

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09906

研究課題名(和文) 高感度シングルセル解析を用いたヒト造血幹細胞分画の層別化

研究課題名(英文) Exhaustive fractionation of human HSCs by high-sensitive single cell analysis

研究代表者

森 康雄 (Mori, Yasuo)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90573345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1) ヒト造血幹細胞(hematopoietic stem cell: HSC)分画の一部に補体制御分子であるCD35の発現を認める亜分画が存在する 2) 定常状態においてCD35+HSCとCD35-HSCの遺伝子発現パターンや増殖・分化能は同等である 3) 補体系が活性化するストレス造血環境下(骨髄移植や化学療法後など)では、CD35+HSCはCD35-HSCに比して活性化した補体系の影響を受けず、生存が担保され増殖優位性を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト造血幹細胞(HSC)分画は未だ不均一な細胞集団であり、その中に補体制御分子であるCD35を発現する機能的なHSC亜分画を同定し得た。階層的な正常造血システムの理解が一層進むことが期待される。さらに適切な補体制御技術が確立されれば、造血幹細胞移植後の生着不全を回避し、その臨床成績向上に寄与する可能性がある。さらに、白血病の治療抵抗性・再発にはHSCをカウンターパートとして存在する「白血病幹細胞」の重要性が示されており、白血病幹細胞においてCD35発現が認められ治療抵抗性に寄与しているとするれば、その制御により難治性白血病の新規治療法開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that i) human hematopoietic stem cell (HSC) population contained a subfraction which expressed CD35, an inhibitory molecule of complementary system, ii) CD35+ and CD35- HSCs were comparable in their gene expression pattern and potential about proliferation or lineage differentiation at the steady state, and that iii) CD35+HSCs preferentially survived and proliferated under the stress hematopoiesis (e.g., xenotransplantation and chemotherapies) by escaping the attack of complementary cascade.

研究分野：血液学

キーワード：造血幹細胞 補体制御因子 層別化 ストレス造血

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 自己複製能と多分化能を有する造血幹細胞 (hematopoietic stem cell: HSC)は、生涯にわたり成熟血球を供給し、生体の恒常性維持に極めて重要な役割を担っている。我々はマウス及びヒト造血系において、HSCと成熟血球の中間に存在する common lymphoid progenitor (CLP)、common myeloid progenitor (CMP) granulocyte/macrophage progenitor (GMP)、megakaryocyte (MegK)/erythrocyte progenitor (MEP)などの系統特異的前駆細胞をマルチカラーFACS技術で純化し、pureな細胞群を用いた機能解析により系統決定メカニズム・分化制御機構を明らかにしてきた(Cell 91, 661-72, 1997; Nature 404, 193-7, 2000; PNAS 99, 11872-7, 2002)。
- (2) HSCからCMP/CLPを経てGMP/MEPへと段階的にlineage potentialを失う形で系統特異的前駆細胞が分化してくる造血モデルは世界標準として認知され、その後の正常造血・造血器悪性腫瘍研究のツールとして広く用いられてきた。しかしながら近年、従来のモデルとは異なる分化様式(上流のHSCやmulti-potent progenitor (MPP)分画内に亜集団として存在する系統特異的前駆細胞から直接分化)の報告が相次いでいる。マウスHSC分画のなかに、強力なMegKポテンシャルを有するMegK-biased HSC (Nature 502, 232-36, 2013)やMegK-committed progenitor with long-term repopulating capacity (Cell 154, 1112-26, 2013)が存在することが示され、シングルセル遺伝子発現解析により、マウスmyeloid progenitor分画は複数の系統特異的前駆細胞の集合である可能性が示唆された(Cell 163, 1663-77, 2015)。我々も、マウスHSC/MPP分画中に存在するCD41陽性細胞が、従来のCMPより上流に存在する骨髓球系にコミットした亜集団であることを明らかにしている(Stem Cells 33, 976-87, 2015)。ヒト造血系においても、成体骨髓ではMPP段階で赤芽球系にコミットした前駆細胞が存在することが示された(Science 351, aab2116, 2016)。しかしながら、ヒトHSC分画中に同様の亜集団が存在するかは十分に解析されていなかった。
- (3) ヒトHSCが濃縮されるCD34+CD38-分画を用いて表面抗原発現を網羅的に解析すると、HSCの一部に発現を認める分子(CD35)が見出だされ、HSC分画をさらに層別化し得る可能性が示唆された。

2. 研究の目的

血球分化モデルの最上流に位置し多分化能を有すると考えられていたHSC/MPP分画が、特定の系統に運命付けられた前駆細胞を含む機能的に不均一な細胞集団であることを示唆する結果がマウスを中心に集積しつつあるなかで、本研究では、新規高感度シングルセル遺伝子発現解析とマルチカラーFACS技術を用いて「ヒトHSC分画の層別化」(HSC内に存在する最上流の系統特異的前駆細胞の同定 true HSCの濃縮)を行うことを目的とし、将来的には、造血分化モデルを再構築し、ヒト正常造血・造血器悪性腫瘍研究の新たなツールとして利用するための基盤整備を目指した。

3. 研究の方法

健常者骨髓・臍帯血よりマルチカラーFACSでソーティングしたHSC分画を用いて、Fluidigm C1/Biomark systemでのシングルセル遺伝子発現解析を行う。「HSC分画内の一部細胞での発現」が再現性を持って確認できた遺伝子のうち、細胞表面抗原をpick-upしてその蛋白発現をFACSで確認し、HSC分画内に存在すると想定される機能的に均一な前駆細胞集団を絞り込む。HSC分画内の亜集団として系統特異的前駆細胞を分離することができれば、自明ながらそれらを除くことで、多分化能と自己複製能を残す“true HSC”の濃縮につながる。

絞り込んだHSC分画内亜集団を、全ての細胞系列に分化可能な条件下で培養し、lineage-readoutを確認する。幹細胞性の評価としてStemness関連遺伝子解析や細胞周期解析を実施する。in vivoでの造血再構築能・分化能は免疫不全マウスへの異種移植実験(継代移植を含む)で評価する。

HSC分画内に系統特異的前駆細胞(unipotent/oligopotent progenitor)を同定し得た場合には、これまでにHSCの下流に同定してきたオリジナルの骨髓球系/リンパ球系前駆細胞群(CMP/GMP/MEP/CLP)との関係性を明らかにする。また転写因子やシグナル伝達分子の発現に着目し、系統決定メカニズムを推定する。最終的には今回得られた知見を併せて、新規造血分化モデルを提唱する。

4. 研究成果

ヒト健常骨髄および臍帯血を解析すると、CD34+CD38-CD90+のHSC分画のおよそ20-30%にCD35が発現していることが確認された(図1左)。CD35はMEP分画で高発現していることが既に報告されており、我々の解析でも同様の結果が再現された(図1右)。

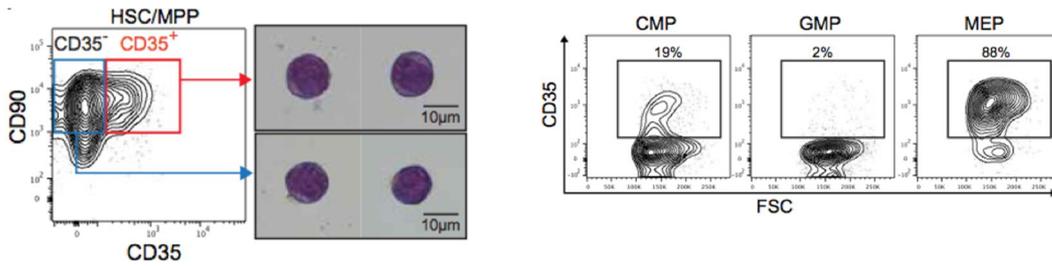
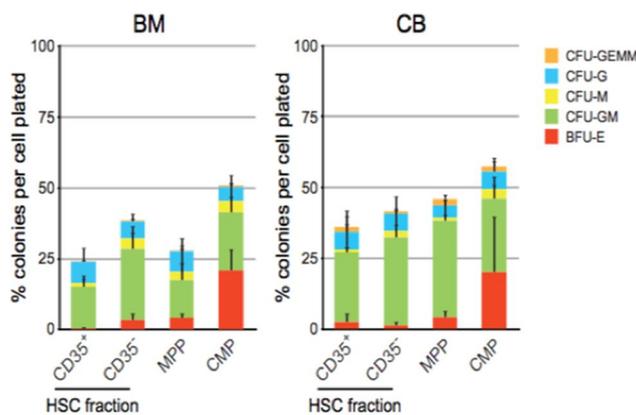


図1 造血幹・前駆細胞におけるCD35発現

HSC分画内に存在するCD35陽性亜分画が既にMEPにコミットした細胞集団である可能性を想定し、CD35+HSCおよびCD35-HSCを用いてin vitroでの分化能を比較検討した。全ての系統に分化可能なサイトカイン条件下で単細胞コロニーアッセイをおこなうと、両者はともに全ての骨髄球系細胞を含むCFU-Mixをはじめとする種々のコロニーを形成し、予想に反して巨核球・赤芽球への限定的な分化能は示されなかった(図2)。

図2 HSC亜分画のin vitro分化能



短期間の液体培養の結果、CD35+HSCからCD35-HSCへと一方向性の分化が確認され、造血ヒエラルキーにおいてCD35+HSCはCD35-HSCより上流に存在することが示唆された。遺伝子発現解析では、細胞周期制御に関連したCCND2, CDK4/6, E2F1などの発現がCD35+HSCで低下しており、実際に細胞分裂に要する時間もCD35+HSCで有意に長いことから、CD35はdormantなHSCを規定するマーカーであることが示された。

次いで、HSC亜分画のin vivo分化能を評価した。ヒト臍帯血由来のCD35+/-HSC分画をそれぞれ500細胞sortし、放射線照射後のNSGマウスに移植した。移植後12週、20週で評価するとCD35+HSCで有意に高いヒト造血の再構築能が確認された。加えて、CD35+HSCのみが継代移植の能力を有していたことから、ストレス環境下ではCD35+HSC分画が造血の主役を担うことが示唆された。

CD35(complement receptor type 1)はC3b/C4bの受容体であり、補体カスケードのnegative regulatorとして知られている。そこでHSCの細胞表面上に発現しているCD35が補体制御機能を発揮しているかに関し、解析を進めた。ヒト血清で刺激すると、CD35-HSCにはC3b沈着が確認されたが、CD35+HSCでは認めなかった。この効果はCD35阻害抗体や可溶性CD35の添加によりキャンセルされた(図3)。

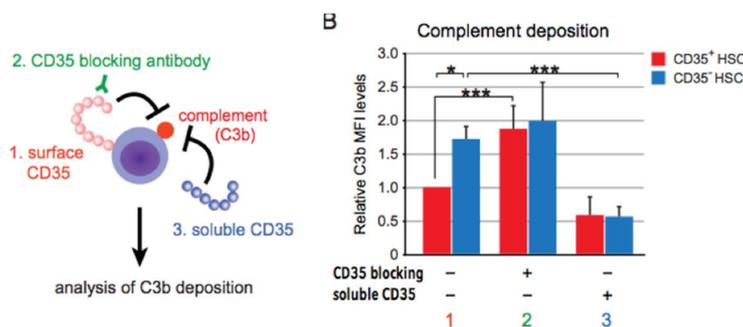
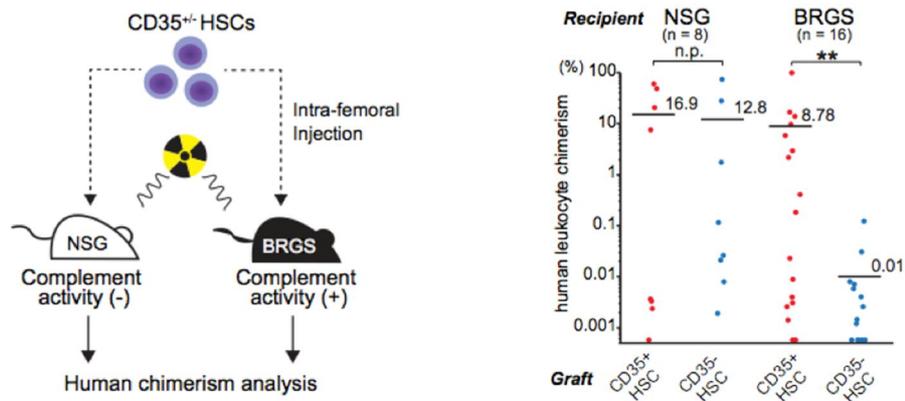


図3 ヒトHSC細胞表面上に発現するCD35のin vitro補体制御能

in vivoでの補体制御活性を明らかにするため、これまでの実験に用いたNSGマウス(補体系欠

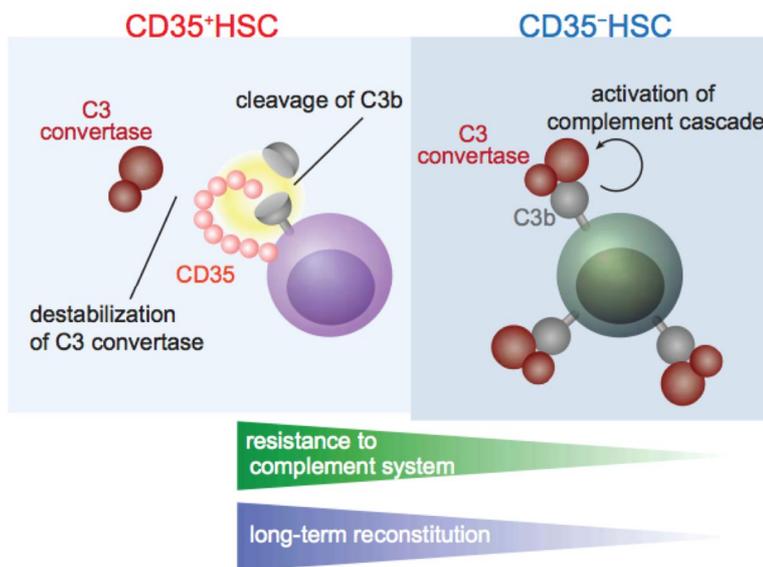
損)に加えて、BRGS マウス (補体系維持) をレシピエントとして同様の異種移植を実施した。NSG マウスを用いると CD35+HSC、CD35-HSC の両者がヒト造血を再構築可能であるのに対し、BRGS マウスを用いると、CD35+HSC のみがヒト造血を再構築可能であった(図 4)。

図 4 ヒト HSC 細胞表面に発現する CD35 の in vivo 補体制御能



本研究により、ヒト HSC 分画は依然として不均一な細胞集団であり CD35 発現による層別化が可能であることが明らかとなった。CD35+HSC は、i)分化のより上流に位置して定常状態では dormancy を維持している ii)ストレス環境下では活性化した補体系からの逃避機構により、生存・増殖優位性が担保される という生物学的特性を有していることが示された(図 5)。

図 5 CD35+HSC の生物学的特性



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 次郎丸 高志
2. 発表標題 機能的意義を有する新規ヒト造血幹細胞分画の同定
3. 学会等名 第80回日本血液学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----