

細胞系譜解析を用いた骨髄造血微小環境の形成メカニズムの解明

木村健一

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター

【研究の背景】

MSCs は、その多分化能や組織再生能を利用した再生医療のツールとして注目され、骨疾患治療など多くの疾患に対し臨床試験が始まっている。しかし、MSCs の生体内での動態や分化能について未だ不明な点が多く、治療の有効性や作用機序が不明確なまま、臨床応用が先行しているケースも少なくない。そのため、安全で効果的な治療法の確立のため、生体内の MSCs の性質の解明が望まれている。

MSCs は生体内で特殊な微小環境(ニッチ)によって保持されている。そのニッチの一つとして知られる骨髄ニッチは、類洞血管内皮細胞 (SECs)、造血細胞、周皮細胞などにより形成され、様々な液性因子、サイトカイン、細胞間接着により緻密に制御されている。近年、骨髄内ニッチを構成する細胞群の特徴が明らかになりつつあるが、ニッチを構成する細胞の起源やニッチの維持に関わる分子機構は未だ不明である。

【目 的】

本研究では、ニッチを形成する間葉系幹細胞(MSCs)と類洞血管内皮細胞(SECs)に高発現する CD73 に着目し、これら CD73 陽性細胞がどこから発生し、どのようにニッチを形成するかを明らかにし、骨髄ニッチ維持機構における役割を明らかにする。

【方 法】

CD73 発現細胞がどのように組織障害に応答し、ニッチの再構築に関わるかについて、CD73-BAC-EGFP マウス (Breitbach M, Kimura K et al., Cell Stem Cell, 2018)に大腿骨骨折モデルを作製し解析した。7、14、28 日後に組織切片を作製し、免疫染色による細胞種の特異および造血幹細胞との関わり、骨髄内の MSCs、SECs が血管新生、骨・軟骨形成およびニッチの再構築にどのように寄与するか解析した。

また、CD73-CreERT2:R26-tdTomato (タモキシフェン誘導型 CD73 レポーター) マウスを用いて、細胞系譜解析を行った。胎生 13.5 日から段階的にタモキシフェン投与を行い、CD73 発現細胞が骨組織にどのように分布していくか解析した。

【結 果】

まず、このマウスから CD73 陽性 MSCs と CD73 陰性 MSCs を単離し、性質を比較した。これら細胞は、いずれも MSCs に特徴的なマーカー発現を示していた。一方、細胞増殖や分化能を解析すると、CD73 陽性 MSCs は CD73 陰性 MSCs と比較して、生体外における高い増殖能と骨・軟骨細胞への分化能を有していた。次に、このマウスの大腿部に骨折を作製し、骨修復における CD73 陽性 MSCs の動態を解析した。術後 4 日目には、骨折部位に遊走した CD73 陽性 MSCs が多数観察され、その後、この細胞は骨芽細胞や軟骨細胞に分化し、積極的に組織修復に関わっていた。また、CD73 陽性血管内皮細胞は、骨修復中期になると骨折部位において観察され、周囲には造血幹前駆細胞が集積し、ニッチの再構築に働いていた。さらに、CD73 陽性 MSCs と CD73 陰性 MSCs を野生型マウスの骨折部位に移植し、組織再生能を評価したところ、移

植された CD73 陽性 MSCs は骨折部位で骨・軟骨へと分化し、骨修復を促進することが明らかとなった。

さらに、細胞系譜解析では、tdTomato 陽性細胞は胎生 14.5 日から出現し、海綿骨、関節軟骨、滑膜において存在が確認された。しかし、胎生期におけるタモキシフェン投与群では tdTomato 陽性 SECs が認められず、SECs における CD73 発現は出生直後あるいは成体期に開始することが考えられた。

【考 察】

以上のことから、CD73 陽性 MSCs は、増殖能および骨軟骨細胞への分化能の高い集団であることが明らかとなった。これらの細胞群は骨損傷時の骨軟骨形成およびニッチの再構築に重要な役割を果たすことが明らかとなった。今後、細胞系譜解析をさらに進め、骨髄ニッチを構成する CD73 陽性細胞を包括的に解析する予定である。

また、CD73 は AMP からアデノシン (ADO) を生成する細胞表面酵素であり、ADO 受容体 (ADO-R) の活性化を介して骨髄内の免疫細胞の増殖・分化などの調節に働いている。CD73 陽性細胞は高い増殖能、組織再生能を示したことから、CD73 を介した ADO シグナルが生体内の MSCs/SECs の生理機能にどのように影響を与えているかについても検討する予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

類洞血管における CD73 の発現は申請者が初めて発見した事象であり (Breitbach*, Kimura*, Cell Stem Cell, 2018)、CD73 の発現が間葉系組織および類洞血管の形成、恒常性または再生に果たす役割について明らかにすることは極めて新規性が高く、学術的にも意義が深い。MSCs と SECs という 2 つの異なる細胞集団が CD73 分子を共発現していることはニッチの形成維持機構を理解する上で大変興味深い点である。さらに、CD73 はヒト MSCs のマーカーとして用いられているため、本研究によるマウス骨髄 MSCs の細胞ダイナミクス解明と ADO シグナルの機能解析は、ヒト CD73 陽性 MSCs の性質の解明へと展開が期待でき、幹細胞生物学や骨疾患治療の分野へも大きな波及効果を有する。

【参考・引用文献】

1. **Kenichi K***, Breitbach M, Schildberg FA, Hesse M, Fleischmann BK. Bone marrow CD73+ mesenchymal stem cells display increased stemness in vitro and promote fracture healing in vivo. *Bone Rep.* 2021;15:101133. doi: 10.1016/j.bonr.2021.101133. #:corresponding author
2. Breitbach M*, **Kimura K***, Luis TC, Fuegemann CJ, Woll PS, Hesse M, Facchini R, Rieck S, Jobin K, Reinhardt J, Ohneda O, Wenzel D, Geisen C, Kurts C, Kastenmüller W, Hölzel M, Jacobsen SEW, Fleischmann BK. In Vivo Labeling by CD73 Marks Multipotent Stromal Cells and Highlights Endothelial Heterogeneity in the Bone Marrow Niche. *Cell Stem Cell.* 2018;22(2):262-276.e7. doi: 10.1016/j.stem.2018.01.008. *: equally contributed