

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02841

研究課題名(和文) 間葉系ニッチのシングルセルプロファイリングによる造血器腫瘍発症及び進展機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms for leukemia developments and progress by single cell profiling of mesenchymal niches

研究代表者

国崎 祐哉 (Kunisaki, Yuya)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：80737099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：正常造血を支持する「ニッチ」は多彩な種類の細胞から構成されており、その細胞間の相互作用の理解は欠かすことができない。その構成細胞の一つである間葉系幹細胞をその機能により分類することは、骨修復や骨病変を来す病態のより深い理解、ひいては効率的な骨再生や新たな骨病変治療薬の開発に繋がると期待される。細胞傷害や加齢により、造血幹前駆細胞の悪性形質転換やクローン選択を促進する「変異原性微小環境」が生じる可能性が示唆されている。よって、加齢に伴う「ニッチ」と幹細胞相互作用の変化を解明し、その知見をヒト造血器腫瘍に応用することで、微小環境を標的とした新たな造血器腫瘍治療法の開発へも繋がると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍は、最も多くの死因を占めておりその克服は現在においても重要な課題である。本研究課題が対象とする造血器腫瘍においても、その発症率は高齢で高くなる傾向にあり、その原因解明は重要であると考えられる。よって加齢、造血器腫瘍による骨髄微小環境の変化を詳細に解析し、微小環境と腫瘍細胞の相互作用を明らかにした本研究成果は、病態の理解のみならず、新たながん治療へ貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：“Niches” play important roles in supporting hematopoiesis and are constituted with various cells including mesenchymal stem cells in bone marrow. This study aimed to classify the mesenchymal stem cells according to their functions such as niches for hematopoiesis, regenerative capability, differentiating capacity, etc., which will lead to development of new methods for tissue regeneration.

Furthermore, genetic insults including tissue injuries and aging on bone marrow mesenchymal stem cells might raise “tumorigenic microenvironments” that promote malignant transformation or selection of malignant clones. Therefore, understanding of the mutual interaction between hematopoietic cells and their microenvironments is essential. The anatomical and functional interactions between tumor cells and their microenvironments are essential to efficiently control tumor cells. The outcome that this study has achieved may add new concept as “anti-cancer niche” to cancer therapy.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血器腫瘍 骨髄微小環境 間葉系幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞ニッチの構成細胞として、CXCL12-abundant reticular (CAR)細胞、NG2 陽性細胞、レプチン受容体陽性細胞など血管周囲の間葉系幹前駆細胞の重要性が示されている。これらの研究結果は、上述の間葉系細胞の修飾によっておこる造血幹細胞数や活性の変化に基づくものであり、骨髄内の造血幹細胞の分布からその環境を解析するというアプローチはされていなかった。申請者は、骨髄の3次元イメージング技術を確認し、造血幹細胞の骨髄内実測分布とコンピューターシミュレーションによる確率的な分布を比較解析することにより、NG2 とレプチン受容体という異なる表面マーカーを発現する間葉系幹細胞によって構成される細動脈ニッチと骨髄洞ニッチが、造血幹細胞の静止状態の維持、細胞増殖という異なる機能を支持していることを世界で初めて明らかにした(Kunisaki et al. Nature 2013)。これらの間葉系幹細胞活性を持つ細胞群の機能解析より、NG2 陽性細胞およびレプチン受容体陽性細胞も100%の自己複製能、多分化能を示さず、不均一性を持つと考えられる。また、元来、中胚葉由来と考えられていた骨髄間葉系幹細胞の中に、神経堤由来の分画が存在することも示されている(Nagoshi et al. Cell Stem Cell 2008)。また、近年、癌の発症や進展においてもその微小環境との相互作用の重要性が明らかとなっている。本課題では、造血支持に不可欠である間葉系幹前駆細胞をその起源やシングルセルレベルでの網羅的な遺伝子解析により細分化し、その知見を基にして現在までに明らかになっていない造血器腫瘍を支持する骨髄微小環境を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究は、Drop-seq(新規シングルセルシーケンス)技術を用いて骨髄微小環境各細胞分画の不均一性を明らかにし、3次元イメージング技術による骨髄組織の構造的解析と組み合わせることにより、それぞれの細胞間の相互作用が発生、加齢においてどのように変化し、その変化が造血器腫瘍の発生や動態にどのような影響を及ぼすのかについての解明を目的とする。

(1) シングルセル遺伝子解析を用いた間葉系幹前駆細胞の細分化と3次元イメージングを用いた骨髄微小環境マップの作製

既知のマーカーで分離された間葉系幹前駆細胞、血管内皮細胞をマウス骨髄よりソーティングにより採取し、網羅的な遺伝子発現解析を行い更に細分化する。間葉系幹細胞を亜群に分離するためのマーカーを抽出し、そのマーカーによりそれぞれの細胞群の骨髄内分布を3次元イメージングにより得、正常骨髄における骨髄微小環境のマップを作成する。造血器発達期(出生後4週以内)、成体、加齢(90週齢以上)骨髄を比較する事で、それぞれのステージにおける血管や骨との構造的、機能的相関を解析するための遺伝子改変マウスの作成を行う。

(2) 造血器腫瘍性疾患において、1-で同定された各々の間葉系幹細胞分画の遺伝子発現と骨髄内分布の変化を解析することで腫瘍特異的微小環境を明らかにする

急性骨髄性白血病や多発性骨髄腫において、様々なレポーターマウスで標識される間葉系幹前駆細胞を 1-で得られた正常骨髄間葉系細胞と比較することにより、腫瘍特異的な変化の見られる分画を特定する。更に、マウスモデルで得られた分画や遺伝子発現の変化を、各疾患患者由来の骨髄間葉系幹前駆細胞にて解析し、疾患治療応用のための基礎データを得る。

3. 研究の方法

(1) 間葉系幹前駆細胞の起源の同定と正常組織における分布、機能解析

細胞傷害や加齢は、骨髄微小環境を構成する間葉系細胞に炎症性変化を起こすことで、骨髄異形成症候群発症の母地(造血幹前駆細胞の悪性形質転換やクローン選択を促進する「変異原性微小環

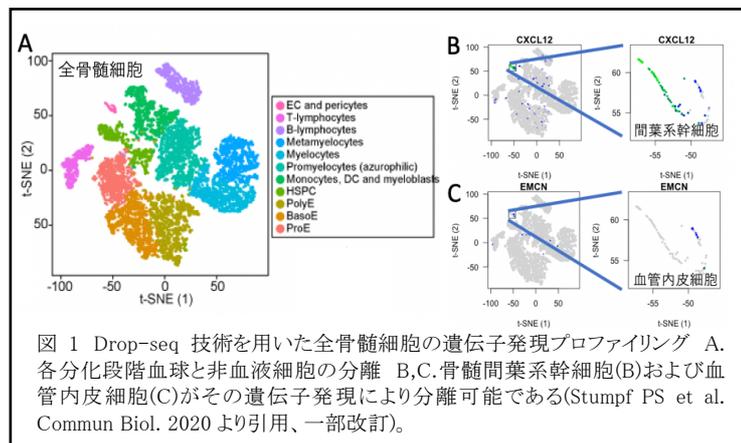
境)」となる可能性が示唆されている。実臨床においても、前白血病状態と位置づけられている骨髄異形成症候群や多発性骨髄腫は、ほぼ高齢者にその発症が限られているため、それらの発症と加齢変化には共通の因子があることが予想される。本研究目的においては、加齢と骨髄腫モデルマウスにおける骨髄微小環境変化を比較し、共通因子を同定する。

(2) 疾患モデルを用いて骨髄間葉系幹細胞と腫瘍細胞との位置的相関を解析することにより造血器腫瘍ニッチを同定する

前年度に得られたデータより各間葉系細胞を亜群に分離するためのマーカーを抽出し、そのマーカーによりそれぞれの細胞群の骨髄内分布を3次元イメージングにより得、正常骨髄における骨髄微小環境のマップを作成する。このマップを対照として、造血器腫瘍モデルマウスにおいて間葉系幹細胞分画の分布にどのような変化を来すかを解析する。急性骨髄性白血病(AML)マウスモデルとして MLL-AF9 遺伝子導入による AML モデルを用いる。予備実験において、間葉系幹前駆細胞もしくは骨芽細胞を蛍光標識するマウスに、AML を発症させることにより、AML 骨髄では NG2-cre かつ Collagen1.1-cre で標識される間葉系細胞分画が増加することを見出している。この細胞集団の Drop-seq 技術を用いたシングルセル遺伝子発現解析により、AML を特異的に支持する細胞群、更にはシグナル分子を同定し、白血病の進展を支持するニッチを特定する。造血器腫瘍が、微小環境を再構築することで、白血病ニッチを形成すると報告されている(Schepers et al. Cell Stem Cell 2013, Hanoun et al. Cell Stem Cell 2014)。一方で、遺伝子改変マウスを用いた研究で、微小環境の異常により、造血器腫瘍が発症することも示されている(Raaijmakers et al. Nature 2010, Kode et al. Nature 2014)。これまでの研究で、成年期の骨髄において間葉系幹前駆細胞の多くは、細胞周期静止状態にあり、ガン抑制遺伝子のひとつである PTEN (phosphatase and tensin homolog)を間葉系幹細胞特異的に欠損させ(NG2-creERTM / flox PTEN マウス)細胞増殖を誘導すると、骨髄増殖性疾患を発症することを見出している。この予備実験結果は、ニッチ細胞の静止状態からの逸脱は、その機能にも重要であり、ニッチの機能破綻が、造血器腫瘍の発症に関わっている可能性を強く示唆するものである。よって、PTEN 欠損により増殖している間葉系幹前駆細胞は、造血器腫瘍の発症を促す微小環境を形成している可能性が考えられ、前述の MLL-AF9 誘導 AML と比較することにより、造血器腫瘍の発症に関わる間葉系ニッチ細胞の変化を同定する。申請者は、更に 5TGM1 マウス骨髄腫細胞株を、C57BL/6.Rag2(-)Il2rg(-)NOD-Sirpa (BRGS) 免疫不全マウスへ静脈内注射することで発症する骨髄腫モデルを確立している。ただし、BRGS マウスは、免疫不全マウスであり、免疫学的機序を考慮していないという問題点が挙げられる。よって現在、マウス腫瘍細胞株が生着可能な突然変異 C57BL/KaLwRijHsd マウス(EMVIGO より購入)を導入しており、BRGS マウスで得られた知見の再現性を確認する。

4. 研究成果

Drop-seq とは、微小流路を用いて、mRNA を細胞毎に異なるオリゴバーコードで標識するシステムで、シーケンスの際に各々の mRNA の由来細胞が特定できるシステムである。本装置を用いたシングルセル RNA シーケンス技術を用いてマウス及びヒトの骨髄細胞を分離し骨髄の正常マップの作製に成功



し発表した(図 1 Stumpf PS et al. Commun Biol. 2020)。近年のシングルセルシーケンス解析技術革新により、これまで骨髄の非血球と考えられていた分画に赤血球とリンパ球への分化能を有する新規細胞の存在が示された。この新規赤血球・リンパ球前

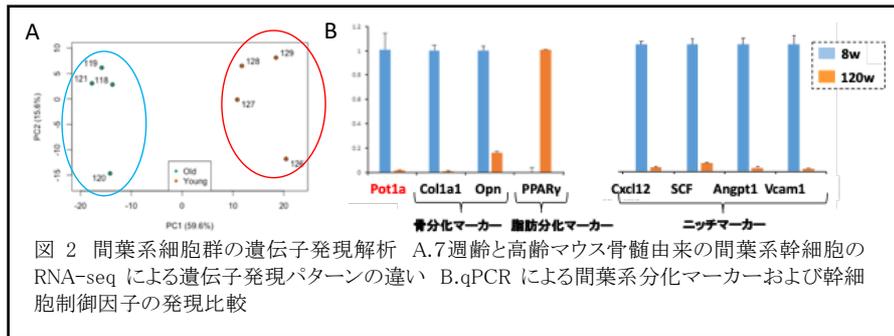


図 2 間葉系細胞群の遺伝子発現解析 A.7週齢と高齢マウス骨髄由来の間葉系幹細胞のRNA-seqによる遺伝子発現パターンの違い B.qPCRによる間葉系分化マーカーおよび幹細胞制御因子の発現比較

駆細胞の最終分化にミトコンドリアのタンパク合成が重要であることを血球特異的 p32 欠損マウスを用いて証明し責任著者として報告している(Goto et al. iScience 2020)。マウスモデルを用いた実験で、細胞傷害や加齢は、「ニッチ」を構成する間葉系細胞に炎症性変化を起こすことで、造血器腫瘍発症の母地(造血幹前駆細胞の悪性形質転換やクローン選択を促進する「変異原性微小環境」)を形成する可能性が示唆されている。加

齢骨髄における骨髄微小環境の構造的、機能的変化の評価するために、7週齢と120週齢の高齢マウス骨髄より既知のマーカーでソートした間葉系幹細胞集団のRNAシーケンスとqPCR

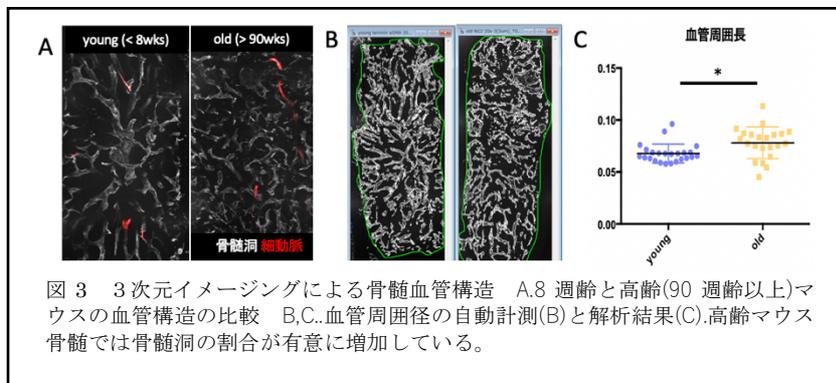


図 3 3次元イメージングによる骨髄血管構造 A.8週齢と高齢(90週齢以上)マウスの血管構造の比較 B,C.血管周囲径の自動計測(B)と解析結果(C).高齢マウス骨髄では骨髄洞の割合が有意に増加している。

による遺伝子発現解析を行った。これらの間葉系幹細胞は、異なる細胞群としての遺伝子プロファイルを示した(図 2)。また、特定の遺伝子に関してその発現を比較すると、骨、脂肪分化関連遺伝子や造血幹細胞制御に関わる因子の発現は、著明に変化しており、加齢に伴う骨髄微小環境の機能的な変化を示唆する十分なデータが得られた(図 2B)。加えて、骨髄組織の3次元イメージングによる血管構造の詳細な計測、解析を行い、高齢マウス骨髄において、細動脈には形態的な変化を認めないが、骨髄洞は増加しているという結果を得た(図 3)。以上の結果より、高齢マウスの造血幹細胞ニッチは、機能的、構造的に再構築されており、この変化が造血器腫瘍を始めとする造血器疾患の発症に影響を与えていることが強く示唆された。

「変異原性微小環境」の特定を目的として、加齢と造血器腫瘍モデルマウスにおける骨髄微小環境変化を比較し、共通因子を同定を試みた。骨髄増殖性疾患類似病態を示す血球特異的 Ragnase-1 欠損マウス(Kidoya et al. Nat Commun 2019)から既知のマーカーでソートした間葉系幹細胞や血管内皮細胞集団のRNAシーケンスを行い双方で有意に上昇を認めた因子 X をすでに特定することに成功した(大阪

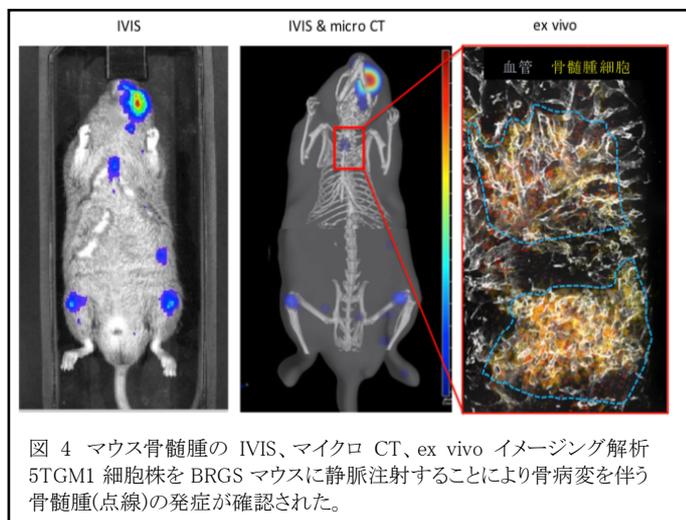


図 4 マウス骨髄腫の IVIS、マイクロ CT、ex vivo イメージング解析 5TGM1 細胞株を BRGS マウスに静脈注射することにより骨病変を伴う骨髄腫(点線)の発症が確認された。

大学微生物研究所 木戸屋先生との共同研究)。この因子 X について、大阪大学微生物研究所にて細胞特異的に欠損や過剰発現が可能となる flox マウスが完成しており、今後これらのマウスと血管内皮特異的 Cre(Cdh5-creERT2)マウスや骨髄間葉系幹細胞で発現する(NG2-cre)マウスを交配することにより、この因子 X の生体内での役割を検証する。更に、別の造血器腫瘍モデルとして、5TGM1 マウス骨髄腫細胞株を、C57BL/KaLwRijHsd マウスへ静脈内注射することで発症する骨髄腫モデルを確立することができた(図 4)。Drop-

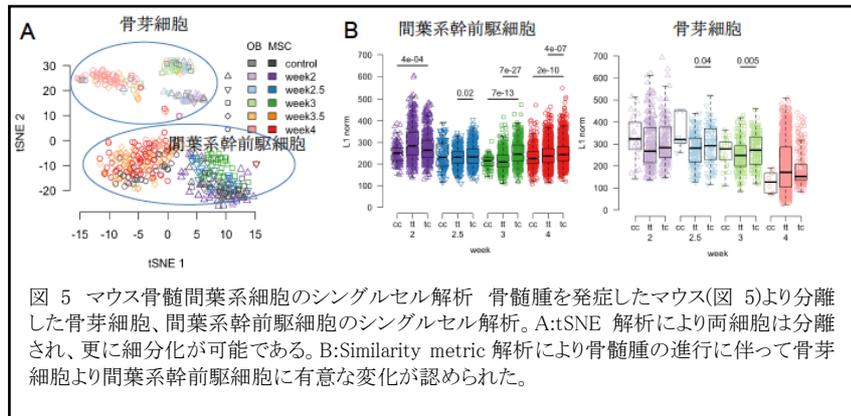


図 5 マウス骨髄間葉系細胞のシングルセル解析 骨髄腫を発症したマウス(図 5)より分離した骨芽細胞、間葉系幹前駆細胞のシングルセル解析。A:tSNE 解析により両細胞は分離され、更に細分化が可能である。B:Similarity metric 解析により骨髄腫の進行に伴って骨芽細胞より間葉系幹前駆細胞に有意な変化が認められた。

seq 技術を用いて、多発性骨髄腫モデルマウスの骨芽細胞と間葉系幹前駆細胞のシングルセル遺伝子発現解析を行い、t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding(tSNE)解析法にて、両細胞が別々の集団として識別される結果が得られた(図 5A)。また、Similarity Metric 解析を行ったところ、骨髄腫の骨髄浸潤が進行するにつれ、骨芽細胞よりむしろ間葉系幹前駆細胞に有意な変化が認められ(図 5B)、シングルセル解析により、未知の骨髄微小環境の変化を同定することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kidoya Hiroyasu, Muramatsu Fumitaka, Shimamura Teppei, Jia Weizhen, Satoh Takashi, Hayashi Yumiko, Naito Hisamichi, Kunisaki Yuya, Arai Fumio, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Osawa Tsuyoshi, Akira Shizuo, Takakura Nobuyuki | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Regnase-1-mediated post-transcriptional regulation is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09028-w | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Oshima Tsuyoshi, et.al, Kunisaki Yuya, Yagita Kazuhiro, Ikeda Masaaki, Kinoshita Takayoshi, Kay Steve A., Itami Kenichiro, Hirota Tsuyoshi | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Cell-based screen identifies a new potent and highly selective CK2 inhibitor for modulation of circadian rhythms and cancer cell growth | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Science Advances | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aau9060 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Kunisaki Yuya | 4. 巻 1122 |
| 2. 論文標題 Pericytes in Bone Marrow | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol. | 6. 最初と最後の頁 101 ~ 114 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-11093-2_6 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Nakano Michitaka, Kikushige Yoshikane, Miyawaki Kohta, Kunisaki Yuya, Mizuno Shinichi, Takenaka Katsuto, Tamura Shingo, Okumura Yuta, Ito Mamoru, Ariyama Hiroshi, Kusaba Hitoshi, Nakamura Masafumi, Maeda Takahiro, Baba Eishi, Akashi Koichi | 4. 巻 38 |
| 2. 論文標題 Dedifferentiation process driven by TGF-beta signaling enhances stem cell properties in human colorectal cancer | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Oncogene | 6. 最初と最後の頁 780 ~ 793 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-018-0480-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Gotoh Kazuhito, Kunisaki Yuya, Mizuguchi Soichi, Setoyama Daiki, Hosokawa Kentaro, Yao Hisayuki, Nakashima Yuya, Yagi Mikako, Uchiumi Takeshi, Semba Yuichiro, Nogami Jumpei, Akashi Koichi, Arai Fumio, Kang Dongchon | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Mitochondrial Protein Synthesis Is Essential for Terminal Differentiation of CD45 ⁺ TER119 ⁺ Erythroid and Lymphoid Progenitors | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 101654 ~ 101654 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101654 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Stumpf Patrick S., Du Xin, Imanishi Haruka, Kunisaki Yuya, Semba Yuichiro, Noble Timothy, Smith Rosanna C. G., Rose-Zerili Matthew, West Jonathan J., Oreffo Richard O. C., Farrahi Katayoun, Niranjan Mahesan, Akashi Koichi, Arai Fumio, MacArthur Ben D. | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Transfer learning efficiently maps bone marrow cell types from mouse to human using single-cell RNA sequencing | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Communications Biology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01463-6 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 國崎 祐哉 |
| 2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞におけるテロメア保護分子POT1aの役割 |
| 3. 学会等名 第67回 日本輸血・細胞治療学会 学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 國崎 祐哉 |
| 2. 発表標題 概日リズム制御分子を標的とした新規白血病治療薬の開発 |
| 3. 学会等名 第68回日本臨床検査医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 國崎 祐哉 |
| 2. 発表標題 骨髄微小環境のイメージング |
| 3. 学会等名 第29回日本フローサイトメトリー学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 國崎 祐哉 |
| 2. 発表標題 シングルセル解析による造血幹細胞ニッチを構成する間葉系細胞の機能的分類 |
| 3. 学会等名 第66回日本輸血細胞治療学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 國崎 祐哉 |
| 2. 発表標題 シングルセル解析による造血幹細胞ニッチを構成する間葉系細胞の機能的分類 |
| 3. 学会等名 第65回日本臨床検査医学会学術集会 |
| 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 |
|-------|---------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 新井 (Arai) | | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|---------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 赤司 (Akashi) | | |
| 研究協力者 | 木戸屋 (Kidoya) | | |

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 |
|---------|---------|
| | |