

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591415

研究課題名(和文) 転写因子によるヒト iPSC 細胞から造血幹細胞への新規分化誘導システムの開発

研究課題名(英文) Development of novel differentiation induction system of hematopoietic stem cells from human induced pluripotent stem cells

研究代表者

北島 健二 (KITAJIMA, Kenji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：10346132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円

研究成果の概要(和文)：我々は、マウス人工多能性幹細胞(iPSCs)から造血幹細胞(HSCs)様の細胞へ分化誘導することに成功している。マウス iPSCs を造血性血管内皮細胞(HECs)へ分化させ、マウス骨髄 HSCs の体外増幅活性を有する転写因子 Lhx2 を発現させると、HSC 様の細胞が得られる。この知見に立脚し、ヒト iPSC から HSC への誘導法開発を試みた。まず、ヒト iPSC から血液細胞への効率的な分化誘導法開発をおこなった。その結果、GSK3 阻害剤により、効率よく血液細胞に分化誘導できることが判明した。そこで、ヒト iPSC 由来の HECs に Lhx2 の強制発現をおこなったが、HSCs はほとんど得られなかった。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that hematopoietic stem cell (HSC)-like cells were obtained from mouse induced pluripotent stem cells (iPSCs). When mouse iPSCs are differentiated into hemogenic endothelial cells (HECs) and a transcription factor Lhx2, known to induce ex vivo amplification of adult HSCs, is introduced, HSC-like cells are differentiated. Based on this finding, we challenged to induced HSCs from human iPSCs. First, we established an efficient in vitro hematopoietic differentiation induction system from human iPSCs. We found that a GSK3beta inhibitor greatly improved hematopoietic differentiation from human iPSCs. Using this method, we carried out enforced expression of Lhx2 into human iPSC-derived HECs. However, HSC-like cells were hardly obtained.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：iPS細胞 造血幹細胞 ホメオボックス 細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト人工多能性幹細胞 (iPSCs) から造血幹細胞 (HSCs) への試験管内分化誘導システムの確立は、ヒト HSCs の発生メカニズムの解明、およびヒト iPSCs を用いた再生医療の実現に重要である。

我々は、マウス iPSCs・マウス胚性幹細胞 (ESCs) から HSC 様細胞への分化誘導に成功した。

マウス iPSCs・ESCs を OP9 ストロマ細胞との共培養により、中胚葉細胞へ分化誘導し、Lhx2 をレトロウイルスベクターにより、強制発現させると、Lineage<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup> (LSK) 細胞が大量に得られることが判明した。LSK 細胞は、マウス骨髄では、HSCs を含む細胞集団である。

Lhx2 により誘導されたマウス ESC・iPSC 由来の LSK 細胞を放射線照射したマウスへ移植すると、移植後 4 ヶ月以上、成熟血液細胞を産生し続け、2 次移植にも成功した。

Lhx2 により得られた LSK 細胞は、成体内において、赤血球、好中球・マクロファージ、巨核球・血小板、B リンパ球へ分化したが、T リンパ球へは分化しなかった。

## 2. 研究の目的

マウス ESCs・iPSCs を用いて、Lhx2 による HSC 様細胞の誘導メカニズムと、この HSC 様細胞から T 細胞へ分化誘導法の開発、Lhx2 を利用したヒト iPSCs から HSC 様細胞への分化誘導システムの開発を目的とした研究を展開した。

## 3. 研究の方法

(1) Lhx2 の発現をドキシサイクリン (dox) により誘導できるマウス ESCs (iLhx2-ESCs) を樹立し、この ESCs を用いることで、Lhx2 の作用機序の解明をおこなった。また、この ESCs から Lhx2 の強制発現により得られた LSK 細胞をマウスへ移植し、血液細胞分化の解析を行なった。さらに、骨髄 LSK 細胞、胎仔肝 LSK 細胞に Lhx2 の強制発現をおこない、LSK 細胞の試験管内自己複製、および T 細胞分化に関する解析を行なった。

(2) ヒト iPSCs から効率よく血液細胞へ分化誘導できる方法を開発した。

(3) ヒト iPSCs から血液細胞への分化過程において Lhx2 の強制発現をおこない、HSC 様細胞が得られるかどうかを調べた。

## 4. 研究成果

(1) マウス ESCs・iPSCs を OP9 ストロマ細胞と共培養すると、側板中胚葉細胞 (Flk-1<sup>+</sup>細胞)、造血性血管内皮細胞 (HECs, Tie-2<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>細胞)、造血前駆細胞 (HPCs, CD41<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>細胞) を経て、成熟血液細胞へ

分化する。iLhx2-ESCs を用いて、これらの分化段階において、Lhx2 の強制発現をおこなった結果、① Lhx2 は、ESCs から HECs への分化を強く阻害すること、② HECs へ分化後に Lhx2 を発現させると、LSK 細胞を誘導できること、③ Lhx2 は、CD41<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup> HPCs から成熟血液細胞への分化を阻害し、CD41<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup> HPCs のまま自己複製させること、を見出した。

このことから、Lhx2 は、マウス ESC・iPSC 由来の CD41<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup> HPCs に自己複製能を付与することにより、HSC 様細胞へと変換していることが明らかとなった。

(2) Lhx2 を、レトロウイルスベクターを用いて、マウス骨髄 LSK 細胞へ遺伝子導入し、試験管内で培養する、長期 (1 ヶ月以上) にわたって増殖し続ける細胞が出現し、その中には、LSK 細胞が含まれていることが判明した。この細胞を放射線照射したマウスへ移植すると、長期骨髄再建能を示し、Lhx2 は、従来の報告通り、骨髄 HSCs の体外増幅活性を有していることが明らかとなった。しかし、従来の報告とは異なり、T 細胞への分化は認められず、また、胎仔肝 LSK 細胞に Lhx2 を強制発現させ、試験管内で T 細胞へ分化誘導したところ、Lhx2 は、T 細胞分化を阻害することが明らかとなった。

これらの結果から、Lhx2 により得られたマウス iPSC・ESC 由来の HSC 様細胞が T 細胞へ分化しないのは、Lhx2 が T 細胞分化を阻害している可能性が高いと思われる。

(3) iLhx2-ESCs を分化誘導し、Lhx2 の強制発現により、HSC 様細胞を誘導し、放射線照射したマウスへ移植した。移植マウスを dox 含有飲料水で飼育すると、Lhx2 の発現が維持され、長期骨髄再建が認められた。一方、移植マウスを dox なしの飲料水で飼育した場合、全く骨髄定着が認められず、Lhx2 の発現は、骨髄定着に必須であることが判明した。

試験管内においても、Lhx2 により得られた HSC 様細胞において、Lhx2 の発現を無くすと、速やかに成熟血液細胞へ分化し、HSC 様細胞は消失することを見出した。

iLhx2-ESC 由来の HSC 様細胞を移植し、dox 含有飲料水で飼育したマウスでは、赤血球、好中球・マクロファージ、巨核球・血小板、B リンパ球の再建能が認められたが、T リンパ球分化は認められなかった。そこで、この移植マウスを dox なしの飲料水に切り替えて飼育した結果、約 4 週間で、T 細胞への分化が認められた。

(4) 骨髄 LSK 細胞は、OP9-DL1 ストロマ細胞との共培養により、T 細胞へ分化する。T 細胞分化は、DN1 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>)、DN2 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>)、DN3 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>)、DN4 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>)、DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) 細胞の順に進行

する。胸腺内では、DP 細胞は、さらに CD4SP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) と CD8SP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) 細胞へ分化するが、OP9-DL1 を用いた試験管内分化誘導では、DP 細胞までの分化を主に再現できる。

iLhx2-ESCs を分化誘導し、Lhx2 の強制発現により、HSC 様細胞を誘導し、この OP9-DL1 を用いて T 細胞への分化誘導をおこなったところ、Lhx2 の発現を維持した場合、DN2 から DN3 への移行が阻害されていることが判明した。一方、Lhx2 の発現を無くした場合、DP 細胞までの分化が認められた。

以上の結果から、Lhx2 は、T 細胞分化を阻害すること、および、Lhx2 により得られたマウス ESC 由来の HSC 様細胞は、Lhx2 の発現を無くすと T 細胞へ分化できることが明らかとなった。

(5) Lhx2 により得られた HSC 様細胞 (+Lhx2) と、その細胞を Lhx2 の発現を無くして 3 日間培養したもの (-Lhx2) において、マイクロアレイ解析による遺伝子発現の比較をおこなった。その結果、いくつかの転写因子の発現が、+Lhx2 で亢進していることが判明した。その中のひとつである転写因子 Gata3 は、初期胚において HSC が発生する背側大動脈・生殖隆起・中腎 (AGM 領域) において発現している。そこで、Lhx2 により得られた HSC 様細胞において、short haripin RNA (shRNA) により、Gata3 の発現抑制をおこなった結果、細胞増殖が著しく低下することが明らかとなった。

また、293T 細胞において、Lhx2 と転写補助因子 Lmo2 の共発現をおこなった結果、Lhx2 は、Lmo2 タンパクの分解を誘導していることが判明した。Lhx2 と Lmo2 は共に転写補助因子 Ldb1 に結合することができる。Lhx2 を強制発現させた場合、Lmo2 と Ldb1 の結合が阻害されることを共免疫沈降により明らかにした。Ldb1 から解離した Lmo2 は、ユビキチン系による分解を受けることが知られている。したがって、Lhx2 は、Lmo2 : Ldb1 の複合体形成を阻害し、Lmo2 タンパクの不安定化を誘導しているものと考えられた。

Lhx2 により得られた HSC 様細胞において、Lmo2 の過剰発現を試みた結果、一部の細胞が成熟血液細胞へと分化し、Gata3 の発現が低下した。

以上の結果から、Lhx2 は、Lmo2 の不安定化、および Gata3 の発現を誘導し、マウス ESC・iPSC 由来の HPC に自己複製能を付与し、HSC 様の細胞へ変換しているものと考えられた。

(6) 現在までに報告されているヒト iPSCs から血液細胞への分化誘導法をいくつか試みた。しかしながら、得られる血液細胞は極めて少なかった。そこで、ヒト iPSCs から血液細胞への効率の良い分化誘導法の開発を試みた。

その結果、ヒト iPSCs をマトリゲルコートした培養ディッシュに播種し、StemDiff APEL 培地で培養し、① GSK3 β 阻害剤 (CHIR99021) を分化誘導開始から 1 日目まで一過的に添加、② 中胚葉誘導因子 BMP4 を 1 日目から 4 日目、③ 血管内皮細胞増殖因子 VEGF を、2 日目から 4 日目まで添加すると、4 日目に CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>細胞が顕著に増加することが明らかとなった。さらに、④ IL-3、SCF など血液細胞の増殖・分化をサポートするサイトカインの添加により、培養開始から 12 日目には、多数の CD43<sup>+</sup>血液細胞が分化した。この CD43<sup>+</sup>細胞は、GSK3 β 阻害剤無処理では、ほとんど現れなかった。

GSK3 β 阻害剤の一過的処理により得られた、分化誘導開始から 4 日目の CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>細胞をフローサイトメーターにより単離し、OP9 ストロマ細胞上で培養した結果、血管内皮細胞と血液細胞へ分化することが判明した。したがって、この CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>細胞は HECs であった。この HECs は、GSK3 β 阻害剤無処理では、ほとんど現れず、また、分化誘導開始から 4 日目まで GSK3 β 阻害剤で処理した場合も、HECs への分化効率は低下した。この場合、細胞の多くは内胚様細胞へと分化していた。

以上の結果から、GSK3 β の一過的処理により、効率的に HEPs、および血液細胞への分化を誘導できることが判明した。

(7) ヒト iPSCs を GSK3 β 阻害剤で一過的処理した場合と無処理の場合において、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析をおこなった。ヒト iPSCs を ±GSK3 β 阻害剤で 1 日間培養し、その後、BMP4 を加えさらに 1 日間培養し、RNA を回収した。マイクロアレイ解析により、ホメオボックス遺伝子 CDX1, 2, 4, 上皮間葉転換 (EMT) 関連遺伝子、中胚葉・中内胚葉系遺伝子、などの発現が、GSK3 β 阻害剤処理により大幅に上昇し、一方、ESC 関連遺伝子の発現が抑制されていることが判明した。

ほ乳類初期胚において、中胚葉・中内胚様細胞は、原条から EMT を経て誘導される。また、CDX 遺伝子は血液細胞の発生に関与しており、胚後方の中胚葉細胞で強く発現している。したがって、GSK3 β 阻害剤は EMT を誘導することにより、HEPs を産み出す後方中胚葉細胞をヒト iPSCs から誘導しているものと考えられた。

(8) GSK3 β 阻害剤の一過的処理を用いて得られたヒト iPSC 由来の HECs に Lhx2 の強制発現をレンチウイルスベクターを用いておこなった。コントロールベクター (Lhx2 なし) を遺伝子導入した場合、CD34<sup>+</sup> HPCs から CD34<sup>+</sup>成熟血液細胞へと分化が進行した。一方、Lhx2 を導入した場合、導入された細胞の大部分は、CD34<sup>+</sup>細胞のまま維持されていた。しかし、この細胞は、ほとんど増殖しなかった。

このことから、Lhx2 はマウスの場合と同様、ヒト iPSC 由来の HPCs からの分化阻害活性を示すが、マウスの場合と異なり、この HPCs を試験管内増幅することが出来ないものと考えられた。

#### 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 6 件)

- ① Kitajima K, Kawaguchi M, Miyashita K, Nakajima M, Kanokoda M, Hara T.  
Efficient production of T cells from mouse pluripotent stem cells by controlled expression of Lhx2.  
*Genes Cells, in press* (査読あり)
- ② Kodaka Y, Tanaka K, Kitajima K, Tanegashima K, Matsuda R, Hara T.  
LIM homeobox transcription factor Lhx2 inhibits skeletal muscle differentiation in part via transcriptional activation of Msx1 and Msx2.  
*Exp Cell Res* 331:309-19 (2015) (査読あり)  
doi:10.1016/j.yexcr.2014.11.009.
- ③ Okada Y, Funahashi N, Tanaka T, Nishiyama Y, Yuan L, Shirakura K, Turjman AS, Kano Y, Naruse H, Suzuki A, Sakai M, Zhixia J, Kitajima K, Ishimoto K, Hino N, Kondoh M, Mukai Y, Nakagawa S, García-Cardeña G, Aird WC, Doi T.  
Endothelial cell-specific expression of roundabout 4 is regulated by differential DNA methylation of the proximal promoter.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:1531-8 (2014) (査読あり)  
doi:10.1161/ATVBAHA.114.303818.
- ④ Kitajima K, Kawaguchi M, Iacovino M, Kyba M, Hara T.  
Molecular functions of the LIM-homeobox transcription factor Lhx2 in hematopoietic progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells.  
*Stem Cells* 31:2680-9 (2013) (査読あり)  
doi:10.1002/stem.1500.
- ⑤ Tanaka K, Kondo K, Kitajima K, Muraoka M, Nozawa A, Hara T.  
Tumor suppressive function of protein tyrosine phosphatase non-receptor type 23 in testicular germ cell tumors is lost upon overexpression of miR142-3p.  
*J Biol Chem* 288:23990-9 (2013) (査読あり)  
doi:10.1074/jbc.M113.478891.
- ⑥ Okada Y, Yonekura M, Watanabe M, Nakai T, Wakimura A, Shimizu M, Kamikawa Y,

Kitayama M, Kitajima K, Aird WC, Doi T.  
Embryonic stem cell differentiation system for evaluating gene functions involved in physiological megakaryocyte differentiation.  
*Biochem Biophys Res Commun* 419:477-81 (2012) (査読あり)  
doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.021.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 北島健二, 川口真実, 宮下和也, 鹿子田真衣, 中島鞠乃, 原孝彦.  
転写因子 Lhx2 による多能性幹細胞から長期骨髄再建能を有する造血幹細胞様細胞への誘導.  
第 37 回・日本分子生物学会年会,  
パシフィコ横浜 (神奈川・横浜),  
2014 年 11 月 25 日
- ② Miyashita K, Kitajima K, Hara T.  
Transcription factor Lhx2 inhibits proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia-derived cells.  
*The 12th Stem Cell Research Symposium*,  
Centennial Hall Kyushu University School of Medicine (Fukuoka, Fukuoka),  
May 30 - 31, 2014
- ③ 宮下和也, 北島健二, 原孝彦.  
転写制御因子 Lhx2 は急性 T リンパ芽球性白血病細胞の増殖を抑制する.  
第 36 回日本分子生物学会年会,  
神戸ポートアイランド, 神戸国際会議場,  
神戸国際展示場, 神戸ポートピアホテル (兵庫・神戸),  
2013 年 12 月 3~6 日
- ④ 川口真実, 北島健二, 原孝彦.  
Gata2 は hemogenic endothelial cells からの血液細胞出芽を促進する.  
第 36 回日本分子生物学会年会,  
神戸ポートアイランド, 神戸国際会議場,  
神戸国際展示場, 神戸ポートピアホテル (兵庫・神戸),  
2013 年 12 月 3~6 日
- ⑤ 小高悠作, 田中貴代子, 北島健二, 松田良一, 原孝彦.  
Lhx2 は筋脱分化因子 Msx1, Msx2 の発現を制御する.  
第 36 回日本分子生物学会年会,  
神戸ポートアイランド, 神戸国際会議場,  
神戸国際展示場, 神戸ポートピアホテル (兵庫・神戸),  
2013 年 12 月 3~6 日
- ⑥ Kitajima K, Kawaguchi M, Miyashita K, Hara T.  
In vitro induction of HSC-like cells from mouse ESCs/iPSCs by a transcription factor Lhx2.  
*The 75th Annual Meeting of the Japanese*

*Society of Hematology,*  
Royton Sapporo, Sapporo Geibun-kan,  
Sapporo Education and Culture Hall  
(Hokkaido, Sapporo),  
Oct 11-13, 2013

- ⑦ Kitajima K, Kawaguchi M, Iacovino M, Kyba M, Hara T.

Molecular functions of the LIM-homeobox transcription factor Lhx2 in hematopoietic stem-like cell differentiation from mouse embryonic stem cells.

*The 11th Stem Cell Research Symposium,*  
The University of Tokyo, Ito International Research Center (Tokyo),  
May 17-18, 2013

- ⑧ Kawaguchi M, Kitajima K, Kyba M, Hara T.

Enforced expression of Lhx2 enhances the differentiation of CD41+ hemato-poietic precursors from mouse ES cells.

*The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan,*  
Fukuoka International Congress Center,  
Marine Messe Fukuoka (Fukuoka, Fukuoka),  
December 11-14, 2012

- ⑨ Kitajima K, Kawaguchi M, Momiyama K, Kyba M, Hara T.

Induction of hemato-poietic stem-like cells from mouse pluripotent stem cells by LIM-homeobox transcription factor Lhx2.

*The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan,*  
Fukuoka International Congress Center,  
Marine Messe Fukuoka (Fukuoka, Fukuoka),  
December 11-14, 2012

- ⑩ Kitajima K, Kyba M, Hara T.

Underlying mechanisms of the in vitro induction of hematopoietic stem cell-like cells from mouse embryonic stem cells by LIM-homeobox transcription factor, Lhx2.

*International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting,*  
Pacifico Yokohama (Kanagawa, Yokohama),  
June 13-16, 2012

[その他]

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/stem-cell/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北島 健二 (KITAJIMA, Kenji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・

生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：10346132