

エストロゲンシグナルによる造血幹細胞エイジング制御

国立国際医療研究センター研究所生体恒常性プロジェクト 田久保 圭誉

要約

造血幹細胞は自己複製能と多分化能を有し、生涯にわたって血液細胞システムを維持する組織幹細胞である。体内では細胞周期は静止期を保っており休眠状態であるが、体外に取り出した造血幹細胞を体内同様の細胞周期の静止期にとどめることは困難であるために、試験管内で幹細胞の静止期性に関わる分子機構を解析するのは技術的障害がある状況であった。本研究では、造血幹細胞の静止期を維持する生理的な培養因子を網羅的に探索して、高濃度の脂肪酸や低いサイトカイン濃度、そして低酸素環境の必要性を同定した。さらに、これらの環境因子の濃度条件を最適化することで、未分化で細胞周期を静止した造血幹細胞を体外で維持することが可能になった。本システムでは表面マーカーを維持したまま移植生着能も有する静止期造血幹細胞を培養可能である。すなわち、*in vitro*で造血幹細胞の特性や効果を及ぼす因子を研究し、新たな造血幹細胞操作技術開発が進むことが期待される。今後はエストロゲンシグナル等の細胞外因子が静止期幹細胞におよぼす効果を厳密に検証することも可能となった。

緒言

哺乳類の全構成細胞の三分の二を占める血液細胞は、主に骨の中の骨髓に由来する。骨髓は造血幹細胞(hematopoietic stem cell; HSC)と周囲の微小環境(ニッチ)との相互作用によって維持される造血器官であり、またニッチを構成する間葉系幹細胞や骨芽細胞、破骨細胞が協働する造骨器官でもある。加齢に伴う造骨器官としての骨髓機能の変化は、骨粗鬆症をはじめとする運動器疾患の原因となることが骨代謝研究の進展で知られるようになった。一方、造血器官としての骨髓機能にも加齢変化が生じて、リンパ球や赤血球の産生低下と、骨髓球系細胞や血小板の産生の相対的増加がみられる。さらに、易感染性や貧血、炎症性疾患、造血器腫瘍の可能性が高まる。これは加齢で変化した骨髓環境にHSCが適応した結果、HSCレベルの加齢変化(HSCエイジング)が生じ、感染・炎症・出血等で血液細胞システムがダメージを受けた際の修復能が変化・低下するためと考えられる。造血幹細胞の能力は、移植アッセイとセルソーターによるプロスペクティブな分離を組み合わせて評価することができる。しかし、体外に取り出したHSCを体内同様の細胞周期の静止期にとどめることは困難であるために、試験管内で幹細胞の静止期性に関わる分子機構を解析するのは困難であった。これまでに種々のサイトカインやケモカイ

ン、低分子化合物等を添加してHSC培養を確立する試みが行われてきた。これまでの研究から、細胞周期が静止期の造血幹細胞は、細胞循環、代謝、分化能、ストレス耐性などの点で、増殖中の造血幹細胞とは異なることがわかっているが(文献1-4)、HSCを試験管内で静止状態に保つ方法については未解明な状況であった。そこで本研究ではまず、HSCの静止期を維持する条件は骨髓に存在するが、多くの培養系では不足しているという仮説を立て、骨髓の微小環境を模倣し、造血幹細胞を*in vitro*で静止期にとどめて機能的に維持する最小限の因子群を定義することを目指した。その結果、造血幹細胞が脂肪酸を必要とするユニークな栄養素要求性を持っていることを見出した。また、サイトカイン濃度の低下や低酸素状態の維持など、環境条件を最適化することで、未分化で静止した造血幹細胞を維持することができた。このシステムの開発により、*in vitro*で造血幹細胞の特性を定常的に研究し、定義された因子を操作する道が開かれた。当初計画では次いで加齢HSCがこの培養中で呈する変化を明らかにしたうえで、女性ホルモンの効果を検証する予定であった。今回の助成研究期間においてはそこに至る前段階の検討である静止期維持培養の確立に注力したため、それらについての知見を中心に報告する。

方法

1) マウス

8-14週齢のC57BL/6マウスを使用した。移植レシピエントにはC57BL/6-Ly5.1コンジュニックマウスを用い、国立国際医療研究センター研究所の動物実験施設においてSPFの条件で飼育した。遺伝子組み換え実験や動物実験については国立国際医療研究センター研究所のバイオセーフティ委員会や動物実験委員会の承認を得て実施した。実験には雄と雌のマウスを使用した。

2) 細胞調製・培養・移植実験

マウスの大腿骨と脛骨からマウス骨髓細胞を分離し、溶血により単核球を調製した。Auto-MACS Proを用いてc-Kit陽性細胞を分離し、抗体染色してフローサイトメトリーを行った。10%BSA濃縮液を希釈するか、BSA粉末を加えることで作成した、0.1%v/vのBSAを添加した。さらにBSA粉末または脂肪酸フリーBSAを培地に溶解しフィルターでろ過した。濾過前に2-MEを最終濃度55 μ Mで添加した。培地にはサイトカインや試薬を添加した。培養条件は、1% O₂+5% CO₂または20% O₂+5% CO₂、37°Cで行った。移植実験のドナー細胞には、新鮮HSC、または培養HSCを、コンペティターとして骨髓単核球を使用し、9.5Gyを照射したレシピエントにコンペティターとともに移植された。移植後キメリズムは末梢血を利用して解析した。

結果

1) 脂肪酸条件の最適化

まず、細胞周期の静止期を維持できない古典的な培養後の造血幹細胞における遺伝子発現の変化を評価するために、新鮮造血幹細胞と、幹細胞因子(SCF)およびトロンボポエチン(TPO)を添加して16時間培養した造血幹細胞を用いてcDNAマイクロアレイ解析を行った。培養条件は血清の有無で2条件設定した。血清なしの培養条件で最も有意に上昇した遺伝子は、脂肪酸およびコレステロール生合成関連遺伝子であった。また、培養した造血幹細胞と新鮮造血幹細胞では、血清の有無にかかわらず、細胞分裂関連遺伝子の発現が増加し、幹細胞関連遺伝子の発現が減少することが確認された。また、脂質代謝関連遺伝子のマスターレギュレーターであるSREBPの標的遺伝子が、血清なしの条件で培養した造血幹

細胞では、新鮮な造血幹細胞や10%の血清で培養した造血幹細胞に比べて、有意に濃縮されていた。これらの結果から、無血清培地でのSREBP標的遺伝子の発現上昇は、既存の培地中の脂肪酸やコレステロールが相対的に不足していることが引き金になっている可能性が示唆された。そこで、血清中のアルブミン濃度を模倣するために4%BSAを培地に添加すると、脂肪酸合成阻害剤の存在下での造血幹細胞の増殖能は、血清添加条件と同程度のレベルまで回復した。一方、培養中の脂肪酸合成阻害剤の効果は、培養条件によって異なっていた。例えば、翻訳後のSREBP活性化を阻害するファトスタチンは、10%血清群では造血幹細胞由来のコロニーの増殖を強く抑制したが、脂肪酸を含まないBSA群では抑制しなかった。以上のことから、BSAはHSC培養において脂肪酸源として機能することが明らかになった。以下では、4% BSAをHSC培養液に利用した検討を実施した。

2) 酸素・サイトカイン条件の最適化

次に、静止期のHSCが骨髓内で曝されている環境因子としてサイトカイン濃度と酸素分圧に着目した。様々な濃度のSCFとTPOに4%BSAを加え、低酸素(1%O₂)または通常酸素(20%O₂)で7日間培養した後、分化と増殖を評価した。予想通り、SCFおよびTPOの濃度と並行して造血幹細胞由来の細胞の総数が増加していることが確認され、SCFおよびTPOが細胞の循環を促進していることが示された。さらに、いずれのサイトカイン濃度においても、低酸素状態では総細胞数が減少していた。巨核球の数は、SCFおよびTPOの濃度が高くなるにつれて増加した。低酸素あるいは通常酸素のいずれの条件下でも、サイトカイン濃度は表現マーカー上の造血幹細胞頻度と負の相関があった。高SCF濃度では造血幹細胞の減少が促進された一方、高TPOと低SCF条件では、形質上のHSC数が最も増加し、約40%の細胞がCD150+CD48⁻ LSK画分に残った。CD150-CD48⁻ LSK細胞の数は、SCF濃度とともに増加したが、TPO濃度の変化によっては変化しなかった。一方、CD150+CD48⁺ LSK細胞の数は、TPO濃度の増加によってのみ増加した。また、酸素分圧の増加は、分化したCD150+CD48⁺およびCD150-CD48⁺ LSK細胞の数を増加させた。これらのパターンは、0.1%BSA条件下で大きく異なった。この場

合、HSC数は100ng/mL SCFおよび100ng/mL TPOで最も多かったが、細胞はより低いサイトカイン条件でも生存した。これらの知見と、生体内のHSCが分化細胞産生を最小限に抑え、細胞周期の静止期性を維持していることを考え合わせて、in vitroでのHSC維持を、次の3つの基準で評価した。(1)培養開始時と7日後の総細胞数の比較(300個から開始)、(2)巨核球数の最小値(約10個)、(3)表現型の造血幹細胞が約100個存在すること。これらを満たす条件は、3ng/mL SCF、0.1ng/mL TPO、1%O₂であり、20%O₂条件では仮に低サイトカイン条件であっても細胞は静止状態を維持できなかった。最適な条件で培養した造血幹細胞のコロニーは、100ng/mL SCF、100ng/mL TPO、20% O₂の条件で培養したコロニーよりもはるかに小さく、LSKの60%以上の細胞がCD150+CD48-画分に存在し、分化が抑制されていた。また、短期EdU取り込み実験を行って細胞周期を評価したところ、低酸素・低サイトカイン条件では細胞周期の静止期が良好に維持されていることが示された。

3) 静止期維持培養時の幹細胞機能の評価

培養後のHSC機能を評価するために、新鮮な造血幹細胞、または静止期維持または高サイトカイン条件下で14日または27日培養した造血幹細胞をレシピエントマウスに移植した。高サイトカイン条件で培養した造血幹細胞は、14日または27日培養しても再増殖能を維持できなかったが、維持条件で14日間培養した造血幹細胞は、一次移植、二次移植ともに新鮮な造血幹細胞とほぼ同等の挙動を示した。移植4ヶ月後の骨髄内でのドナー造血幹細胞のキメラは、新鮮な造血幹細胞と14日間培養した造血幹細胞で同等であった。27~31日目の培養後HSCは二次移植でも再構築能を示した。

考 察

以上の検討から、培養中の代謝物、サイトカイン、酸素分圧を最適化することで表面形質と細胞周期の静止期性、そして移植生着能を保ったHSCを体外で維持することが可能となった(図1)。今後はこのシステムを利用してエストロゲンシグナルを含む各種の分子の静止期HSCに対する効果の検討が期待される。培養法の詳細およびそのヒトHSCへの拡張については文献5-7に報告した。

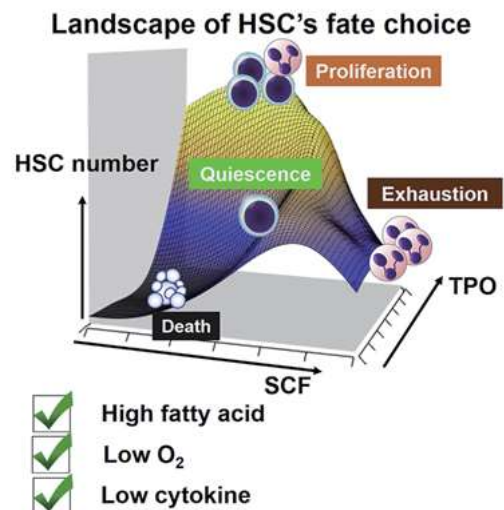


図1. 培養中の環境因子の最適化によるHSC静止期維持培養(文献5より引用)

本研究で実施した各種の環境因子の網羅的な検討によって、環境因子の濃度によってHSCが培養中でたどる運命変化が確認され、その最適化によって静止期維持培養が可能になった。

謝 辞

本研究を支えていただいた神澤医学研究振興財団に深謝申し上げます。

参考文献

1. Takubo K, Goda N, Yamada W, et al., Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010 7:391-402.
2. Iriuchishima H, Takubo K, Matsuoka S, et al., Ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells by quiescence induction through Fbxw7alpha overexpression. *Blood*. 2011 117:2373-2377.
3. Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi CI, et al., Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013 12:49-61.
4. Karigane D, Kobayashi H, Morikawa T, et al., p38alpha Activates Purine Metabolism to Initiate Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Cycling in Response to Stress. *Cell Stem Cell*. 2016 19(2):192-204.
5. Kobayashi H, Morikawa T, Okinaga A, et al., Environmental Optimization Enables Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo. *Cell Rep*. 2019 28:145-158.
6. Kobayashi H, Takubo K. Protocol for the Maintenance of Quiescent Murine Hematopoietic Stem Cells. *STAR Protoc*. 2020 1:1000785.
7. Kobayashi H, Takubo K. A Culture Method to Maintain Quiescent Human Hematopoietic Stem Cells. *J Vis Exp*. 2021 171.

Abstract

Hematopoietic stem cells are tissue stem cells that are capable of self-renewal and multipotency and maintain the blood cell system throughout life. Although hematopoietic stem cells are quiescent in the bone marrow, it was difficult to maintain the same quiescence of cell cycle in hematopoietic stem cells outside the body. In this study, we conducted a comprehensive analysis for physiological culture factors that maintain hematopoietic stem cell quiescence and identified the requirement for high fatty acid concentrations, low cytokine concentrations, and a hypoxic environment. Furthermore, by optimizing the concentration conditions of these environmental factors, it became possible to maintain undifferentiated, cell cycle quiescent hematopoietic stem cells in vitro. This system enables the cultivation of quiescent hematopoietic stem cells with transplantation capacity while maintaining their surface markers. By using this technology, it will be possible to study how quiescent hematopoietic stem cells are regulated and what environmental factors influence them, which will lead to the development of new stem cell-based technologies. In the future, the effects of extracellular factors such as estrogen signaling on quiescent stem cells can be examined.