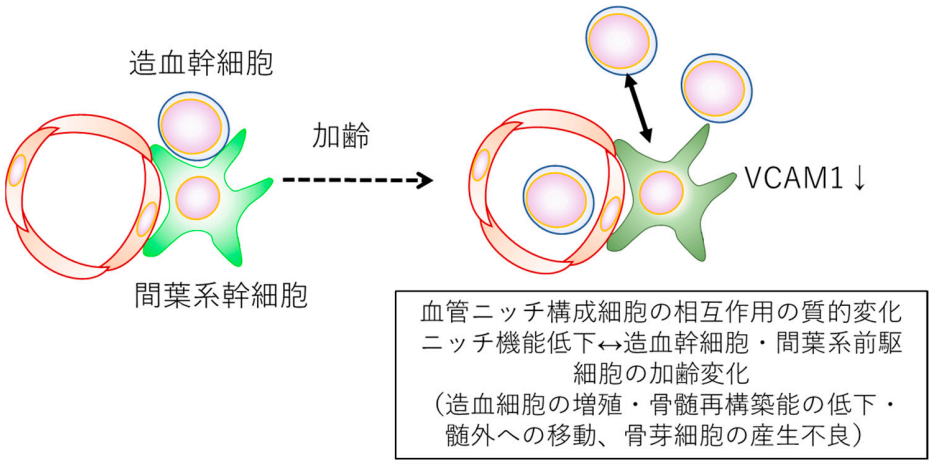
127　加齢造血幹細胞―ニッチ相互作用の単一細胞解析	小林　央

【目的】造血幹細胞は加齢に伴い造血再構築能および正常な分化能が徐々に失われる一方、骨髄中の幹細胞の総数はヒトにおいてもマウスにおいても増加する。造血幹細胞の加齢変化についてはゲノム・エピゲノムの変化を含めて個々の細胞で多様な変化も影響しており単一細胞レベルでその多様性を理解することが不可欠である。

【方法】若齢および様々な加齢段階の造血幹細胞に対して単一細胞 RNA シークエンス（scRNA-seq）を実施し、若齢から高齢に至るまでの造血幹細胞の性質の細胞ごとの経時的な変化を解析した。さらに細胞分裂と造血幹細胞の加齢変化との関係を明らかにするために細胞分裂履歴マウスを用いて scRNA-seq を行い、加齢マウスとの遺伝子発現の相違を比較した。同様に造血幹細胞ニッチとして知られる骨髄間葉系幹細胞（MSC）も 10 週齢および 2 年齢の個体から採取し scRNA-seq を実施した。

【結果】加齢造血幹細胞に高発現する遺伝子は 7 ヶ月齢から発現が上昇しており、以降明瞭な違いは認めない。加齢に特徴的な遺伝子発現プロファイルはより高い未分化性を示していた。細胞分裂履歴は加齢変化に伴う遺伝子発現よりもむしろ細胞分裂の亢進と分化の傾向を示しており、短期的には細胞分裂は加齢形質に影響を与えなかった。間葉系幹細胞のうち、造血幹細胞維持に関連する液性因子の発現変化は認められなかったが、接着因子の Vcam1 の発現低下が認められた。

造血幹細胞とニッチ細胞の相互作用の質的変化



127. 加齢造血幹細胞－ニッチ相互作用の単一細胞解析

小林　央

国立国際医療研究センター 生体恒常性プロジェクト

Key words：造血幹細胞，間葉系幹細胞，ステムセルエイジング，単一細胞 RNA シークエンス

緒　言

造血幹細胞は加齢に伴い造血再構築能および正常な分化能が徐々に失われる一方、骨髄中の幹細胞の総数はヒトにおいてもマウスにおいても増加する。造血幹細胞の機能低下と数的増加の要因を明らかにすることは、加齢関連血液疾患（易感染性、慢性貧血、造血器悪性腫瘍）の克服にも重要な課題である。高齢者においては DNMT3A や ASXL1 など、骨髄系悪性腫瘍に特徴的な遺伝子変異が生ずることで、10%程度の高齢者でクローン造血［1, 2］を引き起こすことから造血幹細胞の加齢変化の一部は遺伝子変異により説明できる可能性がある一方、大部分のヒト高齢者で造血幹細胞数の増加とリンパ球分化能の低下を呈することから［3］、遺伝子変異によらない変化が造血幹細胞に生じていることが想定される。細胞分裂は造血幹細胞の加齢変化の要因の一つと報告されているものの、造血幹細胞の細胞分裂を促す要因や、細胞分裂の下流で造血幹細胞にどのような長期的変化が起こるかはわかっていない。造血幹細胞の分裂は感染などのストレス下でニッチとの相互作用の変化が重要な役割を果たしであることは申請者による研究も含めて明らかになってきており［4, 5］、骨髄の炎症－再生（造血幹細胞の増殖）の長期的帰結と考えられる造血幹細胞の加齢変化についても造血幹細胞―ニッチの相互作用を明らかにする必要がある。一方、ゲノム・エピゲノムの変化を含めて個々の細胞で多様な変化も加齢に影響しており単一細胞レベルでその多様性を理解することが不可欠であった。私たちは若齢および様々な加齢段階の造血幹細胞に対して単一細胞 RNA シークエンス（scRNA-seq）を実施し、若齢から高齢に至るまでの造血幹細胞の性質の細胞ごとの経時的な変化を解析した。さらに細胞分裂と造血幹細胞の加齢変化との関係を明らかにするために細胞分裂履歴マウスを用いて scRNA-seq を行い、加齢マウスとの遺伝子発現の相違を比較した。同様に造血幹細胞ニッチとして知られる骨髄間葉系幹細胞（MSC）に対して scRNA-seq を実施した。

方　法

1. マウス

C57BL/6J マウスを三協ラボサービスもしくは日本 SLC より購入した。Tal1-tTA:Col1a1-TetO-H2B-GFP マウス（H2B-GFP）マウスは Jackson ラボラトリーSCLtTA（Stock No : 006209）および pTRE-H2BGFP（Stock No : 005104）を交配することで得られた。

2. 造血幹細胞採取

両側大腿骨および脛骨を 21 ゲージ針を用いて PBS＋2%FCS にてフラッシュし骨髄プラグを採取した。よく懸濁し細胞浮遊液を得て溶血剤（0.17 M NH_4Cl、1 mM EDTA、10 mM $NaHCO_3$）により赤血球を除去後、Lineage 抗体（CD4、CD8a、B220、Ter-119、Gr-1、Mac-1）-PerCP-Cy5.5、CD150-PE、CD41-FITC、CD48-FITC、Flt3-APC、CD34-Alexa700 により 10 週齢の個体は $CD150^+CD41^-CD48^-Flt3^-CD34^-$LSK、7 ヶ月齢以上の加齢個体は $CD150^+CD48^-Flt3^-CD34^-$LSK 分画を採取した。

3. 単一細胞 RNA シークエンス

単離した造血幹細胞ないし間葉系幹細胞をソート後、約 10,000 細胞/mL となるようメディウムに懸濁し、Fluidigm C1 システムを用いて単一細胞ごとに cDNA 合成および増幅を行った。その後 Nextera XT DNA Sample Preparation Kit（Illumina）を用いてタグ付けを行い、造血幹細胞は京都大学腫瘍生物学分野（小川誠司教授）、間葉系幹細胞は東

京大学ゲノム情報解析研究分野（白髭克彦教授）にてそれぞれ Illumina HiSeq2000 にてシークエンスされた。

4. 細胞分裂履歴の確認

H2B-GFP マウスは造血未分化細胞に特異的に発現する Tal1 プロモーター下で tTA を発現し、ドキシサイクリンの非存在下で恒常的に GFP を結合したヒストン H2B（H2B-GFP）を発現するマウスである。ドキシサイクリン投与により H2B-GFP の発現は抑制され、細胞分裂に従って細胞の GFP シグナルは減弱する。1 年齢時点でドキシサイクリンを飲用水に混ぜ、2.5 ヶ月にわたり投与を継続した。その時点で骨髄細胞を採取し、Lineage 抗体（CD4、CD8a、B220、Ter-119、Gr-1、Mac-1）-PerCP-Cy5.5、抗 CD150-BV421、抗 CD48-PE、抗 Flt3-APC の各抗体により染色、FACS AriaII にて、GFP シグナルの強い分画（GFP-high $CD150^{+}CD48^{-}Flt3^{-}$LSK）および GFP シグナルの弱い分画（GFP-low $CD150^{+}CD48^{-}Flt3^{-}$LSK）をそれぞれ分取した。分取にあたって、ドキシサイクリン非投与マウスおよび、H2B-GFP を発現しないマウスをポジティブコントロールおよびネガティブコントロールとしてそれぞれ用いた。

5. 間葉系幹細胞の分取

マウスの骨髄より骨髄プラグを採取し、HBSS（Ca+、Mg+）中、リベラ―ゼ（Roche）および DNaseI にて 37℃10 分間の処理を 2 回行い、間葉系細胞を分離した。溶血剤（0.17 M NH_4Cl、1 mM EDTA、10 mM $NaHCO_3$）により赤血球を除去後、CD45-PerCP-Cy5.5、Ter-119-PerCP-Cy5.5、CD140a-APC、CD31-PE、Lepr-biotin 抗体にて染色を行った。ストレプトアビジン-PE-Cy7 にて二次染色を行い、FACS Aria にて $CD45^{-}Ter119^{-}CD31^{-}CD140a^{+}Lepr^{+}$細胞を分取した。

結果および考察

私たちは若齢から高齢に至るまでに造血幹細胞の遺伝子発現プロファイルが細胞ごとにどのように変遷していくかを明らかにするため、10 週齢、7 ヶ月齢、12 ヶ月齢、18 ヶ月齢および 24 ヶ月齢の各加齢段階の造血幹細胞に対して単一細胞 RNA シークエンス（scRNA-seq）を実施し、経時的な変化を解析した。10 週齢から 2 年齢に変化する時点で 1.5 倍以上の発現変化を認める 383 遺伝子に対して主成分分析を実施した（図 1）。その結果 10 週齢と 7 ヶ月齢以上の造血幹細胞は別々のクラスターを形成し、7 ヶ月齢以降では明確なクラスターに分かれなかった。これは、加齢に特徴的な遺伝子発現プロファイルが、実際の個体の加齢よりもかなり早期に起こっていることを示唆している。また、加齢に伴いクラスターはより大きな広がりを見せており細胞ごとの遺伝子発現の多様性は増加していると考えられる。特に加齢変化を特徴付ける第一主成分（PC1）を特徴付ける個々の遺伝子発現を見ても、加齢造血幹細胞に高発現する Selp や Sdpr などは 7 ヶ月齢から発現が上昇しており、以降明瞭な違いは認めない（図 2）。

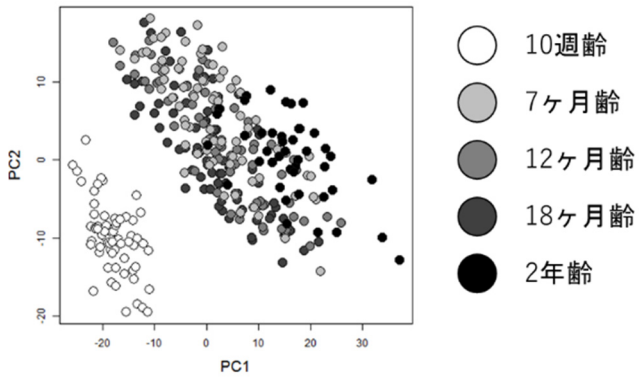


図 1. 若齢および加齢（A）造血幹細胞の scRNA-seq の結果の主成分分析結果
造血幹細胞は 7 ヶ月齢から加齢様プログラムへと変化している。

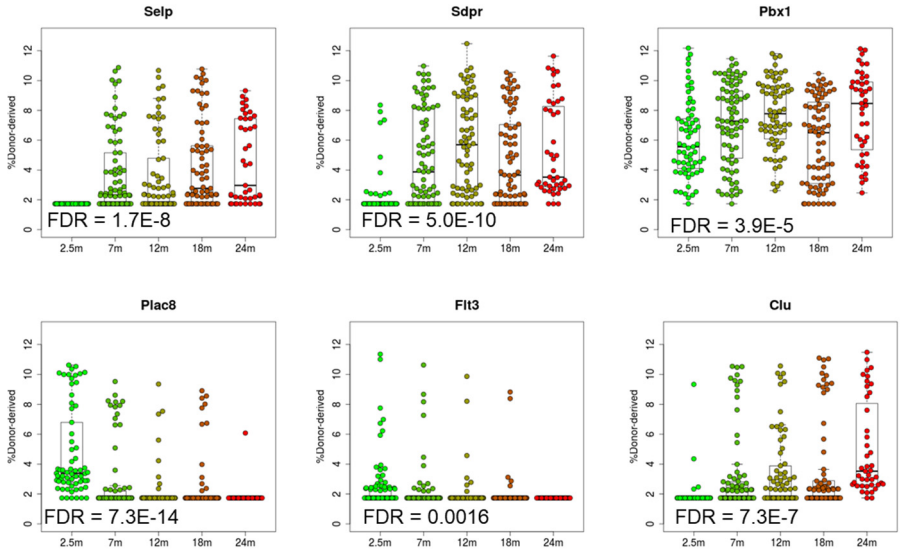


図 2. 加齢に伴い発現変動する遺伝子

ANOVA により P 値を算出した後、FDR を Storey の方法で算出した。

10 週齢と 2 年齢の造血幹細胞に限って、scRNA-seq のデータを用いて gene set enrichment analysis（GSEA）を実施したところ、2 年齢の造血幹細胞では、分化した前駆細胞である多能性前駆細胞より未分化な造血幹細胞で発現する遺伝子が 10 週齢造血幹細胞に比較して enrich していたことから、加齢に特徴的な遺伝子発現プロファイルはより高い未分化性を示すことが示唆された（図 3）。

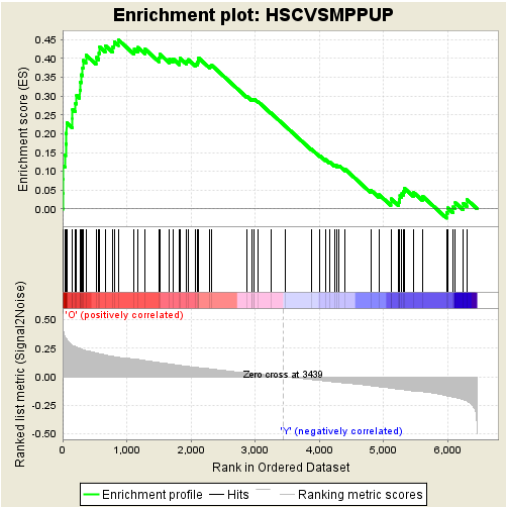


図 3. Gene set enrichment analysis

2 年齢造血幹細胞（Old HSC）と 10 週齢造血幹細胞（Young HSC）の scRNA-seq による遺伝子発現を比較した。遺伝子発現セットは造血幹細胞と多能性前駆細胞を比較して造血幹細胞に多く発現する遺伝子群。

造血幹細胞の加齢変化は細胞分裂によって引き起こされるという先行研究があり［6, 7］、細胞分裂履歴を評価できる H2B-GFP マウス［8］を用いて、1 年齢時点から 10 週間ドキシサイクリンを投与することで、この 10 週間の間に細胞分裂した造血幹細胞が分裂していない細胞と比較してどのような遺伝子発現プロファイルの相違があるかを scRNA-seq によって検証した。細胞分裂した造血幹細胞は娘細胞へヒストンが分配されるため、H2B-GFP シグナルが細胞分裂に伴う希釈によって減弱することを用いる。H2B-GFP シグナルが強い細胞（H2B-GFP-High）と弱い細胞（H2B-GFP-Low）を比較した。H2B-GFP-Low の細胞は PC1 について 10 週齢と 2 年齢の中間段階にあり、PC2 については 10 週齢および 2 年齢と比較して低値を示した（図 4）。両者の違いは、Mcm2、Mcm6 の上昇や Ly6a（Sca-

1)、Fos の発現低下が顕著であった（図 5)。一方加齢関連遺伝子の上昇は Pbx1 および Clu にのみ見られ、Selp や Sdpr の発現に相違はなかった。Mcm の発現上昇は加齢変化では認められないことから、細胞分裂の影響は短期的には加齢様変化よりもむしろ細胞分化に関連していた。

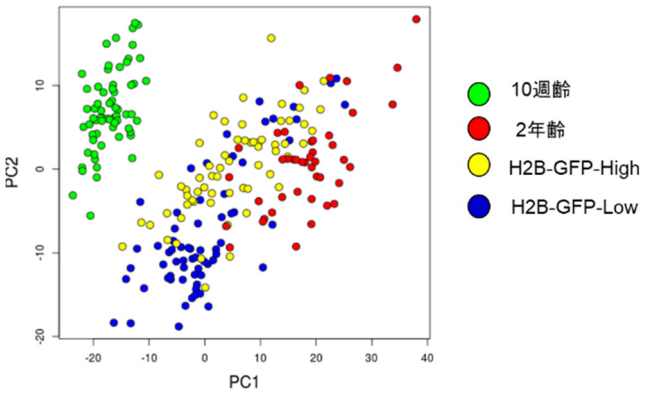


図 4. 分裂履歴の有無による遺伝子発現の相違

10 週齢、2 年齢の造血幹細胞および、12 ヶ月齢から 14.5 ヶ月齢までの間に分裂履歴のある細胞（H2B-GFP-Low）および分裂履歴のない細胞（H2B-GFP-High）を主成分分析にて図示。

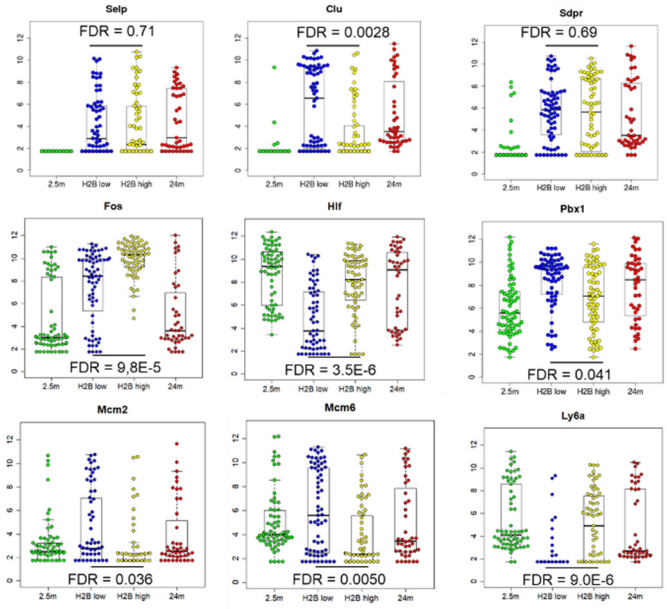


図 5. 分裂履歴の有無による個別の遺伝子発現の相違

H2B-GFP low（青）とH2B-GFP-High（黄）の造血幹細胞のscRNA-seq遺伝子発現。H2B lowとH2B highの間で検出された遺伝子についてt検定を行いその後Storeyの方法でFDRを算出した。

最後に、造血幹細胞を維持するニッチ細胞である間葉系幹細胞について scRNA-seq を実施した。間葉系幹細胞の加齢に伴う遺伝子発現変化は造血幹細胞ほど明瞭ではなく、主要な発現変動は同一固体内の細胞間の相違によって説明された。重要な造血幹細胞ニッチ因子について遺伝子発現変化を比較したところ、液性因子である Kitl、Cxcl12 には遺伝子発現変化を認めなかったが、接着因子である Vcam1 の低下が加齢に伴って認められた（図 6)。このことは造血幹細胞と間葉系幹細胞の相互作用が低下することを示唆しており、今後両者の接着の低下が造血幹細胞の機能変化にどのような影響があるのかを明らかにしていく必要があろう。

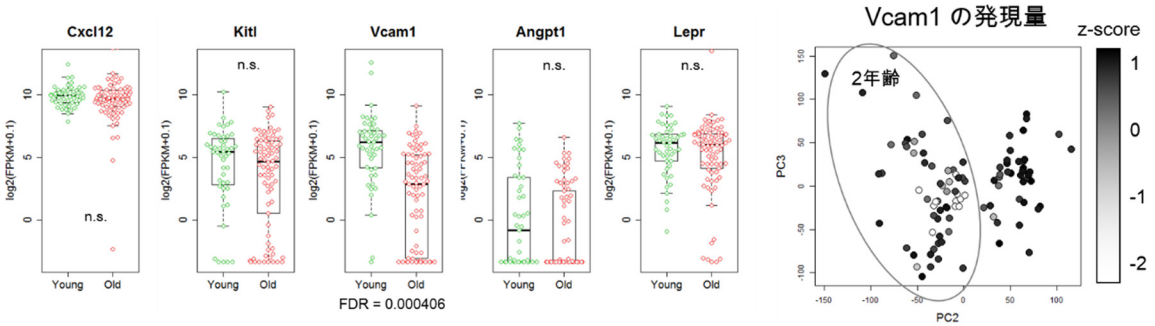


図 6. 加齢間葉系幹細胞の scRNA-seq 解析

加齢間葉系前駆細胞ではVcam1の発現が低下する。Vcam1以外のニッチ因子は明らかな低下を認めない。2年齢(Old)と10週齢(Young)の間で両側t検定を行った後FDRを算出した(左)。また主成分分析を行った後、Vcam1のz-scoreにより色づけを行った(右)

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学研究室の小川誠司教授、塩澤裕介博士、東京大学ゲノム情報解析研究分野の白髭克彦教授、中戸隆一郎博士である。

文　献

1) Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. N Engl J Med. 2014;371(26):2488-98. doi: 10.1056/NEJMoa1408617. PubMed PMID: 25426837; PubMed Central PMCID: PMCPMC4306669.

2) Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. N Engl J Med. 2014;371(26):2477-87. doi: 10.1056/NEJMoa1409405. PubMed PMID: 25426838; PubMed Central PMCID: PMCPMC4290021.

3) Pang WW, Price EA, Sahoo D, Beerman I, Maloney WJ, Rossi DJ, et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(50):20012-7. doi: 10.1073/pnas.1116110108. PubMed PMID: 22123971; PubMed Central PMCID: PMCPMC3250139.

4) Kobayashi H, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Karigane D, Haeno H, Yamamoto KN, et al. Bacterial c-di-GMP affects hematopoietic stem/progenitors and their niches through STING. Cell Rep. 2015;11(1):71-84. Epub 2015/04/02. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.066. PubMed PMID: 25843711.

5) Kobayashi H, Suda T, Takubo K. How hematopoietic stem/progenitors and their niche sense and respond to infectious stress. Exp Hematol. 2016;44(2):92-100. Epub 2015/12/02. doi: 10.1016/j.exphem.2015.11.008. PubMed PMID: 26646990.

6) Beerman I, Bock C, Garrison BS, Smith ZD, Gu H, Meissner A, et al. Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. Cell Stem Cell. 2013;12(4):413-25. Epub 2013/02/14. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.017. PubMed PMID: 23415915.

7) Bernitz JM, Kim HS, MacArthur B, Sieburg H, Moore K. Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions. Cell. 2016;167(5):1296-309.e10. Epub 2016/11/10. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.022. PubMed PMID: 27839867; PubMed Central PMCID: PMCPMC5115957.

8) Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. Cell. 2008;135(6):1118-29. doi: S0092-8674(08)01386-X [pii]10.1016/j.cell.2008.10.048. PubMed PMID: 19062086.