

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19904

研究課題名(和文)マイクロRNAスイッチ法を用いた新規ヒト造血幹細胞濃縮技術の開発

研究課題名(英文) Detection of human hematopoietic stem cells using microRNA switch technology

研究代表者

江藤 浩之(ETO, KOJI)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：50286986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト造血幹細胞の真の特異的なマーカーが同定されていない。そこで、細胞の固有の特性を規定すると報告されている“マイクロRNA”こそがマウスとヒト造血幹細胞とで共通との仮説を立てて本研究を開始した。Hoxb5レポーターマウスの使用不可理由から、別のレポーターマウスから調整した造血幹細胞分画及び、ヒト臍帯血由来の造血幹細胞を用いて、少ない幹細胞集団で発現をしているmiRNAを網羅的にリスト化し、細胞調整方法、miRNAの抽出法を新たに最適化した。その後、無刺激状態と、サイトカイン刺激によって造血幹細胞から分裂した多能性造血前駆細胞集団(MPP)でのmiRNAの抽出を行い、リスト化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来から細胞集団を特定し、分離する方法が検証されてきた。その結果、多くの場合、細胞としての固有の特性、機能発揮様式が細胞表面分子の発現レベルおよび発現パターンと強い連関があることから、細胞表面分子を用いた細胞集団の特定と分離方法が発展してきた。しかしながら、同じ細胞表面分子発現パターンであっても、その細胞集団が以前、高い不均一性や場合によっては全く異なる“機能”を示すことがあり、細胞表面分子による方法の限界が知られている。本研究は細胞内部の機能制御に働くであろうmRNAに対するmiRNAの阻害活性を指標に細胞をより純化することを提案した点で画期的である。

研究成果の概要(英文)：There is unresolved issue of why some succeed and some fail in the history of human hematopoietic stem cell (hHSC) transplantation, partly because the true marker of hHSCs is unidentified. We hypothesized that miRNA which determines the cell-specific characteristics could be the true marker. Earlier studies have shown that the activity of a specific miRNA, which binds to messenger RNA (mRNA) to inhibit its function, is crucial rather its expression level. Thus, using "miRNA switch technology" which can distinguish cells via the activity of miRNA, we attempted to validate whether "miRNA switch technology" enables to detect specific miRNA activities in blood cells. We performed the miRNA profiling by hHSCs, human multipotent progenitors (MPPs) as well as murine HSC population. We attempted to pursue the proposal objective of establishing and optimizing the application condition of "miRNA switch technology" to such rare blood cell population.

研究分野：血液内科

キーワード：造血幹細胞 miRNA mRNA

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞 (Hematopoietic Stem Cell: HSC) は、主に骨髄に存在し生涯に渡り赤血球、血小板、顆粒球、リンパ球といったあらゆる成熟血液細胞を供給し続ける組織幹細胞であり、その移植は、白血病、リンパ腫等の悪性血液疾患に対する根治療法及び最近の一部の代謝疾患への治療として臨床応用されている。現在、ヒト HSC は Lineage<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> 分画に存在すると推測されている。しかし、そのうちの何%が本当の HSC に該当するかは全く不明である。その要因として、マウスとヒト HSC を規定する細胞表面タンパク質の同等性、同一性が否定され、マウスで得られた知見を直接ヒト研究に応用できないことが挙げられる。一方で、転写因子等の“固有細胞の特性を規定する”細胞内シグナル動態に関わる分子は、動物種間で遺伝子配列や機能が保存されているケースが散見される。HSC の機能発揮に関するマイクロ RNA に関し、マウスとヒトでの共通性が最近報告され (Wojtowicz et al. *Cell Stem Cell*, 2016)、種を超えて保存されている可能性が強く示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究提案の最初のきっかけは、マウス HSC を細胞表面分子ではなく細胞内分子を指標に 2 個に 1 個の比率で純化可能なマウス個体の作出に成功したことを基盤として、さらに、種差を超えて共通する HSC の固有の特性である自己複製能・多分化能に関し、その特性を規定するマイクロ RNA (miRNA) の同定を実施し、その情報をもとにマウス、ヒトの真のヒト HSC を規定することを目標とした。

この問題点を解決するため、連携研究者である斎藤が発明した“マイクロ RNA スイッチ技術”によって、最終的にはヒト HSC を定義付ける根拠と生物学的特性を決定することを提案した。

## 3. 研究の方法

### (1) 最初の研究計画

計画 1: マウス HSC 特異的に発現するマイクロ RNA の網羅的探索

本研究の可否を決める最も大切な要因の一つが、HSC の生物学的特徴を正確に表したデータセットを作製することである。そのためには、1) 高純度な HSC の分離と 2) 少ない細胞数からのライブラリー作製が極めて重要である。

従来の表面タンパク質マーカーを用いた方法では、“真の HSC”である長期造血幹細胞 (Long-term (LT)-HSC) の純化は不可能と想定したため、50%の確率で純化できていることが示された Hoxb5 レポーターマウス (Miyanishi et al., *Nature* 2016) を用いること、そのために宮西博士が分担研究者に参画した。一方で、マウス LT-HSC はマウス 1 匹あたり 1000 細胞しか採取できないことが知られている。良質なマイクロ RNA シーケンシングデータを得るには、通常数十万個の細胞を用いて行っており、この計算ではマウスを数百匹を用いなければならない。試料の安定性、データの再現性を考えると、HSC1000-10000 細胞という少量の細胞数から信頼性のあるマイクロ RNA ライブラリーを作製する技術の確立が必要となる。

その対策として、マウス細胞株 (Ba/F3) を用いた至適化した少数細胞でのマイクロ RNA 抽出方法に基づき、Hoxb5 レポーターマウスを用いて LT-HSC、および比較対象として分化の進んだ短期造血幹細胞、さらにその下流に存在する多能性前駆細胞、骨髄球性共通前駆細胞、リンパ球性共通前駆細胞等を分離回収し、各々の分画についてマイクロ RNA シーケンシングを行い、さらにマイクロ RNA スイッチを用いた機能評価 (二次スクリーニング) により、最終的な候補マイクロ RNA を同定する戦略を立てた。

計画 2 : マウス HSC レポーターシステムとマイクロ RNA スイッチによる HSC 純化法の至適化 : 実際に、マイクロ RNA スイッチのみで雑多な細胞集団から LT-HSC が純化できるかを検討することを計画した。上記、計画 1 で得られた候補マイクロ RNA スイッチを用いて雑多な細胞集団 (骨髄細胞) から純化された細胞集団を、放射線照射したマウスへ移植し、その造血能を判定し、次に Hoxb5 レポーターマウスから純化した Hoxb5 陽性 HSC (LT-HSC として証明済み) と競合させて移植することで、正確に LT-HSC としての機能評価が可能となると想定した。

計画 3 : ヒト HSC 特異的に発現するマイクロ RNA の網羅的探索 : 現在、ヒト HSC は Lineage<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> 分画に存在すると推測されている。しかし、そのうちの何%が本当の HSC に該当するかは全く不明である。その要因として、マウスとヒト HSC を規定する細胞表面タンパク質の同等性、同一性が否定され、マウスで得られた知見を直接ヒト研究に応用できない。一方で、転写因子等の “固有細胞の特性を規定する” 細胞内シグナル動態に関わる分子は、動物種間で遺伝子配列や機能が保存されているケースが散見される。HSC の機能発揮に関するマイクロ RNA に関し、マウスとヒトでの共通性が最近報告され (Wojtowicz et al. *Cell Stem Cell*, 2016) 計画 1 で得られた情報がヒトにおいても保存されている可能性が強く示唆できたため、1 細胞解析を用いて、ヒト HSC 特異的マイクロ RNA の候補分子をスクリーニングできると推測した。

計画 4 : マイクロ RNA スイッチを用いたヒト HSC 新規濃縮法の開発 : 計画 2、3 から得られた知見をもとに、ヒト臍帯血を用いて、マイクロ RNA スイッチによる HSC 濃縮を試みる。濃縮された細胞分画は、免疫不全マウスを用いた移植実験にて機能評価を行う。具体的には、末梢血の細胞分布解析により多分化能、2 次、3 次移植により自己複製能を評価できる。さらに、HSC の濃縮純度を評価するため、限界希釈法もしくは 1 細胞移植法を行うことを計画した。

## (2) 実際に実行した計画

2 個に 1 個の比率でマウス造血幹細胞を純化できる細胞内タンパク質マーカー Hoxb5 分子の発見をもとに、本マーカーのレポーターマウスを活用し、マウスの造血幹細胞とヒト造血幹細胞に共通な分子を決定することを目的として本研究を提案していたが、研究開始 1 年目の途中で分担研究者の宮西博士が研究分担者から離脱することが決定した。そのために予定していた Hoxb5 レポーターマウスの使用が不可能となった。以上の緊急事態を踏まえて、別のレポーターマウスから調整したマウス造血幹細胞分画 及び、ヒト臍帯血由来の造血幹細胞を用いての解析に変更した。

## 4 . 研究成果

- (1) 少ない幹細胞集団で発現をしている miRNA を網羅的にリスト化することに主眼を起き、細胞調整方法、miRNA の抽出法を新たに最適化した。
- (2) 無刺激状態と、サイトカイン刺激によって HSC 細胞集団( Lineage<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> 分画) から 1 度分裂した多能性造血前駆細胞集団( MPP) での miRNA の抽出を行い、リスト化した。
- (3) 従来からの最も純化したとされるヒト HSC 細胞集団( Lineage<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> 分画) を一定数( おそらく不均一集団と予想) を移植した免疫不全 NOG マウスの骨髄中に存在するヒト CD45 陽性分画( 主に不均一な分化した血液細胞を示す) での miRNA のリストとの比較を実行した。
- (4) この比較データから、標的となるヒト miRNA に関し、他の細胞での既知の特性情報を参考にして選別化し、転写因子発現との相関から HSC での候補の順位付けを実施した。
- (5) 別のレポーターマウスおよび細胞表面分子マーカー方法( c-kit+Sca-1+Lin<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>) によって純化した HSC を含む細胞集団と、Lin<sup>-</sup>細胞集団における miRNA リストとヒトの候補 miRNA リストの共通リストの上位数個に関してマイクロ RNA スイッチ配列ならびにベクターシステムを準備した。
- (6) 2 年間での研究結果に関しては候補を絞る過程まで進められた。その候補遺伝子の中から種に関係ない HSC の自己複製能、血液細胞として分化能を規定するマイクロ RNA をその活性価から決定する実験を今後も予定している。
- (7) 技術的に、極少数の生細胞における miRNA の発現量、ならびにその活性価を測定する技術の確立に時間と労力を割くことになったが、同じ細胞表面分子発現パターンであっても、その細胞集団が以前、高い不均一性や場合によっては全く異なる ” 機能 ” を示すことがあり、細胞表面分子による方法の限界が知られている。

本研究は細胞内部の機能制御に働くであろう mRNA に対する miRNA の阻害活性を指標に細胞をより純化することを提案した点で画期的であると考える。

## 5 . 主な発表論文等

本グラントでの成果はなし。

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

## 6 . 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：斎藤博英

ローマ字氏名：SAITO HIROHIDE

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、研究者個人に帰属されます。