

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08337

研究課題名(和文) ヒツジ胎仔造血環境下でのヒトiPS細胞由来造血幹細胞の発生機序の解明とその応用

研究課題名(英文) Elucidation of the developmental mechanism of human iPS cell-derived hematopoietic stem cells in the sheep fetal hematopoietic environment

研究代表者

阿部 朋行 (Abe, Tomoyuki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20610364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヒツジ胎仔肝臓内でヒトiPS細胞由来の中胚葉系細胞から造血幹細胞を分化させることに成功した(特許第6861405号)。本研究では、ヒト造血幹細胞の産生メカニズムを明らかにし、体外培養系に応用することを試みた。その結果、ヒトiPS細胞由来造血性内皮細胞はヒツジ胎仔肝臓内で、Notchシグナルを介して、多系統分化能を特徴とする造血幹細胞へと分化することを明らかにした(Exp Hematol., 2021)。ヒツジ胎仔体内で起きる造血幹細胞への分化誘導メカニズムを試験管内に応用するには、培養法のさらなる改善が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄や臍帯血を用いた造血幹細胞移植は、がん治療や細胞移植のための有効な治療手段である。造血幹細胞のドナー不足が続く近年、新たな移植細胞源としてiPS細胞の活用が期待されているものの、iPS細胞の造血幹細胞への分化誘導はいまだに難しい。本研究により、試験管内でヒトiPS細胞から造血幹細胞を分化誘導・大量生産するための基盤となるデータが明らかとなった。また将来的に本研究を応用して、動物体内での臓器の三次元構築や、未だ作製が困難な系統の細胞の分化誘導が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in the generation of hematopoietic stem cells (HSCs) from human iPS cell-derived mesodermal cells in fetal sheep liver (Patent No. 6861405). In this study, we attempted to clarify the generation mechanism of human hematopoietic stem cells and to apply it to an in vitro culture system. As a result, we found that human iPS cell-derived mesodermal cells differentiate into HSCs, which are characterized by long-term engraftment and multilineage differentiation, via Notch signaling in the liver of sheep fetuses (Exp Hematol., 2021). To apply the mechanism of differentiation into HSCs in sheep fetuses in vitro, further improvement of the culture method is necessary.

研究分野：幹細胞生物学、実験動物学

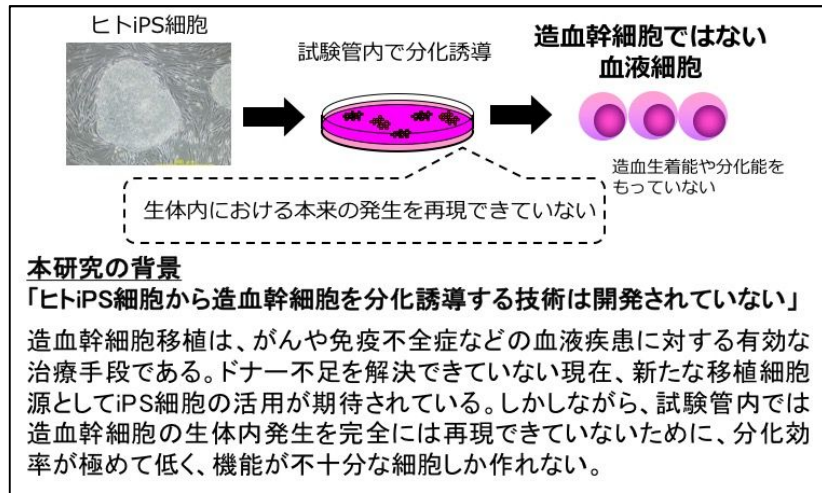
キーワード：多能性幹細胞 造血幹細胞 分化 動物体内 胎仔 ヒツジ

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

■ ヒト多能性幹細胞から造血幹細胞を分化誘導する技術が開発されていない

骨髄や臍帯血を用いた造血幹細胞移植は、がん治療や細胞移植のための極めて有効な治療手段である。一方で造血幹細胞移植は、慢性的なドナー不足という深刻な問題を抱えている。そのため近年、新たな移植細胞源としてES/iPS細胞の応用が期待されている。しかしながら、試験管内では造血幹細胞の生体内での本来の発生を完全には再現できていないために、分化効率が極めて低く、機能が不十分な細胞しか作れない(右図)。



■ ヒツジ胎仔造血環境を利用したヒト iPS 細胞の造血分化誘導技術の開発

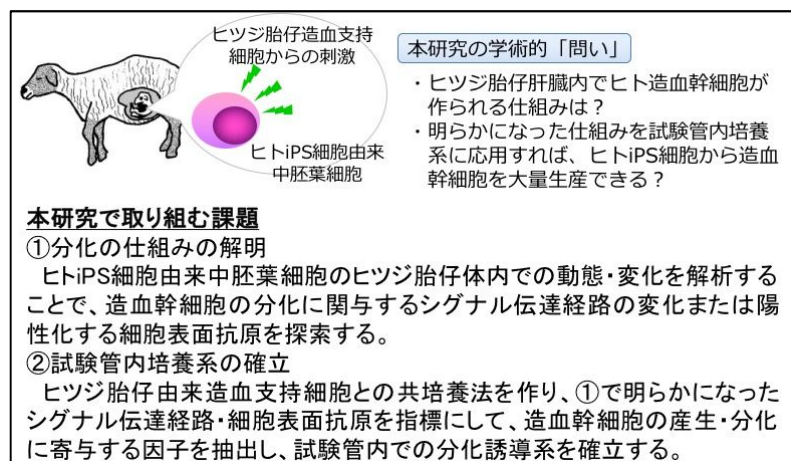
一方、申請者らは、妊娠早期(約60日齢、満期は147日齢)のヒツジ胎仔が免疫寛容を誘導することを利用し、造血発生場である胎仔肝臓内でヒト iPS 細胞由来の中胚葉細胞を造血幹細胞に分化させることに成功した(特許第6861405号)。ヒツジ胎仔肝臓を介して得られたヒト iPS 細胞由来造血幹細胞は、骨髄由来の造血幹細胞と同じく、長期生着能を有していることがわかっている。

■ ヒツジ胎仔肝臓内でのヒト造血幹細胞の産生機序は明らかではない

申請者らの研究における独創的な点は、本来の造血幹細胞の発生過程を忠実に再現できることである。すなわち哺乳動物では、造血幹細胞は中胚葉系細胞を経て発生し、胎仔肝臓で成熟・増殖を遂げた後で、成体造血組織である骨髄に移行する。本研究では、将来、造血幹細胞となる細胞(ヒト iPS 細胞由来の中胚葉細胞)を発生学的に近い段階の体内環境(胎仔の肝臓)に移植することで、本来の発生の仕組みと同じように造血幹細胞へ分化させることができる。この時、ヒツジ胎仔の造血環境からヒト iPS 細胞由来中胚葉細胞に、分化を進めるための何らかの働きかけがあると考えられる。本研究では、「なぜヒツジ胎仔肝臓内でヒト iPS 細胞由来の中胚葉細胞が造血幹細胞へ分化できるのか」を解く分子機構を明らかにする。また、明らかになった分化の仕組みを基に、試験管内でヒト造血幹細胞を分化誘導する技術を開発する。

2. 研究の目的

本研究では、試験管内でヒト iPS 細胞から造血幹細胞を作る技術の開発を目指す。我々は、ヒツジ胎仔肝臓内で長期生着能と多系統分化能をもつ造血幹細胞を作ることに成功している。この独自の特許技術を使い、次の2つの項目に取り組む。すなわち、ヒツジ胎仔の造血環境からヒト iPS 細胞由来中胚葉細胞への作用とその因子の探索、試験管内培養系への応用、である。



【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

3. 研究の方法

本研究の実施にあたっては、自治医科大学医学部 花園豊 教授ならびに宇都宮大学農学部 長尾慶和 教授の協力を得た。

■ ヒツジ胎仔体内でのヒト iPS 細胞由来中胚葉細胞の動態解析

ヒト iPS 細胞を、6 日間にわたってサイトカイン添加下で OP9 ストローマ細胞と共培養し、妊娠 60 日齢前後(満期 147 日齢)のヒツジ胎仔肝臓内に移植した。移植手技は、子宮壁越しに超音波ガイド下で胎仔の肝臓を把握し、細胞を注入する方法を用いた(Abeら, 2014, 2012, 2011, 2009)。移植 28 日後のヒツジ胎仔の肝臓および骨髄、ならびに移植 23 ヶ月後のヒツジ成体骨髄を採取した。これらのサンプルに対して、血球細胞マーカーCD45 および Notch シグナル活性化マーカーN1ICD および HES-1、リンパ球系マーカーCD2、赤芽球系マーカーCD71、巨核球系マーカーCD42b、造血幹細胞マーカーSCL の発現を免疫染色で評価した。この時、ヒト iPS 細胞に由来する細胞をヒト特異的マーカーSUN2 または STEM121 で同時に染色した。

■ 共培養系の確立

造血発生に関与すると考えられるヒツジ胎仔組織として、臍帯血静脈内皮細胞、肝臓、骨髄からストローマ細胞を初代培養し、その一部は SV40LT antigen の導入により不死化した。これらの細胞とヒト iPS 細胞由来中胚葉細胞を共培養し、CD45 や N1ICD の発現を免疫染色で評価した。

■ 倫理面への配慮

遺伝子組換え実験

本研究で行われる組換え DNA 実験は、以下の通り承認を得た。ヒト iPS 細胞の作製は自治医科大学再生医学研究部(P2 に対応可)で実施し、ヒツジの飼養管理は宇都宮大学農学部附属農場(P1A に対応可)で行った。

なお、本実験では、遺伝子非組換え細胞または遺伝子組換え済み細胞を入手し、ウイルス粒子の残存がないことを予め確認したもののみを、ヒツジ胎仔への移植に用いた(機関承認 P1A 実験)。

- 「大型動物を利用する幹細胞操作技術の開発」、阿部朋行申請、自治医科大学 平成 28 年 3 月 30 日承認(許可番号: 16-37 号)
- 「幹細胞を利用する再生医療の基盤作技術の開発」、花園豊申請、自治医科大学 平成 28 年 3 月 30 日承認(許可番号: 16-36 号)
- 「ヒツジ胎仔内微小環境へ移植した GFP 導入ヒト iPS 細胞由来造血系細胞の動態解析」、長尾慶和申請、宇都宮大学 平成 29 年 9 月 26 日承認(許可番号: D17-0005 号、令和 4 年 3 月 31 日まで)

生命倫理

ヒト iPS 細胞の作製・使用、ならびにヒト臍帯血・リンパ球の使用について以下の通り承認を得た。

- 「iPS 細胞の作製」、花園豊申請、自治医科大学 平成 29 年 5 月 29 日承認(許可番号: 臨大 17-変 063 号、令和 3 年 3 月 31 日まで)
- 「造血幹細胞移植治療の効率化をめざす研究」、花園豊申請、自治医科大学 平成 29 年 5 月 29 日承認(許可番号: 臨大 17-変 064、令和 3 年 3 月 31 日まで)
- 「ヒツジ胎仔内微小環境を利用した霊長類幹細胞の分化誘導法の確立」、長尾慶和申請 宇都宮大学 平成 29 年 8 月 30 日承認(許可番号: H17-0022 号、令和 4 年 3 月 31 日まで)

動物実験倫理

本研究ではヒツジへの外科的処置が必須となることから、動物福祉または動物実験倫理への十分な配慮が必要と考えた。ヒツジを用いる実験は、以下の通り承認を受けた。

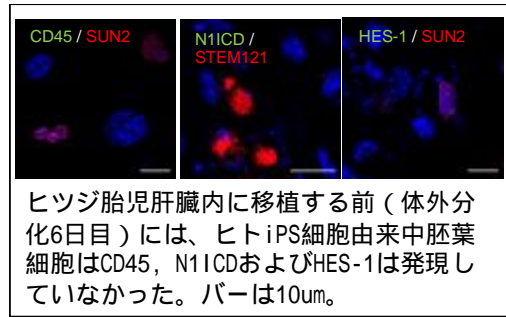
- 「ヒツジを利用する幹細胞研究」、阿部朋行申請、自治医科大学 平成 30 年 3 月 29 日承認(許可番号: 17145-01 号)
- 「幹細胞の増殖・分化の解析」、花園豊申請、自治医科大学 平成 29 年 3 月 30 日承認(許可番号: 17173 号)
- 「ヒツジ胎仔内微小環境を利用した霊長類幹細胞の分化誘導法の確立」、長尾慶和申請、宇都宮大学 平成 29 年 8 月 25 日承認(許可番号: A17C-0013 号、令和 4 年 3 月 31 日まで)

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

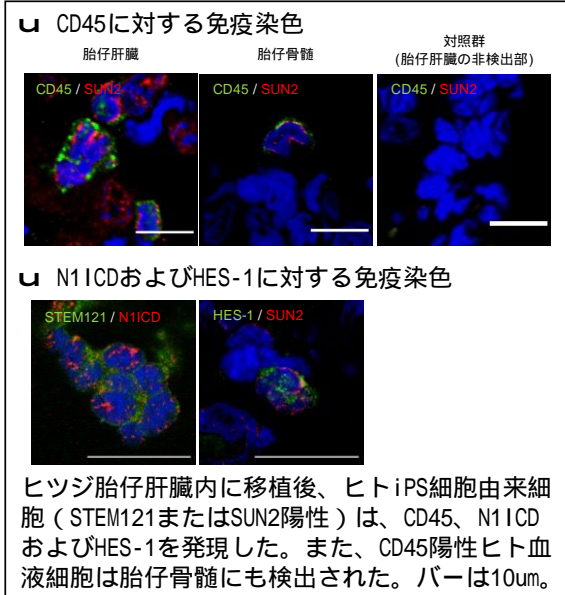
4. 研究成果

■ ヒツジ胎仔体内でのヒト iPS 細胞由来中胚葉細胞の動態解析

ヒト iPS 細胞由来中胚葉細胞を移植したから 28 日後にヒツジ胎仔を摘出し、胎仔肝臓や骨髄の組織切片を評価した。その結果、移植に用いた中胚葉細胞はもともと CD45 や N1ICD、HES-1 は全て陰性だった(上図)のに対し、移植 28 日後にヒツジ胎仔肝臓内で CD45 を発現し、Notch シグナルを活性化した(中図)。加えて、造血幹細胞マーカー-SCL、リンパ球系マーカー-CD2、赤血球系マ-



ヒツジ胎仔肝臓内に移植する前(体外分化6日目)には、ヒト iPS 細胞由来中胚葉細胞は CD45、N1ICD および HES-1 は発現していなかった。バーは 10µm。



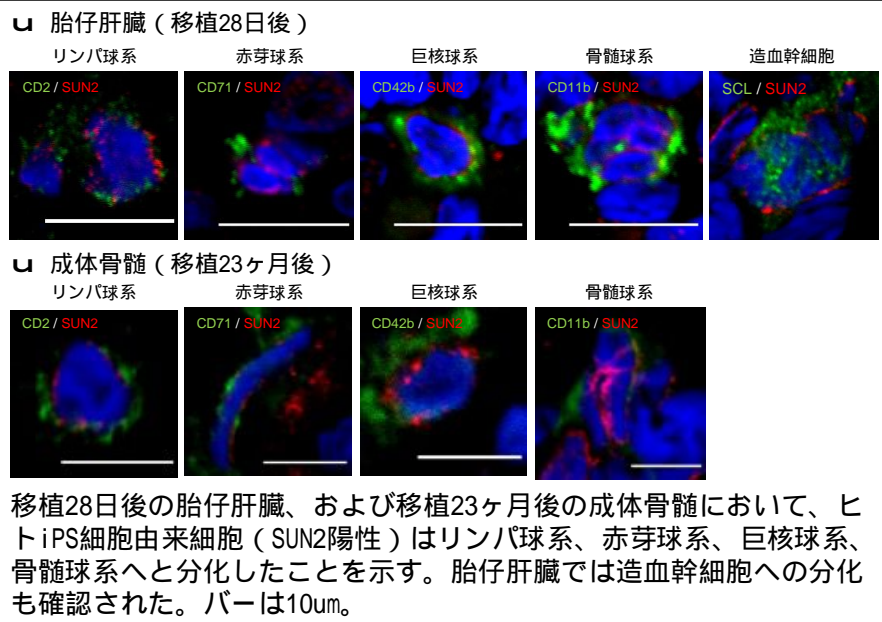
ヒツジ胎仔肝臓内に移植後、ヒト iPS 細胞由来細胞 (STEM121 または SUN2 陽性) は、CD45、N1ICD および HES-1 を発現した。また、CD45 陽性ヒト血液細胞は胎仔骨髄にも検出された。バーは 10µm。

カー-CD71、血小板系マーカー-CD42b を発現するヒト細胞を検出した(下図)。これらの結果から、ヒト iPS 細胞由来中胚葉細胞はヒツジ胎仔肝臓内で、Notch シグナルを介して、多系統分化能を特徴とする造血幹細胞へと分化したことが示された。また、移植 23 ヶ月後の成体骨髄においても多系統の分化マーカー陽性細胞が検出されたことから、ヒト iPS 細胞由来造血細胞は長期にわたって生着し、多分化能を有していたことが示された。以上の成果について論文発表した (Exp Hematol., 2021)。

■ 共培養系の確立

造血発生に関与することが推測されるヒツジ胎仔造血支持組織として、肝臓や骨髄、臍帯静脈から細胞を初代培養し、その一部は不死化を行った。各組織で複数株のストローマ細胞または血管内皮細胞が得られた。しかし現状では、これらの細胞をフィーダーとして、ヒト iPS 細胞由来中胚葉細胞と共培養しても上

記で見出したマーカー (CD45、N1ICD) を発現しなかった。このことから、Notch シグナル活性化に関わる上流制御因子の探索ができなかった。今後、二次元での共培養系だけでなく、ヒツジ胎仔造血組織由来の細胞を再凝集させて三次元で培養するような実験系を検討する。



移植 28 日後の胎仔肝臓、および移植 23 ヶ月後の成体骨髄において、ヒト iPS 細胞由来細胞 (SUN2 陽性) はリンパ球系、赤芽球系、巨核球系、骨髄球系へと分化したことを示す。胎仔肝臓では造血幹細胞への分化も確認された。バーは 10µm。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Abe T, Uosaki H, Shibata H, Hara H, Borjigin S, Nagao Y, Hanazono Y.	4. 巻 95
2. 論文標題 Fetal sheep support the development of hematopoietic cells in vivo from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 46 ~ 57.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2020.12.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Chanthra N, Abe T, Miyamoto M, Sekiguchi K, Kwon C, Hanazono Y, Uosaki H.	4. 巻 10
2. 論文標題 A Novel Fluorescent Reporter System Identifies Laminin-511/521 as Potent Regulators of Cardiomyocyte Maturation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61163-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Byambaa S, Uosaki H, Hara H, Abe T, Shibata H, Nureki O, Ohmori T, Hanazono Y.	4. 巻 69
2. 論文標題 Generation of novel Il2rg-knockout mice with clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and cas9.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 189-198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.19-0120.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 阿部 朋行、花園 豊	4. 巻 27
2. 論文標題 ヒトiPS細胞由来造血幹細胞の作成を目指して	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organ Biology	6. 最初と最後の頁 167 ~ 172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11378/organbio.27.167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 阿部朋行、柴田宏昭、魚崎英毅、原弘真、ボラジギン・サラントラガ、長尾慶和、花園豊
2. 発表標題 大型動物胎仔を用いたヒト臓器再生技術：ヒツジで作るヒト造血幹細胞
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原弘真、菱川修司、伊藤拓哉、阿部朋行、柴田宏昭、魚崎英毅、國田智、新幸二、本田賢也、花園豊
2. 発表標題 ビッグ同種輸血の試み
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原弘真、伊藤拓哉、菱川修司、中野和明、阿部朋行、柴田宏昭、魚崎英毅、渡邊將人、國田智、長嶋比呂志、花園豊
2. 発表標題 SCIDビッグの長期飼育：再生医療・細胞治療評価系の確立をめざして
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原弘真、菱川修司、伊藤拓哉、阿部朋行、柴田宏昭、魚崎英毅、國田智、新幸二、本田賢也、花園豊
2. 発表標題 汎血球減少ビッグへの同種輸血
3. 学会等名 第7回日本先進医工学ブタ研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Byambaa S, Uosaki H, Hara H, Shibata H, Abe T, Nagao Y, Nureki O, Ohmori T, Hanazono Y.
2. 発表標題 Phenotypical correction of X-SCID mice after CRISPR/Cas9-mediated genome-editing therapy of hematopoietic stem cells
3. 学会等名 第25回日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Byambaa S, Uosaki H, Hara H, Shibata H, Abe T, Nagao Y, Nureki O, Ohmori T, Hanazono Y.
2. 発表標題 Cure of X-SCID mice after ex vivo non-viral genome-editing therapy of hematopoietic stem cells.
3. 学会等名 The 21st American Society of Gene and Cell therapy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部朋行、長尾慶和、花園豊
2. 発表標題 子宮内移植法によるヒト/ヒツジ造血キメラの作出
3. 学会等名 第20回日本繁殖生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	花園 豊 (Hanazono Yutaka)	自治医科大学・医学部・教授	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	長尾 慶和 (Nagao Yoshikazu)	宇都宮大学・農学部・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関