

骨・骨髄の透明化による全身の造血幹細胞ニッチの構造と変容の解明

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

【研究の背景】

造血幹細胞は、骨髄の微小環境(ニッチ)によって自己複製能と多分化能を維持する。ニッチは細胞成分であるニッチ細胞(間葉系幹細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、血管内皮、巨核球などの血球細胞)や酸素分圧、サイトカインや接着分子などのニッチ因子から構成される。私たちのグループはこれまで、骨髄ニッチの構成要素とニッチによる造血幹細胞の代謝特性制御を明らかにしてきた。例えば分化した血球細胞である巨核球がサイトカインを供給する新たな造血幹細胞ニッチとして働くことを報告している(Nakamura-Ishizu & Takubo et al., *J Exp Med* 2015)。さらに、非細胞性のニッチ因子として骨髄の低酸素環境が、低酸素応答のマスターレギュレーターである転写因子 HIF-1 α 蛋白を安定化・活性化し、ピルビン酸脱水素酵素リン酸化酵素(pyruvate dehydrogenase kinase; Pdk)の発現誘導を介して解糖系主体のエネルギー産生と静止期維持を行うことを見出した。造血幹細胞はこうして過剰な細胞周期の進行を抑制し、細胞老化を防いで、生涯に亘り造血を維持していることを同定した(Takubo et al., *Cell Stem Cell* 2010; 2013)。また、移植や抗がん剤投与後など、造血幹細胞が増殖する際には造血幹細胞で p38MAPK ファミリーの p38 α によってプリン体生合成経路の律速酵素 Impdh2 の発現上昇されることを見出した。その結果、造血幹細胞の増殖に必要なプリン体代謝が活性化されることを同定している(Karigane et al., *Cell Stem Cell* 2016)。

このように、造血幹細胞ニッチの構成要素や、そこで作動している分子機構については分子遺伝学的な解析が着実に進展している。その一方、ニッチの実際の構造—幹細胞やニッチ細胞の空間的配置や相互関係、各骨ごとの差異—については手付かずの状態である。また、加齢によってニッチの構造変化やニッチ因子の発現異常が発生すると考えられているが、その時空間変化やメカニズムは不明である。こうした状況を打破するために本研究では全身の全骨/骨髄の真の透明化技術を目指した検討の実施が必要であると考え、基礎的な検討を行った。

【目 的】

本研究では骨髄に最適化した透明化技術のための基礎的検討を行い、それを用いて造血幹細胞ニッチ全体の完全な形態学的理解を得るための解析を行う。

【方 法】

(I) マウス骨・骨髄の透明化

骨髄の造血幹細胞と造血幹細胞ニッチの局在を解明するため、昨年報告された骨と骨髄構造を比較的よく保てる新規透明化技術 uDISCO とアミノアルコールによる血液透明化技術を組み合わせて骨・骨髄の同時透明化法を確立する。

(II) 透明化した骨と骨髄の解析

前項で確立した技術を用いて透明化したマウス全身の骨を光シート顕微鏡あるいはスピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡、多光子レーザー顕微鏡により観察する。

(III) ストレス負荷時の造血幹細胞とニッチ細胞の動態と相互作用の変容を同定する

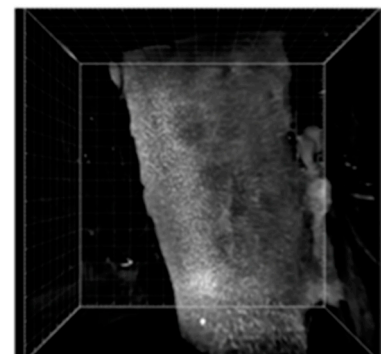
加齢モデルマウスにおいても同様の検証を実施する。また、多光子レーザー顕微鏡を用いて生きたマウスの頭蓋骨骨髄

のライブイメージングによる検証も行う。

【結 果】

既存の透明化液では皮質骨の自家蛍光が強いために観察が困難であったが、各種の条件を調整して大腿骨でライトシート顕微鏡で観察可能なレベルの条件を見出すことができた(右図・透明化した骨と骨髓のライトシート顕微鏡による観察像)。骨髓内を各種方向に走行する血管の描出も可能になっているが、抗体染色との併用は困難であることも明らかになった。今後さらなる条件検討が必要と考えている。

一方、加齢骨髓でも同様の検討を行い、血管の変容を見出している。スナップショット解析である透明化技法では時間情報が失われてしまうため、多光子レーザー顕微鏡による加齢骨髓の解析を実施した結果、血流等の組織酸素化に関連するステータスの変化を見出しており、現在メタボローム解析や、蛍光レポーター造血幹・前駆細胞の追跡を通じてこれらの問題の分子機構や生物学的な意義の解析を行っている。



【考 察】

今後は透明化液の更なる最適化を行いつつ、大腿骨以外の他の骨を用いた検討も実施予定である。また、抗体染色との併用が困難であることから、多色蛍光レポーターマウスの使用も考慮した検討も必要であることが示唆された。一方、透明化技法による細胞や組織の固定は、細胞社会のダイナミクスの解析の際は問題となることから、生きたままの観察・半透明化技法も重要になると考えており、研究を展開していく予定である。加齢骨髓では様々な変化が生じることが知られているが、酸素化という幹細胞制御においても重要なファクターの変化が生じることが明らかとなったため、その生じるメカニズム、生物学的意義、分子機構の解析が重要になると考えている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

組織を丸ごと解析することで細胞社会の構成を一度に明らかにする技術は、骨・骨髓においても重要であり、臨床病理学的な検体の解析・評価を通じた診断学への貢献が期待される。また、加齢に伴う骨髓造血の変化の理解は、加齢関連造血器疾患(MDSや多発性骨髓腫等)の病態生理学的な理解や、治療戦略の作出のために必須である。

【謝辞】

本研究をサポートしていただいた公益財団法人先進医薬研究振興財団に深謝いたします。独立したての研究者にとって非常にありがたい資金援助で、資金面のみならず採択していただいたことで心強い励ましをいただいたと感謝しております。