

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09911

研究課題名(和文)炎症性サイトカインによるマウスES細胞から造血幹細胞の誘導

研究課題名(英文) Induction of hematopoietic stem cells from mouse embryonic stem cells by inflammatory cytokines

研究代表者

北島 健二 (KITAJIMA, Kenji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：10346132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胚体内では、造血幹細胞(HSC)はAGM領域の造血性血管内皮細胞(HEC)からプロHSC・プレHSCを経て分化する。本研究では、OP9細胞による胚性幹細胞(ESC)の分化誘導により、これらの細胞と同様な細胞表面マーカーを発現する細胞が得られることを見出した。AGM領域におけるHSC発生には炎症性サイトカインが関与している。そこで、ESCから得られたHECをインターフェロン- γ 処理したところ、Lin-Sca-1+c-Kit+細胞(LSK細胞)が顕著に誘導された。しかし、この細胞をマウスへ移植したが骨髄定着能は認められず、HSC活性を有する細胞をESCから誘導することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスESCsから様々な血液細胞をin vitroで誘導することができるが、現在まで、遺伝子操作なしでHSCsへ分化誘導する方法の開発には誰も成功していない。この原因は、AGM領域に存在するHSC分化誘導因子がin vitroでは欠けている可能性が考えられる。マウスESCsからHSCsをin vitroで分化誘導できる因子の同定は、哺乳類胚発生におけるHSC発生機構の理解につながるものであり学術的意義は高い。また、ヒト人工多能性幹細胞(iPSCs)からin vitroでHSCsへ分化誘導する培養法の開発にも繋がるものであり、iPSCsを利用した再生医療などへの応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：In mouse embryos, hematopoietic stem cells (HSCs) are differentiated from hemogenic endothelial cells (HECs) via pro-HSCs and pre-HSCs. We found that the cells phenotypically identical to those cells could be induced from mouse embryonic stem cells (ESCs) by co-culture with OP9 stromal cells. In AGM regions, inflammatory cytokines are involved in HSC development. Therefore in vitro-differentiated HECs from ESCs were treated with Interferon-gamma. Consequently, Lin-Sca-1+c-Kit+ (LSK) cells were significantly induced. However, these LSK cells were not engraftable when transplanted into irradiated recipient mice. Thus, engraftable HSCs could not be obtained from mouse ESCs.

研究分野：血液学

キーワード：造血幹細胞 ES細胞 細胞分化 インターフェロン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、ホメオボックス転写因子 Lhx2 の強制発現により、マウス胚性幹細胞 (ESCs) から *in vitro* で Lineage 陰性 Sca-1 陽性 c-Kit 陽性 (LSK) 細胞を得ることに成功している。この LSK 細胞は、放射線照射したマウスへ移植すると長期骨髄再建能を示す。マウス人工多能性幹細胞 (iPSCs) からも同様な細胞を得ることができる。ホメオボックス転写因子 HoxB4 の強制発現により、マウス ESCs から長期骨髄再建能を示す造血幹細胞 (HSCs) が得られることも知られているが、Lhx2 による LSK 細胞の誘導効率は HoxB4 よりも優れていた。しかし、Lhx2 や HoxB4 などの転写因子の強制発現なしでは、*in vitro* で、マウス ESCs・iPSCs から長期骨髄再建能を示す細胞を得ることは未だ誰も成功していない。

マウス胚体内では、胎生 10.5 日目の背側大動脈・生殖隆起・中腎 (AGM) 領域の造血性血管内皮細胞 (HECs) から HSCs は発生する。一方、OP9 ストロマ細胞によるマウス ESCs から血液細胞への *in vitro* 分化誘導でも HECs を得ることはできるが、この細胞は HSCs に分化しない。このことから、1) AGM 領域の HECs と ESC 由来の HECs の性質が異なること、2) 両 HECs は似たような性質を持つが、現在の *in vitro* 分化誘導システムは HSCs への分化をサポートしていないこと、などが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子操作なしで、マウス ESCs から長期骨髄再建能を示す HSCs を誘導することが目的である。そのため、マウス胎仔の AGM 領域における造血発生と、マウス ESCs の *in vitro* 造血細胞誘導を比較し、HSCs の発生に関与する因子を見つけ出す。また、HSCs の発生には、インターフェロン- γ 、腫瘍壊死因子 (TNF) シグナルなどが関与していることが知られている。予備的知見から、マウス ESCs の分化誘導により得られた HECs は、インターフェロン- γ (Ifn- γ) により、LSK 細胞への分化が大幅に亢進することを見出している。そこで、Ifn- γ により得られた LSK 細胞の骨髄再建能を明らかにする。

3. 研究の方法

【HECs の比較解析】

マウス ESCs (E14tg2a 株) を OP9 ストロマ細胞と 6 日間、および 9 日間共培養し、Tie-2 陽性 c-Kit 陽性 CD45 陰性の HECs を得た (それぞれ、Day 6 ES-HECs、Day 9 ES-HECs と称す)。また、胎生 10.5 日目の C57BL/6 マウス胎仔の AGM 領域から Tie-2 陽性 c-Kit 陽性 CD45 陰性の HECs を採取した (E10 AGM-HECs と称す)。これらの HECs における細胞表面マーカーをフローサイトメーターにより解析した。また、マイクロアレイ解析より遺伝子発現パターンを比較した。さらに、これらの HECs を免疫不全マウスに移植し、骨髄再建能を調べた。

【AGM 領域の HSCs の骨髄定着能の改善】

胎生 10.5 日目の AGM 領域から採取した CD45 陽性細胞には HSCs が存在するとされているが、この HSCs は骨髄定着能が低い。そこで骨髄定着能を改善できるかどうか調べた。

【ESCs 由来と AGM 由来の未分化血液細胞の比較解析】

Day 6 ES-HECs、Day 9 ES-HECs、および E10 AGM-HECs を OP9 細胞と共培養して得られる血液細胞の細胞表面マーカーの解析を行った。

Day 6 ES-HECs に Lhx2 遺伝子を強制発現させ OP9 細胞と共培養すると、*in vitro* 自己複製活性を持つ c-Kit 陽性血液細胞を得ることができる (ES-Lhx2 細胞と称す)。同様に E10 AGM-HECs から Lhx2 により *in vitro* 自己複製活性を持つ c-Kit 陽性血液細胞を得た (AGM-Lhx2 細胞と称す)。この両者に違いがあれば、その差は、それぞれの元の細胞の差を反映しているのではないかと考え、移植実験・コロニーアッセイ・フローサイトメーター解析・マイクロアレイ解析を行った。

予備的知見により、Day 6 ES-HECs を Ifn- γ 処理すると LSK 細胞が顕著に誘導されることが判明している。そこで、E10 AGM-HECs から同様に LSK 細胞が誘導されるのかどうかを調べた。これらの LSK 細胞を放射線照射した免疫不全マウスに移植し、骨髄再建能を調べた。

AGM 領域では、HECs から ProHSCs (CD31 陽性 CD41 弱陽性 CD43 陰性 CD45 陰性)、Type I PreHSCs (CD31 陽性 CD41 弱陽性 CD43 陽性 CD45 陰性)、Type II PreHSCs (CD31 陽性 CD41 弱陽性 CD43 陽性 CD45 陽性) を経て、HSCs に分化する。そこで、Day 6 ES-HECs を OP9 細胞と共培養し、これらの細胞が認められるかどうかを調べた。

AGM 領域の ProHSCs・Type I PreHSCs・Type II PreHSCs は、直接、成体マウスへ移植しても骨髄再建能が認められないが、OP9 細胞と凝集培養すると、骨髄再建能を持つ HSCs に分化する。そこで、ESCs から得られた ProHSCs・Type I PreHSCs・Type II PreHSCs を OP9 細胞と凝集培養し、得られる血液細胞の解析を行った。

4. 研究成果

【HECs の比較解析】

Day 6 ES-HECs・Day 9 ES-HECs・E10 AGM-HECs のフローサイトメーター解析を行った結果、

E10 AGM-HECs は CD34 陽性であったが Day 6 ES-HECs の 90%近くは CD34 陰性であり、CD34 陽性細胞は 10%以下であることが判明した。一方、Day 9 ES-HECs は約 40%が CD34 陽性であった。CD34 陰性 Day 6 ES-HECs を単離し、OP9 細胞と 3 日間共培養すると、CD34 陽性 HECs に分化した。以上の結果から、Day 6 ES-HECs の多くは CD34 陰性であり、E10AGM-HECs と異なること、および、E10AGM-HECs と同様な CD34 陽性 HECs は、分化誘導期間を長くすることにより、ESCs から得られることが判明した。

次に、Day 6 ES-HECs・Day 9 ES-HECs・E10 AGM-HECs のマイクロアレイ解析を行った結果、E10 AGM-HECs と比べて、Day 6 ES-HECs・Day 9 ES-HECs の両方で発現が低い (Log2 : <1.0) あるいは高い (Log2 : >1.0) 遺伝子がそれぞれ 872 個、597 個 (計 1,469 個) であったのに対し、Day 6 ES-HECs のみで発現が低い、あるいは高い遺伝子はそれぞれ 2365 個、191 個 (計 2,556 個) であり、Day 9 ES-HECs は、より E10 AGM-HECs に近い細胞であるものと思われた。

興味深いことに、E10 AGM-HECs と比べて、Day 6 ES-HECs・Day 9 ES-HECs ではミトコンドリアゲノムにコードされている遺伝子の発現が、全体的に低下していることが見出された。一方、核ゲノムにコードされているミトコンドリア関連遺伝子の発現は低下していなかった。この意義については不明であるが、胚発生では、細胞のエネルギー獲得は、血液循環系・胎盤の発達に従って解糖系から酸化的リン酸化にシフトする。今後、ESCs の invitro 分化誘導では、このシフトが in vivo と同じように行っているのかどうかを調べる必要がある。

マウス ESCs の試験管内分化誘導により得られた Flk-1 陽性細胞は極めて低い頻度であるが、短期的な骨髄再建活性を示すことが報告されている。Day 6 ES-HECs は Flk-1 陽性である。そこで、Day 6 ES-HECs・Day 9 ES-HECs・E10 AGM-HECs を免疫不全マウスへ移植したが、骨髄再建能は認められなかった。

【AGM 領域の HSCs の骨髄定着能の改善】

予備的知見から、胎生 10.5 日目の AGM 領域の CD45 陽性細胞を放射線照射した免疫不全マウスに移植したが、骨髄再建能は認められなかった。骨髄 HSCs は、dmPGE2 処理により骨髄再建能が亢進することが知られている。そこで、胎生 10.5 日目の AGM 領域の CD45 陽性細胞を dmPGE 処理後、移植すると長期骨髄再建能が認められた。

【ESCs 由来と AGM 由来の未分化血液細胞の比較解析】

胎生 10.5 日目の AGM 領域の CD45 陽性細胞は、大部分が c-Kit 陽性 CD34 陽性であった。Day 6 ES-HECs・Day 9 ES-HECs・E10 AGM-HECs を OP9 細胞と共培養すると、いずれの HECs から CD45 陽性 c-Kit 陽性 CD34 陽性細胞が得られた。しかし、E10 AGM-HECs と比べると、Day 6 ES-HECs からは CD45 陽性 c-Kit 陽性 CD34 陽性細胞への分化効率が低いことが判明した。一方、Day 6 ES-HECs と比較すると、Day 9 ES-HECs から CD45 陽性 c-Kit 陽性 CD34 陽性細胞への分化効率が高いことが明らかとなった。

ES-Lhx2 細胞と AGM-Lhx2 細胞は、双方とも長期骨髄再建能を有していた。コロニーアッセイでは、AGM-Lhx2 の方が 2 倍程度、コロニー形成能が高いことが明らかとなった。両細胞の遺伝子発現を比較すると、AGM-Lhx2 では、炎症性シグナル経路に関する遺伝子の発現が高いことが判明した。そこで、これらの遺伝子の発現が、元の細胞 (胎生 10.5 日目の AGM 領域の CD45 陽性 c-Kit 陽性細胞と Day 6 ES-HECs を分化誘導して得られた CD45 陽性 c-Kit 陽性細胞) においても異なっているのかどうかを調べることを試みたが、AGM 領域の CD45 陽性 c-Kit 陽性細胞からの RNA 調製が難航しており、結果は得られなかった。

予備的知見から、Day 6 ES-HECs を Ifn- 処理すると LSK 細胞が誘導できることを見出している。また、E10 AGM-HECs から Ifn- により LSK 細胞が誘導できた。しかし、これらの ESC 由来、AGM 由来の LSK 細胞は骨髄再建能を示さなかった。

次に、マウス ESCs を 5 日間 OP9 細胞と共培養し、得られた Tie-2 陽性 HECs を、さらに OP9 細胞と共培養したところ、2 日後の接着細胞分画に、ProHSCs (CD31 陽性 CD41 弱陽性 CD43 陰性 CD45 陰性) 浮遊細胞分画に、Type I PreHSCs (CD31 陽性 CD41 弱陽性 CD43 陽性 CD45 陰性) と、Type II PreHSCs (CD31 陽性 CD41 弱陽性 CD43 陽性 CD45 陽性) と同様の細胞表面マーカーを発現する細胞が認められた。そこで、ProHSCs 様の細胞を OP9 細胞と再凝集培養したところ、CD45 陽性 Sca-1 陽性細胞が出現した。しかし、この細胞は骨髄再建能を示さなかった。

マウス AGM 領域では、Sca-1 陽性細胞に HSC 活性がある。本研究の結果から、Ifn- 処理、OP9 細胞との凝集培養により、Sca-1 を発現する血液細胞を得ることに成功した。しかし、胎生 10.5 日目の AGM 領域の CD45 陽性細胞が骨髄再建能を示すような移植条件を用いて移植しても、骨髄再建能を示す HSCs をマウス ESCs から遺伝子操作なしで得ることができなかった。Day 6 ES-HECs・Day 9 ES-HECs では、ミトコンドリアゲノムにコードされている遺伝子の発現が低いことが判明した。この現象と、HSCs を得ることができなかったこととの関連性は、今後、明らかにする必要がありと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitajima Kenji, Kanokoda Mai, Nakajima Marino, Hara Takahiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Domain-specific biological functions of the transcription factor Gata2 on hematopoietic differentiation of mouse embryonic stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 753 ~ 766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/gtc.12628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tabata Harumi, Hara Takahiko, Kitajima Kenji	4. 巻 512
2. 論文標題 Inhibitory action of an ERK1/2 inhibitor on primitive endoderm cell differentiation from mouse embryonic stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 399 ~ 404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima Marino, Suzuki Teruhiko, Hara Takahiko, Kitajima Kenji	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 In vitro differentiation of mouse T cell-derived hybrid cells obtained through cell fusion with embryonic stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrc.2019.04.038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyashita Kazuya, Kitajima Kenji, Goyama Susumu, Kitamura Toshio, Hara Takahiko	4. 巻 495
2. 論文標題 Overexpression of Lhx2 suppresses proliferation of human T cell acute lymphoblastic leukemia-derived cells, partly by reducing LMO2 protein levels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 2310 ~ 2316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.12.135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北島健二、原孝彦
2. 発表標題 転写因子Gata2の赤血球・巨核球誘導ドメインの同定。
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田畑陽美、原孝彦、北島健二
2. 発表標題 転写因子Gata4によるマウスES細胞から原始内胚葉系細胞への分化誘導メカニズム。
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 佑奈、北島 健二、原 孝彦
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の血液細胞分化に対するLIMホメオドメイン転写因子Lhx2の機能。
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北島 健二、鹿子田 真衣、原 孝彦
2. 発表標題 マウスES細胞から血液細胞への分化における転写因子Gata2のドメイン特異的な機能。
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

幹細胞を利用した血液再生医療技術とがん治療法の開発(幹細胞プロジェクト)
<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/stem-cell.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----