

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670498

研究課題名(和文)細胞内代謝と微小環境の制御による、ヒトES・iPS細胞由来造血幹細胞の維持増幅

研究課題名(英文) Induction and expansion of PSC-derived HSCs by manipulating culture microenvironment

研究代表者

中畑 龍俊 (Nakahata, Tatsutoshi)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：20110744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトES/iPS細胞から2次元無血清条件で誘導したCD34陽性造血前駆細胞に対し、同じくES/iPS細胞に由来する血管内皮細胞ストロマとの共培養によって造血幹細胞様活性を賦与できることを明らかにした。さらに、低分子化合物の添加によって、NOGマウス体内における長期生着能を維持したままこれらの細胞を増幅できることを示した。

研究成果の概要(英文)：Developing the way of hematopoietic stem cell (HSC) expansion or de novo stem cell induction has been of great interest in medical scientific fields. We cleared that pluripotent stem cell (PSC)-derived VE-Cadherin+ endothelial cells function as stromal microenvironment to induce PSC-derived HSC-like cells; they showed serial colony forming potential in vivo and were observed engrafted in NOG mice as long as twelve weeks. Moreover, a small molecule cocktail containing GSK3 and AHR pathway inhibitors successfully expanded them as high as six times in vitro, and increased the chimerism in vivo.

研究分野：医歯薬学

キーワード：造血幹細胞 ES/iPS細胞 移植・再生医療 臨床応用 細胞内代謝 ストロマ細胞 ニッチ

1. 研究開始当初の背景

近年、Wnt や HIF をはじめとする細胞内シグナル経路、あるいは血管内皮細胞などの微小環境細胞が造血幹細胞の長期恒常性維持に対し果たす役割が徐々に明らかにされてきている。こうしたシグナルを試験管内で人為的に制御することができれば、造血幹細胞を老化や酸化ストレスから防御しながら自己増幅する手法に結びつく可能性がある。移植可能な造血幹細胞の体外増幅は重要な医学的課題である。また、ES/iPS 細胞からの機能的造血幹細胞作出は再生医療にとどまらず、血液疾患の病態解析への応用という観点からも臨床的・学術的な意義が大きい。

2. 研究の目的

まず、マトリクスからのシグナルや酸素濃度、化合物の違いが、臍帯血由来の造血幹前駆細胞集団にどのような細胞プロファイル・幹細胞能の変動をもたらすかを明らかにすることを目的とする。そうして得られたデータをヒト ES/iPS 細胞からの造血細胞分化に適用し、マウスへの長期生着可能な造血幹細胞を試験管内で作出・同定する方法の開発を目指す。

3. 研究の方法

臍帯血 CD34 陽性造血幹前駆細胞分画を種々の低分子化合物での刺激、あるいは iPS 細胞由来血管内皮細胞などとのストロマ共培養法を用いて維持増幅する。継代コロニー形成能および免疫不全 NOG マウスへの生着率を指標に、それら増幅後の細胞の幹細胞能を評価する。

申請者らが先に報告した二次元無血清培養法を用いてヒト ES/iPS 細胞から CD34 陽性造血前駆細胞を誘導する。それらを で得られた条件に当てはめて培養し、細胞増幅能、継代コロニー形成能、NOG マウスへの長期生着能の観点から評価する。以上の方法により、ヒト ES/iPS 細胞から造血幹細胞を作出する手法を探索、決定する。

4. 研究成果

Wnt 刺激と AHR 阻害の組み合わせにより、臍帯血造血幹細胞を従来に比べ高効率に体外増幅出来ることを見出した。

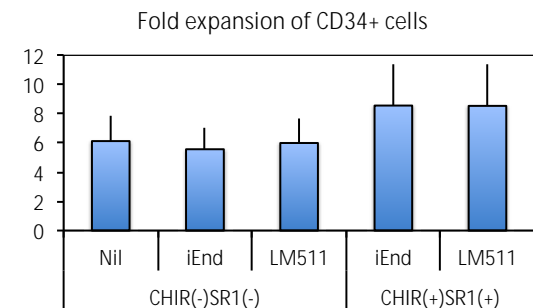
【方法】臍帯血 CD34 陽性細胞を種々の低分子化合物およびサイトカインで刺激し、1 週間培養後にメチルセルロースコロニーアッセイおよび NOG マウスへの移植を行って幹細胞

維持増殖能を評価した。

【結果】CHIR(GSK 阻害剤)と SR1(AHR 阻害剤)の組み合わせにより、メチルセルロースコロニー継代法、NOG マウス骨髄再建能ともにもっとも有意な幹細胞増幅能を得られることが明らかになった。

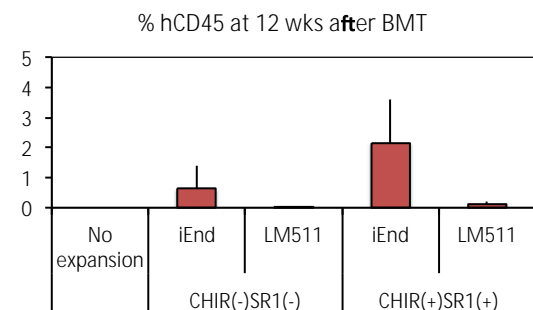
ヒト ES/iPS 細胞由来血管内皮ストロマ細胞との共培養により、ヒト ES/iPS 細胞由来 CD34 陽性細胞から造血幹細胞様の機能を持つ細胞を無血清条件下で誘導することに成功した。

【方法】の低分子化合物カクテルが、ヒト ES/iPS 細胞由来造血幹細胞も増幅可能か検討を試みた。まず試験管内でヒト iPS 細胞に BMP4、VEGF サイトカインを順次投与し、中胚葉前駆細胞を経て KDR・CD34 共陽性の血球血管内皮共通前駆細胞を誘導した。ここに SCF、TPO を加えて CD34 陽性造血前駆細胞を誘導し、磁気カラムを用いて単離した。それらを iPS 細胞由来血管内皮細胞または数種のマトリ



クス上に載せ替え、さらに 1 週間の培養を行った。その際、の低分子化合物カクテルを投与し、効果を判定した。

【結果】試験管内での iPS 細胞由来 CD34 陽性細胞増幅率は、各条件下で有意差を認めなかった。一方、継代コロニー形成能は、血管内皮ストロマ上で培養した場合にのみ、2 継代目までの CFU-GM、CFU-M、BFU-E が観察された。移植実験では、血管内皮ストロマ上で共培養した場合のみ 12 週以上の長期キメリズム維持が観察された。その割合は hCD45 を指標にすると CHIR+SR1 非添加条件で 0.62 (SD=0.76)%, 添加条件で 2.13 (SD=1.46)% であった。



【結論】以上から、ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞を用いることにより iPS 細胞由来造血細胞からマウスで生着可能な造血幹前駆細胞を誘導し得ること、低分子化合物カクテルによりそれらの機能を維持したまま増幅出来ることが示唆された。

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 13 件)

1. Nemoto A., Saida S., Kato I., Kikuchi J., Furukawa Y., Maeda Y., Akahane K., Honna-Oshiro H., Goi H., Kagami K., Kimura S., Sato Y., Okabe S., Niwa A., Watanabe K., Nakahata T., Heike T., Sugita K. and Inukai T.: Specific Antileukemic Activity of PD0332991, a CDK4/6 Inhibitor, against Philadelphia Chromosome-Positive Lymphoid Leukemia. *Mol Cancer Ther.* 2016 Jan;15(1):94-105. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-1065. Epub 2015 Dec 4. 査読有
2. Yamashita S, Chiyonobu T, Yoshida M, Maeda H, Zuiki M, Kidowaki S, Isoda K, Morimoto M, Kato M, Saito H, Matsumoto N, Nakahata T., Saito MK, Hosoi H.: Mislocalization of syntaxin-1 and impaired neurite growth observed in a human iPSC model for STXBP1-related epileptic encephalopathy. *Epilepsia.* 2016 Apr;57(4):e81-6. doi: 10.1111/epi.13338. Epub 2016 Feb 25 査読有
3. 齋藤潤、中畑龍俊：血液・免疫疾患の iPS 細胞研 . 月刊細胞 Vol.48 No.2 (通巻 633 号)(特集 疾患特異的 iPS 細胞研を用いた病態解明の最前線): 13 (65) -16(68) 2016 年 2 月 20 日 ニューサイエンス社
4. Yoshida M, Kitaoka S, Egawa N, Yamane M, Ikeda R, Tsukita K, Amano N, Watanabe A, Morimoto M, Takahashi J, Hosoi H, Nakahata T., Inoue H, Saito MK, Modeling the early phenotype at the neuromuscular junction of spinal muscular atrophy using patient-derived iPSCs. *Stem Cell Reports.* 2015 Apr 14;4(4):561-8. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.02.010. Epub 2015 Mar 19. 査読有
5. Suzuki NM, Niwa A., Yabe M, Hira A, Okada C, Amano N, Watanabe A, Watanabe K, Heike T, Takata M, Nakahata T., Saito MK, Pluripotent cell models of Fanconi anemia identify the early pathological defect in human hemoangiogenic progenitors. *Stem Cells Transl Med.* ;4(4):333-8. 2015 Apr, doi: 10.5966/sctm.2013-0172. Epub 2015 Mar 11. 査読有
6. Shoji E, Sakurai H, Nishino T, Nakahata T., Heike T, Awaya T, Fujii N, Manabe Y, Matsuo M, Sehara-Fujisawa A.: Early pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy modelled in patient-derived human induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports.* 2015 Aug 20;5:12831. doi: 10.1038/srep12831. 査読有
7. Sakashita K, Kato I, Daifu T, Saida 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.* 2015 Mar;29(3):606-14. doi: 10.1038/leu.2014.239. Epub 2014 Aug 8. 査読有
8. Takahashi H, Watanabe T, Kinoshita A, Yuza Y, Moritake H, Terui K, Iwamoto S, Nakayama H, Shimada A, Kudo K, Taki T, Yabe M, Matsushita H, Yamashita Y, Koike K, Ogawa A, Kosaka Y, Tomizawa D, Taga T, Saito AM, Horibe K, Nakahata T., Miyachi H, Tawa A, Adachi S.: High event-free survival rate with minimum-dose-anthracycline treatment in childhood acute promyelocytic leukaemia: a nationwide prospective study by the Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group. *Br J Haematol.* 2016 Mar 31. doi: 10.1111/bjh.14068. [Epub ahead of print] 査読有
9. Maeda H, Chiyonobu T, Yoshida M, Yamashita S, Zuiki M, Kidowaki S, Isoda K, Yamakawa K, Morimoto M, Nakahata T., Saito MK, Hosoi H.: Establishment of isogenic iPSCs from an individual with SCN1A mutation mosaicism as a model for investigating neurocognitive impairment in Dravet syndrome. *J Hum Genet.* 2016 Feb 4. doi:

- 10.1038/jhg.2016.5. [Epub ahead of print] 査読有
10. 中畑龍俊: iPS 細胞から HTS に耐えうる疾患モデル評価系の構築 (特別インタビュー) 国際医薬品情報 通巻第 1026 号: 25-27 2015 年 1 月 26 日
 11. 齋藤潤、中畑龍俊: iPS 細胞を使った血液疾患研究. 病理と臨床 Vol133, No6: 582-586 2015 年 6 月 1 日発行
 12. 中畑龍俊: . 臨床応用を目指した基礎研究 疾患モデル細胞、iPS 細胞を用いた毒性評価と創薬研究「iPS 細胞を用いた疾患モデル研究(総論)」(増刊号 再生医療 - 新たな医療を求めて -) 日本臨床 37 巻増刊号 5 (通巻第 1080 号): 374-380 2015 年 6 月 20 日
 13. 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.* 3(7):792-800. 2014 Jul, doi: 10.5966/sctm.2013-0216. Epub 2014 May 29. 査読有

[学会発表](計 19 件)

1. Niwa Akira, Saito Megumu, Nakahata Tatsutoshi; PSC-Derived hematopoietic cells as a new tool for exploring leukemia pathogenesis. (poster) ISSCR 2015 Annual Meeting 2015/6/24-27(24) Stockholmsmässan Exhibition and Convention Center (Stockholm, Sweden)
2. Saiki Norikazu, Ozaki Hitomi, Hirayama Akiyoshi, Soga Tomoyoshi, Tomita Masaru, Nakahata Tatsutoshi, Saito Megumu K.; The contribution of metabolites of the TCA cycle to maintenance of pluripotent stem cells.(poster) ISSCR 2015 Annual Meeting 2015/6/24-27(25) Stockholmsmässan Exhibition and Convention Center (Stockholm, Sweden)
3. Nishinaka Yoko, Niwa Akira, Osawa Mitsujiro, Nakahata Tatsutoshi, Saito Megumu K.; Exploring the pathogenesis of transient my-exploiferative disorder using iPSCs. (poster) ISSCR 2015 Annual Meeting 2015/6/24-27(26) Stockholmsmässan Exhibition and Convention Center (Stockholm, Sweden)
4. Ohta Ryo, Niwa Akira, Nakahata Tatsutoshi, Saito Megumu; Sequential switching of matrices directs human pluripotent stem cells into endothelial lineage. (poster) ISSCR 2015 Annual Meeting 2015/6/24-27(26) Stockholmsmässan Exhibition and Convention Center (Stockholm, Sweden)
5. 中畑龍俊:iPS細胞を用いた今後の医療. 第66回長野県医学会 2015年7月26日 上田東急 REI ホテル3階「信濃の間」(長野県上田市)
6. 中畑龍俊:疾患特異的 iPS 細胞を用いた今後の医療. 第39回阿蘇シンポジウム 2015年8月1日 阿蘇リゾートグランヴィリオホテル(熊本県阿蘇市)
7. 中畑龍俊:iPS細胞研究の現状と今後の臨床展開 - いよいよ本格化する再生医療の創薬の世界 - 第39回日本血液事業学会総会 2015年10月4-6日(4日) グランキューブ大阪(大阪市)
8. 中畑龍俊:iPS細胞を用いた今後の医療. 第29回日本臨床内科医学会 2015年10月11-12日(12日) ホテル日航熊本(熊本県熊本市)
9. 長谷川大輔、濱麻人、野沢和江、平林真介、渡邊健一郎、土田昌宏、伊藤雅文、小島勢二、中畑龍俊、真部淳:治療関連骨髄異形成症候群 44 例の臨床像. cytopenia of childhood defined according to the WHO 2008 classification. 第57回日本小児血液・がん学会学術総会 2015年11月27-29日(27日) 甲府富士屋ホテル(山梨県甲府市)
10. Niwa Akira, Nakahata Tatsutoshi, Saito Megumu: Efficient and less labor-intensive methods for inducing vascular endothelial cells from human pluripotent stem cells. ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center (CANADA) June 18-21, 2014(6/18, poster)
11. Suzuki Naoya, Samata Bumpei, Habu Toshiyuki, Watanabe Akira, Nakahata Tatsutoshi, Takahashi Jun, Saito Megumu: Impaired neuronal maturation on seckel syndrome is caused by loss of self-organization and centrosome integrity during early neuronal development. ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center (CANADA) June 18-21, 2014(6/20, poster)
12. Ohta R, Niwa A, Nakahata T, Saito MK.: Efficient And Less Labor-Intensive Methods for Inducing Vascular Endothelial Cells from Human Pluripotent Stem Cells, ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center (CANADA) June

- 18-21,2014(poster)
13. Saiki N., Oshima K., Hirayama A., Soga T., Tomita M., Nakahata T., Saito MK.: Pluripotent stem cell models of reticular dysgenesis as a tool for elucidating the potential role of intracellular bioenergetics systems on controlling the fate of hematopoietic progenitors, ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center(CANADA) June 18-21,2014(poster)
14. 桐野浩輔、尾崎富美子、丹羽明、中畑龍俊、齋藤潤、平家勇司：末梢血 Natural Killer 細胞を用いた人口多能性幹細胞の樹立．第 35 回日本炎症・再生医学会 2014 年 7 月 1-4 日(2 日) 万国津梁館(沖縄県名護市) ポスター発表
15. 王茂治、丹羽明、齋藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞を用いた Chediak-東症候群の病態解析．第 35 回日本炎症・再生医学会 2014 年 7 月 1-4 日(2 日) 万国津梁館(沖縄県名護市) ポスター発表
16. 中畑龍俊：iPS 細胞を用いた小児医療の将来．第 50 回中部日本小児科学会 2014 年 8 月 10 日 信州大学医学部付属病院
17. 中畑龍俊：iPS 細胞時代：医療はどうか変わるか．日本早期認知症学会(JSED)第 15 回学術大会 in 佐倉 2014 年 9 月 12-14 日(14 日) ウィンストンホテル・ユーカー(千葉県佐倉市)
18. 中畑龍俊：臍帯血中の造血幹細胞発見秘話と最近の iPS 細胞研究．第 38 回日本血液事業学会総会 2014 年 10 月 29-31 日(29 日) 広島国際会議場(広島県広島市)
19. Nishinaka Yoko, Akira Niwa, Mitsujiro Osawa, Akira Watanabe, Tatsutoshi Nakahata, Megumu K Saito: Exploring the Pathogenesis of Down Syndrome-Related Myeloproliferative Disorders Using iPSCs. 56th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 6-9, 2014, Mascone Convention Center(San Francisco) (poster).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中畑 龍俊 (NAKAHATA, Tatsutoshi)
京都大学・iPS 細胞研究所・特定拠点教授

授

研究者番号：20110744

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

丹羽 明 (NIWA, Akira)
京都大学・iPS 細胞研究所・助教
研究者番号：20546999

大澤 光次郎 (Osawa, Mitsujiro)
京都大学・iPS 細胞研究所・助教
研究者番号：70546770