

研究報告書

「iPS 技術による血液、血管内皮細胞の誘導」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 片岡 宏

1. 研究のねらい

iPS 細胞の作成方法およびその効率化については種々の進歩が報告されているが、臨床応用のためには分化誘導技術の改良が必要である。血液、内皮細胞は治療上有用な細胞集団であり早くから ES 細胞を用いた分化誘導が研究されているが、実際のマウス胎児内での発生、分化過程が完全に理解されているわけではなく ES 細胞からの試験管内分化でも完全な方法は確立されていない。特に移植が可能な血液を ES 細胞から作るには特定の転写因子を遺伝子導入し強制発現させることが必要とされており、生理的に妥当な方法とは言いがたい。試験管内で生理的な造血が再構成できない原因としては未知の因子の機能が十分に解明されていないために至適な造血環境が再現できていない可能性が高い。血液、内皮細胞の分化過程を詳細に解析する目的で ES 細胞を中胚葉、血管内皮、血液に分化誘導し、その培養系において各分化段階の遺伝子発現解析を行った。この解析から内皮、血液分化を促進する必須因子として Ets ファミリーのひとつである Etv2 を見いだした。Etv2 を欠損させるとマウス胚で内皮、血液が完全に消失し、これらの細胞系譜を決定するマスター遺伝子であることがわかった。残念ながらこの劇的なノックアウトの表現型は我々の解析中にアメリカのグループから先に報告されたが、ES、iPS 細胞から中胚葉を経て内皮、血液を誘導する際には考慮すべき最重要因子であり、Etv2 を手がかりとした血液、内皮分化過程の解明、ES 細胞等での Etv2 発現の効果など検討した上で Etv2 を利用して幹細胞からの内皮、血液の効率的な誘導法の開発を目指して研究を進めた。

2. 研究成果

(1) 概要

1) Etv2 の血液、内皮細胞発生における役割の解析

Etv2 の発現をマーカー遺伝子ノックインマウス、ES 細胞にて解析し、機能的な意義を Etv2 欠損マウス、ES 細胞を用いて検討した。

2) Etv2 の一過性発現の必要性に関する検証

Etv2 の一過性発現の重要性をマウスの発生過程で検討した。Etv2 が持続発現するマウスでは正常の血管、血液の発生が阻害されることを示した。

3) 1. 造血に重要な初期中胚葉の検索。血液、内皮細胞発生に必須である Etv2 を指標にして造血に最重要である中胚葉の領域を検索した。

2. マウス胚での知見をもとにした試験管内での ES 分化で 1.に相当する細胞集団を解析した。

(2) 詳細

1) Etv2 の血液、内皮発生における役割の解析

ES 細胞から中胚葉、血液と分化誘導する培養系で各分化段階の細胞集団の遺伝子発現解析を網羅的に行い、血液、内皮の前駆細胞に相当する Flk-1 陽性集団に特異的に高発現する遺伝子として Etv2 を見いだした。ノックアウトマウスを作製したところ血管内皮、血液細胞が完全欠損し胎生9日目に致死であったため、血液、内皮細胞の分化、発生における最重要遺伝子であると考えさらに解析を進めた。Venus ノックインマウスで Etv2 の発現をみたところ初期中胚葉の Flk-1 陽性細胞に一致して発現が始まるがその発現は一過性で、内皮、血液を初期中胚葉から誘導した後は胎生10日目頃には発現がほぼ消失することがわかった(図1)。Etv2 欠損マウスおよび Etv2^{-/-}-ES 細胞の解析から、初期の Flk-1 陽性細胞の誘導は Etv2 欠損状態でも可能であるが、Flk-1⁺/PDGFR α ⁺の未分化中胚葉を Flk-1⁺/PDGFR α ⁻の内皮、血液に特化した前駆細胞への分化させるのには Etv2 は必須であった。Etv2 は種々の内皮、血液に特異的で重要な転写因子等を誘導するが、Etv2 の標的となる遺伝子群の中でも Scl と Fli1 が Etv2 欠損状態からでも血液、内皮細胞誘導を rescue できることから最重要の因子と考えられた。さらに Flk-1 陽性初期中胚葉に Etv2 を発現誘導するうえで VEGF が強力に作用することを示した(図2)。

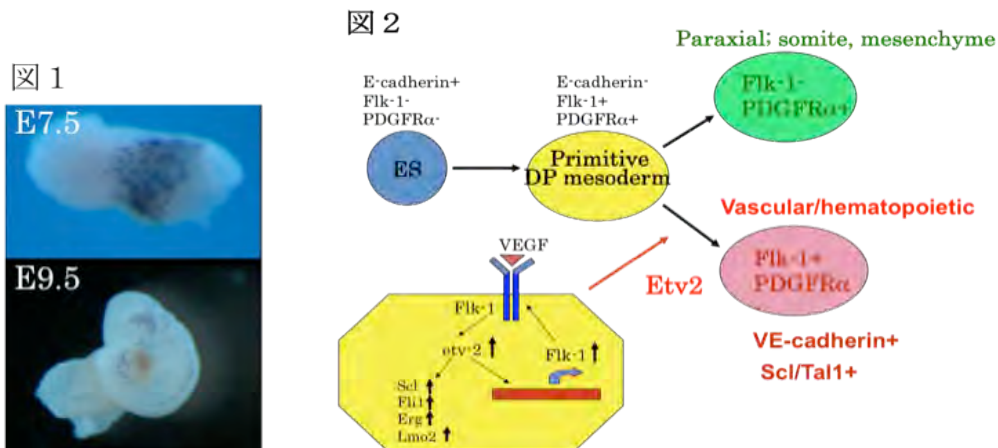


図1) Etv2 のマウス胚における発現。造血が始まる胚外中胚葉に胎生7日目に発現がみられるが、その発現は一過性で9日目には消失し、胚内の血管系に発現がシフトしている。

図2) ES 分化の中胚葉培養系では Flk-1⁺/PDGFR α ⁺の未分化中胚葉が PDGFR α ⁺の筋肉、間葉系の細胞と Flk-1⁺の内皮、血液になる細胞に分化する。Etv2 は未分化中胚葉の細胞集団を内皮、血液の方向に誘導するのに必須の因子である。VEGF が我々の検索した中では最も強力に Etv2 の発現を誘導した。

2) Etv2 の一過性発現の必要性に関する検証

Etv2 の発現が一過性であることが血液、内皮細胞の分化誘導に利用する際にも重要かを検討した。この目的のため組織特異的 Cre トランスジエン依存性に Etv2 を恒常的に発現し続けるマウスの系統を作製した(図3A)。神経上皮、体節に Etv2 を持続発現させても発生は正常に進み明らかな表現型は認めなかったが、内皮、血液の強発現が持続すると血管系の異常

で胎生致死となった他、成体の造血も阻害された(図 3)。この結果から Etv2 は適切な発現調節により一過性のみ発現し、内皮、血液細胞の分化後はその発現が低下する必要があること示唆された。

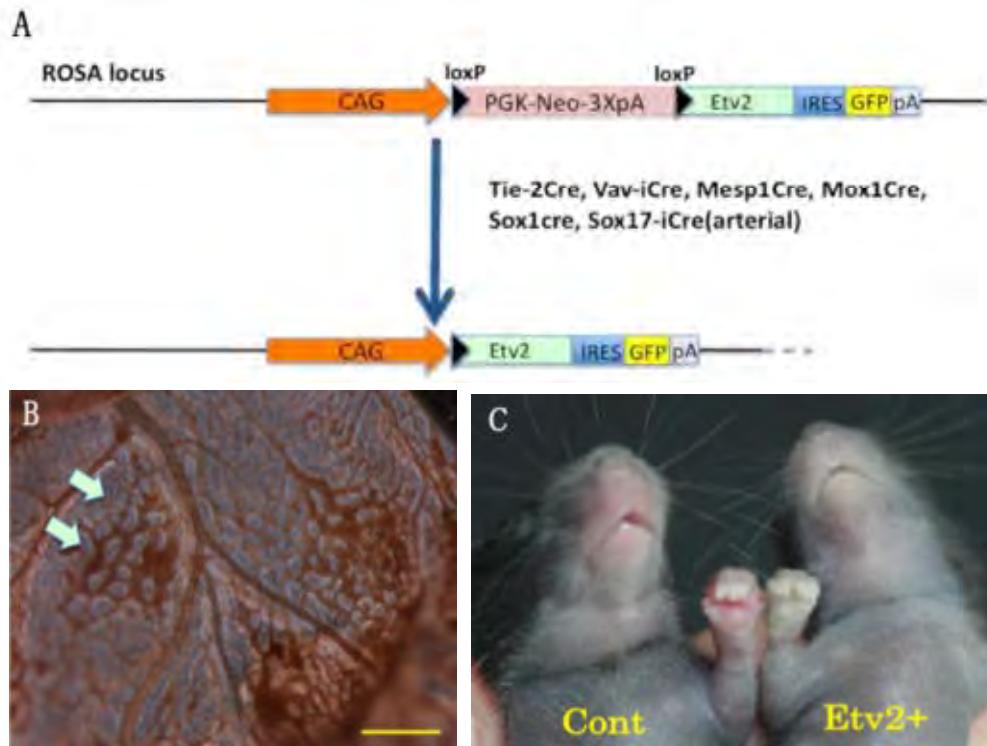


図3)A. 組織特異的に Etv2 の強発現を得るため ROSA26 に Cre 依存的に Etv2 transgene を発現するカセットをノックインした。B. Tie-2Cre により内皮細胞に強発現を誘導すると血管の一部が拡張し、マウス胎児は胎生 11 日目前後で致死となった。C. Vav-Cre により Etv2 を成体血液細胞に強発現した。Etv2 の発現が血液で持続すると骨髓細胞のコロニー形成能は著しく低下し、マウスは貧血を呈した。

3)

1. 造血に重要な初期中胚葉の検索

Etv2 の欠損は内皮、血液分化を完全に阻害することおよび発現パターン等から示唆されるごとく中胚葉から血液をつくる過程でのみ必須であり以降の内皮、血液の機能にはほぼ不要である。この分子の特性を利用して、血液をつくれる内皮細胞(hemogenic endothelial cell)の由来を検討した。成体の血液に寄与できる細胞は Aorta-Gonad-Mesonephron(AGM)の hemogenic endothelial cell に由来するとされるが、その起源が初期中胚葉のレベルでは明らかにされていない。Cre を各中胚葉領域特異的に発現するマウスと Etv2 conditional マウスを掛け合わせて造血に重要な中胚葉の領域を検索した。体節や神経上皮由来の内皮細胞の血管、血液への関与も報告はされているがこれらを標的とする Cre で Etv2 を欠損させても発生は進み正常のマウス個体が得られた。使用した Cre マウスのうち Mesp1Cre, Hoxb6Cre, Hes7Cre マウスによる Etv2 欠損で血液発生の著しい阻害をみた。特に Hoxb6Cre による欠損

では血管の障害が尾部に限局しているにもかかわらず胎児は貧血様であり、AGMで c-Kit 陽性細胞が著減していた(図 4)。Hoxb6ERCre で同様の実験を行い Tmx で時期特異的な Etv2 欠損を誘導したところ胎生 7.5-8.5 日の Hoxb6 発現領域に相当する尾側の側板中胚葉が将来的な造血に最重要である中胚葉集団であることがわかった。

2. マウス胚での知見をもとにした試験管内での ES 分化

マウス胚で領域特異的に Etv2 を欠損させた結果から Hoxb6Cre の標的となる尾側側板中胚葉の胎生 7-8 日目に相当する部分が造血に最も重要な部位と判明した。この知見を試験管内での分化誘導に応用するため Hoxb6 に蛍光蛋白をノックインした ES 細胞を作製した。OP9 細胞、Embrioid Body を用いる方法で血液系に分化させたがこれらの従来の分化方法では Hoxb6 レポーター陽性細胞(Hoxb6+/Flk-1+)は Flk-1 陽性のうちの 0.3%前後であった。しかし Hoxb6+/Flk-1+の集団は gene expression profiling や T 細胞産生能から成体での造血細胞に近い特徴がみられている。現在移植実験、およびこの集団をより高率に誘導できる培養条件を検討している(図 5)。

図4

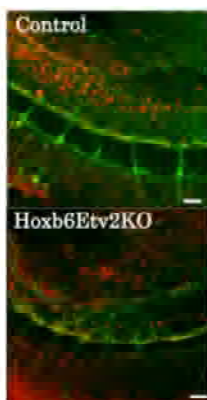


図5

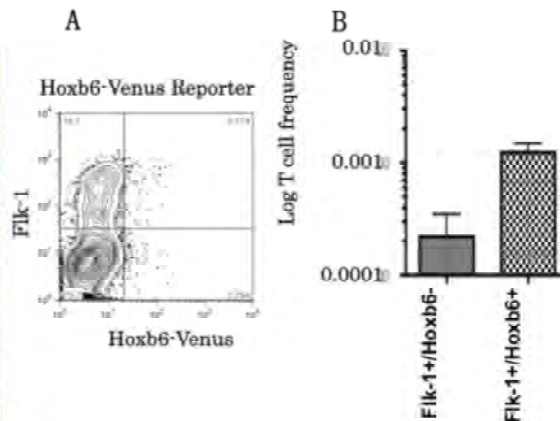


図4) Etv2 を Hoxb6-Cre が標的となる中胚葉で欠損させると Aorta(Green)内の c-Kit(Red)陽性細胞が減少し、AGM での造血能低下を示唆する。

図5) A. Hoxb6 promoter で蛍光タンパクを発現する ES 細胞を血液に分化させる条件で培養した。従来の培養法では Flk-1 陽性のうちの 0.3%くらいしか Hoxb6 reporter 陽性にならなかった。

B. Hoxb6+の細胞集団はより高い lymphoid potential を有している。Flk-1+の細胞で Hoxb6 陽性と陰性の集団を OP9-DL1 上で T 細胞を誘導した。Hoxb6+の細胞がより高頻度で T 細胞を産生した。

3. 今後の展開

Etv2 が血液および内皮細胞の発生に必須の因子でありその作用につき以下のことを解明した。

1) Etv2 の発現は一過性であり過剰に発現が持続することが血管系、血液系ともに正常発生を妨げる。2) Etv2 をマウス初期中胚葉で部位特異的に欠損させることで造血に最も重要な中胚葉の集団を同定できた。1)については Etv2 を試験管内造血に応用する上で一過性に発現を誘導できるベクターシステムの構築が必要であり、導入効率等の面からセンダイウイルスによる方

法を検討している。2)については現在頻用されている分化誘導法である embryoid body、OP9 ストローマ細胞上での培養法ともわずかしが該当する細胞集団が試験管内では誘導できていない。新たな増殖、分化誘導因子の組み合わせで Hoxb6 陽性となる Flk-1 陽性細胞の効率的な誘導法を検討する必要がある。

4. 自己評価

iPS 細胞、ES 細胞の有効な活用につながる研究として、血液細胞を効率よく得ることを目指したが特定の分子の機能解析が研究期間内では主な成果になってしまった。世界で数グループが競争するこの分野では最も興味深いターゲットであるので早めに出せる成果を追わねばならない状況にあったことは確かであるが、Etv2 をいかに試験管内の造血に利用すべきかという課題については十分な仕事できていない。期間内で得られた知見が今後の応用に生かされるような状況を期待したい。

5. 研究総括の見解

本来の目的は iPS 細胞から血液血管細胞を高効率に誘導する方法の開発であったが、残念ながらそこまでは到達できていない。ただ、これを可能にすると考えた Etv2 分子の研究については最高レベルの解析を行い、この分子の機能についてほぼ明らかにし、いくつかの論文にまとめている。また、同じさきがけの依馬研究者などと共同研究を行い、論文作成にまで至っている。このように、productivity という面では高く評価できる。積み上げた膨大な解析データの全てをまだまだ論文に出来ていないようで、まずこれらを論文として発表する事を期待する。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Etv2/ER71 induces vascular mesoderm from Flk1+PDGFR α + primitive mesoderm.
Kataoka H#, Hayashi M, Nakagawa R, Tanaka Y, Izumi N, Nishikawa S, Jakt ML, Tarui H, Nishikawa S. *Blood*. 2011 Dec 22;118(26):6975-86. (#Corresponding author)
2. Molecular basis for Flk1 expression in hemato-cardiovascular progenitors in the mouse.
Ishitobi H, Wakamatsu A, Liu F, Azami T, Hamada M, Matsumoto K, **Kataoka H**, Kobayashi M, Choi K, Nishikawa S, Takahashi S, Ema M. *Development*. 2011 Dec;138(24):5357-68.
3. PKA/CREB signaling triggers initiation of endothelial and hematopoietic cell differentiation via Etv2 induction. Yamamizu K, Matsunaga T, Katayama S, **Kataoka H**, Takayama N, Eto K, Nishikawa S, Yamashita JK. *Stem Cells*. 2012 Apr;30(4):687-96.
4. Endothelialization and altered hematopoiesis by persistent Etv2 expression in mice.
Hayashi M, Pluchinotta M, Momiyama A, Tanaka Y, Nishikawa S, **Kataoka H**#. *Exp Hematol*. 2012 Sep;40(9):738-750. (#Corresponding author)
5. PDGF receptor alpha+ mesoderm contributes to endothelial and hematopoietic cells in mice. Ding G, Tanaka Y, Hayashi M, Nishikawa SI, **Kataoka H** #. (#Corresponding author)

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. Hiroshi Kataoka. Role of Etv2 for the generation of hematopoietic and endothelial cells from mesoderm. 第8回 幹細胞シンポジウム, 淡路夢舞台国際会議場、2010.5
2. Hiroshi Kataoka. Embryonic Vasculogenesis ; Analysis using a Key Regulator. Gordon Research Conference, New England, USA, Aug. 2010
3. 片岡 宏 Specification of endothelial and hematopoietic cells by Etv2., 第34回日本分子生物学会、横浜、2011.12
4. Hiroshi Kataoka, Misato Hayashi, Shun-Ichi Nishikawa., Mesoderm compartmentalization for distinct endothelial contribution to embryonic vasculature. 10thISSCR, Yokohama, 2012.6
5. Ding Guo, Hiroshi Kataoka, Shin-Ichi Nishikawa Derivation of hematopoietic cells from PDGF receptor alpha mesoderm in mice. 10thISSCR, Yokohama, 2012.6
6. Ding Guo, Yosuke Tanaka, Misato Hayashi, Shin-Ichi Nishikawa, Hiroshi Kataoka., PDGF receptor alpha+ mesoderm contributes to hematopoietic and endothelial cells in mice. Hong Kong Society for Developmental, Biology Symposium, Hong Kong, 2012.11
7. Kumiko Kobayashi, Ding Guo, Shin-Ichi Nishikawa, Hiroshi Kataoka., Late stage Etv2 is required for the completion of vascular development., Hong Kong Society for Developmental, Biology Symposium, Hong Kong, 2012.11
8. Ding Guo, Yosuke Tanaka, Misato Hayashi, Shin-Ichi Nishikawa, Hiroshi Kataoka., PDGF receptor alpha+ mesoderm contributes to hematopoietic and endothelial cells in mice. 第20回日本血管生物医学会学術集会, 徳島、2012.12