

LPS 投与マウスにおけるストローマ細胞を介した
顆粒球および B 細胞造血の調節機構の検討

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系形態生理学専攻

滝 雅史

2016 年

指導教員 相澤 信

略語一覧

- α -MEM : alpha-minimum essential medium
ANOVA : analysis of variance (分散分析)
BFU-E : burst colony-forming unit- erythroid (赤血球バースト形成ユニット)
CD : cluster of differentiation
CFU-E : colony-forming unit-erythroid (赤芽球系前駆細胞)
CFU-G : colony-forming unit-granulocyte (顆粒球系前駆細胞)
CFU-GEMM : colony-forming-unit-granulocyte-erythroid-megakaryocyte-macrophage (顆粒球-赤芽球-マクロファージ-巨核球系前駆細胞)
CFU-GM : colony-forming unit-granulocyte-macrophage (顆粒球-マクロファージ系前駆細胞)
CFU-M : colony-forming unit-macrophage (マクロファージ系前駆細胞)
CFU-Meg : colony-forming unit -megakaryocyte (巨核球系前駆細胞)
CFU-preB : colony-forming unit-preB cell (B細胞系前駆細胞)
FITC : Fluorescein isothiocyanate
GAPDH : glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
G-CSF : granulocyte colony-stimulating factor (顆粒球コロニー刺激因子)
GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子)
HSC : hematopoietic stem cell (造血幹細胞)
HU : hydroxyurea
IFN : interferon
IL : interleukin
IMDM : Iscove-modified Dulbecco's medium
LPS : lipopolysaccharide
mRNA : messenger ribonucleic acid
PBS : phosphate-buffered saline
PE : phycoerythrin
qPCR : Quantitative Real-Time polymerase chain reaction
SCF : stem cell factor
SDF-1 : stromal cell-derived factor -1
SPF : specific pathogen free
TNF- α : tumor necrosis factor-alpha
TGF- β : transforming growth factor-beta
TLR4 : Toll-like Receptor 4

目次

	頁
1. 研究概要	1
2. 英文抄録	3
3. 緒言	5
4. 方法	9
5. 結果	14
6. 考察	20
7. まとめ	25
8. 謝辞	26
9. 図	27
10. 文献	39
11. 研究業績	45

1. 研究概要

骨髄、脾臓などの造血組織における造血現象は、ストローマ細胞と呼ばれる間葉系細胞等より構成される造血微小環境により制御されている。ところで感染、炎症時などの反応性造血においては顆粒球造血が亢進し、B細胞造血が抑制されることが知られている。しかしながらこのような反応性造血時のストローマ細胞の役割についての十分な検討はなされていない。本研究では lipopolysaccharide (LPS) 投与モデルマウスを用いて、炎症反応時の造血制御機構について検討を行った。C57BL/6 雌マウスに 5 µg /マウスの LPS を経静脈的に投与後、造血組織における造血前駆細胞数の変動、またストローマ細胞からの種々の造血因子産生能について経時的に観察した。LPS 投与後には骨髄の顆粒球 - マクロファージ前駆細胞(colony-forming unit granulocyte-macrophage: CFU-GM)および B 細胞前駆細胞(colony-forming unit preB: CFU-preB)の急激な減少が認められた。投与 3 日後には CFU-GM 数は速やかな回復が認められたのに対し、CFU-preB の減少は遷延していた。脾臓においては LPS 投与後の CFU-GM 数の有意の増加を認めたが、CFU-preB 数は変動を認めなかった。LPS 投与後の骨髄、脾臓における造血因子産生能について、RT-PCR 法を用いて検討した。顆粒球造血の促進因子である granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) 、 interleukin (IL)-6 および granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)の発現の増強が骨髄、脾臓ともに観察された。B 細胞造血の促進因子である stem cell factor (SCF)、stromal cell-derived factor (SDF)-1 および IL-7 については発現に変動を認めなかった一方で、B 細胞増殖の抑制因子である tumor necrosis factor (TNF)-αは発現の増強が観察された。また骨髄の S 期 CFU-GM 数は LPS 投与後増加していたのに対し、S 期 pre-B 細胞は減少を認めた。これらの結果は、炎症時においてはストローマ細胞によ

り造血因子産生などの機序を介して顆粒球優位の造血が誘導され、B細胞造血は逆に抑制されていることを示すものであり、造血動態が変化することにより感染時などにおける生体の防御システムが機能していることが示唆された。

2. 英文抄録

Hematopoiesis in the bone marrow (BM) and the spleen is controlled by stromal cells. Inflammation promotes myelopoiesis and simultaneously suppresses B lymphopoiesis. The role of the reciprocal regulation of myelopoiesis and B lymphopoiesis by stromal cells during inflammation is not fully understood. We investigated inflammation-induced alteration of hematopoietic regulation in lipopolysaccharide (LPS)-treated mice. C57BL/6 female mice were intravenously injected with a single, 5 μ g dose of LPS. LPS induced a rapid decrease in the number of granulocyte-macrophage progenitors (colony-forming unit granulocyte-macrophage: CFU-GM) and B cell progenitors (colony-forming unit preB: CFU-preB) in the BM. The CFU-GM rapidly recovered, whereas the recovery of CFU-preB was delayed. LPS induced a marked increase in the number of CFU-GM but not in the number of CFU-preB in the spleen. After LPS treatment, the gene expression levels of positive regulators of myelopoiesis, such as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), interleukin (IL)-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), in the BM and spleen were all markedly up-regulated, whereas the levels of positive regulators for B lymphopoiesis, such as stromal cell-derived factor (SDF)-1, stem cell factor (SCF), and IL-7 remained unchanged. The level of negative regulators of B lymphopoiesis, such as tumor necrosis factor (TNF)- α , was markedly up-regulated. The number of CFU-GM in S-phase in the BM increased after LPS treatment, whereas the number of CFU-preB in S-phase decreased. These results suggest that

LPS-activated stromal cells induce positive-dominant regulation of myelopoiesis and negative-dominant regulation of B lymphopoiesis, which facilitates emergency myelopoiesis during inflammation by suppressing B lymphopoiesis, thereby contributing to the host defense against infection.

3. 緒言

体内において、血液細胞は、造血組織に存在する造血幹細胞から分化し、恒久的に産生される。造血幹細胞は全ての血球に分化できる多分化能を有し、さらに自己複製能を有することにより枯渇することなく、一生涯造血が営まれる (Figure 1)。生体内における造血は、造血幹細胞が造血組織において育つ過程を示すものであり、特に造血幹細胞の自己複製、増殖、分化は、造血微小環境と称される造血幹細胞を取り巻くように存在する環境により制御されていると考えられている。この造血微小環境の重要な構成因子として、線維芽細胞、マクロファージ、骨芽細胞、脂肪細胞、内皮細胞などの間質系細胞が重要な役割を担っていることがわかり、これらの細胞をストローマ細胞と総称している。ストローマ細胞はサイトカインなどの造血因子産生や、細胞間の接着因子を介した直接接触などにより造血幹細胞の増殖、分化を制御していると考えられている (1-3) (Figure 2)。

造血幹細胞は恒常的に血球が産生されるために自己複製をするとともに、各血球系に分化する。基本的には分化の第一段階で B 細胞、T 細胞に分化可能なリンパ球系前駆細胞とそれ以外の血球系へ分化する前駆細胞に分かれ (lymphocyte progenitor と colony-forming unit granulocyte-erythroid-megakaryocyte-macrophage : CFU-GEMM) となり、さらに各血球系へと分化し、成熟血球が末梢血中に遊出する (Figure 1)。CFU-GEMM から分化する顆粒球造血については、関与する造血因子を含めて Figure 3 のようなモデルが考えられている。CFU-GEMM は分化し、顆粒球-マクロファージ前駆細胞 (colony-forming unit granulocyte-macrophage: CFU-GM) を経て、顆粒球系の前駆細胞 (colony-forming unit granulocyte: CFU-G) とマクロファージ系の前駆細胞 (colony-forming unit macrophage:

CFU-M)となり、それぞれが成熟して好中球、単球となり末梢血中に遊出する。一方 lymphocyte progenitor は B 細胞系と T 細胞系の前駆細胞にわかれ、それぞれはさらに分化して末梢血中に遊出する。ただし顆粒球系細胞等とは異なり、B 細胞は抗体産生細胞まで分化しきらない未熟 B 細胞の段階で末梢血中に遊出し、脾臓、リンパ節、消化管粘膜などの組織において最終的に成熟し、抗体産生細胞となる(Figure 4)。しかし、恒常的に血球が産生されるための造血幹細胞の自己複製については、どのような因子が必要なのか、その制御機構を含めて未だに不明な点が多く、造血幹細胞の増殖や分化の方向付けがどのような機序でコントロールされているかは明らかにされていない。また感染や炎症時には、生体反応として造血が速やかに亢進することが明らかとなっている。しかしそのような状況下においても造血細胞は安定して供給されており、造血現象の制御には複雑なメカニズムが関与していると考えられる。

感染や炎症時には生体防御システムとして顆粒球造血が活発となり、骨髄より顆粒球の遊出が増加し、末梢血では顆粒球(白血球)増多状態となり(4、5)、一方 B 細胞造血は逆に抑制されている(6-9)。先に述べたように骨髄、脾臓における造血現象はストローマ細胞により制御されていると考えられているが、その主要な制御機序として促進的あるいは抑制的造血因子産生機能が報告されている(10-12)。例えば顆粒球造血においてはストローマ細胞が産生する造血促進因子として granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF)、granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF) や interleukin(IL)-6 が報告されており、また B 細胞造血については促進因子として stromal cell-derived factor(SDF)-1、stem cell factor(SCF)や IL-7 が、また抑制因子として tumor necrosis factor(TNF)- α や transforming growth factor(TGF)- β が知られている(13-20)。したがって感染や炎症時などにおける顆

顆粒球造血と B 細胞造血の異なる反応についてはこれら促進あるいは抑制因子がバランスを取りながらストローマ細胞より産生され、調整を行っている可能性が考えられる。

lipopolysaccharide(LPS)はグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であり、脂質および多糖から構成される糖脂質である。内毒素（エンドトキシン）である LPS は多彩な生物活性を発現する。LPS の生理作用発現は、宿主細胞の細胞膜表面に存在する Toll 様受容体（Toll-like Receptor : TLR）4 を介して行われるが、ストローマ細胞も TLR4 を発現しており、グラム陰性菌感染時において LPS により活性化されたストローマ細胞は G-CSF 等の造血因子を産生して顆粒球造血を亢進する(21、22)。B 細胞造血については *in vitro* での実験より促進および抑制因子の相互作用により造血がコントロールされていることが明らかとなってきた。抑制因子である TNF- α はストローマ細胞からの SDF-1 産生を抑制し(23)、TGF- β は同じく SDF-1、SCF や IL-7 産生を抑制する(24-26)。一方で促進因子である IL-7 は TGF- β の産生を抑制する(27)。また *in vivo* での検討でも炎症時に骨髄での SCF や SDF-1 産生が低下することより B 細胞造血が抑制されていることが明らかとなっている(7、8)。これら結果は造血現象が複雑な造血因子産生促進・抑制のカスケードから制御されていることを示唆するものである。このように感染や炎症時の反応性造血調整については多くの知見が得られてきているが、これら反応が終息し、恒常的造血へ安定化していく過程について等未だ不明の点が多い。

本研究では LPS 投与マウスモデルを用いて、感染や炎症時の顆粒球系および B 細胞造血反応制御のメカニズムを検討する目的で、特にストローマ細胞由来の促進的あるいは抑制的造血因子産生に注目し、これら因子がどの様に相互関連をもちながら造血調整を行っているかを検討した。方法として LPS 投与後マ

ウス骨髄、脾臓の CFU-GM 数および B 細胞前駆細胞(colony-forming unit preB: CFU-preB)数の変動を測定するとともに各造血組織における顆粒球および B 細胞造血促進、抑制因子の遺伝子発現レベルの変動を Quantitative Real-Time PCR(qPCR) 法を用いて経時的に検討した。さらに LPS 投与後の CFU-preB および CFU-GM の細胞周期の変動を測定することにより、反応期～終息期における造血動態について検討を行った。

4. 方法

4-1 マウス

8-10 週齢の C57BL/6J 雌マウス は日本クレア株式会社より購入し、specific pathogen free(SPF)の条件下(室温 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$)で飼育した。全ての動物実験は、日本大学動物実験運営内規に則り、医学部動物実験委員会の承認の下で行った。

(承認番号 AP13M028、AP14M026-1)

4-2 試薬

マウス GM-CSF と TNF- α は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)より購入した。Fluorescein isothiocyanate(FITC)-標識 rat anti-mouse Gr-1 monoclonal antibody (clone RB6-8C5) と phycoerythrin(PE)-標識 rat anti-mouse CD11b monoclonal antibody (clone M1/70) は Becton Dickinson Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)より購入した。

4-3 LPS 投与方法

LPS は Sigma Chemical 社 (St. Louis, MO, USA)より購入した *Escherichia coli* LPS055:B5 を使用した。生理的食塩水で最終濃度 $25\ \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように溶解し、経静脈的に $0.2\ \text{mL}$ ($5\ \mu\text{g}/\text{mouse}$) を単回投与した(28、29)。LPS 投与量については従来よりの当研究室における研究結果をもとに濃度を決定した。なおマウスの種類、年齢等により濃度は異なるが、8 週齢の B6J3J/Nia マウスの LD50 は $340\ \mu\text{g}/\text{mouse}$ である(28、29、30)。対照として $0.2\ \text{mL}$ の生理食塩水を同様に投与した。1 グループ(各採取時毎)に 3 匹のマウスを使用し、1、3、6 時間後、および 1、2、3、5、7 日後のマウスについて LPS の作用について検討した。

4-4 骨髄、脾細胞の採取

骨髄は大腿骨より 23G 針を装着した注射器を用いて Iscove-modified Dulbecco's medium(IMDM : Life Technology 社、Grand Island、NY、USA) または α -minimum essential medium(α -MEM : Life Technology 社)培地を繰り返しフラッシュすることにより細胞浮遊液を作製した。各実験群の 3 匹のマウスの両側の大腿骨を個々に採取し、それぞれ細胞数を算定した。脾臓ははさみを用いて細切後、4°Cに冷却した IMDM または α -MEM を用いて、Potter のガラスホモジナイザーでホモジナイズし、脾細胞浮遊液を作製した。

4-5 in vitro コロニーアッセイ法による CFU-GM 数および CFU-preB 数の算定

CFU-GM の培養は、骨髄細胞あるいは脾細胞を 1%メチルセルロース、30%牛胎児血清、1% Bovine Serum Albumin、0.1 mM 2-メルカプトエタノールおよび 2 mM L-グルタミンからなる 1 mL の MethoCult M3231 半固形培地(Stem Cell Technologies 社 Vancouver、BC、Canada)に植え込み、10 ng/mL の GM-CSF を添加し、35-mm プラスチック培養皿(Falcon353001、Corning 社、Durham、NC、USA)で培養した(31)。CFU-preB の培養は、骨髄細胞あるいは脾細胞を 1%メチルセルロース、30%牛胎児血清、0.1mM 2-メルカプトエタノール、2 mM L-グルタミンおよび 10 ng/mL の IL-7 からなる 1 mL の MethoCult M3630 半固形培地(Stem Cell Technologies 社)に植え込み、35-mm プラスチック培養皿(Falcon353001)で培養した(9、32)。培養皿は 37°C、5%二酸化炭素の加湿条件下で培養した。CFU-GM および CFU-preB はそれぞれ 7 日間培養後、50 個以上の細胞集塊をコロニーとして算定した。

4-6 ハイドロオキシウレア自殺実験

S 期に入っている CFU-GM および CFU-preB の割合を測定するため、S 期の細胞のみが特異的に取り込むヒドロオキシウレア(HU、Sigma Chemical 社)

を用いて自殺実験を行った。1 x 10⁶ /mL の骨髓細胞または脾細胞を 6 x 10⁻³M 濃度の HU を含む IMDM で 1 時間 37℃、5%二酸化炭素の加湿条件下で培養後、3 回 HU を含まない IMDM で洗浄し、CFU-preB、CFU-GM の in vitro コロニーアッセイを施行した(28、29、31)。IMDM のみを添加し、同様に処理した細胞を HU 非処理コントロールとした。S 期細胞は HU を取り込み、死滅することより

S 期細胞数 = HU 非処理時コロニー数 - HU 処理時コロニー数
として算定した。

4-7 骨髓ストローマ細胞の分離と培養

ストローマ細胞は in vitro では培養皿底面に付着して増殖する。1 x 10⁶ /mL の 10%牛胎児血清を含むα-MEM 培養液で作製した骨髓細胞浮遊液を 6-well plate(Falcon353046)に 4 mL ずつ蒔き、37℃、5%二酸化炭素の加湿条件下で 7 日間培養後、浮遊細胞を含む培養上清すべてを新たな培養液と交換し、培養を継続した。さらに 7 日間培養し、付着し、増殖したストローマ細胞が subconfluent になった状態で再度培養液全量を交換した。2 日後、100 ng/mL の LPS を添加し、1、3、6 時間後にストローマ細胞は Cell Scraper(IWAKI 9000-220、東京)を用いて底面より剥して回収し、RNA 抽出を行った。

4-8 RNA の抽出と qPCR による解析

総 RNA は 1 グループあたり 3 匹のマウスより採取した骨髓細胞プールより ISOGEN (日本ジーン株式会社、富山) を用いて抽出した。分離した mRNA は Superscript III (Life Technology 社)と Oligo-dT(Promega 社、Madison、CA、USA)を用いて逆転写させ cDNA を作製した。cDNA は TaqMan Universal Fast PCR master mix(Life Technology 社)と特異的 primer と probe を加えて、Applied Biosystem7500 FAST Real-Time PCR System を用いて、qPCR を施

行した。SDF-1、SCF、IL-7、TGF- β 、TNF- α 、G-CSF、IL-6、GM-CSF および glyceraldehyde phosphate dehydrogenase(GAPDH)の特異的 primer と probe は Life Technology 社より購入した(TaqMan Gene Expression Assays; SDF-1, Mm00445552_ml ; SCF、Mm00442972_ml ; IL-7、Mm00434291_ml ; TGF- β 、Mm00441724_ml ; TNF- α 、Mm00113281_ml ; G-CSF、Mm00438334_ml ; IL-6、Mm00446190_ml ; GM-CSF、Mm00438328_ml ; GAPDH、Mm99999915_g1)。qPCR 条件およびデータの解析は Sequence Detection System version2.0 使用説明書に従って設定した。全てのサンプルに対し 3 組の qPCR を施行した。目的遺伝子の増幅は、SDS software v1.3(Life Technology 社)にて確認し、定量は probe の発する蛍光強度が自動で設定された Threshold に達するまでのサイクル数 (Ct : Cycle times) 値を基に、使用説明書に従い相対的に行った。サイトカイン遺伝子の発現量は、GAPDH を内因性コントロールにして、各サイトカイン遺伝子と GAPDH の Ct 値の差 (Δ Ct) により補正した。サイトカイン遺伝子発現量の相対定量は各タイムポイントの Δ Ct からコントロール (LPS 非投与マウス) の Δ Ct を引くことで ($\Delta\Delta$ Ct) 行った。PCR ではターゲットとなる遺伝子配列は 1 サイクルで 2 倍に増幅するため、相対定量の結果は以下の計算式により算出した。

サイトカイン遺伝子発現量の補正 : $2^{-\Delta\text{Ct}} = 2^{-(\text{Ct Cytokine} - \text{Ct GAPDH})}$

サイトカイン遺伝子の相対的発現量 : $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-(\Delta\text{Ct, for LPS treatment} - \Delta\text{Ct, for control})}$

4-9 フローサイトメトリーによる未熟顆粒球系細胞の解析

CFU-GM より分化した、かつ未熟な顆粒球系細胞の検出のため、分化マーカーである Gr-1 および CD11b の発現についてフローサイトメトリーを用いて測定した。採取した骨髄あるいは脾細胞は IMDM で 1 回洗浄後 10 mL の 0.86%

NH₄Cl 溶液に浮遊させ、4℃で 5 分間静置し溶血処理を行った。得られた骨髄または脾臓の有核細胞は IMDM で 2 回、2% 牛胎児血清を含む phosphate-buffered saline(PBS) で 1 回洗浄後、 2×10^5 細胞を 0.5 mL の 2% 牛胎児血清、0.02% NaN₃ を含む PBS に浮遊させ、10 μL の FITC-標識 rat anti-mouse Gr-1 monoclonal antibody と PE-標識 rat anti-mouse CD11b monoclonal antibody と 4℃、30 分間暗所で静置、反応させた。PBS で 3 回洗浄後、CytoACE-150two-color フローサイトメーター(日本分光、東京)で Gr-1 および CD11b 発現を測定し、double positive 細胞を未熟顆粒球系細胞として検出した。

4-10 統計学的検討

全ての結果は 平均値±標準偏差値(mean ± SD)あるいは平均値±標準誤差値(mean ± SE)で記載した。実験グループ間の有意差検定は one-way analysis variance(ANOVA)を用いて評価した。統計学的に p 値 0.05 未満のものを有意な差と判断した。

5. 結果

5-1 LPS 投与後の骨髄、脾臓の CFU-preB および CFU-GM の変動

炎症反応時の骨髄および脾臓における CFU-GM、CFU-preB の変動を検討する目的で、LPS 投与マウスについて検討を行った。5 μ g の LPS 投与後の骨髄中の CFU-preB および CFU-GM 数の変動を、投与 1、2、3、5、7 日後に測定した結果を Figure 5 に示す。LPS 非投与マウス(コントロール)の骨髄 CFU-preB および CFU-GM 数は $30,177 \pm 946$ と $68,835 \pm 2,953$ (mean \pm SD)であった。LPS 投与マウスでは CFU-preB 数は 2 日後にコントロールマウスの 27%まで低下し、その後徐々に回復し、7 日後には投与前状態に復帰する(Figure 5A)。CFU-GM 数は投与後急速に減少し、1 日後にはコントロールの 56%まで低下するが、2 日後までに速やかに回復し、3 日後にはコントロールの 211%まで増加し、その後徐々に低下するものの 7 日後でもコントロールの 159%まで増加が続いているのが観察された(Figure 5B)。

脾臓での CFU-preB、CFU-GM の変動を Figure 6 に示す。コントロールマウス脾臓の CFU-preB および CFU-GM 数は 247 ± 65 と $1,232 \pm 77$ (mean \pm SD)であった。脾臓の CFU-preB の変動は LPS 投与後もわずかであり、有意の変化を認めなかった(Figure 6A)。一方 CFU-GM は LPS 投与後に増加し、特に 3 日目には急激な増加によりコントロールの 2,372%まで達し、その後低下はするが 7 日目でもコントロールより有意の増加を認めている。

5-2 LPS 投与後の骨髄、脾臓の未熟顆粒球系細胞の変動

CFU-GM より分化した、しかしながら未熟段階の顆粒球系細胞は抗 Gr-1、抗 CD11b 抗体 double positive 細胞として検出が可能である(33)。骨髄中の未熟顆粒球系細胞比率は、コントロール、LPS 投与 1 日、3 日後でそれぞれ 31.3%、28.1%、57.0%であった(Figure 7)。脾臓では同様に 12.4%、20.7%、16.5%で

あった(Figure 7)。これら結果は、骨髄における未熟顆粒球系細胞は CFU-GM の増加同様に LPS 投与 3 日目には有意に増加していること、脾臓でも投与 1 日後には増加を認めるが有意の変動は見られなかったことを示している。

5-3 骨髄、脾臓における種々のサイトカイン(SDF-1、SCF、IL-7、TGF- β 、TNF- α 、G-CSF、IL-6、GM-CSF) mRNA 発現の変動

LPS 投与後の顆粒球、B 細胞造血におよぼすストローマ細胞の影響を検討する目的で、骨髄、脾臓での種々のサイトカインの mRNA 発現の変動を検討した。SDF-1、SCF、IL-7 は B 細胞造血の促進因子であり(13-15)、TGF- β 、TNF- α は B 細胞造血の抑制因子(16、17)、また G-CSF、IL-6、GM-CSF は顆粒球造血の促進因子である(18-20)。いずれのサイトカインもストローマ細胞が産生することが知られている。

LPS 非投与マウス骨髄の SDF-1、SCF、IL-7、TNF- α 、G-CSF、IL-6、GM-CSF の mRNA はいずれも TGF- β に比較して低発現であり、TGF- β の発現を 1 とした場合、0.079、0.0061、0.00065、0.096、0.00032、0.040、0.012 となる。LPS 非投与マウス脾臓におけるこれら遺伝子発現も TGF- β に比較して骨髄同様低値であり、TGF- β の発現を 1 とした場合、0.11、0.095、0.0037、0.169、0.028、0.012、0.011 となる。

LPS 投与後の骨髄、脾臓における遺伝子発現の変動として、B 細胞造血の促進因子(Figure 8A、9A)、B 細胞造血の抑制因子(Figure 8B、9B)、顆粒球造血の促進因子(Figure 8C、9C)を示す。骨髄での TGF- β の発現は投与 1 時間後には急激な上昇を認め、投与前の 201% に達する。その後徐々に低下し、1 日後には 55% まで低下した後、再び上昇し、7 日後には 133% のレベルであった(Figure 8A)。SDF-1 の発現は投与後急速な上昇を認め、1 時間後には投与前の 347% に達する。その後投与 2 日後には 61% まで低下したが、再び上昇するとともに投与前

の 261%から 334%のレベルで推移していた(Figure 8A)。SCF についても SDF-1 と同様の変動が認められた。IL-7 については投与 3 時間後には 210%に上昇し、徐々に低下しながら 96%から 214%のレベルで推移していた(Figure 8A)。B 細胞造血抑制因子である TNF- α は投与 1 時間後に投与前の 3,480%と急速な上昇を認める。投与 1 日後には投与前レベルまで低下するが再び上昇し、7 日後でも 365%の発現上昇を認めている(Figure 8B)。顆粒球系細胞造血促進因子である G-CSF は投与 1 時間後には 89,826%と極めて急速な上昇を認め、1 日後にはほぼ投与前状態に戻り、その後は 18%から 204%のレベルで変動していた(Figure 8C)。IL-6 は同様に急速な上昇を認め、投与 1 時間後には 13,583%に上昇した。3 日後には 74%にまで低下するが再び上昇し、7 日後には投与前の 225%のレベルであった(Figure 8C)。GM-CSF も投与 3 時間後には 808%まで上昇し、1 日後には投与前レベルにまで戻り、その後は 57%から 203%のレベルで変動していた(Figure 8C)。

脾臓でのサイトカイン遺伝子発現は、変動幅は比較的緩やかであるがほぼ骨髄での変動と同様であった(Figure 9A-C)。TGF- β 遺伝子発現は投与後徐々に低下し、2日後には投与前の23%となるが再び上昇し、3日後には105%となり以後も投与前とほぼ同じレベルで推移した(Figure 9A)。SDF-1 の発現は投与1時間で57%に低下し、3時間後には122%に戻るが1日後には6.8%まで低下する。その後発現レベルは上昇し、7日後には126%とほぼ投与前の状態であった。SCF 遺伝子発現も SDF-1 とほぼ同様の推移であった(Figure 9A)。IL-7 遺伝子発現は、投与 1 時間後には 59%に低下するが 3 時間後には 271%に上昇を認めた。1 日後には 29%に低下するが、7 日後では投与前の 315%のレベルであった(Figure 9A)。TNF- α 遺伝子発現は3時間後には610%と急速な上昇を認めるが2日後には30%まで低下し、5日後にはほぼ投与前レベルとなり以後ほとんど変動は認めな

かった(Figure 9B)。G-CSF の発現は、投与 3 時間後には 1,431%に上昇し、1 日後には 135%まで戻り、以後は 91%から 395%のレベルで推移していた(Figure 9C)。IL-6 は投与 3 時間後には 3,316%に上昇した後 2 日後までに 78%まで低下し、5 日後に 299%まで再び上昇した後はほとんど変動を認めない(Figure 9C)。GM-CSF は投与 3 時間後に 1,246%に上昇するが 6 時間後には 165%となり、その後は 112%から 388%のレベルで推移していた(Figure 9C)。

造血状態との関係を理解するために、促進因子と抑制因子の遺伝子発現状態の比較を行った。この際定常状態(LPS 非投与コントロールマウス)において安定して高く発現している TGF- β (B 細胞造血抑制因子)を基準として各遺伝子を比較し、遺伝子発現比率を“cytokine/TGF- β 比”として Figure 8a-c、9a-c に示した。骨髄では TGF- β 同様にB細胞造血抑制因子である TNF- α の、顆粒球系細胞造血因子である G-CSF、IL-6 の著しい、また投与直後の急速な増加が確認されている。B 細胞造血促進因子である SCF、SDF-1、IL-7 については TGF- β に対して低いレベルのまま推移しているのが確認された。脾臓においても TNF- α の増加を認めるが、G-CSF、IL-6 の増加は骨髄に比較すると軽微であり、SCF、SDF-1、IL-7 については同じく相対的に低レベルでの発現であった。

5-4 in vitro 培養骨髄ストローマ細胞に対する LPS 添加時における種々のサイトカイン(SDF-1、SCF、IL-7、TGF- β 、TNF- α 、G-CSF、IL-6、GM-CSF) mRNA 発現の変動

10 ng/mL の LPS 添加後の培養骨髄ストローマ細胞における各サイトカイン遺伝子発現の変動を、LPS 非添加時の各遺伝子発現との比率として Figure 10 に示す。B 細胞造血促進因子である SDF-1、SCF、IL-7 遺伝子発現は LPS 添加後 1 時間で非添加時の 211%、245%、143%に上昇後、徐々に低下を認めた(Figure 10A)。B 細胞造血抑制因子である TNF- α の発現は添加1時間後に

35,820%に上昇し、わずかな低下は認めるものの 6 時間後でも高い発現レベルを維持していた(Figure 10B)。一方同じく抑制因子の TGF- β は添加1時間後に151%まで上昇を認めたが、非添加時と比較してほぼ同様のレベルで推移していた(Figure 10B)。顆粒球系細胞造血促進因子である G-CSF、IL-6 の遺伝子発現は添加後急速に上昇し、6時間後には非添加時の 29,750%、163,630%に上昇していた(Figure 10C)。GM-CSF 遺伝子発現も添加3時間後には 368,850%まで上昇し、以後やや低下するものの6時間後でも非投与に比較して 79,190%の高い発現レベルであった(Figure 10C)。

5-5 CFU-preB コロニー形成に対する TNF- α の影響

LPS 投与後マウスで顆粒球系造血の亢進と B 細胞造血の抑制がみられ、また同時に in vivo および in vitro でストローマ細胞における TNF- α 遺伝子発現の顕著な上昇が認められた。TNF- α が実際に B 細胞造血を抑制するかを確認するため、CFU-preB コロニーアッセイ時に直接 TNF- α を添加し、その作用について検討した。10 ng/mL の IL-7 存在下に骨髓細胞を培養し、CFU-preB コロニー形成を行い、1 または 10 ng/mL の TNF- α を添加しコロニー数を比較検討した。TNF- α 非添加では $76.3 \pm 8.6 / 1 \times 10^5$ 骨髓細胞のコロニー数であったが、1 および 10 ng/mL の TNF- α 添加により 67.0 ± 9.5 、 53.3 ± 4.9 と減少を認め、TNF- α がB細胞増殖、分化を直接抑制している結果が得られた(Figure 11)。

5-6 LPS 投与後マウスの骨髓 S 期 CFU-preB および CFU-GM 数の変動

LPS 投与後マウス骨髓での造血動態を検討する目的で、ハイドロオキシウレア自殺実験を用いて S 期 CFU-preB、CFU-GM の存在比率について測定した。LPS 非投与コントロールマウスでは、S 期の CFU-preB、CFU-GM は 11648 ± 1237 、 $17621 \pm 1664 / \text{femur}$ であった。骨髓 S 期 CFU-preB は LPS 投与 1 日後にコントロールの 20%に減少し、その後減少が続いたのち 7 日目で 161%まで

回復した(Figure 12A)。一方 S 期 CFU-GM は投与 1 日後よりコントロールの 120%に増加し、5 日後には 363%まで増加した後 7 日目には 217%に低下しているのが観察された(Figure 12B)。

6. 考察

造血組織においてはストローマ細胞が液性因子、接着因子などを介した直接作用により造血を制御していることが知られている(10-12)。定常状態においてほとんどの造血幹細胞は休止状態であり、感染や炎症などの所謂「バイオストレス」に曝露されると造血が活性化され幹細胞は細胞周期に入り、必要に応じて末梢に血球細胞を供給することにより個体としての恒常性を維持する(34)。この反応性造血については造血環境を構成するストローマ細胞が制御の中心的役割を担っていると考えられているが、そのメカニズムなど詳細は未だ不明の点が多い。

感染や炎症時の反応性造血では顆粒球系細胞造血の亢進と B 細胞造血の抑制が知られている(6-9、35)。ほとんどの幹細胞が休止状態である定常時では一般に造血は抑制的に維持されており、ストローマ細胞の液性因子産生能は低レベル状態であるが、ひとたびバイオストレスに曝露されるとこの機能が活性化され、反応性造血を誘導すると考えられているが(32)、特に顆粒球系および B 細胞系造血における相反的反応を絡めて検討した具体的報告はほとんどないのが現状である。本研究ではストローマ細胞の造血促進、抑制因子の産生のバランスが感染や炎症時の反応性造血においてどの様に機能しているかを検討した。感染や炎症のモデルとして LPS 投与マウスを実験に使用した。LPS は TLR4 を介してストローマ細胞を活性化し、サイトカイン産生を誘導することが報告されており、本実験に適したモデルと考えた(21、22)。

LPS の経静脈的投与後、骨髄 CFU-GM および CFU-preB の急速な減少が認められた。このことは投与直後の骨髄における顆粒球系、B 細胞系の造血抑制状態を示すものと考えられる。ただし炎症時には骨髄から末梢血に両者前駆細胞が動員されることより骨髄中の前駆細胞数が減少することが知られており(36)、本

実験結果も同様の現象が再現されている可能性がある。さらに経時的に観察すると、CFU-GM はその後速やかに回復するのに対し、CFU-preB の減少は遷延していた(Figure 5A、5B)。フローサイトメトリーを用いた未熟顆粒球系細胞の検討でも同様の変動が認められている(Figure 7)。一方脾臓では、従来の報告(28、29)と同様に骨髄とは異なり LPS 投与後の両者前駆細胞の減少は認めない(Figure 6)。これらの結果より、LPS 投与後反応時には主として骨髄プールから前駆細胞の動員が行われるのか、動員された前駆細胞が末梢器官である脾臓に移動して反応初期の造血が脾臓主体に行われているのか、あるいは特に骨髄では急性期に強い造血抑制が起こっているのか、等が推測される。解明のためにはさらに検討が必要ではあるが、本実験の結果は骨髄、脾臓で異なる反応性造血が行われていることを示唆するものである。また顆粒球系細胞と B 細胞の動員が異なることより、それぞれの造血反応に対応する制御機構が機能していることが予想できる。

反応性造血のメカニズムを検討する目的で、LPS 投与後のストローマ細胞における種々の造血因子の遺伝子発現の変動を qPCR 法を用いて検討した。マウス骨髄では LPS 投与 1 時間後には B 細胞造血促進因子である SDF-1、SCF、IL-7 遺伝子発現の軽度の上昇を認めたが、その一方で抑制因子である TNF- α の著しい上昇を認めている(Figure 8)。TNF- α は未熟な造血前駆細胞に対して抑制的に作用するのみならず、より分化した段階の B 細胞造血および赤血球造血に対しても抑制的に作用することが報告されている (17、37、38)。したがって抑制因子である TNF- α の著しい上昇は促進・抑制のバランスを抑制方向と変化させる一因であったと考えられる。骨髄由来培養ストローマ細胞への *in vitro* での LPS 添加実験でも TNF- α 遺伝子発現の上昇を認めている。さらに CFU-preB コロニー作製時に TNF- α を添加すると B 細胞の増殖、分化が抑制されることより

(Figure 11)、LPS 投与後の骨髄における B 細胞造血抑制に TNF- α が重要な要素となっていることが予想された。脾臓においても TNF- α 遺伝子発現は LPS 投与直後より上昇している結果が得られたが(Figure 9)、CFU-preB 数の変動は骨髄に比較して軽微であり(Figure 5A, 6A)、さらに異なるメカニズムが機能していることが予想される。興味深いことに、定常状態(LPS 非投与コントロールマウス)において、B 細胞造血促進因子である SDF-1、SCF、IL-7 あるいは抑制因子である TNF- α に対して TGF- β の遺伝子発現が明らかに高値であり、このことは定常状態では抑制系優位の制御が働いており、造血幹細胞あるいは前駆細胞の多くが休止期で存在していることと関連していると考えられた。実際、TGF- β の遺伝子発現がそれ以外のサイトカインに比較し高値である傾向は、他の系統のマウスにおいても同様に観察される (28、31)。また、TGF- β は他の系統のマウスにおいても LPS および 5-FU などのストレスを加えた際にも変動は軽微であるという特徴を有しているため、他のサイトカインとの比率を取ることにより促進、抑制のバランス変化を観察する際の良いコントロールになると考えられる (28、31)。

一方、顆粒球系細胞造血促進因子である G-CSF、IL-6 は骨髄、脾臓ともに LPS 投与直後より著しい遺伝子発現上昇を認めている(Figure 8、9)。骨髄、脾臓における LPS 投与 3 日後にみられる CFU-GM の顕著な増加は、これら造血因子の産生により誘導された可能性が高い。以上より LPS 投与はストローマ細胞より顆粒球系造血促進因子および B 細胞造血抑制因子の産生を誘導し、これを介して骨髄、脾臓での反応性造血が制御されていることが示唆された。また造血が促進される過程において CFU-GM の S 期細胞比率が増加していることより、休止期細胞が細胞周期に入ることにより造血が著しく亢進されていると考えられた。LPS 投与後の G-CSF を介した特に初期の顆粒球系細胞造血亢進に、

血管内皮細胞が強く関与している報告がある(39)。Boettcherらは血管内皮が感染を速やかに検知、反応し、顆粒球造血を亢進すると述べている(39)。骨髄では基本的に造血幹細胞を休止期に安定させている骨芽細胞ニッチェと必要に応じて増殖、分化を誘導する内皮細胞ニッチェが存在していると考えられている(40)。反応性の顆粒球造血亢進はそれぞれの造血の場で行われる生体維持のための様々な反応の総合的な現象としてとらえることができる。残念ながら本研究では「骨髄ストローマ細胞」全体として造血因子産生等の機能を観察している。技術的な困難はあるが、今後内皮細胞、骨芽細胞、線維芽細胞などのストローマを構成する各細胞に分離して、反応性など固有の機能を検討することは重要と考える。

感染や炎症時の造血反応について、造血制御の中心的役割を担っているストローマ細胞の、特にサイトカイン産生能に焦点をあて、LPS 投与マウスをモデルとして検討した。定常状態では比較的抑制系優位の制御であるが、ひとたびLPS等の刺激が入ると抑制、促進造血因子産生が新たに誘導され、両者のバランスが変化することにより、結果的に顆粒球系細胞造血亢進、B細胞造血抑制状態となり、個体としての恒常性が維持されていることが推測された。炎症性物質としてLPSはTLR4を介してストローマ細胞を活性化するが、炎症時にはその他様々な生理活性物質が生じる。事実、慢性炎症に関連する acetyl-chiken γ globulin 投与によりLPSと同じくB細胞造血を抑制することが知られているが、その機序としてLPS投与ではほとんど変動の無かったストローマ細胞からのSDF-1の産生低下を誘導することに起因していることが報告されている(7,8)。このように生体が恒常性を維持するシステムの一つとして、ストローマ細胞は様々な機能を介して造血制御を行っていると思われる。接着因子を介した制御機構など今後さらにストローマ細胞機能を解明していくことが生体維持のメ

カニズムを知るうえで大切な課題と考えられる。

7. まとめ

LPS 投与モデルマウスを用いて、感染や炎症時の B 細胞系および顆粒球系の反応性造血について検討した。1 回の経静脈的 LPS 投与後、速やかな顆粒球系細胞造血の亢進と B 細胞造血の抑制が観察され、約 1 週間にわたり反応が持続していることが明らかとなった。これら反応を惹起する機序の一端として、ストローマ細胞が産生する促進的あるいは抑制的造血因子が相互に関与している結果が得られ、感染や炎症時においてストローマ細胞が反応性造血を制御し、個体の恒常性を維持していることが示唆された。

8. 謝辞

この稿を終えるにあたり、この研究に対して多大なるご尽力を頂きました機能形態学系・生体構造医学分野の相澤信教授、壺井功准教授、今田正人准教授、原田智紀先生はじめ教室の先生方にこの場を借りまして心から厚く御礼申し上げます。

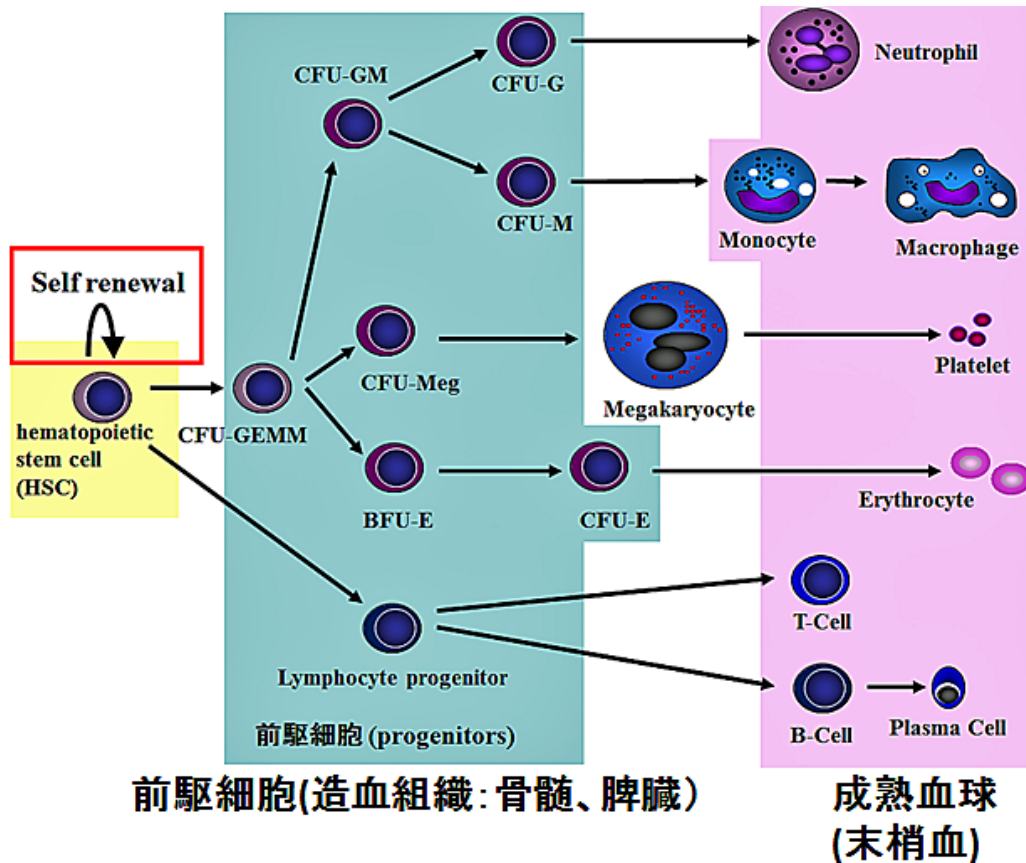
研究の遂行にあたり多くの助言を賜りながら、本論文の完成前に急逝されました故井上達博士に哀悼の意を表するとともに、心より御礼申し上げます。

最後に終始暖かい支援をしていただいた両親、妻と子供に感謝いたします。

9. 図

Figure 1

造血幹細胞の自己複製と分化



すべての血球は造血幹細胞より分化し、成熟血球となり造血組織より末梢に遊出する。
ヒトでは CD34 陽性細胞が造血幹細胞として考えられている。

HSC : hematopoietic stem cell

CFU-GEMM : colony-forming-unit-granulocyte-erythroid-megakaryocyte-macrophage

CFU-GM : colony-forming unit-granulocyte-macrophage

CFU-G : colony-forming unit-granulocyte

CFU-M : colony-forming unit-macrophage

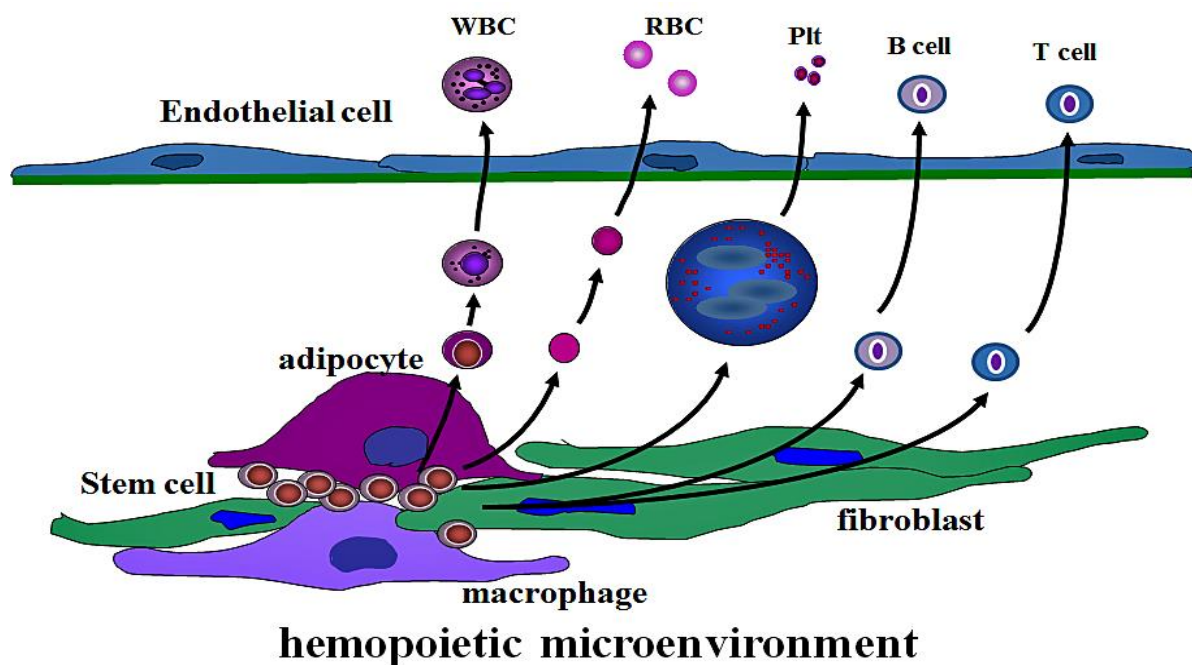
CFU-Meg : colony-forming unit -megakaryocyte

BFU-E : burst colony-forming unit- erythroid

CFU-E : colony-forming unit-erythroid

CFU-preB : colony-forming unit-preB cell

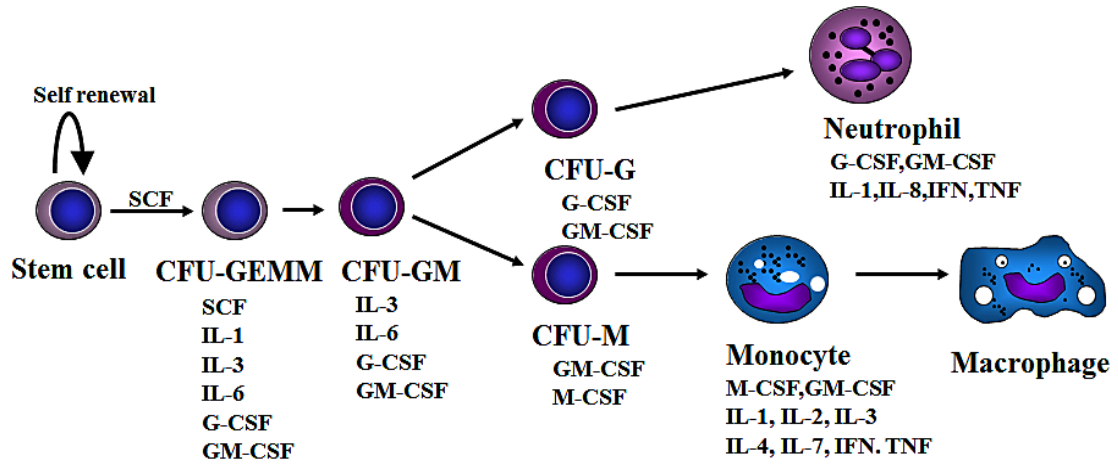
Figure 2
造血微小環境



造血微小環境(hemopoietic microenvironment)は線維芽細胞、マクロファージ、骨芽細胞、脂肪細胞、内皮細胞などの間質系細胞から構成され、これら細胞はストローマ細胞と総称されている。ストローマ細胞はサイトカインなどの造血因子産生や、細胞間の接着因子を介した直接接触などにより造血幹細胞の増殖・分化を制御していると考えられている。

Figure 3

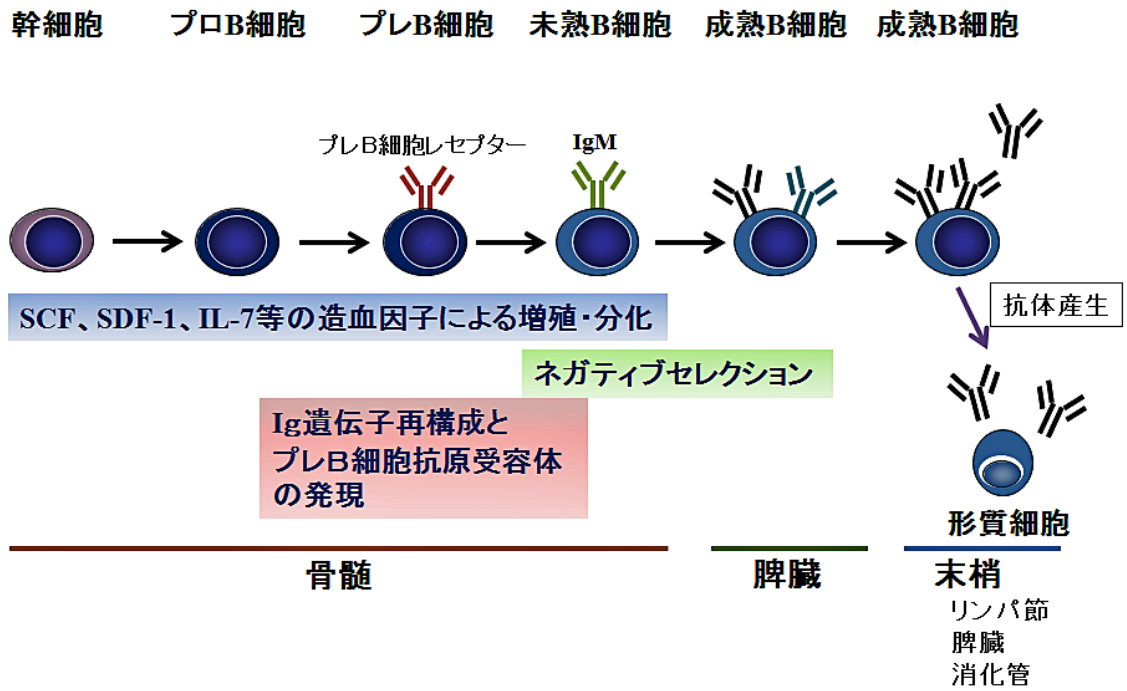
顆粒球造血と関与する造血因子



顆粒球造血分化と関与する造血因子を示す。造血因子の多くはストローマ細胞より産生され、造血動態が制御されると考えられている。

Figure 4

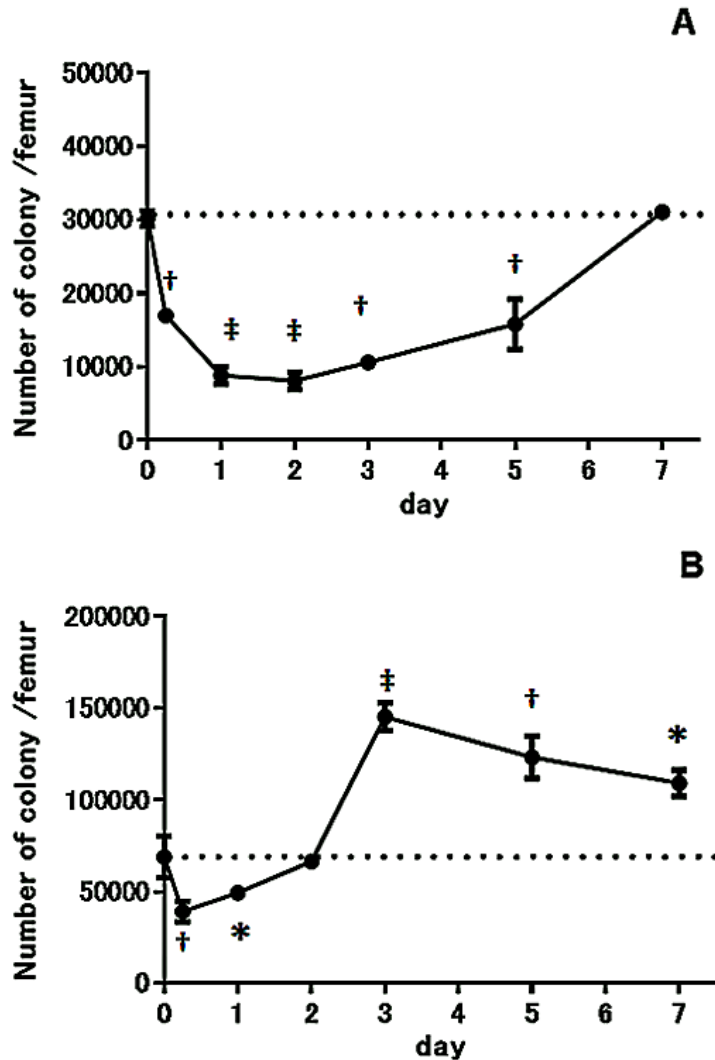
B細胞造血と関与する造血因子



B細胞造血分化と関与する造血因子を示す。造血因子の多くはストローマ細胞より産生され、造血動態が制御されると考えられている。B細胞は未成熟段階で骨髓より遊出し、セレクションされた後、末梢組織において抗体産生細胞に成熟する。

Figure 5

LPS 投与後の骨髄中の CFU-preB および CFU-GM 数の変動

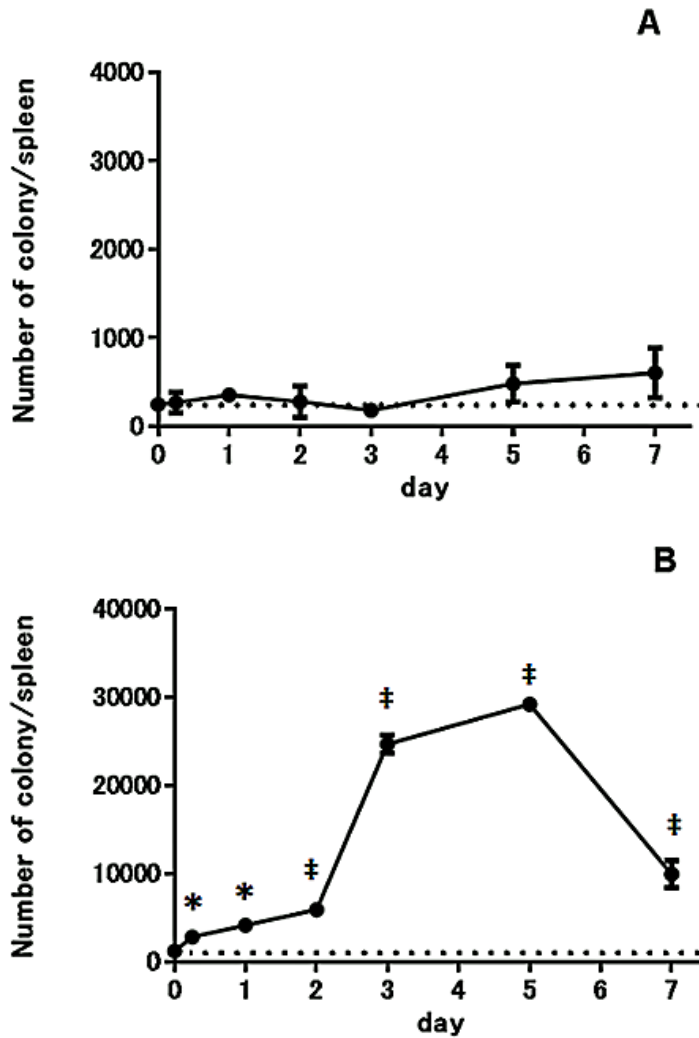


Changes over time in the number of (A) CFU-preB cells and (B) CFU-GM cells in the BM of mice following LPS treatment are shown. The samples were obtained from three mice of 6 h and 1, 2, 3, 5, and 7 days after a single intravenous injection of 5 μ g LPS. Each data point represents the mean and the bars show the standard deviation.

*p < 0.05, †p < 0.005, ‡p < 0.001 vs. control.

Figure 6

LPS 投与後の脾臓中の CFU-preB および CFU-GM 数の変動

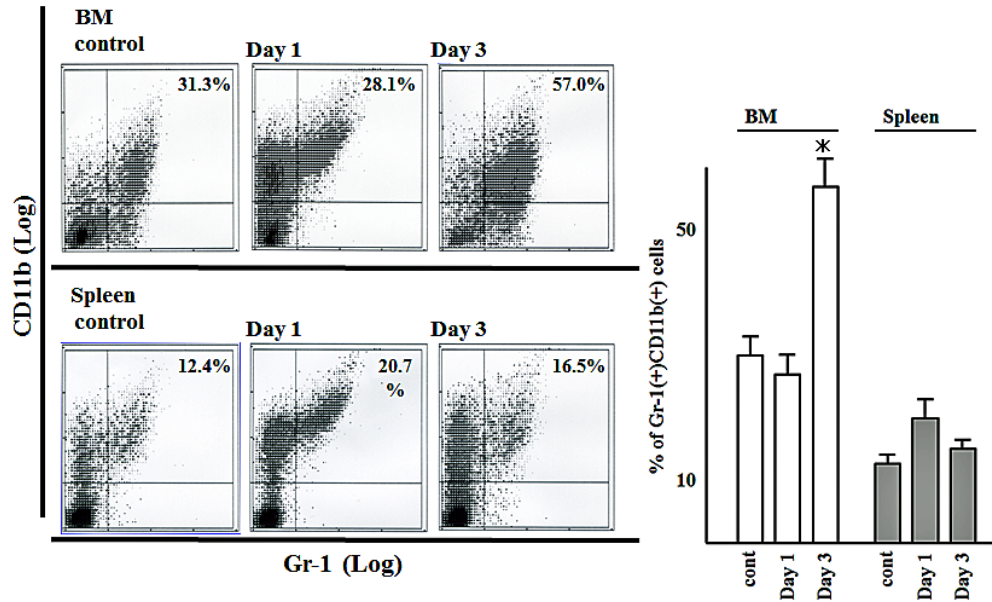


Changes over time in the number of (A) CFU-preB cells and (B) CFU-GM cells in the spleens of mice following LPS treatment are shown. The samples were obtained from three mice of 6 h and 1, 2, 3, 5, and 7 days after a single intravenous injection of 5 μ g LPS. Each data point represents the mean and the bars show the standard deviation.

* $p < 0.05$, † $p < 0.005$, ‡ $p < 0.001$ vs. control.

Figure 7

LPS 投与後の骨髄、脾臓中の未熟顆粒球系細胞の変動

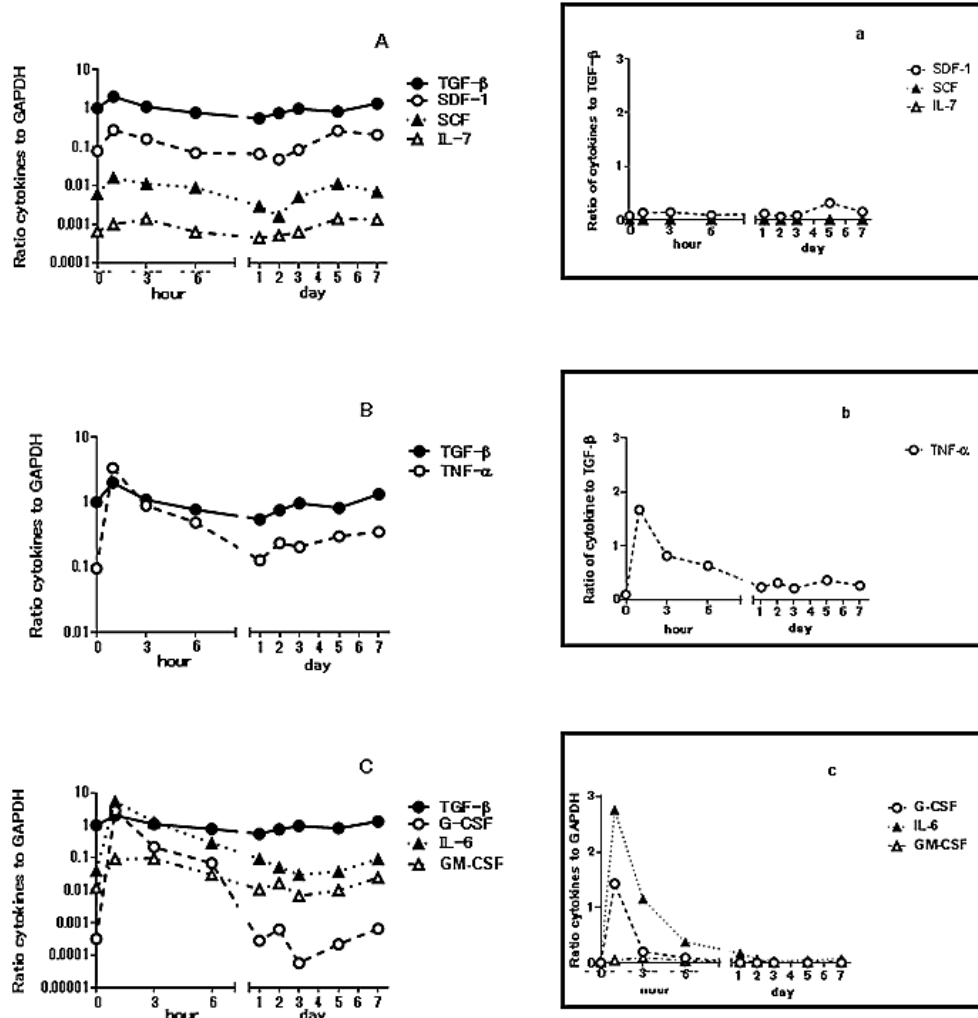


BM and spleen cells obtained from non-treated mice (control) and mice 1 and 3 days after LPS treatment were stained with anti-Gr-1 and CD11b monoclonal antibodies. The percentages of immature myeloid cells that are Gr-1 and CD11b double positive in the BM and spleen are shown. The dot plot data shows the data derived from one of three independent experiments with similar results. Three different experiments were performed, and data are expressed as means \pm SD.

*p < 0.05 vs. control.

Figure 8

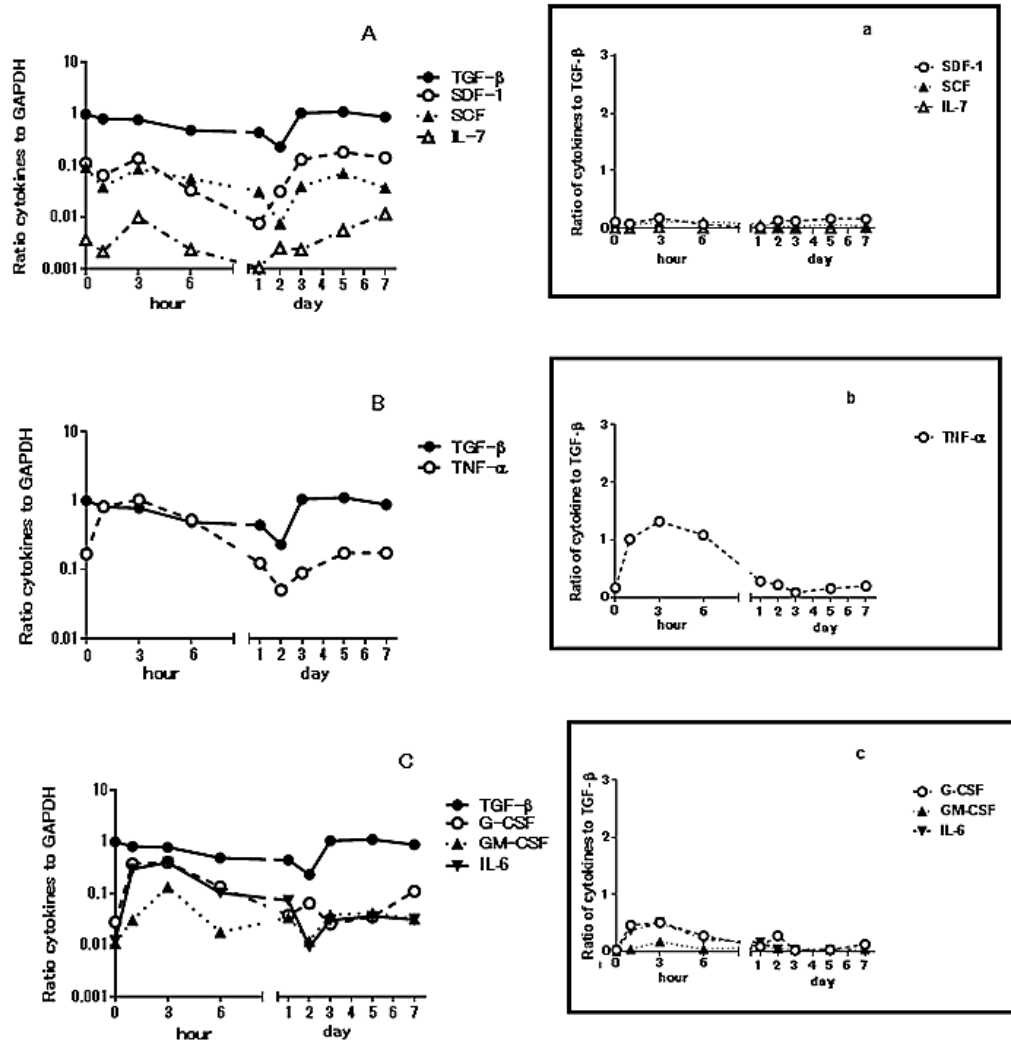
LPS 投与後の骨髄における造血因子(SDF-1、SCF、IL-7、TGF- β 、TNF- α 、G-CSF、IL-6、GM-CSF)遺伝子発現の変動



mRNA levels of positive regulators of B lymphopoiesis, SDF-1, SCF, and IL-7 (A and a); mRNA levels of negative regulators of B lymphopoiesis, TNF- α and TGF- β (B and b); and mRNA levels of positive regulators of myelopoiesis, G-CSF, IL-6, and GM-CSF (C and c) were evaluated 1, 3 and 6 h and 1, 2, 3, 5, and 7 days after a single intravenous injection of 5 μ g LPS. The results were normalized to GAPDH mRNA levels. The values shown for SDF-1, SCF, IL-7, TNF- α , G-CSF, IL-6, and GM-CSF are relative to the TGF- β level in untreated mice, which was arbitrarily set to a value of 1 (A, B, and C). The relative gene expression levels shown for SDF-1, SCF, IL-7, TNF- α , G-CSF, IL-6, and GM-CSF are the gene expression levels divided by the TGF- β gene expression level in treated mice (a, b, and c).

Figure 9

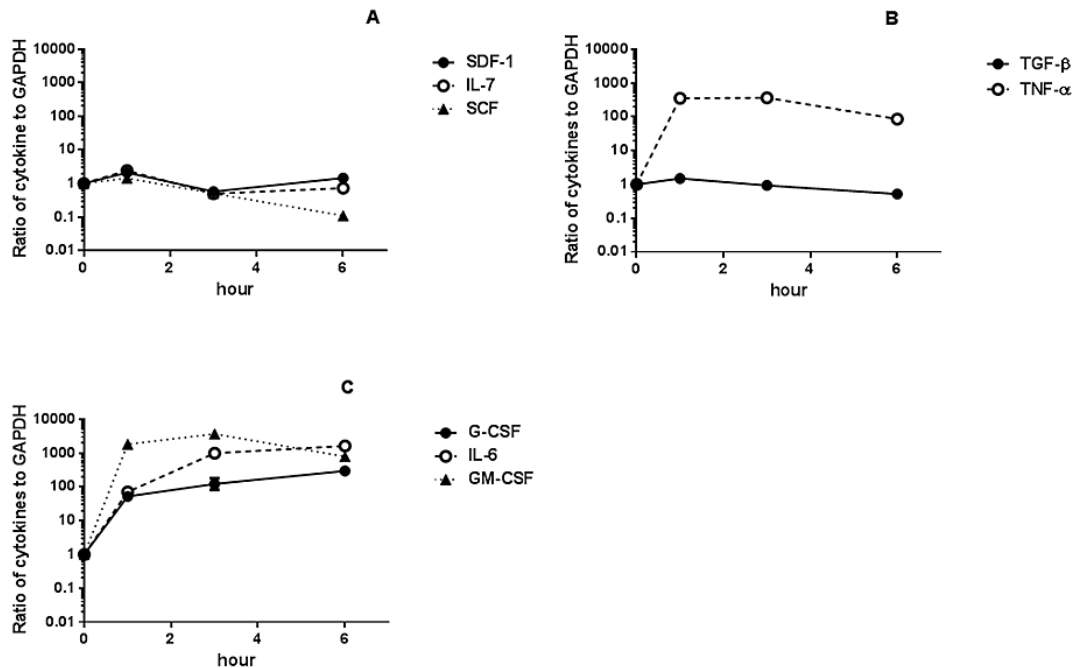
LPS 投与後の脾臓における造血因子(SDF-1、SCF、IL-7、TGF- β 、TNF- α 、G-CSF、IL-6、GM-CSF)遺伝子発現の変動



mRNA levels of positive regulators of B lymphopoiesis, SDF-1, SCF, and IL-7 (A and a); mRNA levels of negative regulators of B lymphopoiesis, TNF- α and TGF- β (B and b); and mRNA levels of positive regulators of myelopoiesis, G-CSF, IL-6, and GM-CSF (C and c) were evaluated 1, 3 and 6 h and 1, 2, 3, 5, and 7 days after a single intravenous injection of 5 μ g LPS. The results were normalized to GAPDH mRNA levels. The values shown for SDF-1, SCF, IL-7, TNF- α , G-CSF, IL-6, and GM-CSF are relative to the TGF- β level in untreated mice, which was arbitrarily set to a value of 1 (A, B, and C). The relative gene expression levels shown for SDF-1, SCF, IL-7, TNF- α , G-CSF, IL-6, and GM-CSF are the gene expression levels divided by the TGF- β gene expression level in treated mice (a, b, and c).

Figure 10

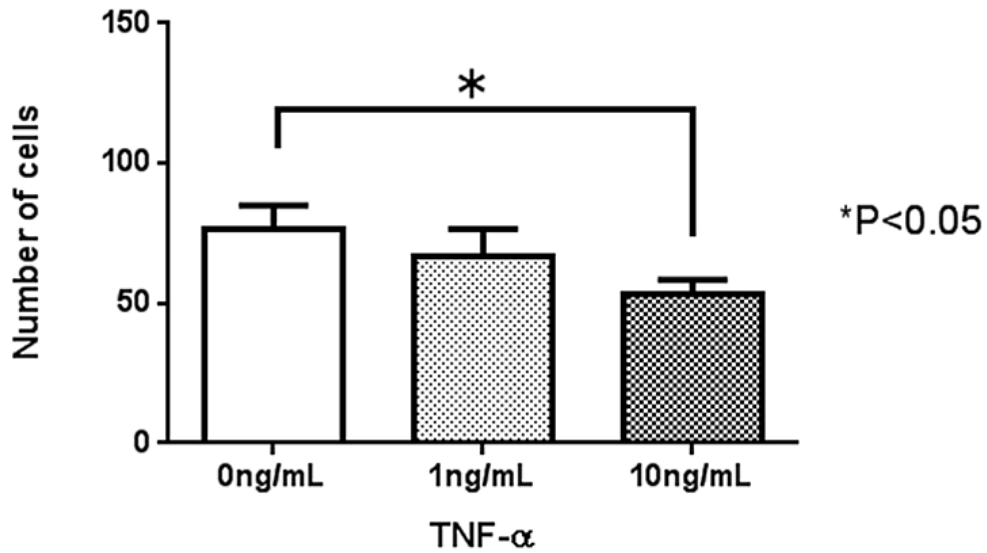
LPS 添加後の培養骨髄ストローマ細胞における造血因子(SDF-1、SCF、IL-7、TGF- β 、TNF- α 、G-CSF、IL-6、GM-CSF)遺伝子発現の変動



A stromal cell monolayer was prepared by culturing whole BM cells. After subconfluent stromal layers were formed, the supernatant was removed, and fresh medium was added again to the culture dish. After 2 days of culture, 100 ng/mL LPS was added to the culture dish. After 1, 3, and 6 h of culture, the culture medium was removed completely, and stromal cells were subjected to RNA extraction. mRNA levels of positive regulators of B lymphopoiesis, SDF-1, SCF, and IL-7 (A); mRNA levels of negative regulators of B lymphopoiesis, TNF- α and TGF- β (B); and mRNA levels of positive regulators of myelopoiesis, G-CSF, IL-6, and GM-CSF (C) were evaluated 1, 3 and 6 h after treatment with 100 ng/mL LPS. The results were normalized to GAPDH mRNA levels. The values shown for SDF-1, SCF, IL-7, TNF- α , TGF- β , G-CSF, IL-6, and GM-CSF are expressed as a ratio for each cultured stromal cell fraction without LPS.

Figure 11

CFU-preB colony 形成に対する TNF- α 添加の影響

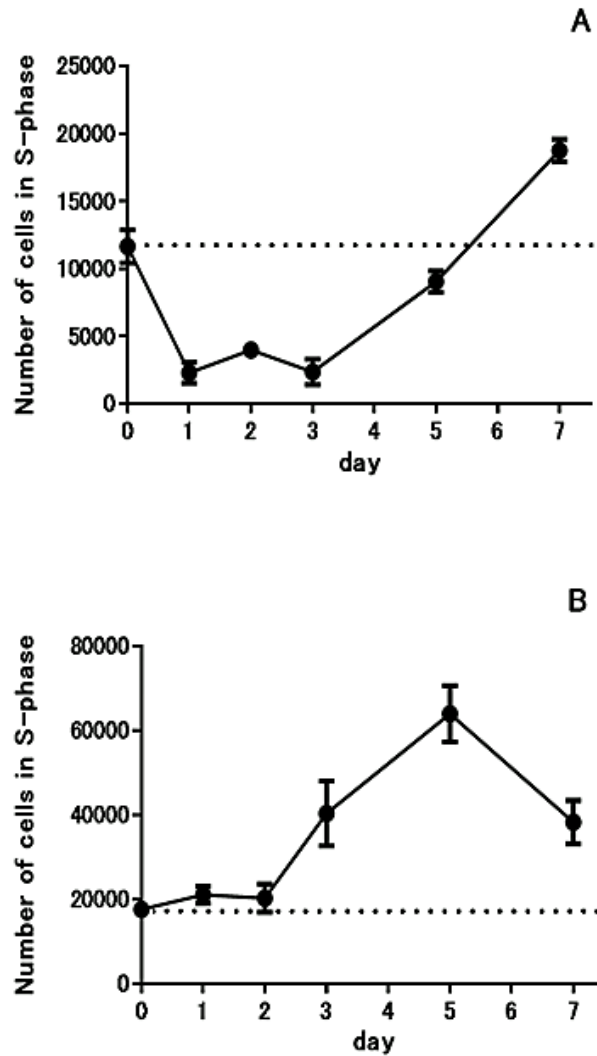


Effect of TNF- α on the proliferation or differentiation of CFU-preB cells was evaluated. Whole BM cells were cultured for 7 days in a semi-solid medium system containing 10 ng/mL of IL-7 in the presence of various concentrations of TNF- α , and the number of CFU-preB colonies was measured. Three different experiments were performed, and data are expressed as means \pm SD.

*p < 0.05 vs. control.

Figure 12

LPS 投与後マウスの骨髄 S 期 CFU-preB および CFU-GM 数の変動



The number of CFU-preB cells (A) and CFU-GM cells (B) in S-phase in the BM was evaluated on day 0 (control) and on days 1, 2, 3, 5, and 7 after a single intravenous injection of 5 µg LPS. Each bar represents the mean \pm SE of data from three mice.

10. 文献

1. Broxmeyer HE. Biomolecule-cell interactions and the regulation of myelopoiesis. *Int J Cell Cloning* 1986; 4: 378-405
2. Dexter TM, Spooncer E. Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Annu Rev Cell Biol* 1987; 3: 423-441
3. Dorshkind K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol.* 1990; 8: 111-137
4. Basu S, Hodgson G, Zhang HH, Katz M, Quili C, Dunn AR. "Emergency" granulopoiesis in G-CSF-deficient mice in response to *Candida albicans* infection. *Blood* 2000; 95: 3725-3733
5. Hirai H, Zhang P, Dayaram T, Hetherington DM, Mizuno S, Imanishi J, Akashi K, Tene DG. C/EBP beta is required for 'emergency granulopoiesis'. *Nat. Immunol* 2006; 7: 732-739
6. Nagaoka H, Gonzales-Aseguinolaza G, Tsuji M, Nussenzweig MC. Immunization and infection change the number of recombination activating gene (RAG)-expressing B cell in the periphery by altering immature lymphocyte production. *J Exp Med* 2000; 191: 2113-2120
7. Ueda Y, Yang K, Foster SJ, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression *J Exp Med* 2004; 199: 47-58
8. Ueda Y, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J Exp Med* 2005; 201: 1771-1780
9. Minami A, Tsuboi I, Harada T, Fukumoto T, Hiramoto M, Koshinaga M, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. Inflammatory biomarker, neopterin,

suppresses B lymphopoiesis for possible facilitation of granulocyte responses, which is severely altered in age-related stromal-cell-impaired mice, SCI/SAM. *Exp Biol Med* (Maywood) 2007; 232: 134 -14

10. Dexter TM, Allen TD, Laitha LG. Condition controlling the proliferation of hematopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 1977; 91: 335-344
11. Mori KJ, Fujitake H, Okubo H, Dexter TM, Ito Y. Quantitative development of adherent cell colonies in bone marrow cell culture in vitro. *Exp Hematol* 1979; 7: 171-176
12. Aizawa S, Yaguchi M, Nakano M, Toyama K, Inokuchi S, Imai T, Yasuda M, Nabeshima R, Handa H. Hematopoietic supportive function of human bone marrow stromal cell lines established by a recombinant SV40-adenovirus vector. *Exp Hematol* 1994; 22: 482-487
13. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a PreB-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2305-2309
14. Waskow C, Paul S, Haller C, Gassmann M, Rodewald HR. Viable c-Kit (W/W) mutant reveal pivotal role for c-kit in the maintenance of lymphopoiesis. *Immunity* 2002; 17: 277-288
15. Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, Wignall J, Mochizuki DY, Schmierer A, Mosley B, March CJ, Urdal D, Gillis S. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* 1988; 333: 571-573
16. Lee G, Namen AE, Gillis S, Ellingsworth LR, Kincade PW. Normal B cell precursors responsive to recombinant murine IL-7 and inhibition of IL-7 activity by transforming growth factor-beta. *J Immunol* 1989; 142: 3875-3883

17. Fernandez S, Knopf MA, Shankar G, McGillis JP. Calcitonin gene-related peptide indirectly inhibits IL-7 responses in pre-B cells by induction of IL-6 and TNF-alpha in bone marrow. *Cell Immunol* 2003; 226: 67-77
18. Nicola NA, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 1983; 258: 9017-9023
19. Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y, Ogawa M. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Nat. Acad Sci U S A* 1987; 84: 9035-9039
20. Gough NM, Metcalf D, Gough J, Grail D, Dunn AR. Structure and expression of the mRNA for murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Embo J* 1985; 4: 645-653
21. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987-995
22. Boettcher S, Ziegler P, Schmid MA, Takizawa H, van Rooijen N, Kopf M, Heikenwalder M, Manz MG. Cutting Edge: LPS-induced emergency myelopoiesis depends on TLR4-expressing nonhematopoietic cells. *J Immunol* 2012; 188: 5824-5828
23. Zhang Q, Guo R, Schwarz EM, Boyce B, Xing L. TNF inhibits production of stromal cell-derived factor 1 by bone stromal cells and increases osteoclast precursor mobilization from bone marrow to peripheral blood. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: R32
24. Heinrich MC, Dooley DC, Keeble WW. Transforming growth factor β 1 inhibits

- expression of the gene products for factor and its receptor (c-kit). *Blood* 1995; 85: 1769-1780
25. Wright N, Lain de Lera T, Garcia- Moruja C, Lillo R, Garcia-Sanchez F, Caruz A, Teixido J. Transforming growth factor- β 1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion. *Blood* 2003; 102: 1978-1984
 26. Tang J, Nuccie BL, Ritterman I, Liesveld JL, Abboud CN, Ryan DH. TGF- β down-regulates stromal IL-7 secretion and inhibits proliferation of human B cell precursors. *J Immunol* 1997; 159: 117-125
 27. Dubinett, SM, Huang M, Dhanani S, Wang J, Berozia T. Down-regulation of macrophage transforming growth factor- β messenger RNA expression by IL-7. *J Immunol* 1993; 151: 6670-6680
 28. Hokari T, Tsuboi I, Harada T, Oshima H, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. Mast cell development and biostresses: different stromal responses in bone marrow and spleen after treatment of myeloablater, 5-fluorouracil, and inflammatory stressor, lipopolysaccharide. *Biol Phar Bull* 2011; 34: 1533-1541
 29. Kumagai T, Morimoto K, Saitoh T, Tsuboi I, Aikawa S, Horie T. Age-related changes in myelopoietic response to lipopolysaccharide in senescence-accelerated (SAM) mice. *Mech Ageing Dev* 2000; 112: 153-167
 30. Chorinchath BB, Kong LY, Mao L, McCallum E. Age-associated differences in TNF- α and nitric oxide production in endotoxic mice *J Immunol* 1996; 156: 1525-1530
 31. Tsuboi I, Harada T, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. Age-related decline of mast cell regeneration in senescence-accelerated mice (SAMP1) after

- chemical myeloablation due to senescent stromal cell impairment. *Exp Biol Med* (Maywood) 2012; 237: 1289-1297
32. Tsuboi I, Morimoto K, Hirabayashi Y, Li GX, Aizawa S, Mori KJ, Kanno J, Inoue T. Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: a decrease in interleukin-7 and transforming growth factor- β levels in stromal cells of senescence-accelerated mice. *Exp Biol Med* (Maywood) 2004; 229: 494-502
33. Song X, Krelin Y, Dvorkin T, Bjorkdahl O, Segal S, Dinarello CA, Voronov E, Apte RN. CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumor of IL-1 β -secreting cells. *J Immunol* 2005; 175: 8200-8208
34. Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Morita Y, Eto K, Ema H, Nakauchi H. Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *EMBO J* 2006; 25: 3515-3523
35. Zhang P, Quinton LJ, Gamble L, Bagby GJ, Summer WR, Nelson S. The granulopoietic cytokine response and enhancement of granulopoiesis in mice during endotoxemia. *Shock* 2005; 23: 344-352
36. Cain D, Kondo M, Chen H, Kelso C. Effect of acute and chronic inflammation on B-cell development and differentiation. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 266-277
37. Pronk CJH, Veiby OP, Bryder D, Jacobsen SEW. Tumor necrosis factor restricts hematopoietic stem cell activity in mice: involvement of two distinct receptors. *J Exp Med* 2011; 208: 1563-1570
38. Grigorakaki C, Morceau F, Chateauvieux S, Dicato M, Diederich M. Tumor necrosis factor α -mediated inhibition of erythropoiesis involves

GATA-1/GATA-2 balance impairment and PU.1 over-expression. *Biochem Pharmacol* 2011; 82: 156-166

39. Boettcher S, Gerosa RC, Radpour R, Bauer J, Ampenberger F, Heikenwalder M, Kopf M, Manz MG. Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. *Blood* 2014; 124: 1393-1403
40. Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 290-301

11. 研究業績

滝 雅史

論文

- | | |
|---------|---------|
| 1. 原著論文 | 2 (共 2) |
| 2. 症例報告 | 3 (共 3) |
| 3. 総説 | なし |
| 4. 著書 | 1 (単 1) |
| 5. その他 | 1 (共 1) |

受賞

1. Highlighted paper 2014 selected by editor-in-chief, Biological and pharmaceutical Bulletin

“Lipopolysaccharide Reciprocally Alters the Stromal Cell-Regulated Positive and Negative Balance between Myelopoiesis and B Lymphopoiesis in C57BL/6 Mice Biological and Pharmaceutical Bulletin, 37(12): 1872-81, 2014”

1. 原著論文

- ① Masafumi Taki, Isao Tsuboi, Tomonori Harada , Michiko Naito , Hiroyuki Hara , Tohru Inoue , Shin Aizawa : Lipopolysaccharide Reciprocally Alters the Stromal Cell-Regulated Positive and Negative Balance between Myelopoiesis and B Lymphopoiesis in C57BL/6 Mice Biological & Pharmaceutical Bulletin, 37(12): 1872-81, 2014
- ② 岡本 真由美, 江頭 富士子, 滝 雅史, 中島 裕美, 荻原 典和, 高村 宏, 吉川 彰一, 林 洋一, 石原 寿光 早期糖尿病性多発神経障害の評価における知覚痛覚定量分析装置 Pain Vision PS-2100 の有用性 糖尿病 56(6) : 343-349、2013.

2. 症例報告

- ① 横山 潔, 関根 直樹, 滝 雅史, 大西 雅彦, 中条 徹朗, 西山 竜, 赤井 祐一, 渡辺 俊一, 塩田 滋朗, 山口 俊一, 宇野 昭毅, 上原 毅, 大谷 豪, 荻原 章史, 後藤 伊織, 中島 典子, 小橋 恵津, 岩崎 有良, 荒川 泰行 特異な内視鏡像を呈した Schoenlein-Henoch 紫斑病の一例 日大医学雑誌 63(1) : 30-34、2004.
- ② 滝 雅史, 岡本 真由美, 太田 令, 佐川 知雅子, 江頭 富士子, 山本 敏樹, 大谷 豪, 田中 直英, 林 洋一, 岩崎 有良, 荒川 泰行 劇症 1 型糖尿病の 1 例 日大医学雑誌 66(3) : 304-305、2007.
- ③ 滝 雅史, 岡本 真由美, 佐川 知雅子, 江頭 富士子, 林 洋一 腸重積を合併した劇症 1 型糖尿病の 1 例 Diabetes Frontier 19(5) : 667-673、2008.

3. 総説

なし

4. 著書

- ① 滝雅史 インスリン注射部位の異常と対処法 監修 河盛隆造, 編集 綿田裕孝, 弘世貴久 糖尿病薬物療法 BRUSHUP 日本医事新報社、156-158、2011

5. その他

- ① 滝雅史, 弘世 貴久【インスリン治療 科学的根拠とその実践】多彩化するインスリン製剤を使いこなすための科学的背景は 持効型溶解インスリンとSU薬併用の理論と実際 Diabetes Frontier 20(2): 183-187、2009.