

論文内容の要旨

論文題目 テラトーマ形成を介した人工多能性幹細胞からの 機能的な造血幹細胞の分化誘導

氏名 鈴木 奈穂

【背景】

現在、白血病やその他の血液疾患について造血幹細胞移植が有効な治療手段として用いられているが、一方で造血幹細胞移植は慢性的なドナー不足などの深刻な問題を抱えている。そのため、再生医療の分野では体外で造血幹細胞を増殖させる技術や造血幹細胞を誘導する技術の開発に期待が寄せられている。しかし、機能的な造血幹細胞を *ex vivo* で無限に増殖させることは未だに困難である(1)。

近年、体細胞のダイレクトリプログラミング技術は、患者自身から胚性幹細胞 (Embryonic stem cells : ES 細胞)とほぼ同等の能力を持つ多能性細胞を樹立することを可能にした(2)。この人工多能性幹細胞 (Induced pluripotent stem cells : iPS 細胞) は、自己複製能と増殖能を合わせ持ち、様々な血液細胞にも分化することが可能である。従って、iPS 細胞を *in vitro* で造血幹細胞に誘導できる技術を開発すれば、骨髄や臍帯血に替わる新たな移植ソースとして血液疾患の治療に用いることができる。これまでに、*in vitro* において、ES 細胞から造血幹細胞への分化誘導に関する知見は多数報告されている。しかし遺伝子を導入することなく ES/iPS 細胞から移植可能な造血幹細胞を分化誘導した例はない。

そこで我々は、造血幹細胞の誘導方法としてテラトーマに着目した。テラトーマは、ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞を免疫不全マウスに移植した際に得られる良性腫瘍であり、三胚葉系の様々な組織へ分化した細胞が含まれている。既に過去の知見により、テラトーマやテラトカルシノーマの中には ES 細胞由来の赤血球、巨核球などが形成されることが報告されている(3, 4)。以上より我々は、テラトーマを作製する過程で造血幹細胞の維持に必要なサイトカインや造血を支持するストローマ細胞を投与することで、テラトーマ内に iPS 細胞由来の造血幹細胞を誘導できるのではないかと考えた。また、成体内の造血幹細胞は骨髄にホーミングする特性があることから、テラトーマ中に誘導した iPS 細胞由来の造血幹細胞もホストマウスの骨髄に移行しうるのでないかと仮説を立てた (Fig. 1 右)。

【目的】

本研究では、レポーター遺伝子以外のいかなる遺伝子導入も行わずにマウスあるいはヒト iPS 細胞を機能的な造血幹細胞に分化誘導させることを目的とし、その方法としてテラトーマを介した *in vivo* での誘導法の開発を目指した。

【方法】

テラトーマを作製するために免疫不全マウスの皮下に iPS 細胞を注入するとともに次の条件で造血幹細胞への分化誘導を試みた。①コントロールとして iPS 細胞のみを注入する群。②造血系サイトカイン(SCF と TPO)を iPS 細胞の注入と同時に浸透圧ポンプに入れ皮下に埋め込み、2週間継続投与する群。③OP9 ストローマ細胞を iPS 細胞と混合してマウスに注入する群。④サイトカインと OP9 を両方投与する群。以上の4つの条件下で、テラトーマが形成されたマウスにおける末梢血中の iPS 由来の血液細胞の頻度と、骨髄細胞中の造血幹前駆細胞の頻度を Fluorescence activated cell sorting (FACS)にて解析し、誘導効率を比較した。また、iPS 細胞由来の造血幹前駆細胞が検出された場合には、骨髄再建能および多分化能を有するかを確認するために、テラトーマが形成されたマウスの骨髄細胞を放射線照射したレシピエントマウスに移植し、移植後の末梢血における iPS 由来の血液細胞のキメリズムを FACS にて解析した。さらに、分化した造血幹細胞が長期骨髄再建能を有するかを確認するために、二次移植を行った (Fig. 1 左)。

我々はまず、造血活性の高い $\text{Lnk}^{-/-}$ GFP マウスより iPS 細胞を樹立し($\text{Lnk}^{-/-}$ GFP iPS)、テラトーマの作製と誘導条件の検討を行った。 $\text{Lnk}^{-/-}$ はノックアウトすることで造血幹細胞の数や機能が亢進することが報告されている。 $\text{Lnk}^{-/-}$ iPS 細胞より造血幹細胞が誘導されれば、誘導効率が低い場合でも移植時に高い造血能が期待でき、骨髄再建能の確認が容易である。

次に、正常な iPS 細胞から機能的な造血幹細胞が誘導されるかどうかを検討するために、上記で確立した最も良い条件を用いて GFP マウスあるいは健康人より iPS 細胞を樹立し(各 GFP iPS、hiPS)、テラトーマを作製して同様の解析を行った。

【結果】

1. $\text{Lnk}^{-/-}$ GFP iPS 細胞を用いた造血幹細胞誘導条件の検討

$\text{Lnk}^{-/-}$ GFP iPS 細胞よりテラトーマが形成されたマウスの末梢血を FACS 解析した結果、造血幹細胞への誘導を行った各群において iPS 細胞由来の血液細胞である $\text{GFP}^+\text{CD45}^+$ 細胞が検出され、その割合は iPS 細胞を注入して 12 週後に最も高くなることが分かった。iPS 細胞注入 12 週間における、末梢血の $\text{GFP}^+\text{CD45}^+$ 細胞の頻度は、④サイトカイン+OP9 投与群で $4.26 \pm 3.79\%$ と最も高かった。また、同時期の骨髄細胞を解析した結果、造血前駆細胞(Lineage⁻)、造血幹前駆細胞(lineage⁻c-kit⁺Sca-1⁺: KSL)および造血幹細胞(CD34⁺KSL)の全ての分画に GFP^+ 細胞が検出された。骨髄中の GFP^+ KSL 細胞の頻度は、末梢血同様に④ サイトカイン+OP9 投与群($0.471 \pm 0.461\%$)で最も誘導効率が高い結果となった。

2. $\text{Lnk}^{-/-}$ GFP iPS 細胞から分化した造血幹細胞の機能解析

$\text{Lnk}^{-/-}$ GFP iPS 細胞由来の造血幹細胞が機能的な造血活性を有しているかを評価するために、iPS 細胞注入 12 週後の骨髄細胞より、 $\text{GFP}^+\text{CD34}^+\text{KSL}$ 細胞を single cell sort し、コロニーアッセイを行った。その結果、 $\text{GFP}^+\text{CD34}^+\text{KSL}$ 細胞は顆粒球、単球、赤芽球、巨核球と全ての血球系譜を形成したため、 $\text{Lnk}^{-/-}$ GFP iPS 細胞由来の造血幹細胞は、多分化能を有することが確認された。

また、骨髄移植の結果、移植 12 週後においても、レシピエントマウスの末梢血、脾臓、骨髄において GFP⁺CD45⁺細胞は高い骨髄再建能(キメリズム)を示し、全ての血球系へ分化していることが確認された。さらに二次移植を行った結果、12 週後においてもやはり GFP⁺CD45⁺細胞は高いキメリズムを示した。以上の結果から Lnk^{-/-}GFP iPS 細胞由来の造血幹細胞は、機能的にも長期骨髄再建能を有していることが示唆された。また、二次移植後 24 週まで経過を観察しても、白血病及びその他の血液異常を発症したマウスは確認されなかった。このことから、Lnk^{-/-}GFP iPS 細胞由来の造血幹細胞は正常な造血能を有することが示唆された。

3. テラトーマ形成を介した GFP iPS 細胞からの機能的な造血幹細胞の誘導

GFP iPS 細胞注入 12 週後の、テラトーマが形成されたマウスの末梢血における GFP⁺/CD45⁺細胞の割合は条件④サイトカイン+OP9 投与群で最も高く、0.3 ± 0.12%であった。また、同時期の骨髄細胞では、全ての造血幹前駆細胞分画に GFP⁺細胞が検出された。

テラトーマが形成されたマウスから骨髄移植を行った結果、移植 12 週後においても、レシピエントマウスの末梢血、脾臓、骨髄に iPS 由来の細胞が生着しており、全ての血球系へ分化していることが確認された。また、レシピエントマウス骨髄の Lin⁻細胞、KSL 細胞、CD34⁺KSL 細胞に高いキメリズムで GFP⁺細胞が検出された。さらに、二次移植では、レシピエントマウスの骨髄細胞を全て移植した場合はキメリズムが顕著に減少するものの、骨髄より GFP⁺CD34⁺KSL 細胞を 40 個分取し競合的に移植した結果、12 週後まで高いキメリズムが確認された。このことより、GFP iPS 細胞由来の造血幹細胞は、長期骨髄再建能を有した機能的な造血幹細胞であることが示唆された。

4. hiPS 細胞からの機能的な造血幹細胞の誘導

最後に、我々は上記の実験系が hiPS 細胞にも応用できるかどうかを検討した。NOD/SCID マウスに hiPS 細胞と OP9 細胞、SCF+TPO のサイトカインポンプを投与し、12 週後に末梢血と骨髄を解析した。その結果、末梢血中で mCD45⁺hCD45⁺を示す細胞が検出されたマウスは、1/15 匹であった。しかし、骨髄中に mCD45⁺hCD45⁺が検出されたマウスは 10/15 匹で、その中には終末分化した血球細胞である hCD45⁺hCD34⁺、造血幹細胞分画といわれている hCD45^{dim}hCD34⁺等の細胞が検出された。そこで、骨髄中に mCD45⁺hCD45⁺が検出されたマウスから骨髄細胞を、あるいは mCD45⁺細胞を除いた骨髄細胞を分取し NOD/SCID あるいは NOD/SCID/JAK3null マウスをレシピエントとして移植を行った結果、いずれの群においてもレシピエントマウスへ生着し、全ての血球系に分化していることが確認された。また、NOD/SCID マウスよりもさらに重症な免疫不全である NOD/SCID/JAK3null マウスの方が生着したマウスの割合が多い結果となった。

【考察】

本研究において、我々は iPS 細胞より遺伝子を導入することなく機能的な造血幹細胞を分化誘導しうることを明らかにした。今回確立したテラトーマ形成を利用した分化誘導法の特徴は、テラトーマを作製する過程で造血幹細胞の維持に必要とされるサイトカインや造血を支持するストローマ細胞を加えたことである。これにより iPS 細胞の造血系への分化を促進させ機能的な造血幹細胞を効率的に分化誘導させることができたと考えられる。現在までのところ、iPS 細胞由来の造血幹細胞を移植したレシピエントマウスにおいて白血病やその他の異常を示したマウスは見られない。その理由として、テラトーマは *in vivo* での骨髄環境に順ずる環境であることから、iPS

細胞が比較的正常に近い造血幹細胞分化のステップとエピジェネティックな変化を遂げたと考えられる。

また、近年では造血幹細胞や前駆細胞からも iPS 細胞を誘導することが可能となった(5)。血液細胞由来 iPS 細胞はその元となる血液細胞と似たエピジェネティックなゲノムの修飾を持ち、血液細胞に分化しやすいとの報告例もある (6)。そのため、今回確立した系に造血幹細胞由来の iPS 細胞を用いることでより造血幹細胞への分化効率が上がる可能性がある。

再生医療の将来戦略として *in vitro* で細胞を分化誘導させて用いる方法、胚盤胞補完による異種の動物を用いたヒト臓器の作製などの方法が考えられる。しかし *in vitro* 誘導法では、生体内での環境を完全に再現できない為、分化させた細胞の機能が不完全である (7)。また、胚盤胞補完では、現段階でキメラ形成能のある hiPS 細胞を樹立することができないためヒトに応用することは難しい。本方法では生体内の環境で造血幹細胞を誘導しており、またキメラ形成能がなくてもテラトーマ形成能がある hiPS 細胞をからも誘導可能である為、最も優れた方法であると考えられる。以上より、iPS 細胞からの機能的な造血幹細胞の誘導法は、従来の移植治療に新たな移植ソースを提唱する画期的な技術であり幹細胞治療に新たな局面をもたらすものと考えられる。

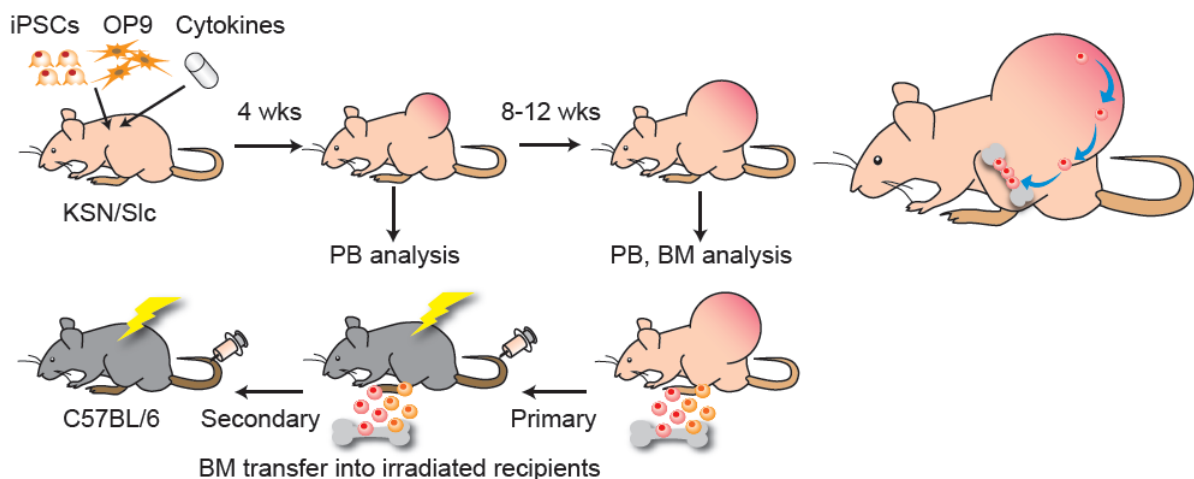


Fig.1 テラトーマ形成を介した iPS 細胞からの造血幹細胞誘導方法と造血幹細胞のホーミング

【参考文献】

1. Zhang, C.C. & Lodish, H.F. *Blood* **105**, 4314-4320 (2005).
2. Takahashi, K. & Yamanaka, S. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
3. Cudennec, C. & Nicolas, J.F. *J Embryol Exp Morphol* **38**, 203-210 (1977).
4. Cudennec, C.A. & Salaun, J. *Cell Differ* **8**, 75-82 (1979).
5. Eminli, S., et al. *Nat Genet* **41**, 968-976 (2009).
6. Watarai, H., et al. *J Clin Invest.*
7. Kyba, M., Perlingeiro, R.C. & Daley, G.Q. *Cell* **109**, 29-37 (2002).