

遺伝子編集後造血幹細胞の静止期性再獲得に着目した新規細胞療法の開発

城下 郊平

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

【研究の背景】

造血幹細胞(HSC)は遺伝子細胞療法の重要なリソースである。定常状態のHSCは、静止期(G0期)に留まり、高い幹細胞機能を維持しているが、ゲノム編集の過程で静止期性を喪失する。これまでゲノム編集後HSCの機能改善を目指した編集技術と体外増幅培養技術の最適化・改良が進められてきたが、ゲノム編集後HSCの細胞周期特性、特に「再静止期化」に注目した研究は限られていた。

【目的】

本研究では、独自の培養プラットフォーム・マウスモデルを用いたHSCの再静止期化機構を解明する。さらに再静止期化機構を応用したゲノム編集後HSCの機能改善を研究目標とする。

【方法】

- 1) ゲノム編集後HSCの再静止期化遺伝子の同定
- 2) 再静止期化候補遺伝子の欠損マウスの樹立
- 3) 再静止期化候補遺伝子欠損HSCにおける再静止期化障害の検討

【結果】

1) ゲノム編集後HSCの再静止期化遺伝子の同定

まず、HSC特異的な遺伝子発現セット(MolO signature¹⁾)のうち、機能未知の遺伝子を抽出した。次に、申請者の先行研究で取得した遺伝子発現解析データ²⁾を元に、再静止期化と連動した発現変動(増殖刺激後に減少、再静止期化後に上昇)を示す遺伝子を探索し、Cathepsin F(CTSF)を同定した。CTSFの再静止期化における役割を調べるため、申請者が樹立済みのマウスHSCに最適化した遺伝子編集・培養プラットフォーム²⁾を用いた。CTSFノックアウト(CTSF^{KO})群はコントロール群に比較して、再静止期化培養後にHSC(CD150⁺CD48⁻LSK)が減少した。一方、レトロウイルスを用いたCTSFの過剰発現では、コントロール群に比較してCTSF過剰発現群でG0割合が有意に増加した。

2) CTSF欠損マウスの造血能解析

CTSFのexon1とexon5に対するgRNAを設計し、受精卵前核に対しgRNAおよびCas9をマイクロインジェクションし、胚を仮親マウスに移植した。WTアレルに対してはexon2に対するprimerを、KOアレルに対してはexon1の5'側、exon5の3'側にprimerを作成し、得られたファウンダーマウスに対してgenomic PCRを行った。同定されたホモKO個体のDNAを用いたSanger sequenceを行い、exon1およびexon5の間の欠失が確認できた個体をライン化した。ライン化後の個体の肝臓・腎臓・心臓を用いてCTSFのウェスタンブロットを行い、蛋白レベルでの欠失を確認し、CTSF^{KO}マウスを樹立した。

3) CTSF欠損HSCの再静止期化障害

全血液細胞で G0 期を標識可能なマウス (Vav-iCre/mVenus-p27-K) と CTSE^{KO} マウスとを交配し、再静止期化培養後 HSC における mVenus 陽性割合を経時的に追跡した。再静止期化 2 日目、5 日目のいずれのタイムポイントでも、野生型に比して CTSE^{KO} HSC の mVenus 陽性割合が低下しており、CTSE 欠失 HSC は再静止期化が障害された。

【考 察】

本年度までに HSC の再静止期化分子として CTSE を同定することに成功した。次なるステップは「CTSE がいかんして再静止期化を制御しているか？」という分子機序の解明である。CTSE はライゾームに局在するプロテアーゼであり、再静止期化過程で標的分子を切断・分解することで再静止期化を制御していると推察される。そこで、切断標的分子の同定を目的として、CTSE 過剰発現細胞株を用いた Proteome 解析を実施した。既に CTSE 過剰発現後に減少する「静止期化候補蛋白質」を複数得ており、その中には細胞周期制御因子や代謝制御因子が含まれていた。今後は、これらの候補蛋白質の過剰発現およびノックアウト実験を通じて、候補蛋白質の中から再静止期化を制御する CTSE の切断分子を同定できる可能性が高いと考えており、現在検討を進めている。

また、興味深いことに CTSE^{KO} マウスの造血能解析では、5-FU・移植後などのストレス造血および定常状態の分化能に違いがみられている。再静止期化機構と並行した解析を進め、CTSE の機能を明らかにする予定である。

本研究の主目的であるゲノム編集 HSC に対する再静止期化機構の応用にはまだ着手できていない。しかし、既に CTSE を同定しており、得られた知見をさらに発展・応用することで、ゲノム編集後 HSC の再静止期化機構の賦活化が遺伝子編集後 HSC の機能改善に繋がるかを検証可能になると考えている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

ゲノム編集 HSC を用いた細胞療法は、先天性免疫不全症のみならず、再発難治の血液腫瘍に対しても有用性が報告されており³⁾、今後 HSC の遺伝子細胞療法は血液疾患に対する次世代の治療基盤となることが予想される。本研究で得られた再静止期化分子は、ヒト HSC で簡便に検証が可能であり、臨床応用の実現可能性は高いと考えている。また、既に報告されている機能的 HSC の増幅培養⁴⁾と再静止期化は共存可能なアプローチであり、増幅後のゲノム編集 HSC の再静止期化がゲノム編集 HSC の機能を大きく改善する余地がある。以上の理由から臨床への貢献度は高いと考える。

【参考・引用文献】

1. Wilson NK et al., Combined Single-Cell Functional and Gene Expression Analysis Resolves Heterogeneity within Stem Cell Populations. *Cell Stem Cell*. 2015;16(6):712-24.
2. Shiroshita K et al., “A culture platform to study quiescent hematopoietic stem cells following genome editing” *Cell Rep Methods*. 2022; 2(12):100354.
3. Casirati G, et al., “Epitope editing enables targeted immunotherapy of acute myeloid leukaemia” *Nature*. 2023;621(7978):404-414.
4. Sakurai M et al., “Chemically defined cytokine-free expansion of human haematopoietic stem cells” *Nature*. 2023;615(7950):127-133.