科学研究費助成專業 研究成果報告書



元年 9 月 5 日現在 今和

機関番号: 17401

研究種目: 国際共同研究加速基金(国際共同研究強化)

研究期間: 2016~2018 課題番号: 15KK0350

研究課題名(和文)巨核球による造血幹細胞運命制御の解明(国際共同研究強化)

研究課題名(英文) The determiniation of megakaryocyte lineage commitment of hematopoietic stem cells(Fostering Joint International Research)

研究代表者

石津 綾子 (Nakamura-Ishizu, Ayako)

熊本大学・国際先端医学研究機構・客員准教授

研究者番号:10548548

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 11,200,000円

渡航期間: 12ヶ月

研究成果の概要(和文):造血幹細胞は異なった機能を有する複数のクローンから構成され血小板に偏った分化能をもつ造血幹細胞が存在する。当研究は、造血幹細胞のheterogeneityの一つである巨核球への特異的分化能を規定する因子の同定とそのメカニズムの解明を目的とした。幹細胞の多様性を解析するため、造血幹細胞のSingle cellレベルでの遺伝子・タンパク発現解析で実績があるシンガポール国立大学Canc er Science Institute (CSI) と共同研究を実施し、造血幹細胞の巨核球系統へ分化決定に関してサイトカインシグナル、ミトコンドリア代謝およびEpigenetic変化が関与していることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義 急激な出血や重度の炎症の際、生体は止血のために早急に血小板を産生する必要がある。このため、造血細胞の おおもととなる造血幹細胞は血小板を産生する巨核球細胞に偏って分化傾向を示す細胞群があることが示唆されている。当研究は、造血幹細胞の巨核球系への分化運命の決定のメカニズムを解析した。シンガポール国立大学の研究室と共同研究と行い、造血幹細胞の巨核球系の分化にサイトカインのひとつであるトロンボポエチンのシグナルが関与していることを解析した。また、同時にミトコンドリア代謝、エピジェネティック変化の解析を行

研究成果の概要(英文): Hematopoietic stem cells (HSCs) are heterogeneous in differentiation potential. We analyzed BM HSCs for the identification of novel HSC subsets that are biased to Mk differentiation and the mechanism of how these HSCs emerge. We identified the cytokine, Thpo, rapidly skews HSC to Mk lineage differentiation. International collaboration with researchers in National University of Singapore enabled us to conduct single cell RNA sequence of HSCs from mice treated with Thpo. The data revealed that Thpo-treated HSCs were highly enriched with mitochondrial-related gene signature. The correlation of high mitochondrial content to Mk lineage differentiation was also confirmed in steady state HSCs with high mitochondria content. We also conducted ATAC sequencing in order to investigate change in chromatin accessibility in HSCs upon Thpo signaling. Collectively, our data indicate that mitochondrial metabolism and epigenetic changes maybe key mechanisms underlying Mk-lineage differentiation.

研究分野: 実験血液学

キーワード: 造血幹細胞 巨核球 単一細胞シークエンス解析 分化 ミトコンドリア代謝

1.研究開始当初の背景

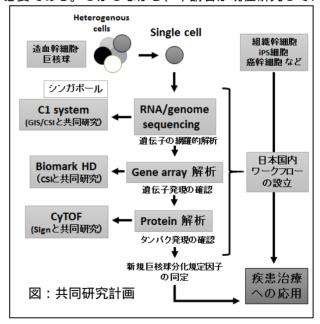
恒常的な血球産生には造血幹細胞の維持・増殖・分化が不可欠である。造血幹細胞は異なった機能を有する複数のクローンから構成され(heterogeneity)、血小板に偏った分化能をもつ造血幹細胞の存在が指摘されている。一方、巨核球は造血幹細胞と多くの性質を共有するものの、その分化機構は不明瞭な点が多い。申請者は、科学研究費補助金(若手研究(A)交付を受け、造血幹細胞heterogeneityの一つである巨核球への特異的分化能を規定する新規因子の同定とそのメカニズムの解明を対象とする研究を行っている。

近年、造血幹細胞の heterogeneity が解明される中、造血幹細胞の中には、個々に異なった特異的な血球系への分化バイアスを有する造血幹細胞が存在することが報告された (Yamamoto et al. Cell 2013)(Sanjuan-Pla et.al. Nature 2013)。これらの報告では、血小板・巨核球バイアスを持つ造血幹細胞(Mk-biased HSC)は、これまで主流と思われている巨赤芽球系前駆細胞を経由した巨核球分化をバイパスする経路の存在が示唆されているが、その生理的意義や発生機序は解明されていない。また、造血幹細胞の分化能の heterogeneity を規定するメカニズムも解明されていない。また、造血幹細胞の分化能の heterogeneity を規定するメカニズムも解明されていない。これまで申請者が行った研究により、造血幹細胞の中に膜タンパクの CLEC-2 を含む血小板・巨核球マーカーを高く発現する造血幹細胞群があることを発見した。また、マウスにサイトカインである Thrombopoietin (Thpo)を投与し造血幹細胞の動向を調べた結果、Thpo 投与後、短期間で血小板・巨核球因子を高く発現する造血幹細胞が誘導された。これらの細胞は in vitro、in vivo でも血小板・巨核球への分化傾向が高く Mk-biased HSC の特徴を有していた。つまり、Mk-biased HSC の発生は骨髄微小環境(ニッチ)からのThpoの供給が非常に重要であることが推測できる。しかしながら、Thpo シグナルや Clec2 分子がどの様に造血幹細胞の巨核球系統への分化を制御しているのか、その詳細なメカニズムは知られていない。

2.研究の目的

申請者の研究を更に進めるためには、Mk-biased HSC の遺伝子発現解析が必要になる。この点、Mk-biased HSC の解析には、 造血幹細胞の巨核球分化傾向に関する heterogeneity のメカニズム の解析のためには、単一細胞レベルでの遺伝子・タンパク発現解析が必要となり、また、 Mk-Biased HSC の発生・制御に巨核球ニッチの産生する Thpo が特異的に関与していることを明らかにするために、Thpo 欠損マウスの解析が必要である。しかしながら、申請者が現在研究してい

る熊本大学及び日本国内において造血幹 細胞の single cell 解析のための設備は確 立しておらず、また、これまで同様な解 析経験がないため、研究を進めることが 困難である。これら2つの解析を実施し Mk-biased HSC の解析を進めるべく、本 研究において、まず、 に関しては、Single cell レベルでの遺伝子・タンパク発現解 析で多くの実績があるシンガポール国立 大学 Cancer Science Institute (CSI) 及び Genome Institute Singapore (GIS)と共同研 究を実施する。また、 に関しては、シ ンガポール国立大学 CSI (Dr. Toshio Suda) で Thpo 欠損マウスまた Thpo floxed/floxed mouse を作成しており、共同 研究において Thpo 欠損マウスの造血幹 細胞及び Thpo floxed/floxed mouse を各種 Cre mouse と交配し細胞特異的 Thpo 欠 損マウスの解析を行う。



3.研究の方法

造血幹細胞の巨核球分化傾向に関する heterogeneity のメカニズムの解析、単一細胞レベルでの遺伝子・タンパク発現解析及び Mk-Biased HSC の発生・制御に Thpo が特異的に関与していることを解析する目的のための研究の具体的な計画としては、以下のとおりである(図:共同研究計画)。シンガポール Genome Institute Singapore (GIS) にある Single-Cell Omics Centre にて、C1

single-cell auto Prep (Fluidigm) を用いて Single cell RNA sequencing を行う。C1 single-cell auto Prep は Microfluidics 技術を用いて分離した細胞 1 つ 1 つの遺伝子増幅と核酸回収が可能で、分離し た巨核球・血小板マーカーhigh 及び low の造血幹細胞から特異的な index を tag した遺伝子ライ ブラリーの作成し次世代シーケンサーで解析する。C1 system の長所として、非常に少ない細胞 のサンプルから single cell library の作成が効率よく可能であり、生体内で非常に頻度の少ない造 血幹細胞の解析に優れていると考えられる。GIS の Dr. Shyam Prabhakar は RNA sequencing デー タの統計解析を熟知し、サンプル調整から統計解析のパイプラインを所有しており、情報交換を 行い、技術の提供を求める。この共同研究を行うことで single cell からの RNA sequencing デー タの収集及び統計解析を円滑に行うことができる。得られたデータからそれぞれの造血幹細胞 群で Mk-biased HSC に優位に高く、あるいは特徴的に発現する新規因子を同定していく。新規 因子の発現の確認のため、Bioinformatics 解析においてイギリス Southampton 大学の Ben D. MacArthur の教室と共同研究を行う。さらに、Singapore Immunology Network (SIgn)にて Fluidigm CyTOF 機器を使用し、single cell レベルで新規因子のタンパクレベルの解析を行う。CyTOF は重 金属標識された抗体を用いて、single cell 上での発現を Mass spectrometry により検出し、一つの 細胞でおよそ 40 種類のタンパクの発現を検出できる。 解析はコントロールマウス、Thpo 投与マ ウス及び Thpo 欠損マウスから得られた造血幹細胞で行い、発現パターンを比較し、巨核球発生 に必要な新規因子を同定していく。シンガポールでは GIS、CSI と SIgn と single cell レベルの遺 伝子・タンパク発現を解析する円滑なパイプラインが確立されており、共同研究を通し、日本国 内では施行が難しい造血幹細胞の single cell 解析が可能である。Single cell レベルの解析は Mkbiased HSC を特徴づける更なる新規分子の同定及びその発生機序の解析のみでなく造血幹細胞 の heterogeneity の解析をより詳細に行うことができる。さらに、Thpo 欠損マウス由来の造血幹 細胞の Single cell 解析することで、これまで研究報告が存在していない、造血幹細胞の heterogeneity がニッチにより規定されるという新概念の提唱につながると考えている。

4. 研究成果

造血幹細胞の巨核球分化傾向に関する heterogeneity のメカニズムの解析、単一細胞レベルでの遺伝子・タンパク発現解析:

本研究において、C1 single-cell auto Prep (Fluidigm)を用いて Single cell RNA sequencing を行う。 C1 single-cell auto Prep は Microfluidics 技術を用いて分離した造血幹細胞をシングルセルレベルでの RNA シークエンス解析を行った。当初、Genome Institute Singapore (GIS) にある Single-Cell Omics Centre にて Microfluidics を使用し、その技術を学び、熊本大学 IRCMS にて C1 single cell auto Prep システムを導入し、Thpo 刺激後及びコントロールのマウスより分離した造血幹細胞のRNA シークエンス解析を行った。その結果、Thpo シグナルを活性化させた造血幹細胞(Thpo 作動薬の Romiplostimを 1 日投与後)では個々の造血幹細胞の遺伝子発現が大きく変動していることが分かった。統計学解析(tSNE 解析、Heatmap 解析)にて、造血幹細胞は Thpo シグナルにより

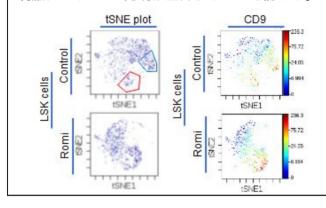
広範な遺伝子発 現の変化を認め るものの、特徴 的に反応するよ うな Cluster など は認められなか った(図1A,B)。 しかしながら、 Thpo刺激造血幹 細胞とコントロ ール造血幹細胞 の間には692 の Differentially expressed genes を認めた。それ ら遺伝子をすで に報告されてい る巨核球分化に 関係する遺伝子 群と比較したと ころ、優位な相 関関係は認めな

図 1:Thpo 刺激造血幹細胞及びコントロールの RNA シークエンスを もとにした(A) tSNE 解析、(B)heat map 解析。(C) Differentially expressed genes の(C)巨核球関連遺伝子との比較(D) GO pathway 解析 (E) GSEA 解析。 C ■ Thpo 2 / 53 D Е DEG Reactome pathways P-value FDR q-value 0.034943145 3.72 8.95E-08 3.68 1.24E-07 2.95 6.97E-03 WT NA Polymerase I Tran 3.04 4.38E-02

かった(図1C)。しかしながら、これらの遺伝子の Pathway 解析、GSEA 解析を施行したところ、Thpo により、優位にミトコンドリア関連遺伝子の発現が増加する傾向にあることを認めた(図1D,E)。これらのことより、Thpo による造血幹細胞の変化はミトコンドリア代謝を介することを仮説として、さらに解析を行うことができた。

さらに、熊本大学 IRCMS にて Fluidigm CyTOF 機器を使用し、single cell レベルで新規因子のタンパクレベルの解析を行った。CyTOF は重金属標識された抗体を用いて、single cell 上での発現を Mass spectrometry により検出し、一つの細胞でおよそ40種類のタンパクの発現を検出できる。 RNA シークエンス解析と同様、Thpo 刺激後及びコントロールのマウスより分離した骨髄細胞の

図 2: Mass cytometry 解析の tSNE plot の一例。赤及び青の枠でかこった造血幹細胞は Romi 刺激により CD9 発現が上昇 することを認める。



解析を行った。巨核球分化マーカー、幹細胞マーカーより構成される抗体パネルを利用し、Thpo 刺激造血幹細胞において、tSNE プロットにて造血幹細胞のCluster を同定した(図 2)。その結果、Thpo 刺激造血幹細胞ではいくつかの巨核球マーカーが有意に発現し、その内CD9 表面マーカーが亢進していることを確認した。

Mk-Biased HSC の発生・制御に Thpo が特異的に関与していることを解析:

の解析にてThpoシグナルにより造血 幹細胞のミトコンドリアがえいきょう を受ける結果を受け、Thpo 刺激造血幹 細胞及びThpo遺伝子欠損マウスの造血 幹細胞のミトコンドリア機能を解析し

た。その結果、Thpo 刺激により造血幹細胞のミトコンドリア膜電位、ミトコンドリア体積が増加することを認めた。また、ATP 産生の解析により Thpo 刺激造血幹細胞はミトコンドリアの代謝亢進を示し、Thpo 遺伝子欠損マウス由来の造血幹細胞はエネルギー代謝が低下していることを認めた。同時に、造血幹細胞をミトコンドリア機能の高低に分け、その巨核球分化を解析したところ、ミトコンドリア膜電位が高い造血幹細胞は巨核球分化が亢進することを認めた。また、タンパク発現解析を裏付けるべく、CD9 陽性の造血幹細胞を解析したところ、ミトコンドリア機能が亢進していることを認めた。これらの結果をまとめ、造血幹細胞の巨核球系統への分化にはミトコンドリア代謝を介した Thpo シグナルが重要であることを報告した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

<u>Nakamura-Ishizu</u> <u>A</u> and Suda T. Multifaceted roles of thrombopoietin in hematopoietic stem cell regulation. *Ann N Y Aca Sci.* 2019 (in press) (corresponding author)

Ayako Nakamura-Ishizu, Takayoshi Matsumura, Patrick S. Stumpf, Terumasa Umemoto, Hitoshi Takizawa, Yuji Takihara, Aled O'Neil, A'Qilah Banu Bte Abdul Majeed, Ben D. MacArthur, Toshio Suda. Thrombopoietin metabolically primes hematopoietic stem cells to megakaryocyte lineage differentiation. *Cell Reports*. 2018 25 (7):1772-1785. 2018. (corresponding author)

[学会発表](計 2 件)

Stem Cell Research Symposium, Invited speaker, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine, Fukuoka, June 2018.

"Thrombopoietin mediates metabolic priming of hematopoietic stem cells for rapid megakaryocyte lineage differentiation"

MSC Cancer Program Symposium, Invited speaker, NUS, Department of Physiology. March 2018.

"Thrombopoietin induces oxidative metabolism in hematopoietic stem cell differentiation"

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称: 発明者: 権利者: 種類: 番号: 出願年: 国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称: 発明者: 権利者: 種類: 番号: 取得年: 国内外の別:

[その他]

ホームページ等

シンガポール大学 Cancer Science Institute ホームページ

 $\underline{https://www.csi.nus.edu.sg/web/thrombopoietin-metabolically-primes-hematopoietic-stem-cells-to-megakaryocyte-lineage-differentiation-cell-rep-nov-2018/$

熊本大学 IRCMS ホームページ

http://ircms. kumamoto-u.ac.jp/publications/2018/11/thrombopoietin-metabolically-primes-hematopoietic-stem-cells-to-megakaryocyte-lineage-differentiatio.html

6. 研究組織

研究協力者

[主たる渡航先の主たる海外共同研究者]

研究協力者氏名:須田年生 ローマ字氏名:Suda Toshio

所属研究機関名:National University of Singapore

部局名: Cancer Science Institute

職名: Principal investigator

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名:Ben D. MacArthur ローマ字氏名:Ben D. MacArthur

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。