

ヒト造血幹細胞特異的エピゲノムダイナミクスを利用したヒト造血幹細胞増幅系の開発

高山直也

千葉大学大学院医学研究院 イノベーション再生医学

【研究の背景】

造血幹細胞 (Hematopoietic stem cell; HSC) は、高い自己複製能を持ち、生涯血液細胞を供給し続ける。この特性を活かした骨髄移植は最も成功している再生医療の一つであるが、深刻なドナー不足に直面している。その解決策として、生体外での HSC 増幅が世界的な共通課題であるものの成功例の報告はない。その根本的な原因は、ヒト HSC の自己複製機構が未解明であり、生体外で自己複製能を維持したまま、安定して増幅できる技術が確立されていないことにある。

本研究では、エピゲノム解析から、ヒト造血幹細胞における新規自己複製制御機構を同定し、それを標的にした低分子化合物の開発、体外造血幹細胞増幅を目指す。

【目 的】

HSC と分化直後の multipotent progenitors (MPP) では、多分化能に関しては同等であるが、HSC のみが自己複製能を示すため、幹細胞の重要な能力である自己複製能を解析するためには非常に有用な細胞モデルである。興味深いことに、ヒト HSC と MPP の遺伝子発現解析した結果、明確な遺伝子発現の違いは得られなかった。これらの細胞は、何らかの刺激に対応して速やかに発現する準備段階である“Poised”な状態だと考えられ、静止期の幹細胞には遺伝子発現解析では捉えられない重要なメカニズムの存在が示唆される。エピゲノム解析は、Active/poised locus を捉えることが可能であるため、遺伝子発現レベルの違いとしては捉えられない幹細胞の特性を同定できる。以上の仮説の元、申請者らはヒト造血系の詳細なエピゲノムマップ作成を試みた。

臍帯血由来の 13 段階の高純化した血液細胞集団のオープンクロマチン領域の解析を行ったところ、正常造血系では、10 個の Chromatin openness signature (オープンクロマチンサイトのグループ) が得られ、これらの情報をもとに、各細胞段階の Master regulator の同定を試みた。その結果、既知の各細胞集団特異的な Master regulator (Progenitor; HOX, T cell; TCF, B cell; PAX, Granulocyte/Monocyte; CEBP, Erythroid; GATA) の Motif が同定された。さらに HSC と MPP での違いを含む複数の Motif が HSC 及び Progenitor 段階で同定された。候補遺伝子の一つとして、クロマチン 3 次元構造の形成に関与する CTCF に注目して、幹細胞制御機構の解明を目指した。

【方 法】

10 個の Chromatin openness signature の中で、HSC には開いておらず、MPP や MLP などの直後の Progenitor で開いているオープンクロマチンサイトに注目し、HOMER による Motif 解析を行った結果得られた候補遺伝子の一つとして、CTCF に注目した。CTCF は、Cohesin complex と複合体を形成し、ゲノムの 3 次元構造形成に関与する因子である。ターゲット遺伝子のエンハンサーとプロモーターの物理的な距離を変化させることでゲノムワイドに遺伝子の発現調節を行う。

HSC, MPP, 及びさらに分化した CD34+/CD38+Progenitor で、shRNA による遺伝子発現抑制 (ノックダウン) 後、① in vitro での血球コロニーアッセイ (血液分化能の評価)、② セルサイクル解析、③ アポトーシス解析、④ 免疫不全マウスへの移植による分化・自己複製能の評価 (in vivo アッセイ) を行った。

申請者らはすでに、高純化したヒト造血幹細胞に対するノックダウン法の適切な条件を同定しており、80% 以上の導入効率を確認している。免疫不全マウスへの移植実験により、自己複製能及び分化能への影響を確認する。同定された幹細胞に必須の Pathway や分子をターゲットとする新規薬剤を High throughput Small compound screening により同定し、造血幹細胞の体外増幅を試みる。

【結 果】

① CTCF 遺伝子抑制後の HSC 及び MPP では、血球コロニー(分化細胞)の形成能の著名な低下が見られた(効果は HSC>MPP)。興味深いことに HSC で最も影響が大きく、MPP での影響は限定的で、より分化した CD34+/CD38+Progenitor では、CTCF 抑制の影響は見られなかった。一方、未熟な幹細胞分画がコントロールと比較して、CTCF 遺伝子抑制群で有意に維持されることがわかった。

コロニー形成能低下の原因を検索するため、アポトーシス解析、細胞周期解析を行った結果、

② アポトーシスでの影響は見られなかった。

③ CTCF 抑制により、HSC の G0 から G1 への移行(静止期からの逸脱)が有意に低下することが明らかになった。やはりこの効果は HSC に限定的で、MPP 及びより分化した CD34+/CD38+Progenitor では見られなかった。

④ さらに、免疫不全マウスへの移植実験から、in vitro のアッセイと同様、末梢血中に産生され、循環する分化した血球細胞の産生は有意に低下していた。一方、骨髄内の未成熟な分画を調べた結果、MPP や MLP などの早期の Progenitor が低下する一方、HSC の比率が有意に増加していた。

【考 察】

細胞周期解析、および血球コロニーアッセイの解析から、CTCF がヒト HSC の G0→G1 期への移行、およびその後の分化・増殖に必須な因子であることがわかった。一方、定常状態では、G0 期の割合が HSC より低い MPP では、コロニーアッセイへの効果が限定的であり、ほぼすべての細胞が増殖期に入っているより後期の CD34+/CD38+Progenitor では影響が見られなかったと考察でき、ヒト HSC 特異的な機能であると考えられる。

In vitro の実験をサポートするように、自己複製能を評価できる免疫不全マウスへの移植実験から、CTCF 抑制により、HSC の分化・増殖が抑制され、HSC の比率の増加と、MPP 以下の分画の低下が見られていると考えられる。

以上から、CTCF が、ヒト HSC の静止期からの逸脱およびその後の分化・増殖を制御するゲートキーパー因子であることがわかった。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

近年 SR1 や UM171 など、いくつかの低分子化合物が、HSC の体外増幅を促進することが示されているが、未だ長期培養の期間中に自己複製能を維持しつつ増幅できる培養系は存在しない。本研究では、静止期状態の細胞での遺伝子発現の違いでは捉えられない新たな“生命原理”機構をエピゲノム解析によりアプローチすることで、新規の自己複製因子の同定が期待できる。今回、申請者らは CTCF がヒト HSC の静止期脱出という、分化・増殖の最初のステップを制御する因子であることを新たに見出した。CTCF 阻害剤などが開発されれば、試験管内での分化を抑制した、HSC の新規維持培養系の確立などが期待できる。同様に、ヒト iPS 細胞も、HSC のソースとして期待されるが、未だに誘導に成功した報告はない。HSC 誘導因子を導入しても、HSC の維持培養系が存在しないため、速やかに分化してしまう可能性もある。このため、この新規の培養系は、ヒト iPS 細胞由来の HSC 誘導系開発にも応用可能である。

【参考・引用文献】

投稿準備中