

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月15日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：21591255

研究課題名（和文） ヒト万能細胞からの成体型造血幹細胞の分化誘導

研究課題名（英文）

Induction of hematopoietic stem cells from human pluripotent stem cells

研究代表者

湯尾 明 (YUO AKIRA)

独立行政法人・国立国際医療研究センター・研究所・疾患制御研究部・部長

研究者番号：90221663

研究成果の概要（和文）：

ヒト多能性幹細胞（いわゆる「万能細胞」）を用いて、無フィーダー分化誘導系による血液細胞の分化誘導を試みた。培養法の基本は、前半の sphere 形成浮遊培養と後半の平面接着培養からなる2段階培養である。低細胞密度分化誘導培養による好中球産生効率の著明な改善、無血清培養の成功、赤芽球系も共存する多能性造血前駆細胞分化誘導変法の達成、センダイウイルスベクターによる安全なヒト iPS 細胞の樹立、ヒト造血前駆細胞由来のヒト iPS 細胞からの血球分化、等の成果があった。

研究成果の概要（英文）：

We tried to induce hematopoietic cells from human pluripotent stem cells (ES cells and iPS cells) using non-feeder culture system. Our differentiation methods consist of two steps with initial sphere formation followed by secondary adherent culture. We succeeded in efficient production of neutrophils by low cell density culture, serum-free culture for hematopoietic induction, multilineage hematopoiesis with concomitant erythroid induction, production of virus-free safe human iPS cells, and hematopoietic induction from human iPS cells derived from hematopoietic progenitor cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、血液内科学

キーワード：再生医学、発生・分化、ヒト万能細胞、造血幹細胞、分化誘導

## 1. 研究開始当初の背景

血液領域の再生・移植医療は、造血幹細胞移植、輸血（成熟血球移植）などの積極的な展開によって、他の臓器分野に比べて先進的・模範的な展開を示してきた。しかしながら、骨髄ドナー不足、臍帯血の量の不足、ド

ナーからの感染症の危険性、などの問題点も抱えており、完全と呼べる状況には達していない。これは、1つには造血幹細胞が *in vitro* で効率よくは増えないこと、さらには、安全で HLA の完全に一致した血球成分が入手しにくいこと、等による。以上のような状況を鑑

みれば、安全で無限増殖するヒト胚性幹細胞（ヒトES細胞）からの血液細胞の産生は、依然として大きく期待されている。さらに、昨今の human induced pluripotent stem cells（ヒトiPS細胞）の開発は、HLA完全一致の再生医療への道を血液学領域においても大きく開いた。

ヒトES細胞やヒトiPS細胞などのヒト万能細胞に関する以上の視点と、胚性の万能細胞からの血液細胞分化に特有の問題点をまとめると以下ようになる。①HLAによる拒絶（肝臓などでは比較的問題ではないが、血液では重大）、②不均一で効率の低い分化誘導、未分化細胞の残存、③マウス支持細胞や牛胎児血清などの動物由来成分の混在・混入、④血液細胞特有の問題である1次造血、2次造血の問題、である。①の拒絶の問題はiPS細胞の開発によって克服されつつあるが、②の分化誘導技術、③の動物由来成分の混入、④の胎児造血の問題、は依然として大きな障壁である。特に②と④は明白で未解決の課題であるが、③に関しても未だにマウス支持細胞による分化誘導論文がTop Journalを飾っている（Ledran MH et al. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell* 3:85-98, 2008）。

本研究計画においての課題の中でもとりわけ乗り越えるべき障壁は、発生の過程をたどりがちな胚性幹細胞からの血球分化において特有の1次造血の問題である。この課題は世界的に誰も克服しておらず、HOXB4などの遺伝子導入でも越えられない困難な障壁である。この問題の解決にヒントを与える重要な報告がごく最近になされた（Taoudi S et al. Extensive hematopoietic stem cell generation in the AGM region via maturation of VE-cadherin+CD45+ pre-definitive HSCs. *Cell Stem Cell* 3:99-108, 2008.）。胎生期において最初に2次造血が発生するAGM領域において、2次造血の一手手前の段階としてのVE-Cadherin（血管内皮マーカー）・CD45（血球分化マーカー）両方陽性の細胞（pre-definitive HSCs（Hematopoietic Stem Cells））の出現が重要であると報告された。ただし、本論文はマウスでの発見であり（大発見であるが）ヒトでは全く不明である。

## 2. 研究の目的

血液成分の輸注は現代医療において不可欠であるが善意のボランティアに供給を依存しているため供給量に限りがあり、また、感染症の媒体となる危険をかかえている。従って、病原体混入がないクリーンな環境で安定して血液細胞成分を生成する技術を開発

していくことは極めて重要である。

骨髄の造血幹細胞から血液細胞成分を増幅する試みは長年研究されてきたが、造血幹細胞は体外では十分に増幅しないことも確認された。一方、ES細胞は無限増殖能と多能性分化能を持つために再生医療における優れた材料として近年注目されている。即ち、ヒトES細胞から安定して試験管内で血液細胞成分を作成することが可能になれば輸血医療・移植医療において革命的な進歩がもたらされる。とりわけ、寿命が短いために現行の輸血療法では効果が乏しい好中球や体外での増幅が困難な造血幹細胞に関してはその恩恵は大きい。また、赤血球などの他の血球も、日本赤十字社の事業負担が大きいことを考慮すれば、ヒトES細胞からの産生が展開されれば、その意義は大きい。以上のような観点から、我々はヒトES細胞を用いて、無血清無フィーダー環境における未分化維持と血液細胞生成を試み、顕著な成果を上げてきた。特に、好中球の分化誘導系は、著名な国際学術誌に公表され世界的な反響を呼んだ（Saeki K et al. *Stem Cells* 27:59-67, 2009、国際特許：出願番号PCT/JP2007/71811）。

一方、近年の細胞初期化技術の進歩により、体細胞を受精卵の状態に戻して、ES細胞のような万能細胞を作成する手法が相次いで報告され、ヒト多能性幹細胞（ヒトiPS細胞）の作成も内外で活発に行われる時代となった。しかしながら、ヒトES細胞と同様にヒトiPS細胞も多能性を有するとはいいながら、あるいは、多能性を有するが上に、特定方向への制御された効率の高い分化誘導は困難である。また、ヒトiPS細胞は、ヒトES細胞のような生命倫理問題は伴わないが、ウイルスベクターによって体細胞を強引に初期化することの危険性がつきまとうことは否定できない。

本研究においては、我々がヒトES細胞において開発した独自の血液細胞分化誘導技術をさらに洗練させてヒトiPS細胞に適應して高効率な血液細胞産生を達成することが主な目標である。その際、医療への応用が主目的であるので、当然のことながら、マウスフィーダー細胞や牛胎児血清などの動物由来成分を出来るだけ排除することが重要である。また、現在のヒトiPS細胞はレトロウイルスベクターによって樹立されたためにウイルスベクター由来遺伝子がゲノムに組み込まれている細胞がほとんどであり、このような危険性排除することも必須の課題である

## 3. 研究の方法

### ●細胞など研究材料

マウス胎児線維芽細胞（murine embryonic fibroblasts, MEF）はマイトマイシンC（MMC）

処理またはX線照射によって増殖を停止させて未分化維持用のフィーダー細胞として用いた。ヒトES細胞 (KhES-3、KhES-4、KhES-5) は京都大学再生医科学研究所から供与を受けた。ヒトiPS細胞は、京都大学iPS細胞研究所 (201B7、253G1) および独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 (#25) より供与を受けた。センダイウイルスベクターを用いてヒト臍帯血CD34陽性細胞より樹立されたヒトiPS細胞は、先端医療振興財団より供与された。ヒトES細胞 (KhES-3)、ヒトiPS細胞 (201B7、253G1、#25) は、MMC処理MEF上で20%KSR存在下に無血清培養により継代した。継代は週2回、コラゲナーゼ処理にて行い、細胞密度を2-4倍に希釈した。OP9細胞は、20%牛胎児血清存在下で継代培養した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell、HUVEC) は、大日本住友製薬株式会社から購入した。新生児皮膚由来線維芽細胞BJはATCCから入手した。

#### ●センダイウイルスベクターを駆使したヒトiPS細胞の樹立

新生児皮膚由来線維芽細胞BJ、HUVECからヒトiPS細胞の樹立を行った。山中4因子を搭載したセンダイウイルス (SeV) ベクター (SeV18+OCT3/4/TSΔF, SeV18+SOX2/TSΔF, SeV18+KLF4/TSΔF, SeVHNLc-MYC/TS15ΔF) をMOI3にて感染させて、6日間培養した後にX線照射したMEF上でFGF存在下で培養した。培養過程で出現するヒトES細胞用のコロニーをマイクロピペットでつり上げて引き続きMEF上で培養した。SeVベクターと導入遺伝子は継代培養により著名に希釈され最終的には高温培養によって消失した。得られたSeVベクターによるヒトiPS細胞はSSEA4、Oct3/4、Nanogなどの多能性幹細胞特異的マーカーを発現していた。

#### ●分化誘導プロトコール

サイトカイン、増殖因子は、分化誘導系によって、文献などを参考に一部異なる組み合わせを用いた。

①当研究室独自の手法による場合は、未分化ヒトES細胞、ヒトiPS細胞をコラゲナーゼ処理によりMEFの混入を避けて回収した後に、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholineコート低接着培養皿にて数日間スフェア形成させた。分化培養液には、15%牛胎児血清の他に、6種類のサイトカイン・増殖因子、すなわち、20 ng/ml IGF-II (insulin-like growth factor II)、20 ng/ml VEGF (vascular endothelial growth factor)、100 ng/ml SCF (stem cell factor)、100 ng/ml FL (Flt-3 ligand)、50 ng/ml TPO (thrombopoietin)、100 ng/ml G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)

を添加した。

②Bhatiaらの手法による場合は、回収した未分化ヒトES細胞、ヒトiPS細胞をpoly(2-hydroxyethyl methacrylate)コート低接着6cmディッシュにて数日間数日間スフェア形成させた。分化培養液には、20%牛胎児血清の他に、7種類のサイトカイン・増殖因子、すなわち、20 ng/ml VEGF (vascular endothelial growth factor)、50 ng/ml BMP-4 (bone morphogenetic protein 4)、300 ng/ml SCF (stem cell factor)、300 ng/ml FL (Flt-3 ligand)、10 ng/ml IL-3 (interleukin 3)、10 ng/ml IL-6 (interleukin 6)、3 U/ml EPO (erythropoietin) を添加した。

③Elefantyらの手法による場合は、回収した未分化ヒトES細胞、ヒトiPS細胞を無血清培地に浮遊して低接着96穴プレートにおいて比重遠心してスフェアを形成させた。分化培養液には以下の9種類のサイトカイン・増殖因子、すなわち、5 ng/ml IGF-II (insulin-like growth factor II)、5 ng/ml VEGF (vascular endothelial growth factor)、10 ng/ml BMP-4 (bone morphogenetic protein 4)、20 ng/ml SCF (stem cell factor)、5 ng/ml FL (Flt-3 ligand)、5 ng/ml IL-3 (interleukin 3)、5 ng/ml IL-6 (interleukin 6)、5 ng/ml TPO (thrombopoietin)、5 U/ml EPO (erythropoietin) を添加した。

④上記の①②③の手法の長所を生かして、安定的に好中球、赤芽球、造血前駆細胞を産生させるために、異なる手法のサイトカインの種類や量などを中間的に改変する、もしくはどれかの手法のサイトカインの種類と量を組み合わせる、等して新たな分化誘導法の創出を試みた。

⑤上記の①②③④の手法に、更に牛胎児血清を排除して無血清培養を試みた。すなわち、元々無フィーダー培養であるので、動物由来成分を完全に排除した無血清・無フィーダー培養を検討した。

⑥上記の①②③④⑤いずれの場合も、分化誘導培養の後半において、スフェアをゼラチンコート培養皿での平面培養に移行した。サイトカイン・増殖因子はスフェア形成期間と同様である。

#### ●コロニーアッセー

造血コロニーアッセーは、市販のキット (Methocult TM GFH4535) を用いて、メチルセルロース中にて造血因子のカクテル存在下 (SCF、IL-3、IL-6、GM-CSF、G-CSF、erythropoietin) で行い、2週間後のコロニー形成を倒立顕微鏡にて観察した。

#### ●RT-PCR

市販のキット (RNeasy Mini Kit) によりRNA抽出後にcDNAを作成して行った。各種のグロビン遺伝子 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ グロビン)、

インターフェロンの同定を行った。

#### ●免疫染色

グロビン蛋白 ( $\alpha$ グロビン、 $\beta$ グロビン)の免疫染色は、細胞をアセトン・メタノール固定した後に、1次抗体と反応させ、アレクサ標識2次抗体と反応させて、蛍光顕微鏡により観察した。

#### ●形態学的組織化学的観察方法

生細胞は、培養皿や培養フラスコのまま倒立顕微鏡により形態観察した。浮遊状態の血液細胞はスライドガラス表面にサイトスピン固定した後に、ライトギムザ染色、エステラーゼ染色、を行い、正立顕微鏡により観察した。

#### ●フローサイトメトリー

細胞膜表面抗原の同定は、細胞をPBS中で30分間1次抗体と反応させた後にFACSCaliburを用いて解析した。解析した抗原は、CD34、CD45、CD11b、CD16b、CD66である。

#### ●食食能

食食能は、FMLP存在下でのザイモザンの食食により定量した。細胞はライトギムザ染色し、正立顕微鏡により食食を観察した。

#### ●活性酸素産生能

活性酸素産生能は、既報の手法によりNBTの還元により測定した。

#### ●フィーダー機能の検定

我々のヒト多能性幹細胞からの血液細胞の分誘導はマウスのフィーダー細胞を用いない無フィーダー培養であるが、培養系には多くの接着細胞が共存し、それらの細胞がヒトフィーダー細胞として造血を支えている可能性が有る。それを検定するために、ヒト多能性幹細胞由来の接着細胞とヒトCD34陽性血液細胞を共培養した後にNOGマウスの移植してマウス体内でどの程度ヒトCD34陽性血液細胞由来のヒト血液細胞が生着・増殖するかを検討した。

#### (倫理面への配慮)

本研究ではヒト検体は使用しないし、臨床研究もない。また、動物実験を行う計画はない。さらに、ヒトのクローンなどの生命倫理に抵触するような実験、研究はいっさい含まれない。

ヒトES細胞の使用に際しては、「ヒトES細胞の使用に関する指針」にのっとり文部科学大臣への届出を行った後に開始した。

#### 4. 研究成果

##### ●ヒトES細胞からの血液細胞の分化誘導に関する検討

我々は、ヒトES細胞から独自の手法を用いて好中球の効率的な分化誘導を行うことに成功した (Saeki K et al. Stem Cells 27:59-67, 2009、国際特許：出願番号

PCT/JP2007/71811)。一方、サルES細胞から、Bhatiaらの手法の変法により高効率の造血前駆細胞を得ることに成功したが、いまだにヒトES細胞では成功していない。さらに、Elefantyらは造血前駆細胞や赤芽球を高効率に誘導する手法を報告しており、しかも、この手法は無血清培養である(我々独自の手法やBhatiaの手法は牛胎児血清を使用している)。以上より、ヒトES細胞での分化誘導実験を従来とは異なる手法も含めて検討した。また、我々独自の手法は無フィーダー培養であるが、動物由来成分排除をさらに推し進めるために、無血清培養を課題とした。実際に検討した手法は、①独自の手法による再現性の十分な確認、②サルES細胞において一時期成功したBhatiaらの手法の変法による造血前駆細胞の誘導、③好中球のみではなく赤芽球や前駆細胞にも有効な新たな手法の導入 (Elefantyらの手法)、の3つの手法である。なお、以下の検討においては最も血球分化が優れている株KhES-3を中心に実験したが、KhES-4、KhES-5においても血球分化が可能である事は確認した。

##### 独自の手法による検討

我々独自の既報の手法によるヒトES細胞からの血球分化を、KhES-3株を使用して検討した。サイトカインカクテル(6種類のサイトカイン・増殖因子(IGF-II, VEGF, SCF, Flt3-L, TPO, G-CSF))を含む分化培地を用いて低吸着培養皿上で3日間浮遊培養を行い、形成された大小不同のsphereをまとめてゼラチンコート皿で培養した。接着後にsphereは平板化し、活発な細胞増殖に伴って円盤状の細胞層が形成された。しばらくすると円盤状細胞層中心付近(sphereの接着部位付近)が重層化し、12日前後で球状細胞を包含する囊状の構造物(囊状構造物(a sac-like structure; SLS))が形成された。球状細胞はSLS内に充満し、次第にSLS外側の円盤状細胞層の上にも載積するようになった。培地交換の際にはまずSLS壁面をマイクロピペットで切開して球状細胞を上清中に放出させ、上清を回収して遠心後に沈殿した球状細胞をフレッシュな分化培地に懸濁させるようにして行った。切開したSLS壁は一晩で塞がり2~3日後には再び球状細胞が充満していった。このような球状細胞は、好中球に分化したが、マクロファージ分化多数を占める時もあり、必ずしもなんて胃的に好中球のみを産生できるとは限らず、また、未分化造血細胞の観察期間が長いとは言えなかった。すなわち、この手法のみに頼ることの危険性が想定された。

##### Bhatiaらの手法の変法による検討

上記の場合と同様に、ヒトES細胞からの血球分化をKhES-3株を使用して検討した。高濃度のSCF、Flt3-Lを含む培養条件におい

て Bhatia らの手法 (約 2 週間) より短期間 (5 日程度) の sphere 形成を行い、その後、平面接着培養を行った。その結果、囊状構造物は形成されずに球状浮遊細胞が持続的に産生され、手法の有効性が示唆された。囊状構造とは異なり、蜘蛛の巣状の構造物が形成され、造血が進行した。再生された球状細胞のライトギムザ染色像では、未分化血球が主体を占める時期が認められ、コロニーアッセイでは、顆粒球、単球マクロファージ、赤芽球コロニーが全て認められ、造血前駆細胞の存在が示唆された。また、グロビン遺伝子発現解析においては、 $\alpha$  グロビン、 $\gamma$  グロビンの他に  $\beta$  グロビン遺伝子発現も認められ、我々の既報より成体造血に近いことが示された。

#### Elefanty らの手法の変法による検討

上記の場合と同様に、ヒト E S 細胞からの血球分化を KhES-3 株を使用して検討した。回収した未分化ヒト E S 細胞を血清培地に浮遊して低接着 96 穴プレートにおいて比重遠心してスフェアを形成させた。約 10 日間の sphere 形成の後に、6 穴ゼラチンコート皿条において接着培養を開始した。sphere は比較的固まったまま分化して、肉眼でも赤いことが確認できるような赤芽球分化が認められた。 $\alpha$  グロビン、 $\beta$  グロビンの免疫染色が陽性で、成体型造血が蛋白レベルで確認された。

我々のヒト E S 細胞からの血球分化誘導においては、上記の①②③いずれの系においても球状の血球増殖分化を支える接着細胞 (ヒト E S 細胞由来の支持細胞・ストローマ細胞の可能性有り) が必ず観察されるが、Elefanty らの手法の変法においては、その様な接着細胞における新たな発見があった。すなわち、注意深い観察により、ストローマ細胞の中に脂肪的を含有する脂肪細胞が存在し、褐色脂肪細胞マーカーである PRDM16 遺伝子発現が陽性であった。

次に、我々の系におけるヒト E S 細胞由来フィーダー様細胞の造血支持機能を検討した。すなわち、我々のヒト多能性幹細胞 (ヒト E S 細胞、ヒト i P S 細胞) からの血液細胞の分誘導はマウスのフィーダー細胞を用いない無フィーダー培養であるが、培養系には多くの接着細胞が共存し、それらの細胞がヒトフィーダー細胞として造血を支えている可能性が有る。それを検定するために、ヒト多能性幹細胞由来の接着細胞とヒト CD 3 4 陽性血液細胞を共培養した後に NOG マウスの移植してマウス体内でどの程度ヒト CD 3 4 陽性血液細胞由来のヒト血液細胞が生着・増殖するかを検討した。

その結果、Elefanty らの無血清赤芽球誘導法で形成された接着細胞は、ヒト CD 3 4 陽性血液細胞の生存を十分に維持して、その後 NOG マウスの移植したとの生着も良好で、

しかも、胸腺での CD3 陽性 T リンパ球の形成も良好であった。従って、極めて優れたフィーダー機能があると考えられた。

#### ●京都大学より供給されたヒト i P S 細胞を用いた血液細胞分化誘導

研究開始当初は、京都大学で樹立したヒト i P S 細胞を用いて造血細胞分化を行なったが、マクロファージ主体の分化誘導であった。用いた手法は、我々独自の手法 (Stem Cells 27:59-67, 2009) である。253G1 株においてはマクロファージのみならず一過性に造血前駆細胞も観察された。また、253G1 株においては、その様な造血前駆細胞に対するマクロファージの血球貪食像が観察された。一方、コロニーアッセイにおいては 253G1 株においては顆粒球コロニーも形成した。従って 253G1 株においては、一端は産生された血球がマクロファージによって貪食されている可能性が示唆された。

このような血球貪食を思わせる現象の分子解析として、様々のサイトカインの RT-PCR を行い、TNF や IL-1 の発現は認めなかったが、I 型インターフェロン (IFN  $\alpha$  1, IFN  $\alpha$  2, IFN  $\beta$  1) の血球分化に伴う発現誘導を認めた。

#### ●独立行政法人国立成育医療研究センターより供給されたヒト i P S 細胞を用いた血液細胞分化誘導

国立成育医療研究センターにおいて樹立されたヒト i P S 細胞を用いて、我々独自の手法 (Stem Cells 27:59-67, 2009) により、造血細胞分化を行なったが、試した 1 株 (#25, 初期化 4 因子導入株) で囊状構造体の形成が確認された。囊状構造体の切開による血球回収後は、速やかに切り口がふさがり血球産生が再開された。回収された細胞は、ライトギムザ染色では成熟好中球も含まれ、エステラーゼ 2 重染色においても顆粒球系細胞の存在が明確に確認された。さらに、コロニーアッセイにおいても顆粒球系細胞の存在が確認された。このような顆粒球系細胞は、CD45 陽性 CD11 b 陽性の食細胞系の成熟血液細胞で貪食能を有していた。好中球特異的抗原 CD16b は約 2 割が陽性であった。ヒト E S 細胞の時と異なり、60 日以上以上の造血が持続し、囊状構造体内部では好中球系の造血が長く保たれていた。

このような結果は、ヒト E S 細胞と同様の中密度培養の時の所見であるが、更に、高密度培養、低密度培養も検討したところ、高密度培養や低密度培養においては、中密度培養と異なり囊状構造体を形成せずに造血が進み、低密度培養においては、高い比率で好中球系の造血が認められた。このような好中球は N B T 還元応が陽性であることも確認した。

#### ●ゲノムにウイルスベクターが取り込まれない安全なヒト i P S 細胞の作成の試み

初期化4因子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-myc)を組み込んだセンダイウイルスベクターを用いて、新生児皮膚由来線維芽細胞BJとヒト臍帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cell、HUVEC)からヒトのiPSを試みた。培養細胞にベクター添加後、一定の期間の後には、もとの細胞とは全く異なる細胞形態を有する(ヒトES細胞と極めて類似した細胞形態を有する)細胞のコロニーが数多く観察され、その様な細胞からヒトiPS細胞が樹立された。樹立されたヒトiPS細胞は、SSEA4、Oct3/4、Nanogなどの多能性幹細胞特異的マーカーを発現し、染色体は正常で、SeVベクター自体も、山中4因子のトランスジーンも検出されなかった。従って、ゲノム内はもちろんのこと細胞の何処にもベクターやトランスジーンが無い安全なヒトiPS細胞が我々の研究室において樹立された。

●ゲノムにウイルスベクターが取り込まれない安全なヒトiPS細胞からの血液細胞分化誘導

新生児皮膚由来線維芽細胞BJから樹立したヒトiPS細胞を用いて我々独自の手法(Stem Cells 27:59-67, 2009)により、血液細胞の分化誘導を行った。その結果、約30%が好中球系の血球に分化した。今後はその効率を上げるための改変を試みる。

一方、ヒト臍帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cell、HUVEC)から樹立したヒトiPS細胞に関しては、同様に我々独自の手法に1部改変を加えて赤芽球もできるよう、しかも、無血清条件で分化誘導を行い、グロビン遺伝子などから成人型の赤芽球の産生が確認された。

なお、本研究課題ではないが、このHUVEC由来iPS細胞は、血管内皮細胞への分化誘導が極めて優れていることが確認できている。これを血液細胞に応用して血液細胞から樹立されたヒトiPS細胞を用いて血球分化を行ったが、特別に優れた結果を出すことはできなかった。

## 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1件)

1. Gokoh M, Nakamura N, Matsuyama S, Nishio M, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K: Early senescence is not an inevitable fate of human induced pluripotent stem-derived cells. Cellular Reprogram 13:361-370, 2011. DOI:10.1089/cell.2011.0004.

[学会発表] (計2件)

1. 西尾美和子、中村直子、松山さと子、湯尾明、佐伯久美子: 無フィーダー・無

血清環境でのヒトES細胞からの赤血球および造血ストロマ細胞の作製。第10回日本再生医療学会総会、2011年3月、東京。

2. Nishio M, Nakahara M, Yuo A, Saeki K: Directed differentiation of human pluripotent stem cells into brown adipocyte-like cells. The 4th Annual Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell, November 2011, Beijing, China.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞とその製造方法並びに細胞療法的使用

発明者: 佐伯久美子、湯尾明、西尾美和子、川崎正子、佐伯晃一、長谷川護

権利者: 独立行政法人国立国際医療研究センター総長、ディナベック株式会社

種類: 特許

番号: 特願2011-100218

出願年月日: 平成23年 4月27日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯尾 明 (YUO AKIRA)

独立行政法人・国立国際医療研究センター・研究所・疾患制御研究部・部長

研究者番号: 90221663

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者

佐伯 久美子 (SAEKI KUMIKO)

独立行政法人・国立国際医療研究センター・研究所・疾患制御研究部・室長

研究者番号: 80322717

西尾 美和子 (NISHIO MIWAKO)

独立行政法人・国立国際医療研究センター・研究所・疾患制御研究部・研究員

研究者番号: 30623318