

G. 研究発表

1. 論文発表

1, Sugiyama D, Kulkeaw K, Mizuochi C, Horio Y, Okayama S.

Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver erythropoiesis through cytokine production.

**Biochem Biophys Res Commun**(in press).

2, Inoue T, Kulkeaw K, Okayama S, Tani K and Sugiyama D.

Variation in Mesodermal and Hematopoietic Potential of Adult Skin-derived Induced Pluripotent Stem Cell Lines in Mice.

**Stem Cell Reviews and Reports** (in press).

3, Kulkeaw K, Ishitani T, Kanemaru T, Ivanovski O, Nakagawa M, Mizuochi C, Horio Y, Sugiyama D.

Cold exposure down-regulates zebrafish pigmentation.

**Genes to Cells** 16(4): 358-367, 2011

4, Inoue T, Sugiyama D, Kurita R, Oikawa T, Kulkeaw K, Kawano H, Miura Y, Okada M, Suehiro Y, Takahashi A, Marumoto T, Inoue H, Komatsu N, and Tani K.

APOA-1 is a novel marker of erythroid cell maturation from hematopoietic stem cells in mice and humans.

**Stem Cell Reviews and Reports**. 7(1): 43-52, 2011

5, Sasaki T, Mizuochi C, Horio Y, Nakao K, Akashi K and Sugiyama D.

Regulation of hematopoietic cell clusters in the placental niche through SCF/c-Kit signaling in embryonic mouse.

**Development**.137(23): 3941-3952, 2010, Selected for cover image.

2. 学会発表

(国際学会)

1, 杉山大介

Haematopoietic development in mice and implications for haematotherapy  
The 3<sup>rd</sup> International Conference on Thalassemia in China  
November 4-6, 2010, China

口頭発表 (招待講演)

(国内学会)

1, Kulkeaw, Kasem、石谷太、金丸孝昭、水落ちよ、堀尾有可、Ognen Ivanovski、  
Suthat Fucharoen、横尾朋子、杉山大介

Cold exposure down-regulate zebrafish erythropoiesis and pigmentation.  
第72回日本血液学会学術集会総会、横浜、2009年9月26日  
口頭発表

2, 堀尾有可、Kulkeaw, Kasem、水落ちよ、小川峰太郎、杉山大介

Variation in hematopoietic potential of induced pluripotent stem cell  
lines.

第72回日本血液学会学術集会総会、横浜、2009年9月24日  
ポスター発表

3, 水落ちよ、佐々木達哉、堀尾有可、バトツエツエグ・バトチュルウン、ロド  
リー・ジョーンズ、  
杉山大介

マウス胎盤ニッチより産生される SCF による造血細胞クラスターの制御  
第72回日本血液学会学術集会総会、横浜、2009年9月24日  
ポスター発表

4, 杉山大介、疋田隼人、Kulkeaw, Kasem、水落ちよ、堀尾有可、Jones, Rhodri、  
竹原徹郎

胎生期肝臓における造血・血管新生制御

第72回日本血液学会学術集会総会、横浜、2010年9月24日  
口頭発表

5, 井上朋子、杉山大介、栗田良、Kulkeaw Kasem、三浦由恵、水落ちよ、堀  
尾有可、小松則夫、谷憲三朗

APOA-1はマウス、ヒトにおいて造血幹細胞から赤血球への新しい成熟マーカー  
である

第72回日本血液学会学術集会総会、横浜、2010年9月25日  
ポスター発表

6, 杉山大介

造血発生システムの動作原理に基づく新規再生医療法の開発  
第23回セルセラピーセミナー、前橋、2010年6月25日  
口頭発表（特別講演）

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

発明の名称：造血幹細胞の増殖促進剤およびペプチド、ならびに造血幹細胞の増幅法（特願 2009-224088）

発明者：杉山大介

出願人：九州大学

出願日：2009年9月29日

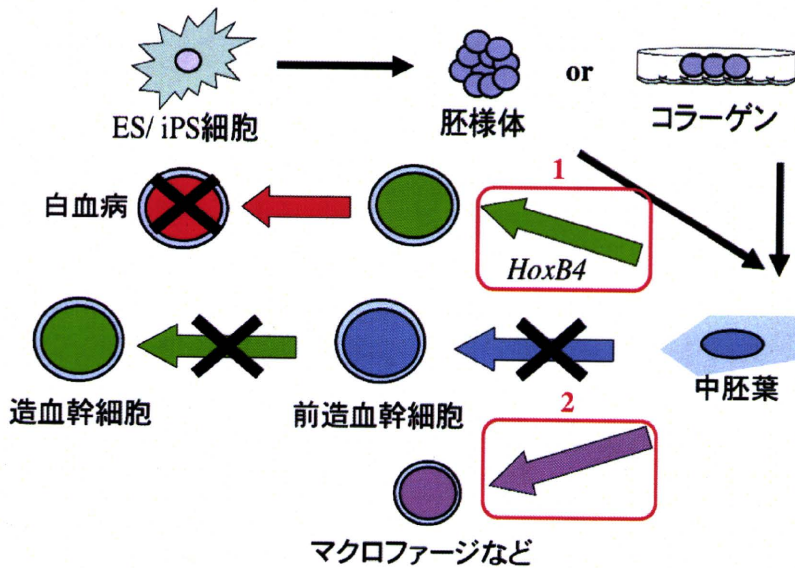
2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

<図1>



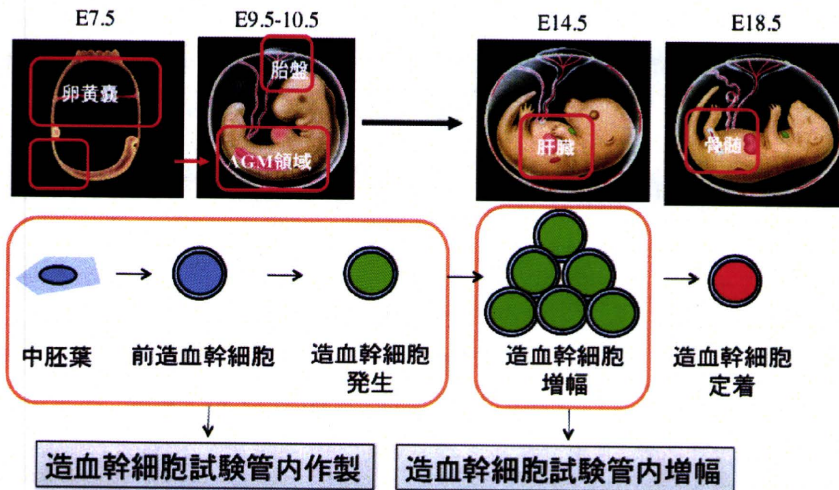
<図1:造血幹細胞作製における問題点>

多能性幹細胞であるES/iPS細胞から胚様体形成法やコラーゲンコーティングしたディッシュを用いた2次元培養法により、造血幹細胞の祖先である中胚葉系細胞を誘導可能である。

ボックス1: *HoxB4* 遺伝子を導入すると造血幹細胞に近い細胞を誘導可能であるが、白血病発症の危険性がある。

ボックス2: 多能性幹細胞は胎仔の細胞であり、胎仔型の血球であるマクロファージなどへ分化しやすい。

<図2>



\*AGM: Aorta- Gonad- Mesonephrosの略  
E: Embryonic dayの略(胎齢)

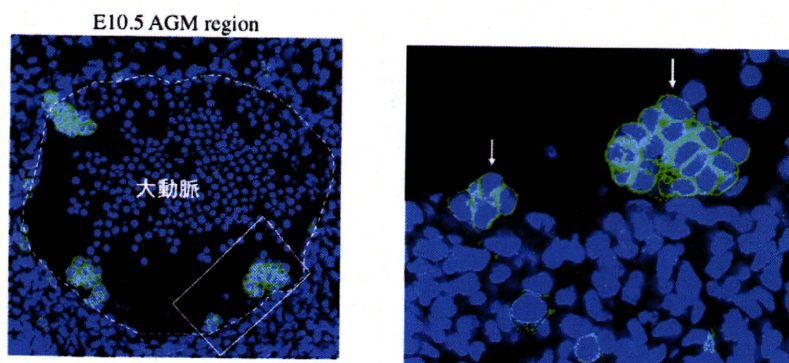
(Sugiyama & Tsuji. Trends Cardiovasc Med, 2006)

<図2:マウス造血発生のシエーマ>

胎齢初期～中期(E7～E11)において、卵黄囊、AGM領域、胎盤において造血幹細胞は発生する。

胎齢中期以降は、肝臓において造血幹細胞は増幅し、最終的に骨髄へ移動・定着する。

<図3>



Green : c-Kit 造血幹細胞マーカー  
Blue : TOTO-3 核

**図3:造血幹細胞クラスター**  
胎齢10.5日目AGM領域の免疫染色。  
c-Kit陽性の造血幹細胞クラスターが観察される。



<図4>

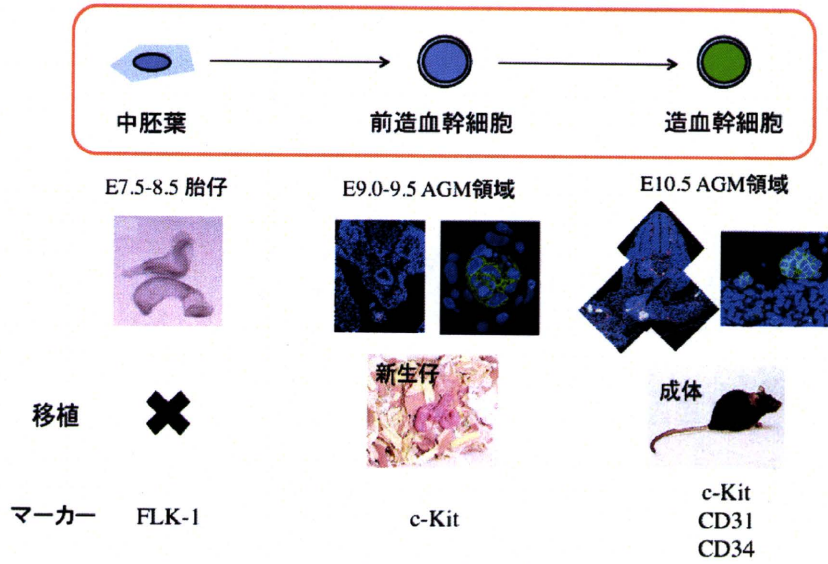


図4: 造血幹細胞の発生過程における性質変化

中胚葉系細胞は前造血幹細胞を経由して造血幹細胞へ分化する。

前造血幹細胞は新生仔へ移植すると骨髄を再構築するが、成体へ移植しても再構築しない。

一方、造血幹細胞は新生仔、成体両者の骨髄を再構築する。



<図5>

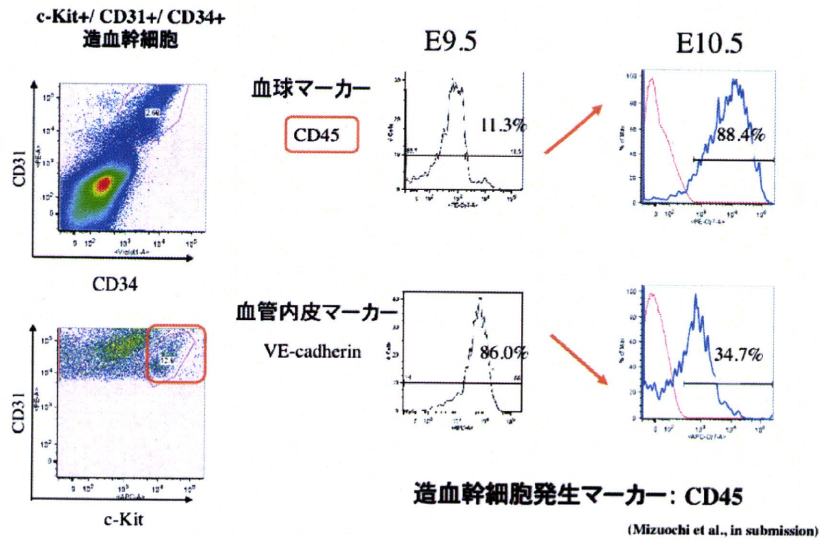
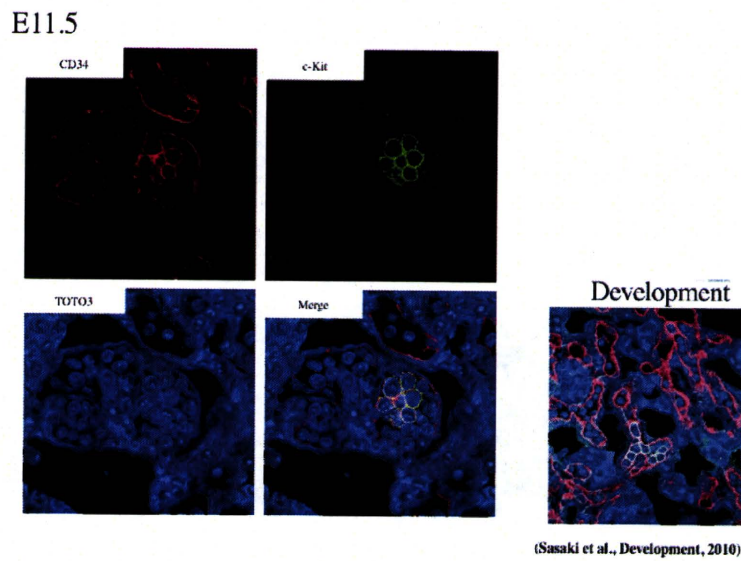


図5: 前造血幹細胞から造血幹細胞への成熟

造血幹細胞発生部位であるマウス胎仔AGM領域のFlow cytometry解析を行った。

胎齢9.5日目AGM領域の前造血幹細胞、胎齢10.5日目AGM領域の造血幹細胞はc-Kit(+)/CD31(+)/CD34(+)細胞と定義が可能である。胎齢9.5日目から10.5日目にかけて、c-Kit(+)/CD31(+)/CD34(+)細胞集団では血球マーカーであるCD45の発現が亢進し、血管内皮マーカーであるVE-Cadherinの発現が低下した。

<図6>

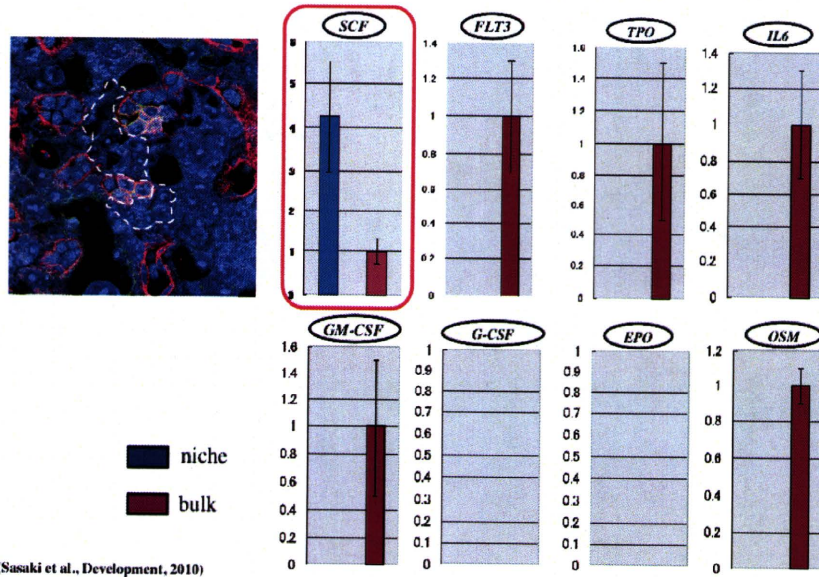


**図6: 胎盤造血幹細胞クラスター**

胎齢11.5日目胎盤の免疫染色を行い、造血幹細胞クラスターを可視化する事に成功した。

胎盤造血幹細胞はc-Kit陽性、CD34陽性である事が明らかになった。

<図7>



(Sasaki et al., Development, 2010)

図7: ニッチ細胞が発現するSCFによる造血幹細胞発生制御

胎盤造血幹細胞の周囲を取り囲むニッチ細胞をレーザーマクロダイセクション法で採取し、細胞刺激因子の発現を検討したところ、SCFのみ発現している事が明らかになった。

<図8>

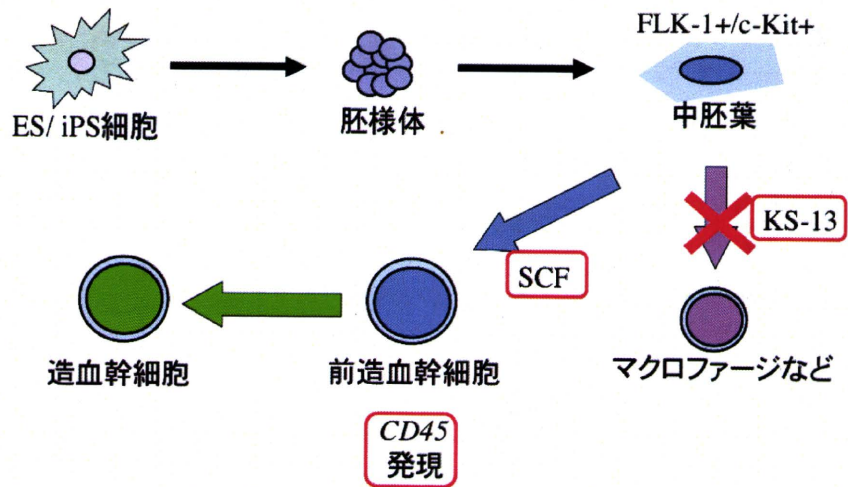


図8: 遺伝子導入法を用いない造血幹細胞作製の戦略

研究成果の蓄積から、造血幹細胞作製にはSCFが重要な事、またCD45の遺伝子発現が造血幹細胞発生のマーカーとして有効な事が明らかになった。

更に、KS-13が骨髄球系分化を抑制する事から図1の問題点を回避すべく、新規造血幹細胞作製の戦略を考案した。



<図9>

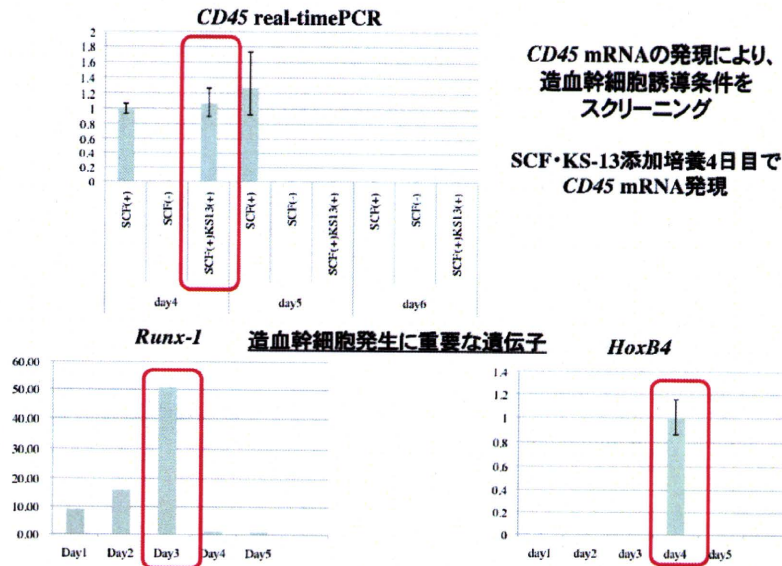


図9: KS-13添加培養後の遺伝子発現

図8のストラテジーに準じてマウス胚性幹細胞から胚様体形成法によりFlk-1(+)-c-Kit(+)-中胚葉系細胞を誘導し、Flow cytometryで純化・採取した。これらをKS-13・SCF添加無血清培地X-VIVO10で培養し、CD45 mRNAの発現を指標に培養の最適化を行った。培養4日目でCD45 mRNAを発現する。また、造血幹細胞発生直前に上昇するRunx-1遺伝子発現が3日目で上昇し、造血幹細胞誘導に有効だったHoxB4遺伝子発現が4日目で一過性に上昇する。

<図10>

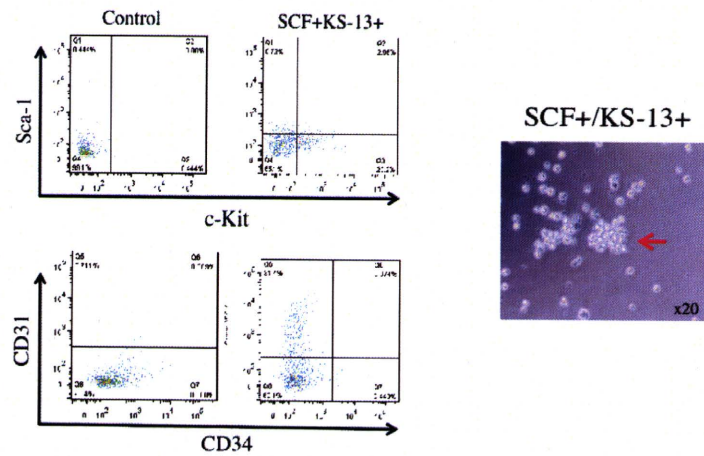
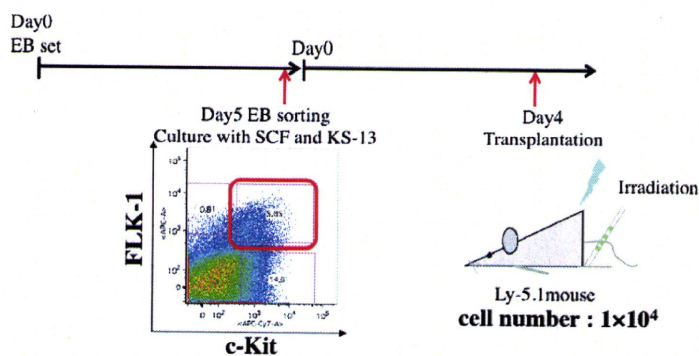


図10: KS-13添加培養後のFlow cytometry解析

KS-13添加培養4日目では、一部の細胞がクラスターを形成した(右図)。これらの細胞をFlow cytometry法で解析したところ、胎仔造血幹細胞のマーカーであるc-Kit及びCD31陽性細胞が検出された。

<図11>



EB (胚様体形成): BRC5細胞株(C57BL6由来)使用。  
Sorting: 胚様体形成5日目。E-cad-/Flk-1+/c-Kit+細胞純化・採取。  
造血幹細胞誘導: SCF(20ng/mL)、KS-13(100 $\mu$ g/mL)添加X-VIVO10培地使用。  
移植: 誘導培養4日目。レシピエントにLy-5.1マウス使用。

#### 図11: ES細胞由来造血幹細胞作製法プロトコール

マウス胚性幹細胞から胚様体形成法によりFlk-1(+)c-Kit(+)中胚葉系細胞を誘導し、5日目にFlow cytometryで純化・採取した。これらをKS-13・SCF添加無血清培地X-VIVO10で培養し、培養4日目の細胞を放射線照射したレシピエントマウスへ移植した。



<図12>

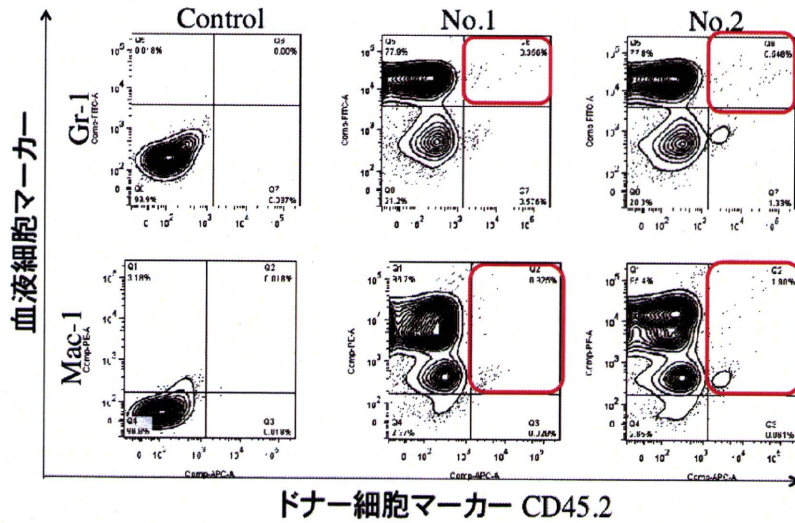


図12: ES細胞由来造血幹細胞:骨髄球

KS-13添加培養により得られた細胞を放射線照射したレシピエントLy5.1マウスへ移植し、移植2-3ヶ月後に末梢血をFlow cytometry法により解析した。

ドナー細胞のマーカーであるCD45.2を発現し、かつ骨髄球マーカー(Gr-1, Mac-1)を発現する細胞が末梢血中で確認された(赤枠がES細胞由来血球)。

<図13>

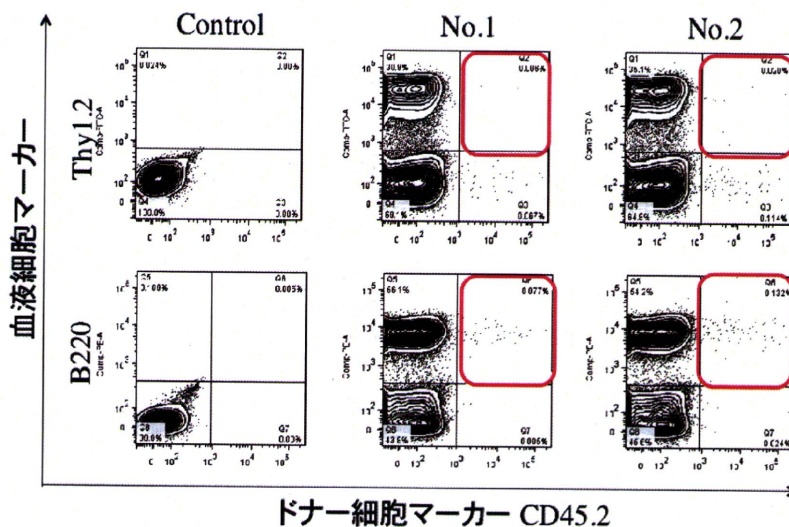


図13:ES細胞由来造血幹細胞:リンパ球

図12と同様に、KS-13添加培養により得られた細胞を放射線照射したレシピエントLy5.1マウスへ移植し、移植2-3ヶ月後に末梢血をFlow cytometry法により解析した。

ドナー細胞のマーカーであるCD45.2を発現し、かつリンパ球マーカー(Thy1.2, B220)を発現する細胞が末梢血中で確認された(赤枠がES細胞由来血球)。

<図14>

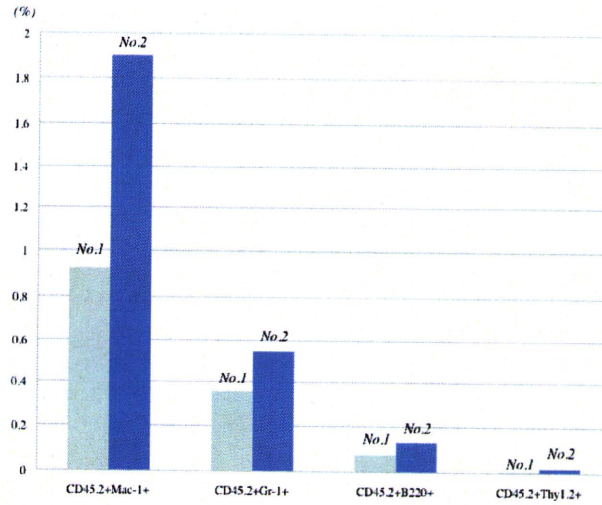
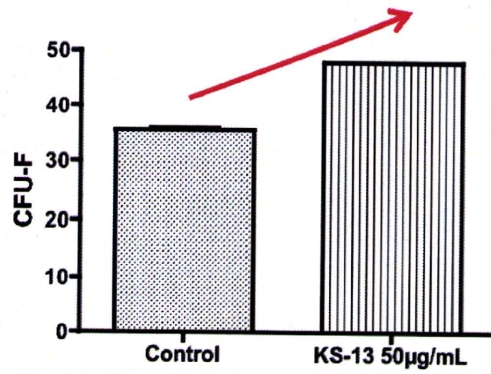


図14:ES細胞由来造血幹細胞:再構築率

図12、13の解析から、各々の白血球分画再構築率を比較した。

骨髓球(Gr-1, Mac-1)の再構築率はリンパ球(Thy1.2, B220)の再構築率よりも高い事が明らかになった。

<図15>



Colony Number/  $2 \times 10^7$  mouse bone marrow cells

**図15:KS-13による間葉系幹細胞の増幅**

マウス骨髄細胞をMesencult (StemCells社)で培養し、間葉系幹細胞の指標であるCFU-Fの評価を行った。

コントロールと比較し、KS-13添加群ではCFU-Fを1.4倍増幅する事が明らかになった。



<図16>

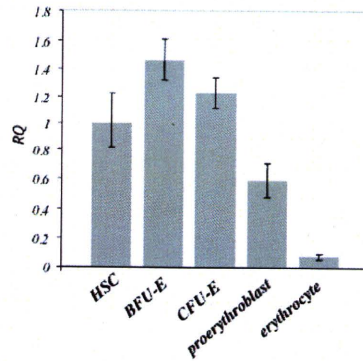


図16: マウス胎仔肝臓の赤血球分化における *Hmgn2* 発現

定量リアルタイムPCR法による *Hmgn2* mRNA 発現を評価した。Y軸は *b-actin* で補正した遺伝子発現の相対量を示す。造血幹細胞/HSC (CD45+/Sca-1+/c-Kit+), BFU-E (Sca-1-/c-Kit+/CD71-/Ter119-), CFU-E (Sca-1-/c-Kit+/CD71+/Ter119-), 前赤芽球 (Sca-1-/c-Kit-/CD71+/Ter119+), 成熟赤血球 (Sca-1-/c-Kit-/CD71-/Ter119+)。造血幹細胞がBFU-Eに分化する過程で *Hmgn2* 発現レベルはわずかに増加した (~1.4倍) が、赤芽球系細胞の分化後期では徐々に減少した。BFU-EおよびCFU-Eでの *Hmgn2* 発現は、成熟赤血球に比べて、14-12倍高かった。