

血管内皮細胞の起源に依存した新たな造血幹細胞制御機構の解明

中嶋洋行

国立循環器病研究センター

【研究の背景】

造血幹細胞は、全系統の血球細胞を産み出す多能性細胞であり、造血幹細胞ニッチと呼ばれる特殊な微小環境において、自己複製と分化を繰り返しながら一生の間維持される。血液疾患治療に際して、造血幹細胞の効率的な増殖や大量生産を実現するためには、幹細胞の増殖や維持に必要な微小環境(ニッチ)の理解が重要となる。造血組織の血管内皮細胞は、組織特異的なアンジオクリン因子を産生し、ストローマ細胞などと協調しながら、造血幹細胞ニッチとして機能する(Raffi et al., 2016)。我々は最近、ゼブラフィッシュ発生期の造血幹細胞ニッチとして機能する血管内皮細胞の多くが、周囲と異なる前駆細胞から派生することを見出したことから、造血幹細胞ニッチの機能に内皮細胞の起源や系譜の違いが重要であることが示唆された(Nakajima et al., 2023)。つまりこの結果から、内皮細胞の起源の違いによって規定される分子が、造血幹細胞ニッチの機能を担うキープレイヤーとして働くことが想定される。

【目 的】

本研究では、内皮細胞の細胞系譜の違いが、どのように造血幹細胞ニッチに特異的な血管機能や造血幹細胞の制御に寄与するのかを明らかにすることで、内皮細胞系譜に依存した新たな造血幹細胞制御機構の解明を目指す。

【方 法】

本研究では、生体イメージングに適した脊椎動物モデルであるゼブラフィッシュを用いて、転写因子 *islet1* の発現履歴を指標に、起源の異なる内皮細胞群を区別できる *in vivo* 検出系を樹立した。さらに、生体イメージングと単一細胞トランスクリプトーム解析を融合させた手法により、内皮細胞の系譜の違いが、どのように造血幹細胞ニッチ特異的な血管機能を生み出しているのかを検討した。

【結 果】

我々は、転写因子 *islet1* の発現履歴をもとに細胞起源の異なる内皮細胞を分けて光らせる独自のモデルを樹立することに成功した。これにより、スピニングディスク型共焦点顕微鏡を用いて高速度かつ高解像度で造血幹細胞ニッチのイメージングを行ったところ、造血幹細胞が内皮細胞に向かって突起を出すなど、造血幹細胞と *islet1* 由来の血管内皮細胞の間で接触性及び非接触性の細胞間コミュニケーションが起きていることが分かった。この結果は細胞起源がニッチ機能を規定するという我々の主張を強く支持するものである。

次に、我々が実施した単一細胞 RNA シークエンス解析の結果を基に、造血幹細胞ニッチの機能を担う *islet1* 由来内皮細胞で有意に強く発現する分子を抽出した。まず我々は、その中でも接着因子 VCAM-1 に着目した。VCAM-1 は造血幹細胞ニッチの機能に重要であり、その機能は VCAM-1 を発現するマクロファージによって担われるという論文が Nature 誌に報告された(Li et al., 2018)。これを検証する為、VCAM-1 の発現をリアルタイムで捉える新規トランスジェニックフィッシュ *TgBAC(vcam1b:EGFP)* を樹立した。その結果、Li らの結果とは異なり、VCAM-1 陽性のマクロファージは観察されず、ニッチ

チに存在する静脈内皮細胞で強い発現を観察した。VCAM-1 は尾部の静脈全域に観察されたが、ニッチ形成内皮細胞において、より強い発現が観察されたことから、VCAM-1 の造血に関する機能はマクロファージではなく内皮細胞によって担われていると考えられる。一方で、islet1 由来内皮細胞とそれ以外の静脈内皮細胞での発現を比較した際に、その発現は all or none では無かったため、VCAM-1 だけで由来の違いを反映している訳では無さそうである。

そこで、単一細胞 RNA シークエンス解析の結果に立ち戻ったところ、Mrca1, Stab1, Stab2 といったスカベンジャー受容体が islet1 由来内皮細胞で上昇していたことから(Nakajima et al., 2023)、内皮細胞のスカベンジャー機能と造血幹細胞ニッチ機能との間に関連性があるのではないかと考えた。共同研究者である長谷川麗博士が合成した、ポリスチレン蛍光ビーズにポリエチレングリコールを付与した粒子を(Morooka et al., 2024)、ゼブラフィッシュ血管内腔にインジェクションすることにより、血管内皮細胞がビーズを取り込む様子を捉えることができたことから、内皮細胞のスカベンジャー機能を評価できる実験系を新たに樹立した。その結果、islet1 に由来しない尾側静脈内皮細胞に比べ islet1 由来内皮細胞でより強い粒子の取り込み、つまりスカベンジャー機能を見出した。このことから、造血幹細胞ニッチの機能に stab 分子などのスカベンジャー機能が関与している可能性が示唆された。これを検討する為、モルフォリノオリゴを用いて stab1 および stab2 のノックダウンを行ったところ、一部スカベンジャー機能の低下が見られたが、その効果が十分でないためか、造血幹細胞ニッチに対する効果は見られなかった。スカベンジャー機能をもっと効率的に抑制するために、現在、Mrca1, Stab1, Stab2 のノックアウトフィッシュの作製を企図しており、これによりスカベンジャー機能と造血幹細胞ニッチ形成能がどのようにリンクするのかを明らかにする。

【考 察】

単一細胞トランスクリプトーム解析によって得られたデータを基に行った解析から、内皮細胞起源の違いが造血幹細胞ニッチ形成に与えるファクターとして、細胞間接着分子 VCAM-1 と血管のスカベンジャー機能の寄与が示唆された。

前者に関しては、Liらが Nature 誌に報告した VCAM-1 陽性のマクロファージが造血幹細胞ニッチをガイドするという主張(Li et al., 2018)に反する結果である為、今後さらなる慎重な解析が求められる。彼らの論文においても、ニッチ形成内皮細胞における VCAM-1 の発現を論文の補足データとして載せていることから、内皮細胞に VCAM-1 が発現することに関しては我々のデータと一致する。そのため、内皮細胞の VCAM-1 の役割だけを切り離して解析することが今後重要となると考えている。

内皮細胞のスカベンジャー機能と造血幹細胞ニッチの機能との関係性はこれまで全く明らかになってこなかったことから、本研究によりこれらの関係性を明確に示すことができれば、造血研究分野における重要な発見になることが期待される。さらには、スカベンジャー機能がどのようなメカニズムで造血幹細胞ニッチの機能と関連するのかという、新たな興味深いクエストが提起される。我々が観察したゼブラフィッシュの造血組織(Caudal hematopoietic niche)はマウスの胎児の肝臓に相当する発生期特有の一過的な造血幹細胞ニッチである。肝臓の内皮細胞もまたスカベンジャー受容体を多く出すことが知られていることから、同様の対応関係が魚だけではなく哺乳類でも保存されていることが示唆される。

本研究をさらに深化させることで、造血幹細胞ニッチの機能を規定する新たな機構の発見に繋がり、ニッチの機能獲得についての本質的な理解に繋がることが期待される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究は、造血幹細胞ニッチを形成する内皮細胞の機能に、細胞起源が重要であることを裏付ける研究であることから、造血幹細胞の効率的な増殖を目指した血液疾患治療の分子的基盤の提供に繋がる研究として位置付けることができる。さらにゼブラフィッシュで得た知見を哺乳類モデルでも検証することで、造血に必要な血管コンポーネントの普遍的な理解に繋がり、造血に関わる病態理解や、iPS 細胞からの造血幹細胞の大量生産技術などの造血幹細胞の人工培養に向けた取り組みのシーズとなる研究である。

【参考・引用文献】

Li, D., Xue, W., Li, M., Dong, M., Wang, J., Wang, X., Li, X., Chen, K., Zhang, W., Wu, S., *et al.* (2018). VCAM-1(+) macrophages guide the homing of HSPCs to a vascular niche. *Nature* *564*, 119–124.

Morooka, N., Gui, N., Ando, K., Sako, K., Fukumoto, M., Hasegawa, U., Hussmann, M., Schulte–Merker, S., Mochizuki, N., and Nakajima, H. (2024). Angpt1 binding to Tie1 regulates the signaling required for lymphatic vessel development in zebrafish. *Development* *151*.

Nakajima, H., Ishikawa, H., Yamamoto, T., Chiba, A., Fukui, H., Sako, K., Fukumoto, M., Mattonet, K., Kwon, H.B., Hui, S.P., *et al.* (2023). Endoderm–derived islet1–expressing cells differentiate into endothelial cells to function as the vascular HSPC niche in zebrafish. *Dev Cell* *58*, 224–238 e227.

Rafii, S., Butler, J.M., and Ding, B.S. (2016). Angiocrine functions of organ–specific endothelial cells. *Nature* *529*, 316–325.