

令和元年6月11日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16200

研究課題名(和文) 単一細胞解析から解き明かす加齢造血幹細胞の自己複製プログラムの亢進

研究課題名(英文) Study of aged hematopoietic stem cells through single-cell RNA-sequencing

研究代表者

小林 央 (Kobayashi, Hiroshi)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：10749542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は様々な月齢段階の造血幹細胞で、各群50-90細胞分のトランスクリプトームを取得した。若齢の造血幹細胞と加齢した造血幹細胞は遺伝子発現では明確に異なるクラスターを形成するがそれぞれのグループ内では均一な細胞集団であった。すなわち造血幹細胞は加齢に伴って集団の各細胞が一様な質的变化を起こすことが見出され、その分子メカニズムとしては造血幹細胞の自己複製を制御する遺伝子プログラムの発現亢進が示唆された。培養ストレスと造血幹細胞の加齢変化との共通点を探るため、培養条件を再検討し、高脂質濃度、低サイトカイン、低酸素の条件が造血幹細胞を静止期に維持する必要最低限の要素であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞は骨髄内において、静止期に維持されることを特徴としており、生涯に渡る造血能を維持する役割を担っている。造血幹細胞は長寿命であるものの、加齢に伴い造血再構築能および正常な分化能を徐々に失い、白血病などの造血器悪性腫瘍の発生源となる。本研究によって造血幹細胞の細胞集団が単一細胞レベルで均質に変容していくこと、その分子メカニズムとして造血幹細胞の自己複製因子が関わっていることを明らかにした。さらに造血幹細胞を体外で生体内と同様に維持する培養法を見出したことで、今後の加齢造血幹細胞の研究や、加齢に関連する造血器疾患の治療薬の研究開発にも有用な方法論を報告できた。

研究成果の概要(英文)：The applicants obtained transcriptomes of 50-90 hematopoietic stem cells at various ages. Younger hematopoietic stem cells and aged hematopoietic stem cells formed distinct clusters in gene expression, but exhibited homogeneous cell populations within each group, suggesting that hematopoietic stem cells undergo uniform qualitative changes during the aging process. Elevated expression of self-renewal genes and TPO-related genes were observed. In order to explore common mechanisms underlying the functional decline during aging and in vitro culture, the culture conditions were re-examined, and high lipid concentration, low cytokines, and hypoxia were found to be the minimum requirement for maintaining hematopoietic stem cells in a quiescent state.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞 ステムセルエイジング 単一細胞RNAシーケンス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は加齢に伴い造血再構築能および正常な分化能を徐々に失う。その一方、骨髄中の幹細胞の総数はヒトとマウスのいずれでも増加する。こうした加齢過程の造血幹細胞の機能低下と数的増加の要因を明らかにすることは、加齢関連血液疾患(易感染性、慢性貧血、造血器悪性腫瘍)の克服に資する重要な研究課題である。高齢者では、**DNMT3A** や **ASXL1** などの造血幹細胞レベルの体細胞遺伝子変異が生じる結果、**10%**程度の高齢者でクローン造血 (**Genovese G et al. NEJM. 2015**) が起こることから造血幹細胞の加齢変化の一部は遺伝子変異により説明できる可能性がある。その一方、大部分のヒト高齢者で造血幹細胞数の増加とリンパ球分化の低下を呈することから (**Pang WW et al. PNAS. 2011**)、加齢に伴い遺伝子変異によらない変化が造血幹細胞に生じていることが示唆されている。しかし、加齢造血幹細胞集団の機能変化が、「正常機能を持つ造血幹細胞の数的な減少」なのか、「全ての細胞の性質の一様な変化」なのかは明らかではない。

申請者はこれまでの研究で感染ストレスが造血幹細胞数を減少させるとともに、細胞分裂を促すことを示してきたが (**Cell Rep. 2015, Exp Hematol 2016**)、造血幹細胞に加齢変化をもたらす要因は未だに明らかでない。そこで、これらの予備検討で得られた転写因子-エピジェネティック因子相互作用の意義を解明し、細胞分裂と造血幹細胞の加齢変化の関連を検証することで造血幹細胞の加齢形質を誘導する遺伝子プログラムを解き明かすことを目的とした本研究計画を着想した。

2. 研究の目的

・加齢造血幹細胞の自己複製亢進を制御する転写因子・エピジェネティック機構
上述した自己複製関連遺伝子 **Pbx1** と **Gata2** がどのように加齢造血幹細胞の自己複製能亢進や分化能異常につながっているか詳細に明らかにする必要がある。また現時点でこれらの転写因子の相互依存関係が明らかになっていないため、**Pbx1** および **Gata2** の発現を制御する転写因子について、加齢で発現変動する遺伝子群 (**AP-1** 複合体、**Ets** ファミリー遺伝子等)を中心に解析の幅を広げて、転写因子ネットワークとして加齢造血幹細胞の自己複製プログラムを明らかにする。また加齢形質をエピジェネティック因子 **G9a/GLP** および **Dot1l** が制御する遺伝子群を、クロマチン免疫沈降-シーケンズを含め網羅的に解析し、自己複製プログラムと造血幹細胞の分化異常の関係を理解する。さらにこれらの因子が **in vivo** で加齢に影響するかどうか検証するために **G9a** ノックアウトマウスおよび **GLP** 高発現マウスを用いて造血幹細胞の自己複製能と分化能を評価する。

・細胞分裂履歴と造血幹細胞の加齢との関係

造血幹細胞の細胞分裂履歴を **GFP** 蛍光の高低で(高:未分裂、低:分裂履歴あり)評価可能な1年齢の **Scl-tTA:H2B-GFP** マウスを用いて **in vivo** における細胞分裂の有無が造血幹細胞の加齢に及ぼす影響を **scRNA-seq** で評価する。特に分裂履歴のある加齢造血幹細胞において自己複製プログラムのパターンが変わるか(例えば、分裂前の造血幹細胞は均一な遺伝子発現プロファイルを有していたのに対し、分裂を経た細胞は自己複製プログラムがより亢進した細胞集団と自己複製プログラムが低下した細胞集団に二極化するのか、あるいは一様に自己複製能が亢進する/低下するかなど)を評価する。これにより細胞分裂をしない造血幹細胞が加齢に関わるのかそれとも細胞分裂

をした細胞が加齢に関わるのか、あるいは両者ともが関与するのかを明らかにする。

造血幹細胞の加齢形質回復法の開発

短期間の **G9a/GLP** 阻害薬処理および **Dot1L** 阻害薬処理が加齢造血幹細胞の性質を一部若齢化させることを見出している。そこで、造血幹細胞-間葉系細胞共培養系を用いて、加齢造血幹細胞が若齢に近い分化能（リンパ球、赤血球分化能の亢進）を示すよう両薬剤の濃度、投与期間を最適化する。更にその条件下で造血幹細胞移植後の赤血球分化能およびリンパ球分化能を若齢幹細胞と同程度まで改善することが可能であるか検証する。

3. 研究の方法

造血幹細胞の加齢過程における経時的な単一細胞トランスクリプトーム解析

10 週齢マウスと 2 年齢マウスの予備的な scRNA-seq 解析から、造血幹細胞の加齢は機能的な幹細胞の減少ではなく、幹細胞集団全体の均一な変化であることが推定され、内在する自己複製プログラムの亢進が示唆された。本研究期間中に中間年齢段階（6 ヶ月、1 年齢、1.5 年齢）の個体での scRNA-seq 解析を本研究課題で実施する。これにより造血幹細胞集団の加齢変化の遷移状態を明らかにする。特に、中間年齢において、少数の加齢遺伝子プログラムを持つ造血幹細胞が出現してそれらが増幅するのか、全ての細胞が一様に遺伝子プログラムを徐々に変化させていくのかに着目して解析する。特に前者の場合は加齢に伴い造血幹細胞のクローン選択が行われていることを示唆するデータとなる。

Scf-tTA:H2B-GFP マウスによる細胞分裂履歴が造血幹細胞の加齢形質に影響するかの解析

Scf-tTA:H2B-GFP マウスはドキシサイクリン(Dox)投与によって造血幹細胞が分裂するたびに幹細胞の GFP の蛍光が低下するマウス系統であり、GFP 蛍光で造血幹細胞の分裂履歴を評価可能である。1 年齢の本マウスに Dox を投与し 10 週継続したうえで造血幹細胞集団を GFP^{high} (分裂回数が少ない、あるいは無し)および GFP^{low} (分裂回数が多い)に分ける。それぞれの造血幹細胞集団を単離し、単一細胞 cDNA ライブラリーを調整し、index 付加後 scRNA-seq を行う。造血幹細胞の加齢特徴的な遺伝子プログラムが分裂履歴に影響するのかが評価される。また、加齢と造血幹細胞の分裂頻度の関係を調べるため、若齢から 2 年齢に至るまで同マウスを Dox 投与後継時的に造血幹細胞分画の GFP 陽性細胞の割合を解析していく。

4. 研究成果

私たちは若齢から高齢に至るまでに造血幹細胞の遺伝子発現プロファイルが細胞ごとにどのように変遷していくかを明らかにするため、**10週齢**、**7ヶ月齢**、**12ヶ月齢**、**18ヶ月齢**および**24ヶ月齢**の各加齢段階の造血幹細胞に対して単一細胞 **RNA シークエンス (scRNA-seq)** を実施し、経時的な変化を解析した。**10週齢**から**2年齢**に変化する時点で**1.5倍以上**の発現変化を認める**383**遺伝子に対して主成分分析を実施した(図1)。

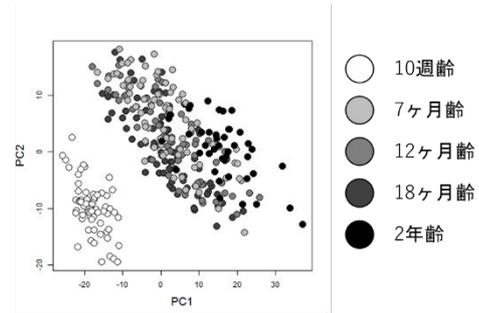


図1. 若齢および加齢(A)造血幹細胞のscRNA-seqの結果の主成分分析結果。造血幹細胞は7ヶ月齢から加齢様プログラムへと変化している。

その結果**10週齢**と**7ヶ月齢**以上の造血幹細胞は別々のクラスターを形成し、**7ヶ月齢**以降では明確なクラスターに分かれなかった。これは、加齢に特徴的な遺伝子発現プロファイルが、実際の個体の加齢よりもかなり早期に起こっていることを示唆している。また、加齢に伴いクラスターはより大きな広がりを見せており細胞ごとの遺伝子発現の多様性は増加している

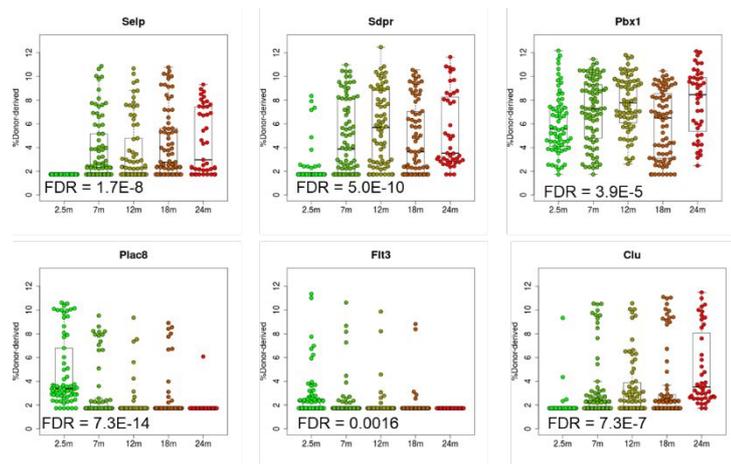


図2. 加齢に伴い発現変動する遺伝子。ANOVAによりP値を算出した後、FDRをStoreyの方法で算出した。

と考えられる。特に加齢変化を特徴付ける第一主成分(**PC1**)を特徴付ける個々の遺伝子発現を見ても、加齢造血幹細胞に高発現する**Selp**や**Sdpr**などは**7ヶ月齢**から発現が上昇しており、以降明瞭な違いは認めない(図2)。

10週齢と**2年齢**の造血幹細胞に限って、scRNA-seqのデータを用いて **gene set enrichment analysis (GSEA)** を実施したところ、**2年齢**の造血幹細胞では、分化した前駆細胞である多能性前駆細胞より未分化な造血幹細胞で発現する遺伝子が**10週齢**造血幹細胞に比較して **enrich** していたことから、加齢に特徴的な遺伝子発現プロファイルはより高い未分化性を示すことが示唆された(図3)。

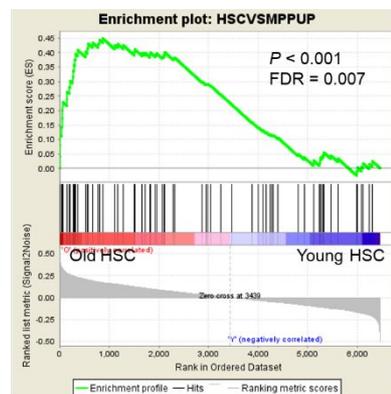


図3. 2年齢造血幹細胞 (Old HSC) と10週齢造血幹細胞 (Young HSC) のscRNA-seqによる遺伝子発現を比較した Gene set enrichment analysis. 遺伝子発現セットは造血幹細胞と多能性前駆細胞を比較して造血幹細胞に多く発現する遺伝子群。

細胞分裂履歴を評価できる **H2B-GFP** マウスを用いて、1 年時点から **10 週間** ドキシサイクリンを投与することで、この **10 週間** の間に細胞分裂した造血幹細胞が分裂していない細胞と比較してどのような遺伝子発現プロファイルの相違があるかを **scRNA-seq** によって検証した。細胞分裂した造血幹細胞は娘細胞へヒストンが分配されるため、**H2B-GFP** シグナルが細胞分裂に伴う希釈によって減弱することを用いる。**H2B-GFP** シグナルが強い細胞 (**H2B-GFP-High**) と弱い細胞 (**H2B-GFP-Low**) を比較した。**H2B-GFP-Low** の細胞は **PC1** について **10 週齢** と **2 年齢** の中間段階にあり、**PC2** については **10 週齢** および **2 年齢** と比較して低値を示した (図 4)。両者の違いは、**Mcm2**、**Mcm6** の上昇や **Ly6a(Sca-1)**、**Fos** の発現低下が顕著であった (図 5)。一方加齢関連遺伝子の上昇は **Pbx1** および **Clu** にのみ見られ、**Selp** や **Sdpr** の発現に相違はなかった。**Mcm** の発現上昇は加齢変化では認められないことから、細胞分裂の影響は短期的には加齢様変化よりもむしろ細胞分化に関連していた。

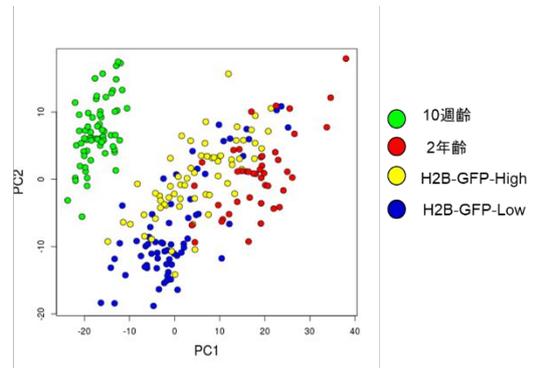


図4. 10週齢、2年齢の造血幹細胞および、12ヶ月齢から14.5ヶ月齢までの間に分裂履歴のある細胞 (H2B-GFP-Low) および分裂履歴のない細胞 (H2B-GFP-High) を主成分分析にて図示。

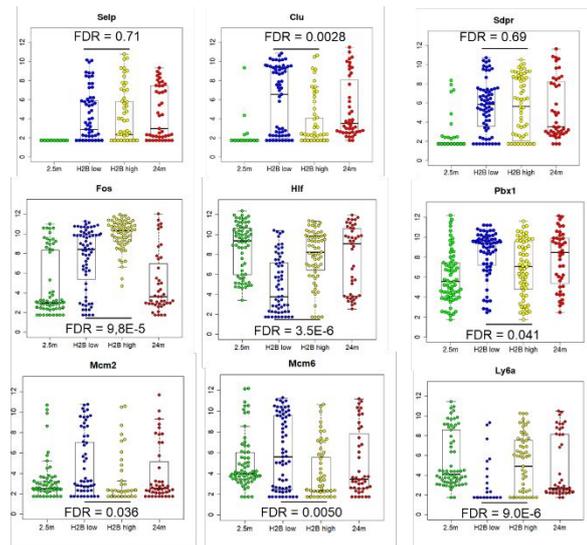


図5. H2B-GFP low (青) と H2B-GFP-High (黄) の造血幹細胞の scRNA-seq 遺伝子発現。H2B low と H2B high の間で検出された遺伝子について検定を行いその後 Storey の方法で FDR を算出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Kobayashi Hiroshi, Morikawa Takayuki, Okinaga Ayumi, Hamano Fumie, Hashidate-Yoshida Tomomi, Watanuki Shintaro, Hishikawa Daisuke, Shindou Hideo, Arai Fumio, Kabe Yasuaki, Suematsu Makoto, Shimizu Takao, Takubo Keiyo
Environmental Optimization Enables Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo. Cell Reports, in press.

Watanuki Shintaro, Kobayashi Hiroshi, Sorimachi Yuriko, Yamamoto Masamichi, Okamoto Shinichiro, Takubo Keiyo

ATP turnover and glucose dependency in hematopoietic stem/progenitor cells are increased by proliferation and differentiation

Biochemical and Biophysical Research Communications, in press

田久保 圭誉、森川 隆之、小林 央

異常造血と幹細胞ニッチ, 臨床血液, 2018; 1844-1850

[学会発表] (計 3 件)

Shintaro Watanuki, Hiroshi Kobayashi, Daiki Karigane, Yukako Ootomo, Ayumi Okinaga, Shinichiro Okamoto, Keiyo Takubo
Age-Dependent Decrease in Requirement for Glycolysis in Hematopoietic Stem Cells.

61st ASH Annual Meeting & Exposition, 2018

Shintaro Watanuki, Hiroshi Kobayashi, Daiki Karigane, Yukako Ootomo, Ayumi Okinaga, Shinichiro Okamoto, Keiyo Takubo

Glycolytic addiction of hematopoietic stem cells is modulated by age and cell cycle status.

第 80 回日本血液学会学術集会, 2018 年

Okinaga A, Kobayashi H, Takubo K.

The acceleration pattern of RhoA-dependent motility is a parameter to distinguish HSCs from MPPs.

第 79 回日本血液学会学術集会, 2017 年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：造血幹細胞を維持培養するための培地、及びそれを用いた培養方法

発明者：小林 央、田久保圭誉

権利者：小林 央、田久保圭誉

種類：特許

番号：特願 2018-100036

出願年：2018 年

国内外の別：国内

取得状況(計 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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。