

## 論文の内容の要旨

論文題目 マウス ES 細胞からの造血幹細胞誘導

指導教員 中内 啓光 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 松本 憲二

ES 細胞(embryonic stem cell;胚性幹細胞)とは着床前の胚盤胞中の内部細胞塊から樹立した細胞株で、未分化状態を維持したまま長期に培養することが可能であり、初期胚に戻すことですべての細胞に分化する多分化能を有している。血液学の分野においては、マウス ES 細胞を用いて血液細胞発生初期の機序を解明し、成熟した各血液細胞系譜を誘導する方法を見出すための基礎研究の多くが行われてきた。

ES 細胞から血液細胞を分化誘導するには主に 2 つの異なる実験方法が用いられている。ひとつは胚様体(Embryoid body;EB)形成法で、もうひとつの方法はストローマ細胞 OP-9 との共培養法である。分化誘導された細胞が造血幹細胞であることを証明するには放射線照射によって骨髄を破壊されたマウスにドナー細胞を移植し、長期間にわたって各血球分化能を持つ細胞が出現することが示されなければならない。今まで ES 細胞から成熟血球を分化誘導したという報告は多数あったが、骨髄を長期間再構築する造血幹細胞を分化させたという報告は、2002 年の Kyba らによる、ES 細胞から分化誘導した造血前駆細胞に転写因子のヒト HoxB4(HOXB4)を過剰発現させることで移植可能な成体型造血幹細胞を分化できるという報告が初めてであった。

本研究の目的は、まず①ES 細胞から造血幹細胞が分化してくる過程で HOXB4 はどの細胞分画に作用して成体型造血幹細胞へ分化するのか、次に②その細胞分画がヘマンジオブラストや胎仔型造血としての能力を持っているか解析することで、発生における分化のどの段階であるか推測し、さらに③HOXB4 発現前後

の細胞表面マーカーや遺伝子発現を比較して HOXB4 が造血幹細胞分化において担っている役割の解明を目指し、最後に④HOXB4 を発現させて移植された細胞が分化能において成体型造血幹細胞といかなる差異を持つか、以上の 4 項目である。

以上のような命題に答えるために、まず HOXB4 を ES 細胞に安定して強制発現させる方法としてテトラサイクリン(tetracycline:Tet)誘導遺伝子発現法の一つである Tet-Off system を用いていた。さらにこれを時間的・空間的に普遍に発現しており遺伝子サイレンシングが起こりにくい ROSA26 部位に遺伝子を導入することによって HOXB4 の発現時期をコントロールすることが可能になり、HOXB4 を発現させる時期を明確にすることができる ES 細胞を作成した。

作成した ES 細胞を用いて造血幹細胞を誘導する際にどの時期から HOXB4 を強制発現させればよいか調べた。まず作成した ES 細胞を胚様体形成法で分化させ、6 日目にトリプシン処理を行った後に OP-9 細胞と共培養し、このときドキシサイクリン(doxycycline:Dox)を投与したものと除去して投与しなかったものを用意した。すると Dox を除去し、HOXB4 の発現を誘導したときに血球様の細胞が出現した。しかし HOXB4 を発現させても全てが血球様の細胞になるのではなく、線維芽細胞様の細胞や中胚葉と思われる形態のものも出現しており、胚様体のすべての細胞が血球に分化するのではないことが示唆された。HOXB4 を発現させたときに出現するこのような血球様の細胞に造血幹細胞が含まれているか否かを調べるために、造血幹細胞のアッセイ法の一つであるコロニーアッセイを行い、胚様体を形成させて何日目に HOXB4 を発現させて OP-9 細胞との共培養を開始すれば一番効率よくミックスコロニーが観察されるかどうか調べた。胚様体形成後 2,4,5,6,7 日に OP-9 細胞上で 4 日間共培養し、HOXB4 の発現を誘導した細胞を FACS でソートしてコロニーアッセイを行った。その結果胚様体形成 4 日～7 日目から HOXB4 を発現させた場合にミックスコロニーが出現することが示された。以上の結果から胚様体形成後 4 日～7 日目の細胞の中に HOXB4 を発現させることで造血幹細胞に分化誘導させることができる細胞群が存在すると考えた。

次に胚様体形成 6 日目(EB6)後に存在する細胞のうち HOXB4 を発現させることで造血幹細胞に分化誘導させることができる細胞はどのような細胞であるか調べた。まず EB6 の細胞表面マーカーの発現を調べた。EB6 では c-Kit の陽性側から CD41、CD34、CD31 などが発現している。しかし CD45 はこの時期ではまだ発現していなかった。経時的にしらべると CD41 は EB6 に発現のピークとなっていた。

c-Kit、CD41、CD34 のマーカーを用いて EB6 の細胞を各分画で分けて FACS でソートし、HOXB4 を発現さ

せながら OP-9 細胞で 4 日間共培養した後に FACS で GFP 陽性の細胞を 1000 個ソートし、コロニーアッセイを行った。さらに放射線照射後のマウスに移植して骨髄再構築能を調べた。移植した ES 細胞由来の細胞が骨髄再構築能を持っているか否か確認するために、移植後 4 及び 12 週目のレシピエントマウスの末梢血を解析した。全体で移植したものでは移植後 4 週目では末梢血中に ES 細胞由来の GFP 陽性細胞を認めたものの、12 週目には消失していて長期の生着は認めなかった。しかし、CD41 陽性細胞をソートして HOXB4 を発現させながら OP-9 細胞共培養後に移植した場合、12 週後も生着を認めた。この結果から、CD41 陽性細胞のみを培養したときの方が長期骨髄再建能を持つ細胞を効率よく誘導できることができると考えられた。さらに、CD41 陽性細胞中の c-Kit 陽性細胞を移植したときのみ長期骨髄再建を認めた。CD34 で分けた場合は陽性、陰性細胞両方で移植が成立した。よって EB6 の CD41(+) c-Kit(+)分画に HOXB4 を発現させながら OP-9 細胞共培養することで移植可能となる細胞が濃縮されていることが分かる。注意することとして、移植後のマウスの末梢血の ES 由来の細胞は全て Gr-1, Mac-1 陽性細胞であり、形態的にも分葉核の好中球を多く認めた。以上より、分化能においては必ずしも成体の造血幹細胞の条件は満たしていない。

この EB6 の CD41(+) c-Kit(+)分画がどのような細胞群であるか調べるために、血管と血球への共通の前駆体であるヘマンジオブラストのアッセイ法であるブラストコロニーアッセイ(blast colony-forming cell(BL-CFC) assay)と原始型造血の指標となる胎仔型赤血球コロニーアッセイ(primitive erythroid colony-forming (EryP) assay)を行った。BL-CFC アッセイにおいて、EB6 では HOXB4 の発現の有無にかかわらず、CD41(+) c-Kit(+)細胞分画ではブラストコロニーを殆ど形成せず、CD41(-) c-Kit(+)細胞分画で最も多く形成された。ブラストコロニーの多分化能は各々のコロニーを新たに撒きなおした際に、多くが血管および血球へと分化したことで確認できた。また EryP アッセイにおいて、EryP は CD41(+) c-Kit(+)細胞分画および CD41(+) c-Kit(-)細胞分画で最も多く形成された。このことから CD41(+) c-Kit(+)細胞分画はヘマンジオブラストとは区別され、胎仔型造血能を有する細胞分画であることが分かった。

EB6 の 4 分画における cDNA の発現を RT-PCR 法で比較したところ、Runx-1、Gata-2、Scl の発現が全て CD41(+) c-Kit(+)細胞分画でみられた。このことから、この分画が成体型造血へ分化する準備段階にあると考えられた。また  $\beta$ -H1,  $\beta$ -major globin は CD41(+) c-Kit(+)細胞分画、CD41(+) c-Kit(-)細胞分画で発現しており、先の EryP アッセイの結果と一致した。また BL-CFC 活性の高い CD41(-) c-Kit(+)細胞分画は Brachyury

と Flk-1 が発現しており、中胚葉の細胞分画であることを示しているが、この分画ではさらに endogenous な mHoxB4 の発現も強かった。またこれらの Brachyury、Flk-1、mHoxB4 は CD41(+) c-Kit(+)細胞分画でも発現しており、この分画が mesodermal な細胞と成体型造血への準備段階の両方の細胞の性質を有しているものと考えられた。

次にこの HOXB4 を発現させて OP-9 細胞と共培養したときに、どのような細胞に変化しているのか調べるために、移植する際の細胞表面マーカーを調べた。EB6 の CD41 陽性細胞分画をソーティングして HOXB4 を発現させながら OP-9 細胞と共培養した4日目の表面マーカーを調べた。比較として野生型 ES 細胞を同様に培養した。HOXB4 を発現させると野生型と比較して、c-Kit(+) CD34(+)細胞が増加した。移植を行ったところ、移植後 3 ヶ月目のレシピエントマウスの末梢血を解析した結果、c-Kit(+) CD34(+) CD41(+) CD45(-)の細胞分画で移植が成立した。HOXB4 を発現させることで、このような表面マーカーを持つ細胞を分化誘導させることが分かった。特に c-Kit は野生型では初期より陰性化するため、HOXB4 は c-Kit の発現を維持させることで移植可能な細胞へ分化させるものと示唆された。

ES 細胞と EB6 の CD41(+) c-Kit(+)と HOXB4 を発現させて OP-9 細胞と共培養させた群、HOXB4 を発現させずに OP-9 細胞と共培養させた群、さらに移植後マウスの骨髄に生着した ES 細胞由来細胞と正常骨髄から mRNA を抽出し、遺伝子の発現を比較した。胎児型赤血球で見られる  $\beta$ -H1 globlin は EB6 では発現しているが、HOXB4 を発現させると減少し、移植後の骨髄では発現していなかった。HOXB4 を発現させた群と発現させなかった群を比較すると Gata-1, AML1 発現は差がないが、Gata-2 と Bmi-1 と Pbx-1 の発現量が HOXB4 を発現させた OP-9 細胞共培養後の細胞では発現しているが、HOXB4 を発現させずに OP-9 細胞と共培養したものは殆ど発現していなかった。

ES から誘導された細胞が本来の造血幹細胞と異なるか調べるために、移植後のマウスの 18 週後の骨髄、末梢血を調べた。その結果 GFP 陽性細胞は殆どが Gr-1, Mac-1 陽性で CD4、CD8、B220 陽性の細胞は殆ど認めなかった。さらにこの細胞を FACS で分離しサイトスピン標本を作ると分葉核の好中球であった。また骨髄において、GFP 陽性細胞で Lineage マーカー陰性の細胞は c-Kit(+) CD41(+) CD45(-)

c-kit であり、この発現パターンは移植時のものと一致する。以上のことより、HOXB4 を発現したままでは移植時と同じ表面マーカーを持つ細胞が維持されており、ES 細胞由来の HOXB4 発現細胞は移植後において正常骨髄と完全には一致しない細胞である可能性が示唆された。

HOXB4 の強制発現が移植後の分化能にどのように影響するか調べた。移植後 8 週目で生着を確認したマウスに Dox を投与して、in vivo で HOXB4 の発現を抑制した。生着の確認として、GFP が使えないので ES 細胞由来の細胞が持つ Ly5.2 とレシピエントマウスが持つ Ly5.2/Ly5.1 で移植の成立を判断した。その結果、Dox の投与を始めると Ly5.2 で GFP 陽性の細胞は消失する。つまり ES 由来の細胞で HOXB4 の強制発現が抑制されていることが分かる。さらに分化マーカーを調べると、HOXB4 を発現していたときはすべて Gr-1 Mac-1 陽性であったのに対し、HOXB4 の強制発現を抑制すると Gr-1 Mac-1 陽性細胞は減少し、今まで存在しなかった CD4/8 陽性細胞が出現した。B220 陽性細胞は出現しない。この状態でマウスの末梢血を経時的に解析すると全体のキメリズムは徐々に減少していく。このことから、HOXB4 が分化能に対し何らかの影響を与えるが、HOXB4 の強制発現を中止することで成体と同様の造血幹細胞に分化するのではなく、ES 細胞由来の造血幹細胞においては長期間にわたって自己複製するには HOXB4 の強制発現が必要であると考えられる。

以上の結果より ES 細胞を胚様体形成法により分化させると 6 日目前後に CD41(+) c-Kit(+)細胞分画が出現し、この細胞分画を OP-9 細胞と共培養させ、このときに HOXB4 を発現させると移植によって長期骨髄生着を示す造血幹細胞に誘導させることができる。この EB6 の CD41(+) c-Kit(+)細胞分画はヘマンジオブラストとしての能力はないが胎仔型造血は示し、さらに成体型造血幹細胞でみられる遺伝子群を発現しており、造血幹細胞の前駆細胞が含まれていると考えられた。この細胞群は HOXB4 の発現によって CD41(+) c-Kit(+) CD34(+) CD45(-)細胞となり、Gata-1、Bmi-1 の発現を誘導した。しかし移植後も HOXB4 を発現させ続けると長期骨髄再建能は維持されるものの骨髄球系の細胞へのみ分化し、HOXB4 の発現が分化に影響を与えることが示された。