

令和 4 年 9 月 8 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03975

研究課題名(和文) iPS細胞由来ヒト造血幹細胞および胸腺作製による免疫ヒト化マウスの標準化の試み

研究課題名(英文) Approaches to standardization of humanized mice by transplanting human hematopoietic stem cells (HSC) and thymus generated from induced pluripotent stem (iPS) cells.

研究代表者

伊藤 守 (ITO, MAMORU)

公益財団法人実験動物中央研究所・役員・所長

研究者番号：00176364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞よりヒト造血幹細胞およびヒト胸腺上皮細胞への分化誘導を行った。研究期間4年間で、様々な分化条件の検討を行い、免疫不全マウスへの移植を行った。しかし、想定された分化造血幹細胞の移植によっても、ヒト造血細胞が検出できず、当初予定したヒト化マウスの標準化には届かなかった。

一方で、新たに開発したNOG-W41マウスはヒト造血幹細胞移植のレシピエントとして極めて有用な免疫不全マウスであった。すなわち、NOG-W41マウスへの造血幹細胞移植はNOGマウスと比べ、X線照射をしなくても極めて少数の細胞でも生着すること、NOG-W41マウスに生着したヒト造血細胞はNOGマウスへ二次移植できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト疾患やその治療の研究、検証のためには、ヒトの細胞や組織を持つヒトマウスは極めて有用である。このヒト化マウスの標準化のために、ヒトiPS細胞よりヒト造血幹細胞やヒト胸腺上皮細胞への分化の検討を行った。この4年間で十分な結果は出せなかったが、今後とも重要なテーマである。一方でヒト化マウス作製のための新しい免疫不全マウスを作出できた。このマウスを使うことで少数の造血幹細胞でヒト化マウスができるようになれば、より安価にヒト化マウスを使うことができるようになる。

研究成果の概要(英文)：We conducted experiments to induce differentiation from human induced pluripotent stem cells (iPS) into human hematopoietic stem cells and human thymus. During the four-year study period, we investigated various differentiation conditions for human hematopoietic stem cells and human thymus, and transplanted them into immunodeficient mice. However, human hematopoietic cells could not be detected even by transplantation of hematopoietic stem like cells differentiated from iPS. It did not reach the originally planned standardization of humanized mice. On the other hand, the newly developed NOG-c-kitV831M (W41) mouse was found to be an immunodeficient mouse extremely useful as a recipient for human hematopoietic stem cell transplantation. That is, hematopoietic stem cell transplantation into NOG-W41 mice can engraft even a very small number of cells without X-ray irradiation compared to NOG mice, and human hematopoietic cells engrafted in NOG-W41 mice can be engrafted in NOG mice.

研究分野：実験動物学

キーワード：iPS細胞 造血幹細胞 胸腺 ヒト化マウス 免疫不全マウス

1. 研究開始当初の背景

我々は2002年に重度免疫不全NOGマウスを開発し、このマウスにヒト造血幹細胞を移入することによって、多様なヒト造血細胞が分化増殖する「ヒト化マウス」の作製が可能であることを世界に先駆けて報告し、「ヒト化マウス」という新しい動物実験分野を切り開くことができた。その現在世界中で、これら免疫不全マウスを基盤とした「ヒト化マウス」を用いて多様なトランスレーショナル研究が行われている。従来のマウスやラットでは解析、検証できない抗体医薬やヒト標的薬剤等の開発には、ヒト環境を保有する「ヒト化マウス」が必要で、今後とも大きな役割を示すと考えられる。

しかし、一方で臍帯血由来の造血幹細胞の不足、造血幹細胞の異質性により必ずしも再現性のある「ヒト化マウス」実験が行えないという現状がある。すなわち、「ヒト化マウス」作製は研究者間でその結果が大きくばらつき、同じ研究者でも臍帯血のロットによって必ずしも同一の結果を得ることができないというジレンマがある。

もう一つの問題点に、ヒトで認められる獲得性免疫が成立しないという点である。これは、マウス体内で造血幹細胞から分化するヒトT細胞はマウスの胸腺で教育され、その結果分化するヒトT細胞はマウスのMHCに拘束されるためである。これを克服するために、我々はマウスの胸腺にヒトのHLAを発現させるNOGマウスを開発を行っている。しかし、実際にはClass IとIIが合致した臍帯血の入手は極めて難しい。今後、更に臍帯血不足が想定されることから、造血幹細胞入手はほとんど難しくなることが想定される。

そのため、ヒトiPS細胞からの造血幹細胞の作製、人工胸腺の作製による「ヒト化マウス」の作出がこれらの問題点を克服できると考えられる。すなわち、同一のiPS細胞からの造血幹細胞作製法を確立することによって、常に安定した「ヒト化マウス」の作製が可能となり、ロット間のバラツキをなくすることができる。また、造血幹細胞と人工胸腺を同一のiPS細胞から作製することによって、ヒト化マウス内のT細胞、B細胞、マクロファージや樹状細胞は同一のHLAの元で協同作用が可能となり、ヒト獲得性免疫の成立をみることができ、現在難しいワクチンや自己免疫疾患薬の開発も可能になる。

しかし、iPS細胞からの造血幹細胞への分化は難しいとされる。従来のiPS細胞から造血幹細胞への分化の報告では、*in vitro*ではCD34+細胞を分化できるが、実際にそれら細胞を免疫不全マウスに移植してもほとんどヒト造血細胞の分化は認められなかった。最近、ESまたはiPS細胞から造血幹細胞の分化 (Sugimura, R. et al. 2017. Nature 545:432-438.) 胸腺上皮細胞の分化 (Su, M., et al. 2015. Sci Rep 5:9882.) が可能であるとの報告がされた。今回報告された造血幹細胞の分化では、免疫不全マウスでの*in vivo*での検証が用いられている。このことから、この分化法を用いれば、「ヒト化マウス」の作製が可能になると考えられた。

2. 研究の目的

ヒトiPS細胞からの造血幹細胞分化法の確立、2.胸腺上皮細胞分化法の確立と人工胸腺構築、3. これらを同時移植することによる安定的で標準化された「ヒト化マウス」作製法の確立である。この研究によって、世界の研究者が均質で安定した「ヒト化マウス」を使用することで再現性ある「ヒト化マウス」研究ができるようにすることが目的である。また、これら細胞の生着性を向上させる新たな免疫不全マウスを開発も必要である。これについても検討を行う。

3. 研究の方法

本研究の検討に用いたiPS細胞は、理研バイオリソースセンターより入手したiPS細胞研究所由来の253G1、201B7、454B2及びHiPS-RIKEN-1Aで、主に253G1、201B7を用いた。

(1) ヒトiPS細胞からの造血幹細胞(HSC: Hematopoietic Stem Cells)への分化検討

杉本ら (Sugimura, R. et al. 2017. Nature 545:432-438.) 太田ら (Ohta, W. et al. 2019. J. Visual. Exp.) の方法を検討した。また、OP9細胞 (マウス骨髄脂肪前駆細胞株/間葉系幹細胞株、Vodyanik, M.A. et al. 2005, Blood) を用いた分化条件も検討した。

まず、杉本らの方法に準じ、CD34+細胞への分化を指標とし、胚様体(Embryoid Body: EB)の作製と分化を行い、CD34+細胞の比率を検討した。StemFit AKO2N (リプロセル) とし、2mM GlutaMAX, 100U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 1 mM Ascorbic acid, 150 µg/mL Transferrin, 0.1 mM 2-Mercaptoethanol, 10 ng/mL BMP-4, 10 µM Y27632 を加えたものを基礎培地として用い、EB作製にはスフェロイド作製用 Ezsphere (AGC テクノグラス) を用い、培養1日目にEBを回収し、6ウェルプレートで10日間培養した。その分化誘導にEB、単細胞として再播種した細胞での分化の優劣を比較した。分化4, 6, 8, 10日目にFACS解析にて、未分化マーカー (SSEA-4, TRA1-60) とHSCマーカー (CD34) 発現を確認した。分化誘導に、基礎培地としてのStemFit、StemPro-34 および StemPro-34 SFM (Thermo Fisher Scientific) および Essential 8 (Thermo Fisher Scientific) を使った場合の分化誘導能を比較した。

次に、太田らの方法を検討した。杉本らの方法で検討した結果を反映させ、iPS細胞の分化を

行った。方法の概略は図1Aに示す。培養維持した80~90%コンフルエントのiPS細胞 (253G1)を TrypLE-express (Thermo Fisher Scientific)で回収し、3.5 cm Ezsphereに1 x 10⁶細胞を播種した。翌日、3.5 cm EzsphereからEBを回収し、40個のEB となるように、10 μM Y27632含有SFM 2 mLに2 μgのiMatrix (タカラバイオ) を添加した培地を入れた6ウェルプレート 1 wellに播種した。3日後、2mLの2μM CHIR99021, 80 ng/mL BMP-4, 80 ng/mL VEGFを加えたEssential 8で培地交換した。6日後、2mLの1μM SB431542, 100 ng/mL SCF, 80 ng/mL VEGF含有Essential 6で培地交換した。8日後、接着している細胞をTrypLE Expressで剥離し、MACS bead (Miltenyl Biotec) でCD34+細胞を単離した。単離したCD34+細胞を0.5 μg/cm² iMatrixまたは5 μg/cm² Fibronectinで1時間コートした6ウェルプレート 1 wellに 5 x 10⁴ cells/cm²で播種した。培地は、10 μM Y27632, 20 ng/mL TPO, 50 ng/mL SCF, 50 ng/mLFLT3L, 20 ng/mLIL-6, 150 μg/mL Transferrin, 2mM GlutaMAX, 100 U/mL Penicillin, 100 μg/mL Streptomycin含有 StemPro34またはStemline II (Sigma-Aldrich)を使用した。1週間後、接着している細胞をTrypLE Expressで剥離し、FACSで細胞抗原マーカーの発現を確認した。CD34, CD43, CD117, CD133の発現と回収細胞数を指標に、253G1と201B7での分化の相違、添加因子 (VEGF, BMP-4, SCF, IL-6, IWR) 濃度による分化の相違などを検討した。

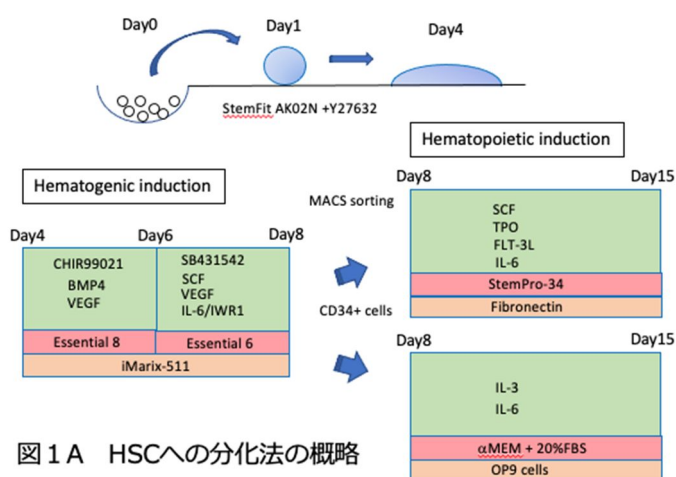


図1A HSCへの分化法の概略

太田らの方法では、培養後16日目に回収した細胞で、浮遊細胞に造血幹細胞様細胞 (CD34+/CD45+細胞) が多数含まれているが、回収できる細胞数が少ない。このことから、in vitroで支持細胞であるOP9細胞が造血幹細胞への系統分化を促進する報告があることから、太田らの方法でCD34+を単離する培養8日目以降を、OP9細胞との共培養による造血幹細胞様細胞の分化促進を試みた。支持細胞としては、OP9またはDelta like-1発現OP9 (OP9/DL1)を理研バイオリソースセンターより入手し

を使用した。6ウェルプレートに播種し、コンフルエントになったOP9/DL1上に 5 x 10⁴ cells/cm²となるようにMACSで単離したCD34+細胞を播種した。培地はOP9の培地である20% FBS含有αMEMに、SCF, TPO, FLT3L, IL-3, IL-6およびIL-11の分化因子を添加して、分化および分化細胞数を検討した。

太田らの方法、及びOP9支持細胞下で8、15または21日間培養して分化させた細胞 (1.5~10 x 10⁵) を、免疫不全NOGまたは新たに樹立したNOG-W41マウスの計50匹に骨髓または尾静脈に投与した。投与後4週および8週でマウス末梢血を採取し、FACSでヒトCD45+細胞の有無を検査した。また、投与後8週または12週で、骨髓および脾臓についても検索を行った。骨髓、脾臓については抗HLA(A,B,C)を用いた免疫組織学的検索も行った。

(2) ヒト iPS 細胞からの胸腺上皮細胞への分化および胸腺の形成

iPS 細胞から胸腺上皮細胞への分化は、Sun X et al. (2013, Cell Stem Cell)、Parent A.V. et al. (2013, Cell stem Cell)および Su M. et al. (2015, Sci Rep)の方法に準じて実施した。

胸腺上皮細胞は肝細胞や肺細胞と同様に内胚葉由来である。従って、上述の3法は基本、iPS 細胞を肝細胞同様に胚体内胚葉 (DE: Definitive Endoderm) に分化させた後に、胸腺上皮細胞へと分化させる方法をとっている。

まず、DE作製の方法を検討した。SunらはRPMI1640、ParentらはXVIVO (Lonza)を基礎培地として用い、そこにActivin, Wnt3a, LY364947などの分化因子を加えてDE形成を行っている。SuらはRPMI1640を基調とするが、DE形成にはEndoderm Differentiation Kit (R&D Systems) を用いて実施している。この3法でのDE形成の比較を行った。iPS細胞は253G1および201B7細胞を用い、維持と継代はStemFit培地を用いた。6ウェルプレート1ウエルにiPS細胞を 1 x 10⁵/cm²で播種し、翌日から4~5日の分化実験を行った。分化細胞でのDEの確認は、抗ヒトOct4, Sox17, EpCAM, CXCR4, K5, K8抗体を用いたFACSで確認した。

Suらの方法では、TEC (Thymic epithelial cell) の形成には、FOXN-1とHOXA3が必要と報告されている。そのため、FOXN-1とHOXA3をDoxycyclineで誘導するTet-on systemのレンチウイルスベクターを構築し、293T細胞でウイルスを作製し、分化誘導に用いた。すなわち、DE形成後、ウイルス感染後、FGF7, FGF10, EGF, BMP4, RAなどの分化因子を加えたXVIVO培地で約10日間培養し、TECの形成をFACSで解析した。

(3) ヒト細胞の生着を亢進させる新たな免疫不全マウスの開発とヒト造血幹細胞の移植
 NOG-W41 マウスはTALEN法を用いたゲノム編集により作製した。TALEN-mRNAとc-kit遺伝子変異配列を含む100bpのsingle strand OligoをNOGマウス前核期卵にマイクロインジェクションにより注入し、NOG-W41マウスを樹立した。これらNOG-W41マウスにヒト臍帯血由来CD34陽性造血幹細胞を尾静脈経由で移入してヒト化し、マウス末梢血を経時的に採取し、ヒトCD45陽性細胞を指標としたヒト白血球キメラ率の測定およびヒトリンパ球系マーカー、ミエロイド系マーカーを用いた各細胞系列への分化能をフローサイトメトリーにて解析した。また、骨髄中のヒト造血前駆細胞、巨核球、赤血球系列の細胞についても解析した。さらに長期生着が可能なヒト造血幹細胞(LT-HSC)は、骨髄細胞二次移植により解析した。すなわち、ヒト造血幹細胞をNOGまたはNOG-W41マウスへ移植し、16週後に各系統から採集した骨髄細胞をNOGマウスに二次移植し、末梢血および各臓器のキメラ率をフローサイトメトリーにて測定した。

4. 研究成果

(1) ヒトiPS細胞からの造血幹細胞への分化検討

杉本らの方法で、EBを作製した後に、EBのまま分化誘導した場合と再播種した場合では、未分化マーカーであるSSEA-4, TRA1-60+細胞の比率は培養時間にしたがって、ともに減少した。CD34+細胞はEBのまま分化誘導した場合で多かったことから再播種することで分化が抑制されることが分かった。分化誘導の基礎培地としてのStemFit、StemPro-34およびEssential 8の比較では、後2者ではEzsphereではEB形成ができなかったことから、以後の実験はStemFitを用いることにした。

次に、太田らの方法を検討した。1週間後、接着している細胞をTrypLE Expressで剥離し、FACSで細胞抗原マーカーの発現を確認した。CD34, CD43, CD117, CD133の発現と回収細胞数を指標に、253G1と201B7での分化の相違、添加因子(VEGF, BMP-4, SCF, IL-6, IWR)濃度による分化の相違などを検討した。6ウェルプレート1well辺りのCD34+細胞は、253G1で 4.7×10^5 、201B7で 3.8×10^5 と細胞株による差は認められず、分化度も差異は認められなかった。また、培養8日までの分化因子および培地についてそれぞれCD34+細胞の比率を基に検討した結果、培養4~6日では10 ng/mL BMP-4, 80 ng/mL VEGF, 2 μ M CHIR99021含有Essential 8培地が、培養7~8日では80 ng/mL VEGF, 1 μ M SB431542, 10 ng/mL IL-6, 3.5 μ M IWR1含有Essential 6で良好な結果が得られた。図1BはMACSでCD34+細胞を単離した各種細胞抗原マーカー陽性率を示

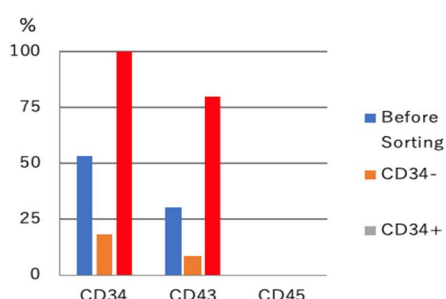


図1B 培養8日目でのMACSによるCD34+細胞の純化

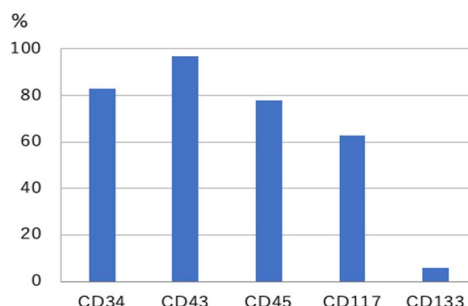


図1C OP9上で培養した15日目の細胞のFACS解

しており、分離前ではCD34+細胞は約50%で、分離後はほぼ全ての細胞がCD34+細胞であった。その時点では、CD34+細胞はCD43+細胞が80%で、CD45+, CD133+, CD235+およびCD309+細胞は認められなかった。培養15日目では浮遊細胞が増え、接着細胞はCD34+が減少していることが明らかとなった。図に示してはいないが、浮遊細胞にCD34+細胞が多く含まれていること、しかし、浮遊細胞の死亡率が高いことが明らかとなった。

このことから、CD34+細胞の比率を上げ、かつCD45+を示す造血幹細胞の比率を上げるため、培養8日目に単離したCD34+細胞を、造血幹細胞への系統分化を促進すると考えられているOP9細胞上に播種し、培養15日目のCD34+, CD45+, CD133+, CD309+細胞の比率を調べたところ、浮遊細胞の死亡率が劇的に減少し、かつCD34+/CD45+細胞数が増加した(図1C)。これら、分化細胞を免疫不全マウスの骨髄、尾静脈に接種したが、移植後8週、12週での解析では、末梢血、脾臓および骨髄にヒトCD45+陽性細胞は認められなかった。

(2) ヒトiPS細胞からの胸腺上皮細胞への分化および胸腺の形成

DE作製に関しては、Sunら、ParentらとSuらの方法を比較した。その結果、Suらの方法は比較的良好と思われた。Kitを使って作製されることとKitに既にActivinなどの分化因子が含まれており、経済的と思われた。SunらとParentらの方法はActivinの量が100 ng/mLの濃度となっており、その点Kitの方が有利と思われた。

DE形成後、ウイルス感染後、FGF7, FGF10, EGF, BMP4, RAなどの分化因子を加えたXVIVO培地で約10日間培養し、TECの形成をFACSで解析した。図2に示すように、EpCAM+, K8+細胞は多いが、K5+細胞の割合は低く、完全にTECを誘導できたとは言い難い。更なる検討が必要と思われた。

(3) ヒト細胞の生着を亢進させる新たな免疫不全マウスの開発とヒト造血幹細胞の移植

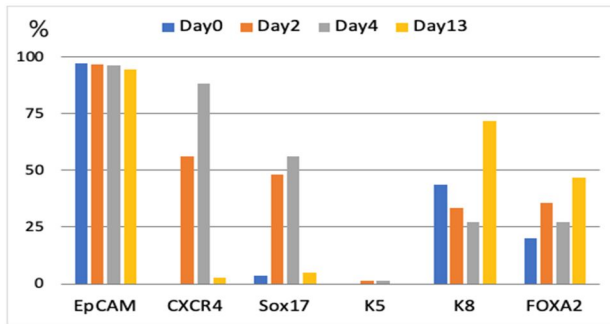


図2 TECへの分化と表面抗原解析

NOG-W41 マウスで CD45+細胞の顕著な生着性亢進を認めた(図3)。また、生着したヒト造血系細胞のキャラクタライズを行った。NOG-W41 マウスで分化したヒト血球系細胞は、従来のNOG マウスと同様に大部分がリンパ球系細胞(T細胞およびB細胞)で占められていたが、好中球や血小板など、これまでほとんど観察されなかった特定のミエロイド系細胞を末梢血中で検出することができ、ヒト造血能の亢進が示唆された(図3)。

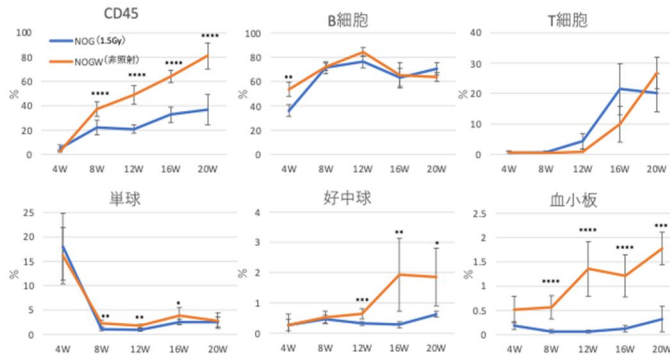


図3 NOG-W41マウスにおけるヒト造血系細胞の分化

比べて、10 倍程度のキメラ率向上を認めた(図4)。また、NOG マウスをヒト化させるためには通常 50,000 個程度のヒト造血幹細胞が必要であるが、40,000 個から 5,000 個まで 1/2 ずつ段階希釈したヒト造血幹細胞を NOG-W41 マウスへ移入したところ、5,000 個の移入でもおよそ 50% 程度のヒト細胞生着を認めた(図5)。これは NOG マウスに比べて 10 倍程度生着性が向上していることを示唆する。これらの結果から NOG-W41 マウスは、稀少ヒト細胞の移植実験に適したモデルであり、ヒト iPS 由来造血幹細胞の移植レシピエントとして応用できる可能性が示唆された。

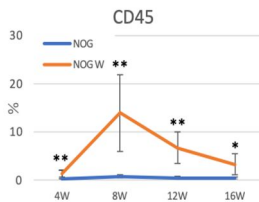


図4 骨髄二次移植後のヒト細胞キメラ率

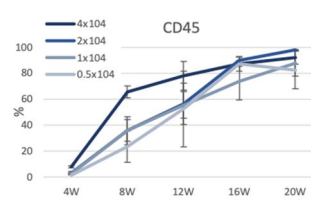


図5 移植ヒト造血幹細胞数の段階希釈によるヒト細胞キメラ率

本研究にて新たに樹立した NOG-W41 マウスは、繁殖効率や体躯の異常は見られず、若干の貧血を認められたものの野生型 NOG マウスと同様に長期飼育、長期実験に耐えうるマウスであった。これら NOG-W41 マウスへ放射線前処置なしでヒト造血幹細胞を移入し、末梢血中のヒト細胞キメラ率を調べたところ、放射線前処置を与えた野生型 NOG マウスに比べて

好中球や血小板など、これまでほとんど観察されなかった特定のミエロイド系細胞を末梢血中で検出することができ、ヒト造血能の亢進が示唆された(図3)。また、NOG-W41 マウスの造血幹細胞長期維持能を解析すべく、骨髄細胞の二次移植を行った。すなわち造血幹細胞を移植して4ヶ月後のNOGマウスまたはNOG-W41マウスの各骨髄細胞をNOGマウスに移入し、二次レシピエントのキメラ率を比較した。その結果、NOG-W41 マウス骨髄細胞移入群はNOG マウス骨髄細胞移入群に

< 引用文

献>

- 1 . Sugimura, R. et al. 2017. *Nature* 545:432-438.
- 2 . Ohta, R. et al. 2019. *J Vis Exp*
- 3 . Vodyanik, M.A. et al. 2005. *Blood* 105:617-626.
- 4 . Parent, A.V. et al. 2013. *Cell Stem Cell* 13:219-229.
- 5 . Sun, X. et al. 2013. *Cell Stem Cell* 13:230-236.
- 6 . Su, M. et al. 2013. *Sci Rep* 5:9882.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	伊藤 亮治 (Ito Ryoji) (60425436)	公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物応用研究部・室長 (72611)	

	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	中畑 龍俊 (Nakahata Tatsutoshi)		
研究協力者	洪 実 (Ko Minoru)		
連携研究者	片野 いくみ (Katano Ikumi) (90442558)	公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物基礎研究部・室長代理 (72611)	

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