

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 3 月 29 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860793

研究課題名(和文) ヒツジ胎仔造血環境と免疫寛容を利用したヒトiPS細胞の造血系分化誘導技術の開発

研究課題名(英文) Engraftment of Human Hematopoietic Stem Cells in Sheep after in Utero Transplantation

研究代表者

阿部 朋行 (Abe, Tomoyuki)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20610364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヒト多能性幹細胞由来の造血幹細胞をヒツジの体内で作製することを目指している。これが出来れば、動物は、ヒト成体・ヒト臍帯血に次ぐ、造血幹細胞の第三のソースになり、現在のドナー不足の解決につながるであろう。以前我々は、サルES細胞を体外で中胚葉系に分化させた後、ヒツジ胎仔の肝臓内(胎仔期の造血器官)に移植する方法で、2年にわたって骨髓内にサル造血細胞をもつヒツジを作出できることを報告した。本研究では、ヒツジ体内で多能性幹細胞由来の造血幹細胞を効率的に作製するために、ヒトリンパ球を用いて、ヒツジ造血系の抑制およびヒツジ骨髓内のヒト造血生着率の促進法を開発した。

研究成果の概要(英文)：The generation of definitive (engraftable) human hematopoietic stem cells (HSCs) from pluripotent stem cells (PSCs) has been a major challenge in hematology. We are trying to generate hematopoietic chimera in sheep with human iPSCs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医学 幹細胞 トランスレーショナルリサーチ 移植・再生医療 応用動物

1. 研究開始当初の背景

<多能性幹細胞に由来する恒久的な血液生産を目指して>

ES/iPS細胞は、身体を構成する全ての細胞に分化することができる。これまでに神経幹細胞や網膜組織などへの分化誘導法が報告されており、臨床への応用が期待されている。しかしながら、白血病や再生不良性貧血などの血液疾患への細胞移植治療を目的とした、長期的に血液を生み出せるような造血幹細胞への分化誘導は、in vitro ではないまだに成功していない。

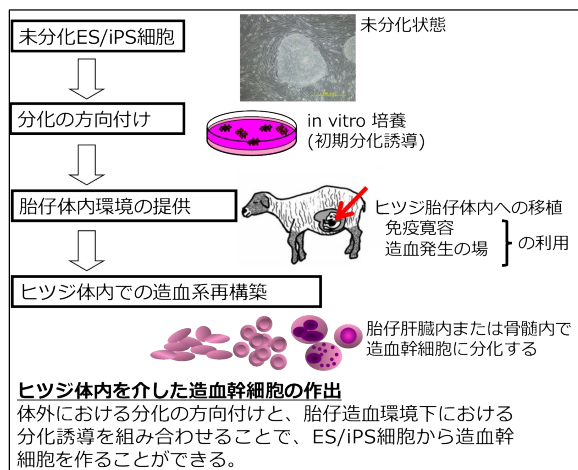
<ヒツジ胎仔微小環境を用いた in vivo 分化誘導>

2005年に申請者らのグループは、サルES細胞を体外で初期分化させた後、ヒツジ胎仔の肝臓(胎仔期の造血器官)に移植する方法で、2年にわたって骨髄内に約1%の割合で**サル造血をもつキメラヒツジを作出した**(下図、*Transplantation* 2005)。続いて2006年には、同様の方法でヒトES細胞由来造血をもつキメラヒツジも作出されている(*Blood* 2006)。さらに申請者らは、サルES細胞の生着がヒツジ胎仔体内の制御性T細胞によって支持されることも明らかにした(Tanaka, Abe, Hanazono et al., *Stem Cells Dev.* 2008)。これらのことは、ヒツジ胎仔体内環境には多能性幹細胞の分化に必要な条件が揃っており、異種である移植細胞に対し免疫寛容を誘導できることを示唆している。

またヒツジには、イヌやブタと比べてヒト造血幹細胞の生着が良い、マウスなどの小動物と比べて長期的な観察が可能、胎盤の構造上、移植後の流産が少ない、ヒツジを禁忌とする宗教がない、大きさがヒト胎児に極めて近い、といった特徴がある。

以上より、**ヒツジ胎仔体内環境が多能性幹細胞から造血幹細胞を作り出す足場として適している**と考えられる。しかしながら、**キメラヒツジ骨髄中におけるサル造血細胞の生着率は約1-8%と低く、またキメラヒツジ末梢血中に移植細胞に由来する血液細胞はほとんど出現していない(0.01%以下)。**

このことに対して申請者は、臍帯血に含ま



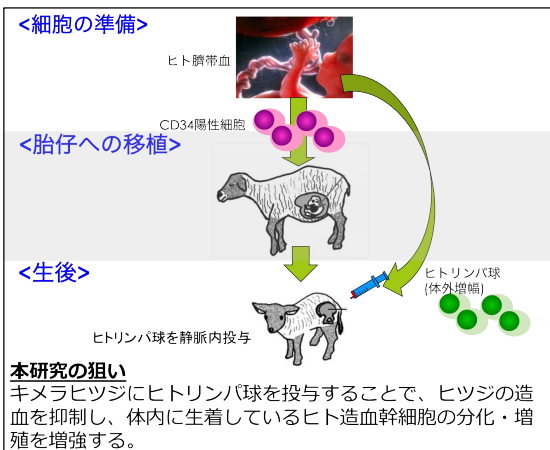
れる造血幹細胞を用いて、

- I. *HoxB4* 遺伝子を一過性発現させることで、ヒト造血幹細胞の増殖を強化し、生着率を約5倍上昇できる(Abe, Hanazono et al., *Exp Hematol.* 2011)
- II. 化学療法剤であるブスルファンをヒツジ胎仔に投与することで、ヒツジ体内の生着スペースを拡げ、生着率ならびにキメラヒツジの獲得割合を向上できる(Abe, Hanazono et al., *Exp Hematol.* 2012)

ということを明らかにしてきた。すなわち、**移植細胞の増殖力強化およびヒツジ胎仔体内の生着スペースのコントロールにより、ES/iPS細胞から造血幹細胞を効率的に作り出せる可能性を示した。**

<多能性幹細胞から造血幹細胞を効率的に作出するための戦略>

リンパ球投与は、臨床およびマウス同種移植実験系においてドナー細胞の強力な増強効果が知られているが、その効果は同種間でのみ知られており、作用機序は未解明である(*Bone Marrow Transplant.* 2000, *Blood* 2002)。ヒト造血幹細胞を生着したヒツジにヒトリンパ球を投与すれば、効率的に多能性幹細胞から造血幹細胞を作製できるかもしれない。またこのことは、同種の実験系でのみ知られている効果が異種間でも作用する、すなわち液性因子等が作用していることを示唆している。したがって、リンパ球投与がもつドナー細胞の増強メカニズムを解明できる可能性がある。そこで本研究では、安定的にキメラヒツジを獲得できる臍帯血を用いて、臍帯血造血幹細胞を生着したキメラヒツジを作出した後、ヒトリンパ球の投与によってヒト造血生着率を向上できるか検討を行った。



2. 研究の目的

臍帯血由来のヒト造血幹細胞を生着したキメラヒツジに対して、同じロットの臍帯血に由来するリンパ球を投与することで、ヒト造血生着率を向上できるか検討した。

3. 研究の方法

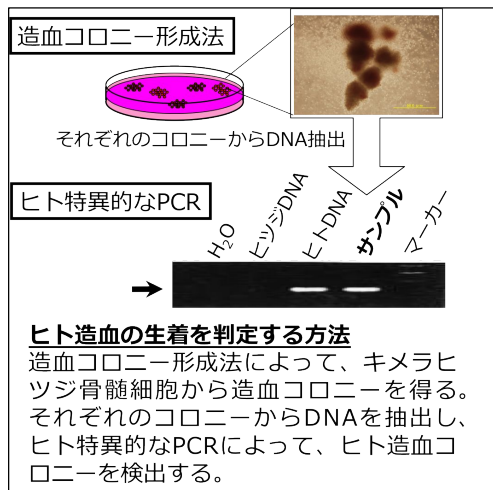
本研究では、ヒトリンパ球の投与によってヒツジの造血系を抑制し、ヒツジ体内のヒト造血幹細胞の増幅・分化を促進する技術を開発する。そこで、(1)ヒトリンパ球の投与条件の検討を行い、(2)臍帯血造血幹細胞を生着したキメラヒツジへのヒトリンパ球投与を実施し、ヒト造血生着率が向上するか解析した。その後、ヒト造血生着率が向上したヒツジにおいて、(3)リンパ球の作用機序の検証、を行った。

(1) ヒトリンパ球投与量の検討

ヒト末梢血由来リンパ球を増幅培養してヒツジ静脈内に投与することで、ヒツジ造血の抑制を誘起する条件を検討した。ヒツジの造血能の評価には造血コロニー形成法を用い、ヒトリンパ球投与後のヒツジ骨髓細胞におけるコロニー数を計測・比較した。

(2) 臍帯血造血幹細胞を生着したキメラヒツジへのヒトリンパ球投与

ヒト臍帯血(理研セルバンク)から、造血幹細胞分画としてCD34陽性細胞を分離し、残りは凍結保存した。胎齢47および58日のヒツジ胎仔(満期は147日)に対し、移植前処置としてブスルファンを母体静脈経路で投与した後、子宮壁越しのエコーガイド下で胎仔肝臓内に細胞を注入した(Abe et al., 2012)。生後(移植から約3ヶ月後)得られた産仔の骨髓をコロニーPCR法で解析し、ヒト造血の生着効率を評価した。キメラヒツジが得られたのを確認できたら、凍結保存したCD34陰性分画の細胞からリンパ球を増幅培養した後、キメラヒツジ静脈内に投与した。投与後、骨髓を経時的に採取し、骨髓中のヒト造血生着率をコロニーPCRで測定した。



(3) ヒトリンパ球の作用機序の検証

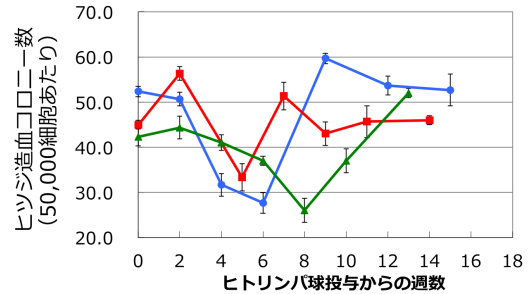
キメラヒツジへヒトリンパ球を静脈内経路で投与した後、経時的に末梢血を採取し、ヒツジ末梢血中のヒトサイトカインをELISAにて測定した。

4. 研究成果

(1) ヒトリンパ球投与量の検討

5 x 10⁷ cells/kgのヒトリンパ球を投与4-8週間後、一過性に造血コロニー数の低下

が認められた。このことは、ヒツジ体内でヒト造血幹細胞に競合すると思われる内因性のヒツジ造血を、ヒトリンパ球の投与によって一時的に抑制できることを示唆している。以上より、5 x 10⁷ cells/kgのヒトリンパ球をヒツジに投与することで、一過性の造血抑制を誘導することが出来た。

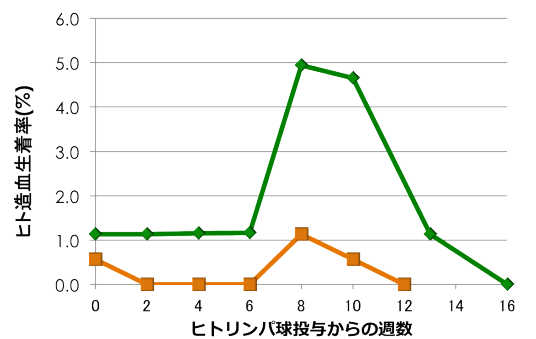


ヒトリンパ球投与後のヒツジ造血の抑制

ヒトリンパ球を約5 x 10⁷ cells/kgの量で投与した結果、投与後4-8週間にヒツジ骨髓における造血能の低下が観られた。内因性造血を低下させた結果として、ヒト造血の生着スペースが拡張できると考えられる。

(2) 臍帯血造血幹細胞を生着したキメラヒツジへのヒトリンパ球投与

臍帯血中の造血幹細胞を用いて作出したキメラヒツジに対し、同じドナー由来のリンパ球を体外増幅後に投与した。その結果、投与してから8週間後に骨髓中のヒト造血生着率を約2-5倍に向上させることに成功した。

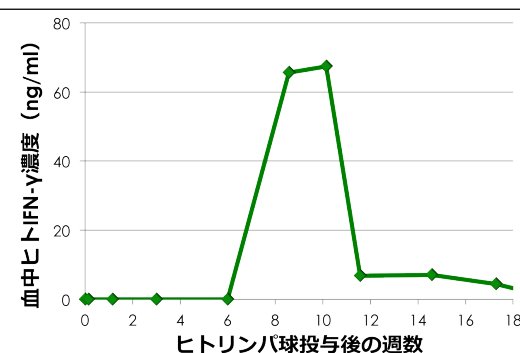


ヒトリンパ球投与後のヒト造血生着率の向上

リンパ球を約5または10 x 10⁷ cells/kgの量で投与した結果、投与してから8週間後に骨髓中のヒト造血生着率を約2-5倍に向上させることに成功した。

(3) ヒトリンパ球の作用機序の検証

ヒト造血生着率が向上していたヒトリンパ球投与後8週目のヒツジ末梢血中に、ヒトIFN- γ を検出した。



ヒトIFN- γ の検出

ヒト造血生着率が向上したキメラヒツジの末梢血において、ヒトリンパ球投与8週間後にヒトIFN- γ を検出した。

以上のことから、ヒトリンパ球投与後の造血促進作用は、投与されたヒトリンパ球が、ヒツジ造血を抑制した結果、ヒト造血の割合が向上した可能性、およびヒトリンパ球から分泌された液性因子によってヒト造血系細胞が増幅した可能性（栄養効果）が示された。今後は、ヒトリンパ球の動態およびヒツジ体内のヒト造血細胞との相互作用を解明し、さらにヒトiPS細胞由来造血をもつキメラヒツジへのヒトリンパ球投与を実施して、ヒツジ体内でヒト造血幹細胞を増幅できるか検証を行いたい。

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2件)

1. Abe T, Hanazono Y, Nagao Y. A long-term follow-up study on the engraftment of human hematopoietic stem cells in sheep. *Exp Anim*. 2014;63(4):475-481. doi.org/10.1538/expanim.63.475 査読有り
2. Mizukami Y, Abe T, Shibata H, Makimura Y, Fujishiro SH, Yanase K, Hishikawa S, Kobayashi E, and Hanazono Y. MHC-matched induced pluripotent stem cells can attenuate cellular and humoral immune responses but are still susceptible to innate immunity. *PLoS One*. 2014;13:9(6):e98319. doi: 10.1371/journal.pone.0098319. eCollection 2014 査読有り

〔学会発表〕(計19件)

1. 阿部朋行 サイエнтиスト・クエスト～あなたと考えるあたらしい科学とくらし～ 日本科学未来館トークイベント、2015年3月22日
2. 阿部朋行、長尾慶和、原明日香、スブド・ビャンパー、柳瀬公秀、ボラジギン・サラントラガ、緒方和子、山口美緒、福森理加、花園豊 ヒツジ子宮内移植系におけるヒト造血細胞の生着促進・増幅技術の開発 第17回日本異種移植研究会 下野市 2015年3月14日
3. 阿部朋行 大動物を用いた再生医療研究～ヒト血液細胞をもつヒツジの作出 第18回予防衛生協会セミナー、つくば市、2015年2月14日
4. Yoshikazu Nagao, Tomoyuki Abe, Asuka Hara, Kazuko Ogata, Mio Yamaguchi, Borjigin Sarentonglaga, Rika Fukumori and Yutaka Hanazono. Factors affecting hematopoietic engraftment of monkey embryonic stem cells in sheep fetuses the 41th Annual

Conference of the international Embryo transfer Society. Versailles, January 10-13, 2015.

5. 水上喜久、阿部朋行、柴田宏昭、牧村幸敏、藤城修平、柳瀬公秀、菱川修司、小林英司、花園豊 Transplantation-related Immunity of Porcine Induced Pluripotent Stem Cells in the MHC-matched Allogeneic Setting 第2回日本先進医工学プラタ研究会 静岡県三島市 2014年10月24-25日
6. 阿部朋行 ヒツジ体内でヒト血液細胞を育てる工夫 第1回共同研究に関する講演会 下野市 2014年10月17日
7. Tomoyuki Abe, Suvd Byambaa, Kimihide Yanase, Asuka Hara, Yoshikazu Nagao and Yutaka Hanazono. Hematopoietic Engraftment of Human iPS Cells in Sheep after in Utero Transplantation. 第13回自治医科大学シンポジウム 下野市 2014年9月5日
8. 柳瀬公秀, 阿部朋行, Suvd・Byambaa, 原明日香, 長尾慶和, 花園豊 ヒツジにおけるヒト造血の生着促進技術の開発 第13回自治医科大学シンポジウム 下野市 2014年9月5日
9. 水上喜久、阿部朋行、柴田宏昭、牧村幸敏、藤城修平、柳瀬公秀、菱川修司、小林英司、花園豊 Transplantation-related Immunity of Porcine Induced Pluripotent Stem Cells in the MHC-matched Allogeneic Setting 第13回自治医科大学シンポジウム 下野市 2014年9月5日
10. Mizukami Y, Abe T, Shibata H, Makimura Y, Fujishiro SH, Yanase K, Hishikawa S, Kobayashi E, and Hanazono Y. Immune responses against induced pluripotent stem cells in porcine MHC-matched allogeneic setting Swine in Biomedical Research Conference. Raleigh, United States of America, July 6-8, 2014.
11. 阿部朋行、長尾慶和、柳瀬公秀、原明日香、ボラジギン・サラントラガ、緒方和子、山口美緒、花園豊 ヒツジ子宮内移植系におけるヒト造血細胞の生着・増幅技術の開発 第61回日本実験動物学会総会 札幌 2014年5月15-17日
12. 阿部朋行、長尾慶和、柳瀬公秀、ボラジギン・サラントラガ、緒方和子、山口美緒、花園豊 ヒツジ子宮内移植系によるヒト造血幹細胞の定量評価の試み 第36回日本造血細胞移植学会、沖縄、2014年3月7-9日
13. 阿部朋行、長尾慶和、柳瀬公秀、ボラジギン・サラントラガ、緒方和子、山口美緒、林聡、花園豊 ヒツジ子宮内異種移植(II)：長期間の造血再構築 第16回

- 日本異種移植研究会、大阪、2013年11月10日
14. 長尾慶和、阿部朋行、柳瀬公秀、サラントラガ、緒方和子、山口美緒、林聡、花園豊 ヒツジ子宮内異種移植(I)：生着条件の検討 第16回日本異種移植研究会、大阪、2013年11月10日
 15. Tomoyuki Abe, Shigeo Masuda, Borjigin Sarentonglaga, Kazuko Ogata, Mio Yamaguchi, Satoshi Hayashi, Yoshikazu Nagao and Yutaka Hanazono. Long-term comparative study on the engraftment of human hematopoietic stem cells in sheep after xenogeneic in utero transplantation. The 12th Congress of the International Xenotransplantation Association, Osaka International Convention Center, Osaka, Japan, November 10-13, 2013.
 16. Yoshikazu Nagao, Tomoyuki Abe, Yujiro Tanaka, Kyoko Sasaki, Shigeo Masuda, Borjigin Sarentonglaga, Kazuko Ogata, Mio Yamaguchi, Satoshi Hayashi, Yoshihiro Kitano and Yutaka Hanazono. Factors influencing engraftment of monkey embryonic stem cells in sheep after xenogeneic in utero transplantation. Oral presentation. The 12th Congress of the International Xenotransplantation Association, Osaka International Convention Center, Osaka, Japan, November 10-13, 2013.
 17. Tomoyuki Abe and Yutaka Hanazono Toward the generation of sheep having human blood The 10th Nikko International Symposium 2013 下野市 2013年10月17日
 18. 下澤律浩、藤城修平、水上喜久、阿部朋行、花園豊：カニクイザル初期胚を用いたES細胞の特性に関する検討。第54回日本卵子学会、東京、2013年5月25-26日
 19. 阿部朋行、花園豊 ヒト化ヒツジの作製を目指して 第60回日本実験動物学会総会ワークショップ、つくば市、2013

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：造血系細胞の作製方法

発明者：花園豊、阿部朋行、長尾慶和

権利者：学校法人自治医科大学

種類：特許

番号：特願 2015-168702

出願年月日：平成 27 年 8 月 28 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

1. <http://www.jichi.ac.jp/saisei/>
2. <http://www.mirai.kan.jst.go.jp/m/event/1503061018015.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 朋行 (ABE TOMOYUKI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20610364