

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. 研究実施体制

(1)「古関」グループ

① 研究代表者: 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

- ・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
- ・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
- ・マウス及びヒト iPS 細胞からの NKT 細胞の誘導系の標準化

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

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
内因性コアサーキットの樹立状態をモニターする目的のために、Nanog, Oct4, Sox2, Lin28 の4遺伝子の各蛋白質翻訳部分のC末端部分にEGFPを融合させた融合蛋白質を発現させるノックインマウスの作成をした。Sox2-GFPだけで、ホモ個体が得られ、ES細胞でのGFP蛍光が観察出来た。このSox2-GFPノックインマウス由来Bリンパ球や胎児繊維芽細胞(MEF)からiPS誘導を行った結果、それぞれ誘導13日後あるいは11日後からES細胞と同等のGFPの蛍光が観察された。またBリンパ球ではMEFに比べてリプログラミングが2日間遅いことから、免疫系細胞のような最終分化した細胞で内因性コアサーキットを樹立するには、持続的な外来性OSKM発現を要求する事を示した。

マウスB細胞由来iPS細胞をモデルとして、リプログラミングが十分に起こらない遺伝子群の検索を試みた結果、エピジェネティック制御因子の一つであるポリコム群タンパク質の標的遺伝子群が十分にはリプログラミングされないことが示唆された^{1,2,5,6,8}。Cdkn2a とポリコム(Ring1B)のダブルノックアウト(dKO)とCdkn2a シングルノックアウト(sKO)を用いて、Bリンパ球からのiPS細胞誘導効率を解析した結果、dKO

細胞では sKO 細胞に比べて誘導効率が約 2 倍上昇するだけでなく、多能性マーカーの発現も有意に増えていた。しかしながら、ES 細胞様コロニーをピックアップ後、5 回継代したところ iPS 細胞として樹立されるクローン数は dKO では有意に減少していた(以上の実験結果について再現性を現在確認中)。このことからポリコム群は、リプログラミング過程初期には抑制的に作用し、後期には促進的に働くことが示された。今後、このメカニズムを解明するべく、山中・山田によって開発されたリプログラマブルマウスを用いた初期過程におけるポリコム群の動態の解析を試みる。

ヒト末梢血リンパ球のリプログラミングについては、センダイウイルスベクターを用いた山中 4 因子の導入により、再現性よくリプログラミングが可能であることや外来遺伝子のゲノムへの挿入がない iPS 細胞を樹立出来ることを明らかにした。また SV40T 抗原を山中 4 因子と共発現することで、T 細胞からの樹立効率を約 10 倍に高められることが明らかになった。さらに抗原特異性 T 細胞クローン(Mart1)からも山中 4 因子だけでは iPS 化が困難であったが、SV40T 抗原の共発現により iPS 化することが可能となった。この結果は SV40T 抗原による細胞増殖の活性化によることが示唆された。

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

in vitro でのヒト T 細胞由来 iPS 細胞(T-iPS 細胞)から T 細胞を分化誘導する培養系の開発を行った。臍帯血中および成人末梢血中の CD8T 細胞(キラー T 細胞)から作製した複数のヒト T-iPS 細胞を用いた。培養にはよく用いられている OP9-DL1 細胞との共培養系に、独自の改良を加えた。

培養開始後 40 日目には CD4CD8 共陽性(DP)細胞の出現が認められた。ES 細胞通常の iPS 細胞を用いた培養に比べて、DP 細胞分画中の T 細胞レセプター発現細胞の割合は 20 倍以上であった。さらに培養 60 日後には、ES 細胞通常の iPS 細胞を用いた培養に比べて 10 倍以上の数の CD8 陽性成熟 T 細胞がみられた。すなわち、T 細胞レセプターの再構成を引き継いだ iPS 細胞から T 細胞を作製した場合は、効率よく T 細胞レセプターが発現し、より高率に in vitro の条件でも成熟 T 細胞を分化誘導できると思われた。この知見を踏まえ、24 年度には、メラノーマ抗原 MART1 特異的な T 細胞から作製したヒト T-iPS 細胞を用いて、抗原特異的キラー T 細胞の誘導を試みる。

ヒト iPS から HSC/HPC の誘導について、サイトカイン添加とストロマ細胞を用いたふたつの培養系で、評価を行った。OP9、OP9-DLL1 を用いた培養系により、ヒト iPS 由来 CD34+CD38-細胞は出現頻度のばらつきはあるものの、確実に分化誘導した⁷⁾。これらの細胞は、顆粒球系、単球系、赤芽球系に分化することが確認された。また、ヒト SCF, TPO, Flt3 リガンド存在下での誘導条件を検討した。この培養条件においては、培養開始14日目(d14)にソートした iPS 由来 CD34+CD38-細胞のほうが d7 にソートした同じ分画の細胞より明確なクラスター形成したことから、d7 から d14 に至る過程で、造血前駆細胞同様なクラスター形成能を獲得すると考えられた。ここで変化する転写因子について検討したところ、iPS で高発現で、d7 iPS-CD34+細胞でも発現が維持されていた SALL1, SALL4, ETV4 が、d14 iPS-CD34+細胞で造血幹細胞に近いレベルにまで低下することが

明らかになった。24年度に、これらの抑制が、中胚葉系から造血系への誘導を促すかについて、ヒト iPS 細胞を用いた検証を実施する。

これらの細胞について、NSG マウスを用いて生着能と分化能について検討した。50匹以上の移植を実施したが、有意なヒト細胞の生着を認めなかった。今後、新たに作製したヒト Kit リガンドノックインマウス等の使用⁴⁾、と成熟マウスへの大腿骨髄への注射法などを併用した解析を試みる。

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

従来のプロトコールにより、iPS より誘導された NKT 細胞は、CD24 陽性、CD44 弱陽性、CD62L 弱陽性、CD69 弱陽性 NK1.1 陰性で、胸腺内に存在する CD4 陽性 CD8 陽性 DP 細胞と表現型が酷似しており、CD4 と CD8 の発現についても両陽性であった。サイトカイン産生については IFN- γ 、IL-4、IL-9、IL-10、IL-13、IL-17A、IL-22 の産生能を有するものの、胸腺 NKT 細胞のそれと比して 1/2~1/5 の産生能しか有していなかった。そのため、より強いアジュバント活性を有する NKT 細胞を誘導するプロトコールの開発が求められた。

IL-15 欠損マウスにおいては IFN- γ 産生性の NKT 細胞の数は 1/10 程度に減っており、IL-12 シグナルカスケードに位置する IL-12 受容体 β 2、Stat4、T-bet の発現が著しく減っていたことにヒントを得て、iPS 細胞共培養 20 日から 25 日まで IL-7、IL-15、可溶化型 IL-15 受容体 α 鎖を加えたところ、著しい細胞増殖が認められ、従来法の 20 倍の NKT 細胞を誘導することが可能となった。しかしながらこの細胞は IFN- γ 産生能の減弱が認められた。そこで、さらに共培養 20 日から 25 日まで IL-7、IL-15、可溶化型 IL-15 受容体 α 鎖に加えて IL-12 存在下培養したところ、細胞増殖阻害を伴うことなく従来の 10 倍以上の IFN- γ を産生し得る NKT 細胞を誘導することに成功した³⁾。この新しい培養法で誘導した NKT 細胞は、強力な抗腫瘍活性を有することも確認できた。EL4/EG7 腫瘍モデルにおいて、従来の 1/40 の移入量 (10^5 個/マウス) で生着および腫瘍の縮退を認めた。

一方 NKT 細胞の iPS 化は絶対的な細胞数が少ないことや誘導効率の低さもあって樹立困難であることが示唆された。現在、NKT 細胞の培養条件改善および、T 細胞を使つての iPS 細胞の誘導効率改善を試みている。また末梢血 CD8 陽性 T 細胞から樹立した iPS 細胞の T 細胞受容体 (TCR) の DNA 配列を ZFN もしくは TALEN システムを用いてターゲッティングし、NKT 様の TCR 配列に改変することで、NKT 様 TCR を保持する iPS 細胞を作製することを試みることにした。T-iPS (hi76-2) のゲノム DNA から再構成された TCR 配列を決定しターゲッティングベクター、およびドナーベクターを現在準備中である。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Li X, Isono KI, 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 and Koseki H, "Mammalian Polycomblike Pcl2/Mtf2 is a novel regulatory component of PRC2 that can differentially modulate Polycomb activity at both the Hox gene cluster and at Cdkn2a genes", *Mol. Cell. Biol.*, 31, 351-364, 2011 (DOI: 10.1128/MCB.00259-10)
2. Casanova M, Preissner T, Cerase A, Poot R, Yamada D, Li X, Appanah R, Bezstarosti K, Demmers J, Koseki H and Brockdorff N, "Polycomblike 2 facilitates the recruitment of PRC2 Polycomb group complexes to the inactive X chromosome and to target loci in embryonic stem cells", *Development*, 138(8), 1471-82, 2011 (DOI: 10.1242/dev.053652)
 3. Watarai H, Sekine-Kondo E, Shigeura T, Motomura Y, Yasuda T, Satoh R, Yoshida H, Kubo M, Kawamoto H, Koseki H and Taniguchi M, "Development and function of invariant natural killer T cells producing t(h)2- and t(h)17-cytokines", *PLoS Biol.*, 10, e1001255, 2012 (DOI:10.1371/journal.pbio.1001255)
 4. Takagi S, Saito Y, Hijikata A, Tanaka S, Watanabe T, Hasegawa T, Mochizuki S, Kunisawa J, Kiyono H, Koseki H, Ohara O, Saito T, Taniguchi S, Shultz LD and Ishikawa F, "Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation", *Blood.*, 119, 2768-2777, 2012 (DOI:10.1182/blood-2011-05-353201)
 5. Hisada K, Sánchez C, Endo T, Endoh M, Román-Trufero M, Sharif J, Koseki H and Vidal M, "RYBP represses endogenous retroviruses, preimplantation- and germline-specific genes in mouse embryonic stem cells" *Mol Cell Biol.*, 32(6), 1139-1149, 2012 (DOI:10.1128/MCB.06441-11)
 6. Mochizuki-Kashio M, Mishima Y, Miyagi S, Negishi M, Saraya A, Konuma T, Shinga J, Koseki H and ama A, "Dependency on the polycomb gene Ezh2 distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells", *Blood*, 118, 6553-61, 2011 (DOI:10.1182/blood-2011-03-340554)
 7. Oshima M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Nakajima-Takagi Y, Sugiyama F, Koseki H, Kyba M, 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*. 117:e142-50, 2011 (DOI:10.1182/blood-2010-12-323212)
 8. Tan J, Jones M, Koseki H, Nakayama M, Muntean AG, Maillard I and Hess JL. "CBX8, a polycomb group protein, is essential for MLL-AF9-induced leukemogenesis" *Cancer Cell*, 20, 563-75, 2011 (DOI:10.1016/j.ccr.2011.09.008)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)