様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　５ 月 ２５ 日現在

機関番号：１４５０１
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2021～2022
課題番号：２１Ｋ２０６６９

研究課題名（和文）高純度長期造血幹細胞単離技術を用いた自己複製能制御遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of genes regulating self-renewal capacity using highly purified long-term hematopoietic stem cell isolation technology

研究代表者
酒巻　太郎（Sakamaki, Taro）

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：４０９０７９９５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　2,400,000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で、生涯に渡り全ての血液細胞を供給し続ける。しかし、造血幹細胞がどのようにその機構を維持しているかは、ほとんど明らかとなっていない。私達は、独自に開発した造血幹細胞レポーターシステムを用いることで、造血幹細胞の自己複製能が制御される機構の一端を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
造血幹細胞は、半世紀以上に渡り造血幹細胞移植に代表される血液疾患の治療に応用されてきたが、生体内で、どのように機能し治療に関与しているか不明な点は依然多い。そこで、造血幹細胞の細胞機能を理解することは、治療成績の向上や新規治療法開発、造血機能の破綻により生じる血液疾患の病態理解に発展する可能性が高い。本研究では、造血幹細胞の主機能の一つである自己複製能を制御する機構の一端を明らかにしており、この結果が造血幹細胞を用いた治療法の発展に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Hematopoietic stem cells (HSCs), defined as cells possessing both self-renewal capacity and multipotency, regulate blood production throughout life. However, how HSCs maintain this mechanism is largely unknown. Using our originally developed HSC reporter system, we have elucidated one aspect of the mechanism by which the self-renewal capacity of HSCs is regulated.

研究分野：血液学

キーワード：長期造血幹細胞　Hoxb5　自己複製能

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

造血幹細胞は、自己複製能と多分化能を有する血液幹細胞である。1988 年に造血幹細胞分画の濃縮が可能であることが初めて報告されて以来（Spangrude et al. *Science*, 1988）、最も研究が進んできた幹細胞研究分野である。しかし、造血幹細胞研究の根本である『生体内でどのように造血幹細胞が維持されるか？』、特に自己複製能の制御機構は、ほとんど明らかにされていない。造血幹細胞の希少性（骨髄有核細胞１０万細胞に１細胞）以外に、細胞表面マーカーで規定される造血幹細胞分画には長期に渡り自己複製能を有する長期造血幹細胞と一過性にしか有さない短期造血幹細胞と少なくとも２種類の自己複製能が異なる細胞分画が含まれていることが古くから指摘されており（Morrison & Weissman. *Immunity*, 1994）、両細胞集団が混在した状態で自己複製能の解析が行われてきたことが大きな障害となっていた。これらの課題を解決するため、私達の研究グループは、造血幹細胞分画の中で長期造血幹細胞のみに発現している遺伝子として Hoxb5 を同定した（Miyanishi et al. *Nature*, 2016）。さらに、Hoxb5 発現を識別可能なレポーターマウスを作製することで、長期造血幹細胞と短期造血幹細胞を分離することに初めて成功した。この結果、長期造血幹細胞と短期造血幹細胞の細胞学的性質や遺伝子発現を個別かつ正確に解析することが初めて可能となったため、長期造血幹細胞に特徴的な自己複製能の分子機構解明を本研究の目標とした。

２．研究の目的

本研究の目的は、自己複製能の強い長期造血幹細胞特異的に発現している遺伝子群に対して網羅的な機能解析を行い、造血幹細胞が持つ自己複製能に関与する遺伝子（群）を同定することで、自己複製能の分子機構解明を進展することにある。

３．研究の方法

（１）長期造血幹細胞のトランスクリプトーム解析

これまで $Lineage^{-}c\text{-}Kit^{+}Sca\text{-}1^{+}Flk2^{-}CD34^{-/lo}CD150^{+}$ で定義されてきた造血幹細胞集団を、Hoxb5 の発現を指標とすることで、自己複製能の強弱に応じ、長期造血幹細胞と短期造血幹細胞に前方視的に分類可能となった。そこで、自己複製能が長期に維持される長期造血幹細胞である Hoxb5 陽性造血幹細胞のトランスクリプトーム解析を行い、長期造血幹細胞特異的な遺伝子群を解析した。

（２）in vitro 手法による長期造血幹細胞特異的遺伝子群の網羅的機能解析

造血幹細胞の機能解析は骨髄移植を用いた手法がゴールデンスタンダードであるが、最低でも８ヶ月の期間を要するため、網羅的解析には不向きである。そこで、これまでに開発してきた in vitro スクリーニング法を応用した。（１）で抽出した遺伝子群を対象に、短期造血幹細胞である Hoxb5 陰性造血幹細胞にレンチウイルスを用い遺伝子導入して機能解析を実施した。遺伝子導入後に、in vitro 培養下で分化の変化を指標として機能スクリーニングを行った。

（３）骨髄移植実験による二次スクリーニング

（２）の in vitro スクリーニングで分化の変化が認められた遺伝子を対象に、Hoxb5 陰性造血幹細胞に遺伝子導入後、サポーティング細胞を加えた競合的骨髄移植実験を実施した。骨髄移植後

は、フローサイトメーターを用いて４週間毎に末梢血を解析し、最も寿命の短い好中球を指標に造血能変化の有無を評価した。

４．研究成果

（１）長期造血幹細胞のトランスクリプトーム解析

長期造血幹細胞である Hoxb5 陽性造血幹細胞と短期造血幹細胞である Hoxb5 陰性造血幹細胞の遺伝子発現を比較すると、遺伝子発現パターンは極めて類似している（Sakamaki et al. *BBRC*, 2021)。そこで、生物学的差異を検出するため、GSEA を用いて評価すると、細胞周期に関連する遺伝子セットで差が認められることが分かった（図１)。そこで、既報から細胞周期に関連する遺伝子やホメオボックス遺伝子を中心に、造血幹細胞における機能解析を進めていくこととした。

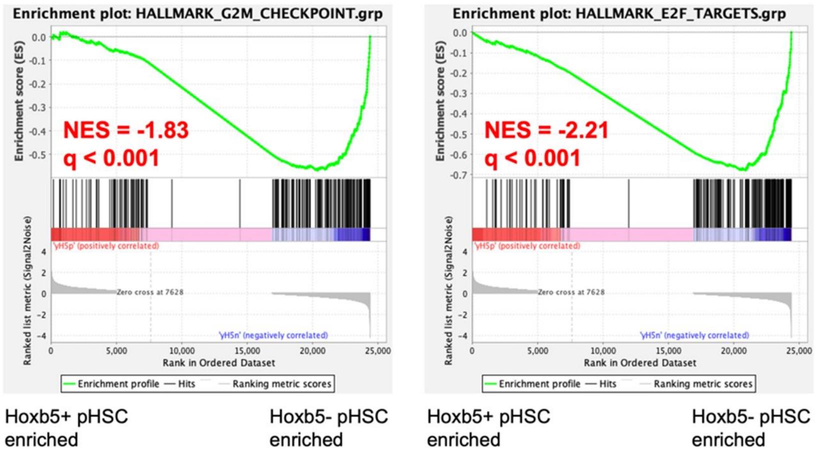

図１：長期造血幹細胞と短期造血幹細胞に発現している遺伝子群の比較

マウス骨髄細胞より長期造血幹細胞と短期造血幹細胞を単離、ライブラリーを調整してRNA seq 解析を実施した。

（２）in vitro 手法による長期造血幹細胞特異的遺伝子群の網羅的機能解析

複数遺伝子の機能解析を行うためには、短期間で評価可能な実験系が必要となる。そこで、in vitroでの分化培養系を用いた。造血幹細胞の機能が、自己複製能と多分化能に大別されることに着目し、造血幹細胞の増殖速度や分化の変化を検出することで、造血幹細胞の機能変化が捉えられると考え、解析を進めた。その結果、一部の遺伝子を遺伝子導入した場合のみ、未分化細胞分画であるLKS分画の割合が増加することやコロニーの形成能が緩やかであることを明らかとし、造血幹細胞の細胞機能に変化をもたらす可能性を示した（図２)。

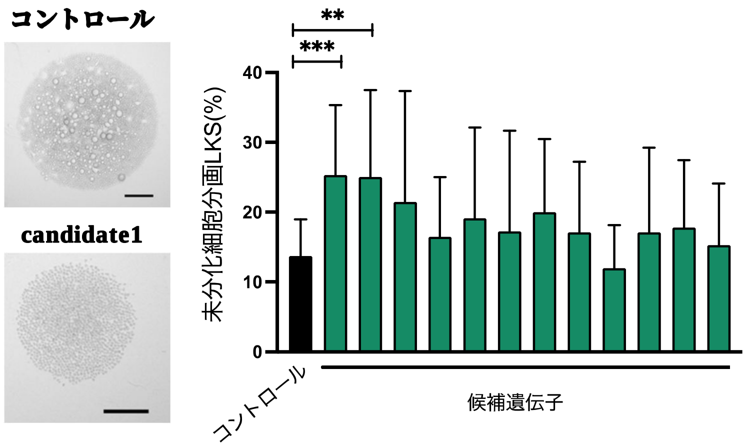

図２：in vitro 培養系を用いた遺伝子機能解析

（左図）特定の遺伝子を導入した場合のみ、コロニー増殖速度が緩やかになる(scale bar; 200μm)。

（右図）特定の遺伝子を導入すると、維持される未分化細胞（LKS）の割合が高くなる。

（３）骨髄移植実験による二次スクリーニング

（２）のスクリーニングで選定した遺伝子群に対して、短期造血幹細胞に遺伝子導入した上、骨髄移植実験を行っている。長期に渡り末梢血解析を継続すると、一部の遺伝子を遺伝子導入した場合のみ、造血が長期に継続することが明らかとなった（図３）。この結果は、同遺伝子が自己複製能に関与する可能性を示唆するものである。本研究期間内に完遂することはできなかったが、二次移植を含めた機能解析実験を引き続き実施して、同遺伝子の機能解析を目指す。

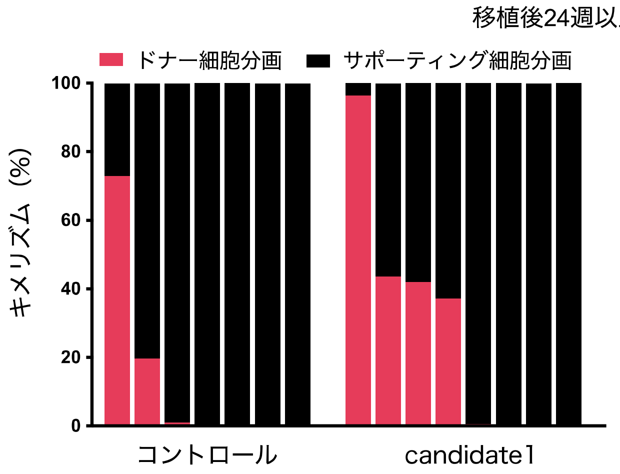

図 3：候補遺伝子が自己複製能に及ぼす影響の評価

候補遺伝子を遺伝子導入した短期造血幹細胞を、致死的放射線照射後のマウスに移植した。コントロールに比し造血が維持され、自己複製能が長期に維持されることが示唆されている。

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　0件）

１．著者名 Katsuyuki Nishi, Taro Sakamaki, Kay Sadaoka, Momo Fujii, Akifumi Takaori-Kondo, James Y. Chen, Masanori Miyanishi.	４．巻 196
２．論文標題 Identification of the minimum requirements for successful haematopoietic stem cell transplantation	５．発行年 2022年
３．雑誌名 British Journal of Haematology	６．最初と最後の頁 711-723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.17867	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 Nishi, K, Nagasaka A, Sakamaki T, Sadaoka K, Miyanishi M	４．巻 -
２．論文標題 Isolation Method for Long-Term and Short-Term Hematopoietic Stem Cells	５．発行年 2023年
３．雑誌名 J. Vis. Exp	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/64488	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 －

〔学会発表〕　計4件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 Taro Sakamaki, Katsuyuki Nishi, Kay Sadaoka, Momo Fujii, Masanori Miyanishi
２．発表標題 The cell fate of HSCs is regulated flexibly by hematopoietic stress
３．学会等名 第83回日本血液内科学会
４．発表年 2021年

１．発表者名 Katsuyuki Nishi, Taro Sakamaki, Kevin Kao, Kay Sadaoka, Momo Fujii, Akifumi Takaori-Kondo, Masanori Miyanishi
２．発表標題 Alteration of the short/long-term hematopoietic stem cell ratio causes lineage-biased hematopoiesis
３．学会等名 第83回日本血液内科学会
４．発表年 2021年

1．発表者名 酒巻 太郎，西 克幸，定岡 恵，長坂 明臣，宮西 正憲
2．発表標題 Varying hematopoietic stress causes heterogeneous cell fates within the HSC compartment
3．学会等名 第84回日本血液内科学会
4．発表年 2022年

1．発表者名 西 克幸，酒巻 太郎，定岡 恵，長坂 明臣，宮西 正憲
2．発表標題 The minimal requirement for successful hematopoietic stem cell transplantation in autologous setting
3．学会等名 第84回日本血液内科学会
4．発表年 2022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