

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2112

課題番号：23659483

研究課題名（和文） 血液細胞の造血幹細胞へのダイレクトリプログラミング

研究課題名（英文） Direct reprogramming of hematopoietic cells into hematopoietic stem cells

研究代表者

岩間 厚志（IWAMA ATSUSHI）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70244126

研究成果の概要（和文）：本研究においては、造血転写制御遺伝子を組み合わせることで分化血液細胞に導入し、造血幹細胞へとリプログラム可能な系を確立することにより、造血幹細胞の形質を規定する転写因子群の最小限の組み合わせを明らかにすることにより、造血幹細胞制御の分子機構を理解するとともに、血液細胞の造血幹細胞へのダイレクトリプログラミングにより、iPS細胞を介さない新しい造血系再生医療の可能性を検証することを目的とした。E2A欠損pro-B細胞に、重要な造血転写制御遺伝子群を組み合わせることで導入し、造血幹細胞・多能性前駆細胞へのダイレクトリプログラミングに挑戦したが、骨髄球系前駆細胞の表現型を有する細胞が増幅されたのみで、いまだリプログラミングには成功していない。目的の達成にはさらなる技術的改善が必要である。

研究成果の概要（英文）：Direct reprogramming of somatic cells into hematopoietic stem cells is challenging and has not been yet achieved. In this study, I tried to reprogram an *E2A*-deficient pro-B cell line, which retain multipotent differentiation capacity, into hematopoietic stem cells. Various combinations of key transcription factors known to be essential for hematopoietic stem cells were transduced into *E2A*-deficient pro-B cells and cultured on stromal cells in a medium which supports hematopoietic stem cells. I observed generation of myeloid cells expanding in culture, but failed to obtain hematopoietic stem cells in this trial. To achieve the real reprogramming, more technical renovation is definitely needed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：ダイレクトリプログラミング、造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

造血系においては各細胞系譜の分化を制御するマスター因子が明らかにされており、その発現操作による分化転換（lineage switch）が可能である。申請者も好酸球（Gata1, C/EBPα）や樹状細胞（PU.1）の分化に重要な転写因子群を報告してきた（J Exp Med 195, 547-558, 2002; J Exp Med 195, 1379-1386, 2002）。一方で近年臓器細胞3つ

の転写因子の組み合わせでBeta細胞へ分化転換させるダイレクトリプログラミングが報告され、iPS細胞を介さないさまざまな機能細胞へのダイレクトリプログラミングが試みられている。しかし、特定の組織幹細胞、あるいは多能性前駆細胞へのダイレクトリプログラミングの報告はない。この試みは、分化の詳細や自己複製能を実験的に検証する確実な系が存在する幹細胞に関して可能

となるものであり、そのような幹細胞は現時点では ES 細胞と造血幹細胞などに限られるものと考えられる。したがって、組織幹細胞のなかでは造血幹細胞こそ可能な解析と考えられる。このような中、B細胞分化決定に必須な転写因子 (E2A, Ebf1, Pax5) の遺伝子欠損マウスにおいて、B細胞分化が pro-B 細胞の段階で停止し、pro-B 細胞が T 細胞、顆粒球、マクロファージへと脱分化することが報告されている (Reviewed by Cobaleda et al. Nat Immunol 8, 463, 2007)。この知見は、特定の血液細胞系譜への最終的な分化決定がなされない状況においては分化の可塑性が維持されることを示し、造血細胞の脱分化の可能性を示すものである。しかしながら、E2A, Ebf1, あるいは Pax5 を欠損する pro-B 細胞はいずれも赤芽球・巨核球分化能は有さず自己複製能も持たない。したがって、これら pro-B 細胞は多能性前駆細胞・造血幹細胞へのダイレクトリプログラミングに最適な細胞と考えられる。今回、申請者らは、既にある程度の分化の可塑性を有し、脱分化しうる E2A 欠損 pro-B 細胞に着目した。この細胞は多能性造血前駆細胞に近い段階まで脱分化可能と考えられ、造血幹細胞・多能性前駆細胞へとリプログラミングする過程において障壁となる脱分化のステップが少なく、ダイレクトリプログラミングを試みるには最適な細胞と考えられる。

2. 研究の目的

iPS 細胞は、ES 細胞に代表される多能性幹細胞の形質維持に必須な転写因子 (Oct4, Sox2, Nanog) をリプログラム因子として用いるが、造血幹細胞の形質維持に重要な分子の中で、Oct4, Sox2, Nanog に相当する分子は明らかとなっていない。本研究においては、既知の造血転写制御因子を組み合わせて分化血液細胞に導入し、造血幹細胞へとリプログラム可能な系を確立することにより、造血幹細胞を規定する転写因子群の組み合わせを明らかにすることにより、造血幹細胞制御の分子機構を理解するとともに、血液細胞の造血幹細胞へのダイレクトリプログラミングにより、iPS 細胞を必要としない新しい造血系再生医療の可能性を検証する。本研究が成功すれば、多能性や自己複製能を獲得するメカニズムの理解、すなわち造血幹細胞の自己複製能・多能性を規定する分子の同定に直結し、造血幹細胞機能制御の分子機構の全貌に近づくことが可能である。また、いまだ実現されていない分化細胞の組織幹細胞へのダイレクトリプログラムが可能となれば、組織幹細胞の分子基盤の理解を大いに進めるとともに、再生医学に iPS 細胞を介さない新しい組織幹細胞分化誘導法を提示することになり、その影響力は計り知れない。ま

た、再生医療の推進にも必ずつながるものと考えられ、産業界への波及効果も大である。

3. 研究の方法

E2A 欠損 pro-B 細胞に、既知の重要な造血転写制御因子を組み合わせて導入し、造血幹細胞・多能性前駆細胞へのダイレクトリプログラミングに挑戦する。転写因子としては、Gata2, Runx1, SCL, HoxB4, ERG, Flil, Gfil, Gfil1B, Bmi1, Ezh2 などを用いる。これらを発現するレトロウイルスを作製し、様々な組み合わせで E2A 欠損 pro-B 細胞に導入し、in vitro で培養後、コロニーアッセイを行い、赤芽球・巨核球を含む混合コロニーを形成する組み合わせを選別する。また、放射線照射マウスに移植し、長期に骨髄を再構築可能なクローンの選別を行う。上記の実験に FACS 解析を組み合わせて造血幹細胞分画 ($CD34^+c\text{-Kit}^+Sca\text{-1}^+Lineage^-$ or $CD150^+c\text{-Kit}^+Sca\text{-1}^+Lineage^-$)、あるいは多能性前駆細胞分画 ($Flt3^+c\text{-Kit}^+Sca\text{-1}^+Lineage^-$) の存在を確認し、存在が確認できればソートしてその多能性、自己複製能に関して検証する。以上の解析を通して、造血幹細胞・多能性前駆細胞へのダイレクトリプログラミングに必要な最小限の転写因子群を同定する。

4. 研究成果

E2A 欠損 pro-B 細胞に、重要な造血転写制御遺伝子群 (前述) を組み合わせて導入し、造血幹細胞・多能性前駆細胞へのダイレクトリプログラミングに挑戦した。E2A 欠損 pro-B 細胞の維持には Tst4 stromal cell との共培養が必要であり、遺伝子をレトロウイルスで感染後、細胞を Tst4 細胞上で維持し、徐々にサイトカインを造血幹細胞の維持に必要な SCF と TPO に置換して培養を継続した。遺伝子導入細胞の中で骨髄球系前駆細胞の表現型を有する細胞の増殖が見られたが、赤芽球・巨核球の分化は認められず、いずれもマクロファージ系細胞へと分化してしまった。未分化な状態で維持可能な細胞は得られておらず、いまだ目的のリプログラミングには成功していない。リプログラミングに必要な遺伝子が今回の準備した中には含まれていなかった可能性もある。今後、画期的な技術改変が必要であると考えられた。発現クローニングにより、E2A 欠損 pro-B 細胞が多能性 (赤芽球・巨核球分化能) あるいは造血幹細胞としての自己複製能を獲得し得る責任分子を同定するなどの方法が考えられる。具体的には、Pax5^{-/-} pro-B 細胞に造血幹細胞から作製したレトロウイルス cDNA ライブラリーを感染後、赤芽球・巨核球分化を誘導する条件下で培養を行い、赤芽球・巨核球分化能を有

する多能性前駆細胞へのリプログラミングを誘導する遺伝子を同定する。さらに、感染細胞を放射線照射マウスに移植し、pro-B細胞を長期骨髄再建能を有する細胞へとリプログラミングしうる遺伝子群を同定する。このような試みが今後必要になるであろう。

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 13 件)

- (1) Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Miyagi S, Endoh M, Endo TA, Takayama N, Eto K, Toyoda T, Koseki H, Nakauchi H, and Iwama A. Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. **Blood** 121, 447-458, 2013. (査読あり)
- (2) Harada Y, Inoue D, Ding Y, Imagawa J, Doki N, Matsui H, Yahata T, Matsushita H, Ando K, Sashida G, Iwama A, Kitamura T, and Harada H. RUNX1/AML1 mutant collaborates with BMI1 overexpression in the development of human and murine myelodysplastic syndromes. **Blood** 121, 3434-3446, 2013. (査読あり)
- (3) 岩間厚志 (2013) 「幹細胞老化とエピジェネティクス」アンチ・エイジング医学-日本抗加齢医学会雑誌 9(1):16-22. pp.1-8. (査読なし)
- (4) Iwama A. Epigenetics of hematopoiesis and hematological malignancies. **Int J Hematol** 96:403-404, 2012. (査読あり)
- (5) Sashida G and Iwama A. Epigenetic regulation of hematopoiesis. **Int J Hematol** 96:405-412, 2012. (査読あり)
- (6) Tanaka S, Miyagi S, Sashida G, Chiba T, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Suzuki Y, Sugano S, Nakaseko C, Yokote K, Koseki H, and Iwama A. Ezh2 augments leukemogenicity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia. **Blood** 120, 1107-1117, 2012. (査読あり)
- (7) Sakai S, Nakaseko C, Takeuchi M, Ohwada C, Shimizu N, Tsukamoto S, Kawaguchi T, Jiang M, Sato Y, Ebinuma H, Yokote K, Iwama A, Fukamachi I, Schneider WJ, Saito Y, and Bujo H. Circulating soluble LR11/SorLA levels are highly increased and ameliorated by chemotherapy in acute leukemias. **Clinica Chimica Acta** 413, 1542-1548, 2012. (査読あり)
- (8) Shide K, Kameda T, Shimoda H, Yamaji T, Abe H, Kamiunten A, Sekine M, Hidaka T, Katayose K, Kubuki Y, Yamamoto S, Miike T, Iwakiri H, Hasuike S, Nagata K, Iwama A, Matsuda T, Kitanaka A and Shimoda K. TET2 is essential for survival and hematopoietic stem cell

homeostasis. **Leukemia** 26:2216-2223, 2012. (査読あり)

- (9) Nishino T, Osawa M, and Iwama A. New approaches to expand hematopoietic stem and progenitor cells. **Expert Opin Biol Ther** 12, 743-756, 2012. (査読あり)
- (10) Nakamura S, Oshima M, Yuan J, Saraya A, Miyagi S, Konuma T, Yamazaki S, Osawa M, Nakauchi H, Koseki H, and Iwama A. Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells. **PLoS ONE** 7, e36209, 2012. (査読あり)
- (11) Oguro H, Yuan J, Tanaka S, Miyagi S, Mochizuki-Kashio M, Ichikawa H, Yamazaki S, Koseki H, Nakauchi H, and Iwama A. Lethal myelofibrosis induced by *Bmi1*-deficient hematopoietic cells unveils a tumor suppressor function of the polycomb group genes. **J Exp Med** 209, 445-454, 2012. (査読あり)
- (12) 指田吾郎、千葉哲博、岩間厚志 (2012) 「癌幹細胞とエピゲノム制御異常」細胞工学 31:24-31. (査読なし)

[学会発表] (計 20 件)

- (1) Osawa M, Nakajima Y, Oshima M, Takagi H, Iwama A. (2013) Critical role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. CiRA International Symposium 2013. March 11-12 (Kyoto, Japan) (oral)
- (2) 武藤朋也, 岩間厚志 (2013) 「MD S 発症におけるポリコム遺伝子 Ezh2 の」関与」第 17 回造血器腫瘍研究会兼、がん研究開発費「がん幹細胞に対する新規分子法的治療薬の開発を目指した基盤研究」班会議 2 月 1 日～2 月 2 日 (宮崎) (オーラル)
- (3) Osawa M, Nakajima Y, Oshima M, Takagi H, Iwama A. (2013) Critical role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. Keystone Symposium : Hematopoiesis. January 15-19 (Colorado, U.S.A.) (poster)
- (4) Sashida G, Tanaka S, Mochizuki-Kashio M, Saraya A, Muto T, Iwama A. (2012) Loss of Ezh2 promotes the development of mutant-RUNX1 induced MDS. 54th ASH Annual Meeting and Exposition. December 8-11 (Atlanta, U.S.A.) (Oral)
- (5) Muto T, Sashida G, Oshima M, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Iwama A. (2012) Long-Term cell autonomous effect of Tet2 loss in hematopoietic cells in mice. 54th AHS Annual Meeting and Exposition. December 8-11 (Atlanta, U.S.A.) (Poster)
- (6) Iwama A. (2012) Role of the polycomb group proteins in the maintenance of hematopoietic stem cells and restriction of tumor development.

The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. October 19-21 (Kyoto, Japan) (Oral)

(7) Wendt G, Iwama A. (2012) The role of long intergenic non-coding RNAs in hematopoietic stem cells. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. October 19-21 (Kyoto, Japan) (Poster)

(8) Wang C, Nakamura S, Kusunoki Y, Kyoizumi S, Imai K, Nakachi K, Iwama A. (2012) Radiation effects on human HSPCs in vivo. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. October 19-21 (Kyoto, Japan) (Poster)

(9) 中島やえ子, 岩間厚志 (2012) 「ヒト ES 細胞からの造血細胞分化における SOX17 の役割」 第 7 4 回日本血液学会学術集会 1 0 月 1 9 日 ~ 2 1 日 (京都) (オーラル)

(10) Iwama A. (2012) Role of the polycomb group proteins in the maintenance of hematopoietic stem cells and restriction of tumor development. 41st Annual Scientific Meeting of the ISEH. August 23-26 (Amsterdam, Netherlands) (Oral)

(11) Wendt G, Iwama A. (2012) Profiling of long intergenic non-coding RNAs in hematopoietic stem cells. 41st Annual Scientific Meeting of the ISEH. August 23-26 (Amsterdam, Netherlands) (Poster)

(12) 望月牧子, 岩間厚志 (2012) 「胎生期の造血幹細胞と成体の造血幹細胞とは、ポリコム遺伝子 E z h 2 への依存性が異なる」 第 8 回麒麟塾 7 月 7 日 (東京) (オーラル)

(13) 宮城聡, 岩間厚志 (2012) 「H b o 1 - B r d 1 / B r p f 2 複合体は、H 3 K 1 4 のグローバルなアセチル化を引き起こし、胎生期肝における赤血球造血に必須である」 第 8 回麒麟塾 7 月 7 日 (東京) (オーラル)

(14) 岩間厚志 (2012) 「ヒストン修飾による造血幹細胞の機能制御」 シンポジウム 「幹細胞の転写制御、エピジェネティック制御」 第 3 3 回日本炎症・再生医学会 7 月 5 日 (福岡) (オーラル)

(15) Iwama A. (2012) Role of the polycomb group proteins in the maintenance of hematopoietic stem cells and restriction of tumor development. IMSUT & RCAST Global COE Program Mini-Symposium. June 18 (Tokyo, Japan) (Oral)

(16) Osawa M, Takagi H, Nakajima Y, Endoh M, Endo T, Iwama A. (2012) Inhibition of TGF-BETA signaling in the early mesoderm stage promotes the development of hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells. ISSCR 10th Annual Meeting. June 13-16 (Yokohama, Japan) (Poster)

(17) Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M,

Takagi H, Iwama A. (2012) The critical role of SOX17 in the development of early hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells. ISSCR the 10th Annual Meeting. June 13-16 (Yokohama, Japan) (Poster)

(18) Oshima M, Nakamura S, Saraya A, Miyagi S, Koseki H, Iwama A. (2012) Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells. ISSCR the 10th Annual Meeting. June 13-16 (Yokohama, Japan) (Poster)

(19) Iwama A. (2012) Lethal myelofibrosis induced by *Bmi1*-deficient hematopoietic cells unveils a tumor suppressor function of the polycomb group genes. The 10th Stem Cell Research Symposium. May 31-June 2 (Awaji, Japan) (Oral)

(20) Osawa M, Nakajima Y, Oshima M, Takagi H, Endoh M, Endo T, Iwama A. (2012) Critical role of SOX17 in the hematopoietic development from human embryonic stem cells. The 10th Stem Cell Research Symposium. May 31-June 2 (Awaji, Japan) (Oral)

〔図書〕 (計 3 件)

(1) 岩間厚志 (2013) 「造血幹細胞のエピジェネティクス」 Annual Review 血液 (高久史麿、小澤敬也、坂田洋一、金倉謙、小島勢二編) pp.1-8, 中外医学社、東京

(2) 岩間厚志 (2012) 「幹細胞のエピジェネティクス」 「再生医療叢書 1 幹細胞」 (山中伸弥、中内啓光編) pp.142-156, 朝倉書店、東京

(3) 指田吾郎, 岩間厚志 (2012) 「白血病幹細胞におけるエピジェネティクス制御」 「造血器腫瘍とエピジェネティクス」 (木崎昌弘編) pp.60-70, 医薬ジャーナル、大阪

(4) 岩間厚志 (2012) 「造血幹細胞」 「みんなに役立つ造血幹細胞移植の基礎と臨床」 (神田善伸編) pp. 28-34, 医薬ジャーナル社、大阪

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩間 厚志 (IWAMA ATSUSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 70244126

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし