

老化個体における“若年様”造血幹細胞検出の試み

自治医科大学 炎症免疫研究部・循環器内科

講師 松村 貴由

はじめに

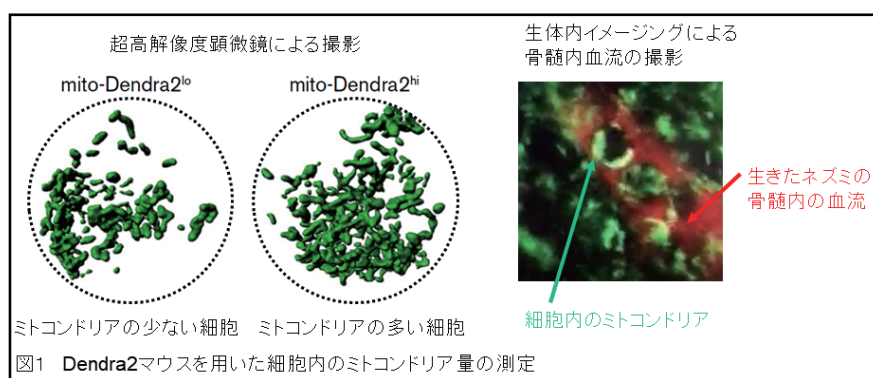
造血幹細胞は全ての血液細胞に分化可能な幹細胞です。ガン化、つまり、悪性腫瘍化することなく生涯にわたる血液の産生を維持するために、造血幹細胞の自己複製と分化は厳密に制御されなければいけません。しかし、残念ながら、造血幹細胞の機能は老化とともに低下し、悪性腫瘍化の危険性は上昇します。様々な細胞内の要因（DNA損傷の蓄積、活性酸素種の増加、ミトコンドリアの機能異常など）と細胞外の因子（幹細胞周囲の微小環境からのサイトカイン、接着因子、細胞外基質など）が複合的に幹細胞の老化を引き起こすと考えられています。

最近の研究では、多くの造血幹細胞は老化によりその機能を低下させる一方で、老化個体の中にもあまり機能が低下しない、若い幹細胞に性質の似た“若年様”幹細胞がある可能性が報告されています。実際、本報告者自身も、造血幹細胞集団は遺伝子発現の面でも機能の面でも多様性に富んでいることを確認していました。また、造血幹細胞の機能とミトコンドリア量には相関があることが知られています。

本研究では、老化造血幹細胞の多様性・不均一性をふまえ、ミトコンドリア量を可視化できるDendra2マウスの若年造血幹細胞及び老年造血幹細胞に対し、単一細胞レベルでの網羅的遺伝子解析（シングルセルRNAシーケンシング）と網羅的エピゲノム解析（シングルセルATACシーケンシング）を施行しました。老化骨髄における遺伝子変化、エピゲノム変化、ミトコンドリア量の全体像を単一細胞レベルで把握することで、老化個体の中で比較的機能が保たれている“若年様”幹細胞にどのような特徴があるかを解明することを目指しました。

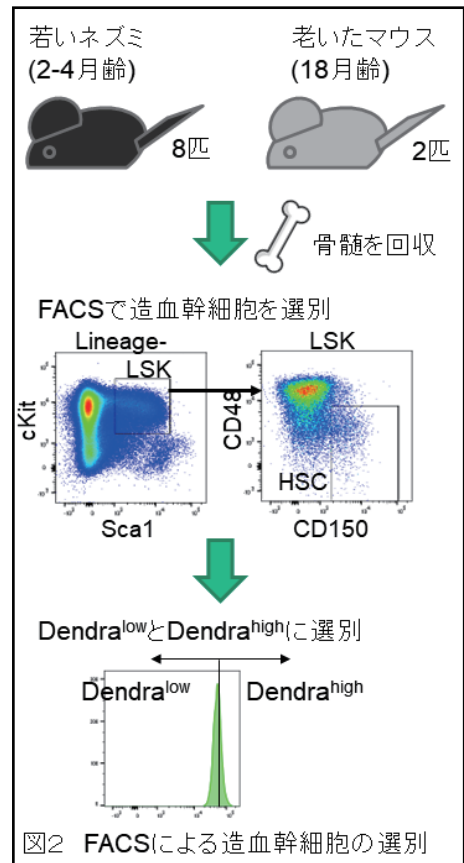
結果

本研究では、細胞内のミトコンドリアが緑の蛍光を発するDendra2マウス（Gt（ROSA）26Sort^{m1.1}（CAG-COX8A/Dendra2）Dcc/Jマウス）を使用しま

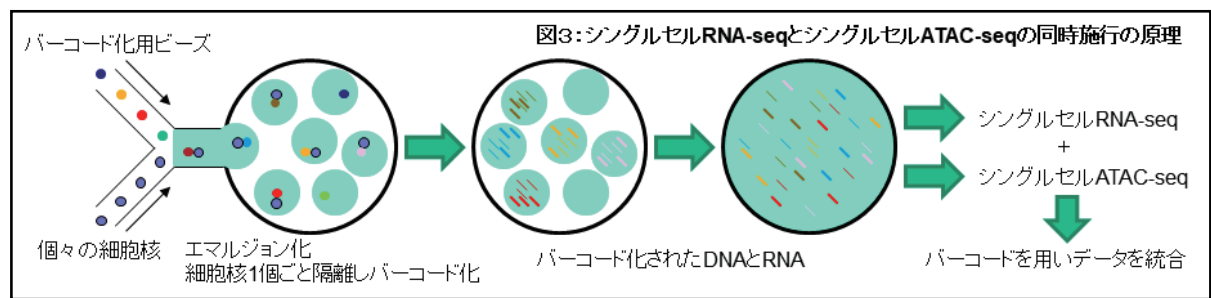


した(図1)。若年(2-4月齢)及び老年(18月齢)のDendra2マウスの骨髄からFACSという細胞を選別する機器でSlam造血幹細胞(CD150+CD48-Lin-Sca1+Kit+)と呼ばれる造血幹細胞を選別し、それをさらにDendra2-high造血幹細胞(ミトコンドリア量の多い造血幹細胞)およびDendra2-low造血幹細胞(ミトコンドリア量の少ない造血幹細胞)にかけて回収しました(図2)。そして、単一細胞ごとの網羅的遺伝子発現解析(シングルセルRNAシーケンシング)と単一細胞ごとの網羅的エピゲノム解析(全ゲノム領域でオープンクロマチン領域を同定するシングルセルATACシーケンシング)を施行しました(図3)。

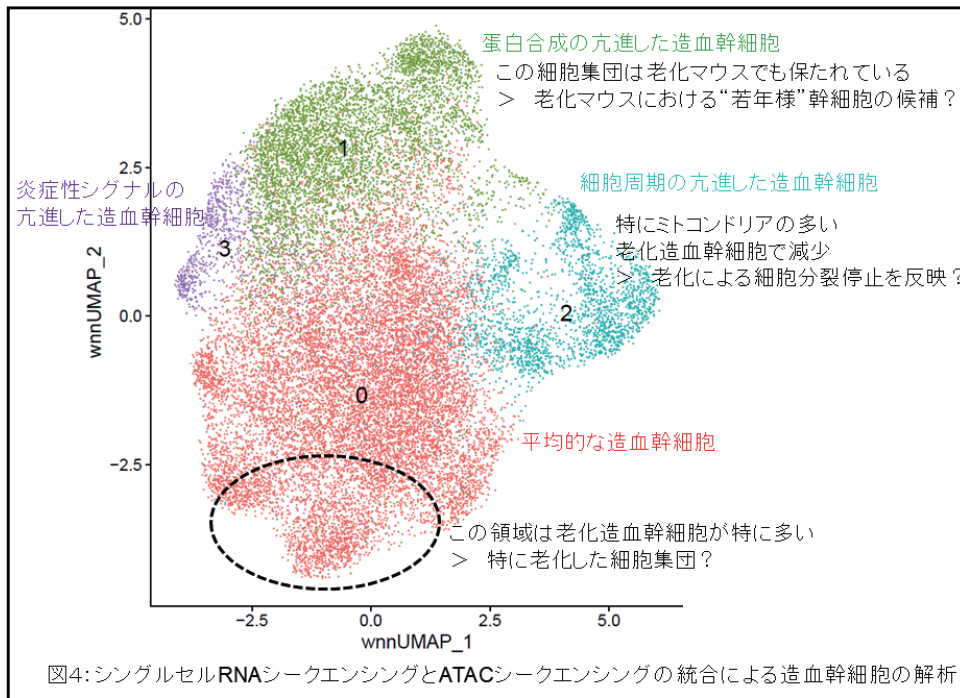
シングルセルRNAシーケンシングの解析方法は世界中の研究者からいくつものやり方が提案されており、どれが優れているのか、いまだ定まっていません。さらに、シングルセルRNAシーケンシングとシングルセルATACシーケンシングを同時に施行した場合の解析方法についてはまだ世界中で探索されている段階です。いくつかの解析方法のうち、今回は、1.各サンプルからのシングルセルRNAシーケンシングのデータを統合、2.各サンプルからのシングルセルATACシーケンシングのデータを統合、3.統合された2つのデータをさらに重みづけ近傍解析WNNという手法で統合、4.統合されたデータ内で、若年、老年、ミトコンドリアが多い、少ない、のそれぞれについて特徴を比較、という手法をとりました。解析結果を均一マニホールド近似投影UMAPという特徴量次元削減手法を用い図示したものが次のページの図4になります。



解析方法についてはまだ世界中で探索されている段階です。いくつかの解析方法のうち、今回は、1.各サンプルからのシングルセルRNAシーケンシングのデータを統合、2.各サンプルからのシングルセルATACシーケンシングのデータを統合、3.統合された2つのデータをさらに重みづけ近傍解析WNNという手法で統合、4.統合されたデータ内で、若年、老年、ミトコンドリアが多い、少ない、のそれぞれについて特徴を比較、という手法をとりました。解析結果を均一マニホールド近似投影UMAPという特徴量次元削減手法を用い図示したものが次のページの図4になります。



造血幹細胞は細胞数の多い順に、赤(下):平均的な造血幹細胞、緑(上):蛋白合成能の高い造血幹細胞、右(青):細胞周期の亢進した造血幹細胞、左(紫):炎症性シグナルの亢進した造血幹細胞、の4群にわかれしました。老化マウスの造血幹細胞の一番の特徴は、細胞周期が亢進している細胞集団(青)が、特にミトコンドリア量の多い老化造血幹細胞で減少



していることでした。これは、細胞の老化に伴い細胞周期が停止してしまう現象を反映していると考えられます。次に、平均的な造血幹細胞(赤)のうち、図の下の領域(黒丸の部分)は、老化マウス由来の造血幹細胞が特に多く、この領域が特に機能の低下した幹細胞の細胞集団と考えられました。一方で、その対側、図の上側の細胞集団(緑)は蛋白合成能が他の集団より高く、幹細胞の機能が保たれている細胞集団と考えられました。この細胞集団の割合は老化造血幹細胞においてもよく保たれており、若いマウスから得られた造血幹細胞と非常に類似した遺伝子発現、エピゲノム変化を示していました。この細胞集団は老年マウスにおける“若年様”造血幹細胞の候補となりうると考えられました。現在、この細胞集団を選別するための表面抗原(FACSで選別するために利用できる細胞表面の蛋白質)として、どれが適切であるかの検討をしております。

考 察

老化したマウスから得られた造血幹細胞の中にも、若いマウスから得られた造血幹細胞と非常に類似した遺伝子発現、エピゲノム変化を示す細胞集団があり、その細胞集団では蛋白の合成が他の細胞集団より亢進していることが示唆されました。今後は、このような造血幹細胞集団を老化個体から選別する方法を確立したいと考えております。“若年様”の幹細胞を同定する方法が近い将来確立されれば、骨髄移植ドナー年齢の引き上げが可能になります。さらに長期的には、造血幹細胞の老化を解明する過程で得られた知見は、骨髄以外の各種組織の幹細胞の老化研究にも応用可能です。血液の病気に限らず各種臓器の病気で、老化に伴う異常がおきる可能性の高い個人を特定する個別化最適医療への応用も考えられます。今回

いただいた助成金でえられた研究成果をもとに、社会に還元できる研究を発展させていきたいと考えております。

要 約

本研究では、老化造血幹細胞の多様性・不均一性をふまえ、ミトコンドリア量を可視化できるDendra2マウスの若年造血幹細胞及び老年造血幹細胞に対し、単一細胞レベルでの網羅的遺伝子解析（シングルセルRNAシーケンシング）と網羅的エピゲノム解析（シングルセルATACシーケンシング）を施行しました。老化したマウスから得られた造血幹細胞の中にも、若いマウスから得られた造血幹細胞と非常に類似した遺伝子発現、エピゲノム変化を示す細胞集団があり、その細胞集団では蛋白の合成が他の造血幹細胞より亢進していることが示唆されました。今後は、このような造血幹細胞集団を老化個体から選別する方法を確立し、各種老化関連疾患の治療に役立てていきたいと考えております。