

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591381

研究課題名(和文) ヒトES細胞からの造血幹細胞誘導

研究課題名(英文) The hematopoietic stem cell induction from human embryonic stem cells

## 研究代表者

大澤 光次郎 (Osawa, Mitsujiro)

京都大学・iPS細胞研究所・特定助教

研究者番号：70546770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトES細胞より誘導される造血幹細胞の骨髄再構築能はヒト成体型造血幹細胞に比べ著しく劣るものであり、造血系再生医療に応用可能な造血幹細胞の分化誘導には至っていない。本研究では、ヒトES細胞由来の造血幹前駆細胞とヒト成体型造血幹細胞との質的相違に着目し、ヒトES細胞由来の造血幹前駆細胞の分化段階(発生学的成熟度)を詳細に追跡し、より成体型造血幹細胞に近い造血幹前駆細胞の存在を明らかにした。また、造血幹細胞の増幅・自己複製に関与する遺伝子及び白血病細胞誘導遺伝子を用いた解析では、造血幹前駆細胞の増幅を示す遺伝子はなく、上述の転写因子群の複合発現、もしくは新規な遺伝子の探索の必要性が示された。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular basis of hematopoietic differentiation from human pluripotent stem cell included human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells, we first analyzed a hematopoietic phenotype and gene expression on human ES-derived hematopoietic progenitor cells. As a result, hematopoietic progenitor cells with long-term culture showed developmental maturation of hematopoietic. We also evaluated the effects of overexpression of key molecules predicted to support the generation and maturation of HSCs. Among genes tested, we found that only SOX17 plays a critical role in priming hemogenic potential of endothelial cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

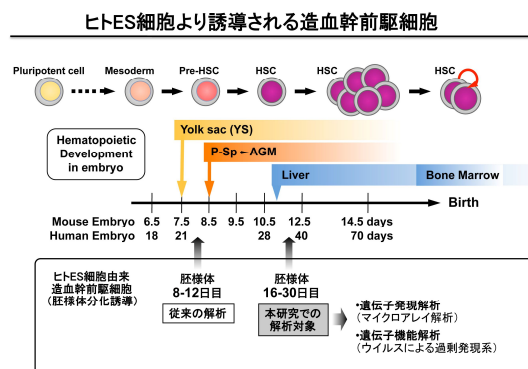
ヒト人工多能性幹細胞(ヒト iPS 細胞)の樹立成功により、ヒト胚性幹細胞(ヒト ES 細胞)に始まった再生医療への期待はより実現性の高いものとなってきた。造血系再生医療の領域においては、造血不全や白血病などの移植治療の供給源として長期骨髄再構築能を兼ね備えた造血幹細胞の分化誘導技術の確立に大きな期待が集まっているが、その現状はいまだ厳しい状況にある。これまでにヒト ES 細胞から長期骨髄再構築可能な造血幹細胞の分化誘導に関するいくつかの報告がなされているが、ヒト ES 細胞より誘導される造血幹細胞の骨髄再構築能はヒト骨髄または臍帯血由来の成体型造血幹細胞に比べ著しく劣るものであり、造血系再生医療に応用可能な造血幹細胞の分化誘導には至っていない。申請者は、これまでにマウス ES 細胞からの造血幹細胞発生、また成体型造血幹細胞の増幅において重要な役割を担っている転写因子 HoxB4 の標的遺伝子をマイクロアレイと ChIP-chip 解析を用いて同定し、HoxB4 が造血幹細胞の発生・維持に重要性な多くの遺伝子を同時に制御することを明らかにした(Oshima et al, Blood, 2011)。また、ヒト ES/iPS 細胞から胚様体法を用い造血系細胞の分化誘導について検討を行ない、アクチビンや TGFβ阻害剤(特願 2010-193827 号)が造血幹前駆細胞の誘導効率を有意に上げることを見だし、効率的かつ安定的な造血系細胞の分化誘導法を確立している。血管内皮細胞や造血幹細胞などの中胚葉系細胞の細胞表面抗原マーカーである CD34 と造血系特異的細胞表面抗原マーカーである CD45 と CD43 を用いて、造血コロニー形成数を指標に造血幹前駆細胞分画の同定を行ない、CD34<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> 細胞分画に最も高頻度にコロニー形成細胞が存在することを明らかにした。コロニー形成細胞が多く存在する分化誘導 10 日目の CD34<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> 細胞を用いたマイクロアレイによる遺伝子発現解析では、ヒト臍帯血由来 CD34<sup>+</sup> 細胞に比べ赤血球系転写因子群や血管内皮細胞関連遺伝子群(VE-Cadherin, KDR, Tie2 等) 胎児期造血幹細胞に発現が認められる AA4.1 遺伝子の高い発現が認められるが、成体型造血幹細胞に発現している CD150 や CD48 遺伝子の発現が低いことから、YS や AGM において出現する造血発生初期の細胞を多く含む細胞分画であることが推測される。また、このヒト ES 細胞より誘導された造血発生初期の造血幹前駆細胞に造血幹細胞発生(Runx1, SCL, GATA2, Gfi1/1B) や成体型造血幹細胞の増幅・自己複製( Sox17, Erg, EZh2, Hmga2, HoxB4, Bmi1 )において重要な役割を担っている遺伝子群を過剰発現させ、in vitro における機能解析を行ってきたが、Sox17 以外の遺伝子において顕著な細胞増殖やコロニー形成能の増加は認められていない。

2. 研究の目的

ヒト ES 細胞から長期骨髄再構築可能な造血幹細胞の分化誘導に関する報告がなされているが、ヒト ES 細胞より誘導される造血幹細胞の骨髄再構築能はヒト成体型造血幹細胞に比べ著しく劣るものであり、造血系再生医療に応用可能な造血幹細胞の分化誘導には至っていない。申請者はこれまでに、ヒト ES 細胞由来の造血幹前駆細胞とヒト成体型造血幹細胞との質的相違に着目し、遺伝子発現プロファイルやコロニー形成能を指標に分化誘導系の改良を行ってきた。その結果、ヒト ES 細胞を長期間分化誘導することにより、よりヒト成体型造血幹細胞に近い造血幹前駆細胞が誘導されることを見いだしている。本研究では、分化誘導後期に出現するヒト ES 細胞由来の造血幹前駆細胞の分化段階(発生学的成熟度)を詳細に追跡し、より成体型造血幹細胞に近い造血幹前駆細胞の同定を行う。そして、それらの解析より得られたヒト ES 細胞由来の造血幹前駆細胞に造血幹細胞の増幅や自己複製に関与する遺伝子群の過剰発現を行い造血幹細胞の誘導を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト ES 細胞より誘導される分化誘導後期(胚様体分化 16-30 日目)の造血幹前駆細胞の質的变化を詳細に追跡し、より成体型造血幹細胞に近い造血幹前駆細胞の同定を行う。そして、それらの解析より得られたヒト ES 細胞由来の造血幹前駆細胞に造血幹細胞の増幅や自己複製に関与する遺伝子群の発現操作を行い造血幹細胞の誘導を試みる(下図参照)。



・長期分化誘導により出現する造血幹前駆細胞の分化段階の同定と機能解析

前述のように、分化誘導後期に出現するヒト ES 細胞由来の造血幹前駆細胞の分化段階(発生学的成熟度)をマイクロアレイによる遺伝子発現解析やコロニー形成能を指標に解析を行い、より成体型造血幹細胞に近い造血幹前駆細胞の同定を行う。

・ヒト ES 細胞由来の造血幹前駆細胞とヒト成体型造血幹細胞の質的相違の解析

これまでの報告、また申請者の解析において、ヒト ES 細胞より分化誘導して得られる造血

幹前駆細胞は、成体型造血幹細胞に比べ in vitro での増幅能力、また移植実験における生着能が著しく劣ることが示されており、この質的相違を解明することは必須である。上記の研究で得られた遺伝子発現プロファイルを詳細に比較解析し、分化誘導後期に出現するヒト ES 細胞由来の造血幹前駆細胞とヒト成体型造血幹細胞の質的相違を補完する遺伝子の探索を行なう。

#### 造血幹細胞の増幅・自己複製に關与する遺伝子の発現操作による機能解析

胎仔期の造血幹細胞発生 (Runx1, SCL, GATA2, Gfi1/1B) や成体型造血幹細胞の増幅・自己複製 (Sox17, Erg, Ezh2, Hmga2) において重要な役割を担っている遺伝子群を長期分化誘導により得られた造血幹前駆細胞に発現させ、in vitro における機能解析と免疫不全マウス (NOD/SCID/Jak3null) を用いた移植実験によりヒト ES 細胞からの造血幹細胞誘導について検証を行なう。

#### 白血病細胞誘導遺伝子の発現操作による機能解析

長期培養によって誘導された造血幹前駆細胞に TEL-Lyn, MLL-AF9, Bcr-Abl 遺伝子等の白血病細胞誘導遺伝子を過剰発現させ、白血病細胞に形質転換可能かどうかの検証を行なう。これまでにヒト ES 細胞より白血病を誘導した報告はなく、我々が分化誘導している造血幹前駆細胞が、ヒト造血幹細胞と同様に上記の白血病遺伝子群に対する反応性を有するか否かは、ヒト ES 細胞より分化誘導される造血幹前駆細胞の発生学的分化段階を推定する上で非常に重要である。

## 4. 研究成果

### 長期分化誘導により出現する造血幹前駆細胞の分化段階の同定と機能解析:

培養期間に伴い造血幹前駆細胞数 (CD34+CD43+細胞分画) の減少が認められたが、造血コロニー形成率は反比例して顕著に増加することが確認された (培養 10 日目で 0.3%, 培養 17 日目で 1.3%, 培養 24 日目で 1.2%, 培養 31 日目で約 3.0% の造血コロニー形成率を確認)。また、造血発生の指標の 1 つであるグロビン遺伝子群の解析では、培養期間に伴い胎児型グロビン遺伝子 (□-GLOBIN) の低下、及び成人型グロビン遺伝子 (□-GLOBIN) の増加が認められた。このグロビン遺伝子の発現変移は、長期培養において単に造血幹前駆細胞が生存し得たというだけでなく、造血幹前駆細胞として質的な成熟を伴っているということが示された。

### ヒト ES 細胞由来の造血幹前駆細胞とヒト成体型造血幹細胞の質的相違の解析:

造血幹前駆細胞の先駆細胞である造血能と血管内皮分化能を有する造血内皮細胞 (hemogenic endothelium) において発現が見られる血管内皮系遺伝子群 (Endogline, CD31, PROCRA/EPOR, TIE1 等) や造血幹前駆細胞

と血管内皮系細胞に共通に発現する遺伝子群 (SCL, GATA2, LHX2 等) の発現維持、また上記の細胞の発生学的上流の位置する中胚葉系細胞に発現している Brachyury 遺伝子が依然として高発現していることから、造血幹前駆細胞は成熟過程を進んでいるものの生体内の造血発生のような正常な成熟は確認できなかった。また、今後、この造血幹前駆細胞の正常な成熟を促進するようなサイトカイン、発生学的制御因子 (Wnt, TGFβ, Notch signaling)、プロスタグランジン (PGE2) や活性酸素 (ROS: Reactive Oxygen Species) の抑制等の外的因子の検討、また転写因子群の検討が必要と考えられる。

### 造血幹細胞の増幅・自己複製に關与する遺伝子の発現操作による機能解析

これまでの解析において顕著な細胞増殖や造血コロニー形成能増加が認められた SOX17 遺伝子の発現誘導系 (Nakjima Y, Osawa M, et al. Blood, 2013) を用いて、造血幹細胞発生において重要な役割を担っていることが示されている 9 つの転写因子群 (RUNX1, SCL, GATA2, GFI1, HMGA2, BMI1, ERG, EGR2, HOXB4) との共発現による機能解析を行った。実験は、SOX17 遺伝子発現により誘導された造血内皮細胞において上記候補遺伝子と共発現実験、また候補遺伝子の共発現後に SOX17 遺伝子の発現抑制を行い、造血細胞分化を促す実験系において検証を行った。その結果、SOX17 遺伝子単独発現の場合よりも細胞増殖や造血コロニー形成能増加が認められる表現型を示す遺伝子は認められなかった。これらの結果は、上述の転写因子群以外の新規な遺伝子の探索の必要性、もしくは上述の転写因子群の複合発現の可能性を示すものであり、研究計画の解析 (ヒト ES 細胞由来の造血幹前駆細胞とヒト成体型造血幹細胞の質的相違) で得られた遺伝子群より候補遺伝子を抽出し検討を進める必要があるものと考えられる。

### 白血病細胞誘導遺伝子の発現操作による機能解析

ヒト ES 細胞由来の造血幹前駆細胞への白血病細胞誘導遺伝子 (TEL-Lyn, MLL-AF9, MLL-ENL, Bcr-Abl) の単独発現、また研究計画と同様に SOX17 遺伝子発現により誘導された造血内皮細胞、また SOX17 遺伝子の発現抑制により誘導された造血幹前駆細胞において上述の白血病細胞誘導遺伝子群を強制発現させ検証を行った。その結果、上述の白血病細胞誘導遺伝子群の単独発現、また SOX17 遺伝子発現により誘導される造血内皮細胞や造血幹前駆細胞において、顕著な細胞増殖や造血コロニー形成能増加が認められる表現型を示す遺伝子は認められなかった。ヒト ES 細胞由来の造血幹前駆細胞においては十分な成熟が行われていないため (上記の研究結果①~③より)、白血病細胞誘導遺伝子がヒト成体型造血幹細胞で認められるような表現系が得られないことが予測される。

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5件)

Nakajima Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Miyagi M, Endoh M, Endo A. T, Takayama T, Eto K, Toyoda T, Koseki H, Nakauchi H, and Iwama A.  
Critical role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood*, 査読有, vol. 121, 2013, 447-458,  
DOI: 10.1182/blood-2012-05-431403

Nakajima Y, Osawa M and Iwama A.  
Manipulation of hematopoietic stem cell for regenerative medicine.  
*Anat Rec* (Hoboken), 査読有, vol. 297 (1), 2014, 111-120,  
DOI: 10.1182/ar.22804

Nobuhisa I, Osawa M, Uemura M, Kishikawa Y, Anani M, Harada K, Takagi H, Saito K, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Iwama A and Taga T.  
Sox17-mediated maintenance of fetal intra-aortic hematopoietic cell clusters.  
*Mol Cell Biol*, 査読有, vol. 34 (11), 2014, 1976-1990,  
DOI: 10.1128/MCB.01485-13.

Anani M, Nobuhisa I, Osawa M, Iwama A, Harada K, Saito K and Taga T.  
Sox17 as a candidate regulator of myeloid restricted differentiation potential.  
*Dev Growth Differ*, 査読有, vol.56 (6), 2014, 469-479,  
DOI: 10.1111/dgd.12147

Wang C, Nakamura S, Oshima M, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Kusunoki Y, Kyoizumi S, Imai K, Nakachi K and Iwama A.  
Compromised hematopoiesis and increased DNA damage following non-lethal ionizing radiation of a human hematopoietic system reconstituted in immunodeficient mice. *Int J Radiat Biol*, 査読有, vol.89 (2), 2013, 132-137,  
DOI: 10.3109/09553002.2013.734947

[学会発表](計12件)

Osawa M, Nakajima Y, Oshima M, Takagi H, Endoh M, Endo T and Iwama A. The Critical role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. The 10th Stem Cell Research Symposium, 2012.5.31-6.2, Awaji, Japan

Osawa M, Takagi H, Nakajima Y, Endoh M, Endo A.T and Iwama A. Inhibition of TGF-beta signaling in the early mesoderm stage promotes the development of hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells. The 10th International Society of Stem Cell Research (ISSCR), 2012.6.13-6.16, Yokohama, Japan

Nakajima Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H and Iwama A. The Critical role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. The 10th International Society of Stem Cell Research (ISSCR), 2012.6.13-6.16, Yokohama, Japan

Nakajima Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Endoh M, Endo A.T, Toyoda T, Koseki H and Iwama A. The Critical role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (JH, 日本血液学会総会), 2012.10.19-10.21, Kyoto, Japan

Osawa M, Nakajima Y, Oshima M, Takagi H and Iwama A. The Critical role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. Keystone Symposium:Hematopoiesis, 2013.1.14-1.19, Steamboat Springs, USA

大澤光次郎: ヒト胚性幹細胞からの造血発生における SOX17 の役割. 東京医科歯科大学駿河台国際シンポジウム (12th Surugadai International Symposium), 招待講演, 2013.10.25, 東京

Nobuhisa I, Osawa M, Uemura M, Kishikawa Y, Anani M, Harada K, Takagi H, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Iwama A and Taga T. Sox17 protein-mediated maintenance of cells with stem cell phenotype in the hematopoietic cell clusters in the fetal AGM region. The 11th Stem Cell Research Symposium. Tokyo, May 17-18, 2013

Nobuhisa I, Osawa M, Uemura M, Kishikawa Y, Anani M, Harada K, Takagi H, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Iwama A and Taga T. Introduction of Sox17 in the aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic cells leads to increased common myeloid progenitors in transplanted mice. The 36th Annual

Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Kobe, December 3-6, 2013.

Nobuhisa I, Osawa M, Harada K, Anani M, Sito K, Takagi H, Iwama A, Taga T. Analysis of recipients transplanted with the bone marrow cells of Sox17-transduced cells-transplanted mice 2013 Annual Meeting of the Japan Society for Immunology. Chiba, December 11-13, 2013

Anani M, Nobuhisa I, Osawa M, Iwama A, Harada K, Saito K, and Taga T. Sox17-transduction imparts fetal hematopoietic cells with the myeloid-restricted differentiation potential. The 12th Stem Cell Research Symposium. Fukuoka, May 30, 2014

Nobuhisa I, Anani M, Osawa M, Iwama A, Harada K, Saito K, and Taga T. Sustained expression of Sox17 in the aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic cells maintain the self-renewal capacity and the hematopoietic ability to produce myeloid progenitors. 第 37 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2014 年 11 月 26 日

Nobuhisa I, Anani M, Osawa M, Iwama A, Harada K, Saito K, and Taga T. Sustained expression of Sox17 in AGM-derived hematopoietic stem/progenitor cells maintain the self-renewal capacity and the hematopoietic ability to produce myeloid progenitors. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 京都国際会館, 2014 年 12 月 11 日

〔図書〕(計 1 件)

鈴木直也、大澤光次郎  
ES/iPS 細胞 実験スタンダード、2014、10

〔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 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :

種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 光次郎 (OSAWA, Mitsujiro)  
京都大学・iPS 細胞研究所・特定助教  
研究者番号 : 70546770

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :