

2022年12月6日
国立国際医療研究センター

造血幹細胞の機能を高く保つ遺伝子編集・培養プラットフォームの開発

1. 発表者：

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

客員研究員 城下 郊平

(研究当時：研究所スチューデントリサーチャー及び慶應義塾大学医学部内科学教室 (血液)
大学院生及び日本学術振興会特別研究員

現本務：慶應義塾大学 医学部 血液内科 助教)

上級研究員 小林 央

プロジェクト長 田久保 圭誉

2. 発表のポイント：

- ◆ 静止期造血幹細胞 (HSC) の遺伝子編集の際に、事前に培養することでガイド RNA/Cas9 複合体の核内移行が促進されて編集効率が高まることを明らかにしました。
- ◆ 遺伝子編集後の HSC 培養を最適化することで、事前培養で増殖状態になった HSC を再度静止期へ誘導し、幹細胞活性を高く保てることを示しました。
- ◆ HSC の新しい制御因子の探索や、ヒト HSC の静止期性研究、HSC を利用した遺伝子・細胞治療の改良にも有用な技術と考えられます。

3. 発表概要

造血幹細胞 (HSC) (注1) は、生涯にわたって各種の血液細胞を産生する幹細胞です。HSC は体内の血液細胞の需要に応じて自己複製と分化を行うことで様々な血液細胞を産生しますが、それ以外の多くの時間は細胞周期 (注2) を静止期に留めることで幹細胞の性質を守っていると考えられています。HSC は血液疾患等を根治する際の骨髄移植 (造血幹細胞移植) に必須の細胞です。近年、HSC に遺伝子編集を施すことで HSC が原因となる様々な疾患の治療が可能になると考えられています。一方これまで、体外では静止期 HSC の維持・操作が困難であったため、静止期 HSC 研究はマウスモデルを中心に行われてきましたが、時間がかかるなどの制約がありました。そこで、より体内同様の状態に HSC を保つことができる遺伝子編集手法の開発が期待されていました。

今回、研究グループは CRISPR-Cas9 (注3) を用いた静止期 HSC の遺伝子編集・培養プラットフォームを開発しました。

まず、マウス HSC の遺伝子編集されやすさを検討したところ、体内から取り出したばかりの静止期 HSC では非相同末端結合修復 (NHEJ) (注4) を介した編集効率が低く、NHEJ 編集効率の改善には、遺伝子編集に先立って培養で HSC を増殖させて、ガイド RNA/Cas9 複合体 (注3) の核内移行性を向上させる必要があることを見出しました。一方、この事前培養によって増殖状態となった HSC は幹細胞の機能が低下します。そこで編集後速やかに、低酸素、低サイトカイン (注5)、高脂肪酸条件 (静止期維持培養条件) で培養すると、遺伝子編集された HSC を再び静止期化できることがわかりました。次いでこの技術が他の遺伝子編集様式やマウス以外の HSC にも利用可能か検証しました。アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター

(注6)を用いたマウス HSC の相同依存性修復 (HDR) 編集 (注4)、およびヒト臍帯血の NHEJ 編集においても遺伝子編集後 HSC の静止期再誘導が可能であることを示しました。今回の研究結果は、HSC の新しい制御因子の迅速かつ簡便な探索や、困難であることが知られているヒト HSC の静止期性研究、そして HSC を用いた新たな遺伝子・細胞治療の開発に有用であると考えられます。

本研究成果は、米国 Cell Press 社のオンラインジャーナル *Cell Reports Methods* 誌 12 月 19 日号で発表され、それに先立つ日本時間 2022 年 12 月 6 日午前 1 時 (米国東部時間 2022 年 12 月 5 日午前 11 時) にオンラインで先行公開されました。

4. 発表内容：

造血幹細胞 (HSC) は、生涯にわたって各種の血液細胞を産生する幹細胞です。HSC は体内の血液細胞の需要に応じて自己複製と分化を行うことで様々な血液細胞を産生しますが、それ以外の多くの時間は細胞周期を静止期に留めることでストレスがかかることを回避し、幹細胞の性質 (未分化性や多分化能等) を守っていると考えられています。HSC は血液疾患等を根治する際の骨髄移植 (造血幹細胞移植) に必須の細胞です。近年、HSC に遺伝子編集を施すことで HSC の異常が原因となる様々な疾患に対する遺伝子・細胞治療が可能になると考えられています。これまで、体外では静止期 HSC の維持・操作が困難であったため、静止期 HSC の研究はマウスモデルを中心に行われてきました。しかし、マウスモデルの作出には時間や費用の課題があることに加え、ヒト HSC への応用が難しいという問題点があり、マウスモデルを利用しない迅速かつ簡便な静止期 HSC の研究ツールの創出が期待されていました。本研究は、新しい遺伝子編集法である CRISPR-Cas9 と HSC を体外で静止期状態に維持できる培養環境 (静止期維持培養) を組み合わせることで、遺伝子編集後に増殖状態になった HSC を再び静止期状態に誘導することで、幹細胞機能を高く保つことを可能にできないか検討しました。

静止期にある新鮮 HSC は NHEJ 活性が高いことが知られています。そこで新鮮 HSC に対し、エレクトロポレーション法で細胞内にガイド RNA/Cas9 複合体 (RNP) を導入し、NHEJ を介した遺伝子編集を試みましたが、予想と異なり低い編集効率を示しました。遺伝子編集に先立って高濃度のステムセルファクター (SCF) とトロンボポエチン (TPO) による 1 日程度の事前培養によって遺伝子編集効率が大きく改善することが分かりました。事前培養による遺伝子編集効率の改善機構を検討したところ、事前培養を行った HSC は新鮮 HSC に比べて、インポーチン α を含む核内輸送関連遺伝子の発現が上昇し、RNP の核内移行性が改善していました (図 1A)。これらの結果から、静止期 HSC の NHEJ 編集効率の改善には、事前培養による RNP の核内移行性を向上させる必要があることを見出しました。

一方、事前培養によって HSC は増殖状態となり、移植生着能をはじめとする幹細胞としての機能が低下してしまいます。そこで遺伝子編集された HSC を編集後速やかに、低酸素、低サイトカイン、高脂肪酸条件 (静止期維持培養条件) で培養することで静止期化が可能であるかを検討しました。S 期を標識可能な EdU ラベリング法で細胞周期を評価したところ、古典的な増殖培養条件や HSC を増幅できるポリビニルアルコール (PVA) 培養条件と比較し、静止期維持培養条件では、EdU の取り込みが低下していました (図 1B)。この結果は、遺伝子編集後培養条件の最適化により、遺伝子編集された HSC を再び静止期化できることがわかりました。また、HSC の NHEJ 編集効率は静止期維持培養条件および増殖培養条件で同等でした。さらに、遺伝子編集された HSC の表面形質や遺伝子発現、コロニー形成能 (図 1C)、移植後生着能 (図 1D-E) は、増殖培養条件よりも静止期維持培養条件で良好に維持されていることが分かりました。

続いて、この技術が他の遺伝子編集様式やヒト HSC にも利用可能かを検証しました。マウス HSC に対して AAV ベクターを用いた HDR 編集を試みたところ、遺伝子編集された HSC が再び静止期へ誘導されることを確認しました。また、表面タンパクのプロファイルやコロニー形成能といった HSC の性質が増殖培養条件に比べて、静止期維持培養条件で高く維持されていることを確認しました。さらに、臍帯血から採取したヒト HSC に対して NHEJ 編集を行い、静止期維持培養条件で培養することによって遺伝子編集されたヒト HSC の静止期再誘導が可能であることを示しました。静止期に誘導された遺伝子編集後ヒト HSC は、未分化性を現す表面形質を高発現しており、遺伝子編集後も幹細胞機能を高く維持していることが示されました。これらの結果は、今回の遺伝子編集プラットフォームが、HDR 編集されたマウス HSC や NHEJ 編集されたヒト HSC の静止期研究へ応用可能であることを示しています。

本研究を通して得られた成果は、迅速かつ簡便な静止期 HSC の新しい制御因子の探索や、困難であることが知られているヒト HSC の静止期性研究、そして HSC を用いた新たな遺伝子・細胞治療の開発に有用であると考えられます。

5. 発表雑誌：

発表媒体名：「*Cell Reports Methods*」

論文タイトル：A culture platform to study quiescent hematopoietic stem cells following genome editing

著者：Kohei Shiroshita*, Hiroshi Kobayashi*, Shintaro Watanuki, Daiki Karigane, Yuriko Sorimachi, Shinya Fujita, Shinpei Tamaki, Miho Haraguchi, Naoki Itokawa, Kazumasa Aoyoama, Shuhei Koide, Yosuke Masamoto, Kenta Kobayashi, Ayako Nakamura-Ishizu, Mineo Kurokawa, Atsushi Iwama, Shinichiro Okamoto, Keisuke Kataoka, Keiyo Takubo[†]

*:筆頭著者

[†]:責任著者

Cell Reports Methods ホームページ: <https://www.cell.com/cell-reports-methods/>

6. 共同研究グループ

石津 綾子 教授（東京女子医科大学 医学部）

小林 憲太 准教授（自然科学研究機構 生理学研究所）

黒川 峰夫 教授（東京大学大学院医学系研究科）

岩間 厚志 教授（東京大学医科学研究所）

片岡 圭亮 教授、岡本 真一郎 名誉教授（慶應義塾大学医学部内科学教室(血液)）

7. 本研究の資金サポート：

本研究は以下の研究資金・枠組みによる支援のもと行われました。

・日本医療研究開発機構（AMED）：

幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム JP20bm0704042,

革新的先端研究開発支援事業（AMED-CREST）「生体組織の適応・修復機構の時空間的解析による生命現象の理解と医療技術シーズの創出」研究開発領域 JP20gm1210011

・文部科学省・日本学術振興会（JSPS）科学研究費補助金：

20K21621, 21H02957, 22K19550, 19K17847, 21K08431, 21J11016, 19K17877, 21J01690, 22K08493

・文部科学省共同利用・共同研究拠点「マルチオミックスによる遺伝子発現制御の先端的医学共同研究拠点」（横浜市立大学先端医科学研究センター）

・国際医療研究開発費

・武田科学財団助成金

8. 問い合わせ先：

<研究に関するお問い合わせ>

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 田久保 圭誉 (たくぼ けいよ)

電話：03-3202-7181 (内線 2875)

E-mail：ktakubo@ri.ncgm.go.jp

<報道に関するお問い合わせ>

国立国際医療研究センター 企画戦略局 広報企画室

広報係長：西澤 樹生 (にしざわ たつき)

電話：03-3202-7181 (代表) <9:00~17:00>

E-mail：press@hosp.ncgm.go.jp

9. 用語解説：

(注1) 造血幹細胞：

哺乳動物の成体では骨髄に存在している数少ない細胞で、細胞分裂することで生涯にわたり血液を供給している。骨髄の血液細胞 10 万個に 1 個程度の割合で存在する。

(注2) 細胞周期：

細胞は分裂する周期に基づいて、静止期 (G0 期)、G1 期、S 期、G2 期、M 期の 5 つに分けられる。大部分の HSC は分裂をしない状態の静止期に留まっている。刺激に応じて G1 期へ移行し (増殖期)、分化細胞の産出や自己複製を行う。

(注3) CRISPR-Cas9：

2012 年にジェニファー・ダウドナ氏とエマニュエル・シャルパンティエ氏が報告した遺伝子編集技術。細菌が外来ウイルスの DNA を切断し、ゲノム上に取り込む仕組みを応用することで、目的遺伝子の遺伝子編集を行う技術。目的遺伝子と結合するガイド RNA と、遺伝子を切断する酵素である Cas9 の複合体 (RNP) を形成し、細胞内へ導入することで遺伝子編集ができる。

(注4) 非相同末端結合修復 (NHEJ) と相同依存性修復 (HDR)：

DNA が Cas9 による切断を受けた後に修復するプロセスには、非相同末端結合修復 (non-homologous end joining：NHEJ) と相同依存性修復 (homology-directed repair：HDR) の 2 つがある。NHEJ 活性は細胞周期に非依存的であり、DNA 切断後速やかに修復できるという利点があるが、修復の精密性は低く、塩基の欠失や挿入を伴うことが多い。NHEJ を介する編集によって遺伝子のノックアウトを誘導できる。一方、HDR は細胞周期 S/G2 期にのみ活性があり、修復の精密性が高い。鋳型となる DNA 配列 (テンプレート) を同時に細胞内導入することにより、遺伝子のノックインが可能となる。

(注5) サイトカイン：

細胞表面の受容体に結合することで、細胞に増殖や分化等の信号を伝える。通常は標的となる細胞とは異なる細胞から分泌される。本研究ではサイトカインのうち SCF (ステムセルファクター)、TPO (トロンボポエチン) を利用した。

(注6) アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター：

ベクターは、遺伝子修復の鋳型となるテンプレートを細胞内に導入する役割を持つ。AAV ベクターはマウス・ヒト HSC で遺伝子修復に広く用いられる。

10. 添付資料：

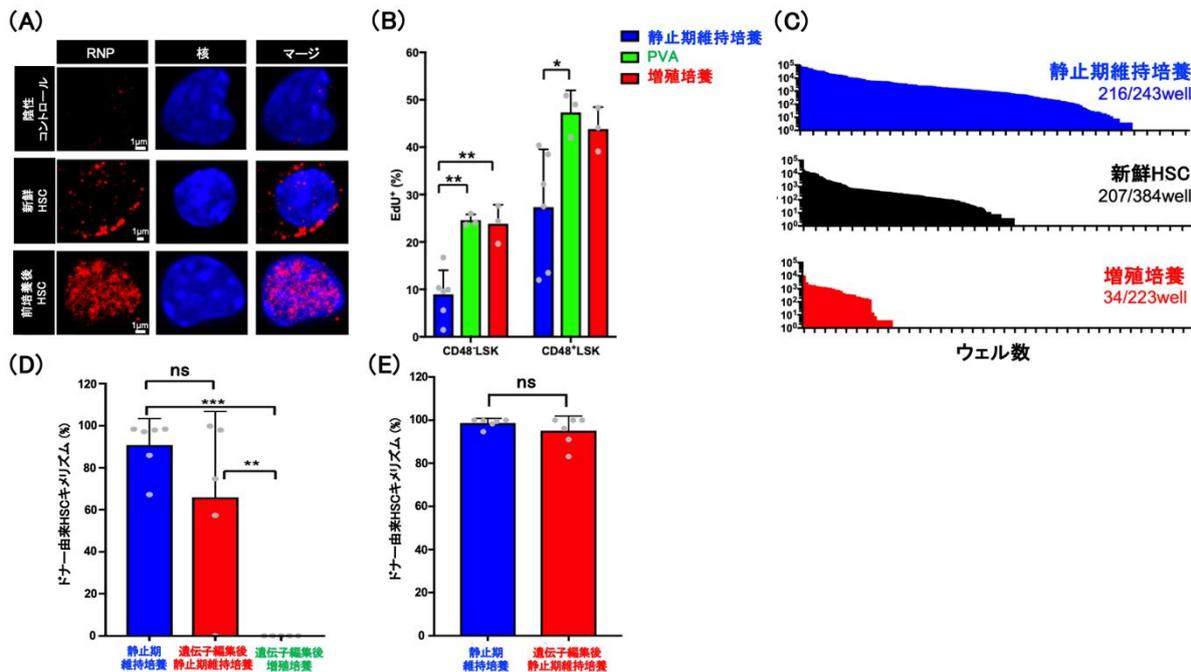


図 1. マウス造血幹細胞の遺伝子編集と再静止期化

フローサイトメトリーを用いてマウス造血幹細胞 (HSC) を単離し、遺伝子編集後に複数の条件下で編集後細胞を培養し、解析した。

(A) 新鮮 HSC (中段) に比べて、遺伝子編集前培養後の HSC (下段) では guide RNA/Cas9 複合体 (赤) が核 (青) の内部に移行している。

(B) S 期を標識する EdU ラベリング解析による遺伝子編集後 HSC の細胞周期解析結果。遺伝子編集後 7 日目において、HSC を含む未分化細胞集団 (Lineage⁻Sca1⁺c-Kit⁺CD48⁻: CD48⁺LSK) において EdU の取り込みが静止期維持培養 (青) で増殖培養 (赤) やポリビニルアルコール (PVA) 培養 (緑) よりも有意に低下していた。

(C) 遺伝子編集後 HSC によるシングルセル由来コロニー形成能の実験結果。遺伝子編集 HSC は CD45 陰性細胞をソーティングした。静止期維持培養下の遺伝子編集後 HSC は、新鮮 HSC および増殖培養下の遺伝子編集後 HSC よりも高いコロニー形成能を示した。

(D) 1 次移植後 4 ヶ月の移植された HSC に由来する骨髄 HSC の割合 (キメリズム) の解析結果。遺伝子編集後静止期維持培養群 (赤) のキメリズムは静止期維持培養のみ群 (青) と比較するとやや低下傾向であったものの、遺伝子編集後増殖培養群 (緑) と異なり、高い生着能を示した。

(E) 2 次移植後 4 ヶ月の骨髄 HSC キメリズムの結果。遺伝子編集後静止期維持培養群 (赤) のキメリズムは、静止期維持培養のみ群 (青) と同等であり、遺伝子編集後静止期維持培養群は連続移植後も高い生着能を示した。