独自の遺伝子解析技術と培養法により血液細胞の新たな分化経路と分化様式を発見

名古屋大学大学院医学系研究科システム生物学分野の小嶋泰弘 特任講師、島村徹平 教授、分子細胞免疫学の西川博嘉 教授と、三重大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学の永春圭規 博士課程学生（現 市立四日市病院）、三重大学医学部附属病院輸血・細胞治療部の大石晃嗣 病院教授（部長）らの研究グループは、小嶋特任講師が開発した深層生成モデルとスプライシング数理モデルの融合により、単細胞レベルの RNA 遺伝子発現の網羅的解析(scRNA-seq)から細胞分化の方向性の“ゆらぎ”を定量的に解析する手法と、大石教授らが開発した包括的リンパ球培養法を用いて、抗体産生に関わるヒト B リンパ球と I 型インターフェロンを分泌する形質細胞様樹状細胞(pDC)が共通の前駆細胞由来であること、この細胞分岐点で細胞分化の方向性が大きくゆらぐこと、接着分子である LFA-1 が pDC 方向への分化（のゆらぎ）に関連すること等を発見しました。

血液細胞の分化は、造血幹細胞から骨髄球系およびリンパ球系前駆細胞に分岐し、さらに様々な細胞に段階的に分岐していく(tree-like model)と考えられていましたが、scRNA-seq 解析の進歩により、現在では、血液細胞の分化は連続的(continuous)に起きるという考え方が主流となっています。本研究グループは今回の研究で、特定の細胞分岐では、外因性あるいは内因性因子の影響を受けて細胞分化の方向性が大きくゆれることを明らかにし、新しい分化モデル(fluctuation-based differentiation model)を提唱しました。

本研究成果は、2022 年 8 月 30 日に、国際学術誌「Cell Reports」にオンライン掲載されました。

ポイント

- **細胞分化の方向性のゆらぎを定量化する新たな scRNA-seq 解析法(VICDYF 法)を独自開発**
- **ヒト B リンパ球と形質細胞様樹状細胞がゆらぎの高い共通の前駆細胞由来であることを解明**
- **特定の細胞分岐では細胞分化の方向性が大きくゆれることを明らかにし、新しい分化モデルを提唱**

１．背景

ヒト血液細胞の分化は、造血幹細胞を頂点とし、骨髄球系細胞とリンパ球系細胞に分岐した後、段階的にさまざまな細胞に分化していると考えられていました(tree-like model)。その後、リンパ球系細胞から、骨髄球系細胞である単球が分化することが明らかとなり、分化経路の改訂が試みられていますが、未だ詳細は明らかではありません。その主な理由は、様々なリンパ球系細胞の分化を同時に観察できる培養系がなかったことです。一方、単細胞レベルでの網羅的 RNA 遺伝子解析技術(single cell RNA sequencing; scRNA-seq)を用いた研究により、血液細胞の分化は、それまで考えられていたような段階的なものではなく連続的なプロセスである(continuous model)と考えられるようになってきました。しかし、これまでの scRNA-seq の解析方法では、分化の方向性の不確実性や“ゆれ”(fluctuation)は考慮されていませんでした。

２．研究成果

本研究グループでは、小嶋特任講師が開発した深層生成モデルとスプライシング数理モデルの融合により scRNA-seq データから確率的な遺伝子発現変化を評価する独自の解析方法（variational inference of cell state dynamics with fluctuation、VICDYF 法）(図 1)と、大石病院教授らが独自に開発した様々な

造血幹細胞からリンパ球系細胞への分化を支持する培養法 (Brit J Hematol 2012, J Immunol 2017)を用いて、Wet と Dry の両面から解析することにより、B リンパ球と形質細胞様樹状細胞(pDC)の共通の前駆細胞を発見し、さらにその細胞分岐点からの B リンパ球あるいは pDC への分化の方向性が大きくゆれていること(fluctuating transcriptome dynamics)を発見しました。

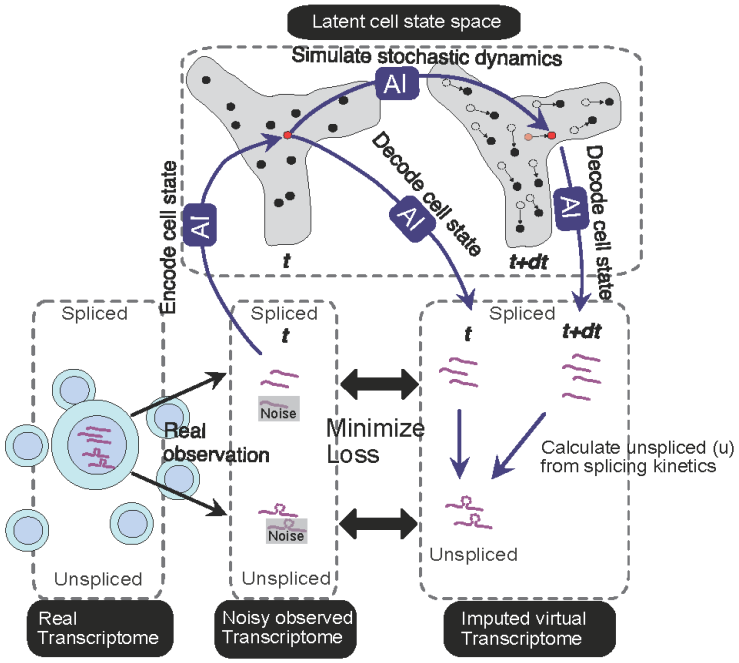


図 1 機械学習を用いた scRNAseq データの解析方法

また、本研究独自の詳細な細胞培養の結果から、ヒト臍帯血 CD34 陽性造血前駆細胞は、c-kit 受容体の発現の有無により増殖能・分化能力が大きく異なり、これまで B リンパ球・NK 細胞にのみ分化すると考えられていた細胞集団 (CD34+CD38+CD45RA+CD19-CD10+CD7-、以後この分画を CD10SP と呼称する)が、多能性リンパ球系前駆細胞から B リンパ球系にコミットした前駆細胞を含む多様な細胞分画であることが明らかとなりました。そこで、CD10SP 細胞を対象に scRNA-seq 解析を行い、VICDYF 法で分化の方向性のゆらぎを解析したところ、c-kit 受容体発現がやや低下し IL-7 receptor(R)α を発現している領域で B リンパ球と pDC の共通の前駆細胞が存在し、その分岐点で分化の方向性のゆらぎ(fluctuation)が高いことを発見しました(図 2)。

加えて、今回の細胞培養では、c-kit 陽性 IL-7R 陽性領域においても、B リンパ球と pDC 両方への分化能が高くなり、一個一個の細胞を培養する single cell culture で B リンパ球・pDC 共通の前駆細胞の存在を確認しました。さらに、VICDYF 法で B リンパ球あるいは pDC への分化に関連する因子を抽出したところ、接着分子である LFA-1 (ITGAL)が pDC への分化には正に、B リンパ球への分化には負に関連することを見出しました。CD10SP 分画の細胞の LFA-1 の発現を FACS で解析したところ、c-kit と IL-7R の発現の有無で B リンパ球あるいは pDC への分化の方向性が大きく変化しており、LFA-1 の発現が高いと分化の方向性が pDC に偏向しており、LFA-1 発現が低いと B リンパ球に偏向していることが明らかとなり、VICDYF 法による解析結果と細胞培養の結果が一致しました。

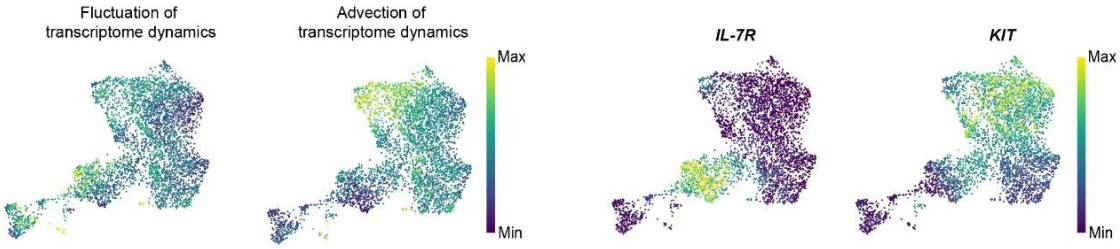
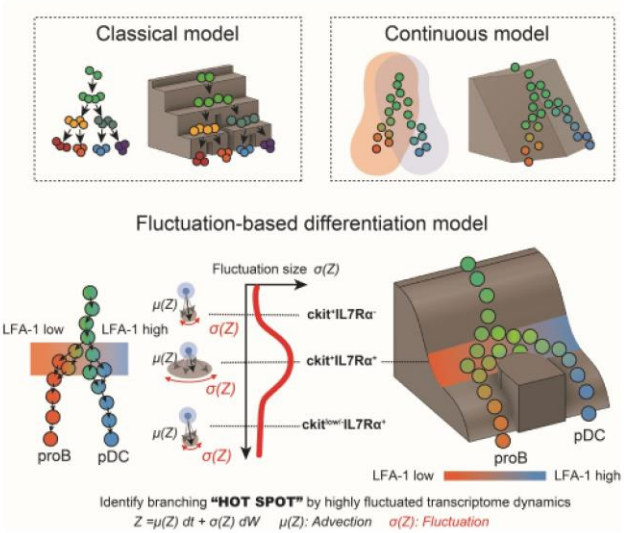


図 2 ゆらぎ(fluctuation)が高い領域と IL-7R・c-kit 発現領域

３．今後の展開

本研究では独自に開発した細胞培養法と scRNA-seq 解析法(VICDYF 法)を用いて、B リンパ球と pDC の新たな分化経路を発見し、この細胞分岐では、血液細胞の分化の方向性が大きくゆれている(fluctuation)ことを見出しました。この結果を踏まえ、tree-like model と continuous model を融合した新たな分化モデル(fluctuation-based differentiation model)を提唱しました。今後は、これらの方法を用いて、血液細胞の新たな分化経路や分化様式の解明や、血液疾患の病態解明を進めていく予定です。



血液細胞の分化モデル

Fluctuation-based modelのイメージ図
制作 ウチダヒロコ

４．用語説明

（注1） single cell RNA sequencing

一細胞ごとの区別をつけた状態で RNA 分子の網羅的なシークエンシングを行うことにより、細胞ごとの遺伝子発現量の網羅的な定量化を行う手法

（注2） 深層生成モデル

深層学習の枠組みにより確率的なデータの生成過程をモデル化した確率モデル。特に変分自己符号化機や Generative adversarial neural network 等が代表的なモデルとなる。

（注3） Splicing kinetics

反応速度論に基づく Spliced RNA の発現量の変化速度を記述する数理モデル。Unspliced RNA の発

現に応じたスプライシング量と Spliced RNA の発現に応じた分解速度により記述される。

（注4） IL-7 receptor(R)α

Interleukin-7 receptor(IL7R)のアルファ鎖を構成するタンパク質。V(D)J 組換えをはじめとした T 細胞の多様な形質と関連する。

（注5） LFA-1

リンパ球上に発現するインテグリン分子。組織内への移行等のリンパ球の多様なプロセスに関与している。

５．発表雑誌

掲雑誌名：Cell Reports

論文タイトル：A bifurcation concept for B-lymphoid/plasmacytoid dendritic cells with largely fluctuating transcriptome dynamics

著者：Keiki Nagaharu,[1,10] Yasuhiro Kojima,[2,10] Haruka Hirose,[2] Kodai Minoura,[2] Kunihiko Hinohara,[3,4] Hirohito Minami,[1] Yuki Kageyama,[1] Yuka Sugimoto,[1] Masahiro Masuya,[1] Shigeru Nii,[5] Masahide Seki,[6] Yutaka Suzuki,[6] Isao Tawara,[1] Teppei Shimamura,[2,4] Naoyuki Katayama,[1] Hiroyoshi Nishikawa,[3,4,7,8] and Kohshi Ohishi[9]

所属名：

[1] Department of Hematology and Oncology, Mie University Graduate School of Medicine, Tsu 514-8507, Japan

[2] Division of Systems Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan

[3] Department of Immunology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan

[4] Institute for Advanced Research, Nagoya University, Nagoya, Japan

[5] Shiroko Women's Hospital, Suzuka 510-0235, Japan

[6] Department of Computational Biology and Medical Sciences, The University of Tokyo, Kashiwa 277-8561, Japan

[7] Division of Cancer Immunology, Research Institute, National Cancer Center, Tokyo 104-0045, Japan

[8] Division of Cancer Immunology, Exploratory Oncology Research and Clinical Trial Center (EPOC), National Cancer Center, Chiba 277-8577, Japan

[9] Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy, Mie University Hospital, Tsu 514-8507, Japan

[10] These authors contributed equally

DOI：10.1016/j.celrep.2022.111260