

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591244

研究課題名（和文）ヒト ES 細胞から免疫細胞への分化系を用いた乳児アレルギー疾患発症機構に関する研究

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of infantile allergic diseases using the system to differentiate human ES cells into immune cells

研究代表者

馬 峰 (MA HOU)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：20378748

研究成果の概要（和文）：我々は、マウス胎仔 AGM 領域から樹立されたストローマ細胞株である AGMS-3 細胞との共培養により、ヒト ES 細胞から造血細胞を分化誘導し、これらの造血細胞から、アレルギー疾患の主たるエフェクター免疫細胞である肥満細胞や好酸球を安定的に産生することに成功した。この分化誘導系は、胎生期における肥満細胞や好酸球の発生・発達を再現していると考えられ、乳児アレルギー疾患の病態解析に有用なツールとな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, major immune effector cells in allergic diseases, from hematopoietic cells derived human ES cells by coculture with AGMs-3 cells which are stromal cell line established from murine embryonic AGM region. Since this system reflect the generation and development of these immune cells in human embryo, it is expected to be a useful tool for analysis of the mechanism causing infantile allergic diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：小児アレルギー学

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)、乳児アレルギー疾患、肥満細胞、好酸球

1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患は、種々の抗原に対する免疫細胞のネットワークによって惹起されるアレルギー反応により引き起こされる病的状態と考えられる。そうした免疫細胞の中でも、肥満細胞や好酸球は主たるエフェクター細胞であり、アレルギー疾患の病態形成に重要な役割を担っていると考えられる。

一方、ミルクアレルギーなどの乳児期のアレルギー疾患は、成人期のそれとは明らかに異なる病像を呈する。その原因については、十分に解明されている訳ではないが、胎児期における母体環境が免疫細胞の発生・発達に及ぼす影響が推定されている。しかし、ヒト胎児を実験的に使用することは倫理的に問題があり、胎児期の免疫細胞の発生・発達の研究はほとんど進んでいない。

そこで我々は、胎児期に起源を有するヒト胚性幹細胞（ES 細胞）から免疫細胞を分化誘導することにより、胎児期の免疫細胞の発生・発達を再現し、その分化過程を解析することを計画した。ヒト ES 細胞から免疫細胞を分化誘導するためには、胎生期の環境を再現することが有効ではないかと考え、ヒト ES 細胞と胎児組織由来のストローマ細胞の共培養法を用いることを着想した。もちろん、前述のように、ヒト胎児を実験的に用いることはできないが、マウス由来ストローマ細胞の多くがヒト造血/免疫細胞を支持することが報告されていたので、マウス胎仔組織由来のストローマ細胞を用いることとした。

2. 研究の目的

ヒト ES 細胞から免疫細胞、特に肥満細胞、好酸球への分化誘導法を確立し、このヒト ES 細胞から免疫細胞への分化系を胎児期における免疫システムのモデルとして、その発生と発達の機構を解析する。さらに、胎児期における免疫システムの発生・発達の破綻としての乳児アレルギー疾患の発症メカニズムを明らかにする。本研究の成果は、胎児医療に貢献するばかりでなく、母体環境の胎児の胎児期の免疫細胞の発生・発達に及ぼす影響の評価系を構築し、母子医療に資することが期待される。

3. 研究の方法

(1)ヒト ES 細胞から肥満細胞及び好酸球への分化誘導法の開発

①ヒト ES 細胞から多能性造血細胞の分化誘導

ヒト ES 細胞と AGMS-3 細胞（マウス胎仔 AGM (aorta-gonad-mesonephros) 領域から樹立されたストローマ細胞株）と 2 週間共培養し、多能性造血細胞を分化誘導する。多能性造血細胞への分化誘導は、SCF (stem cell factor)、FL (Flk2/Flt3 リガンド)、IL (interleukin)-3、erythropoietin、TPO (thrombopoietin)、G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) を用いた血液細胞コロニー法で確認する。

②ヒト ES 細胞由来多能性造血細胞からの肥満細胞及び好酸球への分化誘導

ヒト ES 細胞由来多能性造血細胞を種々のサイトカインの組み合わせで液体培養することにより、肥満細胞及び好酸球を分化誘

導する。

(2)ヒト ES 細胞由来肥満細胞及び好酸球の性状の解析

①ヒト ES 細胞由来肥満細胞の性状を、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。

②ヒト ES 細胞由来好酸球の性状の解析
ヒト ES 細胞由来好酸球の性状を、免疫細胞染色、フローサイトメトリー、RT-PCR、電子顕微鏡による観察などにより解析する。

(3)ヒト ES 細胞由来肥満細胞及び好酸球の機能の解析

①ヒト ES 細胞から分化誘導された肥満細胞の種々の刺激に対するヒスタミン遊離能を検討する。

②ヒト ES 細胞から分化誘導された好酸球の種々の刺激に対する遊走能や、分泌型 IgA に対する EDN (eosinophil derived neurotoxin) 遊離能を検討する。

4. 研究成果

(1)ヒト ES 細胞から肥満細胞への分化誘導法の開発とその性状と機能の解析

①ヒト ES 細胞から肥満細胞への分化誘導法の開発

1)ヒト ES 細胞から造血細胞の分化誘導

ヒト ES 細胞と AGMS-3 細胞（マウス胎仔 AGM (aorta-gonad-mesonephros) 領域から樹立されたストローマ細胞株）と 2 週間共培養した後、血液コロニー培養をおこなった。その結果、骨髄球系細胞コロニー、赤血球系細胞コロニー、骨髄球系及び赤血球系細胞混合コロニーなど、様々な血液細胞コロニーが形成された。このことは、ヒト ES 細胞から、骨髄球系前駆細胞、赤血球系前駆細胞、及び多能性造血前駆細胞など様々な造血前駆細胞が、ヒト ES 細胞が分化誘導されたことを示している。

2)ヒト ES 細胞由来造血細胞から肥満細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞由来血液細胞を、SCF、FL、IL-3、IL-6、TPO 存在下で 1 週間液体培養した後、さらに 6-10 週間同様のサイトカイン存在下で無血清培養することにより、95%以

上の細胞が肥満細胞に分化誘導された。

②ヒト ES 細胞由来肥満細胞の性状の解析
分化誘導された肥満細胞は、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、これらの肥満細胞の顆粒は、tryptase、chymase いずれも陽性であったことから、成熟型の結合組織型肥満細胞 (CTMC: connective tissue-type mast cell) であることが明らかとなった。また、これらの CTMC は、c-Kit、CRA-1、cathepsin-G、carboxypeptidase-A、CD88、CD203c も強く発現していた。

③ヒト ES 細胞由来肥満細胞の機能の解析
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。

(2)ヒト ES 細胞から好酸球への分化誘導法の開発とその性状と機能の解析

①ヒト ES 細胞から好酸球への分化誘導法の開発

1)ヒト ES 細胞から造血細胞の分化誘導
ヒト ES 細胞からの肥満細胞の分化誘導法と同様に、ヒト ES 細胞と AGMS-3 細胞との共培養により、造血細胞を分化誘導した

2)ヒト ES 細胞から好酸球への分化誘導法の確立

ヒト ES 細胞由来造血細胞を、3段階でサイトカインの種類を1週間ごとに変更して、液体培養した。まず第1段階では、SCF、IL-3、IL-6、FL、TPO、第2段階では、IL-3、SCF、GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)、第3段階では、IL-3、IL-5 を用いて液体培養した。培養細胞数は、第1段階、第2段階では増殖し続けたが、第3段階では緩徐に減少した。しかし、培養細胞中の EPO (eosinophil peroxidase) を発現する好酸球の比率は、第1段階、第2段階では上昇し続け、第3段階でも緩徐に上昇し、ほぼ 100% の培養細胞が好酸球となった。

②ヒト ES 細胞由来肥満細胞の性状の解析
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。また、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。

③ヒト ES 細胞由来好酸球の機能の解析
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。

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 14 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, Uchimarui 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 掲載確定 2011
4. Funayama K, Saito-Kurimoto Y, Ebihara Y, Shimane Y, Nomura H, Tsuji K, Asano S. Adhesion-mediated self-renewal abilities of Ph⁺ blastoma cells. Biochem Biophys Res Commun 査読有 396: 193-198, 2010
5. 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
6. Mizutani T Mizutani T, Tsuji K, Ebihara Y, Ohba Y, Taniguchi T, Honda K. Homeostatic erythropoiesis by the transcription factor IRF2 through attenuation of type I interferon signaling. Exp Hematol 査読有

- 36:255-264, 2008
7. 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
 8. Ma F, Kambe N, Wang D, Shinoda G, Fujino H, Umeda K, Fujisawa A, Ma L, Suemori H, Nakatsuji N, Miyachi Y, Torii R, Tsuji K, Heike T, Nakahata T. Direct development of functionally mature tryptase/chymase double positive connective tissue-type mast cells from primate ES cells. Stem Cells 査読有 26(3):706-714, 2008
 9. Ma F, Ebihara Y, Umeda K, Sakai H, Hanada S, Zhang H, Tsuchida E, Nakahata T, Nakauchi H, Tsuji K. Generation of functional erythroid cells from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. Proc Natl Acad Sci USA 査読有 105(35):13087-13092, 2008

[学会発表] (計 24 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. 52nd 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. 52nd ASH Annual Meeting December 4-7, 2010 Orange County Convention Center, Orlando, Florida, USA
5. Ma F. Generation of functionally mature blood cells from human ES/iPS cells and their possible clinical utilization. BIT' s 3rd Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells (RMSC-2010) December 5-7, 2010 Shanghai Everbright Convention and Exhibition Center Shanghai, China
6. Ma F. Generation of functionally mature blood cells from human pluripotent stem

- cells. International Forum on Stem Cells 2010 November 11-13, 2010 Chinese Academy of Medical Sciences Tianjin, China
7. Ma F. The novel transfusion and cellular therapies based on human ES and iPS cells. 5th National Congress of the China Society of Blood Transfusion November, 4-7, 2010 The Century City New International Convention & Exhibition Center, Chengdu, China
 8. 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
 9. 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
 10. Ma F, et al. Generation of mature eosinophils from human embryonic and induced pluripotent stem cells. 39th Annual Scientific Meeting of ISEH August 15-18, 2010 Melbourne Convention & Exhibition Centre, Melbourne Australia
 11. 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
 12. 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
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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
18. 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
 19. 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
 20. 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
 21. 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
 22. 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
 23. 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
 24. 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4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

[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

馬 峰 (MA HOU)

東京大学・医科学研究所・特任研究員
研究者番号: 20378748

(2) 研究分担者

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