

## 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：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390297

研究課題名（和文） 遺伝子マーキングを用いた細胞運命追跡による血液細胞分化経路全体像の解明

研究課題名（英文） Clarification of whole scheme of developmental pathway in hematopoiesis by fate mapping using a genetic marking system

## 研究代表者

河本 宏 (KAWAMOTO HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・免疫発生研究チーム・チームリーダー

研究者番号：00343228

## 研究成果の概要（和文）：

申請者は、T細胞、B細胞、エリスロイド細胞それぞれの系列への分化途上にミエロイド系細胞の分化能が保持されるというモデル(ミエロイド基本型モデル)を提唱して来た。本研究では、このモデルの実証をさらに進めることを目的とした。ミエロイド-B前駆細胞の存在の検証については、胎生期の造血細胞においてはほぼ検証を完了し、論文作成中である。分化停止誘導培養系でミエロイド-Tという分化能をもつステージを固定した成果は報告することができた(Ikawa et al, Science, 2010)。フェイトマッピングで分化経路を追跡する実験に関しては、期間内に遺伝子マーキングに使える有用なマウス(Flt3-ER-Crマウス)の作製に成功しており、これを用いた予備実験の結果から極めて重要な知見が得られている。総合的には、計画以上の進展が得られたと考えている。

## 研究成果の概要（英文）：

We have previously proposed a model of hematopoiesis in which myeloid potential is retained along with development towards T, B and erythroid lineages. In this research project, we aimed to validate this model. Validation of myeloid-B progenitors in fetal hematopoiesis by a single cell analysis was completed (to be submitted). Validation of myeloid-T progenitor stage was achieved by fixing myeloid-T progenitors using a developmental arrest-inducing culture system (Ikawa et al, Science, 2010). Fate map approaches using genetic marking mouse have not yet completed, but a useful line (Flt3-ER-Cre mouse) has been successfully made, and preliminary experiment has provided some promising data. Collectively, the project has been very successful.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学、血液学、免疫学

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、前駆細胞、系列決定、T細胞、ミエロイド系細胞、細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

造血における造血前駆細胞の系列決定の過程については、いくつかのモデルが提唱されている。一般的にはミエロイド系（食細胞系）と赤血球系の共通前駆細胞と、T細胞とB細胞の共通前駆細胞に分岐するモデルが信じられてきた。一方、申請者は、T細胞、B細胞、エリスロイド細胞それぞれの系列への分化途上にミエロイド系細胞の分化能が保持されるというモデル（ミエロイド基本型モデル）を提唱して来た。2008年にミエロイド-T前駆細胞の存在を実証した（Wada et al, Nature）が、この知見はこのモデルを強く支持するものであった。しかし、まだどちらのモデルが正しいかという検証を続ける必要があった。

### 2. 研究の目的

申請者は、T細胞、B細胞、エリスロイド細胞それぞれの系列への分化途上にミエロイド系細胞の分化能が保持されるというモデル（ミエロイド基本型モデル）を提唱して来た（下図）。2008年にミエロイド-T前駆細胞の存在を実証したが、この知見はこのモデル本研究では、ミエロイド基本型モデルが正しいかどうかの検証をさらに進めることを目的とした。具体的には、1）ミエロイド-B前駆細胞、ミエロイド-T前駆細胞などの存在を検証する、2）T細胞、B細胞、エリスロイド細胞へ向う分化途上で派生するミエロイド細胞がどのように分布するか、何らかの機能的違いがあるかをフェイトマッピングの手法を用いて解析する、という2点を目標とする。

### 3. 研究の方法

古典的モデル（下図 A）とミエロイド基本型モデル（下図 B）の相違点は、ミエロイド-リンパ系前駆細胞、ミエロイド-T前駆細胞、ミエロイド-B前駆細胞が存在するという事である。これらの存在を検証する実験を、以下のように進めた。

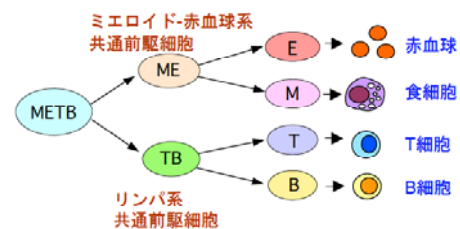
1) シングルセルアッセイを用いて、ミエロイド-B前駆細胞の存在を検証する。マウス胎仔肝臓中あるいは骨髄中の造血前駆細胞をB細胞へ向けた分化段階ごとに分画し、単離して1個ずつ別のウェルで培養する。ミエロイド系細胞とB細胞を支持するストローマ細胞およびミエロイド系細胞とT細胞を支持するストローマ細胞を用いる。

2) 分化停止を誘導する培養系を用いて特定

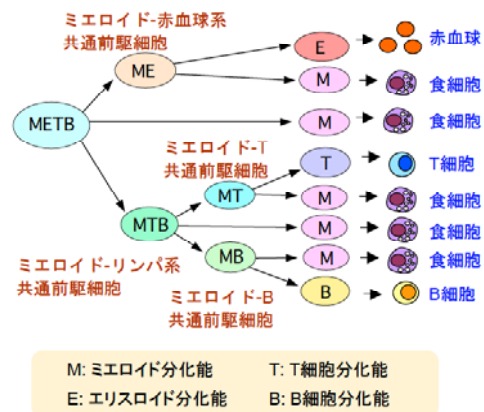
の分化段階で前駆細胞の分化を停止させることにより、その分化ステージが安定したものであることを実証する。マウスの造血前駆細胞をノッチリガンドDLL4を固相化したディッシュ上でIL-7などのサイトカインの存在下に培養する方法を開発して用いた。

3) T細胞、B細胞、エリスロイド細胞へ向う分化途上で派生するミエロイド細胞がどのように派生するか、フェイトマッピングの手法を用いて解析する。具体的にはミエロイド、T、B各系列のごく初期の段階、すなわち、M-T-B前駆細胞段階から特異的に発現するCreマウス（Flt3-Cre, IL-7R-Cre）の作製を進める。

#### A 古典的モデル



#### B ミエロイド基本型モデル



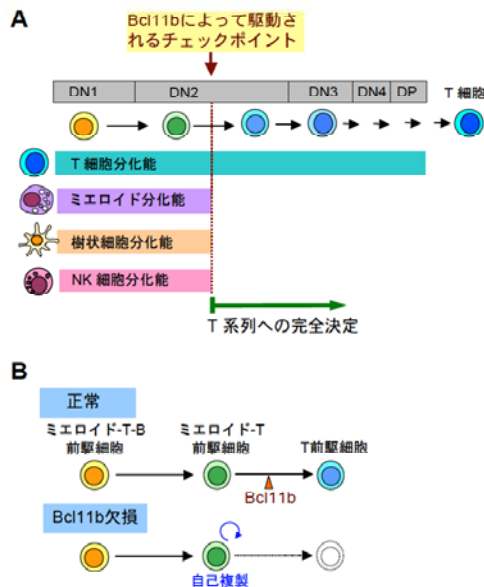
### 4. 研究成果

先ず(1)の方法を用いて進めたミエロイド-B前駆細胞の存在の検証については、胎生期の造血細胞においてはほぼ検証を完了した。T細胞の分化能を消失した後もミエロイド-Bという分化能を持つ段階があることが明らかになった。このデータに関しては、論文作成中である。一方成体の造血においては、B細胞に決定される直前までミエロイド系とT細胞系の分化能を保持していると考えられるデータもえられたが、こちらについてはま

だ検証が必要と考えている。

(2) の分化停止誘導培養系では、ミエロイド-T 前駆細胞という段階で分化停止して自己複製サイクルに入るのを見いだした。この分化停止/自己複製細胞は適切な環境に移すとミエロイド系細胞やT細胞を生成した。さらに Bcl11b という転写因子がミエロイド-T前駆細胞階から次のT前駆細胞階への決定に必須であることも明らかにした。ミエロイド-T 前駆細胞という段階を単なる経過的な段階ではなく安定な分化段階であることを示した(下図A, B)。(Ikawa et al, Science, 2010)。

(3) のフェイトマッピングで分化経路を追跡する実験に関しては、期間内に遺伝子マーキングに使える有用なマウス (Flt3-ER-Crマウス) の作製に成功しており、これを用いた予備実験の結果から極めて重要な知見が得られている。総合的には、計画以上の進展が得られたと考えている。



## 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 14 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  $\gamma\delta$  T cells. Blood, (査読有) 118:586-593, 2011

2) Miyazaki K, Miyazaki M, Guo Y, Yamasaki N, Kanno M, Honda Z, Oda H, Kawamoto H, Honda H. The role of the basic helix-loop-helix

transcription factor Dec1 in the regulatory T cells. J. ImmunolK, (査読有) 185:7330-7339, 2010

3) Ikawa, T, S Hirose, K Masuda, K Kakugawa, R Satoh, A Shibano-Satoh, R Kominami, Y Katsura, H Kawamoto. An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. Science. (査読有) 329: 93-96, 2010.

4) Hirose K, T Inukai, J Kikuchi, Y Furukawa, T Ikawa, H Kawamoto, S H Oram, B Göttgens, N Kiyokawa, Y Miyagawa, H Okita, K Akahane, X Zhang, I Kuroda, H Honna, K Kagami, K Goi, Hu Kurosawa, A T Look, H Matsui, T Inaba, Kanji Sugita. Aberrant induction of LMO2 by the E2A-HLF chimeric transcription factor and its implication in leukemogenesis of B-precursor ALL with t(17;19). Blood, (査読有) 116: 962-970, 2010

5) Y. Nishikawa, F. Hirota, M. Yano, H. Kitajima, J. Miyazaki, H. Kawamoto, Y. Mouri, and M. Matsumoto. Biphasic Aire expression in early embryos and in medullary thymic epithelial cells prior to end-stage terminal differentiation. J. Exp. Med. (査読有) 207:963-971, 2010

6) Oguro H, Y Jin, H Ichikawa, T Ikawa, S Yamazaki, H Kawamoto, H Nakauchi, A Iwama. Poised lineage specification in multipotent hematopoietic progenitor cells by the polycomb protein Bmi1. Cell Stem Cell (査読有) 5: 279-286, 2010

7) Moro K., T. Yamada, M. Tanabe, T. Takeuchi, T. Ikawa, H. Kawamoto, J-I. Furusawa, M. Ohtani, H. Fujii, and S. Koyasu. Innate production of Th2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit+Sca-1+ lymphocytes. Nature (査読有) 463: 540-544, 2010

8) Meek B, Cloosen S, Borsotti C, Elssen J V, Vanderlocht J, Schnijderberg M, Poel M van der, Lewis B, Hesselink R, Manz M G, Katsura Y, Kawamoto H, \* Germeaad W TV, and Bos G MJ. In vitro human G-CSF mobilized CD34+ derived T-cell progenitors fully mature in vivo. Blood. (査読有) 115: 261-264, 2010

9) Watarai H, A Rybouchkin, N Hongo, Y Nagata, S Sakata, E Sekine, N Dashtsoodol, T Tashiro, S-I Fujii, K Shimizu, K Mori, K Masuda, H Kawamoto, H Koseki, and M Taniguchi. Generation of functional NKT cells in vitro from embryonic stem cells bearing rearranged invariant V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 TCR $\alpha$  gene.

Blood (査読有) 115:230-237, 2010.

10) Vroegindeweij, E., S Crobach, M Itoic, R Satoh, S Zuklys, C Happee, W TV Germeraad, J J Cornelissen, T Cupedo, G A Hollander, H Kawamoto, and W van Ewijk. Thymic cysts originate from Foxn1 positive thymic medullary epithelium. Mol Immunol. (査読有) 47: 1106-1113, 2010

11) Imada M, Masuda K, Satoh R, Ito Y, Goto Y, Matsuoka T, Endo S, Nakamura A, Kawamoto H, Takai T. Ectopically expressed PIR-B on T cells constitutively binds to MHC class I and attenuates T helper type 1 responses. Int. Immunol. (査読有) 21:1151-1156, 2009

12) Kakugawa K., T. Yasuda, I. Miura, A. Kobayashi, H. Fukiage, R. Satoh, M. Matsuda, H. Koseki, S. Wakana, H. Kawamoto\*, H. Yoshida\*. (\*correspondence) A novel gene essential for the development of single positive thymocytes. Mol. Cell. Biol. (査読有) 29:5128-5135, 2009

13) Higashi, A. Y., T. Ikawa, M. Muramatsu, A. N. Economides, A. Niwa, T. Okuda, A. J. Murphy, J. Rojas, T. Heike, T. Nakahata, H. Kawamoto, T. Kita, and Motoko Yanagita. Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreERT2. J. Immunol. (査読有) 82:5633-5640, 2009

14) K. Masuda, W. T.V. Germeraad, R. Satoh, M. Itoi, T. Ikawa, N. Minato, Y. Katsura, W. van Ewijk, and H. Kawamoto. Notch activation in thymic epithelial cells induces development of thymic microenvironments. Mol. Immunol., (査読有) 46:1756-1767, 2009

[学会発表] (計 2 件)

1) 河本宏、「Molecular mechanisms for the production and maintenance of the T cell lineage」、第 40 回日本免疫学会シンポジウム、2011 年 11 月 28 日、千葉

2) 河本宏、「T cell lineage determination: termination of myeloid potential in T cell progenitors」、第 39 回日本免疫学会シンポジウム、2009 年 12 月 2 日、大阪

[図書] (計 1 件)

河本宏、羊土社、もっとよくわかる！免疫学、2011 年、221 ページ

[その他]

ホームページ等

成果/活動状況を HP で精力的に発表

HP:<http://www.riken.go.jp/rcai.lymdev/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河本 宏 (KAWAMOTO HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・免疫発生研究チーム・チームリーダー

研究者番号：00343228

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし