

令和 6 年 5 月 4 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19514

研究課題名（和文）単一細胞ゲノム解析と単一細胞エピゲノム解析の同時施行による造血幹細胞老化の研究

研究課題名（英文）Simultaneous analysis of single-cell RNA sequencing and single-cell ATAC sequencing to elucidate hematopoietic stem cell aging

研究代表者

松村 貴由（Matsumura, Takayoshi）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：80436485

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：すべての血液細胞のもとになる細胞を造血幹細胞といいます。造血幹細胞の老化は癌だけでなく心臓・血管などの病気の危険因子にもなります。その老化現象の全体像を理解するためには造血幹細胞1個1個の違いにも注目した解析方法が不可欠です。

本研究では単一細胞のDNAとRNAの同時バーコード化という新しい手法により、若年マウスから得られた造血幹細胞と老年マウスから得られた造血幹細胞の比較にて、老化造血幹細胞を特徴づける遺伝子変化、エピゲノム変化を捉えることに成功しました。さらに、老化造血幹細胞の中で、より老化が進んでいる細胞集団と比較的機能が保たれている細胞集団を特定することにも成功しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、造血幹細胞の老化がどのようにその機能不全をきたしていくのかを包括的にとらえ、新たな知見を得ることを目的としました。我々は、将来的に老化細胞を再度“若返らせる”ための新たな方法、新規化合物を発見するための序章として本研究を位置づけています。さらに長期的には、造血幹細胞の老化を解明する過程で得られた知見は、骨髄以外の各種組織の幹細胞の老化研究に応用可能であると考えています。血液疾患に限らず各種臓器の疾患で、老化関連疾患に罹患する可能性の高い個人を特定する個別化最適医療への応用も考えられます。

研究成果の概要（英文）： Hematopoietic stem cells (HSC) are the source of all blood cells. Aging of HSCs is a risk factor not only for cancer but also for heart and blood vessel diseases. To understand the whole picture of the HSC aging, it is essential to analyze HSCs focusing on their difference among each HSCs.

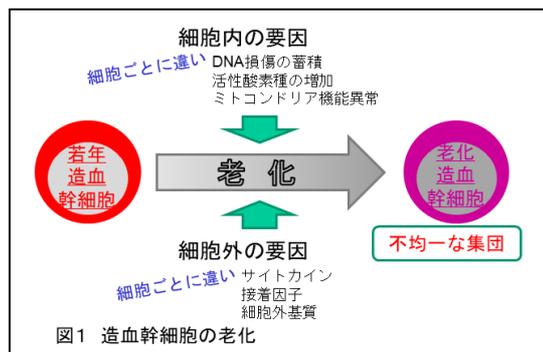
In this study, we utilized a new method of simultaneous barcoding of DNA and RNA of single cells, and successfully identified genetic and epigenomic changes that characterize aging HSCs by comparing HSCs obtained from young mice and old mice. Further, we succeeded in identifying a subset of aging HSCs with relatively preserved function.

研究分野：循環器内科

キーワード：造血幹細胞 老化 シングルセル解析

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は全ての血球系細胞に分化可能な幹細胞であり、悪性腫瘍化することなく生涯にわたる造血を維持するために、造血幹細胞の自己複製と分化は厳密に制御されなければならない。しかし、造血幹細胞の機能は老化とともに低下し、悪性腫瘍化の危険は上昇する。様々な内的要因 (DNA 損傷の蓄積、活性酸素種の増加、ミトコンドリア機能異常など) と外的因子 (周囲微小環境からのサイトカイン、接着因子、細胞外基質など) が複合的に幹細胞の老化を引き起こすと考えられている (図 1)。



研究代表者は若年及び老齢マウスより造血幹細胞を回収、網羅的遺伝子解析 (RNA シークエンシング) を行い、老化長期造血幹細胞では DNA 修復機構関連遺伝子の発現が低下していること、また、老化長期造血幹細胞では周囲環境からのシグナルの下流経路が亢進していることを見出した。各種微小環境 (ニッチ) 因子からのシグナルは幹細胞の細胞周期静止期維持を妨げ幹細胞の DNA 損傷に寄与することが知られており、老化造血幹細胞においては、内的要因 (DNA 損傷修復機能の低下) と外的要因 (微小環境からのシグナル) が相まって老化が進行していると考えられた。しかしながら、このような "bulk" RNA シークエンシング解析は、造血幹細胞集団の平均値に対する解析であり、造血幹細胞個々の違いを考慮することはできないことが問題であった。

また、いくつかの微小環境 (ニッチ) 因子は造血幹細胞の自己複製および増殖・分化に関与することがわかっている。その中でトロンボポエチン (Thpo) とその受容体 Mpl のシグナルは DNA 損傷修復機構の効率を上げ、老化に保護的に働く可能性があるが、その分子生物学的機序の詳細は不明である。研究代表者は、ゲノム解析とエピゲノム解析の両方において、Thpo の効果は造血幹細胞集団内で均一ではなく、細胞ごとに反応性に違いがあることを見出していたが、ゲノム解析における造血幹細胞の異質性とエピゲノム解析における造血幹細胞の異質性の直接的関係性が明らかでないため、Thpo などの微小環境因子がどのように個々の細胞の老化に影響を与えるのか、なぜ細胞ごとに反応性が違うのか、は明らかにできていなかった。

研究代表者自身による予備検討に基づくこのような背景により、造血幹細胞老化の全体像を理解するためには造血幹細胞の異質性 heterogeneity を踏まえた解析が不可欠であると考えるに至った。

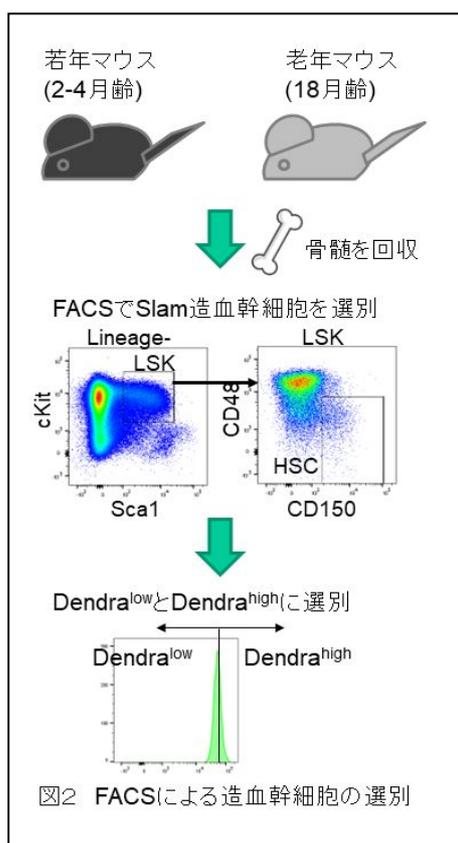


図2 FACSによる造血幹細胞の選別

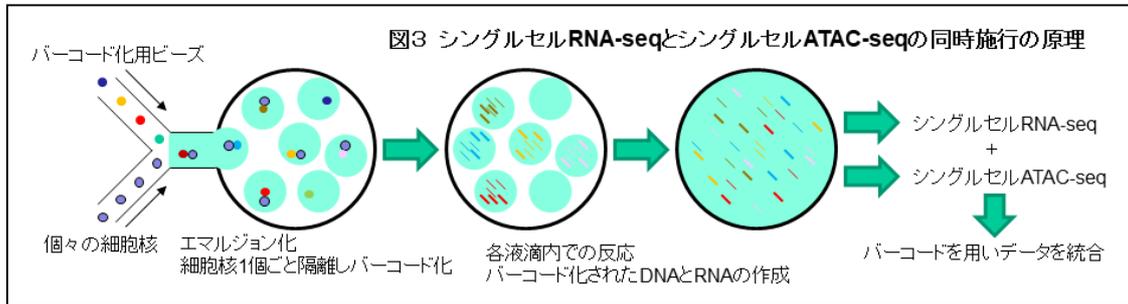
2. 研究の目的

本研究ではエマルジョン化による単一細胞の DNA と RNA の同時バーコード化という新しい手法により、1 個の細胞からゲノム解析とエピゲノム解析を同時に行う新技術、単一細胞 (シングルセル) RNA シークエンシングと単一細胞 (シングルセル) ATAC シークエンシングの同時解析の手法を確立することを初期の目的とした。

さらに、この新技術を用いて若年および老化造血幹細胞のシングルセル解析を行い、造血幹細胞の異質性を克服し、造血幹細胞老化の全体像を捉えること、そして、老化個体の造血幹細胞の中で比較的機能の保たれている造血幹細胞に特異的に発現している遺伝子を見出し、その遺伝子の産生する細胞表面蛋白を用いて幹細胞機能の保たれた老化造血幹細胞を抽出する方法を確立することを後期の目的とした。

3. 研究の方法

以前より造血幹細胞の機能とミトコンドリア機能の関連が報告されており、また、我々からのものを含む複数の報告により、細胞内のミトコンドリアが緑の蛍光を発する mitoDendra2 マウス (Gt (ROSA) 26Sortm1.1 (CAG-COX8A/Dendra2) Dcc/J マウス) においてはミトコンドリア



ア量と緑色蛍光の明るさが比例することが知られていた。若年（2-4月齢）及び老年（18月齢）の mitoDendra2 マウスの骨髄から FACS にて Slam 造血幹細胞 (CD150+CD48-Lin-Sca1+Kit+) を選別し、それをさらに mitoDendra2-high 造血幹細胞 (ミトコンドリア量の多い造血幹細胞) および mitoDendra2-low 造血幹細胞 (ミトコンドリア量の少ない造血幹細胞) にわけて回収した (図2)。そして、単一細胞ごとの網羅的遺伝子発現解析 (シングルセル RNA シークエンシング) と単一細胞ごとの網羅的エピゲノム解析 (全ゲノム領域でオープンクロマチン領域を同定するシングルセル ATAC シークエンシング) を施行した (図3)。

造血幹細胞の機能を評価する骨髄移植実験においては、ミトコンドリア量の多い造血幹細胞あるいはミトコンドリア量の少ない造血幹細胞と通常のマウスから採取した全骨髄細胞の混合物を 9.5Gy の放射線を照射したレシピエントマウスに静脈注射し、4か月後に末梢血および骨髄内における移植細胞の割合を FACS にて解析した。

造血幹細胞の培養実験においては、ミトコンドリア量の多い造血幹細胞あるいはミトコンドリア量の少ない造血幹細胞 1000 個を 96 ウェルプレートに播種し、Soluplus、THP0、SCF などの存在下で 2 週間培養後、FACS にて解析した。

その他、造血幹細胞の各種機能については、オートファジーを検出する試薬、マイトファジーを検出する試薬などで反応後、FACS による解析などをおこなった。

4. 研究成果

まず予備検討として、老化造血幹細胞のシングルセル解析に先立ち、老化造血幹細胞におけるミトコンドリア量と造血幹細胞機能との関連について検討した。上記 mitoDendra2 マウスを用いた解析により、若年マウス、老年マウスともに造血幹細胞はより分化した細胞に比べミトコンドリア量が多いこと、また、若年造血幹細胞と老年造血幹細胞の比較においては、後者の方がミトコンドリア量が多いことがわかった。オートファジー活性、マイトファジー (オートファジーによるミトコンドリアの選択的分解) 活性とも老化造血幹細胞で低下していたため、老化造血幹細胞におけるミトコンドリア量の増加はその産生増加ではなく、分解低下が一因であると考えられた。造血幹細胞の機能評価のための骨髄移植実験においては、ミトコンドリア量の多い老化造血幹細胞とミトコンドリア量の少ない老化造血幹細胞で 4 か月後の骨髄再構築能に有意差はなかったが、ミトコンドリア量の多い造血幹細胞の方が、分化せず造血幹細胞のまま骨髄内に留まる割合が高いことがわかった。造血幹細胞の長期培養実験においても、ミトコンドリア量の多い老化造血幹細胞の方が高い自己複製能を保持し、分化せずに造血幹細胞の機能を長期間保つことがわかった。これらの検討により、加齢に伴いミトコンドリア量が増加した造血幹細胞は、単に機能低下したミトコンドリアが蓄積して疲弊した細胞ではなく、むしろ、高い幹細胞機能を保持した造血幹細胞集団であることがわかった。

次に、若年及び老年の mitoDendra2 マウスの骨髄から FACS にて Slam 造血幹細胞を選別し、それをさらにミトコンドリア量の多い造血幹細胞およびミトコンドリア量の少ない造血幹細胞にわけて回収した。そして、シングルセル RNA シークエンシングとシングルセル ATAC シークエンシングを施行した。各サンプルからのシングルセル RNA シークエンシングおよびシングルセル ATAC シークエンシングのデータをそれぞれ統合、さらに統合された 2 つのデータを重みづけ近傍解析 WNN にて統合し、均一マニホールド近似投影 UMAP という特徴量次元削減手法を用い視覚化した (図4)。造血幹細胞は 4 つの亜集団に分けられることがわかり、それぞれの特徴を明らかにすることができた。さらに、ミトコンドリア量の多い老化造血幹細胞はミトコンドリア量の少ない老化造血幹細胞に比べ、造血幹細胞の機能に関連が大きい遺伝子群の発現パターンが若年造血幹細胞のパターンにより近いこと、酸化的リン酸化に関連する遺伝子群の発現が高いこと、細胞周期に関連する遺伝子群の発現が低いことなどがわかり、上述の実験結果と矛盾しないことがわかった。

さらに、老化個体から幹細胞機能が比較的保たれている造血幹細胞を選択的に回収するための表面蛋白マーカーの選定をおこなった。1) ミトコンドリア量の少ない老化造血幹細胞よりミトコンドリア量の多い老化造血幹細胞により高く発現している、2) 若年及び老年マウス由来の長期造血幹細胞、短期造血幹細胞、多能性前駆細胞の RNA シークエンシングによる比較において老化長期造血幹細胞のみに特異的に発現している、3) 過去の造血幹細胞老化の研究においても再現性をもって老化造血幹細胞に発現している、4) 蛋白が細胞表面に発現している、のすべての

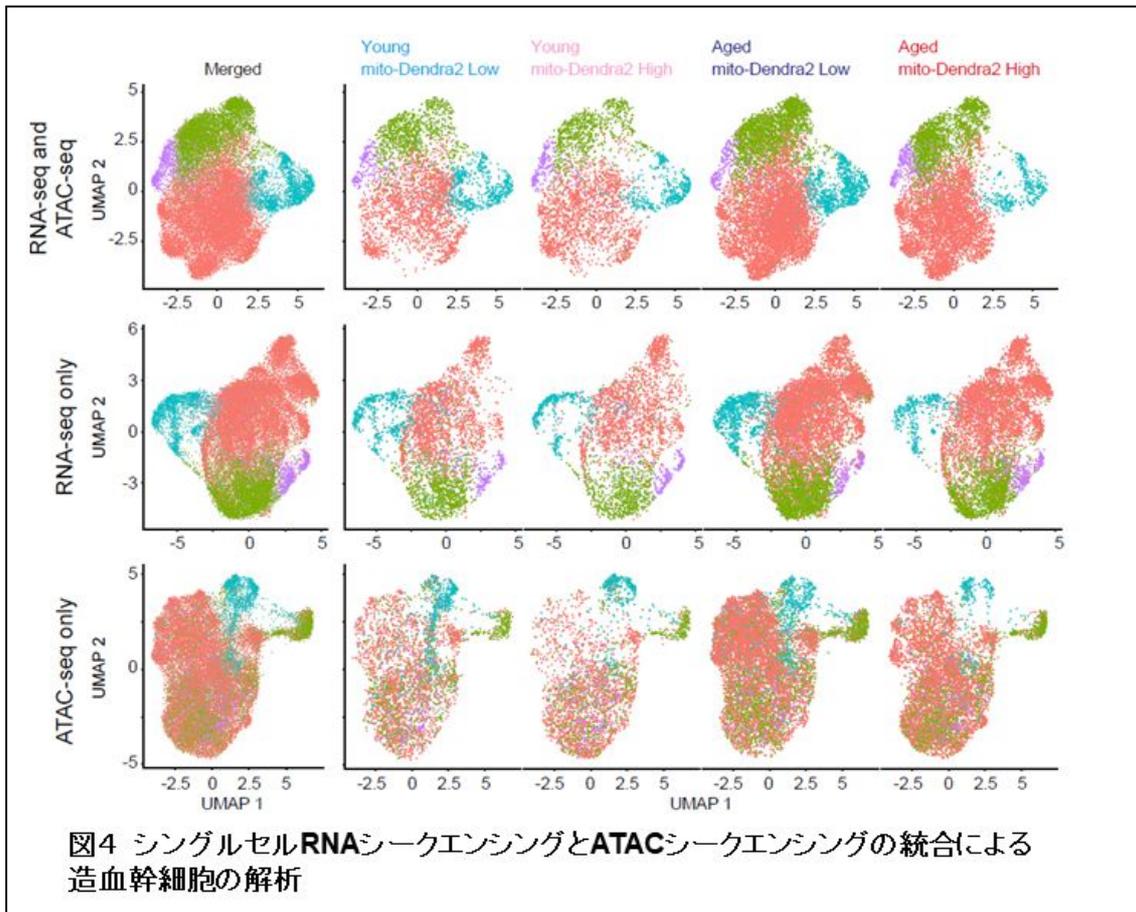


図4 シングルセルRNAシーケンシングとATACシーケンシングの統合による造血幹細胞の解析

条件を満たす候補遺伝子を選び、現在さらに解析を進めている。これらの因子は、将来比較的高齢の骨髄移植ドナーから採取した造血幹細胞のうち機能が保たれている造血幹細胞のみを選択する際の表面マーカーになりうる可能性がある。

日本社会は前例のない超高齢化社会に突入している。老化に伴い、各種臓器の機能低下や悪性腫瘍を含む各種疾患の頻度は著明に上昇することが知られており、老化は多くの悪性腫瘍において最大の危険因子とされている。日本のみならず全世界で老化は非常に大きな社会経済的な問題と位置付けられており、老化の生物学的なメカニズムを理解することは科学の社会に対する貢献という観点で、非常に大きな意義がある。

老化個体の中であまり機能が低下していない造血幹細胞を同定する方法が確立されれば、将来的に骨髄移植ドナー年齢の引き上げが可能になる。長期的には、造血幹細胞の老化を解明する過程で得られた知見は、骨髄以外の各種組織の幹細胞の老化研究に応用可能であり、血液疾患に限らず各種臓器の疾患で、老化関連疾患に罹患する可能性の高い個人を特定する個別化最適医療への応用も考えられる。このような観点から、本研究の臨床的意義は十分にあると考えている。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumura Takayoshi, Totani Haruhito, Gunji Yoshitaka, Fukuda Masahiro, Yokomori Rui, Deng Jianwen, Rethnam Malini, Yang Chong, Tan Tze King, Karasawa Tadayoshi, Kario Kazuomi, Takahashi Masafumi, Osato Motomi, Sanda Takaomi, Suda Toshio	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 A Myb enhancer-guided analysis of basophil and mast cell differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7064
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-34906-1	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

世界初の好塩基球分化系譜のシングルセル解析 https://www.jichi.ac.jp/news/research/2022112204/
--

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		
シンガポール	シンガポール国立大学		