

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26461442

研究課題名（和文）成体の血液細胞系譜の起源の多様性と機能との関連性についての幹細胞学的研究

研究課題名（英文）Multiple developmental origins of adult blood cell lineages and its relevance to functions

研究代表者

山根 利之（YAMANE, Toshiyuki）

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30452220

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：近年、胎生期に発生した成熟血液細胞が、成体骨髄の造血幹細胞へ依存せず、生涯にわたり、末梢組織に存在し続けることが示されている。本研究課題では、これらの成体造血幹細胞非依存的な細胞系譜の発生学的起源を探るとともに、その起源の違いによる機能差異の可能性について精査した。その結果、造血幹細胞非依存的マクロファージについては、卵黄嚢の起源を示唆した。また卵黄嚢に由来するNK細胞の存在を明らかとし、成体由来NK細胞と機能差異を見出した。

研究成果の概要（英文）：In recent years, it has been shown that some mature blood cells originated from embryonic stages persist in adult bodies independently from hematopoietic stem cells (HSC). In this study, we searched the origins of these HSC-independent cell lineages and examined the functional differences between embryo-derived cells and HSC-derived cells. Our study indicated the origin of some macrophages and NK cells in the yolk sac. In addition, we observed a functional differences between yolk sac-derived and adult HSC-derived NK cell lineages.

研究分野：血液学 免疫学 幹細胞生物学 発生学

キーワード：造血発生 細胞分化 造血幹細胞 発生 卵黄嚢 マクロファージ NK細胞 B-1 B細胞

## 1. 研究開始当初の背景

末梢組織に存在するほとんどの成熟血液細胞は、これまで骨髄などの造血組織に存在し唯一自己複製能と多分化能を兼ね備えた造血幹細胞から絶えず供給されつづけると考えられてきた。例外として腹腔や胸腔に存在するB-1B細胞が自己複製能を有することがよく知られていたが、研究開始当初、B-1B細胞のみならず一部の単球・マクロファージ系譜も造血幹細胞に依存せず、成熟細胞自身が末梢組織において細胞分裂を介して長期間に渡って自律的に生存しつづけることが判明してきていた。しかしながら、成体造血幹細胞とは独立に維持される可能性のあったこれらの細胞系譜が、実際どのような前駆細胞からいつ形成されるのかについては具体的には明らかとされていなかった。

これらの発生分化過程を調べる上で、造血発生の詳細を把握しておく必要があったが、研究開始当初、我々は胚発生過程における造血細胞の系譜関係について、細胞表面抗原の発現を指標とした造血前駆細胞集団の単離、性状解析から、胚発生過程における造血細胞の階層性は概ね明らかとしていた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究課題では、以下の点について研究を進めた。

(1) 造血幹細胞非依存的に形成される末梢血液細胞プールとその造血前駆細胞の同定および成体造血幹細胞の寄与の有無の確認。

(2) 起源の異なる同系列細胞における機能的差異の有無の検証。

## 3. 研究の方法

(1) 造血幹細胞非依存的に形成される末梢血液細胞プールとその造血前駆細胞の同定および成体造血幹細胞の寄与の有無の確認。

マウス胚の解析、またマウス胚からセルソーターで単離を行った造血前駆細胞を用い

て、分化能を ex vivo で精査するとともに、マウスへの移植系によって、その成体における長期にわたる生着性を確認した。

(2) 起源の異なる同系列細胞における機能的差異の有無の検証。

同様にマウス胚や単離した造血前駆細胞から誘導した機能細胞を用いて、ex vivo において機能アッセイを行った。

## 4. 研究成果

(1) 造血幹細胞非依存的に形成される末梢血液細胞プールとその造血前駆細胞の同定および成体造血幹細胞の寄与の有無の確認。

### B-1B 細胞系譜について

これまでに造血幹細胞が出現する以前に卵黄嚢に由来する B 細胞系譜が、体腔に多く存在する B-1B 細胞へ生涯に渡り寄与していることを示してきたが、B-2B 細胞系譜への寄与についてはごく少量であると推察していた。しかしながら、マウス胎齢 10.5 日の胎仔肝臓を単離し、ex vivo で器官培養することで得られる B 細胞系譜はほぼ全て B-2B 細胞系譜であった。大動脈及びその周辺領域で形成される造血細胞は胎齢 11.5 日目以降に初めて胎仔肝臓へ到達することから、胎齢 10.5 日の胎仔肝臓から形成された血液細胞は、卵黄嚢由来と考えられる(実際に卵黄嚢に起源する CD45<sup>+</sup>KIT<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>細胞が胎齢 10.5 日には胎仔肝臓していることは確認済み)。このことは、少なくとも造血幹細胞が出現する以前の胎生期における最初期の B-2B 細胞形成は卵黄嚢由来であることを示された。

また逆に、最近、成体マウスの最も未熟な造血幹細胞は、B-1B 細胞への分化能を失っているとの報告があったが、我々は、老齢マウス骨髄から Lineage-KIT<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>細胞を単離し、ex vivo にて短期間、培養し、Rag1 ノックアウトマウスへ移植することで、効率よく B-1B 細胞へ分化させられることを示し

ている。生理的条件においてどの程度、寄与があるかについては不明であるが、少なくとも分化能は失われていないことを示した。上述の報告については、レシピエント型骨髄細胞と競合的移植を用いているため、レシピエント型骨髄細胞がより早く B-1B 細胞末梢プールを形成し、ドナー造血幹細胞の寄与を観察しにくくしている可能性が高い。

また本研究課題の副次的成果として、卵黄嚢由来プロB細胞と成体骨髄由来プロB細胞間で発現差異のある遺伝子群を見出した。これらのデータから B-1B 細胞方向および B-2B 細胞方向への偏向分化を説明する可能性のある候補遺伝子を多く抽出した。

### マクロファージ系譜について

一部の単球・マクロファージ系譜については造血幹細胞非依存的に産生されることが示されていたが、その起源については不明であった。そこで我々は、まず単球・マクロファージ系譜が胚体内でいつ出現するのか検討した。その結果、マウス胚胎齢 9.5 日目には、卵黄嚢において、CSF1R (FMS)陽性の細胞が、CD45<sup>+</sup>分画中に存在することを示した。また胎齢 10.5 日には卵黄嚢のみならず、胚本体においても CSF1R 陽性細胞が出現していた(図)。前出の通り、大動脈及びその周辺領域において造血細胞が形成されるのは胎齢 11 日目以降であるので、最初期の単球・マクロファージ系譜は卵黄嚢由来であることが示された。卵黄嚢においては多段階的に造血が進行するので、現在これらの CSF1R 陽性細胞の起源を探索中である。

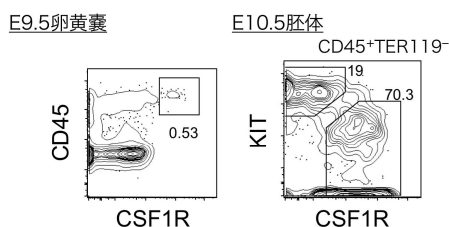


図 マウス胚におけるCSF1R陽性細胞の起源

### NK 細胞系譜について

NK 細胞について、これまで胎仔肝臓がその最初の供給源であると考えられてきた。これに加え、我々は卵黄嚢に存在する CD45<sup>+</sup>KIT<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>の多能性造血細胞が NK 細胞を供給し得ることを NK 細胞を欠く IL2R $\gamma$ c ノックアウトマウスへの移植系で示した。これらの移植した NK 細胞系譜は、移植後 12 週を超えて成体マウスに存在していた。現在のところ、生理的な条件下で卵黄嚢由来 NK 細胞が、長期間にわたり生存するかについて不明であるが、少なくとも競合する NK 細胞系譜が不在の場合には、長期間にわたり成体内に維持され得ることを示した。

### (2) 起源の異なる同系列細胞における機能的差異の有無の検証。

#### NK 細胞系譜について

上述の研究から卵黄嚢由来 NK 細胞系譜と成体骨髄由来 NK 細胞系譜の機能を比較した。まず、IFN $\gamma$  産生能を比較したが、有意な差は認められなかった。一方、成体骨髄由来 NK 細胞系譜と比較し、卵黄嚢由来 NK 細胞系譜は、細胞を傷害する機能が有意に低いことが判明した。このことは、発生初期の NK 細胞系譜は、サイトカイン産生に特化していることが示した。また発生初期には、組織適合性抗原(MHC)クラス I を発現しない組織が多く、容易に NK 細胞の攻撃対象となり得ることから、このことの生物学的意義も予想される。

#### <今後の展望>

現在、発生学的起源の異なる B-1B 細胞系譜についても、その抗原特異性など、機能の差異を精査している。また起源の異なるマクロファージ系譜についても、その機能の特異性について今後、解析を進めていく。NK 細胞系譜については、卵黄嚢由来 NK 細胞が、胎生期や新生仔期に一過性の細胞集団であ

るのか、あるいは生理的条件下においても長期間にわたって生存する細胞であるのか精査するとともに、低細胞傷害機能性を説明し得る分子機構について明らかとしたい。これらの研究を通じて、血液細胞系譜の発生学的起源の多様性と機能的差異について、その生物学的意義について考察したい。

#### 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 2 件)

Toshiyuki Yamane, Chie Ito, Aya Washino, Kana Isono, Hidetoshi Yamazaki. Repression of primitive erythroid program is critical for the initiation of multi-lineage hematopoiesis in mouse development. *J. Cell. Physiol.* 232: 323-330, 2017 [査読有]

Naoki Tsunokuma, Toshiyuki Yamane, Chiaki Matsumoto, Motokazu Tsuneto, Kana Isono, Kyoko Imanaka-Yoshida, Hidetoshi Yamazaki. Depletion of neural crest-derived cells leads to reduction in plasma noradrenaline and alters B lymphopoiesis. *J. Immunol.* 198: 156-169, 2017 [査読有]

[学会発表](計 5 件)

Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki “Characterization of embryonic day 9-derived B progenitors” 第 45 回 日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月 7 日 沖縄コンベンションセンター (沖縄・宜野湾)

Toshiyuki Yamane, Chie Ito, Hidetoshi Yamazaki “Initiation of multi-lineage hematopoiesis during mouse ontogeny” 第 78 回 日本血液学

会学術集会 2016 年 10 月 13 日 パシフィック横浜 (神奈川・横浜)

Toshiyuki Yamane, Chie Ito, Hidetoshi Yamazaki “Cellular and genetic cues to multipotency during ontogeny” 第 77 回 日本血液学会学術集会 2015 年 10 月 17 日 ANA クラウンプラザホテル金沢 (石川・金沢)

Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki “Cellular and genetic cues to multipotency during ontogeny” 第 43 回 日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 11 日 国立京都国際会館 (京都・京都)[口頭発表]

Naoki Tsunokuma, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki “Roles of neural crest-derived cells in the mouse bone marrow and thymic hemato-lymphopoiesis” 第 43 回 日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 11 日 国立京都国際会館 (京都・京都)

[その他]

ホームページ等

三重大学大学院医学系研究科幹細胞発生学分野

[http://www.medic.mie-u.ac.jp/physiol\\_regener/](http://www.medic.mie-u.ac.jp/physiol_regener/)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

山根 利之 (YAMANE, Toshiyuki)

三重大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：30452220

(2)研究分担者

山崎 英俊 (YAMAZAKI, Hidetoshi)

三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：00283987

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

伊藤 千絵 (ITO, Chie)