

(平成 25 年度 研究実施報告)

国際科学技術共同研究推進事業
(戦略的国際共同研究プログラム)

研究領域「幹細胞のエピジェネティクス」

研究課題名「正常造血及び白血病における幹細胞とエピジェネティクス」

平成25年度実施報告書

 代表者氏名 中内 啓光
(東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター・教授)

1. 研究実施内容

1-1. 研究実施の概要 公開

(中内研)

多能性幹細胞から効率的に造血幹細胞を誘導するテラトーマ形成法において、各ステップを改善するために2つの点について研究を進めた。1) 多能性幹細胞と共培養する支持細胞として OP9細胞がある。しかし、OP9細胞の分泌するサイトカンだけでは造血幹細胞を効率的に誘導出来得ないことが問題となっている。従来はそのサイトカンを補うために浸透圧ポンプを用いることにより、サイトカインをマウスに投与していた。今回はこのポンプを使用することなく OP9細胞にサイトカインを強制発現させることにより改善することを試みた。また微小環境側の分化・増殖に関連した転写因子を OP9細胞に発現させる方法を用いることで、より効率ならびに品質の高い造血支持細胞を作製することを試みている。2) テラトーマを作製する際、ホスト側のマウス造血幹細胞が存在するために多能性幹細胞側の造血幹細胞が効率良く骨髄に生着しないという可能性がある。そこで血球細胞特異的に細胞死を起こすマウスの作成を試みており、現在細胞死誘導システムを持つキメラマウスを得ている。

(小川研)

若年性骨髄単球性白血病(JMML)およびダウン症候群に伴う骨髄増殖性疾患(TMD)について全ゲノムシーケンスおよび全エクソンシーケンスによってこれらの腫瘍の発症に関わる遺伝子変異の網羅的な同定を行った。いずれの腫瘍においても、体細胞変異は全てのがん腫の中で最も少なく(平均 1-2 個の非同義変異)、JMMLにおいてはRAS経路の活性化変異が、またTMDにおいてはGATA1変異が多くの症例でほぼ唯一の変異となっていることが明らかとなった。また、TMDに続発する再発時には、コヒーシン、ヒストン修飾酵素群変異が45-50%の症例で観察された。体細胞変異数が極めてすくなくかつ特定の変異に大きく偏っていることから、これらの小児白血病においては、その起源となる幹細胞のEpigeneticな特性が腫瘍の発症に非常に重要な役割を担っていることが示唆された。

2. 研究実施体制 公開

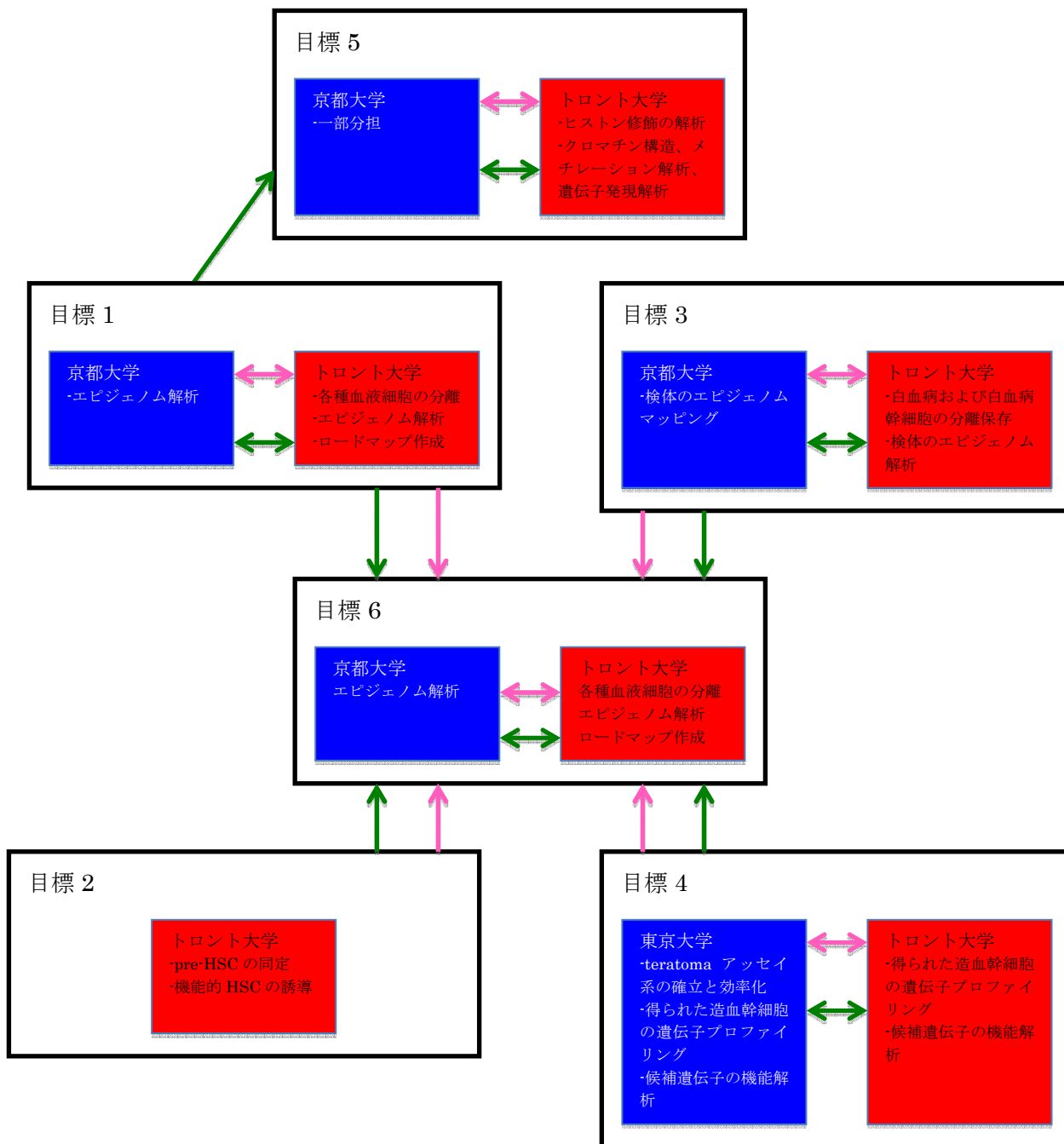
2-1. 日本側の研究実施体制

研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	中内 啓光	東京大学	医科学研究所	教授
主な共同研究者	小川 誠司	京都大学	医学研究科	教授

2-2. 相手側の研究実施体制

研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	John E.Dick	トロント大学	Department of Molecular Genetics	教授
主な共同研究者	Gordon Keller	トロント大学	Department of Medical Biophysics,	教授
主な共同研究者	Mathieu Lupien	トロント大学	オンタリオン 癌研究所	准教授

2-3. 両国の研究実施体制



目標 1 : 胎児期、新生児期、成体正常造血幹細胞および造血前駆細胞のエピジェノムマッピング

目標 2 : ヒト多能性幹細胞 (PSC) 由来造血幹細胞の *in vitro* での分化誘導

目標 3 : 白血病および白血病幹細胞のエピジェノムマッピング

目標 4 : エピジェネティクス制御遺伝子の機能アッセイのための造血幹細胞誘導システムの開発

目標 5 : ヒストン修飾、クロマチン構造、メチレーション解析および遺伝子発現解析

目標 6 : データ解析とバイオインフォマティクス

3. 原著論文発表 公開

3-1. 原著論文発表

① 発行済論文数

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0 件	(0 件)
国際誌 19 件	(0 件)
計 19 件	(0 件)

※本共同研究の相手側チーム研究者との共著に限る

(中内研)

- Ishihara J, Umemoto T, Yamato M, Shiratsuchi Y, Takaki S, Petrich BG, Nakauchi H, Eto K, Kitamura T, Okano T. Nov/CCN3 regulates long-term repopulating activity of murine hematopoietic stem cells via integrin $\alpha v \beta 3$. *Int J Hematol*. 2014 Feb 22. [Epub ahead of print]PMID: 24563081
- Matsunawa M, Yamamoto R, Sanada M, Sato-Otsubo A, Shiozawa Y, Otsu M, Isono K, Koseki H, Nakauchi H, Ogawa S. Haploinsufficiency of Sf3b1 leads to compromised stem cell function but not to myelodysplasia. *Leukemia*. 2014 Feb 18. doi: 10.1038/leu.2014.73. [Epub ahead of print]PMID: 24535406
- Nakamura S, Takayama N, Hirata S, Seo H, Endo H, Ochi K, Fujita KI, Koike T, Harimoto KI, Dohda T, Watanabe A, Okita K, Takahashi N, Sawaguchi A, Yamanaka S, Nakauchi H, Nishimura S, Eto K. Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically Applicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2014 Feb 12. pii: S1934-5909(14)00012-5. doi: 10.1016/j.stem.2014.01.011. [Epub ahead of print]PMID: 24529595
- Miyagi S, Koide S, Saraya A, Wendt GR, Oshima M, Konuma T, Yamazaki S, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Chiba T, Kitabayashi I, Nakauchi H, Iwama A. The TIF1 β -HP1 System Maintains Transcriptional Integrity of Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2014 Jan 23;2(2):145-52. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.12.008. eCollection 2014 Feb 11.PMID: 24527388
- Lai CY, Yamazaki S, Okabe M, Suzuki S, Maeyama Y, Iimura Y, Onodera M, Kakuta S, Iwakura Y, Nojima M, Otsu M, Nakauchi H. Stage-specific roles for Cxcr4 signaling in murine hematopoietic stem/progenitor cells in the process of bone marrow repopulation. *Stem Cells*. 2014 Feb 8. doi: 10.1002/stem.1670. [Epub ahead of print]PMID: 24510783
- Ariki R, Morikawa S, Mabuchi Y, Suzuki S, Nakatake M, Yoshioka K, Hidano S, Nakauchi H, Matsuzaki Y, Nakamura T, Goitsuka R. Homeodomain transcription factor meis1 is a critical regulator of adult bone marrow hematopoiesis. *PLoS One*. 2014 Feb 3;9(2):e87646. doi: 10.1371/journal.pone.0087646. eCollection 2014.PMID: 24498346
- Hirose S, Takayama N, Nakamura S, Nagasawa K, Ochi K, Hirata S, Yamazaki S, Yamaguchi T, Otsu M, Sano S, Takahashi N, Sawaguchi A, Ito M, Kato T, Nakauchi H, Eto K. Immortalization of Erythroblasts by c-MYC and BCL-XL Enables Large-Scale Erythrocyte Production from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2013 Dec 5;1(6):499-508. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.10.010.
- Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Crawford BE, Brown JR, Ohashi T. Enzyme augmentation therapy enhances the therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type II mice. *Mol Genet Metab*. 2013 Sep 21. doi:pii: S1096-7192(13)00325-9. 10.1016/j.ymgme.2013.09.013. [Epub ahead of print] PMID: 24100247

9. Saka K, Kawahara M, Teng J, Otsu M, Nakauchi H, Nagamune T. Top-down motif engineering of a cytokine receptor for directing ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J Biotechnol.* 2013 Sep 23. doi:pii: S0168-1656(13)00403-3. 10.1016/j.jbiotec.2013.09.012. [Epub ahead of print] PMID: 24070902
10. *Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, Hamanaka S, Onodera M, Rudolph KL, Ema H, Nakauchi H. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell.* 2013 Aug 29;154(5):1112-26. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.007. PMID: 23993099

これまででは造血幹細胞だけが自己複製すると考えられていたが、血小板等にコミットした細胞も自己複製することを明らかにした。さらにこれらの細胞が造血幹細胞から直接分化する経路が存在することを示した。血液学の教科書を書き換える発見であり、本プロジェクトにも大きな影響を与える成果である。
11. Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nature Genet.* 2013 Oct;45(10):1232-7. doi: 10.1038/ng.2731. Epub 2013 Aug 18. PMID: 23955599
12. Shinji Hirata, Naoya Takayama, Ryoko Jono-Ohnishi, Hiroshi Endo, Sou Nakamura, Takeaki Dohda, Masanori Nishi, Yuhei Hamazaki, Ei-ichi Ishii, Shin Kaneko, Makoto Otsu, Hiromitsu Nakauchi, Shinji Kunishima, and Koji Eto. CAMT-iPS Cells Exhibiting Defective MPL Signaling Dysregulate Megakaryopoiesis and Erythropoiesis. *J Clin Invest.* 2013. 123(9):3802-14.

(小川研)

13. Becker H, Yoshida K, Blagitko-Dorfs N, Claus R, Pantic M, Abdelkarim M, Niemoller C, Greil C, Hackanson B, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Dohner K, Schnittger S, Henneke P, Niemeyer CM, Flotho C, Pfeifer D, Ogawa S, Lubbert M. "Tracing the development of acute myeloid leukemia in CBL syndrome", *Blood*, No., 2014 (10.1182/blood-2013-10-533844)
14. *Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Park MJ, Terui K, Suzuki H, Kon A, Nagata Y, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S. "The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders", *Nat Genet.* vol. 45, No. 11, pp.1293-1299, 2013 (10.1038/ng.2759)

Down 症候群患児に特徴的に認められる一過性骨髄増殖性疾患(TMD)について、ゲノム異常の全容の解明をおこなった。TMD では GATA1 変異が唯一の体細胞変異となっている一方、その再発には、コヒーシ複合体/CTCF、PRC2 複合体、KANSL1 など複数のエピゲノム制御に関わる異常が高頻度に認められることが明らかとなった。

15. Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. "Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia", *Nat Genet.* vol. 45, No. 8, pp.937-941, 2013 (10.1038/ng.2698)
16. Saida S, Watanabe K, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T. "Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome", *Blood.* vol. 121, No. 21, pp.4377-4387, 2013 (10.1182/blood-2012-12-474387)
17. Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, Sanada M, Miyagi S, Saraya A, Kamio A, Nagae G, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Koseki H, Suzuki Y, Sugano S, Aburatani H, Ogawa S, Iwama A. "Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders", *J Exp Med.* vol. 210, No. 12, pp.2627-2639, 2013 (10.1084/jem.20131144)
18. Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Sauntharajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP. "Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies", *Nat Genet.* vol. 45, No. 8, pp.942-946, 2013 (10.1038/ng.2696)
19. Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koeflter HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. "Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms", *Nat Genet.* vol. 45, No. 10, pp.1232-1237, 2013 (10.1038/ng.2731)

② 未発行論文数

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0件	(0件)
国際誌 0件	(0件)
計 0件	(0件)

※本共同研究の相手国チーム研究者との共著に限る