

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07081

研究課題名(和文) 造血性内皮細胞の分化制御：ES細胞から造血幹細胞の試験管内分化誘導を目指して

研究課題名(英文) Controlling the differentiation of hemogenic endothelial cells: Toward the derivation of hematopoietic stem cells from ES cells

研究代表者

小川 峰太郎 (OGAWA, Minetaro)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：70194454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞は背側大動脈の造血性内皮から発生する。マウスES細胞から造血性内皮細胞を効率よく分化誘導する方法を開発した。造血性内皮細胞の分化能力を細胞外シグナル分子によって調節できることを明らかにした。マウス胎仔から取り出した造血性内皮細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養系を確立した。この培養系を用いてもES細胞から得た造血性内皮細胞から造血幹細胞を誘導することには成功しておらず、ES細胞から真正の造血性内皮細胞を分化誘導することが今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells are generated from the hemogenic endothelium of the dorsal aorta. We developed an efficient method for inducing differentiation of hemogenic endothelial cells from mouse ES cells. We demonstrated that the differentiation potential of hemogenic endothelial cells can be controlled by extracellular signaling molecules. We established a culture system for inducing differentiation of hematopoietic stem cells from hemogenic endothelial cells isolated from mouse embryos. Even by using this culture system, however, we still failed to induce hematopoietic stem cells from ES cell-derived hemogenic endothelial cells. It is thus a future challenge to induce differentiation of genuine hemogenic endothelial cells from ES cells.

研究分野：造血発生学

キーワード：造血幹細胞 血管内皮細胞 造血性内皮細胞 中胚葉細胞 ES細胞 試験管内分化 個体発生 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

ES細胞やiPS細胞から造血幹細胞を試験管内で分化誘導する培養システムは、骨髄に代わる造血幹細胞の新たな供給源となることから、骨髄移植におけるドナー不足の観点からもその開発が急がれている。マウス ES 細胞から造血幹細胞を試験管内で分化誘導する試みとして、HoxB4 などの転写因子を遺伝子導入により強制発現させた ES 細胞を分化させ、造血幹細胞に似た細胞を誘導した報告がある。しかし、この方法で誘導された細胞は正常な造血幹細胞が持つべき分化能力を持たない。遺伝子の強制発現ではなく、増殖因子などの生理的な作用の下で、本来の発生経路をたどりながら造血幹細胞まで導く必要があるが、このような培養法は未だ実現されていない。

一般に脊椎動物の造血幹細胞は背側大動脈の血管内皮から発生する。背側大動脈の内皮細胞の一部は、胎生期の限られた期間だけ血液細胞系列に分化する。このような内皮細胞は造血性内皮細胞と呼ばれる。ほとんどの造血性内皮細胞は、幹細胞としての能力を持たない単なる血球前駆細胞に分化するだけであるが、一部の造血性内皮細胞は造血幹細胞にまで分化すると考えられている。造血性内皮細胞は造血幹細胞の前駆細胞であり、造血幹細胞の分化誘導において造血性内皮細胞の分化制御は重要な鍵となる。

我々は、造血性内皮細胞が存在することの実験的証明と、その特性を明らかにする研究を主導的に行ってきた。マウス胎仔から血管内皮細胞を FACS で取り出して血液細胞に分化することを明らかにし、適切なマーカーを用いれば通常の血管内皮細胞と造血性内皮細胞を分離できることを証明した。マウス ES 細胞を試験管内で培養して血管内皮細胞を分化誘導し、さらに、そこから血液細胞を分化誘導する実験系を確立してきた。しかし、従来の方で ES 細胞から誘導された造血性内皮細胞は、幹細胞としての能力が無い血球前駆細胞にしか分化できないことが問題であった。造血性内皮細胞の分化能力を調節するシグナルが見つければ、この細胞に造血幹細胞への分化能力を付加するために重要な意義があると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス ES 細胞から誘導した造血性内皮細胞の分化能力を細胞外シグナルを介して調節し、造血幹細胞へ分化させる培養系を確立することであった。そのために先ず、マウス胎仔の造血性内皮細胞を利用し、造血性内皮細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養条件(幹細胞誘導条件)を決めることにした。次に、この条件で造血幹細胞に分化できる造血性内皮細胞を、マウス ES 細胞から誘導するための培養条件を決める。最後に、どの中胚葉細胞から造血性内皮細胞が分化するかを明らかにして、ES 細胞から造

血幹細胞に至るステップワイズで効率的な分化誘導系を完成させることを目指した。

## 3. 研究の方法

(1)造血性内皮細胞から造血幹細胞への分化誘導条件の検討

造血性内皮細胞を培養して造血幹細胞に分化させる条件を決定するために、胎生 9.5~11.5 日齢の C57BL/6(Ly5.2)マウス胎仔から造血性内皮細胞を FACS で単離し、Rybtsov (Rybtsov et al. *Stem Cell Rep.* 3: 489-501, 2014.)の方法に基づいて OP9 ストロマ細胞株との再凝集培養を行った。培養法を簡単に述べると、単離した造血性内皮細胞と OP9 ストロマ細胞を混合して遠心により凝集させた。次に、Stem Cell Factor (SCF)、Flt3 Ligand (FL)、IL-3 を添加した培養液にミリポアメンブレンを浮かべ、細胞凝集塊をメンブレン上に乗せて気相・液相境界面で培養した。培養後、細胞凝集塊をコラゲナーゼ・ディスパーゼで解離し、線照射した C57BL/6(Ly5.1)成体マウスに尾静脈注射により移植した。4~24 週間後に末梢血中のドナー由来(Ly5.2)白血球の割合を FACS で解析し、長期骨髄造血再構築能を持つ造血幹細胞の存在を確認した。

(2)マウス ES 細胞から造血性内皮細胞への分化誘導

ES 細胞は(C57BL/6 × CBA)F<sub>1</sub> マウス由来 KTPU8 細胞株を用いた。ES 細胞を OP9 ストロマ細胞層上で 6 日間培養して CD45<sup>-</sup>CD144<sup>+</sup>(VE-cadherin)<sup>+</sup> 内皮細胞を分化誘導した。CD45<sup>-</sup>CD144<sup>+</sup> 内皮細胞を FACS で単離し、造血因子存在下で OP9 細胞と共培養して血液細胞に分化する能力を検討した。また、ES 細胞を OP9 ストロマ細胞層上で 4 日間培養し、Flk-1<sup>+</sup>PDGFR<sup>+</sup> 未分化中胚葉細胞、Flk-1<sup>+</sup>PDGFR<sup>-</sup> 側板中胚葉細胞、Flk-1<sup>-</sup>PDGFR<sup>+</sup> 沿軸中胚葉細胞を分化誘導した。それぞれ FACS で単離し、OP9 ストロマ細胞層上で培養して造血性内皮細胞を分化誘導した。

(3)造血性内皮細胞の分化能力を調節するシグナル

マウス ES 細胞を OP9 ストロマ細胞と共培養して CD45<sup>-</sup>CD144<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> 細胞を分化誘導し、その血液分化能、内皮細胞コロニー形成能、増殖因子レセプターの発現、転写因子の発現を解析した。さらに、CD45<sup>-</sup>CD144<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> 細胞を FACS で単一細胞として単離し、血液細胞と内皮細胞への分化能力を単一細胞レベルで解析した。単一細胞レベルでの分化能力に影響を与える増殖因子シグナルを探索し、分化能力がシグナルによってどのように調節されるか検討した。

## 4. 研究成果

(1)造血性内皮細胞から造血幹細胞への分化誘導条件の検討

Rybtsov らは、胎生 9.5~11.5 日齢のマウス胎仔から単離した造血性内皮細胞 (CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> 細胞) を OP9 ストロマ細胞と再凝集培養することにより、造血幹細胞に分化誘導できると報告している (前出引用文献)。造血性内皮細胞から確実に造血幹細胞へ分化誘導できる培養条件を決定するために、Rybtsov らの培養法の再現を試みた。

まず、マウス胎仔から単離した造血性内皮細胞を直接移植した場合の骨髓造血再構築能について検討した。胎生 11.5 日齢の C57BL/6 マウス胎仔から CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> 細胞を FACS で単離し、1 胎仔相当数を 1 匹の線照射マウスに直接移植した。16 週間後の末梢血の解析により、5 例中 1 例だけ、B リンパ球、T リンパ球、マクロファージ、顆粒球の 4 系列中にドナー由来の血球を検出した。胎生 10.5 日齢のマウス胎仔から単離した CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> 細胞についても同様に解析したところ、5 例中 1 例も骨髓造血再構築能を認めなかった。従って、造血性内皮細胞は造血幹細胞とは異なり、そのままでは骨髓造血再構築能を殆ど持たないことが確認された。

次に、造血性内皮細胞を OP9 ストロマ細胞と再凝集培養することによって造血幹細胞に分化誘導できるか検討した。胎生 11.5 日齢の C57BL/6 マウス胎仔から単離した CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> 細胞 (2 胎仔相当数) を  $1 \times 10^5$  個の OP9 細胞と再凝集して気相・液相境界面で培養した。4 日後に細胞凝集塊を解離して線照射マウスに移植し、16 週間後に末梢血を解析した。8 例中 5 例において、4 血液系列中にドナー由来の血球を検出し、長期骨髓造血再構築能を持つ造血幹細胞を造血性内皮細胞から分化誘導できたことを確認した。

同様に、胎生 10.5 日齢の C57BL/6 マウス胎仔から CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> 内皮細胞を単離し、3 胎仔相当数を  $1 \times 10^5$  個の OP9 細胞と再凝集して 5 日間培養した。細胞凝集塊を解離して線照射マウスに移植し、16 週間後に末梢血を解析したところ、4 例中 3 例で 4 血液系列中にドナー由来の血球を検出した。胎生 10.5 日齢の造血性内皮細胞から造血幹細胞を分化誘導できることが確認された。

さらに、胎生 9.5 日齢のマウス胎仔の尾方半身から解離させた細胞 (2 胎仔相当数) を同様に OP9 細胞と 7 日間再凝集培養して線照射マウスに移植したところ、2 例中 1 例において、8 週間後に 4 血液系列でドナー由来の血球を検出した。

以上の結果から、胎生 9.5 日齢以降の胎仔に存在する造血性内皮細胞もしくはその前駆細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養条件を確立することができたと考えられる。すなわち、真正の造血性内皮細胞を出発点にすれば造血幹細胞まで試験管内で分化誘導することが可能である。もし、マウス ES 細胞から真正の造血性内皮細胞を分化誘導することができれば、造血幹細胞まで分化させ

ることが可能になることを意味している。(以上、未発表)

## (2) マウス ES 細胞から造血性内皮細胞への分化誘導

マウス ES 細胞と OP9 ストロマ細胞との共培養による CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> 内皮細胞の分化誘導において、CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> 内皮細胞の血液分化能を増強する因子を探索する中で、アクチビン A の存在下に分化誘導した CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> 内皮細胞の血液分化能が顕著に高いことを見いだした。アクチビン A のこの効果の至適濃度は 20ng/ml であり、比較的高い。

CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> 内皮細胞における CD41<sup>+</sup> 細胞分画の割合を比較したところ、アクチビン A の存在下に分化誘導した内皮細胞では対照群に比べて 3 倍程度高かった (15% vs 5%)。CD41<sup>+</sup> 細胞分画と CD41<sup>-</sup> 細胞分画の血液分化能を比較したところ、CD41<sup>+</sup> 細胞分画の血液分化能が顕著に高いことが分かり、造血性内皮細胞が CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> 細胞に含まれていることが確認された。アクチビン A の存在下に分化誘導した CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> 内皮細胞の血液分化能が高いのは、造血性内皮細胞をより多く含むためと考えられた。

ES 細胞を OP9 ストロマ細胞と共培養して分化を誘導すると 4 日目までに中胚葉細胞が発生する。アクチビン A が有効である期間はこの 4 日間に限られることから、アクチビン A は中胚葉細胞の発生に影響を与えて造血性内皮細胞を増加させると考えられた。アクチビン A 存在下に分化誘導される中胚葉細胞分画を調べたところ、Fik-1<sup>+</sup> PDGFR<sup>+</sup> 未分化中胚葉細胞と Fik-1<sup>+</sup> PDGFR<sup>-</sup> 側板中胚葉細胞の割合が顕著に高かった。対照群では Fik-1<sup>-</sup> PDGFR<sup>+</sup> 沿軸中胚葉細胞が優位であった。それぞれの中胚葉細胞分画を FACS で純化して OP9 細胞と共培養し、CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> 造血性内皮細胞への分化能力を比較したところ、側板中胚葉細胞の能力が最も高く、沿軸中胚葉細胞の能力が最も低かった。従って、アクチビン A の存在下では側板中胚葉細胞の発生が促進されるために、側板中胚葉を起源とする造血性内皮細胞の分化が促進されることが示唆された。

OP9 細胞の代わりに、poly-D-lysine でコートしたシャーレで ES 細胞を培養して分化誘導した場合には、アクチビン A による側板中胚葉細胞の発生促進が観察されないことから、アクチビン A が効果を顕すには OP9 細胞が必要であると考えられた。以上の結果から、アクチビン A と OP9 ストロマ細胞との組み合わせは、ES 細胞から側板中胚葉細胞の発生を促進することによって、側板中胚葉由来する造血性内皮細胞の分化効率を高めることが明らかになった。ES 細胞から造血性内皮細胞を効率よく分化誘導する培養条件を決定するために重要な知見を与えるものである (発表論文)。

### (3) 造血性内皮細胞の分化能力を調節するシグナル

マウス ES 細胞から分化誘導した造血性内皮細胞の性格付けを行うため、ES 細胞を OP9 ストロマ細胞と共培養して CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> 細胞を誘導し、FACS で単離してリアルタイム PCR 法により遺伝子発現を解析した。CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> 細胞は、内皮細胞が発現すべき転写因子である Sox17, Etv2, CoupTF II, Foxc2 を発現していた。実際に内皮細胞のコロニーを形成する能力も認められたため、CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> 細胞は内皮細胞系列に属することが示唆された。さらに、血液細胞の発生に必須の転写因子である Runx1 と Tal1 も発現しており、その高い血液分化能を裏付けると考えられた。

CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> 細胞の分化能を詳細に検討するため、単離した細胞を単一細胞ごとに独立して培養し、血液細胞系列と内皮細胞系列への分化能力を解析した。その結果、9 個に 1 個が血液細胞を産生し、5 個に 1 個が内皮細胞コロニーを形成した。興味深いことに、血液分化能を示した細胞の 20% が同時に内皮細胞コロニーを形成し、血液細胞系列と内皮細胞系列の両方に分化できる二分化能を持つことが明らかになった。この事実から、ES 細胞由来 CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> 細胞を造血性内皮細胞として同定することができた。

二分化能を持つ細胞をさらに濃縮するために、CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> 細胞が発現する細胞表面マーカーを探索した。その結果、CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> 細胞のうち 19% がケモカインレセプター CXCR4 を発現しており、CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> 細胞は CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> CXCR4<sup>-</sup> 細胞に比べて二分化能細胞を 7 倍ほど高い頻度で含んでいた。すなわち、二分化能を持つ造血性内皮細胞は CXCR4 をより強く発現することが明らかになった。

造血性内皮細胞の分化能力に与える CXCR4 シグナルの影響を明らかにするために、CXCR4 リガンドである CXCL12 を添加した状態で ES 細胞を分化誘導して CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> 細胞を単離した。CXCR4/CXCL12 シグナル存在下に分化した CD45<sup>-</sup> CD144<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> 細胞は対照群に比べて内皮細胞への分化能を半分程度まで失っており、その結果、二分化能を示す細胞の頻度が顕著に減少した。一方、血液分化能への影響は認められなかった。以上の結果から、CXCR4/CXCL12 シグナルは造血性内皮細胞の内皮細胞分化プログラムに特異的に働きかけてこれを抑制することが明らかになった。この成果は、造血性内皮細胞の分化能を細胞外シグナルによって調節できることを示しており、造血性内皮細胞から造血幹細胞を分化誘導するために重要な知見を与えた(発表論文 )

#### <今後の展望>

前述のように、マウス胎仔から単離した造血性内皮細胞を造血幹細胞に分化させる培

養系を確立しつつある。この培養系を ES 細胞から分化誘導した造血性内皮細胞に適用しても、これまでのところ造血幹細胞への分化には成功していない。ES 細胞由来の造血性内皮細胞が依然として真正ではないことが示唆される。今後は、胎仔由来の真正造血性内皮細胞と ES 細胞由来造血性内皮細胞の相違を遺伝子発現などから明らかにし、ES 細胞から真正の造血性内皮細胞を分化誘導する培養条件を探索する必要がある。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Ahmed, T., K. Tsuji-Tamura and M. Ogawa. CXCR4 signaling negatively modulates the bipotential state of hemogenic endothelial cells derived from embryonic stem cells by attenuating the endothelial potential. *Stem Cells* 34: 2814-2824, 2016. 査読有、DOI:10.1002/stem.2441

Hirota, S. and M. Ogawa. Activin A in combination with OP9 cells facilitates development of Flk-1<sup>+</sup> PDGFR<sup>-</sup> and Flk-1<sup>+</sup> PDGFR<sup>+</sup> hematopoietic mesodermal cells from murine embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467: 583-588, 2015. 査読有、DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.09.131

[学会発表](計4件)

小川 峰太郎, ES 細胞から分化誘導した造血性内皮細胞における二分化能の CXCR4 シグナルによる調節、第 37 回日本炎症・再生医学会、2016.6.17、京都市勤業館みやこめっせ(京都府京都市)

廣田 冴香、Tanzir Ahmed、田村-辻 潔美、小川 峰太郎、ES 細胞の血液分化能に及ぼすアクチビンの効果、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.1、神戸ポートピアホテル他(兵庫県神戸市)

[その他]

ホームページ等

[http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya\\_top/cell\\_differentiation/](http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/cell_differentiation/)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

小川 峰太郎(OGAWA, Minetaro)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：70194454

### (2)研究協力者

廣田 冴香(HIROTA, Saeka)(大学院生)

Tanzir Ahmed(AHMED, Tanzir)(大学院生)