

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. 研究実施体制

(1)「岩間」グループ

① 研究代表者: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
3. PcG、trxG によるクロマチン機能制御

【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 による分化多能性の維持機構の解析
2. $E2A^{-/-}$ pro-B 細胞の造血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. ヒト iPS 細胞からの造血幹細胞誘導系の確立
2. 新規造血幹細胞誘導因子の同定

(2)「江藤」グループ

① 主たる共同研究者:江藤 博之(京都大学、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. 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 主たる共同研究者:遠藤 充浩((独)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

【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による分化多能性の維持機構の解析

【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. ヒト iPS 細胞からの造血幹細胞誘導系の確立

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

本研究の目的は、造血幹細胞機能を規定するエピジェネティクスの理解を通して、iPS 細胞から造血幹細胞を誘導する際に必須となるエピジェネティック制御法の分子基盤を確立し、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。

【項目①】造血幹細胞のエピジェネティック制御機構の解明

造血幹細胞のエピジェネティック制御機構の解析を、ヒストン修飾分子であるポリコーム群複合体を中心に行った。Bmi1 の標的遺伝子の解析からポリコーム群 (PcG) 複合体が癌抑制遺伝子のみならず癌遺伝子の発現抑制にも重要な機能を有することを同定し、癌抑制遺伝子と癌遺伝子の発現のバランスをとることにより正常の造血を維持することを明らかにした¹⁾。また、Bmi1 のコンディショナルノックインマウスを作製し、造血細胞特異的な Bmi1 の過剰発現の効果を解析した。その結果 Bmi1 の過剰発現は造血幹細胞に酸化ストレスに対する耐性を付与し、造血幹細胞の自己複製能の維持を強化することが確認された(図1、論文投稿中)。この知見はポリコーム群複合体による幹細胞活性維持・増強のメカニズムの一端を明らかにしたものである。現在は、酸化ストレスと Bmi1 をつなぐシグナルの詳細を検証中である。

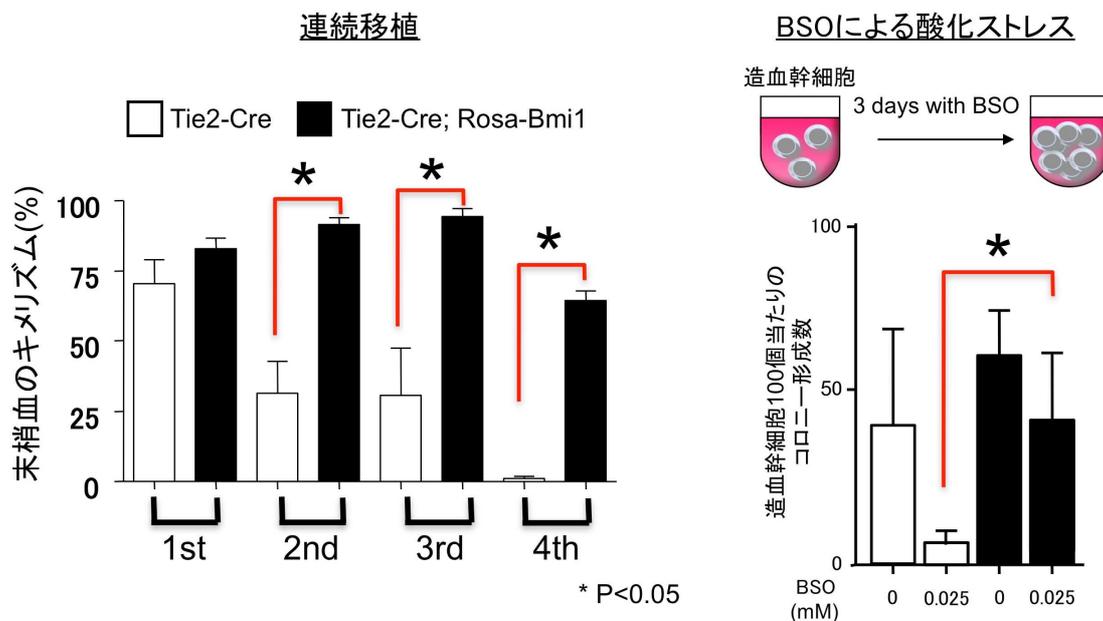


図1 Bmi1 を高発現するマウス造血幹細胞は、連続移植の解析において強い造血再構築活性を示す(左図)とともに、buthionine sulfoximine (BSO) 添加による酸化ストレス条件下においてコロニー形成能が有意に保たれる(右図)。

一方で、クロマチン制御分子 Tif1 β /Kap1 の機能を遺伝子欠損マウスの解析を中心に行い、その造血幹細胞における重要性を確認した。Tif1 β /Kap1 は H3K9 メチル化酵素 SETDB1 ならびにヘテロクロマチン形成に関与する HP1 と協調して転写を正負両方向に制御する。Tif1 β /Kap1 による造血幹細胞における転写制御機構をエピジェネティックな観点から明らかにしつつある。さらに、Polycomb repressive complex (PRC) 2 の機能制御に long intergenic non-coding RNA (lincRNA) の関与が報告されつつある。造血幹細胞特異的な lincRNA 機能をマイクロアレイで抽出しその機能解析に着手した。今後、造血幹細胞制御における lincRNA の機能をポリコーム群複合体の機能制御と絡めて明らかにしていきたい。トライソックス様分子 Brd1/Brpf2 に関しては、その複合体の解析からヒストンアセチル化酵素 Hbo1 と複合体を形成することを明らかにし、ノックアウトマウスの解析から Hbo1-BRD1/Brpf2 複合体が H3K14 のアセチル化の中心的な活性を担うことが確認された²⁾。BRD1/Brpf2 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/Brpf2 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。

以上の成果を ES/iPS 細胞からの造血幹・前駆細胞分化の過程におけるエピジェネティック機構と対比・反映させながら効率のよい造血幹・前駆細胞分化誘導につなげていきたい。

なお、H22 年度にはほぼ解析が終了した以下の研究成果を論文として発表した。①ポリコーム群複合体による造血幹細胞のエピジェネティクス制御様式の胎仔肝と骨髄における違い³⁾。②ヒストン脱メチル化酵素 Fbxl10 (H3K36me2 の脱メチル化酵素)の造血幹細胞における機能⁴⁾。

【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

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を理解する。計画した「Bmi1 による分化多能性の維持機構の解析」に関しては ChIP-sequence 解析を bivalent domain の観点から行っているが、まだ解析が終了していない。この解析は胎児肝と骨髄の造血幹細胞におけるポリコーム群複合体機能の違いを明らかにする解析と一体化して進めつつある。また細胞内外からのシグナルがポリコーム機能をどのように制御するのかの解析も、酸化ストレスシグナルによる Bmi1 機能制御に集約して解析を継続中である。

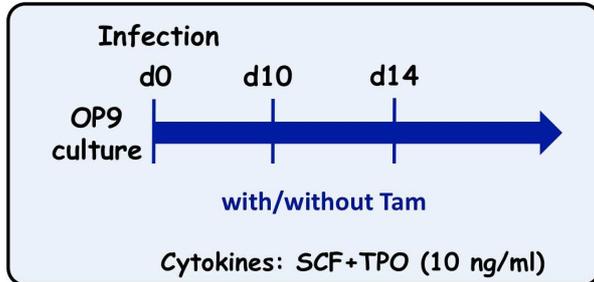
「E2A^{-/-} pro-B 細胞の造血幹細胞へのリプログラミング」に関しては、E2A^{-/-} pro-B 細胞に文献等からリストアップした候補遺伝子群のウイルスを単独あるいは混合して感染後、赤芽球・巨核球分化を誘導する条件下で培養を行い、赤芽球・巨核球分化能を有する多能性前駆細胞へのリプログラミングを誘導する遺伝子の同定を試みた。しかしながら、骨髄球系前駆細胞の表現型を有する細胞が増幅されたのみで、リプログラミングには成功しなかった。本プロジェクトはここで中止とし、今後は他のプロジェクトに集中することとしたい。

【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ック制御

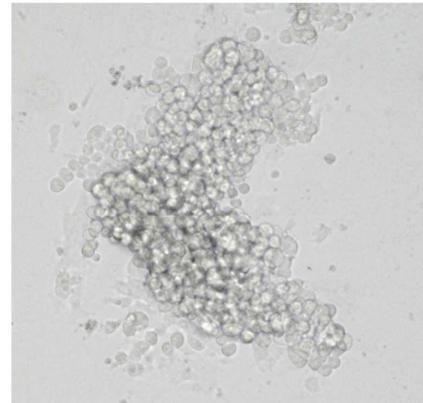
いまだ最終目標の移植可能な造血幹細胞の分化誘導は難しい状況であるが、様々な成果が得られており、着実に進捗している。

まず、ヒト ES/iPS 細胞から胚様体を形成させ、あるいはストローマ細胞上で CD34⁺CD43⁺CD45⁺ 造血幹・前駆細胞を誘導する系を確立し、さまざまな改良を試みている。これまでのところ、誘導早期に得られる造血前駆細胞は発生学的に卵黄囊あるいは傍大動脈・生殖隆起・中腎領域の造血細胞産生能を持つ血管内皮細胞 (hemogenic endothelium) から発生したばかりの胎児造血細胞に近いことが明らかとなった。現在、さらに誘導後期の細胞も検証し分化誘導の最適化を図っている。一方で、ヒト ES/iPS 細胞から分化誘導した造血前駆細胞に様々な転写因子を強制発現させ、造血前駆細胞増幅活性を評価中である。これまでに、胎仔肝造血幹細胞での機能が報告されていた Sox17 がヒト ES/iPS 細胞由来の CD34⁺CD43⁻ hemogenic endothelium に発現すること、Sox17 を CD34⁺CD43⁻血管内皮細胞に強制発現すると *in vitro* で hemogenic endothelium 様細胞が増幅することを見出した(図2)。遺伝子発現のタイミングを正確に操作可能にするために、Sox17 をコンディショナルに発現しうるヒト ES 細胞を作成し、造血幹・前駆細胞の増殖を長期に活性化しうる技術の開発を進めている。

EB day8 CD34⁺CD43⁻ cells
Virus: mSox17-ERT (inducible)



Sox17強制発現細胞



Cell growth

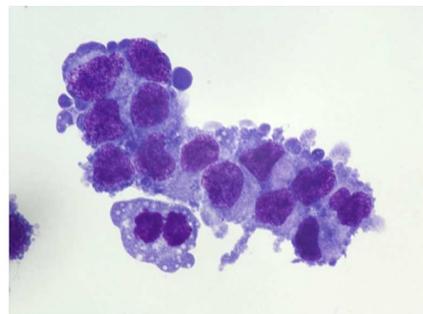
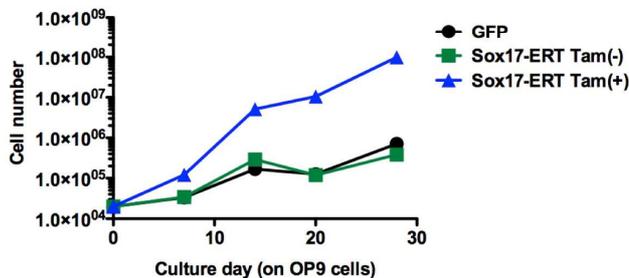


図2 CD34⁺CD43⁻血管内皮細胞に Sox17 を強制発現すると hemogenic endothelium 様細胞が増幅する。感染実験系と細胞増殖曲線(左図)。増幅する hemogenic endothelium 様細胞の形態(右図)。

また、臍帯血造血幹細胞とともにヒト ES/iPS 細胞から造血幹細胞を分化誘導する過程に関与する lincRNA をプロファイリングし造血幹細胞誘導の効率化に繋げるプロジェクトを開始した。

江藤グループは、造血幹細胞の維持機構における細胞接着シグナルとトロンボポイエチンシグナルのクロストークを明らかにした⁵⁾。本研究結果を基盤として、ストローマ細胞上での接着系基本分化誘導系を用いて、各種の低酸素条件と細胞増殖因子阻害を組み合わせることでヒト iPS・ES 細胞から造血細胞へのより選択的な誘導を促進する方法を新たに見いだすことに成功した。今後は本法を用いた解析から得た各血液細胞ステップでの詳細な遺伝子解析、エピゲノム解析結果を行い、その解析結果をもとに更なる誘導系の開発を行う予定である。

なお、H22年度にほぼ解析が終了した、マウス ES 細胞の系において造血幹細胞の分化誘導活性を有する転写因子 HoxB4 の標的遺伝子の網羅的解析を論文として発表した⁶⁾。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Oguro H, Yuan J, Tanaka S, Miyagi S, Mochizuki-Kashio M, Ichikawa H, Yamazaki S, Koseki H, Nakauchi H and Iwama A, "Lethal myelofibrosis induced by *Bmi1*-deficient hematopoietic cells unveils a tumor suppressor function of the polycomb group genes", *J. Exp. Med.*, 209, 445-454, 2012 (DOI:10.1084/jem.20111709)
2. Mochizuki-Kashio M, Mishima Y, Miyagi S, Negishi M, Saraya A, Konuma T, Shinga J, Koseki H and Iwama A, "Dependency on the polycomb protein Ezh2 distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells", *Blood*, 118, 6553-6561, 2011 (DOI: 10.1182/blood-2011-03-340554)
3. Mishima Y, Miyagi S, Saraya A, Negishi M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Katsumoto T, Chiba T, Yamaguchi N, Kitabayashi I, Koseki H and Iwama A, "The Hbo1-Brd1/Brpf2 complex is responsible for global acetylation of H3K14 and required for fetal liver erythropoiesis " *Blood*, 118, 2443-2453, 2011 (DOI: 10.1182/blood-2011-01-331892)
4. Konuma T, Nakamura S, Miyagi S, Negishi M, Chiba T, Oguro H, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Ichikawa H, Miyoshi H, Vidal M and Iwama A., "Forced expression of the histone demethylase Fbxl10 maintains self-renewing hematopoietic stem cells", *Exp. Hematol*, 39, 697-709, 2011 (DOI:org/10.1016/j.exphem.2011.03.008)
5. Umemoto T, Yamato M, Ishihara J, Shiratsuchi Y, Utsumi M, Morita Y, Tsukui H, Terasawa M, Shibata T, Nishida K, Kobayashi Y, Petrich BG, Nakauchi H, Eto K

and Okano T, "Integrin $\alpha\beta3$ regulates thrombopoietin-mediated maintenance of hematopoietic stem cells", *Blood*, 5, 119(1), 83-94, 2012
(DOI:10.1182/blood-2011-02-335430)

6. Oshima M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Nakajima-Takagi Y, Sugiyama F, Koseki H, Kyba M, Iwama A and Osawa M, "Genome-wide analysis of target genes regulated by HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells", *Blood*, 117, e142-150, 2011
(DOI:10.1182/blood-2010-12-323212)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)