

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08389

研究課題名(和文)リンパ球系起源の樹状細胞ならびにB1B細胞の分化機構と生理的役割の解明

研究課題名(英文)Biological role and differentiation mechanism of lymphoid-origin dendritic cells and B1B cells

研究代表者

大石 晃嗣(Ohishi, Kohshi)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00397506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：包括的リンパ球培養法と、深層生成モデルとスプライシング数理モデルの融合により、単細胞レベルのRNA遺伝子発現の網羅的解析(scRNA-seq)から細胞分化の方向性の"ゆらぎ"を定量的に解析する手法を用いて、抗体産生に関わるヒトBリンパ球と、I型インターフェロンを分泌する形質細胞様樹状細胞が共通の前駆細胞由来であること、この細胞分岐点で細胞分化の方向性が大きくゆらくこと、接着分子であるLFA-1がpDC方向への分化(のゆらぎ)に関連すること等を発見しました。さらに、ATAC-seqによりB、pDC分化に関連する転写因子のaccessibilityが両方とも高いことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞は、骨髄球系とリンパ球系に分化し、さらに段階的・断続的に分化・分岐していきと考えられていたが、リンパ球系分化から樹状細胞や単球が分化することから見直しが必要とされている。研究代表者らは、独自の培養法とscRNAseq解析法により、ヒトBリンパ球系細胞と形質細胞様樹状細胞の共通の前駆細胞を同定するとともに、scRNAseq解析では細胞分化は連続的(continuous)に起きると考えられていたが、この細胞分岐では分化方向性が大きくゆれることを明らかにし、揺らぎに基づく新しい分化モデル(fluctuation-based differentiation model)を提唱した。

研究成果の概要(英文)：Using a method that combines comprehensive lymphocyte culture and the integration of deep generative models with splicing mathematical models, we have quantitatively analyzed the "fluctuations" in the directionality of cell differentiation at the single-cell level of RNA gene expression through scRNA-seq. We have discovered that human B lymphocytes involved in antibody production and plasmacytoid dendritic cells share a common progenitor cell origin. At this branching point, there is significant fluctuation in directionality. We have also identified the involvement of the adhesion molecule LFA-1 in the fluctuation towards pDC differentiation. Furthermore, using ATAC-seq, we have revealed that the accessibility of transcription factors associated with B and pDC differentiation is high in both cell types.

研究分野：血液学

キーワード：lymphoid differentiation B plasmacytoid DC scRNAseq LFA-1 fluctuation differentiation model human

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

ヒト血液細胞の分化は、造血幹細胞から骨髄球系細胞とリンパ球系に分化しさらに各 lineage の細胞へと段階的かつ断続的に進む(tree-like model)と考えられてきたが、下記の2つの視点から見直しが必要とされている。

まず、マウスの研究で T リンパ球系にコミットしていると考えられていた細胞から単球が分化することが分かり、ヒトでもリンパ球系前駆細胞から単球系細胞が分化することが明らかとなった。しかし、ヒトリンパ球系分化と樹状細胞 (DC)・単球系分化の関係は未だ十分には明らかにされていない。その主な理由は、様々な lineage への分化を支持する *in vitro* 培養系が存在せず、リンパ球系前駆細胞の各分画の分化の潜在性 (potential) や偏向性 (bias) を十分に評価することができなかつたためである。

次に、単細胞レベルでの解析技術 (single cell RNA sequencing, scRNAseq) の向上により、個々の細胞遺伝子学的プロファイルを網羅的に解析することが可能となり、さらに、splicing および unsplicing mRNA の比較から、分化の方向性も推測することが可能となった。scRNAseq を用いた解析から、ヒト血液細胞の分化は、造血幹細胞を頂点として、段階的かつ断続的に進む (tree-like model) ではなく、連続的なプロセスを経て分化していく (continuous model) と考えられるようになってきている。しかし、これまでの scRNAseq の解析手法では、分化の方向性の不確実性や揺れ (fluctuation) は考慮されてこなかった。

2. 研究の目的

研究代表者は、世界で初めて、様々な lineage のリンパ球系および DC への分化を包括的に観察できる培養系の確立に成功した (Brit J Hematol 2012, J Immunol 2017)。この方法を用いることにより、各分化段階のリンパ球系前駆細胞の分化能や分化の偏向性の詳細が解析可能となり、細胞分化の流れを明らかにすることが可能となった。一方、共同研究者の小嶋は、scRNAseq 解析データから、分化の方向性の不確実性や揺れ (fluctuation) を推定する方法を考案した。そこで、代表者が確立したリンパ球培養法と新しい scRNAseq 解析方法を組み合わせ、ヒトリンパ球系分化と DC・単球系細胞分化の関係を明らかにするための研究に着手した。

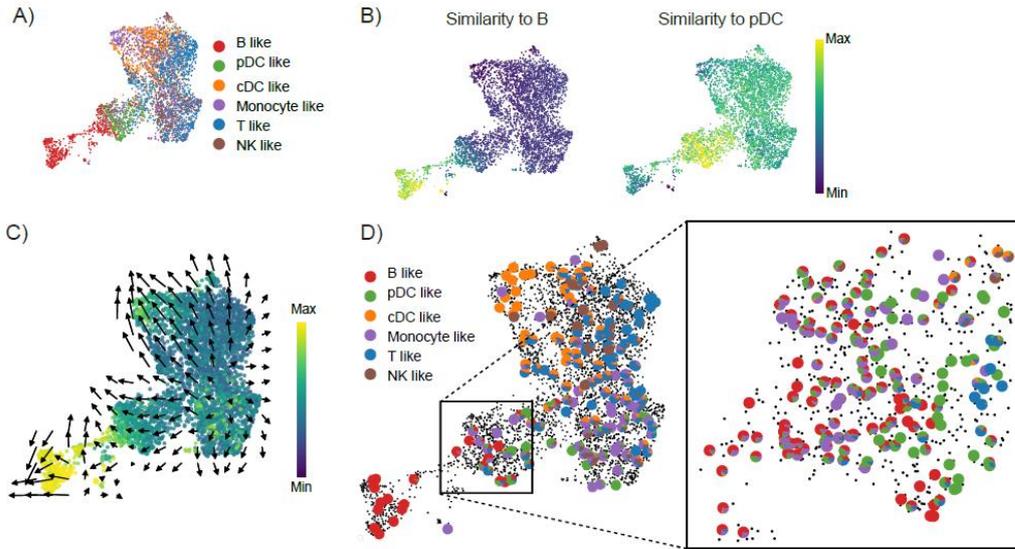
3. 研究の方法

臍帯血 CD34+細胞の様々な分画を、不死化ストローマ細胞上で、SCF+Flt3L+TPO+GM-CSF を含む 20%FCS+ α MEM 培地で 2-3 週間培養した。一部の実験では、96 well plate に 1 個ずつ造血前駆細胞を培養した (single cell culture)。一方、CD34+細胞および CD34+CD38+CD45RA+CD10+CD7- (CD10SP) 分画の細胞に関する scRNAseq においては、小嶋らが開発した深層生成モデルとスプライシング数理モデルの融合により、単細胞レベルの RNA 遺伝子発現の網羅的解析 (scRNAseq) から細胞分化の方向性の“ゆらぎ”を定量的に解析する手法 (variational inference of cell state dynamics with fluctuation, VICDYF) をもちいて解析した。

4. 研究成果

ヒト CD34+CD38+CD45RA+リンパ球系前駆細胞分画における分化能および分化の偏向性は、c-kit 陽性・陰性細胞によって大きく異なり、これまで B 細胞・NK 細胞にのみ分化すると考えられていた CD10SP 分画 (CD34+CD38+CD45RA+CD19-CD10+CD7-) は、多能性リンパ球系前駆細胞から B リンパ球系にコミットした前駆細胞を含むヘテロな細胞分画であることが明らかとなった。そこで、CD10SP 細胞を対象として scRNAseq を行い、血液細胞の分化の方向性のゆらぎを解析する方法で解析したところ、c-kit 発現が減少し IL-7 receptor α (IL-7R α) を発現している領域で B リンパ球系細胞と形質細胞様樹状細胞 (pDC) の共通の前駆細胞が存在し、その分岐点で fluctuation が高いことが明らかとなった (図 1)。培養においても、c-kit+IL-7R α 領域で、B と pDC への分化能が高くなり、single cell culture で B と pDC の共通の前駆細胞の存在を確認した (図 2)。次に scRNAseq 法で、B および pDC への分化に関連する因子を抽出し、前述のゆらぎに関連する因子と突合せた。その結果、表面抗原である LFA-1 (ITGAL) が pDC への分化には正に、B 細胞への分化には負に関連することを見出した。CD10SP 分画において LFA-1 の発現を解析したところ、scRNAseq 解析と一致し、B/pDC の分岐で LFA-1 発現が変化しており、LFA-1 発現が高いと pDC へ分化が偏向しており、LFA-1 発現が低いと B 細胞への分化偏向性を持つことが明らかとなった。これらの結果は、Cell Rep. 30:40 (9): 111260, 2020 に報告した。

1



2

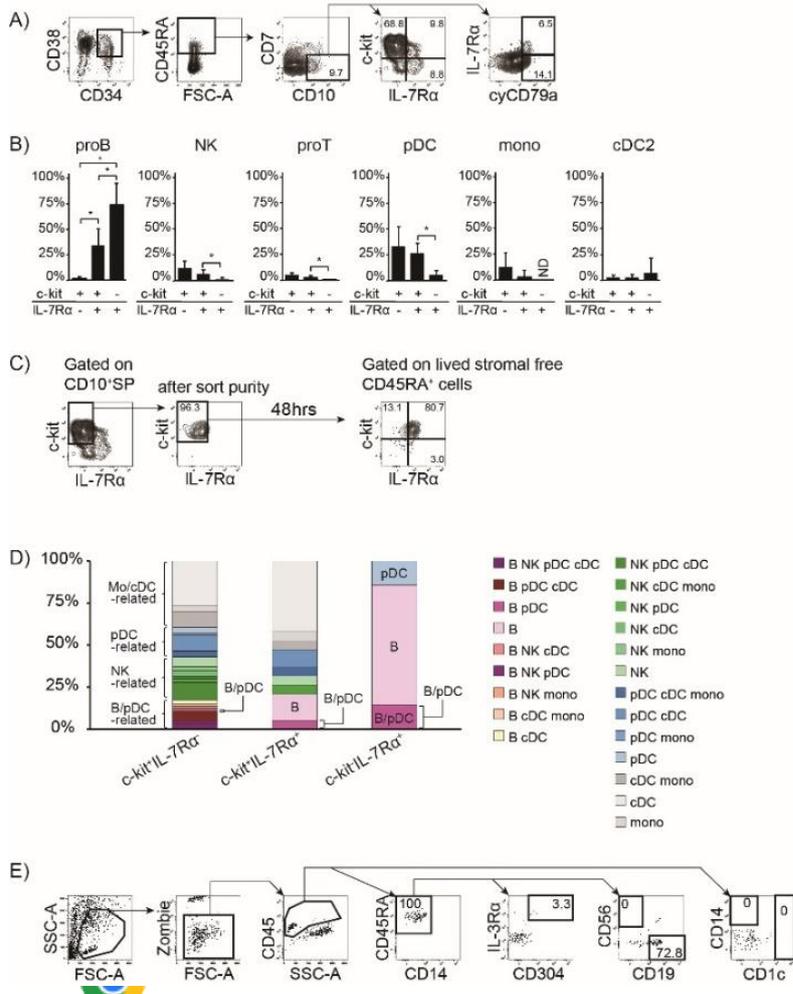
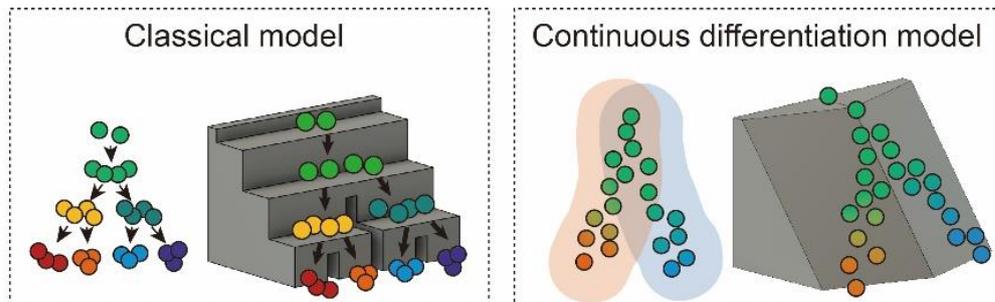


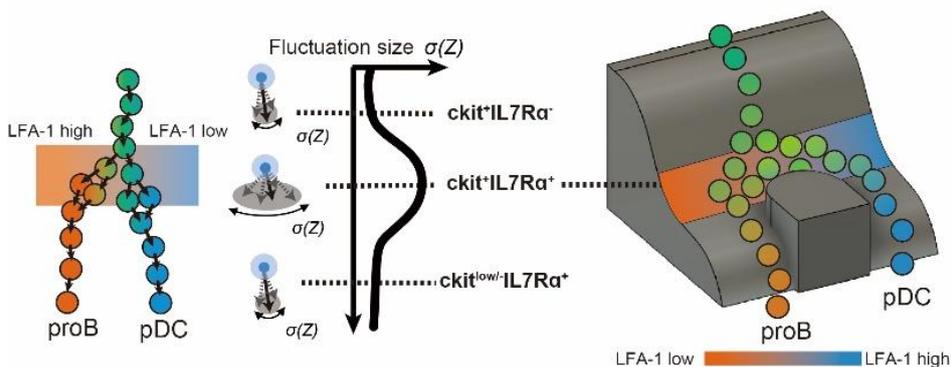
FIGURE 2 cont.

本研究を通して、我々は scRNAseq の新しい解析方法と、独自に開発した同時包括的血液培養法を組み合わせることにより、B リンパ球系細胞と pDC が分岐する新たな分岐点を発見し、さらに、この細胞分岐では、分化の方向性が大きく fluctuation していることを見出した。この結果を受けて、血球分化は、これまで想定されているように continuous に分化が進むのではなく、一部の細胞分岐では分化の方向性が外因性あるいは内因性因子の影響を受けて大きく揺らぐ (fluctuation) することが明らかとなり、これらのデータに基づき新たな分化モデル (fluctuation-based differentiation model) を提唱した(図3)。本研究手法は、今後、他の血液細胞分化や他臓器の分化の解析のみならず、疾患の病態解明にも応用が期待できると考えられる。

図3



Fluctuation-based differentiation architecture



Identify branching **"HOT SPOT"** by fluctuation scoring system
 $Z = \mu(Z) dt + \sigma(Z) dW$ $\mu(Z)$: Advection $\sigma(Z)$: Diffusion

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 Nagaharu Keiki, Kojima Yasuhiro, Hirose Haruka, Minoura Kodai, Hinohara Kunihiko, Minami Hirohito, Kageyama Yuki, Sugimoto Yuka, Masuya Masahiro, Nii Shigeru, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Tawara Isao, Shimamura Teppei, Katayama Naoyuki, Nishikawa Hiroyoshi, Ohishi Kohshi	4. 巻 40
2. 論文標題 A bifurcation concept for B-lymphoid/plasmacytoid dendritic cells with largely fluctuating transcriptome dynamics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111260 ~ 111260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111260	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keiki Nagaharu, Yasuhiro Kojima, Yuki Kageyama, Yuka Sugimoto, Masahiro Masuya, Shigeru Nii, Masahide Seki, Yutaka Suzuki, Isao Tawara, Teppei Shimamura, Naoyuki Katayama, Kohshi Ohishi
2. 発表標題 Unveiling Highly Fluctuating Single-Cell Transcriptome Dynamics at a Novel Bifurcation Point in a Human Lymphoid Pathway
3. 学会等名 The 64th ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永春圭規、小嶋泰弘、廣瀬遥香、日野原邦彦、 杵本由香、仁井栄、俵功、島村徹平、片山直之、大石晃嗣
2. 発表標題 Identification of human pDC/B bifurcation with highly fluctuating cell state dynamics
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022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
研究分担者	永春 圭規 (Nagaharu Keiki) (80883462)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト (14101)	

	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	小嶋 康弘 (Kojima Yasuhiro)	国立がん研究センター・計算生命科学ユニット・計算生命科学ユニット 独立ユニット長 (82606)	
研究協力者	西川 博嘉 (Nisikawa Hiroyoshi)	国立がん研究センター・先端医療開発センター・免疫TR分野長 (82606)	
研究協力者	野阪 哲哉 (Nosaka Tetsuya)	三重大学・感染制御医学・分子遺伝学分野・教授 (14101)	
研究協力者	小埜 良一 (Ono Ryoichi)	三重大学・感染制御医学・分子遺伝学分野・准教授 (14101)	
研究協力者	杉本 由香 (Sugimoto Yuka)	三重大学・血液内科学・准教授 (14101)	
研究協力者	大矢 瑛子 (Oya Eiko)	三重大学・血液内科学・研修生 (14101)	

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