

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

本年度は、①リンパ球由来 iPS 細胞誘導プロトコルの樹立、及び、②iPS 細胞の血球系細胞への分化誘導プロトコルの樹立を試みた。成熟したマウス NKT 細胞と B 細胞から山中 4 因子による iPS 細胞の樹立が可能であることが示され、現状のプロトコルでは NKT 細胞からの樹立頻度は B 細胞に比べ10倍以上低いことが示された。今後、これらのプロトコルを至適化及び標準化していく必要がある。また、NKT 細胞クローン由来 iPS 細胞から機能的に成熟した NKT 細胞を誘導する培養系の樹立に成功した。今後、他の細胞系譜への分化誘導プロトコルの樹立を試みる。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

研究目的

ヒト iPS 細胞から誘導した造血・免疫細胞を用いたヒト化マウスによる疾患治療モデルの樹立というゴールに向けて、本年度は、①リンパ球由来 iPS 細胞誘導プロトコルの樹立、及び、②iPS 細胞の血球系細胞への分化誘導プロトコルの樹立を試みた。項目①については、完全に分化し免疫反応に従事する T 細胞、B 細胞といった末梢リンパ球が繊維芽細胞と同様に山中4因子の強制発現によりリプログラミングして iPS 化するかどうかはこれまで不明であった。ここでは、マウス NKT 細胞と B 細胞を用いて樹立プロトコルの標準化を試みた。②については、抗原特異的リンパ球クローン由来マウス iPS 細胞の成熟リンパ球への分化誘導プロトコルの樹立、および、ヒト iPS 細胞の免疫系細胞への分化誘導プロトコル樹立を試みた。また、予備的な研究として、ES 細胞を用いてエピゲノム状態をゲノムワイドに解析する実験システムの立ち上げを行った。

方法・結果

① リンパ球由来 iPS 細胞誘導プロトコルの樹立

マウス脾臓から NKT 細胞の場合部分精製(30～50%、残りは B 細胞)、B 細胞の場合 98%

以上まで精製した上で、サイトカイン等の存在下で一晩培養した。その後、山中 4 因子を発現するレトロウイルスベクターを感染させ、フィーダー細胞上で ES 細胞維持培地を用いて、4 週間の培養を行い、14〜28 日目にかけて出現してきたコロニーを順次ピックアップした。増殖したコロニーをトリプシンによって解離させ 24 穴プレート上で培養を行い、ES 様コロニーの出現をもって iPS 細胞と判定した。10⁵ 程度の細胞から、通常 30〜40 の iPS 細胞の樹立を見た。その後、NKT 細胞については、それに特異的な Va14/Ja18 の T 細胞抗原受容体 α 鎖の遺伝子再構成をマーカーとして、起源となる細胞の同定を試みた。B 細胞については、脾臓及び骨髓から細胞を精製し、ディジェネレートしたプライマーを用いて組換え後の Ig 重鎖と軽鎖領域を PCR 増幅する系を立ち上げ、使用されている V_H 及び V_L の決定と超可変部位でプロダクティブな遺伝子再構成がおこっているのかを確認した。その結果、NKT 細胞については、最終的に 1 クローンが iPS 化されたことが確認され、残りはいずれも B 細胞由来であることが示された。B 細胞については、10⁻⁴ を超える頻度で iPS 化がおこることが示された。面白いことに、21 日を超えてから現れるコロニーの方が iPS 化される傾向が強く、確認を続けていく。また、B 細胞の方が iPS 化され易いようなので、NKT 細胞についてはより純度の高い細胞を用いる必要があることが明らかになった。

CEBPa あるいは Id3(E2A を抑制:PAX5 抑制と同じ効果を期待できる)の発現ベクターを含んだウイルスを作成し、山中因子とともに精製 B 細胞に感染させ、iPS 細胞誘導効率を比較した。結果として、山中因子だけの場合と比べて特に効率が増加しなかった。山中因子だけで B 細胞から iPS を誘導するのは十分有効であるという感触を得た。

iPS 細胞化できた細胞を選択する目的やマウスの iPS 細胞の分化・未分化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トランスジェニックマウスの作成を試みた。キメラマウスの作成も引き続き実施していく。

② iPS 細胞の血球系細胞への分化誘導プロトコルの樹立

1) NKT 細胞クローン由来 iPS 細胞からの成熟 NKT 細胞の誘導

マウス NKT 細胞は TCR α 鎖領域が Va14-Ja18 再構成していることを特徴とし、NKT 細胞から作製したクローンマウスでは、ほとんどの T 細胞は NKT 細胞となる。すなわち、NKT 細胞に特異的な T 細胞抗原受容体の発現は、NKT 細胞への分化あるいはその増殖を強くプロモートする。NKT クローンマウスの末梢リンパ球及び胎児繊維芽細胞より iPS 細胞を樹立した (NKT-iPS 細胞:4 クローン、NKT-MEF-iPS 細胞:4 クローン)。NKT-ES 細胞、NKT-iPS 細胞、NKT-MEF-iPS 細胞の遺伝子発現プロファイルや DNA メチル化傾向は既存の ES 細胞と同等であることから、NKT-iPS 細胞、NKT-MEF-iPS 細胞は iPS 化しているものと考えられる。我々はこれら 3 種の細胞が機能的な NKT 細胞に分化する培養系を開発した。すなわち、Notch リガンドを強制発現させた OP9 ストローマ細胞と、IL-7, Flt3L 存在下、約 20 日間共培養することにより、生体内で抗腫瘍効果を有し得る機能的な NKT 細胞に分化することが明らかとなった。これらの結果は末梢リンパ球から樹立した iPS 細胞から機能的リンパ球を特異的に分化誘導していることを明確に示した。

2) マウス ES 細胞および iPS 細胞からの IdHP 細胞の作製とその機能解析

IdHP 細胞は B 細胞への分化誘導の途中で分化を強制阻害することにより多能前駆細胞の

自己複製を誘導する方法である。従って、まずマウス ES 細胞から B 細胞を誘導する実験を行った。すでに確立されている定法に従い、まず ES 細胞をストローマ細胞 OP9 と 6 日間共培養し、中胚葉系の細胞を誘導する。その後 OP9 ごととはがして、培地に FLt3 と IL-7 を添加した OP9 細胞上に播き直す。植え継ぎ後約 2 週間で B 細胞が生成した。IdHP 細胞の誘導は今後行なう予定である。

PI ポリアミドは DNA の特定のシーケンス特異的に結合するようにデザインできる。IdHP 細胞は E 蛋白のひとつ E2A の機能阻害により誘導されるものなので、その代替法として E2A の標的 DNA シーケンスに阻害的に結合するような PI ポリアミドを作成し、培地に加えてマウス造血前駆細胞を培養した。Id3 強制発現系に比べると効率は低い、B 細胞の分化を阻害し、前駆細胞を増幅するという効果は得られた。この結果は、レトロウイルスを使用しない方法でも造血前駆細胞が増幅できることを示している。

ヒト細胞用パッケージング細胞 (platF) を用いて、ヒト細胞に感染できるレトロウイルスを作成した。これを用いてヒト臍帯血 CD34 陽性細胞に Id3 を導入し、ヒト B 細胞培養条件で培養した。マウスと同じように、大型の未分化な芽球様細胞の増幅がみられた。この細胞は樹状細胞への分化能を有することが確認できた。

3) ヒト iPS 細胞からの免疫担当細胞の誘導

ヒト iPS 細胞からの免疫担当細胞の誘導プロトコルを樹立し、iPS 細胞から成熟ヒト免疫細胞への分化経路を明らかにする。また、ヒト免疫細胞への分化における液性因子、転写因子の役割をあきらかにする。そのために、以下のプロトコルにしたがって実験を一部行った。

フィーダー細胞上で継代・維持しているヒト iPS 細胞を酵素処理によって single cell suspension にして、OP9 culture または stroma free の培養にかえる。同時に、iPS の継代の過程で形成される embryoid body (胚様体) を準備し、同様に OP9, stroma free culture に移す。これらの培養条件で、iPS 細胞および embryoid body を用いて、中胚葉系、特に造血方向への分化を以下の2つの手法で誘導する。

- 1 液性因子 (TGFb1, TGFb3, SCF, TPO, FL, VEGF) 存在下の培養を 5-7 日間行なう。
- 2 HOXB4 をはじめとする転写因子 (HOXB4 以外の候補として HOPX, HLF, HOXA3) の強制発現を EF1alpha, GAPDH プロモーターを用いたレンチウイルスベクターを用いて実施する。

1 の培養期間中および 2 において感染が成立した Venus (or GFP) 陽性細胞を用いて、表面に発現する分子である Flk 1, VE-cadherin, E-cadherin, CD34, PDGFRa の発現をフローサイトメトリーにて確認することによって中胚葉系への誘導が認められるかどうかを判定する。

その後、中胚葉系に分化したと考えられる上記表面抗原陽性の細胞をソーティングにて純化し、細胞数に応じて以下の解析を実施する。

- 1 新生仔 NOD/SCID/IL2rgKO マウスに経静脈的に輸注し、生体内にて分化したヒト細胞の同定を行なう。
- 2 in vitro の評価系にて、各免疫細胞への分化能を同定する。
- 3 RNA を抽出し、幹細胞性質および胚葉特異的マーカーの検索を qPCR にて行なう。

ヒト iPS の継代培養が安定し、embryoid body の形成まで再現性をもって誘導できたばかりであり、中胚葉系へ誘導する培養 1 のファックス解析を行う。方法 2 の遺伝子強制発現の系で

は、HOXB4 以外に、iPS, ES 細胞との遺伝子発現プロファイルの比較に基づいて、ヒト造血幹細胞に特異的に発現している転写因子群のクローンを準備した。GFP のみを発現するコントロールベクターを用いた感染実験で、レンチウイルスの感染を確認した。候補となる転写因子のクローンを PCR にて増幅して、それぞれの強制発現を行なう。

4) ES 細胞を用いたエピゲノム状況のゲノムワイド解析

ポリコム群を標的として、ES 細胞におけるクロマチン結合をゲノムワイドに解析した。ポリコム群のひとつである Ring1B は、トリメチル化されたヒストン H3K27 が結合する遺伝子の一部に集積することを ChIP-seq 法を用いて明らかにした¹⁾。

3. 研究実施体制

「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

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. 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. (2008) Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet.* 4:e1000242.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 2 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)