

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：84420
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790123
 研究課題名（和文） 細胞内アダプター蛋白質 Lnk の制御による多能性幹細胞からの造血幹細胞誘導
 研究課題名（英文） Induction of hematopoietic stem/progenitor cells from mouse pluripotent stem cells by inhibition of an adaptor protein, Lnk.
 研究代表者
 田代 克久（KATSUHISA TASHIRO）
 独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部幹細胞制御プロジェクト・研究員
 研究者番号：30580138

研究成果の概要（和文）：

本研究では、造血幹細胞の増殖・機能を負に制御しているアダプター蛋白質 Lnk の機能を阻害することによりマウス ES/iPS 細胞から効率的な血液細胞の産生、そして造血幹細胞の作製を試みた。その結果、Lnk の阻害により、①中胚葉細胞への分化効率が向上するとともに、②造血系サイトカインへの応答能が充進しており、これらの作用により効率的に血液細胞が産生されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The adaptor protein Lnk is shown to negatively regulate HSPC function and HSPCs derived from Lnk-deficient mice show enhanced self-renewal and repopulation capacity. In this study, we attempted to generate hematopoietic cells including HSPCs from mouse embryonic stem (ES) cells and induced pluripotent stem (iPS) cells by inhibition of Lnk function using a dominant-negative mutant of Lnk (DN-Lnk) gene. We showed that Lnk inhibition in mouse ES cells and iPS cells resulted in more efficient generation of mesodermal cells and hematopoietic cells than control cells. Lnk inhibition by the transduction of DN-Lnk gene augmented the thrombopoietin-induced phosphorylation of Jak2, Erk1/2, and Akt, indicating the enhanced sensitivity to TPO. Thus, our data clearly showed that inhibition of Lnk in ES cells and iPS cells could lead to efficient generation and expansion of immature hematopoietic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ES 細胞・iPS 細胞・血液細胞・再生医学

1. 研究開始当初の背景

自己複製能と多分化能を有している ES/iPS 細胞を再生医療や創薬研究へ応用するには、これら多能性幹細胞から目的細胞への効率の良い分化誘導法の開発が必須である。目的細胞への分化誘導法として、これまでは主にサイトカインなどの蛋白質を作用させる手法が用いられてきたが、その分化効率は十分ではない場合が多い。我々はこれま

では、細胞分化を担う遺伝子を幹細胞へ導入することにより、効率的な分化誘導が可能ではないかと考え、研究を実施してきた。そして、アデノウイルスベクターを用いてマウス ES/iPS 細胞やマウス骨髄由来間葉系幹細胞へ分化関連遺伝子を導入することにより、従来の液性因子のみを用いる誘導法と比較し、骨芽細胞や脂肪細胞への分化効率を劇的に向上させることに成功してきた。これらの

結果から、これまでは ES/iPS 細胞からの分化誘導が困難であった細胞種においても、遺伝子導入技術を駆使することにより高効率な分化誘導が可能になるものと考えた。

2. 研究の目的

造血幹細胞移植は白血病・骨髄腫・リンパ腫等の造血腫瘍や骨大理石病等の造血障害の治療法として施術されているものの、絶対的なドナー不足という問題を抱えていることは周知の事実である。また、最近新たな細胞ソースとして注目されている臍帯血においても、移植に必要な造血幹細胞数が得られないケースがある。そこで、造血幹細胞自体を試験管内で増幅させる試みも行われてきたが、未だ成功に至っていない。造血幹細胞移植における「ドナー不足」と「細胞数の不足」という問題を解決するため、本研究では、遺伝子導入技術を駆使して ES/iPS 細胞から効率良く造血幹細胞を作製する技術開発を目的とした。

Lnk は造血幹細胞の増殖や骨髄再構築能を負に制御している細胞内アダプター蛋白質である。Lnk 欠損マウスの造血幹細胞では、増殖や機能の亢進がみとめられることから、ES/iPS 細胞からの造血幹細胞誘導に使用する遺伝子として、Lnk の機能を阻害するドミナントネガティブ変異体 (DN-Lnk) 遺伝子が有望であると考え、研究を進めることとした。

3. 研究の方法

①Lnk の発現解析

未分化 ES 細胞 (BRC6)、iPS 細胞 (38C2) およびそれらから作製した胚様体 (EB) から RNA を抽出し、Lnk の発現を解析した。

②DN-Lnk 安定発現株の作製と中胚葉分化

DN-Lnk 遺伝子を発現するプラスミドをマウス ES/iPS 細胞へ導入し、安定発現株を得た。樹立した細胞株については未分化能と多分化能を評価した。その後、胚様体 (EB) 作製法により、中胚葉細胞への分化誘導を行った。中胚葉細胞への分化効率は Flk1 陽性細胞の割合を解析することにより、評価した。また、併せて造血系転写因子の発現を RT-PCR 法により解析した。

③血液細胞への分化誘導

DN-Lnk 発現株と Neo 株 (コントロール) 由来 EB 細胞、または Flk1 発現 (+) 細胞を OP9 細胞上で SCF、Flt3-ligand、TPO、IL-3、IL-6 を含む培地で培養することにより血液細胞を産生した。得られた血液細胞数を計測して比較するとともに、コロニーアッセイやフローサイトメーターを用いた表面抗原の解析を行い、血液細胞の産生効率を検討した。

また、得られた血液細胞のサイトカインに対する応答能をウェスタンブロッティング法にて解析した。

4. 研究成果

まず、各種細胞の Lnk の発現を解析した結果、未分化 ES/iPS 細胞、ならびに ES/iPS 細胞由来 EB おいて Lnk の発現が観察された。特に、血液細胞への分化能を有する Flk1+細胞において発現が高いことが明らかとなり、血液細胞分化に関与していることが示唆された。

そこで Lnk の機能を阻害するため、DN-Lnk 発現 ES/iPS 細胞を樹立した。なお、樹立した細胞株は未分化能・多分化能を保持していた。得られた細胞株を用いて血液細胞を誘導するため、EB を作製した。興味深いことに、培養 7 日目の EB において、DN-Lnk 発現株は Flk1+細胞の割合が増加していることを見出した。さらに、DN-Lnk 発現株は SCL/Tal-1、Runx1、GATA-2 等の造血系転写因子の発現が上昇していたことから、Lnk の阻害により中胚葉分化が促進されていることが示された。

次に、EB 細胞、または単離した Flk1+細胞を OP9 細胞へ播種し、造血系サイトカイン存在下で培養を行った。その結果、DN-Lnk 発現株由来細胞は、OP9 細胞上で効率良く増幅することが明らかとなった。さらに、DN-Lnk 株由来血液細胞にはコロニー形成細胞が多数含まれており、未熟な血液細胞由来のコロニーである CFU-GEMM の数はコントロールと比較し、有意に増加していた。また、CD34 や CD41 を発現する細胞も増加していたことから、DN-Lnk 遺伝子の導入による Lnk の阻害により、未熟な血液細胞、すなわち、血液前駆細胞が生成され、増幅していることが示された。また、DN-Lnk 株由来血液細胞は、TPO 添加時にリン酸化 Jak2、Erk1/2、Akt が増加していることも確認され、サイトカイン応答能が亢進していることも明らかとなった。

以上の結果から、Lnk の阻害により、マウス ES/iPS 細胞から血液細胞への分化効率が上昇することが明らかとなった。この分化効率の上昇には、中胚葉細胞への分化促進と造血系サイトカインへの応答能亢進が関与していることも実証した。今後、得られた血液細胞中に造血幹細胞が含まれているかどうか検討を行う予定である。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Yamaguchi T., Tashiro K., Tanaka S.,

Katayama S., Ishida W., Fukuda K., Fukushima A., Araki R., Abe M., Mizuguchi H., Kawabata K.; Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells, *Stem Cells Dev.*, 2013, 22(5), 726-734.

2. Tashiro K.*, Omori M.*, Kawabata K., Hirata N., Yamaguchi T., Sakurai F., Takaki S., Mizuguchi H.; Inhibition of Lnk in mouse induced pluripotent stem cells promotes hematopoietic cell generation., *Stem Cells Dev.*, 2012, 21(18), 3381-3390. (*equally contributed)

3. Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.; The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using Type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets., *Biomaterials*, 2012 Jun;33(18):4526-4534

4. Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.; Efficient Generation of Functional Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells by HNF4a Transduction. *Mol. Ther.*, 2012 Jan;20(1):127-137

5. Tashiro K., Kawabata K., Omori M., Yamaguchi T., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa T., Mizuguchi H.; Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction., *Stem Cell Res.*, 2012, 8(2), 300-311.

6. Tashiro K.; Optimization of adenovirus vectors for transduction in embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells., *Yakugaku Zasshi.*, 2011, 131(9), 1333-1338.

[学会発表] (計6件)

1. 田代 克久、大森 美幸、川端 健二、平田 信恵、山口 朋子、櫻井 文教、高木 智、水口 裕之、アダプター蛋白質 Lnk の抑制はマウス ES/iPS 細胞から血液前駆細胞への分化を促進する、日本薬学会第133年会、横浜、2013年3月27-30日

2. 山口 朋子、田代 克久、田中 智之、水口 裕之、川端 健二、マウス iPS 細胞から

成熟したマスト細胞の分化誘導法の開発、日本薬学会第133年会、横浜、2013年3月27-30日

3. 山口 朋子、田代 克久、田中 智之、水口 裕之、川端 健二、マスト細胞の成熟化に関与する新規液性因子の同定、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11-14日

4. 長基 康人、田代 克久、高山 和雄、大橋 一夫、岡野 光夫、櫻井 文教、立花 雅史、古江一楠田 美保、川端 健二、水口 裕之、ES/iPS 細胞由来肝細胞の Swiss 3T3 細胞との積層3次元共培養下における成熟化・促進機構の解析、第19回大会肝細胞研究会、札幌、2012年6月29-30日

5. Katsuhisa Tashiro, Tomoko Yamaguchi, Kenji Kawabata, Satoshi Takaki, Hiroyuki Mizuguchi, Enhanced hematopoietic differentiation from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by inhibition of an adaptor protein, Lnk., 第40回日本免疫学会学術集会、千葉、2011年11月27日-29日

6. 田代 克久、川端 健二、櫻井 文教、水口 裕之、幹細胞への高効率遺伝子導入技術を利用した分化誘導法の開発、第61回日本薬学会近畿支部総会・大会、神戸、2011年10月22日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 克久 (TASHIRO KATSUHISA)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部幹細胞制御プロジェクト・研究員

研究者番号：30580138

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

川端 健二 (KAWABATA KENJI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部幹細胞制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

水口 裕之 (MIZUGUCHI HIROYUKI)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

櫻井 文教 (SAKURAI FUMINORI)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

山口 朋子 (YAMAGUCHI TOMOKO)
独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究
部幹細胞制御プロジェクト・プロジェクト研
究員

大森 美幸 (OMORI MIYUKI)
大阪大学・大学院薬学研究科・大学院生