

ヒト造血システムにおける巨核球分化制御機構の解明

菊地 理子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 千葉 滋 (筑波大学 医学医療系)

【背景】

生体内で造血幹細胞(HSC)は、自己複製能と多系統の血液細胞に分化する多分化能を併せもつ細胞と定義され、各血液細胞への分化は多能性を徐々に失い各系統へ制限されていく階層モデルが広く受け入れられていた。しかし、近年のシングルセル解析の結果、マウス HSC に関しては、全系統の細胞をバランスよく分化しうる *Balanced-HSC* 以外に一定の血液系統への分化能力に偏りを有する HSC (*Lineage-biased HSC*)の存在が提唱され、HSC は分化能や自己複製能をもつ均一な細胞でなく、機能的にヘテロな細胞集団であることが明らかとなった。特に血小板・巨核球系列への分化能に偏りを有する *Megakaryocyte-biased HSC* の存在は出血、血小板減少などの緊急時に HSC から直接的に血小板産生を促す *Emergency hematopoiesis* で重要と考えられている。一方ヒト HSC においては骨髄・臍帯血・末梢血動員 HSC が造血幹細胞移植の移植片として広く用いられており、マウス同様、多分化能をもつ HSC から巨核球が直接的に分化する経路の存在が示唆されているが²⁾、その詳細な解析は行われていない。

インテグリンは、様々な細胞における細胞骨格組織、細胞運動、細胞生存に必要なシグナルを伝達する細胞接着分子で、細胞外マトリックスの受容体として機能する。CD41(α IIb β 3インテグリン)は代表的な巨核球・血小板表面抗原であるが、マウスでは、巨核球・血小板のみならず、HSC の一部に発現しており、加齢とともにその頻度が増加する *Myeloid-biased HSC* で高い発現を示すことが知られている³⁾。このような背景から本研究ではヒト血液細胞における CD41 の発現に注目し、ヒト HSC における巨核球系列への分化運命決定機構の詳細を検討することとした。

【材料・方法】

1. ヒト HSC/HSPC(造血前駆細胞)の単離

ヒト末梢血幹細胞(PBSC)は筑波大学附属病院で採取された PBSC の残余を(倫理委員会承認済)、ヒト骨髄細胞は *Stem Cell Express* 社より購入したものを用いた。まず比重遠心で単核球を分離した後、*Magnetic-activated cell sorting* 法を用い CD34⁺ヒト HSC・HSPC を単離した。

2. ヒト HSC/HSPC の培養

マウス HSC を *In vitro* で効率的に増幅させることのできる培養法として発表された新規無血清培養システム⁴⁾をもとに、新規化学物質 X と HSC の自己複製維持に必須のサイトカインシグナルである TPO/SCF 経路を活性化させるために低分子化合物 Y・Z を添加したヒト HSC 培養システム(未発表データ)で PBSC 由来 CD34⁺細胞を用いて HSC の *Ex vivo* 培養を行なった。

3. フローサイトメトリ解析

培養前、または培養した細胞を抗 CD34, CD38, CD41 抗体で染色し、LSRFortessa X-20 Flow Cytometer で解析を行ない、セルソーター(MoFlo XDP)を用いて各分画の細胞を単離した。

4. コロニー形成アッセイ

MethoCult H4435 Enriched (メチルセルロース培地)に各分画の細胞を 200 個播種し、2 週間後コロニーの種類・数を計測した。

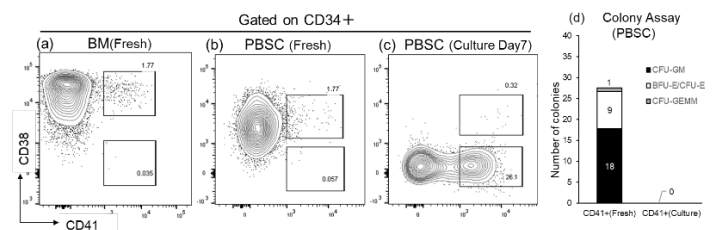
【結果】

①骨髄由来末梢血動員または *Ex vivo* 増幅 HSC・HSPC における CD41 発現パターンの解析

骨髄由来 CD34⁺CD38⁺CD41⁺分画は巨核球前駆細胞(unipotent MKP)分画として報告されており、確かに低頻度で CD34⁺CD38⁺CD41⁺分画が確認された(図 a)。PBSC でも同様に CD41⁺細胞は CD34⁺CD38⁺分画で確認された(図 b)。一方、新規培養システムで HSC の自己複製を促進したところ、HSC 分画である CD34⁺CD38⁺分画が増加し、一部で CD41⁺細胞が確認された(図 c)。

②骨髄由来末梢血動員または *Ex vivo* 増幅 HSC・HSPC 由来 CD41⁺細胞の分化能評価

培養前、または培養した細胞内に見られる CD41⁺細胞の性質を調べるためそれぞれの細胞を分取しコロニー形成アッセイを行った。興味深い事に PBSC 由来 CD34⁺CD41⁺分画の細胞は、表現型は MKP 分画であるにも関わらず、ミエロイド系のコロニーを複数形成し、多分化能を有すると考えられた(図 d)。一方、*Ex vivo* 増幅 HSC/HSPC 由来 CD41⁺細胞は、HSC 分画の一部であるにも関わらずコロニー形成能を有さず、継続して液体培養を行うと CD41 の発現を維持し、巨核球に限定的な分化能を示していた。



【考察・展望】

ヒト骨髄や臍帯血において CD34⁺CD38⁺CD41⁺細胞は MKP であると報告されているが⁵⁾、本来末梢血に存在しない HSC を G-CSF により骨髄から動員して得られる PBSC では同様の表現型の細胞は MKP ではなく多分化能を示した。一方で、HSC を増幅する条件で培養すると、HSC 分画内の一部で CD41 の発現を認め、かつ MKP の能力を有することが明らかとなった。この現象は、PBSC が骨髄で静止期に留められている骨髄由来 HSC と比較して異なり、よりミエロイド系の分化能を有している可能性や、HSC の自己複製を促進する条件で、HSC 分画の一部で MKP が出現することから、HSC の自己複製と巨核球分化の近接性が示唆される。今後、各細胞の遺伝子発現解析や移植実験により、ヒト HSC における分化能の相違、巨核球分化運命の決定機構を明らかにしていく予定である。

【参考文献】

- 1) Yamamoto et al (2013). *Cell*. 154(5)
- 2) Notta et al (2016). *Science*. 333(6039)
- 3) Christos Gekas1 and Thomas Graf (2013). *Blood* 121(22)
- 4) Wilkinson et al (2019). *Nature*. 571
- 5) Miyawaki et al (2017). *Blood*. 129(25)