

# 多能性幹細胞を用いた新規血球分化系の構築に関する研究

研究分担者 中畑 龍俊 京都大学 iPS 細胞研究所 副所長・教授

## 研究要旨

造血幹細胞移植は多くの原発性免疫不全症に対する根治的治療法であるが、疾患により前処置の方法、移植後合併症、GVHD の制御などが異なり、移植成績の向上のためには各疾患の病態解明が必須と考えられている。我々は、健常人あるいは患者の皮膚、末梢血から iPS 細胞を作成し、この細胞から免疫担当細胞を含む各種血球系に分化させる系の構築を行い、複数の免疫不全症の疾患解析を開始している。さらに、将来的に移植のソースとして多能性幹細胞由来血球細胞を用いることを目標に、血球分化系の改善に取り組んでいる。

本年度は、血球分化系の改善として、従来より開発している二次元の無血清、フィーダー細胞を用いない血球分化法を拡張し、新たなスキャフォールドを用いた 3 次元培養法を確立した。PET 線維で補強したコラーゲンスポンジを基材として用いることにより、従来の血球系と異なり、細胞クラスターでなく単一細胞を播種して血球分化を開始することが可能となった。また、この系には、長期間の培養が可能になり、電子顕微鏡による解析では、ニッシュ細胞と血球細胞が 3 次元スキャフォールド上でつつしえを構築していることが明らかになった。この系を応用することにより、ニッシュ細胞と血球細胞のマウスへの同時移植や、血球系細胞の大量培養が可能になると期待される。

## A. 研究目的

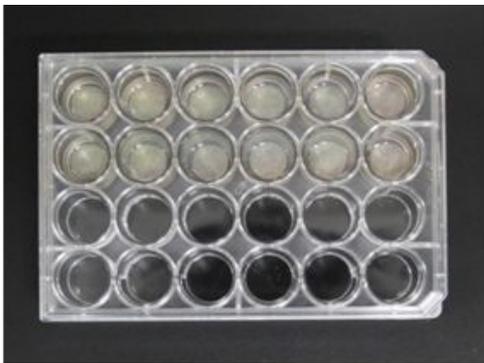
造血幹細胞移植は多くの原発性免疫不全症に対する根治的治療法であるが、疾患により前処置の方法、移植後合併症、GVHD の制御などが異なり、移植成績の向上のためには各疾患の病態解明が必須と考えられている。我々の研究は、健常人あるいは患者の皮膚、末梢血から iPS 細胞を作成し、この細胞から免疫担当細胞を含む各種血球系に分化させる系の構築を行い、複数の免疫不全症の疾患解析を行うことにより、移植医療の最適化に資することのできる病態解析データを蓄積することを目的

としている。また、将来的に移植のソースとして多能性幹細胞由来血球細胞を用いることを目標に、血球分化系の改善に取り組んでいる。

これらの目的のためには、iPS 細胞より多くの血球系細胞を安定して確保することが必要であるが、従来の方法では限界があった。そこで、本年度は、既存の二次元培養法を拡張し、3 次元のコラーゲンスポンジ中で血球分化を行い、擬似的にスキャフォールド内でニッシュを構築する系を確立することを試みた。

## B. 研究方法

ヒト ES/iPS 細胞コロニーをコラゲナーゼで解離し、非接着培養用に処理した培養皿で浮遊培養を行う。基礎培地としては主に臍帯血の ex vivo 増幅に用いられる無血清培地を用いる。サイトカインは主に ES/iPS 細胞の中胚葉分化に VEGF、造血分化に SCF, TPO, FL, IL3, EPO を用い、それらの濃度と投与期間を変えて検討した。3 次元スキャフォールドとして、PET 繊維補強コラーゲンスポンジ (PETcol-24W) を MedGEL CO., LTD から購入して使用した。



24穴プレートで培養中のCS

(倫理面への配慮)

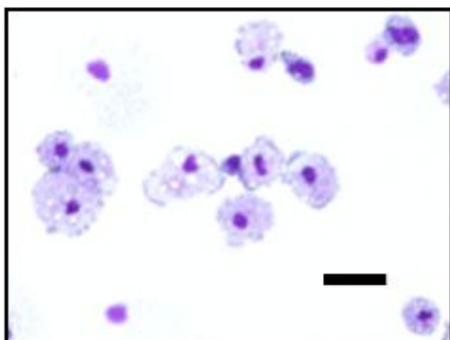
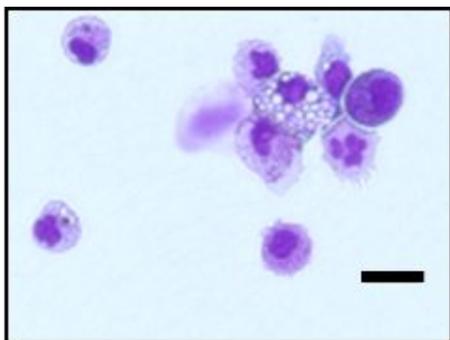
尚、iPS 細胞に関する本研究における患児の遺伝子情報の取り扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”及び文部科学省研究振興局長通知に定める細則に沿って、京都大学医の倫理委員会の審査承認を受けている(実施責任者:中畑龍俊、当初承認日:平成 20 年 6 月 4 日、変更・追加承認日:平成 24 年 7 月 19 日)が、人権及び利益の保護について、十分配慮しながら実験を行った。患者からの疾患関連 iPS 細胞作製にあたり、「ヒト疾

患特異的 iPS 細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究」について、京都大学医の倫理委員会の承認を頂いている(実施責任者:中畑龍俊、当初承認日:平成 20 年 6 月 4 日、変更・追加承認日:平成 24 年 7 月 19 日)。

## C. 研究結果

最初に、我々が以前に開発した二次元・マトリゲル上の血球分化系(以下 2D-MG 系)を応用して、CS 上の血球分化を行えるかを検討した。すると、従来の方法と同様に、Day 6 の flow cytometry では、KDR+CD34+の中胚葉系の血球前駆細胞と考えられる分画が生じていた。その割合は、クローン毎に様々であったが、2D-MG 法と同程度であった。

次に、上述の造血前駆細胞分画から各種血球細胞を得るために幾つかのサイトカインの組み合わせを用いて血球分化を行った。概ね day 20 頃からスポンジから浮遊細胞の出現が顕著になり、well の底に溜まっていく。これらの細胞は、スポンジを取り出して残りの培養上清を遠心することにより簡単かつ繰り返し回収することができる。得られた血球細胞の細胞表面マーカーと形態を観察すると、サイトカインカクテルの組み合わせにより、好中球系細胞、単球系細胞あるいは赤芽球系細胞を作り分けることが可能であった。



好中球様細胞(上)と  
単球様細胞(下)

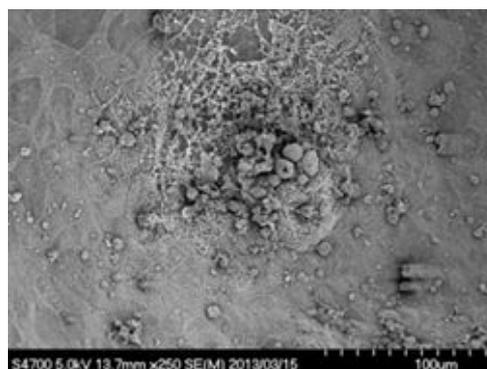
中胚葉・血球分化系は共培養や胚様体形成が必要で、Single-cell にばらした状態からフィーダーフリーで血球分化させるのは困難である。しかし、分化能の定量化や手技の簡略化のためには、Single cell にしたPSCから分化が行えることが望ましい。そこで、接着しているiPS細胞を単一細胞に解離してCSに撒いて分化が可能かを検討した。この場合も、Day 6のflow cytometryでは、KDR low ~ + CD34+の分画が出現していた。さらに、Day 20頃からCSから浮遊細胞が遊離しており、これらはCD43+CD45+の血球系細胞であることが確認された。CSの内部構造を確認するため、走査電顕でCSを観察したところ、一部で、円柱あるいは扁平上皮が細胞集簇して平面を形成し、その一部から球形の細胞が敷石状に萌出している部分を認めた。また、

PET 繊維に円形の細胞が集団を形成している部分を認めた。

#### D. 考察

このような3次元スカフォールドを用いた多能性幹細胞からの血球分化系は過去に報告がない。この系では、ニッチェを構成する基質と細胞が一塊となって形成され、血球分化を支持しているように見える。この分化系は、従来の2D-MG系などに比べて長期間維持が可能であることや、ニッチェと血球系前駆細胞を一塊として可搬性のある基材上で誘導できることから、複数のCSを浮遊培養に持ち込むことにより大量の血球細胞を継続的に得ることが可能になるかもしれない。また、ニッチェと血球系前駆細胞を一塊として免疫不全マウスに移植するという応用も考えられる。

もちろん現時点ではニッチェの機能は不十分ではあるものの、今後改善を重ねて、系を改良することにより、より有用な系が開発できるものと期待される。



ニッチェ細胞上の  
血球様細胞

## E. 結論

免疫不全疾患の解析や移植実験に有用な、新たな多能性幹細胞からの分化誘導系を開発することができた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T. Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica*. 2013 Aug;23:98: doi 10.3324/haematol.2013.083873.
- 2) Saida S, Watanabe KI, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T.: Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood*, 121:4377-87, 2013.
- 3) Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK: Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell-free conditions. *PLoS ONE*. 4/3/2013; 8(4): e59243. doi:10.1371/journal.pone.0059243.
- 4) Tomizawa D., Akio Tawa A., MD/PhD, Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe K., Nakahata T., Adachi S.: Excess reduction of anthracyclines results in inferior event-free survival in core binding factor acute myeloid leukemia in children; a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). *Leukemia* doi:10.1038/leu.2013.153.
- 5) Nakazawa Y., Saito S., Yanagisawa R., Suzuki T., Toshiro Ito T., Ishida F., Muramatsu H., Matsumoto K., Kato K., Ishida H., Umeda K., Souichi Adachi S., Nakahata T., Koike K.: Recipient seropositivity for adenovirus type 11 is a highly predictive factor for the development of AdV11-induced hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 48:737-739, 2013.
- 6) Kodera Y, Yamamoto K, Harada M, Morishima Y, Dohy H, Asano S, Ikeda Y, Nakahata T, Imamura M, Kawa K, Kato S, Tanimoto M, Kanda Y, Tanosaki R, Shiobara S, Kim SW, Nagafuji K, Hino M, Miyamura K, Suzuki R, Hamajima N, Fukushima M, Tamakoshi A; for the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Halter J, Schmitz N, Niederwieser D, Gratwohl A.: PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Sep 30. doi: 10.1038/bmt.2013.147. [Epub ahead of print].
- 7) Honda Y, Tsuchida M., Zaike Y, Masunaga A, Yoshimi A, Kojima S, Ito M, Kikuchi A, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic leukemia who

developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology (JSPHO). Brit. J. Haematol. 2013 In press.

- 8) 斎藤潤、中畑龍俊：疾患特異的iPS細胞。再生医療12(1):19-29,2013.

## 2. 学会発表

(海外)

- 1) Suzuki N., Hira A., Niwa A., Matsuo K., Takata M., Yabe M., Nakahata T., Saito M.: Mesodermal development from reprogrammed Fanconi anemia cells is affected by ALDH2 enzymatic activity. 11th Annual Meeting of international Society for Stem Cell Research (ISSCR). 7/12-7/15, Boston, MA, USA.

(国内)

- 1) 中畑龍俊：特別講演、iPS細胞研究が切り開く未来の医療。日本学術会議公開学術講演会「未来社会を築く生命科学と医療のフロンティア」2013年8月3日 京都大学薬学部記念講堂。
- 2) 中畑龍俊：特別講演、さい帯血造血幹細胞発見秘話とiPS細胞ストックの臍帯血活用の未来像。さい帯血移植1万例突破記念事業「さらなる飛躍へのステップ」記念講演会 2013年9月28日 TKP田町カンファレンスセンター。
- 3) 中畑龍俊：特別講演、iPS細胞の小児医療への応用。第38回東日本小児科学会 2013年11月23日 大宮ソニックシティ(さいたま市)。
- 4) 中畑龍俊：教育講演、iPS細胞の臨床応用。第55回日本小児血液・がん学会学術集会。2013年11月29日-12月1日(30日) ヒルトン福岡シーホーク。
- 5) 中畑龍俊：基調講演、iPS細胞を用いた今後の医療の可能性。日本製薬医学会第4回年次大会 2013年7月19日 エーザイ株式会社本社5階ホール(塩野義製薬)。

- 6) 中畑龍俊：基調講演、iPS細胞を活用した医療の可能性と倫理。第10回STSフォーラム「科学技術が拓く人間の未来」公開シンポジウム 2013年10月5日 京都商工会議所ビル講堂。

- 7) 横山宏司、西小森隆太、池谷真、那須輝、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男：罹患者由来iPS細胞を用いたCINCA症候群における関節病態の分子機構の解明。第34回日本炎症・再生医学会 2013年7月2-3日(ポスター) 国立京都国際会館。

- 8) Hasegawa D., Hama A., Nozawa K., Salaguchi H., Yabe M., Ito E., Ito M., Kojima S., Nakahata T., Manabe A.: Hematological and morphological characteristics of inherited bone marrow failure syndromes(IBMFS). The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2013年10月11 - 13日(12日) さっぽろ芸文館。

- 9) Honda Y., Tsuchida M., Masunaga A., Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 17 children with JMML who developed blast crisis. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology(第75回日本血液学会学術集会) 2013年10月11 - 13日(12日) 札幌市教育分化学会館

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし