

## 「生体ストレスへの造血応答解析を可能にする造血幹細胞同定法の開発」

東京科学大学 准教授

金山 剛士

### 要旨

造血研究で最も盛んに研究されてきた造血幹細胞 (HSC) はヘテロな細胞集団であり、HSC に特徴的な骨髄再構築能や多能性が低い細胞も含まれている。HSC 画分内の細胞構成は炎症や加齢等の刺激に伴って大きく変化するため、HSC 画分の解析から得られた実験結果が HSC の内在的変容を捉えているのか、細胞構成の変化を反映しているのか判断が困難であった。この問題を解決するため、HSC 画分の中でも幹細胞性の高い休眠 HSC を同定する方法が開発されてきた。古くは薬剤排出能に基づく **side population** の同定、最近では一酸化窒素や細胞内カルシウムの検出などが挙げられる。しかしながら、これらの方法は HSC の培養を必要とするため、培養によって HSC の機能や遺伝子発現、分化段階が変化する可能性を排除できず、定常状態と生体ストレス存在下の比較実験には適さない。シングルセル RNA 発現解析 (scRNA-seq) は休眠 HSC の正確な検出を可能にするものの、RNA 抽出過程で細胞を溶解するため標的細胞の単離が行えず、機能評価による検証が行えないという短所があった。休眠 HSC を培養無しで簡便に同定・単離するために、休眠 HSC 特異的な細胞表面マーカーも複数提案されているものの、生体ストレス存在下での有用性は十分に検証されていなかった。本研究では、定常状態と加齢や炎症時のマウスから HSC を採取し、CITE-seq を用いた細胞表面分子と mRNA の網羅的な発現解析を行うことで、定常状態と生体ストレスの両方で休眠 HSC を正確に同定できる既知の休眠 HSC マーカーは存在しないことを確認した。そこで、培養を必要とせず、加齢や炎症の存在下で従来法より正確な休眠 HSC の識別が可能な、新たな「休眠 HSC を簡便に識別できる手法」の樹立を行った。

### 背景・目的

HSC は全ての血球細胞の源であり、免疫応答や恒常性の維持に寄与している。炎症や加齢などの生体ストレス環境下における HSC の変容を理解することは病態のさらなる理解や造血制御による新規治療法の開発に寄与すると期待できる。しかしながら、現在の同定法によって定義される HSC 分画はヘテロな細胞集団であり、長期の骨髄再構築能を有する HSC (真の HSC) を識別することは出来ない。また、申請者は造血前駆細胞の識別に使用される細胞表面分子 (マーカー) の発現は炎症等の生体ストレスによって変動することを発見し、従来の造血前駆細胞同定法を生体ストレス下の造血応答解析に用いることで実験結果が大きく歪曲するリスクを報告してきた (1)。加齢のような慢性的な炎症では、定常状態で「真の HSC」が多く含まれるとされる CD34 陰性の分画は加齢により増大する一方、その中に含まれる「真の HSC」の割合は減少し、多能性や骨髄再構築能を失った細胞が HSC 分画に増加する (2)。このように、マーカー分子の発現に基づく現在の HSC 同定法は「真の HSC」を正確に捉えておらず、加齢による「真の HSC」の割合変化や「真の HSC」以外の細胞で起こる変容も反映するため、「真の HSC」の内在的な加齢変容を解析できなかった。そこで本研究提案では、将来的な生体ストレス環境下にお

る正確な HSC の内在的変容の検証と、新たな HSC の維持機構の発見を行うための手段を確立するために、HSC の機能的な特徴に基づいて幹細胞性の高い HSC を簡便に同定する新たな手法を開発することを目的とした。

## 方法

申請者は HSC 画分内の細胞における機能的特性の違いによって、ある分子を細胞表面に提示する細胞集団と、提示しない細胞集団に分けられることを見出した（未公表のため詳細は割愛）。細胞表面に提示される分子の有無をフローサイトメトリーで調べることで、培養等の操作なく簡単に HSC 画分内にあるこの2つの細胞集団を単離出来ることから、各細胞集団の幹細胞性（骨髄再構築能、多分化能）を移植実験により調べるとともに、CITE-seq を用いた遺伝子発現と細胞表面分子の網羅的な発現解析によって、休眠性に関連する分子の発現や細胞増殖関連分子の発現を調べた。また、DAPI 染色や BrdU の取り込みを評価することで、実際にそれらの細胞の細胞増殖を調べた。さらに、加齢や炎症といった生体ストレス存在下において、当該分子の識別が休眠 HSC の同定を可能とするか、同様に検証を行った。

## 結果

長期造血幹細胞（LT-HSC : Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>）において、細胞の機能的特性を反映した細胞表面分子（以後当該分子と呼称）が検出できる細胞と出来ない細胞をフローサイトメトリーで比較したところ、当該分子陽性 LT-HSC と比較して当該分子陰性 LT-HSC は CD48 や c-kit の発現が低く、Sca-1 の発現が高く、高い割合で CD34 陰性細胞が含まれていた。この結果から、当該分子陰性の画分には幹細胞性の高い HSC が多く含まれていると推察した。そこで、HSC（Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>）（CD45.2<sup>+</sup>）を当該分子陰性と陽性に分けて単離し、5, 10, あるいは 40 個ずつ 10<sup>5</sup> 個の EGFP 陽性細胞（レスキュー細胞）と混合して放射線照射したレシピエントマウス（CD45.1<sup>+</sup>）に移植した。その結果、当該分子陰性 HSC は陽性 HSC と比較して高い骨髄再構築能を示した（図 1 A）。また、その差は二次移植を行った際にさらに拡大した。特に、当該分子陰性 HSC は HSC 画分を再構築する能力が高かった。以上の結果から、幹細胞性の高い休眠 HSC が当該分子陰性 HSC に多く含まれていると推察できた。これを検証するため、DAPI 染色や BrdU 染色による細胞増殖の評価を行ったところ、当該分子陰性 HSC はほとんど細胞増殖を示さないことが分かった（図 1 B）。以上の結果をさらに裏付けるため、HSC 画分に対する

CITE-seq によって細胞表面分子と遺伝子発現の網羅的な解析を行ったところ、当該分子陰性 HSC は休眠性に関連する既知の分子が高発現しており、逆に増殖や細胞周期に関連する分子はほとんど発現していないことが示された。このように、HSC の機能を反映した当該分子を指標として簡便に休眠 HSC を識別する方法

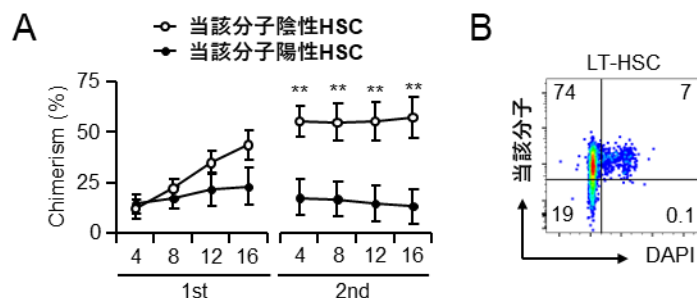


図 1 HSC の幹細胞性と増殖性

- A) 当該分子陰性、あるいは当該分子陽性の HSC (10 個) を、EGFP 陽性骨髄細胞（レスキュー細胞、10<sup>5</sup> 個）とともに放射線照射したレシピエントマウス（CD45.1 陽性）に移植し、血液細胞におけるキメリズムを評価。  
B) DAPI 染色による HSC の増殖活性の評価。

を樹立した。

以上の結果は定常状態における解析から得たものであった。そこで次に、加齢や敗血症といった生体ストレス存在下でも、当該分子に基づく休眠 HSC の識別が可能か CITE-seq を用いて調べた。その結果、加齢や敗血症においても HSC 画分内における当該分子の非検出は細胞増殖活性の低い細胞集団の正確な指標となっていることを確認できた。また、CITE-seq を用いた解析から、当該分子の識別は既知のマーカーと比べて休眠 HSC の指標として高い正確性を有していることが示された。実際に、加齢マウスやリポポリサッカライド投与後 24 時間のマウスから当該分子陰性と陽性の HSC を単離しレシピエントマウスに移植したところ、定常状態と同様に当該分子陰性 HSC が、高い骨髄再構築能や多能性を示すことが確認された。

## 考察

本研究では新たな指標に基づいた休眠 HSC の同定法を開発した。この方法は、既存の方法と比較して培養を必要とせず簡便であり、加齢や炎症といった生体ストレス存在下でも信頼性が高いという優位性を有している。新手法は一つの分子の発現に依存せず、HSC の機能的な特徴に基づいて識別するという点で、過去に報告された休眠 HSC マーカーとは一線を画し、生体ストレスに伴う偶発的な遺伝子発現の変化の影響を受けにくいと考えられる。本研究成果は、将来的なストレス造血研究の正確性を向上させ、新たな発見につながる可能性がある。この新たな手法を用いて既存の方法では同定できなかった新たな HSC の機能制御因子やメカニズムの発見を行うことで、本研究手法の血液学・幹細胞生物学における有用性を証明することが望まれる。

## 共同研究者

1. 泉 湧太 (東京医科歯科大学 博士課程・学生 (当時))
2. 山田 悠貴 (東京科学大学 修士課程・学生 (当時))
3. 荒川 聡子 (東京科学大学 バイオサイエンスセンター・教授)
4. 岩間 厚志 (東京大学 医科学研究所・教授)
5. 樗木 俊聡 (東京科学大学 生体防御学分野・教授)

## 引用論文

- [1] Kanayama M, Izumi Y, Yamauchi Y, et al. CD86-based analysis enables observation of bona fide hematopoietic responses *Blood*. 2020, 136:1144-1154
- [2] Yamamoto R, Wilkinson AC, Oebara J, et al. Large-Scale Clonal Analysis Resolves Aging of the Mouse Hematopoietic Stem Cell Compartment. *Cell Stem Cell*. 2018, 22:600-607

## 助成研究に関連した発表論文

該当なし