

博士論文

自己複製能を獲得し幹細胞にリプログラミングされた
造血前駆細胞の機能解析

岡部基人

自己複製能を獲得し幹細胞にリプログラミングされた
造血前駆細胞の機能解析

東京大学大学院 医学系研究科

紹介教員：南谷 泰仁

申請者：岡部 基人

目次

1. 略語2
2. 要旨4
3. 序文5
4. 材料と方法13
5. 結果20
6. 考察53
7. 参考文献64
8. 謝辞72

1. 略語

APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-cyanin7
B6	C57BL/6
CD34 ⁺ c-Kit ⁺ Sca1 ⁺ Lineage ⁻	CD34 ⁺ KSL
CD34 ⁻ c-Kit ⁺ Sca1 ⁺ Lineage ⁻	CD34 ⁻ KSL
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ES cells	Embryonic stem cells
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HLA	Human Leukocyte antigen
HPCs	Hematopoietic progenitor cells
HSCs	Hematopoietic stem cells
IL-7R	Interleukin-7R
iPS cells	induced pluripotent stem cells
IRES	internal ribosome entry site
Lin	Lineage
MOI	Multiplicity of infection
PE	Phycoerythrin

PE-Cy7

Phycoerythrin -cyanin7

RT-PCR

reverse transcription polymerase chain reaction

Sca-1

Stem cell antigen-1

SCF

Stem cell factor

TPO

Thrombopoietin

2. 要旨

造血幹細胞移植は造血器腫瘍を根治しうる治療法であるが、常に十分量のドナー細胞が得られるわけではない。そのため造血幹細胞の増幅法もしくは異なる細胞からの造血幹細胞誘導法の確立が期待されている。本研究で自己複製能を持たない造血前駆細胞を造血幹細胞にリプログラミングさせるための候補遺伝子のスクリーニングを行った結果、*HoxB4* 遺伝子を造血前駆細胞に遺伝子導入することで生着可能な造血幹細胞様の細胞を誘導することに成功した。本成果を応用することで移植治療において不足する移植細胞数を改善させる可能性が示唆される。

3. 序文

生体内に存在する細胞の運命決定は、しばしば丘を下って転がるボールに例えられる。丘の頂上にあるボールは多方向に転がることができるが、転がる坂の方向が決まると同時に目的の場所に向かって進んでいき、その坂を駆け上がることはできない (図 1)。これで例えられるように、未分化な幹細胞は分化のヒエラルキーの頂点に存在し、その定常状態において可塑性を有して多方向へ丘を下ることができる”多能性”を有する。しかし分化の方向が定まっていってつれてその可塑性は失われていき、隣接する丘を越えることができず一方向への分化の道を進むことで細胞の運命は決定され、その道を元に戻ることとはできなくなる。これを制御するものとして転写制御におけるネットワークとエピジェネティックステータスが知られており、それによって分化の方向は不可逆的に進行すると考えるのがエピジェネティックランドスケープと呼ばれる、分化の基本的な概念である¹。分化の方向を変えることは生理的な状況では困難であるとされているが、その厳密な制御の下で個体は正常に発生する。エピジェネティックランドスケープの例外として受精卵があり、分化した生殖細胞同士の受精によって得られた胚はこの丘の一番上に戻り、改めて分化の丘を下り個体を発生させ、このループを次世代へと受け継いでいく。

このエピジェネティックランドスケープのリセットを人為的に起こさせたの

が、体細胞の核移植である。1996年に、生体内に存在する体細胞の核を用いて脱核させた卵母細胞に核移植を行うことで体細胞由来のクローン動物が作成できると報告された^{2,3}。卵母細胞へ移植をすることによって丘を下ったはずの体細胞のエピジェネティックステータスを丘の頂点まで引き戻すことができたこの成果は、リプログラミング技術の先駆けと言える報告であった。その後2006年に京都大学の山中らによって、*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*の4つの遺伝子を体細胞に導入することで核移植を行わずに個体発生が可能な多能性幹細胞へリプログラミングできることが報告された。この細胞は人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS細胞)と名付けられ、以降の再生医療の技術発展に大きく貢献をした⁴⁻⁶。その後のリプログラミング技術の革新は目覚ましく、標的遺伝子やmicroRNAの導入によって終末分化細胞から様々な多系統の細胞へのconversionも可能となった。その主なものとしてB細胞からT細胞、外分泌系の細胞からすい臓のβ細胞、線維芽細胞から神経細胞や筋細胞、造血細胞などの変換が挙げられる⁷⁻¹³。これらの結果を踏まえると、遺伝子操作やエピジェネティックステータスをリセットすることによって、特定の細胞系譜から丘を駆け上がって多能性幹細胞へリプログラミングを果たすのみならず、丘を越えて異なる多様な細胞系譜へと誘導させることはもはや不可能ではなくなった。そのため、この技術を用いることで移植治療において必要な移植細胞の

増幅および誘導が可能となれば、慢性的に不足する移植細胞や臓器のドナーを補うことができると考えられる。

造血幹細胞 (Hematopoietic stem cells: HSCs)は自己複製能と多分化能を兼ね備えた体性幹細胞の一つであり、多分化性の造血前駆細胞を経て各血液細胞系譜へと分化していく (図 2)。その能力を利用し、HSCs は造血器腫瘍をはじめとした血液疾患の根治治療として行う造血細胞移植の移植細胞として用いられる。造血細胞移植は、自己の造血を破壊しうるほどの強力な前処置を行うことで正常な造血幹細胞も含めて悪性腫瘍の駆逐を目指し、その後自己ないし非自己の HSCs を輸注しその造血を補完することが目的とされる治療法である¹⁴。非自己を用いた造血幹細胞移植では血縁者間、非血縁者間でドナーを検索するが、そのドナー選択においては Human Leukocyte Antigen (HLA)の一致が重要である。レシピエントとドナー間における HLA の一致の程度やアレル座の組み合わせなどによってドナー細胞がレシピエントを非自己として認識する移植片対宿主病や、生着不全のリスクが高くなることが分かっているため、このリスクを最小限にするためには HLA を一致させることが非血縁者間の造血細胞移植においては肝要である¹⁵。しかしながら、その HLA の組み合わせ次第では完全に一致するのは数万人に一人ともいわれることから造血幹細胞移植のドナーを探すのはしばしば困難となる。

HSCs を含む移植片として骨髄、末梢血、臍帯血が主に用いられ、その採取量が移植後の生着率に大きく関わる。しかし、骨髄細胞や末梢血細胞の採取において事前に採取量を正確に予測することは難しく、しばしば予定の採取量よりも少なくなってしまうことがある。臍帯血移植においては臍帯血バンクに保存されているストックの細胞数を確認したうえでドナー選択が可能であるという利点があるが、もともとの細胞数が多くないということから、大柄な患者は臍帯血ドナーの選択で体重当たり十分な細胞数が得られないことがある。これらの問題点を打破するため、HSCs を試験管内で増幅させる方法や他の細胞から誘導する方法の確立が強く期待される。多能性幹細胞である胚性幹細胞 (Embryonic stem cells: ES 細胞) や iPS 細胞からの HSCs の分化誘導は多くの科学者が試みているが、その先駆的な研究として 1996 年にホメオボックス遺伝子である *HoxB4* をマウス ES 細胞に強制発現させることで多分化能を有する HSCs を試験管内で誘導することに成功した報告がある¹⁶。その後、同遺伝子を用いることで生着可能な HSCs の誘導が報告された他、胚葉体の誘導を経て効率的に HSCs を誘導させる方法など報告が相次いだ¹⁷⁻²⁰。また、ES 細胞/iPS 細胞からテラトーマを作成する過程を介して、HSCs を誘導するといった方法も試みられている^{21, 22}。さらには複数遺伝子のヒト iPS 細胞への遺伝子導入によって HSCs の誘導が確認できたとの報告も多く、多能性幹細胞からの HSCs の誘導は実験的

には可能となったと考えられる²³⁻²⁵。また、適切なサイトカインの設定や濃度調整での HSCs の維持・増幅も試みられており、一般的には Stem cell factor (SCF) や Thrombopoietin (TPO) を用いることが多い²⁶。近年 Wilkinson らはポリビニルアルコールを用いて単一の HSCs を 1 か月間の培養期間でその数を約 900 倍にまで増やすことに成功した²⁷。このように HSCs の増幅、誘導には一定の成果が得られてきている一方、早急に移植を要する状況下の場合には中長期間の培養を待つ余裕はないこともあるため、必要に応じて速やかな HSCs の増幅および誘導が可能となる手法の開発も期待される。これらの問題をクリアするために ES 細胞/iPS 細胞から HSCs をあらかじめ作成しておくといった方法も検討されるが、多能性幹細胞からの HSCs の誘導においてはしばしば腫瘍化が問題となっているため、他の細胞ソースを用いたより安全な HSCs の誘導が一つの選択肢として挙げられる。そこで本研究では、リプログラミング技術を利用し、多能性幹細胞からの誘導ではなく造血前駆細胞 (Hematopoietic progenitor cells: HPCs) を用いた効率的な HSCs の誘導法を構想しこれに着手した。

HPCs をソース細胞として選択した根拠として、HSC よりも豊富に骨髄の中で存在し、細胞数が十分に得られるという利点があることに加え、血球細胞系譜においてより未分化な細胞においてリプログラミングが起りやすいことを示した Eminli らの報告が挙げられる²⁸。終末分化した細胞からのリプログラミング

グ効率が悪いことを踏まえ、まず私は未分化な状態ではあるものの長期的に骨髄再構築を行うことができない、自己複製能を持たない HPCs を細胞ソースとして選択し、このシステムが機能するかどうかを確認することとした。これまでの先行研究において成体内に存在する比較的分化の進んだ前駆細胞や終末分化細胞からの HSCs の誘導は報告があるが、HPCs からの HSCs の誘導の報告はない^{17, 29, 30}。そこで私は、HSCs の幹細胞活性に関与しうる転写因子の導入によって HPCs が自己複製能を獲得しうるかどうかを *in vivo assay* で評価を行った。まず、マウス HPCs を用いて実際にリプログラミングが可能かどうかを確認するために、同細胞分画を用いて iPS 細胞の樹立を試み、これに成功した³¹。前駆細胞を豊富に含む血球成分よりリプログラミングが可能であったことを確認したのち、これまでに報告のあった HSCs を増幅させると報告のあった遺伝子群を基に 8 つの遺伝子を用いて機能解析を行った³²。遺伝子導入を行った HPCs を用いて移植実験を行い、多分化能を評価した。またレシピエントマウス体内において HPCs 由来の HSCs が存在するかどうかを確認するために、表面抗原マーカー解析を行い表現型における HSCs の誘導を評価した。さらに、遺伝子導入を行った HPCs を用いて二次移植を行うことで骨髄再建能を評価し、また腫瘍原性についても評価を行った。以上を証明することによって、臨床応用可能な安全かつ迅速な HPCs からの HSCs の誘導方法の確立とした。

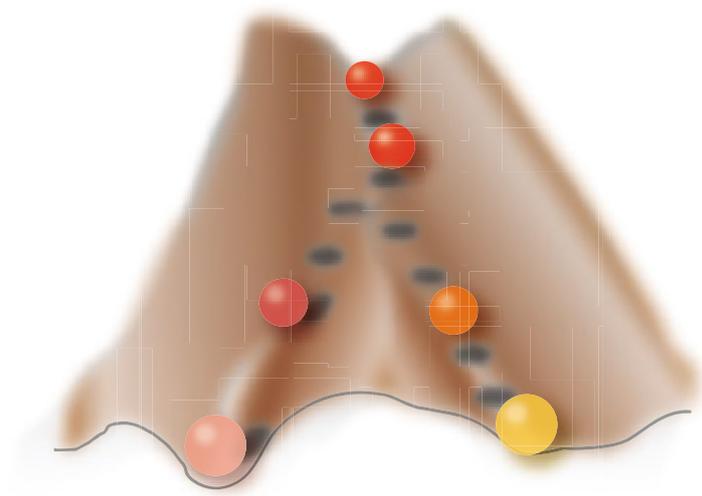


図 1. エピジェネティックランドスケープの概念図

頂点にあるボールは多方向へ向かうことが可能だが、丘を下り始めると特定の方向へ向かって下っていく。分化の過程も同様であり、一度分化の方向が決まった場合、丘を越えて細胞系統を変えることはできない (Waddington 1957 改変)。

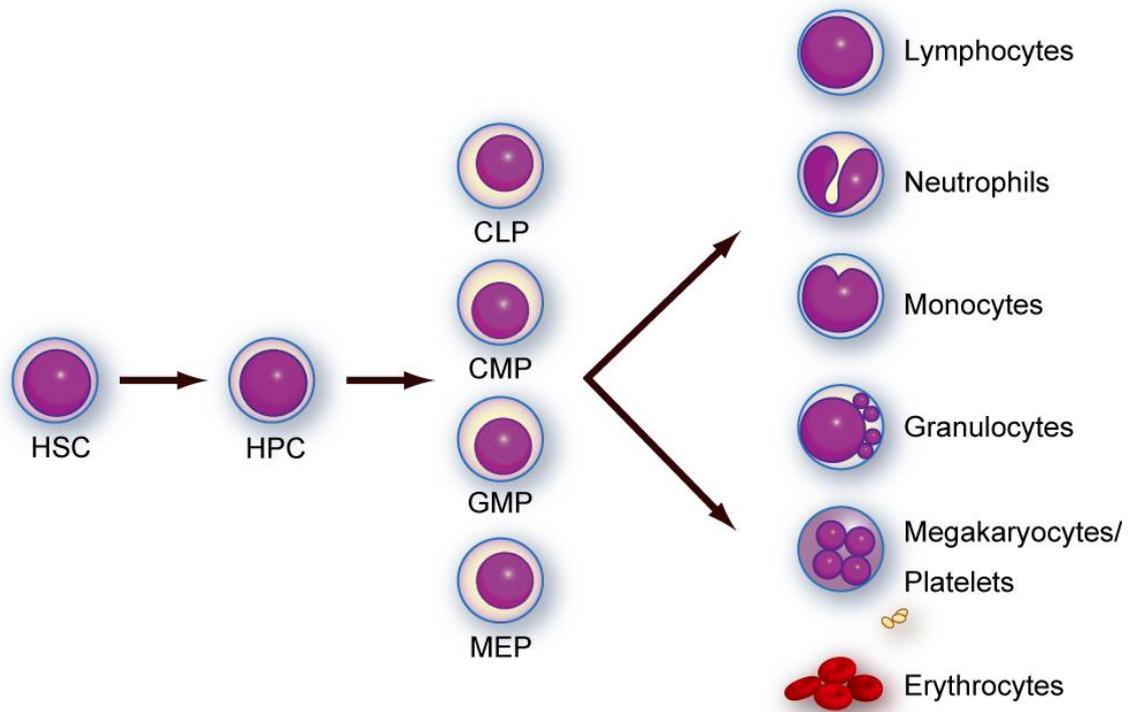


図 2. 古典的な血液細胞の分化のモデル

造血幹細胞は自己複製能と多分化能を有し、これにより体内の血液細胞の恒常性を維持している。造血前駆細胞では自己複製能が失われ各細胞系譜へと分化していき、リンパ球系前駆細胞や骨髄球系前駆細胞など分化の方向が徐々に進み、細胞系譜の決定がなされる。HSC, hematopoietic stem cell; HPC, hematopoietic progenitor cell; CLP, common lymphoid progenitor; CMP, common myeloid progenitor; GMP, granulocyte-macrophage progenitor; MEP, megakaryocyte-erythroid progenitor cell

材料及び方法

マウス

C57BL/6-Ly5.2 (B6-Ly5.2)、ICR マウスは日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。C57BL/6-Ly5.1 (B6-Ly5.1)および C57BL/6-Ly5.1/5.2 (B6-Ly5.1/5.2)マウスは三協ラボサービス株式会社 (Tokyo, Japan)より購入した。動物を用いたすべての実験は東京大学医科学研究所の実験動物安全委員会の規定に則って行った。

骨髓液からの HSCs および HPCs の分離

8-12 週齢の B6-Ly5.1 マウスの大腿骨、頸骨、骨盤から骨髓細胞を採取した。骨髓細胞から各細胞系譜を除くため、ビオチン付加した 抗マウス lineage 抗原ラット抗体カクテル (抗 CD4、CD8、B220、IL-7R、Gr-1、Mac-1、Ter-119 (PharMingen, San Diego, CA, USA) で反応後に Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 (DynaL Biotech, Lake Success, NY)を用いて反応後、抗ラット抗体マイクロビーズと MACS® LS カラム (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany)を用いて分化細胞を分離除去した。その後、Fluorescein isothiocyanate (FITC)-結合抗 CD34 抗体、 phycoerythrin (PE)-結合抗 Sca-1 抗体、allophycocyanin (APC)-結合抗 c-Kit 抗体、ストレプトアビジン結合-APC-cyanin7 (Cy7)と反応させた (すべて PharMingen)。死細胞はヨウ化プロピジウムを用いて除去した。細胞の解析と分離は MoFlo flow cytometer 及び Summit software (Beckman Coulter)もしくは

FACSAria flow cytometry (BD Biosciences)を使用した。結果の解析は FlowJo software (Tree Star)を用いて行った。

細胞培養

50 個の HSCs もしくは 500 個の HPCs を丸底の 96 穴プレートにソーティングを行い、S-clone SF-O3 serum-free medium (Sanko Junyaku, Tokyo, Japan)に 1% ウシ血清アルブミン、マウス SCF (50 ng/mL)、ヒト TPO (50 ng/mL, PeproTech, London, UK)を加えて 7 日間培養を行った。細胞は 5% CO₂ で 37°C のインキュベーター内で培養を行った。その後細胞は回収し、各穴の培養細胞を 2×10^5 個の B6-Ly5.1/5.2 骨髄細胞とともに 1 匹の B6-Ly5.2 マウスに経静脈的に骨髄移植を行った。

ウイルス産生細胞の樹立

HPCs からの HSCs の誘導には、pGCDNsam ベクターを用いた。レトロウイルスベクターは京都大学 山本玲博士から供与いただいたものを使用し、目的遺伝子の cDNA を pGCDNsam の internal ribosome entry site (IRES)-Enhanced green fluorescent protein (EGFP)配列の上流にクローニングされているものを以降のトランスフェクションに使用した。ウイルス産生細胞株に用いた 293gp 細胞株は

マサチューセッツ工科大学 Richard Mulligan 博士から供与していただいたものを用いた³³。293gp パッケージング細胞に目的遺伝子の pGCDNsam ベクターと VSVG プラスミドをリン酸カルシウム法でコトランスフェクションした。その際に得られた培養上清中のウイルスを回収し 6000G で 16 時間の遠心で濃縮し、ウイルス濃縮液として使用した³⁴⁻³⁶。得られたウイルス液を 293gp 細胞へ感染させて、安定したレトロウイルスベクター産生細胞株を樹立した。HSCs の誘導に用いた実験においては、すべての細胞株で FACSCanto II (Becton Dickinson) を用いて EGFP の 90% 以上の陽性率を確認した。

HSCs 及び HPCs への遺伝子強制発現

50 個の HSCs もしくは 500 個の HPCs を、フィブロネクチンフラグメント CH296 (Takara Bio, Shiga, Japan) をコートした丸底の 96 穴プレートにソーティングを行い、 α -MEM に 1% ウシ胎仔血清、マウス SCF (50 ng/mL)、ヒト TPO (100 ng/mL) (PeproTech) を加えて 24 時間培養を行った。翌日に、先述した方法で作成したレトロウイルスベクターを感染多重度 (Multiplicity of infection: MOI) 500 となるように培養液中に加え、24 時間培養を継続した。各ウイルス溶液の感染効率はヒトリンパ球系細胞株 Jurkat への感染効率を EGFP をマーカーとして用いて算出し (Infectious units/mL)、これを用いて MOI は下記のように算出し使用ウ

ウイルス溶液量を調整した： MOI=Infectious units/感染細胞数。さらに翌日に培養上清を吸引除去し、S-Clone SF-O3 培養液に 1% ウシ血清アルブミン、マウス SCF (50 ng/mL)、ヒト TPO (50 ng/mL) を加え 2 日間培養を行った。細胞は 5% CO₂ で 37°C のインキュベーター内で培養を行った。その後細胞は回収し、各穴の培養細胞を 2x10⁵ 個の B6-Ly5.1/5.2 骨髄細胞とともに 1 匹の B6-Ly5.2 マウスに、下記に示すように競合的骨髄再構築法を用いて移植を行い評価した (競合的骨髄再構築法の項を参照)。

Reverse Transcript-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

遺伝子発現を確認するために行った RT-PCR には、TRIzol RNA Isolation Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてマニュアルに従い抽出した RNA から ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて cDNA を合成した。RT-PCR は cDNA を用いて、GAPDH をコントロールとして使用した。PCR 反応には ExTaq HS と LA Taq HS (Takara Bio) を用いた。用いたプライマーは以下に示す。

HoxB4

Fw: 5'-GGCATCGCAGCTTGGATACA-3' (レトロウイルスベクター配列を認識)

Rv: 5'-CCCTCCCCACCCACCCAACA-3'

HoxA9

Fw: 5' - GGCATCGCAGCTTGGATACA -3' (レトロウイルスベクター配列を認識)

Rv: 5'-CGCGACGCACCGTCGATGAT-3'

Gapdh

Fw: 5'-TATTGCGCGCCTGGTCAC-3'

Rv: 5'-AGATGATGACCCTTTTGGCTC-3'

競合的骨髄再構築法

競合的骨髄再構築法は、Ly5 コンジェニックマウス系を用いて行った。B6-Ly5.1 マウスから採取し純化した HSCs もしくは HPCs を、B6-Ly5.1/5.2 マウスの骨髄細胞 (競合細胞)とともに 9.5Gy の致死放射線量を照射した B6-Ly5.2 マウスへ経静脈的に移植を行った。また、7日間無血清培養を行った HSCs もしくは HPCs も同様に競合細胞と混和して移植を行った。二次移植においては、一つの大腿骨から 2 匹のレシピエントマウスへ分配するよう調整し移植を行った。移植後の末梢血解析は、4 週ごとに経時的に行った。各分化細胞の評価は、得られ

た末梢血を溶血バッファー (NH₄Cl 150mM)を用いて溶血をさせたのちビオチン付加抗-Ly5.1 抗体, Pacific Blue-結合-抗 Ly5.2 抗体、APC-結合抗-Gr-1 抗体および抗 Mac-1 抗体, PE-Cy7-結合抗-B220 抗体、PE 結合抗-CD4 および抗-CD8 抗体で染色を行った。ビオチン付加抗体の検出は streptavidin-APC-Cy7 を用いて行った (すべて BD Biosciences, San Jose, CA)。同解析で Mac-1/Gr-1 陽性細胞はミエロイド系の細胞、B220 陽性細胞は B 細胞系譜、CD4/8 陽性細胞は T 細胞系譜とした。全解析は FACSCantoII (Becton Dickinson)を用いて行った。移植後のキメリズムは下記のように算出した： $(\text{percent CD45.1}^+, \text{EGFP}^+ \text{ test donor cells}) \times 100 / (\text{percent CD45.1}^+ \text{ test donor cells} + \text{percent CD45.1/45.2}^+ \text{ competitor cells})$ 。生着の定義は、移植後 16 週時点でドナー骨髄球系、B 細胞および T 細胞のキメリズムが 1%を上回った場合とした。レシピエントマウスの骨髄の解析には PE-Cy7-結合抗-Ly5.1 抗体、Pacific Blue-結合抗-Ly5.2 抗体、上述した抗マウス lineage 抗原ラット抗体カクテル、Alexa fluor-700-結合抗-CD34 抗体、PE-結合抗-Sca-1 抗体、APC-結合抗-c-Kit 抗体を用いた。ビオチン付加抗体の検出にはストレプトアビジン結合-APC-Cy7 と反応させた。細胞の解析と分離は細胞の解析と細胞分離は FACSAriaII flow cytometry (BD Biosciences)を使用した。結果の解析には FlowJo software (Tree Star)を用いて行った。

組織学および形態学的評価

一次および二次移植後 16 週経過後に、レシピエントマウスから脾臓および大腿骨を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定後にパラフィン包埋を行った。薄片標本はヘマトキシリン-エオジン染色を行った。末梢血および骨髄細胞はメイグリュンワルドギムザ染色を行い評価した。病理組織の作製は東京大学医科学研究所の病理部に依頼をした。

全血球計算

レシピエントマウスの眼底静脈叢からヘパリン管を用いて採取した末梢血は、全自動血球計測機 MEK-6528 (日本光電工業)を用いて全血球計算を行った。

網羅的遺伝子解析

遺伝子発現解析は、レトロウイルスベクターへ感染を行い4日後の HSCs もしくは HPCs を評価検体とし、SurePrintG3 Mouse GE 8x60K Microarray (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)を用いて行った。同解析はタカラバイオ株式会社に外注を行った。

統計解析

データは平均値 (±標準誤差)で示し、両群間の比較は two-tailed student t 検定にて行った。3 群間以上の比較には、one way ANOVA 解析を行った。2 群の比率の比較には Fisher の正確検定を行った。統計学的有意差は $p < 0.05$ をもって有意とした。全ての統計解析は Prism 4 software (Graphpad, San Diego, CA)を用いて行った。

4. 結果

5-1. HSCs および HPCs の移植後骨髄再建能の評価

私は、移植後の骨髄再建能を持たない前駆細胞から、一段階”若返り”をさせることで骨髄再構築が可能な HSCs の誘導を試みた。そこでまず候補となる細胞分画として $CD34^+c\text{-Kit}^+Sca\text{-1}^+Lineage^-$ ($CD34^+KSL$)の自己複製能を持たない HPCs を選択した³⁷。その理由として、先述した分化段階としてより HSCs の近くに存在する細胞集団でリプログラミングは起こりやすいという既報を踏まえ、同分画が本システムの構築に最適と仮定したからである。そこでまずは、HPCs が多分化能および自己複製能を有するかどうか予備実験における検討を行った。もし生着可能な自己複製能を有するのであれば、ソース細胞としては不適切である。

HSCs と HPCs の骨髄再建能を評価するため、私は競合的骨髄再構築法を用い

た。まずはじめに、8-12 週齢の B6-Ly5.1 マウスより 50 個の HSCs と 500 個の HPCs をそれぞれ単離し B6-Ly5.1/5.2 マウスの骨髄細胞 2×10^5 個とともに、致死量放射線を照射した B6-Ly5.2 マウスに経静脈的に骨髄移植を行った。造血幹細胞活性を評価するため、一次移植マウスにおける移植後 16 週以上の造血維持と、二次移植マウスでのドナー造血の再構築を 2 つの基準とした。前者は長期骨髄再建能の評価とし経時的に末梢血を採取しその末梢血中の白血球分画およびドナーキメリズムを解析した。また、後者は自己複製能の評価とし、二次移植後のレシピエントマウス内でも同様に多分化能を維持できるかを評価した。これらの細胞の移植を行ったところ、HSCs を移植した群では T リンパ球 (CD4 および CD8 陽性と定義)、B 細胞 (B220 陽性と定義)、骨髄球系細胞 (Gr-1/Mac1 陽性と定義) の 3 系統の血液細胞系譜の造血が一次移植マウスおよび二次移植マウスいずれにおいても確認された (図 3、HSCs、Fresh)。一方、HPCs の移植を行った群においては一次移植マウスにおいては経時的にそのキメリズムは低下し、短期的な骨髄再建能のみを認めた。さらに、二次移植を行うともはや HPCs 由来のドナー細胞を認めることができなかった (図 3、HPCs、Fresh)。次に、HSCs を増幅させうる短期的な培養法によって、HPCs も同様に増幅し骨髄再建能および自己複製能を獲得しうるかを確認するため、HSCs および HPCs を 7 日間 SCF および TPO 存在下で無血清培養を行った後、先述した方法と同様に致死量放射線照射

マウスに移植を行った。その結果、培養した HSCs 移植群においては長期的骨髄再建能が確認でき、そのキメリズムは採取直後の新鮮な HSCs を移植した群と比べて高いことが示された (図 3、HSCs、Expanded)。一方、培養 HPCs 移植群においては新鮮な HPCs を移植した群と同様に 3 系統の血液細胞系譜のキメリズムは一次移植マウスにおいては経時的に低下し、二次移植マウスにおいてはドナー細胞の造血を認められなかった (図 3、HPCs、Expanded)。このことから、既報と同様に HPCs はレシピエントマウス体内において長期骨髄再建能や自己複製能を有さないこと、さらに培養による HSCs の増幅培養系を用いても HPCs ではこれらの能力は獲得できないことが証明された。この結果をもって私は、HSCs への若返りをさせるソース細胞として、自己複製能や長期骨髄再構築能を持たない HPCs を選択した。

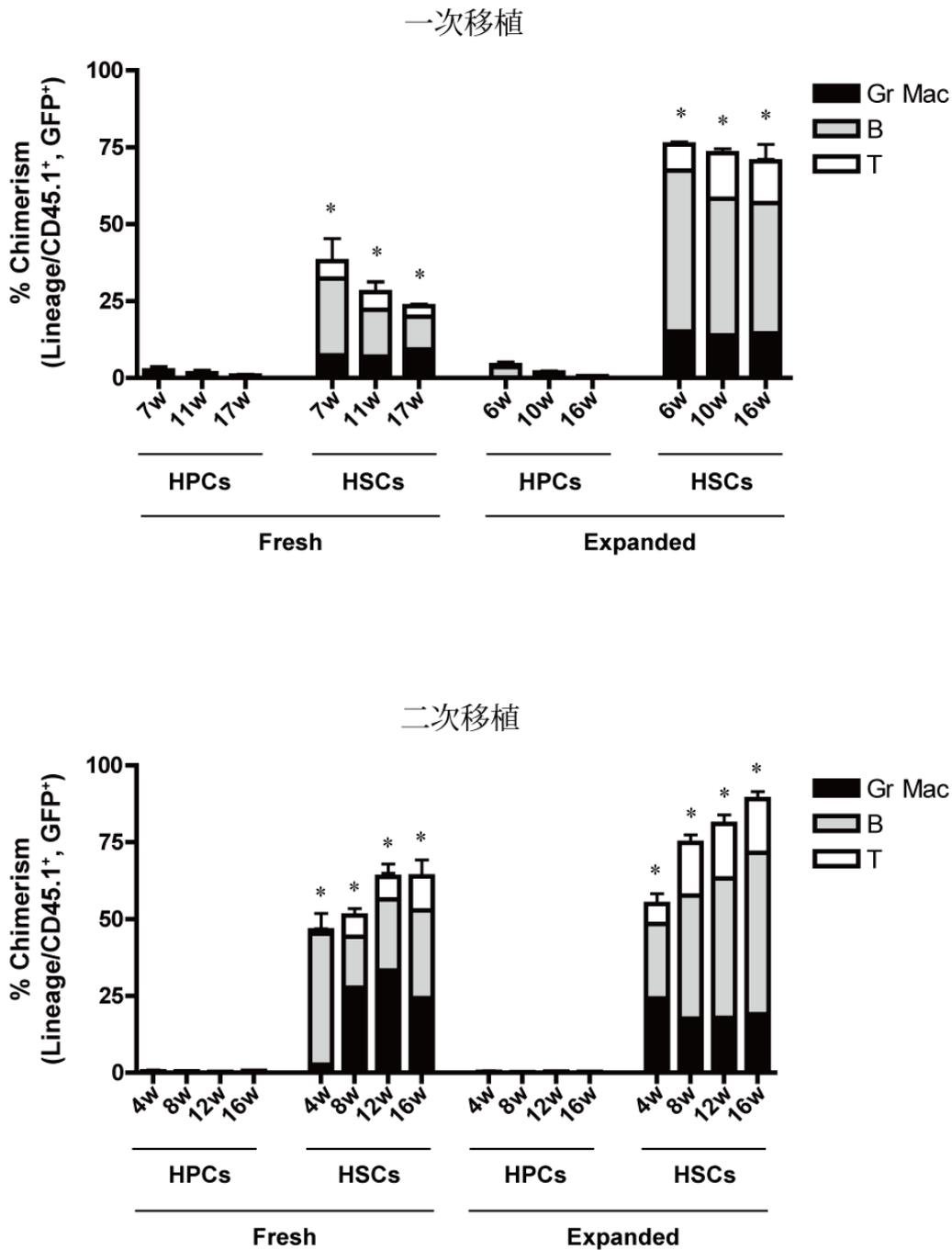


図 3. HSCs および HPCs の多分化能および骨髄再構築能の評価

採取直後(Fresh)および培養による培養増幅後 (Expanded)のHSCsおよびHPCsの機能評価のため、一次移植 (上段)および二次移植 (下段)における経時的なキメリズムの評価を行った (n=2~6)。エラーバーは平均値±標準誤差で示している。同条件下での移植において、同じ週数のキメリズムをHSCsおよびHPCs群で比較した。*p<0.05

5-2. HSCs を誘導する候補遺伝子の選択

次に私は、HPCs から HSCs を誘導すべく造血幹細胞の未分化性の維持にかかわる遺伝子をスクリーニングした。これまでに Deneault らは、HSC 活性に強く関与する遺伝子を 18 個報告した³²。ここで報告された遺伝子は、CD150⁺CD48⁻Lin⁻の分画に存在する HSCs にレトロウイルスベクターで遺伝子導入することによって移植後にキメリズムを上昇させることから、造血能の強化に有利に働く因子として同定された。また、Sung らは各血液細胞系譜におけるマイクロアレイ解析を実施し、CD34⁺KSL 分画の HSCs に特異的に発現し、CD34⁺KSL 分画の HPCs において発現が低下している遺伝子を網羅的に解析した³⁸。一方、野田らは、培養系において増幅された CD48⁺KSL 分画で定義された HSCs と生着能を持たない CD48⁺KSL に発現している遺伝子を比較し、stemness 活性に寄与する遺伝子群を評価した³⁹。これらの報告で示されている HSCs のフローサイトメトリーにおける分画はそれぞれ異なるが、いずれの細胞分画においても高い発現を維持している遺伝子があれば、それらが造血幹細胞活性の維持に重要である可能性が考えられる。以上の報告を基に、既報のデータにおいてオーバーラップしている遺伝子を用いることで、幹細胞活性を有さない HPCs が自己複製能を獲得しうる、と仮説を立てた。最終的に *Hes1*, *Klf10*, *HoxA9*, *FosB*, *Runx1*, *PU.1*, *Hdac1*, *HoxB4* の 8 つの遺伝子を抽出し HSCs を誘導するための候補遺伝子とし

た (図 4)。

A. Stemness activity

- Affects hematopoietic stem cell activity

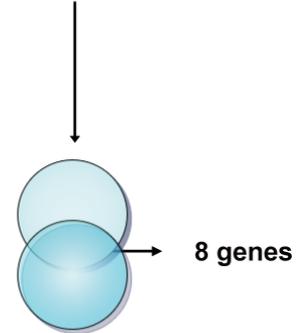
→*Egr1, Gata2, PU.1, Meis1, Myb, HoxA9, Runx1, Hdac1, Fos, Ski, Sox4, Klf10, Trim27, Prdm16, Erdr1, Smarcc1, Vps72...*
(Deneault et al., Cell, 2009)

B. Microarray analysis

- Exclusively expressed in hematopoietic stem cells

a. $CD34^{\cdot}KSL > CD34^{+}KSL > KL Sca-1^{\cdot} > Granulocytes$
(Sung et al., Nature Genetics, 2006)

b. Ex vivo expansion of HSC:
 $CD34^{\cdot}KSL \geq CD48^{\cdot}KSL > CD48^{+}KSL$
(Noda et al. stem cells, 2008)



→*Hes1, Klf10, HoxA9, FosB, Runx1, PU.1, Hdac1, HoxB4*

図 4. HSCs 誘導のための候補遺伝子の抽出

既報をもとに幹細胞活性を増強する遺伝子および HPC 分画に比して HSC 分画で発現量が高い遺伝子と HSCs の培養で発現が高くなる遺伝子に着目し、*Hes1*、*Klf10*、*HoxA9*、*FosB*、*Runx1*、*PU.1*、*Hdac1*、*HoxB4* を選択した。

5-3. 候補遺伝子を導入した HPCs の機能解析

候補遺伝子の機能解析を行うため、まずは HPCs への遺伝子導入を行った。遺伝子導入のマーカースとして、レトロウイルスベクターの IRES 配列下に EGFP を結合させ、EGFP の発現を基に目的遺伝子の導入及び発現を確認した (図 5A)。B6-Ly5.1 由来の HSCs および HPCs は、レトロネクチンをコートした 96 穴プレートに播種後 1 日間培養を行った (day0)。翌日に各候補遺伝子それぞれのウイルス溶液を MOI 500 となるように個別に培地に加え、24 時間静置した (day1)。さらに翌日に、培地交換を行ってウイルス上清を回収したのち 2 日間静置させた。培養開始後 4 日目に、先述した方法と同様の手技で競合細胞を加えてレシピエントマウスに移植を行った (図 5B)。レトロウイルスの導入効率は EGFP の陽性率で評価を行い、HSCs および HPCs でいずれも 90%以上の遺伝子導入効率を確認した (図 5C)。コントロールとして EGFP 遺伝子導入 HSCs (EGFP-HSCs) 移植群と EGFP 遺伝子導入 HPCs (EGFP-HPCs) 移植群を用いた。

遺伝子導入を行ったドナー細胞のキメリズムの評価として、EGFP/Ly5.1 共陽性の細胞を経時的に評価した (n=5)。移植後 16 週の時点において、候補遺伝子導入によって、*HoxB4* 遺伝子導入 HPCs (*HoxB4*-HPCs) 移植群および *HoxA9* 遺伝子導入 HPCs (*HoxA9*-HPCs) 移植群でドナー細胞の再構築を認めた。またそのドナーキメリズムは HSCs 移植群では 27.0%±10.5%であったのに対し *HoxB4*-

HPCs 移植群では 6.36%±4.53%、*HoxA9*-HPCs 移植群では 4.07%±2.12%といずれも HSCs 移植群と比べて低値であった (図 6A)。*HoxB4*-HPCs および *HoxA9*-HPCs は移植後 12 週まで経時的にそのキメリズムは低下したが、移植後 12 週と 16 週とでは大きな差は認められなかった。また、*Hes1*、*Klf10*、*FosB*、*Runx1*、*PU.1* もしくは *Hdac1* の遺伝子導入を行った群では有意なドナーキメリズムを維持することはできず骨髄再構築は認められなかった (図 6B)。また、その多分化能を評価するために、移植後 16 週目のキメリズムを血液細胞系譜毎に評価を行ったところ、*HoxA9*-HPCs 移植群では骨髄球系の再構築が優位であったのに対し、*HoxB4*-HPCs 移植群では骨髄球系および B 細胞系のドナーキメリズムが比較的優位であったが、そのキメリズムには移植を行った個体で大きく偏りが認められた (図 6C、図 7)。このことから、個体差はあるものの *HoxB4*-HPCs 群および *HoxA9*-HPC 群いずれにおいても長期的に 3 系統の血液細胞系譜の再構築を確認することができた。また、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った *HoxA9* 及び *HoxB4* の発現を確認するために、RT-PCR を用いて遺伝子導入後の HPCs を用いて解析をし、その遺伝子の発現を確認することができた (図 6D)。

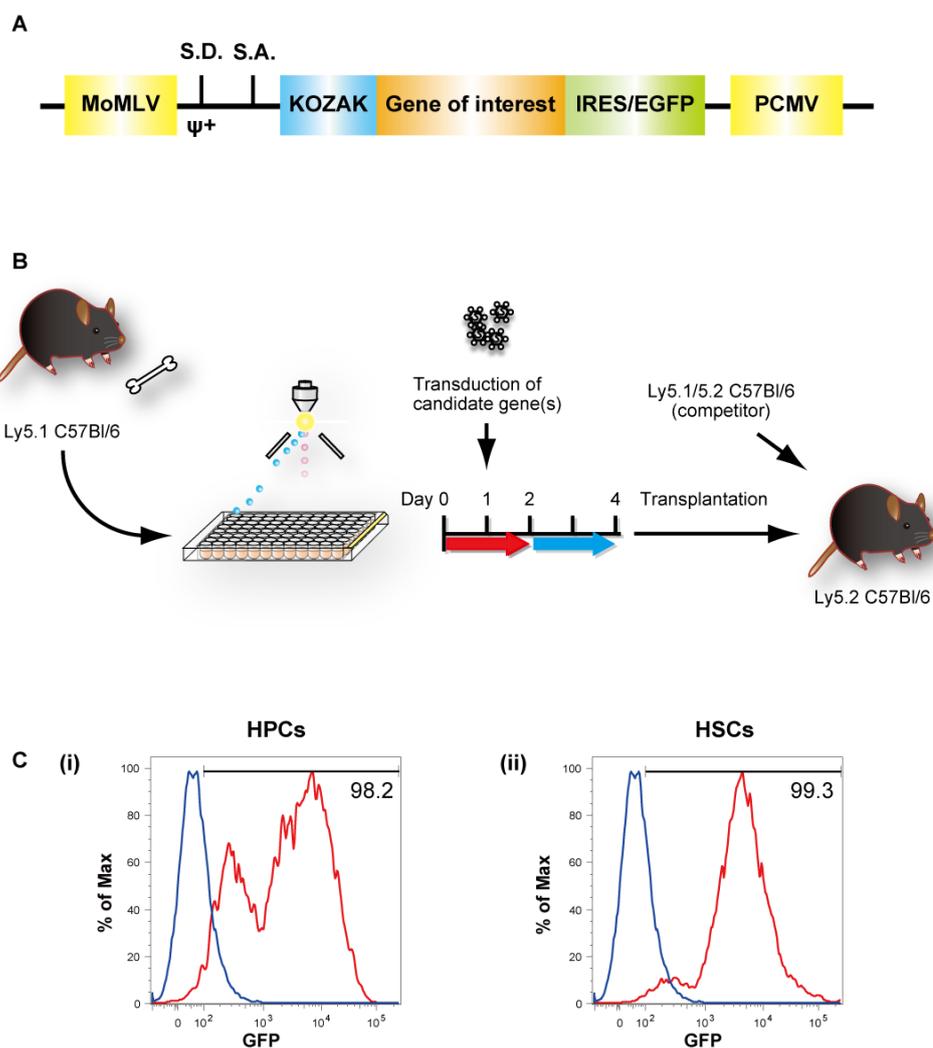


図 5. HPCs への候補遺伝子の導入

(A) レトロウイルスベクターの構造。KOZAK 配列の下流の候補遺伝子を組み込み、IRES 配列の下流に EGFP を発現するように作成した。MoMLV, Moloney murine leukemia virus LTR; PCMV, PCC4 cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus LTR; $\psi+$, packaging signal; S.D., splice donor; S.A., splice acceptor; IRES, internal ribosome entry site. (B) HPCs への遺伝子の導入。Ly5.1 B6 マウスより採取した HPCs および HSCs を 96 穴プレートに播種後、day1 にレトロウイルスベクターの感染を行った。day2 にウイルス上清を回収後 2 日間静置し、day4 に回収後、Ly5.2 B6 マウスに競合細胞とともに移植を行った。(C) ウイルス導入効率の評価。HPCs(i)および HSCs(ii)への遺伝子導入効率を示す。いずれも 98%以上の効率で遺伝子導入が確認できた。Red; EGFP, Blue; 非感染細胞

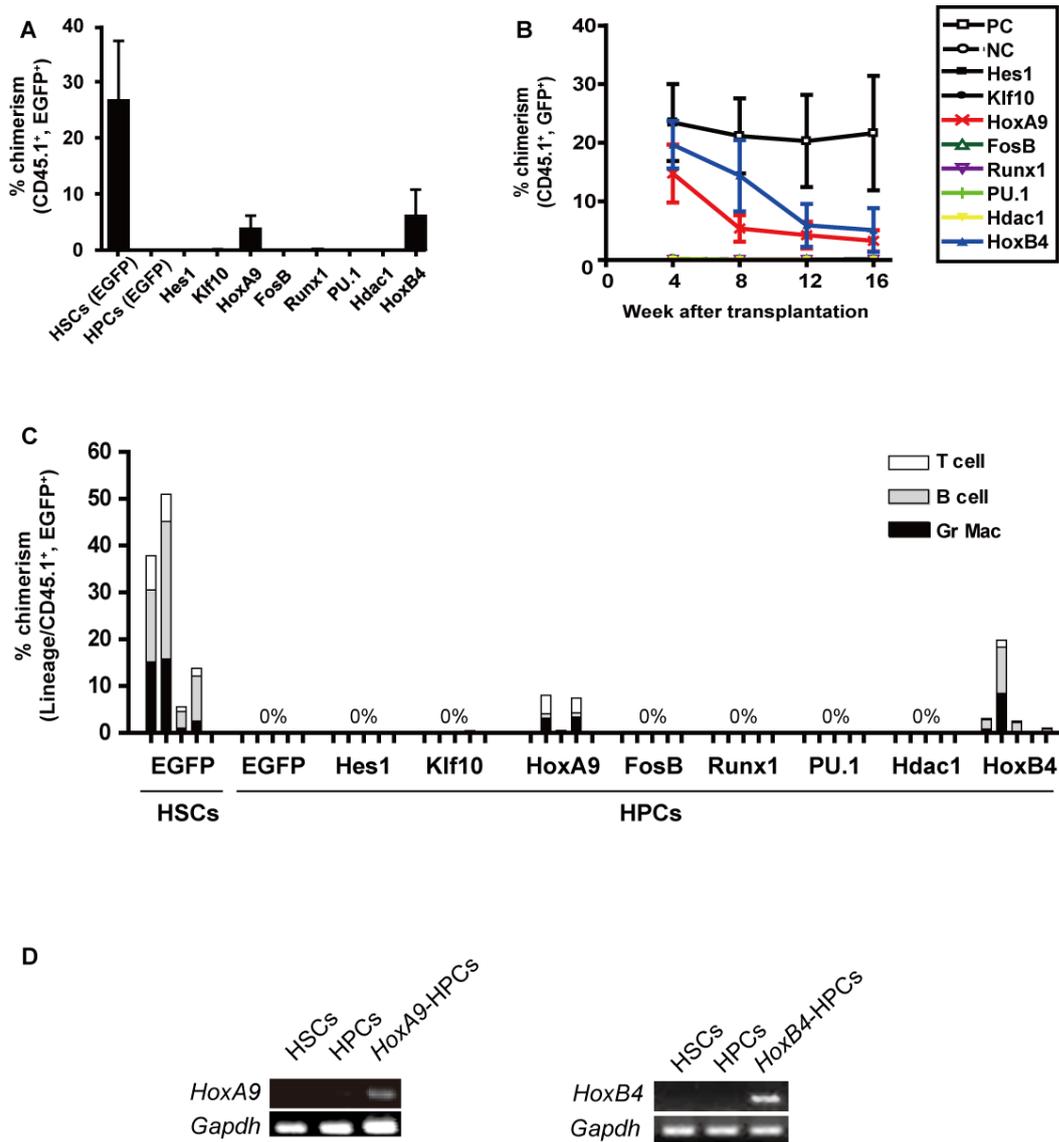


図 6. 候補遺伝子を導入した HPCs の機能評価

(A) 移植後 16 週後のドナーキメリズムの評価。エラーバーは平均値±標準誤差を示す。(B) 移植後のキメリズムの経時的評価。PC は EGFP-HSCs 群を、NC は EGFP-HPCs 群を示す。エラーバーは平均値±標準誤差を示す。(C) 各個体における移植後 16 週のキメリズムの評価。キメリズムは T 細胞、B 細胞、骨髄球系細胞毎に示しており、積み上げグラフで示す (n=5)。(D) Gapdh を転写産物の内部標準とした半定量的 RT-PCR による導入遺伝子の発現解析を行った。

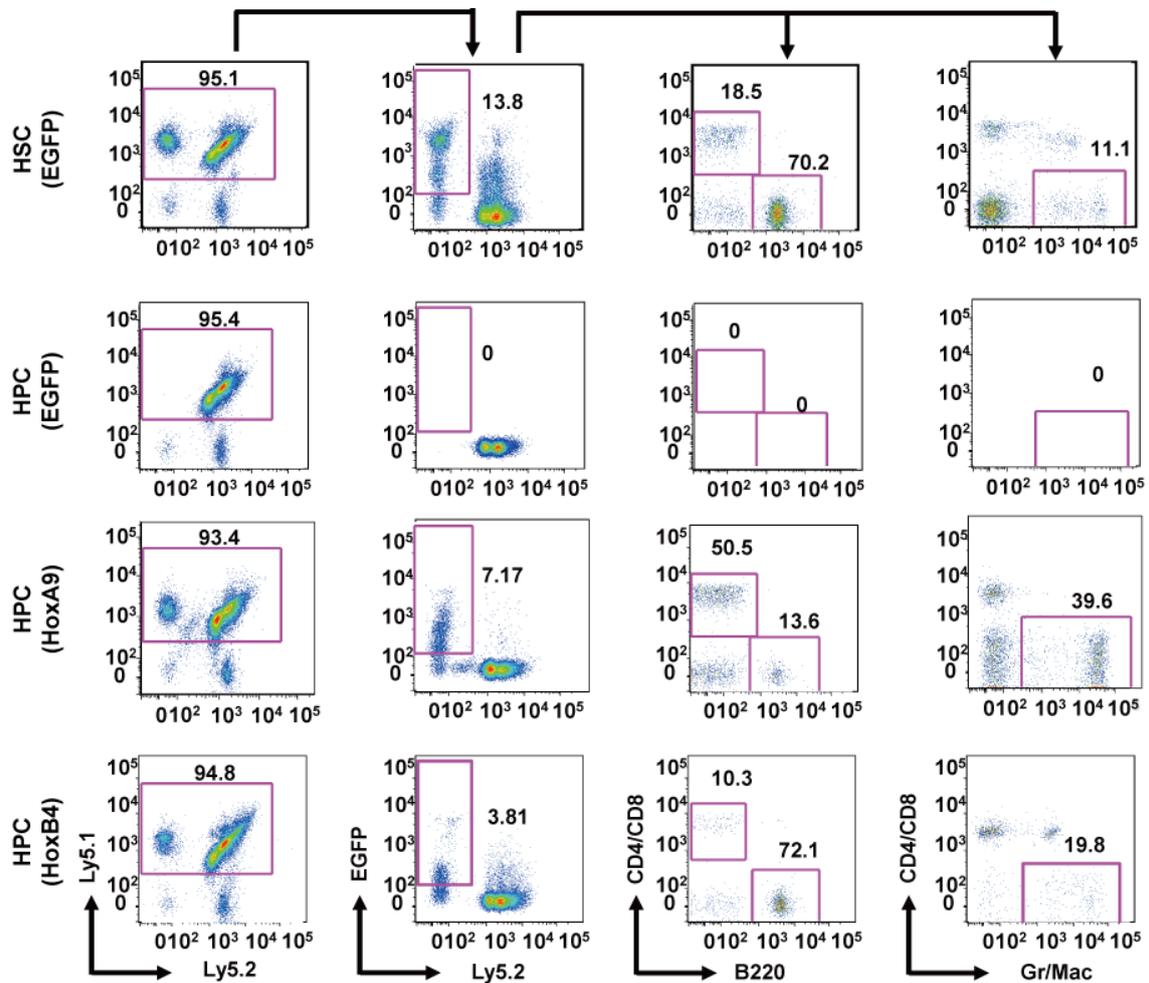


図 7. 候補遺伝子を導入した HPCs の 16 週後のフローサイトメトリー解析
 移植後 16 週経過した一次移植マウスの末梢血を用いて骨髄再建能を評価した。
 CD4/CD8 は T 細胞系、B220 は B 細胞系、Gr/Mac は骨髄球系の細胞を示す。

5-4. 導入遺伝子による腫瘍原性の評価

これまでの報告で *HoxB4* や *HoxA9* 遺伝子の強制発現で造血幹細胞活性が増強されることは知られているが、*Hox* 遺伝子と *Pbx1* や *Meis1*, もしくは *NUP98* 遺伝子との融合で造血器腫瘍の発生のリスクが上がることも知られている^{33, 40-42}。そのため、*HoxB4* および *HoxA9* の遺伝子導入による腫瘍原性の有無の評価は同システムの臨床応用において必要不可欠である。そこで次に、腫瘍原性の有無を評価するため *HoxB4*-HPCs 移植群および *HoxA9*-HPCs 移植群および各コントロール移植群において全血算測定と骨髄及び脾臓の組織学的評価を行った。その結果、骨髄細胞数、末梢血白血球数、赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリットおよび血小板数は、EGFP-HSCs 移植群と比べて各遺伝子を導入した HPCs 群ではほぼ同等であり統計学的有意差は認められなかった (図 8)。また、*HoxB4*-HPCs 移植群及び *HoxA9*-HPCs 移植群の移植後 16 週以降経過したレシピエントマウスを用いて造血器の組織学的評価を行ったところ、脾臓に明らかな脾腫は認めずまたその組織学的構造に大きな変化は認められなかった。同様に骨髄の評価においては、*HoxA9*-HPCs 群では肉眼的に巨核球の増多が目立ったが、その組織学的構造に大きな変化はなかった (図 9A, B)。先に行った骨髄細胞数や末梢血の全血算測定の評価等からも明らかな腫瘍性を疑う所見は認めなかったことから、*HoxB4*-HPCs および *HoxA9*-HPCs は一次移植レシピエントマウスにおいては明らかな腫瘍原性がないことが示唆された。

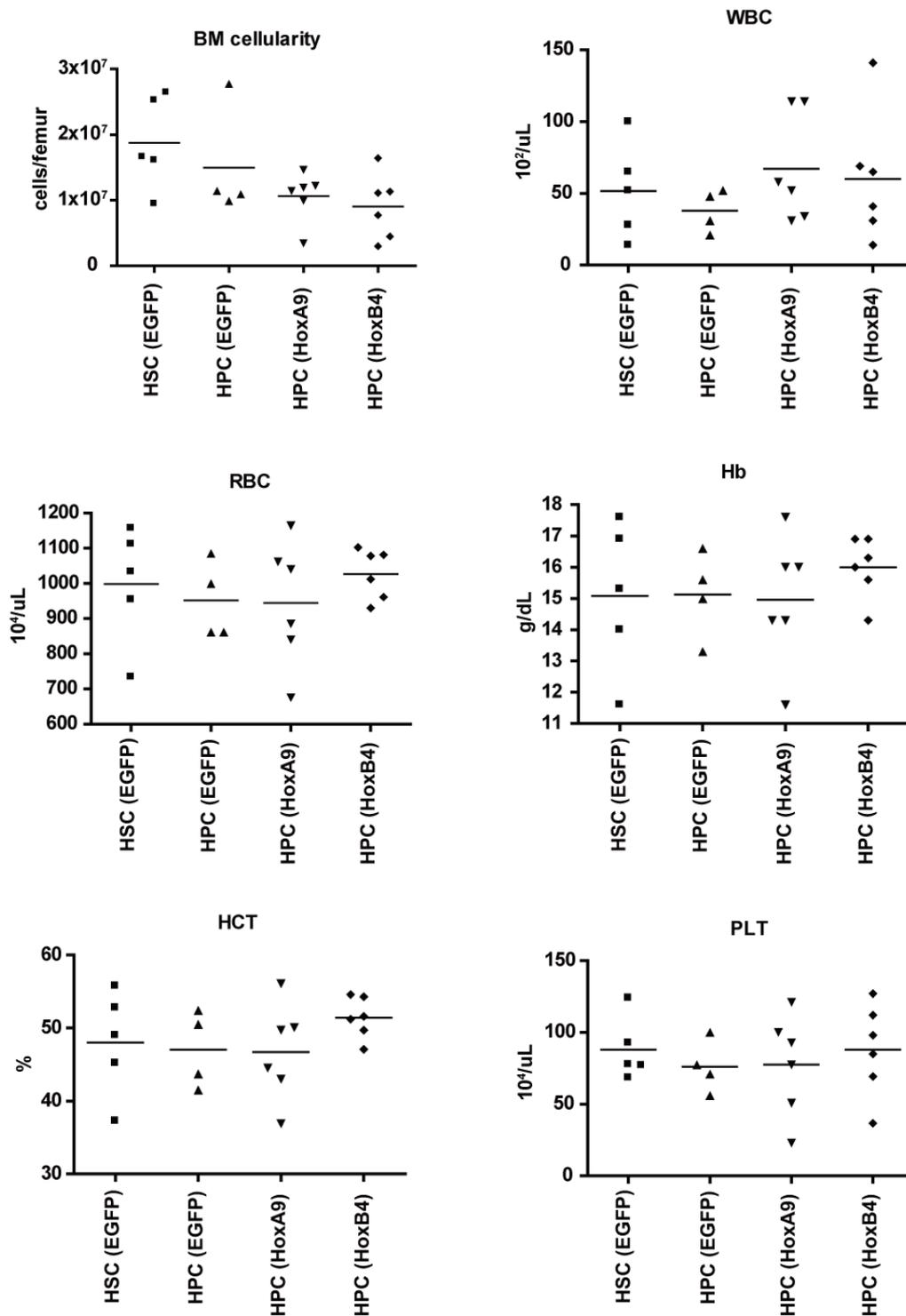


図 8. 候補遺伝子を導入した HPCs 移植マウスの 16 週後の全血算評価
 Bar は平均値を示す(n=4-6)。one-way ANOVA で解析を行い、各群において有意差は認めなかった。Bone marrow: BM, white blood cell: WBC, Red blood cell: RBC, Hemoglobin; Hb, Hematocrit: HCT, Platelet: PLT

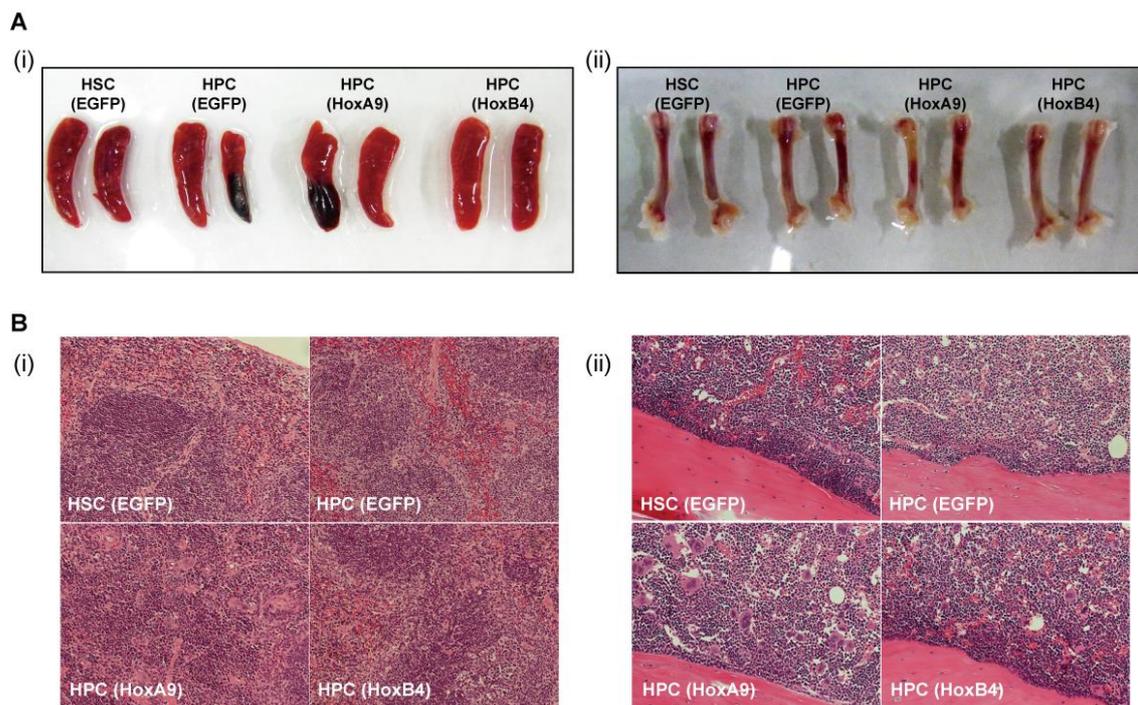


図 9. 移植後 16 週経過した一次移植マウスの造血組織における組織学的評価
 (A) 脾臓 (i)および大腿骨 (ii)の肉眼的評価。(B) 脾臓 (i)および大腿骨 (ii)の組織学的評価。各臓器は HE 染色を行った (倍率 x20)。

5-5. HPCs への *HoxB4* 遺伝子の導入による HSCs 表現型の獲得

これらの結果を基に私は *HoxB4* もしくは *HoxA9* の遺伝子導入によって HPCs が HSCs 様の機能を獲得したのではと仮定した。そこで次に、ドナー由来の細胞がレシピエントマウス骨髄中の HSCs 分画に存在するかどうかをフローサイトメトリーを用いて解析した。ドナー由来細胞が造血幹細胞としてレシピエント内に存在していれば、Ly5.1⁺EGFP⁺の細胞が CD34⁺KSL 分画に存在するはずである。実際 EGFP-HSCs 移植群においては同分画にドナー由来の細胞を認め [図 9, HSC (EGFP)]、EGFP-HPCs 移植群では同分画にドナー由来の細胞は認められなかった [図 10, HPC (EGFP)]。 *HoxA9*-HPCs 移植群においては CD34⁺KSL 分画に EGFP⁺のドナー由来の細胞を確認することができなかったが [図 10, HPC (HoxA9)]、驚くべきことに、 *HoxB4*-HPCs 移植群で 9 匹中 6 匹 (67%)で末梢血中にドナーキメリズムが確認でき、そのうち 4 匹 (67%)の個体において CD34⁺KSL 分画に EGFP⁺のドナー由来の細胞の存在を確認することができた [図 10, HPC (HoxB4), 表 1]。この結果から、 *HoxB4* の強制発現によって HPCs は HSCs と同等の表現型を獲得することが示された。先の実験とまとめると、 *HoxB4* 遺伝子の導入を行った HPCs は骨髄再建能を獲得するだけでなく、その表面マーカーの表現型も HSCs と同等になることが証明された。

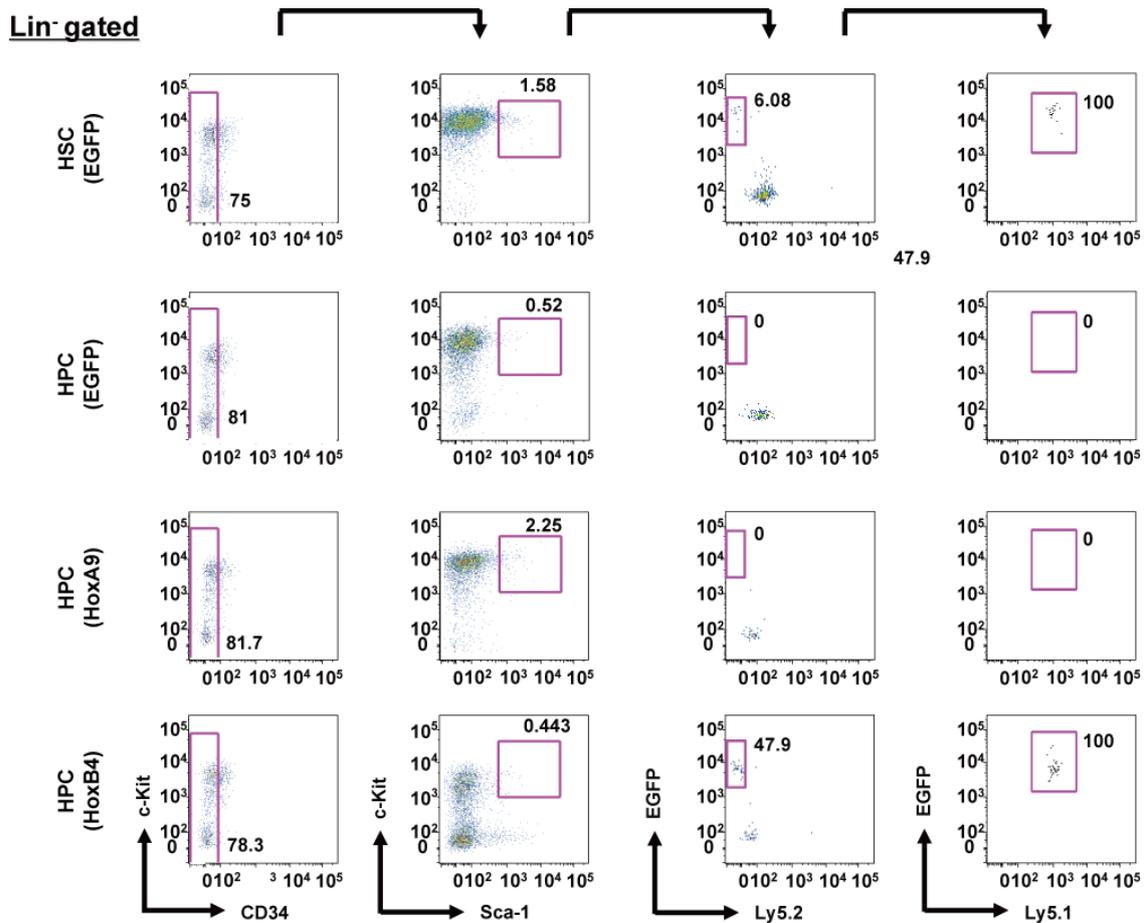


図 10. フローサイトメトリーによる HSCs 分画におけるドナー細胞の評価
 移植後 16 週経過した一次移植マウスの骨髄細胞から分化抗原 (Lineage)陰性分画からゲーティングし、CD34⁺KSL⁻分画における Ly5.1⁺/EGFP⁺細胞の存在を確認した。

5-6. *HoxB4*-HPCs の自己複製能獲得の証明

HoxB4-HPCs が HSCs と同等の幹細胞活性を獲得したかどうかを証明するためには、自己複製能の評価が必要不可欠である。しかしながら、移植後のレシピエントマウスにおいて EGFP⁺のドナー細胞は CD34⁺KSL 分画においてその絶対数が少ないことやソーティングによるストレスに伴いその移植効率が低下することから、同分画をソーティングして純化したのちに二次移植を行うのは困難と考えた。そこで次に、一次移植を行ったレシピエントマウスの全骨髄細胞を用いて、致死量放射線照射を行ったレシピエントマウスに二次移植を行った。二次移植を行うにあたり、*HoxB4*-HPCs もしくは *HoxA9*-HPCs を移植した一次移植マウスの末梢血中に EGFP⁺Ly5.1⁺細胞のキメリズムが 16 週以上持続的に 1%以上維持しているレシピエントマウスを選択し、一つの大腿骨を用いて 2 匹の二次レシピエントマウスに移植を行った。二次移植を行った 16 週後、予想通り EGFP-HSCs 二次移植群においては 3 系統の血液細胞系譜の再構築を 70% (7/10 匹)で認めたが、それに対して EGFP-HPCs 二次移植群ではドナー細胞を認めたマウスは 0%であった (0/8 匹、図 11, 12 および表 1)。驚くべきことに、*HoxB4*-HPCs 二次移植群においては 3 系統の血液細胞系譜の再構築は 58% (7/12 匹)で認め、その割合は EGFP-HSCs 二次移植群とほぼ同等であった。また、*HoxA9*-HPCs 二次移植群においてはドナー細胞の生着を認めることはできなかった (図 11, 12

および表 1)。ドナー細胞を末梢血で確認できた二次レシピエントマウスの骨髄を解析し HSC 分画にドナー細胞が存在するかを評価したところ、EFGP-HSCs 移植群と同様に *HoxB4*-HPCs 二次移植群においても HSC 分画に EGFP⁺Ly5.1⁺ のドナー細胞を十分量認めることができた (図 13)。さらに、二次移植において HSC 分画にドナー細胞が出現する確率を各移植群で評価したところ、*HoxB4*-HPCs 二次移植群の 33% (3/9 匹)において十分量のドナー細胞が CD34⁺KSL 分画に存在し、その割合は EFGP-HSCs 二次移植群と同等 (30%, 3/10 匹)であることが示された(表 1)。以上のことから、*HoxB4*-HPCs は長期骨髄再建能を有し、かつ自己複製能も獲得し二次レシピエントマウス体内においても CD34⁺KSL の表現型を維持することが示されたため、*HoxB4* 遺伝子を HPCs に遺伝子導入をすることによって、HPCs から HSCs と同等の細胞を誘導できるということが証明できた。

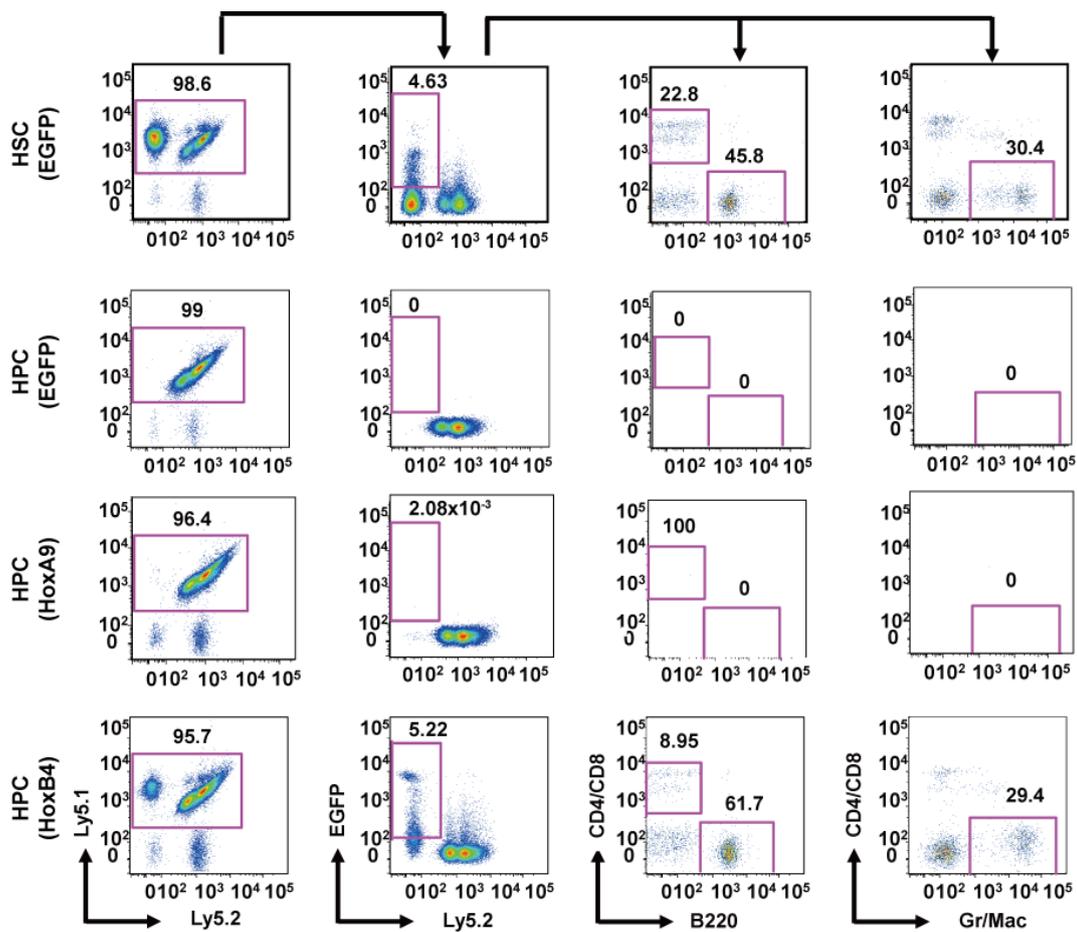


図 11. 候補遺伝子を導入した HPCs の 16 週後のフローサイトメトリー解析
 移植後 16 週経過した二次移植マウスの末梢血を用いて骨髄再建能を評価した。
 CD4/CD8 は T 細胞系、B220 は B 細胞系、Gr/Mac は骨髄球系の細胞を示す。

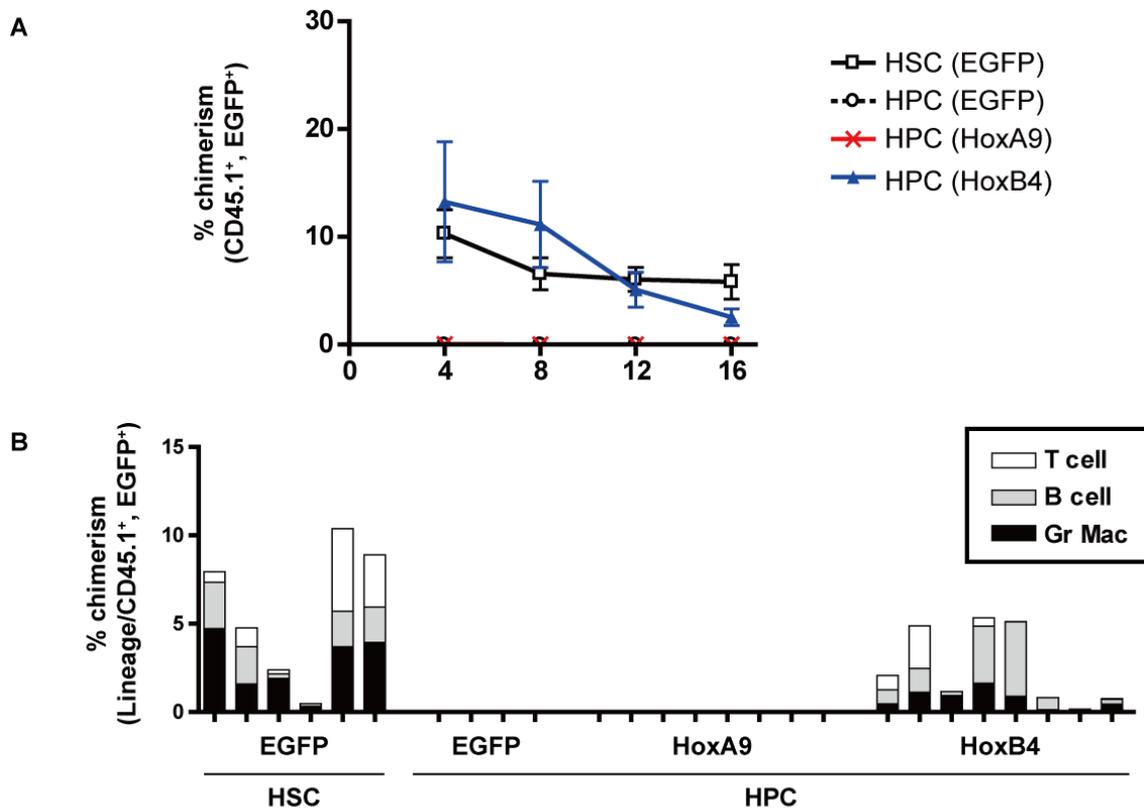


図 12. 候補遺伝子を導入した HPC 移植マウスの二次移植後の機能評価
 (A) 移植後のキメリズムの経時的評価。エラーバーは平均値±標準誤差を示す。
 (B) 各個体における移植後 16 週のキメリズムの評価。キメリズムは T 細胞、B 細胞、骨髄球系細胞毎に示しており、積み上げグラフで示す (n=4-8)。

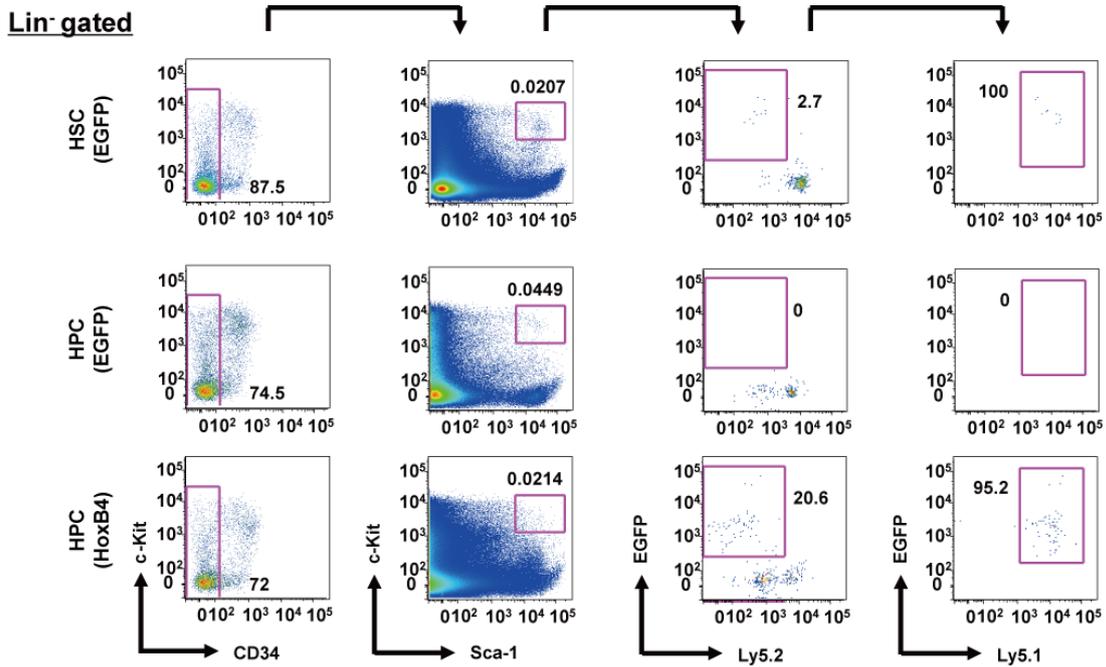


図 13. フローサイトメトリーによる HSCs 分画におけるドナー細胞の評価

二次移植レシピエントマウス骨髄中におけるドナー細胞の評価を行った。分化抗原 (Lineage) 陰性分画からゲーティングし、CD34-KSL 分画における Ly5.1⁺/EGFP⁺細胞の存在を確認した。HoxA9-HPCs 二次移植群では長期的な生存は得られず解析を行っていない。

	ドナー	末梢血キメリズム > 1%	HSC分画におけるドナー細胞の有無 (1×10^5 骨髄細胞中1個以上)
一次移植	HSC (EGFP)	100% (7/7)	100% (5/5)
	HPC (EGFP)	0% (0/8) ***	0% (0/6) **
	HPC (HoxA9)	44% (4/9) *	50% (3/6)
	HPC (HoxB4)	67% (6/9)	67% (4/6)
二次移植	HSC (EGFP)	70% (7/10)	30% (3/10)
	HPC (EGFP)	0% (0/8) **	0% (0/8)
	HPC (HoxA9)	8% (1/12) **	Not analyzed
	HPC (HoxB4)	58% (7/12)	33% (3/9)

表 1. 移植後の末梢血および骨髄キメリズム

HSC を対照群とし、Fisher の正確検定を行った。*: $P < 0.05$ 、**: $P < 0.01$ 、***: $P < 0.001$

5-7. 二次移植レシピエントマウスにおける腫瘍形成の評価

一次移植のみならず二次移植を行うことによって、自己複製の負荷がさらに強くなり腫瘍化のリスクが高まることが知られている。そこで次に、一次移植と同様に二次移植後において、HPCs への遺伝子導入に伴い腫瘍化を認めたかどうかを評価するため、全血算測定と骨髄及び脾臓の組織学的評価を行った。いずれの解析も二次移植後 16 週以上経過しかつドナーキメリズムが 1%以上で維持しているマウスを解析に用いた。その結果、骨髄細胞数、末梢血白血球数、赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリットおよび血小板数は、EGFP-HSCs 二次移植群と比べて *HoxB4*-HPCs ではほぼ同等であり統計学的有意差は認められなかった (図 14)。また、*HoxB4*-HPCs 二次移植群では一次移植マウスと同様に明らかな脾腫は認めず、またその組織学的構造に大きな変化は認められなかった (図 15A, 15B)。二次レシピエントマウスの骨髄の評価においては、*HoxB4*-HPCs 二次移植群では肉眼的および組織学的構造にも大きな変化はなく (図 15A, 15C)、先に行った血算の評価等からも明らかな腫瘍性を疑う所見は認めなかった。最終的に二次移植後 16 週間の観察期間の中で *HoxB4*-HPCs 二次移植群ではいずれの個体でも死亡することはなかった (図 16)。これらの結果から *HoxB4*-HPCs には二次移植後の強いストレス環境下においても明らかな腫瘍原性を認めず正常な造血を維持することが示唆された。これに対し、*HoxA9*-HPCs 二次移植群におい

では経時的にレシピエントマウスが死亡しドナーキメリズムを維持しながら長期的に生存したマウスを得ることができなかった (図 16)。死因については詳細な評価をすることはできなかったが、レトロウイルスベクターを用いたマウス骨髄細胞への *HoxA9* 遺伝子の強制発現系では、遺伝子導入から長期間経過したのちに白血病を発症することが報告されており、本解析においても二次移植後に *HoxA9*-HPCs が腫瘍化を認め死亡したと想定している⁴²。

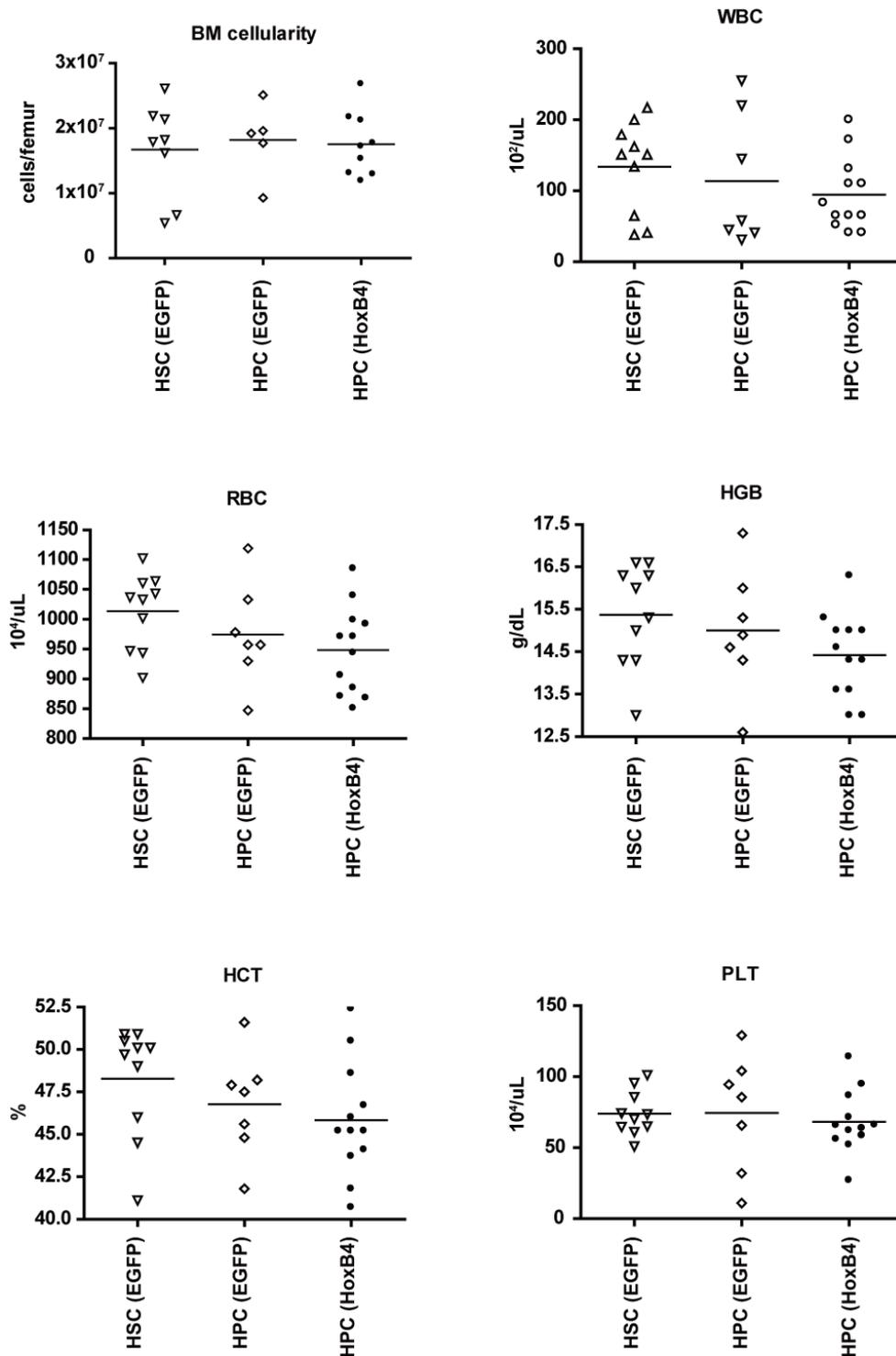


図 14. 候補遺伝子を導入した HPCs の二次移植 16 週後の全血算評価
 Bar は平均値を示す(n=7-12)。one-way ANOVA で解析を行い、各群において有意差は認めなかった。Bone marrow: BM, white blood cell: WBC, Red blood cell: RBC, Hemoglobin; Hb, Hematocrit: HCT, Platelet: PLT

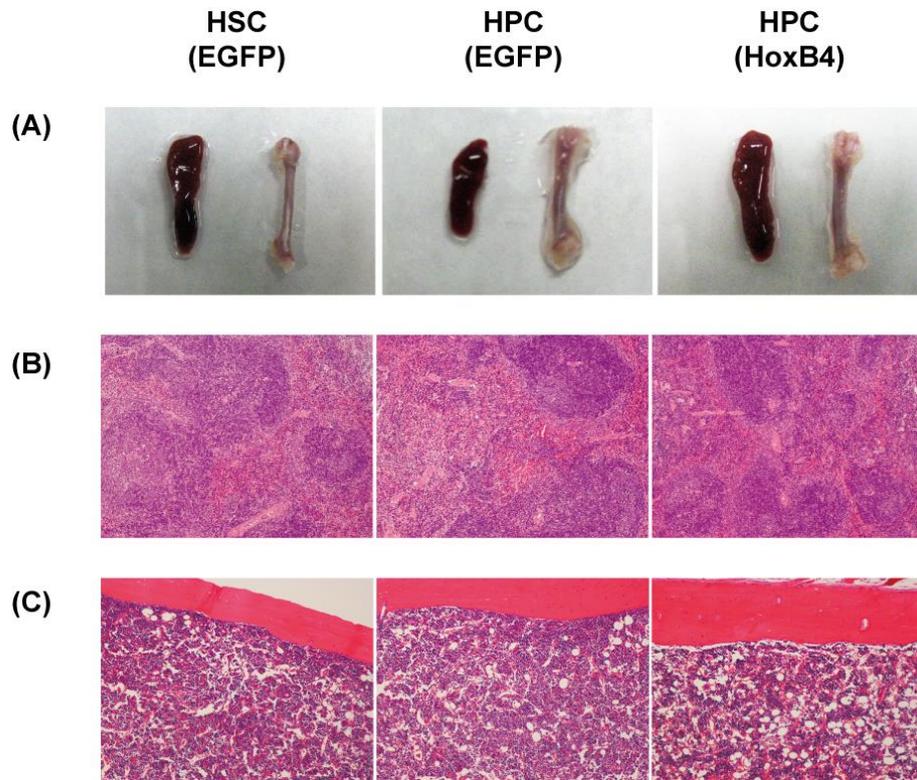


図 15. 移植後 16 週経過した二次移植マウスの造血組織における組織学的評価
 (A) 脾臓および大腿骨の肉眼的評価。(B) 脾臓の組織学的評価。(C) 大腿骨の組織学的評価。各臓器は HE 染色を行った (倍率 x20)。

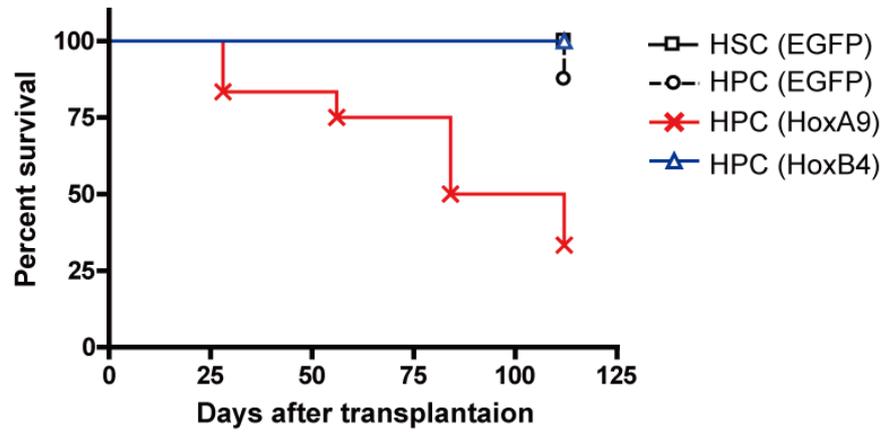
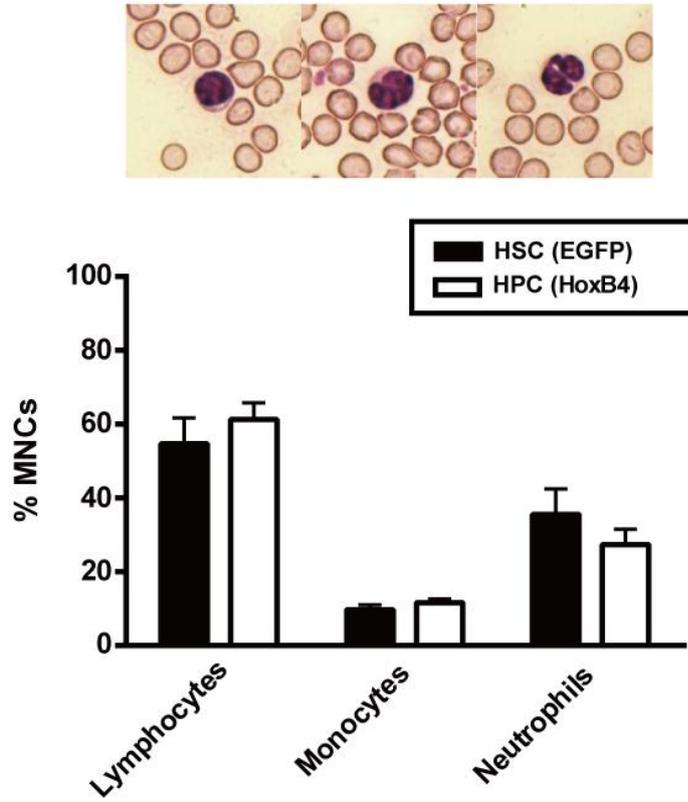


図 16. 候補遺伝子を導入した HPCs の二次移植後の生存曲線。Kaplan-Meier 曲線を用いて示した(n=8-12)。

5-8. *HoxB4* の強制発現と血液細胞の形態学的評価

以前に Cellot らは、*HoxB4* と *Pbx1* の共強制発現系によって分化抑制が出現することを示した⁴³。そのため、*HoxB4*-HPCs が骨髄もしくは末梢血中で芽球として維持し増加している可能性があった。そこで次に、*HoxB4*-HPCs 二次移植群の末梢血および骨髄を用いてギムザ染色を行い形態学的に評価を行った。その結果、*HoxB4*-HPCs 二次移植群において末梢血中に芽球の出現を認めることなく、成熟した血液細胞の異型性もみられなかった (図 17A, 写真)。また、3 系統に分化した正常造血の維持が観察され、その比率においても EGFP-HSCs コントロール群との間に大きな差を認めなかった [図 17A, ヒストグラム)。同様に骨髄標本を確認しても *HoxB4*-HPCs 二次移植群で明らかな芽球の増多は認めなかった(図 17B)。以上のことから、*HoxB4*-HPCs は二次レシピエントマウス体内でも形態学的に異形成を認めることなく、EGFP-HSCs と同等の造血能を有することが証明できた。

A



B

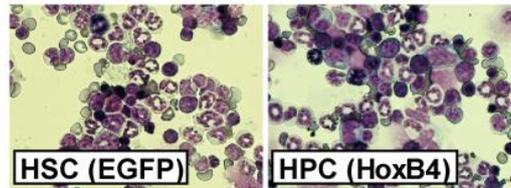


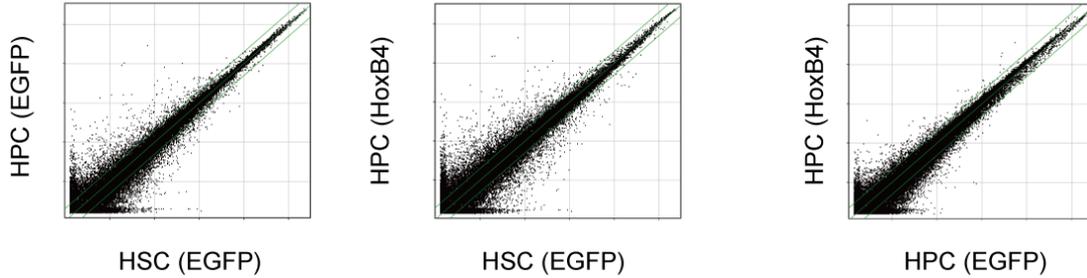
図 17. HoxB4-HPCs の二次移植 16 週後の末梢血の血液細胞の形態学的評価。(A)リンパ球、単球、好中球の正常な形態を示す (上段、倍率 x60)。末梢血中における HSC 群(n=6)と HoxB4-HPCs 群 (n=8)の平均値±標準誤差を示す。各群において有意差は認めなかった。Mononuclear cells: MNCs. (B) 骨髄細胞の塗抹標本像 (倍率 x40)。

5-9. *HoxB4*-HPCs の遺伝子発現パターンの解析

次に、HPCs に対する *HoxB4* 遺伝子導入によって生じる遺伝子の発現パターンの変化を評価するために、EGFP-HSCs、EGFP-HPCs および *HoxB4*-HPCs を用いてマイクロアレイ解析を行った。細胞は、遺伝子導入後 4 日目の移植前の条件と同様の細胞を用いた。HSCs と HPCs は分化段階としては近傍に位置することからその遺伝子発現パターンは類似することが想定され、実際にその発現パターンは非常によく似ていた (図 18A, 左)。このことから、ごくわずかな遺伝子の発現変化によって自己複製能が制御されていることが示唆された。そこで私は、EGFP-HSCs 及び *HoxB4*-HPCs で転写産物が確認できた遺伝子が共通して認められれば、その遺伝子及びその下流でのシグナルが幹細胞へのリプログラミングに重要で自己複製能の寄与に関与すると仮定した。そこでこれらの検体に共通する遺伝子発現の有無を評価したところ、30 の遺伝子で EGFP-HSCs 及び *HoxB4*-HPCs で共通して発現していることが分かった。これに対し、66 の遺伝子で EGFP-HSCs 及び *HoxB4*-HPCs で共通して発現量が低いことが分かった(図 18B)。予想に反して、すでに HSC 関連遺伝子と知られている *Gfi1*、*Evi1*、*Runx1*、*Tie2* などが共通して発現していることは確認できなかった。その理由としては、これらの遺伝子の機能は *HoxB4* とは必ずしも関連しないことは示唆される。本解析の信頼性を評価するため、公開されている遺伝子発現データバンク (Gene

Expression Commons, <https://gexc.riken.jp/>)のデータと比較しその整合性を評価した⁴⁴。興味深いことに、*Samd12*、*Cadps2*、*Lhcgr*、*Pkia*、*Clec1a*、*Ill7re* の6つの遺伝子で HPCs に比べて HSCs および *HoxB4*-HPCs において発現が高く、*F13b*、*Tdrd5*、*Gm7536*、*Tnfrsf17*、*A730091E23Rik*、*Abcc8* の6つの遺伝子で HPCs に比べて HSCs および *HoxB4*-HPCs で発現が低いことが、先の解析で得られた遺伝子群と共通するものとして抽出できた。これらの遺伝子と HSCs に関連する報告はほとんどないことから、*HoxB4* のシグナルの下流で HSCs を誘導しうる、またはその活性を増強する新規の候補遺伝子として期待ができる。今後はデータの蓄積を行うことでより詳細なそのシグナル経路や相互作用を評価し、HPCs における *HoxB4* の強制発現による幹細胞活性の獲得に対するそのメカニズムを評価していく予定である。

A



B

Expressed in EGFP-HSCs and <i>HoxB4</i> -HPCs	Not expressed in EGFP-HSCs and <i>HoxB4</i> -HPCs
<p><i>Crispld1</i>, <i>Tnfrsf11</i>, <u><i>Samd12</i></u>, <i>Sh3bgrl2</i>, <i>4930579K19Rik</i>, <i>Cellf5</i>, <u><i>Cadps2</i></u>, <i>Apln</i>, <i>D0H4S114</i>, <i>Acer2</i>, <i>1700003G18Rik</i>, <i>Erpp5</i>, <u><i>Lhcgr</i></u>, <i>Gm10638</i>, <i>2700008G24Rik</i>, <u><i>Pkia</i></u>, <i>Robo1</i>, <i>Trim6</i>, <i>Lax1</i>, <u><i>Clec1a</i></u>, <i>Cage1</i>, <i>Fmn2</i>, <i>Lax1</i>, <i>Kis2</i>, <u><i>I177e</i></u>, <i>Dmd</i>, <i>Flrt3</i>, <i>Gm9927</i>, <i>Zbtb10</i>, <i>Dnalc1</i></p>	<p><u><i>F13h</i></u>, <u><i>Tdrd5</i></u>, <i>Olf1533</i>, <i>Cyp27a1</i>, <i>Apcdd1</i>, <i>Vmn2r86</i>, <i>Vmn2r16</i>, <i>P2ry6</i>, <i>Btn1a1</i>, <i>Cd300lh</i>, <i>Fpr2</i>, <i>Tmco1</i>, <i>Chrne</i>, <i>Mamstr</i>, <i>Shroom2</i>, <i>Ngp</i>, <i>Bicc1</i>, <i>Omg</i>, <i>Lep</i>, <i>Mmp9</i>, <u><i>Gm7536</i></u>, <i>Flrt1</i>, <i>Olf1878</i>, <i>A630012P03Rik</i>, <i>Grm6</i>, <i>Ugt2b34</i>, <i>1700126A01Rik</i>, <i>Fgf7</i>, <i>Tmc1</i>, <i>I13ra1</i>, <i>Mogat2</i>, <i>Angptl1</i>, <i>F3</i>, <i>Daam2</i>, <u><i>Tnfrsf17</i></u>, <i>B230334C09Rik</i>, <i>AY074887</i>, <i>Gcg</i>, <i>Gm6846</i>, <i>Olf1967</i>, <i>Olf1339</i>, <i>A030010E16Rik</i>, <i>Gsg1</i>, <i>BC057022</i>, <i>Bhlhe41</i>, <i>Amica1</i>, <i>Cstad</i>, <i>Olf1153</i>, <i>Sele</i>, <i>2310001K24Rik</i>, <i>Rnf43</i>, <i>P2ry6</i>, <i>Rtn4r11</i>, <u><i>A730091E23Rik</i></u>, <i>5730405A17Rik</i>, <i>Lrrc4b</i>, <i>2810030D12Rik</i>, <i>Heph</i>, <u><i>Abcc8</i></u>, <i>Olf11396</i>, <i>2700089I24Rik</i>, <i>Gdf9</i>, <i>B430306N03Rik</i>, <i>AU020951</i>, <i>Cmya5</i>, <i>Kynu</i></p>

図 18. HSCs, HPCs および *HoxB4*-HPCs の遺伝子発現比較

(A) 各群間における遺伝子発現の比較を scatter plot で示す。(B) 発現量が 2 倍以上異なる遺伝子を抽出し、HSCs および *HoxB4*-HSCs で共通して発現量が高いものもしくは低いものを抽出した。本解析で得られた候補遺伝子に対して公開されている遺伝子発現データベース (Gene Expression Commons, <https://gexc.riken.jp/>) のデータと比較し、共通する遺伝子を下線で示した。

5. 考察

本研究では、自己複製能を持たないマウス HPCs に特定の遺伝子の導入を行うことによって自己複製能を有する機能的な HSCs の誘導を試みた。その結果、本研究では HPCs に *HoxB4* 遺伝子の導入を行うことで HSCs と同等の機能および表現型を有する細胞の誘導に成功した。未分化な多能性幹細胞である ES 細胞や iPS 細胞からではなく、HSCs より分化した前駆細胞から脱分化をさせることで生理的な HSCs を誘導し得た点が本研究の大きな特徴である。

今回の強制発現系によって HPCs から HSCs への”若返り”をきたしうる遺伝子のスクリーニングにおいて、既報の造血活性を増強させうる遺伝子を候補としてまず選択した³²。これらの遺伝子を用いることでいずれの遺伝子においても一定期間の骨髄再建能は獲得できる可能性を考えていたが、予想に反して、造血発生に寄与し HSC の自己複製能を増強させると報告されている *Runx1* や *PU.1* などの転写因子の強制発現では十分な効果が得られなかった⁴⁵。加えて、造血前駆細胞を不死化させ慢性骨髄性白血病において芽球転化を起こしうるとされる *Hes1* の強制発現においても HPCs において自己複製能を獲得させることはできなかった⁴⁶。*HoxB4* および *HoxA9* の 2 つの遺伝子の強制発現系においては骨髄再建能が認められたが、*HoxA9* の強制発現系では二次移植でドナーキメラリズムの維持は困難であり、自己複製能の獲得には至らなかった。最終的には、*HoxB4*

の遺伝子導入によってのみ HPCs に自己複製能を獲得させつつ、腫瘍原性を認めることなく正常な造血を維持させることが可能となった。

HoxB4 はホメオボックスファミリーの転写因子の一つであり、HSCs への強制発現によってその自己複製能が増強することが知られている^{32,33}。また、*HoxB4* の強制発現によって原始的な造血前駆細胞や多能性幹細胞から生着可能な HSCs を誘導できることも報告されている^{17,29,47}。これらの知見は、ヒト造血幹/前駆細胞を用いた解析においても同様に認められており、またヒト *HOXB4* 遺伝子のヒト ES 細胞への導入によっても同様に造血細胞の誘導が示されていることから、同遺伝子の造血機能に与える機能は種を超えて保存されていると考えられている⁴⁸⁻⁵⁰。先行研究によって *HoxB4* は HSCs の維持や誘導に必須な因子として考えられたが、分化の進んだ前駆細胞における *HoxB4* の効果というのはこれまでに報告はない。また、多能性幹細胞に *HoxB4* を強制発現することによって誘導される生着可能な HSCs は、その分化の過程で骨髄球系に偏向していることが示されているため、アンバランスな造血であり生理的な HSCs とは似て非なるものであった⁵¹。今回私が行った解析では、個体差はあるものの *HoxB4* の強制発現によって明らかな分化方向の偏りは認められなかった。加えて、これまでの先行研究において HSCs の誘導でドナー由来の細胞がレシピエント骨髄中の HSC 分画に存在することを示したものは多くはない。本研究では、これら

を示すことでより真に HSCs を誘導し得たと評価ができる。今回私は 1)多分化能、2)自己複製能、3)表現型、そして 4)腫瘍原性を評価することで HPCs からの HSCs の誘導を証明した。その表現型や生着率は EGFP-HSCs とほぼ同等であり、また腫瘍原性も認めなかった。既報との結果を統合すると、*HoxB4* は HSCs の自己複製能を増幅させるだけでなく、多能性幹細胞や HPCs などから両方向に HSCs を誘導しうる大きな役割を持つことが強く示唆される (図 19)。これらのことから、本手法が生理的な機能を有する HSCs を安全に誘導しうる方法として、今後臨床に応用できる可能性があるかと期待できる。

以前に Akala らは、*Bmi1* の標的遺伝子である *p16Ink4a/p19Arf* と *Trp53* のトリプルノックアウトによって HPCs から長期の骨髄再建能を獲得したことを報告したが、その表現型が HSCs と同等であるという事は示されなかった⁵²。一方、He らは胎生 HSCs において発現を認める *Sox17* の強制発現によって多能性前駆細胞が自己複製能を獲得したことを報告したが、その表現型としては胎児 HSCs から再構築された血液細胞系譜と同様のパターンを示し、成体内の HSCs とは異なっていた。また、分化傾向としては赤芽球系優位でリンパ球数の少ない造血パターンを示し、最終的には白血病化をきたしてしまうことも示された⁵³。Riddel らは *Runt1t1*、*Hlf*、*Lmo2*、*Prdm5*、*Pbx1*、*Zfp37* の 6 遺伝子を共通骨髄球系前駆細胞に導入することによって HSCs を誘導することが可能であるということを示した。

報告した。更に、*Mycn* や *Meis1* などの遺伝子を 6 遺伝子に加えて導入することによってそのリプログラミングの効率が増すことも示した³⁰。同研究において誘導し得た HSCs はその表現型や多分化能、自己複製能、遺伝子発現パターンも HSCs と同様であったため、これまでで最も生理的な HSCs に近い細胞が誘導できたと考えられ、その成果は画期的であった。一方、同研究成果では導入遺伝子の数の多さが実際に臨床応用を検討するにあたり大きな課題と考える³⁰。また、HSCs の増幅や他の細胞からの誘導において臨床応用するにあたり除外すべきリスクは誘導細胞の腫瘍化である。今回の私のシステムにおいては、*HoxB4* の強制発現系であるものの、一遺伝子の導入という簡便なシステムによって二次移植も含めた長期の観察期間の中で腫瘍化した個体は認められなかった。この結果を踏まえ、本研究は造血細胞移植において不足するドナーを安全に補ううる、臨床応用に結び付く技術となる可能性があると考えるが、導入遺伝子の発現持続の必要性や、挿入変異による安全性の担保など、検討すべき課題は残されている。将来的には *self inactivating* ベクター、発現調節が可能なウイルスベクターや、タンパク導入などを用いることによってより安全なシステムを構築することが必要である。

また今後の解析として、他の分化細胞においても同様に *HoxB4* の強制発現によって HSC 様の機能および表現型を獲得しうるのかどうかを検討課題である。

予備実験ではあるが、骨髄球系の細胞すべてに分化しうる共通骨髄系前駆細胞に同様に *HoxB4* の強制発現を行うと、中期的な骨髄再建能が維持されるというデータが得られている。しかしながら共通前駆細胞に HSCs と同様の長期的な骨髄再建能を獲得させるためには、*HoxB4* の強制発現のみでは不十分であり、例えば *c/EBP α* のような additional factor を必要とし、既報と同様に複数遺伝子の導入が必須である可能性が考えられる。また、近年確立された HSCs の増幅法を応用することによって導入遺伝子の数を減らしつつ HSCs を誘導しうる可能性もあり、今後は複数のプロトコールを組み合わせる誘導増幅することも検討する。

では、なぜ *HoxB4* の強制発現によって HPCs が HSCs 化し得たのか。Oshima らは以前、*HoxB4* 強制発現系による ES 細胞由来の HSCs および HPCs を用いてその下流の遺伝子発現パターンを評価し、*Runx1* や *Scl/Tall1*, *Gata2* と *Gfi1* を直接的に働く因子として、また *Lmo2*, *Erg*, *Meis1*, *Pbx1*, *Hemgn* などを間接的に働く因子として報告した⁵⁴。一方、Schiedlmeier らは HSCs/HPCs 分画である KSL 細胞に *HoxB4* を強制発現させターゲットとなる遺伝子を実験し、その結果 TNF- α の negative regulator である *Bre* の発現が高くなることや FGF ファミリーの発現が高くなることで幹細胞活性を維持することを示した⁵⁵。また、個体の発生段階においては沿軸中胚葉において発現し、造血ニッチで *Vegf* や *Frzb*, *scf* の発現に関与し造血支持をすること、また HSCs とニッチに interaction に関与する Wnt や

Hedgehog、Notch シグナルに関連する複数の遺伝子に発現に関与することも分か
ってきており、その HSCs の維持及び誘導のメカニズムは非常に複雑に制御され
ていると考えられる⁵⁶。しかしながらこれらの先行研究で示された *HoxB4* 遺伝
子の造血に関わるメカニズムが本システムで得られた結果を説明しうるもので
はない。今回用いたソース細胞は HSCs と非常によく似た性質を持っているた
め、その遺伝子発現の差はごくわずかであると考えられる。そこで、そのわずか
な差を見出すことによって HSCs の幹細胞活性の維持に寄与するメカニズムを
解明できる可能性がある。

HoxB4 の強制発現と自己複製能に関する遺伝子を評価するため行ったマイク
ロアレイ解析では、予想通りに HSCs と HPCs とではその発現パターンに大きな
違いは認められなかった。このような遺伝子発現パターンは既報でも認められ
ており、ごく少数の遺伝子発現の違いが自己複製能の獲得に寄与していると考え
られている。本解析では既報とは異なり、予想に反して *HoxB4* の下流の Wnt
シグナル、Notch シグナル、TGF- β の発現などには大きな変化は認められなかつ
た⁵⁵。マイクロアレイの解析では遺伝子導入時に培養を行った移植前の HPCs を
評価検体とし、そのコントロールとしては同様に無血清培地にて培養した HSCs
および HPCs を用いた。HSCs の培養維持のため、培養液中に TPO が含まれてい
るが、TPO は *HoxB4* の発現を強めるとの報告もあることから⁵⁷、TPO を含む培

地での培養によって内在性の *HoxB4* の発現が活性化したことによって、HSCs と HPCs との間で遺伝子発現パターンの差がより不明瞭となった可能性が考えられる。本解析で得られた知見として特記すべきものとして、*Lhcgr* の発現が HSCs および *HoxB4*-HPCs において高いことである。ヒトおよびマウス HSCs で LHCGR の発現が高く、黄体ホルモン刺激によってこれらが増幅されるという報告があることから、同遺伝子の発現上昇に伴って HSCs 誘導の効果が得られた可能性はある⁵⁸。しかしながら同遺伝子の単独での効果とは考えにくく、その他の候補に挙げた遺伝子の発現の synergistic な影響もあると考えるが、本遺伝子発現解析では詳細なメカニズムまでは評価はできていない。また、各群のメチル化状態の比較も評価できておらず今後の検討課題と考える。エピジェネティックステータスが多能性幹細胞へのリプログラミングや、多能性幹細胞からの運命決定、また、造血幹細胞における自己複製能の維持や分化方向のかじ取りに大きく関与していることはすでに知られている⁵⁹⁻⁶²。今回私が行ったシステムで誘導した細胞が真に HSCs であるかどうか、またその誘導メカニズムを詳細に評価するためには今後エピジェネティックステータスを評価することが非常に重要な課題となる。今後は追加の解析にてより詳細な評価を行いそのメカニズムを精査していく予定である。

さらに、本研究の限界として、HPCs が完全に HSCs 化をしたということを証

明ができていないことが挙げられる。一つの可能性として、*HoxB4*-HPCs は、ポリクローナルな増殖をして、結果として 3 系統への分化が確認できたということが考えられる。この課題をクリアする方法として単一の HSC 移植で評価をすることが検討される。単一の HSC を用いた移植システムにおいてもレシピエント環境において 3 系統の血液細胞系譜を再構築させることができることから、本解析手法を用いることによって単一の HSCs からの多分化能及び自己複製能を評価することが可能である。しかしながら通常の遺伝子導入を行っていない HSCs においても、そのソーティングや移植後の骨髄再構築のストレスによってその幹細胞活性は低下し生存率も低下するため、二次移植における single-HSC transplantation assay は効率が非常に低下することが知られている。それに加えて、ウイルス感染に伴う細胞ストレスを踏まえると、*HoxB4*-HPCs において同 assay で正確な評価は困難であると考えた。また、*HoxB4*-HPCs を移植した一次レシピエントマウスでは、ドナー細胞のキメリズムはいずれの個体でも安定して高いという結果は得られず個体差が大きかったため、一次レシピエントマウスの HSC 分画から十分量のドナー細胞を回収することはできなかった。一つの方法として検討するのは、近年確立した HSCs の培養増幅法の応用である。この手法を用いて単一細胞でソーティングをしてきた *HoxB4*-HPCs 由来の HSCs を一定量まで培養増幅させて、この細胞を移植する。これによって 1 クローンから

十分量の造血を得られることが期待され、より正確にそのクローンの特性を評価できる可能性がある。本研究ではそのクローン毎の多分化能を評価することができていないことから、厳密な意味での HSCs 化は証明できていない。しかしながら先述した 4 つの評価項目を満たしたことから、細胞集団として *HoxB4*-HPCs は HSCs とほぼ同等であることが示されたと考える。

本研究での除外すべき重要な点としては腫瘍原性の有無である。先に述べたように、数々の遺伝子を用いて HSCs の誘導は試みられているが、その多くは腫瘍原性が認められている。*HoxB4* も例外ではなく、*HoxB4* の強制発現系によって腫瘍化のリスクが示された報告もある⁶³。今回の 16 週間という観察期間の中では腫瘍化した個体は認められなかったが、さらなる長期観察の中で腫瘍化のリスクを評価していく必要がある。KrosI らはヒト *HOXB4* と TAT の融合タンパクの導入によって遺伝子操作を行わずに HSCs を増幅させることに成功している⁶⁴。また、ヒト *HOXB4* タンパクの導入によって $CD34^+CD38^-$ のヒト造血幹/前駆細胞が試験管内で増幅することも示されている⁶⁵。遺伝子導入を行わずに HSCs を増幅させる方法が確立されれば、遺伝子導入に伴う挿入部位変異もなく腫瘍性のリスクは大きく減ると考えられる。HPCs からの HSCs の誘導も同様に、候補となりうるタンパク質の導入や発現調節型ベクターの使用、もしくは培養系を調整することによって腫瘍化のリスクを軽減しつつ可能となると考えられ

る。

目的の細胞を多能性幹細胞から誘導する方法はその発生のメカニズムを知る一歩となるとともに臨床への応用が強く期待される一方、腫瘍化のリスクなど超えるべき壁はまだあるため、実用化が可能と考えられる再生医療・細胞治療は限られている。私の今回の成果では、*HoxB4* 遺伝子の導入によって分化した HPCs から目的とする HSCs へのリプログラミングが起こり、その細胞は腫瘍化することなく生理的な HSCs と類似していることを示すことができた。今後の課題として HPCs から若返りをした HSC 様の細胞の特性を詳細に解析し、真に HSCs となったことを確認するとともに、安全性を評価することでこの手法が新たにドナープールを増やす方法として臨床に応用できることに期待したい。

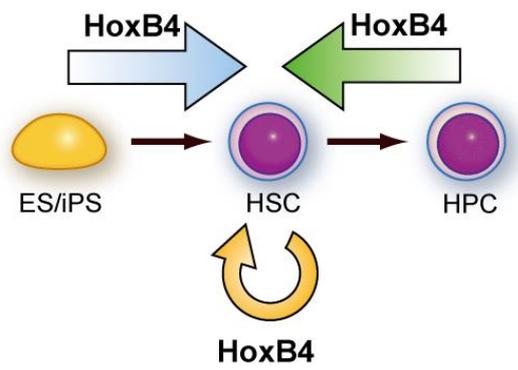


図 19. HoxB4 による HSCs の増幅および誘導の概念図

7. 参考文献

1. Waddington C. *The Strategy of the Genes*. George Allen & Unwin; 1957.
2. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*. 1996;380(6569):64-66.
3. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997;385(6619):810-813.
4. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676.
5. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*. 2008;321(5889):699-702.
6. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872.
7. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*. 2008;455(7213):627-632.
8. Cobaleda C, Jochum W, Busslinger M. Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature*. 2007;449(7161):473-477.
9. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*. 2010;463(7284):1035-1041.
10. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*. 2010;142(3):375-386.
11. Szabo E, Rampalli S, Risueño RM, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A, Levadoux-Martin M, Bhatia M. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature*. 2010;468(7323):521-526.
12. Cates K, McCoy MJ, Kwon JS, Liu Y, Abernathy DG, Zhang B, Liu S, Gontarz P, Kim

- WK, Chen S, Kong W, Ho JN, Burbach KF, Gabel HW, Morris SA, Yoo AS. Deconstructing Stepwise Fate Conversion of Human Fibroblasts to Neurons by MicroRNAs. *Cell Stem Cell*. 2020.
13. Zhang M, Dong Y, Hu F, Yang D, Zhao Q, Lv C, Wang Y, Xia C, Weng Q, Liu X, Li C, Zhou P, Wang T, Guan Y, Guo R, Liu L, Geng Y, Wu H, Du J, Hu Z, Xu S, Chen J, He A, Liu B, Wang D, Yang YG, Wang J. Transcription factor Hoxb5 reprograms B cells into functional T lymphocytes. *Nat Immunol*. 2018;19(3):279-290.
 14. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Clift RA, Fefer A, Flournoy N, Goodell BW, Hickman RO, Lerner KG, Neiman PE, Sale GE, Sanders JE, Singer J, Stevens M, Storb R, Weiden PL. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood*. 1977;49(4):511-533.
 15. Kanda Y, Kanda J, Atsuta Y, Maeda Y, Ichinohe T, Ohashi K, Fukuda T, Miyamura K, Iida H, Mori T, Iwato K, Eto T, Kawa K, Morita S, Morishima Y. Impact of a single human leucocyte antigen (HLA) allele mismatch on the outcome of unrelated bone marrow transplantation over two time periods. A retrospective analysis of 3003 patients from the HLA Working Group of the Japan Society for Blood and Marrow Transplantation. *Br J Haematol*. 2013;161(4):566-577.
 16. Helgason CD, Sauvageau G, Lawrence HJ, Largman C, Humphries RK. Overexpression of HOXB4 enhances the hematopoietic potential of embryonic stem cells differentiated in vitro. *Blood*. 1996;87(7):2740-2749.
 17. Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell*. 2002;109(1):29-37.
 18. Matsumoto K, Isagawa T, Nishimura T, Ogaeri T, Eto K, Miyazaki S, Miyazaki J, Aburatani H, Nakauchi H, Ema H. Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. *PLoS One*. 2009;4(3):e4820.
 19. Lis R, Karrasch CC, Poulos MG, Kunar B, Redmond D, Duran JGB, Badwe CR, Schachterle W, Ginsberg M, Xiang J, Tabrizi AR, Shido K, Rosenwaks Z, Elemento O, Speck NA, Butler JM, Scandura JM, Rafii S. Conversion of adult endothelium to immunocompetent haematopoietic stem cells. *Nature*. 2017;545(7655):439-445.

20. Rowe RG, Mandelbaum J, Zon LI, Daley GQ. Engineering Hematopoietic Stem Cells: Lessons from Development. *Cell Stem Cell*. 2016;18(6):707-720.
21. Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, Okabe M, Masaki H, Takaki S, Otsu M, Nakauchi H. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther*. 2013;21(7):1424-1431.
22. Tsukada M, Ota Y, Wilkinson AC, Becker HJ, Osato M, Nakauchi H, Yamazaki S. In Vivo Generation of Engraftable Murine Hematopoietic Stem Cells by Gfi1b, c-Fos, and Gata2 Overexpression within Teratoma. *Stem Cell Reports*. 2017;9(4):1024-1033.
23. Elcheva I, Brok-Volchanskaya V, Kumar A, Liu P, Lee JH, Tong L, Vodyanik M, Swanson S, Stewart R, Kyba M, Yakubov E, Cooke J, Thomson JA, Slukvin I. Direct induction of haematoendothelial programs in human pluripotent stem cells by transcriptional regulators. *Nat Commun*. 2014;5:4372.
24. Doulatov S, Vo LT, Chou SS, Kim PG, Arora N, Li H, Hadland BK, Bernstein ID, Collins JJ, Zon LI, Daley GQ. Induction of multipotential hematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells via respecification of lineage-restricted precursors. *Cell Stem Cell*. 2013;13(4):459-470.
25. Sugimura R, Jha DK, Han A, Soria-Valles C, da Rocha EL, Lu Y-F, Goettel JA, Serrao E, Rowe RG, Malleshaiah M, Wong I, Sousa P, Zhu TN, Ditadi A, Keller G, Engelman AN, Snapper SB, Doulatov S, Daley GQ. Haematopoietic stem and progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nature*. 2017;545(7655):432-438.
26. Ieyasu A, Ishida R, Kimura T, Morita M, Wilkinson AC, Sudo K, Nishimura T, Ohehara J, Tajima Y, Lai CY, Otsu M, Nakamura Y, Ema H, Nakauchi H, Yamazaki S. An All-Recombinant Protein-Based Culture System Specifically Identifies Hematopoietic Stem Cell Maintenance Factors. *Stem Cell Reports*. 2017;8(3):500-508.
27. Wilkinson AC, Ishida R, Kikuchi M, Sudo K, Morita M, Crisostomo RV, Yamamoto R, Loh KM, Nakamura Y, Watanabe M, Nakauchi H, Yamazaki S. Long-term ex vivo haematopoietic-stem-cell expansion allows nonconditioned transplantation. *Nature*. 2019;571(7763):117-121.
28. Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, Maherali N, Ahfeldt T, Mostoslavsky G, Hock H, Hochedlinger K. Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet*. 2009;41(9):968-976.

29. Wang Y, Yates F, Naveiras O, Ernst P, Daley GQ. Embryonic stem cell-derived hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(52):19081-19086.
30. Riddell J, Gazit R, Garrison BS, Guo G, Saadatpour A, Mandal PK, Ebina W, Volchkov P, Yuan GC, Orkin SH, Rossi DJ. Reprogramming committed murine blood cells to induced hematopoietic stem cells with defined factors. *Cell*. 2014;157(3):549-564.
31. Okabe M, Otsu M, Ahn DH, Kobayashi T, Morita Y, Wakiyama Y, Onodera M, Eto K, Ema H, Nakauchi H. Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood*. 2009;114(9):1764-1767.
32. Deneault E, Cellot S, Faubert A, Laverdure JP, Fréchet M, Chagraoui J, Mayotte N, Sauvageau M, Ting SB, Sauvageau G. A functional screen to identify novel effectors of hematopoietic stem cell activity. *Cell*. 2009;137(2):369-379.
33. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, Lawrence HJ, Largman C, Lansdorp PM, Humphries RK. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev*. 1995;9(14):1753-1765.
34. Hamanaka S, Nabekura T, Otsu M, Yoshida H, Nagata M, Usui J, Takahashi S, Nagasawa T, Nakauchi H, Onodera M. Stable transgene expression in mice generated from retrovirally transduced embryonic stem cells. *Mol Ther*. 2007;15(3):560-565.
35. Nabekura T, Otsu M, Nagasawa T, Nakauchi H, Onodera M. Potent vaccine therapy with dendritic cells genetically modified by the gene-silencing-resistant retroviral vector GCDNsap. *Mol Ther*. 2006;13(2):301-309.
36. Sanuki S, Hamanaka S, Kaneko S, Otsu M, Karasawa S, Miyawaki A, Nakauchi H, Nagasawa T, Onodera M. A new red fluorescent protein that allows efficient marking of murine hematopoietic stem cells. *J Gene Med*. 2008;10(9):965-971.
37. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996;273(5272):242-245.
38. Sung LY, Gao S, Shen H, Yu H, Song Y, Smith SL, Chang CC, Inoue K, Kuo L, Lian J, Li A, Tian XC, Tuck DP, Weissman SM, Yang X, Cheng T. Differentiated cells are

- more efficient than adult stem cells for cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nat Genet.* 2006;38(11):1323-1328.
39. Noda S, Horiguchi K, Ichikawa H, Miyoshi H. Repopulating activity of ex vivo-expanded murine hematopoietic stem cells resides in the CD48-c-Kit+Sca-1+lineage marker- cell population. *Stem Cells.* 2008;26(3):646-655.
 40. Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, Jerome L, Bijl J, Lawrence HJ, Humphries K, Sauvageau G. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood.* 2002;99(1):121-129.
 41. Bach C, Buhl S, Mueller D, García-Cuellar MP, Maethner E, Slany RK. Leukemogenic transformation by HOXA cluster genes. *Blood.* 2010;115(14):2910-2918.
 42. Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg AM, Sauvageau G. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *Embo j.* 1998;17(13):3714-3725.
 43. Cellot S, Kros J, Chagraoui J, Meloche S, Humphries RK, Sauvageau G. Sustained in vitro trigger of self-renewal divisions in Hoxb4hiPbx1(10) hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 2007;35(5):802-816.
 44. Seita J, Sahoo D, Rossi DJ, Bhattacharya D, Serwold T, Inlay MA, Ehrlich LI, Fathman JW, Dill DL, Weissman IL. Gene Expression Commons: an open platform for absolute gene expression profiling. *PLoS One.* 2012;7(7):e40321.
 45. Zon LI. Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature.* 2008;453(7193):306-313.
 46. Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, Kato N, Uchida T, Haraguchi K, Kumano K, Harada Y, Harada H, Kitaura J, Ogawa S, Kurokawa M, Kitamura T, Chiba S. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 2010;115(14):2872-2881.
 47. Izawa K, Yamazaki S, Becker HJ, Bhadury J, Kakegawa T, Sakaguchi M, Tojo A. Activated HoxB4-induced hematopoietic stem cells from murine pluripotent stem cells via long-term programming. *Experimental Hematology.* 2020;89:68-79.e67.
 48. Schiedlmeier B, Klump H, Will E, Arman-Kalcek G, Li Z, Wang Z, Rimek A, Friel J,

- Baum C, Ostertag W. High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound in vivo competitive growth advantage on human cord blood CD34+ cells, but impairs lymphomyeloid differentiation. *Blood*. 2003;101(5):1759-1768.
49. Lee GS, Kim BS, Sheih JH, Moore M. Forced expression of HoxB4 enhances hematopoietic differentiation by human embryonic stem cells. *Mol Cells*. 2008;25(4):487-493.
50. Bowles KM, Vallier L, Smith JR, Alexander MR, Pedersen RA. HOXB4 overexpression promotes hematopoietic development by human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(5):1359-1369.
51. Pilat S, Carotta S, Schiedlmeier B, Kamino K, Mairhofer A, Will E, Modlich U, Steinlein P, Ostertag W, Baum C, Beug H, Klump H. HOXB4 enforces equivalent fates of ES-cell-derived and adult hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(34):12101-12106.
52. Akala OO, Park IK, Qian D, Pihalja M, Becker MW, Clarke MF. Long-term haematopoietic reconstitution by *Trp53*^{-/-}*p16Ink4a*^{-/-}*p19Arf*^{-/-} multipotent progenitors. *Nature*. 2008;453(7192):228-232.
53. He S, Kim I, Lim MS, Morrison SJ. *Sox17* expression confers self-renewal potential and fetal stem cell characteristics upon adult hematopoietic progenitors. *Genes Dev*. 2011;25(15):1613-1627.
54. Oshima M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Nakajima-Takagi Y, Sugiyama F, Koseki H, Kyba M, Iwama A, Osawa M. Genome-wide analysis of target genes regulated by HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells. *Blood*. 2011;117(15):e142-e150.
55. Schiedlmeier B, Santos AC, Ribeiro A, Moncaut N, Lesinski D, Auer H, Kornacker K, Ostertag W, Baum C, Mallo M, Klump H. HOXB4's road map to stem cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(43):16952-16957.
56. Forrester LM, Jackson M. Mechanism of action of HOXB4 on the hematopoietic differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2012;30(3):379-385.
57. Kirito K, Fox N, Kaushansky K. Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. *Blood*.

2003;102(9):3172-3178.

58. Velardi E, Tsai JJ, Radtke S, Cooper K, Argyropoulos KV, Jae-Hung S, Young LF, Lazrak A, Smith OM, Lieberman S, Kreines F, Shono Y, Wertheimer T, Jenq RR, Hanash AM, Narayan P, Lei Z, Moore MA, Kiem HP, van den Brink MRM, Dudakov JA. Suppression of luteinizing hormone enhances HSC recovery after hematopoietic injury. *Nat Med.* 2018;24(2):239-246.
59. Li S, Ali S, Duan X, Liu S, Du J, Liu C, Dai H, Zhou M, Zhou L, Yang L, Chu P, Li L, Bhatia R, Schones DE, Wu X, Xu H, Hua Y, Guo Z, Yang Y, Zheng L, Shen B. JMJD1B Demethylates H4R3me2s and H3K9me2 to Facilitate Gene Expression for Development of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Rep.* 2018;23(2):389-403.
60. Konuma T, Nakamura S, Miyagi S, Negishi M, Chiba T, Oguro H, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Ichikawa H, Miyoshi H, Vidal M, Iwama A. Forced expression of the histone demethylase Fbx10 maintains self-renewing hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 2011;39(6):697-709.e695.
61. Nishizawa M, Chonabayashi K, Nomura M, Tanaka A, Nakamura M, Inagaki A, Nishikawa M, Takei I, Oishi A, Tanabe K, Ohnuki M, Yokota H, Koyanagi-Aoi M, Okita K, Watanabe A, Takaori-Kondo A, Yamanaka S, Yoshida Y. Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity. *Cell Stem Cell.* 2016;19(3):341-354.
62. Wada T, Kikuchi J, Nishimura N, Shimizu R, Kitamura T, Furukawa Y. Expression levels of histone deacetylases determine the cell fate of hematopoietic progenitors. *J Biol Chem.* 2009;284(44):30673-30683.
63. Zhang XB, Beard BC, Trobridge GD, Wood BL, Sale GE, Sud R, Humphries RK, Kiem HP. High incidence of leukemia in large animals after stem cell gene therapy with a HOXB4-expressing retroviral vector. *J Clin Invest.* 2008;118(4):1502-1510.
64. Krosl J, Austin P, Beslu N, Kroon E, Humphries RK, Sauvageau G. In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med.* 2003;9(11):1428-1432.
65. Amsellem S, Pflumio F, Bardinet D, Izac B, Charneau P, Romeo PH, Dubart-Kupperschmitt A, Fichelson S. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells

by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. Nat Med. 2003;9(11):1423-1427.

8. 謝辞

本稿の作製にあたり、研究の機会を与えてくださりご指導ご鞭撻を賜りました、東京大学医科学研究所附属病院 先端医療研究センター 造血病態制御学分野 南谷泰仁教授、分子療法分野 東條有伸前教授に心より御礼を申し上げます。また、研究を進めるにあたり、親身なご指導ならびにご助言を賜りました東京大学医科学研究所 中内啓光東京大学特任教授に深く感謝を申し上げます。また研究の遂行にあたりご協力いただいた北里大学医学部輸血部 大津真博士に深く感謝申し上げます。

ウイルスベクターの作製や評価システムの構築に多大なる助言をしていただいた京都大学高等研究院 山本玲博士、フローサイトメトリー解析でご支援いただいた東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センターの山崎裕治氏に深く感謝申し上げます。研究生活全般にわたりご協力およびご支援いただきました津久井弘子氏、岡田京子氏に深く感謝申し上げます。

最後に、研究の継続を支持し心身ともに支えてくれた妻子および両親に心からの謝意を記します。