

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249057

研究課題名(和文)ミエロイド細胞の生成経路の解明

研究課題名(英文)Clarification of physiological developmental pathway of myeloid lineage cells

研究代表者

河本 宏 (Kawamoto, Hiroshi)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：00343228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、フェイトマッピングの手法を用いてミエロイド系列の細胞の生理的な分化経路を解明することを主目的とした。ミエロ-リンフォイド前駆細胞(Flt3陽性)をマークしようとしたFlt3-Creでは、全ての系列がマークされてしまい、Flt3-ERCreを用いる系では、マークされる率が低く、明確な結果はえられなかった。従って、当初の計画については期間内に達成できなかった。一方、関連する研究として金沢大学と共同で行ったヒト造血細胞のクローンを追跡する研究では、「個々の造血幹細胞は限られた系列の細胞しかつくらない」という重大な知見が得られた(Stem Cells, 2013)。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to clarify physiological developmental pathway of myeloid lineage cells by using “fate mapping” method. To this aim, we genetically marked myelo-lymphoid (Flt3 positive) progenitors by using Flt3-Cre mice. However, in this setting, all hematopoietic cells were marked. We also used inducible system (Flt3-ERCre mice), but in this setting, marking ratio was too low to get conclusive results. Therefore we have to say that we failed to achieve the original plan during the period. On the other hand, in another line of study related to this subject, we chased the fate of hematopoietic clone in human hematopoiesis. The results provided very important findings that individual hematopoietic stem cells produce only limited lineage cells (Stem cells, 2013). To explain this phenomenon, we proposed “mosaic commitment-inducing microenvironment model”, and simulation results based on this model agreed well with clinical data.

研究分野：血液学

キーワード：系列決定 フェイトマッピング エピジェネティクス T細胞系列 B細胞系列

## 1. 研究開始当初の背景

造血における系列決定過程を解明するためには、幹細胞から単能性前駆細胞に至る分化経路地図が必須である。これまでは正確な地図がなかったため、研究が停滞していた。

従来のモデルでは造血幹細胞からの最初の分岐で T-B 共通前駆細胞 (common lymphoid progenitors: CLP) とミエロイド-エリスロイド共通前駆細胞 (common myelo-erythroid progenitors: CMEP) に分けられるとされていた (古典的モデル)。しかし、申請者らは、独自に開発したクローナル培養法 (MLP assay: multi-lineage progenitor assay) を用いて、造血における系列決定過程を明らかにしてきた (Kawamoto et al, Int Immunol, 1997; Immunity, 2000, Lu et al, J. Immunol, 2002)。得られた知見に基づいて、ミエロイド基本型モデルを提唱した (2001, Katsura and Kawamoto, Int Rev Immunol, Kawamoto et al, Immunol Reviews, 2010)。申請者らのモデルでは、最初の分岐で CMEP とミエロイド-リンフォイド共通前駆細胞 (common myelo-lymphoid progenitors: CMLP) に分岐し、さらにミエロイド-T とミエロイド-B という分化段階を経て、T 前駆細胞と B 前駆細胞が作られるとした。

同じ時期に、Weissman らによって成獣骨髄中に CLP (Kondo et al, Cell, 1997) さらに CMEP (Akashi et al, Nature, 2000) が存在するという報告がなされ、成獣では古典的モデルに従って造血が起こるとされた。しかし、申請者らは最近、成獣の造血においても、M-T 前駆細胞段階が存在すること、また胸腺の中で M-T 前駆細胞からマクロファージが作られることを示した (Wada et al, Nature, 2008)。さらに、M-T 前駆細胞から T 前駆細胞へ至るステップが重要な分化のチェックポイントであることも示した (Ikawa et al, Science)。これらの知見は古典的モデルでは説明できないものであった。

われわれは胎仔肝臓中に CMLP が存在することを示したが (Lu et al, J. Immunol, 2002) 引き続いて骨髄中の CMLP の存在が報告され (Adolfsson et al, Cell, 2005) また最近ヒトの造血においても CMLP が存在することが示された (Nature Immunol, 2010)。すなわち、分化能限定過程を表す図 (分化能マップ) としてはミエロイド基本型モデルで提唱したことはほぼ正しいと考えられるようになった。

ただし、まだ大きな問題が残っている。それは、ミエロイド系細胞は主にどの経路で作られるかということである。すなわち、CMEP 経由か、CMLP 経由か、あるいは幹細胞から直接作られるのかという問題である。

CMLP をマウス生体に移入すると、顆粒球、単球を含むミエロイド系細胞を作成することは報告されている (Adolfsson et al, Cell, 2005)。しかし、生理的な条件で CMLP がミエロイド系細胞を作成するかどうかは不明であった。それを知るためには、特定のステージに遺伝子にマークをつける手法、いわゆるジェネティックなフェイトマッピングを行う必要がある。骨髄中の CMLP は Flt3 分子の発現で特徴づけられるが、最近 Jacobsen らにより Flt3 の発現様式を用いたのマーキングが試みられた。すなわち Flt3-Cre マウスを用いて Flt3 発現細胞をマークする実験が行われた。しかし、この研究では全ての血液細胞がマークされており (Blood, 2011) ミエロイド細胞の由来を特定するに至らなかった。

このように造血における極めて重大な課題が、未解決のまま残っていたのである。

## 2. 研究の目的

本研究は、血液細胞の主要な系列の生理的な分化経路を解明することを主目的とする。

申請者らは前駆細胞の分化能の詳細な解析から、独自の造血モデル(ミエロイド基本型モデル)を提唱し、実証してきた。このモデルは現在では「分化能マップ」として正しいと考えられているが、血液細胞の「生理的な生成経路」は依然不明のままである。本研究の戦略としては、フェイトマッピングの手法を用いる。Flt3の発現に応じてCreを発現するマウスとLox-GFPマウスを掛け合わせたマウスなどを用いて、ミエロイド系細胞の生理的な生成経路を解析する。本研究により、血液細胞の生成経路図を完成させる事が可能であると考えた。

### 3. 研究の方法

すでにFlt3-Cre::Lox-GFPマウスにおいて以下のふたつの実験を行う。(1)分化途上の各ステージの前駆細胞においてマークされる割合を測定する。(2)CMEPを単離してミエロイド系細胞をin vivoやin vitroで分化させ、それらにはマークが入らないことを検証する。また、ミエロイド細胞が起源により機能的な差異があるかどうかを調べるために、(3)マークが入ったミエロイド細胞と入っていないミエロイド細胞で、生体での分布や機能に差異があるかを調べる。さらに、造血幹細胞からCMLPへの分化誘導の主因子の同定を目指して、(4)マイクロアレイによる候補遺伝子の選定、前駆細胞に候補遺伝子を発現させ子を発現させIL-7R-Cre-Lox-GFPシステムによるGFP陽性細胞の出現をモニターとしたスクリーニングを行う。

### 4. 研究成果

#### 1) フェイトマッピングは不調に終わる

本研究では、まず作製したFlt3-Creで、レポーターとしてCAG-Lox-GFPあるいはRosa26-Lox-RFPを用いて、マークされた系列とマークされる率を計測中したが、全て

の系列がマークされてしまった。またFlt3-ERCre::Rosa26-lox-RFP成体マウスにタモキシフェンを投与する系を用いた実験も行ったが、この場合はマークされる率が低く、明確な結果はえられなかった。

従って、当初計画していたフェイトマッピングに関しては、計画が達成できなかったと言わざるを得ない。期間内に達成できなかった理由のひとつとして、研究室の異動(理研免疫センターから京大再生研へ)、Flt3CreおよびFlt3-ERCreのどちらの系も、別なレポーターを用いれば使える可能性があり、研究は続行する予定である。例えばいわゆるレインボーマウスといわれるレポーターマウスを用いて、複数のクローンのフェイトを追い、各系列間でのクローンの混在比を比較する実験を計画している。これにより、前駆細胞の動態が迎れると考えられる。

#### 2) ヒト造血におけるクローン追跡実験では重要な知見が得られた

一方、本研究に関連するものとして、ヒトの検体を用いて生理的なマッピングにあたる研究を、金沢大学の中尾真二との共同研究として進めた。

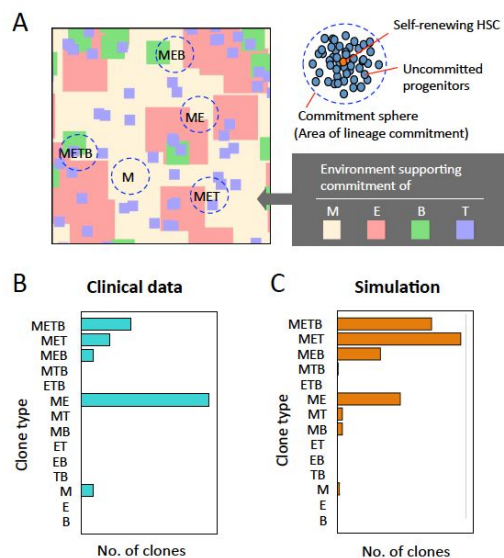
これはPIG-Aという遺伝子に変異が入って働かなくなった造血幹細胞の造血動態を、末梢血中で追跡するという研究である。成果はStem Cells誌に2013年に発表した。

造血幹細胞(HSC)は、分裂に際して一方で自己複製し他方で多能前駆細胞となることにより、造血を維持すると考えられている。また、多くのHSCは休眠中で、一部だけが造血に貢献している事も知られている。しかしながら、恒常的な造血の中で「個々のHSCは全ての系列の細胞をつくっているか」は不明であった。我々はHSCに稀に起こるPIG-A遺伝子欠損に注目した。PIG-A遺伝子欠損HSCはGPIアンカー型のタンパク質(GPI-AP)を発現できなくなるので、その子

孫細胞は FACS によって検出できる。GPI-AP 陰性細胞は健常人では稀であるが、再生不良性貧血 (AA) や骨髄異形成症候群 (MDS) では出現頻度が高い。

計 574 人の AA あるいは MDS の患者の末梢血を、6 種類の系列=[好中球 (G), 単球(M), 赤血球(E), T 細胞(T), NK 細胞(NK), B 細胞(B)]について調べたところ、250 人で GPI-AP 陰性細胞が検出された。興味深いことに、殆どの例で限られた系列にしか見られなかった。さらに、6ヶ月-18ヶ月の間隔をあけて再検査したところ、全ての症例において同じ組み合わせの系列が検出された。すなわちこれらの GPI-AP 陰性細胞は前駆細胞ではなく HSC に由来する事を意味している。系列の組み合わせは 16 タイプあり、限定例の中では G-M-E, G-E, G, G-M, G-M-E-NK, G-M-E-B などが比較的高頻度にみられた。

限られた系列だけ産生している事を、HSC の内因的な能力の差の反映とみることもできるが、我々は系列決定を誘導する微小環境のモザイク性の反映というモデルでも説明できると考えてた。これを「モザイク系列決定誘導微小環境モデル」と名付けた。このモデルに基づいてシミュレーションを行った結果は、臨床データによく合致していた (図 1)。患者で見られた現象ではあるが、AA や MDS の中でも GPI-AP 陰性細胞がみられる (すなわち免疫による HSC の攻撃が病因である) 症例では骨髄環境自体は本質的に正常と考えられ、また GPI-AP 陰性 HSC も造血能自体は正常と考えられている。さらに、「限られた系列の造血」は AA の軽症例でも重症例でも同じように見られ、また 2 例だけはあるが健常人でもみられた。従って、正常造血の動態も同様であろうと考えている。



**図 1 モザイク系列決定誘導微小環境モデルに基づいたシミュレーションにより、実際のデータに良く似たクローンを再現することができた**

**A.** 骨髄の造血環境は系列決定誘導能力において不均一であるとするモデル。1 個の造血幹細胞からつくられる系列決定前の前駆細胞が分散するエリアを「系列決定スフェア」と呼ぶ。骨髄環境のうちベージュ、ピンク、緑、青に塗り分けられたエリアはそれぞれミエロイド (M)、エリスロイド (E)、B、T 系列への決定を誘導する環境とする。もしも造血幹細胞がたまたま周囲に M 環境と E 環境しかないような場所に存在してそこで造血を行うとすると、この幹細胞はミエロイド細胞とエリスロイド細胞しかつけれないことになる。

**B.** 実際の臨床データ。GPI アンカー蛋白陰性の細胞がみられた系列の組み合わせをクローンタイプとして、100 人分について、それぞれのタイプの頻度を表している。

**C.** A に示したモザイク環境パターンに基づいてシミュレーションを行った結果を示す。計 100 個の造血幹細胞を図の中にランダムに固定し、個々の造血幹細胞の造血動態をシミュレーションする。造血幹細胞から生じた娘

細胞はランダムに動きまわりながら運命決定前の前駆細胞として数回分裂し、その後環境に応じて系列決定される。系列決定後も数回の増殖を行い、その後分化成熟する。臨床例と同じタイプのクローンが出現している。

#### 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9件)  
計画研究(河本)

- 1) Arner E et al ( Kawamoto H は 109 人の著者のうち 38 番目 ) □ Enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells. □ Science. 329: 1010-1014, 2015.
- 2) Stinke FC, Yu S, Zhou X, Yang W, Zhou B, Kawamoto H, Zhu J, Tan K, Xue HH. TCF-1 and LEF-1 act upstream of Th-POK to promote the CD4(+) T cell fate and interact with Runx3 to silence Cd4 in CD8(+) T cells. Nat. Immunol. 15: 646-656. 2014.
- 3) Hoshii T1, Kasada A, Hatakeyama T, Ohtani M, Tadokoro Y, Naka K, Ikenoue T, Ikawa T, Kawamoto H, Fehling HJ, Araki K, Yamamura K, Matsuda S, Hirao A. Loss of mTOR complex 1 induces developmental blockage in early T-lymphopoiesis and eradicates T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. Proc Natl Acad Sci USA. 11;111(10):3805-3810. 2014.
- 4) Okuyama K, Ikawa T, Gentner B, Hozumi K, Harnprasopwat R, Lu J, Yamashita R, Ha D, Toyoshima T, Chanda B, Kawamata T, Yokoyama K, Wang S, Ando K, Lodish HF, Tojo A, Kawamoto H Kotani A. MicroRNA-126-mediated control of cell fate in B-cell myeloid progenitors as a potential alternative to transcriptional factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110: 13410-13415. 2013.
- 5) Katagiri T\*, Kawamoto H \*, Nakakuki T\*, Ishiyama K, , Okada-Hatakeyama Ohtake S, Seiki S, Hosokawa K and Shinji Nakao. (\*equal contribution) Individual hematopoietic stem cells in human bone marrow of patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome stably give rise to limited cell lineages. Stem Cells. 31: 536-546. 2013.
- 6) Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, Ikawa T, Shimizu K, Fujii S-I, Koseki H, Kawamoto H \*. Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPS cells derived

from mature CD8+ T cells. Cell Stem Cell. 12: 31-36. 2013.

7) Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. Process for immune defect and chromosomal translocation during early thymocyte development lacking ATM. Blood. 120: 789-799. 2012.

8) Seo W, Ikawa T, Kawamoto H, Taniuchi I. Runx1-Cbfb facilitates early B lymphocyte development by regulating expression of Ebf1. J Exp Med. 209: 1255-1262. 2012.

9) Watarai H, Sekine-Kondo E, Shigeura T, Motomura Y, Yasuda T, Satoh R, Yoshida H, Kubo M, Kawamoto H, Koseki H, Taniguchi M. Development and function of invariant natural killer T cells producing t(h)2- and t(h)17-cytokines. PLOS Biology. 10: e1001255, 2012.

[学会発表](計4件)

研究代表者河本 海外招待講演

1) Nikolas Symposia, May 10, 2013, Athens, Greek

"Close relationship between myeloid and lymphoid lineages"

2) Congress of European Hematology association, June 12, 2013, Stockholm, Sweden

"Regeneration of antigen specific T cells using iPS cell technology"

3) World Conference of Regenerative Medicine, Oct 23, 2013, Leipzig, Germany

"Regeneration of antigen specific T cells using iPS cell technology"

4) Annual Meeting of Chinese Medical Association, June 28, 2014, Taipei, Taiwan

"Regeneration of antigen specific T cells using iPS cell technology: a novel strategy for cancer immunotherapy"

[図書](計1件)

1) 河本宏、オーム社、マンガでわかる免疫学、2013年6月

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 1 件）

名称：**造血幹 / 前駆細胞の特性を有する細胞  
の製造方法**

発明者：河本宏、伊川友活、桂義元

権利者：理研

種類：特許

番号：WO2009113595 A1

出願年月日：2009 年 3 月 11 日

取得年月日：2014 年 10 月 29 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河本 宏 (Hiroshi Kawamoto)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：00343228