

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：32701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660245

研究課題名(和文)ダイレクト・リプログラミングによる皮膚繊維芽細胞から血液細胞への分化誘導

研究課題名(英文) Differentiation of hematopoietic cell from Cutaneous fibroblasts by direct reprogramming

研究代表者

久末 正晴 (Hisasue, Masaharu)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80333144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：イヌ皮膚由来繊維芽細胞を分離・培養してレンチウイルスベクターを用いて、Oct4を導入しCD45陽性細胞への分化誘導を試みた。感染からday18ではiPS細胞に類似するコロニーが著しく増加した。また、形成されたコロニーはRT-PCRでOct4の発現が見られ、さらにアルカリフォスファターゼ陽性でありday14, day21ではCD45の高発現が認められた。本研究の結果、イヌ繊維芽細胞にOct4を導入することで、CD45陽性細胞を分化させることに成功した。この細胞に様々なサイトカインや増殖因子を加えて培養することで、白血球、赤血球、血小板などの血液細胞に分化できる可能性が大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：Differentiation from canine fibroblast into CD45 positive cell was performed using lentivirus vector integrated Oct4 by culture including KSR, glutamine, and β -Mercaptoethanol. On day 18, round colony like as iPS cells was increased remarkably. These colony expressed Oct4 in RT-PCR assay and positive for ALP stain. On day 14 and 21, high expression of CD45 gene was conformed. In this study, differentiation from canine fibroblast into CD45 positive cell was succeeded by integration of Oct4. It is expected that hematopoietic cells including leukocyte, erythrocyte, and platelet will be cultured by stimulation of a variety of cytokine and growth factor in future.

研究分野：再生医療

キーワード：犬 皮膚 血液 幹細胞 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

近年、iPS 細胞や体性幹細胞などによる臓器再生が注目され、その臨床応用も次第に近づいてきている。しかし、その一方で iPS 細胞自体は極めて未分化な状態であるため、臨床応用する際には常に腫瘍形成のリスクを負い、最大の障壁となっている。ところが、カナダの研究グループから **ヒト皮膚繊維芽細胞から単一の遺伝子導入 (Oct4) といくつかの増殖因子で培養することで白血球、赤血球、および血小板が分化誘導されることが報告された (Szabo, Nature, 2010)**。この信じがたい報告は疑問視されたが、その後続々と心筋、神経、肝臓および造血細胞分化が報告され (Efe JA, *Nat Cell Biol.* 2011, Vierbuchen T, *Nature*, 2010, Sekiya S, *Nature*, 2011)、新たな再生医療法として一躍脚光を浴びることとなった。

その後、残念ながらマウスやラットのげっ歯類では、皮膚組織から血液細胞へのダイレクト・リプログラミングは、成功してこなかった。しかし、我々はこれまで血液病 (骨髄繊維症) のイヌで、皮膚に髄外造血巣が発生した事例に遭遇した。かつイヌの皮下組織には造血幹細胞マーカーである CD34 陽性細胞も確認され、イヌであれば皮膚組織から血液細胞へのダイレクト・リプログラミングは成功する可能性は高いものと予想した。

2. 研究の目的

iPS 細胞を利用した細胞リプログラミングは、臓器再生を推進する上で重要であるが、その一方でその理論・手法を簡便簡略し医療コストを削減し、安全性を高めることも強く求められる。我々が提唱するダイレクト・リプログラミングによる造血は、ヒトと造血機構の大きく異なるげっ歯類よりも大型実験動物であるイヌの方がより適切と思われる。本テーマがげっ歯類で証明不可能な状態である以上、イヌにおいて証明した上で、動物

実験を推進すれば数十年単位でダイレクト・リプログラミングによる再生造血細胞を輸血・移植分野で普及できるものと考え、以下のテーマについて検討することとした。

- (1) 適切な分化誘導因子の選択と培養条件の設定
- (2) 赤血球および白血球の前駆細胞および血小板系成熟細胞への分化誘導
- (3) 分化誘導細胞の性状および機能解析
- (4) 実験動物による投与実験および赤血球および白血球の体内寿命測定

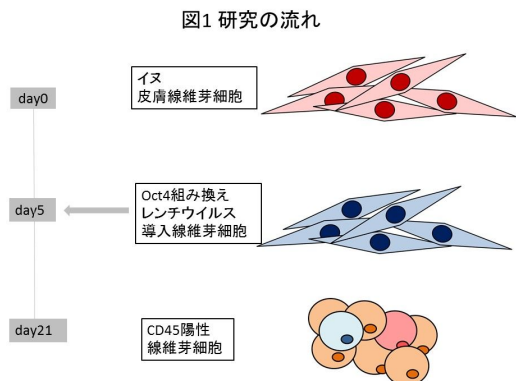
3. 研究の方法

まず、イヌ胎仔皮膚繊維芽細胞を分離・培養してレンチウイルスベクターを用いて、Oct4 を導入し CD41 陽性細胞群への分化誘導を行う。さらに、適切な分化誘導因子の選択と培養条件の設定を行い、白血球、赤血球の前駆細胞および血小板系成熟細胞への分化誘導を行う。また、血液細胞の細胞分化能を厳密に測定する必要があり、コロニーフォーミングアッセイを実施することにした。さらに、分化誘導細胞の分化能力、性状および機能解析を、表面抗原解析、電子顕微鏡、および血小板凝集能測定などで評価する。最終的に、得られた細胞を実験動物に投与し、安全性の確認を行ったうえで、赤血球および血小板の体内寿命の測定をピオチンラベル法で行う。

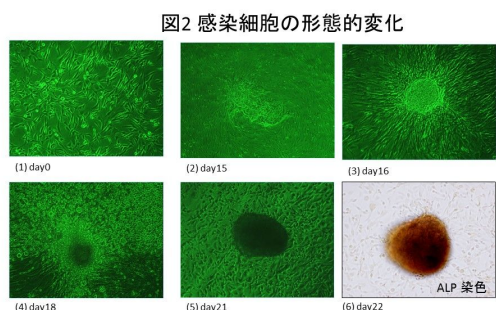
4. 研究成果

イヌ線維芽細胞を分離・培養してレンチウイルスベクターを用いて、Oct4 を導入した。さらに、KSR、グルタミンおよび β -Mercaptoethanol を添加した培地にて、まず CD45 陽性細胞群への分化誘導を試みた (図 1)。また、同時に造血細胞の分化能を検討するため犬骨髄組織を採取し、メチルセルロース寒天培地および methylcellulose medium にて

コロニーフォーミングアッセイの適切な条件検討を行った。



健常犬から麻酔下にて皮膚組織を採取し細断の後に 10%FBS 添加 DMEM にて培養を行った。2 ないし 3 週間後に培養細胞を回収し線維芽細胞を分離した。その結果、DMEM にてイヌ皮膚線維芽細胞を採材・分離し、10%加 FBS 加 DMEM 培地で培養した。Oct4 組み換えレンチウイルスベクターを作製し、線維芽細胞へ感染させ Oct4 の導入を行った。得られた細胞の形態的評価、定性および定量的 RT-PCR を用いて遺伝子発現量を検討、さらにアルカリフォスファターゼ染色によって形成されたコロニーの多能性の評価を行った。感染から day6 で iPS 様のコロニーが、day15 で島状に球形の細胞集団が多数認められ、day18 ではコロニーを囲うように球形の細胞が著しく増加した。また、形成されたコロニーにアルカリフォスファターゼ染色を行ったところ、強く茶褐色に染色され、多能性を持つことが示唆された。



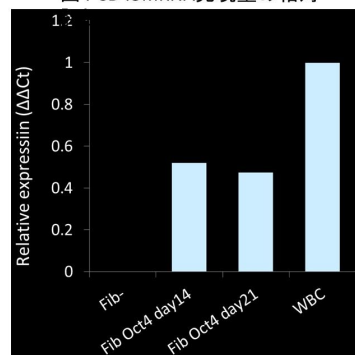
(1) day15 球形の細胞集団が島状に認められた。(2) day16 iPS様のコロニーが多数観察された。(3) day18 球形の細胞がコロニー周囲に埋め尽くすように増殖していた。(4) day21 コロニーをピックアップしてSNLフィーダー細胞と共培養した。(5) day 21 SNLフィーダー細胞と共培養したday22 (6)アルカリフォスファターゼ染色を行ったところコロニーのみが茶褐色に強く染まり陽性反応を示した。

また、定性的および定量的 RT-PCR では感染細胞には、いずれの時期においても Oct4 の発現が見られ、day14, day21 では CD45 の高発現が認められた (図 3,4)。

図3 定性的PCRによるmRNA発現の評価

	Fib ^{Oct4} day5	Fib ^{Oct4} day12	Fib ^{Oct4} day14	Fib ^{Oct4} day21	WBC	Fib ⁻
CD45			+	+	+	
Human Oct4	+	+	+	+		
Canine Oct4	ND	ND	+	+	ND	ND
Canine NANOG	ND	ND			ND	ND
GAPDH	+	+	+	+	+	+

図4 CD45mRNA発現量の相対



イヌ線維芽細胞にただ一つの遺伝子を導入することで、CD45 陽性細胞を分化させることに成功した。この細胞に様々なサイトカインや増殖因子を加えて培養することで、白血球、赤血球、血小板などの血液細胞に分化できる可能性が大いに期待される。

引用文献

1. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. Szabo E, et al Nature. 2010.
2. The placenta growth factor in skin angiogenesis. Odorisio T, et al, J Dermatol Sci. 2006.

3. In vitro selective suppression of feline myeloid colony formation is attributable to molecularly cloned strain of feline leukemia virus with unique long terminal repeat. Nagashima N, et al, Res Vet Sci. 2005.

4. Generation of red blood cells from human embryonic/induced pluripotent stem cells for blood transfusion. Ebihara Y et al, International journal of hematology, 2012.

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)

PMID: 23986119

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

久末 正晴 (HISASUE Masaharu)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号: 80333144

(2) 研究分担者

土屋 亮 (Tsuchiya Ryo)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号: 30188586

鳩谷 晋吾 (HATOYA Shingo)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号: 40453138