

## 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 5 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 年度～2012 年度

課題番号：23890199

研究課題名（和文）

ヒツジ胎子微小環境下におけるヒト iPS 細胞の造血系分化誘導に関する研究

研究課題名（英文）

Development of in vivo hematopoietic differentiation system for human iPS cells

研究代表者

阿部 朋行 (ABE TOMOYUKI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20610364

## 研究成果の概要（和文）：

人工多能性幹(iPS)細胞から、in vitro で造血幹細胞を分化誘導することは未だ出来ていない。申請者らは、初期分化サル胚性幹(ES)細胞をヒツジ胎子肝臓内に移植することで、骨髄内に約 1%の割合でサル造血をもつヒツジを作出した。つまり、ヒツジ胎子体内環境下 (in vivo) で ES 細胞から造血幹細胞を誘導できたのである。しかしながら、ヒツジ末梢血中にサル血液細胞はほとんど出現しなかった(0.01%以下)。これに対し申請者は、末梢血中への ES/iPS 細胞由来細胞の安定した出現を目指し、骨髄中の生着率を 10%まで向上させることを試みている。骨髄移植の前処置剤として用いられるブスルファンに着目し、ヒツジ胎子造血を一時的かつ安全に抑制する技術を開発した。この技術を元にして、ヒツジ胎子へのヒト造血幹細胞を移植する 6 日前に母体経由で投与することで、安全かつ効果的に産子の骨髄キメラ率を向上しうることを示した。以上の成果から、ヒツジ体内でヒト iPS 細胞から効率的に造血幹細胞を作り出す技術を開発する足がかりが出来た。また、ヒツジのような大型動物の胎子を用いた試験は前臨床的な位置づけを担っており、今回の成果がヒト iPS 細胞の実用化に大きく貢献できると言える。

## 研究成果の概要（英文）：

We have shown the safety and effectiveness of treatment with busulfan in sheep and have suggested a conditioning regimen with busulfan for sheep in utero transplantation involving intravenous administration of 3 mg/kg busulfan to pregnant ewes 6 days before transplantation. The ease of the procedures and the lack of adverse effects and need for cumbersome administrative oversight of the procedures might make it a desirable conditioning method for sheep in utero transplantation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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、幹細胞、トランスレーショナルリサーチ、移植・再生医療、応用動物

## 1. 研究開始当初の背景

ES/iPS 細胞は、身体を構成する全ての細胞に分化することができる。これまでに神経幹細胞や網膜組織などへの分化誘導法が報告されており、臨床への応用が期待されている。しかしながら、白血病や再生不良性貧血などの血液疾患への細胞移植治療を目的とした、造血幹細胞への分化誘導について *in vitro* では未だ再現できていない。

2005 年に申請者らのグループは、サル ES 細胞を体外で初期分化させた後、次にヒツジ胎子の肝臓（胎子期の造血器官）に移植する方法で、約 2 年にわたって骨髄内に約 1% の割合でサル造血をもったキメラヒツジを作成した (*Transplantation* 2005)。これに続き、ヒト ES 細胞を樹立したアメリカの Thomson らは、同様の方法でヒト ES 細胞に由来する造血をもつキメラヒツジを作成した (*Blood* 2006)。さらに申請者らは、

- A) 妊娠 50 日齢未満のヒツジ胎子は、制御性 T 細胞によってサル ES 細胞の生着を支持すること (*Stem Cells Dev.* 2008)、
- B) 超音波ガイド下での細胞注入法が、移植手術後の流産率を低く抑えることに有効であること (*Cloning Stem Cells.* 2009)、
- C) 移植ルート（胎子腹腔内と胎子血管内）により生着率に相違がないこと (*Transplantation* 2010)、
- D) ヒト造血幹細胞への *HoxB4* 遺伝子の一過性発現により、生着率を約 5 倍に増幅できること (*Exp. Hematol.* 2011)

を明らかにしてきた。しかしながら、骨髄中におけるヒツジ造血細胞に対するヒトあるいはサル造血細胞の割合は約 1-8% と低く、ま

たキメラヒツジ末梢血中に移植細胞に由来する血液細胞はほとんど出現していない (0.01% 以下)。

上記の報告からヒツジ胎子体内微小環境は、

- 分化に必要な条件が揃っており、ES/iPS 細胞を目的とする組織幹細胞へ分化誘導できる
- 妊娠早期の胎子は免疫システムが未熟であり、異種である移植細胞に対して免疫拒絶が誘導されない

ことを示唆している。一方で、移植細胞の分化・増殖がヒツジ自身の造血に対して競合し、その結果、生着率が低迷してしまっていると考えられる。

ブスルファン (BU) は、開裂直後の DNA を架橋して細胞の増殖を止める、DNA アルキル化型の抗ガン剤である。白血病や再生不良性貧血の治療のための造血幹細胞（骨髄や臍帯血）移植を行なう際に、移植前処置として BU を投与する。BU の増殖抑制作用により、一時的に造血抑制状態が誘導され、ドナー由来細胞に有利な環境が創出された結果、移植細胞の生着率を向上させることができる。

この前処置ストラテジーをヒツジ胎子に応用すれば、ヒト iPS 細胞の生着に有利な環境を作り出せると考えられる。そこで本研究では、BU 前処置を施したヒツジ胎子に対してヒト造血幹細胞ならびに iPS 細胞由来中胚葉系細胞の移植を行ない、胎子体内での造血系分化誘導を試みる。

## 2. 研究の目的

ヒツジ胎子体内微小環境を利用したヒト iPS 細胞の分化誘導において、細胞移植時の BU 前投与が生後の骨髄キメラ率を向上しう

るか否か検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1)BU の至適投与条件の検討

BU を胎子に直接投与するのは困難なため、母体経路で投与することとした。妊娠 48-52 日齢のヒツジ胎子に対し、母体重量換算で 3 および 7.5 mg/kg の BU を母体静脈内から投与した。投与 9-14 日後にヒツジ胎子を摘出し、胎子の肝臓における造血能をコロニーアッセイ法によって評価した。また母体ヒツジの末梢血中の血球数を評価した。

#### (2)BU の至適投与タイミングの検討

妊娠 42 日齢のヒツジ胎子に対して母体重量換算で 3 mg/kg の BU を母体静脈内投与し、造血幹細胞としてヒト臍帯血 CD34 陽性分画細胞を BU 投与から 2 および 6 日後にヒツジ胎子肝臓内に注入した。産子の骨髄キメラ率は、ヒト特異的な PCR 法により評価した。

### 4. 研究成果

臨床において骨髄移植の前処置剤として用いられているブスルファンをヒツジ母体静脈から 3mg/kg (母体重量換算) 投与することで、ヒツジ胎子造血を一時的かつ安全に抑制できることを明らかにした (図)。

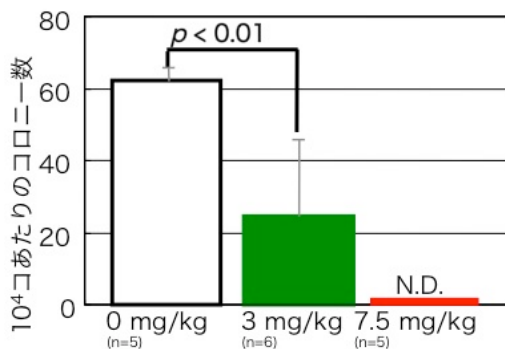


図. コロニーアッセイによるヒツジ胎子肝臓細胞の造血能の評価

次に、この至適投与条件を元にして、ヒツジ胎子へのヒト造血幹細胞 (CD34 陽性分画細胞) を移植する 6 日前に母体経路で投与した結果、安全かつ効果的に産子の骨髄キメラ率を有意に向上することを示した (表)。

表. BU 前処置後のヒト造血幹細胞移植における骨髄キメラ率

群	BU前処置から移植までの間隔	移植細胞	例数	骨髄キメラ率 (%)
対照群	-	CD34+ 細胞	6	0.0 ± 0.0
BU	2 days	CD34+ 細胞	4	0.6 ± 1.1
	6 days	CD34+ 細胞	4	1.9 ± 1.1 *

\* 対照群に比べて有意差あり ( $p < 0.01$ )

### 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 4 件)

1. Fujishiro SH, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Arai Y, Matsunari H, Ishino R, Nishimura T, Watanabe M, Abe T, Furukawa Y, Umeyama K, Yamanaka S, Ema M, Nagashima H, Hanazono Y. Generation of Naive-like Porcine Induced Pluripotent Stem Cells Capable of Contributing to Embryonic and Fetal Development. *Stem Cells Dev.* 2013;22 (3) :473-482. doi: 10.1089/scd.2012.0173. 査読有り
2. Abe T, Masuda S, Tanaka Y, Nitta S, Kitano Y, Hayashi S, Hanazono Y, Nagao Y. Maternal administration of busulfan before in utero transplantation of human hematopoietic stem cells enhances engraftments in sheep. *Exp Hematol.* 2012;40 (6) :436-444. doi: 10.1016/j.exphem.2012.01.018. 査読有り

3. Masuda S, Hayashi S, Ageyama N, Shibata H, Abe T, Nagao Y, Hanazono Y. Correspondence: Migration of cells from the yolk sac to hematopoietic tissues after in utero transplantation of early and mid gestation canine fetuses. *Transplantation*. 2011;92:e5-6. doi: 10.1097/TP.0b013e318222119f. 査読有り
  4. Abe T, Masuda S, Ban H, Hayashi S, Ueda Y, Inoue M, Hasegawa M, Nagao Y, Hanazono Y. Ex vivo expansion of human HSCs with Sendai virus vector expressing HoxB4 assessed by sheep in utero transplantation. *Exp Hematol*. 2011;39(1):47-54. doi: 10.1016/j.exphem.2010.09.007. 査読有り
- [学会発表] (計 14 件)
1. Shuh-hei Fujishiro, Kazuaki Nakano, Yoshihisa Mizukami, Takuya Azami, Yoshikazu Arai, Hitomi Matsunari, Takashi Nishimura, Masahito Watanabe, Tomoyuki Abe, Kazuhiro Umeyama, Shinya Yamanaka, Masatsugu Ema, Hiroshi Nagashima, and Yutaka Hanazono, Generation of Naive-like Porcine Induced Pluripotent Stem Cells Capable of Contributing to Embryonic and Fetal Development. MBSJ The 35th Annual Meeting, Fukuoka, December 11-14, 2012.
  2. 水上喜久, 阿部朋行, 藤城修平, 柴田宏昭, 菱川修司, 小林英司, 花園豊: ブタを用いた iPS 細胞の免疫原性に関する検証. 第 15 回日本異種移植研究会, 京都, 2012 年 12 月 8 日.
  3. 新田卓, 阿部朋行, 田中裕次郎, 佐々木京子, 増田茂夫, ボラジギン・サラントラガ, 林聡, 北野良博, 花園豊, 長尾慶和: ヒツジ胎子内におけるサル ES 細胞の生着、造血系分化およびテラトーマ形成に及ぼす要因, 第 105 回日本繁殖生物学会, 筑波, 2012 年 9 月 5-8 日
  4. 阿部朋行, 増田茂夫, 新田卓, 林聡, 長尾慶和, 花園豊 ヒツジにおけるヒト造血細胞の長期生着 第 11 回 自治医科大学シンポジウム, 下野, 2012 年 8 月 31 日
  5. Yutaka Hanazono, Tomoyuki Abe, Suguru Nitta, Shigeo Masuda, Satoshi Hayashi, Yoshikazu Nagao; Long-term Follow-up on the Engraftment of Human HSCs in Sheep after in Utero Transplantation; Society for Hematology and stem cells, 41<sup>st</sup> Annual Scientific Meeting, 23-26 August, 2012, Amsterdam, Netherland
  6. Yoshikazu Nagao, Tomoyuki Abe, Yujiro Tanaka, Kyoko Sasaki, Shigeo Masuda, Suguru Nitta, Borjigin Sarentonglaga, Satoshi Hayashi, Yoshihiro Kitano, Yutaka Hanazono; Possible factors for engraftment of monkey embryonic stem cells after in utero transplantation into sheep fetuses, 17th International Congress on Animal Reproduction, Vancouver, July 29-August 2, 2012
  7. Tomoyuki Abe, Suguru Nitta, Shigeo Masuda, Satoshi Hayashi, Yoshikazu Nagao and Yutaka Hanazono; HoxB4-Transduction of Human HSC Results in Longer-Term Engraftment Compared to Busulfan-Conditioning in

- Sheep after in Utero Transplantation;  
The 18<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan  
Society of Gene Therapy, Kumamoto,  
Japan, June 28-30, 2012.
8. Tomoyuki Abe, Suguru Nitta, Shigeo Masuda, Satoshi Hayashi, Yoshikazu Nagao and Yutaka Hanazono; Long-Term Comparative Study on the Engraftment of Human Hematopoietic Stem Cells in Sheep; The 10<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cells Research, Yokohama, Japan, June 13-16, 2012.
  9. Tomoyuki Abe, Suguru Nitta, Shigeo Masuda, Satoshi Hayashi, Yoshikazu Nagao and Yutaka Hanazono; HoxB4-Transduction of Human HSC Results in Longer-Term Engraftment Compared to Busulfan-Conditioning in Sheep after in Utero Transplantation; 第 10 回 幹細胞シンポジウム, 淡路, 2012 年 5 月 31 日~6 月 2 日
  10. 阿部朋行、新田卓、増田茂夫、林聡、長尾慶和、花園豊 ヒツジにおけるヒト造血細胞長期生着の条件検討 第 59 回 日本実験動物学会総会, 別府, 2012 年 5 月 24-26 日
  11. 阿部朋行、増田茂夫、新田卓、林聡、長尾慶和、花園豊: ヒツジ胎子へのブスルファン前処置によるヒト造血幹細胞移植後の造血キメラ率の向上: 第 14 回 日本異種移植研究会、広島、2011 年 12 月 10 日
  12. 新田卓, 阿部朋行, 増田茂夫, 林聡, 花園豊, 長尾慶和 子宮内移植後のヒツジ体内におけるヒトおよびサル造血の長期生着に及ぼす要因、第 104 回日本繁殖生物学会, 盛岡, 2011 年 9 月 15-17 日
  13. Tomoyuki Abe, Shigeo Masuda, Nitta Suguru, Satoshi Hayashi, Yujiro Tanaka, Hiroshi Ban, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoshikazu Nagao, Yutaka Hanazono: Conditioning With Busulfan Confers Engraftment Potential on Human Hematopoietic Stem Cell Comparable to *HoxB4* Transduction in Sheep *In Utero* Transplantation: The 9<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cells Research, Toronto, Ontario Canada, June 15-18, 2011.
  14. 阿部朋行、増田茂夫、新田卓、林聡、花園豊、長尾慶和: ヒツジ胎子へのブスルファン投与はヒト造血幹細胞移植後の生着率を向上させる: 第 58 回 日本実験動物学会総会、東京、2011 年 5 月 25-27 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿部 朋行 (ABE TOMOYUKI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20610364