

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03268

研究課題名(和文)造血幹細胞自己複製能分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Understanding of the molecular mechanisms of self-renewal capacity in hematopoietic stem cells

研究代表者

宮西 正憲 (Miyanishi, Masanori)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：80542969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：Hoxb5の発現により、造血幹細胞(HSC)分画は自己複製能を消失することなく、長期に渡り造血システムを維持する事が明らかになった。加齢の過程において、HSC分画内でHoxb5を特異的に発現する長期造血幹細胞(LT-HSC)が選択的に増大する。この変化は、自然老化のみならず、移植後や化学療法後の骨髓内においても再現され、普遍的な変化であると考えられる。またLT-HSC特異的な解析から、生涯に渡りLT-HSC自身の細胞分化は造血の恒常性を保つような柔軟性を有しており、加齢に伴う骨髓球系優位な細胞分化も、ミエロイドバイアスHSCの濃縮ではなく、LT-HSCの濃縮により惹起されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HSCを用いた細胞治療、再生医療技術開発は世界的にもホットな研究分野である。一方で、これまでの開発研究成果を用いた先行する臨床試験の結果から、治療効果やその持続期間等の技術的な面、さらには腫瘍化等の安全性の面、両方において課題が明確になっている。その大きな理由としては、移植時におけるドナー細胞に起きうる変化を正しく理解する技術、ノウハウが不十分であったことが考えられる。今回、我々が新たに発見した、造血幹細胞における自己複製能の維持、破綻のメカニズム、さらにはその生理的な意義は、上記の課題を解決し、安全かつ効果的な治療技術開発に大きく貢献しうるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that the hematopoietic stem cell (HSC) fraction maintains the hematopoietic system over time without losing its capacity for self-renewal owing to Hoxb5 expression. Consequently, during the aging process, the proportion of long-term hematopoietic stem cells (LT-HSC) within the HSC fraction that express Hoxb5 selectively increases. This transformation appears to be universal, as it is replicated not only by natural aging but also by bone marrow transplantation and chemotherapy. Myeloid-biased hematopoiesis with aging is induced by the enrichment of LT-HSC, but not by the enrichment of myeloid-biased HSCs, according to LT-HSC-specific analysis.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 自己複製能 細胞分化

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

造血系は、約1兆個の血液細胞が毎日入れ替わる極めてダイナミックなシステムである。産生された成熟血液細胞は、栄養の運搬や細菌等の異物の除去のみならず、多臓器の修復や機能維持等、生体恒常性の維持に大きな役割を果たしている。そのため、造血系における機能異常は、免疫機能の低下や白血病等の悪性疾患、さらには個体全体の機能低下を惹起する。それゆえ、造血系がその恒常性を生涯に渡りどのように維持しているか、その全容を明らかにすることは幹細胞研究のみならず、医学的にも極めて重要な課題である。

このダイナミックな血液産生システムは、長期造血幹細胞（Long-Term HSC: LT-HSC）と呼ばれる造血系階層の頂点に位置する細胞により維持されている。LT-HSCは、造血幹細胞（HSC）の定義である『自己複製能』と『多分化能』を生涯にわたり有する唯一の細胞であり、細胞分裂に伴い分化が進むと多分化能を維持したまま自己複製能を減弱もしくは消失した短期造血幹細胞（Short-term HSC: ST-HSC）を産生する。そのため、自己複製能の分子メカニズムを解明するには、“自己複製能を有する細胞群（LT-HSC）”と、“自己複製能以外の機能は全て維持されているが自己複製能のみが減弱もしくは欠失した細胞群（ST-HSC）”を比較、解析することが最も論理的である。一方、LT-HSCは骨髄有核細胞10万細胞にたった1細胞と極めて希少であり、これまでLT-HSC、ST-HSCをそれぞれ単離する技術が存在しなかった。そのため、LT-HSCのみならず、ST-HSCやさらに分化した細胞を含む雑多な細胞集団を用いた解析しか行うことができず、自己複製能の本質ははまだ未解明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、『どのようにして、生涯に渡り血液が作り続けられるのか？』を明らかにするため、造血系恒常性のメカニズム、特に自己複製能維持機構の全容を解明することを目的とする。本研究期間内での達成目標は、下記3点である。

1. LT-HSCにおける自己複製能制御遺伝子の同定
2. 自己複製能破綻のメカニズム解明
3. 自己複製能維持と破綻を運命づける生体内メカニズムの解明

3. 研究の方法

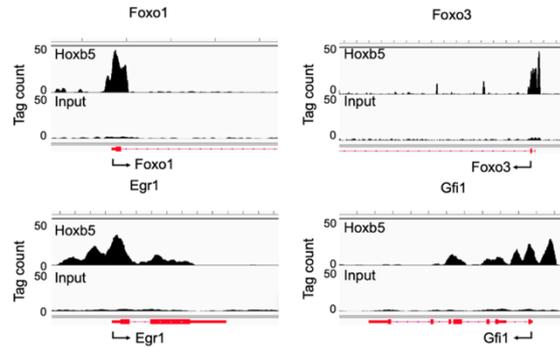
研究開発には、主に研究開発代表者が独自に開発したLT-HSC特異的レポーターマウスを用いる。造血幹細胞は、Lineage⁻cKit⁺Sca-1⁺F1k2⁻CD34^{-/lo}CD150⁺（pHSC）で規定される造血幹細胞分画内に自己複製能が強く生涯にわたり維持される細胞集団（LT-HSC）と自己複製能が減弱もしくは消失した細胞集団（ST-HSC）の異なる二つの細胞分画が存在する。申請者の作製したレポーターシステムは、このLT-HSCとST-HSCを明確に分離する手法であり、また自己複製能はLT-HSCのみに強く観察される細胞機能であることから、移植を介さずに前方視的にLT-HSC、ST-HSCを単離し、自己複製能に関する解析を高精度に実施可能である。そこで本研究では、高純度に単離されたLT-HSCとST-HSCを用い、レシピエントマウスへの移植実験をベースとして、分子生物学、オミクス解析、システムバイオロジー的アプローチ等を組み合わせることで、本研究課題の達成を目指す。

4. 研究成果

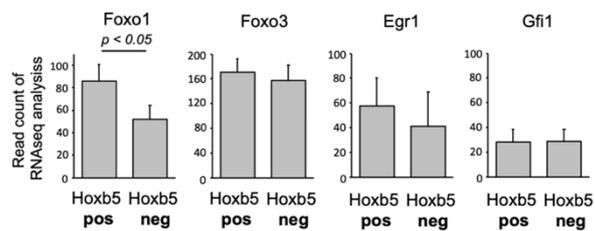
本研究期間中に、上記目標に関し、主に以下の点を明らかにし、造血系恒常性のメカニズムの理解に貢献した。

目標 1 : LT-HSC における自己複製能制御遺伝子の同定

申請者の開発した LT-HSC 特異的レポーターシステムを用いて、LT-HSC および ST-HSC をそれぞれ単離し、LT-HSC 特異的に発現もしくは消失する遺伝子群を、次世代シーケンスを用いてスクリーニングを行った。これまでの成果を継続する形で、本期間中においては、特に Hoxb5 に着目し、その機能解析や生体における Hoxb5 遺伝子発現の意義を明らかにし、論文発表を行った。さらに、公開データを用い、Hoxb5 制御遺伝子の推測を行ったところ、自己複製能との関連性があると報告される遺伝子群の制御に Hoxb5 が関与していることを示唆する結果が得られた (右図)。そこで、Hoxb5 陽性および陰性 HSC 分画から作製した RNAseq データ



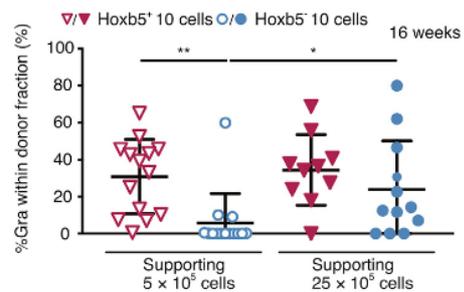
を用いた解析を行ったところ、特に Foxo1 の発現が Hoxb5 陽性 HSC に有意に発現しており、HSC 分画内では Hoxb5 が Foxo1 発現を制御することで自己複製能が維持されている可能性が示唆された (右図)。



また LT-HSC と ST-HSC 間で有意に発現差を認める遺伝子群 (158 遺伝子) および Hoxb5

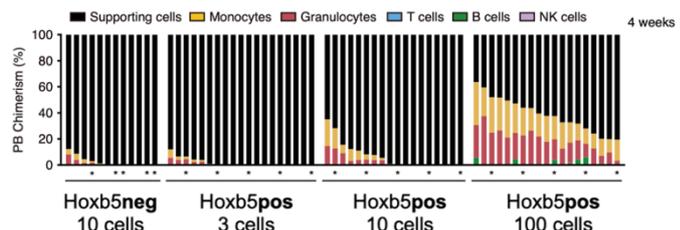
を用いた遺伝子ネットワーク解析を行った。さらに Hoxb5 と相関性を有する遺伝子のみを表示すると、Runx1 や Myc、また他の Hox ファミリー遺伝子とネットワークを構成していることが確認された。

また、これまでの Hoxb5 に着目した機能実験から、骨髄破壊的な処置 (化学療法、放射線照射) のような非常に高い造血要求性のある環境下においては、ST-HSC は短期的に細胞が分化し、造血幹細胞分画から消失する。一方で、自然経過的な老化のような低い造血要求性環境下においては、ST-HSC はこれまでの理解より遥かに長期に渡り自己複製能を維持することが明らかになった (右図)。これまでの結果を統合すると、Hoxb5 は高い造血要求環境下においても、自己複製能を喪失しないように造血幹細胞に耐性を賦与する役割を担っていることが明らかになった (ストレス耐性モデル)。

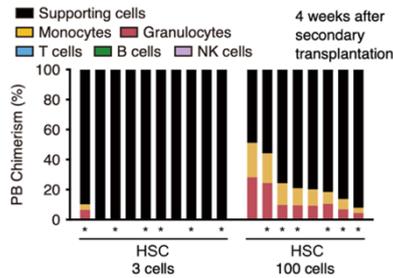
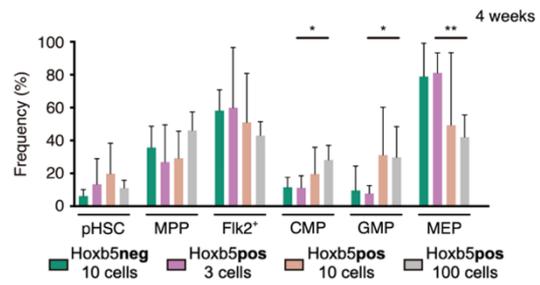


目標 2 : 自己複製能破綻のメカニズム解明

次に、一般的な骨髄移植よりもさらに強い造血要求性を、Hoxb5 陽性 HSC (LT-HSC) に付加すると、どのような変化が起きるかを検討した。ドナー細胞数を変化 (3, 10, 100 細胞) させ移植実験を行い、ドナー細胞あたりの細胞分裂、細胞分化 (造血要求性) の強弱による変化を観察した。その結果、ドナー細胞数が減弱する (ドナー細胞あたりの造血要求性が高くなる) ことで、自己複製能を短期的に失うケースが増えることが明らかになった (右図)。



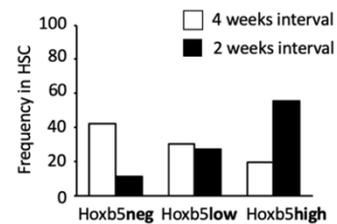
一方で、これらマウスの骨髄を解析すると、予想に反し、造血要求性の強い移植条件においても造血幹細胞は依然として存在しており、その代わりにドナー細胞の分化が巨核芽球系に有意に傾くことが明らかになった(右図)。さらに、造血要求性の高い移植後(骨髄内の環境が巨核芽球へと分化が誘導されている状態)のマウスより HSC



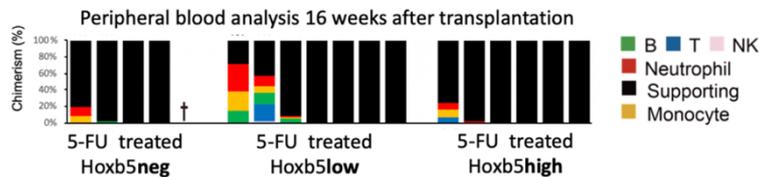
を単離し、造血要求性の強度を緩和すると細胞分化の傾きが正常化することが確認された(左図)。このことは、自己複製能の強い LT-HSC に対しては、非常に強い造血要求性を付加した場合においても、自己複製能が破綻するというよりは細胞分化が一時的に変化することが明らかになった。

次に、骨髄移植以外に造血要求性が高くなる手法として、5-FU が HSC 分画に及ぼす影響を検討した。5-FU を 2 週間隔

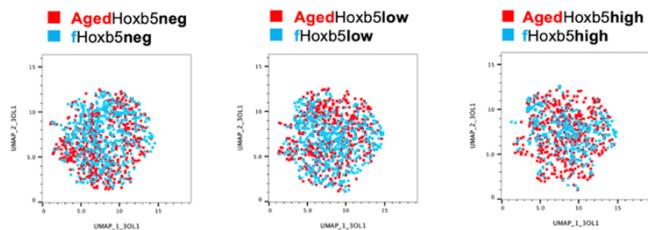
もしくは 4 週間隔投与し、50 日後に骨髄内の HSC 分画を解析した所、Hoxb5 強陽性分画が短期間に選択的に増大することが明らかになった(右図)。この 5-FU 投与により選択的に増大する Hoxb5 強陽性 HSC 分画が、どのような表現系を示すかを移植実験にて確認した。その結果、5-FU 投与後に出現する Hoxb5 強陽性 HSC 分画は、著明に自己複製能が減弱していることが明らかになった(下図)。興味深いことに、後述するが、自然老化マウスにおいても同様に Hoxb5 強陽性 HSC 分画が選択的に増大し、自己複製能が減弱することが明らかになった(dysfunctional HSC : dysHSC と命名)。



そこで、1 細胞 RNAseq 解析を用いて、5-FU 投与と老化に



共通して出現する Hoxb5 強陽性 HSC 細胞分画を比較検討した。5-FU 投与群、自然老化マウス群から Hoxb5 陰性、弱陽性、強陽性分画をそれぞれ単離し比較したところ、Hoxb5 の発現強度に関わらず、非常に類似した細胞集団であることが示された(右図)。さらに自己複製能機能維持、喪失のメカニズムを解明するための基



盤技術となりうる HSC 移植の成否に必要な最小条件を明らかにした。その結果、LT-HSC と ST-HSC から構成される細胞分画のみで移植がほぼ成立すること、一方でそのどちらかが欠けるとレシピエントはほとんど死亡することも明らかになった。以上より、LT-HSC と ST-HSC の混合する細胞分画が HSC 移植成功の最小条件 (Minimum Subset for Transplantation : MST と命名) であると同定し、その結果をまとめ論文報告した。

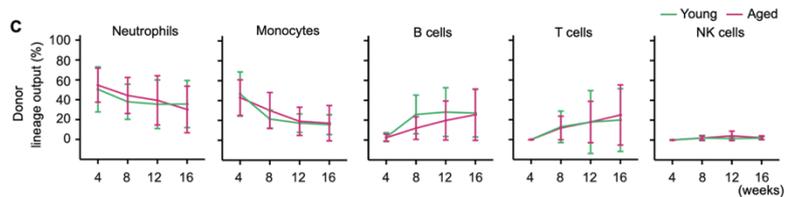
目標 3 : 自己複製能維持と破綻を運命づける生体内メカニズムの解明

個体の加齢に伴い、造血系においては様々な変化が引き起こされる。その一つに末梢血における骨髄球系への分化の偏りがある。この変化の説明として、HSC の集団中に元来骨髄球系へ優位

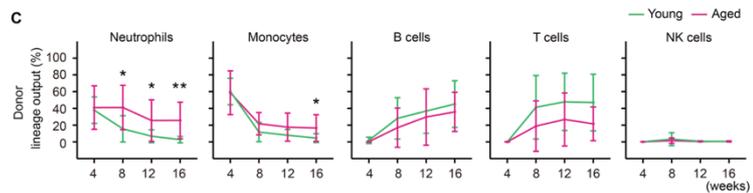
に細胞分化するクローンが存在し、加齢の過程で何らかの理由で選択的に濃縮することがその原因であるとする考えが、現在最も広く受け入れられている。

今回、我々は従来の仮説ではなく、自己複製能維持および破綻の変化が、末梢における骨髓球への分化の傾きを生じさせていると考えており、その仮説を検討した。

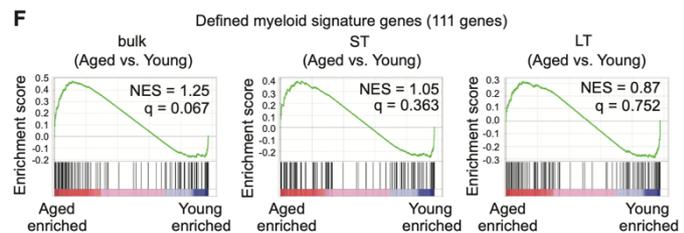
まず、造血幹細胞の分化が加齢に伴い実際に骨髓球系に傾くのか、すなわち骨髓球系優位に分化する HSC クローンが濃縮しているかを確認した。加齢に伴う変化は、長寿命型である LT-HSC に蓄積するため、若齢および加齢マウスより同数の LT-HSC を単離し、同一レシピエントマウスへ移植を行った。すると、これまでの報告とは全く異なり、加齢に伴う分化の変化は認められなかった (右図)。



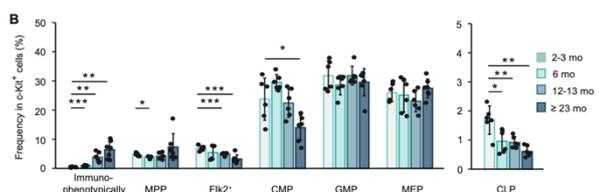
一方で、LT-HSC 以外に自己複製能が減弱した ST-HSC を含む従来の HSC 分画を用いて同様の移植実験を行うと、これまでの報告通り、加齢 HSC から分化した末梢血液細胞は著明に骨髓球系に傾いていた (右図)。



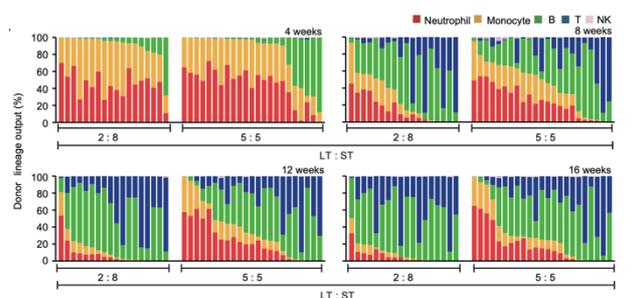
そこで、次に HSC 内在性の変化を明らかにするために、RNAseq を行った。すると、一般的な加齢性変化は認めるものの、骨髓球系への傾きをサポートするような遺伝子群の変化は、単離した LT-HSC および ST-HSC においては認められなかった。一方で、興味深いことに、LT-HSC と ST-HSC が混在した雑多な細胞集団で同様の解析を行うと、既報と同様に骨髓球系への遺伝子発現の傾きを認めた (右図)。



また、加齢に伴う骨髓内ニッチの変化が細胞分化へ及ぼす影響を検討した。すると意外なことに、骨髓内においては骨髓系前駆細胞の比率が加齢とともに減少していた (右図)。



一方で、HSC 分画は加齢とともに増大し、さらに HSC 分画内において、LT-HSC/ST-HSC が加齢とともに増大していることを見出した。そこで、この比率の変化、すなわち自己複製能破綻が、加齢に伴う末梢での骨髓球系への傾きの原因であるかを確認するため、若齢マウスから LT-HSC および ST-HSC をそれぞれ単離、その混合比率を若齢マウス型、あるいは加齢マウス型と変化させ、移植実験を行った。すると、加齢マウス型比率で移植したマウスにおいては、若齢マウス由来 HSC を移植したにも関わらず、末梢血の様子は加齢マウスと類似した骨髓球系への著明な傾きを示した (右図)。



そこで、この比率の変化、すなわち自己複製能破綻が、加齢に伴う末梢での骨髓球系への傾きの原因であるかを確認するため、若齢マウスから LT-HSC および ST-HSC をそれぞれ単離、その混合比率を若齢マウス型、あるいは加齢マウス型と変化させ、移植実験を行った。すると、加齢マウス型比率で移植したマウスにおいては、若齢マウス由来 HSC を移植したにも関わらず、末梢血の様子は加齢マウスと類似した骨髓球系への著明な傾きを示した (右図)。

一方で、HSC 分画は加齢とともに増大し、さらに HSC 分画内において、LT-HSC/ST-HSC が加齢とともに増大していることを見出した。そこで、この比率の変化、すなわち自己複製能破綻が、加齢に伴う末梢での骨髓球系への傾きの原因であるかを確認するため、若齢マウスから LT-HSC および ST-HSC をそれぞれ単離、その混合比率を若齢マウス型、あるいは加齢マウス型と変化させ、移植実験を行った。すると、加齢マウス型比率で移植したマウスにおいては、若齢マウス由来 HSC を移植したにも関わらず、末梢血の様子は加齢マウスと類似した骨髓球系への著明な傾きを示した (右図)。

この結果は、自己複製能の破綻により、細胞分化そのものに不均一性や変化が伴わなくても、末梢血中の血液分化の表現型を変えうるという従来の通説を覆す発見である。現在、これらの成果をまとめ論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishi Katsuyuki, Sakamaki Taro, Sadaoka Kay, Fujii Momo, Takaori Kondo Akifumi, Chen James Y., Miyanishi Masanori	4. 巻 196
2. 論文標題 Identification of the minimum requirements for successful haematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 711 ~ 723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.17867	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakamaki Taro, Kao Kevin S., Nishi Katsuyuki, Chen James Y., Sadaoka Kay, Fujii Momo, Takaori-Kondo Akifumi, Weissman Irving L., Miyanishi Masanori	4. 巻 539
2. 論文標題 Hoxb5 defines the heterogeneity of self-renewal capacity in the hematopoietic stem cell compartment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 34 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.12.077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Katsuyuki Nishi, Taro Sakamaki, Kevin S. Kao, Kay Sadaoka, Momo, Fujii, Akifumi Takaori-Kondo, Masanori Miyanishi
2. 発表標題 Purification of hematopoietic stem cells uncovered the mechanism of age-associated lineage biased hematopoiesis
3. 学会等名 3rd Research Meeting on Cell Dynamics (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Katsuyuki Nishi, Masanori Miyanishi
2. 発表標題 Purification of hematopoietic stem cells uncovered the mechanism of age-associated lineage biased hematopoiesis
3. 学会等名 Young Research Forum
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Katsuyuki Nishi, Taro Sakamaki, Kevin S. Kao, Kay Sadaoka, Momo, Fujii, Akifumi Takaori-Kondo, Masanori Miyanishi
2. 発表標題 Alteration of the short/long-term hematopoietic stem cell ratio causes lineage-biased hematopoiesis
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taro Sakamaki, Katsuyuki Nishi, Kay Sadaoka, Momo Fujii, Masanori Miyanishi
2. 発表標題 The cell fate of HSCs is regulated flexibly by hematopoietic stress
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masanori Miyanishi
2. 発表標題 Current status and future directions of a multi-color analysis to understand the dynamics nature and the hematopoietic system
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 1. 造血幹細胞含有組成物	発明者 宮西正憲、西克之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-174101	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------