

骨髄球バイパスを含む造血システムの数理モデルを用いた 1 細胞移植実験のデータ解析

岩波翔也¹, 山本玲², 岩見真吾^{3,4}, 波江野洋³

九州大学大学院システム生命科学府¹

Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Stanford University School of Medicine²

九州大学大学院理学研究院生物科学部門³

科学技術振興機構さきがけ⁴

Shoya Iwanami¹, Ryo Yamamoto², Shingo Iwami^{3,4}, Hiroshi Haeno³

Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University, Japan¹

Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Stanford University School of Medicine, USA²

Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University, Japan³

Precursory Research for Embryonic Science and Technology, Japan Science and Technology Agency,
Japan⁴

1 はじめに

造血システムは、自己複製能力と多分化能力を有する造血幹細胞 (HSC: hematopoietic stem cell) によって維持されている。従来、HSC は、自己複製能力を持たないが多分化能力を有する多能性前駆細胞 (MPP: multipotent progenitor) を経て、最終的に成熟した血球細胞を作ると考えられている。また、造血組織を構成する細胞やその階層性は詳細に調べられており、分化ステージや細胞の種類によって、特徴的に発現する遺伝子が知られている¹。さらに、HSC の特徴の一つに、放射線処理によって造血能力を失ったマウスに移植すると、その造血システムを再構築できることが知られている²。対照的に、MPP 単体による血球の再生産は一時的にしか現れない。この、HSC と MPP の再生産能力の差は自己複製能力の差によるものだと考えられている³。

近年の研究から、HSC と考えられてきた分画の中にも自己複製能力に多様性があることが示されており、長期的な自己複製能力を有する HSC は long-term HSC (LT-HSC)、短期的な自己複製能力を有する HSC は short-term HSC (ST-HSC) などと呼ばれている⁴。さらに、長期的な自己複製能力を持つものの、すでに分化能力が特定の細胞に偏っている HSC があることが知られている⁵。スタンフォード大学の山本玲らは、造血幹細胞だと考えられていた細胞集団の中に、自己複製能力を持ちながら分化能力が限定された骨髄球系前駆細胞 (MyRP: myeloid-restricted progenitors with long-term repopulating activity) が存在することを発見した³。また、山本らはこの細胞 (MyRP) が MPP を経るのではなく、HSC から直接分化することも、PDC (paired daughter cell) assay と 1 細胞移植実験を組み合わせること

で示した³。

本研究では、近年明らかにされてきた HSC 周辺の分化関係を踏まえて、MyRP を含む造血幹細胞分化の数理モデルを構築し、山本らの行なっている 1 細胞移植実験データの解析を行った。これによって造血組織の維持に MyRP が果たす役割を示すとともに、1 細胞解析による最新の実験データに即した造血組織の動態を示す。骨髄球系細胞の生産に特化した自己複製能力を持つ細胞が、造血組織の階層性の中に存在する意義や、造血組織の機能に与える影響を解明することは、特定の血球細胞の量産や白血病などの造血組織由来の疾患の原因解明に重要であると考えられる。

2 造血幹細胞の 1 細胞移植実験

本研究で用いた 1 細胞移植実験データは、まず 5 系統の血球細胞（赤血球、血小板、顆粒球、B 細胞、T 細胞）において赤色の蛍光タンパク質であるクサビラオレンジを発現するマウスの系統を作り、細胞膜マーカーにより造血幹細胞と分類される区画（ $CD150^+ CD41^- CD34^- c-Kit^+ Sca-1^+$ lineage）から 1 細胞を採取した。このクサビラオレンジを発現する細胞 1 個と、発現しない血球細胞 2×10^5 個を、放射線処理によって造血能力を失ったマウスに移植し、経過観察によって、クサビラオレンジが発現している細胞から分化した成熟した細胞の全体に占める割合（キメラ率）を 24 週目まで測定した³。

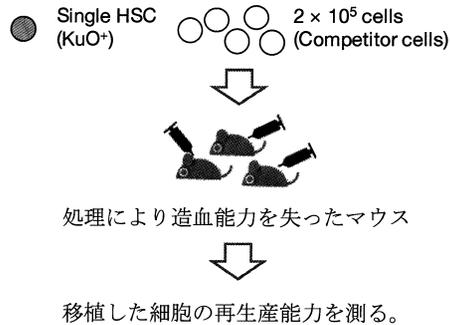


図 1 : 1 細胞移植実験の概要

この実験に基づき、骨髄球系に特化した前駆細胞（MyRP）を従来考えられてきた造血組織の細胞集団に加えた数理モデルを用いて、1 細胞移植実験データを解析する。単純化のために、LT-HSC、ST-HSC、MyRP、リンパ球系細胞、骨髄球系細胞の 5 つの細胞集団の増殖動態を微分方程式で表し、データとのフィッティングによってそれぞれの細胞集団の特性を調べる。

3 造血幹細胞分化の数理モデル

本数理モデルでは造血組織を構成する HSC、MyRP、分化系統が限定した前駆細胞、分化細胞の 4 種類の細胞集団を想定した。前駆細胞と分化細胞は、B 細胞（リンパ球系細胞）と赤血球、血小板、好中球・単球（骨髄球系細胞）という 4 つの系統を考えた。分化の階層構造の一番上流上流に当たる細胞の数を $X(t)$ とし、これは HSC の役割を果たす。すなわち、最終的に全ての血球細胞（B 細胞、赤血球、血小板、好中球・単球）に分化することができ、自身と同じ細胞を長期的に作る事ができる自己複製能力を持つ。さらに、HSC は MyRP もしくは前駆細胞に分化する。MyRP は、HSC と同じように自己複製能力を持ち、骨髄球系前駆細胞に分化することができる。MyRP の細胞数を $M(t)$ とした。つまり、このモデルでは HSC から骨髄球系細胞への分化経路に関して、MyRP を経由する経路と、早い段階で分化が骨髄球系に限定する MyRP を通る経路（骨髄球バイパス）の二つの経路を考えた。前駆細胞はそれぞれの系統の分化細胞へと分化する。前駆細胞数と分化細胞数をそれぞれ $Y_i(t), Z_i(t)$ （赤血球： $i = 1$ 、血小板： $i = 2$ 、好中球・単球： $i = 3$ 、B 細胞： $i = 4$ ）とした。本モデルの分化スキームを図 2 に示した。

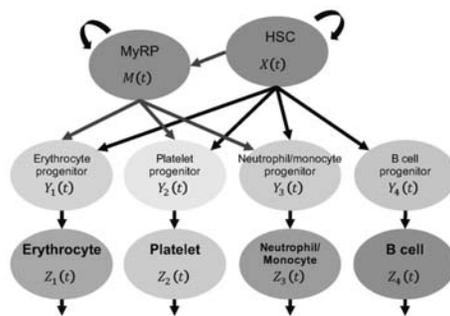


図2: 骨髄球バイパスを含む分化モデル

HSC と MyRP は自己増殖能を持つため、ロジスティック増殖をすると仮定して、骨髄球系細胞（赤血球、血小板、好中球・単球）が 2 つの経路から分化することに注意すると、造血組織の分化ダイナミクスは次のようになる：

$$\frac{dX(t)}{dt} = r_X \left(1 - \frac{X(t)}{K_X} \right) X(t), \quad (1)$$

$$\frac{dM(t)}{dt} = c_{XM} X(t) + r_M \left(1 - \frac{M(t)}{K_M} \right) M(t), \quad (2)$$

$$\frac{dY_i(t)}{dt} = c_{Xi} X(t) + c_{Mi} M(t) - d_i Y_i(t) \quad (i = 1, 2, 3), \quad (3)$$

$$\frac{dY_4(t)}{dt} = c_{X4}X(t) - d_4Y_4(t), \quad (4)$$

$$\frac{dZ_i(t)}{dt} = p_i d_i Y_i(t) - \delta_i Z_i(t) \quad (i = 1, 2, 3, 4). \quad (5)$$

ここで、 r_X と r_M はそれぞれ HSC と MyRP の内的自然増加率であり、 K_X と K_M はそれぞれ HSC と MyRP の環境収容力である。また、 c_{XM} と c_{Xi} ($i = 1, 2, 3, 4$) はそれぞれ HSC から MyRP、前駆細胞への分化率である。 c_{Mi} ($i = 1, 2, 3$) は MyRP から骨髄球系前駆細胞への分化率である。前駆細胞は分化率 d_i で分化により流出し、分化細胞は $p_i d_i$ で産生されるとした。さらに、本数理モデルでは、分化細胞のみが死亡率 δ_i で死亡するとした。

4 パラメータ推定と骨髄球バイパスへの依存性

本研究で使用する1細胞移植実験データは、上述の通り、蛍光タンパクを発現している細胞1個と発現していない血球細胞を放射線処理したマウスに移植し、造血組織を再構築させて、成熟した血球細胞における蛍光タンパク質を発現しているものの割合（キメラ率）を計測している³。そこで、前節で得られた微分方程式系を3つ考え、蛍光タンパク質が発現した細胞（ドナー細胞と呼ぶ）と発現していない移植細胞（コンペティター細胞と呼ぶ）、発現していないレシピエント由来の細胞（レシピエント細胞と呼ぶ）の集団に分けて、その動態を考えた。上付きの添え字を用いて、ドナー細胞の各集団の数をそれぞれ $X^{(d)}(t), M^{(d)}(t), Y_i^{(d)}(t), Z_i^{(d)}(t)$ ($i = 0, 1, 2, 3, 4$)、コンペティター細胞の各集団の数をそれぞれ $X^{(c)}(t), M^{(c)}(t), Y_i^{(c)}(t), Z_i^{(c)}(t)$ ($i = 0, 1, 2, 3, 4$)、レシピエント細胞の各集団の数をそれぞれ $X^{(r)}(t), M^{(r)}(t), Y_i^{(r)}(t), Z_i^{(r)}(t)$ ($i = 0, 1, 2, 3, 4$) とした。すなわち、以下の関係式が成り立つ：

$$X(t) = X^{(d)} + X^{(c)} + X^{(r)}, \quad (6)$$

$$M(t) = M^{(d)} + M^{(c)} + M^{(r)}, \quad (7)$$

$$Y_i(t) = Y_i^{(d)} + Y_i^{(c)} + Y_i^{(r)}, \quad (8)$$

$$Z_i(t) = Z_i^{(d)} + Z_i^{(c)} + Z_i^{(r)}. \quad (9)$$

さらに、健康なマウスもしくは移植後十分に時間がたった時のマウスの体内では、血球数が平衡状態に達していると仮定した。HSC、MyRP、前駆細胞、分化細胞の平衡状態での細胞数をそれぞれ X^*, M^*, Y_i^*, Z_i^* ($i = 1, 2, 3, 4$) とし、平衡状態での細胞数に対する時刻 t での各細胞集団の密度をそれぞれ $x(t) = X(t)/X^*, m(t) = M(t)/M^*, y_i(t) = Y_i(t)/Y_i^*, z_i(t) = Z_i(t)/Z_i^*$ ($i = 0, 1, 2, 3, 4$) と定義する。各細胞集団の密度は次のようになる：

$$\frac{dx(t)}{dt} = r_x \left(1 - \frac{X^*}{K_X} x(t) \right) x(t), \quad (6)$$

$$\frac{dm(t)}{dt} = \frac{X^*}{M^*} c_{XM} x(t) + r_M \left(1 - \frac{M^*}{K_M} m(t) \right) m(t), \quad (7)$$

$$\frac{dy_i(t)}{dt} = \frac{X^*}{Y_i^*} c_{Xi} x(t) + \frac{M^*}{Y_i^*} c_{Mi} m(t) - d_i y_i(t) \quad (i = 1, 2, 3), \quad (8)$$

$$\frac{dy_4(t)}{dt} = \frac{X^*}{Y_4^*} c_{X4} x(t) - d_4 y_4(t), \quad (9)$$

$$\frac{dz_i(t)}{dt} = \frac{Y_i^*}{Z_i^*} p_i d_i y_i(t) - \delta_i z_i(t) \quad (i = 1, 2, 3, 4). \quad (10)$$

このとき、ドナー細胞の各集団の密度をそれぞれ $x^{(d)}(t) = X^{(d)}(t)/X^*$, $m^{(d)}(t) = M^{(d)}(t)/M^*$, $y_i^{(d)}(t) = Y_i^{(d)}(t)/Y_i^*$, $z_i^{(d)}(t) = Z_i^{(d)}(t)/Z_i^*$ ($i = 0, 1, 2, 3, 4$)、コンペティター細胞の各集団の密度をそれぞれ $x^{(c)}(t) = X^{(c)}(t)/X^*$, $m^{(c)}(t) = M^{(c)}(t)/M^*$, $y_i^{(c)}(t) = Y_i^{(c)}(t)/Y_i^*$, $z_i^{(c)}(t) = Z_i^{(c)}(t)/Z_i^*$ ($i = 0, 1, 2, 3, 4$)、レシピエント細胞の各集団の密度をそれぞれ $x^{(r)}(t) = X^{(r)}(t)/X^*$, $m^{(r)}(t) = M^{(r)}(t)/M^*$, $y_i^{(r)}(t) = Y_i^{(r)}(t)/Y_i^*$, $z_i^{(r)}(t) = Z_i^{(r)}(t)/Z_i^*$ ($i = 0, 1, 2, 3, 4$) とすると、各細胞集団のダイナミクスは以下の通りになる：

$$\frac{dx^{(d)}(t)}{dt} = r_X \left(1 - \frac{X^*}{K_X} (x^{(d)}(t) + x^{(c)}(t) + x^{(r)}(t)) \right) x^{(d)}(t), \quad (11)$$

$$\frac{dm^{(d)}(t)}{dt} = \frac{X^*}{M^*} c_{XM} x^{(d)}(t) + r_M \left(1 - \frac{M^*}{K_M} (m^{(d)}(t) + m^{(c)}(t) + m^{(r)}(t)) \right) m^{(d)}(t), \quad (12)$$

$$\frac{dy_i^{(d)}(t)}{dt} = \frac{X^*}{Y_i^*} c_{Xi} x^{(d)}(t) + \frac{M^*}{Y_i^*} c_{Mi} m^{(d)}(t) - d_i y_i^{(d)}(t) \quad (i = 1, 2, 3), \quad (13)$$

$$\frac{dy_4^{(d)}(t)}{dt} = \frac{X^*}{Y_4^*} c_{X4} x^{(d)}(t) - d_4 y_4^{(d)}(t), \quad (14)$$

$$\frac{dz_i^{(d)}(t)}{dt} = \frac{Y_i^*}{Z_i^*} p_i d_i y_i^{(d)}(t) - \delta_i z_i^{(d)}(t) \quad (i = 1, 2, 3, 4), \quad (15)$$

$$\frac{dx^{(c)}(t)}{dt} = r_X \left(1 - \frac{X^*}{K_X} (x^{(d)}(t) + x^{(c)}(t) + x^{(r)}(t)) \right) x^{(c)}(t), \quad (16)$$

$$\frac{dm^{(c)}(t)}{dt} = \frac{X^*}{M^*} c_{XM} x^{(c)}(t) + r_M \left(1 - \frac{M^*}{K_M} (m^{(d)}(t) + m^{(c)}(t) + m^{(r)}(t)) \right) m^{(c)}(t), \quad (17)$$

$$\frac{dy_i^{(c)}(t)}{dt} = \frac{X^*}{Y_i^*} c_{Xi} x^{(c)}(t) + \frac{M^*}{Y_i^*} c_{Mi} m^{(c)}(t) - d_i y_i^{(c)}(t) \quad (i = 1, 2, 3), \quad (18)$$

$$\frac{dz_i^{(c)}(t)}{dt} = \frac{Y_i^*}{Z_i^*} p_i d_i y_i^{(c)}(t) - \delta_i z_i^{(c)}(t) \quad (i = 1, 2, 3, 4), \quad (19)$$

$$\frac{dz_i^{(c)}(t)}{dt} = \frac{Y_i^*}{Z_i^*} p_i d_i y_i^{(c)}(t) - \delta_i z_i^{(c)}(t) \quad (i = 1, 2, 3, 4), \quad (20)$$

$$\frac{dz_i^{(r)}(t)}{dt} = -\delta_i z_i^{(r)}(t) \quad (i = 1, 2, 3, 4). \quad (21)$$

ここで、造血幹細胞移植を受けるマウスは放射線処理により造血組織を破壊されているため、HSC と MyRP、前駆細胞の集団は完全に除去、または機能を持たないと仮定し、分化細胞のダイナミクス ($z_i^{(r)}(t)$) のみを考えた。これらの式から、成熟した血球細胞のキメラ率を計算すると、以下のようになる：

$$C_i(t) = \begin{cases} \frac{z_i^{(d)}(t)}{z_i^{(d)}(t) + z_i^{(c)}(t) + z_i^{(r)}(t)} \times 100. & (i = 1, 2) \\ \frac{z_i^{(d)}(t)}{z_i^{(d)}(t) + z_i^{(c)}(t)} \times 100. & (i = 3, 4) \end{cases}. \quad (22)$$

ここで、 $C_i(t)$ ($i = 1, 2, 3, 4$) はそれぞれ赤血球 ($i = 1$) と血小板 ($i = 2$)、好中球・単球 ($i = 3$)、B 細胞 ($i = 4$) のキメラ率である。移植実験において、赤血球と血小板ではコンペティター細胞とレシピエント細胞の区別ができないため、キメラ率は末梢血における全血球中のドナー細胞の割合となる。これに対して、好中球・単球と B 細胞ではコンペティター細胞とレシピエント細胞の区別が可能であるため、キメラ率は末梢血におけるドナー細胞とコンペティター細胞の合計中のドナー細胞の割合である。

実験において、移植後に HSC と MyRP から前駆細胞への分化にはある一定の時間がかかると仮定し、 $0 < t < \tau_X$ で $c_{Xi} = 0$ 、 $0 < t < \tau_M$ で $c_{Mi} = 0$ とした。また、構築した数理モデルで平衡状態 ($dx(x)/dt = 0, dm(t)/dt = 0, dy_i(t)/dt = 0, dz_i(t)/dt = 0$) において $x(t) = 1, m(t) = 1, y_i(t) = 1, z_i(t) = 1$ であるから、数理モデル中のパラメータについて以下の関係が成り立つ：

$$\frac{K_X}{X^*} = 1, \quad (23)$$

$$\frac{K_M}{M^*} = \frac{r_M}{r_M + \frac{X^*}{M^*} c_{XM}}, \quad (24)$$

$$d_i = \frac{X^*}{Y_i^*} c_{Xi} + \frac{M^*}{Y_i^*} c_{Mi} \quad (i = 1, 2, 3), \quad (25)$$

$$d_4 = \frac{X^*}{Y_4^*} c_{X4}, \quad (26)$$

$$\delta_i = \frac{Y_i^*}{Z_i^*} p_i d_i. \quad (27)$$

ここで、 $X^*/M^*, X^*/Y_i^*$ ($i = 1, 2, 3, 4$)、 M^*/Y_i^* ($i = 1, 2, 3$)、 Y_i^*/Z_i^* ($i = 1, 2, 3, 4$) は定数であるから、数理

モデル中の未知のパラメータは、 $r_X, r_M, (X^*/M^*)c_{XM}, (X^*/Y_i^*)c_{Xi} \ (i = 1,2,3,4), (M^*/Y_i^*)c_{Mi} \ (i = 1,2,3)$
 $(Y_i^*/Z_i^*)p_i \ (i = 1,2,3,4)$ の 14 個となる。

図 3 は、1 細胞移植実験の中で移植した 1 細胞が LT-HSC であると判別された実験の時系列データの平均と数理モデルをフィッティングした結果を示している。図 3 中の丸の点は、それぞれ 1 細胞移植実験で得られた赤血球と血小板、好中球・単球、B 細胞の時系列データを示している。また、実線は数理モデルの $C_i(t) \ (i = 1,2,3,4)$ である。

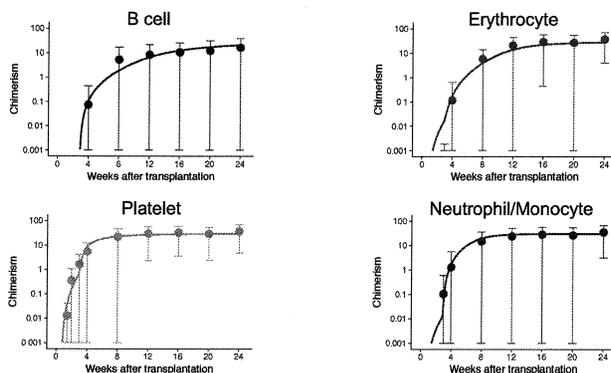


図 3 : 時系列データとフィットしたモデル

骨髓球産生における骨髓球バイパスへの依存性を調べるために、移植後の各時刻における骨髓球前駆細胞の新規産生量を計算した。骨髓球前駆細胞への産生経路は HSC からの産生

$$C_i(t) = \begin{cases} \frac{z_i^{(d)}(t)}{z_i^{(d)}(t) + z_i^{(c)}(t) + z_i^{(r)}(t)} \times 100. & (i = 1,2) \\ \frac{z_i^{(d)}(t)}{z_i^{(d)}(t) + z_i^{(c)}(t)} \times 100. & (i = 3,4) \end{cases} \quad (22)$$

$$\frac{X^*}{Y_i^*} c_{Xi} x^{(d)}(t) \quad (i = 1,2,3)$$

と、MyRP からの産生

$$\frac{M^*}{Y_i^*} c_{Mi} m^{(d)}(t) \quad (i = 1,2,3) \quad (22)$$

の 2 つの経路があり、合計の新規産生量は

$$\frac{X^*}{Y_i^*} c_{Xi} x^{(d)}(t) + \frac{M^*}{Y_i^*} c_{Mi} m^{(d)}(t) \quad (i = 1,2,3) \quad (22)$$

となる。図4中の濃く示した部分は数理モデルと1細胞移植実験データとのフィッティングから推定されたパラメータを用いて計算した、骨髓球前駆細胞の新規産生にしめる骨髓球バイパスからの新規産生の割合

$$\frac{\frac{M^*}{Y_i^*} c_{Mi} m^{(d)}(t)}{\frac{X^*}{Y_i^*} c_{Xi} x^{(d)}(t) + \frac{M^*}{Y_i^*} c_{Mi} m^{(d)}(t)} \times 100 \quad (i = 1, 2, 3) \quad (22)$$

を示している。

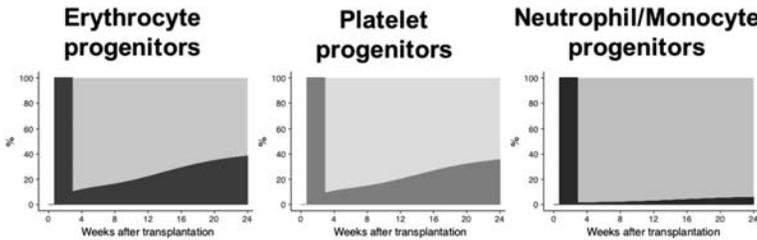


図4: 骨髓球前駆細胞の新規産生にしめる骨髓球バイパスからの新規産生の割合

三つの骨髓球の系統すべてにおいて、移植実験開始後にまず骨髓球バイパスからの新規産生が100%をしめ、その後1~10%に落ち時間経過とともに5~40%となることがわかった。

5 考察とまとめ

本研究では、自己複製能力を持ちながら分化能力が限定された骨髓球系前駆細胞 (MyRP: myeloid-restricted progenitors with long-term repopulating activity) の発見を元に、初めて、骨髓球バイパスを含む造血システムの数理モデルを構築した。この数理モデルを用いて、HSCの1細胞移植実験データを解析した結果、移植の系において、MyRPによる骨髓球バイパスからの骨髓球前駆細胞の産生が、骨髓球バイパスを経由しない経路よりも早く始まり、移植後24週では全新規産生量のうち5~40%をしめることがわかった。この2点を合わせると、移植時のような緊急時における骨髓球の産生に大きく貢献していると言える。本研究では健康なマウスでの骨髓球バイパスの機能を明確にできていないが、今回構築した数理モデルを解析することで、その機能が解明できることが期待できる。また、図3でしめたとおり、移植後の各系統のキメラ率には大きなばらつきがあることから、個体差を考慮するために数理モデルを Non-Linear Mixed Effect Model に拡張する必要がある。

現在、HSCの分化経路の解明は盛んに行われており、パイオインフォマティクスなどの手法によって、膨大な遺伝子配列データから新しいモデルが提唱されつつある。移植の実験系や正常マウスでの

標識実験においても、骨髓球バイパスの存在が認められ始めていることから、本研究の解析手法は HSC の分化経路の解明への先駆けとなることが期待される。今後は、加齢に伴う HSC の分化様式の変化についても焦点を当て、本研究で提案した数理モデルを元にしたシミュレータの開発にも取り組んでいく。

6 References

- 1 Orkin, S. H. & Zon, L. I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**, 631-644, doi:10.1016/j.cell.2008.01.025 (2008).
- 2 Eaves, C. J. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* **125**, 2605-2613, doi:10.1182/blood-2014-12-570200 (2015).
- 3 Yamamoto, R. *et al.* Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* **154**, 1112-1126, doi:10.1016/j.cell.2013.08.007 (2013).
- 4 Wilson, A. *et al.* Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* **135**, 1118-1129, doi:10.1016/j.cell.2008.10.048 (2008).
- 5 Notta, F. *et al.* Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* **351**, 139+, doi:10.1126/science.aab2116 (2016).