

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19578

研究課題名(和文) 巨核球・血小板系造血の分化機構の解明(IncRNAに注目して)

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of megakaryocyte-lineage differentiation focusing on lncRNAs

研究代表者

宮脇 恒太(Miyawaki, Kohta)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：50774709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：血小板は、止血機能を担うだけでなく、脳心血管障害の原因となる血栓の形成や種々の炎症の制御、また腫瘍の病態に関与していることが明らかになってきており、近年注目されている細胞である。しかしながら、血小板やその産生細胞である巨核球が、造血幹細胞からどのような機構で分化し、また病態に寄与するのかが不明な点が多い。我々は、本研究を通じて、ヒト骨髄において造血幹細胞がその多分化能を失い、巨核球・血小板系統に分化する最も上流の細胞集団＝巨核球前駆細胞を同定した。また、この巨核球前駆細胞が、骨髄増殖性腫瘍と呼ばれる造血器腫瘍の病態に強く関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recent studies revealed that platelets and megakaryocytes contribute not only to hemostasis but also to various pathological conditions including cardio-vascular diseases, inflammatory diseases, and tumors. However, the development pathway for megakaryocyte- and platelet-lineage has been poorly understood, especially in human hematopoiesis. In the present study, we first identified prospectively-isolatable and functionally homogeneous human megakaryocyte progenitor residing near hematopoietic stem cells in human adult bone marrow. This newly-identified unipotent megakaryocyte progenitor significantly contributes normal megakaryopoiesis and pathogenesis of hematologic malignancies such as myeloproliferative diseases.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：巨核球 前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

100年以上前には“dust of the blood”と称されていた血小板の機能は、近年の報告から、止血反応に留まらず実に広範囲に及んでいることが明らかになってきている。炎症の惹起や制御、さらには腫瘍細胞間の相互作用や腫瘍免疫に対する影響など、私たちを取り巻く多くの疾患との関連性が示唆されている。このように血小板は、この100年でその機能的意義が大きく高まっており、その造血メカニズムを明らかにすることは、様々な病態解明や治療に対する可能性など、益々意義深いものになっている。

一方、血球細胞である巨核球・血小板が、その起源である造血幹細胞(HSC)、その多分化能をどのように失い、巨核球・血小板系の血球へと分化していくか、特にその起源がどこにあるか、という点は、いまだ議論の余地があるテーマであり、本研究はこの領域に焦点を当て研究を進める。

多分化能を有するHSCは、リンパ球系への分化能を失った骨髓球系共通前駆細胞(CMP)を経て、さらに顆粒球/単球系への分化能を失うことで巨核球・赤血球前駆細胞(MEP)へと分化し、最終的に巨核球系前駆細胞(MegP)と赤血球系前駆細胞(EryP)の二つの単一系統の前駆細胞に至ると考えられてきた。ヒトではこれまでMegPの明確な定義がなされてこなかったが、今年になってヒトMEPの中にEryPが同定され、MEPの大部分が赤芽球系に分化する細胞であることが示され(Proc Natl Acad Sci USA.2015;112:9638)、巨核球系造血の起源がどこに存在が注目されている。

2. 研究の目的

我々は、ヒト骨髓液中の造血幹細胞に近い、多分化能を有する細胞集団の中に、他の全ての系統への分化能を失い、巨核球系への分化を運命付けられた巨核球系前駆細胞を同定する。また、この細胞集団を用いることによって、巨核球・血小板系の分化機構を明らかにすることを目的とする。

HSCの定義が明らかになることで、それを前向きに分取することが可能となり、様々な解析を加えることにより、幹細胞の特徴や機能(自己複製や多分化能等)やその背景に存在するメカニズム(nicheの存在や機能等)が解明されてきた。機能的に均一な細胞集団を同定することは、その機能の背景にあるメカニズムを明らかにすることの強力なツールとなる。我々は今回MegPを同定することで、(1)MegPがどのような機構でCMPから巨核球・血小板系統への運命決定を受けるのか、という分子メカニズム、そして(2)ET等の骨髓増殖性疾患やその他の血小板造血に異常を来す造血管疾患における意義や病態形成に果たす役割、について明らかにしたいと考えている。

特に、本研究では long non-coding RNA (lncRNA) という新しい切り口から研究を進

める。lncRNAは、マイクロRNA(miRNA)に代表される non-coding RNA の一種であり、主に核に局在することで転写因子自体の制御・クロマチン構造の制御・miRNA とのクロストーク・PRC2 等のエピジェネティック因子の制御といった、遺伝子発現機構を根幹からコントロールする因子として、2010年頃から急速に注目を集めている。本研究では、巨核球・血小板分化の鍵となる lncRNA を同定し、これらの lncRNA がどのように巨核球・血小板造血に寄与するのか、その分化の機構を明らかにすること、そして、血小板造血に異常を来す造血管疾患において、MegP その病態形成に果たす役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

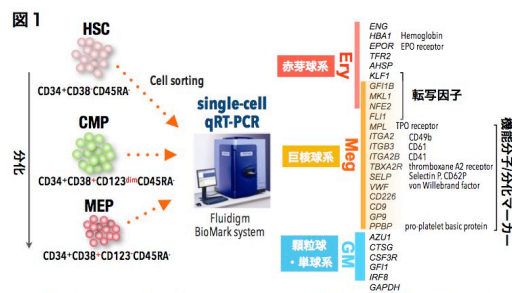
新規巨核球系前駆細胞(MegP)を同定し、その正常造血、及び病的造血における機能を明らかにする。さらにMegPにおいて特異的に強く発現している lncRNA を、網羅的トランスクリプトーム解析を行うことで同定する。同定した lncRNA の機能を理解するために、ノックダウンや強制発現実験による、細胞の分化能や遺伝子発現パターンの変化を解析する。

さらに、病態との関連という観点から、骨髓増殖性腫瘍における MegP のもつ意義を明らかにするとともに、疾患特異的に発現が変化している lncRNA を同定し、この機能解析を行う。

4. 研究成果

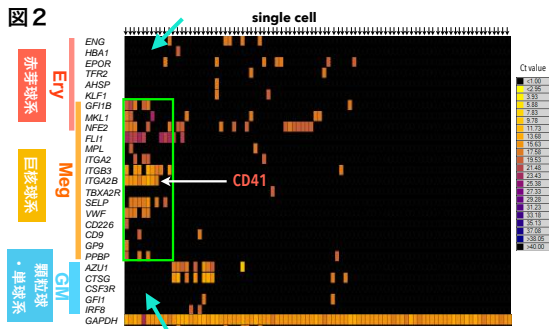
(1) MegP の同定と機能の解明

まず我々は、高感度シングルセル遺伝子発現解析を用いて、正常骨髓細胞の造血幹/前駆細胞分画に存在する細胞一つ一つの特徴を明らかにすることで、MegPを探索することにした(図1)。

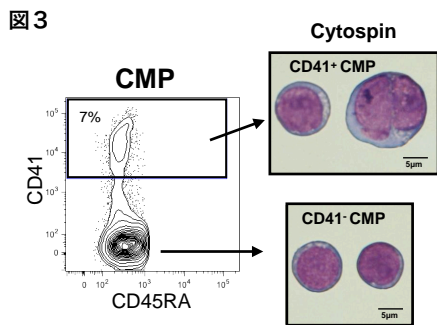


“巨核球らしい”遺伝子を発現している最上流の細胞を探索する

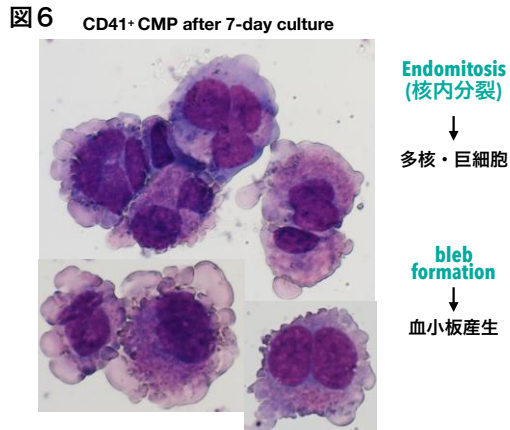
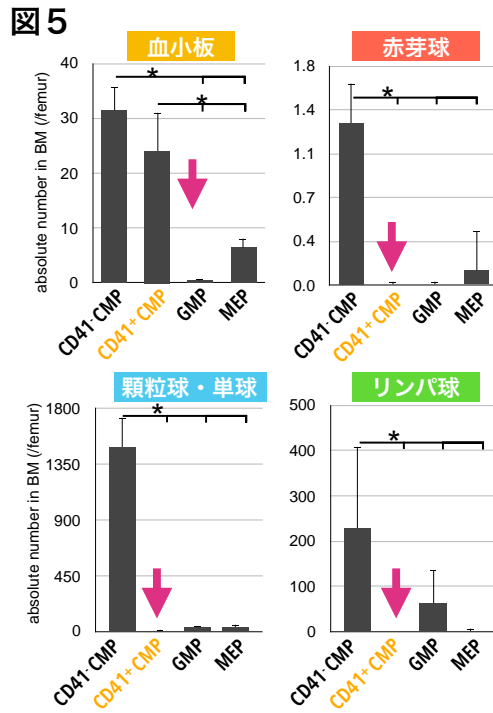
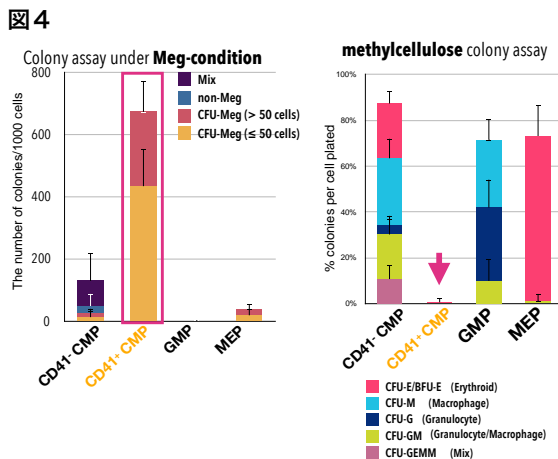
これまで MegP に分化すると考えられていた MEP の大部分は、専ら赤芽球系統特異的な遺伝子を発現していることから、MEP 自体が大きく赤芽球系統にコミットした細胞集団であることが示唆された。驚くべきことに、MEP の上流に位置し、更に未分化である骨髓球系共通前駆細胞(CMP)内の一部に、既に巨核球系細胞への分化に必要な遺伝子を特異的に、かつ高レベルに発現する細胞クラスターを発見した。これらの細胞を前向きに同定するため、最も普遍的に発現している細胞表面マーカー遺伝子として CD41 に着目した(図2)



CD41 の発現は、造血幹細胞/前駆細胞のうち CMP の一部 (5-10%) にのみ限定的に認められ、HSC や MEP では認められなかった。これら CD41+ CMP は骨髄芽球様の幼若な形態を呈しながら、一部は巨核球の特徴の一つである endomitosis の特徴を有していた (図3)。



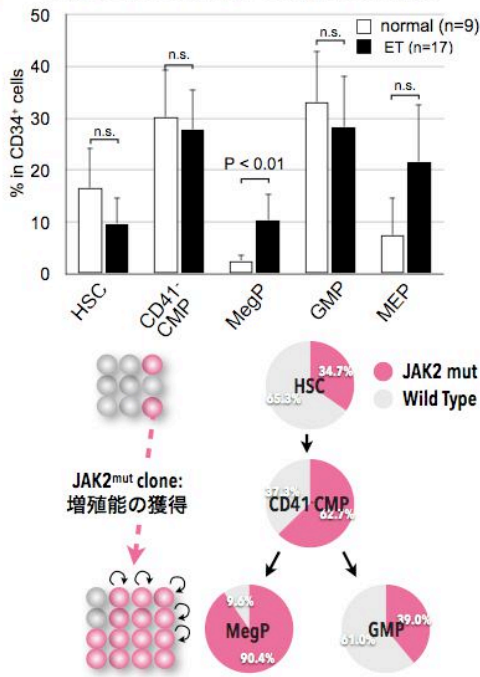
続いて、この細胞の分化機能を検証した。in vitro (図4)、及び超免疫不全マウス (BRGSK) を用いた in vivo (図5) での分化能解析において、CD41+ CMP は巨核球系統への強い分化能を示す一方、巨核球系以外への分化能を完全に失っていたこと、またこの細胞が産み出す細胞は一樣に endomitosis や bleb formation といった巨核球特異的な形態変化を持ち合わせていた (図5) ことから、これらが HSC から巨核球系統への分化を運命づけられた細胞、すなわち MegP であると考えた。網羅的遺伝子発現解析や lineage tracing assay の結果も併せて、MegP は、これまで巨核球の供給源と思われていた MEP とは独立した、ヒト巨核球造血の主要経路と考えられた。



(2) MegP の疾患における機能の解明

MegP が病的造血においてどのような意義があるのかを検討するため、骨髄増殖性疾患の1つであり、末梢血中の血小板が異常に増加する疾患である本態性血小板血症 (ET) の患者骨髄を用いて解析を行った。図7上に示す通り、MegP はET患者で劇的に、かつ特異的に増加していることが明らかになった。また同疾患の driver 変異である JAK2V617F 変異が、各造血幹前駆細胞集団にどの程度蓄積しているかを解析した。すると、HSC ではその頻度は2~3割程度だったのに対し、MegP では顕著な蓄積が認められた。これらの結果から、JAK2変異クローンが HSC の段階で存在しているにもかかわらず、この分化段階では正常 HSC を凌駕するだけの増殖能を持ち合わせず、MegP の段階になって初めてその高い増殖能を獲得することが考えられ、MegP が ET の病態形成に関与する可能性が示唆された (図7下)。

図7 骨髓 CD34⁺ 細胞分画中のMegP割合の変化



5. 主な発表論文等
 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)
宮脇恒太、次郎丸高志、岩崎浩己、赤司浩一.
 Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis. 査読有. Blood. 2017; 129: 3332-3343.
 doi: 10.1182/blood-2016-09-741611

6. 研究組織
 研究代表者
 宮脇 恒太 (MIYAWAKI, Kohta)
 九州大学病院・遺伝子細胞療法部・助教

研究者番号 : 50774709

(3) MegP 特異的な lncRNA の同定とその機能解析

巨核球造血 (正常・異常) における、lncRNA の機能を明らかにするために、網羅的遺伝子発現プロファイルを行い、MegP で特異的発現している lncRNA を、バイオインフォマティクスの手法を用いて同定した。このうち、統計学的に最も有意に発現が亢進している lncRNA に注目 (lnc_X、及び lnc_Y) した。これらの lncRNA は、ET 患者のセルラインにおいて高い発現を認めた。さらに、通常技術的に難しい lncRNA のノックダウンを、LNA GapmeR 技術を用いて行い、セルラインに与える検証した。その結果、当該 lncRNA の発現が抑制されていることを確認し、それらが ET セルラインの増殖を抑制していることを示した (図8)。以上の結果より、MegP に特異的に発現している lncRNA がその増殖を制御している可能性が示された。

図8

