

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19520

研究課題名（和文）炎症ストレスに起因したクローン造血の出現と進展

研究課題名（英文）Inflammation induced emergence and evolution of clonal hematopoiesis

研究代表者

滝澤 仁（Takizawa, Hitoshi）

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授

研究者番号：10630866

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ゲノムバーコードとトランポゾン技術を用いて、細胞クローンの数とサイズを同時に測定できる実験系を立ち上げた。同時に、このシステムを利用したマウスを作製した。これらのモデルマウスは、細胞細胞特異的かつ条件的なバーコード発現調節により造血組織以外の組織へも応用可能であり、国産の研究材料として、他分野においても非常に有用な研究ツールとなりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞機能に対する造血ストレスの影響は、昨今非常に活発な血液研究分野の一つである。本研究では、炎症反応が起きる場である血液の幹細胞をモデルとして、感染や炎症など日常的に起こる免疫活性化に起因した造血ストレスがクローナル造血の発症・進展に関与するという新たな仮説の検証を行うため、シングルセルからのゲノムバーコード検出を可能にする高感度ゲノムバーコード増幅法やクローンの数とサイズの評価を可能にするゲノムバーコードマウスの作成を行なった。これらの技術や実験材料は、造血幹細胞の分野だけでなく、幹細胞生物学や癌生物学など他生物医学研究領域にとっても有用なツールを提供し、次世代医療技術の発展につながる。

研究成果の概要（英文）：We have established an experimental system that allows to track cell clonality and clone size using genome barcoding and transposon, and generated mice that carry these constructs. This model will become a platform useful and applicable to other field of research than just hematology.

研究分野：造血、幹細胞学

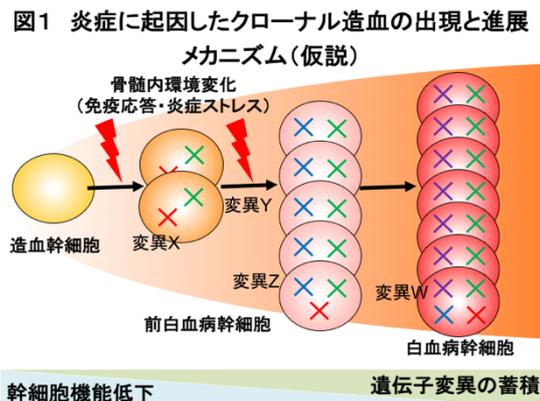
キーワード：造血幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

発生から老化に至る個体形成と維持は、しばしば各臓器に存在する自己複製能力と多分化能をもつ細胞、つまり幹細胞により担われている。幹細胞の増殖や分化障害は腫瘍や形成不全につながる恐れがあるため、幹細胞機能は細胞自律的かつ環境依存的プログラムを介して厳密に制御されなければならない。加齢に伴い幹細胞の機能変容とその再生能力の低下が起き、細胞癌化のリスクが高まることが知られている。近年、数理モデルを用いた疫学データ解析から、組織癌化のリスクと組織幹細胞の分裂回数の間には正の相関が認められ、幹細胞の癌化プロセスは内在性因子と環境因子の影響を受けることが推察された(Tomasetti et al, Science 2015 ; Wu et al, Nature 2016)。しかしながら、幹細胞の機能変容から癌化に至るプロセスにおける細胞自律的または環境依存的因子の相対的役割や分子基盤については生物学的な検討がなお必要である。

免疫・造血システムは骨髄内で非常にゆっくりと分裂する造血幹細胞により維持されている。白血病化の大きな要因として、この造血幹細胞への遺伝的変異の蓄積、それに伴うクローナル造血への進展および拡大がある (Steensma et al, Blood 2015)。近年、白血病関連の遺伝子変異を持つものの、白血病化する前の造血幹細胞、いわゆる“前白血病幹細胞”の存在が示された。加齢に伴い、前白血病幹細胞の血中出現頻度やクローナル造血の頻度は高くなり、将来の白血病リスク、ひいては心血管系疾患や2型糖尿病といった、老化関連疾患のリスク因子となることが示された (Genovese et al, NEJM 2014 ; Jaiswal et al, NEJM 2014)。これらの知見は、クローナル造血から前白血病幹細胞の発症が一般的な老化のプロセスであり、臨床学的には白血病が予測可能かつ予防可能な疾患であることを示唆する。しかしながら、前白血病幹細胞の起源および発生や拡大の機序については未だ分かっていない。代表者らは、感染や老化に伴う炎症は造血幹細胞の分裂を増長し、その細胞機能を低下させることを明らかにした(Takizawa et al Cell Stem Cell 2017)。さらに、疫学研究から自己免疫疾患や感染に伴う慢性炎症と造血器腫瘍発症の間に強い相関性があることから(Kristinsson SY et al, Haematologica 2011 and J. Clin. Oncol. 2010)、“前白血病幹細胞”のクローン出現や進化には免疫応答や炎症反応などの骨髄内環境変化が深く関与しているという仮説に至った (図1)。



### 2. 研究の目的

本研究では、炎症ストレスがクローナル造血を促進するという挑戦的な仮説を検証するために、細胞クローナリティーをシングルセルレベルで検出できる高感度バーコード検出システムの立ち上げと、そのシステムを用いたクローナル造血モデルマウスを作製する。

本研究では、クローナル造血の起源を探るとともに、クローナル造血の出現と進展およびクローナル造血に対する炎症ストレスの役割を理解するために、その基盤技術の開発とモデルマウスの作出を行う。

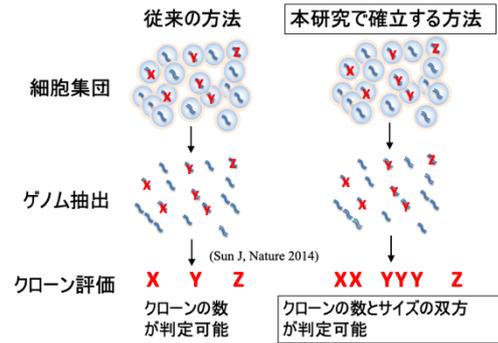
### 3. 研究の方法

本研究の基盤技術となる高感度ゲノムバーコード増幅法の立ち上げは HTLV (ヒト T 細胞白血病) キャリアー細胞の検出技術をもつ佐藤博士 (熊本大学) と、クローナル造血モデルマウスの作成は遺伝子改変動物作成のエキスパートである荒木博士 (熊本大学) との密接な連携を構築し

ながら、申請者と博士研究員(Md. Fakruddin)が中心となり研究を推進した。

以前に発表されたクローナル造血モデルマウスでは細胞集団全体での割合として相対的にクローナリティーを追跡できるもののクローンサイズを定量化することはできない (Sun J, Nature 2014)。一方、レトロウイルスを検出する方法を応用すると、DNA 断片部位の違いを指標に同一クローン由来の細胞数をシングルセルレベルで定量化できる (図 2)。本研究では、以下の目的に沿って、クローナリティーとクローンサイズを同時に評価できる実験の立ち上げを行いつつ、そのシステムを用いたクローナル造血モデルマウスを作製した。

図2 クローン数とサイズの評価系



目的 1) シングルセルレベルで検出を可能にする効率的ゲノムバーコード増幅法の確立

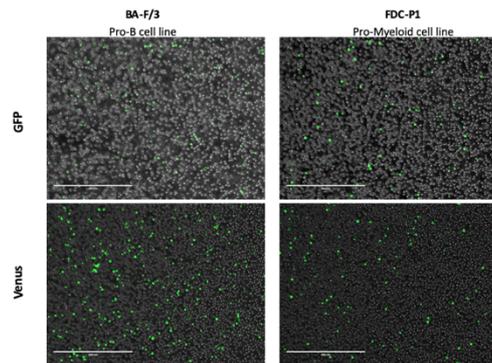
目的 2) クローナル造血モデルマウスの作製

#### 4. 研究成果

目的 1) シングルセルレベルで検出を可能にする効率的ゲノムバーコード増幅法の確立

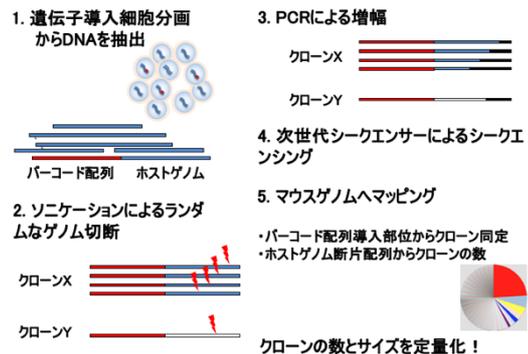
蛍光色素とバーコード配列をのせたプラスミドと、トランスポゼースの一つである Hyper Sleeping Beauty(HSB)を細胞株に導入して、ランダムなゲノム挿入を行なった。B 細胞株の BA-F/3 と骨髄球系細胞株の FDC-P1 に遺伝子導入を行い、それぞれ GFP または Venus を安定的に発現し、遺伝子がゲノムに挿入された細胞株を樹立した (図 3)。ソニケーションによりランダムに切断したゲノム DNA を

図3 バーコード配列とGFP/Venusを安定的に発現する細胞株の確立



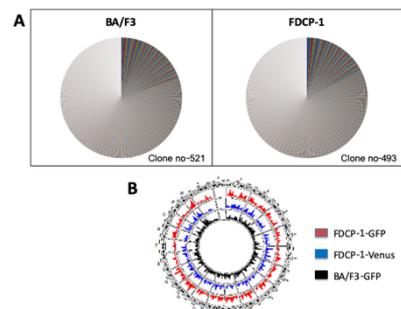
Droplet Nested PCR により増幅し、シーケンシングによりクローンの数とサイズを定量化した(図 4 および Satou Y et al, Sci Reports 2017)。

図4 バーコード配列のゲノム組み込み部位を特定する方法



BA-F/3 と FDC-P1 についてそれぞれ定量化を行なったところ、ともに異なるゲノム挿入領域を持った細胞を約 500 クローン程度、検出することに成功した (図 5)。また、その挿入領域を調べてみると、ゲノム全域においてランダムにかつ、偏りなくバーコード配列が挿入されることが分かり、HSB を介した遺伝子導入が効率よく行われることが確認された。

図5 細胞株を用いたクローンサイズと数の検出

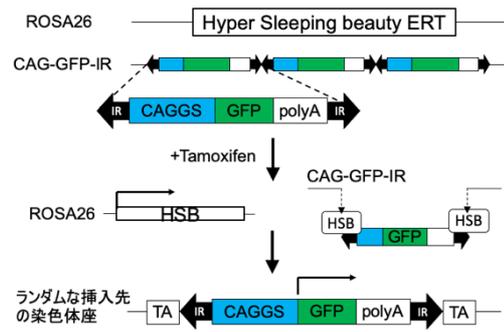


目的 2) クローナル造血モデルマウスの作製

まず固有 DNA バーコード (一つまたは複数コピー) と Venus カセットを持つが、定常状態ではその発現が抑えられているバーコードマウスを作成する

(monoIR-Venus or polyIR-Venus)。Cre 活性依存的に ROSA26 プロモーター下でトランスポゼースの一つ、Hyper Sleeping Beauty(HSB)を発現するマウスも作成する(R26-STOP-HSB)。Cre 発現には造血幹細胞特異的に CreERT2 を発現するマウス (Hif-CreERT2, Yokomizo T et al, J. Exp. Med. 2019) を用いる。これらのマウスの交配により、タモキシフェン投与に Cre 依存性、つまり HSB 発現依存性に造血幹細胞が DNA バーコードおよび蛍光標識され、シーケンシングおよび顕微鏡で造血幹細胞のクローン数、クローンサイズ、組織局在が同時に行うことが可能となり、シングルセルレベルでの造血幹細胞クローンの組織学的、機能的動態を捉えるようになる(図5)。現在までのところ、polyIR-Venus はマウス作成まで完了しており、R26-STOP-HSB は ES クローニングが終わりキメラマウスの確認作業を行なっている。

図5 トランスポゼースを利用した条件的細胞バーコード



以上、ゲノムバーコードとトランスポゾン技術を用いて、細胞クローンの数とサイズを同時に測定できる実験系を立ち上げた。同時に、このシステムを利用したマウスを作製した。これらのモデルマウスは、細胞細胞特異的かつ条件的なバーコード発現調節により造血組織以外の組織へも応用可能であり、国産の研究材料として、他分野においても非常に有用な研究ツールとなりうる。今後は、炎症を誘導して造血幹細胞クローン動態の変化を追跡し、クローナル造血における炎症の役割を明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国際先端医学研究機構 幹細胞ストレス研究室 <a href="http://ircms.kumamoto-u.ac.jp/research/hitoshi_takizawa/">http://ircms.kumamoto-u.ac.jp/research/hitoshi_takizawa/</a>
--

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
連携研究者	佐藤 賢文  (Satoh Yorifumi)  (70402807)	熊本大学・レトロウイルスセンター・教授   (17401)	
連携研究者	荒木 喜美  (Araki Kimi)  (90211705)	熊本大学・生命資源研究・支援センター 疾患モデル分野・教授   (17401)	