

2004.01190A

厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

ヒト胚性幹細胞を利用した分化誘導培養による  
人工血液の開発に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

平成 17 (2005) 年 3 月

主任研究者 辻浩一郎  
(東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 細胞療法分野 助教授)

## 目 次

I. 総括研究報告書	
ヒト胚性幹細胞を利用した分化誘導培養による人工血液に関する研究 辻浩一郎	1
（資料1）ヒト ES 細胞	11
（資料2）マウス胎仔肝由来ストローマ細胞	13
（資料3）ヒト ES 細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞の共培養 （培養 16 日目）	15
（資料4）ヒト ES 細胞由来混合コロニー	17
（資料5）ヒト ES 細胞由来赤血球	19
（資料6）ヒト ES 細胞由来赤血球における成人型ヘモグロビン	21
II. 分担研究報告	
ヒト胚性幹細胞の分化の分子生物学的解析 河崎裕英	25
（資料1）ヒト臍帯血 CD34+細胞から分化誘導された肥満細胞と NK 細胞	29
（資料2）tryptase を発現する顆粒を多数有する肥満細胞	31
（資料3）ヒト臍帯血 CD34+細胞から産生された CD56+CD3- NK 細胞	33
（資料4）臍帯血単核球における CD34 と CD81 の発現	35
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別冊	43

# I. 総括研究報告書



厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
総括研究報告書

ヒト胚性幹細胞を利用した分化誘導培養による人工血液に関する研究

主任研究者 辻浩一郎 東京大学医科学研究所・先端医療研究センター・  
細胞療法分野・助教授

研究要旨

ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) を、マウス胎仔肝から培養したストローマ細胞と共培養することにより、赤血球系前駆細胞、骨髄球系前駆細胞、さらには、複数の血液細胞に分化可能な多能性造血前駆細胞に分化誘導できた。これらの前駆細胞から分化誘導された赤血球の一部には、脱核した成熟赤血球も認められ、酸素運搬能を有する成人型ヘモグロビンを合成していた。これらのヒト ES 細胞由来の成熟赤血球や好中球は、輸血医療を含めた、様々な再生医療への応用が期待される。

分担研究者

河崎裕英 東京大学医科学研究所  
附属病院小児細胞移植科  
助手

存している。そのため、輸血用血液の供給量の絶対的不足が社会問題となって久しいが、これに加えて、現在の輸血用血液は不特定多数のドナーから採取されるため、種々の感染症の危険性等、その安全性についても大きな問題となっている。そのため、充分量の安全な輸血製剤の確保が社会的に強く求められている。

A. 研究目的

現代医学の著しい進歩にもかかわらず、輸血医療は現在の医療においても不可欠な補助療法であり、その供給は今日もなお多くのドナーの善意に依

そこで、我々は、全ての組織細胞に分化可能な能力を保持しつつ、半永久的に増殖可能なヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) に着目した。もし、ヒト ES 細

胞から効率良く大量の成熟血球（赤血球、好中球、血小板）を分化誘導することが可能となれば、現在輸血事業において問題となっている多くの案件を解決することができる。特にこれらの輸血製剤はHLAに係らず使用できるため、必ずしも多数のヒト ES 細胞を用意する必要がなく、その過程でクローン胚が作製される危険性もない。したがって、倫理的に十分に考慮された条件下でのヒト ES 細胞の作製が可能となった現在、極めて実現可能な人工血液の産生法と考えられる。

我々は、ヒト ES 細胞を血液細胞へ分化誘導するためには、ヒト ES 細胞がたどるであろう胎生期造血を再現することが重要であると考えた。しかし、胎生期造血は、造血の場を次々かえながら、次第に発達していくことが知られており、そのこと自体、胎生期造血の発達には、適した造血環境が極めて重要であることを示唆している。そこで我々は、ヒト ES 細胞から効率的に血液細胞を分化誘導するためには、胎生期の造血環境の中心的役割を担っているストローマを *in vitro* で再構築するのがよいのではないかと着想した。

当然のことながら、ヒト胎児組織からストローマ細胞を樹立することは、倫理的に許されないが、マウスのストローマ細胞には、ヒト造血細胞にも作

用するものが多数存在する。そこで、マウス胎仔の造血組織よりストローマ細胞を樹立し、このストローマ細胞との共培養により、ヒト ES 細胞から効率的に血液細胞へ分化誘導できるのではないかと考えた。

マウスの胎生期造血は、卵黄嚢に発生し、胎生初期造血を担う一次造血と、その後の一生にわたる造血を支えることになる二次造血にわけられる。二次造血は、マウス胎仔の胎生 10 日の AGM (Aorta-Gonad-Mesonephros) 領域に発生し、その後、造血の場を胎仔肝に移し、爆発的に増幅した後、脾臓、骨髄へ移動し、それ以降の一生にわたる造血を担うことになる。

そこで、マウス胎仔肝からストローマ細胞を培養し、ヒト ES 細胞をこのストローマ細胞と共培養することにより、ヒト ES 細胞から造血細胞への分化誘導を計画した。

## B. 研究方法

### 1. マウス胎仔肝由来ストローマ細胞の培養

胎生 14.5-16.5 日のマウス胎仔肝から分離された細胞を付着培養し、ストローマ細胞の樹立を試みた。

## 2. ヒト ES 細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞の共培養

ヒト ES 細胞（資料 1）を、樹立されたマウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養し、産生されてきた細胞を、形態学的観察、フローサイトメトリー、コロニー形成法などにより、経時的に解析した。

## 3. ヒト ES 細胞由来赤血球におけるヘモグロビンの解析

マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により分化誘導されたヒト ES 細胞のコロニー培養し、形成された赤血球系コロニーや混合コロニーに含まれる赤血球系細胞のヘモグロビンを、免疫染色により解析した。

### （倫理面への配慮）

本研究の遂行にあたっては、「ヒト ES 細胞の樹立および使用に関する指針」を遵守して実施された。なお、本研究の過程において、クローン胚が作製される危険性はない。

本研究計画は、東京大学バイオサイエンス委員会ヒト生殖・クローン専門委員会の承認を得た後、平成 14 年 12 月 20 日に文部科学省特定胚及びヒト ES 細胞研究専門委員会にて承認された。

## C. 研究結果

### 1. マウス胎仔肝由来ストローマ細胞の培養

胎生 14.5–16.5 日のマウス胎仔の胎仔肝から分離された細胞を付着培養することにより、ストローマ細胞を樹立することができた（資料 2）。

### 2. マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養によるヒト ES 細胞の血液細胞への分化

ヒト ES 細胞は、樹立されたマウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養すると、培養 6 日目頃より、ヒト ES 細胞は分化を開始し、培養 12 日目頃には、未分化な血液細胞が出現し、その数は次第に増加した。未分化な血液細胞数が最大となる培養 16 日目頃（資料 3）に、これらの未分化な血液細胞を採取し、interleukin (IL)-3、エリスロポエチン、トロンボポエチン、GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)、G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)、SCF (stem cell factor)、存在下で、コロニー培養すると、赤血球コロニー、顆粒球・マクロファージコロニー、種々の血液細胞を含む混合コロニー（資料 4）など、様々な血液細胞コロニーが形成され、これらのコロニーからは、赤血球、好中球、マク

ロファージ、巨核球などの種々の血液細胞が産生された。産生された赤血球の中には、脱核した成熟赤血球も認められた(資料5)。

以上の結果は、ヒト ES 細胞は、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、赤血球系前駆細胞、骨髓球系前駆細胞、さらには、複数の血液細胞に分化可能な多能性造血前駆細胞に分化誘導されたことを示している。

### 3. ヒト ES 細胞由来赤血球における成人型ヘモグロビンの合成

上記の方法により形成された赤血球系コロニーに含まれるヒト ES 細胞由来赤血球のほとんどが、胎児型ヘモグロビン(HbF)を保持していたが、さらに、70-80%の赤血球は、成人型ヘモグロビン(HbA)も保持していた(資料6)。また、これらのヘモグロビンは、酸素結合能を有していることも確認された。

## D. 考察

胎生期造血においては、生物の一生を担うことになる二次造血は、胎児肝において、劇的に増幅する。このことは、未分化な造血細胞は、胎児肝という造血環境で、著明に分化・増殖する

ことを示している。また、従来より、マウスストローマ細胞の多くは、ヒト造血細胞にも作用することが知られている。そこで、マウス胎仔肝から樹立されたストローマ細胞との共培養系により、ヒト ES 細胞を効率的に血液細胞に分化・増殖することを試みた。

その結果、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、ヒト ES 細胞から多数の赤血球系前駆細胞、骨髓球系前駆細胞、多能性造血前駆細胞が産生された。胎生期の二次造血が AGM 領域で発生することを考慮すると、これらの造血前駆細胞が、ヒト ES 細胞由来の造血幹細胞から分化したものではなく、中胚葉系細胞から直接発生した細胞である可能性も残されている。いずれにしても、現段階では、本培養系における、長期造血再構築能を有する造血幹細胞の産生は確認されておらず、今後の課題と考えている。

ただ、そうした造血前駆細胞の由来は別として、これらの前駆細胞から分化誘導された赤血球の中には、脱核した成熟赤血球も含まれており、一部は酸素運搬能を有する成人型ヘモグロビンを有していた。このことは、本研究において、ヒト ES 細胞から分化誘導された成熟赤血球が、輸血用血液として、使用可能であることを示唆している。今後は、これらの赤血球を完全に成熟赤血球にまで分化誘導する方



法を確立したいと考えている。

さらに、本培養系において産生される好中球についても、輸血用血液として使用可能な機能を有しているかいなかを検討していく予定である。もし、これらの好中球が、遊走能、貪食能、殺菌能を有していることが確認されれば、これまで、重症感染症に対する有用性が認められながら、ドナー確保が困難なために実施されてこなかった好中球輸血が可能となる。

#### E. 結論

ヒト ES 細胞を、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養することにより、赤血球系前駆細胞、骨髄球系前駆細胞、さらには、複数の血液細胞に分化可能な多能性造血前駆細胞に分化誘導できた。これらの前駆細胞から分化誘導された赤血球の一部には、脱核した成熟赤血球も認められ、酸素運搬能を有する成人型ヘモグロビンを合成していた。これらのヒト ES 細胞由来の成熟赤血球や好中球は、輸血医療を含めた、様々な再生医療への応用が期待される。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(雑誌)

Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential.

Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K: Stem Cells 22: 649-648, 2004.

Viral infections in juvenile myelomonocytic leukemia: Prevalence and clinical implications.

Manabe A, Yoshimasu T, Ebihara Y, Yagasaki H, Wada M, Ishikawa K, Hara J, Koike K, Moritake H, Park Y-D, Tsuji K, Nakahata T: J Pediatr Hematol Oncol 26: 636-641, 2004

Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia. Yasuda T, Shirakata M, Iwama A, Ishii A, Ebihara Y, Osawa M, Honda K, Shinohara H, Sudo K, Tsuji K, Nakauchi

H, Iwakura Y, Hirai H, Oda H,  
Yamamoto T, Yamanashi Y:  
J Exp Med 200: 1681-1687, 2004.

Methylation status of the p15 and p16  
genes in paediatric myelodysplastic  
syndrome and juvenile myelomonocytic  
leukaemia.

Hasegawa D, Manabe A, Kubota T,  
Kawasaki H, Hirose I, Ohtsuka Y,  
Tsuruta T, Ebihara Y, Goto Y, Zhao XY,  
Sakashita K, Koike K, Isomura M,  
Kojima S, Hoshika A, Tsuji K, Nakahata  
T:  
Br J Haematol, in press.

CD7/CD13 陽性急性分類不能型白血病.  
長谷川大輔、真部淳、鶴田敏久、大塚  
欣敏、海老原康博、河崎裕英、有瀧健  
太郎、松浦恵子、星加明德、辻浩一郎：  
日小血会誌 18：155-159, 2004.

後天性サイトメガロウイルス感染症  
小児に合併した免疫学的血小板減少  
性紫斑病.  
河崎裕英、峰研治、野田幸弘、中野崇  
秀：  
日小血会誌 18：561-565, 2004.

ヒト胚性幹細胞からの血液産生と再  
生医療.  
辻浩一郎：

日小血会誌、印刷中  
(著書)

造血幹細胞並びにサイトカインの基  
礎と応用.

辻浩一郎：  
必携造血幹細胞移植—わが国のエビ  
デンスを中心に—、小寺良尚、加藤俊  
一編、  
医学書院（東京）：21-34、2004.

造血幹細胞.

辻浩一郎：  
血液の辞典、平井久丸、押味和夫、坂  
田洋一編、  
朝倉書店（東京）：39-41、2004.

造血幹細胞と血液の分化.

辻浩一郎：  
血液細胞アトラス、三輪史朗、渡辺陽  
之輔編、  
文光堂（東京）：30-32、2004.

小児白血病.

辻浩一郎：  
白血病はこわくない、  
丸善（東京）：64-75、2004.

## 2. 学会発表

(学会)

Bisphosphonate Zoledronic acid (ZOL) inhibits the abnormal proliferation and differentiation of juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) cells.

Ohtsuka Y, Manabe A, Kawasaki H, Watanabe S, Zaike Y, Hasegawa D, Miyazaki T, Tanizawa T, Nakahata T, Tsuji K

46<sup>th</sup> Annual Meeting, American Society of Hematology, San Diego, December 4-7, 2004

The effect of prolactin on the proliferation and differentiation of erythroid progenitors from hematopoietic stem cells in Diamond-Blackfan anemia.

Kawasaki H, Noda Y, Nakano T, Kobayashi Y, Tsuji K:

9th Congress of the European Hematology Association, Geneva, June 10-13, 2004.

小児骨髄異形成症候群 (MDS) 及び若年性骨髄単球性白血病 (JMML) における p15 メチル化の検討  
長谷川大輔、真部淳、久保田健夫、河

崎裕英、大塚欣敏、磯村万理子、小島勢二、辻浩一郎、中畑龍俊 :

第 46 回日本血液学会

京都、2004 年 9 月

若年性骨髄単球性白血病 (JMML) におけるビスフォスフォネート製剤の検討

大塚欣敏、真部淳、長谷川大輔、河崎裕英、辻浩一郎 :

第 46 回日本臨床血液学会

京都、2004 年 9 月

非血縁者間同種骨髄移植後の再発に対してドナーリンパ球輸注 (DLI) を行った 3 例

河崎裕英、大塚欣敏、長谷川大輔、鶴田敏久、真部淳、海老原康博、辻浩一郎 :

第 46 回日本小児血液学会

京都、2004 年 11 月

(学会シンポジウム)

ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導.

辻浩一郎

第 46 回日本小児血液学会シンポジウム「小児血液研究の進歩」

2004 年 11 月 23 日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

「血液作成方法」として、出願準備中。

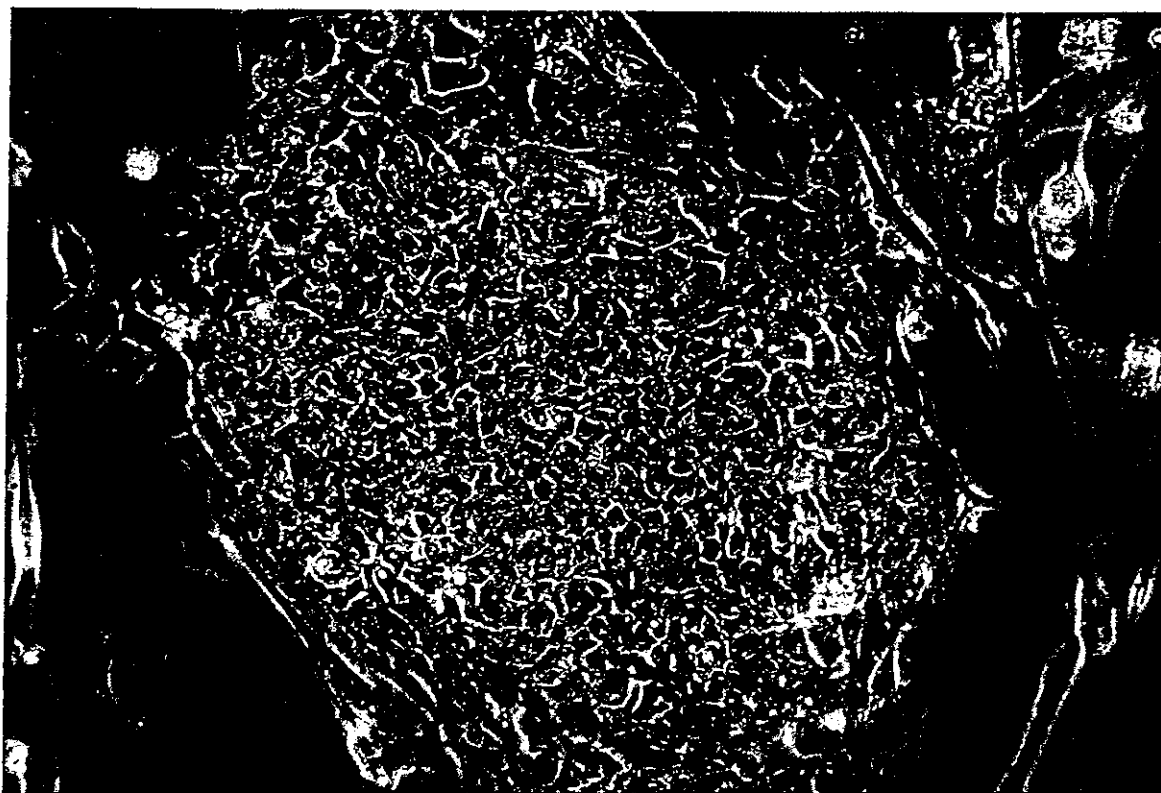
2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

(資料1) ヒトES細胞





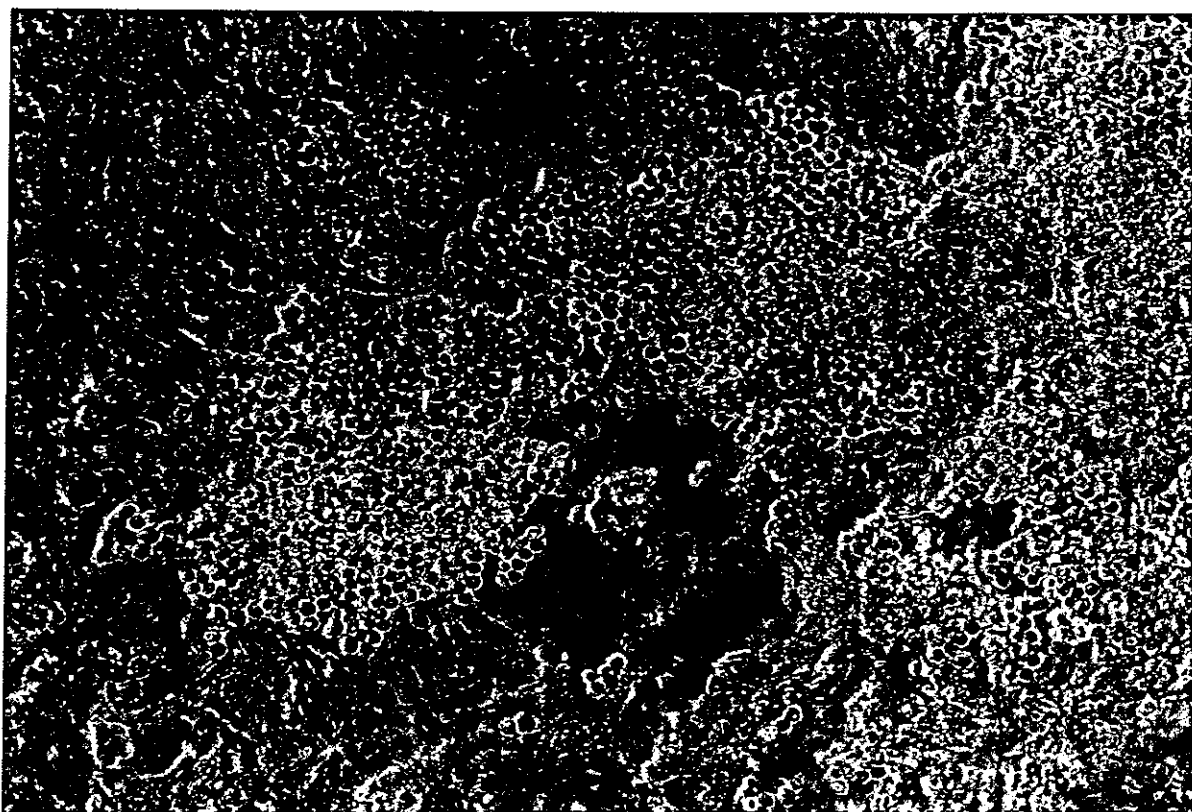
(資料2) マウス胎仔肝由来ストローマ細胞







(資料3) ヒト ES 細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞の共培養 (培養  
16 日目)





(資料4) ヒトES細胞由来混合コロニー

