PCR によって、血液細胞分画と骨髄の非血液細胞分画、すなわち CAR 細胞、内皮細胞、Sca-1 陽性 PαS 細胞（$CD45^{-}Ter119^{-}CD31^{-}Sca\text{-}1^{+}PDGFR\alpha^{+}$ 細胞）、骨芽細胞の中で、CAR 細胞での発現が特異的に高かった。そこで、薬剤（tamoxifen（Tam））投与によって Ebf3 発現細胞でのみ蛍光蛋白質遺伝子が恒常的に発現する Ebf3 発現細胞を標識できるマウスに、10 週令で Tam を投与したところ、投与後 2 日では CAR 細胞のみが標識されており、投与後約 1 年経過しても、全ての CAR 細胞が標識されていた。また、Tam 投与後約 1 年経過したマウスでは、骨髄の大部分の骨芽細胞と脂肪細胞が標識されており、CAR 細胞は、自己複製し、骨髄の骨芽細胞と脂肪細胞を供給する間葉系幹細胞であることがはじめて証明された［7］。

一方、Ebf3 flox マウスを LepR-Cre ノックインマウスと交配した CAR 細胞特異的に Ebf3 を欠損する LepR-Cre；$Foxc1^{flox/flox}$ マウスを解析した。野生型マウスと比較して、26 週令 LepR-Cre；$Foxc1^{flox/flox}$ マウスの大腿骨では、組織学的解析で異常は認められなかったが、フローサイトメトリー解析で、B 前駆細胞の細胞数は著差なく、造血幹細胞、共通リンパ球前駆細胞（CLP）、骨髄球系前駆細胞、赤血球前駆細胞の細胞数が約半分に減少していた［7］。

しかし、驚いたことに 90 週令の LepR-Cre；$Foxc1^{flox/flox}$ マウスの組織学的解析では、骨髄に異所性の骨棘が著増し、重度の大理石病症状を呈していた。このマウスの骨髄腔は半分以下に減少し、CAR 細胞は残存していたが、骨基質を産生する成熟骨芽細胞で発現が増加するアルカリフォスファターゼ活性が著増しており、野生型マウスではほとんど観察されない、転写因子 Osterix を高発現する CAR 細胞が著増していた。更に、フローサイトメトリーで分離した CAR 細胞の定量 RT-PCR によって、成熟骨芽細胞で発現が増加する Osterix、Osteocalcin、CollagenIa の発現が著増していた。以上より、老齢マウスで Ebf3 の欠損により CAR 細胞の骨芽細胞への分化が著明に進行していた。一方、フローサイトメトリー解析で、造血幹細胞、共通リンパ球前駆細胞（CLP）、骨髄球系前駆細胞、赤血球前駆細胞、B 前駆細胞、B 細胞の細胞数が著減しており、骨髄腔あたりに換算しても、これらの細胞数は著減していた（図 1）。また、フローサイトメトリーで分離した CAR 細胞の定量 RT-PCR では、造血幹細胞や B 前駆細胞、赤血球前駆細胞の維持に必須のサイトカイン CXCL12 と SCF の発現量が著減しており、造血幹・前駆細胞ニッチが障害されていた［7］。

以上より、CAR 細胞特異的に発現する Ebf3 が、老齢マウスにおいて CAR 細胞の骨芽細胞への分化の抑制と、造血幹細胞・B 前駆細胞ニッチの維持に必須であることが明らかになった。これによって、CAR 細胞は、造血幹細胞・免疫前駆細胞ニッチの維持に必須の 2 つの転写因子（Foxc1、Ebf3）を特異的に高発現する骨髄特有の間葉系幹細胞であることが示された（図 2）［7］。

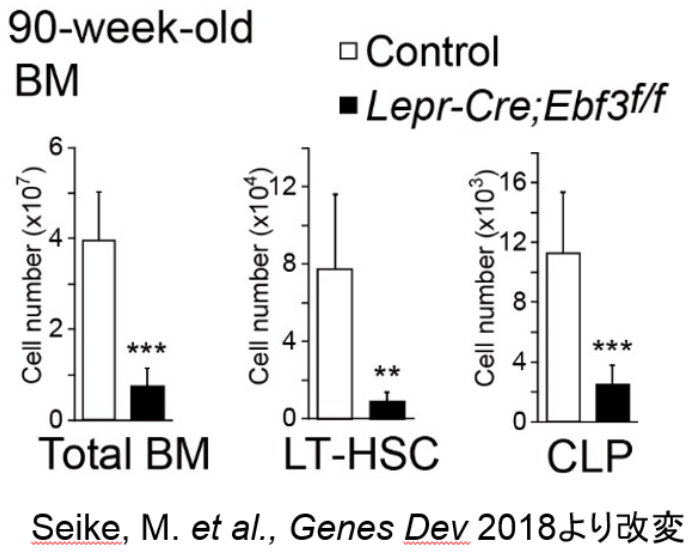


図 1. CAR 細胞特異的に発現する転写因子 Ebf3 の欠損により、90 週令の骨髄で、造血幹細胞（HSC）、共通リンパ球前駆細胞（CLP）が著減していた。t 検定を施行. **p < 0.01, ***p < 0.001.
Seike et al. Genes Dev 2018 より改変.

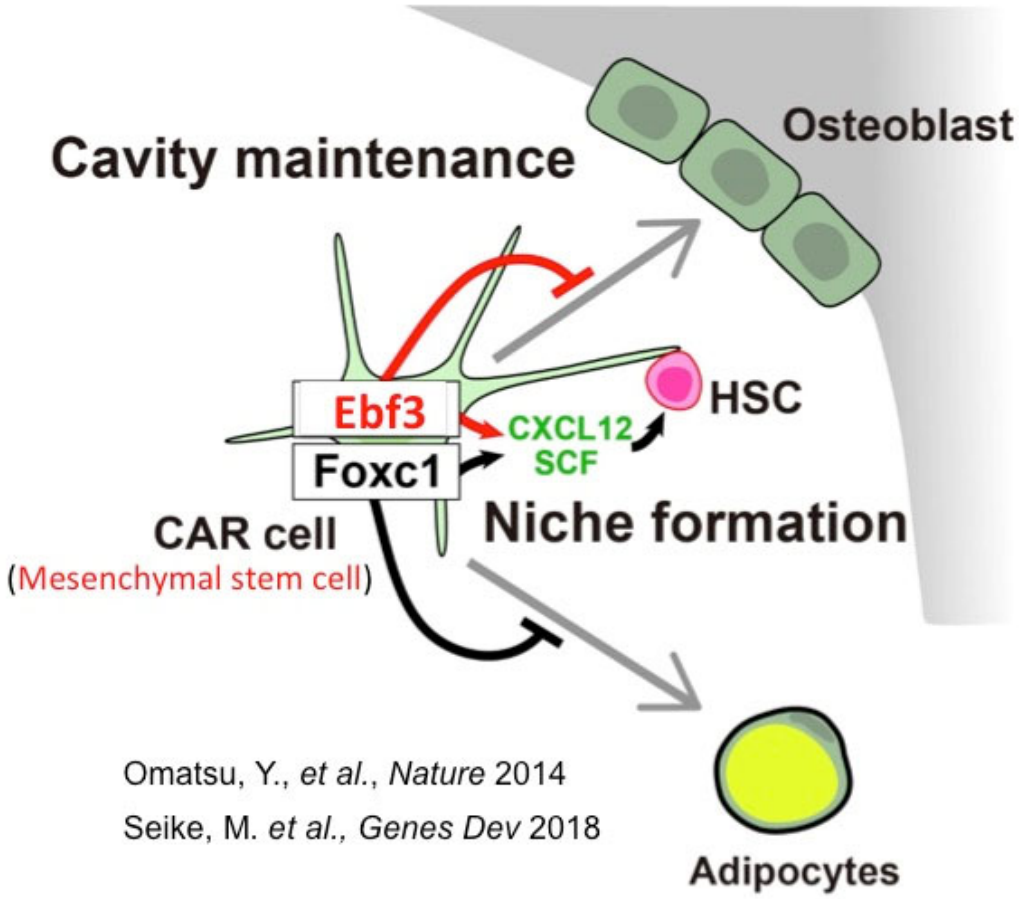


図 2. CAR 細胞は、造血幹・前駆細胞ニッチの維持に必須の 2 つの転写因子（Foxc1、Ebf3）を特異的に高発現する骨髄特有の間葉系幹細胞である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学ウイルス・再生医科学研究所の近藤玄、渡邊仁美である。

文　献

1) Bowers M, Zhang B, Ho Y, Agarwal P, Chen CC, Bhatia R. Osteoblast ablation reduces normal long-term hematopoietic stem cell self-renewal but accelerates leukemia development. Blood. 2015 Apr 23;125(17):2678-88. doi: 10.1182/blood-2014-06-582924. Epub 2015 Mar 5.

2) Yu VW, Saez B, Cook C, Lotinun S, Pardo-Saganta A, Wang YH, Lymperi S, Ferraro F, Raaijmakers MH, Wu JY, Zhou L, Rajagopal J, Kronenberg HM, Baron R, Scadden DT. Specific bone cells produce DLL4 to generate thymus-seeding progenitors from bone marrow. J Exp Med. 2015 May 4;212(5):759-74 doi: 10.1084/jem.20141843. Epub 2015 Apr 27.

3) Acar M, Kocherlakota KS, Murphy MM, Peyer JG, Oguro H, Inra CN, Jaiyeola C, Zhao Z, Luby-Phelps K, Morrison SJ. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. Nature. 2015 Oct 1;526(7571):126-30. doi: 10.1038/nature15250. Epub 2015 Sep 23.

4) Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. Immunity 2006; 25: 977-988. PMID:17174120.

5) Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, *et al.* The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. Immunity 2010; 33: 387-399. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.017.

6) Omatsu Y, Seike M, Sugiyama T, Kume T, Nagasawa T. Foxc1 is a critical regulator of haematopoietic stem/progenitor cell niche formation.Nature. 2014 Apr 24;508: 536-40. doi: 10.1038/nature13071. Epub 2014 Mar 2.

7) Seike M, Omatsu Y, Watanabe H, Kondoh G, Nagasawa T.Stem cell nich-specific Ebf3 maintains the bone marrow cavity.Genes Dev. 2018 Mar 1;32(5-6):359-372. doi: 10.1101/gad.311068.117. Epub 2018 Mar 21.