

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591277

研究課題名（和文） ヒト胚性幹細胞を用いた胎児期造血の発達の解明

研究課題名（英文） Analysis of the development of fetal hematopoiesis using embryonic stem cell

研究代表者

氏名（アルファベット） 海老原 康博（EBIHARA YASUHIRO）

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号 40302608

研究成果の概要：

ヒト胎生期の造血発達の解明を目的として、胎生期の未分化な多能性幹細胞であるヒト胚性幹細胞(ES細胞)から血液細胞への分化を再現することを試みた。そのためには、胎生期の造血環境を実験的に再構築することが重要と考えた。そこで、哺乳類の胎生期造血は肝臓で劇的に増幅するため、マウス胎子の肝臓の造血環境を反映するストローマ細胞を樹立し、ES細胞と共培養したところ、血液細胞へ分化誘導することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：小児血液学・幹細胞生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：ヒトES細胞、胎生期造血、胎児肝、ストローマ細胞、CD34+細胞、CD45+細胞、GPA+細胞、造血前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト胎生期における造血機構の発達の研究は、正常胎児の発達の理解ばかりでなく、母体環境の胎児造血に及ぼす影響の解明、先天性の造血障害や造血器腫瘍の病因解明のためにも、極めて重要な課題であるにもかかわらず、ヒト胎児の詳細な研究が倫理的に困難であることから、国内外を問わず、その研究は現在まで全く進んでいなかった。

(2) 1998年に、世界で始めてヒトES細胞が樹立され、その胎生期医学への応用が期待されていた。

(3) 我々は、それまでに哺乳類の胎生期造血の発達を研究してきたことより、胎生期の造血環境を *in vitro* で構築し、胎生期に起源を有する多能性幹細胞であるヒトES細胞を

そうした環境下で培養することにより、胎生期造血が *in vitro* で再現できるのではないかと考えた。そのため、胎生期の造血組織からストローマ細胞を樹立し、ヒト ES 細胞と共培養することを考えた。

(4) 当然のことながら、ヒト胎児を実験的に用いることは倫理的に許されないが、マウス由来のストローマ細胞の多くがヒト造血を指示することが報告されていたので、マウス胎仔の造血組織からストローマ細胞を樹立し、ヒト ES 細胞との共培養を計画した。

2. 研究の目的

胎生期に由来する多能性幹細胞であるヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導法を開発し、その分化過程を解析し、胎生期造血の発達機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) マウス胎仔のマウス胎仔の AGM(aorta-gonad-mesonephros) 領域、肝臓などの造血組織からストローマ細胞を樹立する。

(2) 樹立されたストローマ細胞とヒト ES 細胞を共培養する。

(3) 共培養されたヒト ES 細胞の分化を解析する。

RT-PCR による種々の分化マーカーの検討

フローサイトメトリーによる血液細胞マーカーの検討

血液細胞コロニー法による血液細胞への分化の検討

免疫不全 Nod-scid マウス移植系による造血幹細胞活性の検討

(4) ヒト ES 細胞から分化誘導された赤血球の解析

赤血球に発現しているヘモグロビンの解析

赤血球の酸素結合能の検討

赤血球の G6PD 活性の検討

4. 研究成果

(1) ヒト ES 細胞から造血細胞への分化誘導

胎生 14~15 日のマウス胎仔肝からストローマ細胞を培養し、ヒト ES 細胞を樹立されたストローマ細胞と共培養することを試みた。

この共培養系においては、培養 2~3 日間は、ヒト ES 細胞は未分化な形態を維持しつつ増殖を続けたが、培養 3~5 日目頃より分化を開始した。培養 11~12 日目頃には、cobble stone area(CSA) が出現し、その数は次第に増加した。CSA に含まれる cobble stone-like cell (CS 細胞) は、CD34 を発現し、血管内皮細胞と血液細胞への分化能を保持していた。

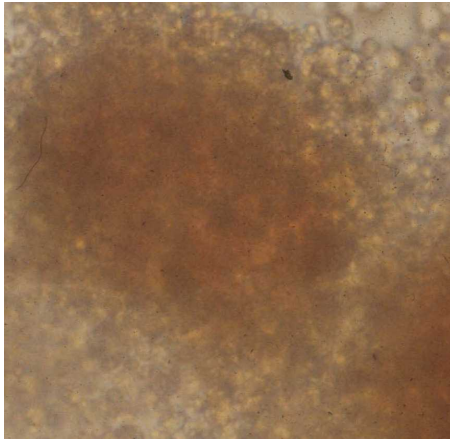
特にこれらの CS 細胞を、エリスロポエチン、トロンボポエチン、interleukin (IL) -3、IL -6、SCF (stem cell factor)、G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) 存在下で、コロニー培養すると、赤血球コロニー、顆粒球・マクロファージコロニー、混合コロニー (図 1) 等、様々な血液細胞コロニーが形成された (雑誌論文)。

以上の結果は、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞を用いた共培養系により、ヒト ES 細胞から、多能性造血前駆細胞を含む種々の造血前駆細胞が分化誘導されたことを示している。

図 1

ヒト ES 細胞から分化誘導された多能性造血前駆細胞を血液細胞コロニー培養すること

により形成された混合コロニー



(2)ヒト ES 細胞由来赤血球の解析

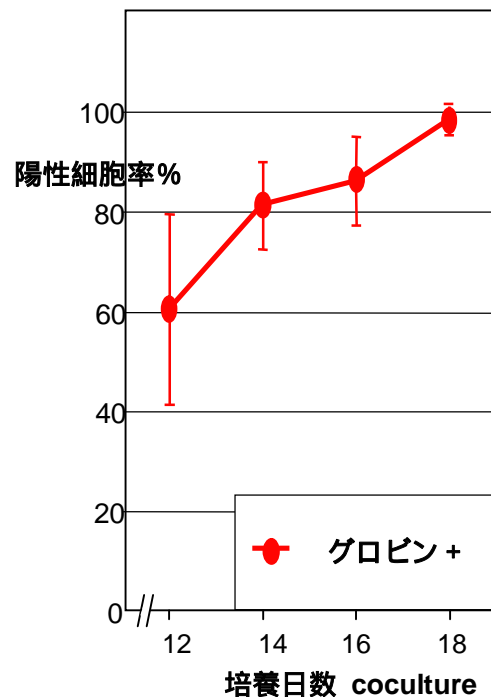
マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と2週間共培養したヒト ES 細胞を血液細胞コロニー培養したところ、培養 14 日目には赤血球から成る赤血球コロニーが形成された。そこで、赤血球コロニーに含まれる赤血球で発現されているグロビンのタイプを免疫細胞染色により検討すると、培養 14 日目の赤血球コロニーでは 100%の赤血球が 及び グロビンを発現していた。グロビンを発現する赤血球は約 60%であったが、培養期間を延長することにより、培養期間依存的に グロビンを発現する赤血球の比率は上昇し、培養 18 日目にはほぼ 100%の赤血球で グロビンを発現していた(図 2)。この結果は、我々の確立した分化誘導法により産生される赤血球では、コロニー培養 14 日目には全ての赤血球が 及び グロビンからなる胎児型ヘモグロビン(Hb F)を合成している一方、及び グロビンからなる成人型ヘモグロビン(Hb A)は約 60%で合成されており、その後培養期間を延長することにより、ほとんど全ての赤血球が Hb A を合成するようになったことを示している。また、ヒト ES 細胞から分化誘導された赤血球の酸素結合能を検

討してみると、その酸素結合能は、成人末梢血赤血球よりも臍帯血赤血球に類似していた。(雑誌論文)

以上のことより、ヒト ES 細胞由来の赤血球造血は胎児期造血を反映しており、我々の開発したヒト ES 細胞から血液細胞へ分化誘導系は、胎生期造血のよい in vitro モデルとなると考えられた。

図 2

ヒト ES 細胞由来赤血球における グロビン陽性細胞の比率



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 17 件)

Ebihara Y. Identification and clinical application of fibroblasts/myofibroblasts derived from hematopoietic stem cells. Japan J Pediatr Hematol. 22:1-6,2008 査読有

Ma F, Tsujii K (他 13 名、13 番目) Direct development of functionally mature

tryptase/ chymase double positive tissue-type mast cells from primate ES cells. Stem Cells 26: 706-714, 2008. 査読有

Ma F, Ebihara Y, Tsuji K (他8名、2番目) Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. Proc Natl Acad Sci USA, 105:13087-13092, 2008 査読有

Mizutani T, Tsuji K, Ebihara Y (他3名、3番目) Homeostatic erythropoiesis by the transcription factor IRF2 through attenuation of type I interferon signaling. Exp Hematol 36: 255-264, 2008 査読有

Konuma T, Ebihara Y, Tsuji K (他5名、10番目) Cardiovascular toxicity of cryopreserved cord blood cell infusion. Bone Marrow Transplant. 41:861-865, 2008 査読有

Kulkeaw K, Tsuji K (他4名、5番目): Application of whole mouse embryo culture system on stem cell research. Stem Cell Rev & Rep, 掲載確定 査読有

海老原康博: 造血幹細胞由来線維芽細胞および筋線維芽細胞の同定とその臨床応用 日本小児血液学会会誌 22: 1-6, 2008 査読有

辻浩一郎: 胎児造血とヒトES細胞からの血液の産生 日本小児科学会雑誌 112: 1654-1662, 2008 査読無

辻浩一郎: ヒトES細胞からの血液細胞の産生 人工血液、掲載確定 査読無

辻浩一郎: iPS細胞からの血液誘導 臨床検査、掲載確定 査読無

Sugiyama D, Ogawa M, Tsuji K (他9名、12番目) B cell can be obtained from pre-circulatory yolk sac, but with low frequency. Dev Biol 301: 53-61, 2007. 査読有

Ma F, Wang D, Hanada S, Ebihara Y, Tsuji K (他4名、4番目) Novel method for efficient production of multipotential hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells. Int J Hematol 85:371-379, 2007. 査読有

Ebihara Y, Manabe A, Tsuji K (他6名、

1番目) The effect of donor leukocyte infusion (DLI) on refractory pure red blood cell aplasia after allogeneic stem cell transplantation in a patient with myelodysplastic syndrome developing from Kostmann syndrome. Int J Hematol 86: 446-450, 2007. 査読有

辻浩一郎: 末梢血幹細胞 血液・腫瘍科 55(Suppl.5): 15-19, 2007 査読無

辻浩一郎: がん治療とアフェレシス 日本アフェレシス学会雑誌 26:226-227, 2007 査読無

辻浩一郎: 造血幹細胞から赤血球への分化 膜 32: 155-162, 2007 査読有

辻浩一郎: 人工血液 チャイルドヘルス 10: 42-43, 2007 査読無

[学会発表](計10件)

海老原康博、馬峰、花田佐智代、富澤大輔、辻浩一郎、小野田春男、小柳津直樹
ヒトES細胞維持能を有するヒトES細胞由来ストローマ細胞 第8回日本再生医療学会 2009,3,5 東京

海老原康博、辻浩一郎、佐藤亜紀、加藤せい子、門間文彦、小沼貴晶、塚田信弘、大井淳、高橋聡、東條有伸、浅野茂隆 15-20歳の思春期症例に対する臍帯血移植の検討 第31回日本造血細胞移植学会 2009,2,5 札幌

S. Hirabayashi, A. Manabe, S. Watanabe, Y. Zaike, M. Tsuchida, Masunaga A, A. Yoshimi, M. Ito, A. Kikuchi, K. Tsuji, A. Ohara, S. Kojima, T. Nakahata. Myelodysplastic Syndrome (MDS) and Myeloproliferative Disease (MPD) in Children: A prospective Registration of 222 Cases. 15th annual meeting of American Society of Hematology 2008,12,7 San Francisco, USA

海老原康博、馬峰、花田佐智代、辻浩一郎、小野田春雄、小柳津直樹 異種動物血清を用いないヒトembryonic stem cell(hESC)から間葉系幹細胞(MSC)への分化誘導 第70回日本血液学会 2008,10 京都

Tsuji K Differential production of connective tissue-type and mucosal mast cells from human embryonic stem cells for anti-allergy drug screening, st International Conference on Drug Design &

Discovery 2008.2,7 dubai

Ebihara Y, Umeda K, Sakai H, Hanada S, Zhang H, Tsuchida E, Nakahata T, Nakauchi H, Tsuiji K Clonal analysis of progressive maturation of erythroid cells from human embryonic stem cell derived definitive hematopoiesis. 49th annual meeting of American Society of Hematology 2007.12,9 atlanta

真部淳、土田昌宏、在家裕司、増永敦子、菅原祥子、吉美礼美、伊藤雅文、辻浩一郎、菊地陽、中畑龍俊 小児 MDS のセントラルレビュー-435 例の解析 日本血液学会 2007 2007.10,13 横浜

馬峰、海老原康博、中畑龍俊、中内啓光、辻浩一郎 ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導 日本血液学会 2007 2007.10,12 横浜

本田浩章、馬峰、小川秀明、山崎憲政、奥田司、辻浩一郎、宮崎和子 IRES による AML1 発現は胎生期における末梢血管形成および二次造血に必須である。 日本血液学会 2007 2007.10,12 横浜

Ma F, Ebihara Y, Hanada S, Sakai H, Tsuchida E, Nakahata T, Nakauchi H, Tsuiji K eneration of human embryonic stem cell derived erythroid cells with functional maturity 36th Annual scientific meeting of International Society of Experimental Hematology 2007, 9,30 humberg

〔図書〕(計 2 件)

辻浩一郎：幹細胞をめぐる現状と展望 Annual Review 呼吸器 2007、工藤翔二、土屋了介、金沢実、大田健編、中外医学社(東京)：1-6、2007 246 p

辻浩一郎：遺伝子治療 新小児がんの診断と治療、別所文雄、杉本徹、横森欣司編、診断と治療社(東京)：175-178、2007 374 p

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/>
東京大学医科学研究所ホームページ

<http://www.natureasia.com/A-IMBN/article.php?id=168>

A-IMBN Rearch (by Asian Pacific International Molecular Biology Network)
Highlights: "Turning stem cells into Blood", on 17 December 2008.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

海老原 康博 40302608
(東京大学・医科学研究所・助教)

(2)研究分担者

辻 浩一郎 50179991
(東京大学・医科学研究所・准教授)