

血液の加齢を模倣する試験管内再構成法の開発

所属： 京都大学 高等研究院 ヒト生物学高等研究拠点

助成対象者： 山本 玲

共同研究者：

概要

造血幹細胞は、一生涯にわたってすべての血液細胞を産生し続けることができる特異的な細胞である。造血幹細胞も加齢し、クローナル造血を呈すると報告されているが、その加齢メカニズムは未だ不明である。本研究課題では、培養皿で造血幹細胞の加齢を模倣する新規技術開発を目的とした。ポリマーを用いた培養方法に低分子化合物などを添加し、加齢を模倣するような低分子化合物のスクリーニングを行った。また実際、それらが生体内でも加齢の表現型を呈するか検討を行った。次に、その機序解明を目指す。

abstract

HSCs are unique cells that can continue to produce all blood cells throughout life. It has been reported that HSCs also age and exhibit clonal hematopoiesis, but the mechanism of aging is still unknown. The objective of this research project was to develop a novel technique to mimic the aging of HSCs in culture dishes. We screened low-molecular-weight compounds that mimic aging by adding them to a polymer-based culture method. We also examined whether these compounds actually exhibit the aging phenotype in vivo.

研究内容

背景

造血幹細胞は、一生涯にわたってすべての血液細胞を産生し続けることができる特異的な細胞である (Seita and Weissman 2010)。近年、健常者においても加齢とともに造血幹細胞から末梢血液細胞に至るまで特異的な遺伝子変異が徐々に蓄積し、その遺伝子変異を有したクローンが増殖していくことが明らかとなった。この現象は加齢に伴うクローナル造血と呼ばれている。さらにある特定の遺伝子変異が導入されると骨髄異形成症候群や急性白血病などを発症する。しかし、その詳細なメカニズムは未だ分かっていない。

特定の遺伝子変異が骨髄異形成症候群様の病態の一部を示すことは報告されているが (Inoue et al. JCI 2013, Shirai et al. Cancer Cell 2015, Obeng et al. Cancer Cell 2016)、加齢 関連遺伝子変異がクローナル造血、さらにどのように RNA スプライシング分子が関わって骨髄異形成症候群を引き起こすのか未解明である。加齢から疾患発症に至るプロセスは複雑で、複数の遺伝子変異が徐々に蓄積することが重要であると考えられている。さらに、マウスの寿命は 2-3 年と短く、その短期間では様々な遺伝子変異は蓄積されていないことが分かっている (未発表データ)。そのような複雑なプロセスを 1, 2 個の遺伝子改変がなされたマウスを用いてマウスの寿命内で再現することは非常に困難であると考えられる。本研究はそれを打破するため、加齢というプロセスを試験管内のみで完結しようというものであり、非常に有用な技術となり得る。培養下では、細胞の分裂が生体内より早く、遺伝子変異が蓄積されやすい。より加齢に近い培養条件下で造血幹細胞を長期培養することにより、加齢及び加齢による疾患発症を試験管内のみで再構成しようという試みはこれまでなされておらず、本研究の基盤技術の開発は加齢研究・疾患研究において非常に有意義なものであると考える。

目的

加齢という長期にわたるプロセスを短期間に再現するモデルが存在しないことが原因であると考えられる。この加齢によるクローナル造血のモデルを確立できれば、加齢及び加齢から疾患 発症の機序解明に有用となり、治療戦略の構築、さらには加齢の予防・加齢進行の抑制など様々な 応用が期待できる。

申請者らは最近、のりの成分であるポリビニルアルコールを使用したマウス・ヒトの造血幹細胞の長期増幅培養法を開発した。これを応用すれば加齢プロセスを試験管内のみで再

構成できると仮説を立てた。血液細胞の加齢・血液疾患発症を試験管内のみで再構成し、加齢によるクローナル造血及びそこから血液疾患の発症機序を明らかにすることを目的とした。

結果

1. 造血幹細胞の新規培養法の確立

まず申請者らが開発した造血幹細胞の長期培養法(Wilkinson et al. 2019)を改良し、加齢プロセスにより近い培養条件を確立した。ポリビニルアルコールの代わりにあるポリマーを用いた。まずマウスより造血幹細胞画分 CD150+CD34-CD41-KSL を分取(図1)し、ポリマー0.1%, SCF 10 ng/mL, TPO 100 ng/uL, F12 培地で培養を行ったところ、長期にわたり(4ヶ月以上)造血幹細胞の維持培養が可能となった(図2)。

図1 造血幹細胞の分取

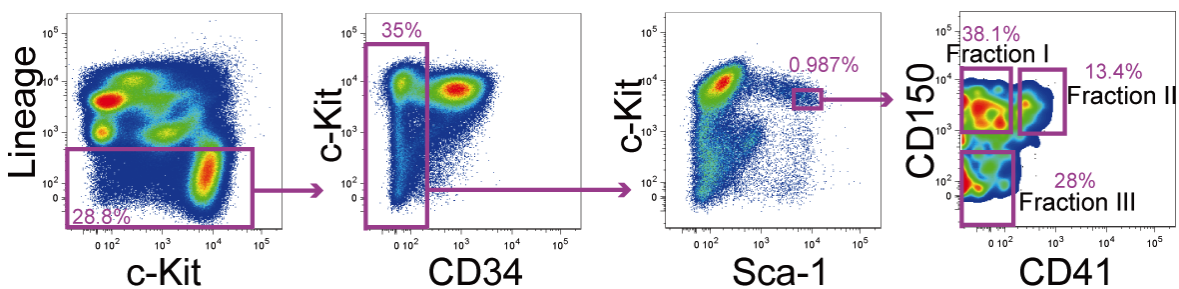


図2 マウス造血幹細胞の増幅培養

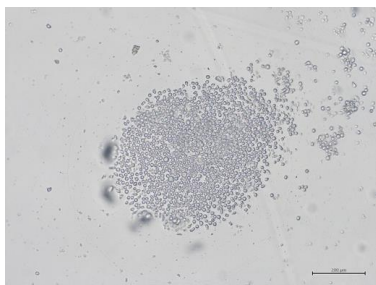
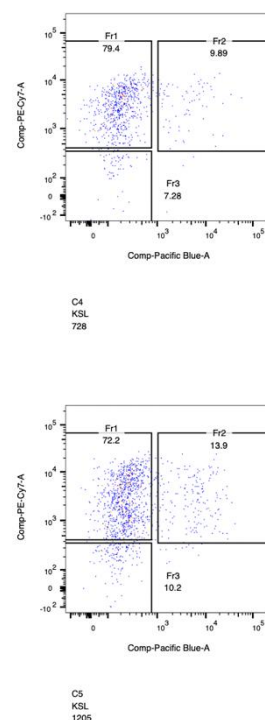


図3 低分子化合物スクリーニング

2. 造血幹細胞の加齢を模倣する培養法の確立

加齢は慢性的な炎症であるとも考えられており、炎症性サイトカインを中心に、低分子化合物も含めスクリーニングを行う。造血幹細胞は加齢とともに CD41 の発現が上昇することが知られており (Yamamoto et al. 2018)、CD41 発現を誘導する数種類の低分子化合物をスクリーニングした (図 3)。

まず低分子化合物ライブラリーを導入し、前述の新規培養法にて CD41 発現を誘導する低分子化合物を抽出する。図のように CD41 を誘導する低分子化合物を同定した。



3. 生体内で加齢造血幹細胞の表現型を呈するかの確認

前述でスクリーニングを行い抽出した低分子化合物により実際に生体内で造血幹細胞の加齢を模倣した状態になるか移植系を用いて検討した。まず、若齢マウス (10 週齢) より造血幹細胞画分 CD150+CD34-KSL をフローサイトメトリにて分取し、様々な低分子化合物と共に 4 週間培養する。その後、致死量放射線照射したマウスに移植を行った。定期的に末梢血の好中球・Bリンパ球・Tリンパ球のキメリズムを 4 週間毎に 2 4 週まで測定した。いずれの低分子化合物においてもコントロールと比較して優位な差は認められなかった。一般に、加齢した造血幹細胞は、若齢に比較してリンパ球への分化能力が低いと報告されている。

4. 加齢特異的遺伝子改変造血幹細胞の検討

Tet2、Dnmt3a 遺伝子欠損マウス、U2af1-S34F・Sf3b1-K700E 遺伝子は、造血幹細胞の加齢に関与していると報告されている。まず、Tet2、Dnmt3a conditional KO マウスから造血幹細胞を分取し、2/3 と同様の実験を行う。現在、培養した造血幹細胞をマウスに移植し、末梢血解析を行っている。

5. 造血幹細胞の加齢を模倣する培養法の再検討

加齢は慢性炎症とも考えられており、低分子化合物スクリーニング以外に炎症性サイトカインを培養液に添加することとした。今回は、CD41 発現誘導をマーカーとせず、全例移

植によりスクリーニングを行っている。現在定期的に末梢血解析を行っている。

今後

本研究課題は、血液の加齢プロセスを試験管内のみで再構成しようというもので非常にオリジナリティの高いものである。これまで、造血幹細胞の長期培養は不可能であったが、申請者らの新規培養法で可能となった。この培養法をさらに改良することにより、加齢を模倣した培養系が確立できると期待できる。

加齢を模倣する培養条件の検討に関しては、CD41 をスクリーニングの指標としたが、加齢は慢性炎症とも考えられており、低分子化合物スクリーニング以外に炎症性サイトカインを培養液に添加することとした。今回は、CD41 発現誘導をマーカーとせず、全例移植によりスクリーニングを行う予定である。

さらに、上記 4 に関しては、(1) 細胞数を計測し、クローナル増殖能の評価を行う。(2) クローナル造血や骨髄形成症候群・急性白血病で報告されている遺伝子 (Tp53、Tet2、Dnmt3a・Asxl1・Srsf2・U2af1・SFf3b1 など) のターゲットシーケンスを行い、これらの遺伝子変異が長期培養中に新たに蓄積されたか検討する。さらに TIDE 解析により、どの遺伝子変異を有した造血幹細胞が増幅優位性をもつか解析を行い、クローナル造血の有無を判断する。(3) マウスを用いた細胞移植実験を行う。マウスに放射線照射など前処置を用いずに移植を行い、移植後、定期的に末梢血を採取し、末梢血中の顆粒球・B リンパ球・T リンパ球における各遺伝子のシーケンスを行う。これにより、どの変異を有した細胞が有意に増幅しているか検討できる。さらに末梢血・骨髄の病理像により、骨髄異形成症候群・白血病様病態を呈するか検討を行う。

引用文献

Seita, Jun, and Irving L. Weissman. 2010. "Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation." *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine* 2 (6): 640-53.

Wilkinson, Adam C., Reiko Ishida, Misako Kikuchi, Kazuhiro Sudo, Maiko Morita, Ralph Valentine Crisostomo, Ryo Yamamoto, et al. 2019. "Long-Term Ex Vivo Haematopoietic-Stem-Cell Expansion Allows Nonconditioned Transplantation."

Nature 571 (7763): 117-21.

Yamamoto, Ryo, Adam C. Wilkinson, Jun Ooehara, Xun Lan, Chen-Yi Lai, Yusuke Nakauchi, Jonathan K. Pritchard, and Hiromitsu Nakauchi. 2018. “Large-Scale Clonal Analysis Resolves Aging of the Mouse Hematopoietic Stem Cell Compartment.” *Cell Stem Cell* 22 (4): 600-607. e4.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

特記事項無し

[口頭発表]

特記事項無し

[ポスター発表]

特記事項無し

[その他]

特記事項無し