慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ヒト造血幹細胞遺伝子編集のためのシングルセルクローニング法の開発
Sub Title	Development of a single cell cloning method for human hematopoietic stem cell gene editing.
Author	櫻井, 政寿(Sakurai, Masatoshi)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2023
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	造血幹細胞は、難治性血液疾患に対して行われる造血幹細胞移植において、移植後の造血および免疫の再構築において重要な役割を担う。しかし、造血幹細胞は非常に数が少なく、特に臍帯血移植においては、移植のリスクが増したり、ドナー選択が制限される可能性があることから、生体外増幅技術の確立が求められている。 これまで、生体外での造血幹細胞の維持には、血清アルブミンとサイトカインを組み合わせた培地が不可欠とされてきたが、実際には、短期間の造血幹細胞維持はできるものの、その増幅作用は限定的であった。 2019年に、ポリビニルアルコール培地にサイトカインを加えると、血清アルブミンを用いずに、長期に安定してマウス造血幹細胞を増幅できることが報告されている。今回、我々はアルブミンとサイトカインを、それぞれ高分子ポリマーと特定の化合物に置き換えた培地を用いて、ヒト造血幹細胞の生体外での長期増幅を可能とする新規の培養技術を開発した。これにより、臍帯血に含まれるヒト造血幹細胞を1か月間にわたって増幅することができるようになった。また、単一細胞RNAシークエンス解析により、既存の培養技術と比較しても、造血幹細胞が選択的に増幅されることが示唆された。 さらに、単一の造血幹細胞からでも造血再構築可能な造血幹細胞のクローン増幅を行うことが可能であることを示した。この技術は、今後造血幹細胞の遺伝子編集を行うにあたって、必須のシングルセルクローニング技術になる可能性を持つ。以上の成果はNature誌に掲載された。 今後、この培養技術をヒト造血幹細胞の基礎研究ツールとして提供するとともに、より安全な造血幹細胞移植の実現とドナー不足の解消に向けた臨床応用を目指す。 Hematopoietic stem cells (HSCs) play an important role in hematopoietic and immune reconstitution in hematopoietic stem cell transplantation for various blood disorders. However, HSCs are extremely rare, and may increase the risk of transplantation and limit donor selection, especially in cord blood transplantation. Therefore, there is a need to establish ex vivo expansion techniques. While serum albumin and cytokines have been considered essential components of culture medium for maintaining HSCs ex vivo, their amplification effects have been limited, and HSCs could only be maintained for a short period. In 2019, it was reported that cytokines added to a polyvinyl alcohol medium could amplify mouse HSCs stably for an extended period without serum albumin. In our recent study, we have developed a novel culture technique that uses a culture medium replacing serum albumin and cytokines with high-molecular-weight polymers and specific compounds, enabling the long-term ex vivo expansion of human HSCs. With this technique, we were able to amplify human HSCs from umbilical cord blood for one month. Moreover, single-cell RNA sequencing analysis suggested that HSCs were selectively amplified compared to existing culture techniques. We also demonstrated the feasibility of cloning and expanding HSCs that can reconstruct hematopoiesis even from a single HSC. This technology may become an essential single-cell cloning technique for genetic editing of HSCs in the future. These achievements have been published in the prestigious journal Nature. Our next steps include providing this culture technique as a fundamental research tool for human HSCs and aiming for clinical applications to achieve safer hematopoietic stem cell transplantation and solve the shortage of donors.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2022000010-20220252

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2022年度　学事振興資金（個人研究）研究成果実績報告書

2023年3月17日

研究代表者	所属	医学部臨床教室	職名	専任講師（有期・医学部）	補助額	300 （A） 千円
	氏名	櫻井 政寿	氏名（英語）	Masatoshi Sakurai		

研究課題（日本語）

ヒト造血幹細胞遺伝子編集のためのシングルセルクローニング法の開発

研究課題（英訳）

Development of a single cell cloning method for human hematopoietic stem cell gene editing.

１．研究成果実績の概要

造血幹細胞は、難治性血液疾患に対して行われる造血幹細胞移植において、移植後の造血および免疫の再構築において重要な役割を担う。しかし、造血幹細胞は非常に数が少なく、特に臍帯血移植においては、移植のリスクが増したり、ドナー選択が制限される可能性があることから、生体外増幅技術の確立が求められている。

これまで、生体外での造血幹細胞の維持には、血清アルブミンとサイトカインを組み合わせた培地が不可欠とされてきたが、実際には、短期間の造血幹細胞維持はできるものの、その増幅作用は限定的であった。

2019年に、ポリビニルアルコール培地にサイトカインを加えると、血清アルブミンを用いずに、長期に安定してマウス造血幹細胞を増幅できることが報告されている。今回、我々はアルブミンとサイトカインを、それぞれ高分子ポリマーと特定の化合物に置き換えた培地を用いて、ヒト造血幹細胞の生体外での長期増幅を可能とする新規の培養技術を開発した。これにより、臍帯血に含まれるヒト造血幹細胞を1か月間にわたって増幅することができるようになった。また、単一細胞RNAシークエンス解析により、既存の培養技術と比較しても、造血幹細胞が選択的に増幅されることが示唆された。

さらに、単一の造血幹細胞からでも造血再構築可能な造血幹細胞のクローン増幅を行うことが可能であることを示した。この技術は、今後造血幹細胞の遺伝子編集を行うにあたって、必須のシングルセルクローニング技術になる可能性を持つ。以上の成果はNature誌に掲載された。

今後、この培養技術をヒト造血幹細胞の基礎研究ツールとして提供するとともに、より安全な造血幹細胞移植の実現とドナー不足の解消に向けた臨床応用を目指す。

２．研究成果実績の概要（英訳）

Hematopoietic stem cells (HSCs) play an important role in hematopoietic and immune reconstitution in hematopoietic stem cell transplantation for various blood disorders. However, HSCs are extremely rare, and may increase the risk of transplantation and limit donor selection, especially in cord blood transplantation. Therefore, there is a need to establish ex vivo expansion techniques.

While serum albumin and cytokines have been considered essential components of culture medium for maintaining HSCs ex vivo, their amplification effects have been limited, and HSCs could only be maintained for a short period.

In 2019, it was reported that cytokines added to a polyvinyl alcohol medium could amplify mouse HSCs stably for an extended period without serum albumin. In our recent study, we have developed a novel culture technique that uses a culture medium replacing serum albumin and cytokines with high-molecular-weight polymers and specific compounds, enabling the long-term ex vivo expansion of human HSCs. With this technique, we were able to amplify human HSCs from umbilical cord blood for one month. Moreover, single-cell RNA sequencing analysis suggested that HSCs were selectively amplified compared to existing culture techniques.

We also demonstrated the feasibility of cloning and expanding HSCs that can reconstruct hematopoiesis even from a single HSC. This technology may become an essential single-cell cloning technique for genetic editing of HSCs in the future. These achievements have been published in the prestigious journal Nature.

Our next steps include providing this culture technique as a fundamental research tool for human HSCs and aiming for clinical applications to achieve safer hematopoietic stem cell transplantation and solve the shortage of donors.

３．本研究課題に関する発表

発表者氏名（著者・講演者）	発表課題名（著書名・演題）	発表学術誌名（著書発行所・講演学会）	学術誌発行年月（著書発行年月・講演年月）
Sakurai M, Ishitsuka K, Ito R, Wilkinson AC, Kimura T, Mizutani E, Nishikii H, Sudo K, Becker HJ, Takemoto H, Sano T, Kataoka K, Takahashi S, Nakamura Y, Kent DG, Iwama A, Chiba S, Okamoto S, Nakauchi H, Yamazaki S.	Chemically defined cytokine-free expansion of human haematopoietic stem cells.	Nature.	2023;615:127-133.