

## 財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2010 年 3 月 10 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調査・共同研究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： 馬 峰   
所属機関名：東京大学  
所属部署名：医科学研究所 職名：特任研究員  
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

iPS 細胞を利用した先天性骨髄不全症候群の病態解析と治療法の開発

3. 成果の概要

今回の研究により、ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、血液細胞への分化が可能であった。現在、先天性骨髄不全症候群患者から iPS 細胞を樹立中であり、今後は患者由来 iPS 細胞と健常人由来 iPS 細胞の血液細胞への分化を比較検討する予定である。

※発表論文等

Ma F, Ebihara Y, Nakauchi H, Tsuji K: Derivation of mature blood cells from human induced pluripotent stem cells. 38th Annual Scientific Meeting, International Society of Experimental Hematology. Athens. Sept 9 ~ 12, 2009.

4. 研究組織

日本側研究者氏名：馬峰

所属機関名：東京大学

中国側研究者氏名：竺晓凡

所属機関名：中国医学科学院中国协和医科大学

職名：特任研究員

部署名：医科学研究所

職名：教授

部署名：血液学研究所

血液病医院

児童血液病診療センター

## iPS 細胞を利用した先天性骨髄不全症候群の病態解析と治療法の開発

研究者氏名	馬峰
日本研究機関	東京大学 特任研究員
中国研究機関	中国科学院血液学研究所
共同研究者名	竺晓凡

### 要 旨

Fanconi 貧血、Kostmann 症候群、Diamond-Blackfan 症候群、Pearson 症候群、Shwachman-Diamond 症候群、先天性角化異常症等の様々な遺伝的背景を有する先天性骨髄不全症候群 (CBMFS: congenital bone marrow failure syndrome) の研究を目的として、ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) から血液細胞への分化誘導法を、健常人由来人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) と CBMFS 患者由来 iPS 細胞に応用し、その血液細胞への分化過程を解析することを計画した。健常人由来 iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に、胎生 15~16 日のマウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、培養 2 週間頃より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、これらの造血前駆細胞から、赤血球、好中球、マクロファージ、巨核球などの様々な血液細胞の産生が可能であった。今後は、健常人由来 iPS 細胞から血液細胞への分化過程を、現在樹立中の CBMFS 患者由来 iPS 細胞のそれと比較検討することにより、CBMFS の病因・病態が解明され、新たな治療法が開発されることが期待される。

**Key Words** iPS 細胞, 先天性骨髄不全症候群, 造血前駆細胞, ストローマ細胞

### 緒 言:

Fanconi 貧血、Kostmann 症候群、Diamond-Blackfan 症候群、Pearson 症候群、Shwachman-Diamond 症候群、先天性角化異常症等の様々な遺伝的背景を有する骨髄不全症が存在し、これらは先天性骨髄不全症候群 (CBMFS: congenital bone marrow failure syndrome) と呼ばれる。CBMFS の原因遺伝子については、その一部は特定されているが、同定されていないものも多数存在し、特定された遺伝子についても、骨髄不全を惹起するメカニズム、さらには白血病、悪性腫瘍へ進展するメカニズムについてはほとんど解っていない。

一方、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、皮膚繊維芽細胞などの体細胞から樹立される、胚性幹細胞 (ES 細胞) と同質の性状を有する多能性幹細胞である。特に、ヒト iPS 細胞の樹立法が開発されたことにより、その臨床応用が期待されている。我々は、これまでに、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 細胞が多能性造血細胞へ分化誘導されることを示してきた (参考文献 1, 2)。

それらの成果から我々は、我々が確立したヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導系をヒト iPS 細胞の分化誘導に応用することにより、さまざまな CBMF 疾患患者から樹立された iPS 細胞の血液細胞への分化過程を、健常人由来 iPS 細胞のそれと細胞生物学的及び分子生物学的に比較検討することにより、CBMFS の病因・病態の解明や治療法の開発が可能になるのではないかと考え、本研究を実施した。

## 方 法:

### 1. マウス胎仔肝由来ストローマ細胞の樹立

我々がすでに報告した方法で（参考文献3）、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、ストローマ細胞を樹立した。

### 2. ヒト iPS 細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞の共培養

ヒト iPS 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、産生されてくる細胞を、形態学的観察、フローサイトメトリー、RT-PCR 法、血液細胞コロニー形成法などにより、継時的に解析した。

### 3. ヒト iPS 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 iPS 細胞を血液細胞コロニー培養し、形成された赤血球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樹立

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（図1）。

### 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 iPS 細胞から血液細胞への分化

#### (1) 形態学的観察

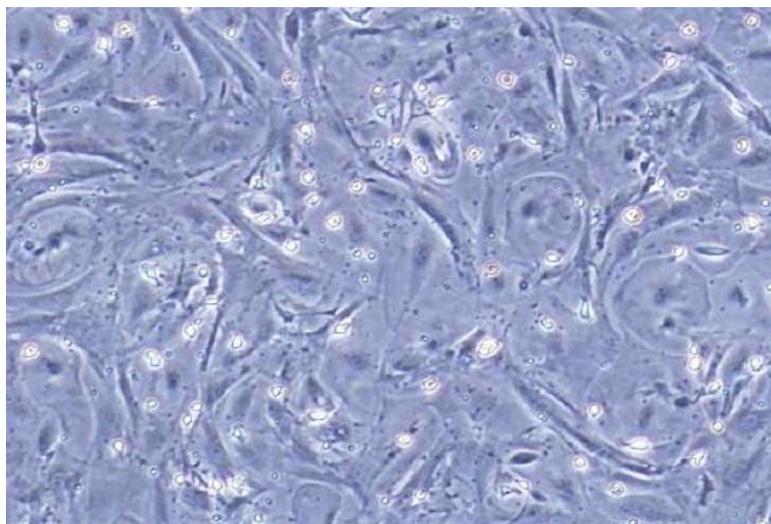
ヒト iPS 細胞は、樹立されたマウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養すると、ヒト ES 細胞との共培養と同様に、培養 5 日目ごろより分化を開始し、培養 10 日目ごろには、未分化な小型円形細胞が出現した（図2）。その後、培養 15 日目ごろまで、これらの細胞は増殖し続けた。

#### (2) RT-PCR による検討

ヒト ES 細胞との共培養と同様に、培養 13 日目には、未分化な iPS 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 の発現は認められなくなった。

図1.

樹立されたマウス胎仔肝由来  
ストローマ細胞



### (3) フローサイトメトリーによる検討

ヒト ES 細胞との共培養と同様に、CD34+細胞は、培養 5 日目ころから共培養中に出現し、培養 16~17 日目ころまで増加し続けた。培養 14 日目の CD34+細胞の一部は、CD45 や c-Kit を発現していた。

### (4) 血液コロニー形成法による検討

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)存在下での血液コロニー培養による検討でも、ヒト ES 細胞との共培養と同様に、血液細胞コロニー形成細胞は、培養 10 日目ごろに初めて出現した。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が認められた。これらのコロニー中には、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されていた。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 iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に、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種々の血液細胞が産生されたことを示している。

### 3. ヒト iPS 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、あるいは混合コロニーに含まれるヒト iPS 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)も保持していることが確認された。

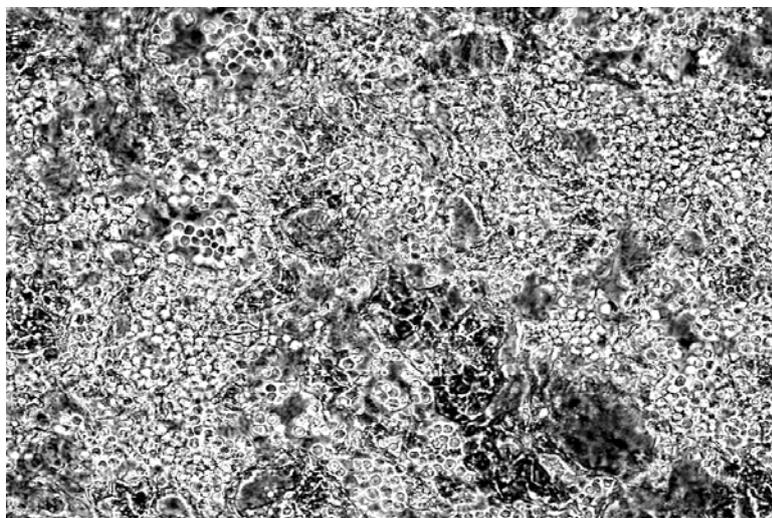
### 考 察：

今回の検討により、ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、血液細胞への分化が可能であった。

現在、CBMFS 患者から iPS 細胞を樹立中であり、今後は CBMFS 患者由来 iPS 細胞と健常人由来 iPS 細胞の血液細胞への分化を比較検討することにより、これまでほとんど解明されていない CBMFS の病因・病態を解明し、治療法の開発に繋げていきたいと考えている。

### 図 2.

ヒト iPS 細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養中に出現した小型円形細胞 (培養 10 日目)



参考文献：

1. Ma F, Ebihara Y, Umeda K, Sakai H, Hanada S, Zhang H, Zaike Y, Tsuchida E, Nakahata T, Nakauchi H, Tsuji K: Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 13087-13092, 2008.
2. Ma F, Wang D, Hanada S, Ebihara Y, Kawasaki H, Zaike Y, Heike T, Nakahata T, Tsuji K: Novel method for efficient production of multipotential hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells. *Int J Hematol* 85:371-379, 2007.
3. Ma F, Wada M, Ebihara Y, Ishii F, Manabe A, Tanaka R, Maekawa T, Ito M, Mugishima H, Asano S, Nakahata T, Tsuji K: Development of human lymphohematopoietic stem/progenitor cells defined by CD34 and CD81 expressions. *Blood* 97: 3755-3762, 2001.

注：本研究成果の一部は、2009年9月9-12日第38回国際実験血液学会にて口頭発表。

作成日：2010年2月28日