

岩間 厚志

千葉大学大学院医学研究院細胞分子医学・教授

造血幹細胞のエピジェネティクスとその制御法の創出

§1. 研究実施の概要

本研究の目的は、造血幹細胞機能を規定するエピジェネティクスの理解を通して、iPS 細胞から造血幹細胞を誘導する際に必須となるエピジェネティクス制御法の分子基盤を確立し、効率良く造血幹細胞を誘導する技術を開発することにある。本年度の研究の概要は以下の通りである。

① 造血幹細胞のエピジェネティクス制御機構の解明

Polycomb repressive complex (PRC) 2 の構成分子である Ezh2 遺伝子を欠損したマウスの解析から、ポリコーム群 (PcG) 複合体による造血幹細胞のエピジェネティクス制御様式が、増幅期にある胎仔肝の造血幹細胞と静止期にある骨髄の造血幹細胞では異なることが明らかとなった。この違いは ES/iPS 細胞からの造血幹細胞誘導の際に、胎仔型から成体骨髄型の造血幹細胞へと成熟を促す上で有用なエピジェネティクス情報を提示するものと期待される。

ヒストンアセチル化酵素複合体 Hbo1-BRD1/Brpf2 に関して、BRD1 コンディショナル KO マウスの解析とともに、Hbo1 コンディショナル KO マウスを作製し、解析を開始した。

未分化造血細胞に発現が限局する H3K36me2 脱メチル化酵素 Fbxl10 の強制発現系を用いた解析を行い、Fbxl10 が造血幹細胞の機能維持に関わることを確認した。この機能はヒストン H3K36me2 の脱メチル化を介するものであり、PRC1 機能との協調作用も示唆された。

② 造血細胞の分化の可塑性と造血幹細胞・多能性幹細胞へのリプログラミング

多能性造血幹・前駆細胞における bivalent domain 様ヒストン修飾による可逆的な遺伝子発現抑制と多能性維持の詳細を理解するために、胎児肝および骨髄の造血幹・前駆細胞を用いて ChIP-sequence 解析を進めている。また、ポリコーム群蛋白 Bmi1 ならびに Ezh2 のリン酸化修飾の同定を行った。今後外来シグナルと PcG 複合体のクロストーク研究につなげる予定である。

③ iPS 細胞から造血幹細胞への分化誘導におけるエピジェネティクス制御

ヒト iPS 細胞から胚様体を介した培養系において、低分子 TGFβ阻害剤が造血幹・前駆細胞の誘導効率を上げることが確認され、特許を出願した。また、培養系にアクチビンを加えることにより

造血幹・前駆細胞の誘導効率がさらに向上することを確認し、アクチビンを用いた培養系を中心に解析を進めている。しかし、誘導される造血幹・前駆細胞に骨髄を長期に再建する活性は見られていないのが重要な課題であり、さらなる培養系の改良を継続中である。

マウス ES 細胞の系において造血幹細胞の分化誘導活性を有する転写因子 HoxB4 の標的遺伝子を、マイクロアレイと ChIP-chip 解析を用いて同定した。これらの情報は、ヒト ES/iPS 細胞から造血幹細胞を分化誘導する際に指標とすべき遺伝子群を提示するものである。この情報をもとに、ヒト iPS 細胞から分化誘導した造血前駆細胞に様々な転写因子を強制発現させ、造血前駆細胞増幅活性を評価した。現時点までに、胎児肝造血幹細胞の維持・増幅に必須である Sox17 が造血前駆細胞の増殖を長期に活性化することを見だし、造血幹細胞増幅因子として特許を出願した。他の遺伝子との組み合わせなどを含めて更なる解析を続けている。

§ 2. 研究実施体制

(1)「岩間」グループ

① 研究分担グループ長：岩間 厚志(千葉大学、教授)

② 研究項目

【項目1】造血幹細胞のエピジェネティクス制御機構の解明

1. 造血幹細胞におけるPcGの機能解析と標的遺伝子の同定
2. 造血幹細胞におけるtrxGの機能解析と標的遺伝子の同定
3. PcG、trxGによるクロマチン機能制御

【項目2】造血細胞の分化の可塑性と造血幹細胞・多能性幹細胞へのリプログラミング

1. Bmi1による分化多能性の維持機構の解析

【項目3】iPS細胞から造血幹細胞への分化誘導におけるエピジェネティクス制御

1. HoxB4 による成人型造血幹細胞誘導のエピジェネティクス
2. 新規造血幹細胞誘導因子の同定
3. ヒト iPS 細胞からの造血幹細胞誘導系の確立

(2)「江藤」グループ

① 研究分担グループ長：江藤 浩之(東京大学、准教授)

② 研究項目

【項目3】iPS細胞から造血幹細胞への分化誘導におけるエピジェネティクス制御

3. ヒト iPS 細胞からの造血幹細胞誘導系の確立

(3)「遠藤」グループ

① 研究分担グループ長：遠藤 充浩(独立行政法人理化学研究所、研究員)

② 研究項目

【項目1】造血幹細胞のエピジェネティクス制御機構の解明

1. 造血幹細胞における PcG の機能解析と標的遺伝子の同定
3. PcG、trxG によるクロマチン機能制御

【項目2】造血細胞の分化の可塑性と造血幹細胞・多能性幹細胞へのリプログラミング

1. Bmi1による分化多能性の維持機構の解析

【項目3】iPS細胞から造血幹細胞への分化誘導におけるエピジェネティクス制御

1. HoxB4 による成人型造血幹細胞誘導のエピジェネティクス

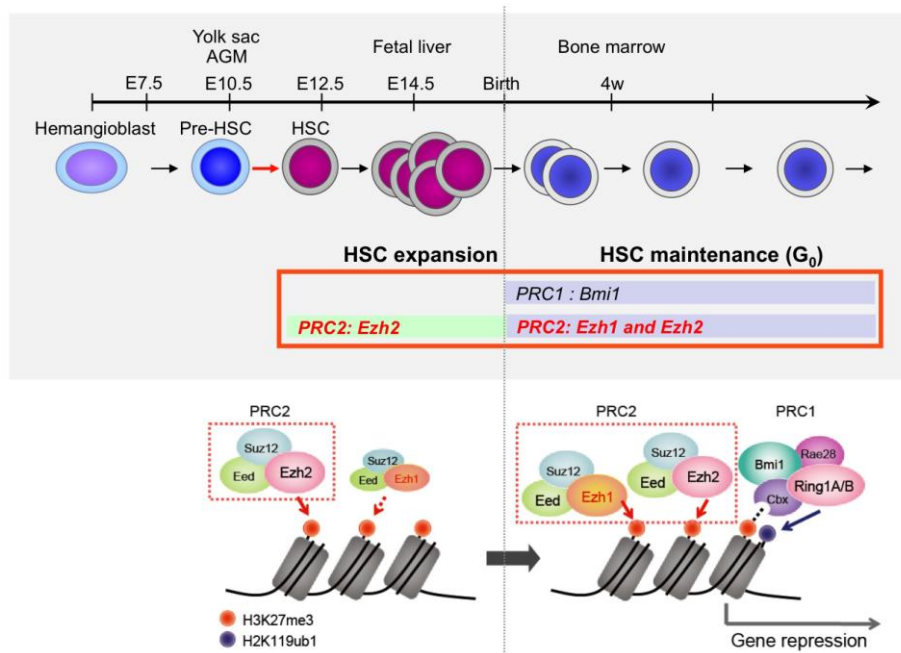
§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

【項目1】造血幹細胞のエピジェネティクス制御機構の解明(岩間・遠藤グループ)

1. 造血幹細胞における PcG の機能解析と標的遺伝子の同定

- 1) PRC2 の構成分子である Ezh2 遺伝子をノックアウトしたマウスの解析から、PcG による造血幹細胞のエピジェネティック制御の様式が胎仔肝と骨髄において異なることが示された。すなわち、増幅期にある胎仔肝の造血幹細胞は PRC2 複合体の Ezh2 への依存性が強く、Ezh1 の関与は低い。一方静止期にある骨髄の造血幹細胞では Ezh1 に加えて Ezh1 と PRC1 の機能が高まることから明らかとなった。この違いは ES/iPS 細胞からの造血幹細胞誘導の際に胎仔型から成体骨髄型の造血幹細胞へと成熟を促すうえで有用なエピジェネティック情報を提示するものと期待される(下図、論文投稿中)。



- 2) *Bmi1* 会合分子として同定した zinc finger 蛋白 *Znf277* を欠損するマウスを作製し、その胎仔線維芽細胞 (MEF) の解析を行い、ストレス存在下における *Ink4a-Arf* 遺伝子座の発現抑制に *Zfp277* と PRC1 の会合が必須であることを明らかにした⁴⁾。現在個体レベルでの機能解析を行っている。また、PRC2 制御分子として *Pcl2* を同定しその機能を解析し報告した⁸⁾。クロマチン制御分子 *Tif1β/Kap1* に関しては遺伝子欠損マウスの解析を中心に行い、骨髄造血幹細胞の維持に必須であることを確認し、その分子機構の解明を行いつつある。

2. 造血幹細胞における *trxG* の機能解析と標的遺伝子の同定

我々が同定したトライソラックス (*trxG*) 関連ヒストンアセチル化酵素複合体 *Hbo1-BRD1/Brpf2* に関して、H21 年度に作成した BRD1 コンディショナル KO マウスの解析を開始するとともに、*Hbo1* コンディショナル KO マウスを作製した。今後は、*Hbo1* の造血幹細胞における機能解析を中心に解析を進める予定である。

3. 造血幹細胞におけるクロマチン機能制御

H21 年度にヒストン脱メチル化酵素の発現解析を造血系細胞において行った。その結果 *Fbxl10* (*H3K36me2* の脱メチル化酵素) の発現が未分化造血細胞に限局していることが明らかとなった。*Fbxl10* は PRC1 と会合しうることが最近報告されたことから、造血幹細胞に重要な機能が予想された。そこで造血幹細胞への強制発現系を用いた解析を行い、*Fbxl10* が造血幹細胞の機能維持に関わることを確認した。この機能はヒストン *H3K36me2* の脱メチル化を介するものであり、PRC1 機能との協調作用も示唆された²⁾。また、RNA 結合蛋白 *Fus/TLS* も造血幹細胞の維持に必須であることを確認したが、その機序はいまだ不明のままである⁵⁾。

【項目 2】造血細胞の分化の可塑性と造血幹細胞・多能性幹細胞へのリプログラミング (岩間・遠藤グループ)

1. *Bmi1* による分化多能性の維持機構の解析

H20-21 年度の B 細胞分化の解析から、ES 細胞において見られる bivalent domain 様ヒストン修飾による可逆的な遺伝子発現抑制と多能性維持が、造血幹細胞においても見られることを確認した。この現象が B 細胞系への分化に限らず造血幹細胞の分化全般に当てはまるものであるかを検証するために、胎児肝および骨髄の造血幹・前駆細胞を用いて ChIP-sequence 解析を bivalent domain の観点から詳細に検討中である。また、造血幹細胞維持や分化のコミットメントの際に、細胞外からのシグナルが PcG 機能をどのように制御するのかを理解するために、*Bmi1* ならびに *Ezh2* のリン酸化修飾を質量分析を用いて解析した。この研究を、H23 年度以降に予定している外来シグナルと PcG のクロストーク研究につなげる予定である。

2. PcG のリプログラミングにおける機能

白血病遺伝子による造血前駆細胞の白血病幹細胞へのリプログラミングは、自己複製能の再獲

得という観点から、体細胞の多能性幹細胞へのリプログラムと非常に似た現象と言える。白血病幹細胞へのリプログラミング過程における Bmi1 の役割を検討した結果、Bmi1 による一連の癌抑制遺伝子の発現抑制が白血病幹細胞の形質獲得を完遂する上で重要であることが示された¹⁾。

【項目 3】iPS 細胞から造血幹細胞への分化誘導におけるエピジェネティクス制御 (岩間、江藤、遠藤グループ)

1. ヒト iPS 細胞からの造血幹細胞誘導系の確立

ヒト iPS 細胞から胚様体を介して CD34⁺CD43⁺CD45⁺造血幹・前駆細胞を誘導する系を確立した。この系では CD34⁺CD43⁻CD45⁻, CD34⁺CD43⁺CD45⁻, CD34⁺CD43⁺CD45⁺の順に造血発生が進行する。ヒト ES 細胞の使用許可を得て、この培養系がヒト ES 細胞にも適応可能か否かについて現在検討中である。また、上記各細胞分画の遺伝子発現をマイクロアレイで検討する予定である。しかし、このような細胞分画のいずれにも骨髄を長期に再建する活性は見られていない。培養系の改良を継続中である。このような中、低分子 TGFβ 阻害剤がヒト iPS 細胞からの造血幹・前駆細胞の誘導効率を上げることが確認され、特許を出願した(特願 2010-193827 号)。また、培養系にアクチビンを加えることにより造血幹・前駆細胞の誘導効率がさらに向上することを確認し、アクチビンを用いた培養系を中心に解析を進めている。さらに、ヒト iPS 細胞の特性解析を行うとともに⁶⁾、由来の異なるヒト iPS 細胞の血液細胞分化誘導を試みることで、リプログラム因子の差異に依存した造血活性を明らかとし報告した⁷⁾。

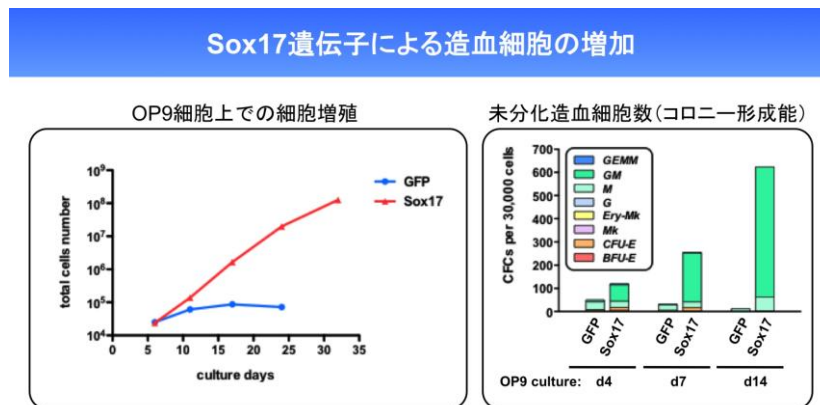
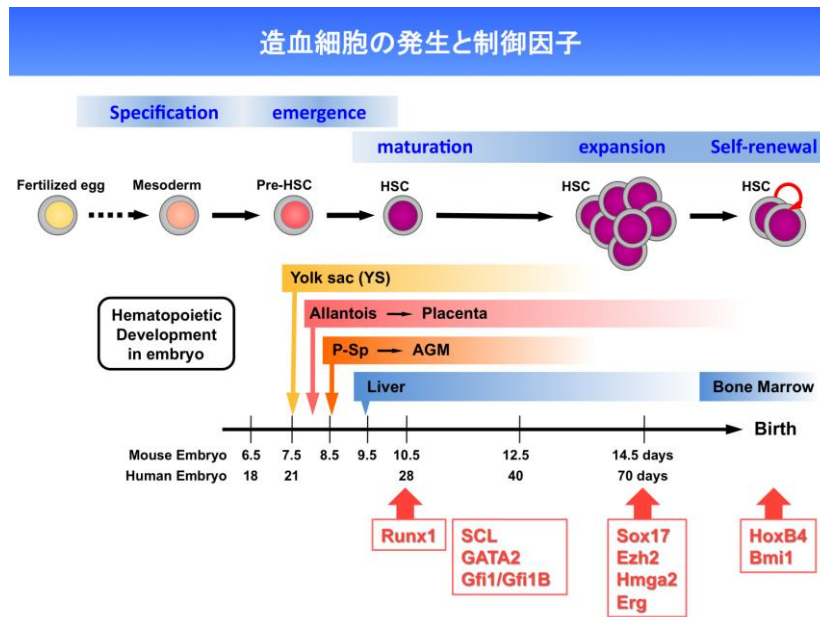
2. HoxB4 による成人型造血幹細胞誘導のエピジェネティクス

転写因子 HoxB4 は、マウス ES 細胞から分化誘導した造血前駆細胞に強制発現することにより、骨髄を長期に再構築可能な造血幹細胞へと成熟させる。昨年度行った HoxB4 の標的遺伝子のマイクロアレイと ChIP-chip データを解析し、マウス ES 細胞から分化誘導した造血前駆細胞において、HoxB4 が造血幹細胞の発生・維持に重要性が示されている代表的な遺伝子の多く (Runx1, SCL, Gata2, Gfi1 など) を直接制御することが明らかとなった。これらの HoxB4 標的遺伝子群の情報は、ヒト ES/iPS 細胞から造血幹細胞を分化誘導する際に指標とすべき遺伝子群を提示するものである³⁾。

3. 新規造血幹細胞誘導因子の同定

上述の情報をもとに、ヒト iPS 細胞から胚様体を介して分化誘導した CD34⁺CD43⁺造血前駆細胞に、様々な転写因子 (Runx1, SCL, Gata2, Gfi1, Sox17, Erg など) を強制発現させ、*in vitro* で造血前駆細胞増幅活性を評価した。現時点までに、胎児肝造血幹細胞の維持・増幅に必須である Sox17 が CD34⁺CD43⁺造血前駆細胞の増殖を長期に活性化し、コロニー形成細胞を増幅しうることを見いだした(下図)。この系で得られた細胞を免疫不全マウスに移植しても骨髄再構築活性は得られていないが、造血幹細胞増幅因子として特許を出願し(特願 2010-193828 号)、他の

遺伝子との組み合わせなどを含めて更なる解析を続けている。



§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Yuan J, Takeuchi M, Negishi M, Oguro H, Ichikawa H, and Iwama A. Bmi1 is essential for leukemic reprogramming of myeloid progenitor cells. *Leukemia in press*.
2. Konuma T, Nakamura S, Miyagi S, Negishi M, Chiba T, Oguro H, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Ichikawa H, Miyoshi H, Vidal M and Iwama A. Forced

expression of the histone demethylase Fbxl10 maintains self-renewing hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* in press.

3. Oshima M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Nakajima-Takagi Y, Sugiyama F, Koseki H, Iwama A, and Osawa M. Genome-wide analysis of target genes regulated by HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells. *Blood* 2011 Feb 22. [Epub ahead of print]
doi: 10.1182/blood-2010-12-323212
4. Negishi M, Saraya A, Mochizuki S, Helin K, Koseki H, and Iwama A. A novel zinc finger protein Zfp277 mediates transcriptional repression of the *Ink4a/Arf* locus through polycomb repressive complex 1. *PLoS One* 5: e12373, 2010.
doi:10.1371/journal.pone.0012373
5. Sugawara T, Oguro H, Negishi M, Morita Y, Ichikawa H, Iseki T, Yokosuka O, Nakauchi H, Iwama A. FET family proto-oncogene Fus contributes to self-renewal of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 38, 696-706, 2010.
doi:10.1016/j.exphem.2010.04.006
6. Hayashi Y, Chan T, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, Eto K, Furue MK, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M. Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. *PLoS One* 5:e14099, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0014099
7. Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, Eto K. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med* 7:2817-2830, 2010. doi:10.1084/jem.20100844
8. Li X, Isono K, Yamada D, Endo TA, Endoh M, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Otte AP, Casanova M, Kitamura H, Kamijo T, Sharif J, Ohara O, Toyada T, Bernstein BE, Brockdorff N, Koseki H. Mammalian Polycomb-Like Pcl2/Mtf2 Is a Novel Regulatory Component of PRC2 That Can Differentially Modulate Polycomb Activity both at the Hox Gene Cluster and at Cdkn2a Genes. *Mol Cell Biol* 31:351-364, 2011. doi:10.1128/MCB.00259-10

(4-2) 知財出願

- ①平成22年度特許出願件数(国内 2件)
- ②CREST 研究期間累積件数(国内 2件)