

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

マウス B リンパ球に由来する iPS 細胞(B-iPS 細胞)をモデルとして、リプログラミングに抵抗する遺伝子群の抽出を試み、エピジェネティック因子であるポリコム群の標的遺伝子群がその標的であることを示した。また、B-iPS 細胞から試験管内での B 細胞誘導を試みても、PAX5 や EBF の発現が上昇しない。PAX5 をレトロウイルスを用いて分化途上の前駆細胞に発現させたところ、部分的ではあるが B 系列の細胞の生成がみられた。PAX5 も EBF もポリコム群の標的遺伝子であることから、この不完全なリプログラミングの結果、B-iPS 細胞の分化刺激への抵抗性が生じていると考えられた。

また、ヒト iPS 細胞からの血球系の多能性細胞誘導を試みた。OP9, OP9-DLL1 をストローマ細胞として、ヒト iPS 細胞からヒト CD45⁺CD34⁺CD38⁺細胞、CD45⁺CD34⁺CD38⁺細胞の誘導に成功したことにより、これら iPS 由来ヒト CD34⁺細胞の *in vitro* での分化能、転写因子を中心とした遺伝子発現プロファイルを決定した。臍帯血、骨髄由来のヒト CD34⁺CD38⁺造血幹細胞との遺伝子発現の違いについても比較検討を行った。

我々は、抗腫瘍効果に必須の免疫担当細胞である多機能性細胞集団ナチュラルキラー T (NKT)細胞から iPS 細胞の樹立についてマウスで成功した。この iPS 細胞は、T 細胞抗原受容体領域が NKT 細胞のみが発現する Va14-Ja18 に遺伝子再構成を起こしているため、試験管内分化誘導系によって NKT 細胞に容易に分化し得る。この iPS 細胞由来 NKT 細胞はリガンドである糖脂質に反応してサイトカイン(特に IFN- γ)を大量に産生する他、移入実験により強力な抗腫瘍効果を発揮することを見出した。

§ 2. 研究実施体制

(1)「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

§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・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

この項目では、マウス B リンパ球に由来する iPS 細胞 (B-iPS 細胞) をモデルとして、リプログラミングに抵抗する遺伝子群の抽出を試みた。C57BL6 系統由来の3系統の B-iPS 細胞と2系統の通常の ES 細胞を用いて、マイクロアレイを用いたゲノムワイドな発現解析を行ったところ、ポリコム群の標的遺伝子群に有意な発現抑制が見出された。実際にポリコム群の結合を、ChIP-Chip 法を用いて解析したところ、ポリコム群のクロマチン結合には、2種類の異常が見出された。ひとつは、ES 細胞におけるポリコム群の標的遺伝子群ではポリコム群の平均的な結合は有意に低下していた。一方、逆に本来ポリコム群の標的ではない遺伝子群では、軽微ではあるものの有意な異所的な結合が観察された。この結果は、ロンドンの研究グループとの共同研究²⁾の結果ともよく合致する。

上記の研究をヒト iPS 細胞へと広げていく前段階として、ヒト末梢血リンパ球のリプログラミングを試みた。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が明らかになった。また、SV40T 抗原の共発現が、顕著に効率を高めることを見出した。

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

この項目でのひとつの目的は、ヒト iPS 細胞から、移植・細胞治療に用いることのできるヒト造血幹細胞・前駆細胞を誘導することである。そのために、OP9, OP9, OP9-DLL1 をストローマ細胞として、ヒト iPS 細胞から誘導したヒト CD45-CD34+CD38-細胞を day 7, day 14 で 500~15000 個回収、CD45+CD34+CD38-細胞を day 14 で 500~20000 個回収して、in vivo (新生仔 NOD/SCID/Il2rgKO マウスへの移植)、in vitro (メチルセルローズ培養系でのコロニー形成能) での分化能について解析した。また、ヒト iPS 細胞、臍帯血ヒト CD34+CD38-造血幹細胞、骨髓由来ヒト CD34+CD38-造血幹細胞、ヒト iPS 細胞由来ヒト CD45-CD34+CD38-細胞、ヒト iPS 細胞由来ヒト CD45-CD34+CD38-細胞の RNA を抽出し、pico-ovation を用いて増幅後、qRT-PCR にて、転写因子の発現様式を qRT-PCR にて解析した。

その結果、造血幹細胞の候補分画であるヒト iPS 細胞由来ヒト CD45⁻CD34⁺CD38⁻細胞を 1000~20000 個/マウスで、30 匹の新生仔経静脈的 NOD/SCID/Il2rgKO マウスへ移植したものの、1%以上の生着は、骨髓、脾臓、末梢血のどの組織にも認めることができなかった。そこで、in vitro での分化能について、ヒト iPS 細胞を OP9 上で培養開始後 day14 で回収した CD45⁻CD34⁺CD38⁻細胞、CD45⁻CD34⁺CD38⁻細胞を、50ng/ml SCF, 3U/ml EPO, 20ng/ml G-CSF, 20ng/ml GM-CSF, 20ng/ml IL-3, 20ng/ml IL-6 存在下でメチルセルロース培養を行った。その結果、顆粒球系および単球系コロニー形成能が両者の細胞において確認された。また、CD45⁻CD34⁺CD38⁻細胞では、fibroblast 様の細胞で構成されるコロニー形成も確認された。

次に、in vivo でのヒト免疫再構築が実現しない原因を探索し、OP9 の培養によるシグナルで誘導された CD45⁻CD34⁺CD38⁻細胞、CD45⁻CD34⁺CD38⁻細胞がどの程度、造血系の転写因子を発現しているかを解析した。その結果、NANOG, OCT3/4, SOX2 などの iPS/ES に重要な転写因子群は、iPS 細胞由来ヒト CD45⁻CD34⁺CD38⁻細胞、iPS 細胞由来ヒト CD45⁻CD34⁺CD38⁻細胞の両者から得られた RNA を用いることで、臍帯血、骨髓由来造血幹細胞と同等のレベルにまで発現が低下していることが確認された。一方、マウス ES 細胞から造血前駆細胞へ誘導するとされる HOXB4 や他の HOX 遺伝子については、同等の発現レベルを示す遺伝子と、十分に発現が高くない遺伝子が混在した。

以上より、マウスの骨芽細胞である OP9 からのシグナルがヒト iPS 細胞に入ることによって、中胚葉系、造血系に分化が誘導されることが確認された。しかし、自己複製能を有するヒト造血幹細胞の誘導には、ヒトストローマ細胞の使用、転写因子の強制発現など、次なるアプローチが不可欠であると考えられる。同時に、in vivo, 転写因子の発現については、day 14 のみならず、day 10, day12 の異なる時期に細胞回収→分化能の解析を行うことで、造血幹細胞になったポイントを見逃していないことを確認する。

この項目でのもうひとつの目的は、iPS 細胞から B 細胞を誘導する系において、B 細胞を生成できないクローンと生成できるクローンがあり、この違いがどうして生じるかを明らかにすることである。まず、iPS 細胞から B 細胞への分化のどの時点で分化が停まっているのかを明らかにするために、OP9 を用いた分化誘導系での経時的な変化を詳細にフローサイトメーター解析した。造血前駆細胞は c-kit⁺CD45⁺として出現し、IL-7R を発現する。次に c-kit の発現が下がって c-kit 弱陽性 (c-kit^{lo}) 細胞になり、その後 B 細胞系のマーカーである B220 を発現して c-kit⁻B220⁺細胞になる。B 細胞への抵抗性を示すクローンの場合、IL-7R+c-kit^{lo} 段階までは分化する。その時点で分化停止し、B 細胞系のマーカーである B220 を発現するにはいたらないことが判明した (図1)。

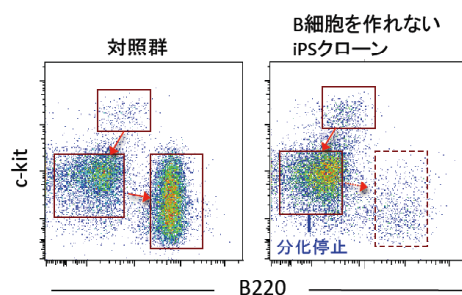


図 B細胞への分化に抵抗性を示すiPS細胞の場合、B220発現の直前の段階で分化が停止する

OP9を用いたB細胞の分化誘導系を用いてiPS細胞を培養した。分化誘導17日目に、生成した細胞。CD45⁺IL-7R⁺分画にゲートをかけたprofileを示している。

そこで、上記培養系において各分化段階の細胞を採取し、マイクロアレイ解析および Q-PCR 法にて遺伝子発現プロファイルを解析した。その結果、B 細胞へ分化しない前駆細胞では、PAX5 や EBF などの B 細胞系の系列決定に必須の転写因子が発現していないことが明らかになった。B 細胞系の分化が進まないのが、PAX5 や EBF などの転写因子の発現の障害に起因するものであれば、これらの因子を強制的に発現させれば、分化停止を解除できるはずである。そこで、上記培養系において、CD45 陽性細胞が出現した直後にレトロウイルスで PAX5 を導入して強制発現させてみた。すると、B220 などの B 細胞系のマーカーを発現する細胞が生成した。これらの実験結果から、いくつかの iPS 細胞クローンの示す B 細胞分化への抵抗性は、初期分化に必須の転写因子の発現が障害されていることに起因すると考えられた。

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

この項目では、NKT 細胞から樹立した iPS 細胞を再分化させて、機能的な NKT 細胞の誘導を試み、iPS 細胞を試験管内で NKT 細胞へ分化誘導するプロトコルを樹立した。iPS 細胞由来の NKT 細胞のアジュバント活性をマウス生体を用いて検証した。マウスに胸腺腫由来のがん細胞を注射すると1週間で肝臓に無数のがん転移巣が生じる。この時点で、 α -GalCer を取り込ませた樹状細胞を投与する治療実験を実施すると、NKT 細胞が活性化し、転移したがんが完全に消失する。NKT 細胞を遺伝的に欠損するマウスに iPS 細胞に由来する NKT 細胞を移植し、 α -GalCer を取り込ませた樹状細胞を投与すると、同様に移植したがんの転移を抑えることが分かった。これにより、iPS 細胞由来の NKT 細胞は、生体内に存在する NKT 細胞と同等の抗がん作用を有していることが証明できた(図2)。

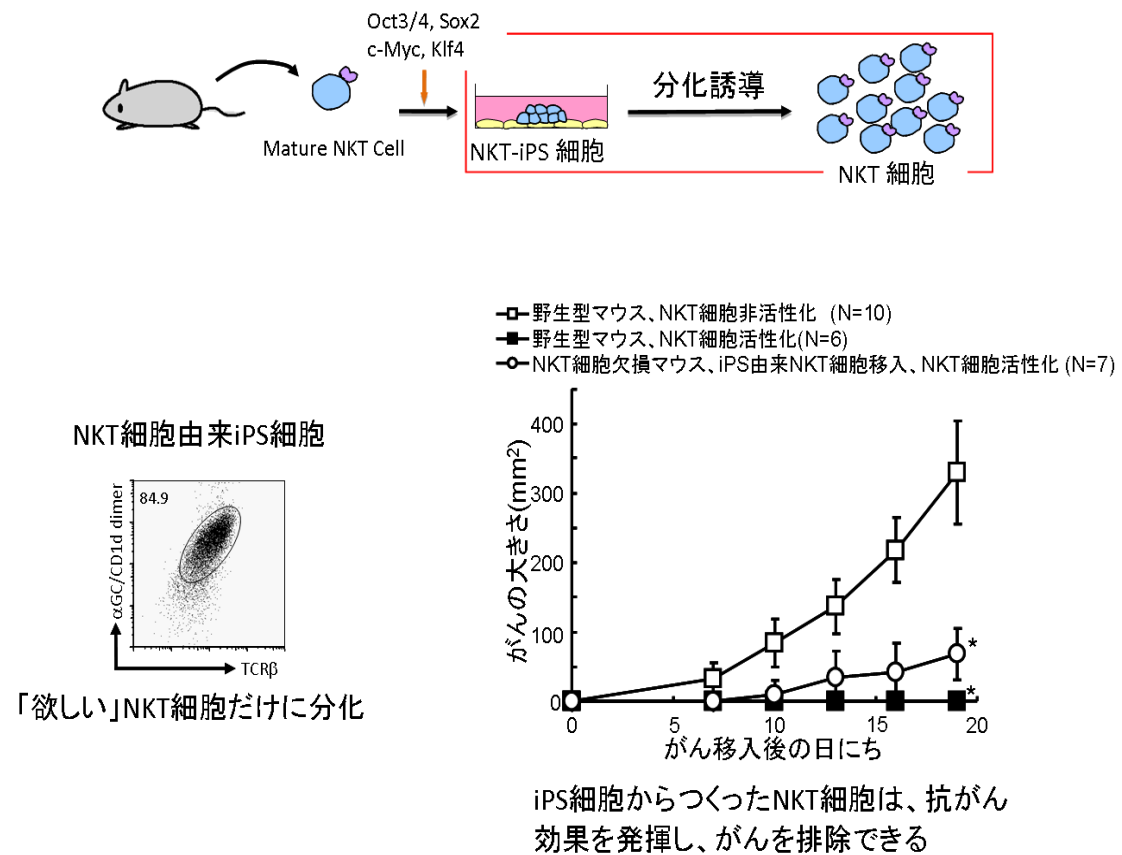


図2 iPS細胞から作ったNKT細胞は抗がん効果を発揮する

NKT細胞から作ったiPS細胞から、リンパ球分化を行うと、すべてNKT細胞に分化できる。NKT細胞を欠損したマウスにiPS細胞から分化させたNKT細胞を移入して、 α -GalCerで活性化すると、移入したメラノーマがん細胞を排除できた。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Watarai H, Fujii S, Yamada D, Rybouchkin A, Sakata S, Nagata Y, Iida-Kobayashi M, Sekine-Kondo E, Shimizu K, Shozaki Y, Sharif J, Matsuda M, Mochiduki S, Hasegawa T, Kitahara G, Endo TA, Toyoda T, Ohara O, Harigaya K, Koseki H, Taniguchi M. Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. *J Clin Invest.* 120:2610-2618. (2010)
2. Pereira CF, Piccolo FM, Tsubouchi T, Sauer S, Ryan NK, Bruno L, Landeira D, Santos J, Banito A, Gil J, Koseki H, Merkenschlager M, Fisher AG. ESCs require PRC2 to direct the successful reprogramming of differentiated cells toward pluripotency. *Cell Stem Cell.* 6:547-556. (2010)
3. Negishi M, Saraya A, Mochizuki S, Helin K, Koseki H, Iwama A. A novel zinc finger protein Zfp277 mediates transcriptional repression of the Ink4a/arf locus through polycomb repressive complex 1. *PLoS One* 5:e12373. (2010)
4. 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, 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.* [Epub ahead of print] (2011)

(4-2) 知財出願

- ① 平成22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)