

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08431

研究課題名（和文）胎児型造血幹細胞の成熟過程の解明と体外成熟化誘導法開発

研究課題名（英文）Development of a method to induce maturation of fetal hematopoietic stem cells

研究代表者

小林 央（Kobayashi, Hiroshi）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：10749542

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：胎児型造血幹細胞と成体型造血幹細胞の環境応答性の相違の解明：成体型造血幹細胞のマーカーは培養条件によって変化し、特にCpne2は間葉系細胞との共培養で緩やかに成熟する。一方、Ndrgr1の発現は間葉系細胞由来の因子が成熟過程を抑制することが示された。胎児型造血幹細胞の長期培養法による体外成熟化誘導：当初研究計画のサイトカインのカクテルによる未分化性維持は困難であったが、間葉系細胞共培養系の最適化により胎児型造血幹細胞は500日以上長期培養が可能で、大きな形質変化を起こさずに維持されることが確認された。さらに、造血幹細胞の遺伝子編集の改良とその応用についても複数の報告を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、造血幹細胞の成熟過程および培養に伴う機能変化の分子基盤が同定され、それを外的環境の調整で静止期・増殖期の性質を制御する方法論がもたらされることで、造血発生に関連する造血・免疫疾患の病態生理が明らかになり、関連した診断技術の基盤が創出されると期待される。また、限られた造血幹細胞移植ソースを増幅する際に、造血幹細胞を機能損失することなく安全に体外で増幅を維持する技術が開発されることが期待される。これらの技術開発により、従来治療法の限られた先天性免疫不全症や先天性代謝疾患にも造血幹細胞移植の適用範囲が拡大し、移植を必要とする患者への治療の提供が向上する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Differences in Environmental Responsiveness between Fetal and Adult Hematopoietic Stem Cells: Adult HSC markers change under various culture conditions. Cpne2 shows gradual maturation when co-cultured with mesenchymal cells. Ndrgr1 expression, induced by mesenchymal cell factors, suppresses part of the HSC maturation process. Long-term Culture of Fetal Hematopoietic Stem Cells: Fetal HSCs can be maintained for over 500 days without significant changes, demonstrating the feasibility of long-term culture. Identification of Maturation and Quiescence Factors: The maintenance ability of HSCs was compared among eight mesenchymal cell lines, identifying genes correlated with maintenance. Overexpression experiments and inhibitor screenings are ongoing to understand HSC maintenance and maturation. Research on gene editing of HSCs has also been published.

研究分野：血液、腫瘍内科学

キーワード：造血幹細胞 幹細胞成熟 遺伝子・細胞治療 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は一生にわたって血液の恒常性を維持する細胞である。造血幹・前駆細胞集団の構成は、造血系の発生期から成熟、加齢の各過程で体内を旅しながら変化していく。胎生期には、造血幹細胞は造血前駆細胞とともに活発な細胞分裂を行うのに対し、出生後は造血の場を骨髄に移し、成熟に伴って造血幹細胞は細胞周期の静止期性を獲得する。造血幹細胞が静止期となるのはマウスにおいては3週齢ごろ (Bowie, J Clin Invest. 2006)、ヒトにおいてはよく知られていないものの出生時の臍帯血造血幹細胞は少なくとも部分的には静止期となっている (Laurenti, Cell Stem Cell. 2015)。しかし、胎児型造血幹細胞が成体型造血幹細胞に成熟し、静止期を獲得するメカニズムはわかっていない。また、人為的に遺伝子導入を経ずに体外で胎児期造血幹細胞を成体型に成熟させる方法は未確立である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、胎児型造血幹細胞と成体型造血幹細胞の相違点は何か 胎児型造血幹細胞を成熟させる環境因子は何か 成熟化を促す分子メカニズムは何か の3点を明らかにすることである。これまでの研究から胎児造血幹細胞と成熟型造血幹細胞の遺伝子発現の相違の解析 (Li, Cell Stem Cell. 2020) や、機能的に重要な遺伝子として Sox17 (Kim, Cell. 2007) や Lin28b (Yuan, Science. 2012)、Hmga2 (Copley, Nat Cell Biol. 2013) などが報告されてきた。一方で成熟化を促す因子やそのメカニズムについては十分理解されておらず、また体外で造血幹細胞を成熟化させることはできていない。

申請者は骨髄環境を模倣した培養条件において成体型の造血幹細胞を静止期に維持する培養法を開発してきた (Cell Rep. 2019, STAR Protocols 2020)。その結果造血幹細胞の維持には、骨髄と同様に脂質が豊富に含まれる低酸素環境と生存維持に最低限度の低いサイトカイン濃度が必要であることがわかった。一方図1に示すように、本培養法を様々な成熟、加齢段階の造血幹細胞に適用すると、サイトカインに対して造血幹細胞数の維持や分化の方向性は加齢段階によって大きく異なることがわかっており、造血幹細胞の成熟過程をサイトカインに対する応答性によって定量化することができている。また、申請者らは以前から造血幹細胞の代謝計測に取り組んでおり (Cell Stem Cell 2013, BBRC 2019)、従来の遺伝子発現のみならず、メタボローム解析や、ATP濃度変化によっても造血幹細胞の成熟の程度を評価可能であることがわかってきた。また、胎児期造血幹細胞の成熟化が困難な理由として、胎児期造血幹細胞が培養下において速やかに分化誘導され、造血幹細胞が維持されないためであったが申請者は最近 IL-4 の添加により胎児造血幹細胞特異的に造血幹細胞が自己複製されることを見出した。これらの知見を組み合わせることで、既存の解析技術では評価できなかった造血幹細胞の成熟過程を定量的に理解するとともに、成熟化に必要な因子を独自に同定している IL-4 を基軸に同定し、さらにその作動メカニズムを明らかにしようと考えた。

## 3. 研究の方法

### 造血幹細胞の成熟化マーカーの探索

既存の新鮮胎生期造血幹細胞および成体造血幹細胞の RNA-seq データ、自身で採取した新鮮胎児造血幹細胞および、IL-4 を含むあるいは含まない各種培養条件下で培養した後の造血幹細胞の RNA-seq を比較することで、成体型に変化した後に発現が誘導される、あるいは減弱する遺伝子を網羅的に探索した。また、特に発現変動の大きな候補遺伝子については定量的 PCR 法によって検証を行った。

## 胎生期造血幹細胞の成熟化誘導因子の探索と成熟メカニズムの解明

当初予定していた IL4 を含む培地では長期間の細胞維持が困難であったことから、下記結果の中で示す通り、間葉系細胞との共培養系を確立した上で成熟化誘導因子の探索を行った。OP9 共培養系で培養した胎児造血幹細胞を FACS Aria III でソーティングを行い、培養後 5 日、10 日、14 日、28 日と各タイムポイントで成熟化マーカーに対して qPCR を行い、成熟の程度を評価した。また、同培養系を用いて、阻害剤ライブラリーを用いて造血幹細胞の維持が可能かどうかの検証を行った。

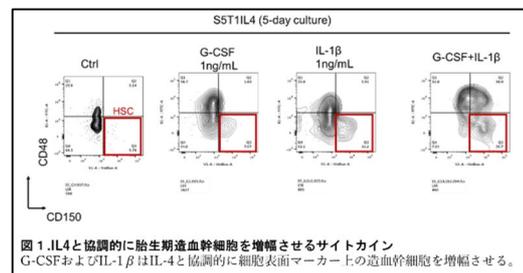
### 遺伝子機能解析のための遺伝子編集技術の開発

採取直後の造血幹細胞を高サイトカイン・高酸素条件で細胞周期に入れたのち、Cas9/guide RNA(RNP)複合体をエレクトロポレーションで細胞に導入した後、静止期維持培養下に戻すことで造血幹細胞を遺伝子編集したうえで静止期にする技術を開発した。さらに同様の方法をヒト臍帯血細胞でも実施した。またマウス Rosa26 ロカス、人 AAVS1 ロカスに相同な配列を有する AAV ベクターを RNP 複合体と同時に細胞内に導入することを同静止期化培養法と組み合わせることで静止期造血幹細胞に特化した遺伝子相同組換え法を開発した。

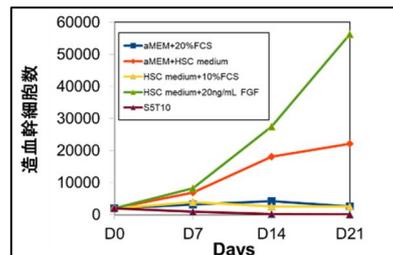
## 4. 研究成果

### 造血幹細胞の成熟化マーカーの探索

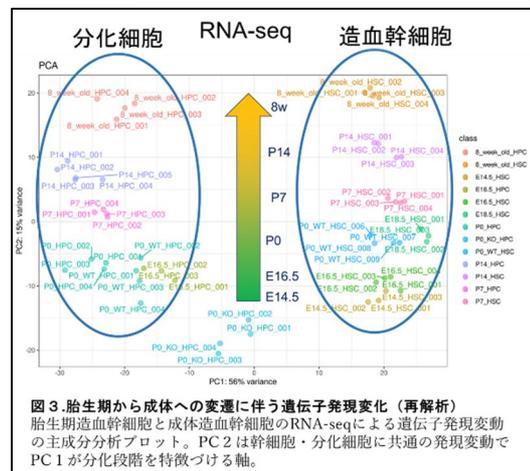
体外で成熟化する条件を詳細に検討する中で、予備的検討の中で得ていた IL-4 による胎児型造血幹細胞の増幅法をさらに改良した。その結果 G-CSF および IL-1 を 1ng/mL で加えることで細胞表面マーカー上の胎児型造血幹細胞は短期のうちに効率的に増幅させることができた(図1)。しかし予



想に反して本方法は、10 日以上培養で造血幹細胞機能を喪失すること、移植生着能の改善が認められないことから、体内での成熟過程と異なることがわかった。そこで、より生理的な成熟環境を探索する中で、旧来より知られる間葉系細胞株 OP9 との共培養系を利用し最適化することで持続的に胎児型造血幹細胞を培養することが可能となった(図2)。本方法による培養は 600 日以上造血幹細胞の体外維持を可能としきわめて骨髄生理的環境に近い培養条件と推測される。改めて本方法で造血幹細胞の成熟化を試みた。



最初に、成熟に伴って変化する遺伝子をデータベース上の RNA-seq データより抽出した(図3)。その上で qPCR で検証したところ、Muc13、Cpne2、Spns3 および Ndr1 が成熟に伴って増加する一方、Igf2bp3、Hmga2 の発現が減少することがわかった。これらのマーカーが in vivo および in vitro でどのように変化するか確認するために、胎児型造血幹細胞を生体内に移植、あるいは各種培養条件で培養した。成体型造血幹細胞マーカーは各種培養条件で様々な変化をし、早期成熟マーカーで



ある Muc13, Cpne2, Spns3 については長期間培養可能な間葉系細胞との共培養系においては生体内に類似した緩徐な成熟過程をとる(図4)。一方、4週齢以降に発現上昇する後期成熟マーカー Ndr1 の発現要因は不明であったが、間葉系細胞との共培養から、非共培養下で、静止期維持培養 (Kobayashi et al. Cell Rep.

2019)に戻すことで発現誘導が見られ、内在性のプログラムではなく、間葉系細胞由来の因子が造血幹細胞の成熟過程の一部を抑制していることがわかった。実際、600日以上培養した造血幹細胞についても Ndr1 の発現は認められなかったことから Ndr1 の発現は経時変化によらないことがわかる。

### 胎生期造血幹細胞の成熟化誘導因子の探索と成熟メカニズムの解明

胎児型造血幹細胞の培養期間を500日以上にまで延長しても大きな形質変化をさせずに培養させることが可能となっており、多くの成熟マーカーはOP9共培養下で発現が上昇することも確認された。さらに移植後の機能解析では骨髓球優位の成体型の骨髓再構築を示したことから、OP9に由来する因子が造血幹細胞を成熟かつ維持させることがわかった。それではOP9の成熟化因子とは何か。胎児造血幹細胞を培養可能な間葉系細胞と維持不可能な間葉系細胞との違いを評価することで成熟化因子を同定することを試みる。8種類の間葉系細胞株について造血幹細胞の維持能を比較し(図5)、それぞれの細胞株をRNA-seqに供した。その中で、造血幹細胞の維持能と高い相関を示す遺伝子を複数同定した(図6)。これらの遺伝子について過剰発現系を用いて、造血幹細胞非維持細胞が造血幹細胞維持可能細胞に変化するかどうかを検証している段階である。

また、造血幹細胞側の成熟因子を検討するために、間葉系細胞共培養系において造血幹細胞の維持が不可能になる阻害剤のスクリーニングを行った(図7)。いくつかの阻害剤によって間葉系細胞の維持能が失われたことから、これら阻害剤のターゲットが造血幹細胞の維持・成熟に関わっていると推測された。今後これらのターゲット分子の検証を行っていく。

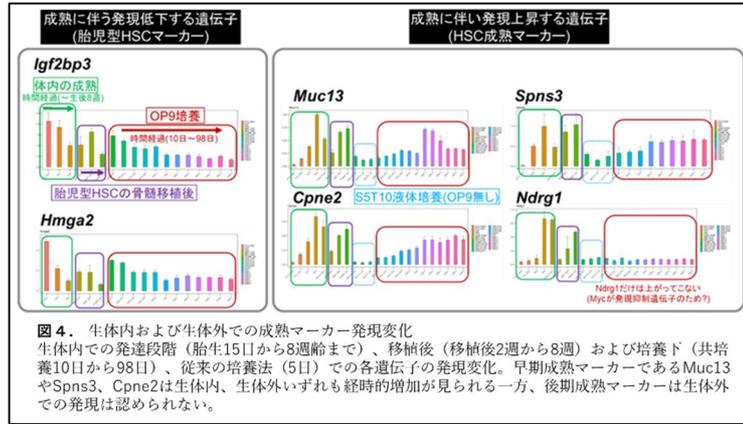


図4. 生体内および生体外での成熟マーカー発現変化。生体内での発達段階(胎生15日から8週齢まで)、移植後(移植後2週から8週)および培養下(共培養10日から98日)、従来の培養法(5日)での各遺伝子の発現変化。早期成熟マーカーであるMuc13やSpns3、Cpne2は生体内、生体外いずれも経時的増加が見られる一方、後期成熟マーカーは生体外での発現は認められない。

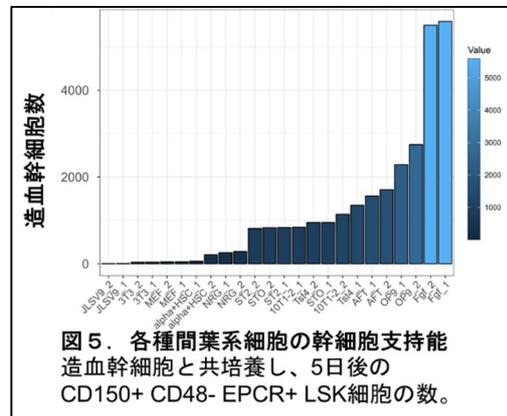


図5. 各種間葉系細胞の幹細胞支持能。造血幹細胞と共培養し、5日後のCD150+ CD48- EPCR+ LSK細胞の数。

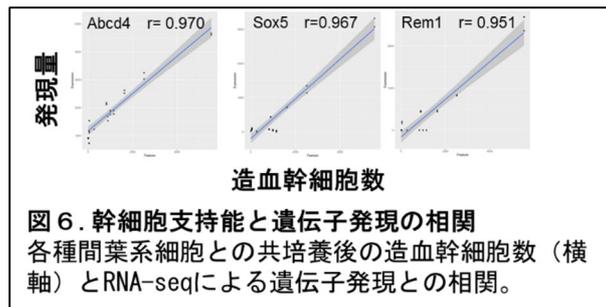


図6. 幹細胞支持能と遺伝子発現の相関。各種間葉系細胞との共培養後の造血幹細胞数(横軸)とRNA-seqによる遺伝子発現との相関。

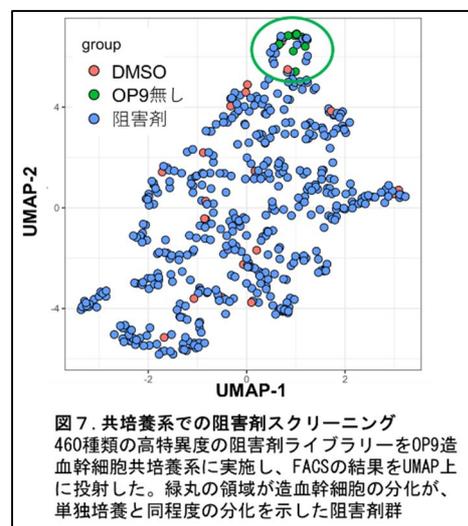
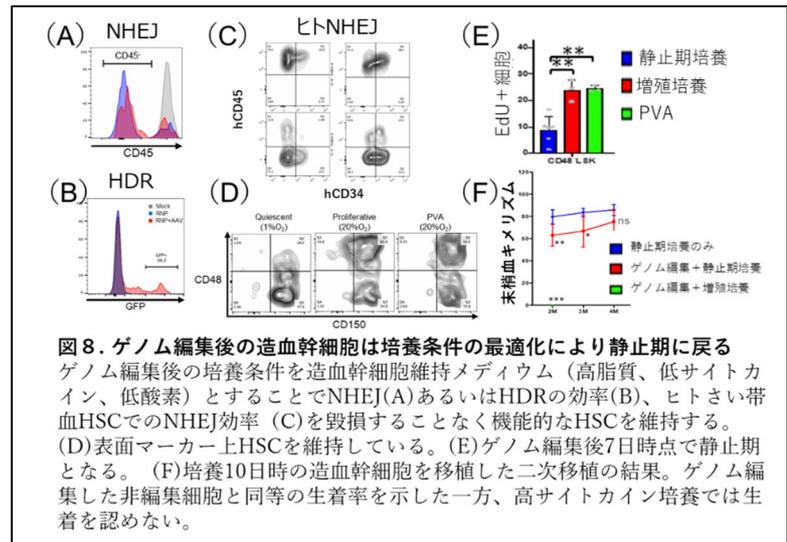


図7. 共培養系での阻害剤スクリーニング。460種類の高特異度の阻害剤ライブラリーをOP9造血幹細胞共培養系に実施し、FACSの結果をUMAP上に投射した。緑丸の領域が造血幹細胞の分化が、単独培養と同程度の分化を示した阻害剤群

### 遺伝子機能解析のための遺伝子編集技術の開発

造血幹細胞のゲノム編集技術の開発は、より速やかな造血幹細胞制御遺伝子の探索に資するとともに、臨床応用上も変異遺伝子の修復等を介した疾患治療に有用な技術であるものの、造血幹細胞の機能を維持した上でのゲノム編集法は十分に開発されていなかった。この研究では上述の静止期維持培養法と CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集技術を組み合わせることで、ゲノム編集効率を落とすことなく（適切なガイド RNA を用いれば 90% 以上）少なくとも 1 週間にわたってゲノム編集後の静止期造血幹細胞を機能維持であることを確認した(図8)。更に、AAV ベクターを用いたノックインも高効率で実施すること、ヒト臍帯血においてもゲノム編集後に同様に静止期化することが可能であることを示した（*Cell Reports Methods* 2022, *Star Protocols* 2023, *Exp Hematol* 2023）。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shiroshita Kohei, Kobayashi Hiroshi, Watanuki Shintaro, Karigane Daiki, Sorimachi Yuriko, Fujita Shinya, Tamaki Shinpei, Haraguchi Miho, Itokawa Naoki, Aoyama Kazumasa, Koide Shuhei, Masamoto Yosuke, Kobayashi Kenta, Nakamura-Ishizu Ayako, Kurokawa Mineo, Iwama Atsushi, Okamoto Shinichiro, Kataoka Keisuke, Takubo Keiyo	4. 巻 2
2. 論文標題 A culture platform to study quiescent hematopoietic stem cells following genome editing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100354 ~ 100354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2022.100354	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 -

1. 著者名 Sorimachi Yuriko, Kobayashi Hiroshi, Shiozawa Yusuke, Koide Shuhei, Nakato Ryuichiro, Shimizu Yukiko, Okamura Tadashi, Shirahige Katsuhiko, Iwama Atsushi, Goda Nobuhito, Takubo Kaiyo, Takubo Keiyo	4. 巻 AOP
2. 論文標題 Mesenchymal loss of p53 alters stem cell capacity and models human soft tissue sarcoma traits	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2023.03.009	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 -

1. 著者名 Kobayashi Hiroshi, Watanuki Shintaro, Takubo Keiyo	4. 巻 11
2. 論文標題 Approaches towards Elucidating the Metabolic Program of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3189 ~ 3189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11203189	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 -

1. 著者名 Watanuki Shintaro, Kobayashi Hiroshi, Takubo Keiyo	4. 巻 On line
2. 論文標題 Context-Dependent Modification of PFKFB3 in Hematopoietic Stem Cells Promotes Anaerobic Glycolysis and Ensures Stress Hematopoiesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 1 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.03.16.532898	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Suchacki Karla J, Thomas Benjamin J, Ikushima Yoshiko Matsumoto, Kobayashi Hiroshi, Cawthorn William P	4. 巻 12
2. 論文標題 The effects of caloric restriction on adipose tissue and metabolic health are sex- and age-dependent	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 88080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.88080	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 Kobayashi Hiroshi, Takubo Keiyo	4. 巻 171
2. 論文標題 A Culture Method to Maintain Quiescent Human Hematopoietic Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/61938	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 -

1. 著者名 Shiroshita Kohei, Kobayashi Hiroshi, Watanuki Shintaro, Karigane Daiki, Sorimachi Yuriko, Tamaki Shinpei, Haraguchi Miho, Yamamoto Masamichi, Nakamura-Ishizu Ayako, Okamoto Shinichiro, Kataoka Keisuke, Takubo Keiyo	4. 巻 124
2. 論文標題 Distinct roles of the preparatory and payoff phases of glycolysis in hematopoietic stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 56 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2023.06.003	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 -

1. 著者名 Shiroshita Kohei, Kobayashi Hiroshi, Takubo Keiyo	4. 巻 4
2. 論文標題 Evaluating the function of murine quiescent hematopoietic stem cells following non-homologous end joining-based genome editing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102347 ~ 102347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2023.102347	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 -

1. 著者名 Takubo Keiyo, Htun Phyto Wai, Ueda Takeshi, Sera Yasuyuki, Iwasaki Masayuki, Koizumi Miho, Shiroshita Kohei, Kobayashi Hiroshi, Haraguchi Miho, Watanuki Shintaro, Honda Zen-ichiro, Yamasaki Norimasa, Nakamura-Ishizu Ayako, Arai Fumio, Motoyama Noboru, Hatta Tomohisa, Natsume Tohru, Suda Toshio, Honda Hiroaki	4. 巻 120
2. 論文標題 MBTD1 preserves adult hematopoietic stem cell pool size and function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2206860120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2206860120	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 -

1. 著者名 Iga Takahito, Kobayashi Hiroshi, Takubo Keiyo, Kubota Yoshiaki	4. 巻 25
2. 論文標題 Spatial heterogeneity of bone marrow endothelial cells unveils a distinct subtype in the epiphysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1415 ~ 1425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-023-01240-7	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hiroshi Kobayashi, Keiyo Takubo
2. 発表標題 Maintenance of HSC quiescence in vitro and its application to genome editing.
3. 学会等名 JPAN-UK joint meeting in Tokyo
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroshi Kobayashi, Shintaro Watanuki, Keiyo Takubo
2. 発表標題 The Pbx1-G9a axis dysregulates lineage output of old hematopoietic stem cells.
3. 学会等名 第20回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2023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
---------	---------