

新規レポーター系を利用した造血幹細胞の試験管内誘導法の開発

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の血管内皮細胞から生み出されるが、血液を生み出す血管内皮細胞には 2 種類あることが分かっている(Dzierzak and Bigas, 2018)。発生過程においてはまず一過性の造血である赤血球骨髄球前駆細胞(Erythro-Myeloid-Progenitor; EMP)を生み出す血管内皮細胞が現れ、のちに造血幹細胞を生み出す血管内皮細胞が現れる。現在広く用いられている ES 細胞からの血液細胞誘導培養系では、EMP ばかりが誘導されてしまうことから(McGrath et al., 2015)、EMP と造血幹細胞を識別するレポーターの開発が望まれていた。

我々はマイクロアレイ解析から造血幹細胞特異的な発現を示す転写因子 Hlf を同定し、ノックインレポーターマウス(Hlf-tdTomato)を作製している(Yokomizo et al., 2019)。Hlf-tdTomato は EMP では発現していないことから、造血幹細胞の発生をモニターするレポーターとしての利用が期待されている。

【目 的】

新たに開発した造血幹細胞特異的レポーター(Hlf-tdTomato)の有効性を確認し、Hlf-tdTomato ES 細胞からの造血幹細胞の誘導を試みる。

【方 法】

1. 造血幹細胞マーカーとしての Hlf の有効性の確認
新たに作製した Hlf-CreERT2 マウスと ROSA-tdTomato レポーターマウスを交配し、胎生期の Hlf 陽性細胞が成体の造血幹細胞に実際に寄与していることを確認する。
2. Hlf-tdTomato ES 細胞からの造血幹細胞の誘導
Hlf-tdTomato ES 細胞を OP9 ストローマ細胞と共培養し、tdTomato 陽性血球細胞の出現をフローサイトメーターを用いて確認する。

【結 果】

1. 造血幹細胞マーカーとしての Hlf の有効性の確認
Hlf-CreERT2 マウスを用いた細胞系譜追跡実験において、胎生期の Hlf 陽性細胞が成体の造血幹細胞に寄与していることが分かった。また、EMP を標識しないことも確認できた。

2. Hlf-tdTomato ES 細胞からの造血幹細胞の誘導

長期培養等を試みたが、tdTomato 陽性細胞の誘導は確認できなかった。

【考 察】

Hlf-tdTomato レポーターは、造血幹細胞の発生を識別するうえで有効であることが改めて確認できた。同様の性質を持つレポーターの報告はなく、現時点において最も使いやすいレポーターのひとつであると言える。しかしながら、Hlf-tdTomato ES 細胞を用いた血液細胞誘導実験では、tdTomato 陽性細胞を誘導できるような条件を見つけることはできなかった。今後は、Hlf-tdTomato マウス胎仔を用いての培養条件の検討もおこなう必要があると考えている。

【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。

【参考・引用文献】

1. Dzierzak, E., and A. Bigas. 2018. Blood Development: Hematopoietic Stem Cell Dependence and Independence. *Cell Stem Cell* 22:639-651.
2. McGrath, K.E., J.M. Frame, K.H. Fegan, J.R. Bowen, S.J. Conway, S.C. Catherman, P.D. Kingsley, A.D. Koniski, and J. Palis. 2015. Distinct Sources of Hematopoietic Progenitors Emerge before HSCs and Provide Functional Blood Cells in the Mammalian Embryo. *Cell Rep* 11:1892-1904.
3. Yokomizo T., *Watanabe N., Umemoto T., Matsuo J., Harai R., Kihara Y., Nakamura E., Tada N., Sato T., Takaku T., Shimono A., Takizawa H., Nakagata N., Mori S., Kurokawa M., Tenen D.G., Osato., Suda T., Komatsu N. 2019. Hlf marks the developmental pathway for hematopoietic stem cells but not for erythro-myeloid progenitors. *J Exp Med*. 216, 1599-1614.