

課題番号 : 29指1015
研究課題名 : 単一細胞網羅的遺伝子発現解析による造血幹細胞の加齢プログラム同定と抗老化法探索
主任研究者名 : 小林 央
分担研究者名 :

キーワード : 造血幹細胞ステムセルエイジング
研究成果 :

初年度に実施する予定であった本研究期間中に中間年齢段階（7ヶ月、1年齢、1.5年齢）の個体での scRNA-seq 解析を実施した。この結果、造血幹細胞集団の加齢変化は予想よりも早く加齢形質（2年齢の造血幹細胞の発現プロファイル）へと遷移することが明らかになった。さらに、そのような性質は全ての細胞が一様に変化を示しており、加齢に伴い造血幹細胞の一様な性質の変化を示唆した。また、加齢造血幹細胞同様、造血幹細胞特異的遺伝子の発現上昇が7ヶ月齢より認められ、造血幹細胞の機能上の変化に先行して遺伝子発現の変化を認めることが示唆された。

転写因子の相互依存関係については、各転写因子を過剰発現させた上で、他の転写因子の発現変化を定量的 PCR によって確認した。その結果、Pbx1,Gata2 は Gata1 を介した赤芽球系プログラムを抑制する一方で顆粒球・リンパ球系分化プログラムを駆動していることを示していた。逆に Gata2 は顆粒球系分化プログラムを抑制する一方、Gata1 を介した赤芽球・巨核球系プログラムを駆動していた。加齢に伴って発現が上昇する造血幹細胞の転写因子はいずれも分化と未分化性の両方を制御していることを意味しており、加齢造血幹細胞の自己複製能の亢進は、これら転写因子の分化抑制のバランスの異常によって引き起こされることを示唆している。

これらの遺伝子発現解析に加えて、加齢造血幹細胞のよりよい（造血幹細胞移植に頼らない）機能評価系を確立するために、造血幹細胞をより生体に近い環境で維持する培養法を開発した。本培養法を用いると加齢造血幹細胞は若齢造血幹細胞に比べてより広いダイナミックレンジの環境変化に対して生存しかつ未分化性を維持することが明らかになった。今後は同培養条件下において薬剤探索スクリーニングや遺伝子発現解析を組み合わせ、加齢造血幹細胞の機能解析を進めていく。さらに、培養液中の栄養因子を操作することで、通常よりも早く加齢形質の出現する条件を見出したため、それを組み合わせて本年度以降の課題に取り組む。

Subject No. : 29-1015

Title : Identification of aging program through single cell RNA sequencing and exploration for anti-aging method of hematopoietic stem cells

Researchers : Hiroshi Kobayashi

Key word : Hematopoietic stem cells, Stem cell aging

Abstract :

We performed scRNA-seq analysis in individuals at the middle age stage (7 months, 1 year old, 1.5 years old) during the present study which was planned to be carried out in the first year. As a result, it was revealed that the aging change of the hematopoietic stem cell population shifted to the aging character (the expression profile of hematopoietic stem cells of 2 years old) earlier than expected. Furthermore, such a property suggested a change in the uniform nature of hematopoietic stem cells with aging as all cells uniformly changed. In addition, similar to age-related hematopoietic stem cells, increased expression of hematopoietic stem cell-specific genes was observed from 7 months of age, suggesting that changes in gene expression may be observed prior to functional changes in hematopoietic stem cells.

Regarding the interdependence of transcription factors, expression transcription of other transcription factors was confirmed by quantitative PCR after overexpressing each transcription factor. As a result, it was shown that Pbx1 and Gata2 are driving the granulocyte / lymphocyte lineage differentiation program while inhibiting the erythroblast program via Gata1. On the contrary, Gata2 suppressed the granulocyte differentiation program, while driving the erythroid and megakaryocyte program via Gata1. Disbalanced expression of these transcription factors may cause the enhancement of the self-renewal ability of the aging hematopoietic stem cells. In addition to these gene expression analyses, in order to establish a functional evaluation system (which does not rely on hematopoietic stem cell transplantation) of age-related hematopoietic stem cells, a culture method to maintain hematopoietic stem cells in a near-physiological environment was developed. Using the culture method, it became clear that age-related hematopoietic stem cells survive and maintain undifferentiated state under a wider dynamic range of environmental change than young hematopoietic stem cells. We will continue to analyze the function of age-related hematopoietic stem cells by combining drug discovery screening and gene expression analysis under the same culture conditions. Furthermore, by manipulating nutritional factors in the culture solution, we found the condition that the aged trait appears earlier than usual, so we will combine it to address the issues after this fiscal year.

研究課題名：単一細胞網羅的遺伝子発現解析による造血幹細胞の加齢プログラム同定と抗老化法探索

研究目的

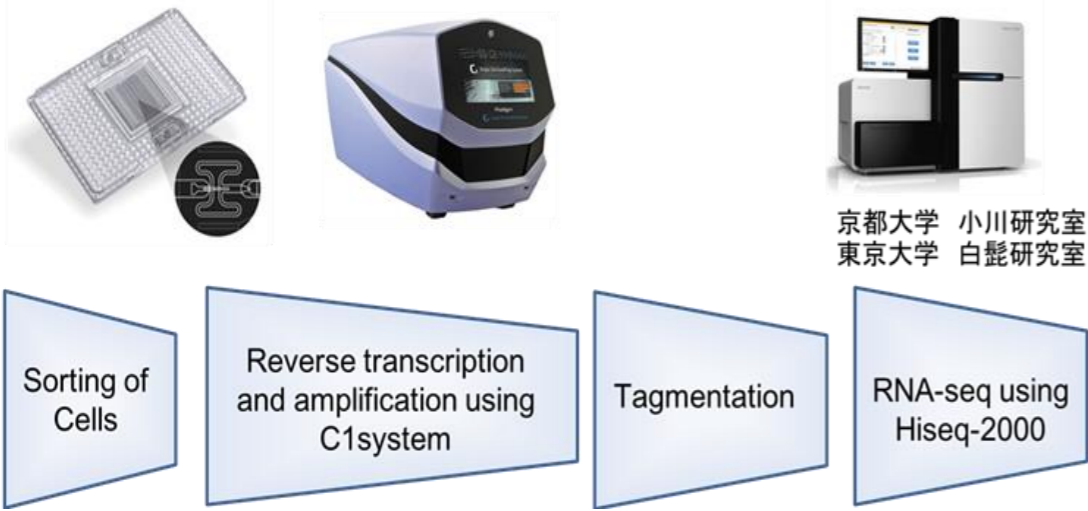
造血幹細胞の加齢形質を誘導する遺伝子プログラムを解明し、幹細胞レベルの抗老化法の端緒をつかむ

研究方法

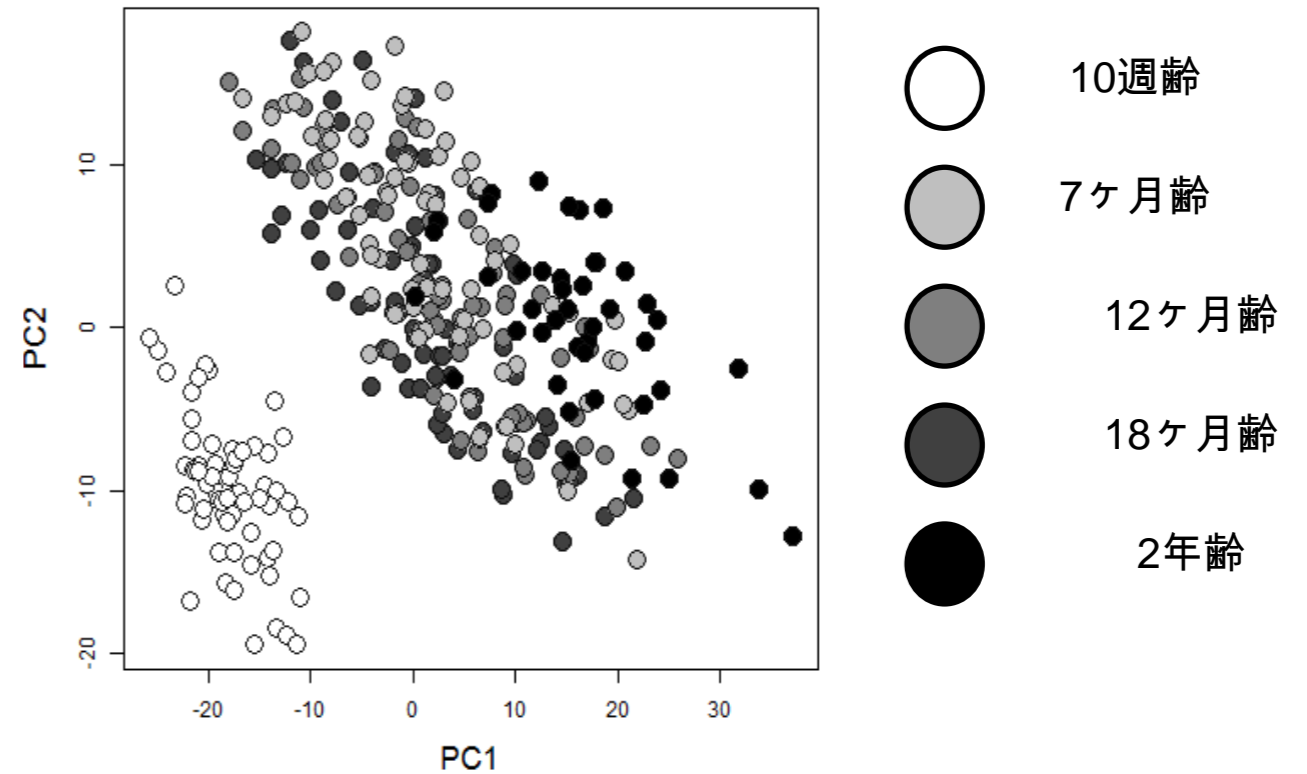
- ★若齢・加齢マウス・ヒト造血幹細胞を用いた単一細胞ごとのトランスクリプトーム取得
- ★インフォマティクス解析による加齢形質を規定する遺伝子ネットワーク同定
- ★関連する分子機構のマウスモデルにおける検証
- ★加齢形質を“若返らせる”化合物の探索・作用メカニズム評価

期待される効果

- ☆幹細胞の経時的自己複製能亢進メカニズムの理解
- ☆加齢造血幹細胞の分化促進法の提供、加齢関連血液病態（易感染性、白血病等）の予防技術の開発を通じた貢献
- ☆関連する知財の創出や外部資金獲得



FludigmC1システム-単一細胞RNAシーケンスのフローチャート



各年齢段階造血幹細胞遺伝子発現プロファイルの主成分分析結果

実施結果

- ★造血幹細胞は加齢に伴い、遺伝子発現が集団として偏移していく
- ★加齢形質(造血再構築能の低下)が出現するよりも先行して7カ月齢時点で遺伝子発現プロファイルは加齢形質を呈する
- ★加齢に伴い造血幹細胞はより未分化な遺伝子発現パターンを示す

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：29指1015

研究課題名：単一細胞網羅的遺伝子発現解析による造血幹細胞の加齢プログラム同定と抗老化法探索

主任研究者名：小林 央

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Abnormal hematopoiesis and hematopoietic stem cell niche.	Takubo K, Morikawa T, Kobayashi H.	Rinsho Ketsueki.	58	2017

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
The acceleration pattern of RhoA-dependent motility is a parameter to distinguish HSCs from MPPs.	Okinaga A, Kobayashi H, Takubo K.	第79回日本血液学会	東京	2017年10月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
(造血幹細胞を維持培養するための培地、及びそれを用いた培養方法)	特願2018-100036	小林央、田久保圭 誉	2018年5月24日	日本

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。