

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21612

研究課題名(和文)完全無タンパク質条件下における造血幹細胞の培養システムの確立

研究課題名(英文) Establishment of culture system for hematopoietic stem cells under completely protein-free conditions

研究代表者

山崎 聡 (Yamazaki, Satoshi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50625580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体内の骨髄に存在する造血幹細胞(HSC)を血清成分やアルブミンをポリヴィニルアルコール(PVA)に代替えることを発見し生体外により増幅可能にした。このPVAの発見により培養液中のタンパク質の酸化や劣化、さらには精製アルブミンやサイトカインに微量に含まれる不純物が造血幹細胞の未分化性を阻害していることが明らかになった。これらの実験結果から申請者はHSCの機能や増幅力を低下させないためには完全な無タンパク質培養条件の構築が必要不可欠であると考えた。本研究期間内に我々は生体内に存在する造血幹細胞を完全無タンパク質条件化により培養することで長期間の幹細胞性維持を可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は造血幹細胞の増幅率を現行の培養システムの10倍もしくは100倍以上向上させる目的は勿論であるが、培養条件にはタンパク質が一切存在しない完全化学物質で構成させた環境下において達成することが大きな目標であった。一方で非常にチャレンジングであった。しかし、本研究は成功し細胞治療の研究分野へ波及することになり世間一般的には波紋や期待度は大きいと言える。

研究成果の概要(英文)：The discovery that serum components and albumin can be replaced by polyvinyl alcohol (PVA) for hematopoietic stem cells (HSCs) in bone marrow in vivo has made it possible to amplify HSCs ex vivo. The discovery of PVA revealed that oxidation and degradation of proteins in the culture medium, as well as impurities contained in trace amounts in purified albumin and cytokines, inhibit the undifferentiated nature of HSCs. Based on these experimental results, the applicant considered that it is essential to establish complete protein-free culture conditions in order to prevent the reduction of the function and amplification of HSCs. During the course of this study, we were able to maintain stemness for a long period of time by culturing HSCs in vivo under complete protein-free conditions.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：無タンパク質培養 造血幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

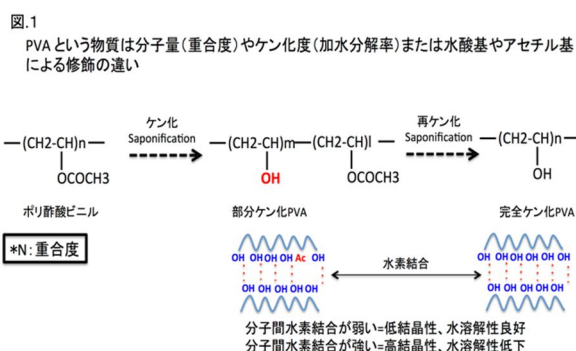
2019年に本研究代表者である山崎は生体内の骨髄に存在する造血幹細胞を血清成分やアルブミンをいわゆる液体糊の主成分であるポリヴィニルアルコール(PVA)に代替することを発見し生体外により増幅可能にした(Wilkinson et al., Nature 2019)。このPVAの発見により培養液中のタンパク質の酸化や劣化、さらには精製アルブミンやサイトカインに微量に含まれる不純物が造血幹細胞の未分化性を阻害していることが明らかになった。これらの実験結果から研究代表者は造血幹細胞の機能や増幅力を低下させない為には完全な無タンパク質培養条件の構築が必要不可欠であると考えた。そのような研究結果と仮定から、研究代表者は生体内に存在する造血幹細胞(HSC)を完全無タンパク質条件下により培養することで長期間の幹細胞性維持を目指すと共に、大幅な増幅技術開発という提案するに至った。

2. 研究の目的

造血幹細胞を生体外で未分化性を維持するためには、様々な細胞ストレスからの回避が必須であるという考えが根本に存在する。その結果、培養中に含まれるタンパク成分の劣化や不純物が酸化してしまい造血幹細胞の未分化性維持を阻害しているのではと考えた。実際に研究代表者はアルブミンタンパク質をPVAに置き換えることにより造血幹細胞の未分化性維持は非常に向上し、さらには、2ヶ月以上も幹細胞性を維持したまま培養が可能になったことを証明している。現在では細胞内のシグナル伝達分子を活性化する化合物など存在することで無タンパク培養系における造血幹細胞培養が可能であると推測される。これらの培養技術の成功から非常に低コストである培養系を確立し、かつ造血幹細胞がどのようなシグナルの活性化により分化誘導や幹細胞性維持のバランスを保っているかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

血清成分を用いることなくHSCを培養可能な技術を有している。しかし、HSCの細胞分裂を誘導するためにはStem Cell Factor(SCF), Thrombopoietin(TPO), Insulin(Ins), Transferrin(Tf)という4つの増殖因子が必須である。この4つの増殖因子を代替する化合物を同定するために研究代表者は3ステップによるスクリーニング系により目的を達成した。1次スクリーニングとして研究代表者はマウスHSCを用いて増幅誘導可能かの有無により評価を行った。具体的には、4因子マイナス(-)1因子の培地を作成し基礎培養液としてはPVAを用いたタンパク質を全く添加していない培養液を用い、その培地へ化合物ライブラリーを加えHSCを1週間培養する。その際にHSCからの細胞増殖が5倍以上であった化合物を陽性とし、2次スクリーニングへの移行対象物とした。2次スクリーニングでは増殖因子を用いずに全て化合物によりHSCの細胞増殖率を1次スクリーニングの評価方法と同様に解析した。候補分子と組み合わせを同定した。一



方で PVA は重合度とケン化度の違いにより性質が変化し低分子化合物との相性や反応を左右することが懸念されていることから、異なる PVA を用いた培養条件下においても同様のスクリーニングを実施した。

細胞増殖の評価系によるスクリーニングによって同定された化合物を用いて HSC を 1 週間培養し、その後、放射線照射したマウスへ培養された HSC を移植した。HSC を移植されたマウスから経時的に末梢血を採取して化合物で培養された HSC の骨髄再構築能や生着能をフローサイトメーターにより評価した。一方で全く生着が認められない化合物群も存在したことから、HSC の性質を維持したまま培養される化合物群と幹細胞性は維持せず細胞分化の方向へ誘導する化合物群が明らかになった。

さらに、長期培養系と限界希釈法また 1 細胞培養増幅系により増幅した細胞を放射線照射したマウスに移植し解析する評価系により HSC がどの程度の期間培養可能であり、何倍増幅したかを定量的かつ詳細に明らかにした。後者に関しては培養後に増殖した細胞を対象に 1 細胞 RNAseq を行い分化してきた細胞がどのような細胞なのかを遺伝子発現レベルで解析をおこなった。

以上の 3 ステップにより本研究課題である完全無タンパク質培養方法の確立により長期間の幹細胞性維持と大幅な増幅技術開発という研究目的を達成した。

4. 研究成果

本研究により化学物質がタンパク質の機能を代替可能な大きな能力を有していることが明らかになり、化学物質（化学）と生物学の融合が加速化された。さらに、2021 年には Nature communications に

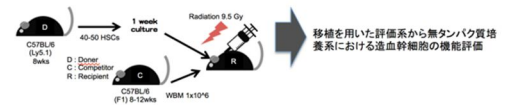
化合物を用いた造血幹細胞の増幅システムを用いた論文を報告した(Ochi et al, 2021)。

図.2

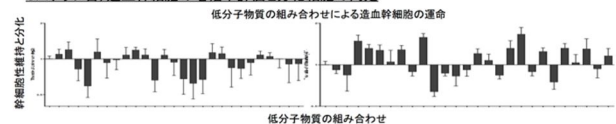
1ステップ目)造血幹細胞の増幅評価系によるスクリーニング



2ステップ目)造血幹細胞の未分化性維持による評価



3ステップ目)造血幹細胞の増幅率評価と分化細胞の同定



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Usui J, Yaguchi M, Yamazaki S, Takahashi-Kobayashi M, Kawamura T, Kaneko S, Seshan SV, Ronco P, Yamagata K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Transcription factor 21 expression in injured podocytes of glomerular diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 11516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68422-3.	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 該当する
1. 著者名 Izawa K, Yamazaki S, Becker HJ, Bhadury J, Kakegawa T, Sakaguchi M, Tojo A.	4. 巻 89
2. 論文標題 Activated HoxB4-induced Hematopoietic Stem Cells from Murine Pluripotent Stem Cells via Long-Term Programming	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp Hematol	6. 最初と最後の頁 68-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exphem.2020.08.003.	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 該当する
1. 著者名 Sato R, Reuter T, Hiranuma R, Shibata T, Fukui R, Motoi Y, Murakami Y, Tsukamoto H, Yamazaki S, Liu K, Saitoh SI, Latz E, Miyake K.	4. 巻 32
2. 論文標題 The impact of cell maturation and tissue microenvironments on the expression of endosomal Toll-like receptors in monocytes and macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Immunol	6. 最初と最後の頁 785-798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa055.	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 該当する
1. 著者名 Omori S, Wang TW, Johmura Y, Kanai T, Nakano Y, Kido T, Susaki EA, Nakajima T, Shichino S, Ueha S, Ozawa M, Yokote K, Kumamoto S, Nishiyama A, Sakamoto T, Yamaguchi K, Yamazaki S,	4. 巻 32
2. 論文標題 Generation of a p16 Reporter Mouse and Its Use to Characterize and Target p16high Cells In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Metab	6. 最初と最後の頁 814-828
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cmet.2020.09.006.	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 該当する

1. 著者名 Zhong C, Kayamori K, Koide S, Shinoda D, Oshima M, Nakajima-Takagi Y, Nagai Y, Mimura N, Sakaida E, Yamazaki S, Iwano S, Miyawaki A, Ito R, Tohyama K, Yamaguchi K, Furukawa Y, Lennox W, Sheedy J, Weetall M, Iwama A.	4. 巻 111
2. 論文標題 A. Efficacy of the Novel Tubulin Polymerization Inhibitor PTC-028 for Myelodysplastic Syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 4336-4347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14684.	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 該当する

1. 著者名 Kayamori K, Nagai Y, Zhong C, Kaito S, Shinoda D, Koide S, Kuribayashi W, Oshima M, Nakajima-Takagi Y, Yamashita M, Mimura N, Becker HJ, Izawa K, Yamazaki S, Iwano S, Miyawaki A, Ito R, Tohyama K, Lennox W, Sheedy J, Weetall M, Sakaida E, Yokote K, Iwama A.	4. 巻 5
2. 論文標題 DHODH inhibition synergizes with DNA-demethylating agents in the treatment of myelodysplastic syndromes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Adv	6. 最初と最後の頁 438-450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020001461.	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 該当する

1. 著者名 Kuribayashi W, Oshima M, Itokawa N, Koide S, Nakajima-Takagi Y, Yamashita M, Yamazaki S, Rahmutulla B, Miura F, Ito T, Kaneda A, Iwama A.	4. 巻 218
2. 論文標題 Limited rejuvenation of aged hematopoietic stem cells in young bone marrow niche	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Exp Med	6. 最初と最後の頁 e20192283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20192283.	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 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山崎 聡
2. 発表標題 造血幹細胞の生体外増幅
3. 学会等名 日本再生医療学 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎 聡
2. 発表標題 細胞学研究の最先端
3. 学会等名 第38回日本ヒト細胞学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎 聡
2. 発表標題 造血幹細胞の増幅の可能性
3. 学会等名 第27回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎 聡
2. 発表標題 生体外におけるヒトiPS細胞由来造血幹細胞の増幅技術開発
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎 聡
2. 発表標題 造血幹細胞の増幅を用いた完全なるゲノム編集とその応用
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎 聡
2. 発表標題 造血幹細胞の増幅とぞの技術開発で見えてくる未来
3. 学会等名 日本化学会 101 春季年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------