

厚生科学研究費補助金高度先端医療研究事業

胚性幹細胞および造血幹細胞を利用した
血液生成技術の開発研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 平井 久丸

平成 14 年 (2002) 3 月

目 次

I.	総括研究報告書	
	胚性幹細胞および造血幹細胞を利用した血液生成技術の開発研究	
	平井 久丸	1
II.	分担研究報告書	
	造血幹細胞の増幅および血球への分化誘導技術の開発に関する研究	
	寺村 正尚	4
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	6
IV.	研究成果の刊行物・別刷	7

I . 総括研究報告

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

総括研究報告書

胚性幹細胞および造血幹細胞を利用した血液生成技術の開発研究
主任研究者：平井 久丸 東京大学医学部附属病院無菌治療部・助教授

研究要旨：体性造血幹細胞および胚性幹細胞から血球への分化を誘導する技術を開発することを目的として、(1)造血支持細胞と造血幹細胞による生体外3次元培養法の新規開発、(2)純化造血幹細胞への Notch シグナル分子 HES1 導入による体外未分化性維持の検証、(3) レチノイン酸受容体のドミナント・ネガティブ体を可逆的遺伝子導入法を用いて、造血細胞に導入し、増殖・分化を人為的に制御するシステムの開発、(4)マウス ES 細胞から未分化中胚葉細胞への分化系の確立を行った

分担研究者

- ・千葉 滋
東京大学医学部附属病院
無菌治療部 講師
- ・黒川 峰夫
東京大学医学部附属病院
血液腫瘍内科 助手
- ・小川 誠司
東京大学医学部附属病院
血液腫瘍内科 助手
- ・高橋 強志
東京大学医学部附属病院
無菌治療部 助手
- ・寺村 正尚
東京女子医科大学血液内科
講師

A. 研究目的

血液製剤の需要は、医療の高度化に伴いますます増大している。現在血液製剤は献血事業に依存しているが、献血による輸血医療は、量的質的な供給の不安定性、感染の危険性などの問題を孕んでいる他、高コストであることから医療経済にも影響を及ぼしている。本研究ではこうした現状に対し、臍帯血や骨髄中に存在する体性造血幹細胞、および、樹立された培養胚性幹細胞 (ES 細胞) の自己複製能と多分化能を利用して、体外で赤血球、白血球、血小板など各血球細胞の分化・増殖による人工血液の産生法の開発を行い、供血者に依存する輸血医療を抜本的に再構築することを目指すものである。

これらの人工血液が実用化されれば、管理された条件の下に計画的な生産が可能になり、安定供給と安全性の問題が解決するのみならず、大規模な生産系の稼働により、輸血医療のコスト低減につながる。一方、様々な理由により現時点では不可能である白血球の自由な輸血が可能になると、悪性腫瘍や難治性感染症に対する新しい強力な免疫治療法や細胞療法の開発に発展する可能性も見込まれる。さらに本研究では、造血幹細胞そのものや、これに由来する前駆細胞の利用も対象とする。本研究の成果により、造血幹細胞移植療法を実施する上でネックとなっている、ドナー細胞入手の問題も解決される。

B. 研究方法

体性造血幹細胞は、その供給が有限であるため、幹細胞としての未分化性を維持することが肝要である。これにあたっては、次の3つの異なるアプローチを用いて、目的とする培養細胞から血球生成の開発研究にあたった。すなわち、
(1) 温度に应答して細胞の接着性を変化させる培養皿（東京女子医大先端生命科学研究所の岡野光男教授らが新たに開発）を用いた、造血細胞と造血支持組織の三次元培養系の開発、
(2) 分化抑制機能を持つ Notch のシグナル分子である HES1 を、レトロウイルスを用いて純化した造血幹細胞に導入後に放射線照射マウスに移植し、造血幹細胞未分化性維持の検討、
(3) Cre/loxP システムを応用した導入遺伝子着脱可能なレトロウイルスを用いて、造血幹細胞の分化を阻止する遺伝子を導入し、増幅後にこの遺伝子を取り除いて成熟血球に分化させる

系をセットアップである。一方、培養 ES 細胞の場合、供給についての制限はないが、成熟血球への効率的な誘導が課題であり、このような分化システムを開発することを念頭においた。まず、成熟血球の産生効率に重要な因子の一つは、ES 細胞から中胚葉細胞への誘導であるので、中胚葉マーカーとして Fik1 を用い、マウス ES 細胞から Fik1 陽性細胞に分化させる条件を検討した。さらに、OP9 ストローマ細胞と各種のサイトカインの組み合わせ、Fik1 陽性細胞から成熟血球への分化効率を検討した。また、Fik1 陽性細胞から成熟血球を産生する目的で、OP9 に替わるストローマ細胞の樹立中である。

我々はすでにヒト由来の造血幹細胞の利用に関して、東大病院の倫理委員会の承認を得ている。ヒト由来の造血幹細胞（骨髄・末梢血・臍帯血）を利用する際には、事前に本研究の目的と方法ならびに個人情報の保護などについて十分に提供者に説明し、承諾が得られた場合にのみ、その一部を研究に利用する。一方、将来的にはヒト ES 細胞を使用する予定であるが、ヒト ES 細胞の使用に関しては、平成13年9月25日に文部科学省より示された「ヒト ES 細胞の樹立および使用に関する指針」に基づいて東京大学の倫理審査委員会に研究計画を申請中であり、承認を待っている段階である。ヒト ES 細胞については海外の機関から供与の応諾を得ている。東京大学で行っている動物実験については、「東京大学動物実験マニュアル」に沿って研究を行っている。

C. 研究結果

(1) 三次元培養法：造血支持細胞（骨髄間質細胞）を温度応答性培養皿でシート状に培養しそれを重ね合わせ、3-4 層からなる三次元培養に成功した。これに造血幹細胞を植え込み、造血環境の変化と造血能との関連性について解析を進めている。(2) 高度に純化したマウス造血幹細胞は、体外ではストローマとの接触がなければ 48 時間で造血再生能は著しく低下する。このように高度に純化したマウス造血幹細胞に、レトロウイルスを用いて Notch のシグナル分子である HES1 を導入し、マウス個体における造血再構築能を評価した。この結果、HES1 導入により、骨髄幹細胞の試験管内における未分化性が強く維持されることが明らかとなった。(3) Cre/loxP システムを応用した導入遺伝子着脱可能なレトロウイルスにより、レチノイン酸受容体ドミナントネガティブ変異体(DN-

RAR)を、マウス 32D細胞および臍帯血 CD34 陽性細胞に導入した。顆粒球分化のモデル細胞である 32D 細胞は、遺伝子導入により分化が阻止され、Cre レコンビナーゼにより再度分化が可能になった。臍帯血 CD34 陽性細胞も DN-RAR 導入により増幅した。(4) ES 細胞から血球分化への第一段階である中胚葉系未分化細胞への分化を、Fik1 単独陽性化を指標として評価したところ、タイプ IV コラーゲンをコートしたプラスチック上での培養により、もっとも効率よい分化が観察された。

D. 考察

(1) 生体内の骨髄組織は支持組織の柱帯により形成された三次元空間であり、そこに造血幹細胞が付着して自己再生および分化がおきている。本研究で検討中の三次元培養法は生体により近い生体外培養システムであるため、造血幹細胞の増幅を可能にするのみならず、造血幹細胞を効率よく終末分化させるシステムであると期待される。(2) Notch のシグナル分子である HES1 を遺伝子導入することにより、骨髄造血幹細胞の試験管内における未分化性が強く維持されたことから、今後 Notch リガンドを含めて HES1 発現を促す外来因子を探索し、これによる造血幹細胞の試験管内未分化性維持の技術確立につなげたい。(3) Cre/loxP システムによる可逆的遺伝子導入法を用いることにより、造血幹細胞を増幅しその後終末分化させる、という制御が可能であることが示唆された。(4) ES 細胞からの血球産生には、1)ES 細胞から中胚葉系細胞へ、2)中胚葉系細胞から造血前駆細胞へ、3)造血前駆細胞から成熟血球へ、の各分化ステップを効率よく誘導する必要がある。1)のステップは効率よい系が確立可能であったが、その後のステップには、現在用いている OP9 のみでは困難であることが明らかになった。今後、新たに樹立しつつあるストローマと、中胚葉系サイトカインを含む種々のサイトカインの組み合わせにより、効率よい血球分化システムを確立する必要がある。

E. 結論

(1) 造血支持細胞（骨髄間質細胞）の重層培養に成功した。(2) 純化したマウス造血幹細胞への HES1 導入により、造血幹細胞を試験管内で維持することに成功した。(3) 遺伝子着脱可能なレトロウイルスを用いて造血幹細胞に分化抑制遺伝子を導入することにより、造血幹

細胞を増幅した後に分化させる制御系確立への、足がかりが得られた。(1) マウス ES 細胞から中胚葉系細胞への効率よい分化系を確立した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. Yamaguchi E, Chiba S, Kumano K, Kunisato A, Takahashi T, Takahashi T, Hirai H. Expression of Notch ligands, Jagged1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice. Immunol Letter 81:59-64, 2002.
2. Shimizu K, Chiba S, Saito T, Takahashi T, Kumano K, Hamada Y, Hirai H. Integrity of the intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for release of

Notch2 intracellular domain. EMBO J 21:294-302, 2002.

3. Kumano K, Chiba S, Shimizu K, Yamagata Y, Hosoya N, Saito T, Takahashi T, Hamada Y, Hirai H. Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression. Blood 98:3283-3289, 2001.
4. Shimizu K, Chiba S, Saito T, Kumano K, Takahashi T, Hirai H. Manic fringe and lunatic fringe modify different sites of the Notch2 extracellular region, resulting in different signaling modulation. J Biol Chem 276:25753-8, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ. 分担研究報告

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

分担研究報告書

造血幹細胞の増幅および血球への分化誘導技術の開発に関する研究

分担研究者：寺村 正尚 東京女子医科大学血液内科・講師

研究要旨：造血幹細胞を安全に体外で維持増幅し、一定の血球への分化を誘導する技術を開発することを目的として、造血支持細胞と造血幹細胞による生体外3次元培養法の新規開発に取り組んだ。また、可逆的遺伝子導入法を用いて、造血幹細胞の増殖、分化を人為的に制御するシステムの開発を行った。

A. 研究目的

現代医療において血液製剤の必要性和需要は高いがその供給は献血事業に頼っており、安全性や経済性などの問題をはらんでいる。一方、従来医療廃棄物として破棄されていた臍帯血中の造血幹細胞は、骨髄や動員による末梢血造血幹細胞にくらべて免疫学的に寛容で、感染暴露の危険性が少なく、かつ提供者である母体や児への影響もない。このような利点をもつ臍帯血造血幹細胞から人為的に血液製剤を製造する事が可能となれば、現行の輸血事業が抱える諸問題を解決することができると考えられる。本研究は、臍帯血造血幹細胞を安全に体外で維持増幅し、一定の血球系への分化を誘導する技術を開発することを目的とした。

B. 研究方法

Poly (N-isopropyl acrylamide) (PIPAAm)を重合させることにより温度に应答して細胞の接着性を変化させる培養皿（東京女子医大先端生命科学研究所の岡野光男教授らが開発）を用いて、造血細胞と造血支持組織の三次元培養系を開発を試みた。具体的には造血支持細胞（骨髄間質細胞）を温度应答性培養皿でシート状に培養し、それらを重ねあわせることにより、重層培養することができるかを検討した。また Cre/loxP システムを応用した導入遺伝子着脱可能なレトロウイルスを用いて造血幹細胞にその未分化性の維持や分化・増殖に関わる様々な因子を導入することにより、造血幹細胞の増幅、あるいは1血球系のみへの分化誘導が可能かどうかについて検討した。

（倫理面への配慮）

臍帯血の提供はあらかじめ文書を用いて説明を行い、同意を得た上で受けた。胎盤娩出後、臍

帯静脈血を採取した。

C. 研究結果

造血支持細胞（骨髄間質細胞）を温度应答性培養皿でシート状に培養しそれを重ね合わせ、3-4層からなる三次元培養に成功した。現在、造血幹細胞を植え込んだ三次元培養をよる造血環境の変化と造血能との関連性について解析を進めている。

また Cre/loxP システムを応用した導入遺伝子着脱可能なレトロウイルスによる遺伝子導入法を用いることにより、造血幹細胞の未分化性の制御を試みた。レチノイン酸ドミナントネガティブ変異体(DN-RAR)を 32D細胞に導入し未分化性維持および分化の再誘導を確認した。さらに Preliminary な結果ではあるが、臍帯血 CD34 陽性細胞にレチノイン酸ドミナントネガティブ変異体を導入したところ、CD34 陽性細胞の増加傾向が認められた。

D. 考察

生体内の骨髄組織は支持組織の柱帯により形成された三次元空間であり、そこに造血幹細胞が付着して自己再生および分化がおきていると推測される。本研究で検討中の三次元培養法は生体により近い生体外培養システムであり、従来の培養法より造血幹細胞の増幅、分化の効率が高まる可能性があると考えられる。また、可逆的遺伝子導入法を用いることにより、造血幹細胞の増幅および特定の血球系への分化を人為的に制御しうる可能性が考えられる。

E. 結論

造血支持細胞（骨髄間質細胞）と造血幹細胞を用いた生体外三次元培養の開発が可能であると考えられた。また、導入遺伝子着脱可能なレトロウイルスを用いて造血幹細胞の増幅や分化を制御しうる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yamaguchi E, Chiba S, Kumano K, Kunisato A, Takahashi T, Takahashi T, Hirai H.	Expression of Notch ligands, Jagged1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice.	Immunol Letter	81	59-64	2002
Shimizu K, Chiba S, Saito T, Takahashi T, Kumano K, Hamada Y, Hirai H.	Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for release of the Notch2 intracellular domain.	EMBO J	21	294-302	2002
Kumano K, Chiba S, Shimizu K, Yamagata Y, Hosoya N, Saito T, Takahashi T, Hamada Y, Hirai H.	Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression.	Blood	98	3283-3289	2001
Shimizu K, Chiba S, Saito T, Kumano K, Takahashi T, Hirai H.	Manic fringe and lunatic fringe modify different sites of the Notch2 extracellular region, resulting in different signaling modulation.	J Biol Chem	276	25753-8	2001

IV. 研究成果の刊行物・別刷

20010682

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。