

総説

間葉系ストローマ細胞による造血制御とその応用

後飯塚僚

東京理科大学 生命医科学研究所 発生及び老化研究部門

〒278-0022 千葉県野田市山崎2669

TEL: 04-7121-4102 FAX: 04-7121-4103

E-mail: ryogoi@rs.tus.ac.jp

【要約】

幹細胞の生存や機能の維持に関与する特殊な微小環境（ニッチ）を構成する細胞の性状について近年精力的に研究が行われており、造血系においても骨髄では特殊な間葉系ストローマ細胞が造血幹・前駆細胞のニッチとして機能していることが明らかになってきている。本稿では、間葉系ストローマ細胞の再生医療における応用の現状と問題点、さらには造血幹・前駆細胞ニッチとしての骨髄間葉系ストローマ細胞の性状に関する近年の知見を概説し、髄外造血に関与する脾臓の間葉系ストローマ細胞に関する我々の研究に基づき、その臨床応用の可能性について言及する。

キーワード: 間葉系ストローマ細胞、髄外造血、脾臓、微小環境、ニッチ

【はじめに】

近年、iPS (induced pluripotent stem) 細胞を始めとした胚性幹細胞様の細胞を用いた再生医療の臨床応用が現実味を帯びてきつつある一方、生体組織の維持や修復に関与する組織幹細胞のひとつである間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells) も、その取扱いの容易さもあって、免疫制御機能などを中心として様々な疾患への応用が試みられている。しかしながら、間葉系幹細胞の臨床応用とその生体における機能に関する基礎的知見には乗り越えなければならない乖離、すなわち、明らかになっていない盲点が存在することも事実であり、evidence-based medicine (科学的根拠に基づく医療) に立脚した治療を行うためには、間葉系幹細胞の実体や生体における役割を明確にしておく必要があり、それに関する知識を臨床に携わる獣医師 (或は医師) が理解しておく必要がある。ここでは、

生体における間葉系幹細胞の役割が最も詳細に明らかになってきている造血制御機能を中心に概説し、その文脈の中で、我々が研究対象としている脾臓間葉系幹細胞の臨床応用の展望について紹介する。

【間葉系ストローマ細胞の歴史的概要】

間葉系幹細胞或は間葉系ストローマ細胞 (Mesenchymal stromal cells) と呼称される細胞は線維芽細胞様の細胞であり、歴史的には、Friedensteinらによって開発された *in vitro* の培養系で、プラスチックディッシュに付着しコロニーを形成する細胞 (Colony-forming unit-fibroblast: CFU-F) として骨髄において同定された。その後、このような細胞が間葉由来の3系統 (脂肪、骨、軟骨) の細胞への分化能を有することが明らかにされ、間葉系幹細胞という呼称が用いられるようになっていった [2]。さらにCFU-F形成能を持ち、かつ、間葉由来の3系統細胞への分化能を有する細胞は、脂肪組織、皮膚、筋肉などの様々な組織に存在することが

受理: 2016年3月10日

明らかにされ [4]、*in vitro* で培養可能な幹細胞として、上述したように、再生医療への応用を目指した多くの医学研究が行われてきた。しかしながら、それらの研究には以下に挙げるような様々な問題点も残されている [7]。まず、第一として、幹細胞を定義する最小限の基準は「自己複製能」と「多分化能」であるにも関わらず、間葉系幹細胞と総称される大部分の細胞は、*in vitro* での間葉由来の3系統細胞への分化能と連続した細胞継代が可能であることが示されているだけであり、移植などによる *in vivo* における組織再構築能や自己複製能が示されていない。第二として、異なる組織で同定された間葉系幹細胞はそれぞれ異なった細胞表面抗原や遺伝子を発現し、同じ組織から単離された間葉系幹細胞であっても、培養条件や細胞継代の回数の違いによって、その表現型が変化することがあり、研究者・論文毎に結果が食い違うことが多い。このような問題点も踏まえ、これ以降は、間葉系幹細胞という用語は用いず、間葉系ストローマ細胞という用語を用いる。

[間葉系ストローマ細胞の組織再生ならびに免疫制御における役割]

組織の再生における間葉系ストローマ細胞の役割についても多くの研究データが発表されているが、これらも間葉系ストローマ細胞の静脈投与を用いた研究が殆どであり、実際に生体内で間葉系ストローマ細胞が組織修復に関わっていることが証明された例は数少ない [6]。また、免疫制御においては、間葉系ストローマ細胞はT細胞の活性化、樹状細胞の分化、B細胞の活性化や増殖、NK細胞の細胞障害活性を抑制し、IL-10を介した制御性T細胞の分化を促すことが報告されている。このような間葉系ストローマ細胞の機能は炎症性サイトカインの発現に影響を与えることによって達成されることが明らかになっている [1]。しかしながら、組織再生と同様、免疫制御機能の研究の殆ども培養した間葉系ストローマ細胞を移入する実験から導かれたものであり、生体内の間葉系ストローマ細胞が同様な機能を有するかは不明である。

[間葉系ストローマ細胞の骨髄造血における役割]

間葉系ストローマ細胞の生体内における機能

が最も詳細に解析されているのが、骨髄での造血システムにおける機能である [12]。骨髄には造血幹細胞の維持や分化を支持する特殊な微小環境（ニッチ）が存在するが、間葉系ストローマ細胞がその環境要素として重要であることが近年明らかになってきている。以下に、造血幹細胞の維持に関与する代表的な間葉系ストローマ細胞集団を挙げる。

1) PaS細胞：骨髄において同定された *in vivo* において自己複製能と多分化能という“幹細胞”の基準を満たす最初の間葉系ストローマ細胞は、Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) α を発現する PDGFR α ⁺Sca-1⁺ (PaS) 細胞である [11]。PaS細胞はPDGFR α 、CD105、CD51陽性であり、骨髄の細動脈周囲に局在するが、造血幹細胞の局在に関与するCXCL12の発現は認められない。しかしながら、移植することによって骨髄のCXCL12発現細胞に分化することから、前駆細胞として造血幹細胞ニッチの形成に関与している可能性が示唆されている。

2) CAR細胞：CAR (CXCL12-abundant reticular) 細胞は、その名の通り、造血幹細胞の静止期の維持や骨髄への係留に必須のケモカインであるCXCL12を高発現する間葉系細胞として同定された [15]。CAR細胞はSca-1陰性で、PDGFR α & β 、VCAM-1、CD44、CD51、レプチン受容体を高発現しており、*in vitro* の分化誘導系で骨芽細胞ならびに脂肪細胞への分化することから、間葉系前駆細胞と考えられる [14]。さらに、CAR細胞は造血幹細胞の維持に必須のサイトカインであるStem cell factor (SCF) を高発現することも報告されている [14]。CAR細胞は骨髄の洞様血管内皮近傍に局在し [15]、また、ジフテリア毒素でCAR細胞を除去すると骨髄中の脂肪・骨芽前駆細胞が減少するだけでなく造血幹細胞も消失することから [14]、CAR細胞は骨髄の造血幹細胞ニッチを構成する細胞集団と考えられる。

3) レプチン受容体陽性細胞：レプチン受容体陽性の血管周囲細胞が、造血幹細胞の静止期の維持に関与するSCFやCXCL12の骨髄におけ

る主要な供給源であることが明らかになっている [3]。レプチン受容体陽性細胞はPaS細胞同様、*in vitro*で間葉由来の3系統細胞系列への分化能を示し、PDGFR α 、CD51陽性のCFU-Fを多く含む細胞集団である [16]。レプチン受容体陽性細胞においてSCFを欠損させると静止期の造血幹細胞が消失し、また、CXCL12を欠損させると造血幹細胞が骨髄から末梢に移動することから、骨髄の造血幹細胞ニッチに必須の細胞集団であることが明らかになっている [16]。

[造血組織としての脾臓と間葉系ストローマ細胞]

脾臓は老化赤血球の除去や骨髄障害時の髄外造血、免疫応答の場として機能する臓器であり、赤脾髄、白脾髄、辺縁帯という異なる機能をもつ領域から構成されているが [10]、造血に関

与する領域は、白脾髄と辺縁帯から構成される濾胞を取り囲む赤脾髄である [9]。赤脾髄は洞様血管ならびにその周囲の細網細胞に富んだ領域であり、そこにはマクロファージや赤芽球が局在している。定常状態では造血は骨髄で行われているが、慢性的な貧血や骨髄異形成症候群、白血病、リンパ腫などの造血疾患などで骨髄造血障害が起こった場合、赤脾髄領域の増加を伴う脾臓サイズの急激な増加（脾腫）が観察される。このストレス造血時には、図1に示すように、赤血球系前駆細胞や造血幹細胞が骨髄から脾臓に移動し、赤脾髄で赤血球造血や骨髄球造血を伴う髄外造血が起こる [9]。髄外造血は脾臓以外に肝臓などの胎仔期に造血の場であった臓器でも起こるが、生体では脾臓が髄外造血の主要な場となる。生体脾臓の微小環境を構成す

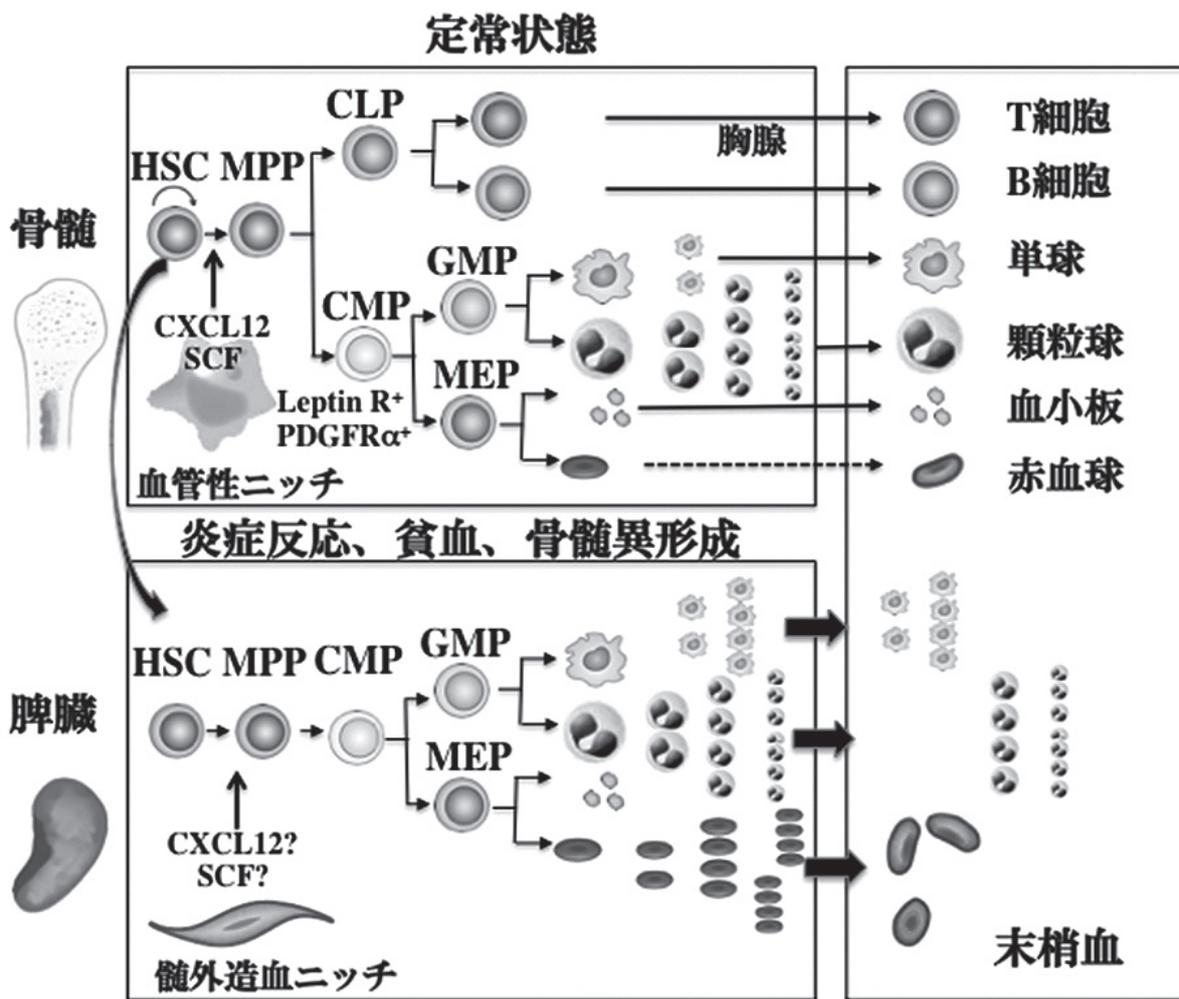


図1 定常状態における骨髄造血と造血疾患における脾臓での髄外造血
HSC; 造血幹細胞, MPP; 多能性前駆細胞, CLP; リンパ球性共通前駆細胞, CMP; 骨髄球性共通前駆細胞, GMP; 顆粒球・マクロファージ系前駆細胞, MEP; 巨核球・赤芽球系前駆細胞

る間葉系ストローマ細胞については、白脾髄のT細胞領域に局在する線維性細網細胞、B細胞領域に局在する濾胞樹状細胞、辺縁帯を構成する辺縁帯細網細胞などの成熟間葉系細胞の免疫応答における機能についての理解が進んでいる一方、赤脾髄に局在し造血に関与する間葉系ストローマ細胞の詳細な性状や機能については未解明なままである。

[髓外造血への脾臓間葉系ストローマ細胞の関与]

我々は、脾臓の器官形成に必須の転写因子であるTlx1の発現を指標にして、脾臓間葉系細胞の発生、分化ならびに機能について研究を行っている。現在までに、1) Tlx1発現細胞は脾臓の中心動脈周囲の血管周皮細胞ならびに濾胞周囲の赤脾髄領域に局在し、線維性細網細胞、濾胞樹状細胞、辺縁帯細網細胞などの成熟間葉系細胞とは異なった細胞集団であること [13]、2) 成体Tlx1発現細胞は、線維性細網細胞、濾胞樹状細胞、辺縁帯細網細胞などの成熟間葉系細胞に分化する能力を有すること、3) PDGFR α 、CD105、Sca-1などの骨髄間葉系ストローマ細胞と類似した表面マーカーを発現し、脂肪細胞、骨芽細胞ならびに軟骨芽細胞への分化能を有すること、などから、Tlx1発現細胞は脾臓間葉系ストローマ細胞であることを明らかにしてきた。脾臓の傍濾胞領域には少ないながらも造血幹細胞が局在することが報告されていることから [8]、脾臓における造血ニッチとTlx1発現細胞の関連について検討したところ、Tlx1発現細胞は造血幹細胞の局在ならびに維持に関与するCXCL12およびSCFを高発現しており、それら細胞にTlx1を過剰発現させると、骨髄および末梢血では血液細胞の変化は認められなかったが、脾臓において造血幹・前駆細胞の増加を伴う赤血球ならびに骨髄球形造血の亢進が観察され、Tlx1発現細胞は、ストレス造血時の脾臓における髓外造血ニッチとして機能する可能性が強く示唆される。

[今後の展望]

骨髄異形成症候群、免疫不全ならびに凝固異常などの造血系疾患の治療には、造血幹細胞の移植が必要であるが、現状では造血幹細胞をその機能（自己複製能、多分化能）を維持しながら

ら大量に増殖させる培養系は存在しない。近年、生体内で骨・骨髄様構造を形成させ、それを*in vitro*で培養することで造血系を再現するシステムの開発が行われているが、このシステムでは量的制限があり、硬組織である骨を用いる観点からも現実的ではない。骨内腔に存在する骨髄間葉系ストローマ細胞を大量に採取・調製するのが困難であるのに比べ、脾臓間葉系ストローマ細胞の採取・調製は安易であり、脾臓の髓外造血ニッチの細胞学的性状が明らかになれば、それを用いて骨髄に代わる造血幹細胞の大量培養システムが構築できる可能性がある。さらに、このようなシステムが確立されれば、造血ニッチも含んだ形での薬物の造血系に対する毒性や効能を評価するシステムとして有望であるだけでなく、新規造血剤のハイスループットスクリーニングシステムとしても応用できる可能性がある。今後、造血幹細胞の維持や機能に関わる間葉系ストローマ細胞の骨髄と脾臓における共通性と特殊性を明確にし、造血ニッチとして機能しえる微小環境構成要素の共通原理を解明していくことで、上述したような応用展開に繋げていきたいと考えている。

[引用文献]

- [1] Bernardo, M.E. and Fibbe, W.E. 2013. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 13: 392-402.
- [2] da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C. and Nardi, N.B. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 119: 2204-2213.
- [3] Ding, L. and Morrison, S.J. 2013. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 495: 231-235.
- [4] Feng, J., Mantesso, A., De Bari, C., Nishiyama, A. and Sharpe, P.T. 2011. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108: 6503-6508.
- [5] Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F. and Kulagina, N.N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4: 267-274.
- [6] Kalinina, N.I., Sysoeva, V.Y., Rubina, K.A., Parfenova, Y.V. and Tkachuk, V.A. 2011.

- Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair. *Acta. Naturae* 3: 30-37.
- [7] Kfoury, Y., and Scadden, D.T. 2015. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 16: 239-253.
- [8] Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Terhorst, C. and Morrison, S.J. 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121: 1109-1121.
- [9] Kim, C.H. 2010. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J. Blood Med.* 1: 13-19.
- [10] Mebius, R.E. and Kraal, G. 2005. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 606-616.
- [11] Morikawa, S., Mabuchi, Y., Kubota, Y., Nagai, Y., Nübe, K., Hiratsu, E., Suzuki, S., Miyauchi-Hara, C., Nagoshi, N., Sunabori, T., *et al.* 2009. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J. Exp. Med.* 206: 2483-2496.
- [12] Morrison, S.J. and Scadden, D.T. 2014. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505: 327-334.
- [13] Nakahara, R., Kawai, Y., Oda, A., Nishimura, M., Murakami, A., Azuma, T., Kaifu, T. and Goitsuka, R. 2014. Generation of a Tlx1 (CreER-Venus) knock-in mouse strain for the study of spleen development. *Genesis* 52: 916-923.
- [14] Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K. and Nagasawa, T. 2010. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 33: 387-399.
- [15] Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. and Nagasawa, T. 2006. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25: 977-988.
- [16] Zhou, B.O., Yue, R., Murphy, M.M., Peyer, J.G. and Morrison, S.J. 2014. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell* 15: 154-168.

Mesenchymal stromal cells: a regulator for hematopoiesis and its potential application

Ryo Goitsuka

Division of Development and Aging, Research Institute for Biomedical Sciences, Tokyo University of Science,
2669 Yamazaki, Noda, Chiba 278-0022
TEL : +81-4-7121-4102 FAX : +81-4-7121-4103
E-mail : ryogoi@rs.tus.ac.jp

Abstract

Extramedullary hematopoiesis refers to the differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) outside the bone marrow, which occurs in the spleen as well as in the liver, usually in association with pathophysiological conditions, such as myelofibrosis, hemolytic anemia and bacterial infections. Compared to the accumulating knowledge on the mesenchymal stromal cells (MSCs) constituting the niche for intramedullary hematopoiesis, almost nothing is known about MSCs in the extramedullary niche for hematopoiesis. We have demonstrated that perifollicular MSCs phenotypically resembling mesenchymal progenitors in the postnatal spleen express a transcription factor Tlx1 that is essential for spleen organogenesis. Here we summarize the properties and functions of MSCs supporting the maintenance of the HSPCs in the bone marrow and spleen, and further discuss the potential application of MSCs derived from the postnatal spleen to the therapy of hematological diseases.

Key words: Mesenchymal stromal cells, extramedullary hematopoiesis, spleen, Microenvironment, niche