

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659496

研究課題名(和文) ヒトES/iPS細胞由来の造血ストロマ細胞を用いた造血幹細胞の作出

研究課題名(英文) Hematopoietic stem cell potential is propagated by human pluripotent stem cell-derived endothelial stroma

研究代表者

中畑 龍俊 (Nakahata, Tatsutoshi)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：20110744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞の試験管内での維持増幅を支持するVE-Cadherin陽性血管内皮系ストロマ細胞を、ヒトES/iPS細胞から2次元無血清条件で誘導・単離する手法を開発した。ES/iPSC由来造血幹細胞の作出を支持する系の構築には至らなかったものの、臍帯血CD34陽性細胞との共培養により、免疫不全NOGマウスへの連続移植で骨髄再構築を示す造血幹細胞の頻度を、2週間で約2倍に増やす能力を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Elucidating the mechanism of homeostasis in hematopoietic system and developing the culture to expand hematopoietic stem cells are of great interest in medical scientific fields. We developed the method to effectively and robustly induce VE-Cadherin+ endothelial stroma cells from human pluripotent stem cells. Those stromal cells can increase CFU in cord blood CD34+ hematopoietic stem/progenitor fraction by two to three times. Moreover, serial transplantation studies with NOG mice indicated that two-week co-culture can double the Scid-repopulating cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ES細胞 iPS細胞 造血幹細胞 ストロマ細胞 ニッチ

### 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は各血球分化と同時に自己複製によって長期に生存し、生涯に亘り造血細胞を補い続ける。移植可能な造血幹細胞の体外増幅や産生は重要な医学的課題である。

胎仔期 AGM 領域から樹立されたストロマ細胞は *in vitro* で造血幹細胞の「維持」と「作出」能力を併せ持つ事が示唆されている。一方、申請者はヒト ES/iPS 細胞から種々の血液細胞を産生する新たな方法を樹立し、未熟な造血幹前駆細胞に特徴的な cobble stone-like コロニーを試験管内で効率よく作出出来ることを報告した。その系の内部には造血細胞とともに生体の支持細胞様細胞も存在しており、AGM 細胞同様に造血幹細胞の維持および作出能力を有する可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

まず、生体由来造血幹細胞を支持しうるストロマ細胞を ES/iPS 細胞から誘導・単離し、造血幹細胞の良質な体外増幅系の樹立を目指す。次に単離したストロマ細胞を用いてヒト ES/iPS 細胞から骨髓再構築可能な造血幹細胞の誘導を目指す。

### 3. 研究の方法

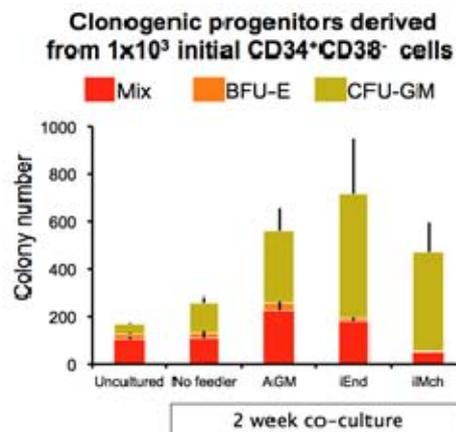
申請者らが開発したマトリゲル上での二次元造血分化系を用いて、ヒト ES/iPS 細胞を分化させ、同時に出現するストロマ細胞を経時的に抽出する。一定期間の培養の後、それらの上で臍帯血 CD34 陽性細胞と 1 週間共培養後、NOG マウスに移植し、造血支持能を持つクローンを選別する。ヒト ES/iPS 細胞から分化誘導した血管内皮前駆細胞、もしくは造血前駆細胞を回収し、2 次元法、3 次元法でこれらストロマ細胞と共培養する。共培養後に細胞を回収し、放射線照射した NOG マウスへの移植を行い、系時的にキメリズムを解析して生着能を評価する。以上の方法によりヒト ES/iPS 細胞からの造血幹細胞作出を支持するストロマ細胞クローンを得る。

### 4. 研究成果

(1) ES/iPS 細胞から無血清条件下での造血分化過程に出現する間質細胞が、造血幹細胞ニッチ機能を有することを示した。

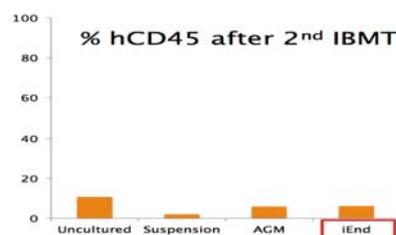
申請者らが開発したマトリゲル上での二次元造血分化系を用いて、ヒト ES/iPS 細胞を中胚葉に分化させ、そこから造血を支持できるストロマ細胞の作出を試みた。ES/iPS 細胞を BMP4+Wnt3a+VEGF を含む DMEM を基本と

した培養液に変換した分化培養系で 1 週間培養後、造血サイトカインに変更し、さらに培養継続していると造血細胞が出現するようになり、造血コロニー周辺に培養皿に軽く附着したストロマ細胞の出現が観察された。顕微鏡下にストロマ細胞を選択して、経時的に分離を試み、ストロマ細胞が多種類得られた。造血幹細胞の増殖を支持するストロマ細胞のスクリーニングのため、ヒト臍帯血から分離した CD34+細胞をストロマ細胞の上に乗せ 1 週間培養した後細胞を回収し、メチルセルロースコロニー法で造血幹/前駆細胞増幅能を測定した。株として樹立することはできなかったものの、短期的にはいくつかのストロマ細胞がヒト臍帯血 CD34+細胞の増殖を支持することが明らかになった。



(2) ES/iPS 細胞由来の血管内皮系ストロマ細胞が、造血幹細胞の維持増幅を支持できることを移植実験によって明らかにした。

上項 (1) のストロマ細胞解析過程で、VE-Cadherin 陽性の血管内皮ストロマが、他の細胞に比較してコロニー形成能を持つ前駆細胞をより効率よく支持することが明らかになった。そこで、磁気ビーズを用いて原法の分化系から VE-Cadherin 陽性細胞を分取し、臍帯血 CD34 陽性細胞と共培養後に免疫不全 NOG マウスへ連続移植して 12-20 週後の骨髓再構築能を判定した。その結果、これらの血管内皮様ストロマ細胞は AGM 細胞と同程度の幹細胞増幅能を有することが明らかになった。



## 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 19 件)

1. Honda Y., Tsuchida M., Zaike Y., Masunaga A., Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic leukemia who developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology (JSPHO). *Brit. J. Haematol.* In press.
2. Daifu T., Kato I., Kozuki K., Umeda K., Hiramatsu H., Watanabe K., Kamiya I., Taki T., Nakahata T., Heike T., Adachi S.: The clinical utility of genetic testing for t(8;16)(p11;p13) in congenital acute myeloid leukemia. *J. Pediatr. Hematol/Onc.* In press.
3. Morishima T., Watanabe K., Niwa A., Hirai H., Saida S., Tanaka T., Kato I., Umeda K., Hiramatsu H., Saito M.K., Matsubara K., Adachi S., Kobayashi M., Nakahata T., Heike T.: Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica.* ; 99(1):19-27. 2014 Jan. doi: 10.3324/haematol.2013.083873.
4. Tomizawa D., Tawa A., Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Kiyokawa N., Isoyama K., Mizutani S., Hara J., Horibe K., Nakahata T., Souichi Adachi S.: Appropriate dose modification in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int. Hematol.* 98(5):578-588, 2013. ;doi: 10.1007/s12185-013-1429-2.
5. Koderu Y., Yamamoto K., Harada M., Morishima Y., Dohy H., Asano S., Ikeda Y., Nakahata T., Imamura M., Kawa K., Kato S., Tanimoto M., Kanda Y., Tanosaki R., Shiobara S., Kim SW., Nagafuji K., Hino M., Miyamura K., Suzuki R., Hamajima N., Fukushima M., Tamakoshi A.; for the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Halter J., Schmitz N., Niederwieser D., Gratwohl A.: PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. *Bone Marrow Transplant.* 2013. doi: 10.1038/bmt.2013.147.
6. Tomizawa D., Tawa A., Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe K., Nakahata T., Adachi S.: Excess reduction of anthracyclines results in inferior event-free survival in core binding factor acute myeloid leukemia in children: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). *Leukemia* doi:10.1038/leu.2013.153.
7. Yanagimachi M.D., Niwa A., Tanaka T., Ozaki F., Nishimoto S., Murata Y., Yasumi T., Ito J., Tomida S., Oshima K., Asaka I., Goto H., Heike T., Nakahata T., Saito M.K.: Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions. *PLoS ONE.* 4/3/ 2013; 8(4): e59243. doi:10.1371/journal.pone.0059243
8. Saida S., Watanabe K.I., Sato-Otsubo A., Terui K., Yoshida K., Okuno Y., Toki T., Wang R., Shiraishi Y., Miyano S., Kato I., Morishima T., Fujino H., Umeda K., Hiramatsu H., Adachi S., Ito E., Ogawa S., Ito M., Nakahata T., Heike T.: Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood.* ; 121(21):4377-4387, 2013; doi: 10.1182/blood-2012-12-474387.
9. Nakazawa Y., Saito S., Yanagisawa R., Suzuki T., Toshiro Ito T., Ishida F., Muramatsu H., Matsumoto K., Kato K., Ishida H., Umeda K., Souichi Adachi S., Nakahata T., Koike K.: Recipient seropositivity for adenovirus type 11 is a highly predictive factor for the development of AdV11-induced

- hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 48:737-739, 2013. doi: 10.1038/bmt.2012.206.
10. 斎藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞. *再生医療* 12(1):19-29, 2013.
  11. Sakai H., Okafuji I., Nishikomori R., Abe J., Izawa K., Kambe N., Yasumi T., Nakahata T., Heike T.: The CD40-CD40L axis and INF-g play critical roles in Langerhans giant cell formation. *Int. Immunol.* 24(1):5-15, 2012. doi: 10.1093/intimm/dxr088.
  12. Izawa K., Hijikata A., Tanaka N., Kawai T., Saito M. K., Goldbach-Mansky R., Aksentijevich I., Yasumi T., Nakahata T., Heike T., Nishikomori R., Ohara O.: Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res.* 19(2):143-152, 2012. doi: 10.1093/dnares/dsr047.
  13. Kawai T., Nishikomori R., Izawa K., Murata Y., Tanaka N., Sakai H., Saito M., Yasumi T., Takaoka Y., Nakahata T., Mizukami T., Nunoi H., Kiyohara Y., Yoden A., Mutara T., Sasaki S., Ito E., Akutagawa H., Kawai T., Imai C., Okada S., Kobayashi M., Heike T.: Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency. *Blood* 119(23):5458-66, 2012. doi: 10.1182/blood-2011-05-354167.
  14. Tsumura M., Okada S., Sakai H., Yasunaga S., Ohtsubo M., Murata T., Obata H., Yasumi T., Kong X., Abhyankar A., Heike T., Nakahata T., Nishikomori R., Al-Muhsen S., Boisson-Dupuis S., Casanova J., AlZahrani M., Shehri MA., ElGhazali G., Takihara Y., Kobayashi M.: Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Human Mutation* 33(9):1377-87, 2012. doi: 10.1002/humu.22113.
  15. Kikuchi A., Hasegawa D., Ohtsuka Y., Hamamoto K., Kojima S., Okamura J., Nakahata T., Manabe A.: Outcome of children with Refractory Anaemia with Excess of Blast (RAEB) and RAEB in Transformation (RAEB-T) in the Japanese MDS99 study. *Brit. J. Haematol.* 158(5):657-661, 2012. DOI:10.1111/j.1365-2141.2012.09210.x
  16. Tanaka T., Takahashi K., Yamane M., Tomida S., Nakamura S., Oshima K., Niwa A., Nishikomori R., Kambe N., Hara H., Mitsuyama M., Morone N., Heuse J. E., Yamamoto T., Watanabe A., Sato-Otsubo A., Ozawa S., Asaka I., Heike T., Yamanaka S., Nakahata T., Saito M. K.: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood* 120(6):1299-308, 2012. doi: 10.1182/blood-2012-03-417881.
  17. Kawai T., Saito M., Nishikomori R., Yasumi T., Izawa K., Murakami T., Okamoto N., Mori Y., Nakagawa N., Imai K., Nonoyama S., Wada T., Yatie A., Oomori K., Nakahata T., Heike T.: Multiple reversions of an IL2RG mutation restore combined immunodeficiency patient. *J. Clin. Immunol.* 32(4):690-7, 2012. doi: 10.1007/s10875-012-9684-1.
  18. 中畑龍俊：白血病治療の進歩と今後の展望. *日本小児血液・がん学会雑誌* (第49巻1・2号、2012) . 11-15、2012
  19. 中畑龍俊、丹羽明：幹細胞増幅、第10章 内科疾患と再生医療、カラー版内科学、門脇孝、永井良三(総編集)、p447-450, 2012, 西村書店、東京
- [学会発表] (計 30 件)
1. 中畑龍俊：教育講演、iPS 細胞の臨床応用. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2013 年 11 月 29 日-12 月 1 日 (30 日) ヒルトン福岡シーホーク
  2. 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞の小児医療への応用. 第 38 回東日本小児科学会 2013 年 11 月 23 日 大宮ソニックシティ
  3. Saida S., Watanabe K., Sato-Otsubo A., Terui K., Yoshida K., Okuno Y., Toki T., Wang R., Shiraiishi Y., Miyano S., Kato I., Umeda K., Hiramatsu H., Fujino H., Adachi S., Nakahata T., Ito E., Ogawa S., Heike T.: Xenograft model of TAM reveals the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. (一般口演) 第 75 回日本血液学会学術集会 2013 年 10 月 11-13 日 (12 日) 札幌市教

- 育分化会館
4. 中畑龍俊：基調講演、iPS細胞を活用した医療の可能性と倫理. 第10回STSフォーラム「科学技術が拓く人間の未来」公開シンポジウム 2013年10月5日 京都商工会議所ビル講堂
  5. 中畑龍俊：さい帯血造血幹細胞発見秘話とiPS細胞ストックの臍帯血活用の未来像. さい帯血移植1万例突破記念事業「さらなる飛躍へのステップ」記念講演会 2013年9月28日 TKP田町カンファレンスセンター
  6. 中畑龍俊：特別講演、iPS細胞研究が切り開く未来の医療. 日本学術会議公開学術講演会「未来社会を築く生命科学と医療のフロンティア」 2013年8月3日 京都大学薬学部記念講堂
  7. Suzuki N., Hira A., Niwa A., Matsuo K., Takata M., Yabe M., Nakahata T., Saito M.: Mesodermal development from reprogrammed Fanconi anemia cells is affected by ALDH2 enzymatic activity. 11<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR). 7/12-7/15, 2013, Boston, MA, USA.
  8. Yagasaki H., Watanabe K., Kudo K., Tsuchida M., Shichino H., Morimoto A., Kobayashi R., Yabe H., Kikuchi A., Ohga S., Ito E., Ohara A., Nakahata N., Kojima S.: Immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and Cyclosporine for fulminant aplastic anemia. 54<sup>th</sup> Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 8-11, 2012, Atlanta
  9. 中畑龍俊：招請講演、iPS細胞研究の進展. 第59回日本臨床検査医学会学術集会 2012年11月29日～12月2日 (11/30) 国立京都国際会館
  10. 中畑龍俊：教育講演、小児患者におけるiPS細胞の応用. 第49回日本小児アレルギー学会 2012年9月15-16日 (16日) 大阪国際会議場
  11. Yanagimachi M., Niwa A., Tanaka T., Oshima K., Saito M., Nakahata T.: Differentiation of monocytic lineage cells from human iPS cells by using a serum and feeder free culture method. 10<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Japan.
  12. Niwa A., Saito M., Oshima K., Yanagimachi M., Tanaka T., Kato I., Nakahata T.: Human ESC/IPSC-Derived

- mesenchymal stroma can support hematopoietic progenitors. 10<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Japan.
13. Morishima T., Watanabe K., Niwa A., Tanaka T., Saida S., Kato I., Umeda K., Hiramatsu H., Matsubara K., Adachi S., Nakahata T., Heike T.: Induced pluripotent stem cell model of severe congenital neutropenia with HAX1 gene deficiency. 10<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Japan.
  14. Tanaka T., Saito M.K., Takahashi K., Yamanaka S., Nakahata T.: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. 10<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Japan.
  15. 井澤和司、土方敦司、西小森隆太、小原収、田中尚子、河合朋樹、八角高裕、齋藤潤、中畑龍俊、平家俊男：次世代シーケンサーによるNLRP3体制モザイクの診断. 第115回日本小児科学会学術集会 2012年4月20-22日 (21日) 福岡国際会議場 福岡市 (口演)
  16. 中畑龍俊：特別講演、iPS細胞研究の今、その可能性と将来展望. 第115回日本小児科学会学術集会 2012年4月20-22日 (20日) 福岡国際会議場

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

特になし

○取得状況 (計0件)

特になし

〔その他〕

中畑研究室ホームページ：

[www.cira.kyoto-u.ac.jp/nakahata](http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/nakahata)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中畑 龍俊 (NAKAHATA, Tatsutoshi)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：20110744

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

丹羽 明 (NIWA, Akira)

京都大学・iPS細胞研究所・助教

研究者番号：20546999

大嶋 宏一 (OSHIMA, Kohichi)

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号：60525377

(2012年度のみ)