

令和 3 年 4 月 30 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019年度

受付番号 201960808

氏名

垣内美和子

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

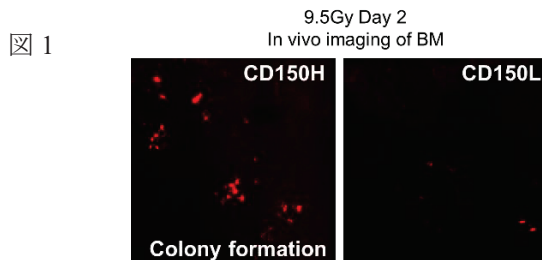
1. 用務地（派遣先国名）用務地：ニューヨーク（国名：米国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
造血幹細胞ニッチに存在する制御性 T 細胞による幹細胞保護作用
3. 派遣期間：平成 31 年 4 月 1 日 ~ 令和 3 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名：コロンビア大学
部局名：Columbia Center for Translational Immunology
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

骨髄中の制御性 T 細胞 (Treg) のうち、造血幹細胞 (HSC) に免疫特権を与え、造血幹細胞の機能の一つである quiescence を維持する機能を持ったニッチ Treg (CD150 高発現 Treg) について、興味深いことに stem cell-like な特徴を備えていることが示唆されてきた。申請者の研究課題は、ニッチ Treg が自己再生および分化能という stem cell-like な機能をもつことを検証し、さらにそのメカニズムを解明することである。

以下にその進捗および成果を示す。

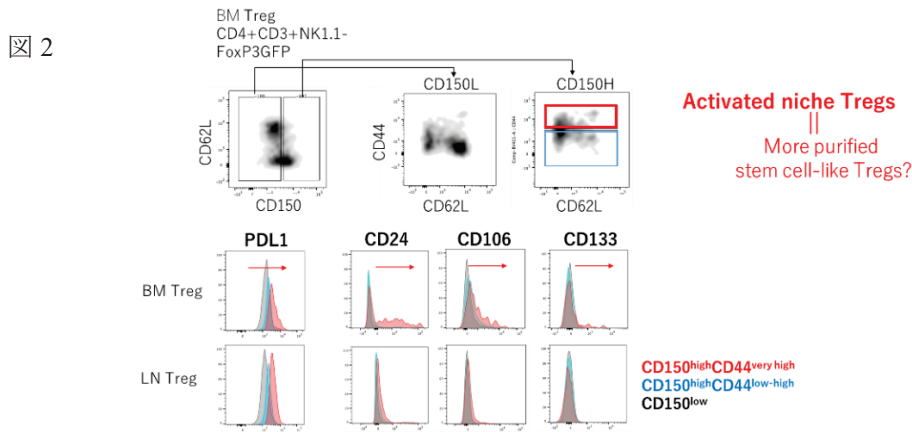
研究課題 1. ニッチ Treg の fate tracking を行い、ニッチ Treg が 1) 自己再生能、2) ほかの Treg を作る分化能、という stem cell-like な機能を持つか検証する。

ニッチ Treg の fate tracking を行うにあたり、ニッチ Treg の増殖 (自己再生) をより誘導するために放射線照射モデルを用いることとした。蛍光ラベルしたニッチ Treg をマウスに移植したのち放射線照射を行い、骨髄中の移植した Treg を in vivo imaging で観察したところ、CD150 高発現 (H) ニッチ Treg は非ニッチ Treg (CD150 低発現 (L)) と比較して放射線照射後に活発に増殖していることが明らかとなった (図 1)。

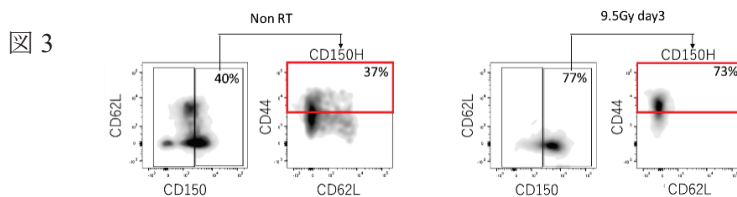


しかしながら、これらの細胞をフローサイトメトリーで同定し、さらにその分化までを track することは、細胞数が非常に少ないことから困難であった。そこで、CD150 高発現ニッチ Treg の中でも、限られた細胞だけがこのような増殖能を持っている可能性があり、その細胞群を track すべきであろうと考えた。

CD150 高発現ニッチ Treg は、その他の Treg と比較して stem cell-like な機能を持つと考えられるが、その中でもさらに活性化マーカーである CD44 を高発現し、その他の stem cell マーカー (CD24, CD106/VCAM1, CD133/PROM1) および免疫抑制性分子 (PDL1) を強く発現する細胞群を同定した (図 2)。



さらに、この細胞群は放射線耐性も強いことが明らかとなった (図 3)。



そこで、この細胞群が特に stem cell-like な機能を持つニッチ Treg なのではないかと考え、以降の研究において主眼を置いて解析にあたることとした。

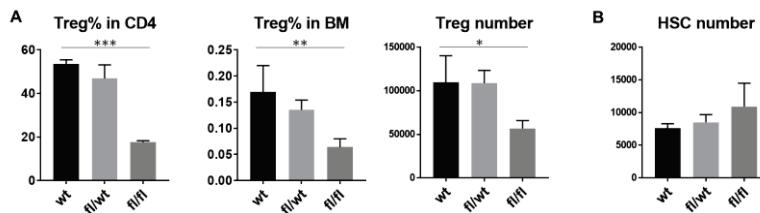
研究課題 2. ニッチ Treg の Stem cell-like な機能を維持するメカニズムを解明する。

ニッチ Treg において造血幹細胞と同様にオートファジーが亢進していることから、その stem cell-like な機能を維持するメカニズムの一つとして、オートファジーの役割を解明する。そのた

めに Treg 特異的にオートファジーを抑制した *Foxp3CreAtg12flox* マウスモデルを作成した。

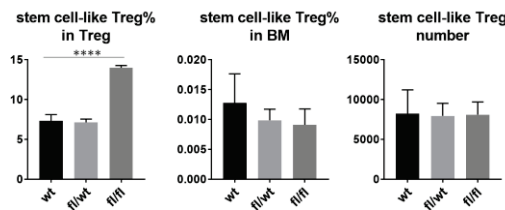
その結果、オートファジー抑制マウスにおいて骨髄中の Treg の頻度および細胞数の低下が認められた (図 4A)。さらに、造血幹細胞も細胞数が増加しており、ニッチ Treg による造血幹細胞の quiescence の維持が破綻していることが示唆された (図 4B)。

図 4



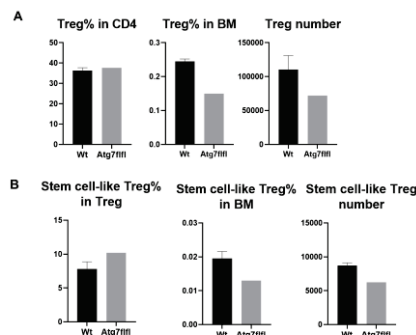
一方、上記のように同定した stem cell-like ニッチ Treg は、Treg 中の頻度が上昇し、骨髄中の頻度および細胞数は維持されていることが明らかとなった (図 5)。これは、stem cell-like Treg から分化したその他の細胞群が減少し、stem cell-like Treg が残存している可能性が示唆される。すなわち、Treg 中のオートファジーを抑制すると、ニッチ Treg の分化能が抑制されることで、Treg のプールサイズが減少するのではないかと考えている。

図 5



より詳細に Treg のサブポピュレーション (stem cell-like ニッチ Treg およびその他 Treg) の変化を経時的に同定するため、タモキシフェン誘導によってオートファジーを抑制する *Foxp3inducibleCreAtg12flox* マウスおよび *Foxp3inducibleCreAtg7flox* マウスを作成した。しかし、新型コロナウイルス感染症の影響により、このモデルマウスの検証は少数の *Atg7flox* マウスのみにとどまった。

図 6



基本的に、non-inducible の系と同様、骨髄中 Treg が減少するも、stem cell-like ニッチ Treg の Treg 中頻度は上昇していた (図 6)。

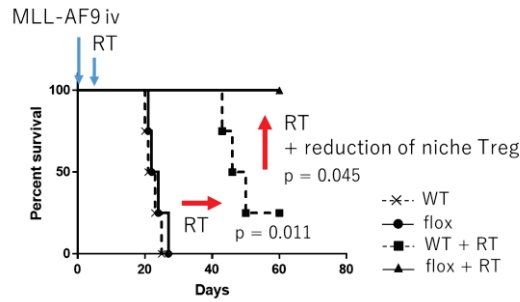
今後はこのモデルを用いて、放射線誘導条件下のニッチ Treg の増殖及び分化能を検証していく。

研究課題 3. ニッチ Treg がもつ stem cell-like な機能が、正常および悪性幹細胞に対するストレス保護に重要か、検討する。

上記、タモキシフェン誘導オートファジー抑制マウスモデルを作成中につき、まずは Treg の骨髄への homing を抑制し骨髄 Treg を減少させた既存のマウスモデル (*Foxp3CreCxcr4flox*) を用いて、骨髄中の悪性腫瘍に対する保護効果を検討した。

悪性腫瘍モデルとして MLL-AF9 白血病細胞を *Foxp3CreWt* マウスおよび *Foxp3CreCxcr4flox* マウスに移植後、放射線を照射した (RT)。その結果、骨髄 Treg 減少マウス (*Foxp3CreCxcr4flox*) において、放射線治療群で有意に生存期間が延長した (図 7)。これは、骨髄ニッチ Treg が悪性腫瘍に対して放射線ストレスからの保護作用を示し、放射線治療に抵抗性をもたらすことを示唆する。

図 7



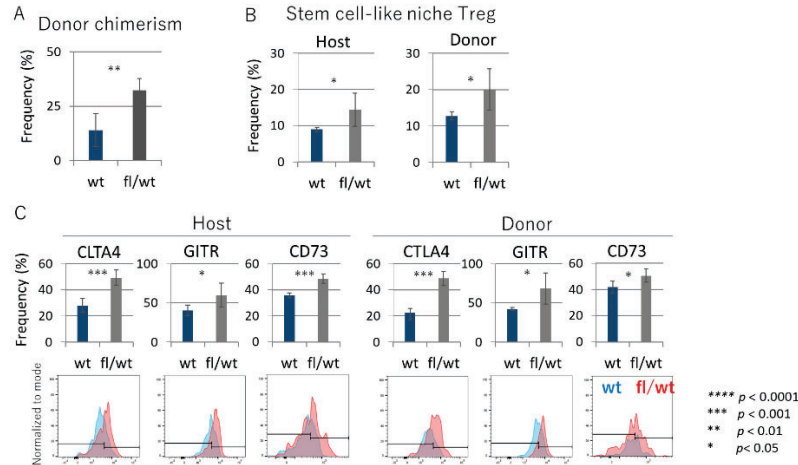
同様のモデルを用いて、オートファジー抑制マウスにおけるニッチ Treg のストレス保護作用を検討していく必要がある。

追加研究 1. 造血幹細胞ニッチを構成する Treg 以外の細胞が、造血幹細胞の免疫特権にどのような役割を持つか検証する。

造血幹細胞ニッチでは、血球系細胞のほか、間葉系細胞がその維持に重要な役割を担っていることが明らかとなっている。特にレプチン受容体 (Lepr) を発現した間葉系前駆細胞は、CXCL12 や SCF といったニッチ因子を豊富に発現し、造血幹細胞維持に重要な機能を果たしている (Cell Stem Cell, 2014, Zhou et al.). さらに、Treg で造血幹細胞へのエフェクター分子として知られるアデノシンの合成酵素 (CD39) が Lepr 陽性間質細胞にも高発現し、免疫抑制効果を担っていると考えられていた。そこで、Lepr 陽性間質細胞特異的に CD39 を抑制したモデル (LeprCreCD39flox) を作成し、造血幹細胞の免疫特権が維持されるかどうか検証した。

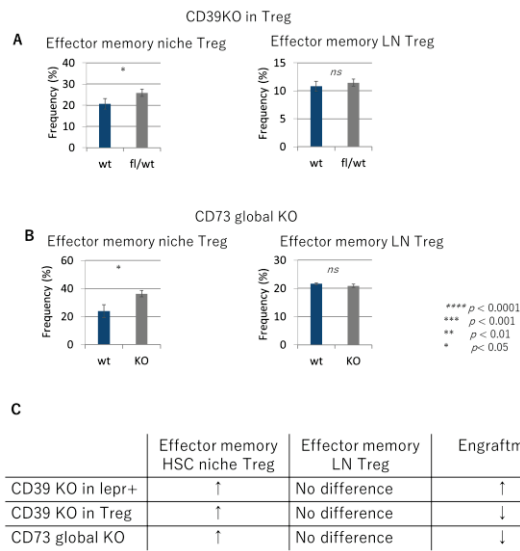
Treg 特異的にアデノシン合成を抑制すると (Foxp3CreCD39flox)、移植された同種異系 (allo) 造血幹細胞の生着が抑制される (Cell Stem Cell 2018, Hirata et al.). 同様に、Lepr 陽性間質細胞でもアデノシン合成抑制によって免疫特権が失われると予想したが、結果はそれに反して、同種異系ドナー造血幹細胞の生着は促進された (図 8A)。そのメカニズムとして、flox マウスでの stem cell-like ニッチ Treg が増加し、さらにその免疫抑制分子が高発現となっていることを同定した (図 8B, C)。

図 8



また、前述したように Treg 特異的に CD39 を KO したマウスおよび、CD73 (アデノシン合成酵素の一つ) global KO マウスでも同様に Stem cell-like Treg は減少し、同種異形造血幹細胞の生着が抑制される (図 9)。

図 9



これらをまとめると、Lepr 陽性間質細胞からのアデノシンはニッチ Treg を抑制しており、造血幹細胞の免疫特権をもたらすのは Lepr 陽性間質細胞ではなくニッチ Treg によるものと考えられる。また、HSC により強力な免疫特権をもたらすニッチこそが、より primitive な HSC を保護するニッチであり、そこには従来ニッチ構成細胞の一つとして重要視されてきた Lepr 陽性間質細胞ではなく、stem cell-like Treg を含むその他の未知のニッチ構成細胞が存在しているかもしれない、という仮説が立てられた。

このように、幹細胞の免疫特権を軸にすると、幹細胞の heterogeneity や hierarchy について免疫学的な側面からも検証することが可能となり、免疫特権を付与する新たな幹細胞ニッチが同定されるであろう。さらに造血幹細胞のみならず、非生殖組織における体性幹細胞ニッチについても、免疫特権というアプローチを用いることで、より重要な幹細胞を同定し、今後の移植・再生医療および癌幹細胞治療においても、根本的な知見を得ることが可能となるであろう。