

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17139

研究課題名（和文）1細胞解析を応用した血管基底膜に起因した骨髄老化メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of bone marrow aging mechanism caused by vascular basement membrane using single-cell analysis

研究代表者

納所 秋二（Nosho, Shuji）

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：40884797

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）：8週齢，および80週齢以上の野生型マウスの骨髄細胞に対する，single cell RNA-sequencing，遺伝子発現変動解析により，類洞基底膜周囲に局在するAdiponectin (ADIPOQ)陽性CAR細胞が老化により変化していた．これらCAR細胞の発現変動遺伝子に基底膜関連のものを多く認めたと，各群の基底膜に対する免疫組織学染色において顕著な差は認めなかった．
また，ラミニン111，221，332，411，511，コントロール（PBSのみ）でコーティングした培養皿にて，cxcl12-GFPマウスよりGFPを指標に単離したCAR細胞を培養した結果，GFP陽性の細胞を確認できなかった．

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄の血管基底膜がCAR細胞の機能維持において重要な役割を果たしていることはすでに明らかとなっているが，骨髄の血管に特異的に発現する基底膜分子や，それら基底膜分子が老化に伴いどのように変化するのが，という点については不明であった．

本研究では，老化により類洞基底膜周囲に局在するAdiponectin (ADIPOQ)陽性CAR細胞が変化し，これらのCAR細胞の発現変動遺伝子に基底膜関連のものが多く含まれることが明らかとなった．これらの発見は，加齢による免疫機能低下のメカニズムを解明し，骨髄老化の関与が報告されている歯周病やインプラント周囲炎に対する予防及び治療法の開発へ繋がるものと考えられる．

研究成果の概要（英文）：Single cell RNA-sequencing in young (8 weeks old) and old (80 weeks old or older) wild-type mice using bone marrow cells collected from each group revealed that the sinusoidal basal Adiponectin (ADIPOQ)-positive CAR cells (Adipo-CAR) localized around the membrane change with aging of bone marrow, and many of the genes whose expression changes in Adipo-CAR are related to the basement membrane. Although, immunohistological staining of the basement membrane of each group revealed no significant differences.

Next, in order to clarify which basement membrane molecules are involved in the maintenance of CAR cells, we cultured CAR cells from cxcl12-GFP mice using GFP as an indicator in culture dishes coated with laminin 111, 221, 332, 411, 511 and PBS(control). However, after 3 days of culture, no GFP signal was observed in any culture dish.

研究分野：生化学分野

キーワード：骨髄老化 CAR細胞 血管基底膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨髄において、造血幹細胞は血管基底膜周囲の CAR 細胞とニッチを形成して造血を営んでいる。加齢に伴う造血機能異常の原因として、血管基底膜の老化が CAR 細胞を中心とした骨髄ニッチに支障をきたすことが考えられる。実際に骨髄微小血管周囲基底膜分子である XVIII型コラーゲン遺伝子の欠損マウスでは骨髄内の CAR 細胞や造血幹細胞、T 細胞の減少といった造血機能の異常を認めた。したがって、骨髄の血管基底膜が CAR 細胞の機能維持に重要な役割を果たしていると考えられるが、骨髄の血管に発現するそれぞれの基底膜分子が老化に伴いどのように変化し、CAR 細胞の老化に起因した骨髄の老化が生じるのかという点は不明である。

2. 研究の目的

本申請研究では、老化・血管基底膜・CAR 細胞・造血機能の関連性に基づき、血管基底膜変化→CAR 細胞老化という観点から、骨髄老化メカニズムを解明する。具体的には、single cell RNA-seq と基底膜分子に対する免疫組織化学染色を用いて、加齢に伴い発現に変化が生じる基底膜分子を網羅的に抽出、CAR 細胞の性質維持に必須な基底膜分子を、培養皿に基底膜分子をコーティングしたスクリーニング系を用いて同定することで、加齢に伴う骨髄老化メカニズムの真相に迫るとともに、基底膜を基盤とした新たな治療法に繋げる。

3. 研究の方法

実験1：若齢 (8週齢)および高齢 (80週齢以上)の野生型マウスの骨髄細胞を採取し、酵素処理により細胞の単一化を行う。骨髄内の血球系以外の細胞を詳細に解析するため、CD45 (白血球)、Ter119 (赤血球)陰性分画に存在する細胞をセルソーターにて分離し、約10,000個の単一細胞を得て、シングルセル解析システム (10x chromium)にてライブラリーを作製し、シーケンスを行う。Seurat (<https://satijalab.org/seurat>)のアルゴリズムを用いて、すべてのタイムコースのデータを統合し、次元削減、クラスター解析、アノテーションを行う。そして、それぞれの細胞集団 (CAR細胞、類洞血管内皮細胞、動脈血管内皮細胞、骨芽細胞、神経細胞など)が老化に伴い、どのように変化するか (細胞数や遺伝子発現量)、細胞集団レベルで詳細に解析する。

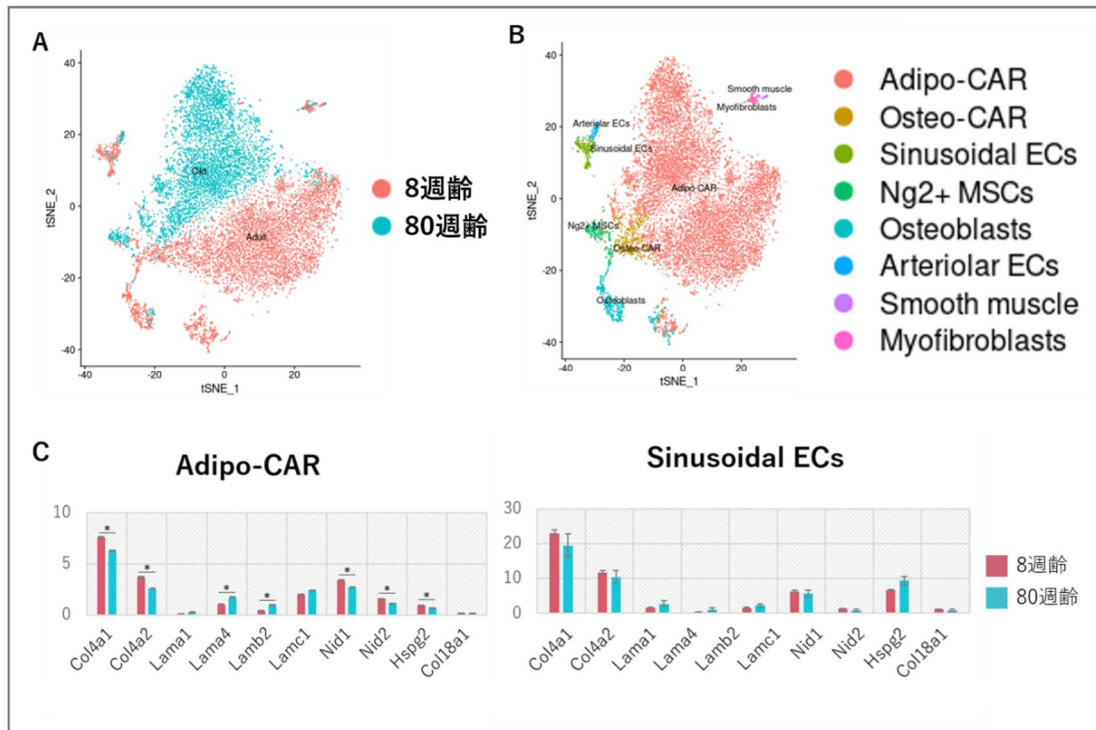
実験1：8, 80週齢野生型マウスの大腿骨の組織切片を作製し、全基底膜分子である Col4a1, Col4a2, HSPG2, Nidogen1, EMCNに対する免疫組織化学染色を行う。そして、骨髄の類洞血管に発現している基底膜分子を蛋白質レベルで解析するとともに、その基底膜分子の発現が老化に伴いどのように変化するか、CAR細胞の変化とともに経時的に解析する。

実験2：cxcl12-GFPマウスより骨髄を採取し、GFPを指標にCAR細胞をセルソーターにて単離する。ラミニン111, 221, 332, 411, 511, PBS (コントロール)をコーティングした培養皿に、単離したCAR細胞を培養し、GFPの発現を指標として造血機能の制御に関わるCAR細胞の性質維持に必須な基底膜分子のスクリーニングを試みる。

4. 研究成果

実験1：類洞基底膜周囲に局在する Adiponectin (ADIPOQ)陽性CAR細胞 (Adipo-CAR)が老化に伴い変化しており、このAdipo-CARの発現変動遺伝子には基底膜関連のものが多く含まれていた。(図.A, B.: 8週齢, および80週齢の野生型マウスより採取した骨髄細胞群のSingle cell RNA-seq

解析，クラスター解析の結果を示す．C：造血幹細胞ニッチ形成に関わるAdipo-CAR細胞および



類洞内皮細胞それぞれにおける基底膜分子の発現量の解析結果を示す．)

実験1 :8, 80週齢野生型マウス大腿骨における基底膜分子の発現変化を確認するため，基底膜分子に対する免疫組織学染色を行なったが，各基底膜分子において若齢および高齢マウスの群間で顕著な差は認めなかった．

実験2：ラミニン111, 221, 332, 411, 511をコーティングした培養皿に，cxcl12-GFPマウスより採取したCAR細胞を細胞培養したが，培養3日後にはいずれの培養皿においても，GFPのシグナルが確認できなかった．今後，コーティングした基底膜の濃度や培地の条件検討が必要である．

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------