

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02953

研究課題名(和文) 周産期前後における骨髄造血開始のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism underlying initiation of bone marrow hematopoiesis in neonate

研究代表者

滝澤 仁 (Takizawa, Hitoshi)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授

研究者番号：10630866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：造血システムを維持する造血幹細胞は発生初期には様々な造血組織を横断的に移動しながら自己複製分裂を繰り返し、最終的に成人型造血の場である骨髄に定着する。出生前に骨髄造血が始まるとされるが、造血幹細胞がどのように骨髄へと生着して成体造血を開始するのか、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。本研究ではこれまでの成果をより発展させるべく、異なる幹細胞の起源・機能的関係性、細胞成熟による制御、そして成体造血への寄与を中心に、周産期にダイナミックに起こる骨髄造血開始メカニズムを明らかにする。得られる知見は、造血幹細胞の末梢血動員、骨髄移植などの再生医療において有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織を維持する幹細胞の機能特性や成体組織に向かう器官形成の一端を明らかにすることは、骨髄以外の幹細胞組織にも新たな生物学的視点を持ち込み学術的価値が高い。固有の実験材料、最新シングルセル解析技術、これまで構築してきた国内外の共同研究者との研究連携を活用することで、十分な国際研究競争力をもった大きな研究成果を残せることが期待される。本研究で得られる知見は造血幹細胞の髓外動員(Wright DE, Science 2001)や効率的な骨髄生着など再生医療に有用な知見をもたらすだろう

研究成果の概要(英文)：The hematopoietic stem cells (HSCs) that maintain the hematopoietic system cross various hematopoietic tissues in the early stages of development, and ultimately settle in the bone marrow (BM), the site of adult hematopoiesis. Although BM hematopoiesis is thought to begin before birth, the detailed mechanism by which HSCs adhere to the BM and initiate adult hematopoiesis remains unclear. Our previous single-cell analysis revealed the presence of three HSC subsets with different self-renewal and differentiation abilities in the perinatal BM. In this study, we aim to elucidate the dynamic mechanism of BM hematopoiesis initiation that occurs during the perinatal period, focusing on the origin and functional relationships of different HSCs, control by undergoing cell maturation, and contribution to adult hematopoiesis. The insights gained will be useful in regenerative medicine such as peripheral blood mobilization of HSCs and BM transplantation.

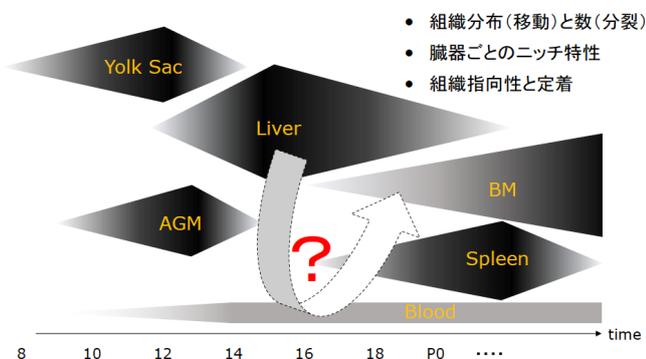
研究分野：血液学

キーワード：造血幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

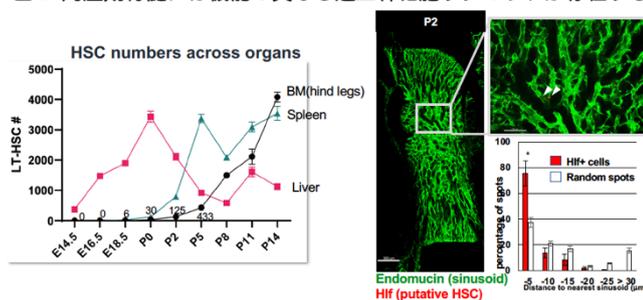
血液産生の源泉である造血幹細胞は大動脈・性腺・中腎(AGM)領域で誕生し、胎盤、肝臓、脾臓を経て、出生前には最終的な成体造血の場である骨髄へと移行する(Hayashi Y, Wiley Interdiscip Rev Dev Biol., 2019)。マウス胎児では胎生 12.5 日目から肝臓において造血幹細胞が活発な自己複製分裂を繰り返してその数を増幅し、誕生前後をピークに周産期後期にかけて脾臓や骨髄でも増加していく(Morrison SJ, PNAS 1995 および図 1)。その際、胎生 14.5 日目の軟骨原基である軟骨組織が成熟骨へと発達するが、それに伴い血管新生と脈管形成、骨芽・破骨細胞の局在化、造血幹細胞の生着および血液産生などが同時進行するダイナミックな組織構築が起こる(未発表データ)。そして、生後 3-4 週間目の成熟骨髄では、造血幹細胞は骨髄ニッチの制御を受けて非細胞分裂状態である静止期 (G0)に入り、数ヶ月に 1 度の非常に低い頻度で自己複製分裂を行う(Bowie MB, JCI 2006 ; Takizawa H, Ann NY Acad Sci 2012)。造血幹細胞はすべての細胞クローンが均一の機能を持った細胞集団ではなく、個々が異なる自己複製能および分化能を持つ(Yamamoto R, Science 2018)。しかしながら、各クローンの発生源や成体造血への寄与、骨髄環境との機能関連については全く分かっていない。

図 1 造血発生過程における造血幹細胞の組織分布と数の動態  
— 組織横断的造血幹細胞移動の制御メカニズム—



我々の解析結果から、周産期の骨髄形成は胎生 14.5 日目 (E14.5)に骨髄原基の中心部より始まり、成長板の移動に伴い骨頭部へと拡大していくことが分かった(図 2)。従来の複雑な抗体染色ではなくより簡便に HSC を同定するため、HSC に蛍光色素 tdTomato を高発現させたマウス(以降 HLF-Tom マウス)を作製し (Yokomizo T, JEM 2019)、このマウス骨髄を Nombela-Arrieta 博士ら(チューリッヒ大学病院)の高解像度 3 次元イメージング法 (Gomariz A, Nat Commun 2018)で観察した。その結果、胎児骨髄では E18.5 の時期に骨外骨膜辺縁部に HLF-Tom 陽性 HSC のコロニー集積を認め、生後 2 日目 (P2)の髄内では 80%の HSC が類洞脈近傍に接着している様子が観察された(図 2 一番右側の拡大図中の矢印とグラフ)。E18.5 では HSC は骨髄への移行過渡期にあり、骨髄の特定領域に生着することを強く示唆している。

図 2 周産期骨髄には機能の異なる造血幹細胞サブセットが存在する



## 2. 研究の目的

本研究では、前述の発生過程の特定の時期および臓器に起こるダイナミックな組織幹細胞移動に注目し、以下の問いを紐解きながら造血幹細胞の骨髄定着と造血開始のメカニズム、成熟骨髄ニッチとの相互作用、ニッチシグナルによる造血幹細胞クローン制御、その後の成体造血への寄与を検討した。

学術的問い Q1：どのように異なる造血幹細胞クローンが骨髄定着し、造血を開始するか？

学術的問い Q2：周産期に発達する骨髄に生着する幹細胞クローンの間の機能連関？

### 3. 研究の方法

以上の問いを紐解くために以下の2つの目的を設定して、研究を推進した。

目的1) 周産期骨髄造血における造血幹細胞とニッチ細胞の機能連関

- a) 周産期骨髄に生着する造血幹細胞の機能特性解析
- b) 胎児期における造血幹細胞の組織間移行の数理モデル化

目的2) 造血幹細胞の骨髄定着と造血開始を規定するシグナルの解析

- c) 造血幹細胞サブセットを規定する因子の探索
- d) 成体造血への寄与

### 4. 研究成果

目的1) 周産期骨髄造血における造血幹細胞とニッチ細胞の機能連関

a) 周産期骨髄に生着する造血幹細胞の機能特性解析：図4の scRNAseq から各 HSC 画分に特異的な遺伝子群を抽出したところ、BM<sup>out</sup>-HSC はマクロファージマーカーである CD163、Csf1r(Mcsfr)、BM<sup>in</sup>-HSC1 は血小板分化を制御する c-Mpl や細胞トレーシングに使った Hlf、BM<sup>in</sup>-HSC2 は VEGF 受容体(Flt4, Kdr)

など血管制御因子の発現が見られた。

物理的に分けられる髄外の BM<sup>out</sup>-HSC

とは別に、髄内 BM<sup>in</sup>-HSC 群を分ける

ために BM<sup>in</sup>-HSC2 に特異的に発現する

VCAM1 に注目した (図3で細胞単離および移植)。

VCAM1 の発現を FACS 解析すると CD150 陽性の造血幹細胞分画(LSK)には VCAM1<sup>+</sup>CD150<sup>low</sup>

BM<sup>in</sup>-HSC2 と VCAM1<sup>-</sup>CD150<sup>hi</sup> BM<sup>in</sup>-

HSC1 の細胞分画が存在し、加齢とともに骨髄成熟が進むにつれてその発現上昇が見られた

(図4左)。骨髄内に VCAM1 陽性造血幹細胞が観察された (図4右矢印)。

ごく最近、VLA4 陽性マクロファージが造血幹細胞に発現する VCAM1 を介して”Do not eat me”シグナルを伝え、

骨髄移植後の生着の際に排除機構から逃れていることが報告された(Pinho S, Nat Cell Biol 2022)。

このことから、VCAM1<sup>+</sup>BM<sup>in</sup>-HSC2 は骨髄生着の際にマクロファージによる免疫監視から逃れていると予想される。

この仮説は骨髄移植で VCAM1<sup>-</sup>HSC に比べて VCAM1<sup>+</sup>HSC が有意に生着することからも裏付けられる。

今後は、VCAM1 欠損 HSC と骨髄マクロファージ・骨芽細胞のイメージング、Clodronate 処理による *in vivo* でのマクロファージ除去の影響、*in vitro* でのマクロファージ貪食について検討する。

異なる造血幹細胞サブセットの分裂頻度を調べるために、H2B-

図3 周産期骨髄(P2)に存在する3種類の骨髄造血幹細胞

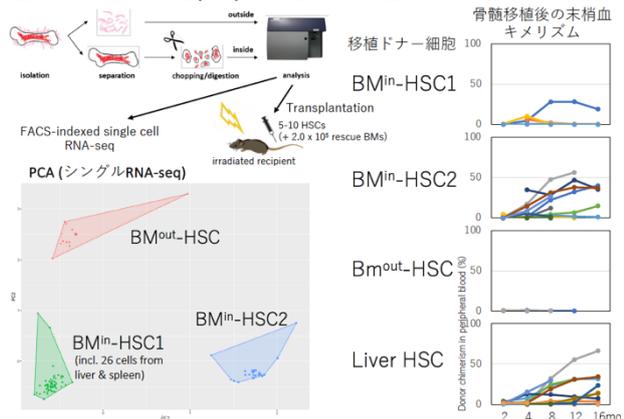
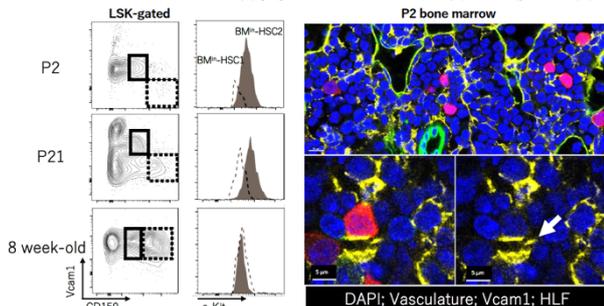
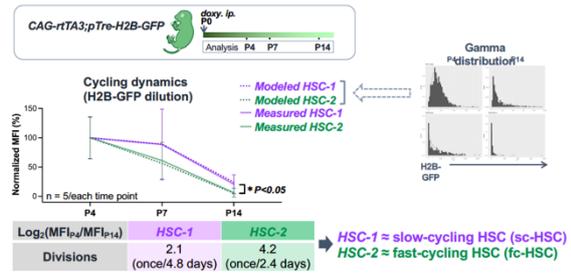


図4 BM<sup>in</sup>-HSC2に特異的なVCAM1発現と骨髄内局在



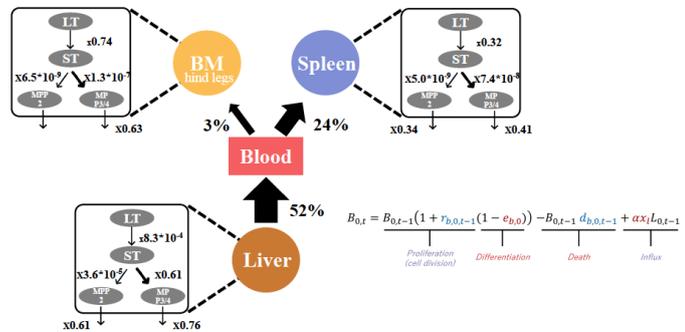
GFP マウスを用いて GFP 輝度 (DNA ヒストンの減少を指標に細胞分裂頻度を計測した (図5)。東京理科大学・波江野博士が数理モデルにより算出したところ、HSC2はHSC1に比して2倍早く分裂していた。このことから、以降ではHSC2を fast-cycling HSC (fc-HSC)、HSC1を slow-cycling HSC (sc-HSC) と定義する。

図5 HSC-2 (fc-HSC) はHSC-1 (sc-HSC)より早く分裂する



b) 胎児期における造血幹細胞の組織間移行の数理モデル化：組織ごとの造血幹細胞数遷移データ (図2) をもとに、波江野博士が多臓器間細胞動態モデルを作成した (図6)。モデルでは実測値である組織分布と数、変動パラメーターとして細胞移動、増殖、分化、細胞流入を設定し、シミュレーションにより実測値にベストフィットする造血幹細胞の動態制御および臓器への細胞流入の方向性と強度を推定した。予備的シミュレーションでは肝臓からの流出だけでは脾臓や骨髄に生まれてくる細胞数を説明できないため *de novo* 造血の存在が示唆され (図6)、骨髄血管から誕生する *de novo* 造血幹細胞の実験証拠 (Yvernoigeau L, Nat Cell Biol 2019) とよく一致した。今後は異なる造血幹細胞集団を想定してそれぞれの分化・増殖速度を予測し、生物学実験で検証する。

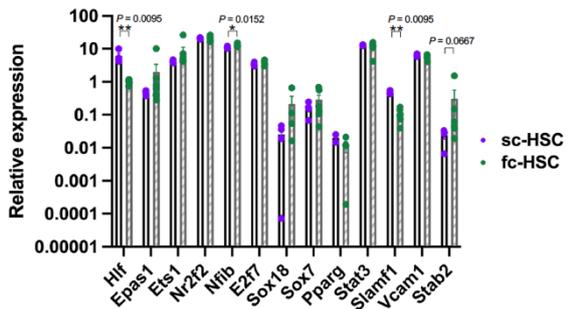
図6 造血幹細胞の臓器間移動の数理モデル



目的2) 造血幹細胞の骨髄定着と造血開始を規定するニッチシグナルの解析

c) 造血幹細胞サブセットを規定する因子の探索：目的1-a) の scRNA-seq で各 HSC サブセット (sc-HSC/fc-HSC) に特異的に発現が見られる遺伝子群について、qPCR による発現検証を行った。その結果、細胞分離に用いた *Hlf*, *Slamf1* (CD150) や幾つかの転写遺伝子で有意差が見られた (図7)。同じく、細胞分離に用いた *Vcam-1* については遺伝子発現に差が見られなかった。今後は、差のある転写因子について Crispr/レンチウイルスによる遺伝子改変を行い、各 HSC サブセットの運命決定が変化するか検討する。

図7 周産期骨髄HSCサブセットに発現する遺伝子群



d) 成体造血への寄与：周産期骨髄に生着する造血幹細胞についてその後の定着および成体造血への寄与を評価するために、目的2-d) でウイルスの固有バーコードを組み込んだ造血幹細胞クローンを生体内で追跡する。具体的には、トランスポゼースの一つである Hyper Sleeping Beauty (HSB) をタモキシフェン (エストロゲン誘導体) 投与で条件的に発現させることで、GFP (蛍光標識) と HSB の認識配列 (IR) が他の染色体座に挿入されて GFP とバーコードがオンになるトレーサーマウスを作成したところである。このシステムでは従来のシステム (Sun J, Nature 2014) と異なり、IR 配列 (クローン) と DNA 断片部位の違いを指標に、クロー

ン数だけでなくサイズを同時に評価することが可能となる。現在、HSB 発現マウスは完成し、新たに作成した IR トレーサーマウスの誕生とスクリーニングを待っている。これらを交配して、タモキシフェン依存的に造血幹細胞クローンを標識できるシステムを構築する。

周産期の骨髄をイメージングやシングルセルシーケンスで調べたところ、遺伝子発現および機能の異なる 3 つの造血幹細胞を見つけた（論文投稿準備中及び図 3）。一方は分裂頻度が遅くて骨髄移植後の生着能が低く、他方は分裂頻度が早く骨髄移植後の生着能が高く、周産期の造血幹細胞にも分裂不均一性があることが明らかとなった（図 8）。今後は、これら造血幹細胞サブセットの関係性、成体造血への寄与についてさらなる解析を進めていく。

図 8 周産期骨髄でのHSC クローンの不均一性

	HSC1	HSC2
<b>Gene Ontology Enrichment</b>	Hematopoiesis related genes	Endothelial/developmental related genes
<b>Immunophenotype</b>	CD150 <sup>hi</sup> VCAM <sup>lo</sup>	CD150 <sup>lo</sup> VCAM <sup>hi</sup>
<b>Functionality (in vitro)</b>	Higher Megakaryocyte diff. potency	Lower Megakaryocyte diff. potency
<b>Functionality (in vivo)</b>	Lower donor chimerism	Greater donor chimerism
<b>Cycling behavior</b>	Quiescent	Cycling

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	黒滝 大翼  (Kurotaki Daisuke)  (10568455)	熊本大学・国際先端医学研究機構・特任准教授   (17401)	
研究分担者	波江野 洋  (Haeno Hiroshi)  (70706754)	東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・准教授   (32660)	

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