

発生直後の造血幹細胞を可視化する技術の開発

横溝智雅

熊本大学 国際先端医学研究機構

【研究の背景】

近年、iPS 細胞から様々な種類の細胞の誘導が試みられており、疾患治療・再生医療への応用が期待されている。血液細胞への分化誘導の研究もさかんにおこなわれており、現在までに多種の血液細胞（赤血球、巨核球など）の試験管内誘導が可能となっている。しかしながら、もっとも応用範囲が広いと思われる造血幹細胞の試験管内誘導については、いまだ成功の報告はない。そのおもな理由のひとつとして、造血幹細胞の発生をモニターできる有効なレポーター系が開発されていない点が指摘されている。

造血幹細胞は胎生期に血管内皮細胞から産み出される。したがって、発生直後の造血幹細胞を識別するためには、血管内皮細胞では発現せず、造血幹細胞で発現が亢進するようなマーカーが必要となる。これまでに造血幹細胞を識別するレポーターマウスはいくつか報告されているが、血管内皮細胞での強い発現や、弱い蛍光強度（顕微鏡での検出は困難）等の特徴を持つことから、いずれのレポーターマウスも発生直後の造血幹細胞の識別には適していないと思われる。そこで、これらの欠点を克服したマウスの開発が望まれている。

【目 的】

本研究は、最近我々がマイクロアレイ解析により同定した遺伝子を利用し、発生直後の造血幹細胞を識別するレポーターマウスの開発を目的とする。

【方 法】

本研究に先立ち、血管内皮細胞では発現せず造血幹細胞で発現が亢進するようなマーカー遺伝子の探索を、マイクロアレイ解析を利用しておこなっている。その結果、候補のひとつとして HLF（Hepatic Leukemia Factor）遺伝子を同定した。本研究では、この HLF 遺伝子を利用し、造血幹細胞の発生をモニターするレポーターマウスを作製する。具体的には、CRISPR/Cas9 システムを用いて、HLF 遺伝子座に蛍光タンパク遺伝子 tdTomato を組み込む。作製されたマウスについては、FACS 解析、免疫染色、移植実験により、tdTomato が造血幹細胞で強く発現していることを確認する。

【結 果】

CRISPR/Cas9 システムを利用してマウス受精卵中で相同組換えをおこない、HLF 遺伝子座に tdTomato 遺伝子を導入した。この受精卵からマウス個体を作製し、骨髄中の血液細胞を調べたところ、造血幹細胞での tdTomato の強い発現が FACS 解析により確認された。また、tdTomato の発現は造血幹細胞で最も高く、分化が進行するにしたがって減少していくことが分かった。骨髄内の血管内皮細胞においても弱い発現が観察された。

【考 察】

造血幹細胞での tdTomato の強い発現は当初の予想通りであり、蛍光強度も十分強いことから、顕微鏡によるイメージング

にも活用できると思われる。血管内皮細胞においても発現が見られたが、造血幹細胞での発現に比べるとかなり弱く(数十分の一程度)、識別は可能と思われる。

胎生期における発現様式についても現在解析を進めている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回開発したレポーターマウスは、造血幹細胞の試験管内誘導の実現・最適化に向けての重要なツールになることが期待される。iPS/ES 細胞からの造血幹細胞の誘導・増幅が可能になれば、血液疾患の治療に必要な造血幹細胞の大量供給への道が開けると予想している。