

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07407

研究課題名(和文)造血幹細胞におけるHoxファミリー遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Hox family genes in hematopoietic stem cells

研究代表者

宮西 正憲 (Miyanishi, Masanori)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・上級研究員

研究者番号：80542969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞は、自己複製能と多分化能を有する血液細胞と定義され、生涯にわたり赤血球、血小板、顆粒球、リンパ球といったあらゆる成熟血液細胞を供給しつづけます。しかし、この造血幹細胞が、生体内でどのようにして長期間にわたり維持され、生体の恒常性の維持に寄与しているかは不明な点が多く、自己複製能と多分化能を制御するメカニズムを理解する必要があります。この問題を解く鍵として、申請者が開発した長期造血幹細胞特異的レポーターシステムを用い、自己複製能と多分化能を制御するメカニズムの一端を明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞を用いた細胞治療(造血幹細胞移植)は、白血病等の悪性血液疾患の根治療法として60年以上にわたり広く用いられています。その一方で、造血幹細胞移植に伴う副作用には致死性のものが多く、より安全な治療法の開発は極めて重要な課題であります。そのためには、造血幹細胞の基本となる細胞機能の理解は必須であり、今回の研究成果は造血幹細胞を含む他幹細胞においても有益な情報となります。また将来の造血幹細胞を用いた新規治療法開発に大きく貢献することが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells are defined as blood cells that have the ability of self-renewal and multipotency. With these capabilities, they can continuously supply all mature blood cells such as red blood cells, platelets, granulocytes, and lymphocytes throughout their lives. However, how HSCs can maintain these functions over time in vivo and contribute to the homeostasis of hematopoiesis remains unclear. As a key to solving this issue, we used the long-term HSC-specific reporter system that we recently developed and succeeded in revealing part of the mechanism that regulates the self-renewal capability and multipotency.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 自己複製能 Hox遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞 (Hematopoietic stem cell: HSC) は、自己複製能と多分化能を有する血液細胞と定義づけられ、造血系の頂点に位置する組織幹細胞である。造血系の恒常性維持のため、HSCの一部は、細胞分裂に伴い、その機能の一部を失いながら段階的に分化を続け、最終的には赤血球、血小板、白血球といった種々の成熟血液細胞となる。自己複製能と分化のバランスを保つことで、HSCは長期に渡り機能を維持したまま生存することができる。しかし、どのような機序で、このバランスが保たれているか、その詳細な分子機構は殆ど明らかになっていない。その理由として、モノクローナル抗体とフローサイトメーターを用いて定義される従来の HSC (immunophenotypic HSC: 以降 pHSC と記載) 分画中に “自己複製能を長期に渡り有する長期造血幹細胞 (Long-term HSC: LT-HSC)” と “自己複製能のみが減弱もしくは欠損した短期造血幹細胞 (Short-term HSC: ST-HSC)” が混在することがその要因の一つである我々は仮定し、LT-HSC 特異的な解析を行うことでこれらの問題点が解決できると考えた。これまでに、LT-HSC 特異的にマーキングする遺伝子として *Hoxb5* を同定、さらにこの遺伝子をレポーターとする遺伝子改変マウスを作製することで、LT-HSC のみを純化することに世界で初めて成功してきた (*Nature*, 2016)。*Hoxb5* はマウス骨髄内において、LT-HSC のみに発現する遺伝子として初めて同定されたが、これまでに HSC の機能に関する報告はない。一方で、*Hox* ファミリー遺伝子の中には、造血能への関与が報告されている遺伝子も存在することから、*Hoxb5* が血液細胞、特に唯一発現の認められる LT-HSC の機能を制御している可能性は高い。そこで本研究では、*Hoxb5* 遺伝子を中心に LT-HSC 分画における生物学的役割の解明を目標とした。

2. 研究の目的

Hoxb5 は *Hox* 遺伝子群と呼ばれるファミリー遺伝子の一つである。*Hox* 遺伝子群は、動物の胚発生の初期において、生体の前後軸や体節を決定する遺伝子として同定、報告されてきた。*Hox* 遺伝子群は、ホメオボックスと呼ばれる生物種を超え極めて保存された DNA 結合領域を有しており、転写因子群としてこれまで多くの報告がなされてきた。しかし、HSC における *Hoxb5* 遺伝子に関する詳細な報告は皆無であり、なぜ LT-HSC 特異的に発現し、どのような遺伝子制御を行っているかは、全くの不明である。そこで本研究では、まず *Hoxb5* 遺伝子が HSC、特に LT-HSC においてどのような機能を有しているか明らかにする。また他 *Hox* 遺伝子の HSC への関与、さらにはヒト HSC における *Hoxb5* を含む *Hox* 遺伝子の発現およびその生理活性を明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

造血幹細胞は、Lineage⁺cKit⁺Sca-1⁺Flk2⁺CD34^{-/lo}CD150⁺ (pHSC) で規定される造血幹細胞分画内に自己複製能が強く生涯にわたり維持される細胞集団 (LT-HSC) と自己複製能が減弱もしくは消失した細胞集団 (ST-HSC) の異なる二つの細胞分画が存在する。申請者のレポーターシステムは、この LT-HSC と ST-HSC を明確に分離する手法であり、また自己複製能は LT-HSC のみに強く観察される細胞機能であることから、LT-HSC 特異的に発現する遺伝子による制御の可能性が高いことが示唆される。特に *Hoxb5* 遺伝子は LT-HSC 特異的に発現する遺伝子であることから、自己複製能周辺の細胞機能に直接関与していることが示唆される。また *Hox* 遺伝子はその遺伝子配列の相同性より機能の重複性が知られており、単独の遺伝子欠損では何ら表現形を示さないケースでも、複数のファミリー遺伝子を同時に欠損することで重篤な表現形を示すモデルマウスも報告されている (Hrycaj et al., *Cell Reports*, 2015) ことから、*Hoxb5* 遺伝子単独で機能を

有しない場合にも、ファミリー遺伝子による複合的な関与の可能性が考えられる。そこでまず、LT-HSC 分画に発現する Hox ファミリー遺伝子を、各種トランスクリプトーム解析よりスクリーニングする。発現の確認出来た遺伝子は、in vitro、in vivo での機能評価実験を用い、HSC の機能にどのような影響を及ぼすかを検討する。

4. 研究成果

LT-HSC と ST-HSC は、マウスへの一次移植（トータル観察期間 4 ヶ月）ではその細胞学的相違がほとんど認められず、二次移植にて差異が明らかとなる極めて類似した細胞集団である。そこで、まず LT-HSC 特異的に発現する遺伝子を明らかにするため、上記 LT-HSC 特異的レポーターシステムを用い、マウス骨髄より単離した LT-HSC、ST-HSC、pHSC 分画、多能性前駆細胞から total RNA を調整し、トランスクリプトーム解析を行い比較検討した。結果は、pHSC/MPP 間と比較すると、Hoxb5+ pHSC/Hoxb5- pHSC 間の遺伝子発現パターンは極めて類似しており、移植による実験結果をサポートするものであった（図 1）。

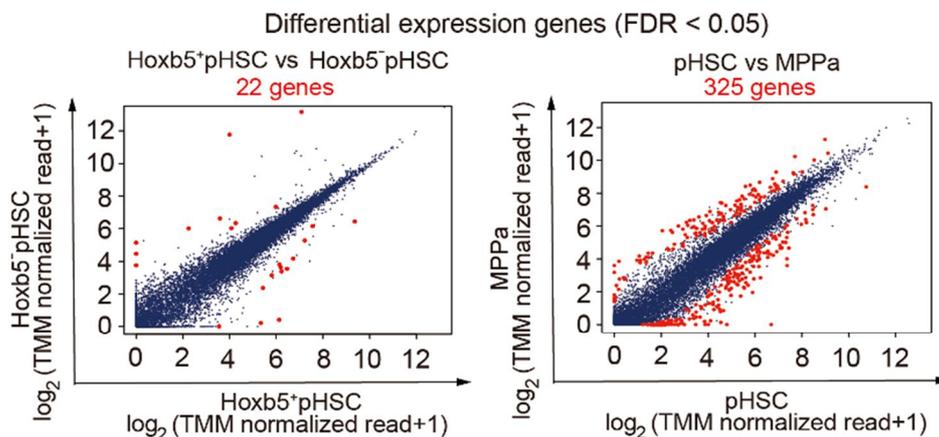


図 1：長期造血幹細胞特異的に発現する遺伝子群の抽出

マウス骨髄細胞より調整した長期造血幹細胞（LT-HSC）、短期造血幹細胞（ST-HSC）、造血幹細胞全体（pHSC）、多能性前駆細胞（MPP）から total RNA を調整し、RNA-seq 解析を行った。LT-HSC、ST-HSC 間での遺伝子発現比較（左図）、pHSC、MPP 間での遺伝子比較（右図）

次に、Hox ファミリー遺伝子がこれら細胞分画において、どのような発現パターンを有するかを確認するため、上記のデータセットを用い解析した。今回解析した 4 細胞分画においては、共通して発現を認めるものや、全ての分画において全く発現を認めないもの、分画により発現の有無を認める 3 パターンが確認された。中でも興味深いことは、細胞が未分化になるにつれ、発現を認める Hox 遺伝子の数が増えることであり、このことから Hox 遺伝子が、造血幹細胞特有の細胞機能を制御している可能性が示唆された（図 2）。

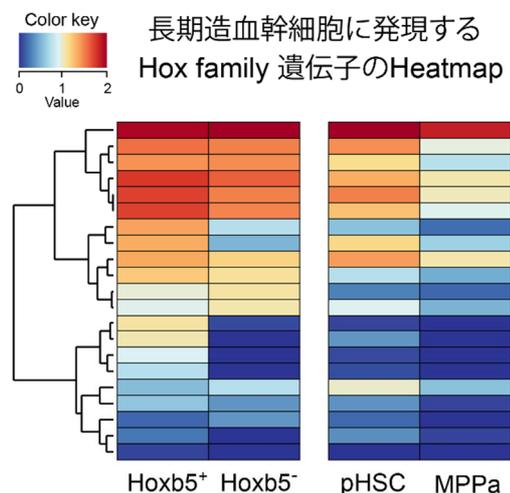


図 2：長期造血幹細胞特異的に発現する Hox ファミリー遺伝子

マウス骨髄細胞より調整した長期造血幹細胞（LT-HSC）、短期造血幹細胞（ST-HSC）、造血幹細胞全体（pHSC）、多能性前駆細胞（MPP）間での Hox ファミリー遺伝子発現の比較

次に、Hox 遺伝子が制御する細胞機能を理解するため、Hoxb5+ pHSC、Hoxb5- pHSC 間で、GO 解析を行った。結果としては、細胞接着に関するものがほとんどであり、LT-HSC 特有の細胞機能は同定出来なかった (図 3)。

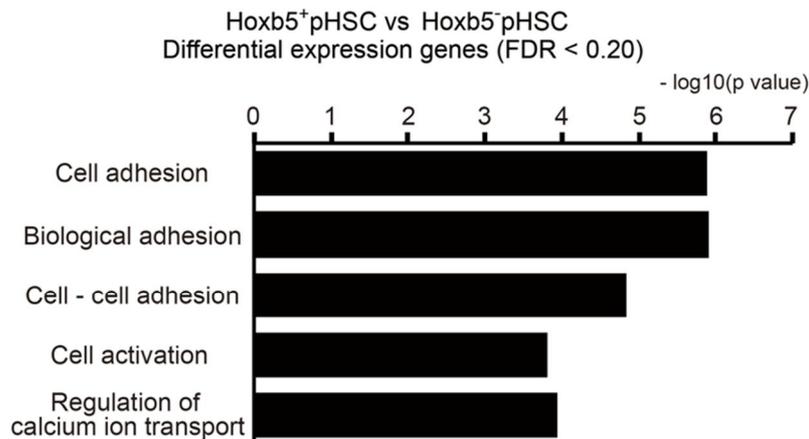


図 3 : 長期造血幹細胞特異的な細胞機能の解析
マウス骨髄細胞より調整した長期造血幹細胞 (LT-HSC)、短期造血幹細胞 (ST-HSC) 由来 RNA-seq をもとに、GO 解析を行った

そこで、造血幹細胞特有の細胞機能を制御しているかを、機能実験を通して実証する方法へと方向転換した。上にも述べたが造血幹細胞の代表的な機能は自己複製能と多分化能である。従来、これらの機能は放射線照射したマウスへの移植実験を介し評価するが、二次移植を含めると 8 ヶ月にわたる観察期間を必要とし、効率的なスクリーニングが行えない。そこで、in vitro での分化培養を応用し、Hox 遺伝子を造血幹細胞に強制発現することで分化のスピードに変化を来すかを指標とする新たなスクリーニング手法を開発した。すると、Hox ファミリーの中でも Hoxb5 が有意に造血幹細胞の分化を抑制することが明らかとなった (図 4)。

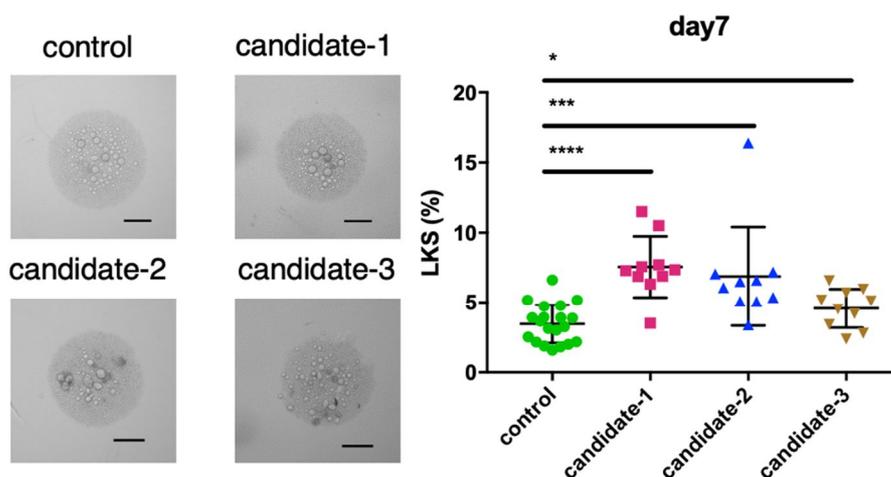


図 4 : in vitro スクリーニング手法による自己複製能制御遺伝子の抽出
短期造血幹細胞に候補遺伝子を導入し、7 日間細胞培養を行った。
培養細胞コロニー比較 (左図)、細胞分化抑制効果比較 (右図)。

そこで、Hoxb5 が実際に生体内で自己複製能や多分化能を制御している遺伝子かを評価するため、移植実験による評価を行った。レンチウイルスを用いて短期造血幹細胞に遺伝子導入した後、致死量の放射線照射を行ったマウスへ移植した。細胞の多分化能、自己複製能を評価するため、4 週間毎に末梢血に含まれるドナー細胞由来の成熟血液細胞を、フローサイトメー

ターを用いて解析した。自己複製能の評価は、末梢での生存期間が3日間とごく短期間である好中球の出現期間を指標に、多分化能の評価は、末梢血に含まれる細胞分画の種類を指標に行った。その結果、Hoxb5を導入した短期造血幹細胞は、長期間にわたり好中球の産生、さらには全ての血球系の産生が回復し、長期造血幹細胞様に振舞うことが明らかとなり、Hoxb5が実際に自己複製能、多分化能を制御していることが明らかとなった(図5)。

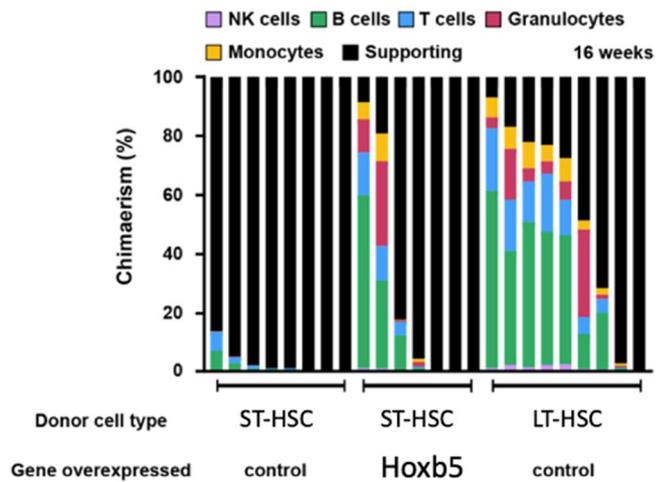


図5 : Hoxb5による自己複製能制御

Hoxb5を導入した短期造血幹細胞を、致死性放射線照射したマウスへ移植したところ、自己複製能が長期にわたり回復したことが確認された。

今回、造血幹細胞分画内に存在する長期造血幹細胞から短期造血幹細胞へと細胞が僅かに変化する過程に着目することで、自己複製能に関連する生命現象を特異的に解析する手法を複数開発してきた。それにより、高感度に候補遺伝子のスクリーニングから機能実証実験までを、再現性を確保しつつ高効率に実験・解析することが可能となり、未解明である自己複製能の分子メカニズムの一端を明らかにすることができた(現在、論文投稿中)。一方で、今回発見した Hoxb5 が自己複製能制御の唯一のマスター遺伝子であるかについては、議論の余地が残る。引き続き、制御遺伝子の同定を行う必要がある。さらに、マスター遺伝子が制御する下流遺伝子ネットワークの解明に関しては、残念ながら本研究期間内に解明することはできなかった。

造血幹細胞は、中でも長期造血幹細胞は骨髄有核細胞10万細胞に1細胞と極めて希少な細胞集団であるため、既存の手法や新規技術を容易に造血幹細胞に導入することが、ほとんど不可能であり、実験手法の高感度化や特殊な機器の新規開発が都度必須となる。そのため、中長期にわたる研究開発戦略や明確な実験プランが重要であり、今後も『長期造血幹細胞自己複製能分子メカニズムの解明』を目指し、研究を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 酒巻 太郎、宮西 正憲	4. 巻 60
2. 論文標題 造血系における長期造血幹細胞の意義と純化システム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1056 ~ 1062
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.11406/rinketsu.60.1056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takagaki Soichiro, Yamashita Rieko, Hashimoto Noriyoshi, Sugihara Kazushi, Kanari Kanako, Tabata Keisuke, Nishie Toshikazu, Oka Shogo, Miyanishi Masanori, Naruse Chie, Asano Masahide	4. 巻 9
2. 論文標題 Galactosyl carbohydrate residues on hematopoietic stem/progenitor cells are essential for homing and engraftment to the bone marrow	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-019-43551-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮西正憲
2. 発表標題 Hoxb5 confers increased stress tolerance and maintenance of self-renewal to the hematopoietic stem cells
3. 学会等名 International Society for Experimental Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮西正憲
2. 発表標題 長期造血幹細胞分離から見てきた造血幹細胞の姿
3. 学会等名 日本血液学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮西正憲
2. 発表標題 Don't waste clean thinking on dirty enzymes
3. 学会等名 Research Meeting on Cell Dynamics (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮西正憲
2. 発表標題 長期造血幹細胞は“究極の未来医療”を創出できるのか？
3. 学会等名 理研イブニングセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮西正憲
2. 発表標題 長期造血幹細胞純化が拓く新たな造血幹細胞研究
3. 学会等名 原医研セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 造血幹細胞における自己複製能関連遺伝子のスクリーニング方法および当該遺伝子の使用方法	発明者 宮西正憲	権利者 ネクスジェン株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、Z0001-1563	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----