

【タイトル】加齢に伴うクローン性造血の病態解明

【背景】造血幹細胞は、自己複製能と多分化能により造血を維持しているが、これまでの造血幹細胞の分化細胞への寄与などの造血システムの研究は、主としてマウスモデルを用いて造血幹細胞を移植して実施されており、ヒトにおいてなされた実験はほとんどなく、不明な点が多い。一方、近年、健常人、特に高齢者においてクローン性造血 (clonal hematopoiesis of indeterminate potential: CHIP) が高頻度に認められることが明らかになっており、高齢者の造血幹細胞には多くの体細胞変異が蓄積している。個々の細胞に異なる変異が蓄積しており、我々は、これらの体細胞変異を幹細胞のマーカーとして用いて、どの幹細胞がどの分化細胞にどの程度の期間寄与しているか、また加齢やドライバー変異がどのように幹細胞の寄与率を変化させるかを評価することを試みている。

【経過】健常人における造血幹細胞の分化細胞への寄与を評価するため、健常人より骨髓を採取しており、2019年9月の時点で、80名以上の健常人をリクルートし、骨髓細胞を採取した。主として、高齢者より採取しており、高齢者ではCHIPが高頻度で認められるため、スクリーニングとして次世代シーケンサーを用いたドライバー変異の解析を実施することとした。CHIPのクローンサイズは腫瘍性疾患と比べて、非常に小さいため、通常シーケンスより高感度に変異を同定することの可能な分子バーコードシーケンスにより解析することにした。

この分子バーコードシーケンスによる変異解析の手法を確立した。クローン性造血で高頻度に変異が認められる遺伝子を中心した22遺伝子を標的としたプローブを設計し、このプローブを用いて標的シーケンスを実施した。ヒト由来細胞株であるK562細胞株のDNAにJurkat細胞株のDNAを異なった割合で混ぜて、標的遺伝子上に存在するJurkat細胞株特異的な体細胞変異がどの程度の感度、陽性的中率で同定できるかを評価したところ、0.5%のアリル頻度の変異を約90%の感度、100%の陽性的中率、0.1%のアリル頻度の変異を約70%の感度、100%の陽性的中率で同定することができた。この感度は既存の手法に比べ非常に高感度である。この手法を全検体に応用して、ドライバー変異のスクリーニングを実施中である。

加齢による変異は、核DNAのみならず、ミトコンドリアDNAにも蓄積する。ミトコンドリアDNAは、核ゲノムに比べて非常に小さいが、変異率は100倍以上高く、核DNAの代わりに、ミトコンドリアDNAの変異を評価することで低コストかつ高スループットに単細胞シーケンスを実施できる可能性がある。ミトコンドリアは単細胞RNAシーケンスやAssay for transposase-accessible chromatin sequencing (ATAC)シーケンスでも評価可能であり、現在その有用性を評価中である。

【今後の予定】ミトコンドリアDNAにおける体細胞変異が、幹細胞の分化系統の追跡に有用であることが明らかにした後、幹細胞・分化細胞の単細胞シーケンスを実施し、幹細胞の分化細胞への寄与、その継時的挙動、加齢やドライバー変異獲得の影響を評価する。血小板は核がなく、核ゲノムによる追跡は不能であるが、ミトコンドリアは、血小板でも認められるため、血小板の追跡も試みる。ミトコンドリアDNA変異のエラー率が高い、または単細胞あたりの変異率が低いなどによりミトコンドリアDNA変異による追跡が困難であった場合は、低カバレッジの全ゲノムシーケンスも考慮する。