

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20890285  
 研究課題名（和文）ES細胞分化誘導系における造血幹細胞の前駆細胞の同定  
 研究課題名（英文）Isolation of HSC progenitors in *in vitro* ES cell differentiation culture system.  
 研究代表者  
 田中 洋介（TANAKA YOSUKE）  
 独立行政法人理化学研究所・幹細胞研究グループ・客員研究員  
 研究者番号：10509087

## 研究成果の概要（和文）：

血液発生において重要な転写因子である Runx1 と Gata1 の発現を同時にモニタリングできる細胞株(RVG25)を樹立した。RVG25 細胞株を用いた ES 細胞分化誘導系において Runx1+かつ Gata1+の血管内皮細胞から高効率に成体型の血液細胞（B 細胞分化能を有する細胞）が分化してくることを明らかにした。さらに胎仔マウス E7.5 の VE-cadherin+細胞が同様に B 細胞分化能を有することを明らかにした。また、Gata1+細胞を発生段階特異的にラベルすることができる Gata1-IRES-MerCreMer マウスを樹立した。

## 研究成果の概要（英文）：

We established RVG25 ES cell lines which can monitor expression of Runx1 and Gata1 at the same time. In the ES cell hematopoietic differentiation culture, we found that Runx1+Gata1+VE-cadherin+ cells had high ability to produce definitive hematopoietic cells (B cells). Additionally, we showed that VE-cadherin+ cells in E7.5 murine yolk sac could differentiate into B cells. Furthermore we made Gata1-IRES-MerCreMer mouse lines. Using the mice, we can label Gata1-expressing cells at any time.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：Runx1, Gata1, VE-cadherin

## 1. 研究開始当初の背景

ES細胞培養系における造血幹細胞の分化誘導といえば、HoxB4の強制発現(Michael et al., 2002)が有名であるが、その分子機序や造

血幹細胞活性を獲得した細胞集団は不明である。申請者らのデータによれば、HoxB4の発現はES細胞分化誘導系においてCD45+細胞よりもむしろFlk1+CD45+細胞に検出された。多くの実験から

ES細胞分化誘導5日目において、VE-cadherin+細胞のみがB細胞分化のポテンシャルを有していることがわかっている。HoxB4の強制発現の系においても、HoxB4の強制発現はES細胞分化誘導後4~6日目に限定しており、この時期に造血幹細胞になりうる細胞が存在することが示唆される。血液細胞はVE-cadherin+CD45-細胞から分化してくること(Nishikawa et al., 1998)、胎仔マウスにおいてAGMやFetal liverの造血幹細胞はVE-cadherin+であることなどからも(Injune et al., 2005)、HoxB4の過剰発現により造血幹細胞活性を与えられた細胞集団はVE-cadherin+細胞であると考えられる。したがって、ES細胞分化培養系において、VE-cadherin+細胞が造血幹細胞を分化誘導するにあたってキーとなる細胞集団である。胎仔マウスにおいて、造血幹細胞活性が認められるのは、初期造血が始まるyolk sacではなく、E10以降のAGMやfetal liverである。しかしながら、これまでに、yolk sacの血液前駆細胞をneonateに移植(Yoder et al., 1997)、あるいはAGM由来のストローマとの共培養により造血幹細胞活性を獲得できるとの報告がある(Matsuoka et al., 2001)。また、最近のin vivoにおけるScl-Cre (Joachim et al., 2005)やRunx1-Cre (Igor et al., 2007)によるtracing studyによればyolk sacの血液前駆細胞中に造血幹細胞に分化できる細胞が存在していることが明らかになった。さらには、胎生期の血液循環を欠損しているNcx1欠損マウスにおいて、AGMに造血幹細胞が存在しないことからAGMの造血幹細胞はyolk sac由来細胞である可能性が示唆されるデータも報告されている(Lux et al., 2005)。これらの報告からも、ES細胞分化誘導系においてVE-cadherin+細胞中に造血幹細胞の前駆細胞が存在していることが示唆される。VE-cadherin+細胞からは血液前駆細胞、血管内皮細胞が分化してくることから、ES細胞分化誘導系において造血幹細胞を作り出すためには、VE-cadherin+細胞をさらに詳細に分類し造血幹細胞前駆細胞を含む細胞集団を特定する必要がある。

昨年、E7.0~E7.5のyolk sacにおいてGata1+VE-cadherin+細胞の存在が報告された(Yokomizo et al., 2007)。彼らによると、この細胞は、頻度は高くないが血液細胞と血管内皮細胞の両方に分化でき、E8.0には消失するとのことである。興味深いことに、血液細胞により分化しやすいとのことである。血液細胞はVE-cadherin+CD45-細胞から分化してくるということをふまえると、VE-cadherin+細胞中の血液細胞への分化は以前考えられていたよりも発生の早い段階(E7.0~)から始まっている可能性が示唆された。そこで、申請者は早速Gata1-HRD-GFP ES細胞株(Fujimoto et al., 2001)を用いたES

細胞分化誘導系においてGata1とVE-cadherinの発現を確認したところ、分化誘導3.5~4.0日目にGata1+VE-cadherin+細胞が存在していることが確認できた。当然のことながらこの細胞集団はRunx1を発現していた。

これらのことから、E7.0-8.0のyolk sacのGata1+VE-cadherin+細胞はRunx1のラベリング実験において示された成体型造血能をもつ細胞であると想定される。この細胞はES細胞血液分化誘導系においても確認できおり、in vivo、in vitroにおいてこの細胞集団の成体型造血細胞への文化能を詳細に解析することでES細胞血液分化誘導系においてVE-cadherin+細胞中に含まれると考えられる造血幹細胞の前駆細胞を含む細胞集団同定のヒントが得られると期待される。

## 2. 研究の目的

申請者の最終目標はES細胞からの造血幹細胞の効率的な分化誘導法の確立であるが、その目的を達成するためのプロセスとして、最初に造血幹細胞の前駆細胞を含むと想定されるVE-cadherin+細胞の詳細な解析を行う。

ES細胞血液分化誘導系において、Gata1とRunx1の発現を同時にモニタリングできるES細胞株を樹立し、この細胞株を用いてGata1+VE-cadherin+細胞の分化を追う。また、ES細胞由来VE-cadherin+細胞をGata1, Runx1, CD41, CD34, c-Kitなどの発現により細分化し、より造血幹細胞活性が高い細胞集団を特定する。ES細胞分化誘導系において造血幹細胞の活性を測定することは困難であることから、特にB細胞、T細胞といったリンパ球への分化能を有した細胞集団を同定することを最初の目標として研究に着手する。

次にE7.0-8.0のyolk sacの細胞がin vitroでB細胞へ分化できるかどうかを検定する。(一般的には、この時期のyolk sacの細胞はB細胞への分化能を有していないと考えられているが、一部ではあるが分化できるという報告もある。)また、同時期のES細胞分化誘導系の細胞はB細胞へ分化できることから、同時期のES細胞とyolk sacの細胞を共培養することによりyolk sacの細胞がB細胞へと分化できるかどうかを検討する。

次にGata1-Creマウスとレポーターマウスを用いてin vivoにおいてGata1+VE-cadherin+細胞から分化してくる細胞を追跡することにより、この細胞が血液発生学上どのような位置づけの細胞であるか、さらには造血幹細胞の前駆細胞かどうかを検討することにした。また、ES細胞分化誘導系においてGata1+VE-cadherin+細胞に注目して血液細胞の分化の過程を再検討することで、VE-cadherin+細胞中に含まれると考えられる造血幹細胞の前駆細胞を含む細胞集団同定のヒントが得られるのではないかと考え、ES培養系においてもこの細胞の分化能を検討することにした。この細胞の分化における位置付けを解明することによって、血液細胞の新しい分化過程が明らかになることが期待される。

さらに、Gata1+VE-cadherin+細胞の特性をよ

り詳細に研究するために、タモキシフェンによりCreの発現がコントロールできるGata1-IRES-Mer-Cre-Merマウスの作成、利用も計画している。

### 3. 研究の方法

- (1) Gata1とRunx1の発現を同時にモニタリングできるES細胞株の樹立  
Runx1遺伝子座にVenusを導入したES細胞株に、Gata1-HRDの下流にhumanCD25をつないだトランスジーンを遺伝子導入することにより目的のES細胞株(RVG25)を樹立する。
- (2) ES細胞分化誘導系において、造血幹細胞活性の高い細胞集団を特定する  
RVG25細胞株を用いたES細胞分化誘導系において分化誘導4～6日目のVE-cadherin+細胞集団をGata1, Runx1やCD41, CD34, c-Kitなどの発現により細分化し、リンパ球(B細胞)を分化誘導できる細胞集団を絞り込む。具体的には、表面マーカーにより分けた細胞をサイトカイン存在下でOP9ストローマ細胞と共培養し、B細胞へ分化できるかどうかを確認する。ある程度絞り込めた段階で限界希釈アッセイ法により厳密にリンパ球への分化能を解析する。
- (3) ES細胞分化誘導系において、造血幹細胞活性の高い細胞集団を特異的に発現する遺伝子の同定  
前年度に細分化した細胞集団をDNAマイクロアレイにより解析し、その細胞集団特異的に発現する遺伝子のリストアップを行う。本研究室では、成体型の造血幹細胞、胎生型の造血幹細胞(現在、申請者がサンプルを調整中である。)などのマイクロアレイのデータを集積しているので、これらのデータと比較検討し、特に細胞表面に発現する分子を同定する。既知の分子で抗体が存在するものに関してはFACSにより解析を行い、抗体のないもの、未知の分子に関しては今後の研究課題とする。
- (4) E7.0-8.0のyolk sacの細胞(特にVE-cadherin+細胞)のリンパ球への分化能の確認  
E7.0-8.0のyolk sacの細胞とES細胞を区別するため、ES細胞はGFPを遺伝子導入したものを用いる。それぞれの細胞を混ぜたものをOP9ストローマ上でサイトカイン存在下で培養しB細胞への分化誘導を行う。コントロールとして、それぞれの単独培養も行う。B細胞への分化が確認できれば、その分化能をもつ細胞集団を2の計画から得られる結果を踏まえて特定する。

Yolk sacの細胞からB細胞が誘導できなかった場合については、yolk sacの細胞(特にVEcadherin+細胞)をリンパ球への分化のない細胞として平成21年度に行う予定であるDNAマイクロアレイのネガティブコントロールとして利用する。

- (5) Gata1+VE-cadherin+細胞が成体型造血に貢献しているかどうかを調べる  
GATA1-CreトランスジェニックマウスとRosa26(R26R-eYFP/R26R-eYFP)マウスを交配し、8週齢以降のマウスの血液をFACS解析することにより確認する。また、実験系の確認のため、E7.0-8.0のyolk sacの細胞も解析する。Gata1+VE-cadherin+細胞の成体型造血への貢献が確認できなかった場合は、①この細胞由来の細胞が発生のどの段階まで存在し、②どのような細胞に分化し、③どこに局在するかを調べ、この細胞の血液発生学上の位置づけをきちんと行うことで、初期発生における造血幹細胞の前駆細胞の同定に役立つ。
- (6) タモキシフェンによりCreの発現がコントロールできるGata1-IRES-Mer-Cre-Merノックインマウスの作成  
Gata1-Creトランスジェニックマウスがうまく動かなかった場合も想定し、新しいマウスのラインを作成する。また、このマウスを用いることにより、発生段階を選んでGata1+細胞をマーキングできることが期待できる。Gata1-IRES-Mer-Cre-MerマウスとRosa26(R26R-eYFP/R26R-eYFP)マウスを交配し、Gata1の発現が始まるE7.5から1日おきに造血幹細胞活性が最初に認められるE10.5までタモキシフェンによりGata1+細胞をマーキングし、分化系譜を解析する。前年度の実験からGata1+細胞の成体型造血への貢献が確認できた場合は、どの段階でマーキングされた細胞が胎生型の造血幹細胞に貢献しているかを確認することで、造血幹細胞の前駆細胞がどの段階でどこに発生してくるかを明らかにする。成体型造血に貢献が認められなかった場合は前年度のGata1-Creマウスの計画とあわせて、より発生段階特異的な解析を行う。

### 4. 研究成果

本研究において得られた研究成果を以下に示す。

- (1) Runx1遺伝子座にVenusを導入したES細胞株に、Gata1-HRDの下流にhumanCD25をつないだトランスジーンを遺伝子導入することによりES細胞株(RVG25)を樹立した。
- (2) RVG25細胞株を用いたES細胞分化誘導系では分化誘導4～6日目のRunx1+VE-cadherin+細胞集団中にB細胞分化能

を有する細胞が多く含まれ、Runx1+/VE-cadherin+細胞集団には含まれていないことがわかった。つぎにRunx1+/VE-cadherin+細胞集団をGata1やCD41の発現によりさらに4つの細胞集団に分け、Gata1+細胞集団にB細胞分化能を有する細胞がより多く濃縮されていることを明らかにした。

- (3) ES細胞分化誘導系において、Runx1+の血管内皮細胞からのみ成体型造血細胞(B細胞分化能を有する細胞)が分化してくることがわかったので、血管内皮細胞から成体型の血液細胞が分化してくる際に重要な遺伝子をスクリーニングする目的で、B細胞への分化能を持たない血液細胞(①primitive HPCs ; Runx1+, VE-cadherin-, CD41+)、B細胞への分化能を有する細胞(②hemogenic EC1 ; Runx1+, VE-cadherin+, CD41+と③hemogenic EC2 ; Runx1+, VE-cadherin+, CD41)とnon-hemogenic EC(④Runx1-, VE-cadherin+, CD41-)細胞に対してGeneChip解析を行った。現在、データを解析中である
- (4) E7.0-8.0のyolk sacのVE-cadherin+細胞がOP9を用いたB細胞分化誘導系によりB細胞分化能を有することを明らかにした。
- (5) Gata1-CreマウスをRosa26-eYFP reporterマウスと交配したところ、過去の報告と同様に胎仔のぜんぶの全身の細胞がラベルされてしまったので、実験を中止した。
- (6) Gata1-IRES-MerCreMerノックインマウスを樹立した。タモキシフェンを投与することにより一過性にCreの発現が誘導でき、レポーターマウスとのかけ合わせにより発生段階特異的にGata1+細胞をラベルすることができる。

本研究において得られた研究成果は断片的かつ基礎的なものであり、さらなる研究が必要である。しかしながら、その中のいくつかの発見は非常にインパクトのあるものであった。特に、胎仔マウスのE7.5 yolk sac中にリンパ球に分化できる細胞がいるということが発見したことは非常に驚きであった(未発表)。なぜなら、これまでに、リンパ球分化能を持つ細胞が確認されたのはE8.5以降であり、yolk sacにいたってはE9.5以降であったからである。この事実は今年の2月にKeystoneで行われた国際学会においても非常に注目を浴びることができ、活発な議論を行うことができた。また、Gata1-IRES-MerCreMerノックインマウスを樹立したことも非常に意義のあることである。申請者らの研究に関しては現在、E7.5におけるGata1+細胞(この時期のGata1+細胞

のほとんどはVE-cadherinを発現している。)をラベルし、成体型造血への貢献を検討中である。これまでに、E7.5のGata1+/VE-cadherin+細胞は少なくともE9.5のyolk sacのVE-cadherin+細胞には貢献(分化)していないことが分かった(未発表)。今回はFACSによる解析しか行なっていないが、LacZレポーターマウスとかけ合わせることでE8.5以降のP-Sp/AGM領域の血液細胞クラスターへの貢献があるかを組織学的に評価する予定である。これにより、E7.5のGata1+/VE-cadherin+細胞がE8.5のP-Sp領域からの造血に貢献しているかどうか明らかになり、非常に重要な知見が得られることになる。また、このラインは特に赤血球の研究分野において非常に有用なツールとなることが期待できる。

ES細胞培養系に関しては、RVG25細胞株を樹立したことにより、血管内皮細胞から血液細胞への分化の過程をRunx1, Gata1の発現を指標にしてより詳細に解析することができるようになり、成体型の血液細胞の前駆細胞を多く含む細胞集団を絞り込むことができた。しかしながら、ES細胞血液分化培養系はin vivoの環境とはかなり異なるため、得られる結果がマウス胎仔からの結果とは異なる場合がしばしば認められている。申請者らはこの違いを詳細に解析することも重要であると考え、今後この点についても研究を深めていきたいと考えている。GeneChip解析については現在解析中であるが、特にRunx1により発現が制御されている遺伝子で、①と②③とで発現量に有意な差が認められるもの(④では当然発現していない)を中心にスクリーニングを行っている。これにより、成体型血液細胞への分化メカニズムが解明できれば、造血幹細胞の発生メカニズムの解明につながることを期待できる。今後はスクリーニングから得られた遺伝子をマーカーにしてVE-cadherin+細胞をさらに分類するとともに、絞り込んだ細胞の成体型造血能を評価するin vivoの移植実験(新生仔マウス肝臓への細胞移植等)も視野に入れて研究を進めていきたいと考える。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

(1) 発表者名: 田中 洋介

発表標題: Investigation of lymphoid potential in early VE-cadherin positive population

学会等名: The 7th Stem Cell Research Symposium

発表年月日: 2009年5月16日

発表場所: 東京都港区六本木 1-5-2 泉ガーデンギャラリー

(2) 発表者名: 田中 洋介

発表標題: Investigation of lymphoid potential in early VE-cadherin positive population

学会等名 : Keystone Symposia Stem  
cell Differentiation and  
Dedifferentiation  
発表年月日 : 2010 年 2 月 1 8 日  
発表場所 : Keystone Resort

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 洋介 (TANAKA YOSUKE)

独立行政法人理化学研究所・幹細胞研究グル  
ープ・客員研究員

研究者番号 : 10509087