

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670470

研究課題名(和文) ETV2を中心とした細胞直接リプログラミングによる血液細胞の作成

研究課題名(英文) Direct reprogramming of human fibroblasts into hematopoietic cells mainly using ETV2

研究代表者

森田 林平 (Morita, Rimpei)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：00362541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ETV2は胎児期の造血、血管系の発生に必須の因子である。申請者らは既に分化した体性細胞である成人皮膚線維芽細胞をETV2導入により血管内皮細胞に直接転換できることを報告した。

面白いことにETV2発現線維芽細胞は造血分化に必須の転写因子RUNX1, TAL1, GATA2も発現していることを見出した。そこでETV2と共に20種類のhemogenic endothelium特異的転写因子を導入し、SCF, FLT3L, TPO, IL-3, IL-6の存在下でOP9細胞と共培養すると、CD45及びc-Kit陽性の血球様細胞が出現した。本成果より皮膚から血液細胞を作製できる可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：An ETS family transcription factor ETV2 is essential for hemato-endothelial development in embryo. We have reported that human adult skin fibroblasts directly convert into functional endothelial cells by transducing ETV2.

Interestingly we found that ETV2-transduced human adult skin fibroblasts also expressed RUNX1, TAL1, and GATA2, which were transcription factors essential for hematopoiesis. Thus to generate hematopoietic cells from fibroblasts, we transduced not only ETV2 but also 20 kinds of transcription factors essential for hematopoiesis into human adult skin fibroblasts, then co-cultured them with OP9 stroma cells in the presence of SCF, FLT3L, TPO, IL-3, and IL-6 for four weeks. Consequently we detected CD45+c-Kit+ hematopoietic-like cells by FACS analysis. Our results may leads to generation of functional hematopoietic cells from individual skin in the future.

研究分野：免疫学

キーワード：造血幹細胞 転写因子 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

造血系と血管系は共に hemogenic endothelium という胎生期にのみ存在する特殊な血管内皮細胞から発生する。そのため造血系の分化に重要な転写因子の多くは血管系と共通していることが、マウスやゼブラフィッシュを用いた研究から明らかになりつつある。これらの転写因子の多くは null により胎生致死となり、複数の転写因子の機能的相互作用を個体レベルで解析することは困難である。一方、近年マウス胎児線維芽細胞に 4 種類の転写因子 Gata2, Gfi1b, cFos, Etv6 を導入し、「直接リプログラミング法」により hemogenic endothelium から血球及び血管内皮細胞に分化する過程を再現できることが報告された (Pereira et al. Cell Stem Cell. 2013)。この流れよりヒト血液細胞分化に関する研究は火急の重要課題となりつつある。

申請者は「細胞直接リプログラミング法」により ETV2 単独でヒト成人皮膚線維芽細胞を機能的な血管内皮細胞に転換することを報告した (PNAS. 2015)。ETV2 は ETS ファミリー転写因子であり、胎児期の造血血管系の発生に必須の因子であることはマウスやゼブラフィッシュの研究により明らかにされている。しかし申請者は既に分化した体性細胞を ETV2 により血管内皮細胞に転換させることにより、ETV2 は強力な血管内皮細胞誘導因子であることを示した。一方面白いことに、ETV2 発現線維芽細胞は造血分化に必須の転写因子 RUNX1, TAL1, GATA2 を発現することを見出した。さらに 2 2 種類の転写因子を導入し、SCF, FLT3L, TPO, IL-3, IL-6 の存在下でマウス骨髄ストローマ細胞株 OP9 細胞と共培養すると、c-Kit 陽性の血球細胞が出現する。これは ETV2 を中心としてによりヒト線維芽細胞を hemogenic endothelium に直接リプログラミング出来る可能性を示している。

2. 研究の目的

本研究では ETV2 以外に表 1 の 2 2 種類の候補転写因子をヒト成人線維芽細胞に導入し、『細胞直接リプログラミング』により hemogenic endothelium 更には血球への分化誘導を試み、ヒト血球の分化に重要な転写因子を同定する。

3. 研究の方法

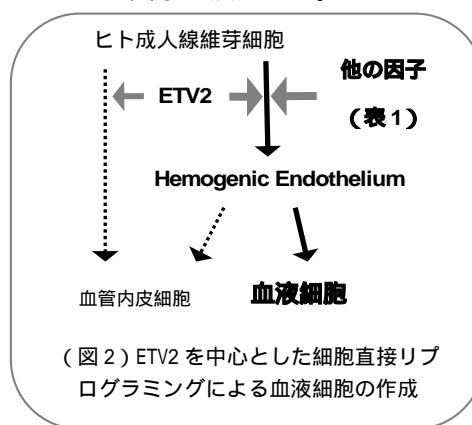
ヒト線維芽細胞に ETV2 をレンチウイルスベクターにて導入し、4 日後に Venus 陽性細胞をソートする。更に表 1 の 2 2 種類の因子の混合レンチウイルスベクターを感染させ、様々なサイトカイン存在下で OP9 細胞と約 1 カ月共培養する。その後 CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>細胞をソートし、定量 PCR や FACS により hemogenic endothelium としての性状を解析する。作成された hemogenic endothelium はサイトカイン存在下で OP9 細胞

|        |       |
|--------|-------|
| BMI1   | LHX2  |
| ERG    | LMO2  |
| FHL1   | MEIS1 |
| FOSB   | MEST  |
| GABPB1 | MYB   |
| HHEX   | NRIP1 |
| HLF    | Oct4A |
| HOPX   | SATB1 |
| HOXA5  | SET   |
| HOXA9  | SOX4  |
| HOXB4  | TCF4  |

(表 1)他の候補転写因

胞と共培養し、加えて NOD SCID マウスに移植し、in vitro と in vivo での血球分化能を評価する。得られた血液細胞からゲノム DNA を回収し PCR により integrate された因子を同定する。検出された因子で再度 hemogenic endothelium と血液細胞への直接リプログラミングを行うこ

とにより因子を決定する。



4. 研究成果

レンチウイルスを用いて ETV2 並びに表 1 の候補転写因子遺伝子を成人皮膚線維芽細胞に導入し OP9 細胞と共培養した。その際培養液には SCF, FLT3L, TPO, IL-3, IL-6, IL-11, BMP4, VEGF を添加した。一ヵ月後には球状の血球系とみられる細胞コロニーが幾つか出現し、FACS 解析にて CD45<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>細胞が検出されたため、この細胞集団をセルソーターにて分取した。ゲノム DNA を抽出し、PCR にてゲノム DNA に組み込まれた因子を検出したところ 14 種類の転写因子が検出された。

現在、これらの 14 因子を成人皮膚線維芽細胞に導入し、血球様細胞の誘導を行っている。

一方、上記の遺伝子導入線維芽細胞を IL-7 存在下で OP9-DL1 細胞と共培養したところ、CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>T 様細胞も検出された。これらの所見より、本研究の候補遺伝子は T 細胞への分化にも関与していることが考察される。

これまで直接リプログラミング法によってマウス線維芽細胞から血球の分化誘導の報告はあるが、ヒトに関しては未だ報告はない。本研究成果は、ヒトの血球分化 (および T 細胞) に重要な因子を決定する上で重要と考えられる。今後は更に因子を絞り込み、必

要かつ十分な因子を決定する。その際、免疫不全マウスへの移植を行い、in vivoでの血球分化の観察、更には、細菌感染実験等により血球機能の評価も行う。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Morita, R., Suzuki, M. Kasahara, H. Shimizu, N. Shichita, T. Sekiya, T. Kimura, A. Sasaki, K. Yasukawa, H. Yoshimura, A. “ETS transcription factor ETV2 directly converts human fibroblasts into functional endothelial cells.” Proc Natl Acad Sci U S A. 査読あり  
112. 2015. 160-165.  
10.1073/pnas.1413234112
2. Sekiya, T. Kondo, T. Shichita, T. Morita, R. Ichinose, H. Yoshimura, A. “Suppression of Th2 and Tfh immune reactions by Nr4a receptors in mature T reg cells” J Exp Med. 査読あり  
212. 2015. 1623-1640.  
10.1084/jem.20142088
3. Kashiwagi, I. Morita, R. Shichita, T. Komai, K. Saeki, K. Matsumoto, M. Takeda, K. Nomura, M. Hayashi, A. Kanai, T. Yoshimura, A. “Smad2 and Smad3 Inversely Regulate TGF-beta Autoinduction in Clostridium butyricum-Activated Dendritic Cells” Immunity. 査読あり  
43. 2015. 65-79.  
10.1016/j.immuni.2015.06.010
4. Akiyama, M. Suzuki, K. Yamaoka, K. Yasuoka, H. Takeshita, M. Kaneko, Y. Kondo, H. Kassai, Y. Miyazaki, T. Morita, R. Yoshimura, A. Takeuchi, T. “Number of Circulating Follicular Helper 2 T Cells Correlates With IgG4 and Interleukin-4 Levels and Plasmablast Numbers in IgG4-Related Disease” Arthritis Rheumatol 査読あり  
67. 2015. 2476-2481.  
10.1002/art.39209
5. Suzuki, M. Morita, R. Hirata, Y. Shichita, T. Yoshimura, A. “Spred1, a Suppressor of the Ras-ERK Pathway, Negatively Regulates Expansion and Function of Group 2 Innate Lymphoid Cells” J Immunol. 査読あり  
195. 2015. 1273-1281.  
10.4049/jimmunol.1500531

6. Ito, M. Shichita, T. Okada, M. Komine, R. Noguchi, Y. Yoshimura, A. Morita, R. “Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury” Nat. Commun. 査読あり  
6. 2015. 7360  
10.1038/ncomms8360

〔学会発表〕(計6件)

1. 吉村昭彦、近藤泰介、染谷和江、岡田匡央、森田林平  
「T細胞の免疫リプログラミング」  
第15回日本再生医療学会総会(招待講演)  
2016年03月17日 19日  
大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
2. 秋山光浩、山岡邦宏、鈴木勝也、安岡秀剛、竹下勝、森田林平、吉村昭彦、竹内勤  
「Activated increased number of T follicular helper subset 2 correlates with increased levels of IgG4, IL-4 and plasmablasts in IgG4-related disease.」  
第44回日本免疫学会学術集会・総会  
2015年11月18日-20日  
札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
3. 竹下勝、鈴木勝也、葛西義明、滝口麻衣子、中山雄介、大友ゆき、森田林平、宮崎宇広、吉村昭彦、竹内勤  
「Characterization of human CD4<sup>+</sup> stem cell memory T.」  
第44回日本免疫学会学術集会・総会  
2015年11月18日-20日  
札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
4. 伊藤美奈子、七田崇、吉村昭彦、森田林平  
「Bruton's tyrosine kinase (BTK)阻害剤によるインフラマソームおよび脳虚血後炎症の抑制」  
第36回日本炎症・再生医学会  
2015年7月21日-22日  
虎の門ヒルズフォーラム(東京都・港区)
5. 伊藤美奈子、吉村昭彦、森田林平  
「Bruton's tyrosine kinase (BTK) is required for NLRP3 inflammasome activation」  
第43回日本免疫学会学術集会・総会  
2014年12月10日-12日  
国立京都国際会館(京都府・京都市)
6. 近藤泰介、森田林平、吉村昭彦  
「Generation of mouse CD4<sup>+</sup> stem cell memory T cells by Wnt signaling and by Notch signaling」  
第43回日本免疫学会学術集会・総会  
2014年12月10日-12日

国立京都国際会館（京都府・京都市）

〔図書〕(計2件)

1. 森田林平、笠原秀範、吉村昭彦  
秀潤社、細胞工学別冊 ダイレクトリプログラミング、2015、31-41

2. 森田林平、笠原秀範、吉村昭彦  
日本臨牀社、再生医療、2015、155-159

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：線維芽細胞から血管内皮細胞を製造  
する方法

発明者：森田林平、吉村昭彦

権利者：学校法人慶應義塾

種類：特許

番号：特開 2015-109833

出願年月日：2014年11月10日

国内外の別：国内

取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

森田 林平 (MORITA, Rimpei)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：00362541

(2)研究分担者

無

(3)連携研究者

吉村 昭彦 (YOSHIMURA, Akihiko)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90182815