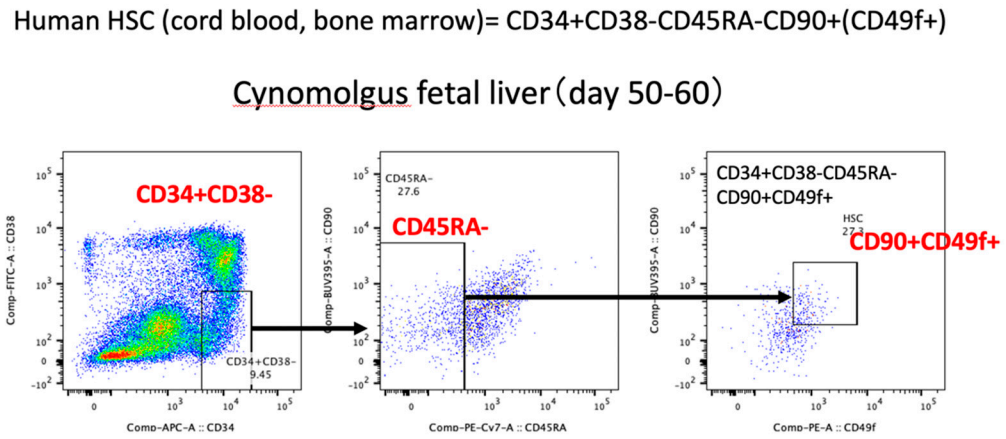
55　造血幹細胞の自己複製能・多分化能メカニズムの解明	山本　玲

【目的】造血幹細胞は、自己複製能（一生涯持続）と多分化能（赤血球・血小板・白血球を産生）を持った未分化な血液細胞と定義される。造血幹細胞は、加齢に伴い自己複製・多分化能が変化し、さらには骨髄異形成症候群等の血液疾患や代謝性疾患に関与すると考えられている。しかし、そのメカニズムの多くは未だ不明である。マウスとヒトでは造血幹細胞のマーカーや機能分子が異なる場合が多く、必ずしもマウスで得られた知見がヒトには適用できるわけではない。つまり、ヒトへの応用という観点で考えると、よりヒトに近い、自家移植を用いた動物実験モデルの構築が望まれる。非ヒト霊長類であるカニクイザルは、寿命が 20〜30 年と長く、遺伝子配列などマウスよりヒトに近い。また多くのヒト抗体との交差性があり、造血幹細胞はヒトと同じく CD34 陽性 CD38 陰性 CD45RA 陰性 CD90 陽性画分に存在すると報告されており、ヒト造血幹細胞研究においても有用であると考えられる。以上のことからカニクイザル研究から得られた知見は、ヒトへの外挿がマウス研究より容易であると期待できる。また、ヒト研究とは異なり、カニクイザル由来の血液細胞をカニクイザルに移植して機能を評価する自家移植の系が利用できることが非常に大きな利点となっている。このように、カニクイザルなどの非ヒト霊長類は実験動物モデルとして非常に優位性が大きいが、倫理的な問題や設備上の制約などから、使用するにはハードルが高く、世界的にも非ヒト霊長類を用いた血液、特に造血幹細胞研究はアメリカ国立衛生研究所の一研究室で行われているのみでほとんど行われていない。我々の現在の所属先であるヒト生物学高等研究拠点には、霊長類遺伝子改変コアやシングルセル解析コア、非ヒト霊長類飼育施設もあり、非ヒト霊長類研究を行う環境がそろっている。

【方法】我々は、非ヒト霊長類であるカニクイザルを動物モデルとして用い、造血幹細胞の表面マーカーの同定、自己複製・多分化能のメカニズム解明を行うことを目的とした。具体的には、シングルセルレベルで細胞系譜追跡が可能となる細胞のバーコード化技術を応用し、カニクイザル造血幹細胞をバーコード化し、自家移植を行う。その後、定期的に末梢血・骨髄細胞を解析することによりメカニズム解明を行う。

【結果】まず、カニクイザルの胎児肝臓・骨髄細胞を用い、その中のどの画分が実際に機能的な造血幹細胞であるかフローサイトメトリーと免疫不全マウスへの移植系を用いて同定した。さらに、その画分のシングルセル遺伝子発現解析を行った。また、細胞系譜追跡実験系を確立するために RNA バーコード実験系を確立した。本研究助成により、RNA バーコード実験系の確立を行い、さらに、カニクイザルに実際に造血幹細胞の機能を有する細胞が含まれることを同定した。

カニクイザル胎児肝臓の造血幹細胞



55. 造血幹細胞の自己複製能・多分化能メカニズムの解明

山本　玲

京都大学 高等研究院 ヒト生物学高等研究拠点

Key words：造血幹細胞，非ヒト霊長類，自己複製能，多分化能

緒　言

造血幹細胞は、自己複製能（一生涯持続）と多分化能（赤血球・血小板・白血球を産生）を持った未分化な血液細胞と定義される。造血幹細胞は、加齢に伴い自己複製・多分化能が変化し、さらには骨髄異形成症候群等の血液疾患や代謝性疾患に関与すると考えられている。しかし、そのメカニズムの多くは未だ不明である。我々はこれまでマウス造血幹細胞のシングルセル移植・シングルセル遺伝子解析などを行い、新しいタイプの造血幹細胞を同定し、新しい分化モデルを提唱した［1］。また、その加齢による変化も同定した［2］。しかし、これらマウスで得られた知見をどのようにヒトに応用するかという大きな問題に常に突き当たる。その要因として、まず、マウスとヒトでは造血幹細胞のマーカーや機能分子が異なる場合が多く、必ずしもマウスで得られた知見がヒトには適用できるわけではないことが考えられる。例えば、マウスの造血幹細胞は CD34 陰性画分に存在するが、ヒト造血幹細胞は CD34 陽性画分に存在し、造血幹細胞の大多数のマーカーは共有されていない。またマウス造血幹細胞は *Hoxb4* 遺伝子を強制発現させると増幅するが、ヒト造血幹細胞ではあてはまらない。更に加齢に伴いヒト造血幹細胞など血液細胞に蓄積する遺伝子変異が加齢マウスでは認められないなど、多くの差違が存在する。さらなる要因として、ヒト造血幹細胞の機能評価は免疫不全マウスをレシピエントに用いた異種間の移植を用いる必要があり、骨髄環境（ニッチ）との相互作用が異なり、マウス環境下で定義されたヒト造血幹細胞が本当に造血幹細胞であるかの評価が難しい点も上げられる。以上のように、ヒトへの応用という観点で考えると、よりヒトに近い、自家移植を用いた動物実験モデルの構築が望まれる。また、マウスあるいはヒト造血幹細胞に真に特異的な表面マーカーは未だ明らかになっていない。現在知られているマウス・ヒト造血幹細胞の表面マーカーを用いても、その集団の半分以上は実は造血幹細胞ではない。造血幹細胞のみを分取する表面マーカーがないことが造血幹細胞のメカニズム解明などの障壁になっており、表面マーカーを明らかにすることができればその機能解析などが容易になると期待できる。特に造血幹細胞の最大の特徴である自己複製能と多分化能のメカニズムの解明は非常に大きな難問であるが、これを明らかにすることができれば、造血幹細胞の増幅や分化の制御が可能となり、現在の造血幹細胞移植医療の改善・向上に大きく寄与することができる。非ヒト霊長類であるカニクイザルは、寿命が 20～30 年と長く、遺伝子配列などマウスよりヒトに近い。また多くのヒト抗体との交差性があり、造血幹細胞はヒトと同じく CD34 陽性 CD38 陰性 CD45RA 陰性 CD90 陽性画分に存在すると報告されており、ヒト造血幹細胞研究においても有用であると考えられる。以上のことからカニクイザル研究から得られた知見は、ヒトへの外挿がマウス研究より容易であると期待できる。また、ヒト研究とは異なり、カニクイザル由来の血液細胞をカニクイザルに移植して機能を評価する自家移植の系が利用できることが非常に大きな利点となっている。このように、カニクイザルなどの非ヒト霊長類は実験動物モデルとして非常に優位性が大きいが、倫理的な問題や設備上の制約などから、使用するにはハードルが高く、世界的にも非ヒト霊長類を用いた血液研究はアメリカ国立衛生研究所の一研究室で行われているのみでほとんど行われていない。我々の現在の所属先であるヒト生物学高等研究拠点には、霊長類遺伝子改変コアやシングルセル解析コア、非ヒト霊長類飼育施設もあり、非ヒト霊長類研究を行う環境がそろっている。そこで我々は、非ヒト霊長類であるカニクイザルを動物モデルとして用い、造血幹細胞の表面マーカーの同定、自己複製・多分化能のメカニズム解明を行うことを目的とした。具体的には、シングルセルレベルで細胞系譜追跡が可能となる細胞のバーコード化技術を応用し、カニクイザル造血幹細胞をバーコード化し、自家移植を行う。その後、定期的に末梢血・骨髄細胞を解

析することによりメカニズム解明を行う。

方法および結果

1. RNA バーコードシステムの構築

細胞系譜追跡のため RNA バーコードシステムの構築を行った。まず、プロモーター下にバーコード配列を挿入し、EGFP が発現するベクターを作製した（図 1A、B）。実際、バーコード部位が多様性を持っているかまずサンガーシークエンスで確認したところ多様性を確認できた（図 1C）。以上により、様々なバーコードを持ったベクターが完成した。これを造血幹細胞に感染させることにより、各々の造血幹細胞の細胞系譜システム実験系が行える。

図1A

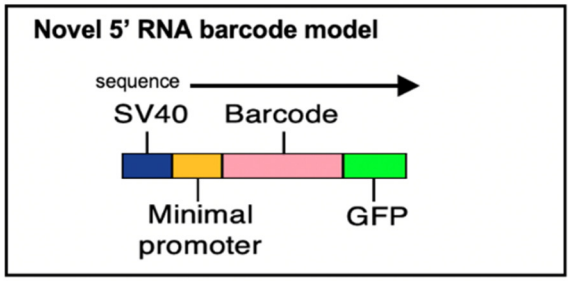


図1B

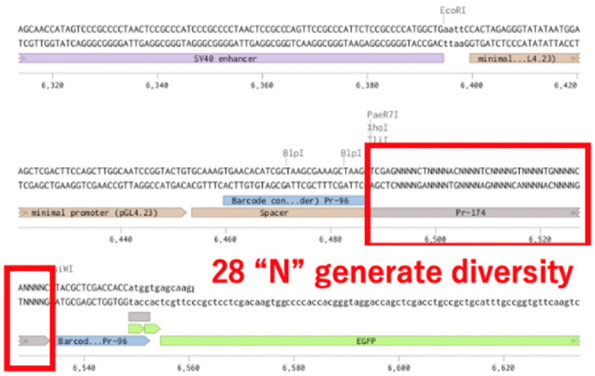


図1C

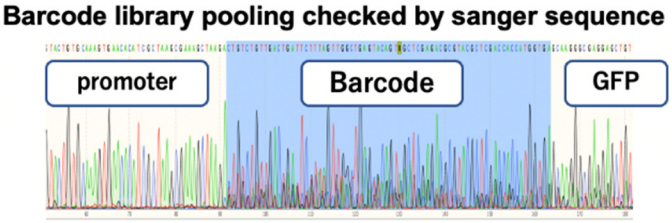


図 1. RNA バーコードシステム

A) バーコードシステムの概念図。

B) バーコードの実際の配列情報。

C) バーコード部位のシークエンス結果。

2. フローサイトメトリーによるカニクイザル造血幹細胞の染色

カニクイザルの骨髄細胞は非常に高価であるため、まず入手が比較的容易なカニクイザル胎児肝臓の造血幹細胞の染色法の確立を行った。胎児肝臓を入手し、ヒトで報告されている造血幹細胞の表面マーカー（CD34、CD38、CD45RA、CD90、CD49f）を用いて染色を行ったところ、人と同様の染色パターンを得た（図 2）。

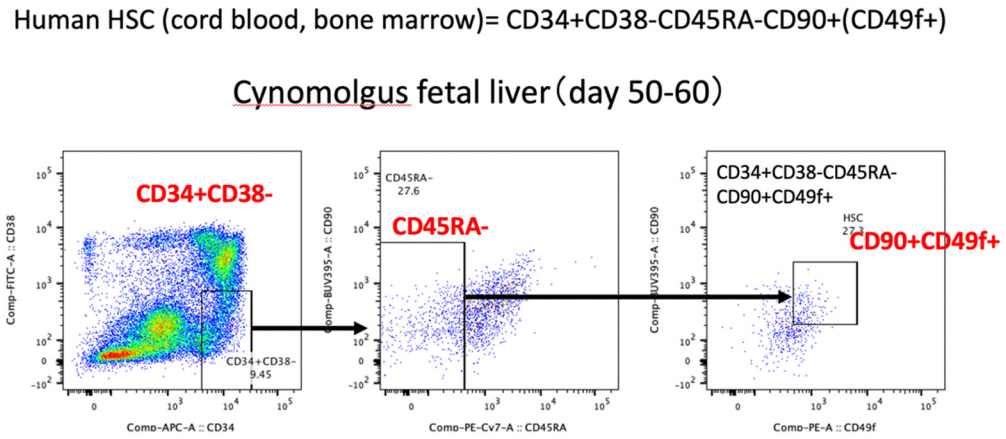


図 2. カニクイザル胎児肝臓のフローサイトメトリー解析
造血幹細胞をフローサイトメトリー抗体で染色解析を行った。

3. フローサイトメトリーによるサル造血幹細胞の同定

また、実際に造血幹細胞画分が造血幹細胞能力を有しているか検討を行った。CD34 陽性細胞画分をフローサイトメトリーで分取し、免疫不全マウスに移植した。その後、定期的に末梢血を解析し、移植した細胞が末梢血を再構築したか検討した。実際、移植された細胞から産生された細胞を確認することができた（図 3）。

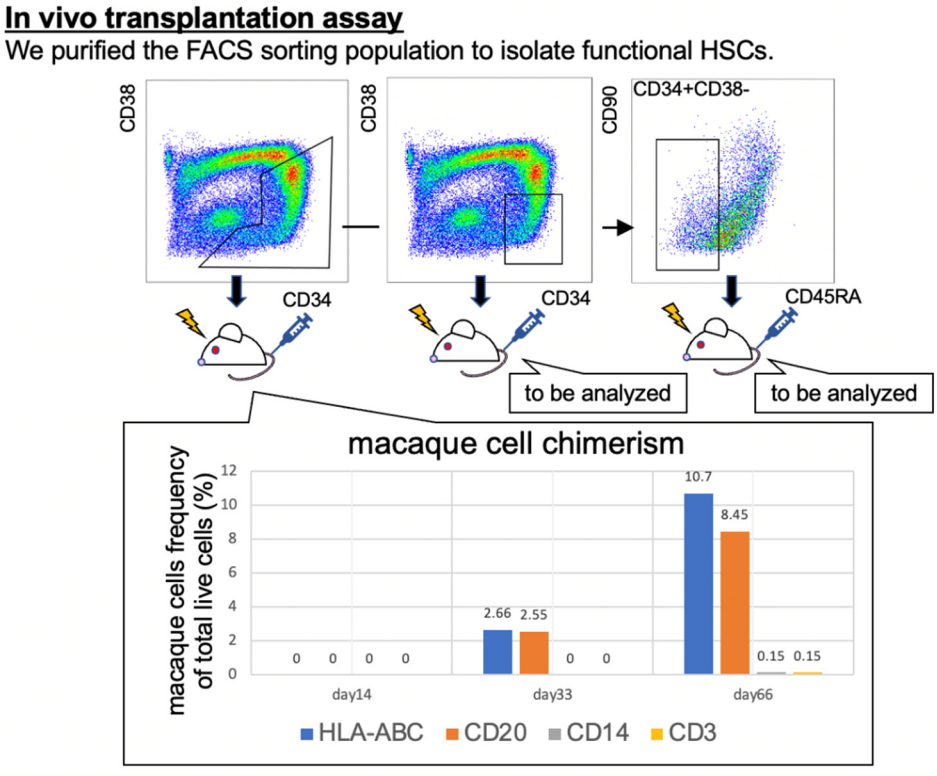


図 3. カニクイザル胎児肝臓の移植解析
造血幹細胞画分をフローサイトメトリーで分取、免疫不全マウスに移植し、キメリズム解析を行った。

4. シングルセル遺伝子発現解析

造血幹細胞の自己複製や分化の機序解明のため、胎児肝臓の造血幹細胞・前駆細胞画分（$CD34^+CD38^-CD45RA^-CD90^+$/ $CD34^+CD38^-CD45RA^-CD90^-$/ $CD34^+CD38^-CD45RA^+$）のシングルセル遺伝子発現解析を行った。そのシングルセル解析データをクラスタリング解析したものが図 4 である。現在、各々に特異的な分子を解析中である。

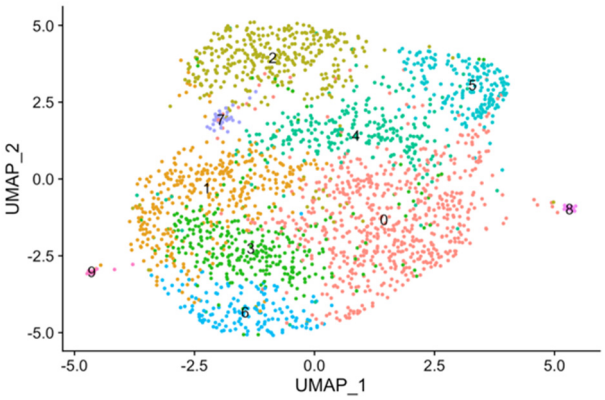


図 4. カニクイザル胎児肝臓のシングルセル遺伝子発現解析
UMPA でクラスタリング表示。

考　察

本研究により、カニクイザルの胎児肝臓もヒト骨髄・臍帯血・胎児肝臓と同様の染色パターンを示すことが示唆された。特に、造血幹細胞画分 $CD34^+CD38^-CD45RA^-CD90^+CD49f^+$がカニクイザル胎児肝臓にも存在することが分かった。以上のように、初めてカニクイザルもヒトと同様に CD34 陽性画分に造血幹細胞が含まれることを示すことができた。この移植結果とシングルセル遺伝子発現解析データを統合することにより、造血幹細胞の自己複製や分化に関する機序を解明できると期待できる。

文　献

1） Ryo Yamamoto, Yohei Morita, Jun Ooehara, Sanae Hamanaka, Masafumi Onodera, Karl Lenhard Rudolph, Hideo Ema, Hiromitsu Nakauchi Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. Cell 154 (5), 1112-1126
PMID: 23993099 DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.007

2） Ryo Yamamoto, Adam C Wilkinson, Jun Ooehara, Xun Lan, Chen-Yi Lai, Yusuke Nakauchi, Jonathan K Pritchard, Hiromitsu Nakauchi Large-Scale Clonal Analysis Resolves Aging of the Mouse Hematopoietic Stem Cell Compartment. Cell Stem Cell . 2018 Apr 5;22(4):600-607.e4.
PMC5896201 DOI: 10.1016/j.stem.2018.03.013