

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06729

研究課題名(和文)両生類の肝臓・脾臓・骨髄における造血幹細胞の分布と血球産生調節に関する研究

研究課題名(英文) Regulation of amphibian hematopoiesis: the distribution of hematopoietic stem cells in the liver, spleen, and bone marrow.

研究代表者

加藤 尚志 (Kato, Takashi)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授

研究者番号：80350388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：無尾両生類ツメガエル(ゼノパス)の成体は、肝臓は赤血球、白血球、栓球(哺乳類の血小板の機能を担う細胞)の全てを、脾臓や骨髄では主に栓球、白血球を産生する。この違いは、各々の造血器に含まれる造血幹前駆細胞(HSPC)の性質あるいは組織環境の違いによる可能性があり、まず本研究ではツメガエルの肝臓に含まれるHSPC候補となる細胞群の分離方法を検討した。そして肝臓に僅かに含まれるHSPC候補を含む細胞集団を得た。このHSPC候補細胞集団の遺伝子発現が他の細胞集団とは異なることを認めた。今後、ヒトやマウスで報告された幹細胞性を示す遺伝子との照合を詳細に進めることが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ノーベル賞受賞者のクロー博士が100年前に比較生物学の重要性を提唱したように、ヒトやマウスでは隠れている仕組みは、ショウジョウバエや酵母などのモデル動物における研究から新たな生命原理を明らかにされてきた。本課題は動物の生存と恒常性の維持に関わる末梢血球数調節を扱うことから、得られた成果が基礎生物学の新知見になるだけでなく、新規創薬標的の発見を通じたヒトの疾患治療への応用に展開する可能性をもつ。

研究成果の概要(英文)：In the adult anuran *Xenopus*, the liver produces all types of blood cells, including red blood cells, white blood cells, and thrombocytes, and the spleen and bone marrow dominantly produce thrombocytes and white blood cells, respectively. This difference may be due to differences in the cell properties of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC) contained in each hematopoietic organ or the tissue environment. In this study, we first developed the purification process of HSPC candidate cells contained in the liver of clawed frogs. We obtained a cell population containing HSPC candidates contained in small amounts in the liver. The gene expression profile of this HSPC candidate cell population is different from that of other cell sub-populations. This result should enable us to proceed in detail with genes indicating stem cellularity reported in humans and mice.

研究分野：分子生理学, 実験血液学

キーワード：造血 血球 両生類 造血幹細胞 造血因子 フローサイトメトリー アフリカツメガエル RNA-seq

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物は、組織の構成細胞の寿命が尽きると、組織幹細胞から増殖・分化した細胞が交代する。この動的平衡により、組織・器官の形態と機能が維持される。しかし末梢血球には寿命がある。多分化能と自己複製能をもつ造血幹前駆細胞(HSPC; Hematopoietic Stem and Progenitor Cell)に分類される未熟な細胞から血球は増殖・分化して成熟血球が造られ、末梢循環に供給される(造血)。こうして末梢血球数は健康であれば恒常的に維持される。

驚くべきことにヒトでは全細胞数の90%近くが血球であり(Senderら, PLoS Biol, 2016), 造血は非常にダイナミックな仕組みといえる。HSPCは血球産生臓器(造血器, 造血巣)の微細組織環境(ニッチ)に囲まれて静止状態にある。造血刺激を受けるとHSPCは自己複製しつつ増殖・分化して全ての血球を生む

(Morrisonら, Nature, 2014; Eaves, Blood, 2015)。成長に伴いHSPCは臓器間を移動し、造血器が変わる。例えばヒトの造血は胎生期に卵黄嚢から始まり、肝臓、脾臓に変わり、出生後に骨髄に移行する(図1)。造血担当臓器は動物種毎に異なる。例えばアフリカツメガエル成体では肝臓、脾臓、骨髄(図2)、ゼブラフィッシュやメダカの成魚では腎臓が造血器である。成長とともに造血器が変わりHSPCが組織を選択する、あるいは臓器が造血機能を失う機構や、HSPCの造血器移行の機序は不明であり、生命の根源的な謎がある。これが本研究の第一の問いである。

血球の増殖・分化には細胞内外の造血因子、転写因子、非翻訳RNAに関わるが、未分化細胞を特定の血球系譜へ誘導する組織の特性には不明な点が多い。最近、iPS細胞から血球を生産する培養系が開発され、研究代表者らも皮膚細胞由来の赤血球産生に成功した(Hiroseら, Stem Cell Rep, 2013)。こうした応用では高効率な細胞分化誘導が必要になる。特定の血球系譜へ造血能を偏向させる仕組みは、本研究の底流にある第二の問いである。

ノーベル賞受賞者のクロー博士は100年前に比較生物学(Krogh, Science, 1899)の重要性を提唱した。ヒトやマウスでは隠れている仕組みを他のモデル動物で発見する機会がある。実際に線虫、酵母、ショウジョウバエ等から高等生物と共通する多くの生命原理が発見された。造血研究の現状では、第一の問い、第二の問いに対して最も研究が進むマウスモデルを選択する研究者は多い。もしマウスなどの確立されたモデル動物から離れば、現代生物学で求められる精緻な実験手段の調達は困難を極める。しかし本研究代表者らは他に追従されないツメガエルの血球実験系を整備してきた。この技術基盤を活用する比較生物学的な新たなアプローチから、造血器を異にする血球分化において、血球系譜の偏向性をもたらす素因が各造血器に分布するHSPCの性質の違いに依存するかどうか、現在までに答えが得られていない。

研究代表者らが1994年に発見した血小板産生因子トロンボポエチン(TPO)は、その受容体分子MPLを発現する巨核球に作用し、血小板産生を刺激する(図6)。TPO発見の後、MPLはヒトやマウスのHSPCにも発現していることが分かり、今日、再生医療や移植医療の場でHSPC

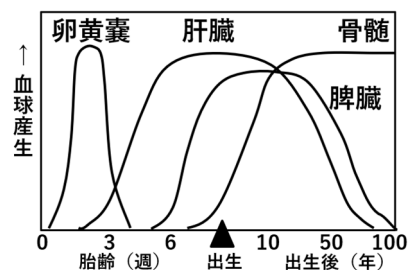


図1 ヒトの出生前後の造血器の遷移

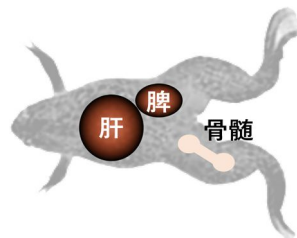


図2 アフリカツメガエル成体の造血器の分布 (肝臓, 脾臓, 骨髄)

の増幅に TPO が利用されるようになった。TPO-MPL 系が HSPC に強力に作用することは全く想定外であり、TPO の発見者として、これが脊椎動物全般に共通するのか、造血制御系の普遍性と多様性の視点から興味が生まれた（加藤，化学と生物，2018；加藤，臨床血液，2019）。

南極のコオリウオとウナギの幼生を除き，7 万種を超える脊椎動物は全て赤血球をもつ。このことに着目し，比較生物学的アプローチによる血球・造血の研究は，動物の多様性と普遍性への理解をもたらす格好の題材である，と研究代表者は考えた。しかし最近までマウス以外の動物の造血研究は遺伝子改変技術や利用可能なゲノム情報，抗体等が乏しくて困難であった。例外は早くから全ゲノム情報が公開された小型魚類ゼブラフィッシュによる疾患モデル研究であり，魚類でもヒト血液疾患が再現され，脊椎動物の

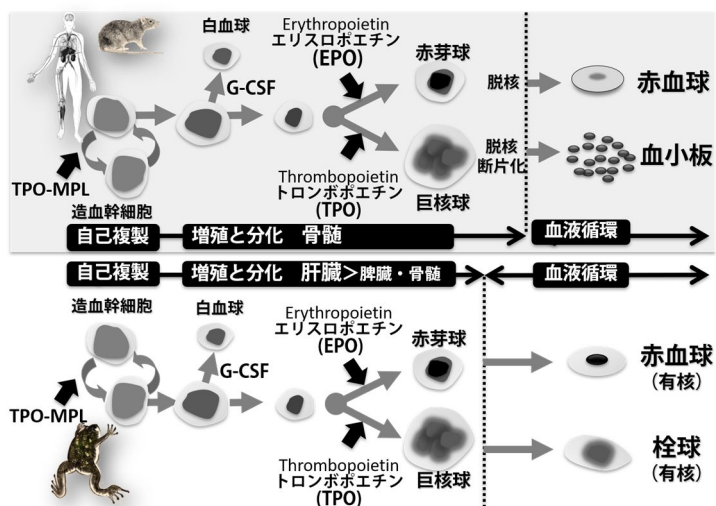


図 6 哺乳類とツメガエルの造血の比較

ヒト成人では骨髄が造血器であるが，ツメガエルでは肝臓，脾臓，骨髄が造血器であり，赤血球産生が優勢な肝造血の規模が最大である。下段に示す両生類の赤血球と栓球（血小板に相当）は脱核せず，有核である。造血因子の EPO，TPO，G-CSF は，各々赤血球，栓球（血小板），白血球（顆粒球）を造る。TPO 受容体の MPL は，巨核球と HSC に発現する。

造血制御系の普遍的要素が示された（Zon, Dis Model Mech, 2016）。これに続いて研究代表者らはアフリカツメガエルとネッタイツメガエルの新規造血解析モデルの確立を目指して，10 余年，取組みを続け，採血・血算，血球鑑別，主要造血因子やその受容体の同定と組換え蛋白質の調製，それらを抗原とした抗体の作出などの実験手段を整備した。その結果，図 6 に示す造血の概観を得るに至り，従来のマウスモデルでは困難であった造血生理や造血発生の課題に挑戦する準備が整った（加藤尚志，臨床血液，2017）。最近では基礎生物学，ヒト臨床の両方から注目されている。哺乳類（図 1）とは異なり，アフリカツメガエル成体の造血器は一個体のなかで肝臓，脾臓，骨髄の複数に分散している（図 2）。興味深いことに造血器によって血球産生能に差異が認められ，各々赤血球，栓球，白血球の産生が優勢である。このような特性をもつ動物モデルはこれまでに報告されておらず，血液学の新たな課題の一つ，血球分化能の偏向性（Biased hematopoiesis）の機序の解明に繋がると考えた。

ヒトやマウスの HSPC や組織微小環境に関する研究は多数あるが，比較生物学的視点で現代生物学の水準に達する造血研究は僅かである。哺乳類以外ではゼブラフィッシュの造血研究の進展が著しく，素晴らしい成果を生み出している（Orkine と Zon, Cell, 2008）。しかし熱帯性で個体が小型であるため，造血生理解析に制約がある。また，ツメガエルの他には一個体内に複数の造血器を同時にもち四肢動物の解析例はない。本研究の課題遂行の過程で，ノーベル賞を受賞されたガードン博士のアフリカツメガエル細胞の初期化の研究概念を礎にして，組織幹細胞，特に造血幹細胞（HSPC）の分離・純化法を両生類で初めて確立することができれば，基礎生物学上の新たな展開の端緒となるのは間違いのない。

2. 研究の目的

両生類ツメガエルの血球産生（造血）は肝臓，脾臓，骨髄が担い，各々の造血器に，多分化能と自己複製能をもち，全血球の源となる造血幹前駆細胞（HSPC）が存在する。しかし各々の造血

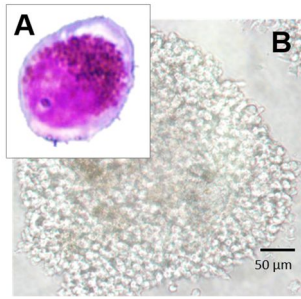


図3 アフリカツメガエル肝臓の MPL+T12-FSC^{low} 細胞。

A)細胞質は乏しく、殆どを核(濃色部)が占め、極めて未分化な細胞染色像。
B)TPO存在下で未分化のまま6か月以上増幅を続けた。

器から出現する血球種に偏りがあり、肝臓は赤血球、脾臓は栓球(哺乳類の血小板に相当)、骨髄は白血球の産生が優勢である。本研究はHSPCの局在や性質と、HSPCを囲む組織環境を比較し、血球分化能の偏向性(Biased hematopoiesis)が生じる仕組みを明らかにする。主な取り組みは次の3点である。

a) ツメガエル HSPC とそのサブセットの存在を明らかにし、両生類で初めて純化法を確立する。

b) ツメガエル HSPC とサブセットの多分化能と自己複製能を検証する。そのために in vitro のコロニー形成法と、in vivo の発生胚 HSPC 移植、他家/自家 HSPC 移植法による解析を可能にする細胞集団の分離を確立する。

c)肝臓、脾臓、骨髄における HSPC サブセット毎の存在量比や発現分子を比較する。また HSPC、血球前駆細胞、成熟血球の組織構造上の位置について形態観察する。これら HSPC 細胞内・外の解析から血球分化能の偏向性の素因を探索する。

3. 研究の方法

【動物の選択】 まずアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の HSC の性状解析を進めた。アフリカツメガエルの全ゲノム情報 (Session ら, Nature 2016) は利用可能だが、異質 4 倍体ゲノムをもつため遺伝子改変モデル評価のリスクになる可能性がある。対策として、性成熟期間が短く、全ゲノム情報が公開されてゲノム編集例が増えつつある 2 倍体ゲノム生物のネットイツメガエル (*X. tropicalis*) をナショナル・パイオリソース・プロジェクト (NBRP ネットイツメガエル; 広島大 両生類研究センター 代表: 荻野肇教授) から分与して頂き、解析を並行することも選択肢に加えた。

【HSPC の同定と純化と HSPC のサブセットの分画】

アフリカツメガエル成体の造血器のうち、本研究期間では肝臓から HSPC 候補となる細胞集団の純化方法を確立した。肝臓から単細胞分散操作後に得た細胞懸濁液をパーコル不連続密度勾配遠心法によって複数の細胞画分を得た。分離した細胞について、塗抹細胞遠心法による細胞標本作製し、メイグリュンワルド・ギムザ (MGG) 染色を施し、細胞形態を観察、記録した。これらをさらにフローサイトメーター (FACS Aria III) で分離した。両生類においては、血球認識抗体の入手は極めて困難であるため、細胞標識手段の選択肢は現局されてしまうが、予備検討の結果、研究代表者らが樹立した 2 種の抗体、すなわち栓球産生因子トロンボポエチン (TPO) の受容体 MPL 認識抗体 (未発表) と、球認識抗体 (T12 抗体; Tanizaki ら, Exp Hematol 2015) を利用することにした。これらの抗体を蛍光標識してフローサイトメーターで得られる直方散乱光 (FSC) と側方散乱光 (SSC) を分離パラメータとして利用した。また分画した細胞について、MGG 染色像による細胞形態の比較を実施した。

HSPC は極めて未熟な細胞であるが、その未分化性にも階層があり、分化段階の幅による不均一性がある。つまり分化能が少しずつ異なる HSPC のサブセットが存在することを想定した。そこで第 2 年度半ばより、HSC サブセットの精緻な純化に資する抗体作出を進めるために、当初は HSPC 候補細胞の膜画分を調製し、ショットガン・プロテオミクス (Nagasawa ら, Biol Open, 2013) を実施すして、細胞集団を識別する新たな細胞膜マーカーの探索を予定し

た。しかし本研究課題の進捗とともに、シングルセルRNA-SeqあるいはバルクRNA-Seqの技術進歩が著しくなり、エンリッチメント解析となるプロテオミクスの利用から転じて、鹿島誠博士、平田晋三博士（青山学院大学）の研究協力を得て、RNA-Seqの利用へ転換することにした。このため技術に適合させるために、あらためて抗体と散乱光によるフローサイトメトリーの最適化に注力した。この点は当初の計画からの大きな変更点であり、本研究課題として大きな収穫を得た。

【純化したHSPC候補細胞の多分化能と自己複製能の検証法】

上記で分画した細胞の自己複製能と多分化能について、*in vitro*培養実験で検証する計画を立てた。*in vitro*コロニー形成法では、分化因子として既に調製した遺伝子組換え主要造血因子（エリスロポエチン（EPO）、TPO、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF））の添加培養を行い、HSC由来のコロニーの出現と、それらの構成細胞内の分化血球の種類を計測する（図4）。この実験で必要となるツメガエル造血因子の組換え体を動物細胞（HEK293細胞）で発現させるなどの準備を進めた。しかしコロニー形成実験の試験に足る十分な細胞数を得ることが困難である等の理由により、本研究期間内においては部分的な展開にとどまった。

4. 研究成果

本研究期間までに得られたアフリカツメガエル肝臓由来造血幹前駆細胞（HSPC）の候補細胞を図5に示す。MPL陽性かつT12陰性の細胞のうちFSCが高い細胞群を除いた細胞画分、すなわちT12-MPL⁺FSC low細胞は細胞形態から最も幹細胞性を有する可能性があった。また各々の細胞画分についてバルクRNA-seqへ展開した。特に肝臓、骨髄のHSPCを対象とするRNA-seqを不安なく実施するため、肝臓、骨髄、脾臓の各々の臓器からビーズ破碎装置を使って高品質なmRNAを高い回収量で調製するプロトコルを確立した。RNA-seqで得られた発現遺伝子情報について、ヒトやマウスで報告されている幹細胞性の発現遺伝子と照合し、遺伝子オントロジー（GO）解析を実施した。その詳細は現時点で本稿に記載できないが、T12-MPL⁺FSC low細胞のDEGs（他の細胞画分に比べて特異性を認める発現変動遺伝子群）の中に、ヒトやマウスのHSPCで共通して発現する遺伝子を見出した。これらの結果を踏まえて、今後、前項に示した造血因子添加細胞培養実験によって、経時的な遺伝子発現の変化を解析することを含め、幹細胞性の検証を進める。さらに本実験で確立した細胞分画法を脾臓、骨髄へ適用して、各々の造血器に存在するHSPCの性状を比較することが可能になった。

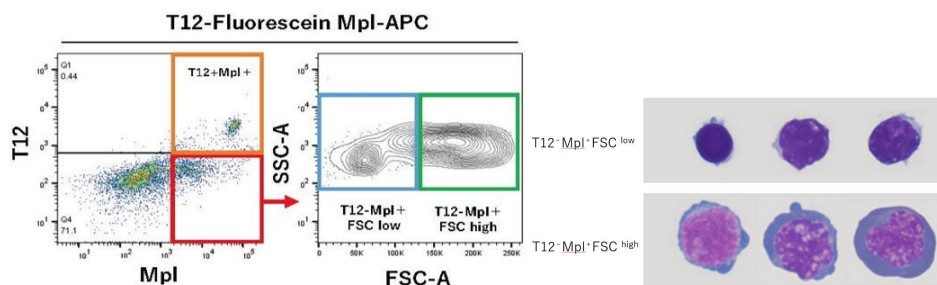


図5 粒球系細胞(T12+MPL+)と重複しないT12陰性・MPL陽性の細胞画分をさらにFSCの大きさを2つの画分に分割した。それぞれの細胞形態を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada Kondo Shiori, Ogawa Ayame, Fukunaga Miku, Izutsu Yumi, Kato Takashi, Ma?no Mitsugu	4. 巻 64
2. 論文標題 A<i>myeloperoxidase</i>enhancer drives myeloid cell specific labeling in a transgenic frog line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 362 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiyama Shingo, Okui Takehito, Kato Takashi	4. 巻 65
2. 論文標題 Detection of hypoxia in the pulmonary tissues of <i>Xenopus laevis</i> over repeated dives	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 94 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12837	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊東 正剛, 加藤 尚志
2. 発表標題 両生類における造血の多臓器分担と環境応答
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会シンポジウム [1S08a-04] 生体を造り、支え、そして歪ませる造血システム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤尚志, 小俣和輝, 小川斐女
2. 発表標題 腎臓と造血の関係における普遍性と多様性
3. 学会等名 日本腎臓学会 特別連続企画 <腎生2131;100年を目指して> (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小俣和輝, 末森みなみ, 田中俊丞, 野村一騎, 加藤尚志
2. 発表標題 フローサイトメトリーによるネッタイツメガエル幼生および成体の赤血球前駆細胞の分画
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第74回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田隆太郎, 田鍋未樹, 福永実久, 加藤尚志, 前野貢
2. 発表標題 アフリカツメガエル幼生肝皮質に出現する骨髓球の性状
3. 学会等名 第92回日本動物学会大会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤太一, 小俣和輝, 小川斐女, 伊東正剛, 加藤尚志
2. 発表標題 Proteomic changes in erythrocyte membrane proteins of the African clawed frog (<i>Xenopus laevis</i>) at low temperatures.
3. 学会等名 第92回日本動物学会大会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Kato
2. 発表標題 Megakaryocytes and thrombocytes: evolutionary and physiological perspectives through animal models.
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小塩未侑, 小俣和輝, 小川斐女, 加藤尚志
2. 発表標題 ツメガエル末梢栓球における糖蛋白質GPIIbとGPIb の遺伝子発現
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第73回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayame Ogawa, Ryo Yamagishi, Takeru Matsumoto, Satoshi Ansai, Kiyoshi Naruse, Takashi Kato.
2. 発表標題 The Expression and Role of Multiple Forms of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Medaka Fish
3. 学会等名 62nd Annual Meeting of the American Society of Hematology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐久間瑞穂, 小川斐女, 加藤尚志
2. 発表標題 抗体によるツメガエル栓球濃縮法の検討
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第75回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村山勘吉, 白水開, 塩川雅貴, 加藤尚志
2. 発表標題 密度勾配遠心法によるアフリカツメガエル肝臓のトロンボポエチン応答性細胞の分離
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第75回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小塩未侑, 小俣和輝, 塩川雅貴, 白水開, 村山勘吉, 加藤尚志
2. 発表標題 両生類におけるトロンボポエチン受容体発現細胞の増殖と分化の評価
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小俣和輝, 加藤尚志
2. 発表標題 Change in erythroid precursor mass through liver reconstruction of <i>Xenopus tropicalis</i> .
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊東正剛, 小川斐女, 斉藤友幸, 谷ヶ崎博, 森岡一朗, 加藤尚志
2. 発表標題 An unique animal model to study metabolic properties of bone marrow responding to cold exposure
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊東正剛, 谷ヶ崎博, 森岡一朗, 鹿島誠, 平田晋三, 加藤尚志
2. 発表標題 RNA-Seqに向けたアフリカツメガエル大腿骨のRNA抽出方法の確立
3. 学会等名 第93回日本動物学会早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小俣和輝, 小塩未侑, 鹿島誠, 平田普三, 加藤尚志
2. 発表標題 エリスロポエチン刺激によるツメガエル成熟赤血球の核形態の変化
3. 学会等名 第93回日本動物学会早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末森みなみ, 小俣和輝, 白水開, 加藤尚志
2. 発表標題 ネットイツメガエルの変態前後肝実質細胞における造血関連遺伝子の発現
3. 学会等名 第93回日本動物学会早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅沼彬人, 田鍋未樹, 上田隆太郎, 小川斐女, 加藤尚志, 前野貢
2. 発表標題 アフリカツメガエル幼生肝皮質に局在する骨髓球の単離と解析
3. 学会等名 第93回日本動物学会早稲田大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Takashi kato	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 1174
3. 書名 Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research (Chapter 40)	

1. 著者名 加藤尚志 (分担)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 772
3. 書名 動物の事典 (血液, 第6章 動物の生理)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>早稲田大学分子生理学研究室 加藤尚志研究室 http://www.f.waseda.jp/tkato/index.html 早稲田大学分子生理学研究室 加藤尚志研究室 http://www.f.waseda.jp/tkato/</p>

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
研究 分 担 者	前野 貢 (Maeno Mitsugu) (10190315)	新潟大学・自然科学系・教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------