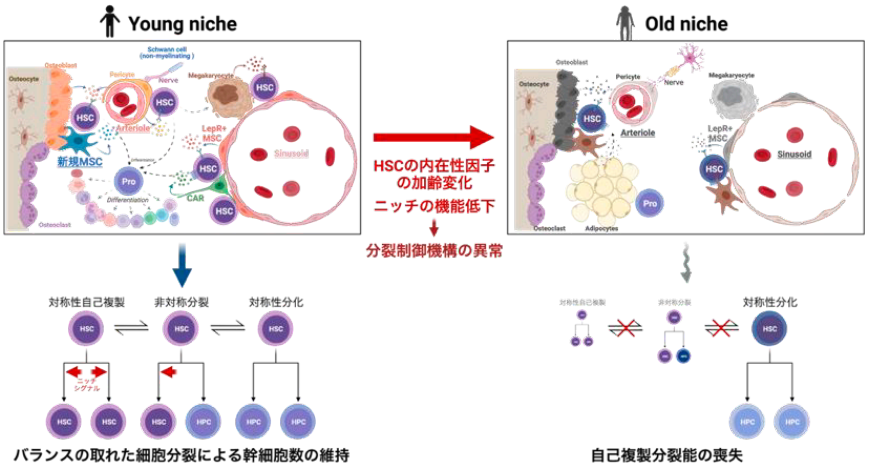
71　老化ニッチによる造血幹細胞の分裂制御異常の分子機構	新井　文用

【目的】加齢に伴う造血微小環境（ニッチ）の機能低下は、造血幹細胞（hematopoietic stem cell：HSC）の分裂パターン ー対称性自己複製分裂・非対称分裂・対称性分化分裂ー に影響を及ぼすことによって、自己複製能の低下と分化異常につながると考えられる。そこで本研究では、HSC の細胞分裂パターンの加齢変化とニッチの老化の関連を明らかにすることを目的とした。

【方法】1. 細胞分裂アッセイ：幼若（4 週齢）、成体（8 週齢）、老齢（18 カ月齢）マウスの造血幹・前駆細胞のシングルセル定量 PCR アレイデータを学習させた人工ニューラルネットワーク（artificial neural network：ANN）を構築した。細胞分裂アッセイでは、学習済 ANN を用いて HSC の娘細胞のアイデンティティーを識別し、その結果に基づいて、分裂パターンとその加齢変化を解析した。2. 新規ニッチ細胞・ニッチ分子の同定：骨内膜領域のライニング細胞（bone lining cell：BLC）のシングルセル定量 PCR アレイ解析、骨髄ストローマ細胞（$CD45^{-}TER119^{-}CD31^{-}$ 細胞）のシングルセル RNA-Seq 解析を行い、ニッチ細胞分画の同定、および HSC の自己複製分裂の制御に関わるニッチ分子の探索を行った。3. 人工ニッチの作製：Matthias P. Lutolf 博士（スイス連邦ローザンヌ工科大学）からの技術指導によって人工ニッチを作製し、HSC の分裂アッセイに用いた。

【結果】1. HSC の分裂パターンの加齢変化：老齢マウスの HSC は、*in vitro* での自己複製分裂能を失っていることが分かった。2. 新規ニッチ細胞・ニッチ分子の同定：骨内膜領域で、主に骨芽細胞から構成される $ALCAM^{+}$ BLC 中に存在する未分化な間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell：MSC）に特異的な細胞表面マーカーとして α8-integrin（Itga8）を同定した。さらに、$ALCAM^{+}Itga8^{+}$ BLC は、骨、脂肪、軟骨への多分化能をもつ MSC であり、さらには HSC の骨髄再構築能を維持する能力が高いことを明らかにした。また、骨髄ストローマ細胞のシングルセル RNA-Seq 解析によって、レプチン受容体（LepR）と Cxcl12 を発現する MSC 分画を同定し、この分画が *Igfbp5*、*Adipoq*、*Ibsp* を高発現していることを見いだした。3. 人工ニッチを用いた分裂様式の解析：HSC の分裂解析に用いる人工ニッチとして、ポリエチレングリコール（polyethylene glycol：PEG）ハイドロゲルを基材としたマイクロウェルを作製した。

老化に伴うニッチ機能の低下と HSC の自己複製分裂低下



71. 老化ニッチによる造血幹細胞の分裂制御異常の分子機構

新井　文用

九州大学 大学院医学研究院 応用幹細胞医科学部門 幹細胞再生修復医学分野

Key words：造血幹細胞，自己複製分裂，間葉系幹細胞，老化，人工ニッチ

緒　言

造血幹細胞（hematopoietic stem cell：HSC）が、生涯にわたり血液細胞を安定して供給するためには、分裂パターン（ー対称性自己複製・非対称分裂・対称性分化ー）のバランスを維持することが重要である。HSC の自己複製能と分化能は加齢に伴って低下するが、これには、HSC の内在性因子の機能異常や周囲の微小環境（ニッチ）の老化によって引き起こされる分裂制御の異常が関係していると考えられる。HSC の分裂制御機構とその加齢変化を理解することができれば、自己複製と分化を制御するメカニズムの解明につながるだけでなく、さまざまな疾患の病因解明、さらには高齢の HSC の機能回復への応用が期待できる。

組織幹細胞はニッチと相互作用することにより未分化性を維持している。ニッチによる幹細胞の運命決定については、例えば、生殖幹細胞や神経前駆細胞、表皮幹細胞では、ニッチとの相互作用が運命決定因子の不均一な分配を誘導することで、分裂パターンに影響することが報告されている［1〜3］。一方で、HSC の自己複製と分化は細胞内因子の働きによってランダムに選択され、外因性のシグナルには依存しないという報告もあり［4］、分裂制御に対するニッチ分子の機能については不明な点が多い。

そこで本研究では、HSC の細胞分裂パターンの加齢変化、自己複製分裂の制御に関わるニッチ細胞・ニッチ分子の同定、ニッチの老化が HSC 分裂に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

方　法

1. 細胞分裂アッセイ

幼若（4 週齢）、成体（8 週齢）、老齢（18 カ月齢）マウスの HSC と造血前駆細胞（hematopoietic progenitor cell, HPC）のシングルセル定量 PCR アレイ（BioMark 96・96 Dynamic Array, Fluidigm）のデータを人工ニューラルネットワーク（artificial neural network：ANN）に学習させ、この学習済 ANN を用いて、HSC の分裂によって生まれる 1 組の娘細胞（paired daughter cell：PDC）のシングルセル定量 PCR アレイデータを分析し、個々の娘細胞のアイデンティティーを識別した。さらに、各娘細胞のアイデンティティーをもとに、HSC の分裂パターンを以下の通りに分類した。

① 2 個の HSC が生まれる対称性自己複製分裂（以下、S-S 分裂とする）

② HSC と HPC が 1 個ずつ生まれる非対称分裂（以下、S-P 分裂とする）

③ 2 個の HPC が生まれる対称性分化分裂（以下、P-P 分裂とする）

本研究における細胞分裂アッセイでは、Evi1-GFP ノックインレポーターマウス［5］から純化した Lineage$^-$ Sca-1$^+$c-Kit$^+$CD41$^-$CD48$^-$CD150$^+$CD34$^-$Evi1-GFP$^+$ HSC（Evi1$^+$ HSC）を親 HSC として用いた。Evi1$^+$ HSC を無血清培地中で、stem cell factor（SCF）、thrombopoietin（TPO）の存在下、angiopoietin-1（Angpt1）の添加あり／なしの条件で培養し、培養 2 日後の時点で 2 個に分裂していた PDC について、娘細胞を 1 個ずつマイクロマニピュレーターで分取し、シングルセル定量 PCR アレイ解析を行った。

2. 新規ニッチ細胞・ニッチ分子の同定

骨内膜領域のライニング細胞（bone lining cell：BLC）を対象として、間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell：MSC）マーカーおよび多能性幹細胞マーカーの発現をシングルセル定量 PCR アレイで解析し、未分化な新規 MSC 分画とその特異的マーカーの同定を行った。骨髄ストローマ細胞（$CD45^{-}TER119^{-}CD31^{-}$細胞）については、シングルセル RNA-Seq 解析を行い、ニッチ細胞の同定と新規ニッチ分子の探索を行った。

3. 人工ニッチを用いた分裂様式の解析

Matthias P. Lutolf 博士（スイス連邦ローザンヌ工科大学）からの技術指導によって人工ニッチの作製を行った。人工ニッチの基材には、ポリエチレングリコール（polyethylene glycol, PEG）ハイドロゲルを用い、パターン転写技術によりフィブロネクチンをコートしたマイクロウェル（ウェル径：約 100 μm、ウェルの深さ：約 50 μm）を作製した。

結　果

1.　加齢に伴う HSC の分裂パターンの変化（図 1）

成体マウス（8 週齢）と老齢マウス（18 カ月齢）から分離した $Evi1^{+}$ HSC の細胞分裂パターンを比較した。8 週齢 HSC は、S-P 分裂、P-P 分裂が合わせて約 80%、残りの約 20%が S-S 分裂を行っており、結果として HSC 数が減少した。Angpt1 を添加した培養では、S-S 分裂が増加し、P-P 分裂が減少したことで、HSC 数が増加していた。一方、18 カ月齢 HSC では、ほぼ全ての HSC が P-P 分裂を行ったことから、自己複製能が著しく低下していることが分かった。また興味深いことに、18 カ月齢 HSC の分裂パターンは、8 週齢 HSC とは異なり、Angpt1 刺激によって変化しないことが分かった［6］。

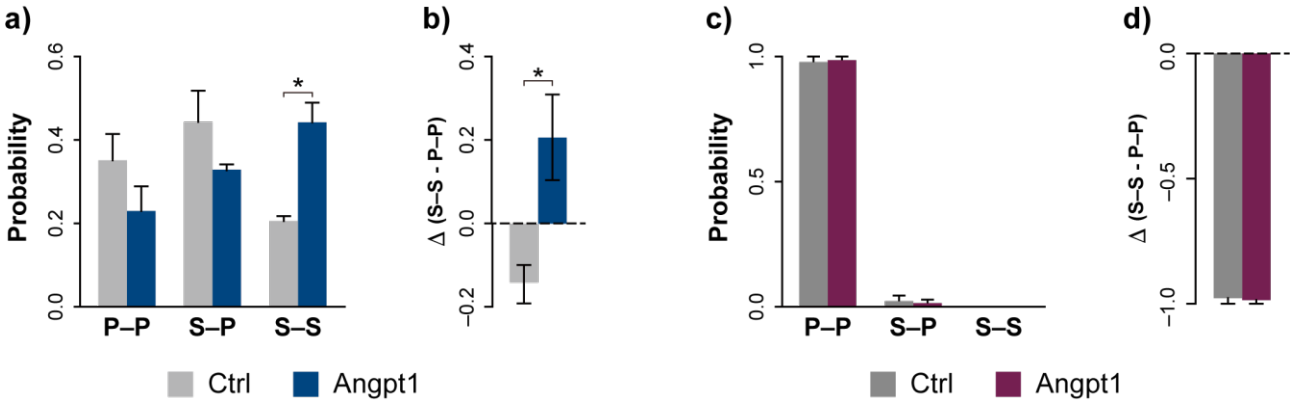


図 1.　8 週齢および 18 カ月齢 HSC の細胞分裂パターン

a）8 週齢 HSC の P-P、S-P、S-S 分裂の頻度（p=0.004、t-test）。

b）8 週齢 HSC の 1 回分裂後の幹細胞数の増減（Δ＝S-S 分裂 – P-P 分裂）（p=0.019、t-test）。

c）18 カ月齢 HSC の P-P、S-P、S-S 分裂の頻度。

d）18 カ月 HSC の 1 回分裂後の幹細胞数の増減（Δ＝S-S 分裂 – P-P 分裂）。

2. 新規ニッチ細胞・ニッチ分子の同定

我々は、マウス骨髄の骨内膜領域で、主に骨芽細胞から構成され、HSC 支持能の高い $ALCAM^{+}$ BLC の一部に骨芽細胞マーカーが陰性で、多能性幹細胞マーカーを発現する亜集団を見いだしていた［7］。この亜集団は、新規 MSC と想定されたことから、$ALCAM^{+}$ BLC を対象としたシングルセル定量 PCR アレイ解析を行い、MSC と多能性幹細胞に発現するマーカーについて解析した。その結果、$ALCAM^{+}$ BLC の中に、骨芽細胞マーカー陰性で *Pou5f1*、*Nanog*

を発現する分画が存在し、その細胞集団が α *8-integrin*（*Itga8*）を特異的に発現することを見いだした。そこで、ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC と ALCAM^{+}Itga8^{-} BLC を分離し、分化能を比較したところ、ALCAM^{+}Itga8^{-} BLC は骨芽細胞と軟骨細胞に分化し、脂肪には分化しなかったのに対し、ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC は骨・軟骨・脂肪への多分化能をもつことが分かった（図 2b）。さらに、ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC は他の MSC 分画と比べて、HSC の骨髄再構築能を維持する能力が高いことが分かった（図 2c）。これらの結果から、ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC はニッチ細胞としての機能をもつ、新規 MSC であると考えられた。次に、ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC、ALCAM^{+}Itga8^{-} BLC、ALCAM^{-}Sca-1^{+} MSC、CD51^{+}CD140a^{+} MSC の RNA-Seq データを比較したところ、*Scube2*、*Pla2g7*、*Bpifb1*、*Ptx4* などが ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC に特異的に発現することが分かった。

さらに我々は、骨髄のストローマ細胞分画のシングルセル RNA-Seq 解析を行い、レプチン受容体（LepR）$^{+}$で Cxcl12 を発現し、類洞血管周囲の MSC［8］に相当すると考えられる細胞集団を同定し［9］、この分画が *Igfbp5*、*Adipoq*、*Ibsp* を高発現していることを見いだした。

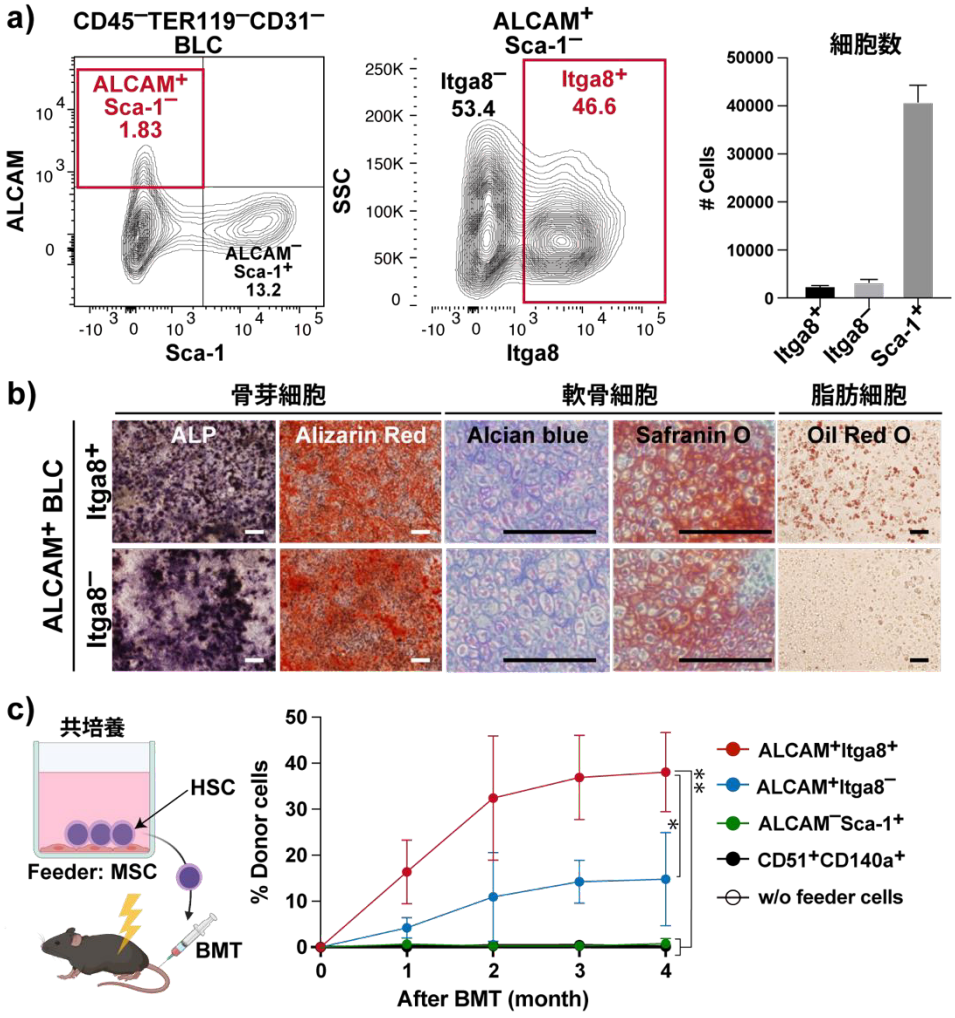


図 2. ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC の多分化能と造血支持能

a）ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC の分離と細胞数。

b）ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC と ALCAM^{+}Itga8^{-} BLC の骨・軟骨・脂肪分化（スケールバー：250 μm）。

c）ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC、ALCAM^{+}Itga8^{-} BLC、ALCAM^{-}Sca-1^{+} MSC、CD51^{+}CD140a^{+} MSC と 2 日間共培養した後の HSC の骨髄再構築能（*p=0.0323、**p=0.0007、Turkey’s multiple comparison test）。

3. 人工ニッチを用いた分裂様式の解析

本研究では、PEG ハイドロゲルを基材とし、パターン転写技術によりフィブロネクチンを導入したマイクロウェル（以下、PEG-MW）［10］を作製して Evi1^{+}HSC の培養に用いた（図 3）。フィブロネクチンコート PEG-MW を用いて HSC の分裂アッセイを行ったところ、Angpt1 を添加しない条件でも、自己複製分裂を行う造血幹細胞の割合が増加した［6］。現在、成体 MSC と老化 MSC にそれぞれ特徴的に発現するニッチ分子を導入し、HSC 分裂パターンに対する作用を検討している。

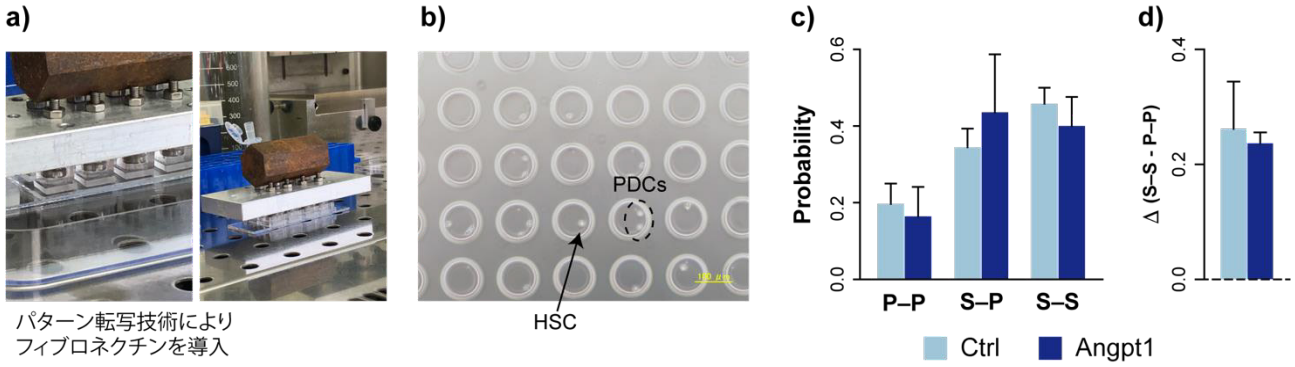


図 3. PEG-MW の作製と分裂アッセイ

a）PEG-MW の作製。

b）PEG-MW を用いた 8 週齢 HSC の培養。

c）8 週齢 HSC の P-P、S-P、S-S 分裂の頻度。

d）8 週齢 HSC の 1 回分裂後の幹細胞数の増減 （Δ＝S-S 分裂 – P-P 分裂）。

考　察

本研究では、高いニッチ細胞活性（造血支持能）をもつ MSC として、ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC を同定することができた。ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC 上で培養した HSC は非常に高い骨髄再構築能を示したことから、ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC は自己複製分裂（S-S 分裂と S-P 分裂）を支持する働きをもつと考えられる。したがって、ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC で発現するニッチ分子の同定は、HSC の体外培養に応用できると考えられる。その点において、ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC で発現している *Scube2*、*Pla2g7*、*Bpifb1*、*Ptx4* などはニッチ分子の候補となるが、HSC に対する機能は不明であることから、それぞれを添加して HSC の分裂パターン解析を行い、HSC の自己複製分裂に対する作用を明らかにすることが必要である。また、骨髄中の LepR^{+}Cxcl12^{+} MSC は、HSC 維持に重要な働きをもつことが報告されていることから［8］、この分画で発現する分子も HSC の体外培養に有用であると考えられる。ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC や LepR^{+}Cxcl12^{+} MSC から産生されるニッチ分子について、HSC の分裂パターンに及ぼす作用を明らかにすることができれば、その成果は、HSC の自己複製分裂のメカニズムの理解につながると考えられる。

一方、8 週齢 HSC と 18 カ月齢 HSC の分裂解析の比較から、8 週齢 HSC は Angpt1 によって分裂パターンに変化（S-S 分裂の増加と P-P 分裂の減少）が見られるのに対し、18 カ月齢 HSC の分裂パターンに Angpt1 は効果を示さないことが分かった。この結果から、①老化 HSC が *in vitro* での培養に対して脆弱であり、容易に自己複製分裂能を失うこと、②老化 HSC の分裂制御では、内在性因子の作用が支配的になっていることなどが考えられる。現在、老齢マウス ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC、および骨髄ストローマ細胞のシングルセル RNA-Seq を行い、加齢に伴う遺伝子発現プロファイルの変化を解析している。老化ニッチ分子を PEG-MW に導入して若齢成体マウス HSC の分裂アッセイを行い、分裂パターンに対する作用を明らかにすることにより、ニッチの老化が HSC 分裂に及ぼす影響を解明したい。

PEG-MW を用いた HSC 培養では、HSC の自己複製分裂が亢進していたことから、PEG-MW は HSC の体外増幅

に有用であると考えられる。今後、若齢成体の ALCAM^{+}Itga8^{+} BLC で産生されるニッチ分子を導入した PEG-MW での培養が、老化 HSC の分裂パターンを修正し、自己複製分裂を誘導できるかを検討することは興味深いテーマである。自己複製分裂を誘導するニッチ分子群を同定することができれば、HSC の体外増幅のみならず、機能の低下した老化 HSC の体外増幅や機能回復（若返り）に応用できると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、英国サウサンプトン大学 Ben D. MacArthur 教授である。また、PEG-MW の作製では、スイス連邦ローザンヌ工科大学 Matthias P Lutolf 教授に技術指導をいただいた。この場を借りて深謝致します。

文　献

1) Yamashita YM, Jones DL, Fuller MT. Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. Science. 2003 Sep 12; 301 (5639): 1547–50. PMID: 16848793 DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06218.x
2) Bhat KM. Notch signaling acts before cell division to promote asymmetric cleavage and cell fate of neural precursor cells. Sci Signal. 2014 Oct 21; 7 (348): ra101. PMID: 25336614 DOI: 10.1126/scisignal.2005317
3) Lechler T, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. Nature. 2005 Sep 10; 437 (7056): 275–80. PMID: 16094321 DOI: 10.1038/nature03922
4) Suda T, Suda J, Ogawa M. Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1984 Apr 1; 81 (81): 2520–4. PMID: 6585813 DOI: 10.1073/pnas.81.8.2520
5) Kataoka K, Sato T, Yoshimi A, Goyama S, Tsuruta T, Kobayashi H, Shimabe M, Arai S, Nakagawa M, Imai Y, Kumano K, Kumagai K, Kubota N, Kadowaki T, Kurokawa M. Evi1 is essential for hematopoietic stem cell self-renewal, and its expression marks hematopoietic cells with long-term multilineage repopulating activity. J Exp Med. Nov 14; 208 (12): 2403–16. PMID: 22084405 DOI: 10.1084/jem.20110447
6) Arai F, Stumpf PS, Ikushima YM, Hosokawa K, Roch A, Lutolf MP, et al. Machine Learning of Hematopoietic Stem Cell Divisions from Paired Daughter Cell Expression Profiles Reveals Effects of Aging on Self-Renewal. Cell Syst. 2020 Dec 16; 11 (6): 640-652.e5. PMID: 33296684 DOI: 10.1016/j.cels.2020.11.004
7) Nakamura Y, Arai F, Iwasaki H, Hosokawa K, Kobayashi I, Gomei Y, et al. Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. Blood. 2010 Sep 2; 116 (9): 1422–32. PMID: 20472830 DOI: 10.1182/blood-2009-08-239194
8) Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. Nature. 2012 Jan 25; 481 (7382): 457–62. PMID: 22281595 DOI: 10.1038/nature10783
9) Stumpf PS, Du X, Imanishi H, Kunisaki Y, Semba Y, Noble T, et al. Transfer learning efficiently maps bone marrow cell types from mouse to human using single-cell RNA sequencing. Commun Biol. 2020 Dec 4; 3 (1). PMID: 33277618 DOI: 10.1038/s42003-020-01463-6
10) Roch A, Giger S, Girotra M, Campos V, Vannini N, Naveiras O, et al. Single-cell analyses identify bioengineered niches for enhanced maintenance of hematopoietic stem cells. Nat Commun. 2017 Aug 9; 8 (1): 1–12. PMID: 28790449 DOI: 10.1038/s41467-017-00291-3