

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料 〔令和4（2022）年度 中間評価用〕

令和4年3月31日現在

研究期間：2020年度～2024年度
課題番号：20H05695
研究課題名：造血幹細胞体外増幅系を用いた幹細胞性・加齢・発癌機構の解析
研究代表者氏名（ローマ字）：中内 啓光 (NAKAUCHI, Hiromitsu)
所属研究機関・部局・職：東京大学・医科学研究所・特任教授
研究者番号：40175485

研究の概要：

我々が開発した造血幹細胞の長期培養増殖法を最適化し機能的な造血幹細胞を増幅させることで、造血幹細胞を対象とした網羅的遺伝子ノックアウトスクリーニングや長期培養後のゲノム変異解析を試み、造血幹細胞の分化と自己複製機構ならびに加齢による血液腫瘍の発症機構の解明に迫る。同様にヒト造血幹細胞の維持増殖を可能にする培養法を確立し、血液学の Holy Grail を達成することを目指す。

研究分野：血液学

キーワード：造血幹細胞、ex vivo 増幅、クローナル造血、CRISPRgRNA スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は多能性と自己複製能を兼ね備えた未分化な細胞で骨髄中に存在し、一生に渡り血液系のホメオスタシスを維持する機能を持つ。その性質を利用し古くから造血幹細胞移植は臨床応用されてきたが、慢性的な HLA 一致ドナーの不足に加え造血幹細胞の異常は種々の血液疾患の発症に繋がることが問題点として挙げられる。また、造血幹細胞は最も良く研究されている幹細胞である一方、極めて稀な細胞（骨髄細胞約 3 万個に 1 個の頻度で存在）であることに加え in vitro で機能を維持したまま増殖することはできておらず、その性質を制御する詳細な分子機構の解析は困難であった。

最近、我々はマウス造血幹細胞において 4 週間の培養でその機能を維持したまま 900 倍以上に増殖させる手法を開発し報告した (Wilkinson et al. Nature 2019)。同手法を用いることで、これまで得られる数が少なく難しかった造血幹細胞の遺伝子スクリーニングやゲノム変異の解析が可能となった。

2. 研究の目的

本研究では我々が開発したマウス造血幹細胞の長期培養法を基に、造血幹細胞を対象とした遺伝子スクリーニングや長期培養後のゲノム変異解析を試み、造血幹細胞の分化と自己複製機構ならびに加齢による血液腫瘍の発症機構の解明を明らかにする。さらには臨床応用可能なヒト造血幹細胞の体外増幅培養法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

我々が開発したマウス造血幹細胞の ex vivo 増幅系において、長期培養に伴い機能的な幹細胞の純度は漸減する。そこでまずフリーサイトメトリーと移植実験を行い、増幅された幹細胞を純化できる表面マーカーを同定する。

この結果をもとに、真の幹細胞分画を分離し、大量のサンプルが必要なマルチオミックス解析を実施する。同時に、CRISPR/Cas9 ゲノム編集ライブラリーで網羅的に遺伝子ノックアウトを行い、幹細胞性の維持に必要なシグナルを同定する。同定されたシグナルを中心に、低分子化合物等のスクリーニングも実施する。そして得られた知見をヒト造血幹細胞の培養系に適用することで、マウスとの共通点、あるいは相違点から、造血幹細胞の自己複製の本態と、ヒト造血幹細胞増幅に必要な条件の解明を目指す (図 1)。

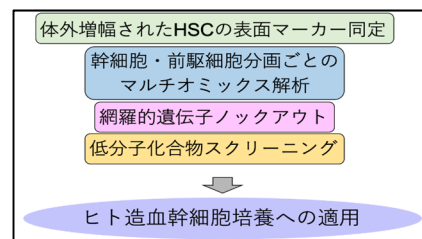


図 1 研究のストラテジー

4. これまでの成果

1. マウス造血幹細胞の長期培養増殖後の細胞の性状解析と培養系のさらなる最適化

長期培養後において造血幹細胞機能と相関する細胞表面マーカーを評価しこれを同定した。また、培養条件の最適化によって造血幹細胞分画のさらなる増殖が得られた。新たに同定した培養後造血幹細胞分画を用いて RNA シークエンスを用いた網羅的遺伝子発現解析を開始しており、現在解析を進めている。

2. マウス造血幹細胞の長期培養による遺伝子変異集積ならびにクローナル造血の解析

造血幹細胞の長期培養後の遺伝子変異が集積するかを評価するため造血幹細胞を 2 ヶ月間培養し、遺伝子変異の集積を whole exon sequencing を用いて経時的に評価したところ、長期の造血幹細胞の培養が遺伝子変異の蓄積と相関することが明らかとなった。

3. CRISPR gRNA ライブラリーによる白血病細胞関連遺伝子のスクリーニング

造血幹細胞の網羅的遺伝子ノックアウトスクリーニングとして Cas9 タンパク質を発現する遺伝子改変マウスから造血幹細胞を採取し長期培養によって増殖しノックアウトスクリーニングを行った。同時に CRISPR gRNA ライブラリー導入後に造血幹細胞移植を行い、レシピエントマウス体内で再構築されたドナー血液細胞中の gRNA の頻度の解析から、生体内での再構築能に影響を与える遺伝子ノックアウトの探索を行っている。得られた候補遺伝子のノックアウトによって表現型が得られるかの確認を進めている。

4. ヒト造血幹細胞の同定と ex vivo 増幅法の開発

マウス造血幹細胞を用いた培養方法の最適化の知見をヒト造血幹細胞に応用したところ、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞は 2-3 週間程度その幹細胞性を維持したまま培養・増殖が可能であることが確認できた。さらに培養後造血幹細胞の表面抗原マーカーの発現においてヒト臍帯血 CD34 陽性細胞とマウス造血幹細胞とで同様の表面タンパク質の発現が確認できた。さらなる培養の最適化を進めるとともに、その他の表面抗原マーカーがヒト造血幹細胞の培養においても有効なマーカーとなりうるかどうか検討を進めている。

5. 今後の計画

マウス造血幹細胞の長期培養法の改良で真に機能的な造血幹細胞が増殖したかを評価するため造血幹細胞移植による機能アッセイや RNA シークエンスを用いたマルチオミクス解析を行い、培養条件のさらなる最適化を進める。また、クローナル造血遺伝子変異を導入し長期培養を行った造血幹細胞を用いて造血幹細胞移植を行い、造血管腫瘍が発症の有無を評価するとともに造血幹細胞機能に影響を与える遺伝子変異について CRISPR/Cas9 システムと AAV6 を用いた遺伝子編集技術を活用して同定する。さらには、CRISPR g RNA ライブラリーによるノックアウトスクリーニングを造血幹細胞移植条件下にて行い、生体内での造血幹細胞機能に影響を与える遺伝子を同定する。これらを踏まえて、マウス造血幹細胞の培養条件の最適化の知見をヒト造血幹細胞の培養に応用し、ヒト造血幹細胞培養条件のさらなる最適化を進める。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

【論文】

1. Polyvinyl alcohol hydrolysis rate and molecular weight influence human and murine HSC activity ex vivo. Sudo K, Yamazaki S, Wilkinson AC, Nakauchi H, Nakamura Y. Stem Cell Res. 査読あり. Volume 56. 2021.
2. Cas9-AAV6 gene correction of beta-globin in autologous HSCs improves sickle cell disease erythropoiesis in mice. Wilkinson AC, Dever DP, Baik R, Camarena J, Hsu I, Charlesworth CT, Morita C, Nakauchi H, Porteus MH. Nat Commun. 査読あり. Volume 12. 2021.
3. Stabilizing hematopoietic stem cells in vitro. Wilkinson AC, Nakauchi H. Curr Opin Genet Dev. 査読あり. Volume 64. 1-5, 2020.
4. Haematopoietic stem cell self-renewal in vivo and ex vivo. Wilkinson AC, Igarashi KJ, Nakauchi H. Nat Rev Genet. 査読あり. Volume 21. 541-554. 2020.
5. In vivo and ex vivo haematopoietic stem cell expansion. Yamamoto R, Wilkinson AC, Nakauchi H. Curr Opin Hematol. 査読あり. Volume 27. 273-278. 2020.

【講演】

1. “Genetic mutations associated with long-term culture of HSCs”. Ludwig Symposium, 2021/12/16.
2. “Stem Cell Niches and Beyond” Hiromitsu Nakauchi Stanford-RIKEN IMS Symposium, 2021/11/30, LIVESTREAM.
3. “Selective expansion of human HSCs in cytokine-free chemically-defined medium”. Hiromitsu Nakauchi “Hematopoiesis”, Keystone Symposium “Hematopoiesis”. 2021/4/22. LIVESTREAM.
4. “Ex vivo expansion of HSCs: towards a holy grail in hematology” Hiromitsu Nakauchi Stanford University School of Medicine / 5th Annual Center for Definitive and Curative Medicine (CDCM) Symposium, 2021/2/25. LIVESTREAM.
5. “幹細胞研究から新しい医療へ”中内啓光 日本口腔外科学会総会 2020/11/13
6. “幹細胞研究から臨床へのトランスレーションを目指して”中内啓光 第69回共済医学会 2020/10/29 (録画配信)
7. “幹細胞研究から未来の医療へ”中内啓光 第27回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム 2020/10/24 (ライブ・オンラインセミナー)

7. ホームページ等

<https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/sct/>