

## 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) 幹細胞とニッチの制御による血液幹細胞移植の効率化  
(英語) Improving haematopoietic reconstitution in blood stem cell transplantation  
procedures through the regulation of stem cells and their niches

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) 滝澤 仁  
(英語) Hitoshi Takizawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立大学法人熊本大学・国際先端医学研究機構・機構長/特別招聘教授  
(英語) International Research Center for Medical Sciences, Kumamoto University,  
Director and Professor

## II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

造血幹細胞移植は造血器腫瘍や代謝性疾患の治療に使われるが、慢性的なドナー不足が問題となっている。血液産生は造血幹細胞とニッチと呼ばれる骨髄微小環境との相互作用によって厳密に制御されており、ニッチは造血幹細胞を DNA 損傷から守り、一生を通じた血液及び免疫細胞の産生を担保している。申請者らのチームはこれまで正常及び悪性造血幹細胞の機能制御について幹細胞及びニッチの役割を明らかにしてきた。化学療法や放射線後の骨髄再建には、1) 移植に十分な数のドナー造血幹細胞、2) 移植したドナー造血幹細胞のレシピエント骨髄へのホーミングと生着、3) 生着したドナー造血幹細胞の増幅と分化、全ての要素が必要となる。ドナー細胞として有用なソースである臍帯血由来造血幹細胞は非侵襲的に回収され凍結保存できる、移植片拒絶のリスクが低いなどの利点がある一方、成人の骨髄移植には複数の臍帯血ユニットが必要となる。また、レシピエント側では、老化に伴い顕著に造血幹細胞の生着が低下するため、高齢患者には造血器腫瘍の治療として造血幹細胞移植を適用することが難しい。以上を踏まえ、本研究では造血幹細胞移植後の生着及び骨髄再建プロセスを骨髄ヒト化マウスで再構築し、造血幹細胞の増殖と血液分化における細胞自律的かつニッチ依存的メカニズムを理解する。

海外共同研究者はヒト造血幹細胞研究を進めるケンブリッジ大学・幹細胞研究所の E. Laurenti 博士と同じくケンブリッジ大学に所属する間葉系幹細胞を専門とする S. Mendez-Ferrer 博士である。また、国内共同研究者として、熊本大学及びシンガポール国立大学で血液研究の第一人者である須田年生博士と国際共同研究網を構築した。具体的な役割分担としては、移植後早期に血液細胞の再構築に寄与する造血幹細胞とニッチ細胞分画の絞り込みと機能解析 (Laurenti、滝澤)、その過程を制御する炎症性因子などのニッチ因子の同定 (滝澤、Mendez-Ferrer)、細胞内代謝やエピゲノムの変化 (Laurenti、須田) を捉える。本研究で期待される成果は、細胞代謝やエピゲノム修飾 (インプリンティング) によるドナー細胞またはレシピエント骨髄の条件化により、迅速かつ効率的・効果的な骨髄再建を可能にする新たな骨髄移植法を確立する可能性を大いに秘めている。本研究では、血液の源である造血幹細胞とその機能を支える間葉系幹細胞に注目し、造血幹細胞移植後に細胞内代謝やエピゲノム変化がどのように造血幹細胞の生着、自己複製分裂、細胞分化に影響を与えるのかを問い、それらの知見から骨髄再建能をさらに効率化させる新たな制御法開発に向けた基礎的知見を得る。

本実験の開始にあたり人工骨髄を再構築する過程で、その指標の一つである試験管内の軟骨形成能が骨髄ドナーによって非常に大きなバラツキがあった。そのために、50を超える骨髄ドナーについて軟骨分化形成試験を行い、軟骨分化の高い骨髄ドナーをスクリーニングして軟骨形成能の高い骨髄ドナーを絞り込んだ。また、軟骨形成能は骨髄に含まれる CD45-CD31-GPA-CD271+CD51+細胞の割合と相関し、その細胞群は CFU-F や Mesenshere などのコロニー形成が高かった。さらに RNA シークエンス解析の結果、PALLADIN というアクチンアンカータンパク質の発現の有無によってコロニー形成能の高い細胞群が濃縮でき、それらの細胞で AGPT1 や CXCL12 などのニッチ遺伝子の発現が高いことが明らかとなった (以下の論文リスト 2)。以降の実験では、軟骨形成能の高い骨髄ドナーや純化した細胞群を用いて骨髄ヒト化マウスを作成し、造血幹細胞の生着カイネティクスの解析を進めた。

それらの間葉系幹細胞から軟骨組織を介して誘導したヒト骨髄様組織にヒト臍帯血由来の造血幹細胞を移植し、5、9、14日後の生着及び細胞分裂動体を解析した。その結果、マウス骨髄に比してヒト骨髄様組織では造血幹細胞の分裂頻度がゆっくりであり、移植後5、14日の造血幹細胞および間葉系幹細胞をシングルセル解析するのが妥当と判断した。移植後5、13日目にはマウス骨髄に比べて人工ヒト骨髄に造血幹細胞が多く生着し、その機能を試験管内コロニー形成能で評価したところ、どちらも遜色なかった。人工ヒト骨髄に生着した造血幹細胞はマウス骨髄のものに比べて、ミトコンドリア活性が低く、比較的ゆっくりと分裂することが分かった。また、アポトーシスの割合が顕著に低かった。これらの結果より、人工ヒト骨

髄環境下で活性酸素ストレスが抑えられ、代謝活性が低いことが考えられた。今後はシングルセル RNA シークエンシング解析を行い、細胞代謝シグナルを中心に機能解析を進めていく。

本研究で得られた成果は、移植後の造血幹細胞動態、つまり増殖やアポトーシスの決定には間葉系幹細胞をはじめとする骨髄微小環境が重要であることを示唆しており、今後の研究ではその細胞性・分子メカニズムについて詳細な解析を行なっていく。そして、本研究成果を、骨髄移植後の生着効率や骨髄再建能促進技術の開発に繋げていきたい。

本研究に関連する発表論文リスト（下線部は研究代表者または共同研究者）

1. Mende N, Bastos HP, Santoro A, Mahbubani KT, Ciaurro V, Calderbank EF, Quiroga Londoño M, Sham K, Mantica G, Morishima T, Mitchell E, Lidonnici MR, Meier-Abt F, Hayler D, Jardine L, Curd A, Haniffa M, Ferrari G, Takizawa H, Wilson NK, Göttgens B, Saeb-Parsy K, Frontini M, Laurenti E. Unique molecular and functional features of extramedullary hematopoietic stem and progenitor cell reservoirs in humans. *Blood*, 2022 Jan 24;blood.2021013450. doi: 10.1182/blood.2021013450.
2. Sezaki M, Biswas S, Nakata S, Oshima M, Koide S, Ho NPY, Okamoto N, Miyamoto T, Iwama A, Takizawa H. CD271+CD51+PALLADIN- human mesenchymal stromal cells possess enhanced ossicle-forming potential. *Stem Cells Dev.*, 2021 Jul 15;30(14):725-735. doi: 10.1089/scd.2021.0021.
3. Ho NP, Takizawa H. Inflammation regulates haematopoietic stem cells and their niche. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022 Jan 20;23(3):1125. doi: 10.3390/ijms23031125.

Haematopoietic stem cell (HSC) transplantation (HSCT) is now routinely performed to save the life of patients with haematological, genetic or metabolic disorders. Regenerating normal blood cell production after chemotherapy/irradiation relies upon 3 key steps: 1) harvesting sufficient donor HSCs, 2) optimal HSC homing to the BM and 3) expansion and differentiation of donor HSCs in the recipient. However, efficacy of HSC engraftment significantly decreases during ageing and in certain haematological diseases, hampering the use of HSC transplantation as a therapeutic option. Improving the outcome of HSCT is an area of priority in the UK, Japan and many other countries, since the demand for HSCT will continue at the existing rate over the next 5-10 years, despite the fact that HSC gene therapies are entering the clinic. Increasing the success of HSCT requires a more detailed understanding of the factors which affect HSC engraftment, maintenance, proliferation and differentiation. However, despite the fact that the HSC is perhaps the best characterised adult stem cell, this knowledge concerns mostly the mouse HSC, whilst the human HSC has been much less characterised. Among different HSC sources for transplantation, umbilical cord blood (CB) is an ideal source that can be non-invasively harvested, cryopreserved and is associated with reduced risk of disease transmission or acute graft-versus-host disease. However, several CB units are necessary for transplantation and engraftment is delayed. Due to these limitations and the improvements in allogeneic HSCT, the use of CB has declined over the past few years in countries such as USA, but not in Japan or the UK, where it remains as an important HSC source for Minority Ethnic groups, and particularly for those individuals affected by Sickle Cell Disease or thalassemia. This proposal aims at understanding and modelling the regeneration process following HSCT. The main goal is to identify cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms that regulate HSC proliferation and lineage commitment during bone marrow (BM) regeneration. Our translational aim is instructing HSC to more efficiently/rapidly/long-lastingly regenerate the haematopoietic and immune systems. This joint project will enable a unique synergy between the 4 applicants with expertise in the cellular and molecular heterogeneity of human blood stem cells (E. Laurenti, Univ. of Cambridge), their regulation through inflammatory factors (H. Takizawa, Kumamoto Univ.), cellular metabolism (T. Suda, Kumamoto Univ./Nat'l Univ. Singapore), and microenvironmental cues (Mendez-Ferrer, Univ. of Cambridge). The complementary expertise of the four teams could facilitate overcoming current limitations in HSCT.

On the way to prepare the planned experiment, we noticed there was a large variation in chondrogenic differentiation capacity in the artificial BM reconstruction process, which is one of the indicators. Therefore, chondrogenic differentiation formation tests were conducted for over 50 BM donors, and BM donors with high chondrogenic differentiation were screened to narrow down those with high chondrogenic formation ability. In addition, the chondrogenic formation ability was correlated with the proportion of CD45-CD31-GPA-CD271+CD51+ mesenchymal stem cells (MSCs) contained in the BM, and this cell group had high colony formation such as CFU-F and Mesosphere. Furthermore, the results of RNA sequencing analysis revealed that a cell group with high colony formation ability could be concentrated by the presence or absence of expression of an actin anchoring protein called PALLADIN, and it was revealed that these cells had a high expression of niche genes such as AGPT1 and CXCL12 (Sezaki M et al, Stem Cell&Dev. 2022). In the following experiments, humanized BM was created using BM donors with high chondrogenic formation ability or purified cell groups, and the engraftment kinetics of HSCs were analyzed.

Human umbilical CB-derived HSCs were transplanted into the human BM-like tissue induced through chondrogenic tissue from MSCs, and engraftment and cell division kinetics were analyzed at 5, 9, and 14 days after transplantation. As a result, the division frequency of hematopoietic stem cells was slower in human BM-like tissue than in mouse BM, and it was determined that single-cell analysis of HSCs and MSCs at 5 and 14 days after transplantation was appropriate. This year, using the next-generation humanized mouse reconstructed from the

artificial human BM that has been developed so far, the functional analysis of HSCs and mesenchymal stem cells after HSCT was conducted. As a result, at 5 and 13 days after transplantation, more hematopoietic stem cells engrafted in the artificial human BM than in the mouse BM, and when their function was evaluated by colony formation ability in test tubes, there was no difference between them. It was found that the engrafted HSCs in the artificial human BM had lower mitochondrial activity and divided relatively slowly compared to those in the mouse BM. In addition, the proportion of apoptosis was significantly lower. These results suggest that it was considered that oxidative stress was suppressed and metabolic activity was low in the artificial human BM environment. In the future, single-cell RNA sequencing analysis will be performed, and functional analysis will be further conducted focusing on cell metabolic signals.

The results obtained from the research suggest that the BM microenvironment, including MSCs, plays an important role in determining the dynamics of HSCs after transplantation, such as proliferation and apoptosis. In future studies, detailed analysis will be conducted on the cellular and molecular mechanisms of this microenvironment. Furthermore, we aim to apply these research results to the development of techniques that can improve the engraftment rate and BM regeneration after transplantation.

List of publication related to this project (underlined author indicate either this project leader or collaborator)

1. Mende N, Bastos HP, Santoro A, Mahbubani KT, Ciaurro V, Calderbank EF, Quiroga Londoño M, Sham K, Mantica G, Morishima T, Mitchell E, LidonniciMR, Meier-Abt F, Hayler D, Jardine L, Curd A, Haniffa M, Ferrari G, Takizawa H, Wilson NK, Göttgens B, Saeb-Parsy K, Frontini M, Laurenti E. Unique molecular and functional features of extramedullary hematopoietic stem and progenitor cell reservoirs in humans. *Blood*, 2022 Jan 24;blood.2021013450. doi: 10.1182/blood.2021013450.
2. Sezaki M, Biswas S, Nakata S, Oshima M, Koide S, Ho NPY, Okamoto N, Miyamoto T, Iwama A, Takizawa H. CD271+CD51+PALLADIN- human mesenchymal stromal cells possess enhanced ossicle-forming potential. *Stem Cells Dev.*, 2021 Jul 15;30(14):725-735. doi: 10.1089/scd.2021.0021.
3. Ho NP, Takizawa H. Inflammation regulates haematopoietic stem cells and their niche. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022 Jan 20;23(3):1125. doi: 10.3390/ijms23031125.