

【別紙 1】

論文の内容の要旨

論文題目 自己複製能を獲得し幹細胞にリプログラミングされた造血前駆細胞の機能解析

氏名 岡部基人

【序文】

造血幹細胞 (Hematopoietic stem cells: HSCs)は自己複製能と多分化能を兼ね備えた体性幹細胞の一つであり、血液疾および一部の代謝性疾患の根治治療として行う造血細胞移植の移植細胞として用いられる。造血細胞移植の成否のカギを握るのは適切なドナー選択であるが、ドナー不足は大きな課題であるとともに常に十分量の移植細胞が得られるわけではない。そのためドナー細胞の不足を解消するため、造血幹細胞の増幅法もしくは異なる細胞からの造血幹細胞誘導法の確立が期待されている。

HSCsの増幅及び誘導にはこれまで多くの研究者が試みており、ES細胞やiPS細胞からのHSCsの誘導や、遺伝子導入を伴わないHSCsの試験管内増幅などが報告されている。しかしながら、前者では誘導後の腫瘍化が問題とされ、後者では増幅までの培養期間が1か月程度かかるといった長期培養という点がクリアすべき課題とされる。

そこで今回私は、iPS細胞の誘導で認められた遺伝子導入によるリプログラミング技術を利用し、多能性幹細胞からの誘導ではなく造血前駆細胞 (Hematopoietic progenitor cells: HPCs)を用いた効率的なHSCsの誘導法を構想しこれに着手した。導入遺伝子の候補として、HSCsの幹細胞活性に強く関わる遺伝子としての既報の結果を基に、*Hes1*、*Klf10*、*HoxA9*、*FosB*、*Runx1*、*PU.1*、*Hdac1*、*HoxB4*の8つの遺伝子を抽出し、これらをHPCsに遺伝子導入を行うことで自己複製能を獲得しうるかどうかを*in vivo* assayで評価を行った。本研究では、骨髄に豊富に存在するHPCsを用いてHSCsを誘導することで慢性的なドナー不足の解消を目標とし、臨床応用可能な安全かつ迅速なHPCsからのHSCsの誘導方法の確立を目指した。

【主な材料と方法】

造血前駆細胞への遺伝子導入

以前よりすでに報告されているCD34⁺KSL分画で示される造血前駆細胞は生着能を持たな

い。これに遺伝子導入を行うことで生着能が得られるかを確認するため、恒常的に導入遺伝子の発現が認められるpGCDNsamレトロウイルスベクターを用いて、8つの候補遺伝子の遺伝子導入を行った。ウイルスベクターはinternal ribosome entry site下にEnhanced green fluorescent protein (EGFP)がクローニングされており、導入遺伝子の追跡はEGFPを用いて行った。

遺伝子導入後の造血前駆細胞の機能解析

遺伝子導入を行った造血前駆細胞を、致死量放射線照射を行ったレシピエントマウスに競合細胞とともに移植を行い、競合的骨髄再構築法を用いて機能解析を行った。フローサイトメトリーを用いて経時的に末梢血中の分化した血液細胞のドナーキメリズムを評価するとともに、移植後16週以降で骨髄中の造血幹細胞分画におけるドナーキメリズムを評価した。また、全血球数の測定や、脾臓および骨髄の組織増を評価し、その腫瘍原性の有無を評価した。

二次移植

ドナー由来の細胞を骨髄中の造血幹細胞分画に認めた一次レシピエントマウスの骨髄細胞を用いて二次移植を行った。移植後の機能解析として、フローサイトメトリー解析や全血球数、骨髄および脾臓組織学的評価を行った。

網羅的遺伝子発現解析

遺伝子導入前後の造血前駆細胞および造血幹細胞からRNAを抽出し、遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。解析にはSurePrintG3 Mouse GE 8x60K Microarrayを用いて行った。

【結果】

造血前駆細胞の移植後骨髄再建能の評価

採取直後の新鮮な、また培養増幅を行ったHPCsおよびHSCsを用いてドナーマウスに移植を行ったところ、いずれの条件においてもHPCsではレシピエントマウス体内において長期的に骨髄再構築を認めることはできなかった。

遺伝子導入後のHPCsの移植後の機能評価

既報から造血幹細胞活性の増強に寄与すると報告のあった遺伝子である*Hes1*、*Klf10*、*HoxA9*、*FosB*、*Runx1*、*PU.1*、*Hdac1*、*HoxB4*の8つを抽出し、pGCDNsamレトロウイルスベクターを用いてHPCsに遺伝子導入を行った。遺伝子導入効率はおおむね90%以上であった。遺伝子導入後のHPCsを用いて競合的骨髄再構築法を用いて評価を行ったところ、*HoxA9*遺伝子を導入した群 (*HoxA9*-HPCs)と*HoxB4*遺伝子を導入した群 (*HoxB4*-HPCs)でのみ、T細胞、B細胞、骨髄球系においてドナー細胞の再構築を認めた (キメリズム：各4.07%±2.12%、6.36%±4.53%)。移植後16週の全血算数および脾臓・骨髄の組織学的評価において腫瘍原性を疑う所見は認めな

った。フローサイトメトリーで造血幹細胞分画のドナーキメリズムを評価したところ、*HoxB4*-HPCs移植群でのみドナー細胞が認められた (4/6匹)。

***HoxB4*-HPCsの自己複製能の評価**

一次移植マウスの全骨髄細胞を用いて二次移植を行ったところ、*HoxA9*-HPCs移植群においては末梢血中にほとんどドナー細胞は認めなかったが、*HoxB4*-HPCs移植群において末梢血中にドナー細胞を認めた (生着率：それぞれ8%、58%)。また、二次レシピエントマウスの骨髄中の造血幹細胞分画において、*HoxB4*-HPCs移植群でドナー由来の細胞を認めることができた(キメラ陽性率：33%)。また、一次移植と同様に二次レシピエントマウスにおける全血算数および脾臓・骨髄の組織学的評価を行ったところ、明らかな腫瘍原性は二次移植後においても認められなかった。これらのことから、*HoxB4*遺伝子の導入によってHPCsは多分化能および自己複製能を獲得し、かつ腫瘍原性を認めることなくその表面抗原マーカーによる表現型においてもHSCsと同等であることが示された。

***HoxB4*遺伝子の導入によってHPCsからHSCsを誘導しうる遺伝子の探索**

*HoxB4*遺伝子の導入によってHPCsからHSCsが誘導されたことから、これを制御する下流の遺伝子を探索するため、*HoxB4*遺伝子の導入を行ったHPCsの及びEGFPのみを導入したHPCs、HSCsを用いて網羅的に遺伝子発現解析を行った。その結果、6つの遺伝子でHPCsに比べてHSCsおよび*HoxB4*-HPCsにおいて発現が高く、またそれとは異なる6つの遺伝子でHPCsに比べてHSCsおよび*HoxB4*-HPCsで発現が低いことが示された。

【考察】

本研究では、自己複製能を持たないマウスHPCsから自己複製能を有する機能的なHSCsの誘導を目的とし、最終的にはHPCsに*HoxB4*遺伝子の導入を行うことで1)多分化能、2)自己複製能、3)表現型といったHSCsと同等の機能および表現型を有する細胞の誘導に成功した。非腫瘍原性も確認できたことから、本手法が生理的な機能を有するHSCsを安全に誘導しうる方法として、今後臨床に応用できる可能性があると考えられる。その安全性をさらに高めるためには、self inactivatingベクターや発現調節が可能なウイルスベクター、タンパク導入などを用いることが、より安全なシステムの構築につながると考える。

また、*HoxB4*遺伝子はHSCsの自己複製能の増強や多能性幹細胞からのHSCsの誘導のみならずHPCsからのリプログラミングに関与することが示唆されたが、その機序についてはまだ未解明である。また*HoxB4*遺伝子の導入に伴うエピジェネティックステータスの変化などの評価も今後の課題である。今後はHPCsから若返りをしたHSC様の細胞の特性を詳細に解析し、真にHSCsとなったことを確認するとともに、安全性を評価することでこの手法が新たにドナープールを増やす方法として臨床に応用できることに期待したい。