

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム  
(幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) ヒト造血幹/前駆細胞の細胞系譜の理解による細胞分化制御基盤技術の開発  
(英語) Establish cell fate control technique by understanding landscape of human hematopoietic stem/progenitor cells

研究開発実施期間: 令和3年6月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 山本玲  
(英語) Ryo Yamamoto

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 京都大学高等研究院 ヒト生物学高等研究拠点 (ASHBi) 特定拠点准教授  
(英語) Kyoto University, ASHBi, Associate professor

## II 研究開発の概要

日本語

ヒト造血幹細胞の「維持」・「増幅」・「分化制御」が可能となれば、(1) 造血幹細胞移植医療の向上、(2) 造血幹細胞から赤血球や血小板の誘導や幹細胞からの造血幹細胞の誘導など応用範囲が広いが、未だその分子機序はほとんど不明である。これは、以下の2つの現状が障壁であると考えられる。①造血幹細胞は非常にヘテロな集団であり、シングルセルレベルで生体内でどのように分化するか不明である。②ヘテロな集団である造血幹細胞の分子機序を高感度・特異的に検出できる実験系が確立されていない。

本研究課題は、RNA バーコードを用いた細胞系譜追跡システムにより、生体内でのシングルセル造血幹/前駆細胞の分化動態、シングルセルエンハンサー解析、シングルセル遺伝子発現解析が同時に可能となる世界初の革新的なシステムを構築することを目的とした。これにより、ヒト造血幹/前駆細胞のヒト造血幹細胞の維持・増幅・分化制御に重要な転写因子やシグナル分子を同定し、ヒト造血幹細胞の維持・増幅・分化制御のメカニズムを解明できる。

まず、この実験系の確立を目指した。ウェット実験や細胞調整・回収法を工夫し、ヒト造血幹/前駆細胞の解析に最適化した方法を用い、ヒト臍帯血及び骨髓細胞由来の造血幹/前駆細胞のシングルセル遺伝

子及び eRNA 発現を解析した。これにより、ヒト造血幹・前駆細胞の各クラスターに特異的な分子や eRNA の同定が可能となった。

シングルセルトランスクリプトームのデータから、真の転写開始点由来リードとバックグラウンドを区別するデータ解析法を組み合わせることで大幅なノイズ除去を行い、高い確信度でエンハンサー同定を行い、従来法では不可能であったレベルで細胞集団を細かくクラスタリングする。正確性の高いエンハンサーの位置情報およびに活性化状況そして遺伝子発現量を組み合わせた解析により、従来の遺伝子発現量のみに基づく解析よりも細胞集団の特性・上流マスター因子などを詳細に解析する。これによりどのような能力の造血幹/前駆細胞(末梢血・骨髄のバーコードより判明)がどのような遺伝子・エンハンサーを発現しているかシングルセルレベルで明らかになる。

次に、eRNA を同時に解析可能な新規細胞系譜追跡システム (RNA バーコードシステム) の確立を行った。これはレンチウイルスを用いて感染させる系であり、1つのバーコードが1つ以上の細胞に入らない感染条件を同定し、今後はこの条件を用いて実際の移植系を用いた機能解析を行う。

実験系の確立が達成されたため、まず、ヒト臍帯血・骨髄細胞を用いて、造血幹細胞画分の同定を行った。従来、ヒト造血幹細胞は、CD45+CD34+CD45RA-CD38-CD90+に存在するとされていたが、CD90 が有用であるか疑問が残っていた。そこでまず、CD90-画分に造血幹細胞が存在するか確認実験を免疫不全マウスへの移植を行ったところ、CD90-画分にも造血幹細胞が存在することが判明した。さらに、ごく最近、造血幹細胞は CD201-画分ではなく CD201+画分に存在することが2報の論文で報告されたため、その確認実験を行った。確かに CD201-画分には造血幹細胞は存在しないことが分かった。

この情報を元に、ヒト臍帯血・骨髄細胞のシングルセル遺伝子発現解析を行った。多数のヒト造血幹細胞のシングルセル遺伝子発現データを UMAP を用いてクラスタリングを行ったところ、20以上のクラスタリングに分けることができた。しかし、その時点では、どの画分が真の造血幹細胞を含むクラスターかは不明であったため、CD201 やその他の造血幹細胞に特異的であると既に報告されている分子 (HLF, HOPX など) や分化の向きが推定可能な RNA velocity を用いて数個の造血幹細胞であると考えられる画分を同定した。次に、その画分に特異的な遺伝子候補を入手した。これらは、真の造血幹細胞であると考えられるが、その確認のためには、その遺伝子の中の表面蛋白に着目する必要がある。その遺伝子候補より表面蛋白を抽出し、さらにフローサイトメトリ抗体が利用可能な3遺伝子を候補とした。

まず、これらの3遺伝子に対するフローサイトメトリ抗体が実際にヒト造血幹細胞画分を染色可能か検討を行った。次に、その染色発現パターンにより画分にわけ、免疫不全マウスに移植を行った。遺伝子候補 No1 は、陽性・陰性に関わらず、造血幹細胞が含まれることが分かり、この遺伝子は造血幹細胞の濃縮に有用でないことが判明し、再現性も確認されている。一方、遺伝子候補 No2 は、造血幹細胞の濃縮に有用である可能性が示唆され、再現性の確認のための移植実験を行っている。また遺伝子候補 No3 は現在確認実験の移植実験を行っている。

本研究課題により、造血幹細胞のさらなる濃縮が可能となれば、造血幹細胞研究にとって非常に大きな進歩となる。造血幹細胞の機能分子の同定や増幅研究の一助となり得る。造血幹/前駆細胞の細胞系譜ランドスケープの全体像を把握し、ヒト造血幹細胞の維持・増幅・分化制御に重要な転写因子やシグナル分子を同定が可能となる。造血幹細胞の維持・増幅・分化制御の分化機序を明らかにすることができ

れば、その分子機序を標的とした低分子化合物・薬剤のスクリーニングなどが可能となる。これにより、造血幹細胞の増幅する低分子化合物などを得られれば、造血幹細胞数の不足を解決でき、移植医療の治療成績の向上の一助となる。また、造血幹細胞から赤血球・血小板を誘導する低分子化合物を同定することも期待でき、輸血ソース不足の問題解決も可能となる。このように分子機序の解明により造血幹細胞移植医療における問題点を解決できる。実際の臨床に使用できる薬剤・低分子可能物スクリーニングなどにはさらに3-5年が必要であると考えられる。現在ES/iPS細胞から造血幹細胞の誘導は達成できていないが、さらには長期的には、本研究成果や本研究で作成したデータベースの利用により、造血幹細胞の”master regulator”も明らかになり、ES/iPS細胞からの造血幹細胞の誘導も期待でき、造血幹細胞移植医療に大きく貢献も期待できる。以上のように、エンハンサーを対象とした分子機序の解明により、造血幹細胞移植医療に大きく貢献が可能であると期待できる。

## 英語

The objective of this research project was to establish the world's first innovative system that enables simultaneous analysis of differentiation dynamics, single-cell enhancer analysis, and single-cell gene expression analysis of single-cell HSCs in vivo by a cell lineage tracing system using RNA barcodes. This will allow us to identify transcription factors and signaling molecules that are important for the regulation of human HSC maintenance, amplification, and differentiation of human HSCs in human hematopoietic stem/progenitor cells.

First, we aimed to establish this experimental system. We analyzed single-cell gene and eRNA expression in human hematopoietic stem/progenitor cells derived from human cord blood and bone marrow cells using methods optimized for the analysis of human hematopoietic stem/progenitor cells by devising wet experiments and cell conditioning and collection methods. This enabled the identification of molecules and eRNAs specific to each cluster of human hematopoietic stem/progenitor cells.

Next, we established a novel cell lineage tracking system (RNA barcode system) that enables simultaneous analysis of eRNA. This is a lentivirus-based infection system, and we have identified the infection conditions under which one barcode does not enter more than one cell.

With the establishment of the experimental system achieved, the first step was to identify the HSC fraction using human cord blood and bone marrow cells. Previously, human HSCs were thought to reside in the CD45+CD34+CD45RA-CD38-CD90+ fraction, but the question remained as to whether CD90 was useful. Therefore, we first conducted experiments to confirm the presence of HSCs in the CD90- fraction by transplantation into immunodeficient mice, and found that HSCs were also present in the CD90- fraction. Furthermore, two papers have recently reported that HSCs are present in the CD201+ fraction, but not in the CD201- fraction. Indeed, we found that there were no HSCs in the CD201- fraction.

Based on this information, we performed single-cell gene expression analysis of human cord blood and bone marrow cells. The single-cell gene expression data of a large number of human hematopoietic stem cells were clustered using UMAP, which allowed us to divide the data into more than 20 clusterings. However, at that time, it was not clear which fractions contained true HSCs, so CD201 and other molecules previously reported to be specific to HSCs (e.g., HLF, HOPX) and RNA velocity, which allows estimation of differentiation direction, were used to identify several fractions that were likely HSCs. We then identified several fractions that were likely to be hematopoietic stem cells. We then obtained candidate genes specific to those fractions. These could be considered

true HSCs, but to confirm this, we needed to look at the surface proteins within the genes. We extracted the surface proteins from the gene candidates and also selected three genes for which flow cytometric antibodies were available.

First, we examined whether flow cytometric antibodies against these three genes could actually stain human hematopoietic stem cell fractions. Next, the fractions were divided according to their staining expression patterns and transplanted into immunodeficient mice. Gene candidate No. 1 was found to contain HSCs regardless of whether it was positive or negative, indicating that this gene is not useful for enrichment of HSCs, and reproducibility was confirmed. On the other hand, gene candidate No. 2 was suggested to be useful for enrichment of HSCs, and transplantation experiments are underway to confirm reproducibility. Gene candidate No. 3 is currently undergoing transplantation experiments to confirm its reproducibility.

The ability to further enrich HSCs through this research project would be a very significant advance for HSC research. It could aid in the identification and amplification studies of functional molecules in HSCs. It will provide a complete picture of the HSC lineage landscape and allow identification of transcription factors and signaling molecules that are important in regulating the maintenance, amplification, and differentiation of human HSCs. The elucidation of the differentiation mechanisms of HSC maintenance, amplification, and differentiation will enable screening of small molecule compounds and drugs that target the molecular mechanisms of HSC maintenance, amplification, and differentiation. If small molecule compounds that amplify HSCs can be obtained, the shortage of HSCs can be solved, and this will help to improve the therapeutic outcome of transplantation medicine. It is also expected to identify small molecular compounds that induce red blood cells and platelets from hematopoietic stem cells, thereby solving the problem of insufficient blood transfusion sources. Thus, the elucidation of molecular mechanisms can solve problems in hematopoietic stem cell transplantation medicine. It will take another 3-5 years to screen drugs and small molecule compounds that can be used in actual clinical practice. Although the induction of HSCs from ES/iPS cells has not been achieved at present, in the long term, the "master regulator" of HSCs will be clarified through the results of this study and the database created in this study, and the induction of HSCs from ES/iPS cells will be possible. In the long term, the results of this research and the database created in this study are expected to reveal the "master regulator" of hematopoietic stem cells and induce hematopoietic stem cells from ES/iPS cells. As described above, the elucidation of the molecular mechanism of enhancers is expected to make a significant contribution to the medical treatment of hematopoietic stem cell transplantation.