

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業
事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 造血幹細胞成熟プログラムの理解と成熟誘導技術の創出
(英語) Spatiotemporal programs regulating hematopoietic stem cell maturation

研究開発実施期間: 令和2年6月1日～令和5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・プロジェクト長
(英語) National Center for Global Health and Medicine, Research Institute, Department of Stem Cell Biology, Project Director

II 研究開発の概要

造血幹細胞移植は、造血器腫瘍等の根治療法である骨髄再生医療である。とりわけ我が国では、社会の少子超高齢化の進展によって、今後のドナーの確保や臍帯血バンクの拡充に様々な困難が懸念される。その一方で、技術革新により発展著しい遺伝子・細胞治療のための造血幹細胞培養・移植技術のニーズも高まっている。これに呼応して、単離された造血幹細胞の体外培養による増幅や、多能性幹細胞からの造血幹細胞の分化誘導が技術開発されている。様々な化合物やポリマー、ハイドロゲルを活用した体外培養によって増幅が可能になりつつあるが、増幅後は表面マーカー上の幹細胞数に見合うほどの生着は得られておらず、造血幹細胞培養を改善できる余地は多いと考えられる。一方、多能性幹細胞からはまだ胎児型の造血幹前駆細胞が作成されてきた段階である。こうした状況は、造血幹細胞を活用した再生医療のポテンシャルを制限する。それだけではなく、例えば患者由来造血幹細胞を高度に増幅、あるいは疾患 iPS 細胞から成体型造血幹細胞を作成することによる血液・免疫病態のモデリングや、新規の診断法の模索や治療薬の探索を実施することも困難である。

これらの問題点のなかで一つ手付かずのまま残されている課題として、造血幹細胞が胎児型から成体型に成熟する過程の理解が不完全で、人為的に成熟を誘導する方法が存在しないことが挙げられ、骨髄再生医療の有用性を制限する技術的障壁にもなっている。幹細胞成熟という現象は、発生過程で臓器横断的に生じると一般に考えられている。他の臓器システムでは徐々にそのメカニズムが明らかとなっており、例えば多能性幹細胞からの分化細胞誘導においても活用されている。しかし、造血幹細胞においては成熟の分子機構のみならず成熟過程の実態や素過程も明らかではない。成体型の造血幹細胞を他の未分化造血細胞(胎児型造血幹細胞を含む)と区別する特徴としては「細胞周期の静止期性」が挙げられる。しかし、成熟過程で静止期性を獲得する場所や外因性・内因性の誘導機構は、既存の転写因子やサイトカイン欠損マウス等の古典的な解析でもたらされた情報のみでは不明な点が多い。そこで、本研究開発課題においては、造血幹細胞成熟時の時空間的な静止期性獲得の実態と、そのメカニズムを明らかにした上で、胎児型から成体型造血幹細胞への移行を体外環境で再現する培養技術を確立して問題解決を図ることを提案した。これまで研究開発代表者は、成体型の造血幹細胞の細胞周期静止期維持や細胞分裂の際に、代謝経路の精密な調節(代謝プログラム)が必要であることを示し、その上流では非古典的ニッチ因子である低酸素分圧や代謝物供給の重要性を報告した。また、低酸素分圧や代謝物条件を至適化することで、体外で造血幹細胞を静止期にとどめることにも成功してきた。

本研究開発課題ではこれらの経験に基づいて、計3年度の研究期間を通じて、造血幹細胞成熟現象を特に細胞周期の静止期獲得に着目するアプローチで解析を実施し、幹細胞成熟の素過程の理解と分子機構の解明を行い、それに加えて人為的な成熟誘導技術を開発するべく研究開発を進めた。分担研究者との協働を進めることで、サイトカインの作動機構の解析や、オミクス解析も実施し、統合的な知見を得るように努めた。

第1年度である令和2年度はまず、造血幹細胞に関する各種の omics 解析と、体外培養とを実施して、胎児型と成体型の造血幹細胞の代謝物依存性と細胞内の代謝特性(代謝プログラム)を解析し、データセットを取得した。トランスクリプトーム以外の omics 階層では、細胞周期の静止期獲得過程が遺伝子発現以上に不連続な変化として観察されて、この時期の代謝プログラムの変化に注目して成熟誘導シグナルを探索して候補シグナル経路を同定した。一方、培養による検討に関しては、これまでサイトカイン濃度の漸減で、増殖する成体型の造血幹細胞を静止期化できることを見出していたことから、同様に成熟過程の幹細胞においても類似した条件の培養が効果を有すると考えて検討を行った、様々なサイトカイン濃度や組み合わせの効果を網羅的に試行したが、胎児型幹細胞は培養中から速やかに失われてしまい、成体型と違う外部因子依存性が示唆された。研究開発分担者は成熟過程の造血幹細胞のトランスクリプトーム解析やサイトカイン要求性の遺伝学的解析を実施することで研究開発代表者の検討を支援した。

引き続き第2年度である令和3年度には、前年度の検討から明らかとなった胎児型造血幹細胞は成体型造血幹細胞の培養条件では体外では全く維持できないという点に着目し、胎児型造血幹細胞を維持可能な体外培養法の確立に努めた。培養条件の検討の範囲を代謝物等も含めてさらに広げて継続して、胎児型造血幹細胞に成熟を誘導する因子の探索を行った。成体型造血幹細胞の培養条件を出発点にして、サイトカインや代謝物濃度の組み合わせ等を試行して、表面マーカーや遺伝学的レポーター等を指標に胎児型造血幹細胞に成熟を誘導する因子を探索した。特に、成体型では必要とされない因子の検討を精力的に実施した。また、造血幹細胞の必須サイトカイン・トロンボポエチンの応答性の変化や、既報で高い有用性が報告されたポリマー分子など、生体内には存在しない化合物の効果の精密な検討も実施した。そして最終的に成熟造血幹細胞とは異なる培養条件を見出すことができた。同定された条件が胎児型造血幹細胞に及ぼす効果をトランスクリプトーム解析等で検証した。その一方、造血幹細胞の成熟過程の指標となるマーカー遺伝子の探索を実施し、マウスにおいて造血幹細胞成熟マーカー遺伝子セットを取得した。多くは造血幹細胞システムにおいては機能が未知であった。研究開発分担者はこれらに関連する各種微量サンプルのトランスクリプトーム・エピゲノム解析や、サイトカインの意義の動物モデルを活用した遺伝学的検証を行い、成熟度の検証と種間の異同をもたらす分子基盤とを解析することで研究開発代表者の検討を支援した。

最終年度・第3年度である令和4年度には、本研究開発の第1年度・第2年度に立ち上げた胎児型造血幹細胞の培養システムをさらに洗練しながら、得られた知見を基にして研究を推進することで、成熟過程が実際に生じているのか否かについての検証を行った。前年度までの検討で見出した胎児型造血幹細胞の体外培養においては成体型とは異なる培養条件が存在することが示唆されたが、その長期培養の可能性、成熟の有無は不明であった。そこで胎児型造血幹細胞を同定した培養条件で長期に培養したところ、表面マーカー上の造血幹細胞の増殖効果が認められた。さらに、同定された培養条件が胎児型造血幹細胞の成熟効果を有するか、解析を実施したところ、培養過程における成熟が誘導可能であることが示された。なお、マウスに加えてヒト造血幹細胞の成熟を規定するマーカーの探索を実施したところ、種特有の成熟マーカー因子が同定された。加えて、ヒト臍帯血造血幹細胞を単離・培養したところ、ヒトに至適化した長期間の維持培養条件で成熟誘導を試験管内で可能であることが見出された。

これらの検討過程では、マウスおよびヒト造血幹細胞の静止期培養法のプロトコルの詳細をそれぞれ取りまとめて報告することもできた(Kobayashi et al., STAR Protocols 2020, Kobayashi et al., J Vis Exp 2021)。また、成熟過程で観察される造血幹細胞の静止期化を、人工的に誘導できるかを生体骨髄の造血幹細胞をサイトカインで刺激したモデルを利用して検討し、実際に可能であることを確認した。この手法に、造血幹細胞に最適化したCRISPR-Cas9ゲノム編集システムを組み合わせることで、造血幹細胞の静止期維持機構の解析も可能な実験方法を同定した。造血幹細胞の細胞周期の静止期を研究するための信頼性の高いプラットフォームは、遺伝子改変マウス以外にはほとんどないために有用なアプローチであると考えている。なお、造血幹細胞を前培養することで、リボ核タンパク質複合体の核内輸送が促進され、編集効率が向上することを実証しており、さらなる遺伝子編集効率の改善のための端緒を得ている。遺伝子編集後の培養では、非相同末端結合に基づき編集されたマウスおよびヒト造血幹細胞を低サイトカイン、低酸素、高アルブミン条件下で培養すると、増殖条件下で培養したものより表現型と静止状態を良好に保持できることも確認できた。この結果は、遺伝子編集造血幹細胞の低サイトカイン培養条件が、造血幹細胞の静止状態を生体外で調べるために有用なアプローチであることを示しており、原著論文として報告し(Shiroshita and Kobayashi et al., Cell Reports Methods 2022)、プロトコルの詳細も報告した(Shiroshita et al., STAR Protocols 2023)。

以上の成果は、造血幹細胞の成熟度の検証や種間の異同をもたらす分子基盤を明らかにし、培養を起点に人為的に成熟を誘導可能であることも実証できた。さらに、成熟で生じる細胞周期の静止期化で得た知識から、遺伝子編集時にいったん増殖誘導された成体造血幹細胞を再度細胞周期の静止状態へと導ける培養

プラットフォーム開発にも成功した。今後はさらに成熟誘導培養を改良し、関与する因子・細胞内機構を明らかにすることで、造血幹細胞の成熟誘導技術をより高度化できると考えられた。また、造血幹細胞の高精度な遺伝子改変・編集によって、特性の生物学的な解析や各種疾患治療用の人工細胞としての多機能造血幹細胞の開発が可能になることも期待される。

Hematopoietic stem cell (HSC) transplantation is a bone marrow regenerative medicine that is a curative therapy for hematopoietic tumors. There are concerns about various difficulties in securing donors and expanding cord blood banks in the future due to the declining birthrate and super-aging society. On the other hand, there is a growing need for hematopoietic stem cell culture and transplantation technology for gene and cell therapy, which has been developing rapidly due to technological innovation. In response, technologies have been developed for amplification of isolated HSCs by in vitro culture and induction of differentiation of HSCs from pluripotent stem cells. Amplification is becoming possible by in vitro culture utilizing various compounds, polymers, and hydrogels. However, after amplification, the number of stem cells on the surface marker has not been sufficient for the number of viable cells, and there is much room for improvement in HSC culture. On the other hand, fetal-type hematopoietic stem progenitors have yet to be generated from pluripotent stem cells. This situation simply limits the potential of regenerative medicine utilizing HSCs. It is also difficult, for example, to model hematological and immunological pathologies by highly amplifying patient-derived HSCs or generating adult-type HSCs from diseased iPS cells, or to search for new diagnostic methods or therapeutic agents.

In this project, we have analyzed the phenomenon of HSC maturation, especially the acquisition of quiescence in the cell cycle, to understand the elementary process of stem cell maturation to elucidate the molecular mechanism, and to develop an artificial maturation induction technique. In addition, we have been developing a technology to artificially induce maturation. In collaboration with other core scientists, we also analyzed the mechanisms of cytokinesis and conducted omics analysis to obtain integrated knowledge. During the course of these studies, we were also able to compile and report details of quiescent culture protocols for mouse and human HSCs, respectively (Kobayashi et al., STAR Protocols 2020, Kobayashi et al., J Vis Exp 2021). We also examined whether the quiescence of HSCs observed during maturation can be induced artificially using a model in which HSCs in living bone marrow are stimulated with cytokines, and confirmed that this is indeed possible. By combining this method with the CRISPR-Cas9 genome editing system optimized for HSCs, we identified an experimental method that can also analyze the quiescence maintenance mechanism of HSCs. We believe this is a useful approach because there are few reliable platforms for studying the quiescent phase of the cell cycle of HSCs other than genetically engineered mice. In addition, we have demonstrated that pre-culturing HSCs enhances the nuclear trafficking of ribonucleoprotein complexes and improves editing efficiency, providing an edge for further improving gene editing efficiency. Post-gene editing cultures also confirmed that mouse and human HSCs edited on the basis of non-homologous end joining and cultured under low cytokine, hypoxia, and high albumin conditions retain their phenotype and quiescence better than those cultured under proliferative conditions. These results indicate that low cytokine culture conditions of gene-edited HSCs are a useful approach to examine the quiescent state of HSCs in vitro, and were reported in the original paper (Shiroshita and Kobayashi et al., Cell

Reports Methods 2022) and the details of the protocol were also reported (Shiroshita et al., STAR Protocols 2023).

These results have clarified the molecular basis of HSC maturation and interspecies heterogeneity, and have demonstrated that maturation can be artificially induced starting from culture. Furthermore, based on the knowledge gained from the cell cycle quiescence induced by maturation, we have succeeded in developing a culture platform that can induce adult HSCs to reenter cell cycle quiescence once induced to proliferate during gene editing. Further improvement of the maturation induction culture and clarification of the factors and intracellular mechanisms involved will enable us to further advance the maturation induction technology of HSCs. It is also expected that highly accurate genetic modification and editing of HSCs will enable biological analysis of their characteristics and the development of multifunctional HSCs as artificial cells for the treatment of various diseases.