

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08398

研究課題名（和文）造血幹細胞の発生起源となる前駆細胞の同定およびその分化制御シグナルの解明

研究課題名（英文）Identifying hematopoietic stem cell progenitors and their signal requirements

研究代表者

古賀 沙緒里（Morino-Koga, Saori）

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：80590249

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、造血幹細胞の前駆細胞であるHECとpre-HSC-Iを正確に同定し、その分化制御シグナルの解明を目指した。その結果、pre-HSC-Iの同定に成功し、胎生11日目のpre-HSC-IはSCFとトロンボポエチン（TPO）の存在下で造血幹細胞へと分化することが明らかになった。また、胎生10日目のpre-HSC-IはSCFとTPOに加えて、内皮細胞との共培養が必要であることも分かった。さらに、この分化条件で胎生10日目のHECから造血幹細胞への分化誘導にも成功した。よって、本研究では、胎生10日目のHECから造血幹細胞への分化過程において、必要な最小限の環境因子を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞は、様々な血液細胞の元になる細胞である。したがって、造血幹細胞を人工的に作ることができれば、多くの血液疾患の治療につながる。今回、我々は、造血性内皮細胞から造血幹細胞への分化誘導条件を検討した。その結果、SCFとトロンボポエチンの2種類のサイトカインが必須であることを明らかにし、さらに内皮細胞との共培養が必要であることも示した。また、これらは全て造血幹細胞が体内で発生する過程において存在していることも証明した。したがって、造血性内皮細胞から造血幹細胞への発生過程を再現する培養系を構築できた。この培養系は、多能性幹細胞から造血幹細胞を誘導するための培養法構築につながると考えている。

研究成果の概要（英文）：Hematopoietic stem cells (HSCs) arise from hemogenic endothelial cells (HECs) through an intermediate stage known as pre-HSCs. In this study, we aimed to elucidate minimal factors required for supporting HSC induction from HECs. We identified stem cell factor (SCF) and thrombopoietin (TPO) as minimal factors to produce HSCs from E11.5 pre-HSC-I in a serum-free and feeder-free culture condition. Furthermore, endothelial feeder cells were additionally required for HSC induction from E10.5 pre-HSC-I and E10.5 HECs. Our results revealed a transition of signal requirement during HSC development from HECs. The culture method established in this study provides a useful tool for investigating the molecular mechanisms underlying the development of HSCs from HECs.

研究分野：幹細胞生物学、造血発生学

キーワード：造血幹細胞 分化 血管内皮細胞 発生

1．研究開始当初の背景

(1) 造血幹細胞 (hematopoietic stem cell; HSC) は、自己複製能を有し、且つ全ての血液細胞へと分化可能な細胞である。実際に、造血幹細胞は骨髄移植として臨床でも用いられており、最も普及している再生医療と言っても過言ではない。しかしながら、骨髄移植はドナー不足等の深刻な問題を抱えているため、その解決策として試験管内で効率よく造血幹細胞を誘導することが求められている。そこで、我々は、ES 細胞を用いて正常な発生過程を再現することで、試験管内で造血幹細胞を分化誘導したいと考えた。

(2) 造血幹細胞の発生は、中胚葉から血管内皮細胞への分化によって始まる。血管内皮細胞はその大半が血管を形成していくが、一部の細胞は造血性内皮細胞 (hemogenic endothelial cell; HEC) へと分化し、血管内腔に向かって細胞塊を形成し、最初の造血幹細胞の発生が起こる。HEC から造血幹細胞が発生する際には、precursor of HSC type I (pre-HSC-I)、pre-HSC-II という 2 つの中間体を経ることが報告されている。これらの前駆細胞は、細胞膜表面抗原の組み合わせにより定義づけられているが、非常に不均一な細胞集団であることが知られており、例えば HEC と血管内皮細胞を区別できる特異的マーカー分子は分かっていない。同様に、pre-HSCs と造血前駆細胞（血液細胞にしか分化できない細胞）を区別できるマーカー分子も同定されていない。そのため、ES 細胞から細胞膜表面抗原を正しく発現している細胞を誘導しても、それは前駆細胞を含んでいないため造血幹細胞の誘導に至らないという問題点があった。

2．研究の目的

我々は、HEC と血管内皮細胞、pre-HSCs と造血前駆細胞を区別して同定することが重要だと考え、「造血幹細胞の特異的な前駆細胞の同定」を目的とした。既存の細胞膜表面抗原では区別できない前駆細胞を特定するために、細胞膜表面抗原だけでなく遺伝子発現も指標にして前駆細胞を同定する。さらに、HEC や pre-HSCs が造血幹細胞へと分化するために必要なシグナル因子の探索も行う。これにより、前駆細胞の同定と造血幹細胞への試験管内分化誘導法の構築の両方を達成することができる。

3．研究の方法

(1) 本研究では、特異的な HEC と pre-HSC-I を同定するため、シングルセル RNA-seq (scRNA-seq) に着目した。scRNA-seq は一細胞毎の遺伝子発現変動を解析する手法であり、遺伝子発現パターンが類似した細胞を 1 つの集団（クラスター）として分類し、各クラスターの特徴的な遺伝子や発現変動の大きい遺伝子を抽出することができる。我々は既にマウス胎仔細胞を用いて胎生 8 日目 (E8)、E9 の scRNA-seq を実施し、E10、E11 は進行中である。現在までに E8 と E9 の解析が進んでおり、E8 では中胚葉から血管内皮細胞への分化が認められ、その血管内皮細胞は静脈・リンパ管へと分化するクラスターと動脈へと分化するクラスターの 2 つに分かれていることが明らかになった。また、E9 においては、動脈マーカーを発現するクラスターから HEC を含む細胞集団の分岐が起こることが確認できた。これらの結果は、過去に解剖学的に理解されてきた現象と一致している。したがって、我々の解析結果から正確な遺伝子情報を読み取れると判断できたため、現在、さらに解析を進めている。E8 から E11 までの scRNA-seq のデータが全て揃ったら、これらのデータの詳細な解析を進める。そして、HEC や pre-HSC-I の同定を目指す。

(2) scRNA-seq データ上で同定した HEC と pre-HSC-I において活性化しているシグナル経路を明らかにし、試験管内分化誘導法に必要なシグナル因子を特定する。候補となるシグナル因子は実際に培養中に添加することで評価し、胎仔由来の HEC や pre-HSC-I から造血幹細胞へと分化できるか検討する。

4．研究成果

(1) E10 および E11 のマウス胎仔を用いた scRNA-seq データ解析を行い、pre-HSCs を同定することに成功した。同定した pre-HSCs は造血前駆細胞と区別できていることも確認した。また、pre-HSCs に発現している受容体の探索を行い、stem cell factor (SCF) の受容体である Kit とトロンボポエチン (TP0) の受容体である Mpl の遺伝子発現が高いことを見出した。そこで、SCF と TP0 が pre-HSCs から造血幹細胞への分化に必要であるか検討した。その結果、SCF 単独、TP0 単独では、E11 pre-HSC-I から造血幹細胞への分化は認められなかったが、SCF と TP0 が共存している培養条件でのみ、造血幹細胞が誘導された。この培養は、無血清かつフィーダーフリーの条件のため、E11 pre-HSC-I から造血幹細胞への分化に必要な最小限のシグナル因子として SCF と TP0 を同定できた。

(2) 次に、SCFとTP0がE10 pre-HSC-Iから造血幹細胞への分化誘導を促進するか検討したが、E11 pre-HSC-Iと比較して、造血幹細胞への分化効率が非常に低いことが分かった。そこで、造血幹細胞の発生にNotchシグナルが重要という過去の報告に従い (Hadland BK et al., J Clin Invest, 2015)、Notchリガンドを発現していることが知られている血管内皮細胞との共培養を行った。はじめに、2種類の血管内皮細胞株 (bEnd.3細胞、UV 2細胞) を用いて、実際にNotchリガンドを発現しているのか、qPCR解析にて検討を行った。その結果、どちらの細胞株もNotchリガンドを発現していることが確認できた。そこで、これらの細胞株をフィーダーとして用いて、E10 pre-HSC-Iから造血幹細胞を誘導できるか検討した。その結果、どちらのフィーダー条件においても造血幹細胞を誘導できることが明らかになった。さらに、E10 HECを含む血管内皮細胞も同じ培養条件で造血幹細胞へと分化することが示された。したがって、E10 pre-HSC-IおよびE10 HECから造血幹細胞への分化誘導には、SCFとTP0に加えて、内皮細胞との共培養が必要であることが明らかになった。

(3) 実際に、SCFとTP0が造血幹細胞の発生時期に存在しているのか検討を行った。造血幹細胞は、血管内皮細胞中のHECからpre-HSCsが発生した後、血流に乗って肝臓へと移行し、成熟することで発生すると考えられている。そこで、E10とE11のscRNA-seqデータを解析した結果、SCFは血管内皮細胞や肝芽細胞を含む様々な細胞で発現していた。一方、TP0の発現は肝芽細胞にのみ認められることが明らかになった。さらに、E12の肝臓中に存在する血液細胞 (KIT発現細胞) のscRNA-seq解析を行った結果、造血幹細胞ではKitおよびMplとその下流のシグナル分子の遺伝子発現が高いことが分かった。したがって、SCFは血管内腔から肝臓にかけて継続的に供給されているが、TP0/MPLシグナルは肝臓移行後に働くことが示唆された。

(4) 最後に、KITとMPLが前駆細胞の膜上に発現しているのか検討を行った。E10 HECは、KITは発現しているもののMPLは一切発現していないことが分かった。E10 pre-HSC-Iはほとんどの細胞がKITを発現しており、そのうち一部の細胞がMPLを弱く発現し始めていることが示された。E11 pre-HSC-Iでは、KIT発現細胞の1/3ほどがMPLを発現していた。そこで、E11 pre-HSC-IをFACSで単離後、SCFとTP0の存在下 (無血清、フィーダーフリー) で培養すると、培養2日目においてほとんどの細胞がpre-HSC-II/HSCへと分化しており、それらは全てKITとMPLを共発現していた。さらに、培養4日目においてもほとんどの細胞がpre-HSC-II/HSCであり、KITとMPLを共発現している細胞も存在していた。

(5) 総括

本研究では、E10 HECから造血幹細胞までの発生過程を詳細に明らかにした。E10 HECからE11 pre-HSC-Iまでの分化は動脈内腔で行われており、血管内皮細胞の環境とそこから産生されるSCFが必要であることを証明した。E11 pre-HSC-Iからpre-HSC-II/造血幹細胞への分化は肝臓移行後に行われており、SCFとTP0のシグナルを必要としていることも示された。また、E11 pre-HSC-IはSCFとTP0のみの培養環境で造血幹細胞へと分化したが、E10 pre-HSC-Iは血管内皮細胞との

共培養が必要であったことから、E10は初期pre-HSC-I、E11は後期pre-HSC-Iと定義し、造血幹細胞へと分化する際に必要なシグナル因子が異なることを明らかにした。

<引用文献>

Hadland BK. et al., Endothelium and NOTCH specify and amplify aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic stem cells. J Clin Invest, 125(5): 2032-2045, 2015

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1 . 発表者名 S. Morino-Koga, S. Oshiro, M. Tsuruda, D. Gondo, M. Ogawa |
| 2 . 発表標題 Induction of hematopoietic stem cells from mouse embryonic pre-HSCs in serum-free and feeder-free culture supplemented with SCF and TPO. |
| 3 . 学会等名 International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2021 Annual Meeting (国際学会) |
| 4 . 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1 . 発表者名 S. Morino-Koga, S. Oshiro, M. Tsuruda, T. Yokomizo, M. Yamane, S. Tanigawa, K. Miike, S. Usuki, K. Yasunaga, R. Nishinakamura, T. Suda, H. Niwa, M. Ogawa |
| 2 . 発表標題 Single-cell RNA-seq analysis combined with an in vitro culture system unveils the essential factors of pre-HSC differentiation into HSCs. |
| 3 . 学会等名 International Society for Experimental Hematology (ISEH) 52nd Annual Scientific Meeting (国際学会) |
| 4 . 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1 . 発表者名 古賀 沙緒里、鶴田 真理子、趙 雪宇、大城 将吾、小川 峰太郎 |
| 2 . 発表標題 造血幹細胞が発生するための時空間的制御の解明 |
| 3 . 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 |
| 4 . 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1 . 発表者名 S. Morino-Koga, M. Tsuruda, X. Zhao, S. Oshiro, M. Ogawa |
| 2 . 発表標題 Minimum signal requirements for HSC maturation from HECs. |
| 3 . 学会等名 18th International Symposium of The Institute Network (国際学会) |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|