

多能性幹細胞由来赤芽球での脱核制御機構の解明

江藤浩之

京都大学 iPS 細胞研究所

【研究の背景】

2027年以降、日本の輸血医療に必要な量の20%以上の献血ドナーが不足し、その供給不足の割合は年々増加する予測が公表されている。申請者らは、まれ血ドナー（例、M^k/M^k, P^k）、Rh マイナス O 型ドナー由来 iPS 細胞をソースに凍結可能な赤芽球の製造方法を開発した（Hirose et al., Stem Cell Reports, 2013）。一方、多能性幹細胞から誘導した赤芽球では、成人型ヘモグロビンへの置換不全、および脱核機構障害が観察される事が知られている。特に前者における胎児型のヘモグロビン発現が消失しないグロビンスイッチの不完全が問題として指摘されてきた。申請者らはその原因の一つは、胎児型ガンマグロビン鎖のサイレンシング（発現消失）を制御する BCL11A 遺伝子（Science, 2008; Nat Genetics 2010; Science 2013）が、多能性幹細胞由来のすべての血球細胞の分化過程で発現抑制されていることが原因であることを明らかにした（Ochi et al., Stem Cells Transl Med, 2014）。さらにはこの BCL11A の強制発現実験の中で脱核が促進される iPS 細胞クローンを見出すことに成功した。

【目 的】

iPS 細胞などの多能性幹細胞からの赤血球輸血製剤開発は、①胎児型から成人型グロビンへの完全な移行（グロビンスイッチ）の障害、②脱核障害、の2つの大きな課題を解決する必要がある。これらの原因を明らかにすることが本研究課題の目的である。

【方 法】

（1）多能性幹細胞由来血液細胞で BCL11A 発現が抑制されている機構の解明

iPS 細胞由来赤芽球では BCL11A が mRNA レベルで発現がなく、転写の段階での抑制が強く示唆される。そこで、ゲノム DNA 修飾（DNA メチル化）とヒストン修飾（H3K27me3 を含む抑制性ヒストン修飾と、活性化修飾）の状態を次世代シーケンサーによる Bisulfate sequence 及び ChIP-Seq によって確認する。比較対象として臍帯血由来赤芽球を用い、ゲノム上の部分依存的な BCL11A の発現調節機序を明らかにする。

（2）BCL11A-L を外来性に導入して脱核促進が観察されるクローン由来の新規分子の同定

BCL11A-L を外来性に発現させることで脱核の促進まで進行する赤芽球クローンを2つ得た（陽性）。そこで、脱核しなかった陰性クローンをコントロールにして、BCL11A-L 遺伝子あるいは蛋白に会合する複合体、並びに単一分子を同定する。

【結 果】

（1）多能性幹細胞由来血液細胞で BCL11A 発現が抑制されている機構の解明

1. 成人型ベータグロビン鎖の発現は観察されるものの、胎児型ガンマグロビン鎖の発現抑制が観察できない iPS 細胞クローンから CD34 陽性細胞を誘導し、ヒト骨髄細胞 CD34 陽性細胞および臍帯血 CD34 陽性由来赤芽球細胞をグロビンコントロールとして分化ステージの異なる細胞毎のマイクロアレー解析を実施した。iPS 細胞由来の赤芽球細胞での BCL11A の mRNA レベルは抑制されていることを陰性コントロールとして実験遂行の保障とした。その結果、BCL11A と複合体を形成している別の重要な遺伝子 X の発現も同時に抑制されていることを新たに明らかにした。これら2つの

mRNA レベルでの発現抑制のメカニズム確認のために2つの遺伝子座プロモーター領域のメチル化を検証した。BCL11A に関してはプロモーターが同定されていないため複数の予想配列座に対する Bisulfate sequence アッセイを、また X 遺伝子プロモーター配列に対するメチル化検証を実行した。

2. 上記マイクロアレイでは、X 遺伝子以外に、骨髄＞臍帯血＞iPS 細胞の順番で発現が抑制されていく、あるいはその逆の発現パターンをとる候補遺伝子を複数同定した。現在、これら遺伝子と BCL11A の発現、エピジェネティック機構との関連を調べている。これらの遺伝子群(複数候補)は、下記、脱核メカニズムに関わる遺伝子であることも考慮してさらに詳細なメカニズムの解明を目指している。

(2) BCL11A-L を外来性に導入して脱核促進が観察されるクローン由来の新規分子の同定

新たなクローンを得る目的で BCL11A-L あるいは BCL11A-XL を外来性に発現させる再現実験を実施したが、BCL11A 自体の発現サイレンシングが発生する問題に直面した。脱核促進が観察されるようになった最初のクローンを得られた iPS 細胞とは異なる iPS 細胞株では BCL11A の発現維持株(クローン)を得ることは困難であった。そこで新たな iPS 細胞のユビキタな発現を可能にする遺伝子座に直接 BCL11A を組み込む(CRISPR/Cas9 システム)方法に切り替えて細胞株を構築しつつある。

【考 察】

新たな疑問として、グロブンスイッチ障害、脱核障害などが、正常な造血(成人型の造血幹細胞を確実に通過)を経た多能性幹細胞由来の赤芽球細胞でもあるのか、言い換えると非常に原始的な胎児造血経路で成人型造血幹細胞を経由しないために成人型のグロブンスイッチを成し遂げられていないか？が想定される。そこでヒト iPS 細胞から3系統(内胚葉、外胚葉、中胚葉)への分化を可能とするテラトーマ移植法を開発した東京大学医科学研究所の山崎聡博士との共同研究を開始している。ヒト iPS 細胞由来の成人型造血幹細胞を経由した赤芽球を解析する結果、新しい血液発生学上の新発見に繋がることが予想される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

2017 年の輸血製剤は足りないとされるが、その大半は赤血球であり、実際にその不足分を供給できるための赤血球造血システムを早期に実現化でき得ると思われる。