

造血幹細胞の加齢と血液疾患のモデル作製と機序解明

京都大学高等研究院 ヒト生物学高等研究拠点
山本 玲

研究目的

造血幹細胞は、一生涯にわたってすべての血液細胞を産生し続けることができる特異的な細胞である。近年、健常者においても加齢とともに造血幹細胞から末梢血液細胞に至るまで特異的な遺伝子変異が徐々に蓄積し、その遺伝子変異を有したクローンが増殖していくことが明らかとなった。この現象は加齢に伴うクローナル造血と呼ばれている。さらにある特定の遺伝子変異が導入されると骨髄異形成症候群や急性白血病などを発症する。しかし、その詳細なメカニズムは未だ分かっていない。加齢という長期にわたるプロセスを短期間に再現するモデルが存在しないことが原因であると考えられる。この加齢によるクローナル造血のモデルを確立できれば、加齢及び加齢から疾患発症の機序解明に有用となり、治療戦略の構築、さらには加齢の予防・加齢進行の抑制など様々な応用が期待できる。申請者らは、最近のりの成分であるポリビニルアルコールを使用したマウス・ヒトの造血幹細胞の長期増幅培養法を開発した。これを応用すれば加齢プロセスを試験管内のみで再構成できると仮説を立てた。血液細胞の加齢・血液疾患発症を試験管内のみで再構成し、加齢によるクローナル造血及びそこから血液疾患の発症機序を明らかにすることを目的とした。

結果

1. 造血幹細胞の長期培養法によるクローナル造血・血液疾患発症モデルの作出

まず申請者らが開発した造血幹細胞の長期培養法を改良し、加齢プロセスにより近い培養条件を確立する。加齢は慢性的な炎症であるとも考えられており、低分子化合物などスクリーニングを行った。

a) ポリマーを用いた造血幹細胞の長期培養法により加齢の表現型を呈するか検討

確立した造血幹細胞の新規培養法が、若齢・加齢造血幹細胞にどのような影響をもつか検討した(図1)。まず、若齢・加齢・加齢特異的遺伝子変異(今回は、Dnmt3a, Tet2ノックアウト)を持つマウスより造血幹細胞画分(CD34-CD150+cKit+Scal+Lineage-画分)を分取し、ポリマー存在下で培養した(図2)。1ヶ月おきに、細胞数、CD41発現、新規遺伝子変異が出現するか検討を行った。このCD41は、加齢造血幹細胞に特異的に認められるマーカーの一つです。CD41の発現レベルに関しては、加齢・若齢、加齢特異的遺伝子変異をもった造血幹細胞で、いずれも差はなく、とくに新たな変異が誘導されることはなかった。また、総細胞数に変化は認められなかった。

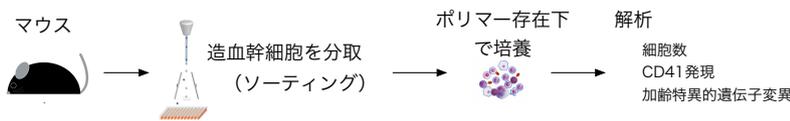


図1 実験の概略

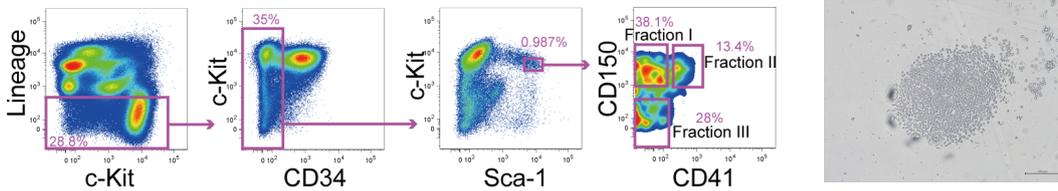


図2 造血幹細胞の分取と培養

b) 加齢を模倣する長期培養法の確立

CD41発現・変異遺伝子・細胞数などに差を認めなかったため、加齢を模倣する培養法の条件の検討を行った。低分子化合物ライブラリー212種を用いてスクリーニングを行った。判定基準として、若齢造血幹細胞（CD34-CD150+cKit+Sca1+Lineage-画分）を分取し、各種低分子化合物存在下で1週間培養を行いCD41の発現が誘導される低分子化合物を探索したところ（図3）、10種の低分子化合物でCD41の発現が誘導された。

次に、in vivoでも加齢に特異的な表現型を呈する移植実験を行い、最終的に加齢を模倣する培養条件の確定を行う。現在、この10種の低分子化合物存在下で1週間培養された造血幹細胞を移植し、末梢血キメリズムをフォロー中である。

加齢を模倣する培養条件の検討(低分子化合物・サイトカインのスクリーニング)

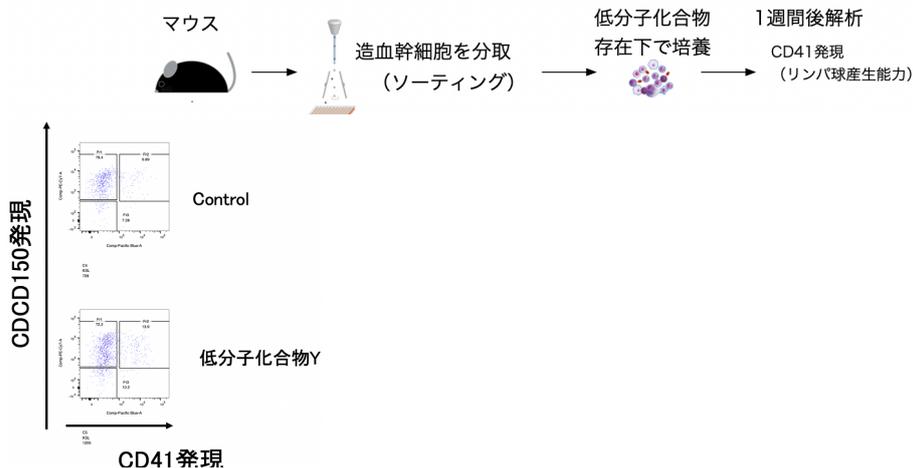


図3 スクリーニング実験の概略

今後の方針

加齢を模倣する培養条件の確立後、加齢によるクローナル造血及び血液疾患発症の機序解明を目指す。これまでの機能解析でクローナル造血などが認められた場合、その遺伝子変異による機能変化を明らかにするために遺伝子発現解析を行う。蓄積する遺伝子変異の組合せも多様性があることから、シングルセルマルチオミックス解析技術を利用する。造血幹細胞を採取し、蓄積された遺伝子変異を解析するシングルセルゲノム解析、またその遺伝子変異による遺伝子発現変化を同時に解析するシングルセルマルチオミ

ックス解析を行う。遺伝子発現の差違・遺伝子オントロジー解析・パスウェイ解析などを用い、機序解明に繋げる。また機能分子あるいは機能経路の機能確認実験を行う。この分子やシグナル経路に関わる分子のノックアウトまたはノックダウン実験、あるいは阻害剤実験などを行い、実際に加齢によるクローナル造血・疾患発症を抑制できるか検討を行う。これらは、加齢によるクローナル造血や血液疾患の治療・予防として有望なターゲットとなり得る。