

造血幹細胞自己複製能分子メカニズムに関する基礎研究

理化学研究所 生命機能化学研究センター

宮西 正憲

1. はじめに

造血系は、約1兆個の血液細胞が毎日入れ替わる極めてダイナミックなシステムである。産生された成熟血液細胞は、栄養の運搬や細菌等異物の除去のみならず、多臓器の修復や機能維持、生体恒常性の維持等の多くの役割を果たしている。そのため、造血系における機能異常は、免疫機能の低下や白血病等の悪性疾患、さらには個体全体の機能低下を惹起する。それゆえ、造血系がその恒常性を生涯にわたりどのように維持しているか、その全容を明らかにすることは極めて重要な課題である。

このダイナミックな血液産生システムは、血液細胞階層の最上位に位置する造血幹細胞により維持されている。造血幹細胞は自己複製能と多分化能を有する細胞集団と理解されているが、造血幹細胞分画内には不均一性が存在することがこれまでの多くの研究より示唆されている。その一つの例として、造血幹細胞恒常性の維持に最も重要な細胞機能である自己複製能の強弱により、自己複製能が強く生涯にわたり維持される細胞集団（長期造血幹細胞）と自己複製能が減弱もしくは消失した細胞集団（短期造血幹細胞）の異なる二つの細胞分画の存在が実験的に実証されている。自己複製能が長期造血幹細胞のみに認められる細胞機能であることより、自己複製能制御機構の解明には、この長期造血幹細胞と短期造血幹細胞を各々単離し、比較することが最も論理的かつ効率的な手法であると推測される。一方で、これらの細胞分画は、Lineage⁻cKit⁺Sca-1⁺Flk2⁻CD34^{-/lo}CD150⁺（以下、pHSCと表記）の分画内に存在することがマウスへの移植実験により明らかになっているが、マウス骨髄有核細胞の0.01%以下と非常に希少な細胞分画であるため、これまで、これら二つの細胞分画を明確に分ける手法が存在せず、上記のような研究手法を行うことができなかった。

そこで申請者は、上記課題を解決するために、独自に開発した多段階スクリーニング法を用いて、マウス長期造血幹細胞特異的に発現する遺伝子としてHoxb5の同定、さらにHoxb5の発現を指標としたレポーターマウスを作製することで、長期造血幹細胞のみを特異的に同定・純化することに世界で初めて成功した。

2. 方法

自己複製能は、長期造血幹細胞のみに強く観察される細胞機能であることより、長期造血幹細胞特異的に発現する遺伝子による制御の可能性が高いことが示唆される。そこで、長期造血幹細胞特異的に発現する遺伝子、特に細胞形質を制御する転写因子を同定するため、上記長期造血幹細胞特異的レポーターマウスを用い、マウス骨髄より単離した長期造血幹細胞、短期造血幹細胞、pHSC分画、多能性前駆細胞からtotal RNAを調整し、トランスクリプトーム解析を行った。次に、同定した候補遺伝子が、実際に自己複製能を制御する機能を有するかを効率的に評価するスクリーニング手法を独自に開発した。具体的には、一次スクリーニングとして、in vitroでの細胞分化培養法を応用した分化抑制効果を計測する実験系と、二次スクリーニングとして、マウスを用いた骨髄移植実験を応用したin vivo自己複製能・多分化能を計測する実験系を組み合わせることで、高効率に自己複製能制御遺伝子の同定を可能とした。さらに同定された転写因子が、どのような下流遺伝子発現ネットワークを制御することで自己複製能をコントロールしている

かを明らかにするためクロマチン免疫沈降シーケンス法 (ChIP-Seq) を用いた。

3. 結果

トランスクリプトーム解析結果をもとに、長期造血幹細胞のみに有意に発現する遺伝子群を抽出した。さらに、遺伝子発現量、短期造血幹細胞との発現量比、転写因子の有無等を指標に再解析を行ったところ、13種の遺伝子が候補遺伝子として残った(図1)。これら候補遺伝子を、レンチウイルスを用いて造血幹細胞に過剰発現する手法を開発した。造血幹細胞は、非常にウイルス感染、遺伝子導入が難しい細胞種であることが知られているが、種々のステップを至適化することで、ほぼ100%の遺伝子導入が可能となった。そこで、本手法を用い、候補遺伝子を短期造血幹細胞に過剰発現させ、細胞の分化が抑制される機能遺伝子を選別する一次スクリーニングを行った。その結果、コントロール群と比較し、有意に抑制効果を有する遺伝子 *Hoxb5* を同定した(図2)。

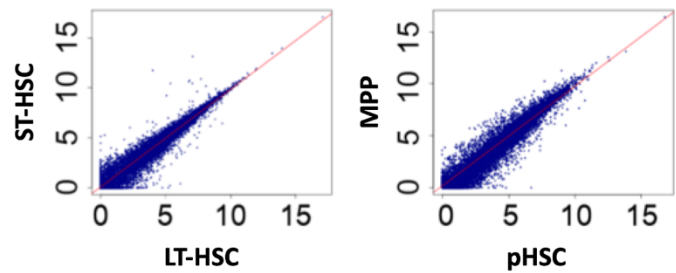


図1：長期造血幹細胞特異的に発現する遺伝子群の抽出
マウス骨髄細胞より調整した長期造血幹細胞 (LT-HSC)、短期造血幹細胞 (ST-HSC)、造血幹細胞全体 (pHSC)、多能性前駆細胞 (MPP) からtotal RNAを調整し、RNA-seq解析を行った。LT-HSC、ST-HSC間での遺伝子発現比較 (左図)、pHSC、MPP間での遺伝子比較 (右図)。

次に、*Hoxb5* が自己複製能を制御しているかを検証するため、移植実験による二次スクリーニングを行った。in vitro 細胞機能実験と同様に、レンチウイルスを用いて短期造血幹細胞に遺伝子導入した後、致死量の放射線照射を行ったマウスへ移植した。細胞の多分化能、自己複製能を評価するため、4週間毎に末梢血に含まれるドナー細胞由来の成熟血液細胞を、フローサイトメーターを用いて解析した。自己複製能の評価は、末梢での生存期間が3日間とごく短期間である好中球の出現期間を指標に、多分化能の評価は、末梢血に含まれる細胞分画の種類を指標に行った。その結果、*Hoxb5* を導入した短期造血幹細胞は、長期間にわたり好中球の産生、さらには全ての血球系の産生が回復し、長期造血幹細胞様に振舞うことが明らかとなり、*Hoxb5* が自己複製能を制御していることを実証した(図3)。

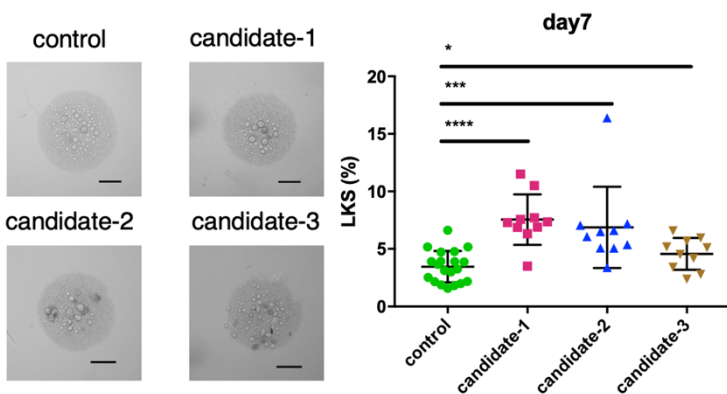


図2：in vitroスクリーニング手法による自己複製能制御遺伝子の抽出
短期造血幹細胞に候補遺伝子を導入し、7日間細胞培養を行った。培養細胞コロニー比較 (左図)、細胞分化抑制効果比較 (右図)。

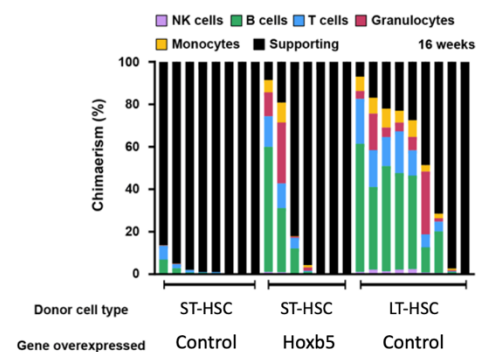


図3：Hoxb5による自己複製能制御
*Hoxb5*を導入した短期造血幹細胞を、致死性放射線照射したマウスへ移植したところ、自己複製能が長期にわたり回復したことが確認された。

次に、*Hoxb5* の制御する遺伝子ネットワーク解明を目指し、ChIP-Seqの至適化を行った。一般的に転写因子結合領域解析を目的としたChIP法には 10^{6-7} 程度の細胞数を要する。1匹あたり500-1000長期造血幹細胞しか採取出来ない技術的ギャップを埋めるため、高感度ChIPアッセイの開発を試みた。まず免疫沈降反応を至適化する目的で、ChIP実験の各ステップの改良を行った。しかしながら、結果としては回収率がinput量の10%程度にしか改善できなかった。またChIP-seqを 10^{3-4} 細胞で行うには、inputとして使用できるDNAがごく微量になる事が想定され、正確なデータを得るためにPCR biasが大きな障壁になると考えられる。このPCR biasを解決するため、バーコード配列を持つoriginal tagを作製し、実際に次世代

シーケンス用のライブラリーが作製可能である事を確認した。さらに、上記の免疫沈降回収率の問題点を解決するため、ChIP 以外の手法で転写因子領域を解析する新規手法の開発プロジェクトも立ち上げ、引き続き研究を進めている。

4. 考察、まとめ

今回、造血幹細胞分画内に存在する長期造血幹細胞から短期造血幹細胞へと細胞が僅かに変化する過程に着目することで、自己複製能に関連する生命現象を特異的に解析する手法を複数開発してきた。それにより、高感度に候補遺伝子のスクリーニングから機能実証実験までを、再現性を確保しつつ高効率に実験・解析することが可能となり、未解明である自己複製能の分子メカニズムの一端を明らかにすることができた (BBRC 2021)。一方で、今回長期造血幹細胞分離マーカーとして同定した *Hoxb5* が自己複製能制御にも関与する機能分子であったことは非常に興味深いが、自己複製能制御の唯一のマスター遺伝子であるかについては、議論の余地が残る。引き続き、制御遺伝子の同定を行う必要がある。さらに、マスター遺伝子が制御する下流遺伝子ネットワークの解明に関しては、残念ながら本研究期間内に解明することはできなかった。

繰り返しになるが、造血幹細胞、中でも長期造血幹細胞は骨髓有核細胞 10 万細胞に 1 細胞と極めて希少な細胞集団であるため、既存の手法や新規技術を容易に造血幹細胞に導入することが、ほとんど不可能であり、実験手法の高感度化や特殊な機器の新規開発が都度必須となる。そのため、中長期にわたる開発戦略や明確な実験プランが重要であり、今後も『長期造血幹細胞自己複製能分子メカニズムの解明』を目指し、研究を継続する。

5. 発表論文、参考文献

発表論文 : Sakamaki T, Kao KS, Nishi K, Chen JY, Sadaoka K, Fujii M, Takaori-Kondo A, Weissman IL, Miyanishi M. *Hoxb5* defines the heterogeneity of self-renewal capacity in the hematopoietic stem cell compartment. *BBRC* 2021 539: 34-41

参考論文 : Chen JY, Miyanishi M, Wang, SK, Yamazaki S, Sinha R, Kao KS, Seita J, Sahoo D, Nakauchi H, Weissman IL. *Hoxb5* marks long-term haematopoietic stem cells revealing a homogeneous perivascular niche. *Nature* 2016 530: 223-227.