

造血幹細胞の機能回復メカニズムの解明

山本 玲

京都大学高等研究院 ヒト生物学高等研究拠点

【研究の背景】

血液の幹細胞(造血幹細胞とも呼ばれる)は、造血・免疫システムの頂点に位置し、あらゆる種類の血液細胞を生涯にわたって産生し続けることができる特異的な細胞である。この造血幹細胞に加齢とともに遺伝子変異が蓄積し、急性白血病や骨髄異形成症候群などのような血液疾患を発症することはよく知られている。最近、この幹細胞の異常が末梢血液細胞を介して心疾患・高脂血症などのような血液疾患以外の疾患にも関与することが報告されているが、その詳細なメカニズムは不明である。

申請者は、造血幹細胞の加齢による変化をシングルセル移植により明らかにした^{1,2)}。造血幹細胞は加齢により、リンパ球系への分化能力を完全に失い、骨髄球系へのみ分化能力を維持した細胞が増加してくる。これは、加齢により、骨髄球系の血液疾患が増えてくると合致している。しかし、これらリンパ球系への分化能力を失った造血幹細胞は、2次移植をすることによりリンパ球系への分化能力が回復することを初めて明らかにした。この造血幹細胞を潜在的造血幹細胞(latent-HSC)と名付けたが、そのメカニズムは不明である。この現象は、ある一定の条件下で加齢した造血幹細胞の失われたリンパ球系への分化能力は可逆的に回復することを示唆している。

【目 的】

造血幹細胞は加齢とともにリンパ球産生能力が低下し、免疫力の低下につながる事が知られている。申請者らが開発した新規造血幹細胞の増幅培養法を加齢造血幹細胞に適応すると、若齢造血幹細胞に類似した表面マーカーの発現を示すことを同定している。これらは、この培養法はリンパ球産生能力など加齢による機能低下を回復させることができる可能性を示唆している。本研究では、リンパ球産生能力を移植実験を行い検討し、遺伝子発現解析などを行うことにより、そのメカニズム解明を目的とし、長期的には骨髄移植再生医療の改良を目指す。

【方 法】

申請者らが開発した造血幹細胞の長期培養法³⁾では、若齢造血幹細胞の機能を数ヶ月以上に渡って維持可能である。一方、加齢造血幹細胞を長期培養したところ、加齢造血幹細胞に特異的なCD41の発現が低下することを見出している。これらは、ポリビニルアルコールを含んだ培養法は、加齢造血幹細胞を若齢造血幹細胞に「若返らせる」可能性を示唆している。そこで機能的にも若齢造血幹細胞に類似するかどうか移植実験を用いて比較検討する。1ヶ月長期培養した若齢(2ヶ月)・加齢(2年)造血幹細胞と、マウスから採取したばかりの加齢造血幹細胞を致死量放射線照射したマウスに移植する。移植後、定期的に末梢血を採取し、ドナー細胞由来の好中球・Bリンパ球・Tリンパ球の割合を測定する。加齢造血幹細胞はリンパ球の産生能力が低下していることは知られており、リンパ球の産生能力が加齢造血幹細胞にて回復していれば、機能的に回復したと考えることができる。次に、遺伝子発現上も加齢造血幹細胞が「若返った」かどうか検討するために、遺伝子発現を比較する。1ヶ月培養した若齢・加齢造血幹細胞、マウスから採取したばかりの若齢・加齢造血幹細胞をRNAシーケンスを用いて比較する。次に、そのメカニズム解明を行う。培養ありなしの加齢造血幹細胞の遺伝子発現を比較し、バイオインフォマティクス解析により特異的に発現する遺伝子・シグナル経路を同定する。それらに関するノックダウン・インヒビターなどを用いた培養実験を行い、培養後の加齢造血幹細胞が「若返り」が抑制されるかどうかを検討する。必要に応じ、ノッ

クアウト作成までに行い、造血幹細胞の「若返り」のメカニズム解明を行う。さらに、若齢造血幹細胞を長期培養し、加齢造血幹細胞のマーカーであるCD41発現を誘導するサイトカイン、低分子化合物のスクリーニングを行う。特に加齢は慢性炎症の集積の結果であるとも考えられており、炎症性サイトカインを中心にスクリーニングを行う。これにより造血幹細胞の「若返り」メカニズム解明にも繋がることを期待できる。

【結 果】

1. 造血幹細胞のポリビニルアルコールを用いた培養実験

若齢・加齢造血幹細胞より造血幹細胞画分(CD150+CD34-cKit+Sca1+Lineage-)をフローサイトメトリーにて分取し、ポリビニルアルコール・SCF・TPO 存在下で培養を行う。その後 2 週間培養し、フローサイトメトリーで発現解析を行ったところ、造血幹細胞の加齢マーカーの一つである CD41 の発現減少を認めた。本結果は、ポリビニルアルコールによる造血幹細胞の培養により、加齢造血幹細胞の表面蛋白は若齢の表現型を示すことが示唆された。

2. 移植実験

前述の実験で得られた表現型がマウス個体内でも実際に認められるか移植実験を行う。1と同様に若齢・加齢造血幹細胞をポリビニルアルコール存在下で培養し、野生型マウスに移植を行った。定期的に末梢血(好中球、B リンパ球、T リンパ球)のキメリズムを測定している。造血幹細胞の機能を評価するためには、6 ヶ月以上の経過を観察する必要があり、現在進行中であるが、培養した造血幹細胞のリンパ球への分化能力の回復が認められている。

3. RNA シークエンス

ポリビニルアルコール存在下で培養した若齢・加齢造血幹細胞が遺伝子発現として、どのような異同があるか検討するために、10x を用いたシングルセル遺伝子発現解析を行った。現在、その遺伝子発現をバイオインフォマティクス解析を行い、遺伝子リストを入手済みである。今後、各遺伝子の機能を各々検討する予定である。

【考 察】

本研究により、培養後の若齢・加齢造血幹細胞に異同が認められ、機能的に『若返り』を行う機序解明に繋がりと考えられる。特に高齢者は、免疫力の低下が知られており、リンパ球系への分化能力の低下がその一因であると考えられており、高齢者のリンパ球系への分化能力の回復は、いわゆる『若返り』とも考えられる。このメカニズムを明らかにすることができれば、加齢に伴う免疫力の回復、加齢に伴う血液疾患・心疾患の抑制などが可能になると期待できる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究をまずヒトの造血幹細胞に応用し、ヒトでも機能的に「若返り」か検討することが期待できる。また本研究では血液に焦点をおいているが、加齢による機能低下を呈する他の細胞種にも応用可能である。さらに、この研究により造血幹細胞における加齢による機能低下の機序が明らかになれば、加齢に伴う骨髄異形成症候群や急性白血病の病態解明にも繋がり、非常に社会的意義が大きいと考えられる。さらに骨髄移植医療において、高齢ドナーは用いられないが、ドナー年齢層には幅がある。本研究の培養法を用いることにより、機能的により「若い」造血幹細胞をドナーとして用いることができる可能性も示唆し、移植再生医療にも役立つものと考えられる。さらに、上記のように加齢による血液疾患の治療・予防などにも応用可能であり臨床的意義も多いものと考えられる。

【参考・引用文献】

1. **R. Yamamoto**, A. C. Wilkinson, J. Ooehara, X. Lan, C. Y. Lai, Y. Nakauchi, J. K. Pritchard, and H. Nakauchi. Large-Scale Clonal Analysis Resolves Aging of the Mouse Hematopoietic Stem Cell Compartment. *Cell Stem Cell*, 22 (2018): 600-07 e4.
2. **R. Yamamoto***, Y. Morita*, J. Ooehara, S. Hamanaka, M. Onodera, K. L. Rudolph, H. Ema, and H. Nakauchi. Clonal

Analysis Unveils Self-Renewing Lineage-Restricted Progenitors Generated Directly from Hematopoietic Stem Cells. *Cell*, 154 (2013): 1112-26. (*Equal contribution)

3. Wilkinson, A. C., R. Ishida, M. Kikuchi, K. Sudo, M. Morita, R. V. Crisostomo, R. Yamamoto, K. M. Loh, Y. Nakamura, M. Watanabe, H. Nakauchi, and S. Yamazaki. Long-term ex vivo expansion of hematopoietic stem cells affords non-conditioned transplantation. *Nature*, 571 (2019): 117-121