

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890025

研究課題名（和文）Notch シグナルを用いたヒト iPS 細胞からの造血幹細胞誘導法の開発

研究課題名（英文）Establishment of the method using Notch signal of inducing hematopoietic stem cells from human iPS cells

研究代表者

横山 泰久 (YOKOYAMA YASUHISA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：70512820

研究成果の概要(和文): Notch シグナルの下流分子である Hes1 が発現振動することに注目し、血液細胞での発現振動の証明とそのはたらきを解明し、造血幹細胞分化に応用することを目指した。Hes1 のプロモーター下にルシフェラーゼの遺伝子配列を挿入したトランスジェニックマウスを用い、Hes1 の発現パターンを顕微鏡下に発光としてとらえる系を立ち上げることに成功した。血液前駆細胞における Hes1 発現は 1～2 時間の短時間でダイナミックに変化することを見出した。

研究成果の概要(英文): Focusing on ultradian oscillation of Hes1 a downstream signal of Notch, we tried to demonstrate oscillation of Hes1 in blood cells and analyze the mechanism of the function of Hes1 oscillation in hematopoiesis. Using transgenic mice harboring the sequence coding luciferase under regulation of Hes1 promoter, we found the dynamic change of the Hes1 expression level in hematopoietic progenitors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,090,000	327,000	1,417,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：医歯薬学・血液内科学

キーワード：Notch、Hes1、造血幹細胞、iPS 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト induced pluripotent stem (iPS) 細胞は、ヒト胚性幹細胞(ESC)と同様に、あらゆる細胞への分化能を有する多能性幹細胞である(Cell 131:861-872, 2007)。一方、造血幹細胞は赤血球、白血球、血小板といった全ての血球へと分化する能力を持った細胞であり、造血幹細胞自身は自己複製することで、生体において一生にわたり血液細胞を供給し続ける。これら多能性幹細胞から造血幹細胞への特異的かつ効率的な分化法を示した

論文は未だ存在しないが、ヘマンジオブラストと呼ばれる血液系と血管系の両方に分化する能力を持つ細胞への分化(Nat Methods 4:501-509, 2007)が可能であり、また応募者らは、成熟血球である好中球への特異的分化法を報告した(Blood 113:6584-6592, 2009)。これらの事実から、ヒト多能性幹細胞から造血幹細胞への分化も可能であると推測される。

(2) 造血幹細胞移植は治療手段としての重要

性をますます増しているが、ドナーは骨髄や末梢血幹細胞などを提供するにあたって、多大な侵襲を受けることを余儀なくされている。ヒト iPS 細胞からの造血幹細胞への分化技術は、このような問題を打破する有力な手段となり得る。

(3)ヒト iPS 細胞から造血幹細胞への分化法を開発するにあたっては、生体内で造血幹細胞がどのように分化し、維持されているのかを知ることが極めて重要である。Notch シグナルは血液細胞の分化制御に重要な役割を持つことが知られており、Notch1 が胎生期の成体型造血の発生に必須であること (Immunity 18:699-711, 2003) や、Notch2 がその下流分子である Hes1 の上昇を介してマウス骨髄前駆細胞を肥満細胞へ分化させること (PNAS 105:7839-44, 2008) などが知られている。応募者らは Notch のリガンドのひとつである Delta1 を用いてヒト臍帯血から分離した CD133 陽性細胞を体外培養する系を開発し、免疫不全マウスにヒト造血を再構築する能力を持った細胞を増幅することに成功している (Stem Cells 24:2456-65, 2006)。

(4)下流分子 Hes1 についても、応募者の所属するグループは、顆粒球系前駆細胞に Hes-1 を導入すると、細胞が *in vitro* で直ちに不活化され、これは Hes-1 の持続的発現に依存することを見出した (Blood 115:2872-2881, 2010)。したがって、Notch やその下流分子 Hes1 によるシグナルが造血幹細胞の分化抑制や増殖の制御に重要なはたらきをしていると考えられ、これらのシグナルにはたらきかけることがヒト iPS 細胞から造血幹細胞を効率的に分化させる方法の開発につながるのではないかと考えている。

(5) Hes1 の発現レベルは周期的に上下する (発現振動する)。この発現振動は胎生期の神経発生に重要であることが知られており (Neuron 58:52-64, 2008)、Hes1 が高発現している時の細胞分裂では神経幹細胞の自己複製が起こり、発現が低下しているときの分裂では分化が進行する、という仮説が提唱されている。Hes1 の発現振動は様々な組織由来の細胞株で示されているが (Science 298:840-843, 2002)、血液細胞での発現振動の報告はない。もし発現振動が証明されれば、神経細胞と同様に、造血幹細胞の分裂後の運命が Hes1 の発現レベルによって制御されている可能性があると考えられる。

以上の情報や、ヒト ESC からの好中球誘導や臍帯血造血幹細胞増幅、Notch・Hes1 シグナルに関する実績を背景とし、応募者は本研究課題において Notch・Hes1 シグナルを応

用したヒト iPS 細胞からの造血幹細胞誘導法の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、Notch シグナルを応用し、ヒト iPS 細胞から造血幹細胞を効率的に誘導する方法を開発することである。

(1)そのために、まず、Notch シグナルによる造血幹細胞制御のメカニズムをさらに明らかにする必要がある。Notch シグナルの下流分子 Hes1 に注目し、血液細胞における発現パターン、特に Hes1 の発現に振動がみられるか否かを明らかにする。

(2)得られた Hes1 の発現パターンの結果をふまえ、Hes1 がどのように造血幹細胞の分化・維持を制御しているかを明らかにする。

(3)Hes1 による造血幹細胞の制御機構が明らかになれば、それを応用しヒト iPS 細胞から造血幹細胞を分化させる、あるいは得られた造血幹細胞・前駆細胞を効率的に増幅する方法を開発する。

## 3. 研究の方法

(1)マウス胎仔肝から、磁気ビーズ法を用いて、幹細胞を含む造血前駆細胞の集団である分化マーカー (Lin) 陰性・c-Kit 陽性細胞集団を分取した。Delta1 と免疫グロブリンの Fc 部分とのキメラタンパクによって培養皿をコーティングし、この培養皿で分取した造血前駆細胞を培養した。これにより、Notch シグナルが活性化され、その下流分子である Hes1 の発現も促されると考えられる。この培養条件下で、経時的に細胞を回収し、mRNA を採取し、定量 PCR 法により Hes1 の発現レベルを比較することで Hes1 の発現が振動しているか否かを検証した。

(2)単一の神経細胞での Hes1 の発現振動の証明には、Hes1 の発現レベルをルシフェラーゼ・ルシフェリンの反応による発光としてとらえることのできるマウスが用いられており、このマウスの血液細胞を用いて実験を行った。このマウスは、Hes1 プロモーターの下流にルシフェラーゼをコードする配列を持った遺伝子が導入されたトランスジェニックマウスである。このマウスの胎仔肝から、磁気ビーズ、フローサイトメーター、あるいはその両方を組み合わせた方法により血液前駆細胞を分取し、液体培養条件下に顕微鏡で発光の観察を 10 時間以上連続して行った。

(3)Hes1 プロモーターの下流に緑色蛍光タンパクをコードする配列を持った遺伝子が導入されたトランスジェニックマウス

(Hes1-GFP マウス)を用い、その骨髄の細胞分画と Hes1 の発現レベルの関係を解析した。Lin 陰性・c-Kit 陽性造血前駆細胞集団、あるいは、その中でさらに Sca-1 が陽性であるより未分化な細胞集団(KSL 細胞)について、GFP 発現レベルを調べた。加えて、KSL 細胞の中で GFP 発現レベルが高いものと低いものに分けてソーティングを行い、それぞれをサイトカインを加えた半固形培地で培養しコロニー形成能を評価することで、Hes1 発現レベルの違いによる分化制御について解析した。

#### 4. 研究成果

(1)Delta1 刺激を加えると、胎仔肝造血前駆細胞において Hes1 発現は1~2 時間後に大きく上昇した。この発現は 2~3 時間後には低下した(図 1)。この結果から、血液細胞においても、Hes1 発現が従来考えられているよりダイナミックに変化することが見出された。その後、Hes1 発現は 2 時間周期で発現振動しているように見えるが、振幅の小ささが影響し実験間のばらつきが大きく、現在のところ確実な証明には至っていない。

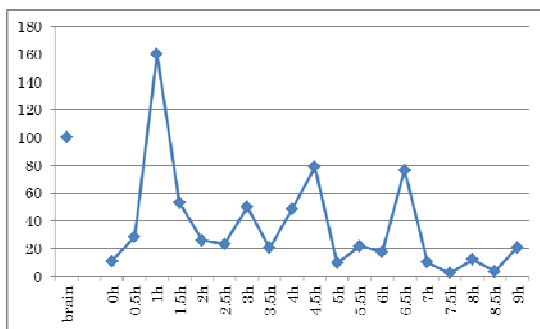


図 1 : 胎仔肝造血前駆細胞の mRNA 発現変化  
胎仔肝の分化マーカー(-)c-Kit(+)細胞を Delta1 により刺激し、30 分ごとの Hes1 mRNA 発現量を測定した。胎仔脳での発現レベルを 100 としている。

(2)Hes1-ルシフェラーゼマウスの胎仔肝の観察では、当初は全く発光が同定できなかったが、細胞分取の方法の改良などにより、Hes1 発現を反映する発光を観察できるようになった(図 2)。分化マーカー(Lin)陰性・c-Kit 陽性前駆細胞でも発光は確認されたが、より未分化である Lin 陰性・c-Kit 陽性・Sca-1 陽性前駆細胞を用いた場合、より多くの発光が観察される傾向にあった。単一細胞における発光は 1~2 時間程度の短時間であり、(1)の mRNA での結果と矛盾しなかった。数時間遅れて発光する細胞も一部認められた。しかし、明らかな発現振動は認められなかった。

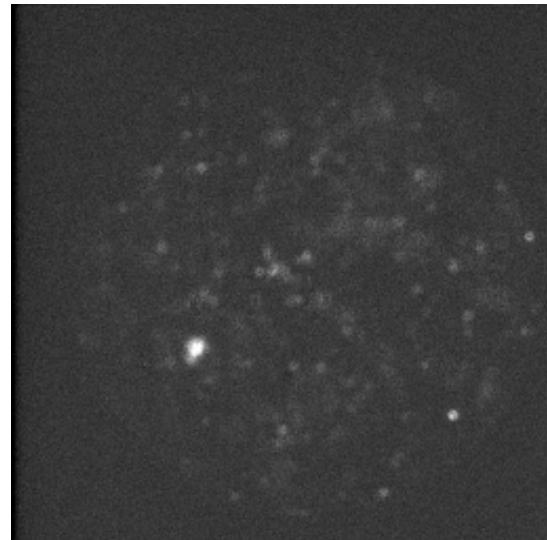


図 2 : 発光による単一細胞での Hes1 発現の同定  
個々の淡い光が、それぞれ 1 個の細胞での Hes1 発現を示している。各発光は 1~2 時間程度の短時間で消失した。

(3)Hes1-GFP マウスの骨髄を用いた検討では、GFP の発現はより未分化な造血前駆細胞集団である KSL 細胞で高い傾向にあった。KSL 細胞を、GFP 発現レベルの高い細胞と低い細胞とに分けてコロニー形成能を評価したところ、顆粒球・赤血球・マクロファージ・巨核球の各系統を含む混合コロニーを形成できるのは GFP 発現の低い細胞であり、発現の高い細胞からは顆粒球コロニーやマクロファージコロニーしか形成されなかった(図 3)。この結果からは Hes1 発現レベルにより細胞分化能が変わることが示唆されたが、神経細胞と異なり、Hes1-GFP マウスの血球における GFP 発現レベルは極めて弱いため非常に繊細な実験系であり、確証を得るに十分な結果は得られていない。

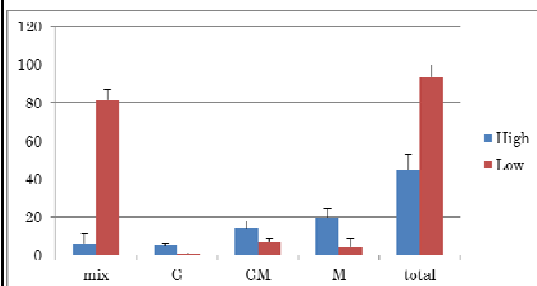


図 3 : Hes1 発現レベルによる、KSL 細胞のコロニー形成能の変化  
Hes1 が低発現の場合、混合コロニー(mix)はほとんど形成されず、顆粒球(G)やマクロファージ(M)コロニーがわずかに形成されるのみであった。

これらの結果からは、Hes1 が発現振動しているか否かについては決着がつかなかったものの、少なくとも短時間のうちにダイナミックな発現レベルの変動がみられることが判明した。また、Hes1 の発現レベルによって KSL 細胞の分化運命に違いが生じる可能性が示唆された。合わせて考えると、短時間の Hes1 発現上昇により、造血幹細胞の分化運命がダイナミックに制御されているという仮説をたてることができる。本研究期間では、この仮説の証明およびこの機構を応用した iPS 細胞からの造血幹細胞誘導までは到達できなかったが、その基盤となる成果が得られた。今後、血液系での Hes1 発現を高めるようサイトカイン・リガンド刺激など培養条件を工夫し、Hes1 発光の系や Hes1-GFP の系でより確実な Hes1 発現パターン分析を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/hematology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横山 泰久 (YOKOYAMA YASUHISA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・  
講師

研究者番号：70512820