

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02843

研究課題名(和文)造血発生における組織横断的造血幹細胞動態の理解

研究課題名(英文) Understanding of hematopoietic stem cell trafficking across developmental hematopoietic organs

研究代表者

滝澤 仁 (TAKIZAWA, Hitoshi)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授

研究者番号：10630866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：体性組織の一つである造血システムでは、大動脈・性腺・中腎領域(AGM)領域で血液産生の源である造血幹細胞が誕生し、胎盤、胎児肝、脾臓を経て、誕生直前には最終的な成体造血の場である骨髄へと移行する。本研究では、造血幹細胞が骨髄に生着するダイナミクスに注目し、誕生直後の発達期にある骨髄に異なる機能をもった造血幹細胞を同定し、数理モデルにより増殖・分化・遊走の割合を計算した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は成体末梢血中に常時遊走している造血幹細胞の生理学的機能、髄外造血の機序、骨髄移植後の骨髄再建能の効率化に向けて有用な知見をもたらすと期待される。

研究成果の概要(英文)：In hematopoietic system, one of somatic tissue, blood forming hematopoietic stem cells (HSCs) are born in aorta-gonad-mesonephros (AGM) region, and migrate to bone marrow (BM) through multiple organs where adult hematopoiesis is maintained. This project focused on dynamics of HSC colonization in BM, identified HSC subset with different function, and calculated proliferation/differentiation/migration using mathematical model.

研究分野：血液学、幹細胞学

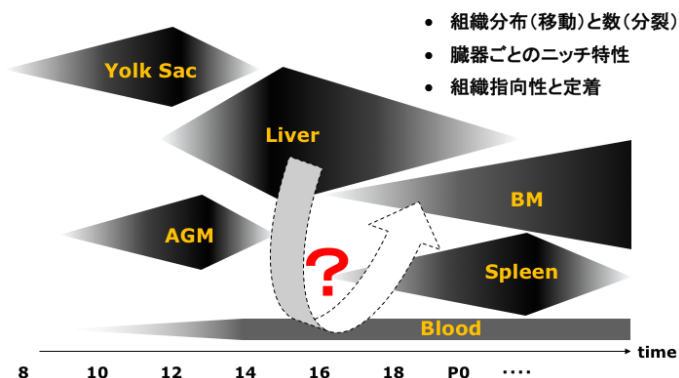
キーワード：造血幹細胞

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

体制組織の一つである造血システムでは、大動脈・性腺・中腎領域(AGM)領域で血液産生の源である造血幹細胞が誕生し、胎盤、胎児肝、脾臓を経て、誕生直前には最終的な成体造血の場である骨髄へと移行する(Wang LD, Nat Rev Mol Cell Biol 2011) (図1)。具体的には、胎児 12.5 日目から始まる肝臓での造血が 16.5 日目をピークに、末梢血管を経て脾臓や骨髄へと移行していく。その後、誕生以降に渡り骨髄では造血幹細胞の数が増加していく一方、脾臓では一過性に増加するものの最終的には減少すると考えられる(Coşkun S, Cell Reports 2014; Morrison SJ, PNAS 1995) (図1)。その発生過程において造血幹細胞は非常に活発な自己複製分裂を繰り返し、その数を指数関数的に増加させるが、生後 3-4 週間目で非細胞分裂である静止期(G0)に移行した後は数ヶ月に 1 度の頻度でしか自己複製分裂を行わない(Bowie MB, JCI 2006 ; Takizawa H, Ann NY Acad Sci 2012)。成体では、ほとんどの造血幹細胞は骨髄に局在してニッチシグナルを受けて機能が維持されているが、常に約 1%の造血幹細胞は非分裂状態のまま骨髄外に動員され、末梢血中を遊走している (Wright DE, Science 2001 ; Bhattacharya D, JEM 2006 and 2009)。一方、感染や炎症などの造血ストレスがある場合には、末梢組織での免疫細胞の消費に伴い造血幹細胞も活性化し、一過性に末梢組織への遊走、細胞分裂および分化することができる(Takizawa H, Blood 2012)。

図1 造血発生過程における造血幹細胞の組織分布と数の動態
— 組織横断的造血幹細胞移動の制御メカニズム—



2. 研究の目的

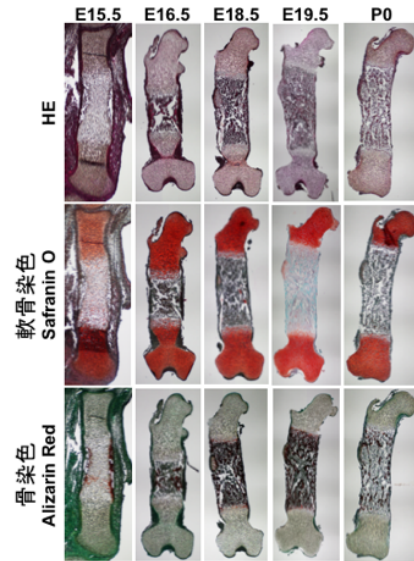
本研究では、造血発生過程における造血幹細胞 (HSC) の多臓器間遊走や定着に着目して、体性組織の成り立ちと運命決定を理解する。個体の誕生前後での骨髄造血の始まりは古くから知られた事実であるが、それを制御する細胞性・分子性メカニズムについては分かっていない。成体で見られる一過性の造血幹細胞遊走と異なり、発生過程に特異的なダイナミックな造血幹細胞動態、つまり組織分布 (移動) と数 (分裂) に注目し、組織ごとのニッチ特性、組織指向性と定着のメカニズム、その過程の運命決定メカニズムを細胞移動、組織内局在、細胞分裂・分化の観点から紐解いていく。当研究室がもつ固有な実験材料 (造血幹細胞トレーサーマウス) や最新実験技術 (シングルセル RNA-seq やマスサイトメーター) を適材適所に活用し、これまで困難であった希少な細胞集団の機能特性をシングルセルレベルで解析する。また、複数の学問分野で活躍する国内外の専門家と実質的な共同研究を進めることで、効率的に学際的研究を展開する。本研究で目指す、発生過程で見られる造血幹細胞動態の理解は、成体末梢血中に常時遊走している造血幹細胞の生理学的機能、髄外造血の機序、骨髄移植後の骨髄再建能の効率化に向けて有用な知見をもたらすと期待される。

3. 研究の方法

目的1) 胎児期における造血幹細胞の組織転移：胎児期の軟骨および成熟骨形成は胎児期 14.5 日目 (E14.5) に骨髓原基の中心部より始まり、成長板の移動に伴い骨頭部へと拡大していく (図2)。従来の複雑な抗体染色ではなくより簡便に造血幹細胞 (HSC) を同定するため、横溝博士が作製した、HSC に蛍光色素 tdTomato を高発現させたマウス (HLF-Tom) を用いる。これを Nombela-Arrieta 博士ら (チューリッヒ大学) の3次元イメージング法と組み合わせ、ハイスループットかつより高解像度の3次元組織イメージングを行った。

目的2) 胎児期における造血幹細胞の組織間転移の数理モデル化：上述で定量化される造血幹細胞の数と組織分布をもとに、波江野博士 (九州大学) の協力を得て多臓器間細胞動態モデルを作成する。モデルでは実測値である組織分布と数、変動パラメーターとして細胞移動、増殖、分化、相対ニッチシグナル強度を設定し、シミュレーションにより造血幹細胞の動態制御および臓器シグナルの方向性と強度を推定する。

図2 胎児期骨形成のようす



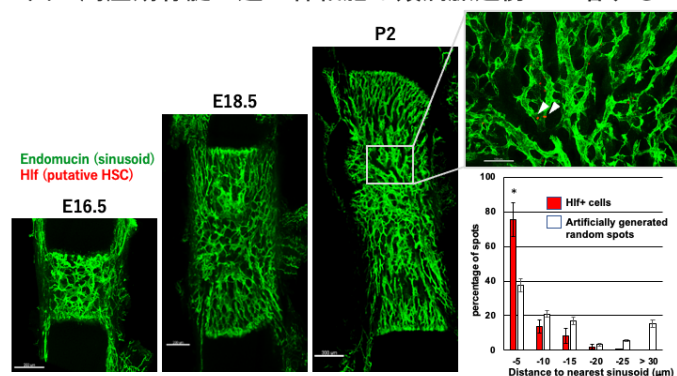
4. 研究成果

目的1) 胎児期における造血幹細胞の組織転移

周産期の骨髓形成は胎生 14.5 日目 (E14.5) に骨髓原基の中心部より始まり、成長板の移動に伴い骨頭部へと拡大していく (未発表データ)。従来の複雑な抗体染色ではなくより簡便に HSC を同定するため、HSC に蛍光色素 tdTomato を高発現させたマウス (以降 HLF-Tom マウス) を作製した (Yokomizo T, JEM 2019)。このマウス骨髓を Nombela-Arrieta 博士ら (チューリッヒ大学病院、2018 年 JSPS 外国人招聘事業で招聘) の3次元イメージング法 (Gomariz A, Nat Commun 2018) で

観察し、より高解像度の3次元組織イメージングを行った。その結果、胎児骨髓では E18.5 の時期に骨外骨膜辺縁部に HLF-Tom 陽性 HSC のコロニー集積を認め、生後 2 日目 (P2) の髄内では 80% の HSC が類洞脈近傍に接着している様子が観察された (図3 一番右側の拡大図中の矢印とグラフ)。E18.5 では HSC は骨髓へ

図3 周産期骨髓の造血幹細胞は類洞脈近傍に生着する



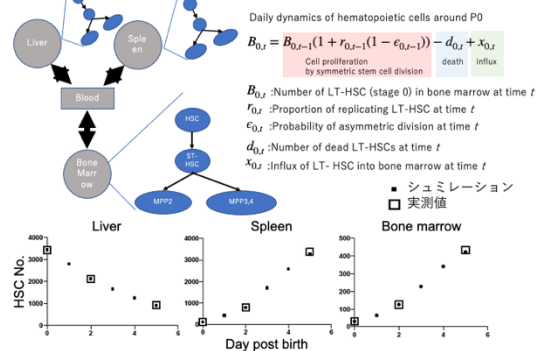
の移行過渡期にあり、骨髓の特定領域に生着することを強く示唆している。P2 骨髓の内外を物理的に分けて FACS 解析及びシングルセル(sc)RNA-seq を行った。得られたデータをケンブリッジ大学の Laurenti 博士に依頼して解析したところ、髄内 HSC はさらに 2 種類の HSC (BMⁱⁿ-HSC1 and -HSC2) に分類されることが明らかとなった。骨髓外の BM^{out}-HSC は遺伝子やタンパクレベルで c-Kit の発現が高いが Sca-1 と CD150 が低く、骨髓移植で生着しないことから前駆細胞に近いものと考えられた。一方、骨髓内の BMⁱⁿ-HSC1 は CD150 の発現が高く c-Kit が低い、いわゆる自己複製能の高い胎児肝 HSC に近い HSC と考えられたが (Grinenko, JEM 2014)、予想に反し

て放射線照射したレシピエントへの生着が成立しなかった。最後に、BMⁱⁿ-HSC2 は c-Kit と Sca-1 とともに発現が高く CD150 が低いにも関わらず、肝臓由来(Liver)の HSC と同等の骨髄再建能を示した。いずれの HSC もシングルセルレベルでサイトカイン存在下(SCF, TPO, IL-3, G-CSF, EPO)で試験管内培養すると、多様な血球コロニーを形成することから多分化能を有していることが確認され、特に BMⁱⁿ-HSC は顆粒球およびマクロファージ分化に、BMⁱⁿ-HSC1 は血小板分化に偏り、BMⁱⁿ-HSC2 は最も未分化な細胞を含んでいた(未発表データ)。

目的 2) 胎児期における造血幹細胞の組織間転移の数理モデル化

組織ごとの造血幹細胞数遷移データをもとに、波江野博士が多臓器間細胞動態モデルを作成する。モデルでは実測値である組織分布と数、変動パラメーターとして細胞移動、増殖、分化、細胞流入を設定し、シミュレーションにより実測値にベストフィットする造血幹細胞の動態制御および臓器への細胞流入の方向性と強度を推定する。予備的シミュレーションでは肝臓からの流出だけでは脾臓や骨髄に生まれてくる細胞数を説明できないため de novo 造血の存在が示唆され(図 4)、骨髄血管から誕生する de novo 造血幹細胞の実験証拠(Yvernogeu L, Nat Cell Biol 2019)と一致した。今後は異なる造血幹細胞集団を想定してそれぞれの分化・増殖速度を予測し、生物学実験で検証する。

図 4 造血幹細胞の臓器間移動の数理モデル



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokomizo T*, Watanabe N, Umemoto T, Matsuo J, Harai R, Kihara Y, Nakamura E, Tada N, Sato T, Takaku T, Shimono A, Takizawa H, Nakagata N, Mori S, Kurokawa M, Tenen DG, Osato M, Suda T	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Hlf expression marks the developmental pathway for hematopoietic stem cells but not for erythroid-myeloid progenitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Exp Med	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Y#, Sezaki M#, Takizawa H	4. 巻 27
2. 論文標題 Development of the Hematopoietic System: Role of Inflammatory Factors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Wiley Interdiscip Rev Dev Biol	6. 最初と最後の頁 e341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/wdev.341	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀬崎真衣子
2. 発表標題 Spatiotemporal coordination of HSC transit and bone marrow remodeling during early hematopoiesis
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬崎真衣子
2. 発表標題 Cross-organ HSC trafficking during definitive hematopoiesis formation
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国際先端医学研究機構 幹細胞ストレス研究室 http://ircms.kumamoto-u.ac.jp/research/hitoshi_takizawa/ 国際先端医学研究機構 幹細胞ストレス研究室 http://ircms.kumamoto-u.ac.jp/research/hitoshi_takizawa/
--

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------