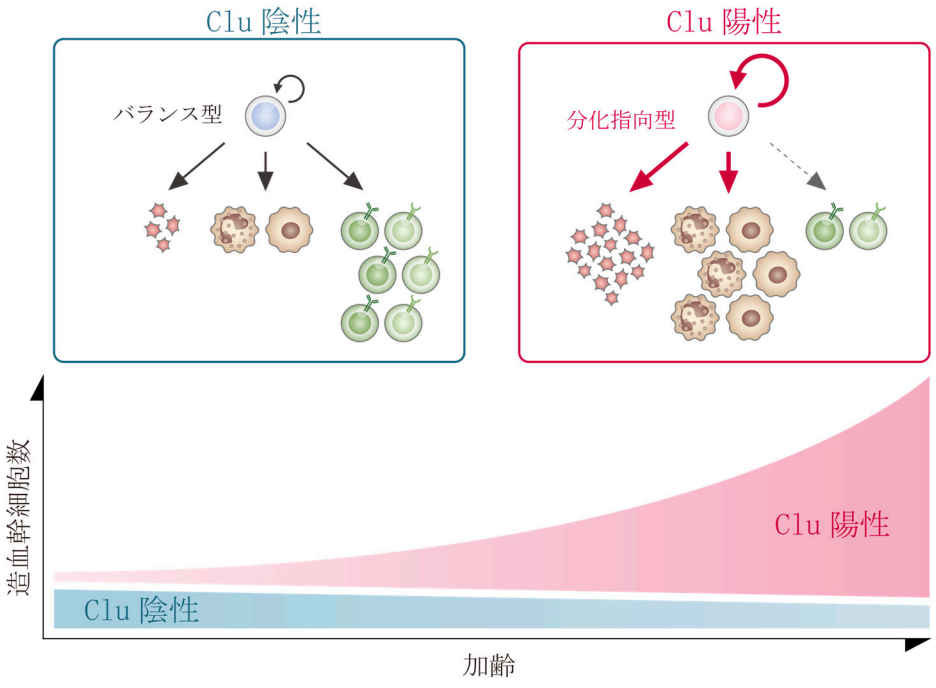
115　加齢に伴う造血幹細胞機能低下機序の解明	小出　周平

【目的】血球細胞は骨髄中に存在するごく少数の造血幹細胞（HSC）によって生涯供給される。若齢期の HSC は多様な造血細胞をバランスよく分化供給するが、加齢期の HSC はリンパ球への分化能が低下することで免疫系が減弱し、骨髄球系に分化能が偏ることで造血システムの恒常性が低下する。さらに、このような加齢 HSC の分化指向性は骨髄異形成症候群（MDS：myelodysplastic syndromes）をはじめとした造血器腫瘍の温床となるとされる。これまでに加齢に伴う HSC の機能的な変化の詳細を解明する試みは多くの研究者により行われているものの、その増幅様式は未だ明らかではない。そこで、本研究では若齢と高齢マウスの HSC をシングルセルレベルで比較解析を行うことで、加齢に伴う分化指向型 HSC の増幅様式を明らかにすることを目的とした。

【方法】若齢（8〜10週齢）および高齢（18〜20ヶ月齢）マウスから採取したHSCを用いて、single cell RNA-sequence解析を行った。また、single cell RNA-sequence解析結果から加齢HSCにおいて顕著に発現亢進するClusterin（Clu）に着目し、そのレポーターマウスを用いて加齢HSCにおけるClu陽性とClu陰性の機能的差異を競合移植から検証した。

【結果】若齢および高齢マウス HSC の single cell RNA-sequence 解析の結果、加齢 HSC は一部若齢 HSC と類似した細胞が含まれるものの、大部分は若齢型と異なる転写発現をすることが明らかとなった。さらに加齢 HSC で顕著な発現変動のあった遺伝子を調べた結果、分子シャペロンである Clu が加齢 HSC において特異的に高発現することが明らかとなった。そこで、Clu-GFP レポーターマウスを導入し、加齢 HSC を Clu 陽性と陰性で比較解析を行った。その結果、加齢 HSC では Clu 陽性型が大半を占めており、その機能はリンパ球産生能が低下するなど幹細胞活性が低下していた。一方、Clu 陰性型は加齢 HSC 中では少数であるものの、若齢 HSC に近しい幹細胞活性を示した。以上の結果より、Clu は加齢 HSC を機能的に分類する有望なマーカーであることが明らかとなった。

HSC は加齢に伴い Clu 陽性型が支配的になる



115. 加齢に伴う造血幹細胞機能低下機序の解明

小出　周平

東京大学 医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞分子医学分野

Key words：造血幹細胞，老化，Clusterin，分化指向性，single cell RNA-sequence

緒　言

血球細胞は骨髄中に存在するごく少数の造血幹細胞（HSC）によって生涯供給される。若齢期の HSC は多様な造血細胞をバランスよく分化供給するが、加齢期の HSC はリンパ球への分化能が低下することで免疫系が減弱し、骨髄球系に分化能が偏ることで造血システムの恒常性が低下する。さらに、このような加齢 HSC の分化指向性は骨髄異形成症候群（MDS：myelodysplastic syndromes）をはじめとした造血器腫瘍の温床となるとされる。これまでに加齢に伴う HSC の機能的な変化の詳細を解明する試みは多くの研究者により行われているものの、機能異常を示す分子基盤の理解は十分ではない。そこで、筆者らは若齢と高齢マウスの HSC をシングルセルレベルで比較解析を行うことで、加齢に伴う HSC の機能異常の分子機序を明らかにすることを目的とした。

若齢（8～10週齢）および高齢（18～20ヶ月齢）マウスから採取したHSCを用いて、single cell RNA-sequence解析を行った。また、single cell RNA-sequence解析結果から加齢HSCにおいて顕著に発現亢進するClusterin（Clu）に着目し、そのレポーターマウスを用いて加齢HSCにおけるClu陽性とClu陰性の機能的差異を競合移植から検証した。

若齢および高齢マウス HSC の single cell RNA-sequence 解析の結果、加齢 HSC は一部若齢 HSC と類似した細胞が含まれるものの、大部分は若齢型と異なる転写発現をすることが明らかとなった。さらに加齢 HSC で顕著な発現変動のあった遺伝子を調べた結果、分子シャペロンである Clu が加齢 HSC において特異的に高発現することが明らかとなった。そこで、Clu-GFP レポーターマウスを導入し、加齢 HSC を Clu 陽性と陰性で比較解析を行った。その結果、加齢 HSC では Clu 陽性型が大半を占めており、その機能はリンパ球産生能が低下するなど幹細胞活性が低下していた。一方、Clu 陰性型は加齢 HSC 中では少数であるものの、若齢 HSC に近しい幹細胞活性を示した。

これらの結果より、Clu は加齢 HSC を機能的に分類する有望なマーカーであることが明らかとなった。今後 Clu 陽性 HSC を標的とした介入法を確立することで、老化関連疾患への新たな治療戦略が期待される。

方　法

1. マウス

シングルセル解析には日本 SLC より購入した C57BL/6NCrSlc マウスを東京大学医科学研究所にて最大 20 ヶ月間加齢させたマウスを用いた。Clu-GFP reporter（Tg（Clu-EGFP）OD95Gsat）マウスは MMRRC より購入した。東京大学医科学研究所内にて繁殖し、実験には C57BL/6NCrSlc マウスと 5 回以上の交配を行った世代を用いた。全ての動物実験は東京大学医科学研究所の動物実験委員会より承認を受けて行われた。

2. フローサイトメトリー

マウス大腿骨、脛骨、骨盤骨を採取し、乳鉢・乳棒を用いて骨髄を回収した。回収した骨髄はリン酸緩衝食塩

水で懸濁後、以下の標識抗体を用いて染色を行った。CD3e（145-2C11）、CD4（GK1.5）、CD8a（53-6.7）、B220（RA3-6B2）、Mac1（M1/70）、Gr-1（RB6-8C5）、Ter119（TER-119）、c-Kit（2B8）、Sca-1（D7）、CD150（TC15-12F12.2）、CD48（HM48-1）、Flk2（A2F10）、CD34（RAM34）。成熟血球マーカーである Lineage（Lin）には CD3e、CD4、CD5、CD8a、B220、Mac1、Gr-1 および Ter119 を用いた。染色後の細胞を Propidium Iodide を含むリン酸緩衝食塩水に懸濁したのち、FACS Celesta および FACS Aria IIIu（BD Bioscience）を用いてデータ取得および標的細胞の分取を行った。

3. Single cell RNA-sequence 解析

10 週齢と 20 ヶ月齢のマウスよりフローサイトメトリーを用いて HSC（Lin^-／$Sca\text{-}1^+$／$c\text{-}Kit^+$／$Flk2^-$／$CD48^-$／$CD150^+$／$CD34^-$）、並びに造血幹前駆細胞（LSK）（Lin^-／$Sca\text{-}1^+$／$c\text{-}Kit^+$）を各 10,000 細胞分取した。HSC は Single Cell 3′ Reagent Kits v3.1（10x Genomics）によりライブラリーを作製し、NextSeq500（Illumina）を用いて NGS 解析を行った。

4. HSC の移植

9.5 Gy の放射線照射により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 HSC と Clu 陰性 HSC 各 150 個（$CD45.2^+$）を 2×10^5 個の補助細胞（$CD45.1^+$）とともに移植した。造血幹細胞の機能性は、移植後 1 ヶ月毎に末梢血のフローサイトメトリーを行い評価した。

結果および考察

1. 若齢および加齢 HSC の single cell RNA-sequence 解析

若齢および高齢マウスから分取した HSC、LSK 分画の細胞を用いて single cell RNA-sequence 解析を行った。得られた RNA 情報を UMAP でクラスター分類した結果、若齢 LSK と比較して加齢 LSK ではリンパ球系前駆細胞である MPP4 が減少していた（図 1a）。これは高齢マウスに見られるリンパ球系細胞への分化障害を反映していると考えられる［1〜3］。また、若齢 HSC と加齢 HSC は互いに近しい状態を示しながらも、明確に異なる転写状態であることが明らかとなった（図 1b）。さらに、加齢 HSC において有意な発現亢進が認められる遺伝子を調べたところ、分子シャペロンである Clusterin（Clu）を見出した（図 1c）。

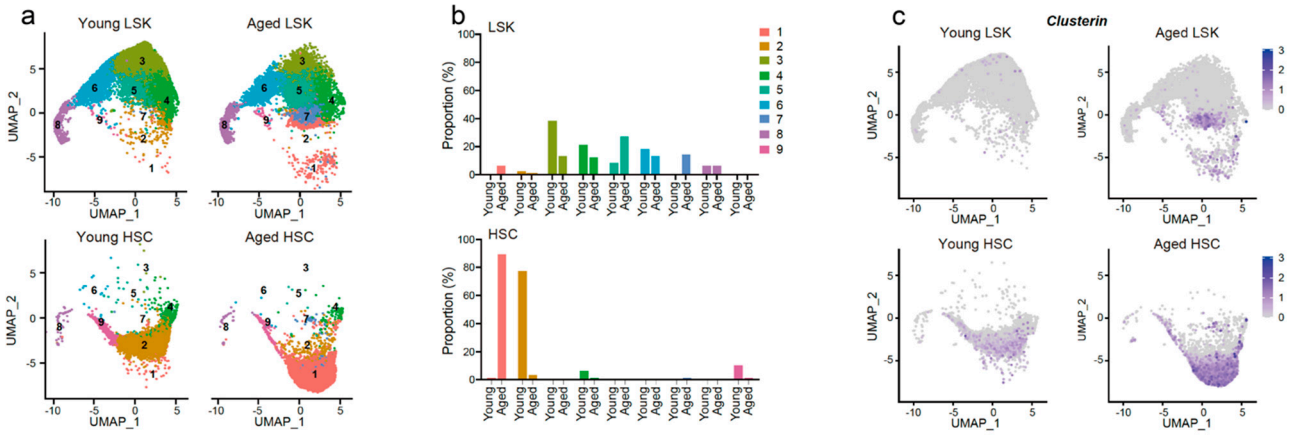


図 1. Clu は加齢 HSC において高発現する

a) 若齢・高齢マウスの LSK と HSC の single cell RNA-sequence 解析（UMAP）。

b) a）のクラスター構成割合。

c) 若齢・高齢マウスの LSK と HSC における Clu の発現度合い。Clu は加齢 HSC において高発現する。

2. Clu レポーターマウスを用いた若齢・加齢 HSC の解析

シングルセル解析の結果から、Clu の発現は HSC 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（Clu-EGFP）OD95Gsat）マウスを MMRRC より購入し、その若齢、並びに高齢マウスにおいて Clu の発現を検証した（図 2a）。その結果、HSC は若齢期においては Clu 陰性が支配的であるものの、加齢の進行度に応じて Clu 陽性割合が増加することを明らかにした（図 2b）。また、高齢マウスは若齢マウスと比較して HSC の絶対数が増加することが報告されている［4，5］。Clu レポーターマウスの HSC を解析した結果、高齢マウスで増加する HSC の大部分は Clu 陽性であることが明らかとなった（図 2c）。

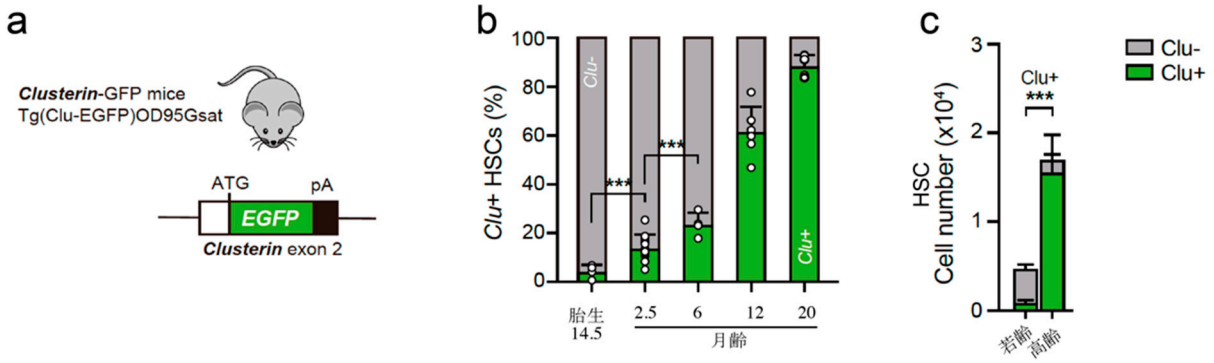


図 2. Clu レポーターマウスを用いた HSC の加齢変化

a） 導入した Clu レポーターマウスの概念図。

b） HSC における Clu 陽性細胞の割合。Clu 陽性 HSC 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 HSC の大部分は Clu 陽性である。

***P＜0.001（Student's *t*-test）。

3. Clu レポーターマウスを用いた若齢・加齢 HSC の解析

前述の解析から、加齢 HSC は大部分の Clu 陽性と一部分の Clu 陰性集団から構成されていることが明らかとなった。続いて Clu 陽性と Clu 陰性の機能性について、骨髄移植実験から検証を行った（図 3a）。9.5Gy の放射線照射により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 陽性と Clu 陰性の加齢 HSC、並びに若齢マウス HSC 各 150 個（CD45.2^{+}）を 2×10^{5}個の補助細胞（CD45.1^{+}）とともに移植した。移植後 1 ヶ月毎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 HSC は Clu 陰性の HSC と若齢 HSC に比べて有意にドナー細胞の割合が低いことが明らかとなった（図 3b）。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 HSC 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 3c）。これは高齢マウスの末梢血で Myeloid の細胞が増加することと合致した結果であった。また、移植後 4 ヶ月の時点で骨髄を解析したところ、HSC において Clu 陽性の加齢 HSC のドナー細胞が維持されていた（図 3d）。以上の結果から、加齢 HSC における分化能が著しく失われ、Clu 陽性細胞は未分化状態で維持されていると考えられた。実際、加齢 HSC を移植したところ、末梢血血球においてはドナー細胞が検出されないのに対して、骨髄においてドナー細胞が検出されることが報告されている［6，7］。

一連の結果から、HSC 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 HSC は若齢 HSC と同様に高い幹細胞活性を示すのに対して、Clu 陽性 HSC はこれまで報告されてきた古典的な加齢 HSC であることが明らかとなった。このことから高齢マウスの造血系は少数の Clu 陰性 HSC が担っていると考えられる。今後、Clu 陽性 HSC 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。

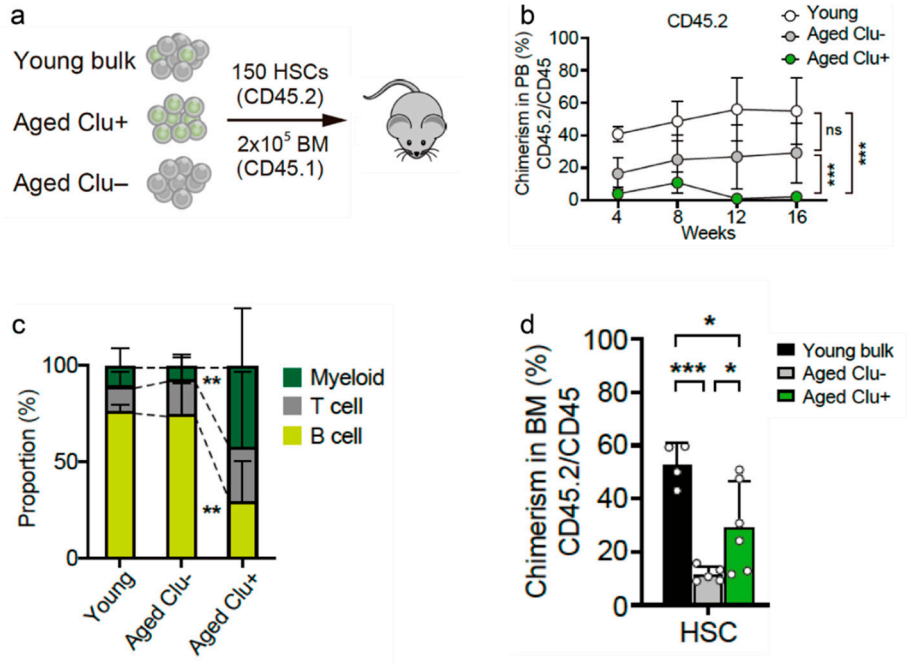


図 3. 骨髄移植解析による Clu 陽性・陰性 HSC の機能的差異の検証

a) HSC 移植実験の概略。

b) HSC 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 HSC は末梢血においてドナー細胞の割合が有意に少ない。

c) HSC 移植後 4 ヶ月の時点の末梢血割合。Clu 陽性の加齢 HSC 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) HSC 移植後 4 ヶ月の時点の HSC。Clu 陽性の加齢 HSC は HSC 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、*** P＜0.001（Student's *t*-test）。

謝　辞

本研究は東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター幹細胞分子医学分野にて行われた成果であり、岩間厚志教授をはじめとする研究室メンバーに感謝申し上げます。また University of Southern California の Higuchi-Sanabria Ryo 博士、および University of Chile の San Martin Carol 博士から多くのご助言をいただきました。この場を借りて感謝申し上げます。本研究を進めるにあたり多大なるご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団の皆様に深く感謝いたします。

文　献

1) de Haan G, Lazare SS. Aging of hematopoietic stem cells. Blood. 2018 Feb 1;131(5):479-487. Epub 2017 Nov 15. PMID:29141947. DOI: 10.1182/blood-2017-06-746412.

2) Colom Díaz PA, Mistry JJ, Trowbridge JJ. Hematopoietic stem cell aging and leukemia transformation. Blood. 2023 Aug 10;142(6):533-542. PMID: 36800569 DOI:10.1182/blood.2022017933.

3) Kasbekar M, Mitchell CA, Proven MA, Passegué E. Hematopoietic stem cells through the ages: A lifetime of adaptation to organismal demands. Cell Stem Cell. 2023 Nov 2;30(11):1403-1420. Epub 2023 Oct 20. PMID: 37865087 DOI :10.1016/j.stem.2023.09.013.

4) Mansell E, Sigurdsson V, Deltcheva E, Brown J, James C, Miharada K, Soneji S, Larsson J, Enver T. Mitochondrial Potentiation Ameliorates Age-Related Heterogeneity in Hematopoietic Stem Cell Function. Cell Stem Cell. 2021 Feb 4;28(2):241-256.e6. Epub 2020 Oct 20. PMID: 33086034 DOI: 10.1016/j.stem.2020.09.018.
5) Itokawa N, Oshima M, Koide S, Takayama N, Kuribayashi W, Nakajima-Takagi Y, Aoyama K, Yamazaki S, Yamaguchi K, Furukawa Y, Eto K, Iwama A. Epigenetic traits inscribed in chromatin accessibility in aged hematopoietic stem cells. Nat Commun. 2022 May 16;13(1):2691. PMID: 35577813 DOI: 10.1038/s41467-022-30440-2.
6) Kuribayashi W, Oshima M, Itokawa N, Koide S, Nakajima-Takagi Y, Yamashita M, Yamazaki S, Rahmutulla B, Miura F, Ito T, Kaneda A, Iwama A. Limited rejuvenation of aged hematopoietic stem cells in young bone marrow niche. J Exp Med. 2021 Mar 1;218(3):e20192283. PMID: 33231616 DOI: 10.1084/jem.20192283.
7) Ho TT, Dellorusso PV, Verovskaya EV, Bakker ST, Flach J, Smith LK, Ventura PB, Lansinger OM, Hérault A, Zhang SY, Kang YA, Mitchell CA, Villeda SA, Passegué E. Aged hematopoietic stem cells are refractory to bloodborne systemic rejuvenation interventions. J Exp Med. 2021 Jul 5;218(7):e20210223. Epub 2021 May 25. PMID: 34032859 DOI:10.1084/jem.20210223.