

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300160

研究課題名(和文) エピゲノムプログラム変換3D環境システムの開発

研究課題名(英文) Development of 3D cultivation system that enables to control "epigenetic change" of the cells

研究代表者

江藤 浩之(Eto, Koji)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：50286986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：staticな培養系およびshakerを用いた独自の3D培養系の比較から、造血系細胞のそれぞれの細胞運命決定のための培養環境条件(未分化性維持、初期造血、その後の細胞系譜決定、作業に適した速度条件)が大きく異なっていること、培養液組成、密度によって微調整が必要など、今後の臨床応用展開、巨大培養系への応用においての課題を整理することに繋がった。細胞の不均一性(heterogeneity)は、生体内の組織同様に培養細胞においても大きな課題であり、Single cell RNA-seqによる1個細胞レベルでの遺伝子発現解析法を組み合わせることがその課題克服に有用であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Comparison between static and 3D conditions allowed us to conclude that physical irritant action including shear stress to contribute to differentiation to a cell growth as well as specific cell genealogy (lineage decision, for example, from a hematopoietic system cell [HSC] to megakaryocyte) and last maturity phase (i.e., platelet production from megakaryocyte). This implicated the importance of culture circumstances towards clinical application, in particular using from pluripotent stem cells. On the other hand, there is the problem of the wide "heterogeneity" of the cells during cell culture. We simultaneously clarified the importance of single cell analyzing technology useful for lineage commitment and controllable differentiation. Development of analysis technology by the single cell levels was associated with development of this research task.

研究分野：血小板、幹細胞生物学

キーワード：エピゲノム 3D培養系 ずり応用 iPS細胞 造血幹細胞 巨核球 赤芽球 血小板

1. 研究開始当初の背景

生体内各組織の“体性幹細胞(組織幹細胞)”を自家移植することで組織の修復あるいは置換を促す細胞療法が現実的になりつつある。中でも同種造血幹細胞移植による骨髄再構築は歴史も長く、血液悪性腫瘍患者や代謝疾患に対する治療法として既に同種他家移植が一般化した。しかし骨髄バンクを含むソースは非常に限られている上、その能力を維持したまま造血幹細胞(HSC)を体外増幅できる確実な技術は未だに確立されていない。ドナーに代わるソースとして、多能性幹細胞であるヒト胎生幹細胞(ES細胞)やヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)が提案されているものの、ヒト骨髄や臍帯血由来HSCと同等の生着および多分化能を示すヒトHSCをin vitro環境下において作製誘導できた報告はない。これらの知見は今までの培養環境条件では限界があることを示唆している。iPS細胞のような胎児型細胞から成体型の終末分化細胞に至る過程では劇的な“遺伝子発現プログラムの書き換え”過程であるエピジェネティック修飾(ヒストン化学修飾、DNAのメチル化、クロマチン制御などの遺伝子発現制御の関与)が関与すると想定される。しかし遺伝子発現プログラムを人為的に書き換える作業【エピジェネティックプログラム変換】を実行するためのエピゲノムの全貌解明は未だに達成されていない。

2. 研究の目的

iPS細胞などの多能性幹細胞は、未分化状態から細胞が分化する際、細胞内部でのエピジェネティックプログラム変換によって目的とする細胞系譜への分化決定およびその維持機構が制御されている事が想定される。一方、エピゲノム変化を制御するための細胞外環境や細胞外から細胞核への伝播方法は明らかになっていない。本研究では、エピゲノム、特に細胞核ヒストンの状態が細胞外環境の変化によって劇的に変化することを証明し、生体外においてエピゲノムやその下流の転写因子発現を制御できる培養技術確立のための材料、材質の選定を特に(1)弾性硬度、(2)酸素飽和度、(3)細胞外基質特性、の観点において検証し、未だに実現できていない移植可能な高品質の造血幹細胞を実際にin vitroで誘導するためのシステム開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 免疫不全マウスに移植したヒトiPS細胞から発生する“奇形腫”内部環境を解剖学的、分子生物学的に解析し、造血幹細胞(HSC)の発生各ステージにおけるエピゲノム情報、転写因子発現プロファイルデータをデータベース化する。

(2) CT、MRI解析と解剖切断サンプルでのルシフェラーゼ染色、蛍光染色を組み合わせ、HSC発生過程とその周囲の環境を3D画像で再現構成し、3D培養プロトコルを組み立てる。

(3) HSCへの分化、維持が困難である場合、HSCとシグナル系譜が類似する巨核球への【エピジェネティックプログラム変換】をヒトES細胞、iPS細胞から実施し、そのエピゲノム変化を捉えることで効率良く血小板が製造可能な培養方法を確立する。

4. 研究成果

iPS細胞などの多能性幹細胞は、未分化状態から細胞が分化する際、細胞内部でのエピジェネティックプログラム変換によって目的とする細胞系譜への分化決定およびその維持機構が制御されていると示唆される。エピゲノム変化を制御するための細胞外環境、ならびに細胞外から細胞核内のエピゲノム制御までの伝播方法の解明が成されて来ていない。この重要な命題を解明する目的で当初の計画では、すべて、マウス体内の奇形腫内部で形成されるであろうヒトES細胞あるいはiPS細胞由来のHSCの解析系からデータを取得しようとしていた。一方、東京大学では成功していた方法が京都大学に移動後には再現できなかった。

そこで計画を変更し、複数のヒト多能性幹細胞を用いて、(i)低酸素、(ii)各種のシグナル刺激、遮断、が造血多能性細胞集団(CD34+CD43+)の出現時期、出現頻度がどのように変化するか基礎データ取得を実施した。その結果、ヒト胚性幹細胞(ES細胞)から造血細胞が出現し、様々な血液細胞に分化するヒエラルキーに関し、従来から指摘されている特異的サイトカインによってのみ依存して決定されるわけではなく、“時間空間依存的に厳密な制御のもと、細胞核内に異なったシグナルが順次伝えられる事で、中胚葉からの血管、あるいは血液系への運命決定、また血液細胞としての多能性が維持されていく”ことを明らかにした。

この上記の細胞分化系譜決定機構をさらに確認する為に、新たに改良した培養系を用いて、異なったクローンのヒトES細胞、iPS細胞からの造血多能性細胞集団(CD34+CD43+)の出現頻度と出現時期を検証した。その結果、造血多能性細胞が生まれ出されるための新規のシグナル系譜の活性化及び遮断経路を見いだした。方法の一つとしてSingle cell RNA-seqによる遺伝子発現解析法を組み合わせ、さらに機械学習の手法による新規アルゴリズムを用いた高次元データ解析を取り入れて、細胞内部のエピゲノム変化をシミュレーションした。

最終年度は、特定の細胞分化(巨核球分化)に的を絞って実際の3D培養の開発を行った。まず、staticな培養系および

shaker を用いた独自の 3D 培養系を構築したのち、その両者を比較した。その結果、shear stress を含む物理的な刺激作用が、造血系細胞の (i) 前駆細胞集団としての細胞増殖、(ii) 巨核球細胞系譜への分化、(iii) 最終成熟 (例、血小板産生) に寄与することを実証した。また、非常に面白いことにそれぞれの細胞運命決定のための培養環境条件 (未分化性維持、初期造血、その後の細胞系譜決定、作業に適した速度条件) が大きく異なっていること、培養液組成、密度によって微調整が必要など、今後の臨床応用展開、巨大培養系への応用においての課題を整理することに繋がった。細胞の不均一性 (heterogeneity) は、生体内の組織同様に培養細胞においても大きな課題であり、Single cell RNA-seq による 1 個細胞レベルでの遺伝子発現解析法を組み合わせることがその課題克服に有用であることを示唆した。この手法は、単一細胞レベルでの RNA 発現レベルだけでなくエピゲノム解析が可能であることも示し、エピゲノムモニターが可能な実例として多能性幹細胞から目的のあった分化細胞集団を誘導作製するための条件を最終的に決定することに成功した (*Cell Stem Cell*, 2014、および論文準備中)。一方、さらに重要な知見として、細胞は単一で行動する血球細胞であってもお互いに“コミュニケーション”していることが強く示唆され、今後の研究課題として大きな命題を生み出すことに貢献した。

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 34 件)

1. Nishimura S, Nagasaki M, Okudaira S, Aoki J, Ohmori I, Ohkawa R, Nakamura K, Igarashi K, Yamashita H, Eto K, Uno K, Hayashi N, Kadowaki T, Komuro I, Yatomi Y, Nagai R. ENPP2 contributes to adipose tissue expansion and insulin resistance in Diet-Induced obesity. *Diabetes*. 査読有 2014 Dec; 63(12):4154-64. DOI: 10.2337/db13-1694
2. Ishii T, Eto K. Fetal stem cell transplantation: Past, present, and future. *World J Stem Cells*. 査読有 2014 Sept. 26; 6(4): 404-420. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i4.404
3. Ochi K, Takayama N, Hirose S, Nakahata T, Nakauchi H, Eto K. Multicolor staining of globin subtypes reveals impaired globin switching during erythropoiesis in human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 査読有 2014 Jul; 3(7):792-800. DOI: 10.5966/sctm.2013-0216
4. 鈴木大助, 江藤浩之 血小板の再生医療の現状と展望 *Bio Clinica* 査読無 Vol.30 No.5 2015. pp.37-41
5. 江藤浩之 先天性無巨核球性血小板減少症を解剖する 遺伝子医学 M00K27 査読無 2015 1 巻 pp.136-140
6. 遠藤大, 江藤浩之 ヒト人工多能性幹細胞を用いた疾患モデルによる分子病態解析と創薬の可能性 査読無 図説分子病態学 2014.5.10・5 版 pp. 18-23
7. Nakamura S, Takayama N, Hirata S, Seo H, Endo H, Ochi K, Fujita KI, Koike T, Harimoto KI, Dohda T, Watanabe A, Okita K, Takahashi N, Sawaguchi A, Yamanaka S, Nakauchi H, Nishimura S, Eto K*. Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically Applicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 査読有 2014 Apr 3; 14(4):535-48. DOI: 10.1016/j.stem.2014.01.011
8. Hirose S, Takayama N, Nakamura S, Nagasawa K, Ochi K, Hirata S, Yamazaki S, Yamaguchi T, Otsu M, Sano S, Takahashi N, Sawaguchi A, Ito M, Kato T, Nakauchi H, Eto K*. Immortalization of Erythroblasts by c-MYC and BCL-XL Enables Large-Scale Erythrocyte Production from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 査読有 2013 Dec 5; 1(6):499-508. DOI: 10.1016/j.stemcr.2013.10.010
9. Hirata S, Takayama N, Jono-Ohnishi R, Endo H, Nakamura S, Dohda T, Nishi M, Hamazaki Y, Ishii EI, Kaneko S, Otsu M, Nakauchi H, Kunishima S, Eto K*. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia iPS cells exhibit defective MPL-mediated signaling. *J Clin Invest*. 査読有 2013 Sep 3; 123(9):3802-14. DOI: 10.1172/JCI64721
10. Nakagawa Y, Nakamura S, Nakajima M, Endo H, Dohda T, Takayama N, Nakauchi H, Arai F, Fukuda T, Eto K*. Two differential flows in a bioreactor promoted platelet generation from human pluripotent stem cell-derived megakaryocytes. *Exp Hematol*. 査読有

- 2013 Aug;41(8):742-8.
DOI: 10.1016/j.exphem
11. Oda A, Eto K. WASPs and WAVES: from molecular function to physiology in hematopoietic cells. *Semin Cell Dev Biol*.
査読有 2013 Apr;24(4):308-13.
DOI: 10.1016/j.semcd.2013.03.002
 12. Nishimura T, Kaneko S, Kawana-Tachikawa A, Tajima Y, Goto H, Zhu D, Nakayama-Hosoya K, Iriguchi S, Uemura Y, Shimizu T, Takayama N, Yamada D, Nishimura K, Ohtaka M, Watanabe N, Takahashi S, Iwamoto A, Koseki H, Nakanishi M, Eto K*, Nakauchi H. Generation of Rejuvenated Antigen-Specific T Cells by Reprogramming to Pluripotency and Redifferentiation. *Cell Stem Cell*. 査読有
2013 Jan 3;12(1):114-26.
DOI: 10.1016/j.stem.2012
 13. Kajiwara M, Aoi T, Okita K, Takahashi R, Inoue H, Takayama N, Endo H, Eto K, Toguchida J, Uemoto S, Yamanaka S. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有 2012 Jul 31;109(31):12538-43.
DOI:10.1073/pnas.1209979109
 14. Eto K. Guest editorial: the contribution of pluripotent stem cells to blood cells. *Int J Hematol*. 査読無
2012 Jun;95(6):599-600.
DOI:なし
 15. Takayama N, Eto K*. In vitro generation of megakaryocytes and platelets from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol*.
査読有 2012;788:205-17.
DOI: 10.1007/s00018-012-0995-4.
 16. Eto K. Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells. *日本炎症・再生医学会学会誌「Inflammation and Regeneration」* Vol.32 No.4 : 144-45 September 2012 査読無
DOI:なし
 17. 江藤浩之、遠藤大 iPS 細胞の目指す方向性；血小板産生系を例に *Pharma Medica* 査読無 30(5):59-64,2012 May.
DOI:なし
 18. 中村壮、高山直也、江藤浩之 ヒト多能性幹細胞を用いた血小板再生 人工血液 査読無 vol.19, No.3. :99-102, 2012. April. DOI:なし
- 〔学会発表〕(計 34 件)
1. 江藤浩之 多能性幹細胞を用いた造血システムの解明の試み 第 14 回日本再生医療学会総会 2015/3/20 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
 2. 江藤浩之 生体外で製造する血液細胞は本当に必要なのか？ 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 2014/11/28 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)
 3. 江藤浩之 Transfusion products by iPS cell technology 第 5 回アジア細胞治療学会 2014/11/10 ハイアット・リージェンシー大阪(大阪府・大阪市)
 4. 江藤浩之 巨核球の c-MYC による自己複製マシナリー 第 87 回日本生化学会大会 2014/10/15 京都国際会館(京都府・京都市)
 5. 江藤浩之 iPS 細胞技術を用いた新しい輸血治療ソースの開拓と開発戦略(特別講演) 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会 2014/5/17 奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)
 6. 江藤浩之 臨床応用に向けた iPS 細胞戦略 第 75 回日本血液学会学術集会 2013/10/11 さっぽろ芸文館(北海道・札幌市)
 7. Kiyosumi Ochi, Sou Nakamura, Takeaki Dohda, Shoichi Hirose, Naoya Takayama, Koji Eto. INDIVIDUAL PLURIPOTENT STEM CELL CLONES RECAPITULATED DISTINCT STAGES IN ERYTHROPOIESIS BY SELF-REPLICABLE ERYTHROCYTE PROGENITORS. The ISSCR 11th Annual Meeting(Boston, USA) Jun 12-15,2013. The Boston Convention and Exhibition Center (BCEC). Boston(USA)
 8. 江藤浩之 iPS 細胞を使って造血システムを解剖する 第 8 回血液腫瘍カレントセミナー 2013/5/21 東京大手町トップオブザ・スクエア(東京都)
 9. Hiroshi Endo, Naoya Takayama, Tomo Koike, Hiromitsu Nakauchi, Koji Eto. Stepwise Analysis of in vitro Hematopoiesis from Human Pluripotent Stem Cells Revealed that Early MYC Inhibition Potentiated Mesodermal Progenitor Cells towards Hematopoietic Differentiation. The ISSCR 10th Annual Meeting. 2012/6/13-16 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
 10. Shoichi Hirose, Naoya Takayama, Sou Nakamura, Takashi Kato, Kazumichi

Nagasawa, Tadashi Sameshima, Hiromitsu Nakauchi, Koji Eto. POTENTIAL APPLICATION OF AN IMMORTALIZED ERYTHROCYTE-PRODUCING CELL LINE DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS. The ISSCR 10th Annual Meeting. 2012/6/13-16 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

11. Toshinobu Nishimura, Shin Kaneko, Ai Tachikawa-Kawana, Koji Eto, Hiromitsu Nakauchi. ANTIGEN-SPECIFIC CELL INDUCTION FROM INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS. The ISSCR 10th Annual Meeting. 2012/6/13-16 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 6 件)

名称: Interleukin-alpha による巨核球分化誘導および血小板増生
発明者: 江藤浩之、西村智
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2014-100376
出願年月日: 2014.5.14
国内外の別: 国内

名称: 巨核球前駆細胞の製造方法
発明者: 江藤浩之、小池朋
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2014-100422
出願年月日: 2014.5.14
国内外の別: 国内

名称: 巨核球及び血小板の製造方法
発明者: 江藤浩之
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2013-23013
出願年月日: 2013.2.28
国内外の別: 国内

名称: 多能性幹細胞からの巨血球及びノ又は血小板の製造方法
発明者: 西野泰斗、中村隆典、岩本俊介、江藤浩之、辻嘉代子、中内啓光
権利者: 同上
種類: 特許
番号: PCT/JP2012/075705
出願年月日: 2012.10.3
国内外の別: 国外

名称: 血小板産生方法及び血小板産生装置
発明者: 江藤浩之、中内啓光、福田敏男、高松遼、新井史人
権利者: 同上

種類: 特許
番号: 特願 2012-120322
出願年月日: 2012.5.26
国内外の別: 国内

名称: 多核化巨核球細胞、及び血小板の製造方法
発明者: 江藤浩之、中内啓光、高山直也、中村壮、稲葉良幸
権利者: 同上
種類: 特許
番号: PCT/JP2012/062217
出願年月日: 2012.5.11
国内外の別: 国外

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
CiRA HP
<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/index.html>
江藤研究室 HP
<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/eto/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
江藤 浩之 (Eto, Koji)
京都大学・iPS細胞研究所・教授
研究者番号: 50286986

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: