

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
3. PcG、trxG によるクロマチン機能制御

【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 浩之 (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
2. 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の様式の胎仔肝と骨髄における違いを、ヒストン修飾の網羅的な ChIP-sequence 解析を岩間グループと共同で行う。
3. PcG、trxG によるクロマチン機能制御

【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クス制御機構の解明

#### (1) ポリコーム群遺伝子機能の解析

岩間らのグループは、遠藤グループと共同してポリコーム群遺伝子の造血幹細胞における機能解析を継続して推進した<sup>1-7)</sup>。特に ChIP-sequence を用いた解析から、ポリコーム群遺伝子 *Ezh2* を欠損する細胞ではポリコーム群複合体によるヒストン修飾 H3K27me3 が劇的に低下するが、造血幹・前駆細胞においては *Ezh1* が代償的に機能し、造血幹・前駆細胞の機能を保つうえで重要な分化関連遺伝子や増殖抑制性の癌抑制遺伝子の発現を抑制することが明らかとなった (図 1 論文投稿中)。*Ezh1* と *Ezh2* の 2 つの H3K27me3 酵素の機能を理解する上で興味深い知見である。

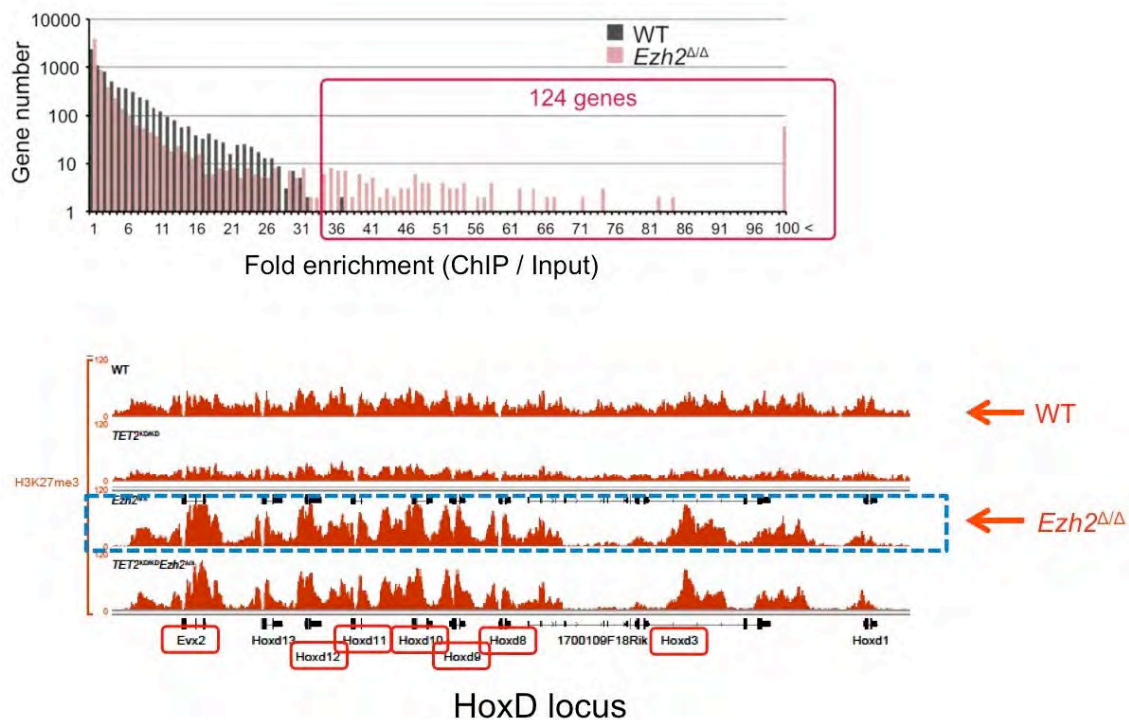


図 1 野生型(WT)ならびに *Ezh2* 欠損前駆細胞における H3K27me3 の ChIP-sequence データ。*Ezh2* 欠損前駆細胞における H3K27me3 レベルの低下が明らかであるが、有意なレベルの H3K27me3 の残存が認められるとともに、レベルが維持あるいは亢進する領域も存在し、*Ezh1* が部分的に *Ezh2* 欠損によるポリコーム修飾異常を代償していることが確認された(上段)。下段は *Ezh1* によって H3K27me3 レベルが保たれている HoxD 遺伝子座の H3K27me3 ChIP-sequence データを示す。

## (2) HeK9 メチル化酵素の機能解析

クロマチン制御分子 Tif1 $\beta$ /Kap1 と H3K9 メチル化酵素 SETDB1 は H3K9me3 修飾を介した遺伝子発現抑制に協調的に機能するが、ポリコーム群複合体と同様に、造血幹細胞の機能維持に重要な機能を有することが確認された。しかしながら、その標的遺伝子群はポリコーム群複合体による遺伝子抑制の標的遺伝子群とは異なることが明らかとなった (図2)。興味深いことに、Tif1 $\beta$ /Kap1 と Eset 遺伝子欠損マウス両方の造血幹細胞において、糖新生経路が活性化しミトコンドリアにおけるエネルギー産生やリボソームにおける蛋白合成の低下が認められた。このような表現系は Ezh2 欠損造血幹細胞には認められない。今後は、Tif1 $\beta$ /Kap1 と SETDB1 による造血幹細胞の代謝のエピジェネティック制御機構を明らかにしたい。

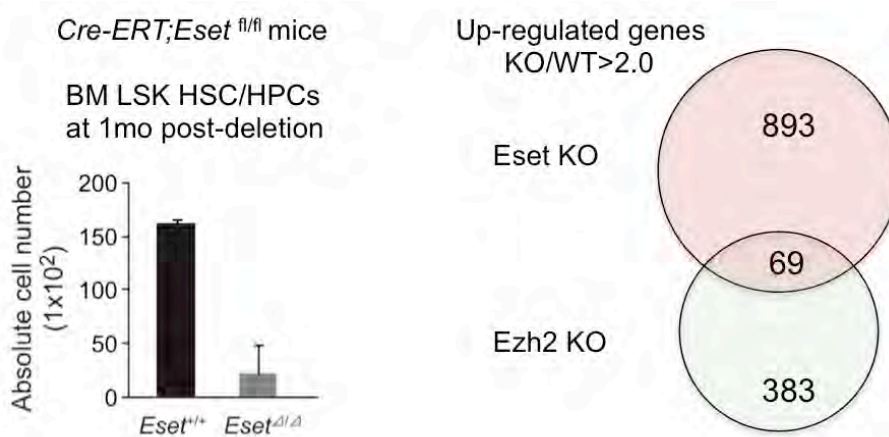


図2 Eset を骨髄血液細胞で欠損させると、造血幹・前駆細胞が進行性に減少する (左図)。Eset と Ezh2 を欠損する造血幹・前駆細胞を比較すると、発現抑制が解除され野生型と比較して2倍以上に発現が亢進する遺伝子群の大部分は重複しない (右図)。

## (3) linc intergenic non-coding (linc) RNA の解析

造血幹細胞特異的な lincRNA をマイクロアレイで 10 遺伝子抽出し、ノックダウン解析を行ったところ、造血幹細胞に必須な lincRNA が複数同定された。その機能解析を行った結果、造血幹細胞に必須な lincRNA を 2 つ同定できた。その機能を明らかにすることにより、造血幹細胞機能制御のエピジェネティクス of 新しい制御機構を理解したい。

### 【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クス制御

岩間らのグループは、江藤・遠藤グループと共同して、ヒト ES/iPS 細胞から胚様体を介して、あるいはストローマ細胞上で造血発生が進行する系を確立しさまざまな改良を試みた。また、胚様体において造血細胞産生能を持つ hemogenic endothelium が造血能を獲得する際に転写因子 SOX17 が重要な機能を果たすことを明らかにした<sup>8)</sup>(図3)。この知見は、ヒト ES/iPS 細胞から分化誘導した hemogenic endothelium (CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>細胞) に SOX17 と様々な遺伝子を組み合わせることで強制発現させることにより、より効率よく造血幹・前駆細胞を分化誘導しうる可能性を示している。そこで、Sox17 をはじめとした遺伝子群をテトラサイクリンを用いて

コンディショナルに発現しうるヒト ES 細胞を作成したが、未分化な ES 細胞状態では誘導がかかるものの、血液系細胞への分化誘導の過程で Tet-responsive element (TRE) が DNA メチル化によると思われる silencing を受けてしまい、hemogenic endothelium ならびに血液系細胞では誘導がかからなくなることが判明した。したがって、遺伝子導入はこれまで通りレトロウイルスまたはレンチウイルスを用いて行うこととし、今後はヒト ES/iPS 細胞から分化誘導した hemogenic endothelium に SOX17 と様々な転写因子、エピジェネティック遺伝子を組み合わせて強制発現させ、造血前駆細胞の増幅と胎児型造血前駆細胞の成人型への分化転換を試みたい。

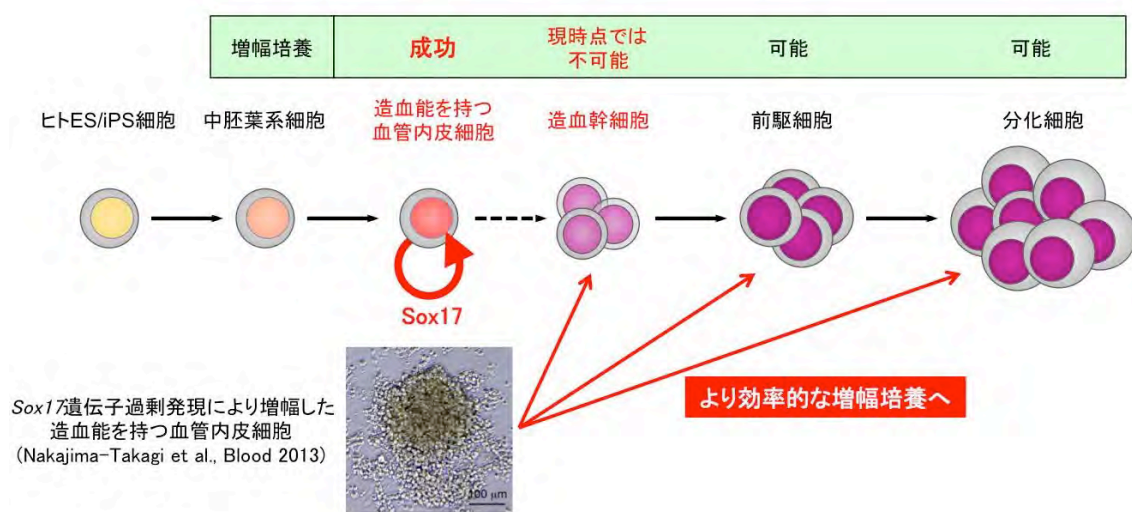


図3 転写因子 SOX17 の強制発現による hemogenic endothelium (CD34<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>細胞) 様細胞の誘導・増殖

江藤らのグループは iPS 細胞からの細胞分化誘導の様々な検証を行った<sup>9-10)</sup>。また、既にストローマ細胞上での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がヒト 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見出すことに成功していた(米国血液学会 2011 発表)が、本方法を基にして、無血清、かつストローマ細胞を使用しない改変法を開発し、造血幹・前駆細胞誘導方法に発展させた(論文準備中)。造血幹・前駆 CD43 陽性細胞分画に焦点を当てて解析した結果、新しい方法によって誘導した細胞集団は以前の方法に比較して骨髓細胞系に特化した高いコロニー形成能があることが判明している。マウス骨髓造血幹細胞は同一性細胞集団でなく、骨髓系細胞への分化を指標にしたヒエラルキーが存在する事が示唆されている。以上の背景から、平成 25 年度では本法を用いた CD43 陽性細胞の解析ならびに分化後の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遠藤グループと共同で解析し、岩間グループと情報を共有しながら幹細胞としての特性を有する細胞への誘導法を引き続き行う予定である。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

1. Iwama A. Epigenetics of hematopoiesis and hematological malignancies. *Int J Hematol* **96**, 403-404, 2012. (DOI:10.1007/s12185-012-1184-9).
2. Sashida G, and Iwama A. Epigenetic regulation of hematopoiesis. *Int J Hematol* **96**, 405-412, 2012 (DOI:10.1007/s12185-012-1183-x).
3. Tanaka S, Miyagi S, Sashida G, Chiba T, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Suzuki Y, Sugano S, Nakaseko C, Yokote K, Koseki H, and Iwama A. Ezh2 augments leukemogenicity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia. *Blood* **120**, 1107-1117, 2012 (DOI:10.1182/blood-2011-11-394932).
4. Nakamura S, Oshima M, Yuan J, Saraya A, Miyagi S, Konuma T, Yamazaki S, Osawa M, Nakauchi H, Koseki H, and Iwama A. Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells. *PLoS ONE* **7**, e36209, 2012. (DOI:10.1371/journal.pone.0036209).
5. Hisada K, Sánchez C, Endo TA, Endoh M, Román-Trufero M, Sharif J, Koseki H, and Vidal M. RYBP represses endogenous retroviruses and preimplantation- and germ line-specific genes in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* **32**, 1139-1149, 2012 (DOI:10.1128/MCB.06441-11).
6. Endoh M, Endo TA, Endoh T, Isono K, Sharif J, Ohara O, Toyoda T, Ito T, Eskeland R, Bickmore WA, Vidal M, Bernstein BE, and Koseki H. Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1-dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity. *PLoS Genet.* **8**, e1002774, 2012. (DOI:10.1371/journal.pgen.1002774).
7. Ku M, Jaffe JD, Koche RP, Rheinbay E, Endoh M, Koseki H, Carr SA, and Bernstein BE. H2A.Z landscapes and dual modifications in pluripotent and multipotent stem cells underlie complex genome regulatory functions. *Genome Biol.* **13**, R85, 2012 (DOI:10.1186/gb-2012-13-10-r85).
8. Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Miyagi S, Endoh M, Endo TA, Takayama N, Eto K, Toyoda T, Koseki H, Nakauchi H, and Iwama A. Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* **121**, 447-458, 2012 (DOI:10.1182/blood-2012-05-431403).
9. Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N, Otsu M, Nagae G, Ueda K, Nakazaki K, Kamikubo Y, Eto K, Aburatani H, Nakauchi H, and Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood* **119**, 6234-42, 2012 (DOI:10.1182/blood-2011-07-367441).
10. Kajiwarara M, Aoi T, Okita K, Takahashi R, Inoue H, Takayama N, Endo H, Eto K,

Toguchida J, Uemoto S, and Yamanaka S. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**, 12538-43, 2012. (DOI:10.1073/pnas.1209979109)

(3-2) 知財出願

- ① CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)