

血液細胞の起源とミエロイド細胞

長畑 洋佑^{1,2)}、増田 喬子¹⁾、河本 宏¹⁾

1) 京都大学ウイルス・再生医科学研究所 再生免疫学分野

2) 京都大学大学院 医学研究科 血液・腫瘍内科学

The origin of blood cells and myeloid cells

Yosuke NAGAHATA^{1,2)}, Kyoko MASUDA¹⁾, Hiroshi KAWAMOTO¹⁾

1) Department of Immunology, Institute for Frontier Life and Medical Sciences,
Kyoto University

2) Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine,
Kyoto University

Corresponding author : 河本 宏

住所 : 〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町 53

電話/FAX : 075-751-3818/3819

e-mail : kawamoto@infront.kyoto-u.ac.jp

抄録

ヒトの血液中には様々な系列の細胞が存在している。造血幹細胞からそれぞれの系列への分化過程を知ることは、血液疾患の病態の理解やその治療法の開発研究において重要である。筆者らは、20 年以上にわたって血液細胞の分化経路を探索し、各系列において、系列決定直前までミエロイド細胞分化能が残されているというミエロイド細胞の特殊性を見出し、「ミエロイド基本型モデル」という造血モデルを提唱した。ミエロイド細胞の特殊性は混合性白血病の特徴をよく反映しているだけでなく、血液の進化過程を考察する上でも非常に重要な手がかりを与えてくれている。モデルの提唱後、現在に至るまでに、巨核球や顆粒球の分化経路、無脊椎動物の血液細胞の知見などが集積し、ミエロイド細胞の特殊性が改めて確認されている。それらの文献を紹介しつつ血液細胞の分化過程と進化過程を辿り、「血液」の起源を考察する。

Summary

In human hematopoiesis, there exist various lineage cells such as neutrophil, lymphocyte, and red blood cells. Unveiling the pathway from stem cells to the various lineages helps us understanding the blood disorders and developing therapies for them. We have studied the developmental pathway of hematopoiesis for decades, and found that myeloid potential is retained just before determination to each lineage in various lineage

progenitors. This uniqueness of myeloid cells may reflect character of mixed phenotype leukemia, and may further provide a very important clue in thinking the evolutionary history of blood cells. Recent studies concerning differentiation pathway of megakaryocyte and granulocyte and findings on hemocytes of invertebrates have given strong support to the concept of the uniqueness of myeloid cells and have enabled us to propose insights on the evolutionary history of blood. In this paper, we discuss about the origin of blood cells in the light of developmental pathway during ontogeny and phylogeny.

Key words: hematopoiesis, developmental pathway, myeloid cell, evolution

血液細胞の分化

ヒトの血液細胞は赤血球、白血球、血小板からなり、それぞれに酸素の運搬や病原体排除、止血など重要な機能を担っている。さらに、白血球は、好中球、好酸球、好塩基球、単球・マクロファージ、T細胞、B細胞など多種多様な系列に分類され、それぞれが貪食や細胞傷害、抗体産生などに特化しており、協調し合っ

てヒトの免疫を担っている。

これら多種多様な血液細胞の分化の流れを遡ると、造血幹細胞に行き着くことはよく知られており、古くよりその存在が予想され、1970年代に証明された¹⁻⁴。その後、造血幹細胞が各系列にどのように分化していくのかについて、多くの研究が重ねられてきた。血液細胞を染色して顕微鏡で観察するという研究は19世紀の終わり頃からおこなわれており、赤血球、好中球、好酸球、好塩基球、単球、巨核球が骨髄で分化することは古くから知られていた。この知見に基づいてこれらの細胞は一括して骨髄系 (myeloid) と分類され、それ以外のリンパ節や脾臓に多い細胞質の少ない機能不明な細胞群は、リンパ系 (lymphoid) の細胞と分類された。最も古い分化モデルは、この形態学的な二分法に基づいたもので、造血幹細胞が、ミエロイド共通前駆細胞 (common myeloid progenitor: CMP) とリンフォイド共通前駆細胞 (common lymphoid progenitor: CLP) に分かれるモデルであり、CMP がさらに分化して好中球、単球、赤血球、巨核球・血小板

になり、CLP が分化して T 細胞、B 細胞になるというものである。このモデルは広く教科書に載るようになったが、実験的な根拠に基づいたものではなかった。

ミエロイド基本型モデル

この古典的なモデルが正しいかどうかを調べるために、筆者らはクローナルアッセイという手法で検証を行った。造血前駆細胞を単一細胞レベルで分離し、胎仔胸腺やストローマ細胞と共培養することで、その分化能を評価するという方法である。この結果、従来考えられていた CLP、すなわち、T 細胞と B 細胞には分化するが単球・好中球（ミエロイド細胞）には分化しない前駆細胞は検出されず、代わりに T 細胞とミエロイド細胞、B 細胞とミエロイド細胞に分化する前駆細胞（それぞれ M-T 前駆細胞、M-B 前駆細胞）が観察された⁵。その後、赤血球の分化能も評価した実験を重ねて、胎生期造血において M-T-B 前駆細胞の存在を証明し⁶、古典的モデルとは異なるミエロイド基本型モデルを提唱した^{7,8} (**Fig 1**)。この研究は胎生期造血を検証したものであったが、後に筆者らは成体期胸腺内に M-T 細胞が存在することを見出し⁹、成体期においても古典的モデルは正しくないことが示された。また、筆者らは胎生期において、胸腺に移住する以前に T 細胞と B 細胞の分岐が存在することも見出した^{10,11}。その後、他

のグループにより、成体の骨髄においても同様の知見が得られつつある^{12,13}。

我々からの報告と同時期に、CLP と CMP の存在を改めて提唱する報告もなされたが^{14,15}、ミエロイド分化能の検出感度が不十分であった可能性があり、CLP や、CLP よりさらに B 細胞へ向けて分化した段階の初期 B 前駆細胞がミエロイド細胞分化能を有していることが示されている^{16,17}。ただし、これらのミエロイド系への分化能を有する B 前駆細胞は T 細胞への分化能を有しており、M-B 前駆細胞は同定されるに至っておらず、今後の課題と言える。その後、M-T-B 細胞が他のグループにより成体期造血において LMPP として同定され^{18,19}、ミエロイド基本型モデルの正しさが追認されている。

RNA シーケンス、バーコーディングによる分化経路の探索

近年、次世代シーケンサーを用いて単一細胞レベルで遺伝子発現を解析することにより、血液細胞の分化経路を探索する研究も行われている²⁰。血液細胞は造血幹細胞から各系列に徐々に分化していくので、RNA シーケンスによって様々な分化段階の細胞を遺伝子発現で評価すれば、分化経路を表現できるのではないかという発想である。次元圧縮法の改良も加わり分化経路の可視化が図られたが^{21,22}、RNA シーケンスでは RNA を抽出した時点で細胞が死んでしまうために分化能の検証ができず、この可視化が本当に正しい分化経路を示している

のかは不明であった。この制約を打破しようと遺伝子バーコーディングを併用した検証がなされ、RNA シーケンスによる予想の限界が明らかとなった²³。

また、この研究により、①T 細胞は B 細胞より樹状細胞と、B 細胞は T 細胞より樹状細胞と近縁であること、②単球は好中球に近い経路の他に、樹状細胞/T 細胞/B 細胞に近い経路を経て分化する場合があることも確認されており (Fig 2)、ミエロイド基本型モデルが再確認されたと言える。さらに、ヒトの生体内での造血について、Wiskott-Aldrich 症候群に対して行われた遺伝子治療で移入された造血幹細胞のその後の分化経路を追跡したところ、ミエロイド基本型モデルに合致することが報告されている²⁴。

白血病の分類とミエロイド基本型モデル

ミエロイド基本型モデルは、血球分化だけでなく臨床的な重要性を示しており、その一つとして急性白血病における病型分類が挙げられる。急性白血病は、臨床像や、白血病細胞の外観、細胞表面抗原 (CD3、CD19、MPO など) などにより、急性骨髄性白血病と急性リンパ芽球性白血病に大別され、さらに急性リンパ芽球性白血病は B 細胞起源のものと T 細胞起源のものとに分類される。しかしながら、複数の系列の表面抗原が陽性であり、細胞表面抗原ではいずれにも分類しきれない混合性白血病という一群が存在する (WHO 分類第 4 版)。この混合性

白血病は、ミエロイド細胞に特徴的な表面抗原と T 細胞に特徴的な表面抗原を両方とも出している M-T 型とミエロイド細胞に特徴的な表面抗原と B 細胞に特徴的な表面抗原を両方とも出している M-B 型がほとんどであり、T 細胞の表面抗原と B 細胞の表面抗原を両方とも出しているが、ミエロイド細胞の表面抗原は出していない T-B 型というものはほとんどみられない^{25,26}。最近では、RNA シーケンスによって、細胞表面抗原だけでなく遺伝子発現全体から混合性白血病が分類されたが、T-B 型はなく、M-T 型と M-B 型に分類されることが示されている²⁷。このこともミエロイド基本型モデルの重要性を示しており、血球分化の解明が白血病細胞の性質の解明と密接に関わっていることも示している。

T 細胞、B 細胞以外の系列についても、AML with MRC の一部や AML with inv (16)などは FAB 分類では M6 や M4Eo とされてきたものであり、それぞれ赤血球(E)や好酸球(Eo)とミエロイド細胞の形質が混合した白血病とも捉えることができる。M-E 型 (M6) , M-Eo 型 (M4Eo) の白血病は存在する一方で、E-Eo 型の白血病は認めないことから、ミエロイド基本型モデルが、白血病を理解する上で合理的なモデルであると言える (**Fig 3**)。

生物各種での造血

上記のように、ヒトやマウスなど哺乳類の造血において、ミエロイド細胞系列は

他の系列とは異なる特殊性を有している。この特殊性が何を意味するかは、血液の進化的起源を探ることで明確となる。以下に、哺乳類以外の生物種の血液細胞にはどのような系列が存在しているのかを紹介し、ミエロイド細胞の意味を考察する。

まず、脊椎動物と無脊椎動物で血液細胞の系列は大きく異なることが知られている。脊椎動物にはヒトを含む哺乳類の他に、鳥類、爬虫類、両生類、硬骨魚類、軟骨魚類、無顎類が存在しているが、これらのいずれにも赤血球や栓球(血小板)が存在している。軟骨魚類以後の脊椎動物には T 細胞と B 細胞が存在しているが、無顎類には T 細胞と B 細胞は存在していない。しかし、無顎類にも T 細胞や B 細胞に類似した血液細胞が存在しており、独自の仕組みで抗原受容体の多様性を創出していることがわかってきた²⁸。このことから、細胞性免疫と液性免疫という 2 つのタイプの免疫細胞への分極は無顎類と軟骨魚類が分岐する前に起こっていたと推測できる。

一方で無脊椎動物にまで視野を広げると、脊椎動物に近縁な尾索動物（ホヤなど）や、棘皮動物（ウニ、ナマコなど）にも、貪食細胞が存在している²⁹⁻³³。貪食細胞は免疫を担う細胞として初めて発見された細胞であり^{34,35}、1880 年代に Metschnikoff が発見し、1908 年にノーベル賞を受賞しているが、この際に用いられたのはヒトでもマウスでもなく、ヒトデ（棘皮動物）である。そして、こ

の発見に際して生み出された貪食細胞 (phagocyte)、マクロファージ (macrophage) という言葉が現在にも引き継がれている。我々は、ホヤの血球を解析し、貪食細胞では哺乳類のミエロイド系の遺伝子のホモログが高発現していることも見出している (未発表データ)。そして、脊椎動物が属する後口動物から、かなり古い段階で分岐した前口動物 (節足動物や軟体動物など) にも貪食細胞は存在している³⁶⁻⁴¹。さらには、胚葉を持たず、最も原始的な多細胞性の動物と言える海綿動物にも貪食細胞は存在しており⁴²、動物は、地球上に出現してから間もなくして、貪食細胞という血液細胞の原型を獲得したと考えられる (Fig 4)。

このように、ミエロイド細胞 (貪食細胞) が各種の動物に共通しており、動物は進化の過程でミエロイド細胞を原型として多様な系列を獲得していったと考えられる。そして、その名残が個体における血液細胞の分化過程などに垣間見えるのである。

以下に、ミエロイド細胞の名残について系列毎にさらに詳しく述べる。

B 細胞とミエロイド細胞

マウスやヒトの B 細胞は、骨髄で B 細胞受容体の再構成を行ったのちに、二次リンパ組織であるリンパ節や脾臓でクラススイッチを行い、形質細胞として骨

髄に戻り、抗体産生を行う。これに対して、B-1 細胞という B 細胞が主に腹腔内に存在する。なお、この B-1 細胞と区別して論じる際には、一般的な B 細胞は B-2 細胞と呼ばれる。この B-1 細胞の一部はマクロファージ様の貪食細胞に分化することが分かっており⁴³⁻⁴⁵、B 細胞とミエロイド細胞の近縁性を示す細胞と言える。さらに、この B-1 細胞は T 細胞のヘルプ無しで IgM 抗体を産生し、クラススイッチは行わないという特徴がある。他の生物の B 細胞に目を転じると、硬骨魚類や両生類の B 細胞は一旺盛な貪食能を有していることが知られており、B 細胞がマクロファージから進化したことを示唆している⁴⁶。硬骨魚類の B 細胞は CD5 陽性でありほとんどが IgM 陽性である。硬骨魚類には明確なリンパ節が見当たらないことから⁴⁷、硬骨魚類の B 細胞は哺乳類で言えば B-2 細胞でなく B-1 細胞に相当し、哺乳類はリンパ節やクラススイッチの発達とともに、B-2 細胞を獲得していったことが示唆される (Fig 5)。

T 細胞とミエロイド細胞

先述前述のように、筆者らは、造血幹細胞から T 細胞への分化過程を詳しく解析し、胸腺内の最も未分化な DN1 細胞がミエロイド分化能と T 細胞分化能は有するが、B 細胞分化能は有しないことを発見した⁹。(Fig 6) 同時期に海外の他のグループからも同様の報告がされ⁴⁸、T 細胞はその分化過程において、B 細

胞分化能を失ったのちにミエロイド分化能を失い、T 細胞に系列決定されることが判明した。筆者らはさらに T 細胞への系列決定が T 細胞受容体の再構成の前に行われることと、その主要な転写因子も解明した^{49,50}。

T 細胞と B 細胞は、「リンパ球」と包括されることの多い系列であるが、その分化経路を辿ると、かなり異なった系列であることがわかる。T 細胞と B 細胞は脊椎動物にのみ存在し、T 細胞受容体や B 細胞受容体(いわゆる免疫グロブリン)に多様性を生み出す際に、RAG タンパク質によって遺伝子の再構成を行うことが知られている。近年、T/B 細胞を持たない、頭索動物のナメクジウオに RAG の原型と推定される遺伝子が発見されており、T/B 細胞の起源を探る研究に大きなヒントを与えてくれた⁵¹。前述のように無顎類でも T 細胞、B 細胞に当たる細胞種が見られることや、T 細胞、B 細胞のどちらか一方だけをもつ生物が確認されていないことなどから、T 細胞と B 細胞の原型となる 2 種類の細胞を有した先祖が RAG を獲得し、T/B 細胞を進化させたと考えられている⁸。

赤血球とミエロイド細胞

硬骨魚類、軟骨魚類（サメ）の赤血球には貪食能があることが報告されており^{52,53}、赤血球もミエロイド細胞から進化してきたことを示す知見と考えられる。

尾索動物であるホヤや棘皮動物であるウニが明確な赤血球を持たないことから、

尾索動物への分岐点と無顎類への分岐点の間に赤血球という系列を獲得したと
考えてよいであろう。ヒトの赤血球は、成熟過程で脱核するため核を有していな
いが、この脱核という現象は哺乳類に特徴的で、哺乳類以外の脊椎動物の赤血球
には核が存在している。核を失ってしまえば、ミエロイド細胞の遺伝子を発現さ
せ貪食能を復活させることは不可能であるため、哺乳類の赤血球は、酸素運搬に
極めて特化した状態と言える。

血小板とミエロイド細胞

巨核球の細胞質がちぎれて、血小板となるという現象も哺乳類に特徴的で、他の
脊椎動物は単核の栓球という細胞が、止血を担っている。両生類、硬骨魚類、軟
骨魚類の栓球には貪食能があり^{53,54}、栓球・巨核球もミエロイド細胞から進化し
てきたと考えられる。棘皮動物の血球には凝集能があることが報告されており
³⁰、昆虫の Lamellocyte は、創傷部位に凝集し、体液凝固も誘導することから、
機能としては栓球に近いと言える。前口動物に栓球様の細胞が存在することは、
栓球とマクロファージの分岐が前口動物・後口動物の分岐以前に起こったこと
を示唆している。最近になって、血球分化における血小板・巨核球の分岐がかな
り早いことが報告されており^{55,56}、進化の過程で早期に栓球が出現したことを反
映していると思われる。

顆粒球とミエロイド細胞

ヒトの白血球には、単球・好中球・T細胞・B細胞の他に、好酸球や好塩基球も存在している。これらの顆粒球と呼ばれる細胞も貪食細胞と近縁あるいは共通の前駆細胞から分岐してくるのか、それとも、顆粒球、あるいはその一部は、貪食細胞と異なる分化経路を辿るのかについて、も研究が進んでいる。Nerlov らのグループは、GATA1 の発現に着目し、好酸球と好塩基球の前駆細胞が、LMPP でなく、赤芽球や巨核球を含む前駆細胞から分岐することを報告した^{57,58}。すなわち、造血幹細胞・多能性前駆細胞はまず、巨核球・赤芽球・好酸球・好塩基球を主に産生する GATA1 陽性前駆細胞と、単球・好中球・リンパ球を主に産生する Flt3 陽性前駆細胞に分岐するということである。ただし、GATA1 陽性前駆細胞にも、単球・好中球への分化能が残っていることも示されている。

ここで、尾索動物であるホヤの血球を調べてみると、赤血球は存在しないものの、顆粒球は存在することが報告されている^{32,33}。さらには、貝類にも顆粒球を持つ種類があることの報告もある⁴⁰。これらの顆粒球が哺乳類の顆粒球に相同な血球としてよいのかについては慎重に判断しなければならないが、顆粒球と貪食細胞の分岐も栓球と同様に、前口動物と後口動物の分岐以前に生じた可能性が示唆される。脊椎動物においても顆粒球・栓球を含む系列の分岐がかな

り早期であることも、この類推に合致する。そして、GATA1 陽性前駆細胞ではない方の分岐から B 細胞や T 細胞が出現してきたと推測される。(Fig 7)

まとめ

このように、血球の進化を辿ることは、ヒトにおける造血の解明につながり、さらには白血病の分類・解明につながっている。逆に、ヒトの造血や血液疾患を解明していくことが、進化の過程を解き明かすことにもなる。哺乳類以外の血液細胞について、現時点では、細胞の外観や機能を中心とした比較が主ではあるが、様々な生物種のゲノム解読が完了しており、今後血液細胞の起源を遺伝子レベルで探ることが期待される。我々は、ヒストン修飾による遺伝子発現の抑制因子をノックアウトすると T 細胞や B 細胞、赤血球、巨核球の各系列の前駆細胞のどれもが共通してミエロイド細胞に転換することを見出しており（未発表データ）、このメカニズムを詳細に調べることで、血液細胞の起源に迫られると期待している。

参考文献

- 1 Pappenheim, A. & Ferrata, A. *Über die verschiedenen lymphoid Zellformen des normalen und pathologischen Blutes.* (Klinikhardt, 1911).

- 2 Till, J. E. & Mc, C. E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research* **14**, 213-222 (1961).
- 3 Lewis, J. P. & Trobaugh, F. E., Jr. Haematopoietic Stem Cells. *Nature* **204**, 589-590, doi:10.1038/204589a0 (1964).
- 4 Abramson, S., Miller, R. G. & Phillips, R. A. The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *The Journal of experimental medicine* **145**, 1567-1579, doi:10.1084/jem.145.6.1567 (1977).
- 5 Kawamoto, H., Ohmura, K. & Katsura, Y. Direct evidence for the commitment of hematopoietic stem cells to T, B and myeloid lineages in murine fetal liver. *International immunology* **9**, 1011-1019 (1997).
- 6 Lu, M., Kawamoto, H., Katsube, Y., Ikawa, T. & Katsura, Y. The common myelolymphoid progenitor: a key intermediate stage in hemopoiesis generating T and B cells. *Journal of immunology* **169**, 3519-3525, doi:10.4049/jimmunol.169.7.3519 (2002).
- 7 Kawamoto, H. A close developmental relationship between the lymphoid and myeloid lineages. *Trends Immunol* **27**, 169-175, doi:10.1016/j.it.2006.02.004 (2006).
- 8 Kawamoto, H., Ikawa, T., Masuda, K., Wada, H. & Katsura, Y. A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: the essence of the myeloid-based model. *Immunol Rev* **238**, 23-36, doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00959.x (2010).
- 9 Wada, H. *et al.* Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature* **452**, 768-772, doi:10.1038/nature06839 (2008).
- 10 Kawamoto, H., Ikawa, T., Ohmura, K., Fujimoto, S. & Katsura, Y. T cell progenitors emerge earlier than B cell progenitors in the murine fetal liver. *Immunity* **12**, 441-450 (2000).
- 11 Masuda, K. *et al.* Prethymic T-cell development defined by the expression of paired immunoglobulin-like receptors. *The EMBO journal* **24**, 4052-4060, doi:10.1038/sj.emboj.7600878 (2005).
- 12 Perry, S. S. *et al.* L-selectin defines a bone marrow analog to the thymic early T-lineage progenitor. *Blood* **103**, 2990-2996, doi:10.1182/blood-2003-09-3030 (2004).
- 13 Chen, E. L. Y., Thompson, P. K. & Zuniga-Pflucker, J. C. RBPJ-dependent Notch signaling initiates the T cell program in a subset of thymus-seeding progenitors. *Nature immunology* **20**, 1456-1468, doi:10.1038/s41590-019-0518-7 (2019).
- 14 Kondo, M., Weissman, I. L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common

- lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-672 (1997).
- 15 Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I. L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197, doi:10.1038/35004599 (2000).
 - 16 Balciunaite, G., Ceredig, R., Massa, S. & Rolink, A. G. A B220+ CD117+ CD19-hematopoietic progenitor with potent lymphoid and myeloid developmental potential. *European journal of immunology* **35**, 2019-2030, doi:10.1002/eji.200526318 (2005).
 - 17 Rumfelt, L. L., Zhou, Y., Rowley, B. M., Shinton, S. A. & Hardy, R. R. Lineage specification and plasticity in CD19- early B cell precursors. *The Journal of experimental medicine* **203**, 675-687, doi:10.1084/jem.20052444 (2006).
 - 18 Adolfsson, J. *et al.* Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295-306, doi:10.1016/j.cell.2005.02.013 (2005).
 - 19 Doulatov, S. *et al.* Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nature immunology* **11**, 585-593, doi:10.1038/ni.1889 (2010).
 - 20 Paul, F. *et al.* Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell* **163**, 1663-1677, doi:10.1016/j.cell.2015.11.013 (2015).
 - 21 Tusi, B. K. *et al.* Population snapshots predict early haematopoietic and erythroid hierarchies. *Nature* **555**, 54-60, doi:10.1038/nature25741 (2018).
 - 22 Rodriguez-Fraticelli, A. E. *et al.* Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis. *Nature* **553**, 212-216, doi:10.1038/nature25168 (2018).
 - 23 Weinreb, C., Rodriguez-Fraticelli, A., Camargo, F. D. & Klein, A. M. Lineage tracing on transcriptional landscapes links state to fate during differentiation. *Science* **367**, doi:10.1126/science.aaw3381 (2020).
 - 24 Biasco, L. *et al.* In Vivo Tracking of Human Hematopoiesis Reveals Patterns of Clonal Dynamics during Early and Steady-State Reconstitution Phases. *Cell stem cell* **19**, 107-119, doi:10.1016/j.stem.2016.04.016 (2016).
 - 25 Weinberg, O. K. & Arber, D. A. Mixed-phenotype acute leukemia: historical overview and a new definition. *Leukemia* **24**, 1844-1851, doi:10.1038/leu.2010.202 (2010).
 - 26 Matutes, E. *et al.* Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. *Blood* **117**, 3163-3171, doi:10.1182/blood-2010-10-314682 (2011).
 - 27 Alexander, T. B. *et al.* The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype

- acute leukaemia. *Nature* **562**, 373-379, doi:10.1038/s41586-018-0436-0 (2018).
- 28 Pancer, Z. *et al.* Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature* **430**, 174-180, doi:10.1038/nature02740 (2004).
- 29 Hartenstein, V. Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annual review of cell and developmental biology* **22**, 677-712, doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093317 (2006).
- 30 Kindred, J. E. Phagocytosis and clotting in the Pperivisceral fluid of Arbacia. *The Biological Bulletin* **41**, 9 (1921).
- 31 Rowley, A. F. The blood cells of the sea squirt, *Ciona intestinalis*: morphology, differential counts, and in vitro phagocytic activity. *Journal of Invertebrate Pathology* **27**, 100 (1981).
- 32 Cima, F., Peronato, A. & Ballarin, L. The haemocytes of the colonial aplousobranch ascidian *Diplosoma listerianum*: Structural, cytochemical and functional analyses. *Micron* **102**, 51-64, doi:10.1016/j.micron.2017.08.007 (2017).
- 33 Franchi, N. & Ballarin, L. Immunity in Protochordates: The Tunicate Perspective. *Frontiers in immunology* **8**, 674, doi:10.3389/fimmu.2017.00674 (2017).
- 34 Metschnikoff, E. Untersuchungen uber die intracellulare Verdauung bei wirbellosen Thieren. *Arbeit aus Zool Instituts zu Wien* **5**, 28 (1883).
- 35 Metschnikoff, E. Lecture of phagocytosis and immunity. *The British Medical Journal*, 5 (1891).
- 36 Zachary, D. & Hoffmann, J. A. The haemocytes of *Calliphora erythrocephala* (Meig.) (Diptera). *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie* **141**, 55-73, doi:10.1007/BF00307396 (1973).
- 37 Brehelin, M. Comparative study of structure and function of blood cells from two *Drosophila* species. *Cell and tissue research* **221**, 607-615, doi:10.1007/BF00215704 (1982).
- 38 Meister, M. & Lagueux, M. *Drosophila* blood cells. *Cellular Microbiology* **5**, 573-580, doi:10.1046/j.1462-5822.2003.00302.x (2003).
- 39 Williams, M. J. *Drosophila* Hemopoiesis and Cellular Immunity. *The Journal of Immunology* **178**, 4711-4716, doi:10.4049/jimmunol.178.8.4711 (2007).
- 40 Tame, A., Yoshida, T., Ohishi, K. & Maruyama, T. Phagocytic activities of hemocytes from the deep-sea symbiotic mussels *Bathymodiolus japonicus*, *B. platifrons*, and *B. septemdirum*. *Fish & shellfish immunology* **45**, 146-156, doi:10.1016/j.fsi.2015.03.020 (2015).
- 41 Castellanos-Martinez, S., Prado-Alvarez, M., Lobo-da-Cunha, A., Azevedo, C. & Gestal, C. Morphologic, cytometric and functional characterization of the

- common octopus (*Octopus vulgaris*) hemocytes. *Developmental and comparative immunology* **44**, 50-58, doi:10.1016/j.dci.2013.11.013 (2014).
- 42 Mukherjee, S., Ray, M. & Ray, S. Phagocytic efficiency and cytotoxic responses of Indian freshwater sponge (*Eunapius carteri*) cells isolated by density gradient centrifugation and flow cytometry: a morphofunctional analysis. *Zoology* **118**, 8-18, doi:10.1016/j.zool.2014.07.002 (2015).
- 43 Spencker, T., Neumann, D., Strasser, A., Resch, K. & Martin, M. Lineage switch of a mouse pre-B cell line (SPGM-1) to macrophage-like cells after incubation with phorbol ester and calcium ionophore. *Biochemical and biophysical research communications* **216**, 540-548, doi:10.1006/bbrc.1995.2656 (1995).
- 44 Almeida, S. R. *et al.* Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. *International immunology* **13**, 1193-1201, doi:10.1093/intimm/13.9.1193 (2001).
- 45 Popi, A. F. *et al.* Co-ordinated expression of lymphoid and myeloid specific transcription factors during B-1b cell differentiation into mononuclear phagocytes in vitro. *Immunology* **126**, 114-122, doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02883.x (2009).
- 46 Li, J. *et al.* B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature immunology* **7**, 1116-1124, doi:10.1038/ni1389 (2006).
- 47 Abos, B. *et al.* Identification of the First Teleost CD5 Molecule: Additional Evidence on Phenotypical and Functional Similarities between Fish IgM(+) B Cells and Mammalian B1 Cells. *Journal of immunology* **201**, 465-480, doi:10.4049/jimmunol.1701546 (2018).
- 48 Bell, J. J. & Bhandoola, A. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature* **452**, 764-767, doi:10.1038/nature06840 (2008).
- 49 Masuda, K. *et al.* T Cell Lineage Determination Precedes the Initiation of TCR Gene Rearrangement. *The Journal of Immunology* **179**, 3699-3706, doi:10.4049/jimmunol.179.6.3699 (2007).
- 50 Ikawa, T. *et al.* An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science* **329**, 93-96, doi:10.1126/science.1188995 (2010).
- 51 Huang, S. *et al.* Discovery of an Active RAG Transposon Illuminates the Origins of V(D)J Recombination. *Cell* **166**, 102-114, doi:10.1016/j.cell.2016.05.032 (2016).
- 52 Qin, Z. *et al.* Antibacterial activity of erythrocyte from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is associated with phagocytosis and reactive oxygen

- species generation. *Fish & shellfish immunology* **92**, 331-340, doi:10.1016/j.fsi.2019.06.008 (2019).
- 53 Stokes, E. E. & Firkin, B. G. Studies of the peripheral blood of the Port Jackson shark (*Heterodontus portusjacksoni*) with particular reference to the thrombocyte. *British journal of haematology* **20**, 427-435, doi:10.1111/j.1365-2141.1971.tb07054.x (1971).
- 54 Nagasawa, T. *et al.* Phagocytosis by Thrombocytes is a Conserved Innate Immune Mechanism in Lower Vertebrates. *Frontiers in immunology* **5**, 445, doi:10.3389/fimmu.2014.00445 (2014).
- 55 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).
- 56 Notta, F. *et al.* Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* **351**, aab2116, doi:10.1126/science.aab2116 (2016).
- 57 Drissen, R. *et al.* Distinct myeloid progenitor-differentiation pathways identified through single-cell RNA sequencing. *Nature immunology*, doi:10.1038/ni.3412 (2016).
- 58 Drissen, R., Thongjuea, S., Theilgaard-Monch, K. & Nerlov, C. Identification of two distinct pathways of human myelopoiesis. *Science immunology* **4**, doi:10.1126/sciimmunol.aau7148 (2019).

Figure Legend

Fig. 1 Classical model and Myeloid-based model of hematopoiesis

In classical model, HSC differentiate into CMP and CLP. On the other hand, in myeloid-based model, HSC differentiate into myelo-lymphoid progenitor (MLP) having no erythroid potential. MLP differentiate into M-T progenitor and M-B progenitor, and proposing that CLP stage does not exist.

Fig. 2 Lineage clustering by barcoding

cited from Fig 4F of Weinreb et al. Science **367**, eaaw3381 (2020)

Fig. 3 Myeloid-based model and mixed phenotype leukemia

There exist various types of leukemia intermediate exhibiting T-myeloid, B-myeloid, Er-myeloid, and Eo-myeloid phenotype. The presence of these mixed types is compatible with myeloid based model.

Fig. 4 Myeloid lineage has been conserved among metazoan

Invertebrates lack erythroid, T, and B lineage, but myeloid cells has been conserved as phagocytes even in sponge.

Ph, phagocyte; Gr, granulocyte; Thr, thrombocyte; Er, erythrocyte; T, T-cell; B, B-cell

Fig. 5 Comparison of B cell in bony fish and mammal

B cell of bony fish resembles B-1 cell of mammal in terms of absence of class switch recombination and potential of phagocytosis.

*macrophages differentiated from B-1 cells have phagocytic activity

Fig. 6 Myeloid potential is retained after loss of B-cell potential in T-cell differentiation pathway

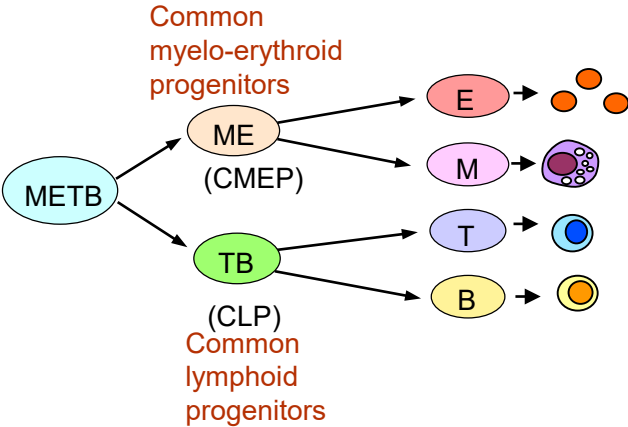
Fig. 7 Hypothesis of evolution of blood cells

Most ancient ancestor of animal like sponge may have acquired phagocyte. Next, ancestor of bilateria is thought to have acquired granulocyte. In ancestor of vertebrate, T cell and B cell are thought to have evolved from branch with macrophage/neutrophil ~~and~~ while

erythrocyte and megakaryocyte from branch of granulocyte representing eosinophil/basophil. It is possible that megakaryocyte is also originated from the stage earlier than segregation towards Deuterostomia and Protostomia, since some animals in either branch carry hemocytes with hemostatic activity.

Fig 1

A. Classical model



B. Myeloid-based model

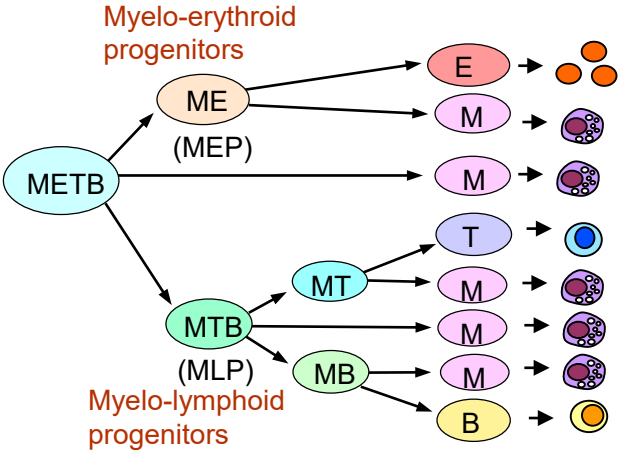


Fig 2

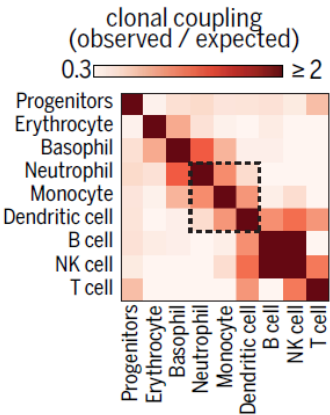


Fig 3

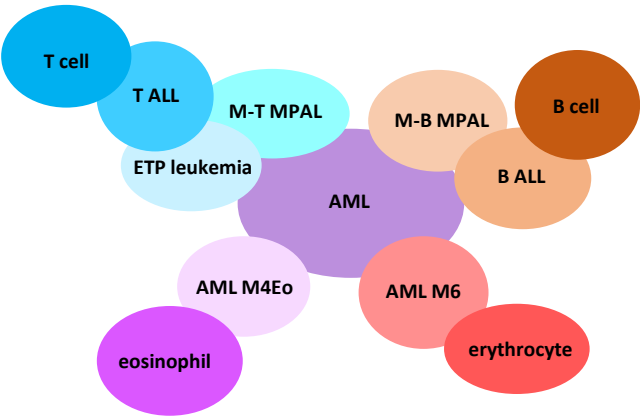


Fig 4

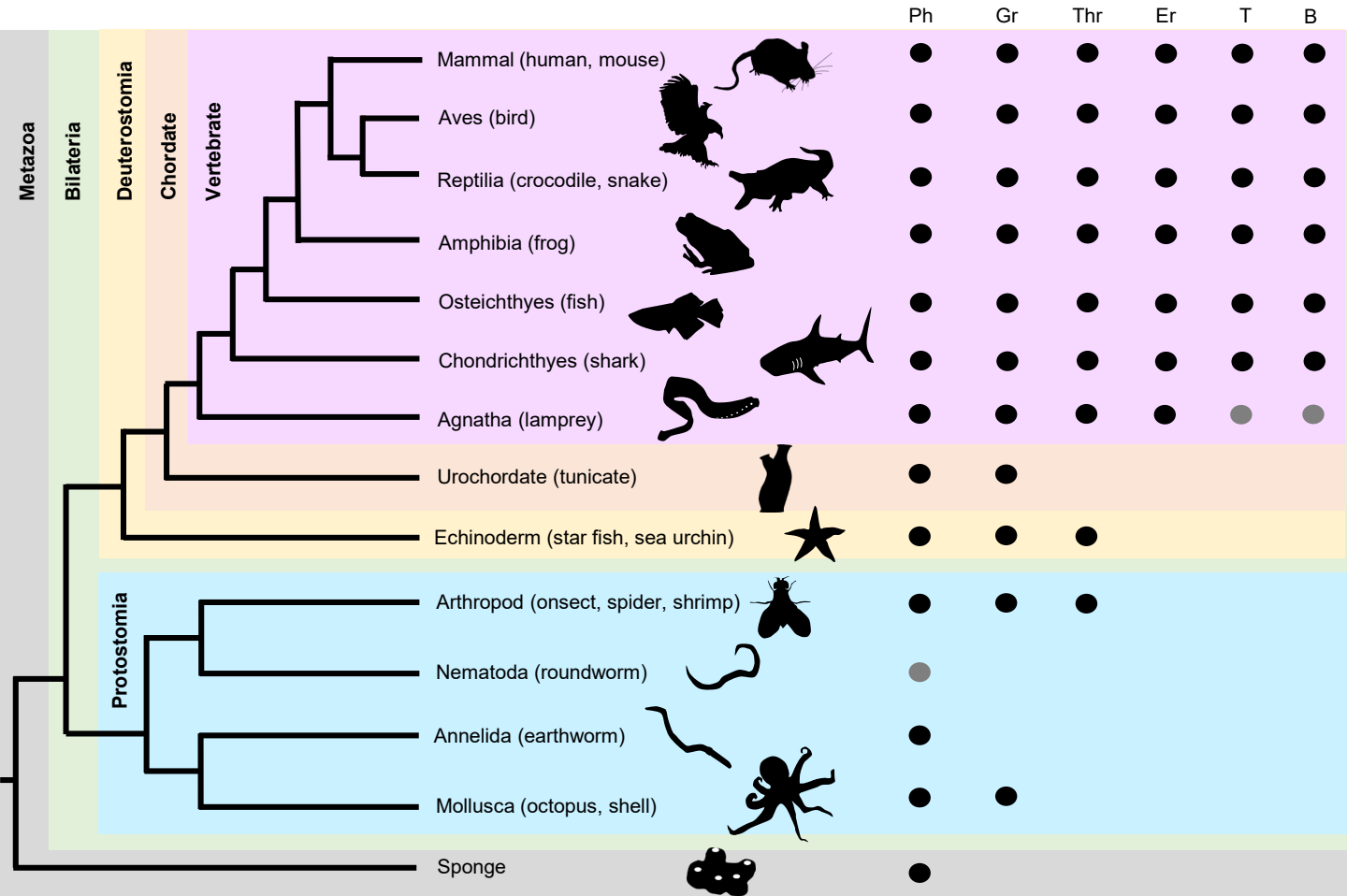


Fig 5

	recombination	Ig class	Class switch	Phagocytosis
B cell of bony fish	○	IgM, IgD	×	○
B-1 cell of mammal	○	IgM, IgD	△	○*
B-2 cell of mammal	○	IgM, IgD, IgG, IgE, IgA	○	△

Fig 6

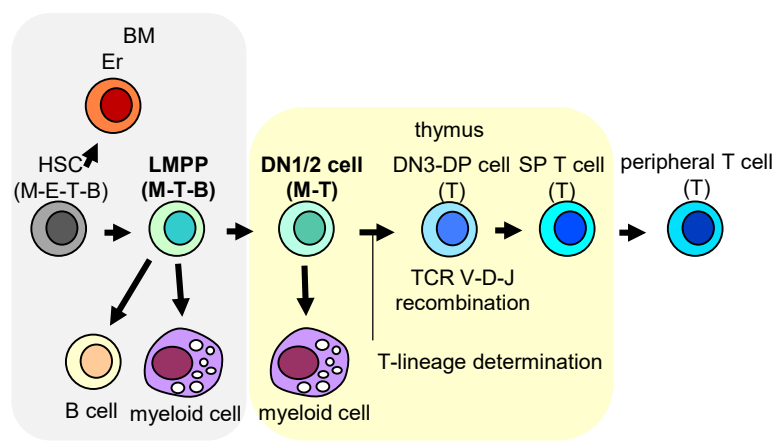


Fig 7

