

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390272

研究課題名(和文) ヒトES細胞を用いた胎児期における自然免疫の発生と発症の解析

研究課題名(英文) Analysis of human innate immunity and acquired immune mechanism during fetal period using human ES cells

研究代表者

望月 慎史 (MOCHIZUKI, Shinji)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：90349473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヒトES細胞から造血細胞を分化誘導し肥満細胞・好酸球を産生、胎生期における肥満細胞や好酸球の発生・発達を再現することに成功した。各種解析から、胎児期の初期においてはまず結合組織型TC型肥満細胞が発生し粘膜型T型肥満細胞は造血系の発達に伴い発生すると推測された。また好酸球と好塩基球は共通の前駆細胞を起源としている可能性が示唆された。さらにヒトiPS細胞から同様に分化誘導し、好中球機能異常症由来iPS細胞からのものと比較して、健全な好中球機能パターンを示す好中球を産生することに成功した。これらの分化誘導系は自然免疫の発生と各種疾患の発生メカニズムの更なる解明に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We succeeded the production of human mast cells and eosinophils from hematopoietic cells derived human ES cells and established the system that reflect the generation and development of these immune cells in human embryo. It is indicated that they first develop connective tissue-type mast cells that both express chymase and tryptase at primary time of induction and then from multipotential hematopoietic progenitor cells at a comparatively later stage they develop mucosal mast cells. It is also suggested that eosinophils and basophils might be originated from common progenitor cells. We succeeded the production of human neutrophils from hematopoietic cells derived human iPS cells as well. In the analyses, they showed normal and healthy functions, compared with the one derived from iPS cells from patients of congenital neutrophilic disorders. it is expected to be a useful tool for investigations into the mechanism of the generation of innate immune system and many diseases.

研究分野：小児血液

キーワード：胎児医学 ES細胞 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

獲得系免疫が十分に確立されていない胎児においては、自然免疫はその感染防御の中心的役割を担っているが、胎児期における自然免疫機構の発生・発達についてはほとんど解明されていない。そこで、我々が開発したヒト胚を起源とするヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) からの各種血球への分化誘導法を用いて、ヒト ES 細胞から自然免疫に関わる種々の免疫細胞を分化誘導することにより、ヒト胎児において免疫細胞が発生し、自然免疫が発達する過程を *in vitro* で再現し、その分化過程を細胞生物学及び分子生物学的に解析することを計画した。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト胎児における自然免疫機構の発生・発達の詳細を明らかにすることを目的とし、さらに母体を取りまく環境物質の胎児の免疫機構の発達に及ぼす影響の評価システムを提供し、ヒト胎生期の免疫機構の生理的発達の破綻に起因する乳幼児の易感染性やアレルギーの発症機構の解明と治療法の開発へ寄与することも期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 肥満脂肪および好酸球、好塩基球への分化誘導と発達の解析

肥満細胞への分化誘導と継時的な分化・成熟の検討  
マウス胎仔 AGM (aorta-gonad-mesonephros) 領域由来ストローマ細胞との 2 週間の共培養によりヒト ES 細胞から分化誘導された CD34+ 細胞から、SCF、IL-3、IL-6、FL、TPO 存在下で液体培養し、続いて SCF、IL-6、FL、TPO 存在下での無結成培地での液体培養を行うことで肥満細胞への分化誘導を行った。得られた細胞の性状を、免疫細胞染色、フローサイトメトリー、電子顕微鏡による観察などにより解析する。

### 好酸球・好塩基球への分化誘導と発達の検討

上記同様に分化培養されたヒト ES 細胞を、液体培養し、SCF、IL-3、IL-5、GM-CSF 存在下で好酸球および好塩基球への分化誘導を行う。得られた細胞をフローサイトメトリー、免疫染色、電子顕微鏡観察などによるフェノタイプの解析により好酸球および好塩基球の継時的な分化・成熟を検討する。

### (2) 結合組織型肥満細胞と好酸球を用いたアレルギー関連細胞の機能の検討

Substance P および compound 48/80 刺激に

### よるヒスタミン放出の確認

肥満細胞細胞懸濁液に substance P, compound 48/80 を添加し反応させ、細胞を遠心分離、その上清を回収する。細胞ペレットを冷凍・融解をさせ遠心した後、水溶性抽出物を回収する。ヒスタミン量は ELISA 法にて測定する。

ヒト ES 細胞由来好酸球の機能の検討  
ヒト ES 細胞由来好酸球を、分泌型 IgA (sIgA) で予めコートしたディッシュで培養し、ELISA 法を用いて培地中の eosinophil-derived neurotoxin (EDN) 量を測定する。また、好酸球を Transwell へ移し、各濃度の IL-5、Eotaxin および fMLP を添加して 1 から 2 時間培養し、上層から下層へ移動した細胞数を測定することで遊走能を確認する。

### (3) 好中球への分化誘導と機能解析

ヒト ES 細胞由来造血幹細胞の好中球分化増殖能の確認  
分化誘導された CD34+ 細胞を血液コロニー培養法を用いて検討する。

### 好中球分化への誘導と機能解析

ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞を用いて、AGM 領域由来ストローマ細胞との共培養法、および間葉系細胞株である 10T1/2 細胞との共培養法により分化誘導された CD34+ 細胞から、さらに G-CSF 存在下で液体培養を行い好中球への分化誘導を行う。得られた細胞の性状と機能を、各種染色、フローサイトメトリー、電子顕微鏡、NBT 法による好中球貪食能、活性酸素産生能 (好中球殺菌能) NET (nuclear extracellular trap) 形成能により測定した。同時に好中球の活性酸素産生障害を来す遺伝性免疫不全症である慢性肉芽腫症 (CGD) 患者由来 iPS 細胞のそれと比較する。

## 4. 研究成果

### (1) 肥満脂肪および好酸球、好塩基球への分化誘導と発達の解析

肥満細胞への分化誘導と継時的な分化・成熟の検討  
分化誘導された肥満細胞を、May-Giemsa、Toluidine Blue または Alcian Blue 溶液で染色したところ形態学的に肥満細胞と確認された。また、c-kit、tryptase、chymase に対する抗体、さらに、IgE-R (CRA-1)、Cathepsin-G、CD203c、Carboxypeptidase-A、CD88 に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、のマーカー遺伝子は全て陽性であった。以上より得られた細胞は肥満細胞と確認された。また、それらのほとんどがトリプテースとカ

イメースの両方を発現する結合組織型肥満細胞であった。一方、分化誘導された CD34+細胞を血液細胞コロニー形成法で2週間培養して形成された多能性造血前駆細胞から分化誘導された肥満細胞は、ほとんどがトリプテースのみを発現し、カイメースを発現していない粘膜型肥満細胞であった。

以上の結果より、胎児期の初期においては、まず結合組織型 TC 型肥満細胞が発生し、粘膜型 T 型肥満細胞は、造血系の発達に伴い発生すると推測された。

#### 好酸球・好塩基球への分化誘導と発達の検討

分化誘導された好酸球は、光学顕微鏡および電子顕微鏡による形態学的観察で確認された。さらに、免疫細胞染色により、これらの好酸球は、EPO 及び MBP (major basic protein) を発現していた。また、RT-PCR でも、ヒト ES 細胞由来好酸球は EPO、MBP、EDN、ECP (eosinophil cationic protein)、IL-5 受容体を発現していることが確認された。さらにフローサイトメトリーによる解析でも、好酸球と一致するフェノタイプを示し、特に好酸球に特異的な siglec-8 はほぼ全ての細胞で発現していた。

分化誘導された CD34+細胞を IL-3 存在下で液体培養すると、培養1週間目ぐらいまでは、培養される細胞は好酸球と好塩基球の両者の形質を有しているが、その後好酸球の形質のみを有する細胞と、好塩基球の形質のみを有する細胞が出現する。その後、好塩基球の形質を有する細胞は約1週間程度で消失し、最終的には好酸球のみが培養される。

以上の結果は、好酸球と好塩基球は共通の前駆細胞を起源としている可能性が示唆された。

#### (2) 結合組織型肥満細胞と好酸球を用いたアレルギー関連細胞の機能の検討

Substance P および compound 48/80 刺激によるヒスタミン放出の確認  
compound 48/80、あるいは substance P で刺激すると、ヒト ES 細胞由来肥満細胞は、刺激物質の濃度依存的にヒスタミンを放出した。

ヒト ES 細胞由来好酸球の機能の検討  
ヒト ES 細胞由来好酸球を分泌型 IgA で刺激すると、健常人末梢血中の好酸球に匹敵する量の EDN を放出した。また、eotaxin、IL-5、fMLP 刺激に対して、濃度依存的な遊走能を示した。

以上の結果は、ヒト ES 細胞から十分な機能を有する肥満細胞および好酸球が分化誘導されたことを示している。したがってこれらは胎生期の肥満細胞および好酸球の発生・分化・成熟過程を再現していると考えられ、こ

れらを解析することにより、今後さらに自然免疫の発生と各種疾患の発生メカニズムが解明されることが期待される。

#### (3) 好中球への分化誘導と機能解析

ヒト ES 細胞由来造血幹細胞の好中球分化増殖能の確認  
分化誘導された CD34+細胞を血液コロニー法にて解析したところ、様々な血液細胞コロニーが形成された。それらの血液細胞コロニーには、骨髄球系細胞コロニー、赤血球系細胞コロニーばかりでなく、骨髄球系細胞及び赤血球系細胞の両者を含む混合コロニーも含まれていた。

好中球分化への誘導と機能解析  
ヒト ES 細胞から AGM 領域由来ストローマ細胞との共培養法により分化誘導された CD34+細胞を、さらに G-CSF 存在下で液体培養を行い好中球への終末分化を試みたが、あらゆる条件下でも得られる好中球はわずかで、十分な検討を行うための好中球数は得られなかった。間葉系細胞株である 10T1/2 細胞との共培養法を用いたが、結果は同様であった。そのため、ヒト iPS 細胞を用いて同様に分化誘導を行ったところ、Wright-Giemsa 染色、ミエロペルオキシダーゼ染色、好中球アルカリフォスファターゼ染色陽性にて形態学的に好中球と確認される細胞が充分量得られたことから以後の検討はこれを用いた。これらの細胞はフローサイトメトリーによる表面マーカー解析でも骨髄球系のマーカーが陽性で、電子顕微鏡でミエロペルオキシダーゼ陽性・陰性の好中球特殊顆粒が確認できた。

また、NBT 法による好中球貪食能、活性酸素産生能および NET 形成能を測定したところ CGD 患者由来 iPS 細胞で欠如しているのと対照的に健常人好中球と同様のパターンを示した。

以上の結果は、ヒト iPS 細胞から十分な機能を有する好中球が分化誘導されたことを示している。これらは骨髄での好中球の発生・分化・成熟過程を再現していると考えられ、好中球の分化・成熟過程のさらなる解明のみならず、CGD をはじめとした好中球機能異常症などの先天異常症との比較から各種疾患の発生メカニズムが解明されることが期待できる。

一方今後、今回ヒト ES 細胞からの分化誘導の系で十分な好中球分化が得られなかった原因を明らかにし、肥満細胞、好酸球および好塩基球と同様の系での好中球、さらには他の免疫担当細胞を分化誘導および解析を進めていく必要があると考えている。

#### 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 17 件)

1. Yamamoto S, Otsu M, Matsuzaka E, Konishi C, Takagi H, Hanada S, Mochizuki S, Nakauchi H, Imai K, Tsuji K, Ebihara Y. Screening of Drugs to Treat 8p11 Myeloproliferative Syndrome Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells with Fusion Gene CEP110-FGFR1. PloS one. 査読有 10(3)巻 2015 e0120841. DOI: 10.1371/journal.pone.0120841.
2. Ebihara Y, Ishikawa K, Mochizuki S, Tanaka R, Manabe A, Iseki T, Maekawa T, Tsuji K. Allogeneic stem cell transplantation for patients with acute myeloid leukemia developing from severe congenital neutropenia. Br J Haematol. 査読有 164 巻 2014 451-464, DOI: 10.1111/bjh.12638 164:451-464,2014
3. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaruru K, Tojo A, Takahashi S. Impact of sex incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. Bone Marrow Transplant. 査読有 49 (5)巻 2014, 634-9 DOI: 10.1038/bmt.2014.10.
4. Nagamachi A, Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Ebihara Y, Tsuji K, Honda Z, Takubo K, Suda T, Oda H, Inaba T, Honda H. Acquired deficiency of A20 results in rapid apoptosis, systemic inflammation, and abnormal hematopoietic stem cell function. PLoS One. 査読有 9(1)巻 2014 e87425 DOI:10.1371/journal.pone.0087425.
5. Sakurai M, Kunimoto H, Aatanabe N. Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, Nishimura T, Sadahira K, Fukuda K, Okano H, Nakauchi H, Morita Y, Matsumura I, Kudo K, Ito E, Ebihara Y, Tsuji K, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. Leukemia, 査読有 28(12)巻 2014 2344-54 DOI: 10.1038/leu.2014.136.
6. Sakashita K, Kato I, Daifu T, Sada S, Hiramatsu H, Nishinaka Y, Ebihara Y, Ma F, Matsuda K, Saito S, Hirabayashi K, Kurata T, Uyen LT, Nakazawa Y, Tsuji K, Heike T, Nakahata T, Koike K. In vitro expansion of CD34+CD38- cells under stimulation with hematopoietic growth factors on AGM-S3 cells in juvenile myelomonocytic leukemia. Leukemia. 査読有 29(3)巻 2014 606-14 DOI: 10.1038/leu.2014.239.
7. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaruru K, Asano S, Tojo A, Takahashi S. Single-unit cord blood transplantation after granulocyte colony-stimulating factor-combined myeloablative conditioning for myeloid malignancies not in remission. Biol Blood Marrow Transplant. 査読有 20(3)巻 2013

- 396-401. DOI:  
10.1016/j.bbmt.2013.12.555.
8. Ebihara Y, Yamamoto S, Mochizuki S, Tsukada M, Taya Y, Kawakita T, Kato S, Ooi J, Takahashi S, Tojo A, Tsuji K. Pneumothorax in an early phase after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Rep.* 査読有 28 巻 2013 34-35  
DOI:10.4081/hr.2013.e10
  9. Ebihara Y, Yamamoto S, Mochizuki S, Tsukada M, Taya Y, Sato A, Kawakita T, Kato S, Ooi J, Takahashi S, Tojo A, Tsuji K. Unusual extramedullary relapse after haploidentical bone marrow transplantation in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *J Blood Disorders Transf* 査読有 4 巻 2013 155  
DOI:10.4172/2155-9864.1000155
  10. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimarui K, Asano S, Tojo A, Takahashi S. Single-unit cord blood transplantation after granulocyte colony-stimulating factor-combined myeloablative conditioning for myeloid malignancies not in remission. *Biol Blood Marrow Transplant.* 査読有 20(3)巻 2013 396-401 DOI:  
10.1016/j.bbmt.2013.12.555.
  11. Ebihara Y, Takedani H, Ishige I, Nagamura-Inoue T, Wakitani S, Tojo A, Tsuji K. Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of hemophilic arthropathy. *Haemophilia* 査読有 19 巻 2013 e87-e89 DOI: 10.1111/hae.12056
  12. Mae H, Ooi J, Takahashi S, Kato S, Kawakita T, Ebihara Y, Tsuji K, Nagamura F, Echizen H, Tojo A. Acute kidney injury after myeloablative cord blood transplantation in adults: the efficacy of strict monitoring of vancomycin serum trough concentrations. *Transpl Infect Dis.* 査読有 15 巻 2013 181-186 DOI:  
10.1111/tid.12038
  13. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Kawakita T, Kato S, Ooi J, Takahashi S, Tojo A, Yusa N, Furukawa Y, Oyaizu N, Watanabe J, Sato K, Kimura F, Tsuji K. Quantitative polymerase chain reaction detection of CEP110-FGFR1 fusion gene in a patient with 8p11 myeloproliferative syndrome. *Leuk Lymphoma.* 査読有 54 巻 2013 2068-2069 DOI:  
10.3109/10428194.2013.767455.
  14. Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Nariai N, Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi M, Kohichiro Tsuji. Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有 110 巻 2013 3023-3028 DOI:  
10.1073/pnas.1217039110.
  15. Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, Kato S, Kawakita T, Ooi J, Yokoyama K, Nagamura F, Tojo A, Asano S, Tsuji K. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent

and young adult patients with hematologic malignancies: A single institute analysis. *Leuk Res.* 査読有 36 巻 2012 128-131 DOI:

10.1016/j.leukres.2011.09.016.

16. Ebihara Y, Ma F, Tsuji K. Generation of red blood cells from human embryonic/induced pluripotent stem cells for blood transfusion. *Int J Hematol.* 査読有 95 巻 2012 610-616 DOI: 10.1007/s12185-012-1107-9
17. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Tsuda M, Yuji K, Uchimaruru K, Tojo A, Tsuji K. Acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1 fusion in an adult male with Down syndrome. *Acta Haematol.* 査読有 128 巻 2012 242-243 DOI: 10.1159/000340049

〔学会発表〕(計4件)

1. 植木 英亮, 小川 千登世, 西 眞範, 望月 慎史, 後藤 裕明, JPLSG 再発 ALL 委員会早期再発解析ワーキンググループ JPLSG ALL-R08-I 観察研究高リスク群(S3/4)における中間解析結果 第56回日本小児血液・がん学会学術集会 2014年11月28~30日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)
2. 海老原 康博, 望月 慎史, 大津 真, 辻 浩一郎 RCC に対して同種臍帯血移植を施行した2例 第56回日本小児血液・がん学会学術集会 2014年11月28~30日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)
3. Mochizuki S, Ogawa C, Sano H, Kinoshita A, Shinoda K, Miyashita E, Imamura T, Goto H, Adachi S, Mizutani S: A Retrospective Study of 22 patients in Refractory Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia with

Bortezomib Combined Chemotherapy in Japan The 8th St Jude-VIVA Forum in Pediatric Oncology, 28 - 29 June 2014, The Shangri La Hotel (Singapore, Singapore)

4. 望月 慎史, 小川千登世、佐野秀樹、木下明俊、篠田邦大、宮下恵実子、今村俊彦、吉原宏樹、井口晶裕、吉田咲子、西川拓朗、西眞範、豊田秀実、熊本忠史、中村和洋、西内律雄、菊田敦、後藤裕明、足立壮一、水谷修紀 本邦におけるボルテゾミブ併用化学療法を行った小児再発難治性急性リンパ性白血病 24 例 の後方視的検討 A Retrospective Study of 24 patients in Refractory Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia with Bortezomib Combined Chemotherapy in Japan第55回日本小児血液・がん学会学術集会 2013年11月29日~12月1日 ヒルトン福岡シーホーク(福岡県福岡市)

〔図書〕(計1件)

1. 海老原 康博 iPS細胞を用いた難病研究-臨床病態解明と創薬に向けた研究の最新知見 (第6章)その他領域の疾患 染色体異常 ダウン症候群 メディカルドゥ 遺伝子医学MOOK 2015年2月27号 Page208-215

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

望月 慎史 (MOCHIZUKI, Shinji)  
東京大学・医科学研究所・特任助教  
研究者番号：90349473

### (2)研究分担者

海老原 康博 (EBIHARA, Yasuhiro)  
東京大学・医科学研究所・特任准教授  
研究者番号：40302608

(H24年度のみ)

辻 浩一郎 (TSUJI, Kohichiro)  
東京大学・医科学研究所・准教授  
研究者番号：50179991