

令和 4 年 10 月 22 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16133

研究課題名(和文) 透明化と単一細胞RNA-seqによる骨髄血管の分類と造血幹細胞ニッチ機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of vascular niche function of hematopoietic stem cells by clarifying and single cell RNA-seq.

研究代表者

辻 真世子(Tsuj i, Mayoko)

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：50808186

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)：本研究では感染症による炎症後には骨髄で血管新生がみられ、種々のangiocrine factorを発現していることがわかりました。そのうちの一つは骨髄修復に必須であり、その他にも造血幹細胞の分化・遊走に関与しているangiocrine factorも見出すことに成功しました。更に血管新生を制御することで、炎症後骨髄修復を促進することもわかりました。これらのことから、炎症後骨髄修復には血管新生がおこり、その際産生されるangiocrine factorが骨髄の修復に必須であるという重要な知見を得ることができました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今まで骨髄血管が炎症後にどの様に骨髄修復にかかわるかを形態学的、機能的に明らかにした報告はありませんでした。本研究では炎症後骨髄修復における血管性ニッチがどの様に骨髄修復に関わるかを明らかにしました。炎症後に造血異常がみられることがあり、血管新生やAngiocrine factorをターゲットとした治療法の開発につながる可能性が考えられました。

研究成果の概要(英文)：We found that angiogenesis was observed in bone marrow after inflammation due to infection then various angiocrine factors were expressed. One factor was essential for bone marrow repair, and we also succeeded in finding an angiocrine factor that is involved in the differentiation and migration of hematopoietic stem cells. Furthermore, we also found to control angiogenesis promotes bone marrow repair. These results suggest that angiogenesis and the angiocrine factor produced at that time is essential for post-inflammatory bone marrow repair.

研究分野：血液内科学、血管生物学、呼吸器内科学

キーワード：造血幹細胞ニッチ 血管新生 PAMP 炎症 血球 造血 Angiocrine factor

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、ニッチと呼ばれる周辺微小環境によって維持されることで自己複製能と多分化能を維持する。ニッチは細胞成分であるニッチ細胞(間葉系幹細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、血管内皮、巨核球などの血球細胞)や酸素分圧、各種のサイトカインや接着分子などのニッチ因子によって構成される。研究代表者の所属研究室ではこれまでに、骨髄ニッチの構成要素とニッチによって制御される造血幹細胞の代謝特性について明らかにしてきた。例えば分化した血球細胞である巨核球や肥満細胞がサイトカインを供給する新たな造血幹細胞ニッチとして働く可能性があることを報告している(Kobayashi et al., *Blood* 2014, Nakamura-Ishizu & Takubo et al., *J Exp Med* 2015)。さらに、非細胞性のニッチ因子として骨髄の低酸素環境が、造血幹細胞の過剰な細胞周期の進行を抑制し細胞老化を防いで、生涯に亘り造血を維持していることを同定した(Takubo et al., *Cell Stem Cell* 2010; 2013)。また、移植や抗がん剤投与後など、造血幹細胞が細胞周期静止期を脱して増殖する際には造血幹細胞で p38MAPK ファミリーの p38 α が活性化され、下流で転写因子 Mitf が誘導された結果、造血幹細胞の増殖に必要なプリン体代謝が活性化されることを同定している(Karigane et al., *Cell Stem Cell* 2016)。このように、造血幹細胞ニッチの要素や分子機構については分子遺伝学的な解析が着実に進展している。その一方、ニッチの実際の構造(幹細胞やニッチ細胞の空間的配置)や相互関係については仮説が乱立して未確定の状況である。これは既存の幹細胞ニッチの研究では、主にノックアウトマウス骨髄のフローサイトメーターを用いた時空間情報を失った細胞集団の解析を中心にされてきたことが一因である。また、骨髄ニッチの解析には切片の2次元解析や、限られた細胞種についての長管骨の3次元解析のみが実施されてきたという歴史的背景も原因である。その結果、造血幹細胞と各種のニッチ細胞が骨髄腔内でどの様に空間的配置されているかは議論が多い。これらを解決する方法論として臓器透明化技術による網羅的形態解析が挙げられる。2007年以降、臓器の透明化手法が報告されてきており、透明化の過程における構造の維持、シグナルの維持、透明性等の面で様々な改良法が報告されている。例えば尿素を含む水溶性溶剤を用いた Scale 法、電気泳動で脂質を除去する CLARITY 法が知られているが、蛍光消退や装置の必要性などの問題がある。比較的蛍光を維持して赤血球中のヘムの脱色が可能な CUBIC 法も報告され、ヘムが豊富な骨髄に一見適している試薬も開発された。しかしこうした改良がされても未だ骨を含めた骨髄の透明化は不完全である。

移植や抗がん剤投与後などに造血幹細胞が細胞周期静止期を脱して増殖する際には、造血幹細胞から炎症細胞が誘導されることがわかっている。これまでそのニッチとしての機能は不明であるが、炎症病態での重要性は知られているため、本研究ではその血管ニッチ制御における意義に着目する。炎症細胞は TLR 等を介して、炎症性サイトカインを放出し血管透過性を亢進する。アレルギー炎症時の骨髄においては造血幹細胞から炎症細胞への分化や各種臓器への遊走が誘導されるなど、造血幹細胞が炎症性疾患において重要な役割を担っていることを示唆する報告がされている反面、炎症細胞と造血幹細胞や血管性ニッチの変容に関する研究は十分におこなわれていないため、本研究計画ではこれらの解明も試みた。

2. 研究の目的

本研究計画では、骨髄の透明化技術を改良して、骨髄の蛍光シグナルや抗原性を保持しつつ骨髄深部の観察を達成し、立体像を取得・構築する方法を確立する。本法に基づいて全骨・骨髄血管構造と近傍のニッチの構造、ニッチ因子の局在などの形態学的な解析を *in situ* で実施し、更に各種血管を分離し 1 細胞 RNA シーケンスを行うことで骨髄血管の分類を行う。それらを通じて造血幹細胞とニッチの空間配置や相互作用の分子機構についての深い理解を得る。さらに炎症モデルマウスにおける造血幹細胞と血管性ニッチの変容について形態学的・分子論的情報を取得し、それらがいかに炎症病態に寄与するか解明することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) マウス骨・骨髄の透明化技術を確立する

骨髄の造血幹細胞と造血幹細胞ニッチの局在を解明するために、マウスより大腿骨、腓骨、頭蓋骨を採取し 4%PFA で固定、0.5M EDTA で脱灰をしたのち新規透明化技術 CUBIC に浸漬することで骨・骨髄の透明化を行ったところ、骨髄への試薬の浸透が不完全であることから骨髄の透明化が不十分であった。そこで本研究では試薬やその組み合わせ、処理時間を変更して完全な骨・骨髄透明を行う。透明化したサンプルは Lightsheet 顕微鏡等によって観察を行い解析ソフトにより立体構築を行なって骨髄の細胞配置や形態解析に供する。

(2) 透明化した定常時の骨と骨髄の造血幹細胞・骨髄血管性ニッチの分類を行ない形態学的情報を得る

前項で確立した技術も用いながら透明化したマウス全身の骨を顕微鏡により観察する。本計画期間中には全骨髄血管が標識されたマウスや抗体を用いた免疫染色を行ない、上記で確立した

透明化技術を用いながら長管骨、椎骨、胸骨、頭蓋骨などの全骨髄血管を立体的に分類する。更に造血幹細胞を標識できるマウスを用いて血管と造血幹細胞の時空間的解析を行なうことで、造血幹細胞と血管ニッチの相互作用を明らかにする。得られた大容量画像データを解析プログラムにより細胞社会の関係性を示す定量的な情報へと変換する。

(3) 各種骨髄血管の分離と 1 細胞 RNA シーケンスによる遺伝子発現の解析

(2)で分類した各々の血管を FACS により分離し、ライブラリを作成し 1 細胞 RNA シーケンスを行なうことで、各血管内皮細胞毎に特徴のある分子基盤を同定する。加えて造血幹細胞標識マウスで炎症モデルを作成し、造血幹細胞と各種血管の分離を行い 1 細胞 RNA シーケンスを行うことで、造血幹細胞と血管ニッチのトランスクリプトームの変化を明らかにすることで形態のみならず、遺伝子レベルでの高精度のデータを得る。

(4) 全身性炎症モデルにおけるストレス負荷時造血幹細胞と血管内皮細胞の動態と相互作用の変容を同定する

感染症モデルマウス、およびアレルギーモデルマウスを作成する。感染症モデルは感染前後、アレルギーモデルは感作が成立した時点と抗原暴露した時点について継時的な血液学的解析と新規透明化技術を用いた徹底した細胞の空間配置と相互作用の解析を行う。骨髄中の造血幹細胞や前駆細胞を FACS により数的変容を、1 細胞 RNA シーケンスにより mRNA レベルでの網羅的遺伝子解析を行う。またその際、造血幹細胞から前駆細胞への分化に必要とされ、また増殖幹細胞移植や抗がん剤投与後などに造血幹細胞が細胞周期静止期を脱して増殖する際には活性化する p38MAPK や *Mitf* 等の変動を確認することで、前駆細胞や各種炎症細胞の増殖・発生の分子機構について検証し、またその細胞代謝の変化についても解明する。

4. 研究成果

マウスの骨・骨髄の透明化は脱灰液を Plank Rychlo に変更して完全な骨・骨髄の透明化を達成したが、自家蛍光が強く、顕微鏡によるシグナルの観察には不十分であった。今後は骨髄の自家蛍光を抑える手法を検討する必要がある。

申請者は、マウスに PAMPs を腹腔内投与する事により感染を模擬するモデルを作成し、骨髄・脾臓・末梢血の炎症時の傷害と修復の過程を解析した。その結果、投与後 7 日目を境に血球は修復されることがわかった。血管性ニッチとしての血管内皮細胞を分類する目的で 7 日目の血管内皮をフローサイトメーターにより抽出し、一細胞 RNA シーケンスを行ったところ、新規血管内皮クラスターを同定した。また洞様血管のマーカーである Endomucin により免疫組織染色を行ったところ、血管のリモデリングが生じていた。この過程で新たに生じた細胞が産生する因子のうちの一つをノックアウトしたマウスで感染モデルを作成すると、骨髄修復が遅延することがわかった。更に薬理的に血管新生を制御することで、炎症後骨髄修復を促進することも明らかにした。これらのことから、炎症後骨髄修復には血管のリモデリングがおこり、その際新たに出現した細胞集団から産生される因子が骨髄の修復に必須であるという重要な知見を得ることができた。またその他にも、感染モデルにおいて骨髄内の造血幹細胞の分化・遊走に関与している因子も同定することに成功した。他にも各種の PAMPs による刺激や、細菌による感染症モデル、アレルギーモデルといった炎症モデルマウスを作成し血管の変化を確認したが、いずれも血管新生や Tip cell 様血管内皮は見られず、これらの変化は今回施行した感染モデルで特有に生じるものであることが示された。

以上から、特定の PAMPs による炎症後骨髄修復時には血管のリモデリングがおこり、その際新たに出現した細胞集団から産生される因子が骨髄の修復に必須であるという重要な知見を得ることができた。感染後の骨髄修復において血管のリモデリングや、新規に出現する細胞集団、そしてそこから産生される因子をターゲットとした治療開発につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 辻真世子、田久保圭誉
2. 発表標題 急性炎症後の骨髄修復には Apelin/APJ シグナルが必要である
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 辻真世子
2. 発表標題 急性炎症後の骨髄修復はtip cell由来の アンジオクライン因子が制御する
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会 血管代謝週間2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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