

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790263

研究課題名（和文） 赤血球分化・脱核および赤血球前駆細胞株化機構の解明

研究課題名（英文） Analysis into terminal erythroid differentiation and trial for establishing human erythroid progenitor cell lines.

研究代表者

寛山 隆 (HIROYAMA TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・細胞材料開発室・専任研究員

研究者番号：50373361

研究成果の概要（和文）：

本研究ではマウス赤血球前駆細胞株を用いて網羅的遺伝子、タンパク質発現解析を行い、赤血球最終分化に関与すると思われる複数の遺伝子を同定した。またヒトES、iPS細胞から効率良く血液細胞を誘導し、特に赤血球系細胞を選択的に培養できる培養系を確立した。さらには、ウイルス由来癌遺伝子を誘導発現系により導入することでヒトiPSおよびヒト臍帯血幹細胞から脱核赤血球を産生し得る赤血球前駆細胞株を樹立した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, some genes that seem to be regulators for erythroid terminal differentiation were identified. Culture method that can produce hematopoietic cells, especially erythroid cells, was also developed. In addition to those, human erythroid progenitor cell lines were established by introducing virus oncogenes by inducible expression vector. These cell lines can produce enucleated erythrocyte.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：ES、iPS、臍帯血、赤血球前駆細胞株

1. 研究開始当初の背景

ヒトES、iPS細胞を用いた再生医療が期待されている。しかしながら、ES、iPS細胞から誘導した細胞・臓器を用いた再生医療への応用には解決しなければならない様々な問題点がある。中でもES、iPS細胞による腫瘍形成の問題は回避することが難しい問題の1つである。しかし、赤血球は

核を持たない細胞であるため腫瘍形成の心配がないと考えられる。一方、iPS細胞が作製可能になったことでES細胞を移植するにあたり大きな障壁であった組織適合性の問題はクリアされた。しかしながらヒトES細胞に関する報告 (Osafune et.al. *Nature Biotechnol.* 2008) によれば、ヒトES細胞株間で分化傾向にかなりの差が見られるという。したがって、患者個人のiPS細胞から

目的の細胞・臓器を誘導・作製するためには患者個人ごとにiPS細胞株を複数株作製し、その中から目的に見合うiPS細胞株を選び出さなくてはならなくなる可能性が高い。一方、赤血球輸血においては臨床的に大きな問題となるのはABO, Rh式血液型であり、RH (-) O型の赤血球を作製することによりほぼ全ての人に対して輸血可能である。したがってヒトES、iPS細胞を用いて赤血球を大量生産する技術が確立できれば、臨床応用への可能性が非常に高まり、慢性的な輸血用血液の不足の解消、輸血による重大な感染症の防止につながることを期待される。

世界的にES、iPS細胞から血液細胞を誘導する研究は多数行われており、ヒトES細胞から赤血球を分化誘導する方法なども多数報告されている。しかしながら、成熟(脱核)赤血球を短期間で効率よく大量に生産する方法は未だ確立されていない。これまでに我々はマウスES細胞から血液細胞を誘導し、長期に培養を行うことで、脱核赤血球を産生しうる赤血球前駆細胞株(MEDEP)樹立に成功している。(Hiroyama et.al. *PLoS ONE* 2008)。MEDEPはサイトカイン依存的に増殖し、エリスロポエチンを加えることにより3日間程度で脱核赤血球にまで分化し得る細胞であることが判明している。また、これまでに6株のMEDEPを樹立しているが、それぞれの株で分化能に差があることも明らかとなっている。そこで1) MEDEP株間の分化能の差に着目して、赤血球分化・脱核の分子機構解明する、2) MEDEPの赤血球前駆細胞株化の仕組みを明らかにする、3) 脱核赤血球産生可能なヒト赤血球前駆細胞株を樹立することでES、iPS細胞から直接赤血球を誘導するよりも短期間に効率良く、生産コストを抑えた赤血球大量生産系の開発につながるのではないかと考え、本研究課題に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究はマウスES細胞から樹立した分化能の異なる複数のマウス赤血球前駆細胞株(機能的脱核赤血球を産生する株を含む)を用いて、赤血球分化・脱核に重要な遺伝子を探索・機能解析し、赤血球分化の分子機構の詳細を明らかにするとともに、赤血球前駆細胞の株化に関係する遺伝子の探索を行う。またヒトES、iPS細胞から効率良く血液細胞を分化誘導できる培養系を確立し、ヒト赤血球前駆細胞を樹立の樹立を試みる。これにより輸血可能なヒト赤血球の大量生産培養系の開発を目指すことが目的である。

3. 研究の方法

(1) MEDEP株間の赤血球分化における遺伝子、タンパク発現変化の解析

MEDEPは増殖している状態ではCD71⁺TER119⁻であるが、分化誘導することにより生体赤血球前駆細胞の分化同様にCD71⁺TER119⁺に分化する。しかし、MEDEP株間で分化能に差があることが明らかとなっている。そこでこれらを利用して、分化前、分化後の遺伝子発現の変化を2色法により解析する。またヒト臍帯血幹細胞から赤血球分化培養を行い、6、10、16日目における遺伝子の発現変化を解析し、各MEDEP株で得られた結果と比較する。株間およびヒト臍帯血の解析結果から発現量の変化に差のある遺伝子を候補遺伝子として抽出する。分化前・後という単純な2点比較だけでは絞り込みがうまくできない可能性もあるので、分化後1-3日など経時的な発現変化も解析するなどの工夫をする。それでも候補遺伝子が多数である場合は特定の機能遺伝子群(細胞表面抗原、転写因子、シグナル伝達分子等)に注目し、候補遺伝子を絞り込む。また同様に網羅的タンパク質発現解析についても行う。

(2) MEDEPおよびヒト赤血球前駆細胞における遺伝子発現の比較

セルソーターで選別回収したCD71⁺TER119⁻マウス赤血球前駆細胞や血液系細胞株などを用いて分化前の各MEDEP株との遺伝子発現の差を解析する。これらを相互に比較し、細胞株で特異的に発現している遺伝子やMEDEPで特異的に発現している遺伝子などを候補遺伝子として絞り込む。この場合も候補遺伝子が多数である場合、特定の機能遺伝子群(転写因子、シグナル伝達分子等)に注目し候補遺伝子を絞り込みを行う。

(3) 赤血球分化関連候補遺伝子の機能解析

遺伝子発現解析のから得られた候補遺伝子をウイルスベクターに組み込み、MEDEPに導入して分化誘導への影響を解析する。発現抑制が必要であると考えられる場合にはsiRNAを導入し同様に解析する。赤血球分化の解析は、CD71、TER119の発現、生体核染色による脱核の有無、ヘモグロビン合成などを解析し評価する。

(4) ヒトES、iPS細胞を用いた効率的

な赤血球分化誘導法の開発

ES細胞は株によって分化の指向性が異なることが報告されているため、ES、iPS細胞の血液分化指向性を向上させるような維持培養法やヒト赤血球前駆細胞株樹立に向けた高効率な赤血球分化誘導法の開発を様々なサイトカインや低分子化合物（阻害剤など）を組み合わせて行う。ES、iPS細胞の維持培養法は血液細胞分化により評価する。血液細胞分化の評価は産生細胞数、コロニーアッセイ、FACS解析などにより行う。

(5) ヒトES細胞株を用いたヒト赤血球系前駆細胞株の樹立

ヒトES、iPS細胞株を用い、赤血球前駆細胞を誘導し、細胞株樹立に関連すると考えられる遺伝子を導入し、長期培養することでヒト赤血球前駆細胞株の樹立を試みる。また臍帯血幹細胞からも赤血球前駆細胞を誘導し、同様に赤血球前駆細胞株の樹立を試みる。細胞株が得られない場合には、細胞不死化に関連する遺伝子（癌遺伝子など）を合わせて導入するなどの工夫をする。状況によりテトラサイクリンなどによる遺伝子発現制御系の利用も視野にいれて実施する。

4. 研究成果

(1) 赤血球分化に関与する遺伝子の探索

赤血球分化における遺伝子発現の変化をMEDEPおよびヒト臍帯血幹細胞からの赤血球分化培養系を用いて解析した。MEDEPの中でMEDEP-BRC5は脱核の効率が大きく、MEDEP-BRC4-1はその効率が低いことから、この二つの細胞株を用い、分化前、分化誘導後1、2日目の遺伝子発現変化を解析した。その結果、MEDEP-BRC5で高い発現上昇が見られ、MEDEP-BRC4-1での発現上昇が比較的弱い遺伝子群を見いだした。また、ヒト臍帯血幹細胞から赤血球分化培養を行い、6、10、16日目における遺伝子の発現変化を解析したところMEDEP-BRC5において高い発現が見られた遺伝子群の多くがヒト臍帯血幹細胞を用いた赤血球分化誘導においても同様に上昇していることも見いだした。

これに加え、MEDEP-BRC5を用いて網羅的タンパク質発現解析も行った。分化前と分化誘導後3日目におけるタンパク質発現を比較し、分化後、有意に発現の上昇が確認できたタンパク質のうち、これまでに赤血球分化における機能があまり報告され

ていない分子を13種類同定した。さらにその中の5種類に関しては遺伝子発現解析で得られた結果と一致していた。この5種類の遺伝子に関し、MEDEP-BRC5とMEDEP-BRC4-1での遺伝子発現変化を定量的PCRにより解析したところ、3種類においてMEDEP-BRC4-1での発現上昇が弱いことが判明した。

この3種類の遺伝子の中でABCG2 (BCRP1) 遺伝子の発現をMEDEP-BRC5を用いてsiRNAにより発現抑制をしたところ、脱核効率がコントロールの20%程度まで阻害されることが明らかとなった。このことからABCG2 (BCRP1) 遺伝子は赤血球分化、特に最終分化の過程において重要な役割を果たしていることが示唆された。ABCG2をMEDEP-BRC4-1に過剰発現させ、赤血球分化、特に脱核の効率が向上するかについては今後行う予定であり、他の2種類の遺伝子についても同様の解析を進めている。

(2) 赤血球前駆細胞の株化に関与する遺伝子の探索

生体内赤血球前駆細胞、血液系細胞株とMEDEP-BRC5における遺伝子発現解析を行ったところ、生体内赤血球前駆細胞での発現が弱く、血液系細胞株とMEDEP-BRC5において高い発現が見られる遺伝子群を見いだした。しかし発現に差の見られる遺伝子数が多すぎることから候補遺伝子選定のための絞り込みが必要であると判断した。このため細胞周期関連遺伝子に注目し、候補遺伝子を決定した。しかしながら、これらを生体内赤血球前駆細胞またはヒトES、iPS由来赤血球前駆細胞に過剰発現させても赤血球前駆細胞株の樹立までには至らなかった。

(3) ヒトES、iPS細胞を用いた効率的な赤血球分化誘導法の開発

これまでにヒトES、iPS細胞からの血液分化誘導に使用していたサイトカイン類に加えてデルタライク1 (DLK1)、アンジオポエチン様5 (Angptl5) を加えることで血液細胞をより多く誘導できることが判明した。さらにTGFβ受容体阻害剤を分化段階の初期の特定の期間に作用させることで、最大で25倍程度まで誘導効率を上げることが可能となった。また、誘導された血液細胞にRoc阻害剤を加えて培養を続けることにより、赤血球系細胞を選択的に増殖させることにも成功した。これらの方法により6ヶ月以上、赤血球系細胞の培養を維持することが可能となった。しかしながら、

現在までのところ、この培養法を用いてもヒト赤血球前駆細胞株の樹立までには至っていない。

(4) ヒト赤血球前駆細胞株の樹立

遺伝子発現解析の結果による遺伝子過剰発現や効率的な分化誘導法を用いた長期培養でもヒト赤血球前駆細胞株を樹立するとはできなかったが、これまでの文献を参照して、ヒトiPS細胞およびヒト臍帯血幹細胞にヒトパピローマウイルス由来の癌遺伝子であるE6/7を誘導発現系により導入した。これによりヒトiPS細胞およびヒト臍帯血幹細胞からサイトカインに依存性のある赤血球前駆細胞株を樹立することに成功した。これらの細胞はステムセルファクター(SCF)またはエリスロポエチン(EPO)存在下で、E6/7を発現している状態では増殖するが、E6/7の発現を抑制することによりMEDEPと同様に脱核赤血球に分化可能であることが判明した。しかし現在までのところ、樹立したヒトiPS細胞由来赤血球前駆細胞(HIDEP)およびヒト臍帯血幹細胞由来赤血球前駆細胞(HUDEP)は全ての株において分化誘導により細胞の生存率が著しく下がってしまい、MEDEP-BRC5ほどの脱核効率を示す株ではなかった。したがって今後、さらに多くの株を樹立するとともに分化誘導法の改良が必要であることが示唆された。

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2件)

① Kurita R, Suda N, Sudo K, Miharada K, Hiroyama T, Miyoshi H, Tani K, Nakamura Y. Establishment of immortalized human erythroid progenitor cell lines able to produce enucleated red blood cells. *PLoS One*. 8(3):e59890 (2013)*

② Hiroyama T, Miharada K, Kurita R, Nakamura Y. Plasticity of Cells and Ex Vivo Production of Red Blood Cells. *Stem Cells Int*. 2011:195780 (2011)*

*査読制度有

[学会発表] (計1件)

① Hiroyama T, Okada N, Kurita R, Nakamura Y. A useful method able to

identify the genes required for terminal erythroid differentiation. *41st Annual Scientific Meeting of the ISEH*. Aug 23~26, 2012. Amsterdam.

[図書] (計1件)

①中村幸夫、西條薫、寛山隆、他。目的別で選べる細胞培養プロトコール。羊土社、66-70, 166-175. 2012年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寛山 隆 (HIROYAMA TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・細胞材料開発室・専任研究員

研究者番号：50373361

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし