

42. 幹前駆細胞の分化・脱分化による組織維持再生制御

中西 未央

千葉大学 大学院医学研究院 先端研究部門 イノベーション治療学研究講座 長寿医学研究室

Key words : 分化可塑性, 多細胞, 組織再生, 幹細胞老化

緒言

幹細胞と前駆細胞は組織の状態変化に応じて、細胞供給における各々の役割を劇的に変化させる。例えば造血幹前駆細胞の場合、定常状態では幹細胞がほとんど造血に貢献せず、各種の前駆細胞が活発に自己複製・分化して造血を担う。これに対し、放射線照射した骨髄への移植時や薬剤による骨髄破壊後の組織再生時には、幹細胞が活発に自己複製・分化して造血と骨髄再生に寄与する (図 1a)。このような幹前駆細胞間の活性バランスの変化は、消化管上皮や表皮などでも観察されており、組織の状態変化に応じた幹前駆細胞間の活性バランス調節が恒常性維持と修復再生制御の鍵であると考えられる。しかし、このような幹前駆細胞間のバランス制御メカニズムは明らかになっていない。そのおもな原因として、メカニズム解析に利用可能な幹前駆細胞集団の試験管内モデルが存在しないことがあった。

我々は最近、ヒト多能性幹細胞 (ES 細胞および iPS 細胞) の一部に、前駆細胞様の特徴をもつ細胞を見出し、これを多能性創始細胞 (ファウンダー細胞) と名づけた [1]。ファウンダー細胞は多能性関連遺伝子と初期分化関連遺伝子を共発現し、活発な自己複製によって多能性幹細胞集団の恒常性維持に中心的役割を担うなど、多能性幹細胞集団における前駆細胞に相当する機能的特徴をしめす。そこで我々は、前駆細胞様のファウンダー細胞を含むヒト多能性幹細胞が、幹前駆細胞間の活性バランス制御機構解明に有効な試験管内モデルとなると考えた。

ファウンダー細胞は分化関連遺伝子の発現にもかかわらず、幹細胞分画もふくむ多能性幹細胞集団全体を再構築する能力をもつ。この事は多能性幹細胞集団において、幹→前駆 (ファウンダー) 細胞への分化だけでなく、前駆→幹細胞への脱分化も可能である事を示唆している。実際に RNA ベロシティ法 [2] により各細胞の変化の方向性を解析した結果、ファウンダー細胞の中にさらに分化する細胞と、幹細胞状態へと脱分化する細胞の双方が観察された。この結果は多能性幹細胞集団において、幹細胞から前駆細胞への分化が可逆的であり、幹前駆細胞が互いに分化と脱分化を繰り返して動的なバランス制御を行っている事を強く示唆する (図 1b)。

前駆細胞から幹細胞への脱分化は、放射線照射等により人為的に幹細胞を枯渇させた消化管上皮および気管支上皮で観察される [3, 4] もの、造血細胞やその他の組織における幹・前駆細胞間のバランス制御を担っているかは不明である。そこで本研究では、我々が多能性幹細胞集団で確立したモデルを組織幹前駆細胞 (特に造血幹前駆細胞) へと敷衍し、幹前駆細胞が分化・脱分化により互いのバランスを動的に変化させ、組織維持や再生を制御することを明らかにし、その未知の相互制御メカニズムを解明することを目的とした。

骨髄ニッチの影響を除くため *ex vivo* においてマウス造血幹・前駆細胞の自発的な分化状態変化を解析した結果、特定の造血前駆細胞の一部が造血幹細胞様の表面抗原および遺伝子発現パターンを獲得することを見出した。このような造血前駆細胞の変化は造血幹細胞との共培養により抑制される傾向があったことから、造血幹細胞由来のシグナルによって造血前駆細胞の脱分化が制御されている可能性が示唆された。このシグナルを造血幹前駆細胞の 1 細胞トランスクリプトームデータの解析から予測したところ、細胞同士の接触 (cell-cell interaction) を介した候補シグナルが多数同定された。実際に免疫組織学的な解析により、これら造血幹細胞および特定の造血前駆細胞の一部が、骨髄において互いに密接したクラスター構造を形成していることを見出した。これらの結果から、特定の造血前駆細胞が幹細胞への脱分化能をもつこと、造血幹細胞と造血前駆細胞がこれまで知られていなかった空間的に制御された相互作用により脱分化を制御していることが示唆された。

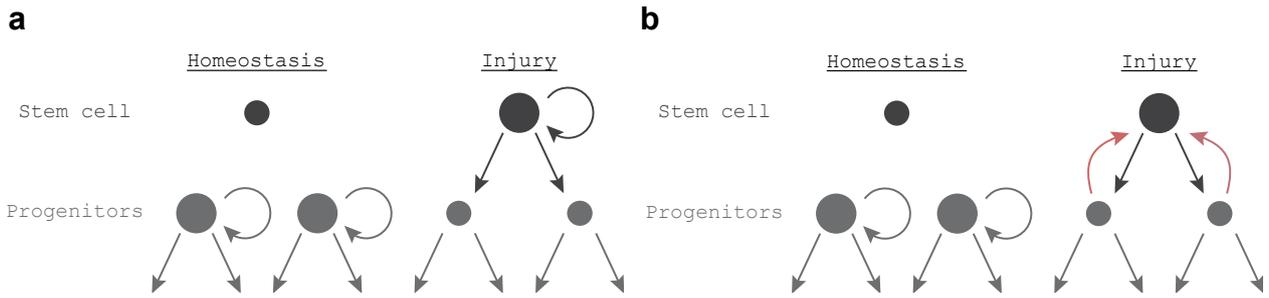


図1. 本研究で提起する幹前駆細胞の新しい制御モデル

- a) 従来の幹前駆細胞制御モデル。
- b) 本研究で提起する幹前駆細胞制御モデル。

方法および結果

1. 造血前駆細胞の脱分化能の解明

最初にヒト ES 細胞社会で観察された幹前駆細胞間の分化・脱分化を介したバランス制御が、造血系でもおきているかを調べた。マウス造血前駆細胞は骨髄移植後の分化能によりリンパ球系・骨髄球系など 4 種類 (Multipotent Progenitor (MPP) 1~4) に分類される [5, 6]。そこでまずフローサイトメトリーで分離したこれらの細胞を、近年確立された造血幹細胞培養法 [7] を用いて培養し、自発的な分化状態の変化を解析した。その結果、4 種類のうち巨核球・赤血球系前駆細胞 (MPP2) の一部が、造血幹細胞と同じフェノタイプへと変化した (図2上)。RNA-seq 解析の結果、これらの細胞は元の前駆細胞より幹細胞に近い遺伝子発現パターンを示した (図2下)。これらの結果から、特定の造血前駆細胞が造血幹細胞へと脱分化しうることが示された。

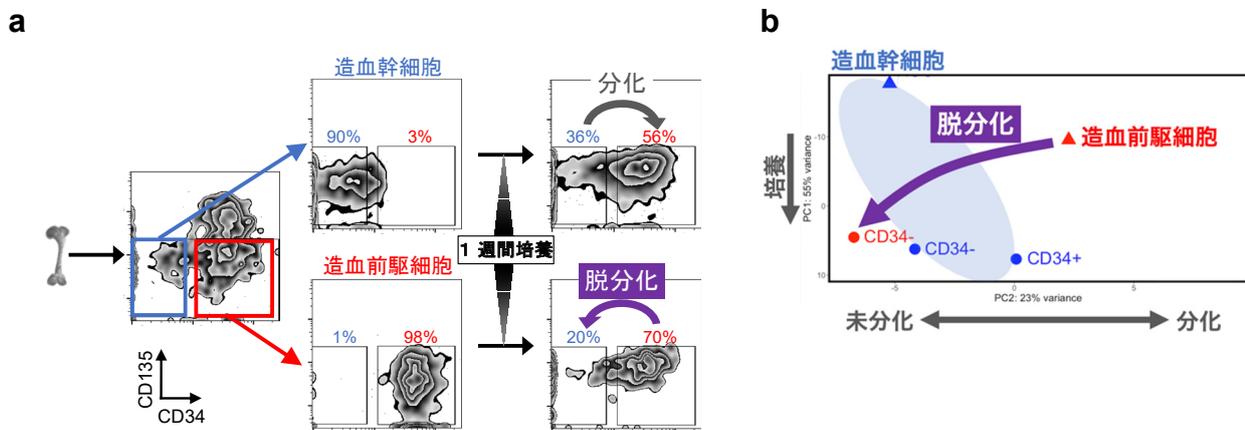


図2. *Ex vivo* における特定の造血前駆細胞から幹細胞様細胞への自発的な変化

- a) *Ex vivo* 培養による造血幹細胞と巨核球・赤血球系前駆細胞の表面抗原マーカー発現変化。CD34 陰性から陽性へと分化方向に変化する造血幹細胞 (上) やその他の前駆細胞 (data not shown) と比較して、一部の巨核球・赤血球系前駆細胞のみが CD34 陽性から陰性へと変化した。
- b) *Ex vivo* 培養前後の造血幹細胞および巨核球・赤血球系前駆細胞の RNA-seq 解析の結果 (PCA プロット)。巨核球・赤血球系前駆細胞 (赤) から生じた CD34 陰性細胞は、元の前駆細胞よりも造血幹細胞 (青) に近い遺伝子発現 signature を示した。

2. 造血幹細胞からのシグナルによる造血前駆細胞脱分化制御の解析

次に、造血幹前駆細胞がどのようにして互いの状態を感知し、分化・脱分化を制御するのか調べた。まず骨髄微小環境の影響を除き、造血幹前駆細胞間の相互作用のみによって脱分化制御が可能か調べるため、培養系をもちいて解析を行った。巨核球・赤血球系前駆細胞を造血幹細胞（識別のためコンジェニック系統マウスから分離）と共培養し、幹細胞由来シグナルの前駆細胞脱分化への影響を解析した。その結果、幹細胞との共培養によって前駆細胞の脱分化が減少したことから、幹細胞に由来するシグナルによって前駆細胞の脱分化が抑制されている可能性が示唆された。

そこで次に、造血幹細胞が前駆細胞の脱分化を制御する未知のシグナルを、造血幹前駆細胞 1 細胞 RNA-seq データを用いて予測した。幹細胞と巨核球・赤血球系前駆細胞とに特異的に発現する遺伝子を抽出し、幹細胞由来の脱分化制御シグナルのリガンド/レセプター候補を予測した [8]。その結果、造血幹細胞から前駆細胞への脱分化制御シグナル候補として直接的な細胞接触 (cell-cell interaction) を介したものが多数同定された。

3. 造血幹細胞・前駆細胞間の空間的制御の解析

造血幹前駆細胞は骨髄の近い領域に存在するとされてきたが [9, 10]、細胞接触するほど密接しているかは不明であった。そこで骨髄切片の多重免疫染色・共焦点顕微鏡観察を行い、造血幹前駆細胞の相対的位置関係を調べた。その結果、マウス・ヒト骨髄で造血幹前駆細胞が数～十数細胞の密接したクラスターを形成していることが初めて明らかとなった (図 3)。

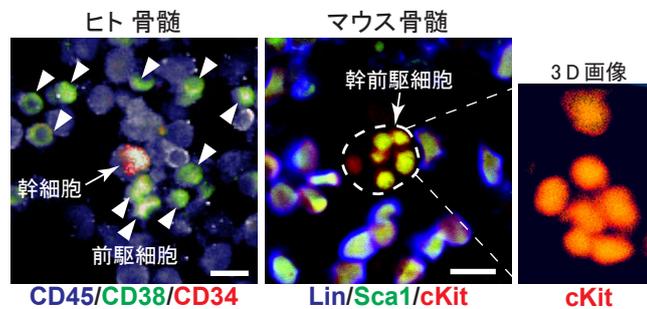


図 3. ヒト・マウス骨髄における造血幹前駆細胞クラスター

ヒト (左) およびマウス (中央・右) 骨髄における一部の造血幹前駆細胞によるクラスター構造形成。ヒト: CD45 (青、血球マーカー)、CD38 (緑、造血前駆細胞マーカー)、CD34 (赤、造血幹細胞マーカー)、マウス: Lin (青、分化マーカー (Gr-1、Cd11b、Ter119、B220、IL-7R、CD4、および CD8))、Sca1 (緑、幹前駆細胞マーカー)、cKit (赤、幹前駆細胞マーカー)。Scale Bars = 50 μ m。

考 察

以上の結果から、造血幹前駆細胞がクラスターの形成・解離を介した直接接触によって相互制御するという新しいモデルが考えられる。すなわち定常状態ではクラスター内の直接的細胞相互作用により幹細胞の周囲の前駆細胞の脱分化を抑制する。これに対して、組織傷害によって幹細胞が枯渇・クラスター構造が破綻すると前駆細胞の脱分化が開始する。その後クラスターの再生にともない、脱分化抑制が再開する。今後はこのモデルを様々なアプローチにより検証し、これまで全く知られていなかった造血幹前駆細胞の空間的制御 (「形作り」) を介した脱分化制御メカニズム解明を目指す。

共同研究者・謝辞

本研究の開始にあたって理解や支援が全く得られないなか、上原記念生命科学財団からの助成は研究の命脈をつなぐ貴重な御支援でした。申請にあたって御推薦を頂いた千葉大学大学院医学研究院長 (現学長) の中山俊憲先生、そして上原記念生命科学財団とその関係者の皆様に心より感謝を申し上げます。

文 献

- 1) Nakanishi M, Mitchell RR, Benoit YD, Orlando L, Reid JC, Shimada K, Davidson KC, Shapovalova Z, Collins TJ, Nagy A, Bhatia M. Human Pluripotency Is Initiated and Preserved by a Unique Subset of Founder Cells. *Cell*. 2019 May 2; 177(4):910-24. Epub 2019 Apr 11. PMID: 30982595 DOI: 10.1016/j.cell.2019.03.013
- 2) La Manno G, Soldatov R, Zeisel A, Braun E, Hochgerner H, Petukhov V, Lidschreiber K, Kastrioti ME, Lönnerberg P, Furlan A, Fan J, Borm LE, Liu Z, van Bruggen D, Guo J, He X, Barker R, Sundström E, Castelo-Branco G, Cramer P, Adameyko I, Linnarsson S, Kharchenko PV. RNA velocity of single cells. *Nature*. 2018 Aug;560(7719):494-498. Epub 2018 Aug 8. PMID: 30089906 DOI: 10.1038/s41586-018-0414-6.
- 3) van Es JH, Sato T, van de Wetering M, Lyubimova A, Yee Nee AN, Gregorieff A, Sasaki N, Zeinstra L, van den Born M, Korving J, Martens ACM, Barker N, van Oudenaarden A, Clevers H. Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat Cell Biol*. 2012 Oct;14(10):1099-1104. Epub 2012 Sep 23. PMID: 23000963 DOI: 10.1038/ncb2581.
- 4) Tata PR, Mou H, Pardo-Saganta A, Zhao R, Prabhu M, Law BM, Vinarsky V, Cho JL, Breton S, Sahay A, Medoff BD, Rajagopal J. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature*. 2013 Nov 14;503(7475):218-23. Epub 2013 Nov 6. PMID: 24196716 DOI: 10.1038/nature12777.
- 5) Pietras EM, Reynaud D, Kang YA, Carlin D, Calero-Nieto FJ, Leavitt AD, Stuart JM, Göttgens B, Passegué E. Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell*. 2015 Jul 2;17(1):35-46. Epub 2015 Jun 18. PMID: 26095048 DOI: 10.1016/j.stem.2015.05.003.
- 6) Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lió P, Macdonald HR, Trumpp A. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008 Dec 12;135(6):1118-29. PMID: 19062086 DOI: 10.1016/j.cell.2008.10.048.
- 7) Wilkinson AC, Ishida R, Kikuchi M, Sudo K, Morita M, Crisostomo RV, Yamamoto R, Loh KM, Nakamura Y, Watanabe M, Nakauchi H, Yamazaki S. Long-term ex vivo haematopoietic stem cell expansion allows nonconditioned transplantation. *Nature*. 2019 Jul;571(7763):117-121. Epub 2019 May 29. PMID: 31142833 DOI: 10.1038/s41586-019-1244-x.
- 8) Efremova M, Vento-Tormo M, Teichmann SA, Vento-Tormo R. CellPhoneDB: inferring cell-cell communication from combined expression of multi-subunit ligand-receptor complexes. *Nat Protoc*. 2020 Apr;15(4):1484-1506. Epub 2020 Feb 26. PMID: 32103204 DOI: 10.1038/s41596-020-0292-x.
- 9) Guezguez B, Campbell CJ, Boyd AL, Karanu F, Casado FL, Di Cresce C, Collins TJ, Shapovalova Z, Xenocostas A, Bhatia M. Regional localization within the bone marrow influences the functional capacity of human HSCs. *Cell Stem Cell*. 2013 Aug 1;13(2):175-89. PMID: 23910084 DOI: 10.1016/j.stem.2013.06.015.
- 10) Christodoulou C, Spencer JA, Yeh SA, Turcotte R, Kokkaliaris KD, Panero R, Ramos A, Guo G, Seyedhassantehrani N, Esipova TV, Vinogradov SA, Rudzinskis S, Zhang Y, Perkins AS, Orkin SH, Calogero RA, Schroeder T, Lin CP, Camargo FD. Live-animal imaging of native haematopoietic stem and progenitor cells. *Nature*. 2020 Feb;578(7794):278-283. Epub 2020 Feb 5. PMID: 32025033 DOI: 10.1038/s41586-020-1971-z.