

## 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：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24657157

 研究課題名（和文） ES/iPS細胞の試験管内分化による  
 遺伝子操作を介さない造血幹細胞誘導法の開発

 研究課題名（英文） Induction of hematopoietic stem cells from ES/iPS cells  
 without gene manipulation

研究代表者

小川 峰太郎 (OGAWA MINETARO)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：70194454

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞をES細胞から試験管内で分化誘導することは極めて困難であり未だに実現していない。そこで、遺伝子操作を介さない定義付けられた条件下でマウスES細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養システムの確立を試みた。ES細胞から多能性血液前駆細胞を無血清条件下で分化誘導することができた。しかし、この多能性血液前駆細胞を放射線照射マウスに移植したが、Bリンパ球造血を含む骨髄造血再構築能は確認されなかった。

研究成果の概要（英文）：This study aimed at establishing a defined culture condition which allows ES cells to differentiate into long-term reconstituting hematopoietic stem cells without gene manipulation. Multi-potent hematopoietic progenitor cells were able to be induced from ES cells in a serum-free culture in the presence of several growth factors and chemicals. When transplanted into lethally irradiated adult mice, however, these hematopoietic progenitor cells failed to show an ability of long-term reconstitution of bone marrow 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	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 造血幹細胞誘導法の重要性

マウス胚性幹(ES)細胞から試験管内で血液細胞への分化を誘導した Doetschman らの報告(J. Embryol. Exp. Morphol. 1985)から25年以上が経過している。しかし、多能性と自己複製能を持つ正常な造血幹細胞をES細胞から試験管内で誘導することは極めて困難であり未だに実現していない。ES細胞もしくは人工多能性幹(iPS)細胞から造血幹細胞を誘導できれば、造血幹細胞の発生機序を解明する優れた実験ツールとなる。また、骨髄に代わる新たな造血幹細胞の供給源として血液疾患の病態解明や移植医療においても

重要な技術である。

## (2) ES細胞からの造血幹細胞誘導

マウスES細胞から試験管内で造血幹細胞を誘導する試みとして、HoxB4やLhx2などの転写因子を遺伝子導入により強制発現させたES細胞を分化させ、造血幹細胞に類似した細胞を検出した報告がある(Kyba *et al.* Cell 2002, Kitajima *et al.* Blood 2011)。しかし、この方法にはいくつかの問題点がある。まず、導入した遺伝子の作用によりリンパ球系列への分化能が阻害される。次に、遺伝子操作を介するために造血幹細胞の正常な発生過程を反映しない可能性が高い。さら

に、造血幹細胞の誘導効率が低いために、その発生過程を直接観察することができない。これらの問題点を解決するためには、遺伝子の強制発現ではなく、増殖因子や細胞外基質の生理的な作用による自律的な造血幹細胞の発生を誘導する必要がある。本研究は、造血幹細胞の発生機序解明と正常な造血幹細胞の試験管内生成の実現をめざし、遺伝子操作を介さずにマウス ES/iPS 細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養システムの確立を試みた。

## 2. 研究の目的

本研究は、遺伝子操作を介さずに、マウス ES 細胞及び iPS 細胞から多能性と自己複製能を持つ正常な造血幹細胞を分化誘導する培養法を開発することを目標とした。従来の、遺伝子強制発現により外部から細胞の性質を改変する手法と、胚様体(embryoid body)形成および支持細胞との共培養に依存した ES 細胞分化誘導法は、造血幹細胞の発生過程をブラックボックスの中に覆い隠すものであった。これに対して本研究は、増殖因子を用いた無血清培養と前駆細胞の純化を組み合わせた「定義付けられた」培養条件下で造血幹細胞を分化誘導する点に特色がある。従って、この培養システムは造血幹細胞発生の分子メカニズムの解明と造血幹細胞の安全で安定的な試験管内生成に直結するものとして非常に大きな意義がある。

## 3. 研究の方法

### (1) 方法論的背景

ES 細胞から造血幹細胞を誘導するためには、造血幹細胞の発生経路を正しく辿ることと、発生した少数の造血幹細胞を増殖させることが必要である。マウス胎児において造血幹細胞は、血管内皮細胞もしくは CD41<sup>+</sup>前駆細胞から分化すると考えられている。我々はこれまでに、マウス ES 細胞の試験管内分化系を用いて、中胚葉由来の血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞を純化し、それぞれから成体型血液細胞が発生することを示した (Hashimoto et al. Dev. Growth Differ. 2007)。また、マウス胎児由来の血液前駆細胞が thrombopoietin(TPO) と stem cell factor (SCF) を含む無血清培養で効率よく自己複製することを見いだした (Huang et al. Genes Cells 2009)。そこで、ES 細胞もしくは iPS 細胞から血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞を分化誘導し、これを純化して TPO と SCF を含む最小限の条件下で培養することにより、その中で発生する少数の造血幹細胞を未分化のまま自己複製させ、高頻度に造血幹細胞を含む細胞集団を得ることができると予想した。

### (2) 基本的なストラテジー

マウスの個体発生において、造血幹細胞は胎生 10.5 日に背側大動脈の腹側内皮近傍で初めて検出される。しかし、それ以前の胎児においても、造血幹細胞の出現に先んじて種々の血液細胞が発生する。胎生期には造血幹細胞を経ない一過性の血液分化が起きており、従来の ES 細胞からの血液分化はこれを再現しているに過ぎない。ES 細胞から造血幹細胞を分化誘導するためには以下の 3 つの問題を考慮する必要がある。

- ① 造血幹細胞の前駆細胞の純化
- ② 造血幹細胞に分化する能力の形成
- ③ 発生した造血幹細胞の増幅

### (3) 造血幹細胞の前駆細胞

造血幹細胞は、背側大動脈の血管内皮細胞もしくはその近傍に存在する CD41<sup>+</sup>前駆細胞から分化する。造血幹細胞を誘導するためには、これら前駆段階の細胞を純化する必要があるが、従来の研究ではこの点が考慮されてこなかった。本研究では、純化した血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞から造血幹細胞の分化誘導を試みた。ES 細胞は、C57BL/6(Ly5.2) × CBA(Ly5.2)F<sub>1</sub> マウス由来の KTPU8 株を用いた。IV 型コラーゲンもしくは poly D-lysine (PDL) でコートした培養シャーレを用いて、牛胎児血清を含む培養液中で ES 細胞を培養し、中胚葉細胞を分化誘導した。Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) の発現を指標にして、抗 VEGFR2 抗体を利用した autoMACS により中胚葉細胞を濃縮し、後述の諸条件下でさらに培養し、血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞を誘導した。また、一部の実験においては、bone morphogenetic protein 4(BMP4) と VEGF を添加した無血清培養液(SF-03)中で ES 細胞を 6 日間培養し、血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞を直接誘導した。

### (4) 造血幹細胞に分化する能力の形成

血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞は、多能性と自己複製能を持たない血液前駆細胞に分化する能力を最初に備えており、種々の細胞外シグナルの作用により、造血幹細胞に分化する能力を最終的に獲得する。従来の ES 細胞培養法は前者の能力だけを再現していたため造血幹細胞を誘導することが困難であった。本研究では、中胚葉細胞から血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞を誘導する過程で適切なシグナルを与えることにより、造血幹細胞に分化する能力の形成をめざした。

上記(3)で濃縮した中胚葉細胞から血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞を誘導する培養は、IV 型コラーゲンでコートした培養シャーレを用いて、VEGF を添加した無血清培養液(SF-03)中で行うことを基本とした。この培

養中に以下に述べるシグナル分子を加えることによって、造血幹細胞に分化する能力を持つ血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞の誘導を試みた。

#### ①BMP4

背側大動脈の腹側内皮近傍では、さらに腹側の組織から BMP4 が分泌され、このシグナルが造血幹細胞の発生に必要であると報告されている (Wilkinson *et al.* Dev. Cell 2009)。この知見を参考に、中胚葉細胞を VEGF と BMP4 存在下に無血清培養し、血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞を誘導した。

#### ②一酸化窒素

造血幹細胞の発生には血流による shear stress が必要であり、このシグナルは一酸化窒素 (NO) によって媒介されると報告されている (North *et al.* Cell 2009)。そこで、VEGF と BMP4 に加えて NO ドナーである Sodium Nitroprusside を無血清培養に添加し、血流による効果を模倣しながら血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞を誘導した。

#### ③Wnt/ $\beta$ カテニン

造血幹細胞の発生には Wnt シグナルによる一過性の  $\beta$  カテニン活性化が必要であると報告されている (Ruiz-Herguido *et al.* J. Exp. Med. 2012)。本研究では、中胚葉細胞の無血清培養に GSK3  $\beta$  阻害剤である CHIR99021 を添加して  $\beta$  カテニンの活性化を促し、血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞を誘導した。

#### ④カテコールアミン

交感神経系から分泌されるカテコールアミンが、背部大動脈内皮からの造血幹細胞の発生を促すことが示唆されている (Fitch *et al.* Cell Stem Cell 2012)。本研究では、カテコールアミン誘导体であるイソプロテレノールおよびフェニレフリンの存在下に中胚葉細胞を培養し、血管内皮細胞を誘導した。

#### (5)血液前駆細胞の誘導

上記 (4) で分化誘導した血管内皮細胞 (VE-cadherin<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup> CD41<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>) と CD41<sup>+</sup>前駆細胞 (VE-cadherin<sup>-</sup> CD41<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>) を FACS で純化し、TPO と SCF を添加した無血清培養液 (SF-03) 中で 1~3 日間培養し、血液前駆細胞の発生とその増殖を促した。

造血幹細胞を再現性よく検出するためには、誘導された少数の造血幹細胞を増殖させなければならない。 $\beta$  カテニンと Akt の活性化が協調的に造血幹細胞の自己複製を促進することが報告されている (Perry *et al.* Genes Dev. 2011)。本研究で使用した無血清培養液 (SF-03) には insulin が添加されているため、Akt の活性化は予め期待された。そこで、一部の実験では、TPO と SCF に加えて、GSK3  $\beta$  阻害剤 CHIR99021 を添加して  $\beta$  カテニンの活性化を促し、血液前駆細胞の増殖

促進を図った。

骨髓ニッチ中の造血幹細胞は細胞周期の休止期にあり、低酸素分圧の環境に適応している。低酸素分圧下で培養された造血幹細胞は休止期に導入され、骨髓ニッチへの定着と骨髓造血再建能が亢進することが知られている (Suda *et al.* Cell Stem Cell 2011)。ES 細胞から試験管内で分化誘導した血液前駆細胞は低酸素分圧環境を経験していないため、骨髓生着率が低い可能性がある。そこで、一部の培養においては、ES 細胞から誘導・増殖させた血液前駆細胞を低酸素分圧下 (1% O<sub>2</sub>) でさらに 1 日間培養し、休止期に導入した後に移植実験に供することで生着率の向上を図った。

#### (6)長期骨髓造血再建能の確認

造血幹細胞が誘導されたことを証明するためには、放射線照射されたマウスに移植して骨髓造血再建能を示す必要がある。KTPU8 ES 細胞株 (Ly5.2/Ly5.2) から上述の培養ステップを経て誘導した血液前駆細胞の長期骨髓造血再建能を検討するために、10Gy のガンマ線を照射した C57BL/6 (Ly5.1) × CBA (Ly5.2) F<sub>1</sub> マウス成獣に、ホストと同系のマウス骨髓細胞と共に尾静脈注射により移植した。ホストの血液細胞の表現型が Ly5.1(+)/Ly5.2(+ ) であるのに対して、ES 細胞由来の血液細胞の表現型は Ly5.1(-)/Ly5.2(+ ) であるため、フローサイトメトリーを用いて両者を区別することが出来る。1~3 ヶ月後に移植マウスの末梢血のフローサイトメトリー解析を行い、ES 細胞由来の血球が検出されたマウスについて、4 ヶ月目に骨髓・脾臓・胸腺の各血液細胞系列におけるキメラ率を決定した。

研究の過程において、この検出系に関わるひとつの問題が生じた。すなわち、移植マウスの中で、Ly5 遺伝子の片方のアレルを発現しない血球 (主に T リンパ球) を低頻度を持つマウスが一定の割合で出現することが分かった。この異常な血球は、フローサイトメトリー解析で Ly5.1(+)/Ly5.2(-) もしくは Ly5.1(-)/Ly5.2(+ ) の表現型を示す。また、この異常な血球は B リンパ球系列には含まれていなかった。そこで、本研究では偽陽性を避けるために、末梢血において 0.1% 以上の Ly5.1(-)/Ly5.2(+ ) 血球を検出し、同時に B リンパ球系列においても同じ表現型の細胞を検出した場合に、移植が成立したと判定することにした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 当初の計画に基づく研究結果

上記の 3. 研究の方法に従って、KTPU8 ES 細胞から分化誘導した VEGFR2<sup>+</sup>中胚葉細胞を濃縮し、種々の増殖因子や化合物の存在下で

無血清培養を行った。各培養条件において、VE-cadherin<sup>+</sup>血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞をそれぞれ純化することが可能であった。純化した血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞を、TPO と SCF のほか種々の増殖因子や化合物の存在下で無血清培養を行い、血液前駆細胞が得られた。一例として、中胚葉細胞を VEGF と BMP4 の存在下に培養して誘導した血管内皮細胞を、TPO と SCF の存在下に培養することで血液前駆細胞を得た。この血液前駆細胞を IL-7 存在下でストロマ細胞と共培養すると、B リンパ球に分化する能力を持つことが確かめられた。従って、この培養系で誘導される血液前駆細胞は、少なくとも *in vitro* アッセイにおいては B リンパ球分化能を含む多能性を有することが示唆された。

本研究では、各ステップで添加する増殖因子と化合物の組み合わせ、濃度、添加時期等を変化させた独立した実験を合計 62 回実施し、それぞれで得られた血液前駆細胞を合計 168 匹のマウスに移植した。しかし、本研究で定めた基準（末梢血において 0.1%以上の Ly5.1(-)/Ly5.2(+)血球を検出し、同時に B リンパ球系列においても同じ表現型の細胞を検出した場合に、移植が成立したと判定する）を満たすマウスは検出されなかった。特に、ES 細胞に由来する B リンパ球を検出したマウスは一例もなかった。従って、当初の計画に基づく分化誘導法においては、骨髓球系の造血を再構築する血液前駆細胞が誘導される可能性は残るものの、リンパ球造血能を含む多能性造血幹細胞を誘導することはできないと結論された。

## (2)造血幹細胞誘導に向けた改善策の検討

### ①ストロマ細胞との共培養

当初、本研究では「定義付けられた」培養条件下での造血幹細胞誘導を目指したため、血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞の分化誘導には IV 型コラーゲンもしくは PDL でコートした培養シャーレを用いた。一方、ES 細胞を OP9 ストロマ細胞株と共培養することにより、血管内皮細胞と CD41<sup>+</sup>前駆細胞を分化誘導することができる。OP9 との共培養は定義付けられた条件とはいえませんが、血管内皮細胞と血液細胞の発生に必要な因子や微小環境が存在していると考えられる。

KTPU8 ES 細胞を OP9 細胞株と共培養し血管内皮細胞を分化誘導した。純化した血管内皮細胞を TPO と SCF 存在下に無血清培養して得られた血液前駆細胞を上述と同様にマウスに移植し、骨髓造血再構築能を検討した。これまで、4 回の独立した実験を予備的に行い、5 匹のマウスに移植を行った。このうち 1 匹の末梢血において、短期間 (8 週間) ながら、ES 細胞に由来すると考えられる Ly5.1(-)/Ly5.2(+)の表現型を持つ B リンパ球を少数検

出した。0.1%以上の Ly5.1(-)/Ly5.2(+)血球を検出するという基準は満たさなかったが、OP9 ストロマ細胞株との共培養により分化誘導した血管内皮細胞は、造血幹細胞への分化に関して一定の能力を持つことが示唆される。

### ②造血性血管内皮細胞の効率的な誘導

BMP4 や VEGF 等の存在下に無血清培養により誘導された血管内皮細胞は血液細胞系列に分化する能力を持つが、その頻度は低い。これに比べて、OP9 ストロマ細胞との共培養で誘導された血管内皮細胞の血液分化能は比較的高いが、なお 1/200 程度の頻度にとどまる。血液細胞系列への分化能を持つ血管内皮細胞をさらに高頻度で誘導する培養条件を確立することが、造血幹細胞の誘導に必要であると考えられる。そこで、ES 細胞と OP9 細胞との共培養に種々の増殖因子を添加し、誘導された血管内皮細胞の血液分化能を解析した。

これまで、Activin A、bFGF、BMP4、Wnt3A、Shh の効果をそれぞれ検討した。その結果、Activin A もしくは bFGF の存在下に誘導された血管内皮細胞が対照群の血管内皮細胞に比べて著しく高い血液分化能を有することを見いだした。今後、これらの増殖因子の存在下に誘導された血管内皮細胞から分化した血液前駆細胞を放射線照射マウスに移植し、骨髓造血再構築能を示すかどうか検討を進める予定である。

## 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) 坂本比呂志、田村潔美、小川峰太郎、微小環境の血液幹細胞への働きかけ-誕生から骨髓での維持まで、実験医学、査読無、31 巻、650-654、2013

[学会発表] (計 3 件)

(1) 坂本比呂志、Levels of the c-Myb protein indicate repopulating capacity in long-term hematopoietic stem cells、54th ASH Annual Meeting and Exposition、2012. 12. 8、Georgia World Congress Center、Atlanta、GA、米国

(2) 坂本比呂志、Expression and function of c-Myb in hematopoietic stem cells、第 74 回日本血液学会学術集会、2012. 10. 20、国立京都国際会館、京都市

(3) 坂本比呂志、Expression and function of c-Myb in hematopoietic stem cells、第

10 回幹細胞シンポジウム、2012.5.31、淡路  
夢舞台国際会議場、兵庫県淡路市

[その他]

ホームページ

([http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/cell\\_differentiation/](http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/cell_differentiation/))

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 峰太郎 (OGAWA MINETARO)  
熊本大学・発生医学研究所・教授  
研究者番号：70194454

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

坂本 比呂志 (SAKAMOTO HIROSHI)  
熊本大学・発生医学研究所・助教  
研究者番号：00347014