

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) 造血幹細胞の医学への最新技術強化  
(英語) Human blood stem cell expansion: Empowering new technology for stem cell  
medicine

研究開発実施期間: 令和2年9月16日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 山崎 聡  
(英語) Yamazaki Satoshi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立大学法人東京大学 医科学研究所 特任准教授  
(英語) The Institute of Medical Science The University of Tokyo Project Associate Professor

## II 研究開発の概要

組織幹細胞の1つである造血幹細胞（HSC）は、全ての成熟血球細胞への分化が可能である。生体内におけるその割合の少なさから、造血幹細胞移植などへの利用を目的とし、生体外での増幅技術開発が長年試みられてきた。我々はマウス HSC を約1000倍近く増幅することに成功している（Wilkinson / Ishida et al., Nature 2019）。この新しい造血幹細胞の培養システムを用いることで、これまで不可能であった生化学的実験などを用いることで造血幹細胞の詳細な分子メカニズムを解明できる可能性が出てきた。さらに、この分子機構はヒト HSC への増幅技術へと繋がる可能性があり、血液学や再生医療への基盤技術として重要であることは間違いない。一方で、昨今では単一細胞の遺伝子発現とプロテオミクス技術の進歩により、個々の細胞における遺伝子発現をはじめとしたオミックス解析が可能になっている。そこで本研究課題では、日英の得意とする解析技術を融合することで本研究課題を効率的に遂行し、最終的にはヒトの HSC の分子のおよび機能的特性を明らかにすることを目的とした。その結果、我々の日英チームは研究期間内において以下の成果を出し複数の科学雑誌に報告した。

### 1) 造血幹細胞の増幅における分子機構の解明

マウス造血幹細胞を用いた基礎的研究を集中に行い、造血幹細胞の増幅時に発現している遺伝子やシグナル伝達経路を解析するためにオミックス解析を日英チームにより構築した。具体的には、日本側が開発した造血幹細胞の増幅技術を英国側に技術提供し、さらには日本側でこれまで蓄積したデータをグループ内で共有することで迅速な議論を行えるようになった。英国側からは造血幹細胞に特化した最新のオミックス解析システム等を日本側へ取り入れ、独自に造血幹細胞における増幅のメカニズムを解析した。その結果、機能的なマウス造血幹細胞における遺伝子群や機能的ではない遺伝子群を選別することで、高機能な真の造血幹細胞を実験的に定義することに成功した（Che et al., EMBO Reports 2022）。

上記に挙げた日英内の解析により造血幹細胞の増幅における重要な遺伝子発現プロファイルやシグナル伝達分子が詳細になる一方で、特定された分子がどのような機能を担っているのかを実際にマウスを用いた研究により明らかにする必要があるがあった。そこで、我々はオミックス解析から特定された造血幹細胞の増幅に重要な遺伝子群についての sgRNA を設計し、CRISPR-Cas9 システムを用いて造血幹細胞へ直接的に欠損させ造血幹細胞の表現系を解析した。加えて、細胞内のシグナル伝達についてはシグナル阻害剤等の低分子物を用いることで、生体外もしくは生体内における造血幹細胞の増幅率や生着率を解析した。これらの結果から、6つの機能的な遺伝子が同定されたと共に、非常に興味深い低分子化合物を発見した。これらの成果は引き続き行う価値があることから、本研究課題が終了した後も日英により研究を継続することとしている。

### 2) 造血幹細胞の分子機構解明から次世代臨床応用へのアプローチ

“造血幹細胞の増幅における分子機構の解明” から特定された分子がヒト造血幹細胞によっても機能しているかを明らかにするために、マウスの研究と同様にマウス造血幹細胞を用いて得られたオミックス解析データから特定された増幅に重要な遺伝子群についても解析した。マウスの実験と同様に sgRNA を設計し、CRISPR-Cas9 システムを用いて造血幹細胞に直接欠損させた。また、細胞内のシグナル伝達についてはシグナル阻害剤等の低分子物を用いることで、生体外もしくは生体内における造血幹細胞の増幅率や生着率を解析した。これら化合物や遺伝子欠損後に培養した造血幹細胞についても各種オミックス解析を行い、デー

タを取得した。その結果、ヒトとマウス造血幹細胞における共通の遺伝子が同定された。一方でヒト造血幹細胞のみの増幅に関する低分子化合物が発見された。これらの化合物は長期間におけるヒト造血幹細胞の培養、増幅を補助し、安定的な増幅ヒト造血幹細胞の提供を行えると期待している。

以上の成果は本研究期間により創出した成果であり、本研究結果により造血幹細胞の増幅における分子機構の解明と次世代の医療技術の発展を提案できると確信している。さらに、造血幹細胞の増幅で重要な遺伝子群やシグナル伝達経路を明らかにし公開（報告）したことで、そのデータを基に生体内のヒト正常造血幹細胞を生体内で制御する分子機構が解明できる糸口になるとい考えられる。

3) 1) と 2) のマウス造血幹細胞の研究結果から多くのヒト造血幹細胞を維持、培養ために必要なデータを取得した。それらの結果から PI3K 活性化剤と Mpl 作動薬の相互作用によりヒト造血幹細胞の増幅系を確立した。さらにピリミドール誘導体を加えることで長期的かつ選択的にヒト CD34 陽性細胞が生体外で培養可能になった。興味深いことはこれらの培養技術は長期的に培養しても CD34 陽性細胞が 90% 以上を維持すること、さらにはマウス、ヒト増幅造血幹細胞のマーカーでもある HLF の発現が低下しない点である。この確立された培養条件を用いてヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を培養して NOG マウスへ移植することで 10-50 倍以上の増幅が確認された (Sakurai et al., Nature 2023)。以上のように本研究期間内に大きな 3 つの成果を生み出した。

本研究課題は基礎及び臨床と双方の側面から見ても再生医療分野において重要な技術と結果をもたらした臨床応用へ直結する結果が創出できたと考えている。具体的には本研究結果の産物として、増幅した造血幹細胞特異的細胞表面もしくは細胞タンパク質マーカーの同定によって、これまで不可能であった生化学的な実験アプローチや精度の高いオミックス解析が可能になった。また、“マウス HSC” の理解をこれまで以上に深めることで”ヒト HSC” の幹細胞性の維持機構が明確になるヒントを提供した。本成果の特筆すべきこととして、安定的かつ長期的なヒト HSC の増幅が可能になったことは、将来的なゲノム編集を用いた遺伝子治療の勘弁な臨床応用に直接つながることである。ES 細胞や iPS 細胞のような多能性幹細胞は半永久的に増幅可能であり、ゲノム編集後のヘテロな細胞集団からクローナルに性質が良い細胞を分取し、ゲノムの安全性等を確認後に移植医療へ展開できることがメリットである。一方で組織幹細胞はこのステップをクリアできないのが現状である。しかし、本課題が成功したことによりゲノム編集した HSC をクローナルに増幅し、一部の細胞をゲノムの安全性試験を実施し、安全性が確認した後に造血幹細胞移植ができるようになった。このモデルが確立することは再生医療分野において大きな飛躍と言っても過言ではない。

最後に、本日英間における国際共同研究チームは、研究期間内において実際に 1 ヶ月の 1 度 Web ミーティングを行うことでコロナ下においても緊密な関係を築いた。さらに本グループから英国内においてはオックスフォード大学、米国においてはスタンフォード大学、カナダにおいてはトロント大学など国際的な複数の大学を巻き込みながら大きなコミュニティを築いた。最終的には 2022 年にはオックスフォード大学 (WIMM) においてミーティングを開催、2023 年には東京大学医科学研究所において最終ミーティングを開催した。以上のことから本日英国国際共同研究は大きな成果と達成目標を大幅に超え、国際的な研究の関係構築に成功した。一方で、今後の課題としては、本研究により得られた大きな成果を今後どのように継続していくかを模索しなければならないことが課題になる。

Our research project aimed to elucidate the molecular and functional characteristics of human hematopoietic stem cells (HSCs) by integrating the analytical techniques expertise of our Japanese and British teams. As a result, we achieved the following outcomes within the research period and reported them in multiple scientific journals.

Elucidation of the molecular mechanism underlying HSC expansion:

Through focused studies using mouse HSCs, we conducted fundamental research to analyze the genes and signaling pathways expressed during HSC amplification. We established an omics analysis platform in collaboration with the British team to analyze the gene expression and signaling pathways in HSC expansion using the HSC expansion technique developed by the Japanese team. By combining the cutting-edge omics analysis systems specialized in HSCs from the British side and the accumulated data from the Japanese team, we successfully defined experimentally the high-functioning true HSCs by selecting gene clusters that are functional in mouse HSCs and those that are not (Che et al., EMBO Reports 2022). Although the above-mentioned analyses within the Japanese and British teams provided detailed information on the gene expression profiles and signaling molecules involved in HSC expansion, it was necessary to determine the functions of the identified molecules through mouse studies. Therefore, we designed sgRNAs targeting the gene clusters crucial for HSC expansion identified through omics analysis and used the CRISPR-Cas9 system to directly analyze the expression system of HSCs by inducing gene knockout. Additionally, by utilizing small molecules such as signal inhibitors, we analyzed the expansion and engraftment rates of HSCs in vitro or in vivo. As a result, we identified six functional genes and discovered intriguing small molecules. Considering the value of these findings, we plan to continue the research in collaboration between the Japanese and British teams even after the completion of this project.

From the elucidation of the molecular mechanism of HSCs to the approach for next-generation clinical applications:

To determine if the molecules identified through "Elucidation of the molecular mechanism underlying HSC expansion" are also functional in human HSCs, we conducted similar analyses using mouse HSCs based on the omics analysis data obtained from the studies using mouse HSCs. Like the experiments performed with mice, we designed sgRNAs and used the CRISPR-Cas9 system to induce gene knockout in HSCs. We also analyzed the amplification and engraftment rates of HSCs in vitro or in vivo by using small molecules such as signal inhibitors. Various omics analyses were conducted on HSCs cultured after gene knockout or treatment with these compounds, and data were acquired. As a result, we identified common genes in human and mouse HSCs while also discovering small molecules specific to the expansion of human HSCs. These compounds are expected to assist in long-term cultivation and amplification of human HSCs, leading to the stable provision of expanded human HSCs.

We firmly believe that the outcomes achieved in this research period provide a foundation for understanding the molecular mechanism of HSC expansion and the development of next-generation medical technologies. Furthermore, by elucidating the crucial gene clusters and signaling pathways involved in HSC expansion and publicly reporting them, we believe that it will provide a starting point to understand the molecular mechanisms for controlling normal human hematopoietic stem cells in vivo based on the data obtained.