

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16334

研究課題名（和文）高精度造血幹細胞分離技術に基づくストレス造血制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the regulatory mechanism of stress hematopoiesis based on high-sensitive 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） 3,500,000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。抗癌剤治療等の外的影響で急速に血液細胞が減少すると、不足した血液細胞を補うためにストレス造血が惹起される。ストレス造血が繰り返し生じることは、血液腫瘍や造血不全発症のリスクになる可能性が示唆されており問題視される。しかし、ストレス造血の詳細な機序は未だ解明されていない。今回、私達は、独自に開発したシステムを用いることで、ストレス造血を制御す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、急激な外的変化（ストレス）に対してストレス造血を行うことで造血系の恒常性を維持する。一方で、ストレス造血が繰り返し生じることは、血液腫瘍や造血不全発症のリスクになる可能性が示唆されている。そのため、ストレス造血が制御される機構を明らかにすることは、造血器疾患を予防する上で非常に重要である。本研究では、造血ストレスが造血幹細胞に及ぼす機能変化を明らかとしストレス造血を制御する機構の一端を示した。この結果は、造血器疾患の予防や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) are defined as cells having self-renewal capacity and multipotency. HSCs regulate blood production throughout life. Rapid depletion of blood cells, such as through anticancer therapy, triggers stress hematopoiesis as a compensatory mechanism. However, the repeated occurrence of stress hematopoiesis poses potential risks, including the development of hematological malignancies and hematopoietic failure. Despite these concerns, the mechanism underlying stress hematopoiesis has not yet been elucidated. In this study, we have developed an original system to elucidate one aspect of the regulatory mechanism governing stress hematopoiesis.

研究分野：血液学

キーワード：造血幹細胞 造血ストレス 細胞分化

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、生涯に渡り血液細胞を供給し続ける。抗癌剤治療等により急速に血液細胞が減少すると、一過的に急激な造血反応が起こり、失われた血液細胞が補填される。このような恒常性を維持するため、外的変化（ストレス）に対応した造血反応は“ストレス造血”として知られている。ストレス造血が繰り返し生じることは、血液腫瘍や造血不全発症のリスクになる可能性が示唆されており問題視される。そのため、造血ストレスが造血幹細胞にどのようにして、どのような影響を及ぼしているかを明確に理解することは、造血器疾患を予防する上で重要である。しかしながら、表面抗原で規定される造血幹細胞分画は機能的に不均一な細胞集団から構成されており、ストレスに反応する応答の仕方も多様なため正確に解析することが困難である。そこで、私達の研究グループは、上述の問題を解決するため、独自に開発したレポーターシステムを用いることで、ストレス反応への抵抗性の違いを指標にした造血幹細胞分画の細分化法を確立した (Sakamaki et al. *BBRC*, 2021)。この手法を用いることで、造血幹細胞分画をストレスへの抵抗性の強弱に応じ、機能的に均一な細胞集団として単離することに成功している。そこで、このシステムを応用し、ストレスへの反応の強弱に応じ分類した造血幹細胞分画を機能解析することで、造血ストレスが造血幹細胞に及ぼす細胞学的性質や遺伝子発現の変化を高感度に解析することを目標とした。

2. 研究の目的

本研究は、ストレス造血時に造血幹細胞に生じる細胞機能や細胞分化の変化を解析し、ストレス造血を制御する分子ネットワークの詳細を解明することを目指している。これまでストレス造血時に造血幹細胞内でどのような遺伝子制御がなされているかは明らかとされていない。そこで、ストレスへの反応性が高い造血幹細胞群の挙動を足掛かりとして、造血幹細胞の主機能である自己複製能や多分化能に造血ストレスが及ぼす変化を評価する。その結果を元に、ストレス造血を制御する遺伝子群のスクリーニング・同定を目的とした。

3. 研究の方法

造血幹細胞分画は、Lineage⁻c-Kit⁺Sca-1⁺Flk2⁻CD34^{low}CD150⁺で定義されてきたが、機能的に不均一な細胞集団で構成されていることが知られている。ストレス造血の詳細な機序が解明困難な理由として、既存の方法では多様なストレス応答をする造血幹細胞集団の混在した応答結果を観察していることが一因と考えられる。そこで、私達の研究グループは、まず、造血ストレスへの抵抗性の強弱に応じた造血幹細胞分画の細分化を試みた。独自開発したレポーターシステムを用いることで、Hoxb5 発現量の多寡が造血幹細胞のストレス抵抗性の強弱と相関していることを見出している (Sakamaki et al. *BBRC*, 2021)。ストレス造血が行われる状況下では、造血幹細胞分画内の Hoxb5 陽性細胞群が選択的に濃縮・増殖する。この結果は、Hoxb5 発現量に応じて造血幹細胞分画を単離することで、造血ストレスへの反応性に応じ細胞集団を均一化し解析可能であることを意味する。

本研究では、まず、ストレス状況下で造血幹細胞に生じる細胞機能変化を、Hoxb5 陽性造血幹細胞群を用いて検証する。そのために、強い造血ストレスがかかる造血幹細胞移植を実施する。造血ストレスが造血幹細胞に及ぼす影響を解析するため、1細胞あたりに異なる造

血ストレス量を負荷し比較検討する。造血幹細胞の主機能である自己複製能・多分化能を評価するため、末梢血中のドナー細胞由来の血液分画をフローサイトメトリーで解析していく。続いて、Hoxb5 陽性造血幹細胞にストレス造血を制御する遺伝子群が特異的に発現していると仮定し、遺伝子群の機能解析を行う。造血幹細胞の機能解析は造血幹細胞移植がゴールドスタンダードであるが、時間を要するため短時間で表現型を検出可能な *in vitro* 培養でスクリーニングを行う。しかし、*in vitro* 培養下で造血幹細胞は自己複製能を長期に維持できず、速やかに分化し始める。そのため、細胞機能変化を検出できない可能性があるため、条件検討を行い最適な培養条件を確立する。最後に、Hoxb5 陽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行う。遺伝子導入後、*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実施する。

4. 研究成果

(1) 造血ストレスは造血幹細胞の細胞分化に影響する

造血ストレスが造血幹細胞の細胞機能に及ぼす影響を解析するため、造血ストレスの強い造血幹細胞移植実験を実施した。加えて、造血ストレス量に応じた変化を解析するため、造血幹細胞 1 細胞あたりに負荷される造血ストレス量を比較検討した。末梢血中の血液分画をフローサイトメトリーで解析し自己複製能・多分化能を評価した。その結果、移植後 4 週時点で末梢血解析を行うと、ストレスの高い少量細胞移植群では、自己複製能の指標となる好中球分画が検出されなかった (図 1 左)。しかしながら、骨髓解析を実施すると LKS 分画内で造血幹細胞分画も検出され、自己複製能は維持されていた (図 1 右)。この結果は、強い造血ストレスは、自己複製能よりも、細胞分化に影響を及ぼすことを示唆している。

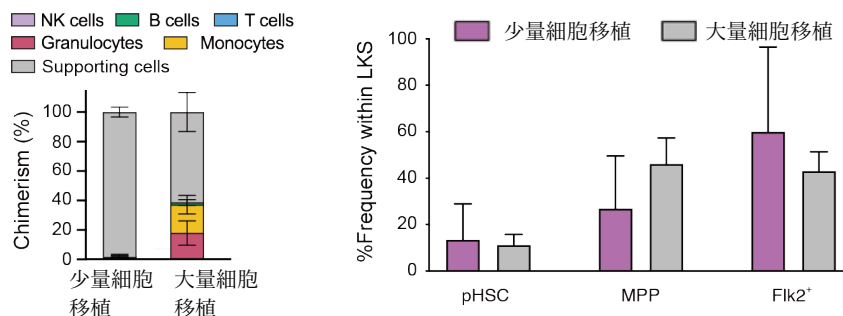
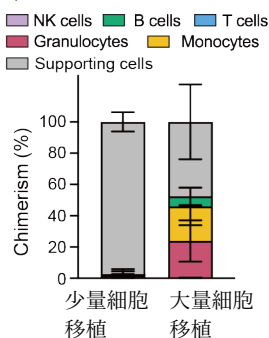


図 1 : 造血幹細胞移植による造血ストレスが Hoxb5 陽性造血幹細胞に及ぼす影響

マウス骨髓細胞より Hoxb5 陽性造血幹細胞を単離、サポーター細胞 2×10^5 細胞とともに異なる細胞数を移植した。

(2) 造血ストレスが造血幹細胞の細胞分化に及ぼす影響は可逆的である



造血ストレスが造血幹細胞に及ぼす影響が不可逆的であるかを検証するため、造血ストレスを軽減する条件で二次移植を実施した。その結果、造血ストレスを軽減すると、細胞分化が正常化することが明らかとなった (図 2)。このことは、造血幹細胞の有する分化能は必ずしも固定されたものではなく、外的ストレスに応じて柔軟に変化している可能性を示している。

図 2 : 造血幹細胞の細胞分化は可逆的に変化する

少量の Hoxb5 陽性造血幹細胞を移植後、ドナーマウスの骨髓から造血幹細胞分画を単離、サポーター細胞 2×10^5 細胞とともに異なる細胞数を二次移植した。

(3) 造血幹細胞の機能変化を検出可能な in vitro 培養系を確立する

造血幹細胞移植による造血幹細胞の機能解析は、長期間のフォローを要するため、スクリーニングには不向きである。そのため、in vitro 培養で機能解析を実施する。一方で、in vitro 培養では自己複製能が消失しやすいため、機能解析の精度を維持することが重要である。そこで、自己複製能が比較的長期に維持される条件を明らかとするため、未分化細胞分画 LKS の割合を指標に条件検討した。その結果、培養における至適サイトカイン濃度を明らかとしスクリーニングに適した培養条件を確立した (図3)。

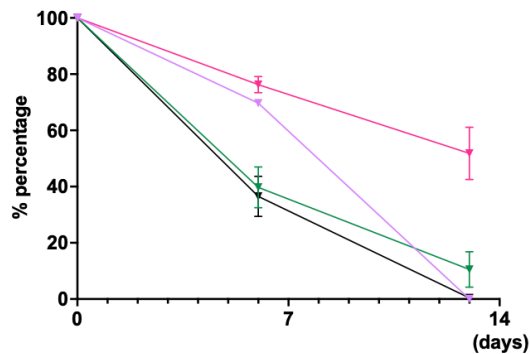


図3 : in vitro 培養系を用いた機能解析

未分化細胞分画 LKS の割合を指標として、最適なサイトカイン濃度を条件検討した。

SCF 12.5ng/mL, TPO 12.5ng/mL (赤線) において LKS の割合が最も高くなる。

(4) in vitro 培養系を用いた遺伝子機能解析

Hoxb5 陽性造血幹細胞特異的に発現している遺伝子群を、レンチウイルスを用い Hoxb5 陽性造血幹細胞に遺伝子導入して機能解析を実施した。遺伝子導入後は、(3) で確立した条件で解析を行った。その結果、一部の遺伝子を遺伝子導入した場合のみ、細胞培養が長期維持可能で、かつ、未分化細胞分画の割合が高く維持されることを明らかにした (図4)。この結果は、同遺伝子が造血幹細胞の細胞機能制御に関与する可能性を示唆するものである。本研究期間中の完遂には至らなかったが、造血ストレス負荷時に同遺伝子を発現させることで、造血幹細胞の細胞機能が変化・強化されるか造血幹細胞移植を引き続き実施して、さらなる機能解析を行う。

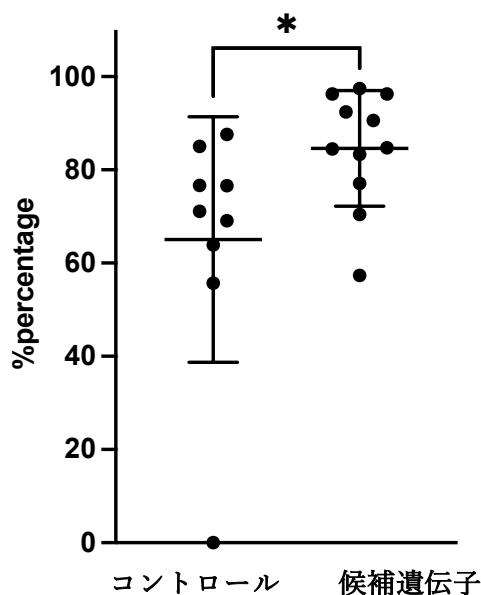


図4 : Hoxb5 陽性造血幹細胞特異的遺伝子の機能解析

マウス骨髄細胞より Hoxb5 陽性造血幹細胞を単離、Hoxb5 陽性造血幹細胞特異的遺伝子を過剰発現し in vitro 培養開始 28 日後。未分化細胞分画 LKS 中の CD150 陽性細胞の割合を比較した。(* ; $p < 0.05$)

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 Nishi, K, Nagasaka A, Sakamaki T, Sadaoka K, Miyanishi M	4. 巻 195
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 -

1. 著者名 Katsuyuki Nishi, Taro Sakamaki, Akiomi Nagasaka, Kevin S. Kao, Kay Sadaoka, Masahide Asano, Nobuyuki Yamamoto, Akifumi Takaori-Kondo, Masanori Miyanishi	4. 巻 -
2. 論文標題 Alteration of long and short-term hematopoietic stem cell ratio causes myeloid-biased hematopoiesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	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） 10.7554/eLife.95880.1	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 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回日本血液学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katsuyuki Nishi, Taro Sakamaki, Akiomi Nagasaka, Kay Sadaoka, Masanori Miyanishi
2. 発表標題 Purification of hematopoietic stem cells reveals the mechanism of myeloid-biased hematopoiesis
3. 学会等名 第85回日本血液学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masanori Miyanishi, Le An, Akiomi Nagasaka, Shigeyuki Tsukamoto, Katsuyuki Nishi, Taro Sakamaki
2. 発表標題 A new multilayer analysis method for investigating the human hematopoietic system
3. 学会等名 第85回日本血液学会
4. 発表年 2023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