

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670489

研究課題名(和文) ヒト胚性幹細胞を用いた胎児造血の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of fetal hematopoiesis using culture system with ES cells

研究代表者

海老原 康博 (Ebihara, Yasuhiro)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：40302608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヒトES細胞由来ストローマ細胞を樹立し、このストローマ細胞との共培養により、より生理的な形でヒトES細胞から造血/血液細胞への分化誘導法を開発し、その分化過程を解析することを試みた。樹立されたストローマ細胞は、中胚葉由来の間葉系幹細胞であることが確認され、この細胞はMEFと同様にES細胞の未分化性を維持できることが確認できた。次に分化誘導された造血細胞は二次造血由来であることが判明した。今回の研究で得られたヒトES細胞から二次造血由来の造血/血液細胞を分化誘導する方法を用いて、さらなる解析によりヒト胎生期造血の解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed the culture system to generate human hematopoietic stem/progenitor cells from human embryonic stem cells (hESCs) more physiologically by the coculture with autologous stromal cells derived from hESCs. In this study, we analyzed fetal hematopoiesis using our culture system. We revealed that the established stromal cells were derived from mesodermal mesenchymal stem cells (MSCs). Human ESC-derived MSCs described above retained the ability to support the growth of autologous hESCs similar to MEF. And our system was capable of generating a number of adult-type human hematopoietic stem/progenitor cells. Using our coculture system may be available for further analysis of human fetal hematopoiesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：胎児医学 ES細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)ヒト胎生期における造血機構の発達の研究は、母体環境の胎児造血に及ぼす影響や先天性の造血障害や造血器腫瘍の病因解明のためにも、極めて重要であると考えられる。しかし、倫理的見地からヒト胎児を用いた研究が困難であり、ほとんど進捗していない。そのため、我々は、マウス胎仔モデルを用いた研究 (Blood 1998, 2001; Mol Cell Biol 2003) からヒト胎生期における造血機構の発達を類推してきた。しかしマウスを用いた研究は、胎生期造血に多くの情報をもたらしたが、造血機構の発達においてマウス胎仔とヒト胎児とは多くの相違点が認められた。

(2)また、我々は、ヒト胎生期を起源とする臍帯血中の造血幹細胞の分化増殖とその制御機構についても研究してきた (Proc Natl Acad Sci USA 1995; Blood 1997, 1999, 2001; J Exp Med 2006; Br J Haematol 1997, 2001; J Immunol 1999; J Clin Invest 2000; Stem Cells 2000; Bone Marrow Transplant 2000; Int J Hematol 2001, 2003)。そこで、我々は、マウス胎生期造血の研究成果と、ヒト胎生期由来の臍帯血中の造血幹細胞に関する研究成果を踏まえ、胎生期に由来するヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) から造血/血液細胞を分化誘導するシステムの確立を目指してヒト ES 細胞の使用計画「ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) から造血細胞への分化誘導法の開発」を東京大学バイオサイエンス委員会ヒト生殖・クローン専門委員会に申請し、平成 14 年 5 月 27 日に同委員会の承認を得た。その後、同年 7 月 8 日に文部科学省特定胚及びヒト ES 細胞研究専門委員会にヒト ES 細胞の使用申請し、同年 12 月 20 日に文部科学大臣の確認を得て、研究を開始した。その結果、我々は、ヒト ES 細胞から造血/血液細胞を分化誘導することに成功した (Proc Natl Acad Sci USA 2008; Int J Hematol 2007)。

そこで、我々は、この分化誘導系を応用して、ヒト胚から血液細胞が産生されるまでの過程を *in vitro* で再現することで、これまでほとんど解っていないヒト胎生期造血を解析することを着想した。

(3)しかし、ヒト ES 細胞から造血/血液細胞への分化誘導法の多くは胚様体形成を介した方法やマウス由来ストローマ細胞との共培養法を応用したものが多く、我々の確立した分化誘導法も含めて、異種動物細胞との共培養系のため、ヒト胎生期造血を正しく反映していないと考えられる。もちろん胚様体形成法は生理的ではなく、ヒト成人骨髄由来ストローマ細胞との共培養法では、ヒト ES 細胞の造血/血液細胞への分化誘導が困難である。以上を踏まえ、ヒト ES 細胞を用いたヒト胎生期造血の解析には、異種動物ストローマに依存しないヒト ES 細胞から造血/血液

細胞への分化誘導の開発が重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト胎児の造血発達過程とこれを制御する分子機構を明らかにすることを目的とする。そのために、異種動物ストローマに依存しないヒト ES 細胞から造血/血液細胞への分化誘導系を開発し、ヒト胚から造血細胞が産生し血液細胞が産生されるまでの過程を *in vitro* で再現し、その分化過程を細胞生物学的、分子生物学的手法を用いて詳細に解析する。

3. 研究の方法

(1)ヒト ES 細胞からストローマ細胞を分化誘導法の開発

ヒト ES 細胞を、ゼラチンコートプレートに播種し、5%ヒト platelet lysate を用いて培養し、ヒト ES 細胞からストローマ細胞への分化誘導する。

(2)ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の解析

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の性状の解析

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の細胞表面マーカーを、フローサイトメトリーで解析する。またマーカー遺伝子を RT-PCR 法を用いて検討する。

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の間葉系幹細胞としての機能解析

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の脂肪・骨・軟骨細胞への分化能を、それぞれ特異的分化誘導培養法により検証する。

(3)ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞とヒト ES 細胞との共培養による未分化性の維持

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞との共培養後に、ヒト ES 細胞の未分化マーカーの発現を検討する。

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞との共培養後にヒト ES 細胞を NOD/SCID マウスに移植して teratoma 形成を確認する。

(4)動物細胞に非依存的なヒト ES 細胞から造血/血液細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞との共培養によるヒト ES 細胞から造血/血液細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞を放射線照射後、種々のサイトカインを含む無血清培養液で共培養する。

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞との共培養によりヒト ES 細胞から分化誘導された造血/血液細胞の性状の解析

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞との共培養によりヒト ES 細胞から分化誘導された造血細胞を用いて、ウシ胎仔血清を含む培地にて

血液細胞コロニー培養し、形成された血液コロニーを用いて、分化解析を行う。

4. 研究成果

(1)ヒト ES 細胞からストローマ細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞をゼラチンコートプレートに播種し、5%ヒト platelet lysate を含む培養液で継代培養すると、6～8週後には紡錘形のストローマ細胞に分化誘導された。

(2)ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の解析

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の性状の解析

フローサイトメトリーによる解析の結果、ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞は、CD105、CD166 陽性、CD45、CD34、CD14 陰性で、間葉系幹細胞のフェノタイプを示した。

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の間葉系幹細胞としての機能解析

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞を脂肪・骨・軟骨細胞特異的分化誘導培養法により分化誘導すると、軟骨、骨、脂肪細胞のいずれにも分化誘導されたことより、間葉系幹細胞であることが確認された。また、RT-PCR 法を用いた検討では、Oct-4 の発現は認められず、brachury や MSX1 の発現の発現を認めた。今回樹立したストローマ細胞は中胚葉由来の間葉系幹細胞と考えられた。

(3)ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞とヒト ES 細胞との共培養による未分化性の維持

放射線照射したヒト ES 細胞由来ストローマ細胞とヒト ES 細胞を 4 週間共培養した後でもヒト ES 細胞は Oct-4、Nanog、Sox-2、TRA-1-60 を発現しており、未分化性を維持していた。また、4 週間ヒト ES 細胞をヒト ES 細胞由来ストローマ細胞との共培養後にヒト ES 細胞を NOD/SCID マウスに移植すると teratoma 形成が確認できた。以上のことから、ヒト ES 細胞由来間葉系幹細胞は ES 細胞の未分化性を維持できることが確認できた。

(4)動物細胞に非依存的なヒト ES 細胞から造血細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞との共培養によるヒト ES 細胞から造血/血液細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞を放射線照射後、ヒト ES 細胞と種々のサイトカインを含む無血清培養液で共培養すると、培養 10～14 日目にはヒト ES 細胞コロニー中に数石状細胞群が観察され、その後小型円形細胞の増殖が認められた。それらを血液細胞コロニー培養すると、骨髓球系細胞コロニー、赤血球系細胞コロニーばかりでなく、骨髓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形成された。以上の結果は、ヒト ES 細胞から動物細胞に非依存的に多能性造血

細胞を含む種々の造血細胞が分化誘導されたことを示している。また、形成された赤血球細胞コロニーに含まれる約 80%の赤血球が、グロブリンを発現しており、これらの赤血球は成人型ヘモグロビンを合成していると考えられ、分化誘導された造血/血液細胞は二次造血を起源としていることが確認された。

(まとめ)

異種動物細胞に依存しないヒト ES 細胞から二次造血由来の造血/血液細胞を分化誘導する方法を開発した。さらなる解析によりヒト胎生期造血の解明が期待される。

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 18 件)

Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimar K, Tojo A, Takahashi S. Impact of sex incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. DOI:10.1038/bmt.2014.10. Bone Marrow Transplant. 査読有 2014 In press, DOI:10.1038/bmt.2014.10.
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
Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimar K, Tojo A, Takahashi S. Effect of ABO blood group incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation following myeloablative conditioning. Biol Blood Marrow Transplant. 査読有 20(4)巻 2014 577-81, DOI:10.1016/j.bbmt.2013.12.563.
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.
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
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(5) 巻 2013 1000155, DOI:10.4172/2155-9864.1000155
Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaruk, 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.
Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, Okabe M, Masaki H, Takaki S, Otsu M, Nakauchi H. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther.* 査読有 21(7) 巻 2013 1424-31 DOI: 10.1038/mt.2013.71.
Saka K, Kawahara M, Teng J, Otsu M, Nakauchi H, Nagamune T. Top-down motif engineering of a cytokine receptor for directing ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Journal of biotechnology.* 査読有 168(4) 巻 2013 659-65 DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.09.012.
Saito T, Yano F, Mori D, Ohba S, Hojo H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Tanaka S, Chung UI, Kawaguchi H. Generation of Col2a1-EGFP iPS cells for monitoring chondrogenic differentiation. *PLoS One.* 査読有 8(9) 巻 2013 e74137 DOI: 10.1371/journal.pone.0074137.
Razak SR, Ueno K, Takayama N, Nariai N, Nagasaki M, Saito R, Koso H, Lai CY, Murakami M, Tsuji K, Michiue T, Nakauchi H, Otsu M, Watanabe S. Profiling of microRNA in human and

mouse ES and iPS cells reveals overlapping but distinct microRNA expression patterns. *PLoS One.* 査読有 8(9) 巻 2013 e73532 DOI: 10.1371/journal.pone.0073532.
Nishimura S, Manabe I, Takaki S, Nagasaki M, Otsu M, Yamashita H, Sugita J, Yoshimura K, Eto K, Komuro I, Kadowaki T, Nagai R. Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation. *Cell metabolism.* 査読有 18(5) 巻 2013 759-766 DOI:10.1016/j.cmet.2013.09.017.
Lin HT, Otsu M, Nakauchi H. Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences.* 査読有 368(1609) 巻 2013 20110334 DOI:10.1098/rstb.2011.0334.
Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *American journal of human genetics.* 査読有 92(3) 巻 2013 431-8 DOI:10.1016/j.ajhg.2013.01.015.
Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koefler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nature genetics.* 査読有 45(10) 巻 2013 1232-7 DOI:10.1038/ng.2731.
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 1(6) 巻 2013 499-508

DOI:10.1016/j.stemcr.2013.10.010.
Hirata S, Takayama N, Jono-Ohnishi R,
Endo H, Nakamura S, Dohda T, Nishi M,
Hamazaki Y, Ishii E, Kaneko S, Otsu M,
Nakauchi H, Kunishima S, Eto K.
Congenital amegakaryocytic
thrombocytopenia iPS cells exhibit
defective MPL-mediated signaling.
The Journal of clinical investigation.
査読有 123(9)巻 2013 3802-14
DOI:10.1172/JCI64721.
Hamanaka S, Ooehara J, Morita Y, Ema
H, Takahashi S, Miyawaki A, Otsu M,
Yamaguchi T, Onodera M, Nakauchi H.
Generation of transgenic mouse line
expressing Kusabira Orange
throughout body, including
erythrocytes, by random segregation
of provirus method. Biochemical and
biophysical research communications.
査読有 435(4)巻 2013 586-91
DOI:10.1016/j.bbrc.2013.05.017.

〔学会発表〕(計 6 件)

自己骨髄由来間葉系幹細胞を用いた血
友病関節症に対する治療の可能性
海老原康博、望月慎史、大津真、竹谷英
之、辻浩一郎 第55回日本小児血液・が
ん学会学術集会 福岡：ヒルトン福岡シ
ーホーク 2013年11月29日～12月1日
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
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、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 第55回日本小児血液・がん学会
学術集会、福岡：ヒルトン福岡シーホ
ーク 2013年11月29日～12月1日
ヒトiPS由来肥満細胞の機能解析
五十嵐晃、熊谷智明、平井博之、永田欽
也、花田佐智代、海老原康博、辻浩一
郎
第 63 回日本アレルギー学会 東京：ホ
テルニューオータニ 2013 年 11 月 28
～30 日
Drug screening for the 8p11
myeloproliferative syndrome using
patient iPS cells
Mai Nanya, Shohei Yamamoto, Yasuhiro
Ebihara, Shinji Mochizuki, Makoto
Otsu, Minoru Tozuka, Hiromitsu
Nakauchi, Kohichiro Tsuji 第 75 回日
本血液学会 札幌：ロイトン札幌 2013
年 10 月 11～13 日
Generation and analysis of a novel

model for CMML with acquired
expression of CBL Q367P
Yuichiro Nakata, Takeshi Ueda,
Norimasa Yamasaki, Akiko Nagamachi,
Keiyo Takubo, Yasuhiro Ebihara,
Masashi Sanada, Seishi Ogawa,
Kohichiro Tsuji, Toshio Suda, Toshiya
Inaba, Hiroaki Honda 第 75 回日本血
液学会 札幌 2013 年 10 月 11～13 日
重症先天性好中球減少症患者由来の
iPS 細胞の樹立とその分子生物学的解
析
海老原康博、平本貴史、山本将平、望月
慎史、辻浩一郎、溝口洋子、中村和洋、
小林正夫 第 116 回日本小児科学会
広島：広島国際会議場 2013 年 4 月 19
～21 日

〔その他〕
ホームページ等

<http://stemcell-u-tokyo.org/scp/>
東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究セ
ンター 幹細胞プロセッシング分野

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
海老原 康博 (EBIHARA Yasuhiro)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：40302608
- (2) 研究分担者
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
- (3) 研究分担者
大津 真 (OTSU Makoto)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：30361330