

古関 明彦

(独)理化学研究所  
免疫・アレルギー科学総合研究センター  
免疫器官形成研究グループ・グループディレクター

ヒトiPS細胞の分化能と腫瘍化傾向を反映するマーカー遺伝子群の探索

## § 1. 研究実施の概要

本研究では、造血・免疫系をモデルとして、iPS細胞を用いた細胞治療の有効性と安全性を検証し、それに基づいてiPS細胞の形質を反映する分子マーカーの探索を試みる。この大きな目標に向けて、①造血・免疫系細胞からのヒトiPS細胞の誘導と遺伝子発現とエピゲノム状態のプロファイリング、②iPS細胞からの造血幹細胞への分化誘導と白血病化傾向の評価、③マウス及びヒトiPS細胞からのNKT細胞の誘導系の標準化という3項目の小目標を設定し、21年度には、予備段階にあたる多くの研究を遂行した。①については、マウス末梢リンパ球から計25系統の独立したiPS細胞株を樹立し、遺伝子発現プロファイルを明らかにした。その結果、リプログラミングに抵抗するエピジェネティック因子の候補の抽出に成功した。今後、この仮説を検証すると同時に、この抵抗性を克服するための試みを行う。一方、ヒト末梢血リンパ球のリプログラミングの至適化のための培養条件の選定も終了した。②については、ヒトiPS細胞を試験管内で初期造血細胞に分化させる条件検討を行い、それらの細胞の分化能についてヒト化マウスを用いた解析を行っている。マウスB細胞由来iPS細胞についても、既存のES細胞からのB細胞誘導プロトコールでは、iPS細胞からの分化誘導には不十分であることを明らかにし、現在新たな誘導プロトコールの開発を始めた。また、ヒト化マウスが、ヒトiPS細胞の腫瘍化傾向を解析する上で有用なシステムであることを明らかにした。③については、マウスiPS細胞由来NKT細胞を用いたがん治療モデルの作出に成功し、iPS細胞由来NKT細胞が、生体内でもアジュバント効果を発揮することを示した。今後、ヒトNKT細胞からiPS細胞を樹立し、ヒト化マウスを用いた治療モデルの作成を試みる。

## § 2. 研究実施体制

### (1)「古関」グループ

① 研究分担グループ長: 古関 明彦 ((独)理化学研究所、グループディレクター)

### ② 研究項目

項目1) 造血・免疫系細胞からのiPS細胞の誘導と遺伝子発現とエピゲノム状態のプロファイリング

項目2) iPS細胞からの造血幹細胞への分化誘導と白血病化傾向の評価

項目3) ヒトNKT細胞から誘導したiPS細胞を用いた成熟NKT細胞の分化誘導および機能解析

## § 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

### 項目1: 造血・免疫系細胞からのiPS細胞の誘導と遺伝子発現とエピゲノム状態のプロファイリング

マウスの造血・免疫細胞からiPS細胞を樹立し、それらのES細胞や胎児性繊維芽細胞(MEF)由来iPS細胞との機能的な相違やそのような違いがもたらされる分子メカニズムの解明を試みた。ヒトの造血・免疫細胞については、iPS細胞樹立の至適化を試みた。

① マウス末梢リンパ球からのiPS細胞の樹立と遺伝子発現とエピゲノム状態の解析 マウス脾臓より磁気ビーズでB細胞あるいはNKT細胞を濃縮し、さらにソーティングにより高純度にした上で、それぞれに適したマイトゲンにより1~2日間活性化する。その上で、山中因子をレトロウイルスにより感染させ、さらに1~2日間同じ培地で培養した後に、MEFをおいた96穴に移してES細胞用培地で1~2週間の培養を行う。ES細胞様コロニーが認められたウェルについて、細胞をクローニングし、それぞれのクローンについて、抗原受容体遺伝子座の塩基配列を決定することで細胞の起源を同定した。同時にキメラマウスの作成を行うことにより多能性の検定を行い、末梢B細胞と末梢NKT細胞に由来するiPS細胞株をそれぞれ20系統と5系統とを樹立した。B細胞由来iPS細胞6株について、マイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを明らかにし、その平均値について、ES細胞及び末梢B細胞の遺伝子発現プロファイルとの比較を行った。ES細胞とiPS細胞において発現量が異なる遺伝子座の特徴を明らかにするために、各種データベースを用いた分析を行った。その結果、ES細胞におけるDNAメチル化状態は、リプログラムの状態に有意な相違はもたらさないことが明らかになった。しかしながら、いくつかのエピジェネティック因子については、有意な効果が見出された<sup>1-2)</sup>。

NKT細胞由来のiPS細胞についても、同じエピジェネティック因子による制御を受ける遺伝子群は十分にリプログラムされていないことが示された。逆に、完全な多能性を有することが示されているiPS細胞では、これらの遺伝子群についてもほぼES細胞と同様なレベルでの発現となっていることが示された。現在、B細胞由来iPS細胞におけるエピゲノム状態の解析をChIP-chip法を用いて行っている。

② ヒトNKT細胞からのiPS細胞誘導と遺伝子発現とエピゲノム状態の解析 ヒトNKT細胞は、健康人末梢血リンパ球画分の0.5%以下しか存在しないため、最低10<sup>4</sup>個程度まで増幅した上でリプログラムする必要がある。今までにリガンド依存的あるいは非依存的にヒトNKT細胞を増幅するプロトコルを開発し、

侵襲性の少ない 10ml程度の採血から  $10^{4\sim5}$ 個程度まで増幅することが可能になった。今までに、患者末梢血由来NKT細胞について、レトロウイルス及びセンダイウイルスによるリプログラミングを各1回ずつ行う段階まで到達した。それと並行して、ヒト繊維芽細胞由来iPS細胞を用いて遺伝子発現プロファイルの解析を開始した。

## 項目2:iPS細胞からの造血幹細胞への分化誘導と白血病化傾向の評価

iPS細胞から中胚葉系、特に造血・免疫系への誘導を行うことで、iPS細胞からヒトの造血・免疫系の分化機序を明らかにし、安全かつ効率的な誘導プロトコルの開発を目指した研究を行った。iPS細胞に由来する種々の造血・免疫細胞を用いて、安全性や機能を生体内で評価しうるシステムの構築を目指す。

① ヒトiPS細胞からの造血前駆細胞の誘導 ヒト iPS細胞を数十個の細胞塊のまま、OP9, OP9/DLL1細胞株をフィーダーとして用いて培養系する。1週間ごとにiPS由来細胞をピックアップし、解析と培養の継代を行う。一部の細胞は汎白血球抗原であるCD45と造血幹細胞・前駆細胞に発現するCD34に対するモノクローナル抗体を用いてフローサイトメリーにて解析を行い、一部はさらにOP9, OP9/DLL1上にて培養を継続する。さらに、in vitroにて誘導したヒトiPS細胞由来中胚葉系細胞・造血細胞をソーティングによって純化し、500-10000個の細胞数にて新生仔NOD/SCID/IL2rgKOマウスに継静脈的に移植した。

マウスES細胞から造血系への誘導が知られているOP9をフィーダー細胞に用いることで、ヒトiPS細胞から中胚葉系への分化誘導を目指した。ヒトiPS細胞を、OP9上で培養すると開始後2週間は生存率に問題なく培養可能であることを確認した。フローサイトメリー解析により、培養開始後7日でCD34+細胞が出現したがCD45を発現しておらず、14日後にCD45+CD34+細胞が出現した。これらの経時的変化は出現する頻度は異なるものの、n=7にて再現性をもって確認した。CD34が造血系前駆細胞だけでなく、血管前駆細胞のマーカーでもあることから、培養1週間後のCD45-の時点では、造血系にコミットする以前の中胚葉系前駆細胞である可能性が示された。また、iPS細胞から中胚葉系・造血系への誘導において、Notchシグナルの果たす役割について検討するため、delta-like ligand 1 (DLL1)の発現するOP9(OP9-DLL1)を用いて同時に中胚葉系への分化誘導を試みた。DLL1の発現の有無によって、ヒトiPS細胞からCD45-CD34+細胞およびCD45+CD34+細胞が出現する効率には有意な差を認めなかった。一方、フィーダー細胞を用いず、SCF, FL, TPOなどサイトカインを用いた造血系への誘導においては、embryoid body(胚様体)の形成に伴って、SSEA4の発現低下は認めたものの、CD45の発現など造血・免疫系への分化は認めなかった。現在、CD45+CD34+細胞の生物活性をNOD/SCID/IL2rgKOマウスに移植して解析している他、qPCRによるマーカー遺伝子群の発現レベルを解析している。現時点で、レシピエントマウスにおける白血病など悪性疾患の発症は認めていない。

② マウスiPS細胞からの造血前駆細胞の誘導 今までに我々が樹立したES細胞からB細胞を誘導するプロトコルを用いて、iPS細胞から抗原特異的B細胞に至る分化経路の解析を試みた。そのために、各種iPS細胞のB細胞系列への分化誘導を試みた。項目①で作成した末梢B細胞由来iPS細胞群は、いずれもキメラマウスの体内では成熟B細胞へと分化し得た。しかしながら、試験管内の誘導プロトコル

では、いずれも成熟B細胞あるいはB前駆細胞へと分化し得なかった。T細胞への誘導培養では、それらはいずれもT細胞系列へと分化することは可能であった。一方、MEFに由来するiPS細胞の一部(3/5)は、試験管内でも成熟B細胞へと分化することが可能であった。これらの事実が意味することは、リプログラムの状態と培養システムの相互作用により、B細胞系列へのiPS細胞の分化は阻害されることが示され、リプログラミングの改善と誘導プロトコールの改善が必要であることが示された。また、NP抗原特異的B細胞から樹立したiPS細胞を用いて作製したキメラマウスにおいて、末梢にNP特異的B細胞が生成していることが確認された。これは任意のB細胞抗原受容体を発現しうるB細胞をiPS細胞化として増幅できたことを示しており、新規のヒト抗体作成法の開発へ近づく成果である。

③ iPS細胞由来細胞の腫瘍化傾向の評価 iPS細胞に由来する細胞の腫瘍化傾向を解析するために、iPS細胞を胚盤胞へ移植して作製したキメラマウスと、iPS細胞由来の血球系細胞とを移植したキメラマウスを維持し、生存期間と死亡原因についてのデータを蓄積している。ヒトiPS細胞由来細胞の腫瘍化傾向を解析するツールとして、NOD/SCID/IL2rgKOマウスが優れたモデルであることをヒト白血病細胞を用いて証明した<sup>4)</sup>。

### 項目3: マウス及びヒトiPS細胞からのNKT細胞の誘導系の標準化

ここでは、NKT細胞を用いたアジュバント療法の確立をゴールとして、iPS細胞相を介した機能的なNKT細胞の試験管内誘導を目指した研究を行った。本年度は、マウスにおける研究に加えて、ヒトNKT細胞リプログラミングに向けた試みを開始した。

① NKT-ES細胞からのNKT細胞誘導 iPS細胞からのNKT細胞誘導を行うにあたり、まずES細胞を用いた予備実験を行い、それを基盤としてiPS細胞を用いた研究を行った。NKT細胞を核移植によってリプログラムし、NKT細胞由来マウス(NKTマウス)とES細胞(NKT-ES細胞)を作製した。NKT-ES細胞を用いて試験管内でのNKT細胞誘導プロトコールの至適化を行った。NKT-ES細胞は、試験管内でIL-7とFlt-3L存在下、OP9/DII-1と20ないし25日間共培養することで、機能的に成熟したNKT細胞に効率的に分化誘導し得ることを明らかとした。誘導されたNKT細胞は、樹状細胞により提示される糖脂質リガンド $\alpha$ -GalCerを認識して、試験管内で大量のIFN- $\gamma$ を産生する。さらに、生体内に移入すると、アジュバント活性を介して抗腫瘍効果を発揮することを示した<sup>3)</sup>。

② NKT-iPS細胞からのNKT細胞誘導 同じ誘導プロトコールを用いてiPS細胞からのNKT細胞誘導を試みた。最初に、NKTマウス由来胎児性繊維芽細胞(MEF)からiPS細胞(この細胞では予めT細胞抗原受容体遺伝子座は、NKT細胞型(Va14-Ja18/Vb8)に再構成している)を誘導し、これらに分化誘導を試みた。その結果、MEF由来のiPS細胞はNKT-ES細胞と同様に試験管内でIL-7とFlt-3L存在下、OP9/DII-1と20ないし25日間共培養することで、機能的に成熟したNKT細胞に効率的に分化誘導し得ることが明らかになった。また、項目①で述べたように、末梢マウスNKT細胞からもiPS細胞株を5系統樹立した。末梢NKT細胞から樹立されたiPS細胞も、同じプロトコールによって、機能的なNKT細胞に分化することが確認された。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

1. Schwermann J, Rathinam C, Schubert M, Schumacher S, Noyan F, Koseki H, Kotlyarov A, Klein C, Gaestel M. (2009). MAPKAP kinase MK2 maintains self-renewal capacity of haematopoietic stem cells. *EMBO J.* 28:1392-1406. DOI:10.1038/emboj.2009.100
2. Román-Trufero M, Méndez-Gómez HR, Pérez C, Hijikata A, Fujimura Y, Endo T, Koseki H, Vicario-Abejón C, Vidal M. (2009). Maintenance of undifferentiated state and self-renewal of embryonic neural stem cells by Polycomb protein Ring1B. *Stem Cells.* 27:1559-1570. DOI: 10.1002/stem.82
3. Watarai H, Rybouchkin A, Hongo N, Nagata Y, Sakata S, Sekine E, Dashtsoodol N, Tashiro T, Fujii SI, Shimizu K, Mori K, Masuda K, Kawamoto H, Koseki H, and Taniguchi M. (2009) Generation of functional NKT cells in vitro from embryonic stem cells bearing rearranged invariant Va14-Ja18 TCRA gene. *Blood* 14:230-237. DOI:10.1182/blood-2009-04-217729.
4. Saito Y, Uchida N, Tanaka S, Suzuki N, Tomizawa-Murasawa M, Sone A, Najima Y, Takagi S, Aoki Y, Wake A, Taniguchi S, Shultz L.D, Ishikawa F. (2010) Cell cycle entry potentiates elimination of quiescent chemotherapy-resistant human AML stem cells. *Nature Biotechnology* 28, 275-280. DOI: 10.1038/nbt.1607

### (4-2) 知財出願

CREST 研究期間累積件数(国内 1件)