

無菌性炎症反応を介したヒト造血幹細胞自己複製機構の解明

高山直也

千葉大学 大学院医学研究院 先端研究部門 イノベーション再生医学

【研究の背景】

造血幹細胞 (Hematopoietic Stem Cell: HSC) の分化促進に伴う枯渇は老化現象の一つで、慢性炎症シグナルによって促進される。一方、胎生期 HSC の発生、自己複製は無菌性炎症性シグナルが必須なことが明らかになった。申請者らは、ヒト HSC の**静止期脱出**に伴う自己複製あるいは分化が開始される‘活性化’機構に、CTCF によるクロマチンループ再編成及びインターフェロンシグナル分子群の関与を発見した。しかしながら、炎症シグナルがどのようにクロマチン再構成を誘導し、HSC の活性化を制御するの分子メカニズムは不明のままである。さらに、活性化後の自己複製並びに分化という相反する運命決定制御システムへの**炎症シグナルの作用も未解明**である。

【目 的】

申請者らは、iPS 細胞由来間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) を支持細胞とした独自のヒト HSC 増幅培養系を確立し、MSC 由来因子が、炎症シグナルの一つであるインターフェロンシグナル遺伝子群 (Interferon Signal Genes; ISGs) を活性化させ、HSC の増幅への関与を示す知見を得た。本研究では、本培養システムを活用し、**炎症シグナルによるヒト HSC の自己複製・分化制御機構の解明とその基礎的基盤を活用した体外増幅系への応用**を目的とした。

【方 法】

iPS 由来 MSC による造血幹細胞増幅機序の解明を目指し、具体的には以下の 2 項目の実験を実施した。

A) ヒト造血幹細胞活性化過程で生じる CTCF 結合領域拡大への ISGs 関与の検証

前述の様に造血幹細胞が活性化する際に必須である CTCF 結合領域の増加を誘導するトリガーについては不明である。MSC 由来の何らかの因子が ISG 発現を増強し、幹細胞の活性化と自己複製を誘導していることから、**MSC 由来因子による ISGs が CTCF 結合領域増加の誘因となっている可能性**がある。この仮説を検証するために、MSC 刺激前後のオープンクロマチン領域を ATAC シークエンスにより解析するため、ライブラリー作成を行った。

B) 活性化後の ISGs による自己複製と分化を規定する機序の解明

i) MSC 共培養時の造血幹細胞での ISG 遺伝子群の機能評価;

MSC 共培養による造血幹細胞内での ISG 遺伝子群の重要性を免疫不全マウスへの移植により検証した。ISG 遺伝子群の主要なシグナル分子である IRF3 及び IRF7 の造血幹細胞での発現を shRNA 法により抑制後、免疫不全マウスへ移植した。

ii) MSC 共培養による造血幹細胞増幅機序の解明;

MSC によるインターフェロンシグナル遺伝子群誘導を代替するため、Interferon α (IFN α) を異なる濃度で添加し、MSC との共培養と比較した。IRF7, ISG15 など複数の mRNA 発現から、MSC による共培養と同程度の ISG 上昇は、 10^{-4} - 10^{-1} ng/ml

という低濃度の IFN a 添加で達成できた。しかし、これらの濃度では MSC 共培養で得られる造血幹細胞増幅が得られず、さらに高濃度では、造血幹細胞数が減少した。つまり、ISG の発現量の違いではなく、ISG を誘導する因子 (MSC 由来因子 vs IFN a) の違いにより ISG 以外の共発現する経路が異なり、自己複製と分化を規定する可能性が示唆された。この仮説を検証するため、①サイトカインのみのコントロール群、②iPS-MSC との共培養群、③低濃度 IFN a (0.1 ng/ml) 添加群、④高濃度 IFN a (0.1 ng/ml) 添加群に分け、培養 7 日目に CD34 陽性 CD90 陽性 CD45RA 陰性造血幹細胞集団をフローサイトメーターで分取し、RNA シークエンスにより解析した。

【結 果】

B-i) MSC 共培養時の造血幹細胞増幅では、ISG 遺伝子群の活性化が必須である；

IRF3 及び IRF7 抑制後の造血幹細胞移植後 8 週の解析で、IRF3 及び IRF7 の抑制により、コントロール群と比較して、マウスへの造血系細胞の生着が有意に抑制されることが明らかになり、MSC による造血幹細胞増幅において、ISG シグナルが必須であることを明らかにした。

B-ii) MSC 共培養による造血幹細胞での ISG 遺伝子群、幹細胞制御遺伝子群の活性化と AhR 遺伝子群の抑制

RNA シークエンスの解析の結果、ISG 遺伝子群は、②iPS-MSC との共培養群と③低濃度 IFN a (0.1 ng/ml) 添加群は同程度であり、④高濃度 IFN a (0.1 ng/ml) 添加群ではさらに上昇していることを確認した。次に MSC との共培養群と、低濃度 IFN a (0.1 ng/ml) 添加群、高濃度 IFN a (0.1 ng/ml) 添加群を比較したところ、MSC との共培養群では、I) 幹細胞関連遺伝子群の上昇、II) AhR シグナル遺伝子群の著明な減少、III) 血液細胞分化関連遺伝子の減少が観察された。以上の成果を 2023 年米国血液学会にて発表し、現在論文投稿中である。

【考 察】

MSC 由来の何らかの因子が、ISG 群の上昇とともに、I) 幹細胞関連遺伝子群の上昇、II) AhR シグナル遺伝子群の抑制、III) 血液細胞分化関連遺伝子の抑制を介して、幹細胞増幅を促進していることが示唆された。今後は、造血幹細胞に対してこれらのシグナルを惹起する MSC 由来因子の同定を進める。また、現在解析中の ATAC シークエンスの結果から、造血幹細胞の活性化時に生じる CTCF の結合領域増大を調節する因子の同定を目指す。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本技術は、HSC 移植の臨床応用への道を切り開く新しいプラットフォームを提供するとともに、造血支持細胞による HSC 制御機構に関する重要な知見をもたらすことが期待される。