

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23618005

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Establishment of hematopoietic differentiation system of human iPS cells in microenvironment of ovine fetuses

研究代表者

長尾 慶和 (YOSHIKAZU, NAGAO)

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) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：中胚葉系に初期分化誘導したサルES細胞を妊娠60日前後のヒツジ胎子肝へ移植することにより、産子において高い骨髄キメラ率を得られることが明らかとなった。一方で50日未満のヒツジ胎子の皮下に未分化なサルES細胞を移植した場合、三胚葉性のテラトーマが形成された。ヒツジ胎子の移植前のコンディショニングを目的に、細胞増殖抑制因子であるブスルファンを母体経由で投与し、ヒツジ胎子の骨髄増殖を抑制した後にヒトCD34+細胞の移植を行った。その結果、キメラ率が有意に向上することが明らかとなった。以上の結果に基づき、ヒトiPS細胞の造血系分化誘導を目指して、ヒツジ胎子肝への移植を行い、現在産子の解析中である。

研究成果の概要(英文)：We found that hematopoietic engraftment was only observed when ES cell-derivatives at the early differentiation stage were transplanted into fetal livers at 51-67 days of gestation. However, teratoma formation with mature monkey tissue structures was observed following transplantation of undifferentiated ES cells into the fetal subcutaneous tissue, but not into the liver, and at 43-50 days of gestation, but not at 51-67 days. Stem cell factor and other many factors may be concerned in the hematopoietic differentiation. Pre-conditioning by maternal administration of busulfan before in utero transplantation of monkey ES cells enhanced hematopoietic engraftments in sheep. And then, human iPS cells were transplanted into ovine fetal liver to differentiate into hematopoietic tissue.

研究分野：幹細胞学

キーワード：iPS細胞 分化誘導 造血幹細胞 大動物 胎子

1. 研究開始当初の背景

移植医療には、突発的事故により臓器を失ってしまった際の、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命を落とすことが多い。そうした中、1998年にUSAの研究グループによりヒト胚性幹細胞（ES細胞）株の樹立が発表された。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、仮にヒト子宮内へ移植すればヒトとして発生することのできる初期胚を壊してその一部を培養することにより得られるため、生命倫理面でのハードルが非常に高く、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、幹細胞を用いた再生医療の実現性を大きく高める画期的な成果であった。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期待は大きく高まっている。しかしながら、iPS細胞を臨床に応用するためには、まだ多くの課題が残されている。その一つが、iPS細胞の分化誘導法である。従来のES細胞ないしiPS細胞の分化誘導に関する研究は、その多くが培養液内（*in vitro*）で行われてきた。これまでの研究により、発生の初期に出現する細胞（神経、心筋、胎児造血細胞等）は幹細胞からの*in vitro*分化が可能となったが、造血幹細胞や膵臓β細胞のように個体発生の後期に「場」誘導的に出現する細胞は、幹細胞からの*in vitro*分化は難しいことが明らかとなっている。近年、それらの*in vitro*実験の弱点を補うべく、マウスやラットなどの実験動物の生体内（*in vivo*）の潜在的な力を借りて分化誘導を試みる実験が行われている。すなわち、個体発生初期の自己免疫系が確立する以前の子宮内胎子へ幹細胞移植を行うことで、移植細胞に対する免疫拒絶を回避し、さらに*in vitro*ではサポートできない分化誘導因子を胎子内の幹細胞増殖環境に期待した実験である。しかしながら*in vitro*においては、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ケースが多い。我々のヒツジを用いた実験系においても、分化誘導が進んでいない未分化な細胞の割合が一定数を超えると、ヒツジ胎子内で巨大なテラトーマを形成することが明らかと

なっている。テラトーマは良性ではあるものの、その増殖能の高さゆえに短期間で大きく成長し、移植された動物の命さえ奪うこともある。このように*in vitro*では困難であり、一方で*in vivo*では制御が難しい組織・細胞の分化誘導をどのように行うかは、今後、ES細胞やiPS細胞を活用した再生医療を安全に効果的に実施する上で、解決しなければならない大きな課題の一つである。我々はこれまで、*in vitro*分化誘導が実現していない細胞種の一つであり、その一方で急性白血病などを背景に再生医療実現の期待が高い「造血幹細胞」に焦点を絞って、ヒトiPS細胞のモデルとしてサルES細胞を用いて、その分化誘導法の確立を試みてきた。従来の課題を解決するため、我々は細胞移植対象動物としてヒツジに着目した。ヒツジを用いるメリットとしては、1) その胎盤構造の特異性から予想される外科処置に対する抵抗生の高さ（流産率の低さ）、2) 胎子が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詳細な経過観察が可能となる点、4) 新生子や成体の大きさがヒトに類似していること、などが挙げられる。これまでの取り組みの結果、中胚葉系へ初期分化誘導したサルES細胞をヒツジ胎子肝臓内に移植することにより、骨髓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。一方、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。この成果は、霊長類のES細胞を動物生体へ移植し、任意に造血幹細胞へと分化させる、あるいはテラトーマを形成させることに成功した世界で初めてのケースである。しかしながら、これまでの研究では、造血系への分化とテラトーマ形成とを正確に制御できた訳ではない。また、造血系に分化誘導できたとしてもヒツジ骨髓中のサル細胞の率（キメラ率）は1～2%であり、必ずしも高いとは言えない。その結果、今のところヒツジ末梢血液中にサル血液細胞を高い割合で有するキメラヒツジを獲得するには至っていない。キメラ率を向上させるための対応策として、これまでに、ヒトとサルの幹細胞の増殖を刺激するがヒツジの幹細胞の増殖は刺激しない合成型ヒトStem Cell Factor (rhSCF) をキメラヒツジに対して投与し、骨髓中のサル造血系細胞の分化・増殖を刺激することを試みた。その結果、投与後直ちにヒツジ骨髓中のサル細胞の比率（キメラ率）が向上し、10%を超えるレベルにまで至った。その際には、末梢血中にサル血液細胞を検出することもできた。一方、この実験においては、ヒツジに対するrhSCFの投与を中止するとキメラ率は直ちに低下し、末梢血中のサル細胞も検出限界以下にまで低下してしまっただけでなく、この結果は、骨髓キメラ率を10%前後にまで向上することで末梢血キメラを得ることができると

rhSCF が刺激しているのは造血幹細胞の下流に位置する造血前駆細胞であり、造血幹細胞自体の存在比率を向上させなければ恒久的な末梢血キメラは得られないことを強く示唆している。

2. 研究の目的

以上の研究経過を背景に、本研究は、ヒト iPS 細胞の分化誘導をヒツジ胎子内においてより精密に効率よく行うための要因について解析し、iPS 細胞の造血系への分化誘導システムを確立することを目的としている。具体的には、まず、移植する胎子の日齢と部位について詳細に検討する。次いで、1) 移植細胞の生着環境(ニッチ)を整備する目的で、細胞移植前のレシピエントヒツジの細胞増殖を細胞増殖抑制剤で調整する方法、2) 移植細胞の生着・分化をサポートする目的で、生体内において造血幹細胞の機能をサポートする間葉系幹細胞の共移植、3) 移植細胞の生着・分化能を増強する目的で、移植細胞に対し造血系誘導因子である HoxB4 遺伝子を強制発現させる方法、を検討する。

3. 研究の方法

検討課題 1 : 移植細胞の分化状態と移植されるヒツジ胎子の胎齢と移植部位の検討

<小課題 1 : 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>

これまでの我々の検討により、移植する ES 細胞が完全に未分化な細胞だと、ヒツジ胎子に全く生着しないか、生着してもテラトーマを形成する可能性の高いことが示されている。一方で、中胚葉系へ初期分化誘導した細胞集団を移植すると、高い確率で骨髓キメラが得られている。この現象を詳細に検討するため、ES 細胞を移植するまでの初期分化培養期間および培養法について、種々の条件を検討した。

<小課題 2 : ヒツジ胎子の胎齢と移植部位と生着・分化との関連>

ヒツジが自己免疫を獲得するのは胎齢 50 日前後と言われている。従って、サル ES 細胞に対する完全な免疫寛容を得るためには、50 日齢以前の移植が望ましい。一方で、完全な免疫寛容を得るということは、移植した細胞に対する免疫学的抑制がなくなることを意味し、テラトーマ形成のリスクも高まる。この現象は、自己の体細胞により作出した iPS 細胞を活用した再生医療時の危険性を予知するモデルとなりうる。また、胎子の造血組織は胎子肝である。従って、造血幹細胞を育むニッチは、胎子の場合には肝臓にあると考えられる。そこで、初期分化細胞を様々な胎齢の胎子の肝臓へ、また対照区として皮下へ移植し、その後のヒツジ胎子および産子内における移植細胞の生着および分化の状態を詳細に解析した。

検討課題 2 : ヒツジ胎子および移植細胞の調

整による生着・分化効率の向上<ヒツジ胎子に対するブスルファン(細胞増殖抑制剤)投与>

ヒト骨髓移植において、細胞増殖抑制剤であるブスルファンを予めレシピエントに投与して、一時的に骨髓抑制状態を誘導する移植前処置が行われる。これにより、移植後のドナー由来細胞に競合するレシピエント側の骨髓増殖能を抑え、その間にドナー由来細胞に生着の場を与えることができ、その結果、移植細胞の生着率を向上させることができる。このプロトコルを本研究へ応用して、細胞移植に先立ってヒツジ胎子へヒツジ母体経路でブスルファンを投与することにより、細胞移植のためのスペースを造血幹細胞のニッチである胎子肝に準備した後に、ヒト iPS 細胞を移植することにより、移植細胞の生着・分化効率の向上を図った。

4. 研究成果

検討課題 1 : 胎齢50日未満のヒツジ胎子の皮下に未分化サルES細胞を移植した5頭中3頭、ならびにサルES細胞を初期中胚葉系に分化させた後に移植した5頭中1頭で、サルES細胞由来の三胚葉性腫瘍すなわちテラトーマが形成された(図1および2)。いずれの産子においても、サル造血系細胞は検出されなかった。一方、胎齢50日以上での移植においては、ES細胞を初期中胚葉系に分化させた後に胎子肝臓に移植した8頭中5頭において、ヒツジ骨髓内にサル造血系細胞が検出された(キメラ率1.1-1.6%)。テラトーマ形成はいずれの産子においても認められなかった。胎齢50日以上での移植では、未分化サルES細胞を移植した9頭中全頭でテラトーマおよびサル造血系細胞は検出されなかった。



図1. ヒツジ形成されたサルES細胞に由来するテラトーマの肉眼像

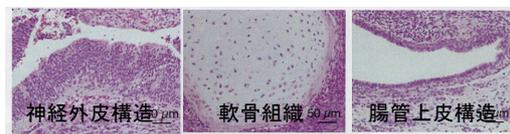


図2. テラトーマの三胚葉性組織像

検討課題 2 : 母体を経由する胎子へのブスルファン投与試験により、ヒツジ胎子の生存性に問題無く、かつ骨髓を抑制する至適投与量を決定した。その上で、ヒトCD34+細胞のヒツジ胎子への移植により、ブスルファン前投与の効果を確かめた。その結果、ブスルファン無投与群(対照群)では6例中でキメラ率は0%

だったのに対し、ブスルファン投与群では1.9%と有意に向上した(P<0.01)。

以上の結果を受けて、現在、ブスルファン前処置を行った種々の日齢のヒツジ胎子へ、種々の分化状態のヒトiPS細胞を移植し、得られた産子について解析中である。

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2件)

①Abe T, Masuda S, Tanaka Y, Nitta S, Kitano Y, Hayashi S, Hanazono Y, Nagao Y. Maternal administration of busulfan before in utero transplantation of human hematopoietic stem cells enhances engraftments in sheep. *Exp Hematol* 40:436-444 (2012).

②Tomoyuki 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). 10.1538/expanim.63.475

[学会発表] (計15件)

①新田卓、阿部朋行、増田茂夫、林聡、花園豊、長尾慶和. 子宮内移植後のヒツジ体内におけるヒトおよびサル造血の長期生着に及ぼす要因. 第104回日本繁殖生物学会大会、*Journal of Reproduction and Development* vol.57, Suppl : Pj113 (盛岡、2011年9月15-17日).

②阿部朋行、増田茂夫、新田卓、林聡、長尾慶和、花園豊. ヒツジ胎子へのブスルファン前処置によるヒト造血幹細胞移植後の造血キメラ率の向上、第14回日本異種移植研究会、抄録集:P40 (広島、2011年12月10日).

③Yoshikazu Nagao, Tomoyuki Abe, Yujiro Tanaka, Kyoko Sasaki, Shigeo Masuda, Suguru Nitta, Borjigin Sarentonglaga, Satoshi Hayashi, Yoshihiro Kitano, Yutaka Hanazono. Possible factors for engraftment of monkey embryonic stem cells after in utero transplantation into sheep fetuses. *The 17th International Congress on Animal Reproduction, Reproduction in Domestic Animals, Vol.47, s4, P589, (29 June-2 August, 2012, Vancouver, Canada)*.

④Yutaka Hanazono, Tomoyuki Abe, Suguru Nitta, Shigeo Masuda, Satoshi Hayashi, Yoshikazu Nagao; Long-term Follow-up on the Engraftment of Human HSCs in Sheep after in Utero Transplantation; Society for Hematology and stem cells, 41st Annual Scientific Meeting (Amsterdam, Netherland, 23-26 August, 2012).

⑤Tomoyuki Abe, Suguru Nitta, Shigeo Masuda, Satoshi Hayashi, Yoshikazu Nagao

and Yutaka Hanazono; Long-Term Comparative Study on the Engraftment of Human Hematopoietic Stem Cells in Sheep; The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cells Research, Wednesday-Thursday Poster Abstracts p. 95 (Yokohama, Japan, June 13-16, 2012).

⑥阿部朋行、新田卓、増田茂夫、林聡、長尾慶和、花園豊. ヒツジにおけるヒト造血細胞長期生着の条件検討 第59回日本実験動物学会総会 抄録集 p.166 (若手優秀発表賞、別府市、2012年5月24-26日)

⑦新田卓、阿部朋行、田中裕次郎、佐々木京子、増田茂夫、ボラジギン・サラントラガ、林聡、北野良博、花園豊、長尾慶和. ヒツジ胎子内におけるサルES細胞の生着、造血系分化およびテラトーマ形成に及ぼす要因、第105回日本繁殖生物学会、*Journal of Reproduction and Development. Vol.58. Suppl; j92:2012.* (優秀発表賞、つくば市、2012年9月5-7日).

⑧Tomoyuki Abe, Suguru Nitta, Shigeo Masuda, Satoshi Hayashi, Yoshikazu Nagao and Yutaka Hanazono; HoxB4-Transduction of Human HSC Results in Longer-Term Engraftment Compared to Busulfan-Conditioning in Sheep after in Utero Transplantation; 第10回幹細胞シンポジウム 抄録集 p.35 (兵庫・淡路夢舞台国際会議場、2012年5月31日~6月2日).

⑨Tomoyuki Abe, Suguru Nitta, Shigeo Masuda, Satoshi Hayashi, Yoshikazu Nagao and Yutaka Hanazono; HoxB4-Transduction of Human HSC Results in Longer-Term Engraftment Compared to Busulfan-Conditioning in Sheep after in Utero Transplantation; The 18th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Abstracts p.148 (Kumamoto, Japan, June 28-30, 2012).

⑩Yoshikazu Nagao, Tomoyuki Abe, Yujiro Tanaka, Kyoko Sasaki, Shigeo Masuda, Borjigin Sarentonglaga, Kazuko Ogata, Mio Yamaguchi, Satoshi Hayashi, Yoshihiro Kitano and Yutaka Hanazono. Factors influencing engraftment of monkey embryonic stem cells in sheep after xenogeneic in utero transplantation. *The 12th Congress of the International Xenotransplantation Association. Abstract: Xenotransplantation, .20 (5), P.372, 2013.* (Osaka International Convention Center, Osaka, Japan, November 10-13, 2013).

⑪Tomoyuki Abe, Shigeo Masuda, Borjigin Sarentonglaga, Kazuko Ogata, Mio Yamaguchi, Satoshi Hayashi, Yoshikazu Nagao and Yutaka Hanazono. Long-term comparative study on the engraftment of human hematopoietic stem cells in sheep

after xenogeneic in utero transplantation. The 12th Congress of the International Xenotransplantation Association. Abstract: Xenotransplantation, .20 (5), P.342. (Osaka International Convention Center, Osaka, Japan, November 10-13, 2013).

⑫長尾慶和、阿部朋行、柳瀬公秀、サラントラガ、緒方和子、山口美緒、林聡、花園豊 ヒツジ子宮内異種移植(I)：生着条件の検討. 第16回日本異種移植研究会、抄録集 p.41 (大阪、2013年11月10日、ベストオーラルプレゼンテーション賞)

⑬阿部朋行、長尾慶和、柳瀬公秀、サラントラガ、緒方和子、山口美緒、林聡、花園豊 ヒツジ子宮内異種移植(II)：長期間の造血再構築 第16回日本異種移植研究会、抄録集 p.42 (大阪、2013年11月10日)

阿部朋行、長尾慶和、柳瀬公秀、サラントラガ、緒方和子、山口美緒、花園豊. ヒツジ子宮内移植系によるヒト造血幹細胞の定量評価の試み 第36回日本造血細胞移植学会抄録集 p.233 (沖縄県宜野湾市、2014年3月7-9日)

⑭阿部朋行、長尾慶和、柳瀬公秀、原明日香、ボラジギン・サラントラガ、緒方和子、山口美緒、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・増幅技術の開発. 第61回日本実験動物学会総会抄録集 p.153. (札幌市、2014年5月15-17日)

⑮Yoshikazu Nagao, Tomoyuki Abe, Asuka Hara, Kazuko Ogata, Mio Yamaguchi, Borjigin Sarentonglaga, Rika Fukumori, Yutaka Hanazono. Factors affecting hematopoietic engraftment of monkey embryonic stem cells in sheep fetuses. The 41th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society. Reproduction, Fertility and Development (Versailles, France, January 10-15, 2015).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願書類作成中(計1件)

名称：造血系細胞の作製方法(仮)

発明者：花園豊、長尾慶和、阿部朋行

権利者：同上

種類：特許

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

福森 理加 (FUKUMORI, Rika)

宇都宮大学・農学部・助教

研究者番号：60721694

(平成26年度より研究分担者)

(3) 連携研究者

花園 豊 (HANAZONO, Yutaka)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：70251264