

## 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4月26日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790898

研究課題名（和文） ヒト iPS 細胞からの効率的な造血幹細胞の誘導と増幅法の開発

研究課題名（英文） Development of efficient hematopoietic stem cell differentiation method from human iPS cell

研究代表者

大澤 光次郎 (OSAWA MITSUJIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号：70546770

研究成果の概要（和文）：

本研究では、低分子化合物のスクリーニングより TGFβ 阻害剤がヒト iPS 細胞から造血細胞への分化を促進すること明らかにし、効率的な造血系細胞の分化誘導法を確立した。また、造血幹細胞の発生や自己複製に関与する遺伝子群のスクリーニングより、Sox17 遺伝子が造血能を有する血管内皮様細胞である造血内皮細胞の増殖に関与し、ヒト iPS 細胞からの造血発生において重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To understand the molecular basis of hematopoietic differentiation from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), we first performed chemical compound screening using in vitro differentiation system based on embryoid body (EB) formation. From this screen, we found that several TGFβ inhibitors enhanced hematopoietic cell differentiation. As the result, we established an efficient method for induction of hematopoietic stem and progenitor cells from hiPSCs. 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 SOX17 plays a critical role in priming hemogenic potential of endothelial cells, thereby regulating the hematopoietic development from hiPSCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

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：血液内科学

## 1. 研究開始当初の背景

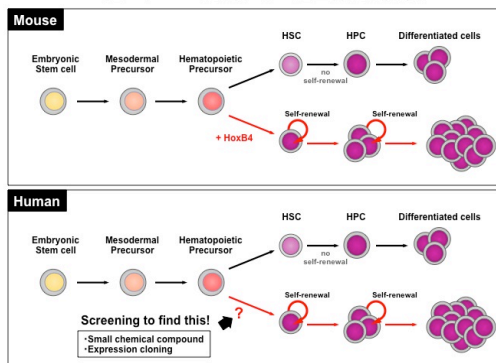
ヒト人工多能性幹細胞（ヒト iPS 細胞）の樹立成功により、ヒト胚性幹細胞（ヒト ES 細胞）に始まった再生医療への期待はより実現性の高いものとなってきた。マウス ES

細胞については、HoxB4 遺伝子を強制発現することにより長期骨髄再構築能をもった成人型造血幹細胞を誘導・増幅することが可能である (Cell 109: 29-37, 2002)。これは ES 細胞から造血幹細胞を誘導しうる画

期的なものであり、いまだ HoxB4 の遺伝子操作なしに ES 細胞から移植可能な造血幹細胞の誘導に成功した例は報告されていない (図 1 上)。この HoxB4 を用いた造血幹細胞誘導系は、様々な造血再生医療の可能性を切り開いた。まず、核移植技術を用いて免疫不全マウスの表皮細胞より ES 細胞を作製し、欠損遺伝子の修復を行った後、HoxB4 遺伝子を用いて造血幹細胞を誘導する。この造血幹細胞を免疫不全マウスに移植することにより免疫機能の回復を得る遺伝子治療モデルが報告された (Cell 109: 17-27, 2002)。この治療モデルは iPS 細胞の発見後速やかに応用された。すなわち、鎌状赤血球貧血症のモデルマウスの表皮細胞より iPS 細胞を作成し、相同組み換えにより変異遺伝子を修復した後、造血幹細胞を誘導し、貧血マウスに移植することにより貧血を治療可能であることが報告された (Science 318: 1920-1923, 2007)。このような ES 細胞・iPS 細胞を用いた遺伝子治療モデルは、遺伝子の相同組み換えを用いることが可能な点において、現在行われている造血幹細胞を用いた遺伝子治療よりも安全性が担保されることが期待される。また、造血不全や白血病などに対する移植治療が自己の細胞由来の iPS 細胞で可能となるなど、移植用の造血幹細胞の供給源として様々な応用が考えられている。

しかしながら、ヒト ES 細胞からの長期骨髄再構築可能な造血幹細胞の分化誘導はいまだ厳しい現状にある。これまでにヒト ES 細胞から造血系細胞また長期骨髄再構築可能な造血幹細胞への誘導に関するいくつかの報告がなされているが (J Exp Med 201: 1603-1614, 2005, Exp Hematol 32: 1000-1009, 2006, Cell Stem Cell 3: 85-98, 2008)、ヒト ES 細胞より誘導される造血幹細胞の分化誘導効率は低く、その増殖は一過性で造血幹細胞を長期にわたり維持することはできない。ヒト ES 細胞における HoxB4 の効果はマウス ES 細胞と同様ではなく、HoxB4 遺伝子はヒト ES 細胞において血液系細胞への分化誘導・増殖を促進するが、造血幹細胞の増幅は認められていない (J Exp Med 201: 1603-1614, 2005)。これは、ES 細胞からの成体型造血幹細胞の発生・増幅機構がマウスとヒトでは異なることを意味するのか現段階では判然としていない。ヒト ES/iPS 細胞から長期骨髄再構築能をもった成人型造血幹細胞の誘導・増幅には、造血幹細胞への specification だけでなく、胎児型造血から成人型造血への移行といった遺伝子プログラミングの書換えに関わる分子機構を明らかにする必要がある (図 1 下)。

(図 1) ES細胞からの造血幹細胞分化



## 2. 研究の目的

本研究は、ヒト iPS 細胞を用いた造血系再生医療における基盤技術の確立を行うことを目的とする。この目的を達成するために、多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) からの造血幹細胞発生に関与する遺伝子群の探索・同定を行い、その分子機構を明らかにする。また、ヒト ES/iPS 細胞から長期骨髄再構築可能な造血幹細胞を効率的に誘導・増幅する系の開発を行う。

## 3. 研究の方法

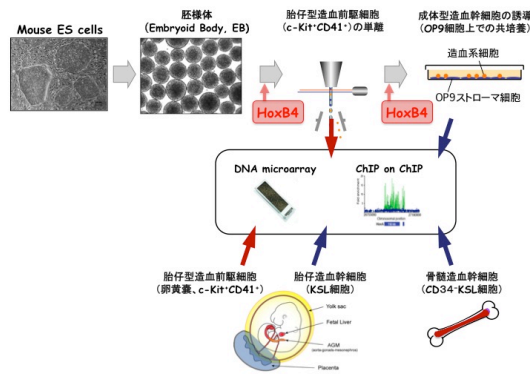
### (1) HoxB4 による造血幹細胞誘導の分子制御機構の解析

Kyba らの報告 (Cell 109: 29-37, 2002) より、HoxB4 遺伝子が ES 細胞に由来する胎仔型造血前駆細胞から成体型造血幹細胞へのプログラミングに関与していることから、造血幹細胞発生期における HoxB4 の標的遺伝子の探索を行う。in vitro 分化誘導実験系を用い、Tet-on システムによる HoxB4 の発現誘導系を組み込んだマウス ES 細胞 (Cell 109: 29-37, 2002) より胚様体 (Embryoid Body, EB) を作製し、胎仔型造血前駆細胞を誘導する。HoxB4 遺伝子を発現誘導した胚様体と発現誘導を行わなかった胚様体より c-Kit<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>胎仔型造血前駆細胞分画を採取し、DNA マイクロアレイ解析と ChIP-on-chip 解析を行い、HoxB4 遺伝子が制御する遺伝子群をリストアップする (図 2 - 赤矢印)。それらの解析結果と ES 細胞由来の胎仔型造血前駆細胞に相当する卵黄囊 (yolk sac) の c-Kit<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>胎仔型造血前駆細胞分画、また成体型造血幹細胞に相当する CD34<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>Lineage<sup>-</sup> (CD34<sup>+</sup>KSL) 骨髄造血幹細胞の発現遺伝子プロファイルを比較することにより、胎仔型造血前駆細胞から成体型造血幹細胞へのプログラミングに関与する標的遺伝子のさらなる絞り込みを行うことが可能と考えられる。

また、HoxB4 遺伝子は成人型造血幹細胞の

増幅・自己複製にも重要な役割を担っていることから (Cell 109: 39-45, 2002)、成体造血幹細胞の増幅・自己複製に関する HoxB4 遺伝子の標的遺伝子についても探索を試みる。前述の HoxB4 の発現誘導系を組み込んだマウス ES 細胞より誘導した c-Kit<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>胎仔型造血前駆細胞を OP9 ストローマ細胞上で共培養を行う。OP9 ストローマ細胞上で HoxB4 遺伝子を発現誘導した細胞群と発現誘導を行わなかった細胞群より誘導された未分化造血細胞 (c-Kit<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>細胞) と骨髓造血幹細胞 (CD34<sup>+</sup>KSL 細胞)、また胎仔肝造血幹細胞 (KSL 細胞) について DNA マイクロアレイ解析と ChIP-on-chip 解析を行い、それらの細胞群の発現遺伝子プロファイルの比較検討を行う (図2-青矢印)。

(図2) HoxB4 標的遺伝子探索の概要

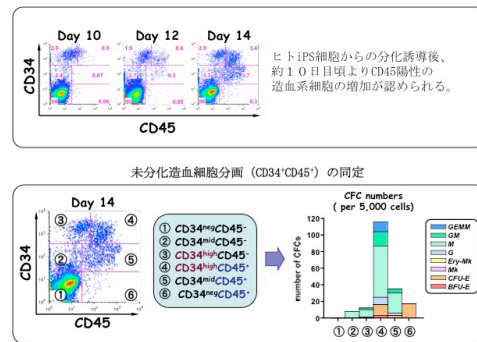


## (2) 造血幹細胞の発生・自己複製においてその重要性が示されている遺伝子の解析

ヒト ES 細胞における HoxB4 の効果はマウス ES 細胞と同様ではなく、ヒト ES 細胞においては HoxB4 遺伝子による造血幹細胞の誘導・増幅は認められない。これらの知見は ES 細胞から成体型造血幹細胞の発生・増幅における HoxB4 の重要性を示す一方で、ヒト細胞においては HoxB4 以外の因子の存在を示唆するものである。そこで、胎仔期の造血幹細胞発生、また成体造血幹細胞の増幅・自己複製において重要な役割を担っている遺伝子群をヒト iPS 細胞由来の造血前駆細胞や未分化造血細胞に発現させ、造血幹細胞の誘導・増幅について解析を行う。その候補遺伝子として、胎仔臍動脈内や AGM 領域 (大動脈生殖原器-中腎領域) を起源とする造血幹細胞の発生に必須な Runx1/AML1 遺伝子、胎仔期および新生仔期の造血幹細胞の維持・増幅に重要な役割を担っている Sox17 遺伝子、成体型造血幹細胞の自己複製に関与するポリコム遺伝子群の中でも中心的な役割を担っている Bmi1 遺伝子、造血細胞の維持・増幅に重要な役割を担っている転写因子 SCL/Tal-1 や GATA-2 遺伝子、また最終的に

骨髓増殖性疾患を誘発するもののマウス ES 細胞より造血幹細胞を誘導することが報告されている白血病関連遺伝子である Bcr-Abl 遺伝子を予定している。申請者は、ヒト iPS 細胞より造血系細胞を効率的に誘導する実験系を確立し、また造血前駆細胞 (CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>) や未分化造血細胞 (CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) の分画を同定している (図3)。これらの細胞に候補遺伝子を単独または複数発現させる、あるいは HoxB4 と共発現させることにより、ヒト iPS 細胞からの造血幹細胞誘導における役割について詳細に検証する。

(図3) ヒト iPS 細胞からの造血系細胞分化



## (3) 新規造血幹細胞誘導因子の同定

前述のように、ヒト ES 細胞からの造血幹細胞誘導においては HoxB4 以外の因子の存在が示唆されることから、以下のスクリーニング系を用いた遺伝子発現クローニングにより新規造血幹細胞誘導因子の同定を試みる。

① in vitro 遺伝子スクリーニング: ヒト iPS 細胞より分化誘導された造血前駆細胞または未分化造血細胞にレトロウイルス cDNA ライブラリーを感染させ、ストローマ細胞上で培養を行い、長期にわたり増殖を示す血液系細胞から遺伝子を同定する。この遺伝子スクリーニングでは、造血幹細胞の増殖や自己複製に関与する遺伝子、細胞の腫瘍化に関与する遺伝子、また造血前駆細胞から造血系細胞への分化を促進する遺伝子等の同定が予測されるが、個々の遺伝子の解析によりその機能を明らかにする。

② in vivo 遺伝子スクリーニング: 同様に、ヒト iPS 細胞より分化誘導された造血前駆細胞または未分化造血細胞にレトロウイルス cDNA ライブラリーを感染させた後、放射線照射マウスに移植し、長期骨髓再構築能を検証する。長期に生着する造血細胞が確認できれば回収し、導入された遺伝子を同定する。この in vivo を用いた遺伝子スクリーニングでは、造血幹細胞への分化・増殖または自己複製に直接関与する遺伝子の同定が期待される。

③ 低分子化合物のスクリーニング: ヒト iPS 細胞より分化誘導された造血前駆細胞を用い、細胞シグナル経路や転写制御等の活性作用点が明らかにされている約 1000 種類の低分子化合物について、造血系細胞の分化・増殖を亢進させる低分子化合物のスクリーニングを行う。

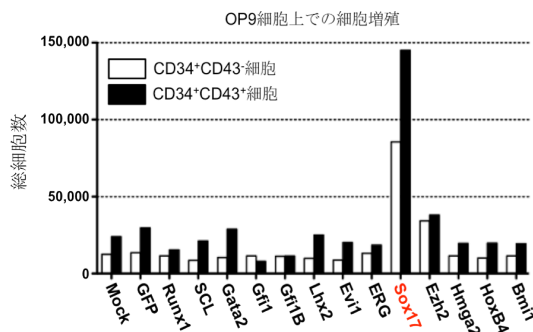
#### (4) ヒト iPS 細胞からの造血幹細胞誘導系の確立

上記の研究成果をもとに絞り込んだ候補遺伝子または低分子化合物について、ヒト iPS 細胞における効果を in vitro の培養系と免疫不全マウスを用いた移植実験系により検証する。また、造血幹細胞への分化誘導効果が認められる遺伝子においては、その代替低分子化合物による効果、またそれら遺伝子や低分子化合物の組み合わせによる相同効果についても検証し、ヒト iPS 細胞から造血幹細胞を効率良く誘導する系を構築する。

#### 4. 研究成果

研究計画①「HoxB4 による造血幹細胞誘導の分子制御機構の解析」においては、マウス ES 細胞からの造血幹細胞誘導において重要な役割を担っている HoxB4 遺伝子の標的遺伝子の同定を行ない、Microarray 解析と Chip-on-chip 解析の結果より、Runx1、SCL、Gata2、Gfi1、c-Myc といった造血幹細胞の発生や維持に重要な多くの転写因子群遺伝子の発現を HoxB4 が直接制御していることが明らかにした。これらの結果は Blood 誌に掲載された。

研究計画②「造血幹細胞誘導に関与する遺伝子の解析」においては、造血幹細胞の発生、維持、増幅や自己複製において重要な役割を担っている遺伝子群の遺伝子スクリーニングを行なった。その結果、Sox17 遺伝子をヒト ES 細胞に由来する未分化造血細胞に過剰発現させることにより、造血前駆細胞にあたる造血内皮様細胞 (Hemogenic endothelial cell: 造血能を有する血管内皮細胞) の恒常的増殖が確認された (特願 2010-193827 号) (下図参照)。

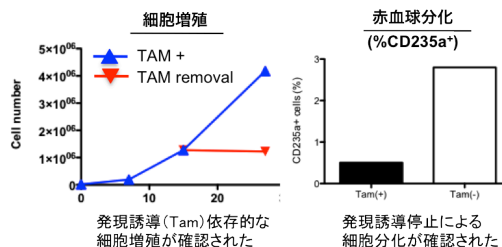
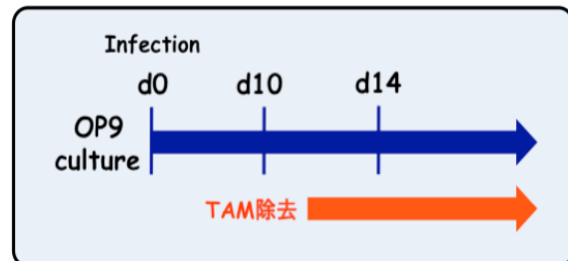


この Sox17 遺伝子にエストロゲンレセプターを結合させた Sox17-ERT 遺伝子による遺伝子発現調節系を用いた解析では、Sox17-ERT 遺伝子の誘導により Sox17 遺伝子の過剰発現と同様に造血内皮様細胞の増殖が確認され、その後 Sox17-ERT 遺伝子を抑制することにより造血細胞への分化が認められた (下図参照)。これらの結果は、ヒト ES 細胞より誘導された前造血細胞や造血幹前駆細胞に Sox17 遺伝子を過剰発現することにより誘導される細胞が造血能を有する血管内皮様細胞である造血内皮様細胞であることを明らかにし、造血内皮細胞における Sox17 遺伝子の重要性を示した最初の知見である。これらの成果については特許申請 (特願 2010-193827 号) を行い、また論文投稿中である。

#### mSox17-ERT

Tamoxifen: 0.2 mg/ml (発現誘導因子)

Tamoxifen 除去: OP9-day10-14



研究計画③「新規造血幹細胞誘導因子の探索」においては、低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、TGF β 阻害剤による造血系細胞の誘導促進効果が認められた。それらの成果については特許申請 (特願 2010-193828 号) を行い、また論文投稿中である。

研究計画④「ヒト iPS 細胞からの造血幹細胞誘導系の確立」においては、研究計画①②③の成果をもとにヒト iPS 細胞より造血系細胞を効率良く誘導する系を確立することができた。しかしながら、造血幹細胞の誘導には至っておらず、今後さらなる研究開発が必要である。

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4件)

- ①. Nishino T, Osawa M and Iwama A.  
New approaches to expand hematopoietic stem and progenitor cells.  
*Expert Opinion on Biological Therapy*,  
査読有、in press、2012  
DOI: [10.1517/14712598.2012.681372](https://doi.org/10.1517/14712598.2012.681372)
- ②. Nishino T, Wang C, Mochizuki-Kashio M, Osawa M, Nakauchi H, and Iwama A.  
Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by garcinol, a potent inhibitor of histone acetyltransferase. *PLoS ONE*,  
査読有、6巻、2011、e24298、2011、  
DOI: [10.1371/journal.pone.0024298](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024298)
- ③. Oshima M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Nakajima-Takagi Y, Sugiyama F, Koseki H, Kyba M, Iwama A, Osawa M.  
Genome-wide analysis of target genes regulated by HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells. *Blood*,  
査読有、117巻、2011、e142-e150  
DOI: [10.1182/blood-2010-12-323212](https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-323212)
- ④. 大澤光次郎: リプログラミングによる多能性造血前駆細胞創出の現状と展望、血液内科、査読無、63巻、2011、344-347  
<http://www.kahyo.com/brand/b-KS201109-633>

[学会発表] (計5件)

- ① Mitsujiro Osawa : Hematopoietic differentiation of human iPS cells induced by forced expression of hematopoietic key regulators、第73回日本血液学会、2011.10.14、名古屋
- ② Mitsujiro Osawa : Hematopoietic differentiation of human iPS cells induced by forced expression of hematopoietic key regulators、The 9th Stem Cell Research Symposium、2011.5.14、Tokyo (Japan)
- ③ Mitsujiro Osawa : Challenging of hematopoietic stem cell differentiation from human induced pluripotent stem cells、CREST/さきがけ「iPS細胞」研究領域合同シンポジウム、2011.1.14、東京
- ④ Mitsujiro Osawa : Genome-wide analysis of

target genes regulated by HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells、第72回日本血液学会、2010.9.24、横浜

- ⑤ Mitsujiro Osawa : Molecular mechanism of HoxB4 mediated self-renewal、The 8th Stem Cell Research Symposium、2010.5.15、Awaji (Japan)

[図書] (計1件)

- ① 大澤光次郎、大津真、岩間厚志  
造血幹細胞と再生医療、実験医学増刊号28(2)、2011、247-254  
<http://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758103046/>

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

- ①名称: ヒト多能性幹細胞からの造血幹細胞の効率的な誘導方法  
発明者: 岩間厚志、大澤光次郎、中島やえ子  
権利者: 国立大学法人 千葉大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2010-193827  
出願年月日: 23年8月31日  
国内外の別: 国内
- ②名称: 造血幹細胞の効率的な誘導および増幅方法  
発明者: 岩間厚志、大澤光次郎、大島基彦、小沼貴晶  
権利者: 国立大学法人 千葉大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2010-193828  
出願年月日: 23年8月31日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/molmed>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 光次郎 (OSAWA MITSUJIRO)  
千葉大学・大学院医学研究院・特任講師  
研究者番号: 70546770

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者