

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25713037

研究課題名(和文)造血幹細胞の未分化性を維持する人工骨髄微小環境の構築

研究課題名(英文) Construction of artificial bone marrow microenvironment that maintains undifferentiated state of hematopoietic stem cells

研究代表者

山崎 聡 (Yamazaki, Satoshi)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：50625580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,600,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞は骨髄微小環境の中で未分化性を維持されている。しかし、我々は未だに造血幹細胞の制御を完全には可能にしていない。我々は、骨髄内におけるアミノ酸濃度の不均一性を見出し、各アミノ酸と造血幹細胞の機能について解析を進めた。その結果、バリン欠損の培養条件下では造血幹細胞は速やかに未分化性を消失し、バリン欠損飼料を長期間マウスに与えることで生体内の造血幹細胞の減少が認められた。さらに、バリン欠損飼料をレシピエントマウスに与える事で放射線照射を行わず造血幹細胞移植が成立するという興味深い結果が得られ、米国科学雑誌Scienceに論文を受理された(Taya et al., 2016)。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells are maintained undifferentiated in the bone marrow microenvironment. However, we have not yet fully enabled the control of hematopoietic stem cells. We found heterogeneity of amino acid concentration in bone marrow, and analyzed function of each amino acid and hematopoietic stem cell. As a result, the hematopoietic stem cells quickly disappeared under the culturing condition of valine deficiency, and the reduction of hematopoietic stem cells in vivo was confirmed by giving the valine-deficient diet to the mouse for a long time. In addition, interesting results were obtained that transplantation of hematopoietic stem cells was established without irradiation by giving valine-deficient diet to recipient mice, and the article was accepted in Science Journal Science of the United States of America (Taya et al., 2016).

研究分野：血液内科学、幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 幹細胞ニッチ

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は骨髄中のニッチという微小環境に G<sub>0</sub> 期 (休眠状態) で存在し、対称分裂と非対称分裂を行いながら血液前駆細胞を生体内に供給していると考えられている。造血幹細胞を用いた臨床応用は歴史が古く、再生医療の先駆けでもある。しかし、造血幹細胞は ES、iPS 細胞のように半永久的に未分化性を維持したまま *in vitro* の条件下で培養するとは困難である。そのため、ドナーにおける負担が必要不可欠な状況である。申請者は約 5 年前より造血幹細胞そのものではなく、造血幹細胞が存在する骨髄微小環境を構築している細胞を同定することにより *in vitro* による造血幹細胞の培養法を確立出来るのではないかと考え、研究を続けてきた。申請者は極わずかな細胞数しか分離できない造血幹細胞を対象とした細胞内のタンパク質の局在やリン酸化を定量的に解析する技術を開発することにより、骨髄中に存在する造血幹細胞の休眠状態を分子レベルで定義づけた (Yamazaki et al., *EMBO J*, 2006)。次に申請者はこの技術を利用して、骨髄中において造血幹細胞を休眠状態に誘導するタンパク質が TGF-β であることを明らかにした (Yamazaki et al., *Blood*, 2009)。さらに、潜在型 TGF-β を活性化させる微小環境こそが造血幹細胞の存在する骨髄微小環境であるという仮説を立て、骨髄組織を定量的に解析する新しい手法を開発することにより、骨髄シュワン細胞が潜在型 TGF-β を活性化させることによって造血幹細胞の細胞周期や休眠状態を制御しているという興味深い事実を明らかにした (Yamazaki et al., *Cell*, 2011)。また、骨髄を構成している細胞や環境を理解することにより、iPS 細胞からテラトーマを利用した機能的な造血幹細胞の誘導等の技術開発にも成功している (Yamazaki et al.,

submitted)。マウスにおいてはドナーとレシピエントを区別する方法として Ly5.1/5.2 システムにより移植後の造血幹細胞の動態を解析できるが、ヒトに関しては困難であった。しかし、ヒトの HLA アリル特異的モノクローナル抗体を作製する技術を開発することにより、ヒト造血幹細胞移植後のドナー細胞の生着率や造血幹細胞の動態を解析することが可能になった (Yamazaki et al., *JIM*, 2009)。この様に申請者はマウスの実験だけではなくヒト造血幹細胞の研究も視野に研究を進めている。申請者がこれまでに蓄積してきた成果と技術をさらに洗練させ、造血幹細胞が存在する骨髄微小環境の詳細を明らかにすることにより、人工骨髄微小環境の作製を目指し、*in vitro* における造血幹細胞の培養系を構築することを最終目的とした。

## 2. 研究の目的

造血幹細胞は骨髄中に存在し、未分化性を保ちつつ生涯にわたり血液細胞を供給する組織幹細胞である。申請者は骨髄中に存在する造血幹細胞の休眠状態を分子レベルで解析を行うことにより、造血幹細胞が線虫や冬眠するリスと同じ機構で休眠状態にあることを明らかにした (Yamazaki et al., *EMBO J*, 2006)。また、造血幹細胞の冬眠状態に維持に TGF-β が重要であること (Yamazaki et al., *Blood*, 2009)、さらに骨髄中の非髓鞘シュワン細胞による TGF-β の活性化が造血幹細胞の休眠状態を誘導することを明らかにした (Yamazaki et al., *Cell*, 2011)。本プロジェクトでは申請者がこれまで報告してきた知見を基に、造血幹細胞を維持する骨髄微小環境の詳細を明らかにすることにより、人工骨髄微小環境を構築し、*in vitro* において造血幹細胞の未分化性を保つ培養法を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 骨髄中の造血幹細胞が存在する場所の特定

造血幹細胞の細胞表面マーカーとしてはモノクローナル抗体を用いることにより多重染色することによりフローサイトメーターにより分離できる。また、Evi1 発現細胞に GFP を発現させることにより 1 カラーでの分離が可能となっている(Kataoka K et al., 2011)。しかし、どちらの方法においても骨髄切片において造血幹細胞を特定することは未だ困難である。申請者は造血幹細胞に特異的かつタンパク質レベルで強い発現を示す分子を同定し、その分子の TVA ノックインマウス、もしくはプロモーター TVA マウスを作製した。TVA タンパクはトリレトロウイルスの受容体であり細胞膜タンパク質であることから抗体を用いて 1 カラーで造血幹細胞を標識できることはもとより、蛍光タンパク質 1 種類に縛られることなく様々なバリエーションで染色可能である。作製したマウスの骨髄切片を TVA 抗体で染色し、定量的に解析することにより、骨髄中における造血幹細胞の場所を明らかにした。さらに、造血幹細胞膜上に TVA を発現することから RCAS(トリレトロウイルスベクター)を用いることにより in vivo における造血細胞特異的遺伝子導入法(RCAS/TVA システム)を確立することが可能である。この方法により shRNA ベクターを造血幹細胞に遺伝子導入することによりインテグリンなどの接着系因子の網羅的なノックダウンシステムが可能となり骨髄微小環境と造血幹細胞との細胞間接着に関連した因子を同定することを目指した。

#### 2) イメージング技術による骨髄環境の三次元解析

現在までに骨髄環境の細胞局在、細胞形、

細胞数を示す解析には、骨髄切片を作製した後、免疫染色しコンフォーカル等の機器により解析してきた。しかし、すべてが二次元であり骨髄環境の極数マイクロの厚さの組織を観察しているにすぎない。申請者は骨皮質と骨髄とを分離し、スケール技術を用いて髄を 3D イメージ化することにより、骨髄環境を広い視点で解析することを目指した。

この方法を構築することにより、造血幹細胞が存在する微小環境の構造が立体的に示した。

#### 3) ヒト骨髄環境の詳細な解析と造血幹細胞の微小環境の同定

マウスを用いた骨髄微小環境の研究は進んでいるが、ヒト骨髄を構成している細胞に関しては未だ不明である。マウスの知見をもとに、ヒト造血幹細胞を維持するヒト骨髄微小環境を構成する細胞集団を明確にした。またヒトにおいては白血病の検体を提供して頂くことで、白血病幹細胞が維持されている骨髄微小環境においても解析した。

#### 4) 循環培養を用いた人工骨髄微小環境の構築

造血幹細胞の培養条件は平面培養が一般である。また、OP9 等のストローマ細胞を用いた共培養系も存在する。しかし、どちらの培養系においても造血幹細胞を半永久的に増殖させることは困難である。申請者は造血幹細胞の未分化性を維持しながら増殖を可能にする骨髄微小環境を構成する数種類の細胞を同定し、その細胞と造血幹細胞の工学的 3D 培養を用いて共培養することにより生体内の骨髄環境を模倣する人工骨髄微小環境を構築した。

### 4. 研究成果

造血幹細胞は骨髄微小環境の中で未分化性

を維持されており、微小環境を構成している細胞や造血を維持する分子が次々と報告されている。しかし、我々は未だに造血幹細胞の制御を完全には可能にしていない。我々は、骨髄内におけるアミノ酸濃度の不均一性を見出し、各アミノ酸と造血幹細胞の機能について解析を進めた。その結果、バリン欠損の培養条件下では造血幹細胞は速やかに未分化性を消失し、バリン欠損飼料を長期間マウスに与えることで生体内の造血幹細胞の減少が認められた。さらに、バリン欠損飼料をレシピエントマウスに与える事で放射線照射を行わず造血幹細胞移植が成立するという興味深い結果が得られ、米国科学雑誌 *Science* に論文を受理された (Taya et al., 2016)。また、これらの知見は白病幹細胞を対象とした治療にも応用できると考えられることから、白血病モデルマウスにおける新規誘導システムの構築を可能にした (Tajima et al., 2017)。さらには、アミノ酸研究から造血幹細胞の培養系に用いる培養液の改良を行うことで *in vitro* における造血幹細胞の維持因子の同定にも成功した (Ieyasu et al., 2017)。以上、平成 28 年度の実績は造血幹細胞研究は再生医療、遺伝子治療のさらなる発展に大きく貢献すると期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Ieyasu A, Ishida R, Kimura T, Morita M, Wilkinson AC, Sudo K, Nishimura T, Oehara J, Tajima Y, Lai CY, Otsu M, Nakamura Y, Ema H, Nakauchi H, Yamazaki S. An All-Recombinant Protein-Based Culture System Specifically Identifies Hematopoietic Stem Cell Maintenance Factors. *Stem Cell Reports*. 2017 Mar 14
2. Tajima Y, Ito K, Umino A, Wilkinson AC, Nakauchi H, Yamazaki S. Continuous cell supply from Krt7-expressing hematopoietic stem cells during native hematopoiesis revealed by targeted in vivo gene transfer method. *Sci Rep*. 2017 Jan 18
3. Sakamoto S, Okeyo KO, Yamazaki S, Kurosawa O, Oana H, Kotera H, Washizu M. Adhesion patterning by a novel air-lock technique enables localization and in-situ real-time imaging of reprogramming events in one-to-one electrofused hybrids. *Biomicrofluidics*. 2016 Oct 27
4. Yuki Taya, Yasunori Ota, Adam C Wilkinson, Ayano Kanazawa, Hiroshi Watarai, Masataka Kasai, Hiromitsu Nakauchi and Satoshi Yamazaki. Depleting dietary valine permits nonmyeloablative mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Science*. Oct 20, 2016
5. Ishida T, Suzuki S, Lai CY, Yamazaki S, Kakuta S, Iwakura Y, Nojima M, Takeuchi Y, Higashihara M, Nakauchi H, Otsu M. Pre-Transplantation Blockade of TNF- $\alpha$ -Mediated Oxygen Species Accumulation Protects Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells*. 2017 Apr;35
6. Koide S, Oshima M, Takubo K, Yamazaki S, Nitta E, Saraya A, Aoyama K, Kato Y, Miyagi S, Nakajima-Takagi Y, Chiba T, Matsui H, Arai F, Suzuki Y, Kimura H, Nakauchi H, Suda T, Shinkai Y, Iwama A. Setdb1 maintains hematopoietic stem and progenitor cells by restricting the ectopic activation of nonhematopoietic genes. *Blood*. 2016 Aug 4
7. Chen JY, Miyanishi M, Wang SK, Yamazaki S, Shnha R, Kao KS, Seita J, Sahoo D, Nakauchi H, Weissman IL.

Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous <sup>本規</sup>perivascular niche. *Nature*. 530(7589):223-7, 2016.

〔学会発表〕（計 3 件）

山崎聡、『アミノ酸バランスにおける造血幹細胞の制御とその応用』学友会セミナー、2016 年 6 月 10 日、医科学研究所

山崎聡、『アミノ酸バランスによる造血幹細胞の制御』SKIP×幹細胞若手の会 Symposium 2016 ~ Integrative Stem Cell Biology for Regenerative Medicine~, 厚生労働省「ヒト幹細胞情報化推進事業」SKIP Seminar・幹細胞若手の会（通称つくしの会）Joint planning、2016 年 9 月 30 日、御茶ノ水トライエッジカンファレンス

山崎 聡、『Valine starvation permits hematopoietic stem cell transplantation without chemoradio- tive myeloablation』第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年 12 月 7 日、沖縄コンベンションセンター

〔図書〕（計 0 件）

特になし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

発明の名称：血液キメラ動物の作成法

発明者：普川一雄、伊藤哲也、上川舞、千代豊、中内啓光、山崎聡、渡部素生

出願人：全国農業協同組合連合会、国立大学法人 東京大学

出願日：2016/6/20

出願番号：PCT/JP2016/068233

出願国：日本

2. 発明の名称：成人 T 細胞白血病リンパ腫を処置するために用いるための組成物およびその製造方法

発明者：中内啓光、石垣知寛、山崎聡、田矢

出願人：国立大学法人 東京大学

出願日：2016/8/5

出願番号：特願 2016-154646

出願国：日本

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

（1）研究代表者

山崎 聡 (Yamazaki, Satoshi)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：50625580