

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25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：22591053

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞からの無フィーダー血球分化における血球貪食症候群類似状態の解明

研究課題名（英文）Mechanistic study for the hemophagocytosis-like condition during the induction of hematopoietic cells from human pluripotent stem cells

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

ヒトES細胞において確立した独自の好中球分化誘導法を駆使してヒトiPS細胞からの血液細胞分化誘導を検討したところ、マクロファージ主体となってしまった。しかし、分化誘導初期には骨髄系の前駆細胞は存在し、これをマクロファージが貪食していると思われる所見を得た。このようなマクロファージによる血球貪食はヒトの疾患でも知られており、その培養系モデルとなる可能性を想定して分子機構の解析を試みた。I型インターフェロン(IFN α 1、IFN α 2、IFN β 1)の発現をRT-PCRにより解析したところ、ヒトES細胞では3株中1株のみで、ヒトiPS細胞では4株全てにおいて分化誘導に伴ってI型インターフェロンの発現が認められた。以上のように、ヒトiPS細胞からの血球分化においてI型インターフェロン産生が高頻度である傾向を認めた。しかしながら、ヒトiPS細胞の株数（さらには供給元）を増やし、培養条件を詳細に検討したところ、一部の細胞株において、低密度培養条件において好中球優位の分化が認められた。一方、ヒトES細胞でも細胞株数を増やして詳細に検討したところ、細胞株によってはマクロファージ優位の分化が認められた。以上より、ヒトiPS細胞における血球貪食による好中球分化不全には再現性が必ずしも無いことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

By using neutrophil-inducing differentiation culture system of human embryonic stem (ES) cells, we observed macrophage-dominant induction of human induced pluripotent stem (iPS) cells. During the early phase of differentiation of human iPS cells, we observed neutrophil-progenitors and the phagocytosis of these progenitors by macrophage, suggesting that our iPS system represent in vitro model of hemophagocytosis known in human diseases. In the present study, we performed molecular analysis of this in vitro model of hemophagocytosis. We observed expression of IFN α 1、IFN α 2、IFN β 1 during the differentiation of all four iPS cell lines and one of three ES cell lines. However, we observed neutrophil-dominant differentiation of human iPS cells under the low cell density culture condition and macrophage-dominant differentiation of human ES cells in certain ES cell lines. Thus, we were not able to clarify the relationship between ES versus iPS cells and neutrophil versus macrophage induction in our differentiation inducing culture system in this study.

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
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：ヒト iPS 細胞、血球貪食、マクロファージ、インターフェロン、ヒト ES 細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト induced pluripotent stem (iPS) 細胞は、患者本人の体細胞から作製される多能性幹細胞であり、免疫拒絶が無いことから再生医療ツールとして大いに期待されている。2007年にヒト iPS 細胞の樹立が報告されて以来、この2年間で様々な組織への分化誘導技術が相次いで報告されてきた。造血細胞分化に関しても、成熟機能を持った赤血球や巨核球の産生が報告されている。しかしこれらの報告では、分化誘導過程においてマウスのストローマ細胞がフィーダーとして用いられており、臨床応用に際しては異種動物由来細胞の排除という課題が残されている。

一方、申請者のグループは、ヒト胚性幹 (embryonic stem, ES) 細胞から無フィーダー環境下で高効率に造血細胞を産生するシステムの開発に成功した (Saeki et al., Stem Cells 2009, 国際特許 WO2008/056779)。この方法は、1) ES細胞を浮遊培養することで sphere を形成するステップ、2) 形成された sphere をゼラチンコート皿で接着培養するステップ、の2段階からなる。接着培養をすると sphere は速やかに平面状になり、以後は細胞分裂により円盤状に拡大していく。そして 10 日前後で、円盤の中央付近から囊状の突出物が出現し、その中には造血前駆細胞が充満する。顕微鏡下で囊状構造物の壁を切開すると、内部の造血前駆細胞は培養上清中に放出される。培養上清を遠心分離して造血前駆細胞を回収して、これを同じ分化培養皿に戻して培養を続けると血球は成熟していく。なお囊壁は切開後に速やかに塞がり、数日以内に造血前駆細胞が囊内に再充満する。このような「囊壁切開」と「造血前駆細胞の再充満」は少なくとも1ヶ月間は繰り返して起きるため、1回の分化誘導操作により成熟血球を増幅して得ることができる。

そこで申請者は、上記のシステムをヒト iPS 細胞へ適用することを試みた (注:ヒト iPS 細胞は京都大学・山中伸弥教授より供与)。ヒト iPS 細胞でも浮遊培養により sphere が形成され、接着培養により円盤状構造体が形成された。囊状構造物の形成率はヒト ES 細胞よりも低かったが (1/3 程度であった)、囊の内部に血球が充満していくことも確認された。しかし、囊壁の切開後に穴が塞がることはなく、血球の再充満は認めなかった。またヒト ES 細胞の場合には見られなかった腸管様構造物が検出されるなど、分化指向性はヒト ES 細胞よりも低いことが判明した。

次に、ヒト iPS 細胞から産生された血球の構

成を調べるために、サイトスピン標本を作製して Wright-Giemsa 染色を施した。まず Day 35 (注:ES 細胞ではこの時期に顆粒球が多く産生される) で標本を作製したところ、細胞質に多数の空胞を持つマクロファージしか検出されなかった。ヒト iPS 細胞の株数を増やして検討を行ったが、やはり産生されたのはマクロファージだけであった。そこで Day 21 で標本を作製したところ、小円形で核/細胞質比の大きな造血前駆細胞らしき細胞が多数検出された。しかも、マクロファージがこれら細胞を貪食している様子もしばしば観察された。さらに M 期のマクロファージが観察されるなど、貪食のみならず増殖能も高いマクロファージであることが判明した。このような現象はヒト ES 細胞からの分化誘導過程では観察されていない。

続いて、Day 21 で観察された小円形細胞の造血機能を調べるためにコロニーアッセイを行った。結果、ヒト ES 細胞と同様の効率で造血コロニーが形成されることが判明した。そもそもコロニーアッセイにおいては、半固形培地を使用するために細胞の運動性が制限されるうえに、極低密度で播種するために細胞同士は隔離されてしまい貪食は阻止された状況になる。このような状況では造血コロニーが十分に形成されていたことから、ヒト iPS 細胞における成熟血球形成不全は、造血前駆細胞が過剰活性化マクロファージにより貪食されて枯渇させられたことが原因であると考えられる。

2. 研究の目的

前項に記載したようなマクロファージによる血球貪食は、悪性腫瘍や重症感染症において発症する血球貪食症候群を想起させる。血球貪食症候群は高サイトカイン血症が基礎にあると考えられているが、その実態は解明されていない。そこで申請者は、ヒト iPS 細胞の分化過程で観察された血球貪食に関する分子機構を明らかにするために、各種の炎症性サイトカインの発現を Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) にて調べてみた。結果、Interferon (IFN) α 1 や IFN β 1 などの I 型インターフェロンの発現が特異的に誘導されていることが判明した。一方、IFN γ や、TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6 などの炎症性サイトカインの発現誘導は認めなかった。

以上、『無フィーダー環境におけるヒト iPS 細胞からの血球分化』においては、「I 型インターフェロンの発現誘導によるマクロファージの過剰活性化に起因する異常な血球貪食」をい

かに抑制するかが成功の鍵となることが明らかとなった。本研究では、ヒト iPS 細胞からの血球分化における I 型インターフェロンの発現誘導の詳細な分子機序を明らかにするとともに、それを抑制する物質のスクリーニングを通して、ヒト iPS 細胞からの無フィーダー環境での効果的な血球産生を実現することを目指す。本研究により、造血障害疾患への治療を目指したヒト iPS 細胞の臨床使用の可能性が開かれるとともに、未だ発症機序が不明である致死的血球貪食症候群の病態解明および治療開発への道が開かれる。

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 E S 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 i P S 細胞は、京都大学 i P S 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 CD 3 4 陽性細胞より樹立されたヒト i P S 細胞は、先端医療振興財団より供与された。ヒト E S 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。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 B J は A T C C 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 i P S 細胞の樹立

新生児皮膚由来線維芽細胞 B J、HUVEC からヒト i P S 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 (S e V) ベクター (SeV18+OCT3/4/TS ΔF, SeV18+SOX2/TS ΔF, SeV18+KLF4/TS ΔF, SeVHNLc-MYC/TS15 ΔF) 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 E S 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 i P S 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

未分化ヒト E S 細胞、ヒト i P S 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。

●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 (α 、 β 、 γ グロビン)、インターフェロンの同定を行った。

●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。

(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、研究はいつさい含まれない。

ヒト E S 細胞の使用に際しては、「ヒト E S 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 E S 細胞からの血液細胞の分化誘導に関する検討

我々独自の既報の手法によるヒト E S 細胞からの血球分化を検討した。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、1

2 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、マクロファージを多数を占める時もあり、必ずしも安定的に好中球のみを産生できるとは限らなかった。このような分化誘導系において、I 型インターフェロン (IFN α 1、IFN α 2、IFN β 1) の発現を RT-PCR により解析したところ、ヒト E S 細胞 3 株中 1 株のみで、I 型インターフェロンの発現が認められた。未分化ヒト E S 細胞では、I 型インターフェロンの発現はなかった。

●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 iPS 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 α 1、IFN α 2、IFN β 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 CD11b 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。

このような分化誘導系においても、I 型インターフェロン (IFN α 1、IFN α 2、IFN β 1) の血球分化に伴う発現誘導を認めた。

●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 B J とヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell、HUVEC) からヒトの i P S 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 E S 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 i P S 細胞が樹立された。樹立されたヒト i P S 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 i P S 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 i P S 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 B J から樹立したヒト 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、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。このような分化誘導系においても、I 型インターフェロン (IFN α 1、IFN α 2、IFN β 1) の血球分化に伴う発現誘導を認めた。

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 2 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.
2. Nishio M, Yoneshiro T, Nakahara M, Suzuki S, Saeki K, Hasegawa M, Kawai Y, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Tobe K, Yuo A, Kubota K, Saito M, Saeki K: Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer. Cell Metab 16:394-406, 2012. DOI:10.1016/j.cmet.2012.08.001.

[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, Saeki K, Hasegawa M, Yuo A, Saeki K: Brown adipocyte differentiation of human pluripotent stem cells without genetic manipulation. The 10th Annual Meeting International Society of Stem Cell Research, June 2012, Yokohama, Japan.

[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、多能性幹細胞由来細胞凝集物と、その製造方法及び細胞療法、内科療法

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、ディナベック株式会社

種類：特許

番号：PCT/JP2012/61212

出願年月日：25年4月26日

国内外の別：国外

○取得状況 (計1件)

霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法

発明者：湯尾 明、佐伯久美子、佐伯晃一、中原正子、中村直子、過足芳子、松山さと子、米田麻子

権利者：独立行政法人国立国際医療研究センター、田辺三菱製薬株式会社

種類：特許

番号：特許第5067949号

取得年月日：24年8月24日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし