

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21689027

研究課題名（和文） E2Aの機能阻害による造血幹・前駆細胞の増幅及びその分子機構の解明

研究課題名（英文） Expansion of hematopoietic stem/progenitor cells by suppressing E2A activities

研究代表者

伊川 友活 (IKAWA TOMOKATSU)

独立行政法人理化学研究所・免疫発生研究チーム・研究員

研究者番号：60450392

研究成果の概要（和文）：

本研究ではE2Aの転写抑制因子であるId3をマウスの造血幹細胞へレトロウイルスを用いて導入し、B前駆細胞の培養条件下で培養することによって造血幹・前駆細胞を生体外で増幅させる方法を確立した。この細胞は同じ条件で培養を続ける限り無限に増殖し、生体内および生体外のいずれにおいてもリンパ球およびミエロイド系細胞への分化能を顕著に示した。また、BMI-1やHOXB4を強制発現することによって赤血球・巨核球への分化能を付与できる可能性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a novel method for expanding hematopoietic stem/progenitor cells by suppressing E2A activities. This was done by ectopic expression of Id3 into hematopoietic stem cells and cultured the infected cells in a B cell differentiating conditions. The cells have potential to proliferate enormously in vitro and to generate lymphoid and myeloid lineage cells. We named the cells induced Leukocyte Stem (iLS) cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	6,200,000	1,860,000	8,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞、自己複製、Id3、転写因子、E2A、B細胞分化

1. 研究開始当初の背景

我々はカリフォルニア大学サンディエゴ

校の C. Murre 教授との共同研究により、転写因子 E2A を欠損したマウスでは B 前駆細胞の段階で分化停止したプロ B 前駆細胞が

多能前駆細胞としての特徴を示すことを報告した (Ikawa et al. *Immunity*, 2004). この知見は「B細胞への分化途上で分化停止した前駆細胞は多能性と自己複製能という造血幹細胞の特性を再獲得する」事を示唆していた. 従って「E2A 欠損B前駆細胞の状態を人為的に誘導して制御することにより, 造血幹細胞として機能する細胞の増幅が可能であるのではないか」と考えた. さらに恒久的な E2A の阻害では E2A 欠損前駆細胞と同じ問題点を抱えることになるので「一時的な E2A の機能阻害法を用いることにより, 生体での造血幹細胞としての生着, 全系列の細胞への正常な分化が可能である」と考えた.

そこでこの仮説を証明すべく, 次のような予備実験を行った. まず, E2A の人為的な機能阻害のために, E2A の機能を阻害する分子として生体に存在する転写抑制因子 Id タンパクを利用することにした. 一時的な阻害法としてレトロウイルスを用いた Id タンパクの導入法を試みた. レトロウイルスで導入された遺伝子は一定の割合で不活性化され, 発現しなくなるので E2A の機能が一定の割合で回復すると予想された.

Id タンパクの1つである Id3 遺伝子をマウスの造血幹細胞へレトロウイルスベクターを用いて導入し, 強制発現させ, B前駆細胞の培養条件下に培養した. すると, プレプロ B細胞様の段階で分化が停止し, 細胞が継続的に増幅した. 驚くべき事にこの細胞は造血幹細胞としての性質を有していた. すなわち, この前駆細胞を放射線照射後のマウスに移植することにより, マウスを4ヶ月以上にわたって T, B, ミエロイド系列を含むすべての系列の造血を維持することが出来た (未発表データ, 特許申請済み). 中でも多数の B細胞が生体内で正常に生成したことは特筆に値する. これは導入した Id3 が一部の細胞で発現されなくなることにより E2A の機能が回復して, B細胞の分化が正常に起こったことを示している. また, この細胞は凍結保存が可能であることもわかった. 申請者らはこの自己複製能と多分化能を併せ持った前駆細胞を Id 因子を用いた造血前駆細胞という意味で Id-induced hematopoietic progenitor (IdHP) 細胞と名付けた.

IdHP 細胞は同じ条件で培養を続ける限り, 無限に増幅するため, 多能性前駆細胞を増幅させる方法としての応用が期待できる. さらにこれまではなかった造血幹細胞株として用いることが出来るため, 幹細胞研究の材料としても様々な利用方法が考えられる. 本研究では IdHP 細胞の自己複製能に着目し, この分子機構の解明に取り組む.

2. 研究の目的

本研究は IdHP 細胞を用いて, 分化を停止させることによって自己複製能が誘導されるときに関与する因子を同定することにより, 造血幹細胞の自己複製能を制御する分子機構を明らかにすることを目的とする. 自己複製を誘導するメカニズムを解析するために, Id3 を導入した造血前駆細胞とコントロールベクターを導入した細胞でアレイを用いて網羅的に遺伝子発現を比較し, 自己複製に重要であると考えられる遺伝子をスクリーニングする. 自己複製に必要な分子として Homeobox (Hox) 遺伝子の1つである HoxB4 や Zinc-finger 型転写因子である Gfi-1, Polycomb group タンパクの Bmi-1 等が示唆されている. もしこれらの遺伝子発現が誘導されていけばいわば造血幹細胞と同じ構造の転写ネットワークが形成されると考えられる. この際は分化停止がそのような自己複製転写ネットワークに至る過程を調べることになり, 誘導に関わる主因を同定する. 一方これらの遺伝子発現が誘導されていなければ未知の制御ネットワークの存在を示唆することになる. この場合は経時的なアレイ解析により誘導される遺伝子群を特定する. 次にこれらの遺伝子をコントロールベクターを用いた細胞, もしくは B細胞にコミットされたプロ B前駆細胞に導入し自己複製能を誘導できるか解析する. 続いてこれらの遺伝子の正常な造血幹細胞における機能を明らかにする. すなわちこれらの遺伝子の造血幹細胞や lympho-myeloid 系前駆細胞, common-myeloid 系前駆細胞など各種前駆細胞群における発現パターンを解析し, 造血幹細胞特異的に発現しているかどうか調べる. もし造血幹細胞への特異的な発現が認められればこの遺伝子を正常な造血幹細胞へ導入し, 造血幹細胞の増幅が認められるか調べる. このようなアプローチにより多能性維持に必要な機構と自己複製に必要な機構とを切り離して解析でき, 幹細胞維持のための転写ネットワークの構造が明らかに出来ると考えられる.

3. 研究の方法

(1) IdHP 細胞を誘導するメカニズムの解析

① DNA マイクロアレイを用いた自己複製誘導遺伝子の解析

先述したように我々は B前駆細胞のごく初期の段階で分化を強制停止させることにより, 多能性造血前駆細胞を誘導, 増幅させることに成功した. これは B細胞分化に必須

の転写因子 E2A を人為的に阻害する方法を用いている。E2A の生理的な阻害因子である Id タンパクの 1 つ Id3 をレトロウイルスを用いてマウス造血幹細胞に強制発現させ、B 細胞分化培養条件下で培養した。すると、B220+CD19- のプレプロ B 細胞段階で分化が停止した。この細胞を IdHP 細胞と呼ぶ。IdHP 細胞は同じ条件で培養を続ける限り、一月で約 10^7 倍にも増殖した。しかも増殖後も T, B, ミエロイド系列への分化能を正常に保持していた。そこで、この自己複製誘導のメカニズムを解析するために Id3 を導入した細胞とコントロールベクターを導入した細胞からそれぞれ RNA を採取し、マイクロアレイを用いてグローバルに遺伝子発現を比較する。遺伝子発現に差の認められたものの中から標的遺伝子の候補となるものをスクリーニングし、Real-time PCR で発現差を確認する。これをこれまで自己複製に関わる因子として示唆されている分子群 (Notch, Wnt, Bmi-1 など) と照合し、既知の分子ネットワークとの関連性を調べる。もし、既知のネットワークとの関連性が認められなければ新規標的遺伝子の解析として次の②、③へ進む。さらに Tamoxifen によって誘導可能な Id3 と Estrogen receptor (ER) との融合タンパク (Id3ER) を用いて Id3 タンパクの発現量を正負に制御することにより、自己複製維持ネットワークの形成過程、安定性などについても検討する。

②スクリーニングした標的遺伝子の機能解析 (その1)

IdHP 細胞において発現の上昇が認められた遺伝子をレトロウイルスベクターに組み込む。これをマウス造血前駆細胞に導入し、IdHP と同じ培養条件で培養する。これを増幅させた後、放射線照射したマウスに移植し、IdHP 細胞と同じような血液再構築能を示すかどうか調べる。具体的には移植後、6ヶ月間にわたり経時的に末梢血の細胞を採取し、フローサイトメータを用いてドナー由来の T, B, NK リンパ球およびミエロイド系細胞の割合を解析する。次に再構築されたマウスの骨髄からドナー由来の細胞を採取し、これを別の放射線照射したマウスに二次移植することにより、自己複製能が保たれている

か調べる。またストローマ細胞との共培養やコロニーアッセイ法などの *in vitro* 分化誘導系を用いて *in vivo* における分化能の解析結果を検証する。

③スクリーニングした標的遺伝子の機能解析 (その2)

IdHP 細胞において発現の低下が認められた遺伝子の shRNA をデザインし、レトロウイルスベクターに組み込む。これをマウス造血幹細胞に導入し、IdHP 細胞と同じ条件で培養する。もし、細胞が増幅されればこれを放射線照射したマウスに移植し、IdHP 細胞と同じような造血幹細胞活性が認められるかどうか調べる。具体的には移植後6ヶ月間、経時的に末梢血の細胞を採取し、フローサイトメータを用いてドナー由来の T, B, NK リンパ球およびミエロイド系細胞の割合を解析する。次に再構築されたマウスの骨髄からドナー由来の細胞を採取し、これを別の放射線照射したマウスに二次移植し、自己複製能が保たれているか調べる。また *in vitro* 分化誘導系を用いて *in vivo* における結果を検証する。

(2) IdHP 細胞の全能性 (赤血球分化能) 獲得とそのメカニズムの解析

IdHP 細胞は多能性を示すが、赤血球への分化能は限定されている。そこで自己複製に重要であると考えられている転写因子 HoxB4 や Bmi-1 を IdHP 細胞へ導入し、赤血球への分化を増強できるかどうか調べる。具体的にはまず、Green mice 骨髄から造血幹細胞を採取し、これに Id3 遺伝子を導入し、IdHP 細胞を誘導する。この Green mice 由来の IdHP 細胞に HoxB4 や Bmi-1 をレトロウイルスを用いて導入し、放射線照射したマウスに移植する。移植後6週以上経過したマウスの骨髄の細胞をフローサイトメータを用いて解析し、IdHP 細胞由来の赤血球分化が増強されているかどうか解析する。次に再構築されたマウスの骨髄から IdHP 細胞由来の細胞を採取し、別の放射線照射したマウスに二次移植を行い、赤血球分化能が保たれているか調べる。

4. 研究成果

(1) IdHP 細胞を誘導するメカニズムの解析

IdHP細胞とコントロールベクターを導入した(TAC)細胞および、E2A欠損造血前駆細胞(E2AHPc)、マウス胎仔肝臓造血幹細胞(LSK)からそれぞれRNAを採取し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現パターンを比較した。IdHP細胞とコントロールのTAC細胞を比較したところ、IdHP細胞においてB細胞特異的遺伝子(CD79a, CD79b, VpreB, EBF1, Pax5)の発現が顕著に減少していた。一方でGATA3, Thy1, CD25, c/EBPβ, EpoR, MPOなど他の系列特異的遺伝子の発現が上昇していた。この遺伝子発現パターンはE2AHPcとほぼ同じであり、IdHP細胞がその分化・増殖能だけでなく、遺伝子発現プロファイルにおいてもE2AHPcと似ていることを示している。IdHP細胞とLSKを比べると、IdHP細胞のB細胞特異的遺伝子の発現が上昇していることが明らかとなった。このことはLSK細胞よりもIdHP細胞の方がよりB細胞系列へ分化が進んでいることを示唆している。一方でIdHP細胞はLSK細胞よりもGATA2, Csf3r, c/EBPε, EpoR等の発現が減少していることも明らかとなった。この結果はIdHP細胞のミエロイド系細胞、赤血球への分化能が限定されていることと一致している。以上の結果から、IdHP細胞は自己複製能と多分化能を兼ね備えた幹細胞様の性質を示すが、分化能はミエロイド系およびリンパ球系に限定されているいわば「白血球幹細胞」であることが明らかとなった(図1)。

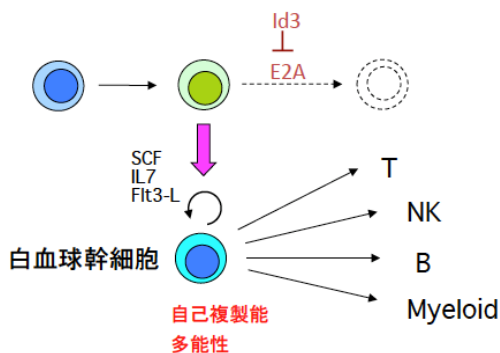


図1 白血球幹細胞の作成

(2) Inducible な IdHP 細胞の作成

Id3-ERT2 ベクターをマウス造血幹細胞に導入し、B細胞分化条件で培養したところ、Tamoxifen を加えないで培養すると、7日間でCD19陽性のB細胞が生成されたのに対して、Tamoxifen を加えるとB細胞分化が阻害され、プレ・プロB細胞様の細胞が生じた。この細胞はIdHP細胞の表面抗原フェノタイプ

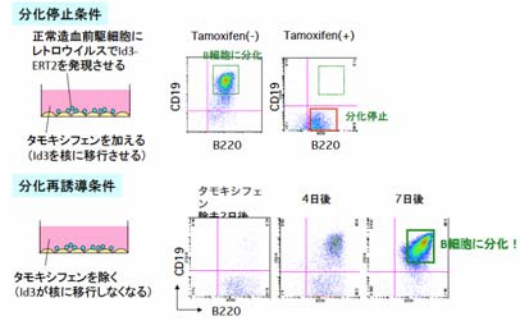


図2 分化停止・誘導を制御できるシステム

と酷似していた。この細胞培養液中からTamoxifenを取り除くと7日間でCD19陽性細胞が生成された。このことはId3-ERT2によって停止した前駆細胞がB細胞分化を再開させたことを示している。この系はB細胞への運命決定の分子機構を調べる上で貴重な誘導系となりうる(図2)。さらにこの方法はB細胞分化研究に有用なだけでなく、前駆細胞の自己複製・分化を自在に制御できるため他の細胞の分化研究に応用できる可能性がある。均一な細胞集団を必要なだけ増幅してから分化誘導できるため、ゲノムワイドな転写ネットワーク解析、エピジェネティック解析に最適である。このように基礎研究において有用であることはさることながら、応用面においてもこのIdHP細胞はT細胞、NK細胞、樹状細胞などの材料として用いることが出来るため、がんに対する免疫療法などへの応用が期待できる。

(3) IdHP細胞への赤血球・巨核球分化能付与
リンパ球、ミエロイド系細胞への分化能に限定されたIdHP細胞へ特定の遺伝子を導入することにより、赤血球/巨核球への分化能を誘導できるかどうか調べた。まず最初に、造血幹細胞の自己複製を誘導する因子であるBMI-1やHOXB4をレトロウイルスを用いてIdHP細胞へ導入した。これらの遺伝子に感染した細胞をソーティングしIdHP細胞と同じ条件で培養したところ、遺伝子導入した細胞はIdHP細胞と同様、顕著な増殖能を示した。次に培養系および移植による分化誘導系を用いてこれらの細胞の分化能を調べたところ、in vivoにおいてもin vitroにおいても赤血球や巨核球への分化能は遺伝子導入前とほとんど変わらなかった。ところが、BMI-1やHOXB4遺伝子を導入したIdHP細胞は巨核球系細胞のマーカーである、CD41を発現することが明らかとなった。このことはIdHP細胞の赤血球/巨核球系細胞への分化プログラムが活性化されてい

ることを示唆している。また、IdHP細胞が造血幹細胞に近い、より未分化な前駆細胞へ誘導された可能性を示している。今後、遺伝子導入した細胞の培養条件に検討を加えることにより、IdHP細胞に赤血球／巨核球への分化能を付与できる可能性を示した。

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)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Shibata K, Yamada H, Sato T, Dejima T, Nakamura M, Ikawa T, Hara H, Yamasaki S, Kageyama R, Iwakura Y, Kawamoto H, Toh H, Yoshikai Y. Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing gd T cells. 査読有、**Blood** 118; 586-593, 2011
- ② Ikawa T, Hirose S, Masuda K, Kakugawa K, Satoh R, Shibano-Satoh A, Kominami R, Katsura Y, and Kawamoto H. An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. 査読有、**Science** 329: 93-96, 2010
- ③ Kawamoto H, Ikawa T, Masuda K, Wada H and Katsura Y. A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: the essence of the myeloid-based model. 査読有、**Immunol Rev.** 238: 23-26, 2010
- ④ Hirose K, Inukai T, Kikuchi J, Furukawa Y, Ikawa T, Kawamoto H, Oram SH, Gottgen B, Kiyokawa N, Miyagawa Y, Okita H, Akahane K, Zhang X, Kuroda I, Nonna H, Kagami K, Goi K, Kurosawa H, Look AT, Matsui H, Inaba T and Sugita K. Aberrant induction of LMO2 theE2A-HLF chimeric transcription factor and its implication in leukemogenesis of B-precursor ALL with t(17;19). 査読有、**Blood** 116: 962-970, 2010
- ⑤ Oguro H, Jin Y, Ichikawa H, Ikawa T,

Yamazaki S, Kawamoto H, Nakauchi H, and Iwama A. Poised lineage specification in multipotent hematopoietic progenitor cells by the polycomb protein Bmi1. 査読有、**Cell Stem Cell** 6: 279-286, 2010

- ⑥ Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Fujiwara J-I, Ohtani M, Fujii H, and Koyasu S. Innate production of Th2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphocytes. 査読有、**Nature** 463: 540-544, 2010
- ⑦ Higashi AY, Ikawa T, Muramatsu M, Ecnomides AN, Niwa A, Okuda T, Murphy AJ, Rojas J, Heike T, Nakahata T, Kawamoto H, Kita T, and Yanagita M. Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreERT2. 査読有、**J. Immunol.** 182:5633-5640, 2009
- ⑧ Masuda K, Germeraad WTV, Satoh R, Itoi M, Ikawa T, Minato M, Katsura Y, W. van Ewijk, and Kawamoto H. Notch activation in thymic epithelial cells induces development of thymic microenvironments. 査読有、**Mol. Immunol.** 46: 1756-1767, 2009
- ⑨ Komaniwa S, Hayashi H, Kawamoto H, Ikawa T, Sato SB, Katsura Y, and Uda K. Lipid-mediated presentation of MHC class II molecules guides thymocytes to the CD4 lineage. 査読有、**Eur. J. Immunol.** 39: 96-122, 2009

[学会発表] (計 11 件)

- ① Ikawa T. Dissection of genetic programs during the T cell lineage specification process 日本免疫学会 2011年11月27日 千葉
- ② 伊川友活 T細胞からB細胞へのリプロ

- グラミング 第17回血液科学セミナー
(招待講演) 2011年11月6日 東京
- ③ 伊川友活 T細胞系列への決定における遺伝子制御ネットワークの解析 Kyoto T Cell Conference 2011年6月10日 京都
 - ④ 伊川友活 T細胞系列への運命決定を制御する分子機構 (招待講演) 第20回東京免疫フォーラム 2011年2月22日 東京
 - ⑤ 伊川友活 転写因子Bcl11bによるT細胞系列への運命決定 (招待講演) 第114回小児血液腫瘍懇話会 2010年10月29日 東京
 - ⑥ Ikawa T. An essential checkpoint for production of the T cell lineage. Inernational Congress of Immunology. 2010年8月24日 兵庫
 - ⑦ 伊川友活 T細胞系列への決定は転写因子 Bcl11b によって制御されている Kyoto T Cell Conference 2010年6月4日 京都
 - ⑧ Ikawa T. An essential developmental checkpoint for early T cell development CSHL meeting 2010年4月22日 ニューヨーク
 - ⑨ 伊川友活 Eタンパク質機能阻害による造血幹・前駆細胞の自己複製能の誘導 日本免疫学会総会・学術集会 2009年12月2日 大阪
 - ⑩ Ikawa T. Expansion of hematopoietic stem/progenitor cells by suppressing E-protein activities Transcriptional Mechanisms of Early Lymphocyte Development Symposium. 2009年11月5日 サンディエゴ
 - ⑪ Ikawa T. Induction of T cell development by the immobilized Notch ligand in the absence of stromal cells. Kyoto T cell Conference 2009年6月2日 京都

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 造血幹/前駆細胞の特性を有する B 前駆細胞の製造方法

発明者: 河本宏、伊川友活、桂義元

権利者: 桂義元

種類: 特許

番号: 特願 2008-061542

出願年月日: 平成 20 年 3 月 1 1 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊川 友活 (IKAWA TOMOKATSU)

独立行政法人理化学研究所・免疫発生研究チーム・研究員

研究者番号: 60450392