

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16298

研究課題名（和文）加齢に伴う造血幹細胞の原理解明と老化関連疾患の克服

研究課題名（英文）Elucidation of the principles of hematopoietic stem cells in aging and overcoming aging-related diseases

研究代表者

小出 周平（Koide, Shuhei）

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：10845126

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究においては申請者がこれまでに同定した新規老化マーカーであるClusterin (Clu)に着目し、そのレポーターマウスの解析から造血幹細胞の加齢機序を明らかにすることを目的とした。Cluレポーターマウスの解析から、Clu陽性の加齢造血幹細胞は分化能が著しく失われるのに対して、Clu陰性の加齢造血幹細胞は高い幹細胞活性を示した。以上の結果から、加齢に伴う造血幹細胞の機能低下は、Clu陽性造血幹細胞に起因すると考えられ、今後Clu陽性造血幹細胞を標的とした介入法が確立できれば、骨髄異形成症候群などの老化関連疾患への新たな治療戦略が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先進国を中心とした高齢化の世界的進行により、健康的に生活できる期間の延伸はいまや世界各国の共通課題である。本研究により明らかとなったCluの発現変容は造血幹細胞の加齢変化を示すバイオマーカーとしての利用が期待される。今後、Cluレポーターマウスの詳細な解析から、加齢造血幹細胞の出現様式の理解が深まり、さらにClu陽性造血幹細胞を直接標的とした介入法が確立できれば、骨髄異形成症候群などの老化関連疾患への新たな治療戦略が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on Clusterin (Clu), a novel marker of aging identified by the applicant, aiming to clarify the aging mechanism of HSCs by analyzing their reporter mice. Clu-negative aged HSCs showed high stem cell activity, whereas Clu-positive aged HSCs markedly lost their differentiation ability. Based on these results, the age-related decline in HSC function may be attributed to Clu-positive HSCs. If future intervention methods targeting Clu-positive HSCs can be established, new therapeutic strategies for aging-related diseases such as myelodysplastic syndrome are expected to be developed.

研究分野：血液および腫瘍内科学関連

キーワード：造血幹細胞 加齢 Clusterin 老化マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

血液細胞は全身を常に循環し続けることで臓器・組織への栄養補給ならびに伝達物質を輸送することで個体維持に重要な機能を担う。その機能低下は全身に影響を及ぼし、個体の機能低下と直結する。造血幹細胞は骨髄ニッチに存在しながら、状況に応じて必要な血液細胞を供給し続けるが、個体の加齢に伴い内因性・外因性の多様なストレスに暴露されることで表現型の変化をきたす。これらの加齢に伴う表現型の変化は結果として造血幹細胞の機能低下へと繋がる。造血幹細胞の機能低下は、貧血やリンパ球の減少・機能不全による免疫系の減弱など造血システムの破綻をもたらす、酸素供給不全や慢性的な炎症などの全身の臓器に影響を及ぼすことで、個体の機能低下を促進する。さらに、加齢に伴う造血幹細胞の特性変化は、加齢に伴い頻度が増加する造血腫瘍の温床となるように、造血幹細胞の機能低下は個体の機能低下に直結する。したがって、加齢を造血幹細胞の観点から理解することは重要な学術的意義を有する。これらの加齢に伴う機能的変化は詳細に解析されつつあるが、その機能を規定する遺伝子発現とその分子基盤はいまだ十分には解析されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、加齢造血幹細胞特異的に高発現する分子シャペロンである Clusterin (Clu) のレポーターマウスを用いて、若齢および高齢の造血幹細胞を解析する。これにより、加齢に伴う Clu 陽性造血幹細胞の増加と幹細胞機能の低下との関係を明らかにし、加齢造血幹細胞の分子機序を理解することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究項目では加齢に伴う造血幹細胞の Clu 陽性頻度の変遷と幹細胞機能低下機序を明らかにすることで、加齢造血幹細胞の分子機序の理解を試みる。

加齢マウスは若齢マウスと比較して、骨髄中の CD150 強陽性の造血幹細胞が著増することが明らかになっており、この CD150 陽性造血幹細胞は骨髄球系への強い分化指向性を示し、加齢マウスの末梢血ではリンパ球と比べて骨髄球の割合が増加することが報告されている。これまでに Clu レポーターマウスを解析した結果、若齢期のマウス造血幹細胞分画の 10%程度が Clu 陽性であり、Clu の発現は骨髄球系分化能を示す CD150 と強く相関することが明らかとなった。また、若齢マウスから採取した Clu 陽性と陰性の造血幹細胞を用いて移植実験を行った結果、Clu 陽性造血幹細胞は骨髄再構築能が有意に減少し、分化してきた造血細胞の大半が骨髄球系細胞であることなど加齢造血幹細胞の移植結果と類似した表現型を示すことを確認している。さらに、これまでに Single-cell RNA-seq と免疫染色のデータから、若齢造血幹細胞と比べて加齢造血幹細胞において Clu の転写・翻訳が著増することが明らかとなっている。これらの結果から、加齢造血幹細胞に認められる骨髄再構築能の低下と骨髄球系への分化指向性は Clu 陽性造血幹細胞が支配的に拡大するためであると仮説を立て、その検証をマウスモデルで行う。

まず若齢(2カ月齢)から加齢(20ヶ月齢)の Clu レポーターマウスの骨髄解析を行い、造血幹細胞の増加と Clu 陽性率の変化を検証する。既に8ヶ月齢の Clu レポーターマウスの解析から、造血幹細胞において Clu 陽性率が若齢期と比べて著増することを確認している。今後、さらなる加齢を重ね加齢造血幹細胞における Clu 陽性頻度を検証する。

#### 4. 研究成果

##### (1) Clu レポーターマウスを用いた若齢・加齢造血幹細胞の解析

申請者はこれまでの研究から、Clu の発現は造血幹細胞の加齢状態を示すマーカーとなりうると考え、そのレポーターマウスである Clu-GFP (Tg(Cluc-EGFP)OD95Gsat) マウスを導入し、造血幹細胞加齢評価を行った (図 1a)。若齢から加齢期にかけての Clu-GFP マウスの骨髄を解析した結果、若齢期の造血幹細胞は主に Clu 陰性である一方、加齢が進行するにつれて Clu 陽性の割合が増加することを明らかにした (図 1b)。さらに、加齢マウスは若齢マウスと比較して造血幹細胞の絶対数が増加することが報告されているが、Clu レポーターマウスの解析結果からは、加齢マウスで増加する造血幹細胞の大部分が Clu 陽性であることが明らかとなった (図 1c)。

##### (2) Clu レポーターマウスを用いた若齢・加齢造血幹細胞の解析

前述の解析より、加齢した造血幹細胞は主に Clu 陽性集団と一部の Clu 陰性集団で構成されていることが明らかとなった。次に、Clu 陽性および Clu 陰性の機能性を骨髄移植実験で検証した (図 2a)。9.5Gy の放射線照射で造血系を破壊したマウス (CD45.1+) に、フローサイトメトリーで分取した Clu 陽性および Clu 陰性の加齢造血幹細胞、並びに若齢マウスの造血幹細胞 150 個 (CD45.2+) を  $2 \times 10^5$  個の補助細胞 (CD45.1+) とともに移植した。移植後 1 ヶ月ごとにフローサイトメトリーを用いて抹消血球を解析した結果、Clu 陽性の加齢造血幹細胞は Clu 陰性の加齢造血幹細胞および若齢の造血幹細胞と比べて有意に分化能が低下していることが明らかとなった (図 2b)。また、移植後 4 ヶ月の抹消血球を解析した結果、Clu 陽性の加齢造血幹細胞は骨髄球系 (Myeloid 系) の細胞割合が高いことが明らかとなった (図 2c)。これは、加齢マウスの末梢血で Myeloid 系の細胞が増加することと一致した結果である。さらに、移植後 4 ヶ月の時点で骨髄を解析したところ、Clu 陽性の加齢造血幹細胞が維持されていた (図 2d)。これらの結果から、Clu 陽性加齢造血幹細胞は、分化能が著しく低下する一方で骨髄内において未分化状態で維持されていると考えられる。一連の結果から、造血幹細胞は加齢に伴い細胞数が増加すること、その大部分は Clu 陽性であることが明らかとなった。加えて、Clu 陰性造血幹細胞は若齢造血幹細胞と同様に高い幹細胞活性を示すのに対して、Clu 陽性造血幹細胞はこれまで報告されてきた古典的な加齢造血幹細胞であることが明らかとなった。このことから加齢マウスの造血系は少数の Clu 陰性造血幹細胞が担っていると考えられる。今後、Clu 陽性造血幹細胞を標的とした介入法が確立できれば、骨髄異形成症候群 (MDS) などの老化関連疾患への新たな治療戦略が期待される。

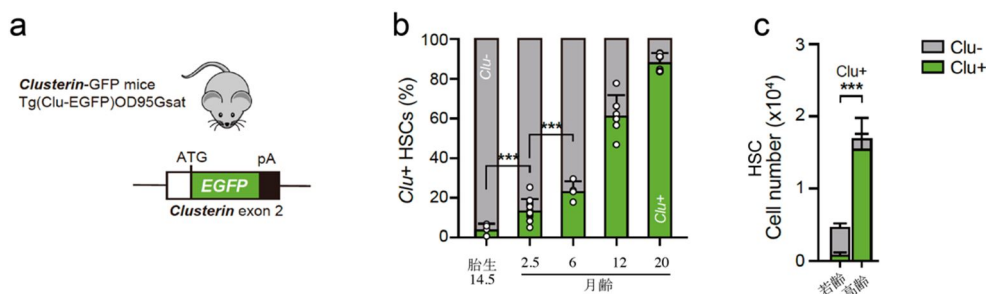


図1 . Cluレポーターマウスを用いた造血幹細胞の加齢変化

- a) 導入したCluレポーターマウスの概念図。
  - b) 造血幹細胞におけるClu陽性細胞の割合。Clu陽性造血幹細胞の割合は加齢に伴い増加する。
  - c) 若齢・高齢マウスにおける造血幹細胞数。加齢造血幹細胞の大部分はClu陽性である。
- \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 ( Student's t-test. )

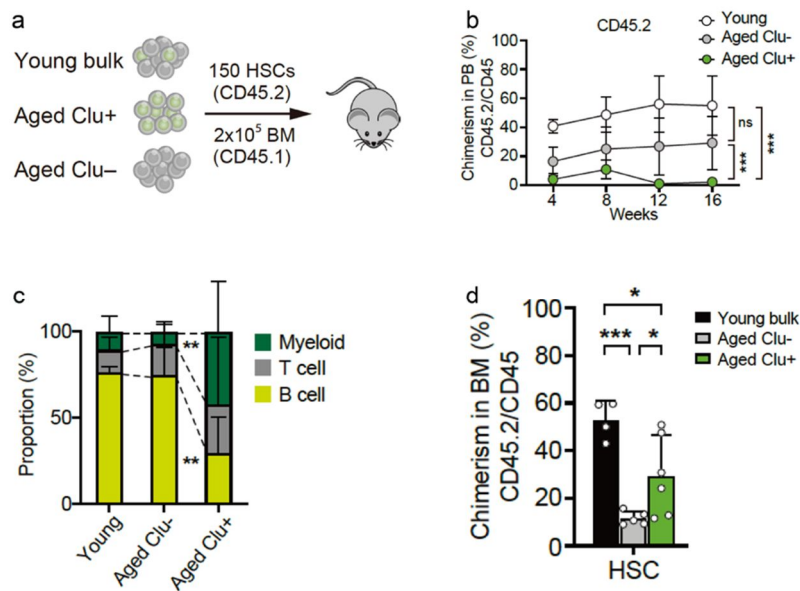


図2 . 骨髄移植解析によるClu陽性・陰性造血幹細胞の機能的差異の検証

- a) 造血幹細胞移植実験の概略。
  - b) 造血幹細胞移植後の末梢血におけるドナー細胞の割合。Clu陽性の加齢造血幹細胞は末梢血においてドナー細胞の割合が有意に少ない。
  - c) 造血幹細胞移植後4ヶ月の時点の末梢血割合。Clu陽性の加齢造血幹細胞はMyeloid系の細胞割合が多く、高齢マウス末梢血と同様の傾向を示す。
  - d) 造血幹細胞移植後4ヶ月の時点の造血幹細胞。Clu陽性の加齢造血幹細胞は造血幹細胞分画においてはドナー細胞が維持されている。
- \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 ( Student's t-test. )

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiroshita Kohei, Kobayashi Hiroshi, Watanuki Shintaro, Karigane Daiki, Sorimachi Yuriko, Fujita Shinya, Tamaki Shinpei, Haraguchi Miho, Itokawa Naoki, Aoyama Kazumasa, Koide Shuhei, Masamoto Yosuke, Kobayashi Kenta, Nakamura-Ishizu Ayako, Kurokawa Mineo, Iwama Atsushi, Okamoto Shinichiro, Kataoka Keisuke, Takubo Keiyo	4. 巻 2
2. 論文標題 A culture platform to study quiescent hematopoietic stem cells following genome editing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100354 ~ 100354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2022.100354	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 Jimbo Koji, Hattori Ayuna, Koide Shuhei, Ito Takahiro, Sasaki Katsuhiko, Iwai Kazuhiro, Nannya Yasuhito, Iwama Atsushi, Tojo Arinobu, Konuma Takaaki	4. 巻 37
2. 論文標題 Genetic deletion and pharmacologic inhibition of E3 ubiquitin ligase HOIP impairs the propagation of myeloid leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 122 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-022-01750-7	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 Poplineau Mathilde, Platet Nadine, Mazuel Adrien, Herault Leonard, N' Guyen Lia, Koide Shuhei, Nakajima-Takagi Yaeko, Kuribayashi Wakako, Carbuccia Nadine, Haboub Loreen, Vernerey Julien, Oshima Motohiko, Birnbaum Daniel, Iwama Atsushi, Duprez Estelle	4. 巻 140
2. 論文標題 Noncanonical EZH2 drives retinoic acid resistance of variant acute promyelocytic leukemias	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2358 ~ 2370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2022015668	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 該当する

1. 著者名 Itokawa Naoki, Oshima Motohiko, Koide Shuhei, Takayama Naoya, Kuribayashi Wakako, Nakajima-Takagi Yaeko, Aoyama Kazumasa, Yamazaki Satoshi, Yamaguchi Kiyoshi, Furukawa Yoichi, Eto Koji, Iwama Atsushi	4. 巻 13
2. 論文標題 Epigenetic traits inscribed in chromatin accessibility in aged hematopoietic stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30440-2	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 Jimbo Koji, Nakajima-Takagi Yaeko, Ito Takahiro, Koide Shuhei, Nannya Yasuhito, Iwama Atsushi, Tojo Arinobu, Konuma Takaaki	4. 巻 36
2. 論文標題 Immunoglobulin superfamily member 8 maintains myeloid leukemia stem cells through inhibition of -catenin degradation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1550 ~ 1562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-022-01564-7	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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Shuhei Koide
2. 発表標題 Clu-positive hematopoietic stem cells show decreased stemness and expand the number with aging
3. 学会等名 Hemato-Retreat 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuhei Koide, Motohiko Oshima, Akira Nishiyama, Koichi Murakami, Zhiqian Zheng, Naoki Itokawa, Nakajima Yaeko, Nozomi Yusa, Kazuaki Yokoyama, Arinobu Tojo, Tomohiko Tamura, Atsushi Iwama
2. 発表標題 Single-cell analysis reveals that Clusterin-positive hematopoietic stem cells with impaired stemness expand with aging
3. 学会等名 ISEH 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuhei Koide, Motohiko Oshima, Akira Nishiyama, Koichi Murakami, Naoki Itokawa, Yaeko Nakajima-Takagi, Zhiqian Zheng, Nozomi Yusa, Kazuaki Yokoyama, Arinobu Tojo, Tomohiko Tamura, Atsushi Iwama
2. 発表標題 Dysfunctional Clusterin-Positive Hematopoietic Stem Cells Expand with Aging
3. 学会等名 64th ASH Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小出 周平、大島 基彦、西山 晃、村上 紘一、テイ シセン、中島 やえ子、遊佐 希、横山 和明、東條 有伸、田村 智彦、岩間 厚志
2. 発表標題 Clu-positive hematopoietic stem cells show decreased stemness and expand with aging
3. 学会等名 第84回日本血液学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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