

平成 23 年 3 月 24 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790480

研究課題名 (和文) 胎生致死マウスを利用する新しい造血解析法

研究課題名 (英文) Novel analysis method of hematopoiesis applying to embryonic lethal mice

研究代表者

和田 はるか (WADA HARUKA)

聖マリアンナ医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・講師

研究者番号：70392181

研究成果の概要 (和文)：

胎生致死となる遺伝子欠損をもつマウス細胞から iPS 細胞を樹立し、造血細胞に分化誘導して造血を解析する目的で本研究をすすめた。

本研究では、まず野生型マウス由来の線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し造血細胞の分化誘導を試みたところ、T 細胞への分化は効率よくみられたものの、B 細胞への分化に抵抗性を示した。iPS 細胞からの正常な造血が観察されなかった原因として、不完全なリプログラミングや、導入遺伝子の再活性化などが原因として考えられた。iPS 細胞化に使用する遺伝子がゲノムに挿入されない方法により iPS 細胞を作製し分化解析に使用する必要性があると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Forced expression of certain transcription factors in somatic cells results in generation of induced pluripotent stem (iPS) cells, which differentiate into various cell types. We investigated T-cell and B-cell lineage differentiation from iPS cells *in vitro*. iPS cells differentiated into lymphocytes in OP9 co-culture systems. iPS cells efficiently differentiated into T-cell lineage. However, iPS cells including B-iPS cells were relatively resistant to B-cell lineage differentiation. One of the reasons of the failure of B-cell lineage differentiation seemed due to a defect of *Pax5* expression in the differentiated cells. Therefore, current *in vitro* differentiation systems using iPS cells are sufficient for inducing T-cell but not B-cell lineage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：iPS細胞、T細胞、B細胞、造血前駆細胞、分化誘導、リプログラミング

### 1. 研究開始当初の背景

すべての血液細胞は造血幹細胞に由来し、造血幹細胞はさまざまな因子の影響を受けながら多種多様な血液細胞に分化してゆく。血液細胞がどのような因子（遺伝子）の作用により分化を遂げ、機能発現していくのかを理解するために、各種遺伝子のノックアウトマウスの造血を解析することは非常に合理的である。血液細胞分化・機能的成熟の誘導因子を研究するために複数のノックアウトマウス解析を行ってきたが、さまざまな困難に直面した。一つは胎生致死という問題、もう一つはコンディショナルノックアウトは造血解析においては必ずしも万全な技術ではないという問題である。

そのような中で、細胞リプログラミング技術の新たな活用法を着想した。細胞リプログラミングにより遺伝子のエピジェネティックな変化は初期化されるが、ヌクレオチドレベルでの遺伝子変異（欠損など）は残存するという事を利用する。すなわち、胎生致死となる遺伝子ノックアウトマウス胎仔細胞をiPS細胞化し、造血前駆細胞に誘導、さらに*in vivo*への移入や*in vitro*分化誘導系にて当該遺伝子の機能を解析するという方法である。

この方法により、これまで困難であった胎生期に致死となるノックアウトマウスの造血解析が容易に解析可能となることが期待される。

### 2. 研究の目的

造血の分子機構解析において、遺伝子欠損マウスの解析から得られる情報は非常に多い。一方で、欠損／変異させた遺伝子が生命維持に不可欠である場合も多く、造血機構の解析が可能となる前の段階で死亡してしまう例も少なくない。

これまで困難の多かった胎生期に致死となる遺伝子欠損をもつマウスの造血解析を、細胞リプログラミング技術を取り入れることにより容易に解析可能となることを示してゆくことが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

マウス細胞を用い、iPS細胞化した。細胞のiPS細胞化には、*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*の山中4因子を用いた。遺伝子導入はレトロ

ウイルスを用いておこなった。

得られたiPS細胞から*in vitro*で中胚葉系細胞、次いでCD34陽性造血前駆細胞、T細胞等を誘導する系を確立した。分化誘導は、胚葉体（EB）形成法およびOP9細胞との共培養法にておこなった。まずiPS細胞をトリプシン処理によりsingle cell suspensionとし、分化抑制因子であるLIFを含まない $\alpha$ -MEM分化培地で5日間培養し、EBを形成させた。EBをトリプシン処理によりsingle cell suspensionとし、OP9細胞（B細胞分化誘導の場合、T細胞分化誘導の場合はOP9/DL1（OP9細胞にDelta like-1分子を強制発現させた細胞）とFlt-3 ligandおよびIL-7の存在下で共培養した。生成した細胞は、6日ごとに新しいOP9細胞（またはOP9/DL1細胞）へと植え替えた。生成した細胞は、フローサイトメーターにより表面抗原の発現解析を行った。

### 4. 研究成果

本研究ではまず、iPS細胞からの各種血液・免疫細胞への分化について検証するため、線維芽細胞由来iPS細胞（MEF-iPSC）及びB細胞由来iPS細胞（B-iPSC）を作製し、樹立したiPS細胞からT細胞、B細胞への分化誘導を試みた。

B細胞では $\sim 1 \times 10^7$ 個の細胞から $\sim 30$ 個のiPS細胞コロニーが得られた（頻度： $3 \sim 6.2 \times 10^{-4}$ ）のに対し、T細胞ではiPS細胞コロニーは得られなかった。B細胞から得られたiPS細胞はES細胞に特徴的な遺伝子を発現していたが、B細胞特異的な遺伝子の発現は消失していた。得られたB細胞由来iPS細胞（B-iPS細胞）のB細胞受容体遺伝子は再構成されており、確かにB細胞由来のiPS細胞であることを確認した。

樹立したB-iPS細胞はMEF-iPS細胞と同様に3胚葉から構成される奇形腫の形成能を有し、多分化能をもつiPS細胞であることを確認した。

MEF-iPS細胞（38C2）およびB-iPS細胞から、胚葉体形成法、OP9系細胞との共培養法により免疫系細胞への分化誘導を試みた。MEF-iPS細胞、B-iPS細胞ともに分化誘導後5日目にはFlk-1<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>細胞の生成が確認され、血液系細胞への分化誘導が可能であることが明らかとなった。

OP9-DL1との共培養系において、

Flt3-ligand, IL-7, Stem cell factor の存在下に培養を続けると、27 日目に CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞および CD8<sup>+</sup>細胞,  $\alpha\beta$ T 細胞,  $\gamma\delta$ T 細胞の生成が確認された。RT-PCR による遺伝子発現解析の結果, CD3 などの T 細胞関連遺伝子の発現がみられた。

生成した T 細胞は抗原刺激により Interferon- $\gamma$  を産生し Transforming growth factor- $\beta$  の添加により FoxP3<sup>+</sup>制御性 T 細胞へ分化しうることを確認した。B-iPS 細胞および MEF-iPS 細胞から生成した T 細胞はともに, 生体内の T 細胞と同様に多様性があることがフローサイトメトリー解析, ゲノム PCR 解析により確認された。これらの結果から, iPS 細胞から各種エフェクター T 細胞へ分化することができる多様な T 細胞の分化誘導が可能であることが明らかとなった。

上述のように, MEF-iPSC, B-iPSC は共に T 系列細胞へ効率よく分化したが B 細胞への分化は抵抗性であった。この分化抵抗性について, 分化誘導した造血前駆細胞において B 細胞のマスター転写因子の一つである *Pax5* の発現がみられなかったことから, iPS 細胞作製時の不完全な初期化による *Pax5* プロモーターのサイレンシングの可能性が考えられたが, *Pax5* のプロモーター領域は低メチル化状態であり, 分化抵抗性は *Pax5* のエピジェネティック修飾によるものではないことが明らかとなった。一方で iPS 細胞から誘導した造血前駆細胞において *Oct4* の異所性発現がみられ, B 細胞分化抵抗性との関連について検討中である。

iPS 細胞を医療応用しようとする際, iPS 細胞化時に使用した因子, 例えば c-Myc の再活性化はがん化の危険をはらんでいるとして問題となっている。iPS 細胞から胎生致死となる欠損/変異遺伝子をもつ細胞から iPS 細胞を作製し, その分化を解析したい場合においても導入遺伝子の再活性化により iPS 細胞の「本来の分化」が阻害されるなどの問題が生じる可能性があり, iPS 細胞化の際の導入遺伝子がゲノム挿入されない方法により iPS 細胞を作製し, 分化解析に使用する必要があると考えられた。

## 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)

Wada H, Yasuda T, Miura I, Watabe K, Sawa C, Kamijuku H, Kojo S, Taniguchi M, Nishino I, Wakana S, Yoshida H, Seino K., Establishment of an improved mouse model for infantile neuroaxonal dystrophy that

shows early disease onset and bears a point mutation in *Pla2g6*, Am J Pathol. 査読有, 175, 2009, 2257-2263

Ohkubo Y, Iwakawa M, Seino K, Nakawatari M, Wada H, Kamijuku H, Nakamura E, Nakano T and Imai T, Combining Carbon Ion Radiotherapy and Local Injection of  $\alpha$ -Galactosylceramide-Pulsed Dendritic Cells Inhibits Lung Metastases in an In Vivo Murine Model, International Journal of Radiation Oncology \* Biology \* Physics, 査読有, 78, 2010, 1524-1531.

Wada H, Kojo S, Kusama C, Okamoto N, Sato Y, Ishizuka B and Seino K, Successful differentiation to T cells, but unsuccessful B cell generation, from B-cell-derived induced pluripotent stem cells, Int Immunol. 査読有, 23, 2011, 65-74

Shinji H, Yoichi K, Kojo S, Wada H, Seino K, Kiguchi K and Ishizuka B., Clinical Significance of Side Population in Ovarian Cancer Cells. Human cell, 査読有, 24, 2011, 9-12

Kobayashi Y, Seino KI, Hosonuma S, Ohara T, Itamochi H, Isonishi S, Kita T, Wada H, Kojo S, Kiguchi K. Side population is increased in paclitaxel-resistant ovarian cancer cell lines regardless of resistance to cisplatin. Gynecol Oncol. 121, 2011, 390-394

[学会発表] (計 18 件)

Wada H, et al., In vitro T or B lineage differentiation from mouse splenic B cell-derived induced pluripotent stem cells, ISSCR 8th Annual Meeting, 16-19 June 2010, San Francisco

[図書] (計 4 件)

和田はるか、清野研一郎、Notch シグナルによる NK 細胞の分化と機能制御、臨床免疫・アレルギー科、2010、53、126-132

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: PRODUCTION METHOD OF IMMUNE CELLS

発明者：清野研一郎、和田はるか  
権利者：聖マリアンナ医科大学  
種類：US 12/845  
番号：178  
出願年月日：2010/7/28  
国内外の別：外国

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.igm.hokudai.ac.jp/byo-ri/ab  
out1.html](http://www.igm.hokudai.ac.jp/byo-ri/about1.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 はるか (WADA HARUKA)  
聖マリアンナ医科大学・医学（系）研究  
科（研究院）・講師  
研究者番号：70392181

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし