

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 革新的幹細胞培養技術に基づいた造血幹細胞遺伝子編集の開発研究
(英語) Gene editing of hematopoietic stem cells based on an innovative culture technology

研究開発実施期間：2018年10月15日～2021年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 田久保 圭誉
(英語) Keiyo Takubo

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

(日本語) 国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・生体恒常性プロジェクト長

(英語) Department of Stem Cell Biology, National Center for Global Health and Medicine Research Institute, Project Director

II 研究開発の概要

造血幹細胞は自己複製能と血液細胞への多分化能を有し、生後の血液細胞システムを維持する典型的な組織幹細胞である。造血器腫瘍を中心とした疾患の根治的治療である造血幹細胞移植では、ドナー造血幹細胞ソースとして、同種あるいは自己造血幹細胞や、保存臍帯血が利用されている。しかし、ドナー数が限られていることなどから、既存の造血幹細胞ソースの有効活用、すなわち細胞数や機能の強化は必要とされている技術である。一方、造血幹細胞レベルの単一遺伝子変異に由来する血液細胞や免疫細胞の機能異常が引き起こす疾患も知られている。その治療法として、造血幹細胞を体外で遺伝子導入あるいは編集し、遺伝子治療に利用する試みが長く行われてきた。既に臨床応用に到達した技術も出現して、一定の成功が収められている。この際、ベクター利用の有無を問わず、造血幹細胞を一度体外で培養する過程があり、技術改良によってさらなる治療の効果の増強が期待できる。

近年、造血幹細胞の培養技術の開発ではいくつかの発見があり、マウスやヒトでは各種の低分子化合物や培養器材の使用が造血幹細胞の増幅に寄与することが示されるなど、活発な研究が行われている。報告されているいずれの方法も増殖を継続的に支持することができるが、体内の造血幹細胞の特徴である細胞周期の静止期状態は失われる。定常状態の造血幹細胞を、静止期から活性化し増殖させると、その分裂回数が増えるほど、細胞老化や遺伝子変異蓄積が増加しうるが、“適切なレンジ”の細胞増殖が達成されていないため、これらの懸念は払拭されていない。また、培養によって、表面マーカーが変調することも報告されている。一方、造血幹・前駆細胞の遺伝子編集技術の論文報告もあるが、これらは造血幹細胞に特化していないため、他の分化した前駆細胞に比べて造血幹細胞における遺伝子編集効率は高くないことも知られるようになっている。こうした状況であるため、新たなアプローチとして造血幹細胞を極力細胞周期や表面マーカーを本来の状態に留める培養技術を開発し、それに基づいて遺伝子・細胞治療に資する遺伝子編集技術の基盤的な知見を得ることが有益と考えられる状況である。

そこで本研究では、造血幹細胞の長期培養系の洗練を、特に細胞周期の静止期性に着目した開発を行い、細胞周期の過剰活性化や表面マーカー変化を極力防止することを目指した。また、この培養技術をヒトへと最適化した。以上の計画の実施を通じて造血幹細胞を用いた再生医療・遺伝子治療の際の問題点である、体外培養時の幹細胞活性低下を防止することをねらいとした研究計画をのべ3年度、実質2年5か月強、にわたって実施した。具体的には、造血幹細胞を利用した再生医療・遺伝子治療技術に資する革新的なヒト造血幹細胞培養システム—とりわけこれまで不可能であった細胞周期の静止期性の維持を試験管内で可能とする培養系—を確立した。特に、本研究では生体内に存在しない物質を極力使用せず、表面形質も新鮮造血幹細胞同様に維持することとし、さらにそれに基づいた遺伝子導入・編集の基盤を築くことを目標とした。3年度の研究実施を通じてこれらの目標はいずれも達成された。以下に具体的な研究成果を述べる：

1) 造血幹細胞の体外維持培養法の洗練とヒトへの最適化

これまで研究開発代表者のグループは、造血幹細胞の代謝制御が幹細胞の特性維持に不可欠であることを見出してきた。それぞれの代謝経路や代謝物は、定常状態やストレス負荷時において造血幹細胞の機能の維持と制御に不可欠であると考えられた。

そこで、得られた造血幹細胞の代謝学的理解に基づいた造血幹細胞の維持培養の検討を実施してきた。その結果、本研究に先立って、骨髄の代謝物環境を模した化学的に定義された培地組成を考案し、マウス造血幹細胞を体外で表面マーカーを維持したまま細胞周期を静止期化して1か月間維持可能となることを見出していた。この知見を手掛かりに、体外維持培養法を洗練し、ヒト造血幹細胞の静止期維持培養へと最適化した。

本研究開発期間ではまず、見出してきた培養条件で連続移植活性を持つ高品質のマウス造血幹細胞が維持されていることを確認した。この新規造血幹細胞培養システムは、体外で造血幹細胞の過剰増殖を防ぎ、新鮮造血幹細胞と同等の幹細胞数と活性を維持できる。本培養の必須要件は「高濃度の脂肪酸結合アルブミン」、「低濃度のサイトカイン SCF と TPO の組み合わせ」、そして「低酸素分圧」であった。特に、高濃度の脂肪酸結合アルブミンが存在しないと、低サイトカイン・低サイトカイン条件ではアポトーシスが誘導されて造血幹細胞が失われた。

次に、マウスで得た知見をヒト造血幹細胞へと応用・最適化して、静止期維持培養法の開発を行った。はじめに、SCF と TPO という造血幹細胞に必須のサイトカイン濃度の組み合わせの検討を網羅的に実施して、サイトカインマッピングの作成を行った。その結果、ヒト造血幹細胞はマウス造血幹細胞と異なって低 TPO 領域では細胞生存ができないという特徴を呈した。サイトカインマッピングをもとに造血幹細胞分画が増殖せず数的に維持されるサイトカイン濃度を設定したところ実際に4週間にわたり試験管内で細胞数をほぼ維持して、分化細胞産生を抑制した細胞周期の静止期性と、未分化性を保った培養が可能になった。この際、マウス同様に高濃度のアルブミンは必須であり、高濃度アルブミン存在下において最も未分化なヒト造血幹細胞分画である CD34+CD38-CD90+CD45RA-分画が維持された。一般的に汎用されてきた培養条件である 0.1%アルブミン存在下では同分画は失われた。一方、マウス造血幹細胞では必要ではないヒト造血幹細胞が固有に必要とする因子として、コレステロールを見出した。特に高脂肪酸培養においてはコレステロールによってヒト造血幹細胞数が維持された。高アルブミンが不可欠であることをさらに詳細に解析するために、脂肪酸を除いたアルブミンを用いた検討を行ったところ、脂肪酸生合成酵素群の発現が上昇することが見いだされたため、高濃度の脂肪酸結合アルブミンが、マウス同様にヒト造血幹細胞においても必要であることが確認された。インスリンはマウス造血幹細胞においては Akt シグナル活性化を通じて造血幹細胞を枯渇させる因子と考えられている。そこで、ヒト造血幹細胞におけるインスリンの効果を検討したところ、インスリンはヒト造血幹細胞の維持培養に必要であることが示唆された。すなわち、サイトカイン TPO の必要性の高さとコレステロール、インスリン要求性が、ヒト造血幹細胞の静止期培養において重要な種間の差であることが示唆された。加えて、近年報告されたヒト造血幹細胞を増幅する低分子化合物である SR1 と UM171 が私たちのヒト造血幹細胞の静止期維持培養に有用であるか検討した。その結果、増殖条件（高サイトカイン条件）ではこれらの低分子化合物はヒト造

血幹細胞の頻度を増加させる傾向を示したが、静止期維持する培養条件ではそうした効果は観察されなかった。

これらの成果を取りまとめて、マウス及びヒト造血幹細胞の静止期を維持し表面マーカー変化を極力防止する培養法を論文報告し、当センターとAMEDとで共同プレスリリースした(Kobayashi et al., Cell Rep 2019)。

2) 新規造血幹細胞培養を用いたヒト造血幹細胞の遺伝子編集技術の開発

造血幹細胞の遺伝子編集技術の開発においては、「前培養」、「遺伝子編集」、「後培養」、「編集効率確認」という4ステップが必要である。そこで、まず「前培養」「後培養」に上記静止期培養を利用することで幹細胞維持が可能であるかをまず検討した。その結果、「後培養」で静止期培養を(高サイトカインを中心とした増殖培養に比して)利用することは遺伝子編集後の造血幹細胞維持効果が大きいことが見いだされた。ただし、報告した静止期培養とはサイトカイン濃度がやや異なり、培養条件の至適化が必要であった。「前培養」については細胞周期を静止期から離脱させることが必要で、ただし、静止期培養同様に十分な脂肪酸等の代謝物供給は必要であった。培養時間の検討も行い、既報の造血幹・前駆細胞の遺伝子編集時にはわずか3時間の培養が最も編集効率が高いとされていたが、自験の造血幹細胞の遺伝子編集には必ずしもその条件は指摘でなく、この点についても至適化が必要であった。「遺伝子編集」には、ベクターを考慮しなくて良い方法を採用し、各種導入条件を網羅的に比較検討して条件決定を完了した。また、導入時に必要とされる細胞数は1回当たり数百個程度まで減らしても効率を下げることなく遺伝子編集が可能であることも確認した。「編集効率確認」においても数百個未満の細胞の回収から編集効率の推定を可能にして、高効率の編集が可能であることを確認した。

In this project, we developed a sophisticated long-term culture system for hematopoietic stem cells, with a particular focus on the quiescent nature of the cell cycle, to prevent cell cycle overactivation and surface marker changes as much as possible. We also optimized this culture technique for humans. Through the implementation of the plan described above, we have carried out a research plan aimed at preventing the decline in stem cell activity during in vitro culture, which is a problem in regenerative medicine and gene therapy using hematopoietic stem cells for two years and five months. Specifically, we established an innovative culture system for hematopoietic stem cells that contributes to regenerative medicine and gene therapy using hematopoietic stem cells, in particular, a culture system that can maintain the quiescence of the cell cycle in vitro, which has been impossible until now. We have achieved all of these goals through three fiscal years of research. The following is a summary of the results of our research.

(1) Refinement of the in vitro maintenance culture method of HSCs and optimization of the method for humans

The PI's group previously found that metabolic regulation of HSCs is essential for maintaining stem cell properties. Each metabolic pathway and metabolite was considered to be essential for the maintenance and regulation of HSC function under steady state and stress conditions. Therefore, we have been investigating the maintenance culture of HSCs based on the obtained metabolic understanding of HSCs. As a result, prior to the present study, we had devised a chemically defined medium composition that mimics the metabolite environment of bone marrow, and found that mouse HSCs can be maintained in vitro for one month in a cell cycle quiescent phase while maintaining their surface markers. Using this finding as a clue, we refined the in vitro maintenance culture method and optimized it for the quiescent maintenance culture of human hematopoietic stem cells.

In this R&D period, we first confirmed that high-quality mouse HSCs with serial transplantation capacity were maintained under the culture conditions we had found. This novel HSC culture system can prevent the overgrowth of HSCs in vitro and maintain the same number and activity of stem cells as fresh HSCs. The essential requirements for this culture were "high concentration of fatty acid-bound albumin", "combination of low concentration of cytokines SCF and TPO", and "low oxygen partial pressure". In particular, in the absence of a high concentration of fatty acid-bound albumin, apoptosis was induced and HSCs were lost under low-cytokine and low-cytokine conditions.

Next, we applied and optimized the findings obtained in mice to human HSCs to develop a quiescent maintenance culture method. First, we examined the combination of SCF and TPO, two cytokines essential for HSCs, and performed cytokine mapping. The results showed that human HSCs, unlike mouse HSCs, could not survive in the low TPO concentration. Based on the cytokine mapping, we set the concentration of cytokines at which the HSC fraction did not proliferate but was maintained in number, and the number of cells was maintained for 4 weeks in vitro. As in mice, high concentrations of albumin are essential, and the most undifferentiated fraction of human hematopoietic stem cells (CD34+CD38-CD90+CD45RA- fraction) was maintained in the presence of high concentrations of albumin. In contrast, the CD34+CD38-CD90+CD45RA- fraction, which is the most undifferentiated fraction of human HSCs, was not maintained in the presence of 0.1% albumin, a

commonly used culture condition. Notably, cholesterol was found to be an intrinsic factor required by human HSCs but not by mouse HSCs. The number of human HSCs was maintained by cholesterol, especially in high-fatty acid cultures. In order to further analyze the necessity of high albumin, we examined albumin without fatty acids and found that the expression of fatty acid biosynthetic enzymes was increased, indicating that high concentrations of fatty acid-bound albumin are required for human HSCs as well as for mice. Insulin was found to increase the expression of the mouse HSCs. Insulin is thought to be a factor that depletes HSCs through activation of Akt signaling in mouse HSCs. Therefore, we examined the effect of insulin on human HSCs and suggested that insulin is necessary for the maintenance and culture of human HSCs. In other words, the high requirement of the cytokine TPO, cholesterol, and insulin requirement were suggested to be important interspecies differences in the quiescent culture of human HSCs. In addition, we investigated whether recently reported small molecule compounds that amplify human HSCs, SR1 and UM171, are useful for quiescent maintenance culture of our human HSCs. The results showed that these small molecule compounds tended to increase the frequency of human HSCs under proliferative conditions (high cytokine conditions), but no such effect was observed under quiescent maintenance culture conditions.

These results were summarized in a paper on a culture method to maintain quiescence of mouse and human HSCs and prevent surface marker changes as much as possible, which was jointly released in press by NCGM and AMED (Kobayashi et al., Cell Rep 2019).

(2) Development of gene editing technology for human hematopoietic stem cells using a novel hematopoietic stem cell culture

In the development of gene editing technology for hematopoietic stem cells, four steps are necessary: "pre-editing culture," "gene editing," "post-editing culture," and "confirmation of editing efficiency". Therefore, we first examined whether it is possible to maintain stem cells by using the above quiescent culture for "pre-editing culture" and "post-editing culture". As a result, the use of quiescent culture in "post-editing culture" (as opposed to proliferating culture with high cytokines) was more effective in maintaining hematopoietic stem cells after gene editing. However, the cytokine concentration was slightly different from that of the quiescent culture reported in the study without gene editing, and the culture conditions needed to be optimized. For "pre-editing culture", cell cycle activation was required, but it was necessary to supply sufficient metabolites such as fatty acids as in the quiescent culture without gene editing. Although a pre-editing culture time of only 3 hours was reportedly the most efficient for gene editing of hematopoietic stem/progenitor cells, this condition was not necessarily optimized for gene editing of highly-purified hematopoietic stem cells, and optimization was also necessary. We also confirmed that gene editing was possible even if the number of cells was several hundred cells without reducing the efficiency. In the "confirmation of editing efficiency", it was possible to estimate the editing efficiency from a few hundred cells. Based on these experiments, we confirmed that highly efficient editing was possible.