

「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。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

未分化造血細胞株 EML を用いたポリコム (PcG) およびそのヒストン修飾の ChIP-Chip 解析を行い、造血幹細胞における PcG の標的遺伝子の探索を行うとともに、Bmi1 ノックアウト造血幹細胞で発現が亢進している遺伝子群の解析から、Bmi1 が造血幹細胞からの巨核球分化を抑制的に制御している可能性が示された。また、Ezh2 ノックアウトマウスの解析から、胎仔肝と骨髄における PcG によるエピジェネティクス制御の様式が異なることが示唆された。さらに、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 の ChIP-Chip 解析を行い、Hbo1 と BRD1 が多くの標的遺伝子を共有することが明らかとなった。

#### 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

転写因子 Ebf1, Pax5 遺伝子座の ChIP 解析より、ES 細胞で認められる 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の維持が、造血幹細胞においても機能することを確認した。

#### 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

HoxB4 の標的遺伝子のマイクロアレイと ChIP-on-chip データより、HoxB4 が造血幹細胞の発生・

維持に重要性な多くの遺伝子を制御することが明らかとなった。HoxB4 にかわる新規造血幹細胞誘導因子のスクリーニングの一つとして、胚様体から誘導した c-Kit<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>胎児型造血幹・前駆細胞に候補遺伝子の強制発現を行った。この結果、c-Kit<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>胎児型造血幹・前駆細胞を増幅する分子を同定し、詳細な解析を進めつつある。ヒト iPS 細胞から胚様体を介して CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>造血幹・前駆細胞を誘導する系を確立した。今後、この系を用いて造血幹細胞誘導遺伝子・化合物のスクリーニングを行う予定である。

## § 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

#### 【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*<sup>-/-</sup>*Ink4a-Arf*<sup>-/-</sup> pro-B 細胞の多能性幹細胞へのリプログラミング

#### 【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

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

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

**【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) *Bmi1* KO 造血幹細胞のマイクロアレイ発現解析の結果を確認・補強するために、未分化造血細胞株 EML に 3xFlag-*Bmi1* を発現させ、Flag, H2AK119ub1, Ezh2, H3K27me3, H3K4me3 に対する抗体を用いて ChIP-Chip 解析を行った。現在そのデータを解析中である。また、*Bmi1* KO 造血幹細胞で発現が亢進している遺伝子の中で特に発現の高い転写因子群を造血幹細胞に強制発現し骨髄移植を行ったところ、2つの遺伝子によって巨核球の増幅が認められ、骨髄線維症を来すことが明らかとなった。*Bmi1* KO では common myeloid progenitor (CMP)からの分化が MEP に偏る傾向が観察されており、*Bmi1* が HSC からの巨核球分化を抑制的に制御している可能性が考えられ、解析を進めている。

2) 造血細胞特異的に *Ezh2* を KO したマウスを解析したところ、胎仔肝において *PcG* の重要な標的遺伝子 *Ink4a/Arf* が脱抑制し、造血幹細胞の増幅が著しく抑制され、胎仔は胎生 13.5-14.5 日に死亡することが明らかとなった。しかし、成体で *Ezh2* を KO しても *Ink4a/Arf* の発現はかわらず、造血幹細胞の明らかな異常は認められなかった。したがって、胎仔肝と骨髄における *PcG* による *Ink4a/Arf* 発現制御は異なるものと考えられ、このエピジェネティクス制御の違いについて現在解析を進めている。この違いは ES/iPS 細胞からの造血幹細胞誘導に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。

**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**

ヒストンアセチル化酵素複合体 Hbo1-BRD1/Brpf2 のうち、BRD1 のノックアウトマウスにおいて、胎仔肝の造血幹細胞の有意な減少を認め、胎仔は貧血のために胎生 13.5 日前後に死亡した。しかしながら、骨髄移植においてはほぼ正常の骨髄再建活性が認められた。これは、BRD1 のファミリー分子による機能的な補完が行われるためと考えられる。この点を確認するために、HAT 活性を有する Hbo1 のコンディショナルノックアウトマウスを作成中であり、現在組み換え ES 細胞が得られている。また、Hbo1 と BRD1 を共発現する K562 血液細胞を用いて ChIP-Chip 解析を行い、Hbo1 と BRD1 がともに多くの標的遺伝子を共有することが明らかとなった(図1)。

## 【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 Pax5 遺伝子発現制御と B 細胞分化

転写因子 Ebf1, Pax5 の発現により B 細胞分化が最終決定される以前の未分化な造血細胞において、Bmi1 が Ebf1, Pax5 の発現抑制状態を維持することにより分化の多能性が維持されることが明らかとなった。すなわち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 (K4me3, K9Ace, K27me3, H2AK119 ubiquitination) の詳細な解析から、ES 細胞に認められる 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 (図 2)<sup>1)</sup>。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のかを検証するために、【項目①】の細目 1 に記述した未分化造血細胞株 EML における PcG の ChIP-Chip 解析結果を、bivalent domain の観点から詳細に検討する予定である。

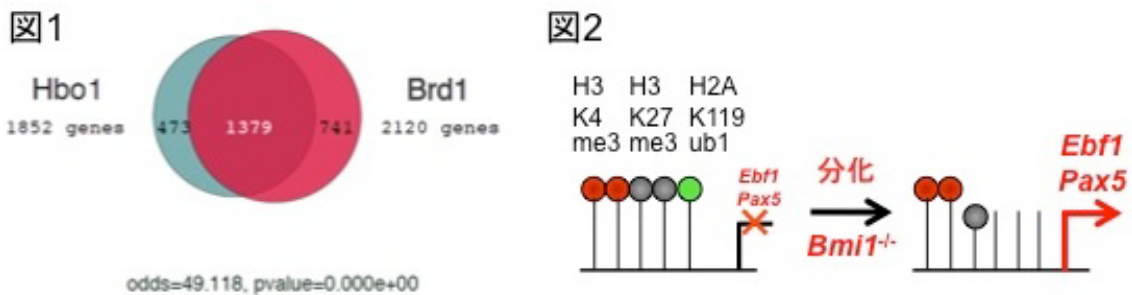


図1 ChIP-Chip 解析で Hbo1 と BRD1 の結合 (バックグラウンドの 4 倍以上) が認められた遺伝子のベン図

図 2 転写因子 Ebf1, Pax5 遺伝子プロモーターは多能性造血幹細胞・前駆細胞では bivalent domain 様ヒストン修飾による可逆的な遺伝子発現抑制を受けるが、B 細胞分化にともない PcG による抑制性のヒストン修飾が解除される。あるいは Bmi1 ノックアウト細胞においては多能性造血幹細胞・前駆細胞において早期に解除され転写が異所性に活性化する。

### 2. Bmi1<sup>-/-</sup>Ink4a-Arf<sup>-/-</sup> MEF細胞の多能性幹細胞へのリプログラム

野生型 MEF、Bmi1 強制発現 MEF、Ink4a-Arf<sup>-/-</sup> MEF および Bmi1<sup>-/-</sup>Ink4a-Arf<sup>-/-</sup> MEF を用いた iPS 細胞へのリプログラミングを行い、リプログラミングの効率、程度を比較することにより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。しかし、昨年中旬に Bmi1 の重要な制御遺伝子である Ink4a-Arf のリプログラミングへの効果が報告されたため、このプロジェクトの重要性は低下したと判断し、プロジェクトは中断している。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

1. Oguro H, Yuan J, Ichikawa H, Ikawa T, Yamazaki S, Kawamoto H, Nakauchi H, and Iwama A. Poised lineage specification in multipotent hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein Bmi1. *Cell Stem Cell* 6, 279–286, 2010. DOI 10.1016/j.stem.2010.01.005
2. Okabe M, Otsu M, Ahn DH, Kobayashi T, Morita Y, Wakiyama Y, Onodera M, Eto K, Ema H, Nakauchi H. Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood* 114:1764-1767, 2009. DOI 10.1182/blood-2009-02-203695.
3. Nishino T, Miyaji K, Ishiwata N, Arai K, Yui M, Asai Y, Nakauchi H, and Iwama A. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by a small-molecule agonist of c-MPL. *Exp Hematol* 37:1364-1377, 2009. DOI 10.1016/j.exphem.2009.09.001
4. Koizumi T, Negishi M, Oguro H, Satoh K, Ichinose M, and Iwama A. Depletion of Dnmt1-associated protein 1 triggers DNA damage and compromises the proliferative capacity of hematopoietic stem cells. *Int J Hematol* in press.