

ヒトB細胞のマクロファージへのLineage転換：

ホジキンリンパ腫の病態との関連

(課題番号 17590993)

平成17年度～平成18年度科学研究費補助金

基盤研究 (C) (2) 研究成果報告書

平成19年3月31日

研究代表者

三重大学大学院医学系研究科教授 片山直之

研究組織

研究代表者：片山 直之（三重大学大学院医学系研究科教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	2,000	0	2,000
平成 18 年度	1,500	0	1,500
総計	3,500	0	3,500

研究の背景と目的

ヒト末梢血単球はマクロファージだけでなく、樹状細胞へも分化することが示されているが、我々はこれまで単球のマクロファージあるいは樹状細胞への分化のサイトカインによる制御機構を解明してきた。また、我々はヒト末梢血成熟好中球はすでに未分化な段階で分化の方向性（系統）が決定され、分葉球に分化するだけと考えられていたが、末梢組織で産生されるサイトカインの存在下で他の系統の細胞にも系統転換分化することを報告した。これらのことは、ヒト成熟血液細胞は分裂能を喪失し、成熟分化するのみと考えられている分化段階であっても多分化能が保持されていることを示しており、血液細胞の分化の認識の根幹に関わる重要な知見であると考えられる。

Hodgkin 細胞が抗原提示細胞であるマクロファージとしての細胞学的特性を持っていることは以前より知られていた。また、Hodgkin リンパ腫の腫瘍は、腫瘍化した少数の Hodgkin 細胞とそれらの周囲に集積した非腫瘍性の CD4⁺ T 細胞より構成されていることが明らかにされている。本研究は、Hodgkin 細胞は腫瘍性の B 細胞が抗原提示細胞であるマクロファージへ系統転換分化した細胞であり、それらが選択的に CD4⁺ T 細胞を刺激し、増生させ、腫瘍を形成している疾患が Hodgkin リンパ腫であるとの仮説のもとに、末梢血 B 細胞の抗原提示細胞であるマクロファージへの系統転換分化の可能性についての検討を目的として開始された。

研究成果

本研究の推進中に、ヒト末梢血単球が皮膚環境で構成的に産生されるサイトカインである GM-CSF、TGF- β 1、Notch リガンド Delta-1 により、Langerhans 細

胞へ分化することを見出した。GM-CSF と IL-3 の単球における細胞内へのシグナルは共通の受容体サブユニットである β 鎖により伝達されると考えられているが、IL-3、TGF- β 1、Notch リガンド Delta-1 の存在下では、単球から Langerhans 細胞は誘導されなかった。これらの知見に基づき、以下の 4 点を中心として研究を遂行した。

1. 皮膚環境で構成的に産生されるサイトカインである GM-CSF、TGF- β 1、Notch リガンド Delta-1 によるヒト末梢血単球の Langerhans 細胞への分化。
2. ヒト末梢血単球の Langerhans 細胞への分化における皮膚環境の特異性の検証。
3. 成熟好中球と単球・マクロファージの細胞分裂歴の差異。
4. ヒストン脱アセチル化酵素の造血前駆細胞の増殖と分化における役割。

1. Langerhans 細胞は表皮の構成細胞の 1 つであり、T 細胞の初期免疫応答を引き起こす抗原呈示細胞であるが、ヒト Langerhans 細胞の発生や分化経路については十分に解明されていなかった。皮膚の上皮と真皮の境界領域に存在するケラチノサイトは GM-CSF と TGF- β 1 を分泌している。ケラチノサイトに囲まれた表皮幹細胞は Notch リガンド Delta-1 を発現している。そこで、ヒト末梢血単球を GM-CSF、TGF- β 1、Notch リガンド Delta-1 の存在下で培養したところ、Langerhans 細胞に発現されている CD1a、CLA、CCR6、Langerin、E-cadherin を発現する細胞が誘導された。これらの細胞の電子顕微鏡検査では、多数の細長い細胞突起と細胞質内に Langerhans 細胞に特異的な Bribeck 顆粒が確認された。これらのことは、ヒト末梢血単球を GM-CSF、TGF- β 1、Notch リガンド Delta-1 で培養して得られた細胞は Langerhans 細胞であることを示している。次に、Notch シグナルの下流にある HES-1 の発現を検討した。Notch リガンド Delta-1 で刺激された培養細胞より RNA を抽出し、HES-1 遺伝子の発現をリアルタイム PCR にて検討したところ、その発現が約 10 倍に亢進していた。Notch の cleavage を阻害することにより Notch シグナルを阻害する γ -secretase 阻害剤を Notch リガンド Delta-1 を含む培養系に加えたところ、単球から Langerhans 細胞の誘導が阻害された。これらの結果は、我々の実験システムにおける Notch シグナルの伝達を確認するものである。GM-CSF、TGF- β 1、Notch リガンド Delta-1 で誘導された Langerhans 細胞は貪食能を持ち、CCR6 のリガンドである MIP-3 α に対する走化性を示した。これらの細胞を CD40 リガンドと TNF- α で成熟させると、成熟型の抗原呈示細胞の表現型を示し、抗原分子特異的に T 細胞を刺激する能

力を獲得し、CCR7 のリガンドである MIP-3 β に対する走化性を示すようになった。以上の研究成果は、ヒト末梢血単球が皮膚環境で産生されるサイトカインにより Langerhans 細胞へ分化することを示すとともに、Notch リガンド Delta-1 の造血系における新たな機能的側面を明らかにしたものである。さらに、Langerhans 細胞の調整法の確立は Langerhans 細胞の細胞生物学的研究のみならず、Langerhans 細胞の細胞療法への応用の可能性を与えるものと期待される。

2. GM-CSF と IL-3 の受容体は 2 つのサブユニットから構成されており、それぞれに特異的な α 鎖と共通の β 鎖がある。 α 鎖だけではサイトカインに対する結合能は弱く、 β 鎖にはサイトカインとの結合能はない。 α 鎖と β 鎖がヘテロダイマーを構成すると、受容体は高親和性となり、サイトカインと結合し、その刺激は β 鎖を介して細胞内に伝達される。まず、ヒト末梢血単球における GM-CSF 受容体 α 鎖 (GM-CSFR α) と IL-3 受容体 α 鎖 (IL-3R α) の発現を検討したところ、いずれも発現されていた。単球を GM-CSF あるいは IL-3 の存在下で 7 日間培養すると、どちらにおいても単球はマクロファージへ分化した。単球を GM-CSF + IL-4 あるいは IL-3 + IL-4 の存在下で 7 日間培養すると、表面形質にわずかな差異を認めるものの、どちらの培養系においても樹状細胞が誘導された。これらの所見は単球のマクロファージあるいは樹状細胞への分化においては、GM-CSF と IL-3 は同様の作用を示し、それらの作用には受容体の β 鎖が関わっていることを示している。1 でも記述したように、GM-CSF は TGF- β 1 と Notch リガンド Delta-1 が存在すると、ヒト末梢血単球を Langerhans 細胞へ分化させる。そこで、単球を TGF- β 1 と Notch リガンド Delta-1 の存在下で、GM-CSF を IL-3 に替えて培養したが、IL-3 + TGF- β 1 + Notch リガンド Delta-1 では Langerhans 細胞は誘導されなかった。IL-3 + TGF- β 1 + Notch リガンド Delta-1 の組み合わせの培養系に GM-CSF をさらに添加すると、ヒト末梢血単球は Langerhans 細胞へ分化した。Microarray 解析では、GM-CSF + TGF- β 1 + Notch リガンド Delta-1 の組み合わせで培養した細胞に特異的に発現している遺伝子が存在し、そのなかには Langerhans 細胞に特異的な E-cadherin と Langerin が含まれていた。IL-3 + TGF- β 1 + Notch リガンド Delta-1 の組み合わせで培養した細胞に特異的に発現している遺伝子は検出されなかった。GM-CSF は TGF- β 1 や Notch リガンド Delta-1 とともに皮膚環境で産生されるが、IL-3 の分泌細胞は定常状態ではなく、活性化された T 細胞に限られることから、単球の Langerhans 細胞への分化には

皮膚組織のサイトカイン環境が重要であることを示している。本研究は細胞分化の決定と末梢組織環境の関連性を改めて指摘するものである。

3. 化学療法後の造血の回復期において単球の方が好中球に先駆けて回復して行くことはよく観察される。このような現象のメカニズムを検討するために、顆粒球・マクロファージ前駆細胞から好中球と単球・マクロファージまでの細胞分裂歴について、細胞分裂に伴い娘細胞に均等に配分される細胞内色素 CFSE などを用いて解析した。90%以上が顆粒球・マクロファージ前駆細胞である CFSE^{high}Sca-1⁺Lin⁻細胞を標的細胞として SCF と IL-11 で培養し、培養細胞を Gr-1 と Fms の発現様式から好中球系細胞と単球系細胞に識別した。培養 5 日目の Gr-1⁺Fms⁻細胞は好中球系の幼弱細胞の形態を、Gr-1⁺Fms⁺細胞は単球の形態を示していた。この 2 分画の細胞は CFSE の強度が同等であり、同じ細胞分裂回数を経ていた。次に、培養 5 日目の Gr-1⁺Fms⁺単球系細胞と Gr-1⁺Fms⁻好中球系細胞を様々なサイトカインを含む培養系で再培養し、その後の細胞増殖を細胞数と BrdU 陽性細胞の割合で解析した。Gr-1⁺Fms⁻好中球系細胞の再培養では、細胞数は増加し、72 時間で 5 倍以上になり、BrdU 陽性細胞は培養 60 時間までは 60%以上であった。一方、Gr-1⁺Fms⁺単球系細胞の再培養では、細胞数は増加せず、BrdU 陽性細胞は再培養の全期間を通じて認められなかった。また、再培養の 84 時間後には、Gr-1⁺Fms⁻好中球系細胞は成熟好中球になり、Gr-1⁺Fms⁺単球系細胞はマクロファージに分化していた。DNA ポリメラーゼの DNA への結合を仲介し、DNA の複製時に DNA を開裂する分子である CDC45 の発現を RT-PCR で検討した。CDC45 の発現は単球系細胞では好中球系細胞と比べ早期に down-regulation されており、単球系細胞が早期に DNA 複製を停止していることが確認された。以上の現象が初期培養で用いた SCF と IL-11 のサイトカイン組み合わせに特異的である可能性を否定するために、SCF と G-CSF あるいは SCF と TPO の存在下でも初期培養を施行したところ、同様の結果が得られた。成熟好中球と単球・マクロファージは共通の前駆細胞に由来するものの、終末分化に必要な細胞分裂回数が異なっていることが明らかになった。日常診療の場において、造血の回復期に単球が好中球より早期に末梢血中に出現する現象は、単球が好中球に比べ少ない分裂回数で成熟細胞に分化し、末梢血に放出されることによる可能性が示された。

4. ヒストンのアセチル化と脱アセチル化はクロマチン構造の再構成を介して細胞の遺伝子の転写を制御している。ヒストンのアセチル化はヒストンと DNA の結合を緩めて転写因子の標的 DNA 配列への接近を容易にさせることで遺伝子の発現を促進させる。ヒストンの脱アセチル化はクロマチンの凝集構造を強くすることにより、転写因子の接近を妨げて遺伝子の発現を抑制する。これまで、ヒストンのアセチル化が造血前駆細胞の増殖と分化に重要な役割を果たしていることが報告されているが、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) のヒトの造血制御における役割についてはほとんど解明されていない。そこで、構造的に異なった HDAC 阻害剤である FK228 とトリコスタチン A (TSA) を用いて、ヒト成人の造血前駆細胞の増殖と分化における HDAC の役割を検討した。造血前駆細胞を含む末梢血 CD34⁺細胞を SCF と IL-3 を含む無血清培地に FK228 存在下で培養すると、FK228 は IL-3 単独あるいは SCF + IL-3 存在下での赤芽球系細胞の生成を促進した。より分化した赤芽球系前駆細胞は IL-3 単独では増殖しなかったが、IL-3 に FK228 を添加することによりそれらの増殖が認められるようになり、FK228 による HDAC 活性の阻害は分化した赤芽球系前駆細胞の IL-3 への反応性を回復させることが示された。次に、EPO あるいは SCF + EPO 存在下での CD34⁺細胞からの赤芽球系細胞の生成に対する FK228 の作用について検討してみると、FK228 は CD34⁺細胞あるいは分化した赤芽球系前駆細胞からの赤芽球系細胞の生成を抑制した。TSA にも FK228 と同様の作用が認められた。これらの実験結果から、HDAC は赤芽球系前駆細胞の分化に伴う IL-3 への反応性の制御に関与し、EPO 依存性の増殖、分化においても重要な役割を果たしていると考えられる。今回の研究により、HDAC のヒト成人の赤血球造血の制御における多彩な役割が明らかになった。

研究発表

(1) 学会誌等

1. Suzuki K, Ohishi K, Sekine T, Masuya M, Katayama N: Selective blast cell reduction in elderly patients with acute myeloid leukemia secondary to myelodysplastic syndrome treated with methylprednisolone. *Int J Hematol* (in press).

2. Hoshino N, Nakase K, Tawara I, Kageyama S, Ohishi K, Nishii K, Sugimura Y, Shiku H, Katayama N: Early tumor regression following severe lung injury after allogeneic stem cell transplantation in a patient with renal cell carcinoma. *Intern Med* 46 (6): 291-293, 2007.

3. Shibasaki T, Katayama N, Ohishi K, Fujieda A, Monma F, Nishii K, Masuya M, Shiku H: IL-3 can not replace GM-CSF in inducing human monocytes to differentiate into Langerhans cells. *Int J Oncol* 30 (3): 549-555, 2007.
4. Nakase K, Kita K, Miwa H, Nishii K, Shikami M, Tanaka I, Tsutani H, Ueda T, Nasu K, Kyo T, Dohy H, Shiku H, Katayama N: Clinical and prognostic significance of cytokine receptor expression in adult acute lymphoblastic leukemia: interleukin-2 receptor α -chain predicts a poor prognosis. *Leukemia* 21 (2): 326-32, 2007.
5. Sugimoto Y, Katayama N, Masuya M, Miyata E, Ueno M, Ohishi K, Nishii K, Takakura N, Shiku H: Differential cell division history between neutrophils and macrophages in their development from granulocyte-macrophage progenitors. *Br J Haematol* 135 (5): 725-31, 2006.
6. Monma F, Nishii K, Shiga J, Sugahara H, Lorenzo F V, Watanabe Y, Kawakami K, Hosokai N, Yamamori S, Katayama N, Shiku H: Detection of the CBF β /MYH11 fusion gene in de novo acute myeloid leukemia (AML): a single-institution study of 224 Japanese AML patients. *Leuk Res* 31 (4): 471-476, 2006.
7. Tanaka Y, Masuya M, Katayama N, Miyata E, Sugimoto Y, Shibasaki T, Yamamura K, Ohishi K, Minami N, Shiku H, Nobori T: Development of mixed-type autoimmune hemolytic anemia and Evans' syndrome following chicken pox infection in a case of low-titer cold agglutinin disease. *Int J Hematol* 84 (3): 220-223, 2006.
8. Yamamura K, Ohishi K, Katayama N, Yu Z, Kato K, Masuya M, Fujieda A, Sugimoto Y, Miyata E, Shibasaki T, Heike Y, Takaue Y, Shiku H: Pleiotropic role of histone deacetylases in the regulation of human adult erythropoiesis. *Br J Haematol* 135 (2): 242-253, 2006.
9. Fujieda A, Nishii K, Tamaru T, Otsuki S, Kobayashi K, Monma F, Ohishi K, Nakase K, Katayama N, Shiku H: Granulocytic sarcoma of mesentery in acute myeloid leukemia with CBF β /MYH11 fusion gene but not inv(16) chromosome: case report and review of literature. *Leuk Res* 30 (8): 1053-1057, 2006.
10. Monma F, Nishii K, Ezuki S, Miyazaki T, Yamamori S, Usui E, Sugimoto Y, Lorenzo F V, Katayama N, Shiku H: Molecular and phenotypic analysis of Philadelphia chromosome-positive bilineage leukemia: possibility of a lineage switch from T-lymphoid leukemic progenitor to myeloid cells. *Cancer Genet Cytogenet* 164 (2): 118-121, 2006.

11. Monma F, Nishii K, Lorenzo F V, Usui E, Ueda Y, Watanabe Y, Kawakami K, Oka K, Mitani H, Sekine T, Tamaki S, Mizutani M, Yagasaki F, Doki N, Miyawaki S, Katayama N, Shiku H: Molecular analysis of PDGFR α/β genes in core binding factor leukemia with eosinophilia. *Eur J Haematol* 76 (1): 18-22, 2006.

12. Hoshino N, Katayama N, Shibasaki T, Ohishi K, Nishioka J, Masuya M, Miyahara Y, Hayashida M, Shimomura D, Kato T, Nakatani K, Nishii K, Kuribayashi K, Nobori T, Shiku H: A novel role for Notch ligand Delta-1 as a regulator of human Langerhans cell development from blood monocytes. *J Leukoc Biol* 78 (4): 921-929, 2005.

13. Fujieda A, Katayama N, Ohishi K, Yamamura K, Shibasaki T, Sugimoto Y, Miyata E, Nishii K, Masuya M, Ueda H, Nakajima H, Shiku H: A putative role for histone deacetylase in the differentiation of human erythroid cells. *Int J Oncol* 27 (3): 743-748, 2005.

(2) 口頭発表等

1. Miyata E, Masuya M, Ishikawa F, Yoshida S, Kato K, Ohishi K, Katayama N: Hematopoietic origin of hepatic stellate cell. American Society of Hematology 48th Annual Meeting. December 9, 2006.

2. Katayama N, Shiku H: Ex vivo generation of human peripheral blood monocyte-derived antigen presenting cells. International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages and Dendritic Cells 2006. June 10, 2006.

3. Ohishi K, Katayama N, Yamamura K, Heike Y, Takaue Y, Shiku H: Divergent roles of histone deacetylases in human adult erythropoiesis. American Society of Hematology 47th Annual Meeting. December 11, 2005.

4. Sugimoto Y, Katayama N, Masuya M, Shiku H: Differential requirement for cell division in the development of terminally differentiated neutrophils and macrophages from their common progenitors. American Society of Hematology 47th Annual Meeting. December 11, 2005.

5. 大石晃嗣、片山直之、山村賢太郎、藤枝敦史、榎屋正浩、平家勇司、高上洋一、珠玖洋: ヒト赤芽球前駆細胞の増殖・分化・生存におけるヒストン脱アセチル化酵素の造血因子特異的な制御. 第 67 回日本血液学会総会・第 47 回日本臨床血液学会総会 同時期開催. 2005 年 9 月 18 日.

6. 杉本由香、片山直之、榊屋正浩、大石晃嗣、宮田恵里、山村賢太郎、柴崎哲典、藤枝敦史、西井一浩、珠玖 洋: なぜ造血回復期に単球が好中球に先行して末梢血中に出現するのか?—その機序の解明—。第 67 回日本血液学会総会・第 47 回日本臨床血液学会総会 同時期開催. 2005 年 9 月 18 日.

(3) 出版物

片山直之、珠玖 洋 (分担執筆) : 細胞・免疫療法. 三輪血液病学、p652-660、文光堂、東京、2006.