

令和 元年 9 月 5 日現在

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 determination 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Cancer Science Institute (CSI) と共同研究を実施し、造血幹細胞の巨核球系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を行い、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った。

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 単一細胞シーケンス解析 分化 ミトコンドリア代謝

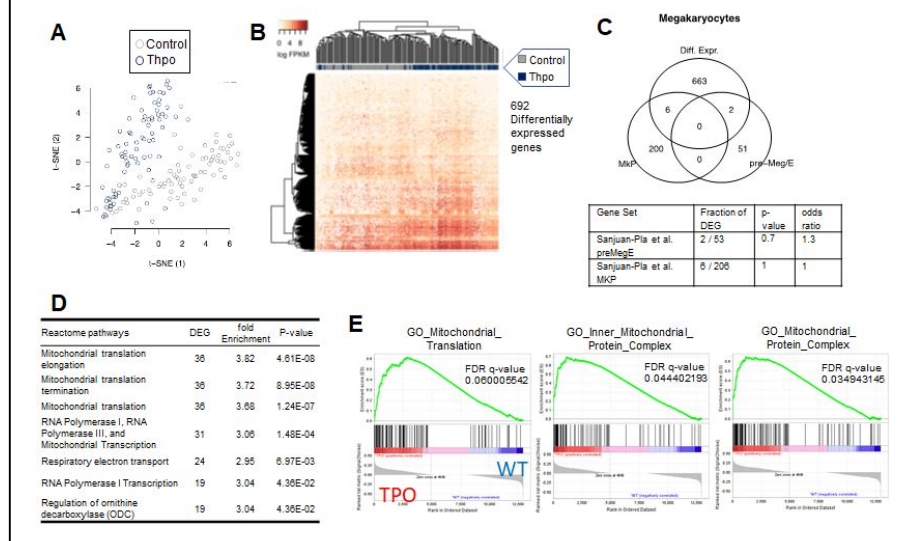
single-cell auto Prep (Fluidigm) を用いて Single cell RNA sequencing を行う。C1 single-cell auto Prep は Microfluidics 技術を用いて分離した細胞 1 つ 1 つの遺伝子増幅と核酸回収が可能で、分離した巨核球・血小板マーカー-high 及び low の造血幹細胞から特異的な index を tag した遺伝子ライブラリーの作成し次世代シーケンサーで解析する。C1 system の長所として、非常に少ない細胞のサンプルから single cell library の作成が効率よく可能であり、生体内で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 Mk-biased 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 1 A,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

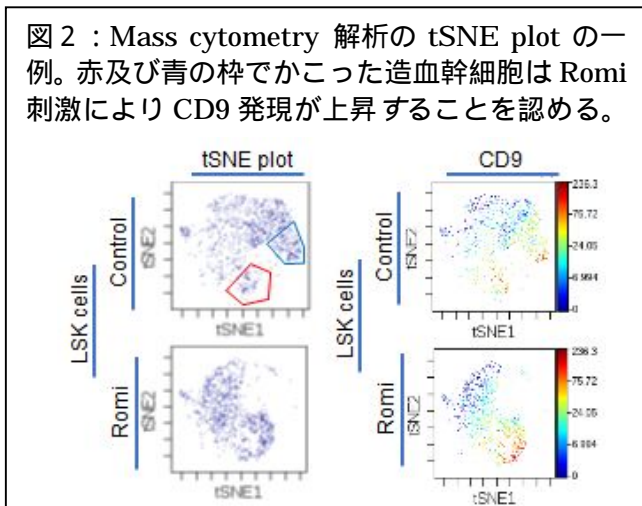
図 1 : Thpo 刺激造血幹細胞及びコントロールの RNA シークエンスをもとにした(A) tSNE 解析、(B)heat map 解析。(C) Differentially expressed genes の(C)巨核球関連遺伝子との比較(D) GO pathway 解析 (E) GSEA 解析。



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

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髓細胞の



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。

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)

Nakamura-Ishizu A and Suda T. Multifaceted roles of thrombopoietin in hematopoietic stem cell regulation. *Ann NY Acad Sci.* 2019 (in press) (corresponding author)

Avako 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

<https://www.csi.nus.edu.sg/web/thrombopoietin-metabolically-primed-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-primed-hematopoietic-stem-cells-to-megakaryocyte-lineage-differentiation.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。