

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011

課題番号：23659533

研究課題名（和文）

ヒト ES 細胞を用いたヒト胎生期造血の解析

研究課題名（英文）

Analysis of human fetal hematopoiesis using human ES cells

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：ヒト胎生期造血を正しく再現するために、ヒト ES 細胞自身からストローマ細胞を分化誘導し、このストローマ細胞との共培養によりヒト ES 細胞を造血/血液細胞へ分化誘導する方法を開発した。ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞は間葉系幹細胞であることが確認され、分化誘導された造血/血液細胞は成人型造血に由来するものであることが示された。我々が開発した自己ヒト ES 細胞由来間葉系幹細胞との共培養によるヒト ES 細胞から造血/血液細胞への分化誘導法は、ヒト胎生期造血の解析に有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We established a coculture system of human ES cells with autologous stromal cells derived from human ES cells to induce their differentiation into hematopoietic/blood cells, truly reflecting human fetal hematopoiesis. The human ES cell-derived stromal cells revealed a homologous phenotype of mesenchymal stem cells (MSCs), and hematopoietic/blood cells developed in the coculture with these human ES cell-derived MSCs were shown to originate from adult-type hematopoiesis. The present culture system using autologous human ES cell-derived MSCs can be useful for the analysis of human fetal hematopoiesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：ヒト ES 細胞、ヒト胎生期造血、間葉系幹細胞、造血前駆細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト胎生期における造血機構の発達の研究は、正常胎児の発達の理解ばかりでなく、母体環境の胎児造血に及ぼす影響の解明、先天性の造血障害や造血器腫瘍の病因解明のためにも、極めて重要な課題であるにもかかわらず、ヒト胎児を用いた研究が倫理的に困難であることから、国内外を問わず、その研究は現在まで全く進んでいない。そのため、我々は、ヒトと同じ哺乳類であるマウスをモデルとして研究し（Immunity 1998; Blood 1998, 2001, 2003; Proc Natl Acad Sci USA 1999; Mol Cell Biol 2003; Stem Cell Dev. 2005; Dev Biol 2007）、その成

果からヒト胎生期における造血機構の発達を類推してきた。こうしたマウスを中心とした研究は、哺乳類における胎生期造血に多くの情報をもたらしたが、同時にこれらの研究から、ヘモグロビンの発現パターンや、脾臓造血への依存度など、マウス胎仔とヒト胎児の造血機構の発達では、両者の間に多くの違いがあることも明らかとなった。

(2) 一方、我々は、ヒト胎生期を起源とする臍帯血中の造血幹細胞の分化増殖とその制御機構についても研究してきた（Proc Natl Acad Sci USA 1995; Blood 1997, 1999, 2001; J Exp

Med 2006; Br J Haematol 1997, 2001; J Immunol 1999; J Clin Invest 2000; Stem Cells 2000; Bone Marrow Transplant 2000; Int J Hematol 2001, 2003)。そこで、我々は、マウス胎生期造血の研究成果と、ヒト胎生期由来の臍帯血中の造血幹細胞に関する研究成果を融合することにより、胎生期に由来するヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) から、再生医療のための造血/血液細胞を分化誘導するシステムを確立することが可能ではないかと考え、ヒト ES 細胞の使用計画「ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) から造血細胞への分化誘導法の開発」を東京大学バイオサイエンス委員会ヒト生殖・クローン専門委員会に申請し、平成 14 年 5 月 27 日に同委員会の承認を得た。その後、同年 7 月 8 日に文部科学省特定胚及びヒト ES 細胞研究専門委員会にヒト ES 細胞の使用申請し、同年 12 月 20 日に文部科学大臣の承認を得て、研究を開始した。その結果、我々は、ヒト ES 細胞から造血/血液細胞を分化誘導することに成功した (Proc Natl Acad Sci USA 2008; Int J Hematol 2007)。

そこで、我々は、この分化誘導系を、従来の再生医療のためにではなく、ヒト胚から造血細胞が発生し、血液細胞が産生されるまでの過程を *in vitro* で再現することに応用し、これまでほとんど解っていないヒト胎生期造血を解析することを着想した。

(3)しかし、我々の確立した分化誘導法も含めて、ヒト ES 細胞から造血/血液細胞への分化誘導法の多くはマウス由来ストローマ細胞との共培養法を応用したものが多く、ヒト胎生期造血を正しく反映していないと考えられる。また、ヒト成人骨髄由来ストローマ細胞との共培養法では、ヒト ES 細胞の造血/血液細胞への分化誘導が困難であることから、異種ストローマに依存しないヒト ES 細胞から造血/血液細胞への分化誘導の開発が、ヒト ES 細胞を用いたヒト胎生期造血の解析には強く求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト胎生期造血を正しく反映する、異種ストローマに依存しないヒト ES 細胞) から造血/血液細胞への分化誘導系を開発し、ヒト胚から造血細胞が発生し、血液細胞が産生されるまでの過程を *in vitro* で再現し、その分化過程を細胞生物学的、分子生物学的手法を用いて詳細に解析することにより、ヒト胎児の造血発達の全体像と、これを制御する分子機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)ヒト ES 細胞からストローマ細胞への分化誘導法の開発

### ①ヒト ES 細胞からストローマ細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞を、ゼラチンコートプレートに播種し、5%ヒト platelet lysate または血清を用いて培養する。

### ②ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の解析

1)ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の性状の解析

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の細胞表面マーカーを、フローサイトメトリーで解析する。

2)ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の間葉系幹細胞としての機能解析

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の軟骨、骨、脂肪細胞への分化能を、それぞれ特異的分化誘導培養法により検証する。

### ③動物細胞に非依存的なヒト ES 細胞から造血/血液細胞への分化誘導

1)ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞との共培養によるヒト ES 細胞から造血/血液細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞を放射線照射下後、種々のサイトカインを含む無血清培養液で共培養した。

2)ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞との共培養によりヒト ES 細胞から分化誘導された造血/血液細胞の性状の解析

A.ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞との共培養によりヒト ES 細胞から分化誘導された造血細胞をウシ胎仔血清、あるいはウシヒト血清を用いて血液細胞コロニー培養した。

B.上記培養により形成されたコロニー中のグロビンの発現を免疫細胞染色法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1)ヒト ES 細胞からストローマ細胞への分化誘導

### ①ヒト ES 細胞からストローマ細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞をゼラチンコートプレートに播種し、5%ヒト platelet lysate、または血清を含む培養液で継代培養すると、6~8 週間後には紡錘形のストローマ細胞に分化誘導された。

### ②ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の解析

1)ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の性状の解析

フローサイトメトリーによる解析の結果、ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞は、CD105、CD166 陽性、CD45、CD34、CD14 陰性で、間葉系幹細胞のフェノタイプを示した。

2)ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞の間葉系幹細胞としての機能解析

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞を軟骨、骨、脂肪細胞特異的分化誘導培養法により分化誘導すると、軟骨、骨、脂肪細胞のいずれにも分化誘導されたことより、間葉系幹細胞であることが確認された。

③動物細胞に非依存的なヒト ES 細胞から造血細胞への分化誘導

1)ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞との共培養によるヒト ES 細胞から造血/血液細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞由来ストローマ細胞を放射線照射後、種々のサイトカインを含む無血清培養液で共培養すると、培養 10~14 日目にはヒト ES 細胞コロニー中に敷石状細胞群が観察され、その後小型円形細胞の増殖が認められた。それらを血液細胞コロニー培養すると、様々な血液細胞コロニーが形成された。それらの血液細胞コロニーには、骨髓球系細胞コロニー、赤血球系細胞コロニーばかりでなく、骨髓球系細胞及び赤血球系細胞の両者を含む混合コロニーも含まれていた。以上の結果は、ヒト ES 細胞から動物細胞に非依存的に多能性造血細胞を含む種々の造血細胞が分化誘導されたことを示している。

2)ヒト ES 細胞から動物細胞に非依存的に分化誘導された赤血球におけるグロブリンの発現

ヒト ES 細胞から動物細胞に非依存的に分化誘導された造血細胞より形成された血液細胞コロニー中の赤血球におけるグロブリンの発現を免疫細胞染色法を用いて解析すると、約 80%の赤血球が  $\alpha$ 、 $\beta$  グロブリンを発現しており、これらの赤血球は成人型ヘモグロビンを合成していると考えられ、分化誘導された造血/血液細胞は二次造血を起源としていることをしめしている。

(まとめ)

ヒト ES 細胞由来間葉系幹細胞との共培養により、ヒト ES 細胞から二次造血由来の造血/血液細胞を分化誘導する方法を開発した。この異種細胞に依存しないヒト ES 細胞から造血/血液細胞への分化誘導法は、ヒト胎生期造血の解析に有用と考えられた。

## 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 10 件)

- ① Singh VK, Satija NK, Tripathi RP, et al. (5 名 4 番目) The antigen CD34: A molecule displaying an implication in regenerative signal in hematopoietic stem cell. 査読有 STEM CELLS Trans. Med. 2012 in press.

- ② Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, et al. (11 名 11 番目) Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent and young adult patients with hematologic malignancies: A single institute analysis. Leuk Res. 査読有 36:128-131, 2012  
DOI: [10.1016/j.leukres.2011.09.016](https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.09.016)

- ③ Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., et al. (20 名 8 番目) In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. Blood 査読有 119:e45-56, 2012  
DOI: [10.1182/blood-2011-09-381400](https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-381400)

- ④ Tsuda M., Ebihara Y., Mochizuki S., et al. (6 名 6 番目) Reduced dose chemotherapy for acute promyelocytic leukemia with adult Down syndrome. Br. J. Haematol. 査読有 115:130-132, 2011  
DOI: [10.1128/CVI.00428-10](https://doi.org/10.1128/CVI.00428-10)

- ⑤ Iwatsuki-Horimoto, K., Horioto T., Tamura D., et al. (21 名 19 番目) Sero-prevalence of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus among schoolchildren and their parents in Tokyo, Japan. Clin. Vaccine Immunol. 査読有 18:860-866, 2011  
DOI: [10.1128/CVI.00428-10](https://doi.org/10.1128/CVI.00428-10)

- ⑥ Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., et al. (32 名 16 番目) Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. Nature 査読有 478:64-69, 2011  
DOI: [10.1038/nature10496](https://doi.org/10.1038/nature10496)

- ⑦ Yokoi, T., Kobayashi, H., Shimada, Y., et al. (10 名 7 番目) Minimum requirement of donor cells to reduce the glycolipid storage following bone marrow transplantation in a murine model of Fabry disease. J Gene Med 査読有 13:262-268, 2011  
DOI: [10.1002/jgm.1566](https://doi.org/10.1002/jgm.1566)

- ⑧ Maeyama, Y., Otsu, M., Kubo, S., (9 名 2 番目) Intracellular estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 exerts in vivo tumor-promoting effects via its coiled-coil region. Int J Oncol 査読有 39:41-49, 2011  
DOI: [10.3892/ijo.2011.1026](https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1026)

- ⑨ Kunishima, S., Kashiwagi, H., Otsu, M., et al. (12 名 3 番目) Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing

constitutive activation of the alphaIIb beta3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. Blood 査読有 117:5479-5484, 2011  
DOI: 10.1182/blood-2010-12-323691

- ⑩ Kawahara, M., Chen, J., Sogo, T., et al. (9名 5番目) Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using an antibody/c-Mpl chimera. Cytokine 査読有 55:402-408, 2011  
DOI: 10.1016/j.cyto.2011.05.024

[学会発表] (計12件)

- ① 辻浩一郎: 誰でもわかる造血幹細胞の基礎知識 第34回日本造血細胞移植学会 2012年2月24-25日 大阪: 大阪国際会議場
- ② 望月慎史 他: 3回の同種臍帯血移植後の再発 ALL に対し非寛解期での T 細胞非除去 HLA 半合致移植を施行した一例 第34回日本造血細胞移植学会 2012年2月24-25日 大阪: 大阪国際会議場
- ③ 前浩史 他: 成人臍帯血移植患者におけるポリコナゾールとシクロスポリン併用療法の安全性評価 第34回日本造血細胞移植学会 第34回日本造血細胞移植学会 2012年2月24-25日 大阪: 大阪国際会議場
- ④ 前浩史 他: 成人臍帯血移植患者におけるアンホテリシン B リポゾーム製剤投与の有効性と安全性の評価. 第34回日本造血細胞移植学会 2012年2月24-25日 大阪: 大阪国際会議場
- ⑤ Hiramoto T., et al.: Suppressed neutrophil development in hematopoiesis of induced pluripotent stem cells derived from a severe congenital neutropenia patient with ELA2 mutation. 53<sup>rd</sup> ASH Annual Meeting December 10-13, 2011 San Diego, USA
- ⑥ Takahashi S., et al.: Matched HLA Haplotype Contributes to Reduce Severe Acute GVHD with Conserving GVL Effect in HLA-Mismatched Cord Blood Transplantation. 53<sup>rd</sup> ASH Annual Meeting December 10-13, 2011 San Diego, USA
- ⑦ 望月慎史 他: Analysis of impaired hematopoiesis in Down syndrome using patient iPSCs. 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14-16日 名古屋: 名古屋国際会議場
- ⑧ 河北敏郎 他: GVL effect "closely related with moderate aGVHD on CBT. 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14-16

日 名古屋: 名古屋国際会議場

- ⑨ 望月慎史 他: 患者由来 iPSC 細胞を用いたダウン症候群における造血障害の解析 第114回日本小児科学会学術集会 2011年8月12-14日 東京: 高輪プリンスホテル
- ⑩ 海老原康博: 動物細胞・動物血清を用いないヒト iPSC 細胞から血液細胞への分化誘導 第21回日本サイトメトリー学会 2011年6月25日 京都: 京都国際交流会館
- ⑪ Ebihara Y., et al.: Induction of hematopoiesis from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) in coculture with autologous hiPSC-derived mesenchymal stem cells under animal serum-free conditions. 9<sup>th</sup> ISSCR Annual Meeting June 15-18, 2011 Toronto, Canada
- ⑫ 平本貴史 他: 重症先天性好中球減少症患者由来の iPSC 細胞の樹立とその解析 第32回日本炎症・再生医学会 2011年6月2-3日 京都: 京都国際会館

[図書] (計4件)

- ① 辻浩一郎 医学書院 今日の小児治療指針(第15版) 2012, p527-529
- ② Ma, F., et al. Transworld Research Network, Kerala Stem Cells in Medicine 2011, p51-70
- ③ Ma, F., et al. Intech, Vienna Embryonic Stem Cells 2011, p239-250
- ④ Ma, F., et al. Springer Science, New York Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells 2011, p266-335

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

- ①名称: 多能性幹細胞からの好酸球の製造方法  
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/番号: PCT/JP2011/077955  
出願年月日: 2011年12月2日  
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/番号: PCT/JP2011/072609  
出願年月日: 2011年9月30日  
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

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

### (2) 研究分担者

大津 真 (OTSU MAKOTO)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：30361330