

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06262

研究課題名(和文) マウスES細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養法の開発

研究課題名(英文) Development of a culture system for in vitro derivation of haematopoietic stem cells from murine embryonic stem cells

研究代表者

小川 峰太郎 (Ogawa, Minetaro)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：70194454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞は背側大動脈の造血性内皮細胞からプレ造血幹細胞を経て発生する。マウス胚体から単離した造血性内皮細胞とプレ造血幹細胞を造血幹細胞に分化させる培養系を確立した。マウス胚体組織のsingle cell RNA-sequencingを行い、造血性内皮細胞以前の早期の前駆細胞から造血幹細胞に至る分化経路を特定した。これらの成果から、より早期の前駆細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養系の開発とES細胞分化系への応用が可能になる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ES細胞やiPS細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養系は、骨髄や臍帯血に代わる造血幹細胞の新たな供給源となることから社会的意義が大きい。遺伝子導入によりES細胞から強制的に誘導された造血幹細胞は正常な能力を持たないため、生理的な条件下で本来の発生経路をたどりながら造血幹細胞まで導く必要がある。多能性のES細胞から出発して試行錯誤で培養条件を探る従来の方法では、造血幹細胞の発生に至る正しい分化経路を再現することはできない。本研究は、胚体内の前駆細胞から造血幹細胞を分化誘導する正しい培養方法を確立し、これをES細胞分化誘導系に応用することを目指している点に学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells are generated from the hemogenic endothelium of the dorsal aorta by passing through a pre-hematopoietic stem cell stage. We established culture systems for inducing differentiation of hematopoietic stem cells from hemogenic endothelial cells and pre-hematopoietic stem cells isolated from mouse embryos. Furthermore, we elucidated the developmental pathway of hematopoietic stem cells from even an early precursor of hemogenic endothelial cells by using single-cell RNA-sequencing of mouse embryos. These achievements will allow us to induce hematopoietic stem cells from earlier embryonic precursors and finally apply to in vitro derivation of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells.

研究分野：発生学

キーワード：造血幹細胞 血管内皮細胞 造血性内皮細胞 中胚葉細胞 ES細胞 試験管内分化 個体発生 マウス

1. 研究開始当初の背景

ES 細胞や iPS 細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養系は、骨髄や臍帯血に代わる造血幹細胞の新たな供給源となることから、骨髄移植におけるドナー不足の観点からも、その開発が急がれている。また、造血幹細胞の発生メカニズムを解明するツールとなるため、造血発生分野に携わる多くの研究者が培養法開発に挑戦しているが、現在まで実現していない。

ES 細胞から造血幹細胞を誘導する試みとして、HoxB4 などの転写因子を強制発現させた ES 細胞から造血幹細胞に似た細胞を誘導した報告がある。しかし、この細胞はリンパ球に分化し難いなど、正常な造血幹細胞が持つべき分化能力を持たない。遺伝子の強制発現に依らず、生理的な条件下で、本来の発生経路をたどりながら造血幹細胞まで導く必要がある。

ES 細胞から血液細胞へのこれまでの分化誘導系は、卵黄嚢もしくは胚体の造血性内皮細胞から造血幹細胞を経ずに分化する血液細胞系列の発生を再現していた。多能性の ES 細胞から出発して造血発生の順方向に沿って試行錯誤で培養条件を探る方法では、造血幹細胞の発生に至る正しい分化経路を再現することはできない。正しい培養条件を決定するためには、先ず、造血幹細胞に分化する真正の前駆細胞である胚体内の細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養方法を確立する必要がある。

2. 研究の目的

脊椎動物の造血幹細胞は背側大動脈の血管内皮から発生する。背側大動脈の内皮細胞の一部は血液細胞に分化する能力を持ち、造血性内皮細胞と呼ばれる。マウスの場合、造血性内皮細胞は胎生 7 日の内臓葉中胚葉にその起源を持つ。胎生 8~9 日には、成体型造血発生に必須の転写因子である Runx1 の発現が始まり、プレ造血性内皮細胞の段階にあると推定される。胎生 9~10 日には、VE-cadherin を発現する造血性内皮細胞として存在する。

胎生 10 日以降、発達した内臓葉は AGM (Aorta-Gonad-Mesonephros) 領域と呼ばれる。AGM 領域の造血性内皮細胞は、胎生 10~11 日に CD41 を発現するプレ造血幹細胞に分化する。胎生 11~12 日に、プレ造血幹細胞は CD45 を発現する造血幹細胞に分化し、胎生期の造血器官である肝臓に移行する。

このように造血幹細胞の発生は幾つかの段階に分けられるが、放射線照射した成体マウスへの移植により骨髄造血を再構築できる細胞は胎生 12 日以降の造血幹細胞だけであり、それ以前の前駆細胞はそのまま移植しても骨髄再構築能を示さない。造血幹細胞以前の前駆細胞を培養して造血幹細胞に分化させる培養系の確立が当面の課題である。

本研究では、造血幹細胞の発生経路を逆に辿り、マウス胎仔のプレ造血幹細胞とその前段階の造血性内皮細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養系を順に確立することを目的とした。さらに、この培養系をマウス ES 細胞から誘導した造血性内皮細胞に適用し、プレ造血幹細胞を経て造血幹細胞まで分化誘導することを目指した。ES 細胞から造血幹細胞の誘導が可能になれば、その発生機構を解明する優れたモデルになり、ヒト多能性幹細胞から造血幹細胞の創出を通して新たな再生医療の展開に繋がると期待される。

3. 研究の方法

(1) 胎生 11 日齢マウス胚体のプレ造血幹細胞から造血幹細胞への分化誘導

プレ造血幹細胞は、造血幹細胞に分化する前段階の前駆細胞であり、放射線照射した成体マウスにそのまま移植しても骨髄造血再構築能を示さないが、一旦培養することによって造血幹細胞に分化し、骨髄造血再構築能を獲得する。

最初に、マウス胎仔から分離したプレ造血幹細胞から造血幹細胞を誘導する培養系の確立を目指した。プレ造血幹細胞は胎生 10~11 日齢マウス胚体の CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(+) 細胞に含まれている。それまでの研究により、胎生 11 日齢マウス胎仔のプレ造血幹細胞から造血幹細胞を分化させることに成功していた。すなわち、胎生 11 日齢マウス胚体 (C57BL/6-Ly5.2) から CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(+) 細胞を FACS で分離し、OP9 ストロマ細胞と混合・凝集させ、数種のサイトカインの存在下に 4 日間培養した後に放射線照射マウス (C57BL/6-Ly5.1) に経静脈的に移植すると、高いキメラ率でドナー (Ly5.2) 由来の骨髄造血が観察されていた。そこで本研究では、OP9 細胞を使わずに、CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(+) プレ造血幹細胞を数種のサイトカインの存在下に無血清培養液で培養して、骨髄造血再構築能を持つ造血幹細胞を誘導することを試みた。

(2) 胎生 10 日齢マウス胚体のプレ造血幹細胞から造血幹細胞への分化誘導

次に、さらに未分化な胎生 10 日のプレ造血幹細胞から造血幹細胞の分化誘導を目指した。それまでの研究結果では、胎生 10 日齢マウス胎仔から分離した CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(+) プレ造血幹細胞細胞を OP9 細胞と凝集培養しても、骨髄造血再構築能を獲得させるのに 7 日間以上の培養時間を要し、移植後のキメラ率も低かった。ところが、CD41 の有無に拘らず、CD45(-) VE-cadherin(+) 細胞を OP9 細胞と凝集培養した場合には、5 日間で高い骨髄造血再構築能を獲得することを見出していた。CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(-) 血管内皮細胞が共存して何らかのシグナルを与えることが、CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(+) プレ造血幹細胞の造血幹細胞への分化を促進する可能性が示唆された。そこで本研究では、マウス胚体からその都度単離した CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(-) 血管内皮細胞の代わりに、既に樹立された血管内皮細胞株を共存させることで、CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(+) プレ造血幹細胞から造血幹細胞の分化誘導を試みた。

(3) 胎生 10 日齢マウス胚体の造血性内皮細胞から造血幹細胞への分化誘導

プレ造血幹細胞は造血性内皮細胞から分化する。造血性内皮細胞は CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(-) 血管内皮細胞中に含まれているが、造血性内皮細胞を識別する特異的なマーカーは同定されていない。そこで本研究では、造血幹細胞に分化する造血性内皮細胞を識別するために、胎生 10 日齢マウス胚体の CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(-) 細胞を Runx1 の発現に基づいて分離し、血管内皮細胞株と共培養を行って造血幹細胞への分化誘導を試みた。

(4) 胎生 8~11 日齢マウス胚体における造血幹細胞発生経路の解明

胎生 9 日以前のプレ造血性内皮細胞とその前駆細胞については、どのような細胞であるか殆ど解明されていない。また、どのようなシグナル因子がその分化に関与しているのかについても明らかにされていない。そこで本研究では、マウス胎仔の内臓葉および AGM 領域の細胞を対象にして、単一細胞レベルで遺伝子発現を網羅的に解析する single cell RNA-sequencing (scRNA-seq) を行った。このデータを利用して、造血幹細胞発生の初期段階の前駆細胞を同定し、その前駆細胞で活性化しているシグナル経路の解析を試みた。

(5) マウス ES 細胞から造血性内皮細胞への分化誘導

ES 細胞から造血幹細胞を分化誘導するためには、側板中胚葉から造血性内皮細胞への分化を制御する因子の特定が重要である。BMP4(bone morphogenic protein 4)は側板中胚葉誘導に必要な因子として知られている。しかし、側板中胚葉から造血性内皮細胞を経て成体型血液細胞へ分化する過程において BMP4 がどのように関与するのか明らかにされていない。そこで本研究では、マウス ES 細胞の分化誘導系を用いて、側板中胚葉から造血性内皮細胞と成体型血液細胞への分化過程に BMP4 がどのような影響を与えるか解析した。

(6) 造血性内皮細胞から造血幹細胞を経由しない肥満細胞の分化経路

マウス胚体の造血性内皮細胞は造血幹細胞の発生源であるが、造血幹細胞が発生する以前にも造血性内皮細胞は成体型血液細胞を産生しており、成体マウスのリンパ球の一部はそのような発生経路に由来すると報告されている。結合組織型肥満細胞は卵黄嚢に由来すると従来考えられてきたが、血管内皮細胞の系譜追跡実験を行った最近の報告では、胚体の内皮細胞に由来する肥満細胞が存在することが示唆されている。しかし、肥満細胞が造血性内皮細胞から造血幹細胞を経て分化するのか、造血性内皮細胞から直接分化するのか明らかにされていない。そこで本研究では、マウス胚体の造血性内皮細胞から肥満細胞を分化誘導する培養系を開発し、肥満細胞が造血幹細胞を経ずに直接分化する経路が存在するか検討を行った。

4. 研究成果

(1) 胎生 11 日齢マウス胚体のプレ造血幹細胞から造血幹細胞への分化誘導

この研究課題に先だて、胎仔肝造血期以前のマウス胚体から分離した血液前駆細胞 (CFU-Mix) を Thrombopoietin (TPO) と c-Kit ligand/Stem cell factor (SCF) の存在下に無血清培養すると、多分化能を維持したまま十数倍に増幅することを報告していた。この培養条件を応用して、プレ造血幹細胞から造血幹細胞の分化誘導を試みた。胎生 11 日齢マウス胚体からソーティングした CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(+) プレ造血幹細胞を TPO と SCF を添加した無血清培養液で培養した後、放射線照射した成体マウスへ移植すると、16 週間以上にわたってドナー由来のリンパ球・骨髄球の造血が観察された。移植マウスの骨髄細胞を別のマウスに再移植する 2 次移植も成立し、胎生 11 日のプレ造血幹細胞から長期骨髄再構築能を持つ造血幹細胞を誘導できることが示された。TPO と SCF のどちらかだけを添加して培養した場合には造血幹細胞が誘導できないことから、TPO と SCF は造血幹細胞発生の最終段階に必要なかつ最小限の因子であることが明らかになった。

(2) 胎生 10 日齢マウス胚体のプレ造血幹細胞から造血幹細胞への分化誘導

胎生 10 日齢マウス胚体からソーティングした CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(+) プレ造血幹細胞は、OP9 ストロマ細胞と CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(-) 血管内皮細胞の共存下に凝集培養すると長期骨髄再構築能を持つ造血幹細胞に分化する。胚体由来の CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(-) 血管内皮細胞の代わりに一般的な血管内皮細胞株を共存させて培養を行ったところ、同様に造血幹細胞を誘導することができた。血管内皮細胞が提供する微小環境が初期のプレ造血幹細胞から造血幹細胞への分化に必要であることが明らかになった。さらに興味深いことに、CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(-) 血管内皮細胞を OP9 ストロマ細胞と血管内皮細胞株の共存下に凝集培養を行うと、造血幹細胞が誘導されることを見出した。この結果から、胎生 10 日齢マウス胚体の CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(-) 血管内皮細胞の中に、プレ造血幹細胞の前駆細胞である造血性内皮細胞が含まれていることが示唆される。

(3) 胎生 10 日齢マウス胚体の造血性内皮細胞から造血幹細胞への分化誘導

胎生 10 日齢マウス胚体の CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(-) 細胞を、サイトカインを添加した無血清培養液を用いて血管内皮細胞株と平面培養することにより、長期骨髄再構築能を持つ造血幹細胞に分化させることができた。この結果から、造血性内皮細胞から造血幹細胞を誘導するために必ずしも OP9 ストロマ細胞は必要ではなく、血管内皮細胞株とサイトカインだけで十分であることが明らかになった。

CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(-) 細胞に含まれる造血性内皮細胞を濃縮するために、*Runx1* 遺伝子エンハンサーの制御下に EGFP を発現するレポーターマウスを用いて、胎生 10 日齢マウス胚体の CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(-) 細胞を *Runx1*(+)細胞と *Runx1*(-)細胞に分画した。それぞれをサイトカインの存在下に血管内皮細胞株と無血清培養を行ったところ、*Runx1*(+)細胞だけが骨髄再構築能を持つ造血幹細胞に分化することが明らかになった。これまで、CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(-) 細胞の中から造血幹細胞に分化する造血性内皮細胞を濃縮した報告はなく、造血性内皮細胞を純化し、その性状を解析するために重要な知見である。

(4) 胎生 8~11 日齢マウス胚体における造血幹細胞発生経路の解明

これまで、胎生 9 日齢マウス胚体の CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(-) 細胞から造血幹細胞を分化誘導することには成功していない。胎生 9 日における造血性内皮細胞やその前駆細胞であるプレ造血性内皮細胞を同定するマーカーや、このような分化初期段階に必要なシグナル因子が不明であることが、その一因としてあげられる。そこで、マウス胚体組織の scRNA-seq により単一細胞レベルでの遺伝子発現プロファイルを取得して、中胚葉細胞から造血性内皮細胞を経て造血幹細胞に至る発生経路を解明し、各発生段階に特異的なマーカーの同定と、それぞれの発生段階で活性化しているシグナル伝達経路を検出することにした。

胎生 8 日齢および胎生 9 日齢マウス胚体の内臓葉と尿膜の一部、胎生 10 日齢および胎生 11 日齢のマウス胚体の AGM 領域と肝臓の一部を分離し、10x Genomics の Chromium システムを用いて scRNA-seq データを取得した。Seurat パッケージを用いてクラスタリング解析を行い、血管内皮前駆細胞から造血性内皮細胞およびプレ造血幹細胞を経て造血幹細胞に至る発生経路に位置するクラスター群を特定した。このデータを基にして、それぞれのクラスターで特異的に発現するマーカー遺伝子の候補を選別することができた。さらに、各種増殖因子の標的遺伝子群の発現の有無から、それぞれのクラスターで活性化しているシグナル経路を推測することができた。今後、同定したマーカーとシグナル活性化の情報をもとに、発生経路を中胚葉に向かって遡りながら、各発生段階の細胞をマウス胚体から分離し、適切なシグナル因子の作用の下に造血幹細胞へ分化誘導する培養系を順次確立する予定である。

(5) マウス ES 細胞から造血性内皮細胞への分化誘導

マウス ES 細胞から分化させた *Fli1*(+)側板中胚葉細胞を OP9 ストロマ細胞と共凝集培養し、側板中胚葉から造血性内皮細胞と造血前駆細胞を分化誘導する培養系を構築した。この系に BMP4 を添加し、フローサイトメトリーおよびコロニーアッセイを用いてその影響を解析した。その結果、BMP4 は中胚葉細胞の OP9 共凝集培養において初期に出現する造血性内皮細胞を増加させることを見出した。さらに、BMP4 の添加は、造血性内皮細胞から分化した CD45(-) VE-cadherin(+) CD41(+)細胞の増殖も促進し、多系統の血球コロニー形成細胞を有意に増加させた。この結果から、BMP4 は側板中胚葉細胞から造血性内皮細胞への分化と、その後の造血前駆細胞の増殖を促進する作用を持つことが明らかになった。これは、ES 細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養系を構築するために BMP4 が有用であることを示唆している。

(6) 造血性内皮細胞から造血幹細胞を経由しない肥満細胞の分化経路

胎生 9 日齢および胎生 10 日齢マウス胚体の CD45(-) VE-cadherin(+) 細胞を SCF 存在下に PA6

ストロマ細胞株と共培養すると結合組織型肥満細胞に効率よく分化することを見出した。培養途中の細胞を放射線マウスに移植しても骨髄造血再構築能を持つ造血幹細胞が殆ど検出されないことから、肥満細胞は造血幹細胞を経ずに分化したと考えられた。生体マウス骨髄から純化した造血幹細胞を同じ条件で培養したところ、胚体由来の CD45(-) VE-cadherin(+) 細胞に比べて、肥満細胞への分化に長い培養時間を要することがわかった。さらに、胎生 10 日齢マウス胚体の CD45(-) VE-cadherin(+) 細胞を生後 1 週齢マウスの腹腔内に直接移植すると、4 週間後にドナー由来の肥満細胞の生着が認められた。この結果から、胚体の造血性内皮細胞から造血幹細胞を経ずに発生する肥満細胞が、生後マウスの結合組織型肥満細胞に寄与する可能性が示唆された。これは、組織常在性免疫細胞の発生起源を解明する上で重要な知見を提供するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 古賀沙緒里、大城将吾、清野麻衣、鶴田真理子、荒木愛、小川峰太郎
2. 発表標題 Establishment of culture system for the induction of hematopoietic stem cells from mouse embryonic precursors.
3. 学会等名 53rd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鶴田真理子、古賀沙緒里、小川峰太郎
2. 発表標題 VE-cadherin+ cells in the mouse embryo proper differentiate into mast cells in vitro and in vivo.
3. 学会等名 53rd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒木愛、清野麻衣、古賀沙緒里、大里元美、小川峰太郎
2. 発表標題 マウス胎仔における造血性内皮細胞の同定と造血幹細胞への分化誘導
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鶴田真理子、古賀沙緒里、小川峰太郎
2. 発表標題 マウスの胚体内VE-cadherin+細胞から肥満細胞への造血幹細胞を経由しない分化
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古賀沙緒里、鶴田真理子、荒木愛、權藤大輝、須田年生、横溝智雅、小川峰太郎
2. 発表標題 シングルセルRNA-seqを用いた造血幹細胞の発生過程の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古賀沙緒里、大城将吾、小川峰太郎
2. 発表標題 Ex vivo maturation of the definitive hematopoietic stem cells from embryonic precursor cells in chemically defined conditions.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴田真理子、古賀沙緒里、小川峰太郎
2. 発表標題 BMP4 promotes the differentiation of hemogenic endothelial cells from mouse ES cells.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学発生医学研究所組織幹細胞分野ホームページ
http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/cell_differentiation/

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
---------	---------