

体外増幅造血幹細胞の品質管理に向けた造血幹細胞亜集団の理解

田中洋介

熊本大学 国際先端医学研究機構

【研究の背景】

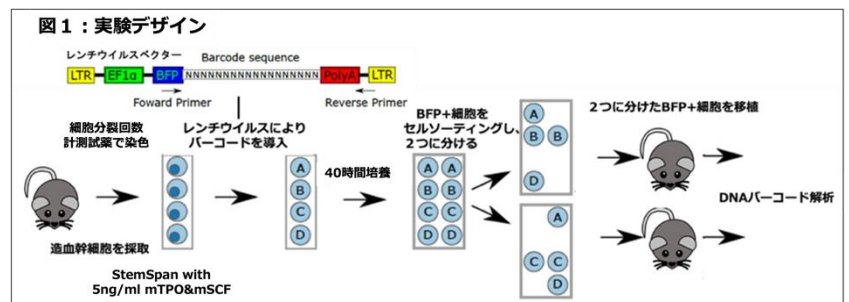
巨核球偏向型、骨髄球偏向型、バランス型(骨髄球とリンパ球を同程度に産生する)やリンパ球偏向型の造血幹細胞亜集団の存在が報告されている¹⁻³⁾。これらの亜集団の階層性や関連性についての理解は進んでいない。亜集団の識別は移植後の産生された血液細胞パターンのみでしか識別できない。階層性を見るためには2次移植が必要となる。また、亜集団の直接的な関連性を見るためには造血幹細胞の分裂パターンの解析が必要である。さらに亜集団の全貌を知るにはこれらの解析をラージスケールで行う必要がある。

【目 的】

造血幹細胞の体外増幅が可能になったことから、次の課題は増幅された造血幹細胞の品質管理である。造血幹細胞はそもそもヘテロな集団であることから、いずれの造血幹細胞が増幅されたかを見分ける必要があるが、今のところ造血幹細胞を移植することでしか亜集団を見分けることができない。そこで、本研究では DNA バーコードを用いた造血幹細胞の分裂パターン・分化パターン解析を行い、亜集団間の階層性・関連性、亜集団を識別できるマーカーを特定し、さらには造血幹細胞の全貌の理解を目指す。

【方 法】

DNA バーコードを用いた娘細胞ペア解析の方法を図1に示す。骨髄から造血幹細胞を採取し、レンチウイルスにより DNA バーコード(BFP 標識)を導入する。造血幹細胞をサイトカイン添加無血清培地で40時間(ほぼ全ての造血幹細胞が1回分裂する)培養する。1回分裂後の BFP+細胞をセルソーティング



により採取し、2つに分けて致死量放射線照射したレシピエントマウスに移植する。これにより、同じバーコードを持つペア娘細胞は、2分の1の確率で2匹のレシピエントマウスに分かれて移植される。移植後4ヶ月後の時点で成熟した血液細胞をそれぞれ分取しDNAバーコードを回収する。ここまでの実験は成功している。次に以下の実験を行う。

- ① 4ヶ月後の造血幹細胞娘細胞ペアの亜集団を解析し、造血幹細胞の分裂パターンを明らかにする。
- ② 4ヶ月後のレシピエントマウスの骨髄を2次移植する。これにより亜集団の階層性を明らかにする。
- ③ 同じく16週間後の骨髄の造血幹細胞のシングルセル RNA 解析を行う。これにより造血幹細胞として骨髄に残っている、つまり自己複製したクローンのバーコードがわかり、亜集団の自己複製能(造血幹細胞としての品質)を調べることができる。また、遺伝子発現データからそれぞれの亜集団に特徴的な遺伝子発現パターンを特定する。

以上の研究により、造血幹細胞の分裂パターンと亜集団の階層性・関連性、自己複製能の差異と遺伝子発現パターンを明らかにし、造血幹細胞の全貌を解き明かすことを目指す。

【結 果】

本年度の研究により以下のことを明らかにした。

- ① 造血幹細胞の主要な分裂様式は、骨髓球偏向型-バランス型、バランス型-バランス型、リンパ球偏向型-前駆細胞のパターンであった(図2)。
- ② バーコードで識別された造血幹細胞亜集団の2次移植により亜集団の階層性は骨髓球偏向型→バランス型→リンパ球偏向型であった(図3)。
- ③ DNA バーコードによりいずれの亜集団かが判明している造血幹細胞のシングルセル遺伝子発現解析を実施し、亜集団に特定のなマーカー候補の同定に成功した。例えば、骨髓球偏向型は、Nupr1, Procr, Cd74、バランス型は Plac8, Cd37, Cd52、さらに今回新たに同定した分化細胞を産生しない造血幹細胞(No output と名付けた)は Vwf, Clu, Cavin2 などが特異的に発現していることがわかった。表面マーカーである Procr, Cd37, Cd52 については、これらの発現により造血幹細胞を細分化できることをフローサイトメトリー解析で確認している(図4)。

【考 察】

本研究において造血幹細胞亜集団の関連性と階層性を明らかにすることができた。また、それぞれを特徴づけるマーカー候補の同定にも成功しており、亜集団特異的マーカーを確立することができれば、移植を介さず亜集団の評価が可能になり研究が加速することが期待される。シングルセル遺伝子発現解析において同定した No output 型は血小板関連遺伝子の発現が高いことから、巨核球偏向型亜集団またはそれに近いものであることが想定された。本研究では成獣マウスの造血幹細胞の亜集団の解析を行ったが、今後の研究で胎生期や老年期における亜集団のパターンを解析することにより、一生における造血幹細胞の亜集団の変化を追うことが可能になり、亜集団の全貌が明らかになることが期待される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

マウスやヒト造血幹細胞の体外増幅が可能になってきた今、次の課題としては、増幅された造血幹細胞の質である。本研究により、造血幹細胞の亜集団の違いを見分ける方法を明らかにすることで、増幅後の造血幹細胞の質(自己複製能)や白血病の温床になりやすい亜集団を特定することができる。この二つ物差しはヒト造血幹細胞に応用することで造血幹細胞の品質管理の良いツールとなり、将来的な造血幹細胞増幅を中心とした再生医療への貢献が期待できる。

【参考・引用文献】

1. Lu, R., Neff, N. F., Quake, S. R. & Weissman, I. L. Tracking single hematopoietic stem cells in vivo using high-throughput sequencing in conjunction with viral genetic barcoding. *Nat Biotechnol* **29**, 928-933 (2011).
2. Sanjuan-Pla, A. *et al.* Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature* **502**, 232-236 (2013).
3. Lu, R., Czechowicz, A., Seita, J., Jiang, D. & Weissman, I. L. Clonal-level lineage commitment pathways of hematopoietic stem cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 1447-1456 (2019).

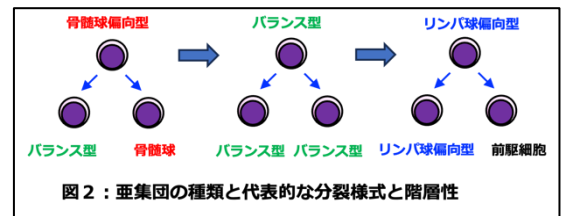


図2：亜集団の種類と代表的な分裂様式と階層性

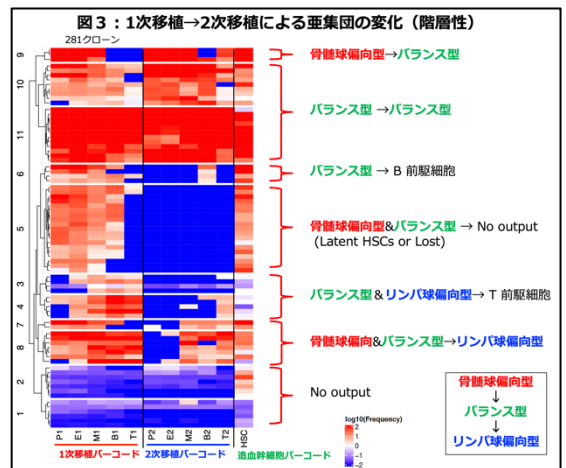


図3：1次移植→2次移植による亜集団の変化(階層性)

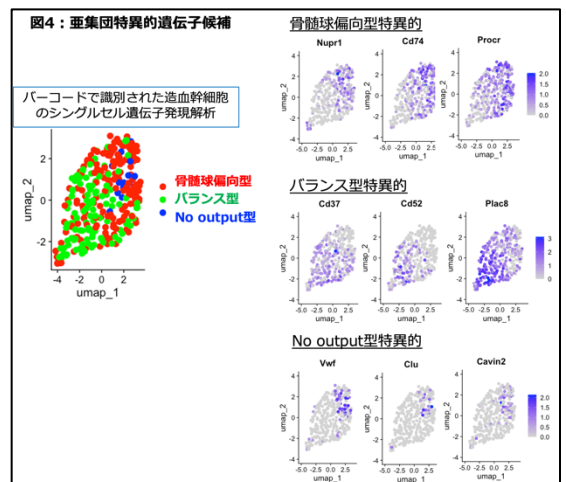


図4：亜集団特異的遺伝子候補