

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業
戦略的国際共同研究プログラム
(英語) International Collaborative Research Program
Strategic International Collaborative Research Program (SICORP)

研究開発課題名： (日本語) 正常造血及び白血病における幹細胞性とエピジェネティクス
(英語) Epigenetics and stemness in human hematopoiesis and leukemia

研究開発担当者 (日本語) 東京大学 医科学研究所 教授 中内啓光

所属 役職 氏名： (英語) The Institute of Medical Science
The University of Tokyo
Project Professor
Nakauchi Hiromitsu

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 白血病細胞におけるエピゲノムの解明
開発課題名： (英語) Understanding of the role of epigenetic modifications
in human leukemia cells

研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科 腫瘍生物学 教授 小川誠司
所属 役職 氏名： (英語) Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate
School of Medicine, Kyoto University, Professor, Seishi Ogawa

II. 成果の概要 (総括研究報告)

造血幹細胞は最もよく研究された幹細胞であり、造血幹細胞移植という形で広く臨床応用されている。しかしながらドナー不足の問題と非自己の幹細胞移植による GVHD は依然として大きな問題となっており、iPS 細胞から造血幹細胞を分化誘導する手法を確立することが期待されている。また、白血病においては白血病幹細胞の存在が明らかとなり、再発防止には白血病幹細胞を標的とした新しい治療法の確立が必須である。

本プロジェクトでは、造血発生ならびに異常造血の分子機構をゲノム、遺伝子発現に加えてエピジェネティクスの観点から総合的に理解すること目標とし、カナダチームと連携しつつ研究を行っている。日本側は東京大学医科学研究所中内啓光チームが、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、京都大学医学部小川誠司チームが、白血病細胞におけるエピゲノムの解明をテーマに研究を行っている。

1) 中内チームの成果

1) 中内チームの成果 (H28 年度)

骨髄由来造血幹細胞と機能的に同等な造血幹細胞を効率的に誘導するために、1. 宿主側の造血系を欠損させることにより骨髄にニッチを作りだし、テラトーマ由来造血幹細胞の移入 (migration) をより効率よく誘導する試み、2. ドナーiPS 細胞に造血系に関わる転写因子を誘導することで、造血幹細胞のより効率的誘導をはかる検討をおこなった。1. についてはコンディショナル c-Kit 遺伝子欠損マウスにテラトーマを形成させることにより、iPS 由来 HSC を生体内で増幅させることに成功した。またマウス iPS 細胞から造血幹細胞を効率よく誘導するために、テラトーマ内において転写因子の Gfilb, c-Fos, Gata2 を Dox 誘導型システムにより発現させることで移植可能な造血幹細胞を誘導することにも成功した。このように iPS 細胞からテラトーマ法を用い in vivo で必要とされる造血幹細胞を得るための検討は着実に前進している。

2) 小川チームの成果

骨髄異形成症候群 (MDS) は汎血球減少を伴う無効造血と高率の急性骨髄性白血病 (AML) への移行を特徴とする骨髄腫瘍性疾患である。AML においては、DNA メチル化に関わる遺伝子異常が認められることから、ゲノム異常によりエピゲノム異常が引き起こされ腫瘍化に関わることが想定されるが、その全容は未だ明らかとなっていない。昨年度の研究で、小川チームは、ゲノム異常とメチル化の異常が腫瘍の増悪や進展に非常に重要な役割を担っていることを報告した。本年度小川チームは、Tet-Assisted Bisulfite Sequencing (TAB-Seq) 技術をジェノタイピングに応用することで、遺伝子プロモーターおよび CpG island とその周辺領域を多数の検体で効率よく行う系を確立することに成功した。さらに本解析系を用いて AML の DNA 脱メチル化異常が起こっている可能性のある遺伝子の候補を挙げることができた。このように白血病患者試料を対象とした網羅的なエピゲノムマッピングというマイルストーンの達成に向けて着実に前進している。

Hematopoietic stem cells (HSCs) are the best-studied stem cells and they have been widely used clinically as a form of bone marrow transplantation to treat patients with leukemia, aplastic anemia, immunodeficiency disease and so on. However, lack of HLA-matched donors and graft versus host disease following allogeneic transplantation remain major issues associated with HSC transplantation. Recent discovery of induced pluripotent stem cells (iPSC) technology opened up the way to generate pluripotent stem cells from patient's somatic cells. Thus, if HSCs can be generated from patient-derived iPSCs, above issues associated with allogeneic HSC transplantation will be solved.

Recent advancement in stem cell biology demonstrated the existence of leukemic stem cells (LSCs), which are not susceptible to current cancer therapy. To avoid recurrence of leukemia, development of novel therapy that targets and eliminates LSCs is required.

The overall objectives of our project are, in collaboration with Canadian scientist, to understand how epigenetic modifications govern stemness, differentiation in normal human hematopoiesis, and to use this knowledge to develop the next generation of HSC therapeutics for regenerative medicine and more effective anti-LSC therapeutics. Below is the progress report from the Nakauchi team at the University of Tokyo and the Ogawa team at Kyoto University.

1) Progress made in the Nakauchi team

In order to develop a method for inducing HSCs which are functionally equivalent to bone marrow-derived HSCs, mainly two approaches are being undertaken. One is an attempt to open a niche in the bone marrow by depletion of the host hematopoietic system for support the engraftment of HSCs derived from teratoma. The

other one is a investigation of the induction of HSCs by inducing transcription factors involved in the hematopoiesis in donor iPS cells. For the first approach, Nakauchi team succeeded in amplifying iPS-derived HSCs in vivo by forming teratoma using conditional c-Kit deficient mice. For the second approach, they succeeded in inducing transplantable HSCs by expressing transcription factors Gfi1b, c-Fos and Gata2 in teratoma using a Dox-inducible system. Thus the project to generate mouse and human HSCs via teratoma formation is progressing well.

2) Progress made in the Ogawa team.

Myelodysplastic syndromes (MDS) is a heterogeneous group of chronic myeloid neoplasms, characterized by ineffective hematopoiesis leading to pancytopenia and high propensity to acute myeloid leukemia (AML). In both MDS and AML, frequent genetic alterations involving epigenetic regulators, suggesting that abnormal epigenetic regulation is involved in the pathogenesis of these myeloid malignancies. In the past year, the Ogawa team reported that genetic alterations and abnormal DNA methylation played important roles in exacerbation and progression of MDS/AML. This year, combining the Tet-associated bisulfite sequencing (TAB-Seq) technology with high throughput genotyping, the group established the platform in which epigenetic alterations in gene promoters/CpG islands and their surrounding regions can be efficiently analyzed in a large number of samples. Using this platform, the group identified candidate genes for abnormal DNA hypomethylation. These represent a substantial and promising progress to achieve the goal of this project, i.e., comprehensive epigenetic mapping of myeloid neoplasms.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 件、国際誌 3 件)

1. Tajima, Y., Ito, K., Umino, A., Wilkinson, A. C., Nakauchi, H. and Yamazaki, S. Continuous cell supply from Krt7-expressing hematopoietic stem cells during native hematopoiesis revealed by targeted in vivo gene transfer method. *Sci Rep.* (2017). 7:40684. "PMID": 28098173.
2. Ieyasu, A., Ishida, R., Kimura, T., Morita, M., Wilkinson, A. C., Sudo, K., Nishimura, T., Ohehara, J., Tajima, Y., Lai, C. Y., Otsu, M., Nakamura, Y., Ema, H., Nakauchi, H. and Yamazaki, S. An All-Recombinant Protein-Based Culture System Specifically Identifies Hematopoietic Stem Cell Maintenance Factors. *Stem Cell Reports.* (2017).8:500-508. "PMID": 28238792.
3. Taya, Y., Ota, Y., Wilkinson, A. C., Kanazawa, A., Watarai, H., Kasai, M., Nakauchi, H. and Yamazaki, S. Depleting dietary valine permits nonmyeloablative mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Science.* (2016).354:1152-1155. "PMID": 27934766.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. From Stem Cells to Organs: Exploiting the organ niche for interspecies organogenesis, 口頭, Hiromitsu Nakauchi, 26th Annual Beckman Symposium on Stem Cells and Regenerative Medicine, November 4, 2016. Duarte, CA. 国外
2. Use of iPSC technology for personalized medicine, 口頭, Hiromitsu Nakauchi, EMBL-Stanford Conference: Personalized Health, November 2, 2016. Stanford, CA. 国外
3. Stem Cell niche--from cells to organs, 口頭, Hiromitsu Nakauchi, 7th Annual Stem Cell Biology and Regenerative Medicine Retreat, September 27, 2016. Monterey, CA. 国外

4. Stem Cell Niche– From Cells to Organs, 口頭, Hiromitsu Nakauchi, University of Southern California, May 17, 2016. Los Angeles, California. 国外
5. Stem cell niche" from cells and organs, 口頭, Hiromitsu Nakauchi, Stower's Li Lab, May 4, 2016. Kansas City, Missouri. 国外
6. Stem cell niche for cells and organs, 口頭, Hiromitsu Nakauchi, Baxter Lab Retreat, January 20, 2016. Menlo Park, CA. 国外
7. 幹細胞ニッチ：細胞から臓器へ, 口頭, 中内啓光, 東京免疫フォーラム, 2017/3/23, 国内
8. アミノ酸バランスにおける造血幹細胞の制御とその応用, 口頭, 山崎聡, 医科学研究所 学友会セミナー, 2016/6/10, 国内
9. アミノ酸バランスによる造血幹細胞の制御, 口頭, 山崎聡, SKIP×幹細胞若手の会 Symposium 2016 ~Integrative Stem Cell Biology for Regenerative Medicine~, 厚生労働省「ヒト幹細胞情報化推進事業」SKIP Seminar・幹細胞若手の会(通称つくしの会) Joint planning, 2016/9/30, 国内
10. Valine starvation permits hematopoietic stem cell transplantation without chemorradiative myeloablation, 口頭, 山崎聡, 第45回日本免疫学会学術集会, 2016/12/7, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業
(英語) International Collaborative Research Program
Strategic International Collaborative Research Program (SICORP)

分担研究 (日本語) 白血病細胞におけるエピゲノムの解明
開発課題名：(英語) Understanding of the role of epigenetic modifications
in human leukemia cells

研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科 腫瘍生物学 教授 小川誠司
所属 役職 氏名：(英語) Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate
School of Medicine, Kyoto University, Professor, Seishi Ogawa

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：東京大学医科学研究所・幹細胞治療分野・中内啓光
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 2 件)

1. Keisuke Kataoka, Yuichi Shiraishi, Yohei Takeda, Seiji Sakata, Misako Matsumoto, Seiji Nagano, Takuya Maeda, Yasunobu Nagata, Akira Kitanaka, Seiya Mizuno, Hiroko Tanaka, Kenichi Chiba, Satoshi Ito, Yosaku Watatani, Nobuyuki Kakiuchi, Hiromichi Suzuki, Tetsuichi Yoshizato, Kenichi Yoshida, Masashi Sanada, Hidehiro Itonaga, Yoshitaka Imaizumi, Yasushi Totoki, Wataru Munakata, Hiromi Nakamura, Natsuko Hama, Kotaro Shide, Yoko Kubuki, Tomonori Hidaka, Takuro Kameda, Kyoko Masuda, Nagahiro Minato, Koichi Kashiwase, Koji Izutsu, Akifumi Takaori-Kondo, Yasushi Miyazaki, Satoru Takahashi, Tatsuhiro Shibata, Hiroshi Kawamoto, Yoshiki Akatsuka, Kazuya Shimoda, Kengo Takeuchi, Tsukasa Seya, Satoru Miyano & **Seishi Ogawa**¹. Aberrant *PD-L1* expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. *Nature* 2016 May 23;534(7607):402-6. doi: 10.1038/nature18294.
2. Makishima H, Yoshizato T, Yoshida K, Sekeres MA, Radivoyevitch T, Suzuki H, Przychodzen BP, Nagata Y, Megendorfer M, Sanada M, Okuno Y, Hirsh C, Kuzmanovic T, Sato Y, Sato-Otsubo A, LaFramboise T, Hosono N, Shiraishi Y, Chiba K, Haferlach C, Kern W, Tanaka H, Shiozawa Y, Ines Gomez-Segui I, Husseinzadeh HD, Thota S, Guinta K, Dienes B, Nakamaki T, Miyawaki S, Sauntharajah Y, Chiba S, Miyano S, Shih LY, Haferlach T, **Ogawa, S**, Maciejewski JP. Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet.* 2016. 49:204-212. doi: 10.1038/ng.3742.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Dynamics of Clonal Evolution in Myelodysplastic Syndromes. Hideki Makishima, Tetsuichi Yoshizato,

- Kenichi Yoshida, Thomas LaFramboise, Matthew Ruffalo, Mikkael Sekeres, Hiromichi Suzuki, Bartłomiej Przychodzen, Yasunobu Nagata, Manja Meggendorfer, Masashi Sanada, Yusuke Okuno, Yusuke Sato, Aiko Sato-Otsubo, Tomas Radivoyevitch, Naoko Hosono, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Claudia Haferlach, Wolfgang Kern, Hiroko Tanaka, Yusuke Shiozawa, Inés Gómez-Seguí, Holleh Husseinzadeh, Swapna Thota, Kathryn Guinta, Brittney Dienes, Tsuyoshi Nakamaki, Shuichi Miyawaki, Yogen Sauntharajah, Shigeru Chiba, Satoru Miyano, Lee-Yung Shih, Torsten Haferlach, Seishi Ogawa, Jaroslaw Maciejewski. 口頭、21st Congress European Hematology Association, 2016/6/11. (国外)
2. Landscape of MDS genomes as revealed by whole genome sequencing. Yasuhito Nannya, Kenichi Yoshida, Keisuke Kataoka, Yasunobu Nagata, Tetsuichi Yoshizato, Shigeru Chiba, Norio Aso, Yasushi Miyazaki, Hiroko Tanaka, Kenichi Chiba, Yuichi Shiraishi, Satoru Miyano, and Seishi Ogawa, 口頭, The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2016/10/6 (国内)
 3. Biological roles and potential therapeutic targeting of spliceosome mutations in myelodysplasia. Ayana Kon, Seishi Ogawa. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2016/10/8 (国内)
 4. Clonal architecture in acquired aplastic anemia. Tetsuichi Yoshizato, Bogdan Dumitriu, Kohei Hosokawa, Hideki Makishima, Kenichi Yoshida, Danielle Townsley, Aiko Sato, Yusuke Sato, Delong Liu, Hiromichi Suzuki, Colin Wu, Yuichi Shiraishi, Michael Clemente, Keisuke Kataoka, Yusuke Shiozawa, Yusuke Okuno, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Yasunobu Nagata, Takamasa Katagiri, Ayana Kon, Masashi Sanada, Phillip Scheinberg, Satoru Miyano, Jaroslaw Maciejewski, Shinji Nakao, Neal Young, Seishi Ogawa. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2016/10/8 (国内)
 5. Landscape of MDS genomes as revealed by whole genome sequencing. Yasuhito Nannya, Kenichi Yoshida, Keisuke Kataoka, Yasunobu Nagata, Tetsuichi Yoshizato, Toru Kiguchi, Nobuaki Dobashi, Kensuke Usuki, Tomoki Naoe, Yukio Kobayashi, Hitoshi Kiyoi, Shigeru Chiba, Norio Aso, Yasushi Miyazaki, Hiroko Tanaka, Kenichi Chiba, Yuichi Shiraishi, Satoru Miyano, and Seishi Ogawa. The 78th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 2016/10/13 (国内)
 6. がんにおけるクロマチン構造制御因子の異常, 吉田 健一, 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016/11/30 (国内)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
なし