


財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2008 年 3 月 12 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 辻 浩一郎 
所属機関名： 東京大学
所属部署： 医科学研究所 職名： 准教授
〒 108-8639
所在地： 東京都港区白金台 4-6-1
電話： 03-5449-5397 内線：

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

新規抗体を用いたヒト ES 細胞から血液細胞への分化の解析

3. 成果の概要 (100字程度)

ヒト ES 細胞を、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、種々の血液細胞を産生する造血前駆細胞に分化誘導できた。今後ヒト ES 細胞から血液細胞への分化機構を種々の新規抗体を用いて解析することにより、再生医療への応用が期待される。

※発表論文等

Ma F, Tsuji K, et al: Novel method for efficient production of multipotential hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells.

Int J Hematol 85:371-379, 2007.

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 辻 浩一郎 職名： 准教授
所属機関： 東京大学 部署： 医科学研究所
中国側研究者氏名： 張 学 光 職名： 副校長・教授
所属機関： 中国 蘇州大学 部署： 医学生物技術研究所

新規抗体を用いたヒト ES 細胞から血液細胞への分化の解析

研究者氏名 辻 浩一郎
日本所属機関 東京大学 准教授
中国研究機関 蘇州大学
共同研究者名 張 学光、馬 峰

要 旨

ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) を、マウス胎仔肝から樹立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。これらの造血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。今後これらのヒト ES 細胞から血液細胞への様々な分化段階にある細胞を、種々の新規抗体を用いて解析することにより、その分化機構が解明されれば、輸血医療をはじめとする様々な再生医療への応用が期待される。

Key Words ヒト ES 細胞, 造血前駆細胞, ストローマ細胞, 再生医療

緒 言:

生物が本来保持している再生能力を医療に応用する再生医療は、21 世紀の医療として、大きな期待を集めている。特に、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) は、再生医療のための有力な細胞資源として注目されている (参考文献 1)。

血液細胞療法の分野においても、もしヒト ES 細胞から効率良く造血幹細胞や大量の成熟血球 (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、現在造血幹細胞移植医療や輸血医療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、輸血赤血球は 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 細胞の使用が可能となった現在、ヒト ES 細胞から輸血用赤血球を産生することは、実現可能な人工血液の産生法と考えられる。

これまでのところ、ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導については、ストローマ細胞を用いた培養法、胚様体を用いた培養法などが報告されているが、いずれの方法においても、その血液細胞への分化誘導効率も低く、また、分化誘導された血液細胞が、実際に臨床応用可能な機能を有しているかについても明らかにされていない。

我々は、従来の分化誘導法において、ヒト ES 細胞の血液細胞への分化誘導が非効率的であった理由として、胎生期を起源とする ES 細胞から血液細胞への分化には、胎生期の特定の時期に、特定の部位で特異的に機能する分子による刺激が重要であるためと推測した。従って、ヒト ES 細胞から血液細胞への効率的な分化誘導のためには、胎生期の造血環境を再現することが重要であり、そのような胎生期造血機構を基盤とする、ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導法の開発が可能ではないかと考えた。そこで、ヒト ES 細胞を用いた研究計画「ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) から造血細胞への分化誘導法の開発」を文部科学省特定胚及びヒト ES 細胞研究専門委員会に申請し、平成 14 年 12 月 20 日に同

委員会の承認を受けて、本研究を開始した。

ヒトの胎生期造血については、ヒト胎児を研究することが倫理的に困難であるため、必ずしも十分に解明されているわけではない。しかし、ヒトと同じ哺乳類であるマウスにおいては、マウス胎仔の二次造血は、胎仔肝において爆発的に増幅されることが知られている（参考文献2）。一方、マウス由来ストローマ細胞の多くがヒト造血をも支持することが報告されていたことより、我々は、胎生15～16日マウス胎仔の胎仔肝よりストローマ細胞を樹立し、ヒトES細胞との共培養を試みた。

方 法:

1. マウス胎仔肝由来ストローマ細胞の培養

胎生15～16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、RT-PCR法、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)を用いた血液コロニー形成法により、継時的に解析した。

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。

結 果:

1. マウス胎仔肝由来ストローマ細胞の培養

胎生15～16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。

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

(1) 形態学的観察

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5日目頃より分化を開始し、培養10日目頃には、ヒトES細胞コロニー中に未分化な小型円形細胞が出現した。その後、培養15日目頃まで、これらの細胞は増殖し続けた。

(2) RT-PCRによる検討

培養13日目には、未分化なES細胞のマーカであるOct4、未熟な中胚葉系細胞のマーカであるBrachuryの発現は消失した。

(3) フローサイトメトリーによる検討

CD34+細胞は、培養5日目頃から共培養中に出現し、培養16～17日目頃まで増加し続けた。培養14日目のCD34+細胞の一部は、CD45やc-Kitを共発現していた。

(4) コロニー形成法による検討

共培養された細胞を血液コロニー形成法で継時的に観察すると、血液コロニー形成細胞は、培養10日目頃に初めて出現した。その数は次第に増加し、培養14～16日目には最大となった。観察されたコロニー形成細胞は多様で、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など、様々な血液細胞コロニーが認められた。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。

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され、これらの造血前駆細胞からは種々の血液細胞が産生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、同時に、成人型ヘモグロビン (HbA) も保持していた。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。

考 察:

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。

我々は、こうした問題を解決するために、新たな輸血用赤血球の供給源として、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 ES 細胞に注目した。我々は、ヒト ES 細胞から血液細胞への効率的な分化誘導のためには、胎生期の造血環境を再現することが重要であり、そのような胎生期造血機構を基盤とする、ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導法を開発したいと考えた。

ヒトを含む哺乳類の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、骨髄球系前駆細胞、多能性造血前駆細胞が産生された。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否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。

一方、種々の血液、悪性疾患に対する根治的治療法である造血幹細胞移植療法においては、その技術的進歩により造血幹細胞移植の適応となる患者の数は増加し、ドナーの絶対的不足が深刻な社会問題となっている。もし、ヒト ES 細胞から造血幹細胞への分化が可

能となれば、そうしたドナー不足を解決することができる。本研究の成果から鑑み、マウス造血幹細胞が発生する胎生 10 日頃のマウス胎仔の AGM(Aorta-Gonad-Mesonephros) 領域(参考文献 3) から樹立したストローマ細胞と共培養することにより、ヒト ES 細胞から造血幹細胞への分化誘導が可能となるかもしれない。

現在、こうしたヒト ES 細胞から血液細胞への分化過程の様々な段階にある細胞を、蘇州大学・医学生物技術研究所で作製された種々の新規抗体 (B7H3、B7H4) を用いて分画し、その分画された細胞の分化能を検討中である。この検討により、ヒト ES 細胞から血液細胞への分化機構が明らかとなれば、より効率的なヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導法の開発が期待される。

参考文献：

1. 辻浩一郎：ヒト胚性幹細胞からの血液産生と再生医療, 日小血会誌 vol119, 175-180 (2005).
2. 辻浩一郎：造血幹細胞の起源と性状, 医学のあゆみ vol194, 1021-1025 (2000).
3. 辻浩一郎：AGM 領域の造血幹細胞とストローマ細胞, 臨床血液 vol40, 268-271 (1999).

注：本研究の一部は、2007 年 9 月 29 日『International Society of Experimental Hematology 総会』, および 2007 年 10 月 11 日『日本血液学会・日本臨床血液学会・合同総会』にて口頭発表、『International Journal of Hematology』(2007 年 VOL85 巻 371-379 頁)に掲載。

作成日：2008 年 3 月 12 日