

127. 造血幹細胞ニッチ細胞の分類と特性解明

田久保 圭誉

国立国際医療研究センター研究所 生体恒常性プロジェクト

Key words : 造血幹細胞, ニッチ, 単一細胞解析, 間葉系前駆細胞

緒言

生体内の臓器のうち、血液や筋肉、皮膚、毛髪、乳腺、腸管、精巣などは自己複製能と多分化能を有する臓器幹細胞によって維持される。臓器幹細胞は前駆細胞を生み出し、最終的に各種の分化細胞を産生する。このような、臓器の細胞ヒエラルキーは「幹細胞システム」と呼ばれる。その異常は、臓器の加齢変化や各種の疾患、発生異常の原因となる。すなわち、幹細胞システムの研究から臓器の恒常性や各種疾患病態への理解を深め、治療技術を開発することが可能である。

臓器幹細胞の性質や動態は周囲の微小環境・ニッチが制御する。ニッチは臓器幹細胞固有の現象（細胞周期の静止状態維持・対称/非対称分裂・分化・遊走・動員等）に必要である。これまでにニッチを構成する各種のニッチ細胞と、ニッチ細胞が供給されるニッチ因子についての研究が進められてきている。ニッチ因子はサイトカインや接着分子などからなる。これらは幹細胞固有の現象を誘導し、必要なエネルギーや代謝物を供給する代謝プログラムを起動する¹⁾。従って臓器幹細胞の理解のためには、ニッチの構成要素と、その作動機構の解明が必須である。陸生哺乳類の生後の造血は、骨髄の造血幹細胞によって担われる。造血幹細胞は骨髄のニッチ細胞によって細胞周期の静止期性や多分化能、自己複製能が維持される²⁾。代表的なニッチ細胞としては間葉系前駆細胞が知られている。間葉系前駆細胞は骨髄の血管近傍に存在し、間葉系系統の骨芽細胞や脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を保持している。間葉系前駆細胞は、各種のサイトカインやケモカイン、接着分子や細胞外基質などを発現して造血幹細胞に作用することが知られている。しかし、間葉系前駆細胞のすべてがニッチ細胞として機能するのか、ニッチ細胞として機能する間葉系前駆細胞に特有の性質があるかは不明である。また、加齢に伴う造血系の変容の際に間葉系前駆細胞がどのように貢献しているかも不明である。そこで本研究では間葉系前駆細胞の1細胞レベルのトランスクリプトーム解析からこれらの問題の解明を図り、間葉系前駆細胞の集団構成と、その加齢に伴う変容についての検討を行った。

方法

1. 骨髄単核球の準備と表面マーカー染色

C57BL/6 マウス大腿骨及び頸骨よりシリンジを用いて骨髄をフラッシュアウトし、予め37°Cに加温しておいたHanks' Balanced Salt solution (HBSS; Ca²⁺およびMg²⁺含有)に200 U/mlのDNase I (Sigma)と250 μg/ml LiberaseDL (Roche)を加えて37°C10分間、穏やかに振盪しながら反応させた(*)。その後、短時間ボルテックスをかけて3分程度沈渣を形成させたのちに上清を別のチューブに移し、沈渣については再度(*)の反応を行った。初回の上清とこの2度目反応由来の上清を合わせて100 μmのフィルターをかけ、2%の血清入りHBSSで洗浄した。得られた細胞の表面マーカーの染色には、Fc blockを加えて10分間氷上で反応させたのち、蛍光標識された抗マウスCD45抗体、Ter119抗体、LepR抗体、CD140a抗体、CD31抗体を使用して氷上で30分間染色して間葉系前駆細胞単離に供した(抗体はいずれもBD Biosciences社)。単離に際してはFACS Aria II (BD Biosciences社)を用いて間葉系前駆細胞分画LepR⁺CD45⁻CD31⁻Ter119⁻CD140a⁺をソーティングした。

2. 単一細胞ライブラリ構築と RNA-seq

ソートした細胞を用いて Fluidigm C1 システムを用いて逆転写と増幅を行い、断片化とアダプター配列の追加を行い、HiSeq-2000 を用いて単一細胞 RNA-seq を行った。得られた各細胞ごとのトランスクリプトームプロファイルに基づいて、主成分分析を実施した。

結果

造血幹細胞のニッチ細胞の中でも間葉系前駆細胞は中心的な役割を果たすとされている。既存の報告では骨髄の間葉系前駆細胞はサイトカインやケモカイン等を造血幹細胞に供給して造血恒常性を維持していると考えられている。そこで、これらの細胞集団内の不均一性、あるいは亜集団の存在を検討し、加齢に伴いそれらに変容があるか検証することとした。

野生型の若齢（2.5 か月齢）マウス及び高齢（24 か月齢）マウスから得られた造血幹細胞のニッチ細胞・間葉系前駆細胞を用いて単一細胞 RNA-seq データを基に主成分分析を実施した結果、若齢の間葉系前駆細胞と高齢の間葉系前駆細胞はそれぞれ別個のクラスターを形成することが明らかとなった。すなわち、若齢（2.5 か月齢）の間葉系前駆細胞と、高齢（24 か月齢）の間葉系前駆細胞はそれぞれ遺伝子発現プロファイルとしては比較的均質な細胞集団であると言える。一方、若齢と高齢の間葉系前駆細胞の遺伝子プロファイル上の違いについて検討したところ、第1主成分と第2主成分のみでは間葉系前駆細胞集団の年齢による差は認められなかったが、追加で第3主成分をつけ加えることで、若齢造血幹細胞と高齢の間葉系前駆細胞が別個の集団として分離されることが見出された（図1）。

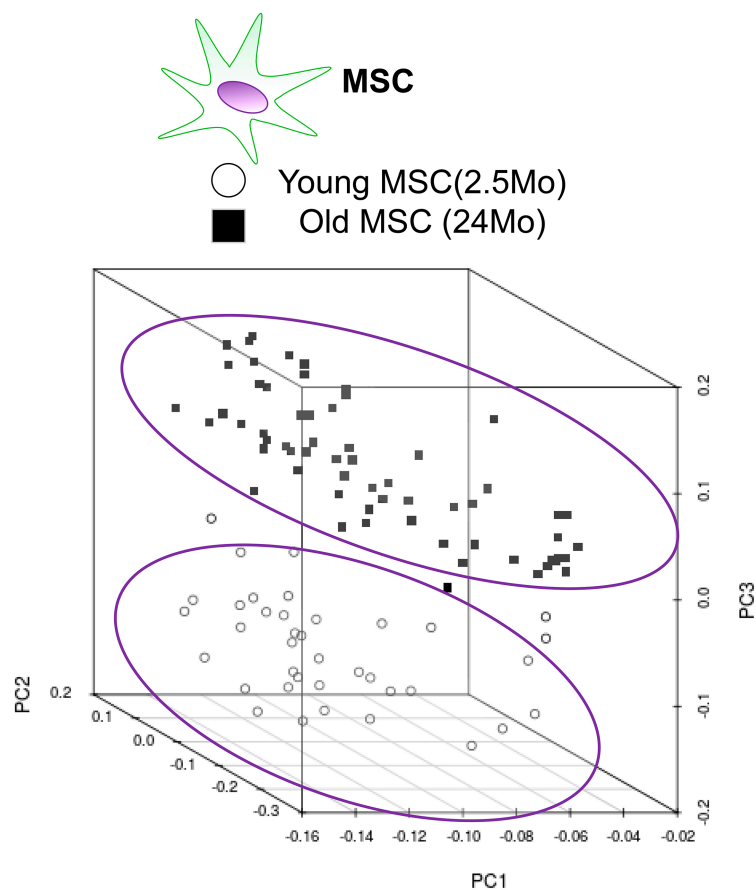


図1. 造血幹細胞ニッチ・間葉系前駆細胞の単一細胞トランスクリプトームに基づいた主成分分析

間葉系前駆細胞（MSC）の単一細胞トランスクリプトームに基づいて主成分分析を行ったところ、若齢（2.5 か月齢）と高齢（24 か月齢）の間葉系前駆細胞はトランスクリプトーム上は別個の集団と分類されることが明らかとなった。

また、遺伝子発現レベルでは主たるニッチ関連遺伝子の発現には変容はなく、加えて各種の細胞老化関連遺伝子の発現について検討をしたが、それらの発現には変化はなかった。興味深いことに細胞老化関連の遺伝子セットは加齢に伴っても発現上昇はしていないことから、造血幹細胞ニッチのエージングと、培養細胞の細胞老化には分子機構の差異が存在することが示唆された。

考 察

これまでに造血幹細胞ニッチ細胞には不均一性、あるいは亜集団が存在するとされてきた。これはニッチ関連遺伝子のケモカインやサイトカイン等の発現の高い集団と低い集団が存在して、より高い集団が未分化性を高く保持しているのではない、と想定したコンセプトであった。間葉系前駆細胞を用いた単一細胞 RNA-seq を実施した本検討においては、そうした亜集団や不均一性は存在しないことが示唆された。今後は加齢に伴う間葉系前駆細胞の遺伝子発現プロファイルの変化において特徴的な遺伝子、とりわけ造血幹細胞に対して傷害や分化を誘導する遺伝子を同定し、その造血幹細胞エージングにおける意義についての検討を実施する予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学分子細胞生物学研究所の白髭克彦教授である。

文 献

- 1) Karigane D, Takubo K. Metabolic regulation of hematopoietic and leukemic stem/progenitor cells under homeostatic and stress conditions. *Int J Hematol.* 2017 May 24. doi: 10.1007/s12185-017-2261-x. PubMed PMID: 28540498
- 2) Kobayashi H, Suda T, Takubo K. How hematopoietic stem/progenitors and their niche sense and respond to infectious stress. *Exp Hematol.* 2016 Feb;44(2):92-100. doi: 10.1016/j.exphem.2015.11.008. PubMed PMID: 26646990