

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21315

研究課題名(和文) ヒツジ体内を介したヒトiPS細胞由来の機能的造血幹細胞の作製・増幅技術の開発

研究課題名(英文) In vivo generation of hematopoietic stem cells from human iPS cells in sheep fetal liver

研究代表者

阿部 朋行(Abe, Tomoyuki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20610364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、動物体内でヒトiPS細胞由来の造血幹細胞を作製することを目指している。本研究は、ヒツジ胎仔肝臓を介してヒトiPS細胞から造血幹細胞を作製することを目的とする。ヒトiPS細胞を造血分化培養し、移植前にブスルファンで処置したヒツジ胎仔の肝臓内に移植した。その結果4頭の産仔が得られ、ヒトiPS細胞由来造血細胞の生着が確認できた。また、産仔へのヒトリンパ球投与により、ヒトiPS細胞由来造血細胞の生着効率を向上させることができた。以上より、ヒツジ胎仔肝臓内の微小環境を介してヒトiPS細胞から造血細胞を作製し、さらにそれを体内増幅することに成功した。今後は、当該ヒツジからヒト造血細胞の取り出しを図る。

研究成果の概要(英文)：Generating hematopoietic stem cells (HSCs) from human iPSCs has been a great challenge. We hypothesized some key environmental factors are missing in vitro. Therefore, we tried in vivo generation of HSCs from human iPSCs. In this study, we generated human/sheep hematopoietic chimera; that is, sheep that have human HSCs derived from human iPSCs. Human iPSCs were cultured on murine stromal OP9 cells with multiple cytokines for 6 days for differentiation to a hematopoietic lineage. The cells were then transplanted into the liver of busulfan-conditioned fetal sheep. The engraftment of human hematopoietic cells was quantitatively evaluated by PCR of colony-forming units. Considering that many researchers have long failed to generate engraftable HSCs from human iPSCs, the data here imply that the acquisition of hematopoietic engraftment ability of human iPSCs may depend on the in vivo microenvironment such as in the fetal sheep liver. We are now taking out human HSCs from the sheep.

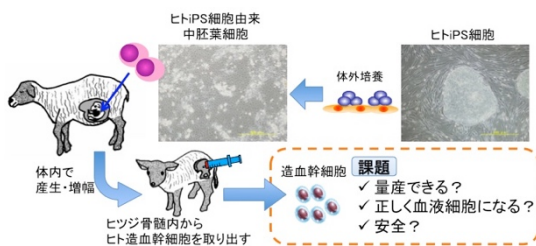
研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞 ニッチ 多能性幹細胞 大型動物 トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

■ヒト iPS 細胞の新規造血分化誘導系
 ~ヒト iPS 細胞由来の造血幹細胞をもつヒツジ~

造血幹細胞の大量生産は、がん治療や細胞移植のために極めて有用である。近年、ES 細胞や iPS 細胞の再生医療への応用が期待されているが、いまだに造血幹細胞への分化誘導には成功していない。一方、申請者らは、妊娠早期 (約 60 日齢、満期は 147 日齢) のヒツジ胎仔が免疫寛容を誘導することを利用し、造血発生の際である胎仔肝臓内でヒト iPS 細胞由来の中胚葉細胞を造血幹細胞に分化させることに成功している。この系を活用し、ヒツジ体内を介してヒト造血幹細胞を大量生産、することを目指す (下図)。



本研究の狙い「ヒツジ体内を介してヒト iPS 細胞から造血幹細胞を作る」
 ヒト iPS 細胞を体外で中胚葉系へ分化させたあとに、ヒツジ胎仔肝臓内に移植する (造血発生の際、免疫寛容を利用する)。生後のヒツジ骨髄内でヒト iPS 細胞由来の造血幹細胞が産生される。この造血幹細胞の医療応用へ向けた課題は、①作製効率、②造血幹細胞としての機能の有無、③安全性の確認、である。

これまで、免疫不全マウスを用いて、ヒト iPS 細胞から三胚葉性奇形腫 (テラトーマ) 中で造血幹細胞を作製する試みがある。しかしながら、テラトーマのサイズが小さいことから量産が困難である (Blood 2012、Mol Ther. 2013)。また、腫瘍から作られる造血幹細胞は造血能が乏しい上、安全性に疑問が残る。さらに、造血幹細胞自体を体外で増やす技術は確立していない。これらに対し、ヒツジ体内を介して造血幹細胞が作製できれば、患者自身の造血幹細胞を必要ときに何回でも得られる、という効果が期待できる。

■現状の課題

ヒツジ体内を介してヒト造血幹細胞を大量生産できるか、正常な造血能を有するか、がん化する危険性はないか、という点が現状の課題である。本研究では、これらの課題に対して、ヒツジ体内におけるヒト造血幹細胞の作製効率の改善と、ヒト造血幹細胞の機能・性状解析を目指す。

■効率的にヒト造血幹細胞を作るための「生着促進法」

申請者らは、臍帯血 CD34 陽性細胞を造血幹細胞として使い、次の研究を行ってきた。ヒツジ胎仔へ移植する前・中 (移植時)・後の 3 段階で、メカニズムの異なる処置を加えることにより、ヒツジ骨髄でのヒト造血幹細胞の生着効率を改善することに成功している。

すなわち、

(1) “移植前”にヒツジ造血系を抑制
 造血器腫瘍の化学療法剤であるブスルファンを、移植前のヒツジ胎仔へ投与して、ヒツジ造血系を抑制した。その結果、ヒト造血幹細胞の生着スペースが拡がり、ヒト造血比率ならびにヒト造血幹細胞をもつヒツジの作出効率を向上できた (Abe et al., 2012)

(2) “移植時”にヒト由来細胞を刺激
 造血幹細胞の自己複製遺伝子である HoxB4 を一過性発現させることで、造血幹細胞を増幅し、ヒト造血比率を約 5 倍に上昇させた (Abe et al., 2011)

(3) “移植後”にヒツジ造血系の抑制・ヒト由来細胞の刺激

ヒト臍帯血由来リンパ球やヒトサイトカインを投与することにより、ヒツジ造血系を抑制しつつ、ヒトまたはサル造血幹細胞を刺激した結果、ヒト造血比率を 2-10 倍に向上できた (申請者のグループ, 2005)

また、ヒツジ体内でヒト造血幹細胞を 3 年以上維持できることを示した (Abe et al., 2014、2015)。

現状では、ヒト造血幹細胞の作製効率は推定で約 10 万個の細胞中に 1 個と極めて低い。これに対して、ヒト iPS 細胞由来の造血幹細胞をもつヒツジに「生着促進法」を用いれば、造血幹細胞の作製効率の向上、ヒト造血幹細胞をヒツジ体外へ分離しやすくなることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、①ヒト由来細胞の刺激および②ヒツジ造血系の抑制を主体とする「生着促進法」によって、ヒト造血幹細胞をヒツジ体内で増幅し、大量作製する技術の開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究の実施にあたっては、自治医科大学医学部 花園豊 教授ならびに宇都宮大学農学部 長尾慶和 教授の協力を得た。

(1) ヒツジ胎仔肝臓内への細胞移植
 ヒト iPS 細胞を OP9 細胞とサイトカイン存在下で 6 日間培養し、移植に用いた。陽性対照群として、臍帯血 (理研 BRC) 由来の CD34 陽性細胞を用いた。それぞれの細胞は、移植 6 日前にブスルファンで前処置したヒツジ胎仔 (胎齢 47-63 日、満期 147 日) の肝臓内に移植した。移植手技は、子宮壁越しに超音波ガイド下で胎仔の肝臓を把握しながら、細胞を注入する方法 (Nagao, Abe et al., 2009) を用いた。移植後、妊娠満期 (約 147 日齢) で自然分娩させ、産仔を得た。このとき、以下の「生着促進法」を用いた。すなわち、

● “移植前”にヒツジ造血系を抑制：移植前

のブスルファン処置

移植 6 日前に母体ヒツジ静脈内にブスルファン 3 mg/kg を投与することで、ヒツジ胎仔肝臓内の造血系（内因性造血）を抑制した。

- “移植後”にヒツジ造血系の抑制・ヒト由来細胞の刺激：産仔へのリンパ球投与
ヒト iPS 細胞の由来となったリンパ球または臍帯血のリンパ球を増幅培養し、生後 2-6 ヶ月のヒツジ産仔に対して $4.8 - 12.9 \times 10^7/\text{kg}$ を静脈内投与した。その後、全身状態を観察しつつ経時的に末梢血・骨髓を採取した。

当初、移植時に HoxB4 遺伝子をヒト iPS 細胞由来造血細胞に一過性発現させることを検討した。しかしながら、造血分化培養中にヒト iPS 細胞へ HoxB4 遺伝子を一過性発現させても、造血幹細胞マーカーである CD34 の陽性率を向上させることはできなかった。このことから、HoxB4 の一過性発現によるヒト iPS 細胞の造血分化誘導における促進的な効果を見出すことができなかった。したがって、今回のヒツジ胎仔への移植実験には用いなかった。

産仔の骨髓を経時的に採取し、骨髓細胞由来の造血コロニーをサンプルとしたコロニー PCR 解析により、ヒト造血比率を算定した。これらの手技は、申請者がすでに確立し、論文発表している (Abe et al., 2014, 2012, 2011)。

(2) 倫理面の配慮

(a) 生命倫理

ヒト iPS 細胞の作製、ならびにヒト臍帯血の使用について以下の通り承認を得た。

- 「iPS 細胞の作製」、花園豊申請、自治医科大学 平成 29 年 5 月 29 日更新 (許可番号：臨大 17-変 063 号、平成 33 年 3 月 31 日まで)
- 「造血幹細胞移植治療の効率化をめざす研究」、花園豊申請、自治医科大学 平成 29 年 5 月 29 日承認 (許可番号：臨大 17-変 064、平成 33 年 3 月 31 日まで)
- 「ヒツジ胎仔内微小環境を利用した霊長類幹細胞の分化誘導法の確立」、長尾慶和申請 宇都宮大学 平成 29 年 8 月 30 日更新 (許可番号：H17-0022 号、平成 34 年 3 月 31 日まで)

(b) 遺伝子組換え実験

本研究で行われる組換え DNA 実験は、以下の通り承認を得た。ヒト iPS 細胞の作製は自治医科大学再生医学研究部 (P2 に対応可) で実施し、ヒツジの飼養管理は宇都宮大学農学部附属農場 (P1A に対応可) で行った。

- 「大型動物を利用する幹細胞操作技術の開発」、阿部朋行申請、自治医科大学 平成 28 年 3 月 30 日更新 (許可番号：16-37 号)

- 「幹細胞を利用する再生医療の基盤作技術の開発」、花園豊申請、自治医科大学 平成 28 年 3 月 30 日更新 (許可番号：16-36 号)
- 「ヒツジ胎仔内微小環境へ移植した GFP 導入ヒト iPS 細胞由来造血系細胞の動態解析」、長尾慶和申請、宇都宮大学 平成 29 年 9 月 26 日更新 (許可番号：D17-0005 号、平成 34 年 3 月 31 日まで)

(c) 動物実験倫理

本研究ではヒツジへの外科的処置が必須となることから、動物福祉または動物実験倫理への十分な配慮が必要である。ヒツジを用いる実験は、以下の通り承認を受けた。

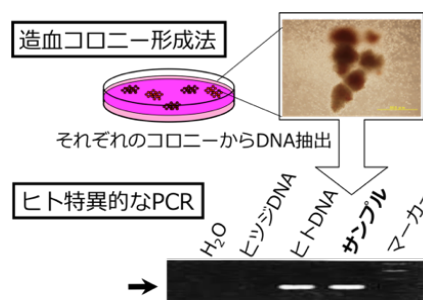
- 「ヒツジを利用する幹細胞研究」、花園豊申請、自治医科大学 平成 29 年 3 月 30 日更新 (許可番号：17174 号)
- 「ヒツジ胎仔内微小環境を利用した霊長類幹細胞の分化誘導法の確立」、長尾慶和申請、宇都宮大学 平成 29 年 8 月 25 日更新 (許可番号：A17C-0013 号、平成 34 年 3 月 31 日まで)

4. 研究成果

本研究では、(1) 移植前のブスルファン投与、(2) 産仔へのリンパ球投与によって、ヒト造血細胞の生着率を向上できるかどうか、検討を行った。その結果は以下に示す通りである。

(1) 移植前のブスルファン処置

ブスルファンを投与した後にヒト iPS 細胞を移植した群では、4 頭中全頭でキメラ産仔が得られ (100%)、そのヒト造血比率は 2.3-6.3% だった。ヒト造血比率の産出には、造血コロニー PCR 法を用いた (下図)。



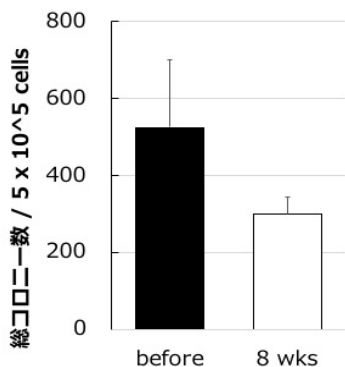
ヒト iPS 細胞移植群中で、3 頭において移植手技が原因と思われる流産が起きたため、産仔が得られなかった。また、臍帯血 CD34 陽性細胞を移植した群では 6 頭中全頭でキメラ産仔が得られ (100%)、ヒト造血比率は 1.1-2.3% だった。1% のヒト造血比率を獲得するために必要な CD34 陽性細胞数を算出すると、両群ともほぼ同数の細胞数が必要という結果から、ヒト iPS 細胞由来造血細胞は臍帯血 CD34 陽性細胞と同等の造血生着能を

もつことが示された。一方、ブスルファンを投与せずに臍帯血 CD34 陽性細胞を移植した群では、6 例中いずれもヒト造血キメラヒツジは得られなかった (0%)。

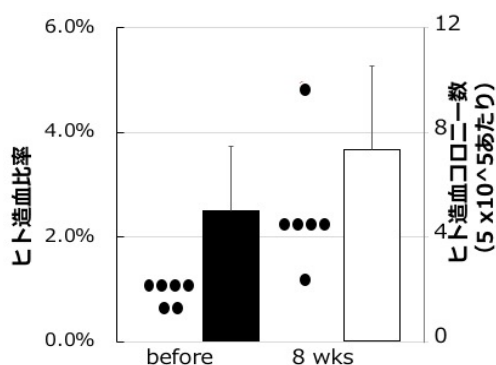
以上のことから、移植前にブスルファン 3 mg/kg を投与することにより、ヒト造血キメラヒツジの作出効率を向上させることができた。また、ヒト iPS 細胞移植群では、陽性対照区である臍帯血と同等の生着効率を得ることができた。

(2) 産仔へのリンパ球投与

造血コロニー形成法を用いて骨髓中の造血前駆細胞 (colony-forming unit, CFU) 数を計測し、造血コロニー PCR 法を用いてヒト造血前駆細胞数を評価した。その結果、総 CFU 数は投与前に比べてリンパ球投与 8 週間後で有意に減少した (下図)。



一方、ヒト造血前駆細胞数は、投与前に比べてむしろ高い傾向だった (下図)。



これらのことから、内因性造血の抑制が起き、ヒト造血細胞への生着スペースが拡張した結果、ヒト造血前駆細胞数が多少増えたことが示唆された。

以上の生着促進法により、ヒト造血細胞をもつヒツジの作製効率を向上し、ヒツジ体内でヒト造血細胞を増幅させることに成功した。しかしながら、いずれの方法を用いても、ヒト造血細胞をヒツジ体外へ取り出すような効率、すなわちフローサイトメトリー等によって分離可能なヒト造血比率であるおおよそ 1,000 個に 1 個程度まで、ヒト造血細胞

数を向上させることはできなかった。

今後は、ヒツジ胎仔体内においてヒト iPS 細胞由来造血分化細胞が造血幹細胞に変化するまでの動態やメカニズムを明らかにし、ゲノム編集法を組み合わせることで、より効率的にヒト造血幹細胞を作り出せるような技術の開発を試みる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Osada N, Kikuchi J, Umehara T, Sato S, Urabe M, Abe T, Hayashi N, Sugitani M, Hanazono Y, Yusuke Furukawa. Lysine-specific demethylase 1 inhibitors prevent teratoma formation of human iPS cells. *Oncotarget*. 2018;9(5):6450-6462. doi: 10.18632/oncotarget.24030.
- ② Hara A, Abe T, Hirao A, Sanbe K, Ayakawa H, Sarantonglaga B, Yamaguchi M, Sato A, Atchalalt K, Ogata K, Fukumori R, Sugita S, Nagao Y. Histochemical properties of bovine and ovine mammary glands during fetal development. *J Vet Med Sci*. 2018;80(2):263-271. doi: 10.1292/jvms.17-0584.
- ③ Hara H, Shibata H, Nakano K, Abe T, Uosaki H, Ohnuki T, Hishikawa S, Kunita S, Watanabe M, Nureki O, Nagashima H, Hanazono Y. Production and rearing of germ-free X-SCID pigs. 2017 *Exp Anim. in press*
- ④ Abe T, Matsuoka Y, Nagao Y, Sonoda Y, Hanazono Y. CD34-negative hematopoietic stem cells show distinct expression profiles of homing molecules that limit engraftment in mice and sheep. *Int J Hematol*. 2017;106:631-637. doi:10.1007/s12185-017-2290-5.
- ⑤ Abe T, Kono S, Ohnuki T, Hishikawa S, Kunita S, Hanazono Y. A Swine Model of Acute Thrombocytopenia with Prolonged Bleeding Time Produced by Busulfan. 2016 *Exp Anim*. 2016;65(4):345-351. doi:10.1538/expanim.16-0022

[学会発表] (計 4 件)

- ① 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)
- ② 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)

- ③ **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)
- ④ (優秀発表賞) **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)

[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：単なる方法の発明
番号：PCT/JP2016/075743
出願年月日：平成 28 年 8 月 26 日
国内外の別：PCT

[その他]

自治医科大学再生医学研究部
<http://www.jichi.ac.jp/saisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 朋行 (ABE Tomoyuki)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：20610364

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

花園 豊 (HANAZONO Yutaka)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：70251246

長尾 慶和 (NAGAO Yoshikazu)
宇都宮大学・農学部・教授
研究者番号：70291953