

20050 10-99A

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 17 年度 総括・分担研究報告書

平成 18 (2006) 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) マウス胎仔肝由来ストローマ細胞の共培養されたヒト ES 細胞	13
(資料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に おける RT-PCR による解析	15
(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中の 培養細胞のフローサイトメトリーによる検討 (培養 14 日目)	17
(資料4) マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養されたヒト ES 細胞 による血液細胞コロニー形成の解析	19
(資料5) マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養されたヒト ES 細胞 による血液細胞コロニー形成	21
(資料6) マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養されたヒト ES 細胞 による血液細胞コロニー形成	23
(資料7) ヒト ES 細胞由来混合コロニー中に含まれる赤血球における β グロビンの発現	25

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	27
(資料1) マウス胎仔肝由来ストローマ細胞	35
(資料2) マウス胎仔肝由来ストローマ細胞における Albumin および Desmin の発現	37
(資料3) マウス胎仔肝由来ストローマ細胞のフローサイトメトリー による解析	39

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 41

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別冊 47

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) を胎生 14-15 日の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と、ヒト ES 細胞は造血細胞へ分化誘導された。培養 11 日以降の共培養中には、赤血球系前駆細胞、骨髄球系前駆細胞、多能性造血前駆細胞が含まれており、その多くは成人血液と同じ、二次造血を起源とするものであった。また、培養 13 日目以降の共培養中には、未分化な ES 細胞が残存している可能性は低いことが示された。これらの結果より、本共培養系においてヒト ES 細胞から産生された造血前駆細胞は、輸血用血液の新たな供給源となることが期待される。

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

供給は今日もなお多くのドナーの善意に依存している。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。そこで、我々は、全ての組織細胞

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

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、マウス由来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。その結果、平成 17 年度の本研究において、ヒト ES 細胞を、胎生 14.5-16.5 日の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。そこで、本年度は、この共培養系の臨床応用の可能性を検討するために、本共培養系における造血細胞の発生について、より詳細に解析した。

B. 研究方法

マウス胎仔繊維芽細胞(MEF: mouse embryonic fibroblast)で維持された未分化なヒト ES 細胞を、胎生 14～15 日のマウス胎仔肝から樹立されたストローマ細胞と共培養し、その経時的変化を観察した。また、共培養系における造血細胞の産生を以下の方法で検討した。

1. RT-PCR

MEF で維持された未分化なヒト ES 細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞を共培養し、培養 0、3、5、13 日目の OCT-4、Brachury、AFP、Nestin、LMO-2、KDR、c-kit、GATA-2 の発現を解析した。

2. フローサイトメトリー

MEF で維持された未分化なヒト ES 細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞を共培養し、培養 14 日目の培養細胞における CD34、CD31、CD38、

CD45、CD126、CD130、c-Kit、glycophorin A (GPA) の発現を解析した。

3. コロニー形成法

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中の細胞を、stem cell factor (SCF)、Flk2/Flt3 (FL)、interleukin (IL)-3、IL-6、granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)、エリスロポエチン、トロンボポエチン存在下で、経時的にメチルセルロース培養し、ヒト血液細胞コロニー形成細胞の産生を検討した。形成されたヒト血液細胞コロニーについては、コロニー毎にサイトスピン標本を作製し、形態学的観察を行った。また、赤血球系コロニーについては、βグロビンを発現する赤血球の有無を、免疫染色により検討した。

(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. ヒト ES 細胞のマウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養における形態学的観察 (資料 1)

MEF で維持された未分化なヒト 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と、最初の培養 2-3 日の間は、ヒト ES 細胞は未分化な形態を維持しつつ増殖を続けたが、培養 3-5 日目頃より分化を開始した。特に、比較的小型の円形細胞は急速に増加、蓄積し、次第に膨隆するように増殖するようになった。培養 11-12 日目頃には、小型円形細胞を内包するような嚢胞状の cobble stone area (CSA) が出現し、その数は次第に増加した。

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系における RT-PCR による解析 (資料 2)

ヒト ES 細胞とマウス ES 細胞の共培養系において、培養 13 日目には、AFP、Nestin、LMO-2、KDR、c-kit、GATA-2 の発現は認められたが、未分化な ES 細胞のマーカである OCT-4、あるいは、未分化な内胚葉系細胞のマー

カーである Brachury の発現は認められなかった。

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系におけるフローサイトメトリーによる解析 (資料 3)

培養 14 日目のヒト ES 細胞とマウス ES 細胞の共培養系中には、ヒト CD34 を発現する細胞が $4.8 \pm 2.8\%$ (n=6) 存在した。その多くは、CD13、CD31 を発現していたが、一部の CD34+細胞は、CD45、c-Kit を発現していた。また、CD34-/GPA+細胞も認められた。

4. 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系におけるコロニーアッセイによる解析

マウス胎仔肝由来ストローマ細胞、あるいは NEF で維持された未分化なヒト ES 細胞をメチルセルロース培養しても、ヒト血液細胞コロニーは形成されなかった (資料 4)。

未分化なヒト ES 細胞をマウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養し、経時的に採取された培養細胞をコロニー培養しても、培養 10 日以前にはほとんど血液細胞コロニーは形成されなかった (資料 4)。しかし、培養 11-12 日以降の培養細胞では、多数の血液細胞コロニーが形成された

(資料5)。

形成されたコロニーを解析すると、顆粒球コロニー、マクロファージコロニー、顆粒球・マクロファージコロニー、赤血球コロニー、混合コロニー等、様々な血液細胞コロニーが形成されていた(資料6)。

血液細胞コロニー形成細胞は、培養12~15日に最もよく産生されたが、培養28日でもなお産生が認められた。

また、個々の赤血球コロニー、混合コロニーについて、赤血球に発現されている β グロビンを免疫染色により検討してみると、ほとんどのコロニーにおいて、 β グロビンを発現する赤血球が観察された(資料7)。このことは、本培養系で、ヒトES細胞から産生されるほとんどの赤血球系前駆細胞、および多能性造血前駆細胞は、二次造血を起源としていることを示している。

以上の結果より、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞を用いた共培養系により、ヒトES細胞から、二次造血を起源とする多能性造血前駆細胞を含む種々の造血前駆細胞が分化誘導されたことと考えられた。

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。

RT-PCRによる検討では、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と、培養13日目には、未分化なES細胞のマーカであるOCT-4の発現は消失していた。このことは、未分化なヒト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、次第に未分化性を失い、分化することを意味すると同時に、培養14日目以降の本培養系に、未分化なES細胞が残存している可能性は低いことを示している。

また、培養14日目のヒトES細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞な共培養中には、ヒトES細胞から産生されたと考えられるヒトCD34細胞が認められ、それらは内皮細胞のマーカばかりでなく、ヒトCD45のような血液細胞マーカも発現して

いた。また、CD34-細胞の中には、GPAを発現する赤血球系細胞も認められた。

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中の培養細胞のヒト血液細胞コロニー形成能を検討してみると、培養 10 日以前には、ヒト血液細胞コロニー形成細胞はほとんど認められなかったが、培養 11 日以降には種々のヒト血液細胞コロニー形成細胞が産生された。これらの中には、顆粒球コロニー形成細胞、マクロファージコロニー形成細胞、顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞、赤血球コロニー形成細胞、混合コロニー形成細胞等、様々な血液細胞コロニー形成が含まれており、このことより、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系により、多能性造血前駆細胞を含む種々の造血前駆細胞に分化誘導されたと考えられる。

特に、ほとんどの赤血球系前駆細胞、および多能性造血前駆細胞は、二次造血を起源としていることが明らかとなった。しかし、胎生期の二次造血の造血前駆細胞の中には、hematogenic endothelial cell から直接産生されるものが存在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。ただ、そうした造血前駆細胞の由来は別として、これらの前駆細胞のほとんどが、成人血液と同じく、二次造血を起源としているということは、本共培養系において分化誘導された血液細胞を、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、ヒト ES 細胞から産生された血液細胞が、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。

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できた。これらのヒト ES 細胞由来の造血前駆細胞の多くは、成人血液と同じ二次造血を起源としていることから、輸血用血液の新たな供給源となることが期待される。

F. 健康危険情報

該当なし。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(雑誌)

RAS-blocking bisphosphonate zoledronic acid inhibits the abnormal proliferation and differentiation of juvenile myelomonocytic leukemia cells *in vitro*.

Ohtsuka Y, Manabe A, Kawasaki H, Hasegawa D, Zaike Y, Watanabe S, Tanizawa T, Nakahata T, Tsuji K:
Blood 106: 3134-3141, 2005.

Definitive hematopoiesis from acetyl LDL incorporating endothelial cells in the mouse embryo.

Sugiyama D, Arai K, Tsuji K:
Stem Cells and Development 14: 687-696, 2005.

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 128: 805-812. 2005

Definitive hematopoiesis from endothelial cells in mouse embryo: A simple guidance.

Sugiyama D, Tsuji K:

Trends Cardiovas Med, in press.

Novel method for efficient production of multipotential hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells.

Ma F, Wang D, Hanada S, Ebihara Y, Kawasaki H, Zaike Y, Heike T, Nakahata T, Tsuji K:
Blood, in press.

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 19 : 175-180、2005.

造血幹細胞

辻浩一郎 :

最新医学 60 : 1695-1700、2005.

JMML に対するビスフォスフォネートの効果

大塚欣敏、辻浩一郎：

血液・腫瘍科 52：97-103、2006.

Embryonic stem cell の造血幹細胞移植への応用

辻浩一郎：

今日の移植 19：51-58、2006.

ヒト ES 細胞からの血液細胞の産生

辻浩一郎：

臨床血液、印刷中

末梢血幹細胞

辻浩一郎：

血液・腫瘍科、印刷中

がんの細胞療法

日本アフェレシス学会雑誌、印刷中

(著書)

遺伝子治療

辻浩一郎：

よく理解できる子どものがん一診療から看護ケアまで一、別所文雄、横森欣司編、永井書店（東京）：印刷中

臍帯血と胎生期造血

辻浩一郎：

臍帯血移植の基礎と臨床、浅野茂隆、

谷口克、中畑龍俊編、医学書院（東京）：印刷中

幹細胞をめぐる現状と展望

辻浩一郎：

Annual Review呼吸器 2007、工藤翔二、土屋了介、金沢実、大田健編、中外医学社（東京）、印刷中

2. 学会発表

(学会)

A novel method for the efficient production of multipotential hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells by co-culture with murine fetal liver-derived stromal cells.

Ma F, Wang D, Hanada S, Kawasaki H, Zaike Y, Heike T, Kitamura T, Nakahata T, Tsuji K:

47th Annual Meeting, American Society of Hematology,

Atlanta, December 10-13, 2005.

非血縁者間同種骨髄移植後の再発に対するドナーリンパ球輸注 (DLI) の臨床検討

河崎裕英、長谷川大輔、大塚欣敏、鶴田敏久、真部淳、海老原康博、辻浩一郎：

第 108 回日本小児科学会学術集会

東京、2005年4月22-24日

リンパ腫様肉芽腫症の1例
河崎裕英、内丸薫、高橋聡、東條有伸、辻浩一郎：
第47回日本臨床血液学会総会
横浜、2005年9月17-19日

JMMLにおける赤芽球系コロニー形成能の検討
長谷川大輔、真部淳、石川久実子、和田美夏、谷ヶ崎博、吉益哲、河崎裕英、海老原康博、中畑龍俊、辻浩一郎、
第47回日本臨床血液学会総会
横浜、2005年9月17-19日

若年性骨髄単球性白血病（JMML）における赤芽球系コロニー形成に対するビスフォスフォネート製剤の効果
大塚欣敏、浅野由美、金田由美、竹田洋樹、森田直子、長谷川大輔、河崎裕英、真部淳、辻浩一郎、谷澤隆邦：
第47回日本臨床血液学会総会
横浜、2005年9月17-19日

小児におけるリンパ腫様肉芽腫症
河崎裕英、辻浩一郎：
第47回日本小児血液学会総会
宇都宮、2005年11月25-27日

(シンポジウム・ワークショップ)

A novel method for the efficient production of multipotential hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells by co-culture with murine fetal liver-derived stromal cells.

Tsuji K:

12th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research.

Shao Xing, Nov 20-23, 2005.

A novel method for the efficient production of multipotential hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells by co-culture with murine fetal liver-derived stromal cells.

Ma F, Wang D, Hanada S, Kawasaki H, Zaike Y, Heike T, Kitamura T, Nakahata T, Tsuji K:

International Symposium on Germ Cells, Reprogramming and Embryonic Stem Cells.

Kyoto, Nov 10-13, 2005.

ヒト胚性幹細胞からの血液細胞の産生.

辻浩一郎：

第47回日本臨床血液学会総会シンポジウム「体性（胚性）幹細胞と再生医療：現状と将来展望」

横浜、2005年9月17-19日

造血幹細胞由来の繊維芽細胞とその前駆細胞.

海老原康博、榎屋正浩、南口仁志、辻浩一郎、小川真紀雄：

第 67 回日本血液学会総会ワークショップ「造血幹細胞とその分化」
横浜、2005 年 9 月 17-19 日

米 国 プ ロ ビ ジ ュ ア ル 出 願
(60/728,665)

Method of producing multipotential hematopoietic progenitors.

Kohichiro Tsuji, Feng Ma:
平成 1 7 年 1 0 月 1 9 日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

2. 実用新案登録

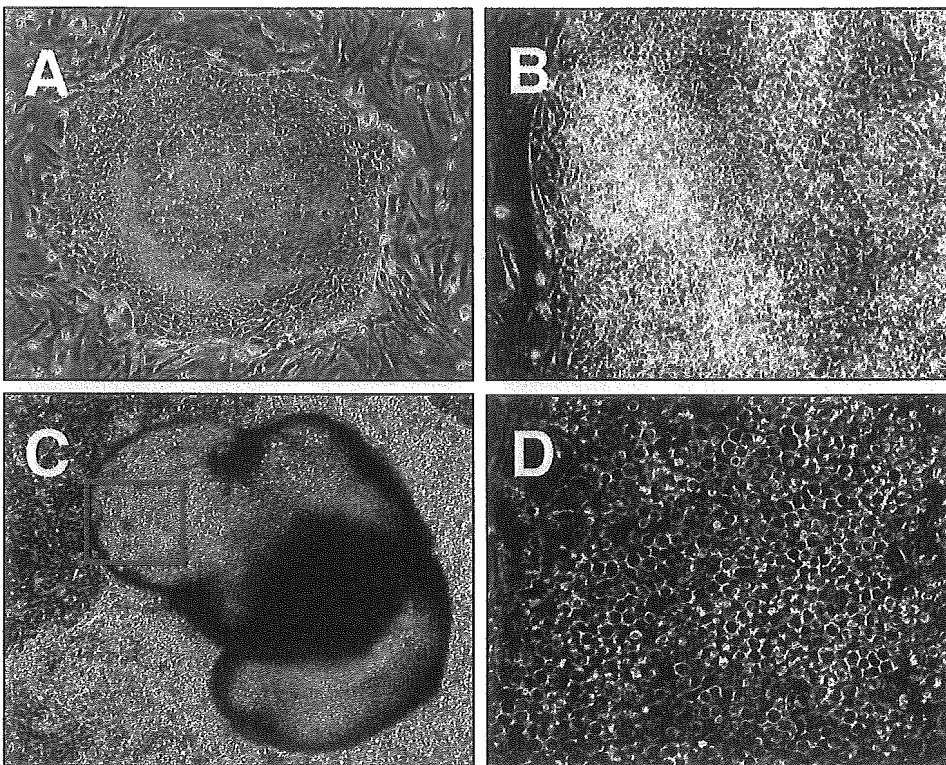
該当なし。

3. その他

該当なし。

(資料1) マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養されたヒト ES 細胞

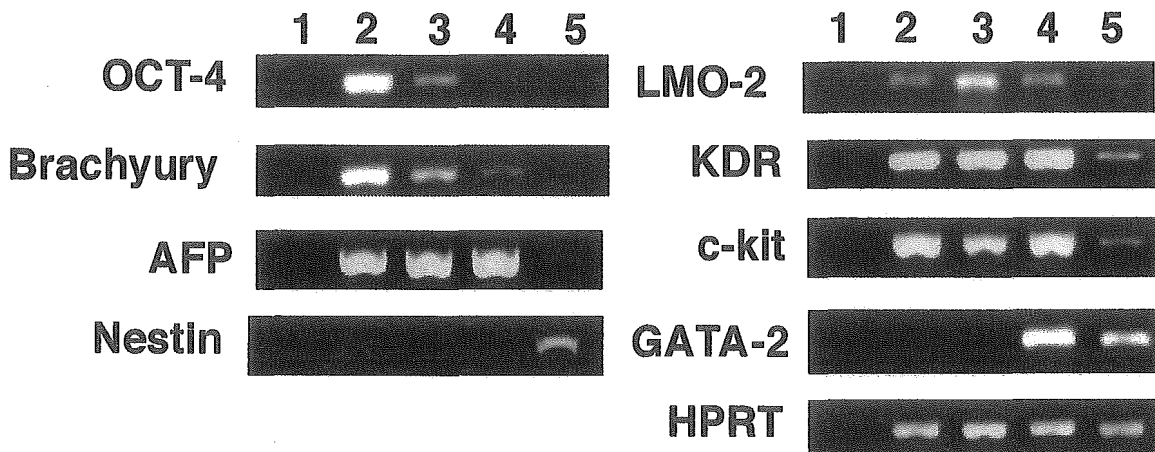
- A. 培養3日目のヒト ES 細胞
- B. 培養5日目のヒト ES 細胞
- C. 培養12日目のヒト ES 細胞
- D. 培養12日目の観察された cobblestone area (Cの赤線で囲まれた四角形の部分) を強拡大したもの



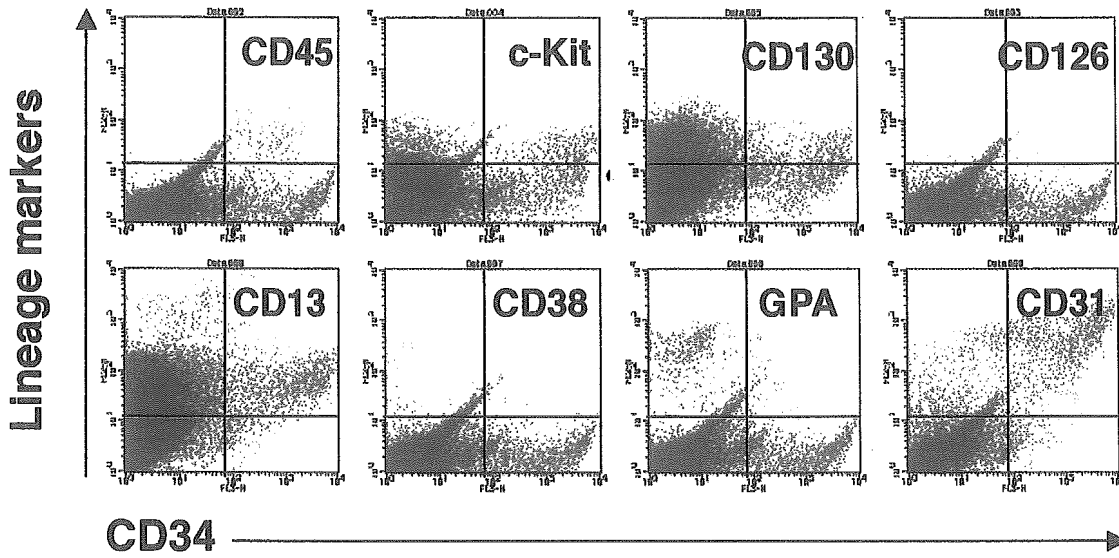
(資料2) ヒト ES 細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞の共培養における RT-PCR による解析

Lane 1: no transcripts

- 2: MEF で維持された未分化なヒト ES 細胞
- 3: マウス胎仔肝由来ストローマ細胞で 5 日間共培養されたヒト ES 細胞
- 4: マウス胎仔肝由来ストローマ細胞で 9 日間共培養されたヒト ES 細胞
- 5: マウス胎仔肝由来ストローマ細胞で 13 日間共培養されたヒト ES 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中の培養細胞のフローサイトメトリーによる検討 (培養 14 日目)



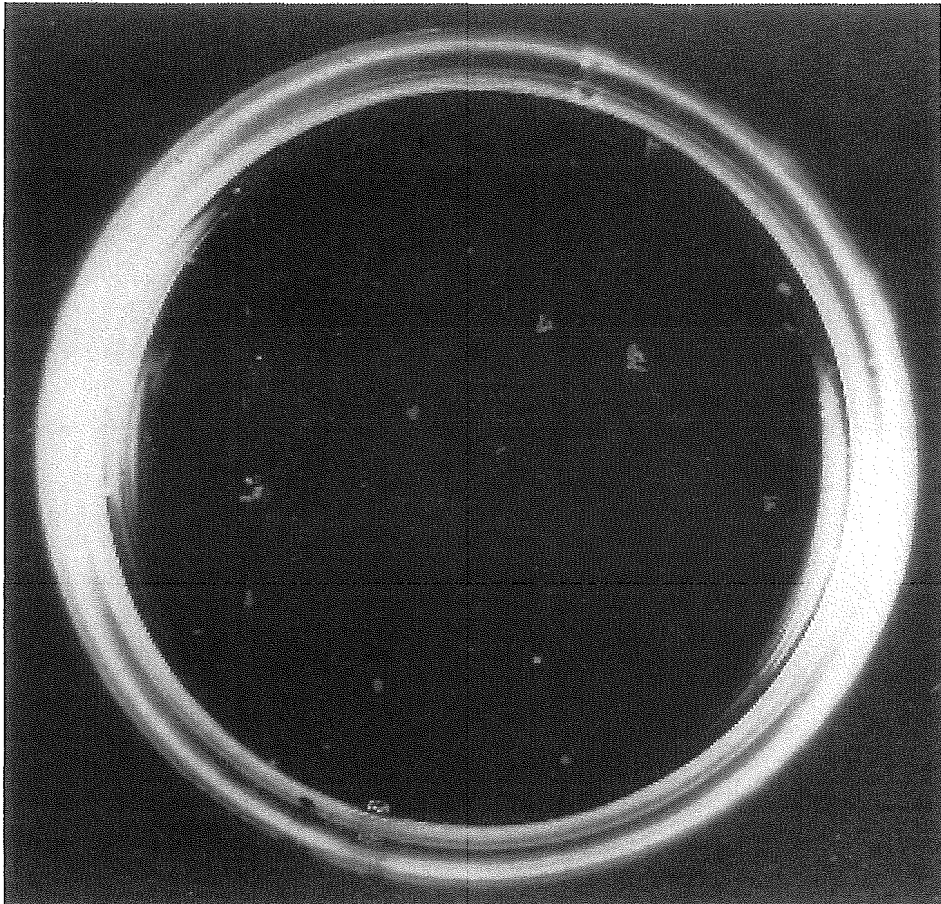
(資料4) マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養されたヒト ES 細胞による血液細胞コロニー形成の解析

Days in culture	Colonies					
	G	M	GM	E	Mix	Total
<u>mFLSC alone</u>						
	0	0	0	0	0	0
<u>Co-culture with mFLSC</u>						
Day 0	0	0	0	0	0	0
Day 8	0	1.2±0.4	0	0	0	1.2±0.4
Day 15	5.4±1.7	60.6±4.1	32.5±7.5	6.6±3.0	9.4±2.5	114.5±7.0

Each value shows the mean ± SD of colony numbers formed from 2×10^5 cells.

Abbreviations: G, granulocyte; M, macrophage, GM, granulocyte-macrophage; E, erythroid; and Mix, mixed lineage colonies.

(資料5) マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養されたヒトES細胞による
血液細胞コロニー形成

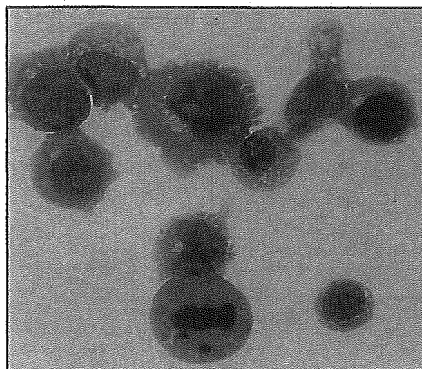
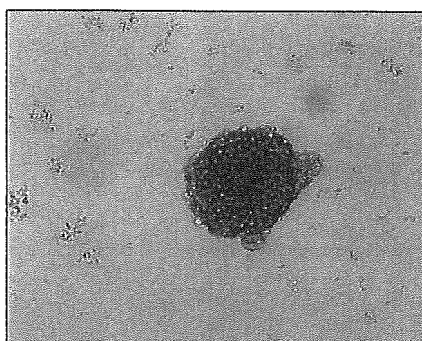


(資料6) マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養されたヒト ES 細胞による血液細胞コロニー形成

(上段) 倒立顕微鏡下での観察

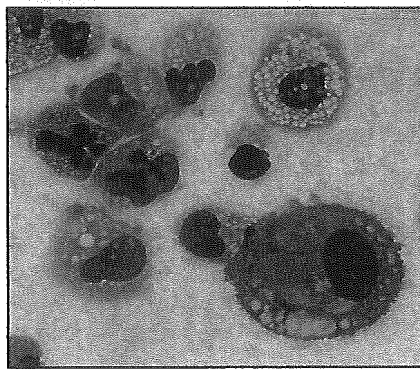
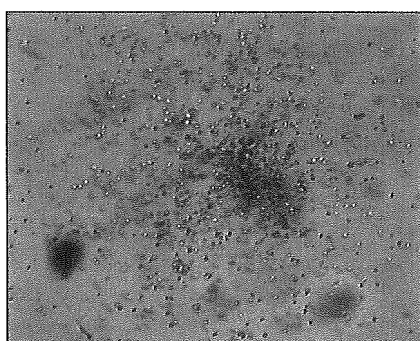
(下段) サイトスピン標本での観察

赤血球コロニー



顆粒球・マクロファージ

コロニー



混合コロニー

