

令和元年6月25日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26501002

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞のヒツジ胎子肝臓内における造血系分化誘導を促す幹細胞ニッチの解析

研究課題名(英文) inAnalyses of stem cells niche in ovine fetus liver for hematopoietic differentiation of human iPS cells in

研究代表者

長尾 慶和 (NAGAO, YOSHIKAZU)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：70291953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに、サルES細胞を初期分化誘導後にヒツジ子宮内胎子に移植して、目的とする造血系組織に分化誘導することに成功している。本研究では、ヒトiPS細胞を用いて、ヒツジ胎子内で造血系に正確かつ効率的に分化誘導する条件を検討した。その結果、敷石状の形態的特徴を有する中胚葉系初期分化細胞を胎齢50～60日のヒツジ胎子の肝臓へ移植した際に、最も効率的に造血系キメラを獲られることが明らかとなった。生着したヒト細胞の長期生着について継続的に解析した結果、少なくとも4年以上の長期に渡って、ヒツジ骨髄中にヒト造血系細胞の存在が確認された。造血系幹細胞ニッチの詳細については、現在解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ESないしiPS細胞のin vitro分化誘導に関する研究が盛んに行われているが、造血幹細胞への分化誘導系はほとんど報告されていない。現在、薬剤で治療効果が少ない白血病に対しては、免疫が適合するドナーの骨髄中の造血幹細胞移植によって賄われており、本人のiPS細胞を活用した再生医療への期待が非常に高い。本研究は、患者本人のiPS細胞を、ヒツジ胎子肝内微小環境を用いて造血系へ分化誘導し、患者への移植に用いる白血病治療の可能性を明らかにした。また、ヒツジ胎子肝内の造血幹細胞誘導因子の解明が進めば、iPS細胞のin vitro造血系分化誘導への道も開けるだろう。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic engraftment has been shown to observe when early differentiated monkey ES cells were transplanted into fetal liver. In this study, we examined optimal condition of ovine fetal liver for hematopoietic differentiation of the human iPS cells. We found that human hematopoietic chimera sheep can be efficiently generated when mesodermal early differentiated human iPS cells were injected into ovine fetal liver at 50-60 days of gestation. The human hematopoietic tissue was observed in ovine bone marrow for at least 4 years.

研究分野：幹細胞生物学、再生医学

キーワード：iPS細胞 分化誘導 造血幹細胞 ヒツジ胎子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 研究の学術的背景

移植医療は、突発的事故により臓器を失ってしまった際に、あるいは疾病により特定の臓器が機能不全に陥った際に、質の高い健康な暮らしを取り戻すための究極の医療として取り組まれている。しかしながら、自分の免疫型に合致する臓器提供者(ドナー)の出現を待たねば実施できないため、多くの臓器移植希望者(レシピエント)がその意をかなえることが出来ずに質の低い余生を余儀なくされ、結果的に命を落とすことも多い。そうした中、1998年にUSAのトムソン博士らの研究グループにより発見されたヒト胚性幹細胞(ES細胞)は、あらゆる臓器・組織に分化しうる多分化能と体外培養における無限増殖能という他の細胞が持たない高い能力を持つ細胞である。しかしながらES細胞は、生命倫理面でのハードルが非常に高く、ヒトES細胞の再生医療への臨床的な応用は困難と考えられてきた。そのような中、2008年の京都大学の山中教授らによるヒトiPS細胞株の樹立は、ES細胞が抱えていた生命倫理問題を完全にクリアすることを可能にした。こうした状況を背景に、iPS細胞を活用した再生医療の実施に向けた研究が盛んに行われ、最近では、iPS細胞由来の網膜や神経系などの組織・細胞において、臨床応用に結びつくような画期的な成果が得られている。

iPS細胞が身体を構成するほとんどの細胞に分化できることは既に明らかにされている。それゆえに、iPS細胞を再生医療の臨床現場に応用するためには、分化を正確に制御・誘導することが必要不可欠である。しかしながら、iPS細胞の分化誘導にはいまだ多くの課題が残されており、前述した網膜、神経系や心筋組織などのように、臨床応用が近いと考えられている組織は限られている。中でも特に既存の*in vitro*分化誘導が困難と考えられているのが造血幹細胞である。造血幹細胞は、現在はドナーの骨髄によって賄われており、白血病などに対する移植医療へ用いられているが、根本的な治療法としてiPS細胞を活用した再生医療への期待が非常に高い。

我々の研究グループでは、ES/iPS細胞の*in vivo*分化誘導実験動物としてヒツジ胎子に着目して研究を進めてきた。ヒツジ胎子を用いるメリットとしては、1)その胎盤構造の特異性による胎子への外科処置に対する抵抗性の高さ(流産しにくい)、2)胎子がある程度大きいことにより移植場所を任意に操作できる点、3)妊娠期間が長いことにより詳細な経過観察が可能となる点、などが挙げられる。平成23年度から25年度にかけての科学研究費補助金による取組み「ヒトiPS細胞のヒツジ胎子微小環境内における造血系分化誘導システムの確立」により、骨髄内にサル造血組織を有するキメラヒツジの作出に成功した(Sasaki et al., 2005)。一方で、移植する細胞の分化段階などの条件を変えると、造血系へは分化せず、テラトーマ形成が誘導されることも明らかになった。これらの成果は、幹細胞を動物体内の至適環境へ置くと、体内のその豊かで恵まれた増殖環境ゆえ、ES細胞の分化を正確に制御することは非常に困難で、目的とした組織系統以外の様々な組織系統への分化が無制限に進み、テラトーマと呼ばれる三胚葉性の腫瘍が形成される可能性が高いことを示している。iPS細胞の多能性を完全に制御し、造血系への分化誘導とテラトーマ形成とを的確に制御することが、iPS細胞を活用した再生医療の実用化に向けた大きな課題である。

#### <引用文献>

Sasaki K., Nagao Y., Kitano Y., Hasegawa H., Shibata H., Takatoku M., Hayashi S., Ozawa K., Hanazono Y. Hematopoietic microchimerism in sheep after *in utero* transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells. *Transplantation* 79:32-37 (2005).

## 2. 研究の目的

本研究においては、移植するヒト iPS 細胞の分化段階を未分化と初期中胚葉系分化の2段階に制御した上で、ヒト iPS 細胞を妊娠 50~60 日前後の様々な胎齢のヒツジ胎子肝へ移植し、得られたヒツジ産子におけるヒト iPS 細胞由来の造血系細胞あるいはテラトーマの状態を、長期間に渡って詳細に解析する。また並行して、様々な胎齢のヒツジ胎子肝における、iPS 細胞の生着と造血系分化をサポートする因子について、免疫組織化学分析により解析する。これらの取組みにより、ヒト iPS 細胞が造血系へコミットする *in vivo* 因子(ニッチ)の全体像と詳細を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 移植細胞の分化状態と移植されるヒツジ胎子の胎齢の相互作用に関する解析

これまでの我々のサル ES 細胞を用いたヒツジ胎子内分化誘導実験系により、超音波断層診断装置を用いたエコーガイド法により、移植後の流産を最小限に抑えることが可能となった (Nagao et al., 2009、図 1)。また、移植する細胞の分化状態、移植する細胞数、移植されるヒツジ胎子の日齢と移植部位が幹細胞の造血系あるいはテラトーマへの分化誘導に強く関与することが明らかとなっている (Tanaka et al., 2008)。このうち、移植部位については、造血系への分化誘導を強く支持することが明らかとなった。また、分化の方向性以前に、移植部位に生着するためには、移植する細胞数がある程度以上 ( $1 \times 10^7$  個以上) 必要なことも明らかとなった。これらの知見は、胎子肝からのパラクラインファクターと、移植細胞集団が自ら分泌するオートクラインファクターの双方の重要性を示唆している。そこで本研究では、移植方法を超音波法、移植部位を肝臓、移植する細胞数を  $1 \times 10^7$  個以上、という条件に固定した上で、移植細胞の分化状態ならびに移植するヒツジ胎子の日齢が移植細胞の生着と造血系分化に及ぼす影響について詳細に解析した。

#### 移植細胞の分化段階と移植された後の生着・分化との関連の検討

造血幹細胞の細胞マーカーはいまだはっきりと規定されていない。定義づけには、様々な多面的な解析が必要不可欠である。その中で、細胞表面マーカーである CD34 は、有力な造血系マーカーと考えられてきた。一方、Matsuoka ら(2017)は、マウスの実験系を用いて、CD34 陰性の細胞集団の中に、長期的な造血を担うことのできる真の造血幹細胞が存在することを報告した。今回、この点について、ヒツジ胎子内分化誘導系を用いて検証した。

#### ヒツジ胎子の胎齢と生着・分化との関連の検討

今回は、胎齢 50~60 日前後の種々の日齢のヒツジ胎子へヒト iPS 細胞由来中胚葉系初期分化細胞を移植し、移植した細胞の生着と造血系への分化状態との関連について解析した。また、胎齢と免疫状態の関係を解析するため、キメラヒツジに対し、iPS 細胞と由来が同じリンパ球輸注実験を実施した。

### (2) ヒツジ胎子肝における造血幹細胞ニッチ因子の解析

中胚葉系初期分化ヒト iPS 細胞を移植後の様々な日齢のヒツジ胎子肝を日齢毎にサンプリ

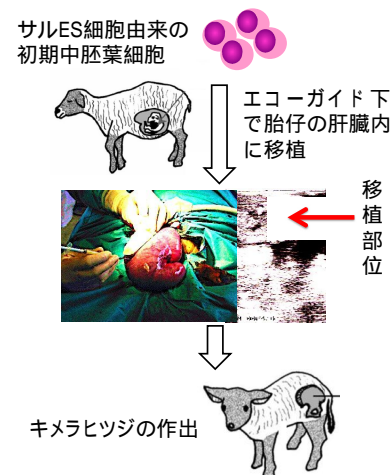


図1. 造血系キメラヒツジ作出法概要

ングし、ヒト細胞とヒツジ胎子肝で発現している幹細胞因子および造血系分化誘導因子について、免疫組織化学的に解析している。

#### <引用文献>

Nagao Y., Abe T., Hasegawa H., Tanaka Y., Sasaki K., Kitano Y., Hayashi S, Hanazono Y. Improved Efficacy And Safety of In Utero Cell Transplantation in Sheep Using An Ultrasound-Guided Method. Cloning and Stem Cells 11: 281-285 (2009).

Tanaka Y., Nakamura S., Shibata H., Kishi Y., Ikeda T., Masuda S., Sasaki K., Abe T., Hayashi S., Kitano Y., Nagao Y., Hanazono Y. Sustained macroscopic engraftment of cynomolgus embryonic stem cells in xenogeneic large animals after in utero transplantation. Stem Cells Dev 17:367-381 (2008).

Matsuoka Y, Takahashi M, Sumide K, Kawamura H, Nakatsuka R, Fujioka T, Sonoda Y. CD34 Antigen and the MPL Receptor Expression Defines a Novel Class of Human Cord Blood-Derived Primitive Hematopoietic Stem Cells. Cell Transplant. 2017 Jun 9;26(6):1043-1058.

#### 4 . 研究成果

##### (1) 移植細胞の分化状態と移植されるヒツジ胎子の胎齢の相互作用に関する解析

###### 移植細胞の分化段階と移植された後の生着・分化との関連の検討

CD 陰性細胞集団について、ヒツジ胎子内分化誘導系を用いて検証した結果、確かに CD34 誕生したヒツジ 4 頭のうち 3 頭において、ヒト造血系細胞の存在を確認することができた (0.6-1.6%)。しかしながら、誕生直後ならびにその後の長期的なキメラ解析において、CD34 陽性細胞含む細胞集団を移植した際のキメラ率 (2.3-6.3%) と差はなかった。この結果は、CD34 陰性細胞集団が、必ずしも真の造血幹細胞あるいはその前駆細胞を含む細胞集団ではないことを示唆している(Abe et al., 2017)。

###### ヒツジ胎子の胎齢と生着・分化との関連の検討

中胚葉系初期分化ヒト iPS 細胞を胎齢 50 - 60 日のヒツジ胎子肝へ移植した結果、10 頭中 9 頭でヒト造血系キメラを確認することができた。キメラヒツジのキメラ率は 0.6-6.3%であった。この結果は、過去の我々のサル ES 細胞を用いた実験結果と同等である。得られたキメラヒツジに対し、リンパ球輸注実験を実施した結果、ヒツジ骨髄内のヒト造血系細胞の比率が 2 - 5 倍向上した。この結果は、移植された初期分化ヒト iPS 細胞がヒツジ胎子肝内で、あるいは生着・分化したヒト造血系細胞がヒツジ生体骨髄内で、一定の免疫的抑制を受けていることを示唆している。

##### (2) ヒツジ胎子肝における造血幹細胞ニッチ因子の解析

現在、中胚葉系初期分化ヒト iPS 細胞を移植したヒツジ胎子肝を様々な日齢でサンプリングし、種々の幹細胞因子および造血系分化誘導因子について検出を試みている。移植されたヒト細胞とヒツジ胎子肝との相互作用の存在が徐々に明らかになってきたが、まだ解析途中である。引き続き解析を進め、得られた結果を原著論文として投稿予定である。結果の詳細については、その後に明記したい。

なお、研究申請・採択当初の計画においては、「ヒト造血系キメラヒツジにおおける SCF によって増強される骨髄内ニッチ因子の解析」と「iPS 細胞の in vitro 造血幹細胞分化誘導系

の確立」についても検討を進める予定であったが、時間の関係で検討を進めることができなかつた。今後、別途研究予算を獲得し、ヒツジ骨髄内の造血系分化誘導因子を解明し、当初、本研究の到達目標としていた「iPS細胞のin vitro造血系分化誘導システムの確立」を成し遂げたいと考えている。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Abe T, Matsuoka Y, Nagao Y, Sonoda Y, Hanazono Y. CD34-negative hematopoietic stem cells show distinct expression profiles of homing molecules limiting engraftment in mice and sheep. *International Journal of Hematology* 106: 631-637 (2017).

DOI :10.1007/s12185-017-2290-5

Tomoyuki Abe, Yutaka Hanazono, Yoshikazu Nagao. A long-term follow-up study on the engraftment of human hematopoietic stem cells in sheep. *Experimental Animals* 63:475-481 (2014). Doi: 10.1538/expanim.63.475

〔学会発表〕(計8件)

阿部朋行、長尾慶和、花園豊 . 子宮内移植法によるヒト/ヒツジ造血キメラの作出 . 第20回日本繁殖生物学会(長野県上田市) . 2018年9月12-16日(抄録集 p.46)

阿部朋行、柴田宏昭、原弘真、魚崎英毅、大貫貴広、竹内絢香、原明日香、ボラジギン・サラントラガ、長尾慶和、花園豊 . 異種移植系における同一ドナー由来リンパ球の影響 第20回日本異種移植研究会(大阪府吹田市) . 2018年3月10日(抄録集 p.41)

Tomoyuki Abe, Hiroaki Shibata, Hideki Uosaki, Hiromasa Hara, Takahiro Ohnuki, Suvd Byambaa, Nawin Chanthra, Borjigin Sarentonglaga, Rika Fukumori, Yoshikazu Nagao, Yutaka Hanazono. Generation of CD45-positive Hematopoietic Cells from Human iPS Cells in Vivo in Ovine Fetal Liver (Poster), The International Society for Stem Cells Research 2017 Annual Meeting, 14-17 June, 2017, Boston, Massachusetts, USA. (Abstracts p.519)

阿部朋行、柴田宏昭、魚崎英毅、原弘真、大貫貴広、スブド・ビャンバー、ナーウィン・ジャントラ、ボラジギン・サラントラガ、福森理加、長尾慶和、花園豊 . ヒトiPS細胞由来造血細胞のヒツジ体内での長期生着 第64回日本実験動物学会総会(福島県郡山市) . 2017年5月25-27日(抄録集 p.270)

阿部朋行、柴田宏昭、魚崎英毅、原弘真、大貫貴広、ボラジギン・サラントラガ、福森理加、長尾慶和、花園豊 . ヒトiPS細胞由来造血細胞のヒツジ体内での長期生着 第19回日本異種移植研究会(京都府京都市) . 2017年2月25日(抄録集 p.31)

阿部朋行、長尾慶和、原明日香、スブド・ビャンバー、柳瀬公秀、ボラジギン・サラントラガ、緒方和子、山口美緒、福森理加、花園豊 . ヒツジ子宮内移植系におけるヒト造血細胞の生着促進・増幅技術の開発 . 第17回日本異種移植研究会講演要旨集 p.16 . 演題番号1(下野市, 2015年3月14日).

柳瀬公秀, 阿部朋行, Suvd Byambaa, 原明日香, 長尾慶和, 花園豊. ヒツジにおけるヒト造血の生着促進技術の開発 第13回自治医科大学シンポジウム講演要旨集 p.25(下野市, 2014年9月5日)

阿部朋行、Suvd Byambaa, 柳瀬公秀、原明日香、長尾慶和、花園豊. Hematopoietic

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：造血系細胞の作製方法  
発明者：花園豊、阿部朋行、長尾慶和  
権利者：自治医科大学、宇都宮大学  
種類：方法の発明  
番号：PCT/JP2016/075743  
出願年月日：平成28年8月26日  
国内外の別：PCT

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

宇都宮大学農学部家畜繁殖生理学研究室

<http://agri.mine.utsunomiya-u.ac.jp/hpj/deptj/ani j/page/nojo.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：福森 理加  
ローマ字氏名：FUKUMORI Rika  
所属研究機関名：宇都宮大学(現所属：酪農学園大学獣医学群)  
部局名：農学部  
職名：助教  
研究者番号(8桁)：60721694

### (2) 連携研究者

研究分担者氏名：花園 豊  
ローマ字氏名：HANAZONO Yutaka  
所属研究機関名：自治医科大学  
部局名：医学部  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：70251264

### (3) 研究協力者

研究分担者氏名：阿部 朋行  
ローマ字氏名：ABE Tomoyuki  
所属研究機関名：自治医科大学  
部局名：医学部  
職名：講師  
研究者番号(8桁)：20610364

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されま

す。