

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06300・19K21388

研究課題名（和文）エピゲノム解析による骨髄ニッチシグナルの解明と骨髄再構築培養法の確立

研究課題名（英文）Elucidation of bone marrow niche signal using epigenome analysis and establishment of bone marrow reconstitution culture method

研究代表者

金澤 三四朗（Kanazawa, Sanshiro）

東京大学・医学部附属病院・客員研究員

研究者番号：60823466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は、MSCを単一細胞レベルでの解析により、間葉系細胞集団の分離を試みた。MSCをscRNA-Seq解析し、遺伝子発現プロファイルから特異性のある7つのクラスターが存在することを確認した。また各クラスターの遺伝子発現プロファイルから、分離可能であることを確認した。また、RNA-SeqおよびATAC-seq解析により7つのクラスターが、独立した細胞集団であることを明らかにした。次に、これらのクラスターのin vitro特性評価をおこなった。その結果、クラスターのいくつかで、幹細胞に類似した機能を有することが分かった。今後はES細胞との直接比較により幹細胞類似細胞集団の同定を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織幹細胞はヘテロな細胞集団であるため、本研究では、先行報告されている骨髄幹細胞マーカーで分離した細胞群には7つの細胞集団が存在することを明らかにし、それぞれが独立した細胞集団であることを証明した。これらのクラスターのうち幹細胞特性に極めて類似したクラスターを同定するため、バイオインフォマティクス解析を行った。結果として、幹細胞類似集団の同定には至らなかったが、特性解析から分化度が低く、分化指向性を有する細胞集団を特定することができたことから、必要な組織への分化誘導が可能なり、また培養することにより必要量を確保できることから、臨床への期待値は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：The author examined to isolate mesenchymal cell populations by analyzing MSCs at the single cell level. The MSCs were analyzed by scRNA-Seq, and seven specific clusters were confirmed from the gene expression profile. In addition, each cluster were confirmed that they could be separated using FACS from the gene expression profile. Furthermore, author revealed that seven clusters were independent cell populations by RNA-Seq and ATAC-seq analysis. Next, author performed in vitro characterization of these clusters. As a result, aauthor found that some of the clusters had a function closely stem cells. Author aim to identify stem cell-like cell populations by direct comparison with ES cells in the future.

研究分野：再生医学

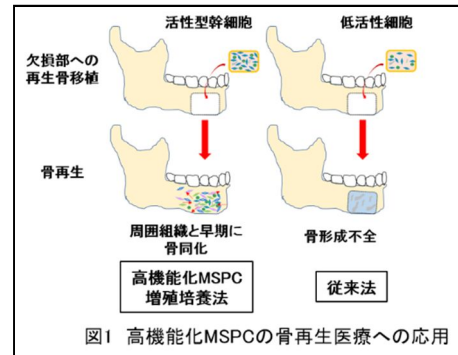
キーワード：骨髄 多能性前駆細胞 幹細胞niche single cell RNA-seq RNA-seq ATAC-seq

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹/前駆細胞 (MSC) はその多くが骨髄中に存在し、造血幹/前駆細胞 (HSC) や幹細胞を中心とした niche と呼ばれる微小環境に存在する niche 構成細胞との相互作用により骨髄の維持、安定に寄与している [Mendez-Ferrer 2010 Nature]。また、損傷等で生じた環境変化により MSC は様々な間葉系組織へ分化することが知られていることから、MSC の多分化性を利用した骨再生医療研究が盛んにおこなわれている。しかし、骨髄幹細胞の特性維持に關与する niche 構成細胞やシグナルについては未知の部分が多い。また、これまでに MSC を FACS で分離することが可能となったが、分離後より直ちに分化していき、培養によりその特性の著しい低下を来すため [Caplan 2017 Stem Cells Transl Med]、MSC を用いた臨床導入の実現はとても厳しい [Caplan 2013 A Gene Therap]。これらの課題を解決するためには、効率的に MSC を分離するためのマーカーを同定する必要がある。また、培養 MSC を足場に搭載し作製する再生骨の移植部への生着成功の鍵は、in vitro において幹細胞特性を維持するための培養法を確立することである。したがって、MSC を構成する niche の中心的役割を果たす造血 (HSC) -間葉 (MSC) 相互作用をもとに、MSC の自己複製と特性維持の分子機序を解明し、特性を維持する増殖培養法が確立できれば、口腔外科領域においても再生医療の適応範囲が飛躍的に拡大すると考えた (図 1)。



### 2. 研究の目的

外傷、口腔癌といった口腔外科疾患を原因とした顎・顔面骨の欠損、機能低下により QOL の著しく低下した患者に対する標準的治療として自家骨移植が行われるが、患者侵襲や採取骨量の限界のため、新たな治療法として、MSC を用いた骨再生医療の導入が期待される。しかし、MSC は生体内より分離した直後から分化を始め、増殖・分化能が著しく低下することから、中～大型骨欠損に対する治療に用いることは現状、不可能である。今後、骨再生医療のさらなる発展には、永続的に MSC 特性の維持した in vitro 培養技術の開発が急務となる。同技術が確立できれば口腔外科における骨再生医療が飛躍的に発展・拡大すると考える。

近年、骨髄 HSC niche 研究の進歩により、間葉系を主体とした niche 構成細胞が HSC の特性維持安定に重要であり、骨髄微小環境の変化により細胞間相互作用から、分化指向性の決定、自己複製制御等の細胞動態を調節すると示唆されている [Evans 2017 Cell Stem Cell]。申請者は、niche を構成する、それぞれ役割を持つ特定細胞に対して、そのマスターレギュレーターとなる MSC によって誘導される幹細胞シグナルが存在すると着想した。しかし、現在有用とされているマーカーを用いた分離法では MSC specific に分離することはできない。したがって、骨髄における MSC 細胞間に存在する幹細胞の同定および niche 構成細胞の特定、また、これらの細胞と HSC との相互作用および関連シグナルを解明することであり、in vitro において高機能化 MSC の増殖培養法の開発と、最終的な骨再生医療の発展の一助となることである。

### 3. 研究の方法

本研究の目的は、ES、iPS 細胞の核内ゲノム構造を指標にして、骨髄 MSC のゲノム構造変化との比較により、MSC 特性制御に関わるゲノム領域およびシグナルの特定と、このシグナルを活用した高機能化 MSC の in vitro 増殖培養法を確立し、骨再生医療への展開を目指すことである。そのため、以下の研究を期間内 (平成 30 年-31 年、2 年間) に実施した。

- ・マウス骨髄中に存在する niche 構成間葉系細胞集団の特定
- ・特定間葉系細胞集団の分離マーカーの同定と遺伝学的特性解析
- ・間葉系細胞集団と HSC との共培養系による幹細胞シグナルの同定
- ・シグナル分子を活用した高機能化 MSC 増殖培養法の確立

#### 平成 30 年度の計画

##### 1) マウス骨髄中に存在する niche 構成間葉系細胞集団の特定

現在、CD31, 45, Ter119 陰性、Sca-1, PDGFR- 陽性で分画される細胞 [Matsuzaki 2012 Nat Protoc] が MSC 分離に有用とされているが、分離した細胞のうち 10-20% 程度しか MSC は存在しないことから [Morikawa 2009 J Exp Med]、これらの細胞集団は MSC 以外の間葉系細胞も混在す

る。したがって、分離した細胞集団を single cell レベルで解析することにより、間葉系細胞集団 (Mesenchymal Cell Population, MCP) を分離することが可能となる。上記マーカーで分離した細胞を基に、single cell RNA-Seq (10X Genomics Chromium 社) 解析をおこない、また、遺伝子発現プロファイルから特異性のある集団を分類した。(図2)

## 2) 特定間葉系細胞集団の分離マーカーの同定と遺伝学的特性解析

1)の各集団における上記網羅的遺伝子発現解析から、2倍以上発現増減した遺伝子を選定し、集団特異的マーカーの検索をおこなった。得られたいくつかのマーカーの組み合わせから、FACSにて集団を分離可能か検討した。方法は、まずマウスより摘出した大腿、脛、腸骨を細切、0.2%コラゲナーゼ処理し単離した骨髓細胞をマーカーで染色したのち、セルソーター (BD Bioscience, FACS Aria Fusion) を用いてシングルセルで分離した細胞に対して、コロニー形成能試験をおこない、また、コロニー形成能した細胞に対し3系統分化能評価をおこない、これらの結果をもとに、最終的に分離マーカーの同定をおこなった。

次に、分離した各細胞集団の細胞内に含まれる mRNA 分子を網羅的かつ定量的に解析し、転写産物のリード数から遺伝子発現量を定量化し、同時にその配列情報から、新規転写産物や、選択的スプライシングや融合遺伝子の検出を行うことで、細胞集団が遺伝学的にどのような特徴を有しているのか結論づけることが重要である。そのために、各集団を上記で同定した特異的マーカーを用いて、FACSにておよそ  $5.0 \times 10^4$  cells を分離する。これらの細胞から mRNA を抽出し、RNA-Seq (日本ジーンウィズ、Illumina High-Seq) 解析をおこなった(図3)。解析データを遺伝子データバンクに登録されている ES 細胞の mRNA 情報と比較することで、最終的に MCP を特徴づける。

平成 31 年度の計画

## 3) 間葉系細胞集団と HSC との共培養系による幹細胞シグナルの同定

MSPC に含まれる細胞集団の存在が骨髓微小環境や幹細胞 niche の維持安定に寄与していると仮定すると、MSPC 中の細胞集団間で伝達される幹細胞シグナルを解析することで、特性維持に寄与する因子が同定できると考える。まず2)で同定した各 MCP を共培養し、共培養後の各集団における細胞の核内ゲノム構造変化を、Illumina プラットフォームに則したライブラリ作製、シーケンシングを行い、配列データを得た。並行して、得られた配列情報より細胞種特異的な特徴を捉えるためのアプローチとして、ATAC-seq によるクロマチン構造の解析を行い、ATAC 領域 (= オープンクロマチン領域) を検出した。これにより、共培養によりオープンクロマチンを形成する領域中の分化制御に関与するエンハンサー領域を特定することで、分化制御に関与する因子の同定が可能となる。この解析で得た因子について、CRISPR/Cas システムを用いて MCP に導入する。その後、MCP を単独あるいは共培養を行った後に細胞を回収し、コロニー形成能、多能性評価等で特性変化を比較検証し、最終的な造血-間葉相互作用に直接的に関与する MCP (MSC 本体) の特定とシグナルを同定する(図4)。

## 4) シグナル分子を活用した高機能化 MSPC 増殖培養法の確立

3)で同定した幹細胞間特性維持シグナルを活用し、再生医療に応用可能な高機能 MSC 増殖培養法を確立する。同定したシグナルの活性化または不活性化によって特性制御が生じる場合、シグナル賦活剤またはインヒビターが存在すれば細胞培養液中へ添加し、存在しないときは virus vector を用いて遺伝子導入し、増殖性ならびに多能性を、マウス骨髓を用いて評価する。骨髓液を 10%FBS 含有 MEM で培養し、さらに各種濃度の賦活剤を添加する。培養後の細胞曲線ならびに多能性を評価し、良好な条件を設定する。これら所見を総合し、幹細胞間シグナルを活用した高機能 MSC 増殖培養法を確立する(図5)。

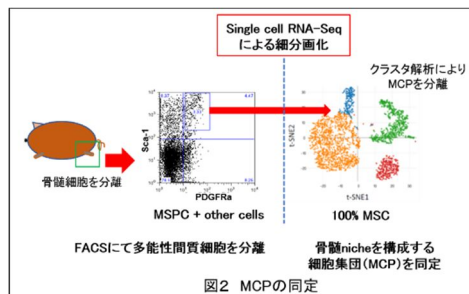


図2 MCPの同定

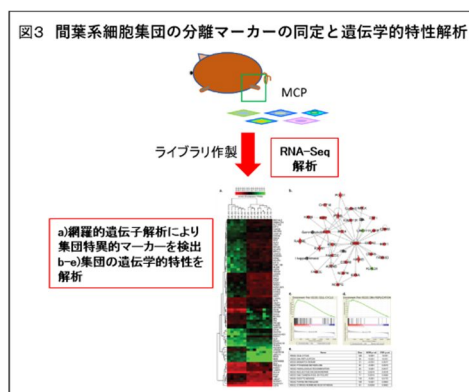


図3 間葉系細胞集団の分離マーカーの同定と遺伝学的特性解析

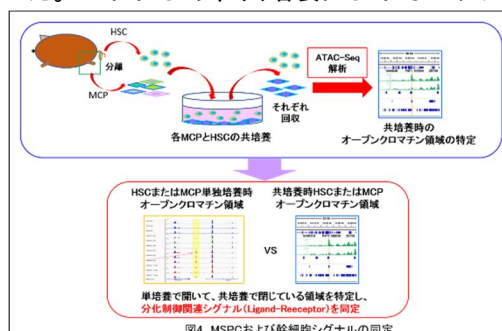


図4 MSPCおよび幹細胞シグナルの同定



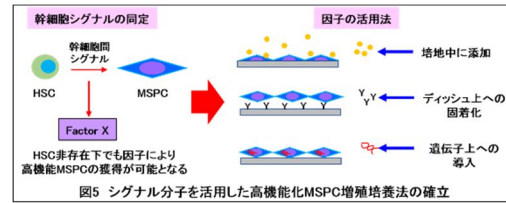
#### 4. 研究成果

平成30年度に実施した内容として、1) マウス骨髄中に存在するniche構成間葉系細胞集団の特定および、2) 特定間葉系細胞集団の分離マーカーの同定と遺伝学的特性解析を実施した。

具体的には、1) は現在Sca-1, PDGFR-陽性で分画される細胞をMSCとされているが、実際はヘテロ

な細胞集団であることが示唆されている。研究代表者は、MSCをsingle cellレベルでの解析により、間葉系細胞集団 (Mesenchymal Cell Population, MCP) の分離を試みた。MSCをsingle cell RNA-Seqにてクラスタ解析をおこない、遺伝子発現プロファイルから特異性のある7つ細胞集団が存在することを確認した。また、2) 項は1)項で同定した各集団における上記網羅的遺伝子発現解析から、2倍以上発現増減した遺伝子を選定し、集団特異的マーカーを同定するため、得られたいくつかのマーカーの組み合わせから、FACSにて集団を分離可能か検討し、分離した細胞に対して、コロニー形成能試験、3系統分化能評価をおこなった。これらの結果から、最終的に同定した分離マーカーの有用性を確認した。次に、分離した各細胞集団の細胞を網羅的かつ定量的に解析し遺伝子発現量を定量化し、細胞集団が遺伝学的にどのような特徴を有しているのか検討をおこなった。これらの細胞からmRNAを抽出し、RNA-Seqで解析をおこない、7つの細胞集団が、遺伝的にそれぞれ特異的な性質を有することを確認した。

また、令和元年度に実施した内容として、研究代表者は、これらのクラスターが遺伝的に独立した集団であることを確認するため、RNA-Seq および ATAC-seq 解析をおこなった。ATAC-seq にていくつかのクラスター間で類似性を有することを認めしたが、7つのクラスターが、独立した細胞集団であることを明らかにした。次に、これらのクラスターの特性評価をおこなった。とくに、クラスターが幹細胞特性を有するか評価した。その結果、クラスターのいくつかで、幹細胞に類似した機能を有することが分かった。このクラスターをさらに GREAT 解析によりクラスター特異的遺伝子発現および発現遺伝子から本質的機能検索した。その結果、分化指向性、未分化性維持に特異的な遺伝子を検出することができなかった。今後は ES 細胞との直接比較により MCP に存在する幹細胞に近似した細胞集団の同定し、骨再生医療への応用を目指す。また、本研究の成果は 2019 年に国際幹細胞学会 (Los Angeles, CA) にて報告し、現在、論文投稿中となっています。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanazawa S et al.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Glial Fibrillary Acidic Protein as Biomarker Indicates Purity and Property of Auricular Chondrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biores Open Access	6. 最初と最後の頁 51-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/biores.2019.0058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kanazawa S
2. 発表標題 Identification of bone marrow mesenchymal stromal cell population and stem cell niche signal
3. 学会等名 International Society of Stem Cell Research 2019, Los Angeles, CA, US, Los angeles Convention Center.（国際学会）
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
研究協力者	大庭 伸介  (Ohba Shinsuke)		生化学的解析
研究協力者	北條 宏徳  (Hojo Hironori)		バイオインフォマティクス解析