

「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」
平成 20 年度採択研究代表者

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、造血幹細胞の自己複製・多能性を規定するエピジェネティクスの理解を通して、iPS 細胞から組織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、iPS 細胞から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。

①造血幹細胞のエピジェネティクス制御機構の解明

造血幹細胞において、polycomb repressive complex (PRC)1 構成分子 Bmi1 の未同定の標的遺伝子の探索を行い、標的遺伝子をリストアップした。また、PRC2 の造血幹細胞における機能を理解するため、PRC2 構成分子 Ezh2 のコンディショナルノックアウトマウスを準備するとともに、解析ツール(強制発現系、ノックダウン系や抗体、遺伝子欠損誘導条件の至適化など)の検討を行った。さらに、トライソックス群(trxG)関連分子 BRD1/Brpf2 が形成する複合体を精製し、造血幹細胞における機能が未だ解析されていなかったヒストンアセチル化酵素(HAT) Hbo1 と BRD1 が複合体を形成することを同定した。

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

Bmi1 を含むポリコーム群(PcG)複合体が造血幹細胞・多能性前駆細胞において Ebf1 の発現を抑制すること、この抑制が破綻すると Ebf1, Pax5 が異所性に発現し、B 細胞分化が促進されるために、造血幹細胞・多能性前駆細胞数が有意に減少することを確認した。クロマチン免疫沈降法を用いた解析より、造血幹細胞・多能性前駆細胞において Ebf1, Pax5 プロモーターは bivalent クロマチン修飾(H3K4me3+H3K27me3)を受けており、Bmi1 欠損による PRC1 ヒストン修飾(H2AK119ub1)の欠落が PRC2 による H3K27me3 修飾の消失に直結し bivalent 修飾の消失を引き起こすことが明らかとなった。また MEF を用いた多能性幹細胞へのリプログラミングを行い系の確立を行った。当初 pro-B 細胞を用いてリプログラミングにおける Bmi1 の役割を検討する予定であったが、MEF の系で十分な情報が得られる可能性が高いと判断し、Bmi1 強制発現 MEF および Bmi1^{+/+}Ink4a-Arf^{-/-} MEF を準備中である。

③iPS 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

Tet-off システムで HoxB4 の発現制御可能なマウス ES 細胞を用いて、胚様体から c-Kit⁺CD41⁺胎児型造血幹・前駆細胞を純化する系を確立した。現在 HoxB4 遺伝子を発現

誘導した c-Kit⁺CD41⁺胎児型造血幹・前駆細胞を純化し、遺伝子発現プログラムの変化をマイクロアレイ解析と ChIP-on-chip 解析により解析中である。また、ヒト iPS 細胞からの造血幹細胞誘導系の予備的な検討として、ヒト iPS 細胞からの造血細胞誘導系の改良を行うとともに、誘導された造血細胞の免疫不全マウスへの移植実験を行った。

本年度の研究はほぼ予定通り進んでおり、それぞれの成果を基に、次の段階に進む予定である。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

本研究の目的を達成するために、以下の 3 項目からなるプロジェクトを推進している。

【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(岩間グループ)

クロマチン修飾分子であるポリコーム複合体 (PcG) とトリソラックス複合体 (trxG) による造血幹細胞機能制御に焦点を当て研究を進めている。

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

PRC1 構成分子 Bmi1 の標的遺伝子の中で、造血幹細胞において未同定の標的遺伝子の探索を行い、解析すべきいくつかの標的遺伝子をリストアップした。今後その機能解析を進めていく。また、PRC2 の造血幹細胞における機能の詳細を理解するため、PRC2 構成分子 Ezh2 のコンディショナルノックアウトマウスを入手し、Mx1 Cre および Tie-2 Cre マウスと交配中である。今後、その造血幹細胞機能の詳細な解析と、その標的遺伝子のプロファイリングを行う予定である。

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

研究代表者らが Bmi1 と会合する分子として同定した trxG 関連分子 BRD1/Brpf2 が形成する複合体をアフィニティー精製し、その構成を明らかにした。その結果、BRD1 はヒストンアセチル化酵素として予想されていた MOZ ではなく Hbo1 を主に含む HAT 複合体を形成することが示された(図 1)。Hbo1 を含む HAT 複合体の造血における機能は報告がなく、詳細な解析により造血幹細胞の新しい制御機構が明らかになることが期待される。

また、以上のプロジェクトと関連の深い幹細胞の自己複製に関する論文を 3 つ報告した¹⁾⁻³⁾。

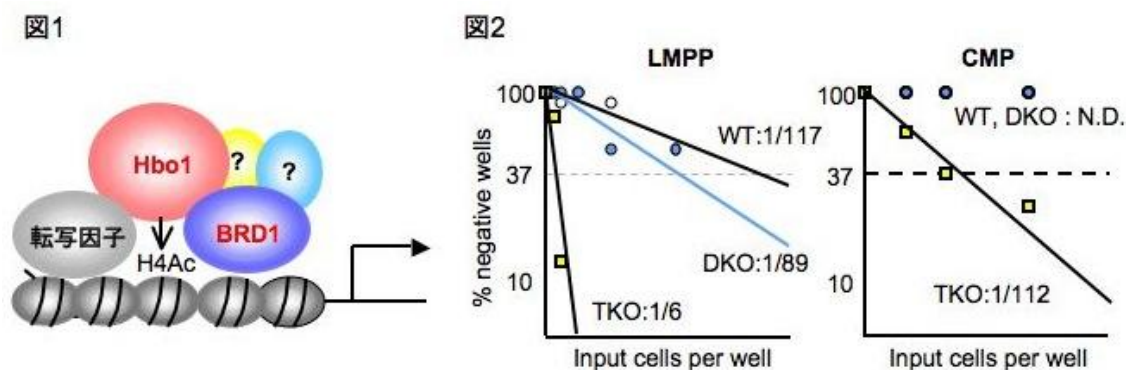


図 1: Hbo1-BRD1 複合体

図 2: Lymphoid-primed multipotential progenitor (LMPP) と CMP の in vitro における B 細胞分化の頻度。DKO: Ink4a-Arf^{-/-}, TKO: Bmi1^{-/-}Ink4a-Arf^{-/-}

【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)

造血細胞において、分化が最終決定された状態と可塑的な状態を規定するエピジェネティクス制御の理解を通して、造血細胞における多能性・可塑性を理解する。さらに、PcG 遺伝子欠損細胞を用いた多能性幹細胞へのリプログラミングの検証を行うことにより、PcG のリプログラミングにおける機能的な役割を明らかにする。

1. Bmi1 による Pax5 遺伝子発現制御と B 細胞分化

本年度は、主に B 細胞分化の分化制御転写因子 Ebf1, Pax5 が発現する以前の未分化造血細胞が保持する分化の多能性・可塑性を、Bmi1 による Ebf1, Pax5 遺伝子の発現制御を通して理解しようと試みた。その結果、Bmi1 を含む PcG 複合体が造血幹細胞・多能性前駆細胞において Ebf1 の発現を抑制すること、この抑制が破綻すると造血幹細胞・多能性前駆細胞において Ebf1, Pax5 が異所性に発現し、B 細胞系への分化が有意に促進され(図 2)、リンパ球系前駆細胞の絶対数が増加するのに反して、造血幹細胞・多能性前駆細胞の絶対数が減少することを明らかにした。また、Ebf1, Pax5 の異所性の発現は骨髓球系前駆細胞においても認められ、common myeloid progenitor の in vitro の培養において 1/112 細胞の頻度で B 細胞が産生されることが確認された。以上より、B 細胞分化が Ebf1, Pax5 により最終決定される以前の未分化な造血細胞においては、Bmi1 が Ebf1, Pax5 の発現抑制状態を維持し分化の可塑性を維持するものと考えられる。クロマチン免疫沈降法 (ChIP)を用いた PcG の Ebf1, Pax5 プロモーターへの局在と同プロモーターのヒストン修飾制御(H3K4me3, H3K27me3, H2AK119 ubiquitination)の解析より、造血幹細胞・多能性前駆細胞において Ebf1, Pax5 プロモーターは bivalent クロマチン修飾(H3K4me3+H3K27me3)を受けており、Bmi1 欠損による PRC1 ヒストン修飾(H2AK119ub1)が PRC2 による H3K27me3 修飾の維持に必須であり、bivalent 修飾の安定化に寄与することが明らかとなった。遠藤らは ES 細胞における bivalent domain が PRC1 が結合するものとしなないものの2つのクラスに分けられ、分化制御に関わる遺伝子プロモーターの多くが PRC1 が結合した bivalent domain を形成することを明らかにしている⁴⁾。今回の知見はこの遠藤らの ES 細胞における知見に符合するものであり、組織幹細胞においても可逆的な遺伝子発現抑制と多能性維持の維持に bivalent domain が関与する可能性を示唆している。

2. Bmi1^{-/-}Ink4a-Arf^{-/-} pro-B 細胞の多能性幹細胞へのリプログラム

MEF を用いた iPS 細胞へのリプログラミングを行い、系の確立を行った。当初 Bmi1^{-/-}Ink4a-Arf^{-/-} pro-B細胞を用いて、リプログラミングにおける Bmi1 の役割を検討する予定であったが、MEF の系で十分な情報が得られる可能性が高いため、Bmi1 強制発現 MEF および Bmi1^{-/-}Ink4a-Arf^{-/-}MEFを準備中であり、まず WT MEF, Ink4a-Arf^{-/-}MEFとリプログラミングの効率、程度を比較する予定である。

【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

iPS 細胞から造血幹細胞を効率良く誘導する系の確立を図る。

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(岩間、江藤、遠藤グループ)

Tet-off システムで HoxB4 の発現制御可能なマウス ES 細胞を用いて、胚様体から

c-Kit⁺CD41⁺胎児型造血幹・前駆細胞を純化する系を確立した(江藤グループ)。現在 HoxB4 遺伝子を発現誘導した c-Kit⁺CD41⁺胎児型造血幹・前駆細胞を純化し、遺伝子発現プログラムの変化を、マイクロアレイ解析と ChIP-on-chip 解析により解析中である(岩間、遠藤グループ)。今後レトロウイルスを用いた HoxB4 遺伝子発現系を用いて同様の解析を行う予定であり、これら2つの結果を合わせて、HoxB4 の標的遺伝子の絞り込みとそのプロモーターにおけるクロマチン修飾の変化を検証する予定である。また、Bmi1 や Sox17 などの造血幹細胞誘導候補遺伝子の機能解析を開始した。

2. ヒト iPS 細胞からの造血幹細胞誘導系の確立(江藤グループ)

既にマウス ES 細胞を始め、ヒト ES 細胞をソースとした培養による血液細胞誘導系を確立している。本誘導系では、造血前駆細胞が集積される ES-sac が培養皿内に観察できる。そこで本年はヒト iPS 細胞からの造血幹細胞誘導系の予備的な検討として、ヒト iPS 細胞からの iPS-sac を誘導できる細胞培養系の改良を行うとともに、iPS-sac 内部の誘導された造血細胞の免疫不全マウスへの移植を行った。遺伝子操作(HoxB4 を含む造血関連遺伝子の強制発現等)をしないで移植したマウスでのヒト細胞の骨髄内の再構築は5週間までは観察可能であったが、長期(3ヶ月以上)ではまったく観察できなかった。今後は胚様体形成によって誘導される CD34 陽性細胞を造血幹細胞のソースとした解析系も検討する予定である。また、遺伝子操作を含めて、系の確立を目指していきたい。

3. 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

【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 Pax5 遺伝子発現制御と B 細胞分化
2. Bmi1^{-/-}Ink4a-Arf^{-/-} pro-B 細胞の多能性幹細胞へのリプログラム

【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)「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

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. 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)理化学研究所、研究員)

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

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

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi SI, Eto K, Ema H, and Nakauchi H. TGF- β as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. **Blood** 113, 1250-1256, 2009.
2. Chiba T, Miyagi S, Saraya A, Aoki R, Seki A, Morita Y, Yonemitsu Y, Yokosuka O, Taniguchi H, Nakauchi H, and Iwama A. The polycomb gene product BMI1 contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma. **Cancer Res** 68, 7742-7749, 2008.
3. Yashiro Y, Bannai H, Yabiku T, Minowa T, Miyano S, Osawa M, Iwama A, Nakauchi H. Transcriptional profiling of hematopoietic stem cells by high-throughput sequencing. **Int J Hematol** 89, 24-33, 2009.
4. Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, Presser A, Nusbaum C, Xie X, Chi AS, Adli M, Kasif S, Ptaszek LM, Cowan CA, Lander ES, Koseki H, Bernstein BE. Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. **PLoS Genet.** 4:e1000242, 2008.
5. Fukushima K, Matsumura I, Ezoe S, Tokunaga M, Yasumi K, Satoh Y, Shibayama H, Tanaka H, Iwama A, and Kanakura Y. FIP1L1-PDGFR α imposes eosinophil lineage commitment on hematopoietic stem/progenitor cells. **J Biol Chem** 284, 7719-7732, 2009.
6. Feng J, Iwama A, Satake M, and Kohu K. MicroRNA-27 enhances differentiation of myeloblasts into granulocytes by post-transcriptionally down-regulating Runx1. **Br J Haematol** 2009 Feb 28. [Epub ahead of print].