

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390291

研究課題名(和文) ヒト胚性幹細胞から造血幹細胞移植治療のための造血幹細胞への分化誘導法の開発

研究課題名(英文) Establishment of a method inducing embryonic stem cells to differentiate to hematopoietic stem cells (HSC) for therapeutic HSC transplantation

研究代表者

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

研究成果の概要(和文)：

我々は、ヒト胚性幹細胞(ES細胞)から分化誘導された造血幹細胞の臨床応用をめざして、動物細胞、動物血清に依存しない分化誘導法の確立を試みた。そこでまず、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、または血清を含む培養液で培養することにより、ストローマ細胞を分化誘導した。このヒトES細胞由来ストローマ細胞とヒトES細胞を無血清の条件下で2週間共培養することにより、動物細胞、動物血清非依存的に多能性造血細胞を分化誘導することに成功した。

研究成果の概要(英文)：

We challenged to establish a method inducing human embryonic stem (ES) cells to differentiate into hematopoietic stem cells without animal cells and serum for their clinical application. In brief, we first transferred human ES cells onto gelatin-coated culture dishes and cultured with 5% human platelet lysate or serum-containing media to induce their differentiation into stromal cells. Then, human ES cells were cocultured with the established stromal cells under animal serum-free condition for 2 weeks to generate multipotent hematopoietic cells. Thus, we succeeded the establishment of a novel method inducing human ES cells to differentiate into multipotent hematopoietic cells without animal cells and serum.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：小児血液学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ヒト胚性幹細胞(ES細胞)、造血幹細胞、ストローマ細胞、

## 1. 研究開始当初の背景

移植医療は現代医療の根幹をなす治療法として定着しつつあるが、その進歩に伴い、移植片の不足が大きな社会問題となっている。種々の血液疾患や腫瘍性疾患に対する根治的治療法である造血幹細胞移植療法においても、造血幹細胞移植療法の適応がありながら適当なドナーがいなかったため移植を受けられない不幸な患者が増加している。我々は、この問題を解決するためには安定した移植片の確保が重要と考え、新たな移植造血幹細胞の供給源として、あらゆる組織細胞に分化可能な胚性幹細胞 (ES 細胞) に着目した。もし全能性を有する ES 細胞から造血幹細胞への分化を自由に制御することができれば、株化されたヒト ES 細胞から必要な造血幹細胞を半永久的に産生することが可能となる。しかし、国際的にも、ヒト ES 細胞から、造血幹細胞移植治療に使用可能な造血幹細胞への安定的な分化誘導法は、いまだ報告されていない。

我々は、平成 15~16 年度及び 17~19 年度の本科学研究の成果として、マウス胎仔の造血組織由来のストローマ細胞との共培養系により、ヒト ES 細胞から多能性造血細胞を分化誘導することに成功した。今後この成果を発展させ、実際の造血幹細胞移植医療に応用していくためには、ヒト造血幹細胞の分化誘導法を動物血清、動物細胞に依存しない方法に改変しなければならない。

## 2. 研究の目的

本研究は、前記の研究成果を基盤として、我々の開発したヒト ES 細胞から造血幹細胞への分化誘導法を発展させ、動物血清、動物細胞に依存しない分化誘導法とすることによって、実際に人に移植可能な造血幹細胞の産生法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)動物血清、動物細胞に非依存的なヒト ES 細胞からストローマ細胞への分化誘導法の開発

①動物血清、動物細胞に非依存的なヒト 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 または血清を用いて培養する。

②ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の解析

1) 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。

2) 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軟骨、骨、脂肪細胞への分化能を、それぞれ特異的分化誘導培養法により検証する。

③動物細胞、動物血清に非依存的なヒト ES 細胞から造血細胞への分化誘導

1)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下後、種々のサイトカインを含む無血清培養液で共培養した。

2)ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞との共培養により分化誘導された造血細胞の性状の解析

A.ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞との共培養により分化誘導された造血細胞をウシ胎仔血清、あるいはウシヒト血清を用いて血液細胞コロニー培養した。

B. 上記培養により形成されたコロニー中のグロビンの発現を免疫細胞染色法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1) 動物血清、動物細胞に非依存的なヒト ES 細胞からストローマ細胞への分化誘導

①動物血清、動物細胞に非依存的なヒト 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、または血清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

### 1) 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。

### 2) 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軟骨、骨、脂肪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。

## ③動物細胞、動物血清に非依存的なヒト ES 細胞から造血細胞への分化誘導

### 1) 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下後、種々のサイトカインを含む無血清培養液で共培養すると、培養 10-14 日目にはヒト ES 細胞コロニー中に敷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。それらをウシ胎仔血清、あるいはウシヒト血清を用いて血液細胞コロニー培養すると、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。以上の結果は、ヒト ES 細胞から動物細胞、動物血清に非依存的に多能性造血細胞が分化誘導されたことを示している。

### 2) ヒト ES 細胞から動物血清、動物細胞に非依存的に分化誘導された赤血球におけるグロブリンの発現

ヒト ES 細胞から動物血清、動物細胞に非依存的に分化誘導された造血細胞より形成さ

れた血液細胞コロニー中の赤血球におけるグロブリンの発現を免疫細胞染色法を用いて解析すると、約 80%の赤血球が  $\alpha$ 、 $\beta$  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 17 件)

1. Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Tamura D, Kiso M, Kawakami E, Hatakeyama S, Ebihara Y, Koibuchi T, Fujii T, Takahashi K, Shimojima M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Sakabe S, Iwasa A, Takahashi K, Ishii T, Gorai T, Tsuji K Iwamoto A, Kawaoka Y. Sero-prevalence of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus among schoolchildren and their parents in Tokyo, Japan. J Clin Microbiol 査読有 掲載確定 2011
2. Tsuda M, Ebihara Y, Mochizuki S, Uchiaru K, Tojo A, Tsuji K. Reduced dose chemotherapy for acute promyelocytic leukemia with adult Down syndrome. Br J Haematol 査読有 掲載確定 2011
3. 辻浩一郎 ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導 Cytometry Research 査読有 印刷中 2011
4. Nagamachi A\*, Htun PW\*, Ma F\*, Miyazaki K, Yamasaki N, Kanno M, Inaba T, Honda Z, Okuda T, Oda H, Tsuji K, Honda H H (\*equally contributed) A 5' untranslated region containing the IRES element in the Runx1 gene is required for angiogenesis, hematopoiesis and leukemogenesis in a knock-in mouse model. Dev Biol 査読有 345: 226-236, 2010
5. Kulkeaw K, Mizuochi C, Horio Y, Osumi N, Tsuji K, Sugiyama D. Application of whole mouse embryo culture system on stem cell research. Stem Cell Rev & Rep. 査読有 175-180, 2009
6. 辻浩一郎 ヒト ES 細胞からの血液細胞の産生. 人工血液 査読有 17:29-36, 2009
7. 辻浩一郎 iPS 細胞からの血液誘導 臨床検査 査読無 6: 737-743, 2009
8. Konuma T, Konuma T, Ooi J, Takahashi S, Tomonari A, Tsukada N, Kobayashi T, Sato A, Kato S, Kasahara S, Ebihara Y, Nagamura-Inoue T, Tsuji K, Tojo A, Asano S. Cardiovascular toxicity of cryopreserved cord blood cell infusion. Bone Marrow Transplant 査読有

41:861-865, 2008

9. Ebihara Y. Identification and clinical application of fibroblasts/myofibroblasts derived from hematopoietic stem cells. Japan J Pediatr Hematol. 査読有 22:1-6, 2008

[学会発表] (計 21 件)

1. 海老原康博 他 ヒトiPS細胞から血液細胞への動物血清・細胞非依存的分化誘導：自己iPS細胞由来 間葉系幹細胞との共培養. 第10回日本再生医療学会総会 2011年3月1～2日 東京：京王プラザホテル
2. 海老原康博 他 15-20歳の思春期症例に対する臍帯血移植の検討. 第52回日本小児血液学会総会 2010年12月17～19日 大阪：大阪国際会議場
3. Yang W, et al. Differentiation of mature eosinophils derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells. 52<sup>nd</sup> ASH Annual Meeting December 4-7, 2010 Orange County Convention Center, Orlando, Florida, USA
4. Nishihama N, et al. Hematopoiesis of human induced pluripotent stem cells derived from patients with Down syndrome. 52<sup>nd</sup> ASH Annual Meeting December 4-7, 2010 Orange County Convention Center, Orlando, Florida, USA
5. Kawakita T, et al. The impact of steroid use as a GVHD treatment or prophylaxis within 100 days after CBT. 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月24～26日 神奈川：パシフィコ横浜
6. Tsuda M, et al. Acute promyelocytic leukemia with adult Down syndrome: a case report. 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月24～26日 神奈川：パシフィコ横浜
7. Ma F, et al. Generation of mature eosinophils from human embryonic and induced pluripotent stem cells. 39<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of ISEH August 15-18, 2010 Melbourne Convention & Exhibition Centre, Melbourne Australia
8. 辻浩一郎 ヒトES細胞から血液細胞への分化誘導 第20回日本サイトメトリー学会学術集会 2010年6月26日～27日 東京：東京慈恵会医科大学
9. 河北敏郎 他 慢性骨髄性白血病に対する骨髄破壊的前処置を用いた臍帯血移植 第32回日本造血細胞移植学会 2010年2月19日～20日 静岡：アクトシティ浜松
10. 渡辺温子 他 再発・難治性白血病4例に対するIDA-FLAG療法の効果および有効性 第51回日本小児血液学会 2009年11月27日～29日 千葉：東京ベイホテル東急
11. Kato S, et al Second or third myeloablative allo-SCT using cord blood for adult leukemia. 第71回日本血液学会総会 2009年10月23日～25日 京都：国立京都国際会館
12. Ebihara Y., et al Human ES cell-derived MSC maintaining human ES and iPS cells under animal serum-free conditions. 第71回日本血液学会総会 2009年10月23日～25日 京都：国立京都国際会館
13. Tsuji K. Regenerative medicine and hematopoietic stem cells. Educational Symposium for Current Pediatric Hematology Sep 18, 2009 中国医科学研究所/天津血液研究所病院 Tianjin, China
14. Ma F, et al Derivation of mature blood cells from human induced pluripotent stem cells. 38th Annual Scientific Meeting of the International Society of Experimental Hematology Sep 9-12, 2009 Horel Divani Caravel, Athens, Greece
15. Ebihara Y., et al Human embryonic stem (ES) cell-derived mesenchymal stem cells capable of efficiently maintaining human ES and induced pluripotent stem cells under animal serum-free conditions. 7th Annual Meeting of the International Society of Stem Cell Research Jul 8-11, 2009 Centre convencions Internacional, Barcelona, Spain
16. Ma F, et al Derivation of multipotential hematopoietic progenitors and mature blood cells from human induced pluripotent stem cells. 7th Keio Stem Cell Research Symposium May 15 - 16, 2009 東京：慶応義塾大学
17. 海老原康博 他 15-20歳の思春期症例に対する臍帯血移植の検討 第112回日本小児科学会学術集会 2009年4月17～19日 奈良：奈良県文化会館
18. 海老原康博 他 ヒトES細胞維持機能を有するヒトES細胞由来ストローマ細胞 第8回日本再生医療学会 2009年3月5日 東京：東京国際フォーラム
19. 海老原康博 他 15-20歳の思春期奨励に対する臍帯血移植の検討 2009年2月5日 北海道：ロイトン札幌
20. 海老原康博 他 異種動物血清を用いないヒトembryonic stem cell (hESC) から間葉系幹細胞 (MSC) への分化誘導 第70回日本血液学会 2008年10月10日 京都：国立京都国際会館
21. Hirabayashi S et al. Myelodysplastic Syndrome (MDS) and Myeloproliferative Disease (MPD) in Children: A prospective Resistration of 222 Cases. 15th annual

meeting of American Society of  
Hematology 2008, 12, 7 Moscone Convention  
Center, San Francisco, USA

〔図書〕（計 5 件）

1. Ma F, Yang W, Tsuji K Transworld Research  
Network, Kerala, Stem Cell Therapy 2011,  
51-70
2. Ma F, Ebihara Y, Tsuji K. Intech, Vienna,  
Embryonic stem cells 2011, 掲載確定
3. Ma F, Gu Y, Nishihama N, Ebihara Y, Tsuji  
K. Humana Press, New York,  
Lineage-specific differentiation of  
human embryonic and induced pluripotent  
stem cells methods and protocols 2011,  
掲載確定
4. 辻浩一郎 医学書院（東京）臍帯血移植の  
基礎と臨床 2011 掲載確定
5. 海老原康博 真興交易医書出版部小児が  
ん. がん患者の心に寄り添うためのサイ  
コオンコロジーの基礎と実践. 2009 43-  
47

〔産業財産権〕

○出願状況（計 4 件）

1. 名称: Method for producing eosinophils  
from pluripotent stem cells

発明者: 辻浩一郎、馬峰、斎藤博久、松本健  
治、中畑龍俊

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: 61/419, 496

出願年月日: 2010 年 12 月 3 日（仮出願）

国内外の別: 国外

2. 名称: ヒト由来の多能性幹細胞を分化さ  
せる方法

発明者: 辻浩一郎、海老原康博

権利者: 東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-222583

出願年月日: 2010 年 9 月 30 日

国内外の別: 国内

3. 名称: Method for producing mast cells  
from pluripotent stem cells

発明者: 辻浩一郎、馬峰、中畑龍俊

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2010/065893

出願年月日: 2010 年 9 月 8 日

国内外の別: 国内

4. 名称: 多能性幹細胞からの肥満細胞の製  
造方法

発明者: 辻浩一郎、馬峰、中畑龍俊

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: 61/240, 376

出願年月日: 2009 年 9 月 8 日（仮出願）

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

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

<http://stemcell-u.tokyo.org/scp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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