

(平成 26 年度 研究実施報告)

国際科学技術共同研究推進事業 (戦略的国際共同研究プログラム)

(研究領域「幹細胞のエピジェネティクス」)

研究課題名「正常造血及び白血病における幹細胞とエピジェネティクス」

平成26年度実施報告書

代表者氏名 中内 啓光

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 教授

1. 研究実施内容

1-1. 研究実施の概要

(中内研)

多能性幹細胞から形成させたテラトーマ内において効率的な微小環境の構築を誘導することにより造血幹細胞の分化を促進できるのではと考え、2つの方法により研究を進めた。1) 多能性幹細胞と共培養する支持細胞として OP9 細胞がある。しかし、OP9 細胞の分泌するサイトカンだけでは造血幹細胞を効率的に誘導出来得ないことが問題となっている。従来はそのサイトカンを補うために浸透圧ポンプを用いることにより、サイトカインをマウスに投与していた。今回はこのポンプを使用することなく OP9 細胞にサイトカインを強制発現させることにより改善することを試みた。2) 多能性幹細胞に骨髓内間葉系細胞の重要遺伝子である FOXC1 を強制発現させ、テラトーマ内の構造を骨髓微小環境様にする事で造血幹細胞の誘導を試みた。3) カナダ側から提案された造血幹細胞のダイレクトリプトグラミングに必要とされる Gif1b, c-fos, Gatat2 を導入した iPS 細胞についてもテラトーマを形成させ、造血幹細胞の誘導を試みた。さらに、テラトーマを作製する際、宿主側のマウス造血幹細胞が存在するために多能性幹細胞側の造血幹細胞が効率良く骨髓に生着しないという可能性がある。そこで血球細胞特異的に細胞死を起こすマウスを2種類以上作製し、血液細胞特異的細胞死誘導システムを持つマウスを用いることで体内における多能性幹細胞由来造血幹細胞の増殖を試みた。また、2013年に我々が発見した自己複製可能な lineage-restricted progenitor 細胞について討議を行い、ヒト ES 細胞における同様な細胞群の存在についてカナダ側が検索を開始した。

(小川研)

骨髓系腫瘍の中でも高率に急性骨髓性白血病 (AML) へ移行する特徴を有する骨髓異形成症候群 (MDS) について網羅的なエピゲノムマッピングを行った。MDS 192 例についてゲノムワイドに DNA のメチル化を測定することでエピゲノム異常の有無を測定した。また、腫瘍発症に直接影響を及ぼす 104 遺伝子に関する標的シーケンスを行うことでゲノム異常を解析した。その結果、DNA のメチル化と遺伝子変異に関する新たな相関関係が同定され、症例をいくつかの特徴を有するグループに層別化することが可能となった。これらのグループ間では DNA メチル化の程度が大きく異なるだけでなく、生存に関して有意差が認められたことから、ゲノム異常とエピゲノム異常が協調して腫瘍の進展に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、カナダで培われた造血幹細胞から各種血液細胞の分離する技術を用いて、造血幹細胞から末梢血における各分化段階でのエピゲノム異常とゲノム異常との相関を解析する予定にしている。

2. 研究実施体制

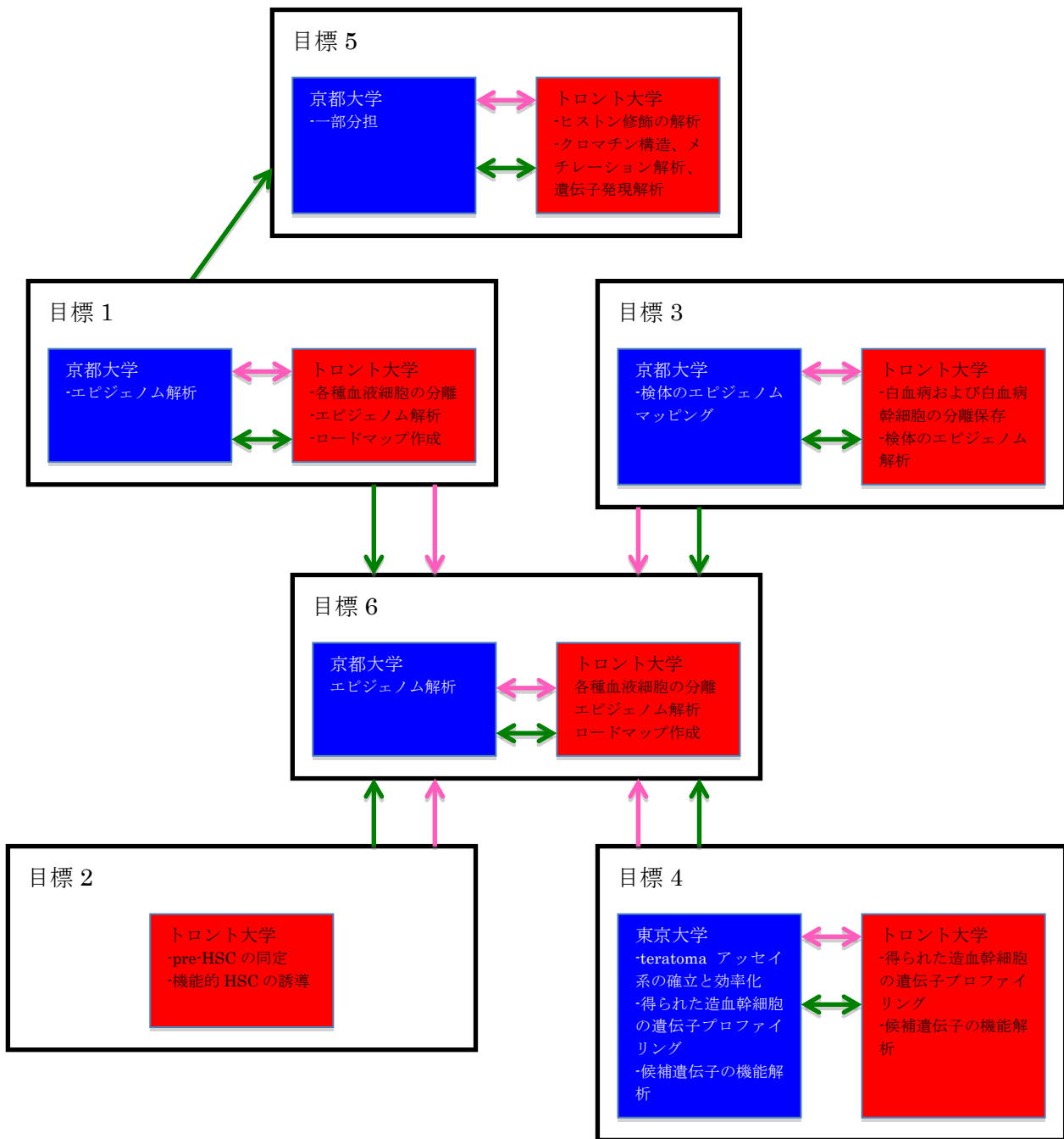
2-1. 日本側の研究実施体制

研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	中内 啓光	東京大学	医科学研究所	教授
主な共同研究者	小川 誠司	京都大学	医学研究科	教授

2-2. 相手側の研究実施体制

研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	John E.Dick	トロント大学	Dept of Molecular Genetics	教授
主な共同研究者	Gordon Keller	トロント大学	Department of Medical Biophysics,	教授
主な共同研究者	Mathieu Lupien	トロント大学	オンタリオン癌 研究所	准教授

2-3. 両国の研究実施体制



目標 1 : 胎児期、新生児期、成体正常造血幹細胞および造血前駆細胞のエピジェノムマッピング

目標 2 : ヒト多能性幹細胞 (PSC) 由来造血幹細胞の *in vitro* での分化誘導

目標 3 : 白血病および白血病幹細胞のエピジェノムマッピング

目標 4 : エピジェネティクス制御遺伝子の機能アッセイのための造血幹細胞誘導システムの開発目標

目標 5 : ヒストン修飾、クロマチン構造、メチレーション解析および遺伝子発現解析

目標 6 : データ解析とバイオインフォマティクス

3. 原著論文発表

3-1. 原著論文発表

① 発行済論文数

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0 件	(0 件)
国際誌 20 件	(0 件)
計 20 件	(0 件)

※本共同研究の相手側チーム研究者との共著に限る

(中内研)

1. Yamamoto R, Morita Y, Nakauchi H. Five-lineage clonal analysis of hematopoietic stem/progenitor cells. **Methods in molecular biology**. 2014;1185:237-45. doi: 10.1007/978-1-4939-1133-2_16. PubMed PMID: 25062633.
2. Sato A, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ishihara M, Tashiro Y, Gritli I, Shimazu H, Munakata S, Yagita H, Okumura K, Tsuda Y, Okada Y, Tojo A, Nakauchi H, Takahashi S, Heissig B, Hattori K. Inhibition of plasmin attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality by suppressing the matrix metalloproteinase-9-dependent inflammatory cytokine storm and effector cell trafficking. **Leukemia**. 2014. doi: 10.1038/leu.2014.151. PubMed PMID: 24791857.
3. Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, Nishimura T, Sadahira K, Fukuda K, Okano H, Nakauchi H, Morita Y, Matsumura I, Kudo K, Ito E, Ebihara Y, Tsuji K, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. **Leukemia**. 2014;28(12):2344-54. doi: 10.1038/leu.2014.136. PubMed PMID: 24732596.
4. Nakauchi Y, Yamazaki S, Napier SC, Usui JI, Ota Y, Takahashi S, Watanabe N, Nakauchi H. Effective treatment against severe Graft-versus-Host Disease with allele-specific anti-HLA monoclonal antibody in a humanized-mouse model. **Experimental hematology**. 2014. doi: 10.1016/j.exphem.2014.10.008. PubMed PMID: 25448490.
5. Nakamura S, Takayama N, Hirata S, Seo H, Endo H, Ochi K, Fujita K, Koike T, Harimoto K, Dohda T, Watanabe A, Okita K, Takahashi N, Sawaguchi A, Yamanaka S, Nakauchi H, Nishimura S, Eto K. Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. **Cell stem cell**. 2014;14(4):535-48. doi: 10.1016/j.stem.2014.01.011. PubMed PMID: 24529595.
6. Miyagi S, Koide S, Saraya A, Wendt GR, Oshima M, Konuma T, Yamazaki S, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Chiba T, Kitabayashi I, Nakauchi H, Iwama A. The TIF1beta-HP1 system maintains transcriptional integrity of hematopoietic stem cells. **Stem cell reports**. 2014;2(2):145-52. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.12.008. PubMed PMID: 24527388; PMCID: 3923190.

7. Matsunawa M, Yamamoto R, Sanada M, Sato-Otsubo A, Shiozawa Y, Yoshida K, Otsu M, Shiraishi Y, Miyano S, Isono K, Koseki H, Nakauchi H, Ogawa S. Haploinsufficiency of Sf3b1 leads to compromised stem cell function but not to myelodysplasia. *Leukemia*. 2014;28(9):1844-50. doi: 10.1038/leu.2014.73. PubMed PMID: 24535406.
8. *Lai CY, Yamazaki S, Okabe M, Suzuki S, Maeyama Y, Iimura Y, Onodera M, Kakuta S, Iwakura Y, Nojima M, Otsu M, Nakauchi H. Stage-specific roles for CXCR4 signaling in murine hematopoietic stem/progenitor cells in the process of bone marrow repopulation. *Stem cells*. 2014;32(7):1929-42. doi: 10.1002/stem.1670. PubMed PMID: 24510783.

CXCR4は造血幹細胞のホーミングに関与していると考えられている分子であるが、本研究で我々はCXCR4が造血幹細胞の骨髓微小環境へのホーミングのステージではなく、ホーミング後の増殖ステージにより重要な役割を持つことを明らかにした。
9. Kazuki Y, Yakura Y, Abe S, Osaki M, Kajitani N, Kazuki K, Takehara S, Honma K, Suemori H, Yamazaki S, Sakuma T, Toki T, Shimizu R, Nakauchi H, Yamamoto T, Oshimura M. Down syndrome-associated haematopoiesis abnormalities created by chromosome transfer and genome editing technologies. *Scientific reports*. 2014;4:6136. doi: 10.1038/srep06136. PubMed PMID: 25159877; PMCID: 4145315.
10. Ito K, Yamazaki S, Yamamoto R, Tajima Y, Yanagida A, Kobayashi T, Kato-Itoh M, Kakuta S, Iwakura Y, Nakauchi H, Kamiya A. Gene Targeting Study Reveals Unexpected Expression of Brain-expressed X-linked 2 in Endocrine and Tissue Stem/Progenitor Cells in Mice. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(43):29892-911. doi: 10.1074/jbc.M114.580084. PubMed PMID: 25143383; PMCID: 4208000.
11. Iriguchi S, Kikuchi N, Kaneko S, Noguchi E, Morishima Y, Matsuyama M, Yoh K, Takahashi S, Nakauchi H, Ishii Y. T cell-restricted T-bet overexpression induces aberrant hematopoiesis of myeloid cells and impairs function of lung macrophages in the lung. *Blood*. 2014. doi: 10.1182/blood-2014-05-575225. PubMed PMID: 25349175.
12. Ieyasu A, Tajima Y, Shimba S, Nakauchi H, Yamazaki S. Clock gene Bmal1 is dispensable for intrinsic properties of murine hematopoietic stem cells. *Journal of negative results in biomedicine*. 2014;13:4. doi: 10.1186/1477-5751-13-4. PubMed PMID: 24606809; PMCID: 4016489.
13. Hirata N, Nakagawa M, Fujibayashi Y, Yamauchi K, Murata A, Minami I, Tomioka M, Kondo T, Kuo TF, Endo H, Inoue H, Sato S, Ando S, Kawazoe Y, Aiba K, Nagata K, Kawase E, Chang YT, Suemori H, Eto K, Nakauchi H, Yamanaka S, Nakatsuji N, Ueda K, Uesugi M. A chemical probe that labels human pluripotent stem cells. *Cell reports*. 2014;6(6):1165-74. doi: 10.1016/j.celrep.2014.02.006. PubMed PMID: 24613351.

(小川研)

14. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann T, Yoshida K, Roller A, Nadarajah N, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Chiba K, Tanaka H, Koeflter HP, Klein HU, Dugas M, Aburatani H, Kohlmann A, Miyano S, Haferlach C, Kern W, Ogawa S. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2014 Feb;28(2):241-7. doi: 10.1038/leu.2013.336.

MDS,944例における標的遺伝子に関する網羅的な解析を行った。1症例あたりの平均変異数は3個であり、病勢が進行するにつれて変異個数が増加することが示された。その内、192例に関してメチル化解析を

行っており、unsupervised クラスタリングの結果、メチル化グループと *SF3B1* 変異や *TP53* 変異との相関が認められ、予後を分類できることが明らかとなった。

15. Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, Kato T, Yamamoto E, Suzuki K, Chen F, Asou N, Ohtake S, Miyawaki S, Miyazaki Y, Sakura T, Ozawa Y, Usui N, Kanamori H, Kiguchi T, Imai K, Uike N, Kimura F, Kitamura K, Nakaseko C, Onizuka M, Takeshita A, Ishida F, Suzushima H, Kato Y, Miwa H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Naoe T. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2014 Aug;28(8):1586-95. doi: 10.1038/leu.2014.55.
16. Yoshida K, Ogawa S, Splicing factor mutations and cancer. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2014 Jul-Aug;5(4):445-59. doi: 10.1002/wrna.1222.
17. Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, Diop M, Scourzic L, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kikushige Y, Davi F, Lambert J, Gautheret D, Merle-Béral H, Sutton L, Dessen P, Solary E, Akashi K, Vainchenker W, Mercher T, Droin N, Ogawa S, Nguyen-Khac F, Bernard OA. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov*. 2014 Sep;4(9):1088-101. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0104.
18. Rose D, Kohlmann A, Nagata Y, Ogawa S, Haferlach C, Kern W, Schnittger S, Haferlach T. A robust molecular pattern for myelodysplastic syndromes in two independent cohorts investigated by next-generation sequencing can be revealed by comparative bioinformatic analyses. *Br J Haematol*. 2014 Oct;167(2):278-81. doi: 10.1111/bjh.12971.
19. Maki K, Sasaki K, Nagata Y, Nagasawa F, Nakamura Y, Ogawa S, Mitani K. Expressional changes of genes and miRNA in common megakaryocyte-erythroid progenitors from lower-risk myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol*. 2014 Oct;100(4):361-9. doi: 10.1007/s12185-014-1639-2.
20. Madan V, Kanojia D, Li J, Okamoto R, Sato-Otsubo A, Kohlmann A, Sanada M, Grossmann V, Sundaresan J, Shiraishi Y, Miyano S, Thol F, Ganser A, Yang H, Haferlach T, Ogawa S, Koeffler HP. Aberrant splicing of U12-type introns is the hallmark of ZRSR2 mutant myelodysplastic syndrome. *Nat Commun*. 2015 Jan 14;6:6042. doi: 10.1038/ncomms7042.

以上