

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390296
 研究課題名（和文） 繊維芽細胞由来 ES 様細胞（iPS 細胞）を用いた造血・免疫細胞作成の基盤技術開発
 研究課題名（英文） Generation of hematopoietic cells and immune cells from iPS cells
 研究代表者
 平家 俊男（HEIKE TOSHIO）
 京都大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：90190173

研究成果の概要（和文）：

マウス iPS 細胞において、マウス ES 細胞と同様に Flk-1 陽性細胞が造血系、血管系への分化能を有するへマンギオブラストに相当することを明らかにし、赤血球への分化を誘導、機能評価を行った。ヒト iPS 細胞からは成熟好中球への分化誘導系を確立し、得られた iPS 細胞由来好中球が形態、機能的に好中球としての特徴を備えており、骨髄における造血と同様の分化過程をとることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

In murine iPS cells, we identified the Flk-1(+) cells as the hemoangiogenic progenitors, “hemangioblasts”, differentiated mature erythrocytes and analyzed their functions. We also established a neutrophil differentiation system from human iPS cells. The iPS cell-derived neutrophils were equipped with morphological and functional characteristics of mature neutrophils and traced the differentiation process similar to bone marrow hematopoiesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
平成21年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
平成22年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ES 細胞、iPS 細胞、繊維芽細胞、再生医学、造血・免疫細胞

1. 研究開始当初の背景

われわれの臓器には、組織特異的な幹細胞が存在し、それぞれの臓器の再生・維持を担っている。この組織幹細胞を活用した種々難治性疾患に対する再生医療の構築が模索されている。しかし、組織幹細胞の体内における

動態・体外における人為的制御に関する知見は不足している。多くの臨床的実績を積み上げてきた造血幹細胞においてさえも、それらの知見を駆使した安定した造血幹細胞の供給には至っていない。また、造血幹細胞に由来する安全な赤血球、血小板、好中球等の作

成基盤技術開発が試みられているが、その実現には解決すべき問題が山積している。さらに、ヒトにおいては、神経幹細胞のように、入手が困難な組織幹細胞が多く存在し、研究の糸口をつかむのにさえ難渋しているケースもあり、有効性、安全性の担保を必要とする再生医療の構築には困難を伴っている。このような状況の中、近年マウスにおいて、体細胞より ES 細胞に匹敵する多分化能、自己複製能を有する幹細胞の作成が報告された。この iPS 細胞を用いた再生医療の構築は、社会的、倫理的な問題をクリアした形で、患者さん個人に特化したヒト ES 細胞様細胞の使用が可能となり、その展開には、国内外より大きな注目と期待が寄せられている。しかし、ヒトへの応用の実現には、ヒト iPS 細胞の樹立、特定系列への分化系の確立、有効性、安全性の確認といった大きな解決すべき問題が存在する。

2. 研究の目的

- (1) ヒト iPS 細胞の作成技術の開発を行う。
- (2) 我々がサル ES 細胞を用いて報告してきたと同様に、マウス・ヒト iPS 細胞より造血幹（前駆）細胞を同定することができるかどうか検討を行い、さらにその分子生物学的機構を明らかにする。
- (3) 造血幹（前駆）細胞のみならず、分化細胞としての赤血球、好中球、血小板等の血球細胞の作製について、マウス・ヒト iPS 細胞を用いて検討し、さらにその機能評価を *in vitro*, *in vivo* にて行う。
- (4) 上記で作成した造血幹（前駆）細胞、血球細胞について、その有効性、安全性を NOG マウスを用いて検討する。

3. 研究の方法

- (1) マウス iPS 細胞をマウスストローマ細胞である OP9 細胞との共培養により分化させる

ことにより出現する Flk-1 陽性、陰性の分画を分取し、それぞれの分画からの造血系、血管系への分化能を評価した。ヒト iPS 細胞については VEGF 存在下に OP9 細胞との共培養により分化させ、VEGFR2, CD34 の陽性、陰性の分画を分取し、それぞれの分画からの血球の分化効率を比較した。

(2) 上記の方法により分取した細胞をさらに種々の血球分化の目的に合わせたサイトカインを添加して OP9 細胞と共培養することにより、種々の成熟血球の分化誘導を行った。さらにそれらの血球について、その微細構造を含む形態の観察、*in vitro* での機能評価等を行った。

4. 研究成果

(1) マウス iPS 細胞を用いて、我々がマウス ES 細胞で確立してきた知見について再評価を行った。その結果、マウス iPS 細胞においても ES 細胞と同様に Flk-1 陽性細胞が造血系、血管系への分化能を有するヘマンギオブラストに相当することを明らかにした。また、この Flk-1 陽性分画の細胞を分取しコロニーアッセイを行った結果、赤血球、好中球、巨核球のコロニーを形成することを明らかにした。また、この Flk-1 陽性分画の細胞をエリスポエチン等のサイトカイン存在下に OP9 細胞と共培養することにより赤血球分化を誘導した。その結果、胎児型赤血球から脱核を伴う成体型赤血球へ分化すること、その機能として酸素結合能等を有していることを確認した。これらの結果は、マウス iPS 細胞においてもマウス ES 細胞で示されてきたと同様の分化過程を経て血球への分化が起こることを示したものであり、iPS 細胞を用いた再生医療や疾患解析の基盤となる成果であると考えられる。

- (2) ヒト iPS 細胞においてもまず、我々がサ

ル ES 細胞で確立してきた知見について検討を行った。その結果、サル ES 細胞と同様に VEGFR2, CD34 共陽性の細胞から血球が効率よく分化することを明らかにした。成熟血球については、ヒト iPS 細胞では成熟好中球の分化について研究を行った。上記で同定した VEGFR2, CD34 共陽性の細胞を分取し、G-CSF 等のサイトカインの存在下に OP9 細胞との共培養を行うことで好中球への分化を誘導した。得られた iPS 細胞由来好中球は形態的に好中球顆粒等の微細構造まで備えており、好中球の基本的機能としての遊走能、貪食能、殺菌能を備えていることを in vitro で確認した。また、好中球の分化過程に働く転写因子等の遺伝子発現について RT-PCR で確認したところ、骨髄における造血と同様の発現パターンをとることを確認した。これらはヒト iPS 細胞から成熟好中球への分化とその機能評価、分化過程の解析について詳細に検討した初めての報告であり、ヒト iPS 細胞を用いた再生医療や好中球に異常を来す疾患の病態解析に重要な役割を果たす成果であると考えられる。

本研究の実施期間中にヒト iPS 細胞の樹立が報告され、その後各種疾患患者からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立の報告が相次いでいる。今回我々が明らかにしたマウス、ヒト iPS 細胞についての知見はこれらの疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態の再現、解析における基盤となるものであり、今後はこれらをもとにして種々の小児疾患の疾患特異的 iPS 細胞について研究を進めていく。また、疾患特異的 iPS 細胞への応用を考えた際に iPS 細胞からの成熟血球への分化系についてもさらなる効率化、簡便化が必須であり、これによって NOG マウスを用いた in vivo の評価も可能になると考えられる。今後はこの点についても研究を進めていく。

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 6 件)

1. Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Fujino H, Matsubara H, Adachi S, Suemori H, Nakahata T, Heike T. Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *J Cell Physiol*. 226(5):1283-91 2011 査読有り
2. Kaichi S, Hasegawa K, Takaya T, Yokoo N, Mima T, Kawamura T, Morimoto T, Ono K, Baba S, Doi H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T. : Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice. *Cardiovasc Res*. 88 : 315-322, 2010 査読有り
3. Mizuno Y, Chang H, Umeda K, Niwa A, Iwasa T, Awaya T, Fukuda S, Yamamoto H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T: Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J* 24:2245-53 2010 査読有り
4. Niwa A, Umeda K, Chang H, Saito M, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T: Orderly hematopoietic development of induced pluripotent stem cells via Flk-1(+) hemoangiogenic progenitors. *J Cell Physiol* 221:367-377, 2009. 査読有り
5. Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukuda S, Yamamoto H, Motohashi N, Suzuki Y, Takeda S, Heike T, Nakahata T: Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J* 23:1907-19, 2009 査読有り
6. Nagao K, Ohta T, Tahara T, Hasiwara T, Naeda Y, Yoneyaya T, Sohma Y, Heike T, Nakahata T, Inagaki Y, Nishikawa M: Expression profile analysis of aorta-gonad-mesonephros region-derived stromal cells reveals genes that regulate hematopoiesis. *Biochem Biophys*

Res Commun 377:205-209, 2008 査読
有り

[学会発表] (計1件)

1. Morishima T, Watanabe K, Niwa A,
Fujino H, Adachi S, Nakahata T,
Heike T: Neutrophil
differentiation from human
induced pluripotent stem
(iPS) cells for disease
investigation. The 72nd Annual
Meeting of the Japanese Society of
Hematology 2010. 9. 25
Yokohama, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平家 俊男 (HEIKE TOSHIO)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90190173

(2) 研究分担者

梅田 雄嗣 (UMEDA KATSUTSUGU)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：80397538

馬場 志郎 (BABA SHIRO)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：60432382

加藤 竹雄 (KATO TAKEO)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：60422945

藤野 寿典 (FUJINO HISANORI)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70532604

(3) 連携研究者

なし