

令和 4 年 5 月 14 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17407

研究課題名（和文）新たな生体外造血幹細胞培養技術を用いたヒトRUNX1遺伝子の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of RUNX1 gene using a novel ex vivo hematopoietic stem cell culture method

研究代表者

櫻井 政寿（Sakurai, Masatoshi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：20570146

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）：RUNX1遺伝子など造血発生や造血幹細胞機能・血球分化に関わる遺伝子の解析は、主にマウスによるもので、ヒトによる解析は困難であった。近年、血清やアルブミンの代わりにポリビニルアルコール（PVA）を用いたマウス造血幹細胞（HSC）の効率的かつ長期的な培養方法が開発された。しかし同じ手法ではヒトHSCは培養できなかったため、まずヒトHSCの長期培養方法樹立から取り掛かった。その結果、ヒトではPI3K/AKT経路が低下していることを見出し、PI3K刺激薬、TPO受容体作動薬、UM171、高分子ポリマーを用いることで、最終的に30日間で約2800倍にヒトHSCを増幅できる全く新しい培養技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における最大の成果は、世界で初めてサイトカインや血清/アルブミンを用いることなく、化合物のみでヒト造血幹細胞の生体外増幅に成功したことである。造血幹細胞はすべての血液細胞のみなもとなる細胞で、難治性血液疾患患者における造血幹細胞移植に用いられている。この細胞を増幅させることができれば、幹細胞研究のみならず、移植医療、輸血医療、またこれから出てくるであろう遺伝子治療において大きなメリットをもたらす。今まで多くの研究者が造血幹細胞の増幅に取り組んできたが、実臨床で用いられるまでに至ったものはない。今回開発した技術は、安価かつシンプルな組成の培養液であり、今後臨床応用を目指したいと考えている。

研究成果の概要（英文）：Functional analysis of genes involved in hematopoietic development, hematopoietic stem cell (HSC) maintenance and blood cell differentiation has been conducted mainly in mice, making analysis in humans difficult. Recently, a long-term ex vivo culture method of mouse HSCs using polyvinyl alcohol (PVA) instead of serum or albumin was developed. However, human HSCs could not be cultured by this method, and I tried to establish a culture method for human HSCs. I found that the PI3K/AKT pathway is downregulated in human HSCs, and finally established a novel chemically-defined culture technique that can expand human HSCs approximately 2800-fold for 30 days ex vivo by using a PI3K stimulator, a TPO receptor agonist, UM171 and a polymer.

研究分野：血液内科学

キーワード：ヒト造血幹細胞 生体外増幅 PI3K/AKT経路 トロンボポエチン受容体作動薬 高分子ポリマー RUNX1 遺伝子

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) *RUNX1* 遺伝子は造血発生や造血幹細胞機能・血球分化に必須の役割を果たしており、ノックアウトマウスは二次造血の異常を示し胎生致死となる。また成体でのコンディショナルノックアウトマウスは巨核球・リンパ球分化異常などを示す。一方、*RUNX1* は骨髄異形成症候群(MDS)や急性骨髄性白血病(AML)で染色体転座や点突然変異が高率に報告されており、これらの疾患では *RUNX1* 変異は予後不良因子であることが知られている。

また、先天的に *RUNX1* ヘテロ変異を有した家族性血小板異常症 (FPD/AML) は稀な常染色体優性遺伝疾患で、幼少時からの血小板減少を主徴とし、壮年期以降高率に造血器腫瘍を発症する。

(2) *RUNX1* 遺伝子の解析は、主にマウスから得られた知見が基盤となっていた。しかし *Runx1* ヘテロマウスは表現型がほとんどでないのに対し、ヒトでは先述のとおり FPD/AML になるなど相違点があり、研究の限界となっていた。

一方、近年、血清/アルブミンの代わりにポリビニルアルコール (PVA) を用いて、マウス造血幹細胞の生体外増幅に成功し、最大 900 倍にも増幅することができたことが報告された¹⁾。

2. 研究の目的

本研究では、移植可能なヒト造血幹細胞を生体外で増幅可能な PVA を基軸とした新規の培養実験技術を用いることにより、今までなされてきた研究の限界を克服し、ヒト *RUNX1* 遺伝子の機能解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト臍帯血由来 (CB) CD34 陽性細胞は市販されているものを購入した。培養前後の比較実験においては、共通のロットの臍帯血を使用した。

(2) シグナル伝達解析は、poly-l-lysine-coated slides コートスライドに、複数の臍帯血ロットから採取した細胞を接着させ、4%パラホルムアルデヒドで固定し、リン酸化特異的抗体を用いて染色を行った。免疫蛍光画像は、Cellomics ArrayScan VTI HCS Reader (Thermo Scientific) を用いて解析した。

(3) ヒト臍帯血細胞由来 CD34 陽性細胞の培養は、IMDM 培地に 0.1% PVA もしくは polyvinyl caprolactam-polyvinyl acetate-polyethylene glycol graft copolymer (PCL-PVAc-PEG; Soluplus®) をベースとして、1% insulin-transferrin-selenium-ethanolamine、1% penicillin/streptomycin/glutamine (P/S/G)、1 μ M 740Y-P、0.1 μ M butyramide、必要に応じて 70 nM UM171 を加えた培養液を用いて行った。長期培養においては、3日毎にあらかじめ温めた新しい培地に交換した。すべての細胞培養は、24 ウェルの平底組織培養プレートを用いて行った。

(4) 細胞数のカウントは、血球計数装置または CYTORECON サイトメーター (GE Healthcare) を用いて、培養前と培養後の細胞を数えた。表面マーカー解析は、各種抗体で染色後、FACS AriaII または FACS Verse (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリー解析を行った。結果の解析には FlowJo software (Tree Star) を用いた。

(5) 異種移植実験は、8-10 週齢の免疫不全マウス NOD/Shi-scid IL-2R null (NOG) に放射線照射 (1.5Gy) を行った後、尾動脈より細胞移植を行った。移植後は経時的に末梢血を採取し、各種抗体で染色後、フローサイトメトリーを用いて、キメリズム解析を行った。また必要に応じて骨髄・脾臓を採取してキメリズム解析を行った。

(6) 限界希釈移植アッセイでは、培養前後の細胞をいくつかの細胞数群に分け、放射線照射した NOG マウスに上述の方法で移植した。キメリズム解析は上記の方法で行った。限界希釈解析は、ELDA ソフトウェアを用い、骨髄におけるヒト CD45 陽性細胞 1%以上を生着の閾値として、解析した。

(7) シングルセル移植アッセイは、単一ヒト臍帯血由来 CD34+CD38-CD90+CD45RCD49f+細胞をフローサイトメトリーを用いて 96 穴プレートにソーティングし、PCL-PVAc-PEG ベースの培地で 7 日間培養した後、増殖効率の高い上位 10well を、放射線照射 (1 Gy) を行った 8-10 週齢の W41/W41 マウスに尾動脈注射で移植した (図 1)。

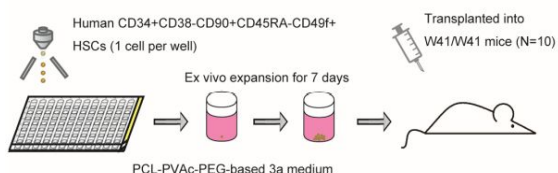


図 1

4. 研究成果

(1) 過去に報告されたマウス造血幹細胞で報告された培養方法は、PVA にサイトカイン(SCF・TPO) を添加した培地を用いていた。同じ培地でヒト造血幹細胞の培養を行うと、1 週間

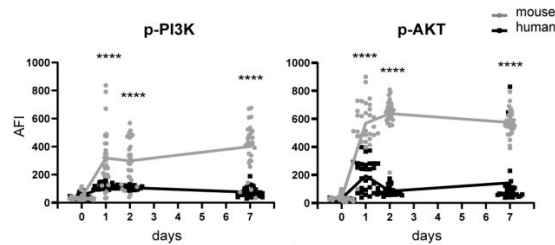


図 2

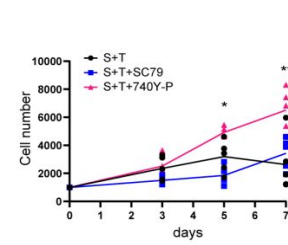


図 3

程度は培養可能であったが、それ以上の長期間培養は困難であった。これは *RUNX1* 遺伝子変異の有無にかかわらず、同様の結果であった。従ってまずこの培養方法を検討し直すことから開始した。

マウスとヒトの差異を明らかにするため、上記条件における双方の造血幹細胞のシグナル解析を行った。結果として PI3K/AKT 経路がマウスと比較しヒトでは有意に低下していることが明らかとなった(図 2)。この結果に基づき、740Y-P (PI3K 刺激薬) を添加することにより、ヒト CD34 陽性細胞の増幅効率が有意に改善した(図 3)。また、先の述べたサイトカインのうち、SCF は PI3K 刺激薬に、TPO は TPO 受容体作動薬に置換可能であることを示した。しかしこの方法では、1 週間は安定して増幅するものの、2 週間が経過すると CD41 陽性細胞に分化してしまった。

(2) さらに長期に安定した培養を行うため、その培養液に造血幹細胞培養に有用と報告されている小分子 UM171 を添加した。すると、ヒト CD34 陽性細胞は 1 か月間の長期にわたって生体外で増幅可能であった(図 4)。培養後細胞の造血再構築能を明らかにするため、免疫不全マウスに培養前後それぞれの細胞を同数移植した。すると、培養前の細胞(Fresh)と比較し、培養後の細胞のほうが有意にヒトキメリズムは高値であった(図 5)。以上より、サイトカインを用いない長期安定した新たなヒト造血幹細胞の培養方法を確立した。

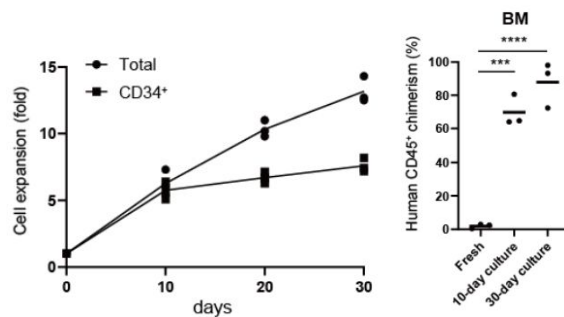


図 4

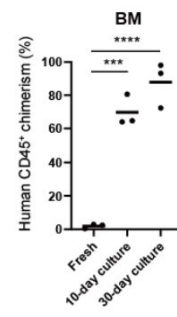


図 5

(3) さらにこの培養方法を改良する目的で、PVA と類似した高分子ポリマーについてスクリーニングを行った。すると、PCL-PVAc-PEG (polyvinyl caprolactam-polyvinyl acetate-polyethylene glycol graft copolymer : Solipolus®) を用いた場合、PVA よりもさらに効率的に細胞を増殖できることが明らかとなった(図 6)。PCL-PVAc-PEG /740Y-P (PI3K 刺激薬) /butyramide (TPO 受容体作動薬) /UM171 からなる培地によって、30 日間の培養で全細胞が約 75 倍、CD34+細胞は約 55 倍に増幅できることが明らかとなった(図 7)。さらに免疫不全マウスに異種移植を行ったところ、高いキメリズムで生着した(図 8)。PCL-PVAc-PEG と PVA ではキメリズムに差はなかったが、PCL-PVAc-PEG のほうが *ex vivo* での増殖率が高いことから、PVA よりもさらに効率よく機能的ヒト造血幹細胞を増殖させたことが示唆された。

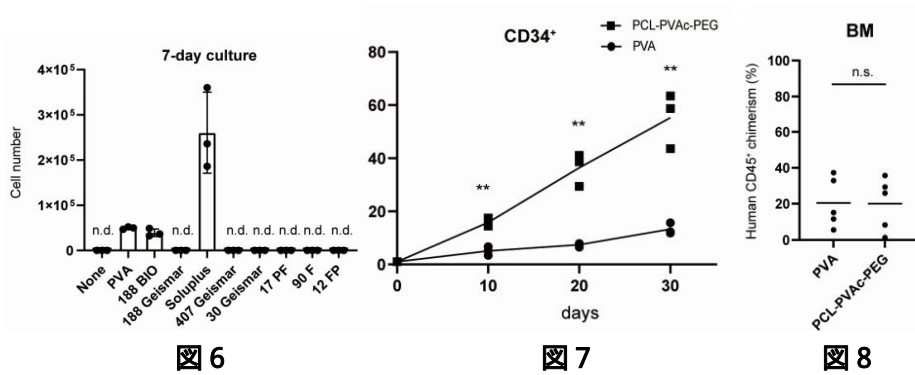


図 6

図 7

図 8

(4) 培養前 (Fresh) と 30 日間培養を行った後の細胞を用いて、それぞれ移植細胞数を数段階に分けて、免疫不全マウスに移植する限界希釈移植実験を行った。その結果、今回開発した培養液によって、ヒト造血幹細胞は 30 日間で約 2800 倍にまで増幅できることが明らかとなった (図 9、10)。

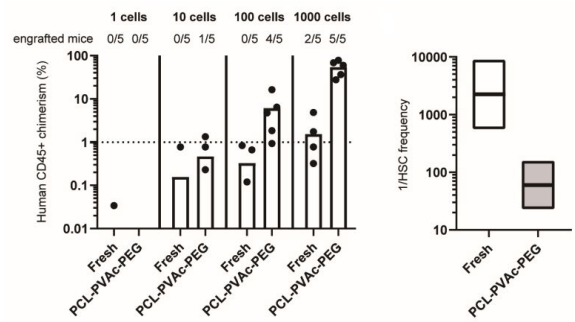


図 9

図 10

(5) さらにこの培養方法を用いると、シングルセルからでも 1 週間の培養で、上位 10% のウェルでは、10 細胞を超えるまでに増幅した (図 11)。さらにこのよく増殖したウェルを免疫不全マウスに移植すると、継続的に生着した (図 12)。

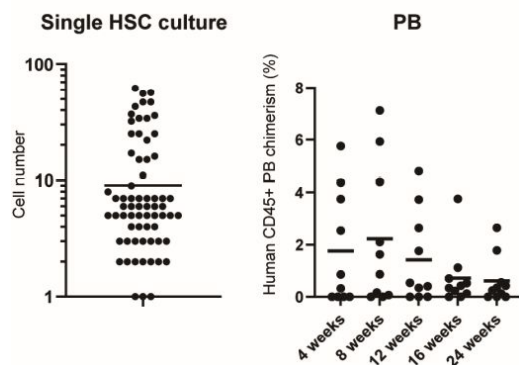


図 11

図 12

< 引用文献 >

1) Wilkinson AC et al., Nature. 2019;571:117-121.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakurai M, Nannya Y, Yamazaki R, Yamaguchi K, Koda Y, Abe R, Yokoyama K, Ogawa S, Mori T.	4. 巻 101
2. 論文標題 Germline RUNX1 translocation in familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ann Hematol.	6. 最初と最後の頁 237-239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00277-021-04430-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sakurai M, Okamoto S, Yamazaki S.
2. 発表標題 Development of culture system for human hematopoietic stem cells without cytokines
3. 学会等名 25th Annual Meeting of the European Hematology Association（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakurai M, Okamoto S, Yamazaki S.
2. 発表標題 Long-Term Expansion of Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in Cytokine-Free Conditions
3. 学会等名 62nd American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻井政寿、岡本真一郎、山崎聡
2. 発表標題 新たなヒト造血幹細胞培養法の確立
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------