

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790240
 研究課題名（和文）胚性幹細胞から樹立した赤血球前駆細胞株による脱核赤血球大量生産系の開発
 研究課題名（英文）Mass production of enucleated erythrocyte from erythroid progenitor cell lines.
 研究代表者
 寛山 隆 (Hiroyama Takashi)
 独立行政法人理化学研究所・細胞材料開発室・専任研究員
 研究者番号：50373361

研究成果の概要（和文）：

本研究課題においては、マウス赤血球前駆細胞株（MEDEP）を用いて脱核赤血球産生の効率的培養方法を開発し、赤血球膜タンパク質（GPC）、Rac-WAVE2シグナルが赤血球前駆細胞の脱核に関与していることが示唆された。またROCK阻害剤を用いることにより、ヒトES、iPS細胞から効率的な血液細胞誘導系を開発した。しかしながら長期培養によるヒト赤血球前駆細胞株の樹立には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we developed a method that enables to produce enucleated erythrocyte efficiently from mouse erythroid progenitor cell lines (MEDEP). And it was indicated that erythroid membrane protein, GPC and Rac-WAVE2 signaling pathway have important rolls in enucleation process. In addition, a culture method using a ROCK inhibitor, by which hematopoietic cells can be induced from human ES or iPS cells, was developed. However, human erythroid progenitor cell line has not been established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：1) ES 2) iPS 3) 赤血球 4) 細胞株 5) MEDEP 6) WAVE2 7) Rac 8) ROCK

1. 研究開始当初の背景

胚性幹（ES）細胞は全身のあらゆる組織の細胞に分化することができる能力を持った細胞であり、

ヒトES細胞を用いて移植可能な細胞・臓器を作成するという再生医療が期待されている。近年、ヒトES細胞から誘導した神経細胞を動物へ移植し生体内で機能し得ることや、誘導した血液幹・前駆細胞を用いた骨髄再構築医療の可能性が示唆された。しかしながら、ES細胞から誘導した細胞・臓器を用いた再生医療への応用には克服すべき大きな問題として、1) ES細胞が持つ腫瘍性の問題、2) 組織適合性の問題、が挙げられる。一方で、血液細胞の中で赤血球は核を持たない細胞であり、腫瘍形成の可能性はほぼ考えられない。組織適合性に関しても、赤血球においては組織適合抗原の発現は認められず、Rh(-)、O型の赤血球を大量生産することができれば、ほぼ全ての輸血需要をカバーできることになる。このような観点からヒトES細胞を用いて赤血球を大量生産する技術が確立できれば、臨床応用への可能性が非常に高く、慢性的な輸血用血液の不足の解消、輸血による重大な感染症の防止につながると考えられる。これまでにES細胞から血液細胞を誘導する研究は多数行われており、ヒトES細胞から赤血球を分化誘導する方法なども複数報告されている。しかし、殆どの場合、赤血球以外の細胞も同時に誘導されてしまうため、他の細胞を取り除く必要性がでてくる。またES細胞から成熟赤血球を産生させるには、2週間程度かかる上、臨床的に必要な赤血球量を確保するためには膨大なES細胞と莫大な費用がかかる。したがって、これらの問題を克服しなければ、実際に臨床への応用は極めて難しいと考えられる。研究代表者においては、これまでにES細胞から誘導した赤血球系前駆細胞を含む血液前駆細胞を長期間(約半年)維持できる培養系を開発し(*Exp. Hematol.* 34: 760-769 [2006])、さらにはマウスES細胞を用いて血液細胞を誘導し、長期培養することによりマウス赤血球前駆細胞株(MEDEP)の樹立に成功した。MEDEPは脱核赤血球にまで分化することが可能であり、貧血誘導したマウスに移植することにより、赤血球数の回復が早くなることを明らかにした。また、試験管内においてヒト臍帯血中の造血前駆細胞から効率よく脱核した成熟赤血球を生産できる培養系の開発にも成功している(*Nat. Biotechnol.* 24:1255-1256[2006])。これらのことから、研究代表者らが開発した技術を融合し、ヒトES細胞からMEDEP同様の赤血球前駆細胞株を樹立し、試験管内において、成熟脱核赤血球を高効率に生産することが可能となれば、赤血球大量生産のための時間の大幅な短縮、およびコスト削減に繋がり、輸血医療に貢献することができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、胚性幹細胞から樹立した赤血球系前駆細胞株から脱核赤血球を生産することを目的としている。マウスES細胞から樹立したMEDEPは試験管内において分化誘導すると一部は脱核するものの、その脱核効率はあまり高くない。しかし、生体内においては脱核赤血球に効率よく分化し得る細胞であることが示唆されていることから試験管内において効率良く脱核赤血球を生産することは可能であると考えられる。そこで、まず生体内または、臍帯血を用いた成熟赤血球生産培養系での赤血球分化における遺伝子発現変化を解析し、MEDEPを分化誘導した場合の遺伝子発現変化との相違点を明らかにすることにより、成熟赤血球への分化に重要な遺伝子群を探索する。その結果から、候補遺伝子についてMEDEPに遺伝子過剰発現または発現抑制などの方法により試験管内において効率良く脱核赤血球を生産する培養系を開発する。また、臨床応用の可能性を拓くため、ヒトES、iPS細胞を用いて血液細胞を誘導する培養系を確立し、長期培養することによってヒト赤血球系前駆細胞株を樹立することも目的とする。

1. 研究の方法

赤血球前駆細胞から赤血球への分化は、CD71⁺, TER119⁻細胞からCD71⁺, TER119⁺細胞へと進むことが知られている。MEDEPは増殖している状態ではCD71⁺, TER119⁻であるが、分化を誘導することによりCD71⁺, TER119⁺になることが明らかとなっている。そこでまず、貧血誘導したマウスの脾臓からCD71⁺, TER119⁻細胞およびCD71⁺, TER119⁺細胞をセルソーター(FACS)により回収し、定量的PCRにより赤血球分化に関与する遺伝子の発現を解析した。MEDEPを用いて同様に解析を行い、両者において発現量に差のある遺伝子を候補遺伝子とし、過剰発現またはRNA干渉により発現抑制するウィルスベクターを構築し、MEDEPに導入して分化誘導への影響を解析した。

研究代表者はこれまでにサルES細胞を用いて、血液分化誘導系の確立および誘導した赤血球系前駆細胞を含む血液前駆細胞を長期にわたって維持できる培養系を開発している(*Exp. Hematol.* 34: 760-769 [2006])。また、この方法を応用して、マウスES細胞から赤血球系前駆細胞株を樹立した。さらにこれをヒトES、iPS細胞に適用して、高効率なヒト血液細胞分化誘導系の確立ならびにヒト赤血球系前駆細胞株の樹立を試みた。

4. 研究成果

貧血誘導したマウスの脾臓からCD71⁺, TER119⁻細胞およびCD71⁺, TER119⁺細胞をセルソーター(FACS)により回収し、定量的RT-PCR法を用いて赤血球分化関連遺

伝子の発現変化を解析した。また、MEDEPを用い、赤血球への分化を誘導し、継時的にRNAを抽出して同様の解析を行った。その結果、CD71⁺, TER119⁻細胞からCD71⁺, TER119⁺細胞へ分化する過程で発現が上昇する遺伝子の中で、MEDEPの赤血球分化過程では発現の上昇が見られない遺伝子があることを見いだした。この遺伝子はGlycophorin C (GPC)という赤血球細胞膜上に発現するタンパク質をコードしており、脱核の際に赤血球細胞膜の動態に関与している可能性があることが考えられた。またこれまでに赤血球分化への関与が知られていない、細胞骨格を制御する分子であるWAVE2という遺伝子が分化にともなって発現が上昇することも見出した。一方、MEDEPを用いた脱核赤血球大量産生の確立に関しては、1) 培地中血清濃度を30%に上げる、2) MEDEPを分化させる前にサイトカイン無添加で1日培養する、など、培養条件の工夫により脱核赤血球の産生を30%前後まで上げることが可能となった。さらに赤血球の分化過程において発現が上昇する遺伝子、WAVE2を過剰発現させることによりさらに効率を上げることができた。これに対し、1) WAVE2の上流で働くシグナル伝達分子であるGTPase (Rac1)の活性を阻害剤により抑制する、2) WAVE2と複合体を形成することが知られるIRS p53, Abi1などの発現を抑制することにより脱核赤血球の産生が抑制されることが示唆された。また、WAVE2ノックアウトES細胞を用いて血液分化誘導を行ったところ脱核赤血球の産生が正常ES細胞に比べ極端に減ることが判明した。これらのことからWAVE2を中心とした分子群が脱核を制御している可能性が示唆された。

ヒトES細胞に関しては京都大学で樹立された3株、ウィスコンシン大学で樹立された2株、研究室で独自に樹立したiPS細胞2株を用いて血液分化誘導を行ったところ、7株すべてにおいて赤血球系細胞を含む血液細胞の産生を確認することができた。この分化誘導過程において、ヒトES細胞のクロニングに有効であるROCK阻害剤を加えて培養を行ったところ、血液前駆細胞の分化誘導効率が良くなることが判明した。さらに、ROCK阻害剤はヒトのみならず、マウス、カニクイザルES細胞においても有効であり、ES細胞から血液細胞誘導する場合には動物種を問わず普遍的に効果があることが明らかとなった。しかし、赤血球を特異的に誘導する効果やマウス骨髄再構築能への効果は見られなかった。また、ROCK阻害剤を用いて長期培養を行ったが、現在使用可能なヒトES, iPS細胞から赤血球前駆細胞株を樹立するまでには至らなかった。

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3件)

① Taro Ishigaki, Kazuhiro Sudo, Takashi Hiroyama, Kenichi Miharada, Haruhiko Ninomiya, Shigeru Chiba, Toshiro Nagasawa, and Yukio Nakamura. Human Hematopoietic Stem Cells Can Survive In Vitro for Several Months. *Adv in Hematol.* 2009: ID936761 (2009)*

② Kenichi Miharada, Takashi Hiroyama, Kazuhiro Sudo, Inaho Danjo, Toshiro Nagasawa and Yukio Nakamura. Lipocalin 2-mediated growth suppression is evident in human erythroid and monocyte/macrophage lineage cells. *J Cell Physiol.* 215:526-537 (2008)*

③ Naoya Takayama, Hidekazu Nishikii, Joichi Usui, Hiroko Tsukui, Akira Sawaguchi, Takashi Hiroyama, Koji Eto and Hiromitsu Nakauchi. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells *in vitro* via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood.* 111: 5298-5306 (2008)*

*査読有

[学会発表] (計5件)

(国内)

① 寛山隆、栗田良、岡田奈緒子、中村幸夫。Enhanced Production of Hematopoietic Cells from Embryonic Stem Cells by Rho-kinase inhibitor. 第9回日本再生医療学会総会 広島 2010年3月18日

② 寛山隆、中村幸夫「万能細胞による骨髄再構築、輸血医療は可能か？」第8回日本再生医療学会総会 東京 2009年3月6日

③ 寛山隆、三原田賢一、青木尚子、須藤和寛、檀上稲穂、中村幸夫。「マウス胚性幹細胞から樹立した赤血球系前駆細胞株 (MEDEPs) の性状の比較」第70回日本血液学会総会 京都 2008年10月11日

(海外)

① Takashi Hiroyama, Ryo Kurita, Naoko Okada, Naoko Aoki, and Yukio Nakamura. A Rho-kinase inhibitor Accelerates Production of Hematopoietic Cells from Embryonic Stem Cells. ISEH 38th Annual Scientific Meeting, Athens (S

September 10, 2009)

②Takashi Hiroyama, Kenichi Miharada, Kazuhiro Sudo, Inaho Danjo, Naoko Aoki and Yukio Nakamura. Establishment of mouse embryonic stem cell-derived erythroid cell lines able to ameliorate acute anemia. ISEH 37th Annual Scientific Meeting, Boston (July 9, 2008)

〔図書〕 (計2件)

①寛山隆、中村幸夫 化学と生物：「万能細胞からの赤血球前駆細胞株の樹立。学会出版センター 2008年

②寛山隆、中村幸夫 改訂・培養細胞実験ハンドブック：「ES細胞からの赤血球誘導。羊土社 2008年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寛山 隆 (Hiroyama Takashi)

独立行政法人理化学研究所・細胞材料開発室・専任研究員

研究者番号：50373361