

造血細胞による再生医療のためのドナー細胞調製法の研究

長尾 研二

目次

第1章 序論	6
1-1 緒言.....	6
1-2 造血幹細胞の特性と多分化能.....	7
1-3 造血幹細胞の体外増幅研究	8
1-4 多能性幹細胞から血液細胞への分化誘導	10
1-5 本研究の目的	11
第2章 AGM 領域由来ストローマ細胞の遺伝子発現解析による造血幹細胞増幅因子の探索 ..	18
2-1 緒言.....	18
2-2 実験材料と実験方法	20
2-2-1 細胞調製	20
2-2-2 コロニー形成試験.....	20
2-2-3 細胞移植	21
2-2-4 Gene Chip 解析	21
2-2-5 RT-PCR 解析	22
2-2-6 Plat-E 細胞への遺伝子導入およびストローマ細胞へのレトロウイルス感染	22
2-3 結果.....	23
2-3-1 ストローマ細胞からのサブクローニング	23
2-3-2 AGM-S3-A9 と AGM-S3-A7 の遺伝子発現プロファイル解析.....	27
2-3-3 Glypican-1 によるヒト造血前駆細胞に対する増殖刺激活性の評価.....	29
2-4 考察.....	32
2-5 小括.....	35
第3章 マウス骨髄細胞からの効率的リプログラミング	36
3-1 緒言.....	36

3-2 実験材料と実験方法	38
3-2-1 実験動物	38
3-2-2 細胞と細胞培養	38
3-2-3 細胞融合	38
3-2-4 レトロウィルスベクターの構築とウィルス調製.....	38
3-2-5 レトロウィルス感染と iPS 細胞誘導.....	39
3-2-6 抗体およびフローサイトメリー解析.....	39
3-2-7 奇形腫形成試験およびキメラマウス作製.....	39
3-2-8 遺伝子発現解析	40
3-2-9 サザンブロット解析	40
3-3 結果.....	41
3-3-1 細胞融合による骨髄単核球細胞のリプログラミング	41
3-3-2 マウス骨髄単核球細胞からの iPS 細胞誘導.....	44
3-3-3 BM iPS 細胞の幹細胞マーカー遺伝子発現および多能性解析	46
3-3-4 骨髄より誘導される iPS 細胞のクローン分析.....	52
3-3-5 骨髄由来 CD45陽性細胞からの iPS 細胞誘導およびクローン分析	55
3-4 考察.....	57
3-5 小括.....	60
第4章 非動員ヒト末梢血細胞からの直接的リプログラミング法の開発.....	61
4-1 緒言.....	61
4-2 実験材料と実験方法	63
4-2-1 細胞と細胞培養	63
4-2-2 ウィルスベクターの構築とウィルス調製.....	63
4-2-3 レトロウィルス感染と iPS 細胞誘導.....	64

4-2-4	フローサイトメトリー解析と免疫細胞化学解析	65
4-2-5	奇形腫の形成	66
4-2-6	核型解析	66
4-2-7	免疫グロブリン重鎖および T 細胞受容体遺伝子座の再構成解析	66
4-2-8	遺伝子発現プロファイルの解析	66
4-2-9	サザンブロット解析	67
4-2-10	バイサルファイト法による DNA メチル化解析	68
4-3	結果	69
4-3-1	ヒト骨髄単核球細胞からの iPS 細胞誘導	69
4-3-2	ヒト末梢血単核球細胞からの iPS 細胞誘導	75
4-3-3	iPS 細胞株の幹細胞マーカー遺伝子発現およびプロモーター領域のメチル化解析	81
4-3-4	iPS 細胞株の多能性評価	87
4-3-5	iPS 細胞株の TCR β , TCR γ および IgH 遺伝子座の解析	89
4-4	考察	92
4-5	小括	94
第5章	総括	95
5-1	造血幹細胞の自己複製と体外増幅	96
5-2	血液系細胞からのリプログラミング	98
5-3	今後の治療応用へ向けた展開	103
	参考文献	106
	原著論文	122
	謝辞	123

略語一覧

本文において以下に示す略語を使用した。

AGM: Aorta-gonad-mesonephros

BFU-E: Erythroid burst-forming units

BM: Bone marrow

CFU-E: Erythroid colony-forming units

CFU-GM: Granulocyte-macrophage colony-forming units

CFU-GEM: Granulocyte-erythroid-macrophage colony-forming units

Daudi cell: Human B lymphoblast cell line

EPO: Erythropoietin

FACS: fluorescence-activated cell sorter

FCM: Flowcytometry

Flt3/L: Flt3 ligand

FP6: Interleukin-6 and IL-6 receptor fusion protein

G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor

GFP: Green fluorescent protein

GM-CSF: Granulocyte Macrophage colony stimulating factor

GPC1: Glypican 1

HEK293 cell: Human embryonic kidney cell line

IL-3: Interleukin-3

IL-6: Interleukin-6

iPSC: Induced pluripotent stem cell

Jurkat cell: Human T lymphocyte cell line

Klf4: Krueppel-like factor 4

Lin: Lineage markers

M-CSF: Macrophage-colony stimulating factor

MEF: Mouse embryonic fibroblast

MNC: mononuclear cell

Oct3/4: octamer-binding transcription factor 3/4

OPM-2 cell: Human multiple myeloma cell line

PB: Peripheral blood

PE: Phyco erythrin

PLAT-E cell: HEK293 derived retroviral packaging cell line

SCF: Stem cell factor

Sox2: SRY (sex determining region Y)-box 2

TPO: Thrombopoietin

第1章 序論

1-1 緒言

臓器不全、臓器損傷の患者を救う治療法として、近年細胞再生医療へ大きな期待が寄せられている。しかしながら、治療に必要な細胞数の不足、免疫拒絶、倫理的問題など、臨床応用へ向けてまだ数多くのハードルが存在している。成体の各種組織においては、一つの分化系譜への分化能をもつ組織固有の組織幹細胞や複数の分化系譜へ分化しうる多能性の幹細胞が存在しており、それらは血液細胞や上皮細胞でみられるように、常に古い細胞を新しい細胞に置き換え、生体の恒常性維持や、組織が損傷したときの修復に携わっている細胞である。組織幹細胞や間葉系幹細胞は腫瘍形成能がほとんどないことや、患者本人の細胞を用いることで拒絶反応や倫理問題なども回避できるなどの利点から、既に再生医療へと臨床応用されているものもある。

既に臨床応用されている代表例として、組織幹細胞である造血幹細胞を用いた骨髄移植が挙げられる。骨髄移植は、全身放射線照射や大量の抗癌剤による移植前処置により骨髄無形成とした後に造血幹細胞を含む骨髄細胞を移植し、血球の回復を図る治療法である。移植された造血幹細胞により患者の骨髄は再生され、一生涯にわたって血液細胞が供給されることから、この治療法は再生医療の先駆けと位置付けることができる。対象疾患は、造血器腫瘍や一部の固形腫瘍、再生不良性貧血、小児の免疫不全症などである。それぞれ腫瘍細胞の駆逐や、造血幹細胞を置換することで正常な血液システムを再構築することを目的としている。しかしながら、骨髄移植のための骨髄採取は全身麻酔により 1000 ml 近くの骨髄液を採取するため、ドナーへの負担は依然として大きい。また、末梢血幹細胞の採取のためには、G-CSF 投与により造血幹細胞の末梢への動員を行うが、健常人への投与の安全性については、白血病発症事例の報告もあり課題を残している。

近年、骨髄移植、末梢血幹細胞移植に次ぐ第三の移植ソースとして臍帯血幹細胞移植が注目されている。臍帯血中には未分化な造血幹細胞が豊富に含まれている。臍帯血を用いた移植は、本来

廃棄されていた出産後の胎盤・臍帯を利用する点でドナーへの負担・リスクが全くない。また HLA2 座不一致の非血縁者間移植でも移植片対宿主病 (graft-versus-host disease; GVHD) の頻度が極めて低く、細胞が移植可能な状態で凍結保存されているため、ドナーとレシピエント間の調整に時間を要せず、骨髄バンクからの移植にはない利点を有しているため近年移植数が増加している (図1-1)。一方血球回復が他の移植に比べて著しく遅れること、悪性腫瘍に対して移植片対白血病反応 (graft-versus-leukemia;GVL)効果が未知であるなどの問題点も存在する。さらに、移植細胞数と成績の相関が報告されており、体重が重く相対的に移植細胞数の少ない成人での安全性が課題となっている。

1-2 造血幹細胞の特性と多分化能

造血幹細胞は自己複製能と多分化能を併せ持つ血液細胞と定義される。自己複製能と多分化能は移植実験によって評価され、移植細胞より骨髄球系、リンパ球系の血液細胞が長期にわたって供給され、レシピエントの造血が再構築されるか否かで判断される。フローサイトメトリー (FCM)を用いた細胞分離技術の開発により、造血幹細胞の分離・同定技術は飛躍的に進歩した。マウスの造血幹細胞は CD34 抗原 low もしくは陰性 c-Kit 陽性 Sca-1 陽性 lineage marker (Lin) 陰性分画に高度に濃縮される。この分画の細胞は骨髄の単核球細胞中約 0.004%と少数であるが、わずか 1 個の細胞を移植することでレシピエントマウスの 2 から 3 匹に 1 匹の割合で造血系を再構築可能である (Osawa et al., 1996)。

ヒト造血幹細胞の解析は、NOD/SCID マウスなどの免疫不全マウスを用いた移植による評価が行われている。しかしながら、この評価系で検出される長期骨髄再構築能を有する細胞は同種移植で検出される造血幹細胞と厳密な意味で同一であるという証明はまだなく、SCID-repopulating cell (SRC) と呼ばれている。SRC の頻度は、臍帯血単核球で $1/9.3 \times 10^5$ 、骨髄で $1/3 \times 10^6$ 、G-CSF による動員末梢血で $1/6 \times 10^6$ と報告されている (Wang et al., 1997)。これまでの報告により、造血幹細胞の

表面抗原の発現特性は、Lin 陰性 CD34 陽性 CD38 陰性とされており、SRC は Lin 陰性 CD34 陽性 CD38 陰性分画に 1/617 の頻度で存在する。

造血幹細胞は前駆細胞を経て、成熟終末細胞へと分化していく過程で 20 回以上の分裂を経て、赤血球や白血球をはじめとする様々な細胞に分化する。赤血球は約 120 日、血小板は約 7 日、好中球は血中に 8 時間留まった後、組織中に移行して寿命を全うする。それらの喪失を補うため、成人の体内では、約 2000 億個の赤血球、700 億個の好中球、1000 億個の血小板が毎日産生されている。このような造血系を生涯にわたって枯渇することなく、ある一定のレベルを維持するためには、造血幹細胞自身が自己複製する能力とあらゆる血球に分化する多分化能を持つことが必要である。造血幹細胞がいったん分化の方向を選択すると多分化能と自己複製能は次第に失われ、各系列に分化することが運命づけられた単能性幹細胞になり、最終的に成熟血球細胞になる。このように造血幹細胞から成熟血球細胞への分化・成熟の過程には「階層性」が存在し、様々な造血因子が協調して作用することがこれまでの研究で明らかとなっている (図1-2)。

発生期において最初の血球は卵黄囊の血島に出現する。血島は発達し、内部に大型の核を有する胚型赤血球で満たされる。卵黄囊での造血を一次造血 (胎児型造血)と呼ぶ。発生の過程で、造血の場は臓側中胚葉 para-aortic splanchnopleural mesoderm (P-Sp)領域、大動脈-生殖隆起-中腎 (aorta-gonad-mesonephros : AGM)領域へと移動し、さらに胎児肝へと移動する。肝臓で生まれる赤血球は成人型ヘモグロビンを産生し、脱核して血中に入り、循環する。肝臓以降の造血を二次造血 (成体型造血)と呼ぶ。妊娠後期には造血の場は骨髄へと移動し、以降一生涯の造血は骨髄で営まれる。造血システムの発生の過程で造血幹細胞は次々と造血の場を移動するが、その生物学的意義については今なおわかっていない (図1-3)。

1-3 造血幹細胞の体外増幅研究

造血幹細胞研究の重要な目的の一つは、造血幹細胞を操作して治療に用いることである。この点において、造血幹細胞の体外増幅の実現は大きな課題の一つである。体外増幅の臨床上的意義として以下の3つが挙げられる。①臍帯血のように移植のための細胞数が十分量得られない供給源からの造血幹細胞の増幅、②造血前駆細胞の移入による骨髄移植時の造血抑制の回避や早期回復、③造血幹細胞を標的とした遺伝子治療などへの応用、である。

これまでにサイトカインを用いた種々の増幅法の検討がなされてきた。Stem cell factor (SCF)やThrombopoietin (TPO)、Flt3 ligand (Flt3L)などのサイトカインに加えて、Interleukin-6 (IL-6)と可溶性型 IL-6 受容体とのキメラ融合蛋白(IL-6/sIL-6R)などを組み合わせた試みが行われている。SCF、TPO、Flt3L、IL-6/sIL-6R 存在下で7日間培養することにより、SRC が4.2倍に増幅することが報告されている (Ueda et al., 2000)。このような造血幹細胞の体外増幅法の進歩は、骨髄移植のみならず、ES細胞、iPS細胞からの造血幹細胞の分化誘導にも寄与するものと期待される。

造血系を増殖刺激するサイトカインには一般に多種多様な機能があり、標的細胞ごとに異なる機能を発揮する (表1-1)。例えば IL-6 は B 細胞の抗体産生細胞への分化を誘導する他に、造血系では SCF などと相乗的に作用して造血幹細胞の増殖や巨核球・血小板造血を刺激する。一つのサイトカインに対応する受容体は一ないし二種類程度であって、受容体の種類からサイトカインの生物学的多様性を説明できない。このようなサイトカインの機能の多様性は、細胞内シグナル伝達経路の違いやその下流に存在する転写因子の発現の違いを反映したものと考えられる。一方、重層性は主に共通サブユニットの存在で説明される。例えば、IL-3、GM-CSF、IL-5 はいずれも好酸球前駆細胞を刺激し、その増殖や分化を促進するが、それはそれぞれの受容体でシグナル伝達に主要な機能を果たす β 鎖を共有していることで説明できる。同様に IL-6、IL-11 は gp130 をシグナル伝達に必須のサブユニットとして共有している。

1-4 多能性幹細胞から血液細胞への分化誘導

一方、ヒト ES 細胞や iPS 細胞から長期骨髄再構築能を有する造血幹細胞を分化誘導することができれば、造血系再生医療において理想的な移植治療法が実現可能となる。マウス ES 細胞からは、ホメオボックス遺伝子である HoxB4 を強制発現することにより、長期再構築能を有する成人型の造血幹細胞を誘導、増幅することが可能であることが示されている (Kyba et al., 2002)。しかしながら、ヒト ES 細胞からの長期再構築能を有する造血幹細胞の分化誘導は未だ不十分なものであり、誘導法が確立されたとは言い難い。Ledran らは、胎生期における造血発生環境に着目し、マウス胎生 10.5 日 (E10.5) の AGM 領域由来の細胞株 AM20.1B4 と泌尿生殖器領域由来細胞株 UG26.1B6 を用いて造血細胞の分化誘導を行い、より移植拒絶の少ない NOD/SCID/IL-2R γ 鎖 KO マウス (NSG マウス) の骨髄内へ移植した。その結果、AM20.1B4 細胞株を用いた場合に、骨髄中のヒト血液細胞キメラ率が約 2%、末梢血に約 16% の細胞生着が認められた (Ledran et al., 2008)。また、UG26.1B6 細胞株を用いた場合では、一次移植時のキメラ率が骨髄で約 1.3%、末梢血で約 1% であり、二次移植においても骨髄、末梢血いずれでも約 2% の生着が認められた。しかしながら、ヒト ES 細胞に由来する血液細胞の生着率はヒト臍帯血由来の成体型造血幹細胞に比べ著しく低く、この点が造血再生医療の実現化に向けてまだ大きな課題となっている。ヒト ES 細胞、iPS 細胞から造血幹細胞を誘導・増幅するためには、単なる造血幹細胞の誘導のみならず、胎児型造血から成人型造血への移行を伴わなければならない。成人型造血への移行には、遺伝子プログラミングの書き換えにおいてエピジェネティックな変化が伴うとされている。最近、組織細胞より誘導した iPS 細胞は由来細胞のエピジェネティックな記憶を残していることが報告された。成人由来の血液細胞から誘導された iPS 細胞は成人型血液細胞の記憶を残していれば、成人型造血幹細胞へ分化しやすい形質を有していることが期待され、造血再生医療の有力な細胞供給源になるものと考えられる。

1-5 本研究の目的

骨髄移植症例数の増加や造血幹細胞の研究の進展により、造血幹細胞移植のメカニズム解明や移植成績は近年着実に進歩している。しかしながら、同種他家の細胞移植による抗腫瘍効果を維持しつつ、他家の移植に伴う免疫拒絶による移植細胞の生着不全や移植細胞が宿主の細胞を破壊してしまう移植片対宿主病 (GVHD)を回避することは、現状で必ずしも十分なコントロールがなされているとは言えない。また好中球の回復遅延による感染症リスクの増加や血小板の回復遅延に伴う移植関連有害事象の低減は依然として臨床現場の課題となっている。一方で移植造血幹細胞数の増加は GVHD を克服し、好中球、血小板の早期回復をもたらすと報告されている。移植細胞数を増やすことは移植関連有害事象を低減させる最も有望な方策の一つと考えられるが、単に細胞提供者からの細胞採取量を増やすことは、細胞提供者の負担を増加させるに留まらず、健全な細胞提供者の健康を害するリスクを増加させる。また、新たな移植細胞ソースとして期待される臍帯血由来造血幹細胞は、そもそも採取できる細胞数に限界があるため採取方法の改善による移植細胞数の増加には十分な期待はできない。そこで細胞提供者より採取された造血幹細胞を、その幹細胞としての機能を維持しつつ体外にて短期間に効率よく増幅することが可能であれば、これまでの移植成績を飛躍的に改善することが期待される。

本研究は造血幹細胞移植に用いるための細胞ソースの体外増幅法の開発を目的として行った。第2章では、発生期における造血の場である AGM 領域より造血支持活性の異なるストローマ細胞株を樹立し、その発現分子の差異を解析することにより、マウスおよびヒト造血幹細胞に対して増幅活性を有する分子の探索を行った。第3章、第4章では、造血幹細胞よりさらに未分化かつ自己複製が容易な幹細胞を体細胞からリプログラミングすることにより、造血幹細胞へ分化可能な多能性幹細胞の調製法の開発を試みた。第3章では、マウス骨髄由来細胞を用いることにより、線維芽細胞を用いるよりもさらに効率のよい多能性幹細胞の誘導法の開発を試みた。第4章では、ヒト骨髄由来細胞を用いることにより、線維芽細胞を用いるよりもさらに効率のよい多能性幹細胞の誘導法の開発を試みると共

に、ヒト検体採取において、骨髄や皮膚といった組織よりもはるかに侵襲性の低い末梢血に由来する細胞から多能性幹細胞を誘導する方法の開発を試みた。

以下、これらの知見について詳述する。

表1-1 主な造血系サイトカインの機能

	分子量 (kDa)	産生細胞	標的細胞	主な機能
SCF	31 (分泌型)	骨髄ストローマ細胞	肥満細胞	幹細胞の増殖支持
	36 (膜結合型)		多能性幹細胞	肥満細胞の増殖
TPO	70	肝臓	巨核球系前駆細胞	成熟巨核球の誘導
		骨髄ストローマ細胞	多能性幹細胞	幹細胞の増殖支持
IL-3	28	T細胞	好中球 マクロファージ 肥満細胞 巨核球系前駆細胞 赤芽球系前駆細胞	multi-CSF 活性 NK細胞の分化誘導 B前駆細胞の増殖・分化 破骨細胞の分化
IL-6	21~28	マクロファージ B細胞/T細胞 線維芽細胞 血管内皮細胞 骨髄ストローマ細胞	好中球 マクロファージ (多能性幹細胞)	B細胞の抗体産生細胞への分化 T細胞の増殖・分化 多能性幹細胞の増殖 巨核球の分化・成熟の促進 血小板産生の亢進
GM-CSF	18~24	マクロファージ T細胞 骨髄ストローマ細胞	好中球 マクロファージ 好酸球	好中球、好酸球、マクロファージの増殖・分化および機能亢進 巨核球の分化 樹状細胞の分化誘導

M-CSF	85 (可溶型)	血管内皮細胞 線維芽細胞 マクロファージ	マクロファージ	単球・マクロファージ産生 GM-CSF,G-CSF 産生 殺腫瘍活性 破骨細胞増殖作用
Flt3L	65 (二量体)	骨髄細胞 T細胞	多能性幹細胞 B前駆細胞	多能性幹細胞の増殖支持 B前駆細胞の増殖支持

(小澤敬也編、造血幹細胞、中外医学社より抜粋)

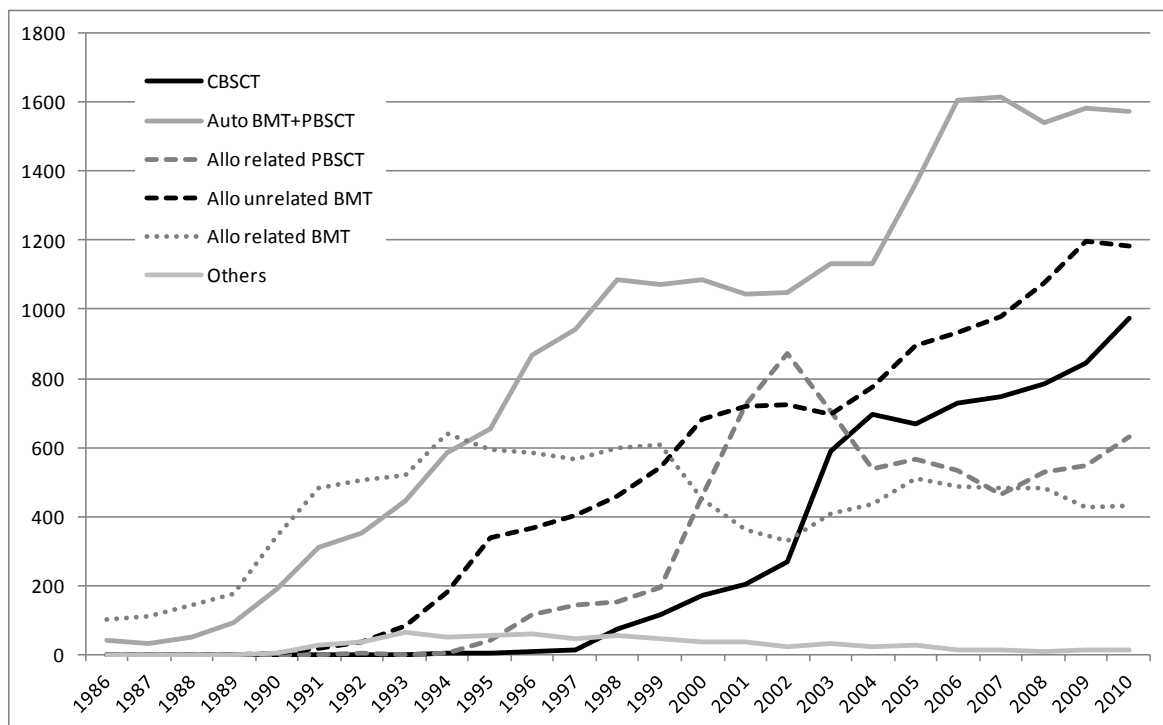


図1-1 日本における造血幹細胞移植数—細胞ソース別年次推移（日本造血細胞移植学会 H23年度全国調査報告書より）

凡例の略号は以下の通りである。CBSCT：臍帯血幹細胞移植、Auto BMT：自家骨髄移植、Auto PBSCT：自家末梢血幹細胞移植、Allo related PBSCT：血縁者間同種末梢血幹細胞移植、Allo unrelated BMT：非血縁者間同種骨髄移植、Allo related BMT：血縁者間同種骨髄移植。

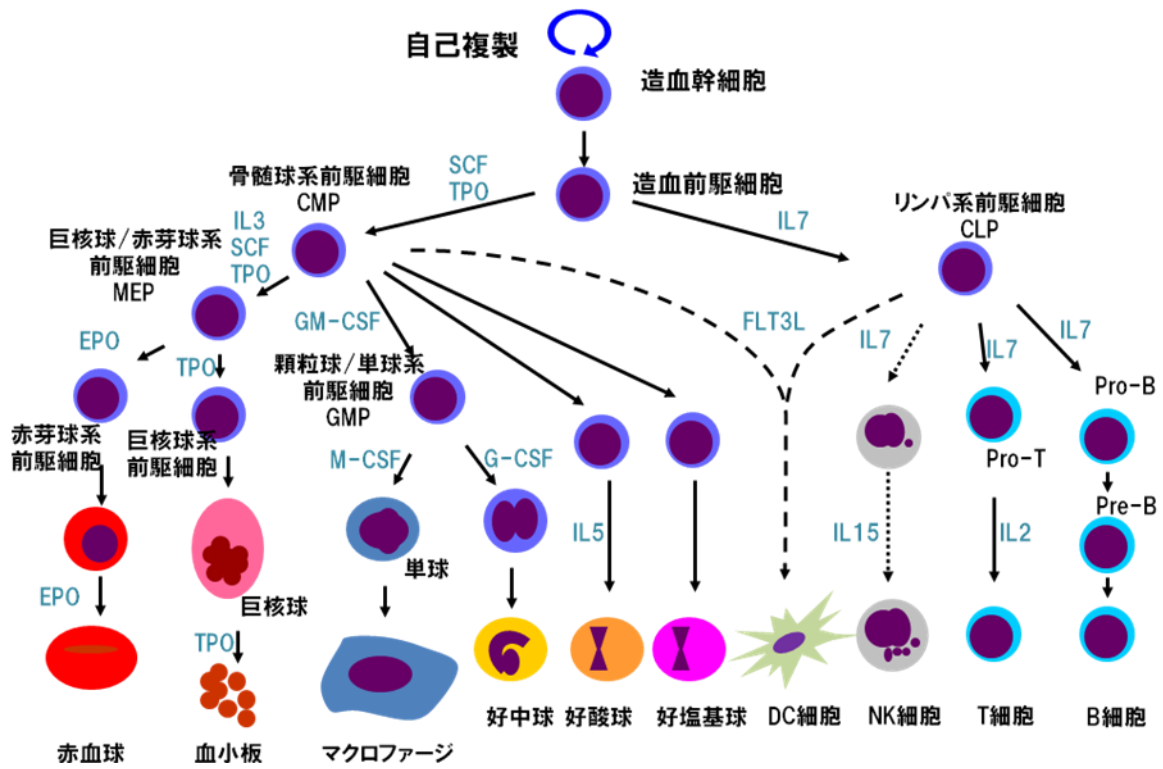


図1-2 血液細胞の分化階層性と細胞系譜

矢印は血液細胞の分化の方向性を示し、併記したサイトカインは分化の際に特異的に作用するサイトカインを示す。造血を長期にわたって支持できる造血幹細胞は、分化に伴い、まずその自己複製能を失い、造血前駆細胞へと変化する。

胎児型造血

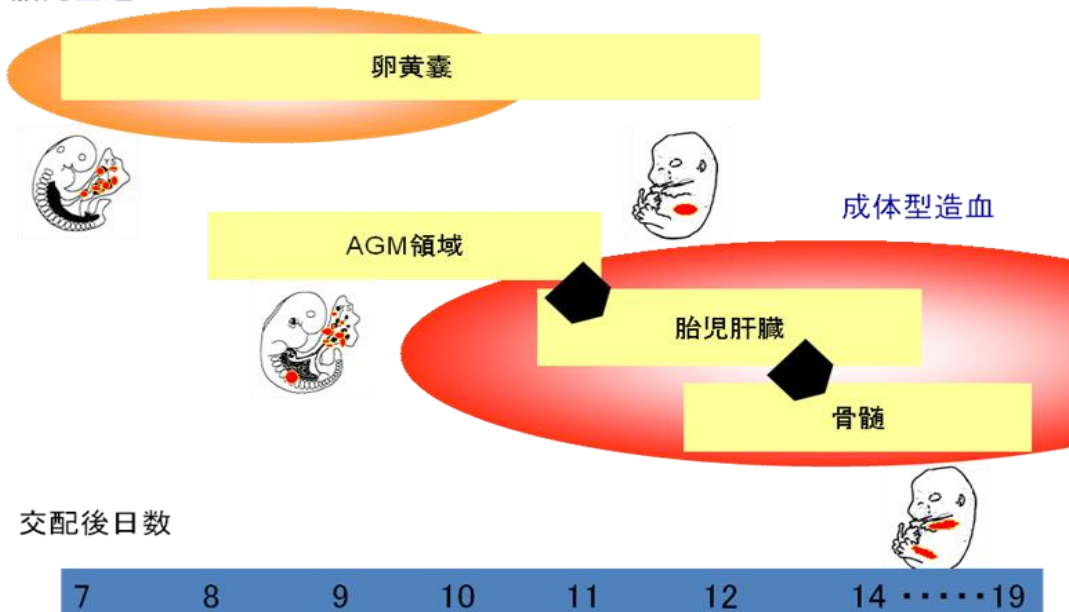


図1-3 マウスの造血発生

マウスでは胎生 7.5 日に胎仔外の卵黄囊の血島で、有核で胎仔型ヘモグロビンを有する原始赤血球とマクロファージを産生する胎仔型造血が始まる。成体型造血は胎生 10.5 日以降に大動脈-生殖隆起-中腎 (aorta-gonad-mesonephros: AGM)領域で発生し、肝臓 (胎児肝)から骨髄へ移動・定着し、生後は骨髄ですべての血球を産生し続ける。

第2章 AGM 領域由来ストローマ細胞の遺伝子発現解析による造血幹細胞増幅因子の探索

2-1 緒言

造血は骨髄などの造血組織における造血細胞と造血微小環境との密接な関与により制御されている。ストローマ細胞は造血微小環境の主要な構成要素であり、造血細胞の分化、増殖を制御する様々な因子を造血細胞に供給している (Fuchs et al., 2004; Ogawa, 1993; Schofield, 1978)。例えば、骨芽細胞や Tie2 リガンドである Angiopoietin-1 (Ang-1)などは造血幹細胞の維持に重要な場を提供することが知られている (Arai et al., 2004)。その中で、ヘパリン硫酸プロテオグリカンは微小環境の構築や、造血幹細胞とストローマ細胞との相互作用に関与することがこれまでに報告されている (Gupta et al., 1998)。ヘパリン結合蛋白として知られる CD45、PECAM-1、Thy-1 などの細胞表面蛋白が増殖因子や増殖因子の co-receptor を提示することにより、造血微小環境の構築に協調的に貢献していることが示されている。(Coombe et al., 1994; Hueber et al., 1992; Watt et al., 1993)

マウスの胚発生において、成体型造血幹細胞は最初に胎生 10.5 日 (E10.5)の AGM 領域に出現し、その後胎生 12.5 日には肝臓へ移行する (Medvinsky and Dzierzak, 1996; Muller et al., 1994; Takeuchi et al., 2002)。これまでに E10.5 の AGM 領域から、造血支持能を有する AGM-S3 ストローマ細胞株の樹立が報告されている (Xu et al., 1998)。さらに、通常造血再構築能を有しない E8 卵黄嚢由来細胞が AGM-S3 と共培養することにより長期再構築能を有する造血幹細胞に成熟することが示されている。このことは E10.5 の AGM 領域に由来するストローマ細胞が提供する微小環境が長期再構築能を有する造血幹細胞の発生に重要な役割を果たしていることを示しており、AGM-S3 細胞は初期造血に関わる分子機構の解明に役立つものと考えられる。

本研究において、著者らは AGM-S3 より造血支持能の異なるサブクローンの樹立を試みるとともに、造血支持細胞特異的に発現する遺伝子群の中から造血支持能に関する責任遺伝子の同定およびその遺伝子産物を用いた造血幹細胞の体外増幅を試みた。

2-2 実験材料と実験方法

2-2-1 細胞調製

AGM-S3 細胞は 10%FCS 含有 MEM α 培地 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) にて培養を行った。サブクローニングは細胞ソーター (FACS Vantage; Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA) を用いて行い、96 穴プレートへ1well 当り 1 細胞ずつソーティングを行った ヒト臍帯血細胞の入手と取扱いは、ヘルシンキ宣言に則り、旧キリンファーマ社の研究倫理審査委員会の承認の下、書面によるインフォームドコンセントを取得した後に実施した。単核球細胞はリンフォプレップ (Nycomed Pharma)を用いた Ficoll 密度勾配遠心により分離した。CD2、CD11c、CD19、CD15、CD41 あるいは Glycophorin A を発現する分化血球細胞は Dynal MPC-1 magnetic separator (Dynal Biotech, Norway)を用いて除去した。CD34 陽性細胞あるいは CD34 陽性 CD38 陰性細胞は FITC 標識抗 CD34 抗体および PC5 標識抗 CD38 抗体 (Immunotech)を用いて細胞ソーターにより回収した。マウス骨髄細胞は8週から 10 週齢の C57BL/6-Ly5.1 雄マウス (東京大学医科学研究所、中内啓光博士より分与頂いた)の大腿骨より回収し、PBS に懸濁した後、定法により造血幹細胞を濃縮した (Osawa et al., 1996; Osawa et al., 1996)。CD34 陰性 Sca-1 陽性 c-Kit 陽性 Lin 陰性細胞画分は細胞ソーターを用いて分離した。GPC1 の発現はラット抗マウス GPC1 モノクローナル抗体と二次抗体として PE 標識抗ラット IgG (BD Bioscience, CA)を用いて検出した。すべての動物実験は、旧キリンファーマ社の動物実験委員会の承認の下に行った。

2-2-2 コロニー形成試験

ストローマ細胞と造血幹細胞との共培養およびメチルセルロース・クローナル培養は既報 (Xu et al., 1998)に従って実施した。

コロニー形成試験は 10 ng/ml ヒト SCF、ヒト IL-3、ヒト IL-6、ヒト G-CSF、ヒト TPO および 2 IU/ml のヒト EPO を MethoCult H4230 (Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada) に添加して行った。

2-2-3 細胞移植

AGM 由来ストローマ細胞株 (AGM-S3-A9、AGM-S3-A7)、OP9 細胞 (RCB1124, RIKEN Cell Development Bank)、L929 細胞 (ATCC)、NIH3T3 細胞 (ATCC) それぞれを 48-well 培養ディッシュ (BD Falcon, MA) に 5×10^4 cells/well の濃度で播種し、10% FCS (HyClone, UT) 含有 MEM α 培地 (Invitrogen, CA) にて 3 日間培養した。C57BL/6-Ly5.1 マウスより予めソートした 30 個の造血幹細胞をストローマ細胞の各培養 well へと加えた (n=5)。共培養 7 日後に、well 毎に細胞を全回収し、C57BL/6-Ly5.2 マウス (Charles River) 由来の 3000 個の Lin 抗原陰性細胞と混合した後、8.5 Gy で X 線照射した 8 週齢の C57BL/6-Ly5.2 雄マウス (Charles River) の尾静脈より移植した。移植後のマウスより末梢血を採取し、フローサイトメーター (FCM) により C57BL/6-Ly5.1 マウス由来細胞を検出した (Osawa et al., 1996)。

2-2-4 Gene Chip 解析

Mouse Genome MG-U74A、B、C Probe array (Gene Chip, Affymetrix, Inc., USA) を用いて遺伝子発現プロファイルの解析を実施した。各ストローマ細胞株より RNeasy mini-kit (Qiagen, Chatsworth, CA) を用いて全 RNA を調製した。アレイ上の遺伝子の発現レベルにおける average difference (AD) を GeneChip ソフトウェアにより算出した。ハウスキーピング遺伝子である β -actin、GAPDH、pyruvate carboxylase、transferrin receptor の 3' 端プローブから計算される mean AD を使用し、STD を算出した。チップ間の染色強度の標準化のために、全てのチップの平均 STD に対する各チップの STD の比を用いて、各チップ上の全ての遺伝子の AD 値を割った値を標準化後の AD 値とした。標準化後の AD 値が 0.1 以下のものについては値を 0.1 で固定した。

2-2-5 RT-PCR 解析

RT-PCR 解析は、逆転写酵素 SuperScriptIII (Invitrogen)とオリゴ dT プライマーとを用いてトータル RNA から cDNA を合成し、DNAポリメラーゼ LATAq (Takara-Bio)により PCR 反応を行うことで実施した。PCR 用のプライマーは以下の配列を用いて実施した。

GPC1 forward, 5'-CCTGGCTTACCAAGGCTGTCA-3'

GPC1 reverse, 5'-GTGCTGGCAATAGCCTCTCTAAC-3'

GAPDH forward, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

GAPDH reverse, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

2-2-6 Plat-E 細胞への遺伝子導入およびストローマ細胞へのレトロウイルス感染

PCR 反応にて増幅した GPC1 cDNA を pMX-IRES-GFP (pMXIG) プラスミド (東京大学医科学研究所、北村俊雄博士より分与頂いた)あるいは pLRT プラスミド (京都大学、萩原正敏博士より分与頂いた)へとサブクローニングした。遺伝子導入試薬 FuGene6 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を用いてサブクローニング後のベクターをパッケージング細胞である PLAT-E 細胞株へと導入した (Morita et al., 2000)。遺伝子導入 48 時間後に、培養上清を回収し、6000 ×g で 16 時間 4°C にて遠心し、ウイルス粒子を濃縮した。ストローマ細胞の培地をウイルス含有培地に交換することでウイルス感染を行った。その後、GFP 陽性細胞を細胞ソーターでソーティングし、共培養評価に使用した。GPC1-A7 細胞はドキシサイクリン(Dox)500 µg/ml 存在下で GPC1 陽性細胞のソーティングを、非存在下で GPC1 陰性細胞をソーティングすることにより取得した。

2-3 結果

2-3-1 ストローマ細胞からのサブクローニング

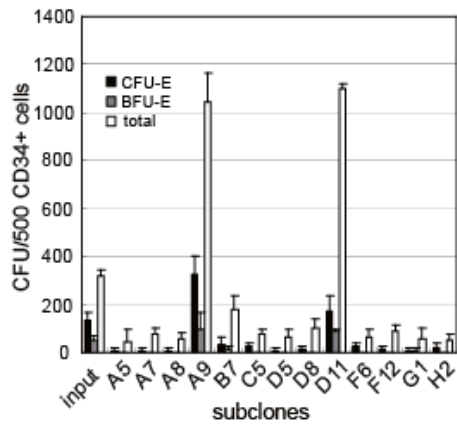
E10.5 の AGM 領域から、造血支持能を有する AGM-S3 ストローマ細胞株の樹立が報告されている (Xu et al., 1998)。しかしながら、本細胞株は繰返しの継代により造血支持活性の発現が不安定となることから、著者らは造血支持能の安定したサブクローンの樹立を試みた。我々は 96 個の一細胞ソーティングを行った AGM-S3 細胞のうち、増殖性を維持していた 13 個のサブクローンを選抜した。これらのサブクローンについて、AGM-S3 細胞株を樹立した際の方法に準じて、臍帯血由来の CD34 抗原陽性細胞からなるヒト造血前駆細胞との共培養系において造血支持能の評価を行った。その結果、2 クローンのみが造血支持活性を示し、他の 11 クローンは支持活性を示さなかった(図2-1A)。これらのクローンの中から、さらに支持活性がより安定しているサブクローン AGM S3-A9 および造血非支持活性サブクローンとして AGM-S3-A7 を選抜した。

AGM-S3-A9 との共培養 14 日後に、コロニー形成細胞数 (CFU-Cs) は 3.4 倍に増加したのに対し、AGM-S3-A7 との共培養ではわずかであった。さらにコロニー形成試験により、AGM-S3-A9 は CFU-GM、BFU-E、CFU-E を含む種々の細胞系譜の前駆細胞の増殖を支持することが明らかとなった(図2-1B)。以上より、AGM-S3-A9 はヒト造血を支持する活性を有することが示された。

新たに樹立したサブクローンの長期再構築能を有するマウス造血幹細胞に対する活性支持能を調べるため、マウス骨髄由来の Lin 陰性 c-Kit 陽性 Sca-1 陽性 CD34 陰性細胞 (34⁺KSL cells) と各種細胞株 AGM-S3-A9 cells、AGM-S3-A7 cells、OP9、L929、NIH3T3 cell lines との共培養を行った。AGM-S3-A9 と共培養した 34⁺KSL cells は、造血幹細胞の支持活性を有することで知られる OP9 細胞 (Kodama et al., 1994)と同様に、致死性放射線照射されたマウスにおいて高いキメリズムで造血系を再構築した (図2-2)。しかしながら、AGM-S3-A7、L929 あるいは NIH3T3 細胞株と共培養した 34⁺KSL 細胞を移植したマウスにおいては、ドナー細胞のキメリズムがいずれも低かった。以上より、

AGM-S3-A9 および AGM-S3-A7 の造血系に対する支持活性は、ヒトとマウスとで同等であることが示唆された。

A



B

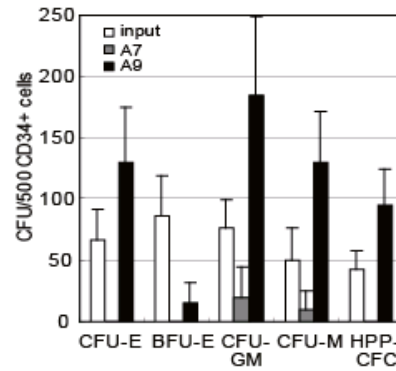


図2-1 AGM-S3 ストローマ細胞のサブクローニング

A:ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞と AGM-S3 由来サブクローンとの共培養を行った。ストローマ細胞を培養した各ウェルにヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を 500 個ずつ播種し、2 週間培養した。各ウェルからそれぞれ細胞を回収し、回収後の細胞についてコロニー形成試験を実施した。コロニー数の計測は培養 14 日目に実施した。

B:ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞と AGM-S3-A9 あるいは AGM-S3-A7 細胞と共培養を行い、コロニー形成試験を実施した。

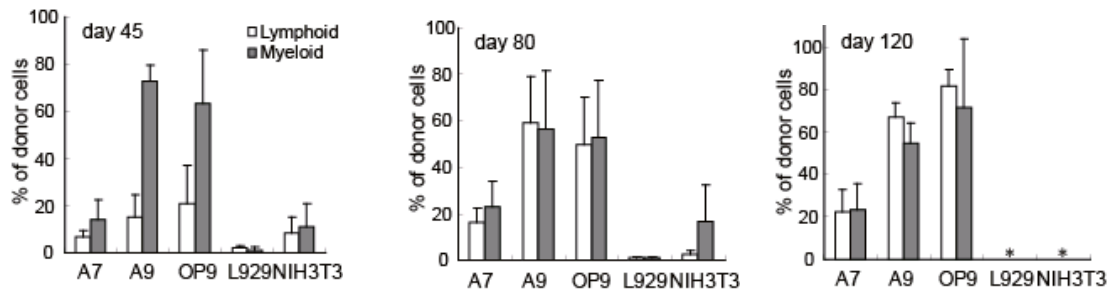


図2-2 各種ストローマ細胞と共培養したマウス骨髄由来 CD34 陰性 KSL 細胞の造血再構築能
 共培養には以下の細胞を用いた; AGM-S3-A7、AGM-S3-A9、OP9、L929、NIH3T3 細胞株。共培養後のマウス骨髄由来 CD34 陰性 KSL 細胞を致死量放射線照射マウスへと移植した(n=5)。Ly-5.2 レシピエントマウス末梢血中のリンパ球系 (Thy-1 抗原陽性および B220 抗原陽性)および骨髄球系 (Gr-1 抗原陽性および CD11c 抗原陽性)における Ly-5.1 抗原陽性細胞の割合を、移植後 45 日目、80 日目、120 日目について算出した。*印は生存個体がないことを示す。

2-3-2 AGM-S3-A9とAGM-S3-A7の遺伝子発現プロファイル解析

著者らは造血支持を促進する因子が AGM-S3-A9 や OP9 などの造血支持細胞において特異的に高発現しているのに対し、AGM-S3-A7 などの非支持細胞ではそれらの因子の発現が低いのではないかと考え、これらの細胞株について遺伝子チップを用いた遺伝子発現解析を実施した。AGM-S3 細胞を用いたこれまでの研究より、培養上清のみを用いた培養では細胞との共培養よりも造血支持活性が減少することより (Xu et al., 1998)、本研究において我々は特に膜分子あるいは膜結合性分子に注目することとした。

遺伝子発現プロファイル解析の結果、造血支持細胞である AGM-S3-A9、OP9 で2倍以上に発現差のある遺伝子として、特異的に高発現する 216 遺伝子、特異的に発現減少している 417 遺伝子を見出した。遺伝子発現プロファイルデータについては GEO データベース(the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>))へ登録を行った (GSE11891)。発現差が大きく、かつ膜蛋白あるいは分泌性蛋白と予想される分子を表2-1に列記した。AGM-S3-A9 で高発現する intercellular adhesion molecule (ICAM)、plexin domain containing 2 (Plxdc2)、glypican や syndecan などの heparan sulfate proteoglycans (HSPGs)などはこれまでに細胞間相互作用に関連することが報告されており、造血幹細胞とストローマ微小環境との相互作用に関係することが示唆される。

表2-1 AGM-S3-A9 および OP9 細胞において AGM-S3-A7 と比して高発現している遺伝子リスト

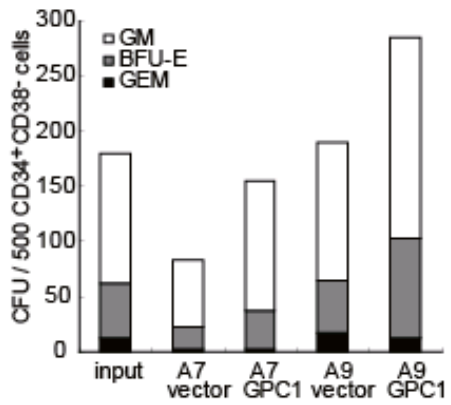
遺伝子名	GenBank accession number	発現比	
		A9/A7	OP9/A7
Cytokine-related genes			
interleukin 1 receptor antagonist	NM_031167	5.6	6.1
kit ligand	NM_013598	3.5	2.9
chemokine (C-X-C motif) ligand 12	NM_021704	3.4	4.3
growth arrest specific 6	NM_019521	3.3	4.2
chemokine (C-C motif) ligand 9	NM_011338	3.2	6.7
wingless related MMTV integration site 10b	NM_011718	2.5	3.1
fibroblast growth factor 10	NM_008002	2.3	4.6
adipo Q	NM_009605	2.3	19.1
Receptor-related genes			
G protein-coupled receptor 109A	NM_030701	11.4	30.3
ephrin B1	NM_010110	3.4	3
PTK7 protein tyrosine kinase 7	NM_175168	2.9	2.1
Notch gene homolog 3 (Drosophila)	NM_008716	2.4	3
discoidin domain receptor family, member 2	NM_022563	2.3	2.4
fibroblast growth factor receptor-like 1	NM_054071	2	4.8
multiple EGF-like-domains 8	XM_994009	2	2.4
Plexin D1	NM_026376	2	2.4
Extracellular matrix-related genes			
procollagen, type XV	NM_009928	23.5	9.4
procollagen, type IV, alpha 1	NM_009931	5.7	2.7
matrilin 4	NM_013592	5.3	2.2
glypican 6	NM_011821	5.3	4.5
a disintegrin and metallopeptidase domain 15	NM_009614	2.5	2.8
glypican 1	NM_016696	2.4	2.3
syndecan 3	NM_011520	2.1	3.7
Other			
R-spondin 3 homolog	NM_028351	27.8	200.2
intercellular adhesion molecule	NM_010493	8.8	24.7
retinoic acid receptor responder 2	NM_027852	5.8	3.7
fibronectin type III domain containing 3a	NM_207636	2.5	2
plexin domain containing 2	NM_026162	2.3	2.5
netrin 1	NM_008744	2	2.3
transmembrane protein 93	NM_025318	2.4	2.1
bladder cancer associated protein homolog	NM_016916	2.2	2

2-3-3 Glypican-1 によるヒト造血前駆細胞に対する増殖刺激活性の評価

造血支持細胞株で高発現する遺伝子をレトロウィルスベクターにより AGM-S3-A7 細胞で高発現させ造血幹細胞と共培養したところ、発現させたいずれの遺伝子も長期再構築造血幹細胞を増幅させることはなく、非支持細胞の活性を変化させることはなかった。一方それらの細胞と臍帯血由来の CD34 陽性 CD38 陰性細胞との共培養系において造血支持能の評価を行った結果、AGM-S3-A7 に Glypican-1 (GPC1)を高発現させた細胞を用いた時に AGM-S3-A9 を用いた時と同様にヒト造血前駆細胞を支持することを見出した (図2-3A)。さらに、AGM-S3-A9 に GPC1 発現ベクターを導入することにより、支持活性がさらに高まることを見出した。このことは内因性の GPC1 発現に伴う AGM-S3-A9 の造血支持活性は活性飽和状態ではなく、GPC1 の強制発現により AGM-S3-A9 細胞の潜在的な支持能力がさらに引き出すことが可能であることを示唆する。RT-PCR 解析の結果、造血支持活性の高い AGM-S3-A9 および OP9 細胞のいずれにおいても GPC1 の mRNA の発現レベルが造血支持活性の低い他の細胞株よりも高いことを確認した (図2-3B)。

ヒト造血を支持する GPC1 の活性を確認するため、著者らはテトラサイクリン誘導性の発現系を用いて、同じ細胞株を用いた条件下で GPC1 の発現の強弱による造血支持活性への影響を検討した。著者らはテトラサイクリン誘導性発現ベクターであるレトロウィルスベクター pLRT (Watsuji et al., 1997) を用いて、GPC1 発現 AGM-S3-A7 細胞株 (GPC1-A7) を樹立した。テトラサイクリン依存性 GPC1 の発現をフローサイトメーターにより確認した (図2-4A)。テトラサイクリンの安定誘導体であるドキシサイクリン(Dox)非存在下では GPC1-A7 は AGM-S3-A7 と同様にほとんど支持活性を示さなかったのに対し、Dox 存在下においては GPC1-A7 は BFU-E を含むヒト造血前駆細胞の増殖を、AGM-S3-A9 と同等に刺激した (図2-4B)。

A



B

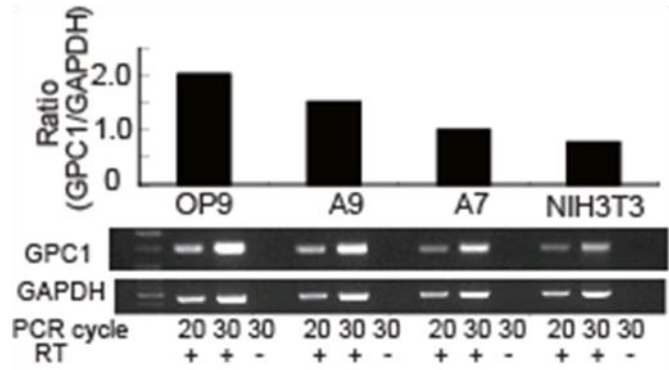
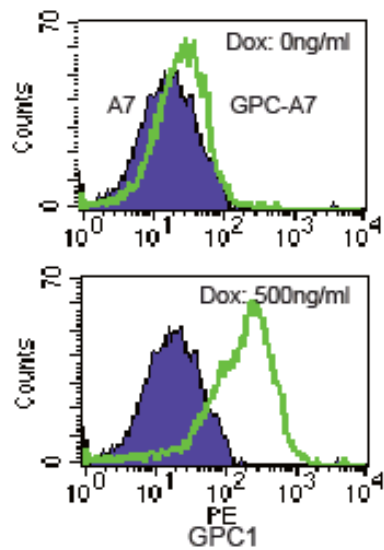


図2-3 Glypican-1 による造血支持活性

A: GPC1 をレトロウィルスベクターにより導入した AGM-S3-A9 あるいは AGM-S3-A7 とヒト臍帯血由来 CD34 陽性 CD38 陰性細胞 500 個との共培養を 14 日間実施した。細胞回収後コロニー形成試験を行い、培養 14 日目にコロニー数を計測した。

B: RT-PCR 解析による各細胞株における GPC1 の発現解析を行った。

A



B

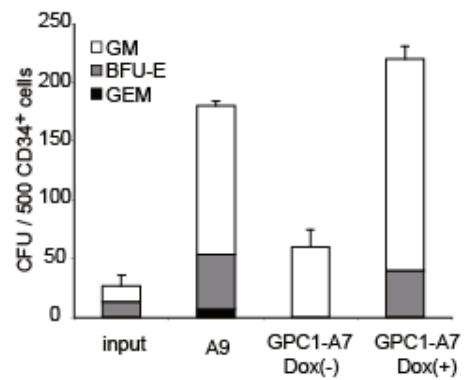


図2-4 Glypican-1 の誘導発現による造血支持活性

A: GPC1-A7 細胞を用いた Dox 依存的 GPC1 誘導発現のフローサイトメーターによる解析を示す。

青色はアイソタイプコントロール、緑色は抗 GPC1 抗体による染色結果を示す。

B: GPC1-A7 細胞とヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞 500 個との共培養を、500 ng/ml Dox 存在下あるいは非存在下にて 14 日間実施した。細胞回収後コロニー形成試験を行い、培養 14 日目にコロニー数を計測した。

2-4 考察

本研究において、GPC1 の遺伝子発現増加が AGM-S3-A7 の造血前駆細胞に対する増殖刺激能を回復させることを見出した。しかしながら、GPC1 が如何に造血支持活性を変化させたかについては未だ明らかとなっていない。GPC1 蛋白は 557 アミノ酸からなる GPI アンカー型のヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、発生期や成体脳における主要なプロテオグリカン分子として知られている(図2-5)。GPC1 が種々の増殖因子の受容体との結合性に影響する co-receptor として機能しうる報告と一致して、可溶化型の組換えヒト GPC1 蛋白が bFGF や VEGF と *in vitro* において結合することを確認している。これらより、GPC1 は増殖因子の受容体への提示様式を変化させることにより、造血支持環境を調節している可能性が示唆される。

著者らの実験は AGM-S3-A9 の造血幹細胞支持活性の一端を担う分子 GPC1 を見出した。また同時に AGM 領域における造血支持環境の分子機構解明に向けて重要な切り口を提供した。長期再構築能を有する造血幹細胞を増幅可能とする、構成分子が明らかな培養条件を見出すことは臨床応用する上で非常に重要である。しかしながら、ストローマ細胞非存在下において、組換え蛋白分子のみを用いて造血支持環境を再構築するには至らなかった。

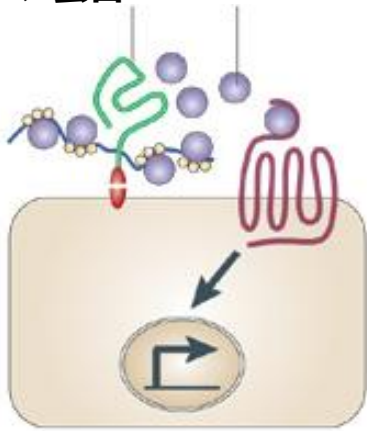
表2-1に含まれる CXCL12 は他のグループが樹立した AGM 由来ストローマ細胞においても高発現が認められている (Weisel et al., 2006)。CXCL12-CXCR4 シグナルは骨髄中における造血幹細胞プールの維持に重要であり、*in vitro* で培養した造血幹細胞の骨髄への生着に重要なことが示されている (Broxmeyer et al., 2003; Sugiyama et al., 2006)。しかしながら、組換え CXCL12 蛋白を AGM-S3-A7 に添加しただけでは、造血支持活性を賦与することはできなかった。同様に、造血因子として知られる SCF (Huang et al., 1990; Zsebo et al., 1990)が表2-1にリストされていることから、AGM-S3-A7 に SCF を高発現させ共培養を試みたが、造血幹細胞の維持活性を賦与することはできなかった。これまでに AGM-S3-A9 との共培養において、SCF の受容体である c-kit に対する抗体が造血前駆細胞数を減少させる一方、長期再構築能の維持に対しては影響を与えないことを報告して

いる (Nishikawa et al., 2001)。SCF は造血前駆細胞の増殖に必要であるが、造血幹細胞の維持には必須ではないことが示唆される。

個々の候補分子により造血細胞に対する支持活性は確認できるあるいは報告されているものの、いずれも単独で長期再構築造血幹細胞を増幅することはできていない。今回見出した AGM-S3-A9 細胞に高発現する分子を組み合わせることで、造血支持環境を再構築できる可能性は十分にあり、引き続きそれらを検討することが必要であると考ええる。

グリピカン
コア蛋白

リガンド分子



- Glypican-1 蛋白 557 a.a.
- GPIアンカー型のヘパラン硫酸プロテオグリカン
- Glypican-1 は発生期や成体脳における主要なプロテオグリカン分子
- FGFs, EGF, Wnts, TGFbなどのコレセプターとして機能
- ヘパラン硫酸糖鎖を介して種々のシグナル分子の活性を制御することが示唆されている。

(Hacker et al., 2005)

図2-5 Glypican-1 (GPC1)分子の特徴

Glypican-1 は主にヘパラン硫酸糖鎖を介して種々のリガンド分子と結合し、受容体を介したシグナル伝達に対して補助的な機能をしていることが示唆されている。

2-5 小括

AGM-S3 細胞株から新たにサブクローニングを行い、造血を支持する S3-A9 細胞株と造血支持能のない S3-A7 細胞株を取得した。gene chip を用いた発現解析の結果、著者らはヘパラン硫酸プロテオグリカンファミリーの一つである Glypican-1 (GPC1) が AGM-S3-A9 細胞株に高発現していることを見いだした。GPC1 を高発現させた S3-A7 細胞株との共培養は、ヒト臍帯血由来造血前駆細胞を増幅した。GPC1 は初期造血を支持する微小環境の構築に重要な機能を果たしていることが示唆された。

第3章 マウス骨髄細胞からの効率的リプログラミング

3-1 緒言

いつでも供給可能な移植用細胞は、遺伝性疾患や再生不良性の損傷に苦しむ患者にとって最も効率的な治療を提供できると考えられる。ヒト ES 細胞はヒト受精胚を破壊することに伴う倫理的課題や移植後の免疫拒絶などの課題について議論が残るものの、細胞移植治療の有力な移植ソースとなりうると考えられている (Hochedlinger and Jaenisch, 2003; Lerou and Daley, 2005; Thomson et al., 1998; Weissman, 2006)。これまでに体細胞に多能性を賦与するために、体細胞核移植や細胞融合などの種々のアプローチが取られてきた (Byrne et al., 2007; Cowan et al., 2005; Do and Scholer, 2004; Wakayama and Yanagimachi, 2001; Yang et al., 2007; Yu et al., 2006)。哺乳類細胞を用いて行われてきたこれらの実験は、ヒト患者においても同様な多能性幹細胞を産み出しうる道を示した。これまでの研究により、成体由来体細胞のエピジェネティックな状態は、卵や ES 細胞に含まれる因子によるリプログラミングに対する受容性を残していることが示されている (Byrne et al., 2007; Campbell et al., 1996; Hochedlinger and Jaenisch, 2006; Wakayama et al., 1998; Wilmut et al., 1997)。しかしながら、ヒト体細胞クローンの作出にまつわる倫理的課題や、クローン取得の効率の低さなどから、核リプログラミングの別法が望まれていた (Jaenisch and Young, 2008)。それらの課題を解決する技術として、4 つの転写因子 Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4 を用いて患者自身の体細胞から多能性幹細胞 iPS 細胞を生み出しうることを示された (Maherali et al., 2007; Meissner et al., 2007; Okita et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2007)。細胞を用いた治療可能性については、既にマウスモデルなどで示されている (Hanna et al., 2007)。

これまでのマウス iPS 細胞研究においては体細胞として MEF が用いられてきたが、ヒトの場合に胚性細胞を用いることは難しい。そこでヒトの細胞リプログラミングには、表皮由来線維芽細胞が用いら

れており、臨床応用性についても示されている (Blueloch et al., 2007; Lowry et al., 2008; Park et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007)。患者より誘導された iPS 細胞を用いた病態解析、治療法開発は種々の遺伝性疾患で試みられ始めている (Park et al., 2008)。移植治療を考慮した場合、どの細胞ソースが最適であるかを見極めることは重要な問題である。マウス肝細胞や胃上皮細胞より誘導された iPS 細胞は MEF 由来の iPS 細胞より造腫瘍性の危険性が低いと報告されている (Aoi et al., 2008)。しかしこれらの組織は侵襲性の観点から理想の組織とは言えない。一方、造血組織由来細胞もドナーソースとなりうることが示されている。あらかじめリプログラミング4因子を誘導発現性に組み込んだトランスジェニックマウスを用いた実験により、骨髄ストローマ細胞や造血細胞から iPS 細胞が樹立されたことが報告されている (Takahashi and Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2008)。しかしながら、トランスジェニックマウスとは異なる野生型マウスの初代造血細胞から iPS 細胞が誘導可能かどうかは示されていなかった。そこで本研究では、マウス骨髄単核球細胞がドナー細胞として多能性幹細胞へとリプログラミングされうるか検討した。

3-2 実験材料と実験方法

3-2-1 実験動物

Oct4-GFP トランスジェニックマウスは横浜市大、大保和之博士より分与頂いた (Ohbo et al., 2003)。Nude mice (BALB/Jcl-nu) は日本クレアより購入した。すべての動物実験は日本国の法令ならびにガイドラインに準拠し、旧キリンファーマ社動物倫理審査委員会の承認を得て実施した。

3-2-2 細胞と細胞培養

BM cells は 12 週～24 週令のマウスより採取し、Histopaque 密度勾配遠心により MNCs を分離した。MEF は 13.5 dpc 胚より調製した。細胞融合実験には KH2 ES 細胞 (Whitehead Institute、Rudolf Jaenisch 博士より分与頂いた)を用い、マイクロアレイ解析には E14 ES 細胞をコントロールとして使用した。ES および樹立された iPS 細胞の培養は irradiated MEF (大日本住友製薬、大阪)上で ES 培地 (DMEM、20% FBS、leukemia inhibiting factor (LIF)、penicillin/streptomycin、L-glutamine、beta-mercaptoethanol、nonessential amino acid)を用いて行った。

3-2-3 細胞融合

5×10^5 個の KH2 ES 細胞と 2×10^6 個の BM MNCs あるいは MEF を混合し、HVJ-E (石原産業, Japan) を用いて細胞融合を実施した。融合細胞は MEF 上に播種し、ES 培地にて培養し、毎日培地交換を実施した。

3-2-4 レトロウイルスベクターの構築とウイルス調製

マウス Oct3/4、Sox2、Klf4 および c-Myc cDNA は SuperScript™ Mouse Testis cDNA Library (Invitrogen, CA)をテンプレートとして増幅した。cDNA はレトロウイルスベクター pMXs へとクローニングし、パッケージング細胞である PLAT-E 細胞へトランスフェクションした。2 日後に 4 種の上清を回収し、混合し、0.45- μm のフィルターで濾過後、BM MNCs あるいは MEF 培養へ添加し感染させた。コ

ントロールとして、pMXs IRES-GFP vector を用いた。

3-2-5 レトロウイルス感染と iPS 細胞誘導

レトロウイルスの高効率感染法として、RetroNectin (Takara-Bio, Japan)でコートした 12-well dish にウイルスを含んだ上清を加え、1060 ×g で 40 分間遠心する。プレート表面へのウイルスの吸着の後、 5×10^5 個の BM MNCs あるいは MEF をそれぞれのウェルに播種する。通常感染の場合、12-well dish のそれぞれのウェルに 2×10^4 個の MEF を播種し、翌日にウイルス液を添加する。2 日後に ES 培地に交換し、放射線照射した MEF 上で培養する。コントロールの GFP の発現はこの時点で回収し、フローサイトメトリーにより解析を実施する。その後、毎日 ES 培地による培地交換を実施し、7 日～15 日後の間に細胞を回収し、フローサイトメトリー解析あるいは細胞ソーティングを行い、細胞のクローニングを実施した。

3-2-6 抗体およびフローサイトメトリー解析

フローサイトメトリー解析には以下の蛍光標識抗体を使用した。Alexa Fluor 647 (Invitrogen, CA) 標識 anti-mouse SSEA1 (Millipore, MA)、APC 標識 anti-mouse CD45 LCA (BD-Bioscience, CA)。フローサイトメトリー解析や細胞ソーティングには FACSCalibur あるいは FACS Aria (BD-Bioscience)を使用した。

3-2-7 奇形腫形成試験およびキメラマウス作製

iPS 細胞を 1×10^7 cells/ml の濃度で 10% FBS 入り DMEM に懸濁し、1 匹あたり 100 μ l を皮下に注入した。2 週あるいは 4 週後に腫瘍塊を外科的に摘出し、4%ホルムアルデヒドによる固定後、パラフィン包埋し、切片作製後にヘマトキシリンおよびエオジンで染色した。

キメラマウスの作製はフェニックスバイオ社にて実施した (Utsunomiya, Japan)。10-15 個の iPS 細胞あるいは ES 細胞を BALB/cA マウスの胚盤胞へ注入し、ICR マウスの仮親へと移植した。

3-2-8 遺伝子発現解析

RT-PCR 解析は、逆転写酵素 SuperScriptIII (Invitrogen)とオリゴ dT プライマーとを用いてトータル RNA から cDNA を合成し、DNA ポリメラーゼ LATAq (Takara-Bio)により PCR 反応を行うことで実施した。PCR 用のプライマーは過去の文献 (Takahashi et al., 2007)) と以下の配列を用いて実施した。Nanog forward, 5'-GTTTCAAACCAAAGGATGAAGTG-3'、および Nanog reverse, 5'-GGGTTGGTCCAGGTCTGGCT-3'、GAPDH forward, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC -3'、および GAPDH reverse, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。

マイクロアレイ解析のために、ES 細胞、iPS 細胞、および BM MNCs 由来のトータル RNA を蛍光色素 Cy3 にて標識し、アジレント社の Whole Mouse Genome Microarray 4 x 44K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) に一色法にてハイブリダイズを行った。ハイブリダイズ後のアレイは Microarray Scanner System (Agilent Technologies)にて解析し、解析ソフト Feature Extraction ver.9.5 (Agilent Technologies) にて画像ファイルの読み取り、シグナルのデータ処理を実施した。解析結果については、GEO DataSets へ登録 (accession number GSE15775)を実施した。

3-2-9 サザンブロット解析

染色体 DNA は Puregene DNA purification Kit (Gentra systems, MN)を用いて調製した。各 DNA 試料を制限酵素 *Bam*HI あるいは *Bam*HI と *Bg*III (Takara-Bio)を用いて消化し、0.7%アガロースゲルを用いた電気泳動による分離後にナイロンメンブレン (Hybond-N+, GE Healthcare, UK) へトランスファーし、³²P 標識したプローブによりハイブリダイズを行った。ハイブリダイズしたプローブのシグナルは Typhoon imaging system (GE Healthcare)を用いて検出した。

3-3 結果

3-3-1 細胞融合による骨髄単核球細胞のリプログラミング

共培養系においてマウス骨髄細胞は ES 細胞と自発的に融合し、さらに融合細胞は ES 細胞様の形質を備えうることを過去の報告により示されている (Terada et al., 2002)。そこで体細胞のリプログラミング効率を調べるため、著者らは Oct4-GFP マウス由来の BM MNCs と MEF cells をそれぞれ ES 細胞と融合した。おおよそ 2×10^6 個の BM MNCs あるいは MEF cells と 5×10^5 個の ES 細胞を hemagglutinating virus of Japan envelop (HVJ-E) を用いて融合した。融合 2 日後には BM MNCs よりも MEF cells と融合した細胞の多くが Oct4-GFP を発現していた (図3-1A、表3-1)。しかしながら、融合 8 日後には MEF cells よりも BM MNCs と融合した細胞から、より多くの Oct4-GFP 陽性の ES 細胞様コロニーが得られた (図3-1B、表3-1)。核型解析の結果、Oct4-GFP-を発現するコロニー形成細胞は 4 倍体を呈しており、これらは細胞融合の結果得られた細胞であることが示された。これらの結果は Oct4-GFP 発現コロニー形成細胞は Oct3/4 遺伝子を発現し、ES 細胞様コロニーを形成しうる始原状態にリプログラミングされたことを示している。さらにこのことは、BM MNC 由来核が MEF 細胞由来核よりも Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 因子により容易にリプログラミングされることが推察された。

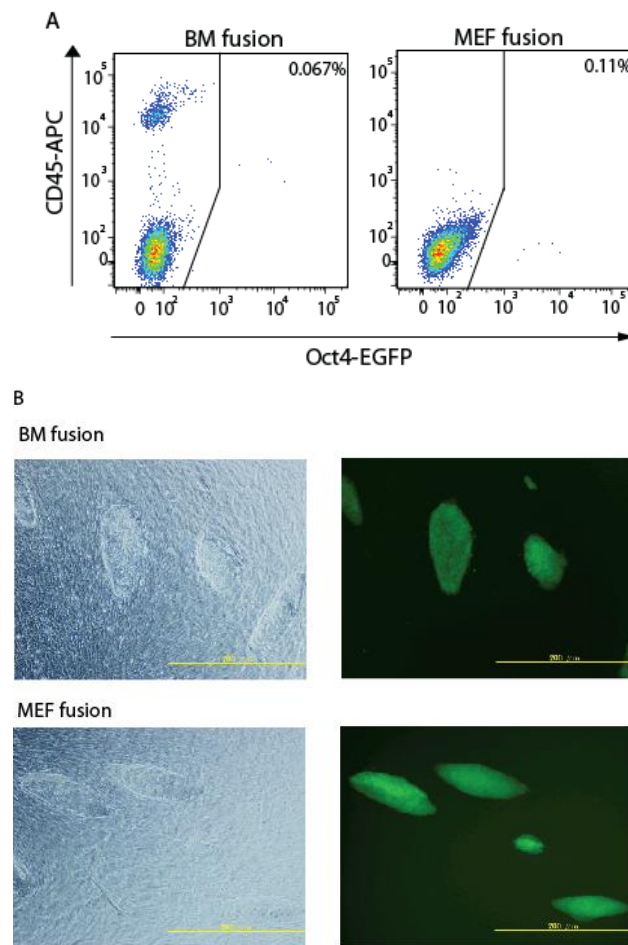


図3-1 ES 細胞と BM MNCsあるいは MEF との融合細胞のリプログラミング

A: 細胞融合 2 日後における Oct4-GFP 発現を FCM により解析した。CD45 は汎血球マーカーを示す。

B: ES 細胞と体細胞との融合細胞により形成されるコロニーの形態および融合後 8 日目におけるコロニー形成細胞の明視野像と Oct4-GFP の発現を示す。

表 3 - 1 細胞融合によるリプログラミング

体細胞	細胞融合 48 時間後		細胞融合 8 日後
	Oct4-EGFP 発現細胞の割合	ソーティングした Oct4-EGFP 発現細胞数	Oct4-EGFP 陽性コロニー数
BM	0.067%	320 cells	40 colonies
MEF	0.11%	520 cells	7 colonies

2×10^6 個の骨髄由来単核球細胞あるいは胚性線維芽細胞と 5×10^5 個の ES 細胞を融合した。

3-3-2 マウス骨髄単核球細胞からの iPS 細胞誘導

レトロウイルスによりマウス Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc 遺伝子を BM MNCs あるいは MEF cells (5×10^5 cells)に導入した。遺伝子導入効率を見積もるため、GFP 発現コントロールウイルスを同様に各体細胞へと導入した (図3-2A)。感染効率は 43.7%であったものの、Oct4-GFP 発現 BM MNCs は感染 5 日後に出現した。Oct4-GFP 発現コロニーは感染7日後に現れ、11 日後にコロニーをピックアップした (図3-2B)。培養した細胞の約 8% (4×10^4 個以上の細胞) が感染 7 日後に GFP を発現しており、著者らは FACS による細胞ソーティングを試みた (図3-2C)。骨髄由来 iPS (BM iPS) クロニーは、SSEA-1 のような未分化な ES 細胞マーカー遺伝子を発現し、BM MNCs の 85%以上の細胞が CD45 の発現が抑制されていた。同時に試みた MEF cells からの iPS 細胞誘導では、感染 5 日後のコロニー形成細胞の出現と、感染 7 日後の Oct4-GFP 発現コロニーの形成を認めたものの (図3-2D)、最終的にクロニーを樹立することはできなかった。以上より、4 因子を用いた BM MNCs のリプログラミングはレトロウイルスの高効率な遺伝子導入を必要とせず、また MEF 細胞を用いるよりも短時間で ES 細胞様コロニーのピックアップおよび iPS 細胞クロニーを樹立できることが示された。

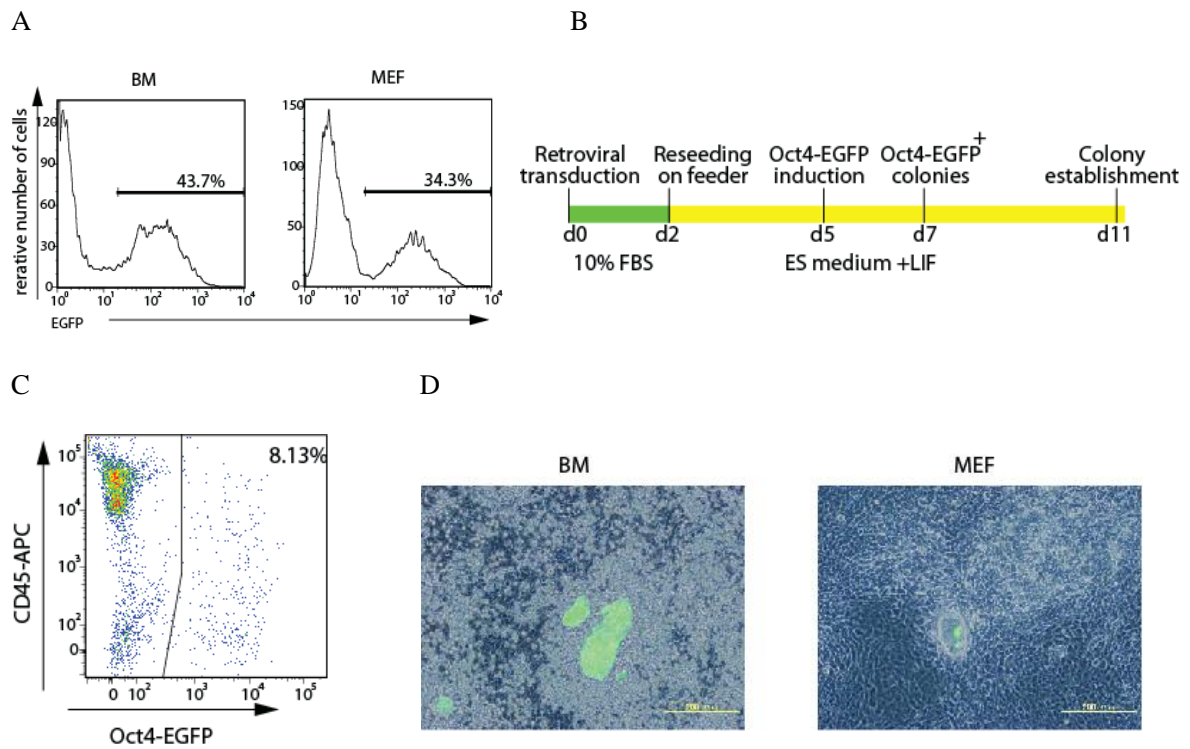


図3-2 骨髄由来 iPS 細胞のコロニー形成

- A) pMXs IRES-GFP レトロウィルスベクターの感染効率を FCM により解析した。
- B) 骨髄由来 iPS 細胞誘導のタイムスケジュールを示す。
- C) レトロウィルス感染後 7 日目の骨髄由来単核球細胞を FCM により解析した。CD45 は汎血球マーカーを示す。
- D) レトロウィルス感染後 7 日目のコロニー形態と Oct4-GFP の発現を示す。

3-3-3 BM iPS 細胞の幹細胞マーカー遺伝子発現および多能性解析

今回樹立した BM iPS cell クローン株#7 (図3-3A)、#13 と BM MNCs およびマウス ES 細胞 (E14) について、RT-PCR および DNA マイクロアレイを用いた比較を行った。RT-PCR 解析の結果、BM iPS cell クローンは内在性の Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc 遺伝子を ES 細胞と同等に発現し、Nanog、Eras、Rex1、Esg1、Gdf3 などの ES 細胞マーカー遺伝子も同様に発現することを確認した (図3-3B)。一方レトロウイルス由来4遺伝子の発現は BM iPS cells においてきわめて低かった。また DNA マイクロアレイ解析の結果、総合的な遺伝子発現パターンは BM iPS と ES 細胞間で酷似していた (linear coefficient of determination, $R^2 = 0.97$) が、BM iPS cells と MNCs の発現パターンは大きく異なっていた ($R^2 = 0.45$; 図3-4)。4遺伝子の挿入コピー数を調べるため、サザン解析を実施したところ、挿入コピー数は 1~5 コピーであり、MEF iPS 細胞についての報告にくらべ少ないことが明らかとなった (図3-5)。

BM iPS cells の多能性を調べるため、 1×10^6 個の BM iPS 細胞をヌードマウスの皮下に移植した。移植 4 週間後、移植したすべてのマウスで奇形腫の形成が認められた。病理解析の結果、形成腫瘍は以下のような多様な組織細胞を含んでいた (図3-6)、神経組織 (外胚葉性)、ケラチン含有上皮組織 (外胚葉性)、筋肉線維細胞 (中胚葉性)、軟骨 (中胚葉性)、salivary gland cells (内胚葉性)、膵臓様組織 (内胚葉性)。以上より、BM iPS は多様な細胞系譜へ分化可能であることが示された。

次に BM iPS 細胞のキメラマウス形成能を調べた。10-15 個の BM iPS 細胞を BALB/c-由来の胚盤胞へ注入し、仮親へと移植した。その結果、毛色から BM iPS cell の由来を判別可能なキメラマウスを取得した。Oct4-GFP transgenic マウスが C57BL/6 系統であることから、BM iPS 細胞に由来する細胞は black coat color を呈する (図3-7A、表3-2)。さらにキメラマウスをメスの C57BL/6 と交配した結果、キメラマウスのうちの 1 匹に由来するすべての F1 マウスが nonagouti black coat colour を呈した (図3-7B)。このことは BM iPS cells が親キメラマウスにおいて生殖系列細胞に分化していたことを意味する。以上より、BM iPS 細胞は ES 細胞と同等の多能性を有することが示された。

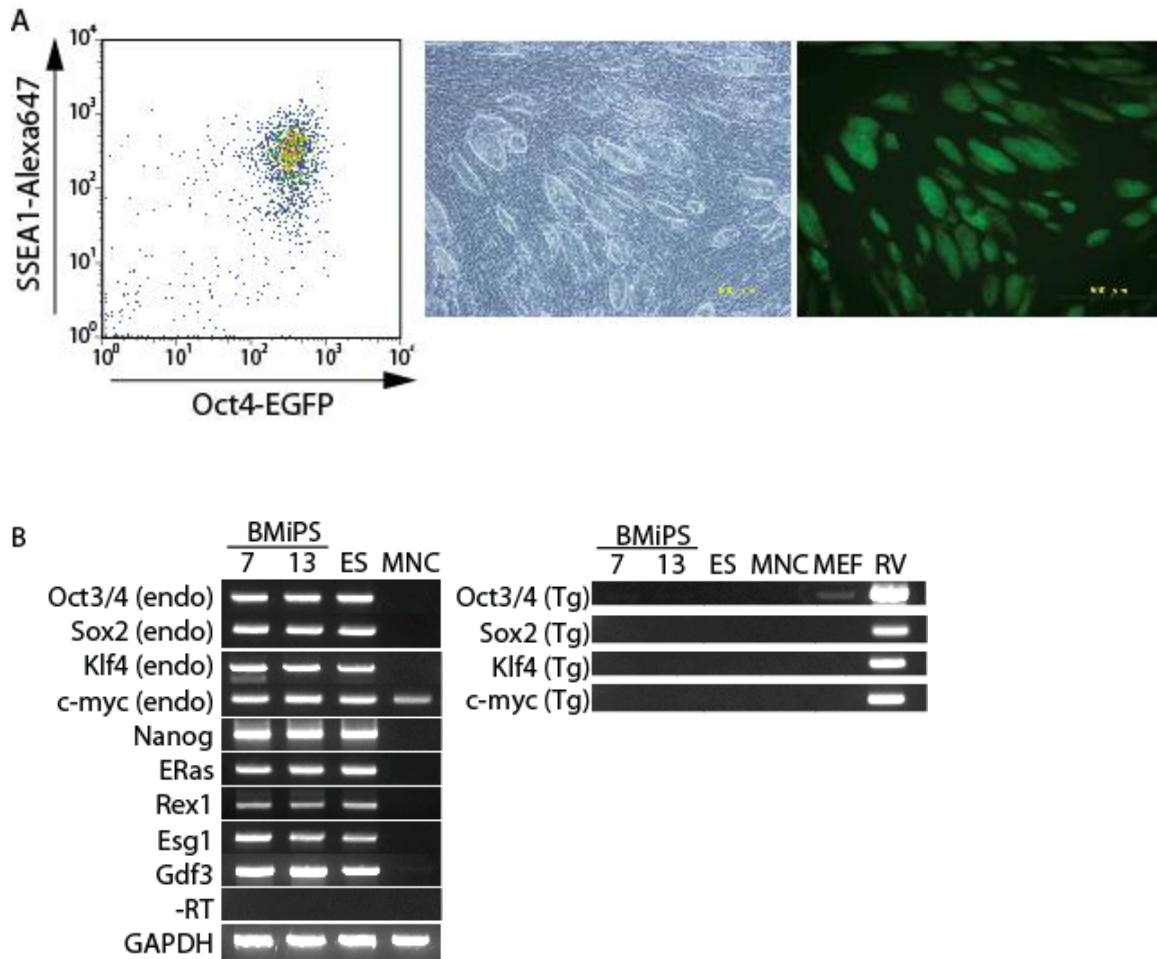


図3-3 骨髄由来 iPS 細胞と ES 細胞マーカー発現解析

A) BM iPS 細胞株 #7 の Oct4-GFP 発現と ES 細胞マーカーである SSEA-1 発現の FCM 解析およびコロニー形態の明視野像と Oct4-GFP の発現を示す。

B) BM iPS 細胞株#7、#13、ES 細胞および骨髄単核球細胞における ES 細胞マーカーおよび iPS4 遺伝子についての RT-PCR 解析。Endo は内在遺伝子からの発現を示し、Tg はレトロウイルス由来の遺伝子発現を示す。

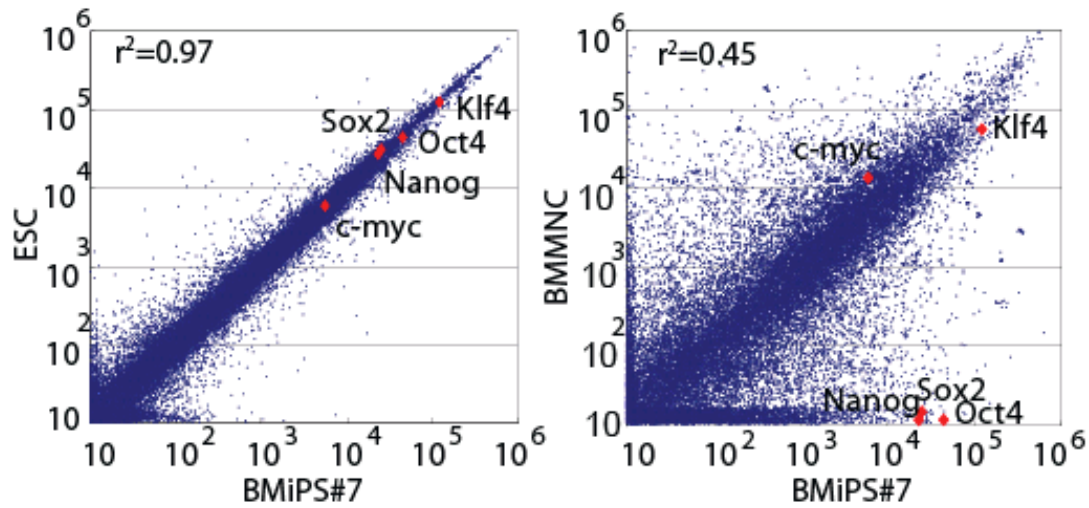


図3-4 骨髄由来 iPS 細胞と ES 細胞の発現プロファイル比較

DNA マイクロアレイを用いた BM iPS 細胞株 #7 と ES 細胞、および BM iPS 細胞株 #7 と骨髄由来単核球細胞の遺伝子発現を比較した。iPS4 遺伝子および ES 細胞マーカーである Nanog の発現強度について、赤色の点で表示する。

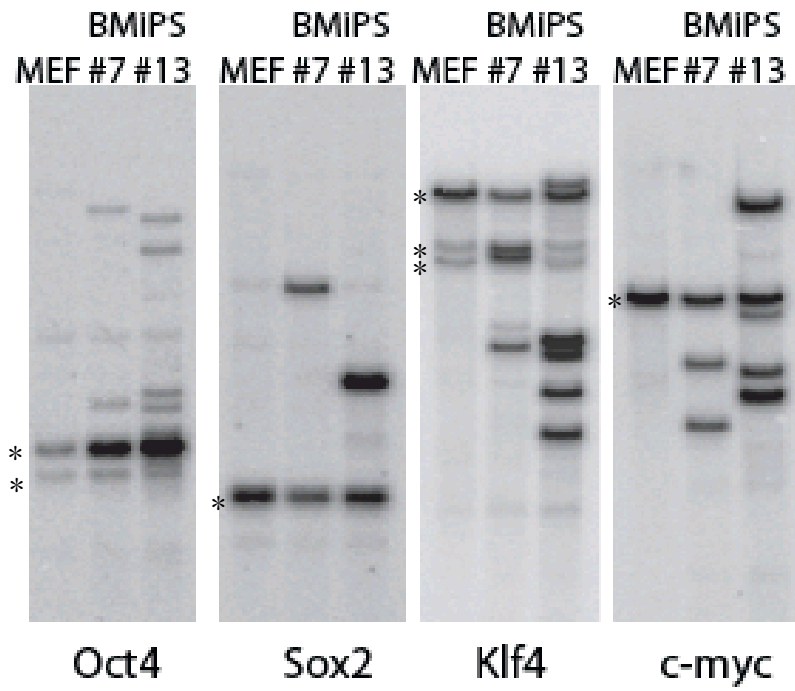


図3-5 骨髓由来 iPS 細胞のサザンブロット解析

BM iPS 細胞株#7、#13 について、iPS4遺伝子のサザン解析を行った。ゲノム DNA は制限酵素 *Bam*HI (Klf4、c-myc)あるいは *Bam*HI および *Bg*III (Oct4、Sox2)で消化した。*は内在遺伝子のシグナルを示す。

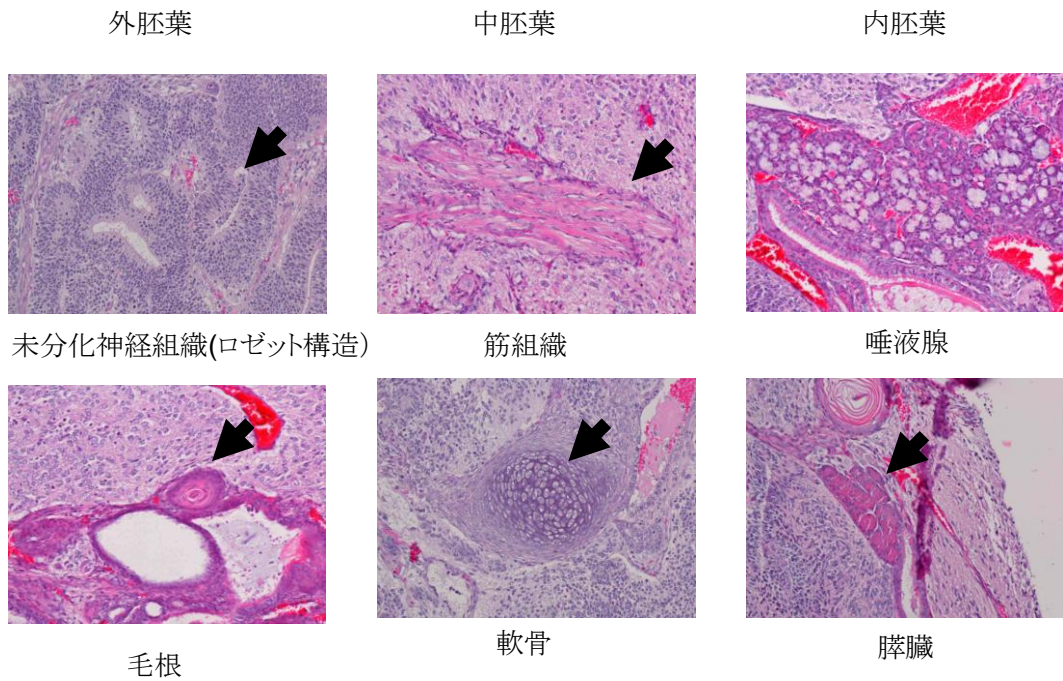


図3-6 in vivo における多分化能評価

BM iPS#7 を 1×10^6 cells/ head(Nude マウス)で皮下移植後 4 週目に形成された奇形腫の組織学的解析を行った;いずれも HE 染色。矢印が各組織の特徴的構造を示す。

A



B



図3-7 BM iPS 細胞からのキメラマウス作製および F1 マウス作製

A) BM iPS 細胞株#7を用いたキメラマウス作製。10-15 個の iPS 細胞あるいは ES 細胞を BALB/cA マウスの胚盤胞へ注入し、ICR マウスの仮親へと移植した。Oct4-GFP transgenic マウスは C57BL/6 系統であることから、BM iPS 細胞に由来する細胞は黒色の毛色を呈する

B) BM iPS 細胞株#7 由来の雄キメラマウスと雌の C57BL/6 マウスとの交配により得られた産仔。全ての F1 マウスは 100% 黒色の毛色を呈した。

表3-2 キメラマウス作製のための移植胚数および取得キメラ個体数

<i>Cell line</i>	<i>Number of injected blastocyst</i>	<i>Number of birth chimera</i>	<i>Number of live chimera</i>
Bone marrow induced pluripotent stem #7	40	24	8 (♂5)
Bone marrow induced pluripotent stem #13	66	23	3 (♂2)
BL/6 ES	14	7	1 (♂1)

3-3-4 骨髄より誘導される iPS 細胞のクローン分析

レトロウイルス遺伝子導入後の BM MNCs において Oct4-GFP 発現細胞を一細胞ソーティングすることにより、iPS 細胞のクローン分析を行った。4 遺伝子を 1×10^5 個の BM MNCs あるいは MEF cells に導入し、BMMNC については感染 8 日後、MEF については感染 15 日後に、Oct4-GFP 細胞の一細胞ソーティングを行った。BM MNCs は 8 日目の時点で 9% の細胞が Oct4-GFP を発現しており、GFP 陽性細胞を 5 枚の 96 穴プレートの各ウェルにソートした (図3-8A)。ソートした細胞の内 19 ウェルで細胞増殖が認められ、19 のうち 17 ウェルで SSEA1 の発現を伴う ES 細胞様コロニーの形成が認められ、残り2ウェルでは SSEA-1の低い発現しか認められなかった (表3-3)。サザンブロット解析の結果、17 個のコロニー形成クローンのうちいくつかは同一のクローン由来であることが判明し、17 個のコロニーは 4~5 クローンの細胞に由来することが判明した (図3-8B)。またサザンブロット解析の結果、これらのクローンではレトロウイルス由来の Sox2 遺伝子挿入が 1~2 コピーであることが判明し、報告されている MEF 由来 iPS 細胞におけるコピーよりもはるかに少ないことが明らかとなった (Aoi et al., 2008)。一回の BM MNCs への遺伝子導入の結果、複数クローンの iPS 細胞株を取得することができた。一方、MEF cells については感染 15 日後に 0.009%の細胞が Oct4-GFP を発現しており、GFP 発現細胞を 6 枚の 96 ウェルプレートに一細胞ソーティングした。しかしながら、6 枚のプレート中 2 ウェルにて細胞の増殖が認められたものの、結局 ES 細胞様のコロニーは一つも得られなかった (表3-3)。

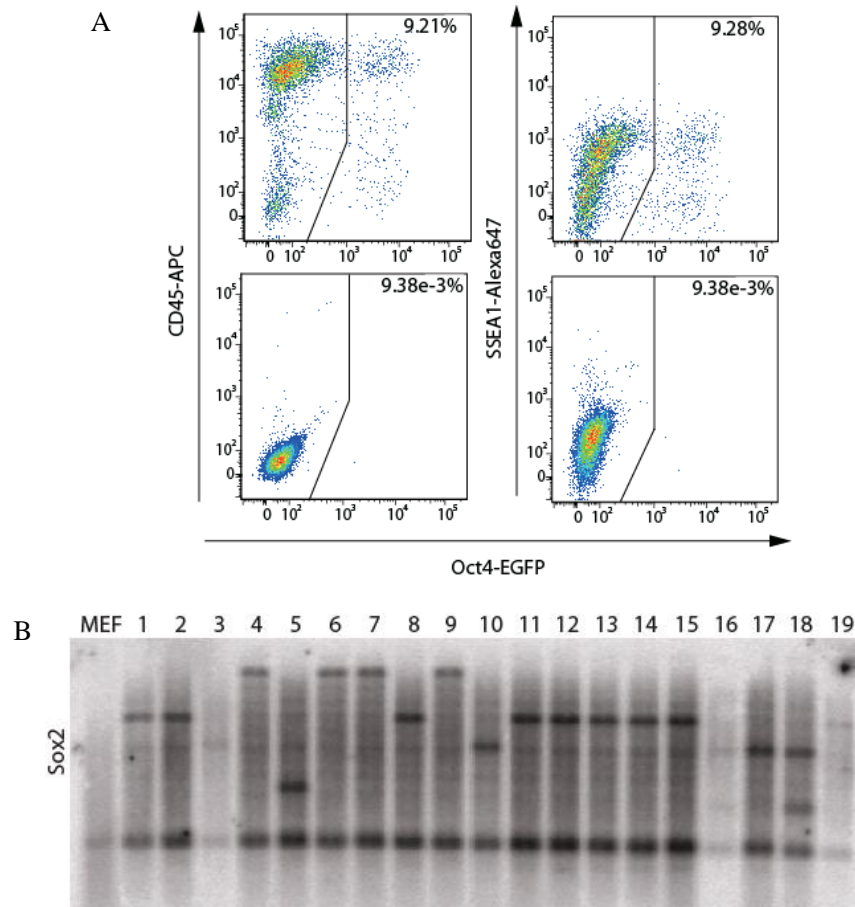


図3-8 一細胞ソートした骨髄由来 iPS 細胞のクローン分析

A) レトロウィルス感染後 8 日目における骨髄由来単核球細胞(上段)および MEF 細胞(下段)を FCM により解析した。CD45 は汎血球マーカーを示す。

B) FCM により一細胞ソートした骨髄由来単核球細胞のサザン解析を行った。ゲノム DNA は制限酵素 *Bam*HI および *Bg*III で消化した。Sox2 cDNA をプローブとして使用した。

表 3-3 4 因子を導入した細胞のシングルセルソーティング

	コントロール GFP の 導入効率	Oct4-GFP の発現時期/ ソーティング時期	ソーティングした細胞数/ 増殖したクローン数
BM	42.2%	day5/day8	480/19
MEF	97.1%	day13/day15	576/0
CD45 ^{+/-}	20.9%	day5/day8	480/18
CD45 ⁺	9.12%	day5/day8	480/3

Oct4-EGFP を発現する BM MNCs (CD45⁺ および CD45^{+/-}についても) あるいは MEF 細胞を 96 穴プレートへ細胞ずつソートした。

3-3-5 骨髄由来 CD45陽性細胞からの iPS 細胞誘導およびクローン分析

骨髄由来 iPS 細胞の細胞起源に迫るべく、著者らは磁気ビーズ (MACS)を用いて CD45 陽性細胞画分と CD45 陽陰性細胞を含むフロースルー画分とに分離し (図3-9A)、各画分に4遺伝子の導入を行った (表3-3)。遺伝子導入 8 日後に CD45 陽性細胞由来の 0.3%が、フロースルー画分に由来する 3%の細胞が Oct4-GFP を発現しており (図3-7B)、GFP 陽性細胞を各 5 枚の 96 穴プレートにソートした。その結果、いずれの画分からも iPS 細胞を取得することができ、骨髄中の間葉系細胞と同様に白血球細胞からも iPS 細胞が誘導可能であることが示された。クローン解析の結果、CD45 陽性細胞に由来する iPS 細胞 (CD45⁺ iPS cells) は同一のクローンに由来することが明らかとなり、一方フロースルー画分である CD45 陽陰性細胞に由来する iPS 細胞 (CD45^{+/−} iPS cells) は複数のクローンに由来することが明らかとなった (図3-9C)。さらにクローン解析の結果、同一のクローンに由来する CD45^{+/−} iPS 細胞であっても、ある時点における SSEA1 および Oct4-GFP の発現はプレートウェル間で異なることが判明した (図3-9D)。

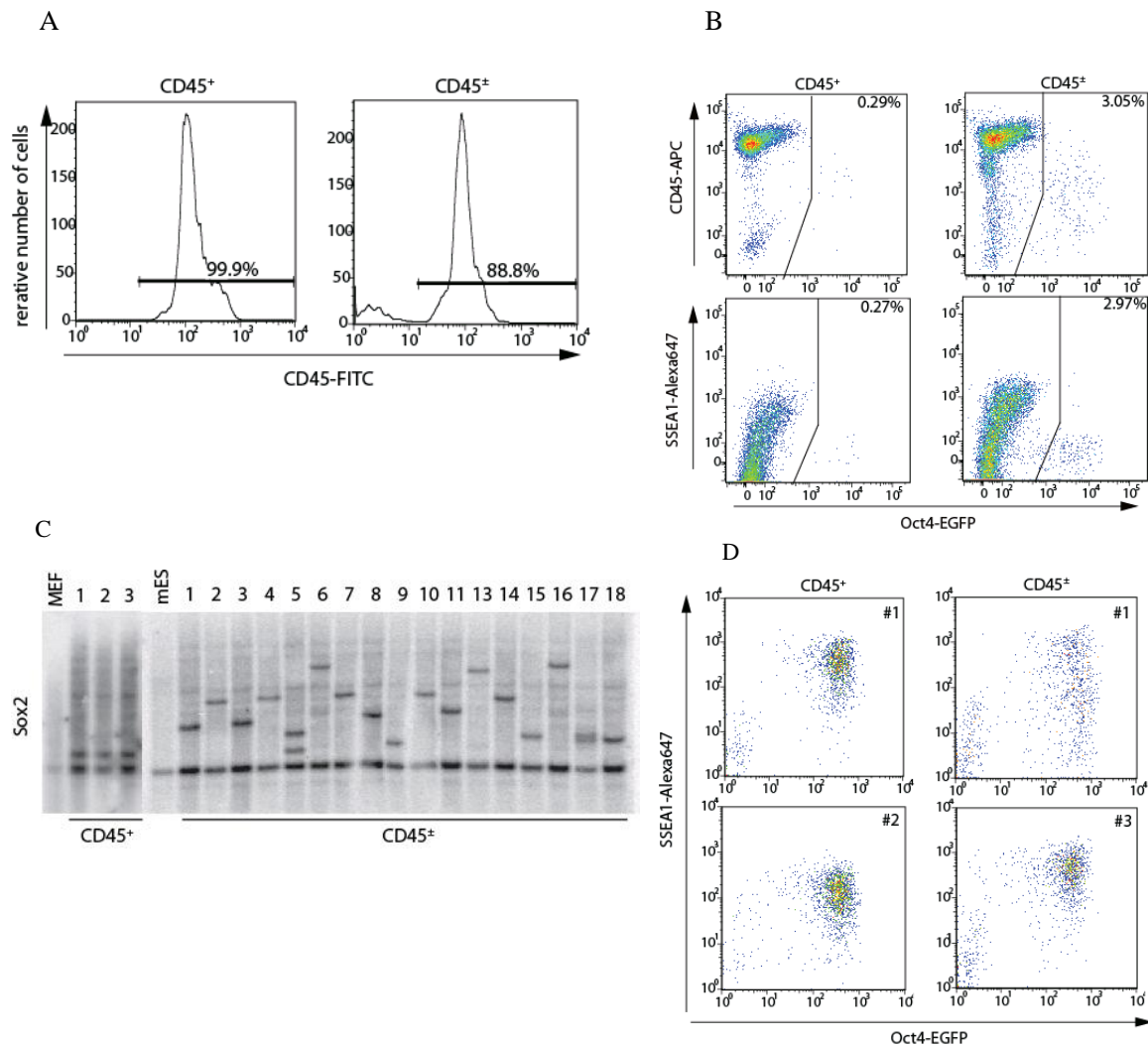


図3-9 一細胞ソートした骨髄 CD45⁺あるいは CD45^{+/-} 細胞由来 iPS 細胞のクローン分析

- A) MACS ビーズでソートした骨髄由来 CD45⁺あるいは CD45^{+/-} 細胞を FCM により解析した。
- B) レトロウイルス感染後 8 日目における骨髄由来 CD45⁺細胞(左)および CD45^{+/-}細胞(右)を FCM により解析した。SSEA1 は ES 細胞マーカーを示す。
- C) 一細胞ソートした骨髄由来 CD45⁺細胞および CD45^{+/-}細胞のサザン解析を行った。ゲノム DNA は制限酵素 *Bam*HI および *Bg*III で消化した。Sox2 cDNA をプローブとして使用した。
- D) 同一クローン由来と考えられる CD45⁺細胞由来クローン#1 および#2、もしくは CD45^{+/-}細胞由来クローン#1 および#3 を FCM により解析した。

3-4 考察

本研究において BM MNCs は MEF cells に比べ高効率に多能性細胞へとリプログラミングされることが、細胞融合および4遺伝子導入の 2 つの方法で示された。細胞融合においては、細胞融合後の Oct4-GFP 発現細胞の数は MEF cells を用いた場合よりも少なかったものの、最終的に得られた ES 細胞様コロニーの数は BM MNCs に由来する方が多かった。融合直後の Oct4-GFP 発現細胞の少なさは融合効率の低さに起因するものと考えられ、その後得られるコロニー数の多さはリプログラミングの受容度の高さに起因するものと考えられる。細胞融合によるリプログラミングの機序は 4 遺伝子によるリプログラミングとは大きく異なっており、体細胞ゲノムのエピジェネティックな修飾は融合後 24 時間以内に多数の因子により劇的な変化を遂げることが示されている (Han et al., 2008)。しかしながら、BM MNCs の融合コロニーの形成し易さは BM MNCs からの高効率な iPS 細胞誘導を示唆していると考えられる。

これまでの研究より、MEF や他の体細胞からのリプログラミングには、すくなくとも 12 日間かけた 4 因子の連続的な活性化が必要であり、より完全なリプログラミングにはさらに 8 日間が必要であるとされている (Aoi et al., 2008; Brambrink et al., 2008; Stadtfeld et al., 2008)。BM MNCs においては、4 遺伝子導入後 5 日目の時点で Oct4-GFP の安定的な活性化が認められている (図3-2)。BM MNCs 由来の Oct4-GFP 発現細胞は MEF 由来よりも多くの ES 細胞様コロニーを形成する。一方、MEF 由来の Oct4-GFP 発現細胞の多くは持続的に Oct4-GFP を発現できず、一部の細胞のみがコロニー形成に到る。一過的に Oct4-GFP を発現する細胞は部分的にリプログラミングされた細胞であることが示唆される (Brambrink et al., 2008)。一細胞ソーティングによるクローナルな解析からも MEF よりも多くの iPS 細胞クローンが BM MNCs より得られている (1×10^5 個の BM MNCs から、少なくとも 40 BM iPS 細胞クローン)。以上のことから、骨髄にはリプログラミングに感受性の高い細胞が多く含まれて入ることが示唆される。骨髄中には様々な細胞種が含まれることが知られている。造血幹細胞、造血前駆細胞、骨髄球系細胞(顆粒球やマクロファージ)、リンパ球系細胞(B、T、NK 細胞)、赤芽球

系細胞、巨核球系細胞などが含まれている。他のグループから、トランスジェニックマウスを用いた 4 因子の誘導発現システムを用いて B 細胞から iPS 細胞が誘導できることが報告されている (Hanna et al., 2008)。彼らの報告によると、終末分化した B 細胞(IgM 陽性、IgD 陽性細胞)のリプログラミングには、4 因子の発現に加え C/EBP α の発現が必要としている。また、終末分化にまで至っていない B 細胞についても、いくつかのサイトカインとストローマ細胞である OP9 細胞との共培養が必要であるとしている。著者らの BM iPS 細胞の誘導に際しては、如何なるサイトカインやストローマ細胞も添加しておらず、また C/EBP α も用いていないことより、BM iPS 細胞の起源は B 細胞以外であることが予想される。骨髄中の単核球細胞の約 85%が CD45 陽性であることや MACS にて精製した CD45 陽性細胞から iPS 細胞が得られていることから、BM iPS 細胞の起源の一部は CD45 陽性細胞であることが示唆される。しかしながら、MACS で精製した細胞画分においてもストローマ細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞などの CD45 陰性細胞を完全には除けず、CD45 陰性細胞から優位に iPS 細胞が誘導されている可能性は否定できない。実際に本研究のクローナルな解析からは CD45 陽性細胞からよりも CD45⁺細胞から多くの iPS 細胞クローンが得られている。BM iPS 細胞の起源については、細胞系譜をマーキングできるような遺伝子改変マウスなどを用いてさらに解析することが必要である。

多くの重要分子と複数の確率的事象が iPS 細胞へのリプログラミングに必要と考えられている (Brambrink et al., 2008; Stadtfeld et al., 2008)。本研究におけるクローンごとのフローサイトメトリー解析により、同一クローンに由来する細胞でも、同時期に全く異なるリプログラミング段階を経ることが明らかとなった (図3-9C, D)。そのことは、4 遺伝子の導入はリプログラミングには十分でなく、細胞の運命は遺伝子導入後の環境や確率的事象に委ねられていることを意味する。

BM iPS 細胞クローンは MEF 由来の iPS 細胞に比べ、レトロウィルスの挿入部位が少ない。このことは BM MNCs のリプログラミングにはわずかな遺伝子コピー数の導入で十分であると考えられる。また、わずかな挿入部位でリプログラミングが可能であれば、BM iPS 細胞の造腫瘍性の低さが期待される (Aoi et al., 2008)。

マイクロアレイ解析の結果から、骨髄中には Klf4 や c-myc を ES 細胞と同等に発現している細

胞が存在している。もしそれら 2 遺伝子を高発現している骨髄中の細胞画分が存在すれば、それらはリプログラミングを受けやすく、さらには神経幹細胞のように Oct3/4 と Sox2 の 2 遺伝子のみでリプログラミングが可能であるかもしれない (Kim et al., 2008)。Oct3/4 と Sox2 とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸との組み合わせによりヒトの線維芽細胞のリプログラミングが可能であるとの報告もあり (Huangfu et al., 2008)、そのような化合物を用いることで骨髄由来単核球細胞からのリプログラミング効率はさらに高まることが期待される。

3-5 小括

著者らは Oct4-GFP マウスの骨髄単核球細胞と胚性線維芽細胞を調製し、ES 細胞との融合あるいはレトロウイルスによる Oct3/4、Sox2、cMyc、Klf4 の発現を試みた。ES 細胞と融合した BM MNCs は MEF に比べ、より多くの ES 細胞様コロニーを形成した。ウイルス導入効率は低かったものの、レトロウイルスで感染された BM MNCs は iPS 細胞へとリプログラミングし、BM MNCs 由来 iPS 細胞コロニーは MEF 由来よりもコロニーの出現時期が早く、頻度も高かった。BM 由来 iPS 細胞 (BM iPS) は、ES 細胞マーカーを発現し、奇形腫を形成し、生殖系列への分化を伴ったキメラマウスの作出に寄与した。クローナルな解析の結果、一度のウイルス感染で複数の BM iPS クローンを取得しており、いくつかのクローンは同一クローン由来の iPS 細胞であっても異なる形質を持つことが判明した。BM MNCs は高効率に iPS 細胞へとリプログラミングされることより、臨床応用上の大きな利点を有しているものと考えられる。

第4章 非動員ヒト末梢血細胞からの直接的リプログラミング法の開発

4-1 緒言

これまでに数種の遺伝子を皮膚細胞などのヒトの体細胞に強制発現することで、ES 細胞と同等の多能性幹細胞を誘導できることが示されている (Maherali et al., 2007; Meissner et al., 2007; Okita et al., 2007; Takahashi et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2007)。患者の負担軽減のためには、表皮よりも侵襲性の低い組織から検体を採取することが望ましい。実際に、小児やある種の炎症性疾患の患者からは表皮の採取自体が難しい。その点において、毛根より分離培養したケラチノサイトからの iPS 細胞誘導の成功は臨床上の意義が大きい。しかしながら、患者特異的な iPS 細胞を得るためにドナー由来体細胞を複数回継代しなければならない点で、表皮細胞やケラチノサイトを用いることは課題を含んでいる。最近の報告では、ほとんどの体細胞が iPS 細胞になりうるポテンシャルを有していると言われている (Hanna et al., 2009)。侵襲性の低さ、採取のし易さから、非動員末梢血はドナー細胞として最も期待されているものの、非動員末梢血細胞から継代培養を経ずに iPS 細胞を直接誘導する方法はまだ確立されていない。

著者らは前章においてマウス骨髄由来細胞が極めてリプログラミングされやすいことを見出した。このことから造血系組織細胞は容易にリプログラミングされることが示唆されたが、ヒトにおいて骨髄採集の過程は極めて侵襲性が高い。より侵襲性の低い組織として、動員末梢血中の CD34 陽性細胞から iPS 細胞を誘導できることが報告されている (Loh et al., 2009; Ye et al., 2009)。しかしながら、検体採取のためだけに末梢血に CD34 陽性造血幹細胞を動員する操作はドナーに対して健康リスクを高める可能性が拭いきれず好ましくない (Anderlini, 2009)。

造血前駆細胞の増殖は IL-6 type cytokine family の共通シグナリングサブユニットである gp130 の活性化により促進されることが知られている。ある種の血液細胞は gp130 を発現するものの、

IL-6 受容体の α 鎖を発現していない。しかし、可溶化型 IL-6 受容体と IL-6 の組み合わせは、IL-6 受容体 α 鎖の発現を伴わなくとも gp130 の下流因子である転写因子 Stat3 経路を活性化することができる (Daheron et al., 2004; Heike and Nakahata, 2002; Niwa et al., 1998)。さらに可溶化型 IL-6 受容体と IL-6 との融合蛋白はより高度に Stat3 経路を活性化することができる (Fischer et al., 1997; Mizuguchi et al., 2001)。マウス ES 細胞の自己複製は LIF/Stat3 シグナルに依存していることが知られているが、ヒト ES 細胞の自己複製の維持には Stat3 シグナルの活性化は必ずしも必須ではない。しかしながら、マウスとヒトで同じ転写因子により体細胞がリプログラミングされることから、多能性に関わる液性因子はマウスとヒトで異なるものの、幹細胞の性質を統括する転写因子ネットワークは同じであることも十分に考えられる。そこで、本研究では Stat3 経路の活性化により iPS 誘導効率が高まることを期待して、可溶化型 IL-6 受容体と IL-6 との融合蛋白を含むサイトカインの組合せを用いることで、ヒトの非動員末梢血からの iPS 細胞誘導を試みた。

4-2 実験材料と実験方法

4-2-1 細胞と細胞培養

BM および PB MNCs は Allcells 社 (Emeryville, CA, ABM007F および PB003F) より購入した。BM MNCs は 25 歳齢の男性ドナー (lot#BM1705)、25 歳齢女性ドナー (lot#BM1703) および 27 歳齢の女性ドナー (lot#BM1715)由来細胞を用いた。PB MNCs は 28 歳齢女性ドナー (lot#A1609)、26 歳齢男性ドナー (#A1611) および 27 歳齢男性ドナー (#A1628) 由来の細胞を使用した。Human embryonic kidney (HEK) 293 (ATCC: CRL-1537)、HEK293T (CRL-11268)、Jurkat (TIB-152) および Daudi (CCL-213) 細胞は ATCC (Manassas, VA)より、OPM-2 (ACC50) 細胞は DSMZ (Braunschweig, Germany)より入手した。G3T-hi cells (Takara-Bio, Otsu, Japan) は 10%FBS 含有 DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)にて培養を行った。樹立した iPS 細胞は放射線照射した MEF (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Osaka, Japan もしくは Kitayama Labes Co., Nagano, Japan) 上で、20% Knock-out Serum Replacement (Invitrogen, Carlsbad, CA)、human basic fibroblast growth factor (bFGF)、penicillin/streptomycin、2 mM L-glutamine、0.1mM beta-mercaptoethanol、nonessential amino acidを含むヒト ES 培地 DMEM/F12 (Sigma-Aldrich) にて培養した。フィーダー細胞を用いない iPS 細胞培養は、0.3mg/ml Matrigel (BD-Bioscience, San Jose, CA) でコートしたプレート上で、mTeSR 培地 (StemCell Technologies, Vancouver, Canada)を用いた。用いた全ての iPS 細胞はフィーダー細胞を用いない培養で維持可能であった。

4-2-2 ウィルスベクターの構築とウィルス調製

ヒト OCT3/4、SOX2、KLF4 および c-MYC のcDNA 断片を RT-PCR にて増幅し、レトロウィルスベクターpMXs ヘクローニングを行った (Kitamura et al., 2003; Morita et al., 2000)。レトロウィルスベクターpMXs、pVSV-G ベクターおよび pGP ベクターを G3T-hi 細胞 (Takara-Bio) ヘトランスフェクション試薬 FuGene6 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)を用いて導入した。トランスフェクション

2 日後にウイルス上清を回収し、混合した後、0.45 μm のフィルターを用いて濾過し、その後遠心機による濃縮を行った。濃縮したウイルス粒子は 10%FBS を含む DMEM 培地にて再懸濁し、感染のため、PBMNCs あるいは BMMNCs の培養へと添加した。コントロールとして同様の感染を pMXs IRES-GFP ベクターを用いて実施した。

4-2-3 レトロウイルス感染と iPS 細胞誘導

PBMNCs あるいは BMMNCs はウイルス感染 2 日前に 6well プレートの 1well あたり 5×10^5 細胞の濃度で播種し、以下のサイトカインを添加した 10%FBS 含有 DMEM 培地にて前培養を実施した。添加したサイトカインは、100 ng/ml human SCF (Kyowa Hakko Kirin, Tokyo, Japan)、100 ng/ml human TPO (Kyowa Hakko Kirin)、100 ng/ml human IL-3 (Kyowa Hakko Kirin) および 20 ng/ml sIL-6R/IL-6 融合蛋白 (FP6; Kyowa Hakko Kirin)、もしくは 100 ng/ml human SCF、100 ng/ml human TPO、100 ng/ml human IL-3、20 ng/ml FP6、100 ng/ml human Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF; Kyowa Hakko Kirin)、50 ng/ml human Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF; Invitrogen) および 100 ng/ml human flt3 ligand (Flt3/L; R&D Systems, Minneapolis, MN)、もしくは 100 ng/ml human SCF、100 ng/ml human TPO、100 ng/ml human IL-3、20 ng/ml FP6、100 ng/ml Lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich)、1 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 antibody (Janssen Pharmaceutical, Tokyo, Japan)、1 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD28 antibody (eBioscience; San Diego, CA)、および 6 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD40 antibody (Kyowa Hakko Kirin) であった。ウイルス感染の際には、RetroNectin (Takara-Bio) でコートした 12well プレートの各 well に濃縮したウイルス上清を添加し、40 分間の遠心を行った。遠心操作によりプレートへウイルス粒子を吸着させた後、 5×10^5 個の PBMNCs あるいは BM MNCs を各 well に播種し、FBS を含む DMEM 培地に以下のサイトカインの組み合わせを添加して培養を行った。サイトカインの組み合わせは次の通りである、SCF、TPO および IL-3 もしくは SCF、TPO、IL-3 および FP6 もしくは SCF、TPO、IL-3、FP6、GM-CSF、M-CSF および Flt3/L、もしくは SCF、TPO、IL-3、FP6、LPS、anti-CD3 antibody、anti-CD28 antibody、および anti-CD40 antibody。ウイルス

感染の2日後に、細胞を 0.05%トリプシン 0.5 mM EDTA を含む PBS にて消化後に回収し、放射線照射した MEF 上で FBS 含有 DMEM を用いて上記のサイトカインの組み合わせを添加して培養を行った。コントロールについてはこの時点で細胞を回収し、FCM 解析により感染効率および感染細胞の表面抗原分子の解析を行った。ウイルス感染 6 日後に、培地をヒト ES 培地に交換した。その後の培養はヒト ES 培地を用いて行い、培地交換は毎日実施した。ウイルス感染 12~23 日後にいくつかの granulated cell clusters をピックアップし、MEF 細胞上あるいはフィーダー細胞なしでヒト ES 細胞培地にて培養を行った。ここでクローン化した ES 細胞様コロニーをその後の種々の解析に用いた。

4-2-4 フローサイトメトリー解析と免疫細胞化学解析

FCM 解析および免疫細胞化学解析には次の抗体を使用した。Alexa Fluor 647 (Invitrogen) 標識抗 human tumor-related antigen-1-60 (TRA-1-60) 抗体 (BD-Bioscience)、PE 標識抗 human TRA1-60 抗体 (BD-Bioscience)、Alexa Fluor 488 (Invitrogen) 標識抗 stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4) 抗体 (BD-Bioscience)、PE 標識抗 SSEA-4 抗体、PE 標識抗 CD38 抗体、PE 標識抗 CD117 抗体、APC 標識抗 CD11b 抗体、PE 標識抗 CD13 抗体 (BD-Bioscience)、APC 標識抗 CD45 抗体、PE 標識抗 CD45 抗体、PE 標識抗 CD3 抗体、PE 標識抗 CD19 抗体 (Immunotech, Praha, Czech Republic)、APC 標識抗 CD34 抗体、PE 標識抗 CD34 抗体 (Beckman Coulter, Brea, CA)、抗 Oct3/4 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 Nanog 抗体 (Cosmo Bio, Tokyo, Japan)、抗 human alpha smooth muscle actin (α -SMA) 抗体、抗 human alpha 1-fetoprotein (AFP) 抗体、抗 human glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (DAKO, Glostrup, Denmark)。

抗 human TRA1-60 抗体あるいは抗 SSEA-4 抗体を用いた FCM 解析は FACSCalibur あるいは FACS Aria (BD-Bioscience) を用いて実施した。

免疫細胞化学解析のため、細胞は 4%パラホルムアルデヒドを含む PBS で室温 15 分間固定した。PBS で洗浄後、細胞を 0.1% TritonX を含む PBS で 5 分間処理し、その後 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) を含む PBS で室温 30 分間ブロッキングを行った。免疫細胞化学解析には、

抗 Oct3/4 抗体、抗 Nanog 抗体、抗 human α -smooth muscle actin (α -SMA)抗体、抗 human alpha fetoprotein (AFP)抗体そして抗 human Glial fibrillary acidic protein (GFAP)抗体を用いた。核染色には 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) を使用した。奇形腫のパラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学解析には DAKO ENVISION kit (DAKO) を添付の説明書に従って使用した。

4-2-5 奇形腫の形成

100 mm ディッシュにコンフルエントに増殖した iPS 細胞を回収し、その 4 分の 1 の細胞を 10 週齢から 14 週齢の SCID マウス (CB17; CLEA Japan, Fujinomiya, Japan) 1 匹の精巣内へと移植した。移植後 8 から 9 週目に腫瘍を摘出し、4%パラホルムアルデヒドを含む PBS にて固定後、パラフィン包埋を行った。パラフィン包埋切片を作製後、ヘマトキシリンおよびエオジンにて染色を行い、病理解析を行った。動物実験はすべて、日本国内法および規制に照らして協和発酵キリン社の動物倫理審査委員会での審議と承認の下に実施した。

4-2-6 核型解析

核型の解析はクロモセンター社 (Yonago, Japan) において、quinacrine-Hoechst 染色により実施した。iPS 細胞を 0.25mg/ml のコルセミド (Sigma-Aldrich)にて 4 時間処理し、さらに 0.075 M の KCl にて 15 分処理した後にカルノア固定を行った。

4-2-7 免疫グロブリン重鎖および T 細胞受容体遺伝子座の再構成解析

免疫グロブリン重鎖 (IgH)、T 細胞受容体 β (TCR β) および T 細胞受容体 γ (TCR γ) の再構成について PCR により解析を行った (Mitsubishi Chemical Medience Co. ; Tokyo, Japan).

4-2-8 遺伝子発現プロファイルの解析

RT-PCR 解析は、逆転写酵素 SuperScriptIII (Invitrogen)とオリゴ dT プライマーとを用いてトー

タル RNA から cDNA を合成し、DNA ポリメラーゼ LATAq (Takara-Bio)により PCR 反応を行うことで実施した。PCR 用のプライマーは過去の文献 (Masaki et al., 2007; Takahashi et al., 2007)と以下の配列を用いて実施した。GAPDH forward、5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'および GAPDH reverse、5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。

マイクロアレイ解析のために、トータル RNA を蛍光色素 Cy3 にて標識し、アジレント社の Whole Human Genome Microarray 4 x 44K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) に一色法にてハイブリダイズを行った。ハイブリダイズ後のアレイは Microarray Scanner System (Agilent Technologies) にて解析し、解析ソフト Feature Extraction ver. 10.5 (Agilent Technologies) にて画像ファイルの読み取り、シグナルのデータ処理を実施した。解析結果については、GEO DataSets へ登録 (accession number GSE20127)を実施した。これらのデータを NCBI に登録されている以下のデータセットと GeneSpring GX11 (Agilent Technologies)を用いて quantile method による標準化と median 値を用いた補正により統合し、遺伝子発現プロファイルの比較を行った。human ES cell lines (GSM194390, GSM194391, GSM194392 (Tesar et al., 2007) および GSM336012 (Hong et al., 2009)), human iPSC lines 201B7 (GSM241846) (Takahashi et al., 2007)、clone 1-8 (GSM257570)、clone 2-4 (GSM257572) および clone 3-2 (GSM257574) (Masaki et al., 2007)、human adult fibroblasts (GSM336057 (Hong et al., 2009) および GSM242095 (Takahashi et al., 2007))。階層クラスタリングのために、median 値から 256 倍以上離れた 660 種のプローブを選択した。2次元階層クラスタリングはユークリッド距離と平均の相関により計られる類似性を基に実施した。

4-2-9 サザンブロット解析

染色体 DNA は Puregene DNA purification Kit (Gentra systems, MN)を用いて調製した。各 DNA 試料を制限酵素 *Pst*I あるいは *Hind*III (Takara-Bio)を用いて消化し、0.7%アガロースゲルを用いた電気泳動による分離後にナイロンメンブレン (Hybond-N+, GE Healthcare, UK) へトランスファーし、³²P 標識したプローブによりハイブリダイズを行った。ハイブリダイズしたプローブのシグナルは

Typhoon imaging system (GE Healthcare)を用いて検出した。プローブの配列は文献 (Takahashi et al., 2007)に基づき合成した。

4-2-10 バイサルファイト法による DNA メチル化解析

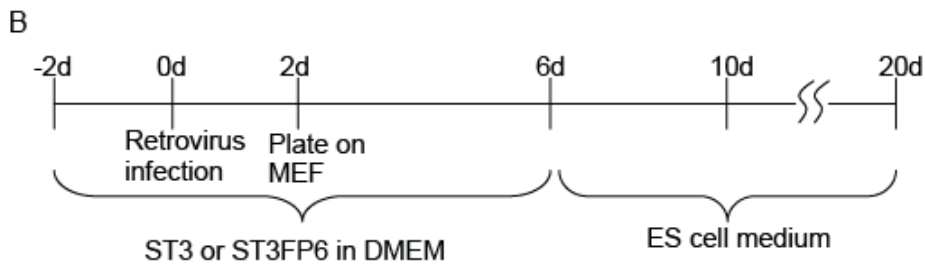
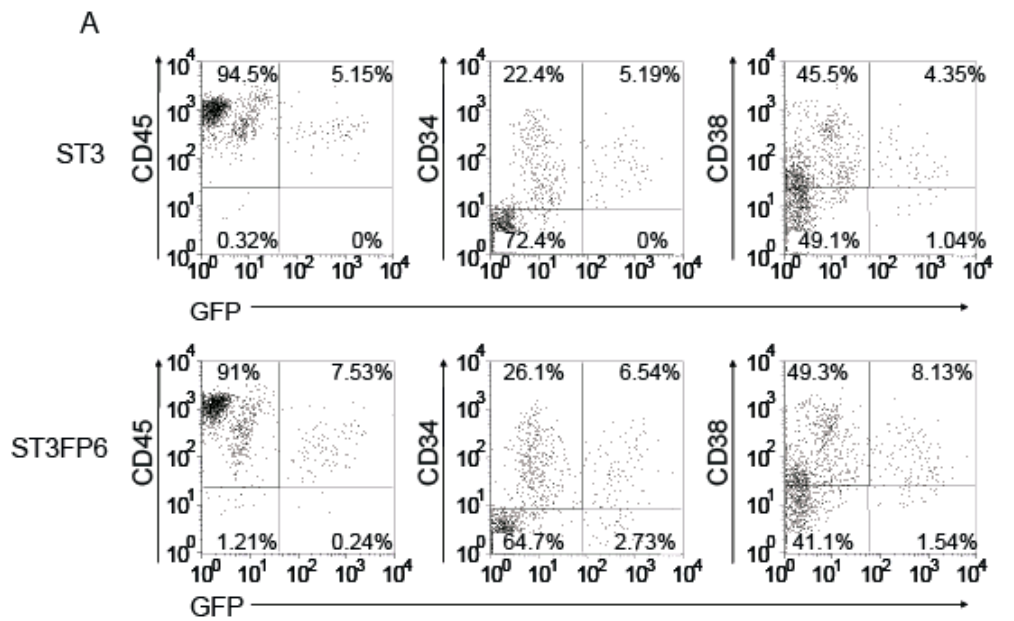
染色体 DNA の Bisulfite 処理は EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen)を用いて行った。Bisulfite 処理により塩基が変換された染色体 DNA の OCT3/4 あるいは NANOG のプロモーター領域を、過去の文献 (Chan et al., 2009)で使用されたプライマーを用いて PCR 増幅を行った。PCR 産物については TOPO TA cloning (Invitrogen) キットを用いてクローニングを行い、クローニング後に各クローンのシーケンス解析を実施した。

4-3 結果

4-3-1 ヒト骨髄単核球細胞からの iPS 細胞誘導

まず、sIL-6R/IL-6 融合タンパク質 (FP6)(図4-1C)を含むサイトカインの組合せがヒト造血細胞のリプログラミングを高めることができるか検討を行った。著者らは、BMMNCs (5×10^5 細胞)にヒト Oct3/4、Sox2、Klf4 と c-Myc の 4 つの遺伝子をレトロウイルスにより導入した。BMMNCs は、SCF、TPO および IL-3 (ST3)または SCF、TPO、IL-3、FP6 (ST3FP6)を添加した、FBS を含む DMEM 培地で 2 日間培養し、4 つのレトロウイルスにより 2 日間の感染を行った後に、MEF 細胞上に細胞を播種した。この時点で、コントロールとして GFP 発現ウイルスベクターを用いた感染細胞を FCM にて解析した (図4-1A)。その結果、多くの GFP 陽性細胞は CD45 抗原陽性、CD34 抗原陽性、CD38 抗原陽性であった。ウイルス感染後 6 日目に培地を 5 ng/ml bFGF を含むヒト ES 培地へと交換した。遺伝子導入から約 10 日後にいくつかの小さな接着性コロニーが出現し始めたが、形態的にはまだヒト ES 細胞コロニーとは異なったものであった (図4-2A)。それらの小さなコロニーをピックアップし、MEF 細胞の上で培養を継続すると、遺伝子導入から 20 から 30 日後にヒト ES 細胞に類似した、平板で細胞密度の高いコロニーが観察された (図4-1B、図4-2A)。これらのコロニーを FCM にて解析すると、いずれも SSEA-4 や TRA1-60 といったヒト ES 細胞マーカーを発現していた (図4-2B)。ヒト ES 細胞様コロニーは ST3FP6 添加あるいは ST3 添加のいずれの培養を用いた BM MNCs から誘導された。しかしながら、SSEA-4 抗原陽性、TRA1-60 抗原陽性細胞の数は ST3FP6 刺激された BM MNCs からの方が ST3 刺激されたものより多かった。これらのコロニーはフィーダー細胞を用いないマトリゲルコートディッシュ上の培養でも継代可能であった (図4-3A)。これらクローン化されたヒト ES 細胞様コロニーを BM iPSCs と呼ぶこととした。ST3FP6 刺激された BMMNC から誘導された BM FP#17 iPSCs について、抗 SSEA4 抗体および抗 TRA1-60 抗体を用いた FCM 解析と抗 Oct3/4 抗体 あるいは 抗 Nanog 抗体を用いて免疫染色を行った (図4-3A、B)。その結果、遺伝子導入効率は低いものの、多くの凝集コロニーの中からヒト幹細胞マーカー陽性の BM iPSCs を

樹立することに成功した。また、取得した BM FP#17 iPSCs の核型は解析の結果、46XX の正常核型を有していた (図4-4)。



C

FP6(可溶化型 IL-6RとIL-6のキメラ蛋白)

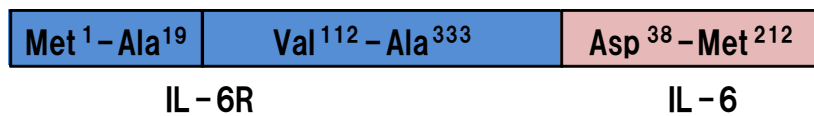


図4-1 ヒト骨髄由来単核球細胞からの iPS 細胞誘導

- A) ST3 (上段)あるいは ST3FP6 (下段)存在下において、コントロール GFP 発現ウイルスベクター感染後の BM MNCs を FCM により解析した。GFP 発現細胞における汎血球マーカーである CD45、造血前駆細胞マーカーである CD34 および CD38 の発現を示す。
- B) 骨髄由来 iPS 細胞誘導のタイムスケジュールを示す。
- C) 可溶化型 IL-6R と IL-6 のキメラ蛋白 FP6 の構造を示す。

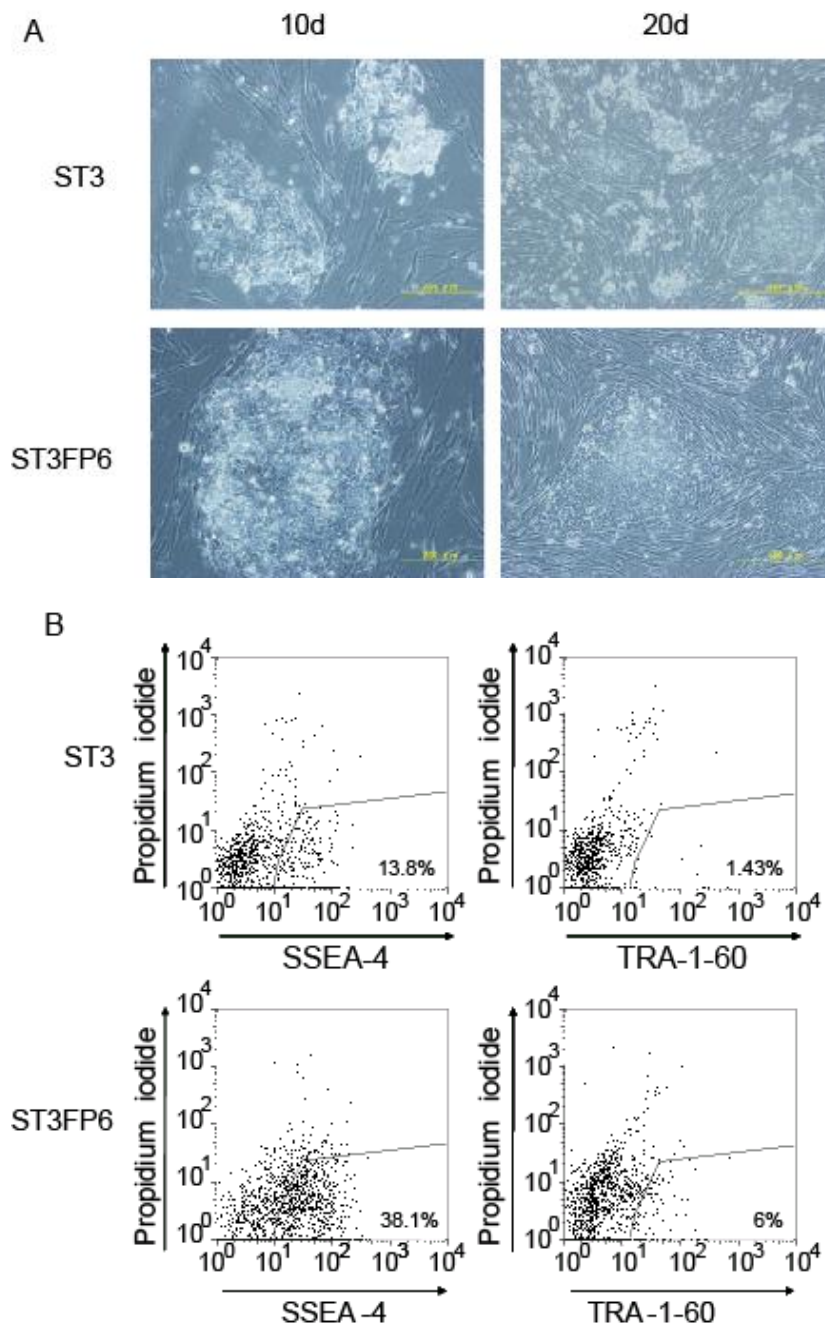


図4-2 レトロウイルス感染 BM MNCs 由来コロニー

A) レトロウイルス感染後 10 日後および 20 日後に出現したコロニーの形態を示す。上段は SCF、TPO、IL-3 存在下で、下段は SCF、TPO、IL-3、FP6 存在下で誘導した。

B) ヒト ES 細胞マーカーである SSEA-4 あるいは TRA1-60 の発現を FCM により解析した。

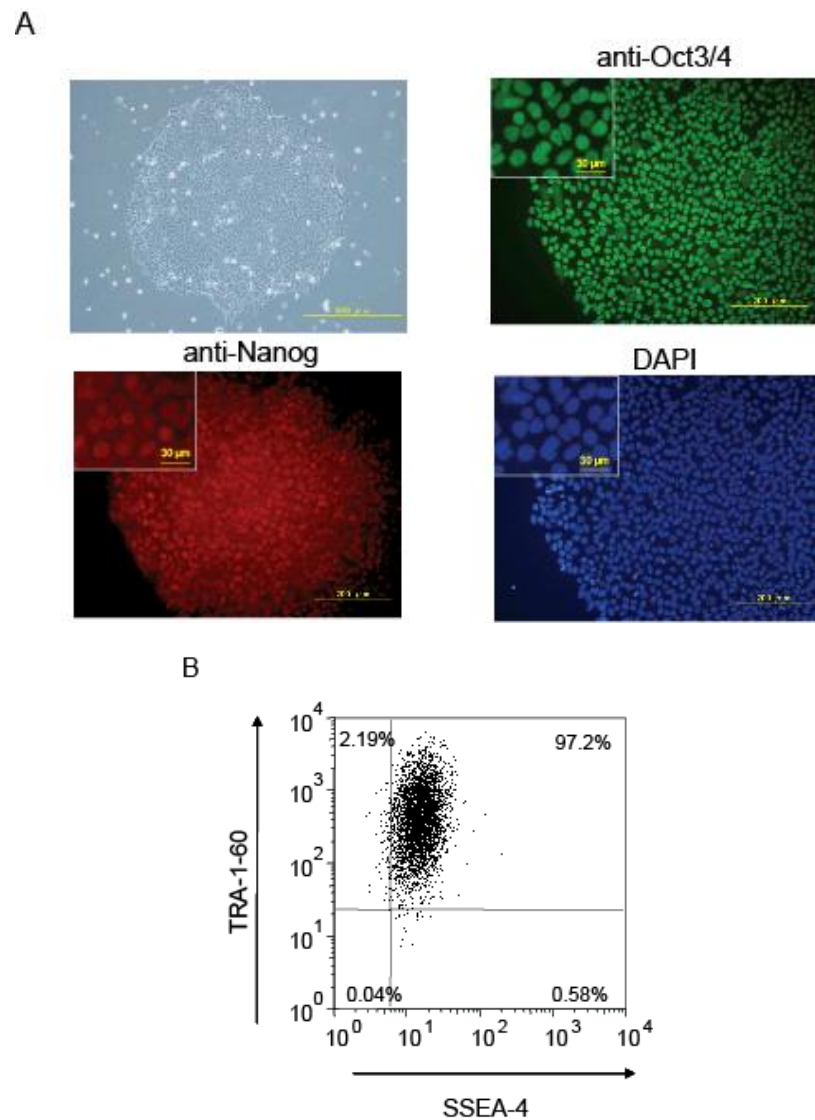


図4-3 ST3FP6 存在下で樹立した BM MNCs由来 BM FP#17 iPS 細胞

A) BM FP#17 iPS 細胞のコロニー形態を示す。また ES 細胞特異的転写因子である Oct3/4 あるいは Nanog に対して免疫蛍光染色を行った。細胞核は 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) により染色した。挿入図は高倍率画像を示す。

B) ヒト ES 細胞マーカーである SSEA-4 および TRA1-60 の発現を FCM により解析した。

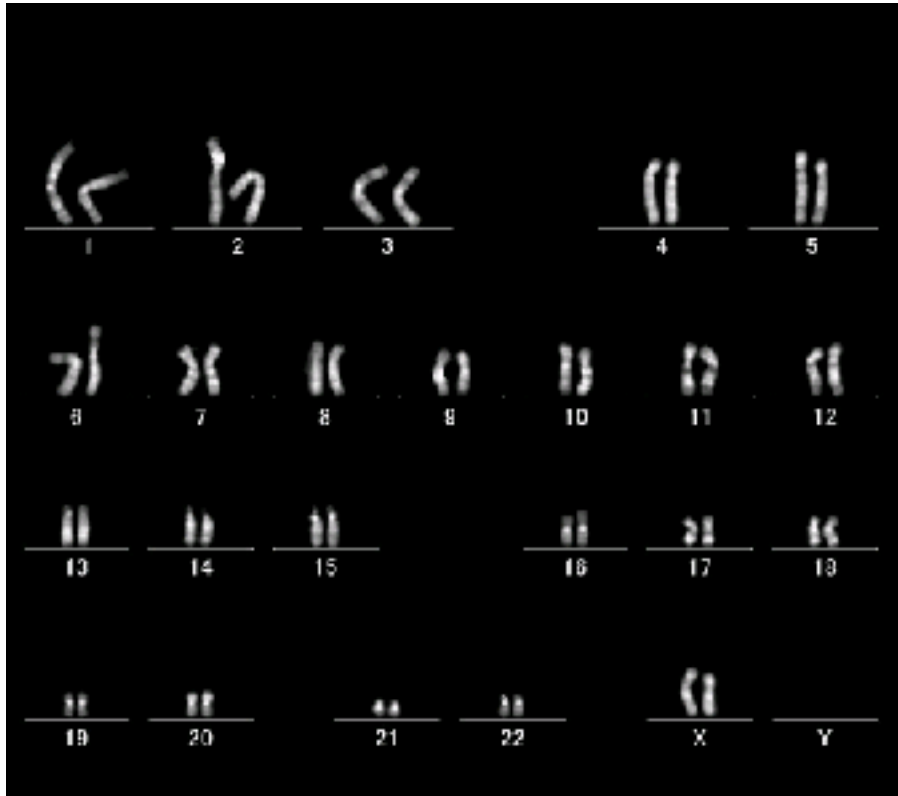


図4-4 BM FP#17 iPS 細胞の核型解析

BM FP#17 iPS 細胞は 46XX の正常核型を有していた。

4-3-2 ヒト末梢血単核球細胞からの iPS 細胞誘導

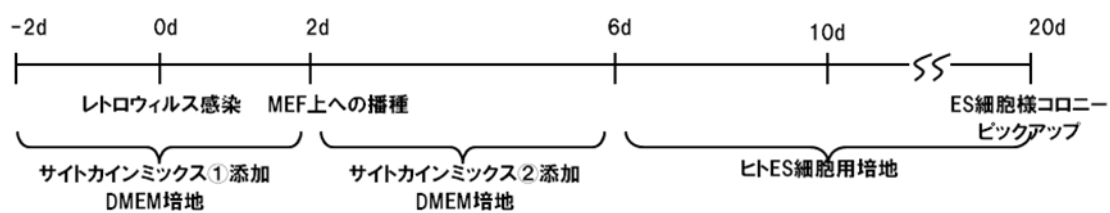
次に、BMMNCs と同様の方法により、PBMNCs から iPS 細胞を誘導することを試みた。BMMNCs と同様に、ST3FP6 あるいは ST3 刺激下にて、4 遺伝子発現ウイルスを含むレトロウイルスを用いて、 5×10^5 個の PBMNCs に感染を試みた。その結果、コントロールの GFP 遺伝子導入効率は極めて低く (図4-5A)、遺伝子導入後 9 から 14 日目に、ST3FP6 刺激した細胞から小さな接着性のコロニーが 3 個現れたが、その数は BMMNCs の場合に比べ極めて少なかった。それらのコロニーをピックアップし、MEF 細胞上あるいはマトリゲルコートディッシュ上にフィーダー細胞なしで播種した。その結果、遺伝子導入 20 日後に ST3FP6 刺激した培養のみからヒト ES 細胞様のコロニーを取得することができた (図4-6A、表4-1)。PBMNCs から誘導したヒト ES 細胞様コロニーを PB iPSCs と呼ぶこととした。さらに、いずれのサイトカインも添加しない条件にて PBMNCs から iPS 細胞誘導を試みたところ、計 11 回の遺伝子導入により唯一のコロニーを取得した。以後の解析においては、ST3FP6 刺激下で取得した PBiPS 細胞として FP#1 iPS、いかなるサイトカイン刺激なしで誘導した iPS 細胞クローンとして Nega#8 iPS を用いる (図4-6A)。両クローンとも幹細胞マーカーである Oct3/4、Nanog、SSEA4 および TRA1-60 は陽性であった (図4-6A、B)。

これまでの実験で用いてきたサイトカインに反応性の血液細胞の末梢血中における存在頻度が極めて低いことが考えられたため、次に PBMNCs を刺激するサイトカインをさらに追加することでプログラミング効率の向上を検討した。そこで ST3FP6 加えさらに、LPS、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体および抗 CD40 抗体 (ST3FPLP-3-28-40 と呼ぶ)、あるいはヒト Flt3 リガンド、ヒト GM-CSF およびヒト M-CSF (ST3FPFLGM と呼ぶ) を用いたところ、PB MNCs に対するコントロール GFP 遺伝子導入効率がわずかに上昇した (図4-5B)。前者は主にリンパ球系細胞を刺激する組み合わせであるため、ST3FPLP-3-28-40 刺激下での GFP 発現細胞の多くは CD45 抗原陽性 CD3 抗原陽性の T リンパ球 (CD34 陰性) であった。一方、ST3FPFLGM 刺激下での GFP 発現細胞は ST3 あるいは ST3FP6 刺激下と同様に、多くの GFP 陽性細胞は非リンパ球系の CD45 抗原陽性で一部 CD34 抗原を発現する白血球細胞であった (図4-5B)。

ST3FPFLGM あるいは ST3FPLP-3-28-40 のサイトカイン刺激下で PBMNCs に 4 遺伝子の導入を試みた。ウイルス感染 2 日前から 2 日後にかけて ST3FPFLGM あるいは ST3FPLP-3-28-40 刺激下で培養を行った後、ウイルス感染 2 日後から 6 日後にかけては ST3FP6 存在下で培養し、6 日後に細胞を回収後、ヒト ES 培地を用いて再播種を行った (図4-5C)。その結果、小さな接着性のコロニーも最終的なヒト ES 様のコロニーも ST3FPFLGM 刺激下で培養した細胞からは取得できたものの、ST3FPLP-3-28-40 刺激した細胞からは取得できなかった (表4-1)。ST3FPFLGM 刺激下で取得した 2 つの PBiPSC クローン PB GM#1 iPS あるいは PB GM#6 iPS を以後の解析に用いた (図4-6A)。それらは他の PB iPSCs 同様にヒト ES 細胞様の形態を示し、Oct3/4、Nanog、SSEA4、TRA1-60 などの幹細胞マーカーは陽性であった (図4-6A、B)。

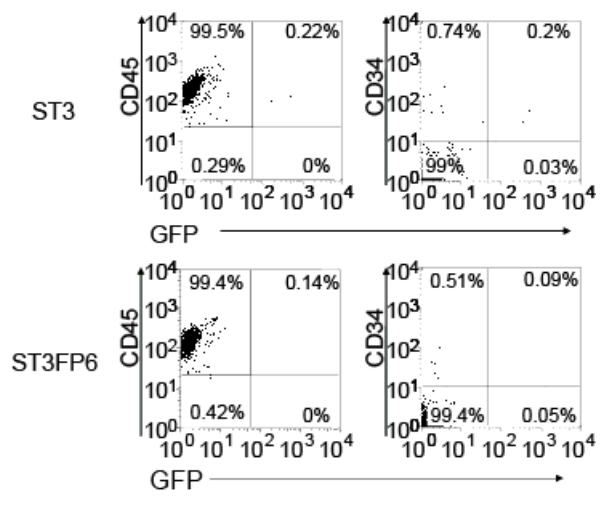
さらに最も効率のよりサイトカインの組み合わせを確認するために、いくつかの組み合わせについて、同時期に評価を行ったところ、ウイルス感染 2 日前から 2 日後にかけて ST3FPFLGM で刺激し、続けて 2 日後から 6 日後にかけて ST3FP6 で刺激した場合に PB MNCs から最も多くのヒト ES 細胞様コロニーが得られることを見いだした (表4-1)。この方法を用いることで、 5×10^5 個の PB MNCs から約 20 から 30 個の iPS 細胞コロニーを得ることができた。

表4-1 末梢血由来単核球細胞のリプログラミングによるコロニー出現数

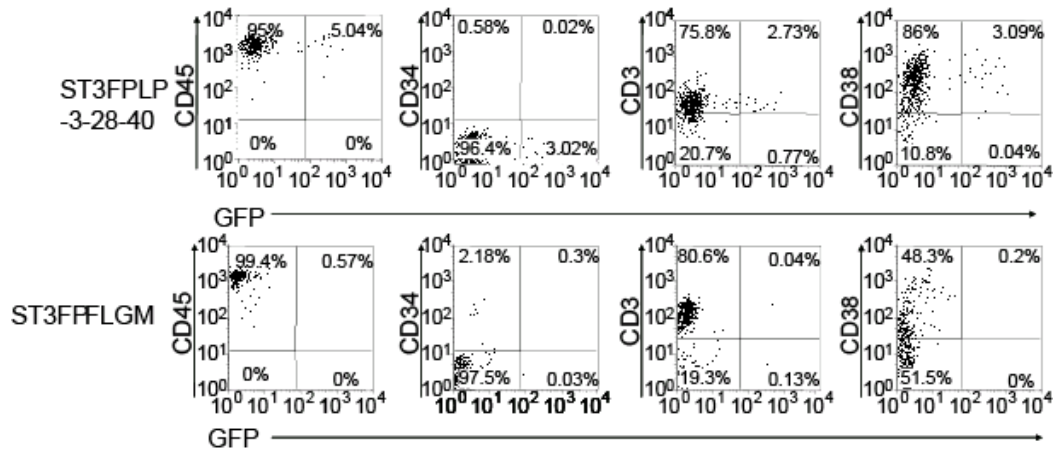


試験番号	添加サイトカイン		コロニー数 (出現日)
	①; day -2~+2	②; day +2~+5 もしくは+6	
1	サイトカイン非添加	サイトカイン非添加	1 (day16)
	SCF, TPO, IL3 (ST3)	SCF, TPO, IL3 (ST3)	0
	ST3+FP6	ST3+FP6	3 (day13)
2	ST3+FP6, Flt3L, GM-CSF, M-CSF	ST3+FP6	21 (day13-20)
	ST3+FP6, LPS, aCD3, aCD28, aCD40	ST3+FP6	0
3	nega	nega	0
	ST3	ST3	3 (day9-12)
	ST3+FP6	ST3+FP6	6 (day9-12)
	ST3+FP6, Flt3L, GM-CSF, M-CSF	ST3+FP6, Flt3L, GM-CSF, M-CSF	20 (day9-12)
	ST3+FP6, Flt3L, GM-CSF, M-CSF	ST3+FP6	29 (day9-12)

A



B



C

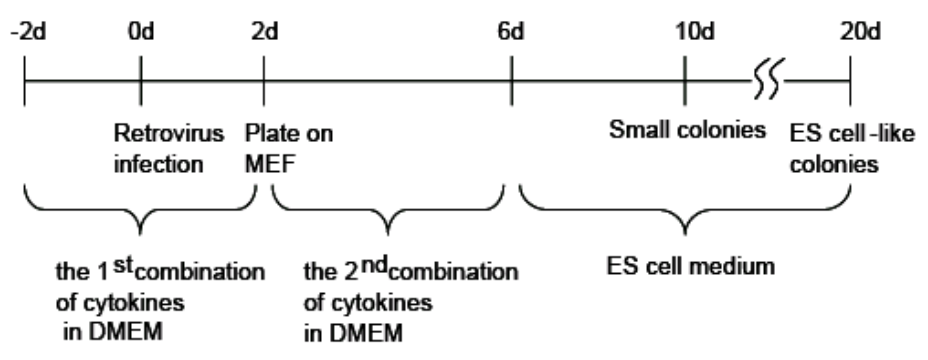


図4-5 末梢血由来単核球細胞からの iPS 細胞誘導

A) ST3 (上段)あるいは ST3FP6 (下段)存在下において、コントロール GFP 発現ウイルスベクター感染後の末梢血由来単核球細胞を FCM により解析した。GFP 発現細胞における汎血球マーカーである CD45 および造血前駆細胞マーカーである CD34 の発現を FCM により解析した。

- B) ST3FPLP-3-28-40 (上段)あるいは ST3FPFLGM (下段) 存在下において、コントロール GFP 発現ウイルスベクター感染後の末梢血由来単核球細胞を FCM により解析した。GFP 発現細胞における CD45、CD34、CD3 (T細胞マーカー) および CD38 の発現を FCM により解析した。
- C) 末梢血由来 iPS 細胞誘導のタイムスケジュール を示す。

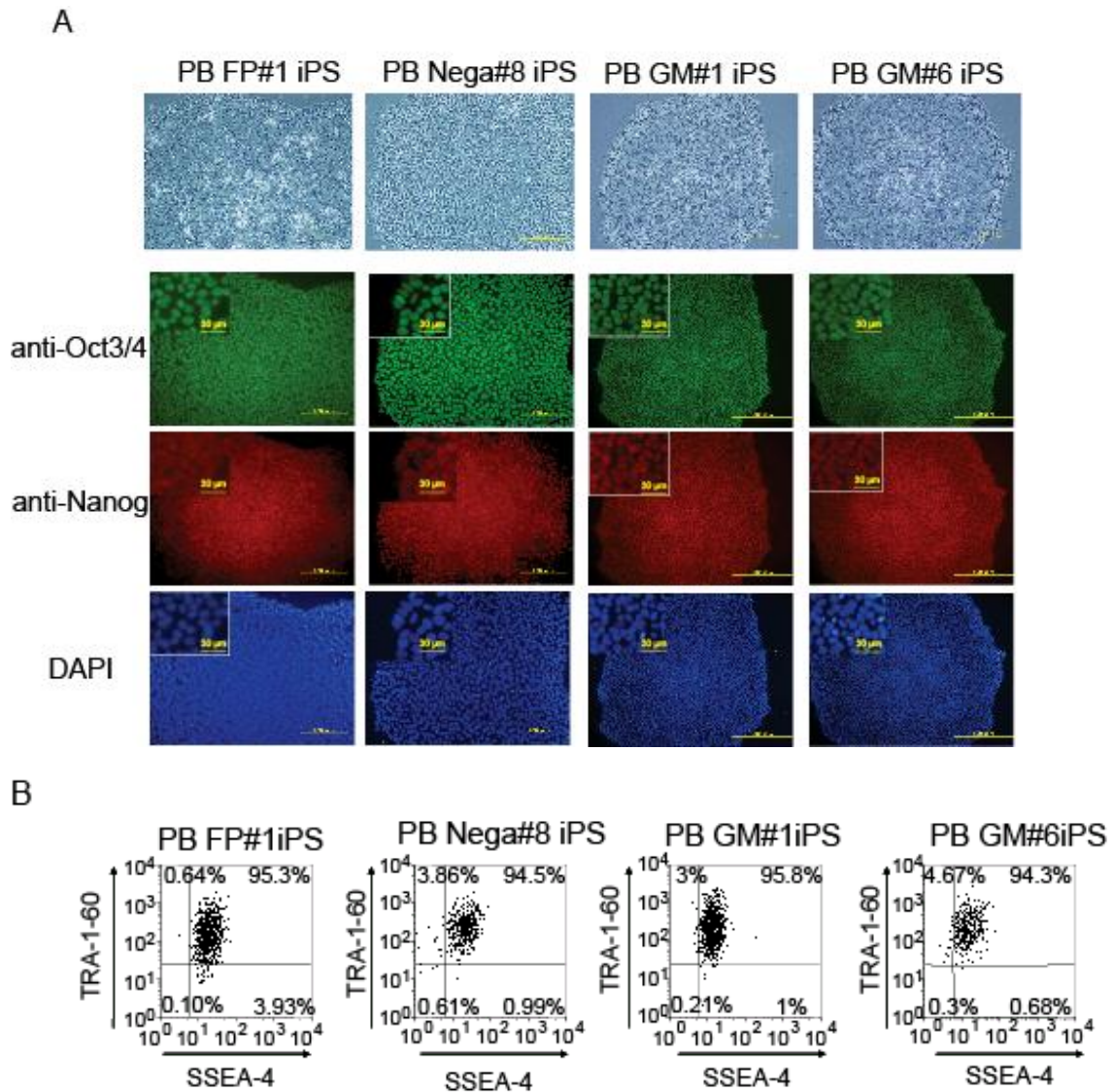


図4-6 末梢血由来 iPS 細胞株の性状解析

A) 末梢血由来 iPS 細胞株(PB FP#1 iPS, PB Nega#8 iPS, PB GM#1 iPS、PB GM#6 iPS)のコロニー形態を示す。また ES 細胞特異的転写因子である Oct3/4 あるいは Nanog に対して免疫蛍光染色を行った。細胞核は 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) により染色した。挿入図は高倍率画像を示す。

B) ヒト ES 細胞マーカーである SSEA-4 および TRA1-60 の発現を FCM により解析した。

4-3-3 iPS 細胞株の幹細胞マーカー遺伝子発現およびプロモーター領域のメチル化解析

さらに 5 つの iPS 細胞クローン (BM FP#17 iPS、PB FP#1 iPS、PB Nega#8 iPS、PB GM#1 iPS、PB GM#6 iPS) について、クローン性解析および表現型解析を行った。OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC それぞれを認識するプローブを用いてサザン解析を行ったところ、調べた 5 つのクローンはいずれも異なる遺伝子挿入パターンを有する独立クローンであることを確認した (図4-7)。個々のクローンは各遺伝子について 0~5 コピーの遺伝子挿入を含んでいた。中でも BM FP#17 iPS はレトロウイルス由来 KLF4 遺伝子の挿入を含んでいなかった。

RT-PCR の結果、いずれの BM あるいは PB iPSC 細胞株も内在性の OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC 遺伝子が ES 細胞マーカー遺伝子である NANOG、GDF3、TDGF1、FOXD3、DNMT3b、ZFP42、CYP26A1、hTERT と同様に高発現していた (図4-8)。

次にマイクロアレイ解析により、BM MNCs、PB MNCs、human fibroblasts、hESCs、BMiPS 細胞株、PBiPS 細胞株の全ゲノム規模での発現プロファイル解析を行った。マイクロアレイデータの階層化解析の結果、BM、PB iPSC clones のいずれもがヒト ES 細胞株あるいは線維芽細胞株由来の iPS 細胞株と同様のクラスターに属し、BM、PB MNCs とは異なるクラスターに分類された (図4-9)。これらの結果は著者らの樹立した 5 つの iPS 細胞株が他のヒト多能性幹細胞株と酷似していることを支持するものである。

バイサルファイトシーケンスにより BM および PB iPS 細胞株の OCT3/4 および NANOG プロモーター領域の DNA メチル化状態を解析した。その結果、コントロールとして用いた HEK293T 細胞株では両プロモーター領域はメチル化されていたのに対して、BM および PB iPS 細胞株は広く脱メチル化されていた (図4-10)。

また各 iPS 細胞株について核型解析を行ったところ、いずれの細胞株も正常核型であることを確認した (図4-11)。

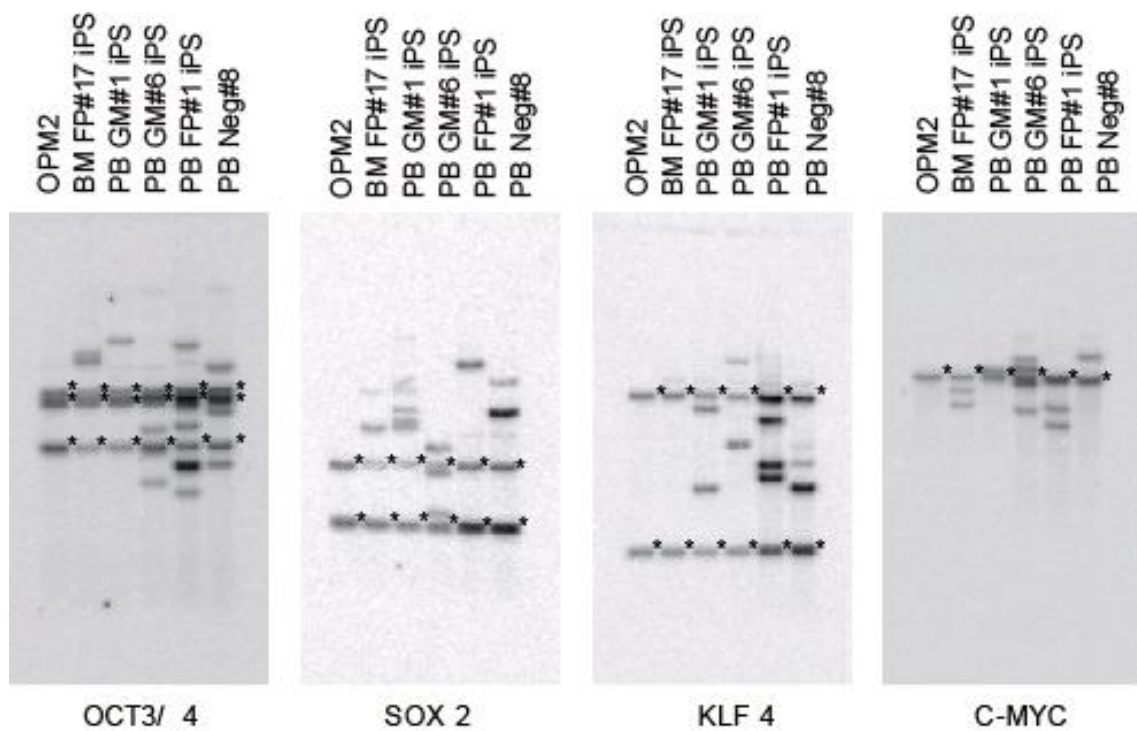


図4-7 iPS4遺伝子プローブを用いたサザンプロット解析

OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC 各遺伝子について文献 (Takahashi et al., 2007)と同様のプローブを使用してサザン解析を実施した。★は内在の遺伝子座に由来するシグナルを示す。ヒトミエローマ細胞株 OPM2 をコントロール細胞として使用した。

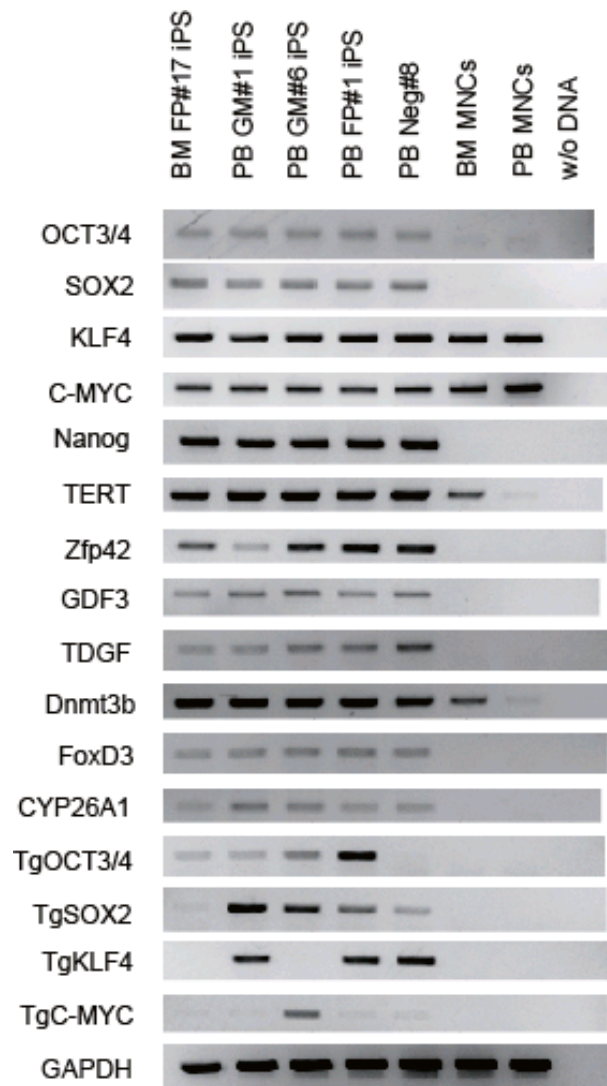


図4-8 ヒト iPS 細胞クローンにおけるヒト ES 細胞マーカー遺伝子の RT-PCR による発現解析

TgOCT3/4、TgSOX2、TgKLF4、TgC-MYC はレトロウィルスに由来する遺伝子発現を示す。

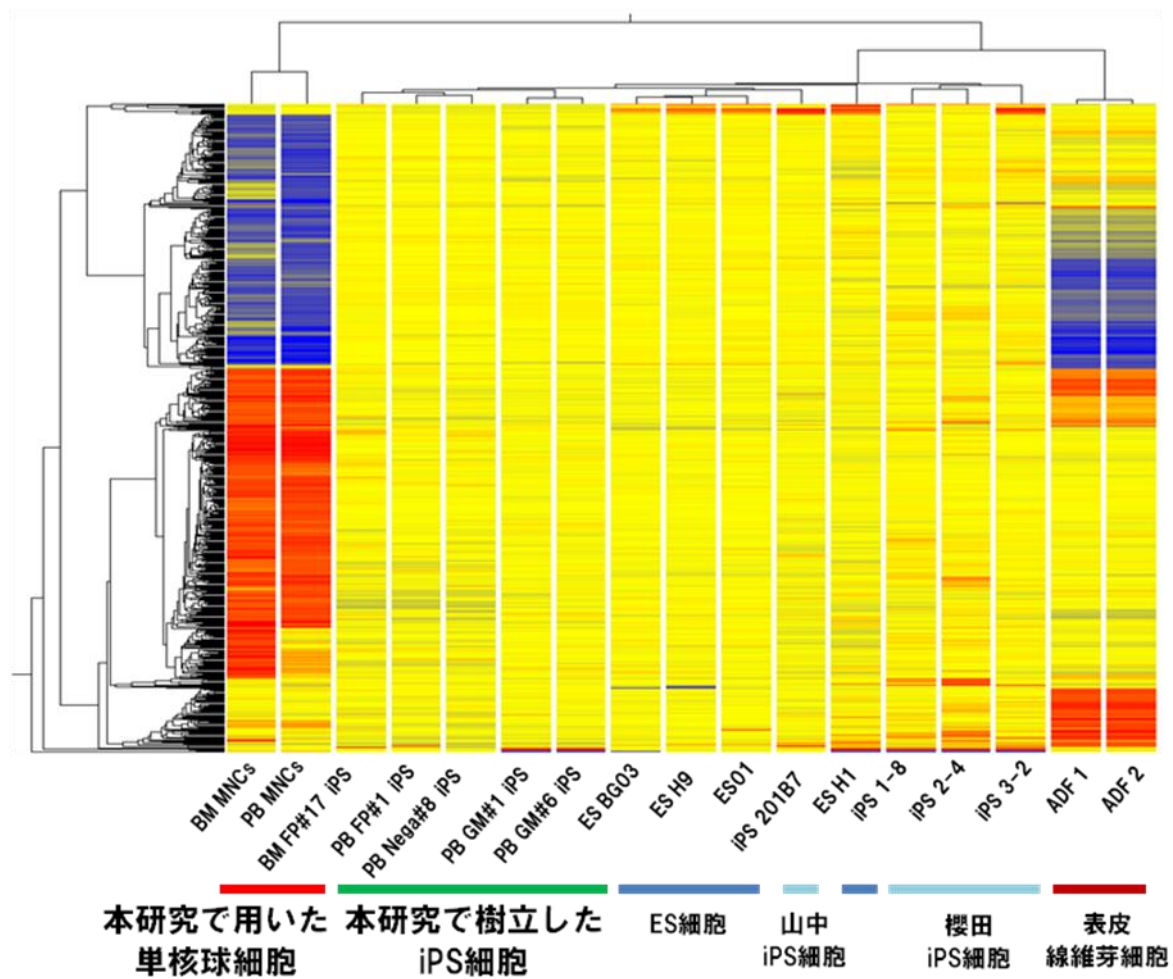


図4-9 ヒト iPS 細胞株、ES 細胞株および体細胞のマイクロアレイおよび階層クラスター解析

iPS 細胞株 (BM FP#17 iPS、PB FP#1 iPS、PB Nega#8 iPS、PB GM#1 iPS、PB GM#6 iPS)、BM MNCs、PB MNCs、ヒト ES 細胞株: BG03 (GSM194391)、H9 (GSM194390)、01 (GSM194392)、H1 (GSM336012)、ヒト iPS 細胞株: 201B7 (GSM241846)、1-8 (GSM257570)、2-4 (GSM257572)、3-2 (GSM257574)、adult human dermal fibroblasts: ADF1 (GSM336057)、2 (GSM242095)の網羅的遺伝子発現に関する 2 次元階層的クラスター分析を行った。GSM 番号併記の細胞株についてのデータは GEO データベースより取得した。青色は低発現遺伝子、赤色は高発現遺伝子を示す。

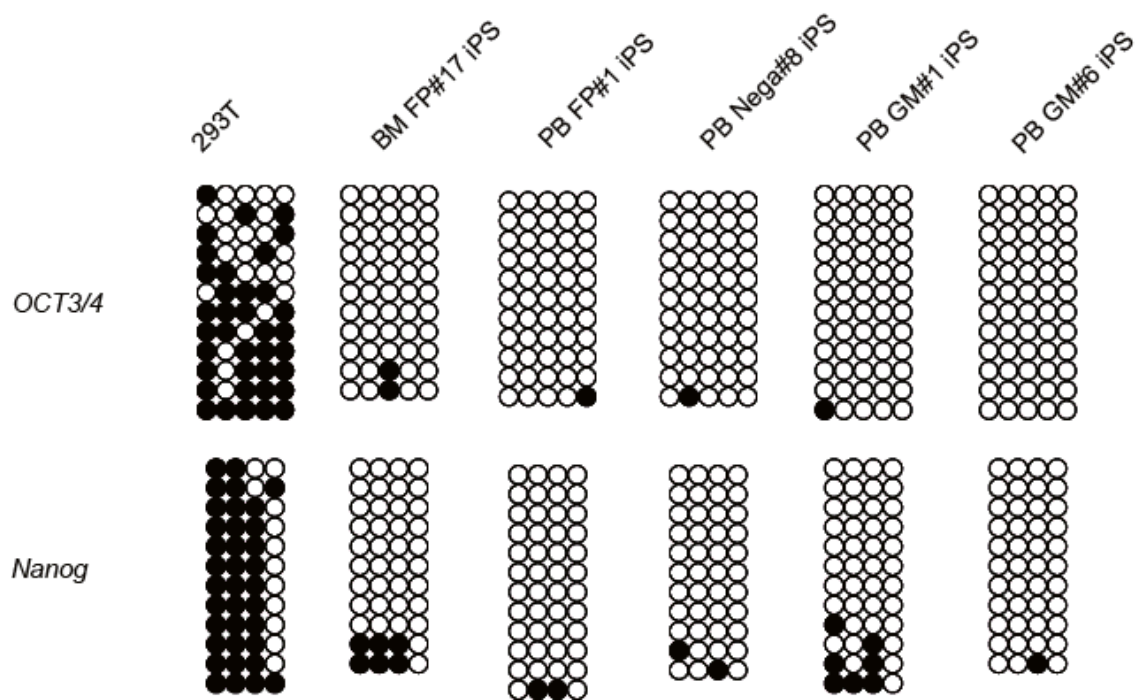
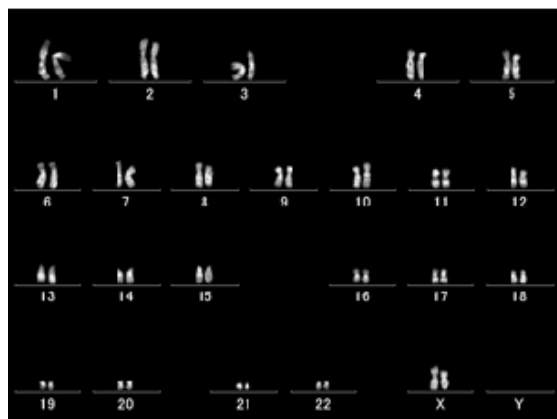


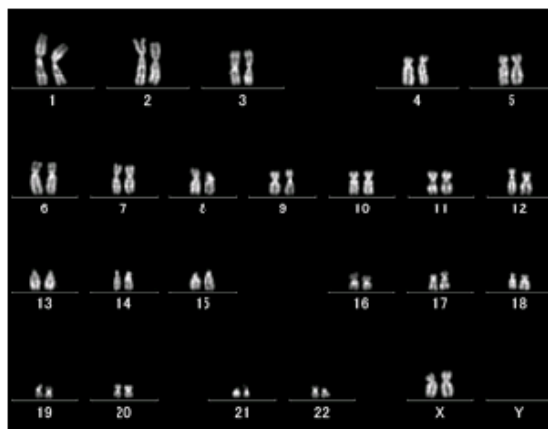
図4-10 バイサルファイト法による OCT3/4 および NANOG 遺伝子プロモーター領域のメチル化解析

OCT3/4 遺伝子については-2106~-1836 領域の 5 箇所の CpG メチル化サイト、NANOG 遺伝子については-302~-215 領域における 4 箇所の CpG メチル化サイトについて解析した。○は非メチル化、●はメチル化 CpG 配列を示す。

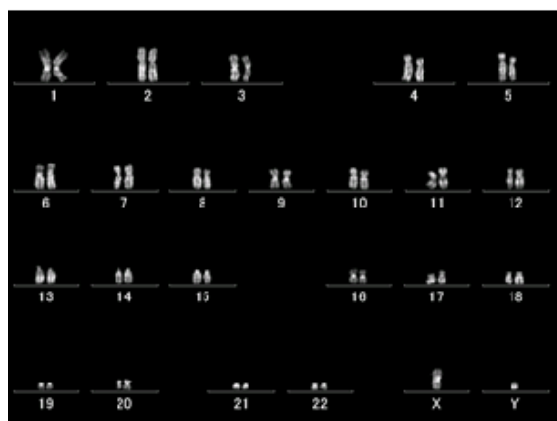
PB FP#1 iPS :46,XX



PB Neg#8 iPS :46,XX



PB GM#1 iPS :46,XY



PB GM#6 iPS :46,XY

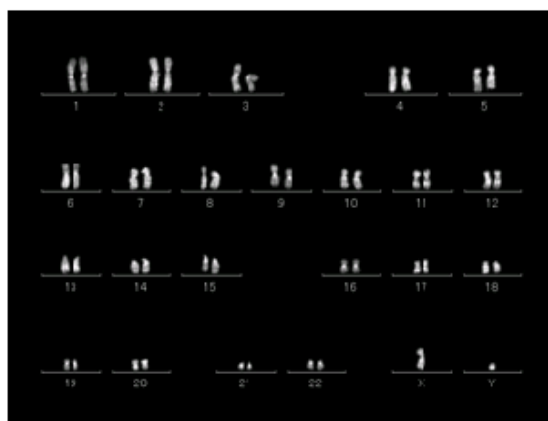


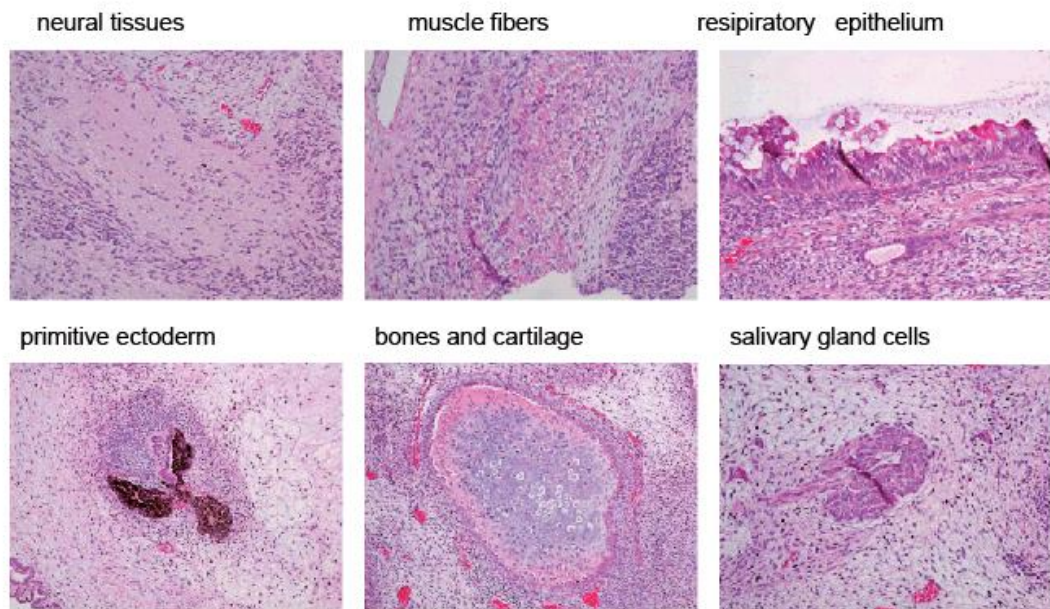
図4-11 ヒト末梢血由来 iPS 細胞株の核型解析

いずれの細胞株も 46XX もしくは 46XY の正常核型を示す。

4-3-4 iPS 細胞株の多能性評価

iPS 細胞株の多能性を評価するために、BM および PB iPS 細胞株の SCID マウス精巣内への移植により *in vivo* における奇形腫形成を試みた。移植後 8、9 週目に奇形腫様の腫瘍塊の形成が認められたため、外科的に摘出し、病理標本を作製した。組織学的解析の結果、腫瘍塊には三胚葉に由来する種々の組織が含まれることを確認した (図4-12A)。外胚葉由来の神経組織、上皮組織、中胚葉由来の筋繊維、骨、軟骨、内胚葉由来の気道上皮、唾液腺に類似した組織像が観察された。さらに抗ヒト GFAP 抗体 (神経)、抗 α -SMA 抗体 (筋肉) および抗 AFP 抗体 (肝細胞) を用いて免疫染色することにより各マーカー分子を発現する特異的細胞へと分化することを確認した (図4-12B)。これらの結果により、BM および PB iPS 細胞株は *in vivo* において、各分化系譜細胞へと分化できることを確認した。

A



B

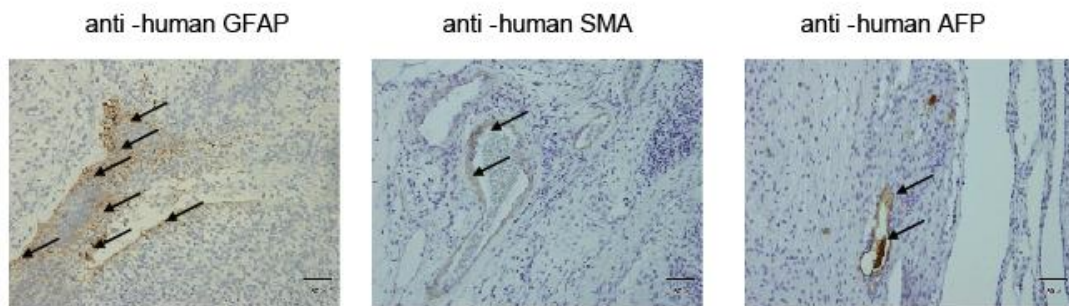


図4-12 ヒト骨髄由来 iPS 細胞株の分化誘導能

A) BM FP#17 iPS 細胞を $0.6 \sim 1 \times 10^6$ cells/head で SCID マウスの精巣内へ移植し、8~9 週後に形成した奇形腫について病理解析を行った。ヘマトキシリン-エオジン染色により解析した。

B) BM FP#17 iPS 細胞由来奇形腫を免疫組織染色した。抗 human GFAP 抗体、抗 α -SMA 抗体、抗 AFP 抗体を用いて染色した。矢印は抗体を用いた染色箇所を示す。

4-3-5 iPS 細胞株の TCR β , TCR γ および IgH 遺伝子座の解析

造血組織には、白血球、血管内皮前駆細胞、間葉系細胞など種々の細胞が含まれることが知られている。今回血液系組織から樹立した iPS 細胞が成熟リンパ球細胞に由来するかどうかを確認するため、BM および PB iPS 細胞株の TCR β , TCR γ , IgH 遺伝子座について、PCR によりゲノム再構成の有無を確認した (表4-2、図4-13) (van Dongen et al., 2003)。その結果、PB Nega#8 iPS 細胞株のゲノム DNA においてのみ、TCR β 遺伝子座の V-J および D-J 再構成と TCR γ 遺伝子座の V-J 再構成が Jurkat 細胞株 (TCR 遺伝子座再構成 control samples)と同様に認められた。一方 BM FP#17、PB FP#1、PB GM#6 iPS のゲノム DNA においては HEK293 細胞 (embryonic type genome control samples)と同様に、TCR β , TCR γ , IgH 遺伝子座におけるいかなる再構成も認められなかった。以上の結果は ST3FP6 あるいは ST3FPFLGM 存在下に樹立された BM あるいは PB iPS 細胞株は造血組織内の非リンパ球細胞に由来することを示している。

表4-2 BM および PB iPS 細胞株の IgH, TCR β , TCR γ 遺伝子座ゲノム DNA 再構成

iPSC clone	IgH	TCR β	TCR γ
BM FP#17	-	-	-
PB Nega#8	-	+	+
PB FP#1	-	-	-
PB GM#1	-	-	-
PB GM#6	-	-	-
Jurkat	-	+	+
Daudi	+	-	-
HEK293	-	-	-

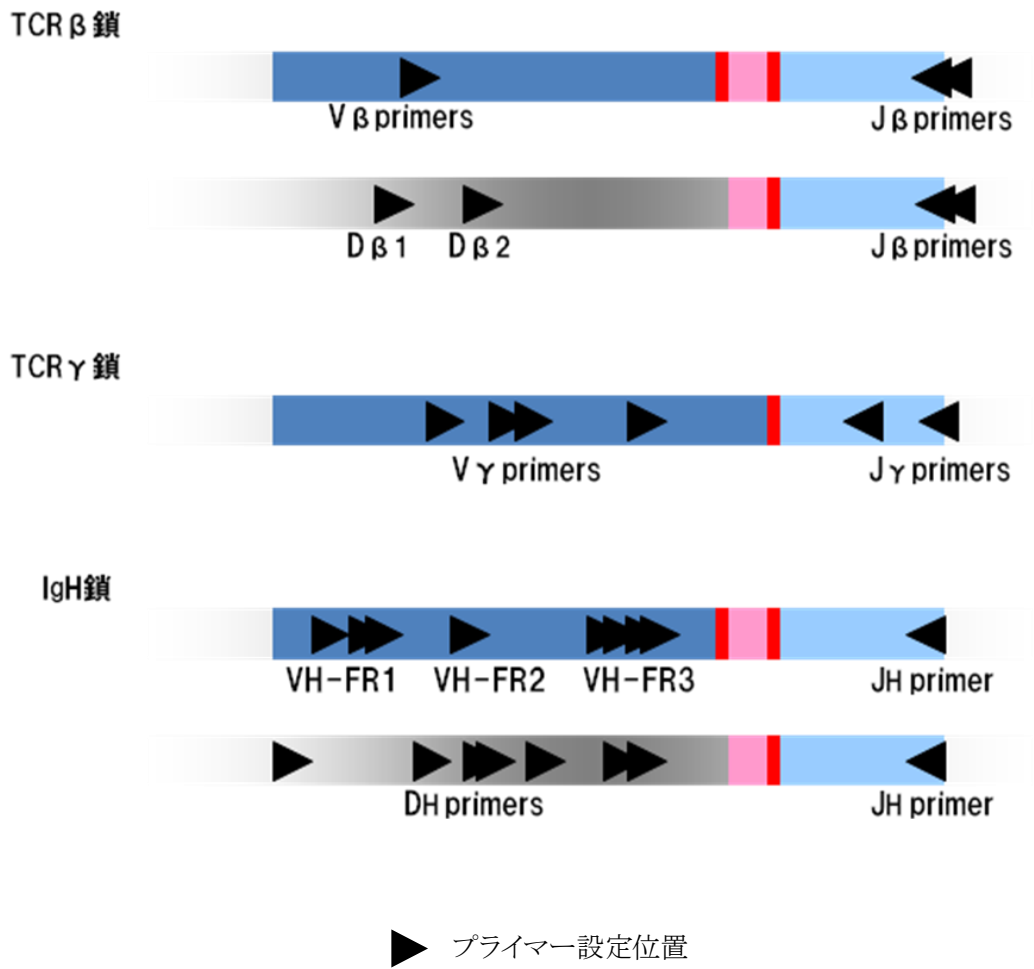


図4-13 遺伝子再構成(IgH、TCR)確認のための PCR 用プライマー

各遺伝子座の混合プライマーを用いて PCR を行い、遺伝子再構成の有無を検出した。

4-4 考察

前章において、マウス骨髄由来単核球細胞から高効率かつ短期間に iPS 細胞が誘導できることを示した。本章の研究では、極めて低いレトロウィルスの感染効率にも拘わらずヒト造血系組織細胞から iPS 細胞の誘導に成功している。近年の研究において、血液系の組織に関してはリンパ球細胞や成熟骨髄球細胞よりも、骨髄球系の前駆細胞がリプログラミングされやすいことが示されている (Eminli et al., 2009)。これらを考え合わせると、骨髄や末梢血の単核球細胞中にリプログラミングされやすい細胞が同様に含まれていることが示唆される。本研究において、骨髄単核球細胞からは ST3 よりも ST3FP6 刺激下においてより多くの iPS 細胞コロニーを取得した。また、末梢血単核球細胞からは ST3 よりも ST3FPFLGM 刺激下においてより多くのコロニーを取得することができた。それぞれの組織中においてリプログラミングされやすい血液細胞画分の同定には至れなかったが、そのような細胞画分では FP6 によりリプログラミングが亢進される可能性が高いと考える。一方コントロールレトロウィルスを用いた感染実験では、骨髄あるいは末梢血中の感染細胞の多くは CD45、CD34、CD38 抗原を発現していた。この結果はリプログラミングされやすい細胞画分が CD34 抗原陽性であり、動員末梢血中の CD34 陽性画分と同様の細胞であることが示唆される (Loh et al., 2009; Ye et al., 2009)。加えて、筆者らの取得した BM あるいは PB iPS 細胞株は、PB Nega#8 を除いて、IgH、TCR β 、TCR γ 遺伝子座の再構成を伴っていなかった。このことは BM あるいは PB より、ST3FP6 あるいは ST3FPFLGM サイトカインを用いて iPS 細胞を誘導することで、胚型の IgH および TCRs 遺伝子を有する iPS 細胞が取得できることを意味する。

本研究により、幹細胞の末梢への動員や特定細胞の濃縮を経ることなく、健常人の骨髄および末梢血由来単核球細胞から iPS 細胞を誘導できることが示された。このことは表皮線維芽細胞から iPS 細胞を誘導するよりも短期間に誘導可能であることを示す。さらに、500 μ l 程度の末梢血から複数の iPS 細胞コロニーを取得できる計算であり、当該採血量は採取が非常に簡便で侵襲性が極めて低く、様々の疾患の患者に対して低リスク、かつ低コストに本法を適用できる。いくつかのグループが

siRNA を用いて Ink4/Arf 遺伝子座を不活化したり、p53-p21 経路を抑制したりすることにより、リプログラミングの効率が上昇することを示している。また、いくつかの低分子化合物が同様にリプログラミング効率を向上させることを示している。これらの方法を組み合わせることで、末梢血由来単核球細胞から得られる iPS 細胞コロニーの数はさらに増加することが期待される (Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009; Li et al., 2009; Marion et al., 2009; Takenaka et al., 2010; Utikal et al., 2009; Zhao et al., 2008)。

4-5 小括

本研究において、骨髄由来単核球細胞同様に非動員末梢血由来単核球細胞を用いて iPS 細胞が誘導可能であることを示した。これらの iPS 細胞は、遺伝子発現プロファイル、免疫不全マウスにおけるテラトーマ形成能等について、ヒト ES 細胞とほぼ同一であった。末梢血や骨髄由来単核球細胞からの iPS 細胞誘導法は長期間の前培養や末梢へ幹細胞を動員することなしに、1 ml 以下の血液相当の単核球細胞から iPS 細胞を誘導する方法を確立した。細胞治療のための患者由来 iPS 細胞の樹立や細胞バンクの構築には、末梢血単核球細胞は理想的な細胞ソースであると考えられる。

第5章 総括

第2章において造血幹細胞の長期再構築能を支持する活性を有する AGM-S3 細胞株から新たにサブクローニングを行い、造血支持能の高い S3-A9 細胞株と造血支持能の低い S3-A7 細胞株を取得した。gene chip を用いた遺伝子発現解析の結果、造血支持能の低い S3-A7細胞株に対して造血支持能の高い S3-A9 細胞株および OP9 細胞で高発現している遺伝子を見出した。それらの遺伝子を S3-A7細胞株に高発現させ、造血細胞と共培養することにより造血支持能を評価したところ、ヘパラン硫酸プロテオグリカンファミリーの一つである Glypican-1 (GPC1)を高発現させた S3-A7 細胞株との共培養は、ヒト臍帯血由来造血前駆細胞を増幅した。GPC1 は初期造血を支持する微小環境の構築に重要な機能を果たしていることが示唆された。

第3章において体細胞の初期化により自己複製可能な多能性細胞を誘導することにより、自家細胞の増幅を試みた。Oct4-GFP マウスの BM MNCs と MEF を調製し、ES 細胞との融合あるいはレトロウイルスにより Oct3/4、Sox2、cMyc、Klf4 の4遺伝子を発現させたところ、ES 細胞と融合した BM MNCs は MEF に比べ、より多くの ES 細胞様コロニーを形成し、レトロウイルスを感染させた BM MNCs は iPS 細胞へとリプログラミングした。BM MNCs 由来 iPS 細胞コロニーは MEF 由来よりもコロニーの出現時期が早く、頻度も高かった。BM 由来 iPS 細胞 (BM iPS) は、ES 細胞マーカーを発現し、生殖系列への分化を伴ったキメラマウスの作出に寄与した。クローナルな解析の結果、BM iPS は一度のウイルス感染で複数のクローンを取得可能であることを示した。BM MNCs は高効率に iPS 細胞へとリプログラミングされることより、臨床応用上の大きな利点を有しているものと考えられる。

第4章において、少量のヒト末梢血より iPS 細胞を誘導することを試みた。まず、ヒト BM MNCs から iPS 細胞を誘導したところ、マウスに比して低い遺伝子導入効率ながら iPS 細胞の取得に成功した。さらに BM MNCs 同様に非動員 PB MNCs を用いて iPS 細胞が誘導可能であることを示した。これら

の iPS 細胞は、発現プロファイル、免疫不全マウスにおけるテラトーマ形成能等について、ヒト ES 細胞とほぼ同一であることを示した。また取得した多くの iPS 細胞クローンは非リンパ球由来であり、TCR や IgH 遺伝子座の再構成を伴わないことを確認した。これらのことより、長期間の前培養や末梢への幹細胞の動員を必要とすることなく、1 ml 以下の末梢血液から iPS 細胞を誘導できる方法を新たに開発した。細胞治療や病態機構解明のための患者由来 iPS 細胞の樹立や iPS 細胞バンクの構築には、少量の PB MNCs は理想的な自己組織由来の細胞ソースであると考ええる。

5-1 造血幹細胞の自己複製と体外増幅

これまでに造血幹細胞増幅を目的とした多くの試みがなされている。しかしながら、造血幹細胞増殖因子としていくつかの因子が報告されたものの、そのいずれもが単独で幹細胞の多能性を維持しつつ自己複製を大幅に促進するには至っていない。その理由の一つとして人為的な細胞増幅は急速な老化を伴うことが考えられる。仮に多能性を維持した幹細胞の体外増幅に成功したとしても、その細胞の活性は増幅前の細胞に比べ、細胞寿命が短縮され、幹細胞の本来の使命である長期に渡る分化細胞の供給の役目を果たす能力を発揮できない可能性は十分に考えられる。造血幹細胞は加齢に伴って血液が枯渇することがないことから極めて高い再生能力を備えていると言える。しかしながら、加齢に伴って造血幹細胞からの分化はリンパ球系の細胞への分化よりも骨髓球系への分化が起りやすくなっている (Beerman et al., 2010)。幹細胞の体外増幅においては、多能性の維持のみならず細胞寿命の短縮を阻止し、望ましくは細胞寿命を延長させられることが求められる。iPS 細胞誘導の過程においては、分化増殖の過程で短縮したテロメアを持つ体細胞もリプログラミングにより再びテロメアが伸長することが知られており、その機構の中に幹細胞の細胞寿命を延ばす手法のヒントが隠されていると考えられる。

造血幹細胞は通常幹細胞ニッチと呼ばれる骨髓微小環境中に存在し、通常細胞増殖期にはなく、休眠状態を維持している。造血幹細胞の自己複製と分化のバランス決定は対称あるいは非対称

分裂によって調節され (Morrison and Spradling, 2008)、増殖刺激を受けた幹細胞は、細胞分裂により二個の幹細胞もしくは二個の分化細胞を供給する対称分裂を行うか、一個の幹細胞から一個の幹細胞と一個の前駆細胞を供給する非対称分裂を行うことにより、最終的に成熟した終末分化細胞を供給する必要があると考えられる。幹細胞を枯渇させてはならないため、幹細胞の数は維持されなければならない。そのため分化細胞を速やかにかつ大量に供給する過程においては、幹細胞の自己複製を活性化する一方で、増殖性の高い前駆細胞の増幅により細胞数を増やし分化細胞を供給するシステムが安全かつ合理的である。不等分裂には細胞極性の維持が必要であり、そのためには極性を規定する環境因子との相互作用が不可欠である。本研究において、ストローマ細胞との共培養下では造血幹細胞を安定的に増幅・維持できていることは幹細胞の多能性維持にはストローマ細胞との接着が必要であることを示唆している。本研究において造血幹細胞の支持活性の高い AGM-S3-A9 細胞および OP9 細胞が CXCL12 を高発現していることが明らかとなった。骨髄においてこの CXCL12 を高発現する細胞として、CXCL12-abundant reticular (CAR) 細胞が同定されており、c-kit 陽性 Sca-1 陽性の造血前駆細胞の大部分がこの CAR 細胞の突起に接着して存在することが報告されている (Sugiyama et al., 2006)。この CAR 細胞を特異的に欠損するマウスを用いた解析では、骨髄中の B 細胞と赤血球前駆細胞が減少し、造血幹細胞数の減少はわずかであったことから、この細胞は B 細胞、赤血球前駆細胞の増殖に必須であると考えられる (Omatsu et al., 2010)。またこの細胞欠損マウスでは SCF の蛋白発現量が著減しており、この細胞が骨髄において SCF、CXCL12 を主に産生する細胞であることが示唆されている。SCF 発現細胞を GFP により可視化させたマウスにおいても、CAR 細胞同様に SCF 高発現細胞が骨髄中に存在し、造血幹細胞の多くがこの細胞と接着して存在することが報告されている。この細胞特異的に SCF を欠損させると骨髄中の造血幹細胞が減少する (Ding et al., 2012)ことから、SCF を高発現する CAR 細胞は造血幹細胞を維持する微小環境を提供していると考えられる。本研究において新たにサブクローニングした AGM-S3-A9 細胞は、CAR 細胞と同様の発現プロファイルを取ることから、*in vitro* においても造血幹細胞を維持できる能力を有しているものと考えられる。

5-2 血液系細胞からのリプログラミング

本研究において、骨髄細胞が極めてリプログラミングされやすいことが示された。GeneChip 解析の結果、BM MNCs における Klf4、c-myc の発現は iPS 細胞、ES 細胞と同等であった。Klf4、c-myc が骨髄中の同一の細胞画分で発現が高いかどうかは本研究において明らかにできていないが、リプログラミングに対する 4 因子の発現依存度は他の細胞画分と異なっている可能性は高い。Hoechedlinger らは、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-myc を誘導性に発現するトランスジェニックマウスを用いた解析により、造血幹細胞および骨髄球系の前駆細胞が B 細胞や T 細胞に比べはるかにリプログラミングされやすいことを報告している (Eminli et al., 2009)。骨髄には造血幹細胞以外に間葉系幹細胞と呼ばれる多能性の幹細胞も含まれており、本研究においてリプログラミングされた細胞が間葉系幹細胞由来である可能性は否定できないが、骨髄球系の血液前駆細胞や間葉系幹細胞を含む骨髄組織そのものが効率的なリプログラミングのための細胞源であることは確かである。

細胞融合においても BM MNCs は MEF よりも短期間でリプログラミングされている。DNA の脱メチル化には DNA の複製が必須であることから、複数回の細胞分裂が必要であると考えられる。しかしながら、融合によるリプログラミングの場合には、多くとも 1 回程度の細胞分裂時間において Oct3/4 などの内在の初期化因子が活性化されていることから、エピジェネティックな変化を伴わずに細胞の初期化を促進する因子が ES 細胞など多能性幹細胞の細胞質中に含まれていることが示唆される。ゲノムワイドな解析により、iPS 細胞の初期化状態は核移植により作製された ES 細胞より不完全であり、iPS 細胞が由来する細胞のメチル化状態を一部保持していることが報告されている (Kim et al., 2010)。このため iPS 細胞からの分化誘導では由来細胞の細胞系譜へと分化しやすい傾向がある。このことが単に DNA のメチル化状態の違いによるものか、あるいはエピジェネティック制御機構の全体的な相違に起因するものであるのかは、iPS 細胞の多能性、多分化能を評価する上で今後重要なポイントとなる。

末梢血細胞は iPS 細胞の発見当初から、その組織採取にかかる侵襲性の低さからドナー細胞として最も注目されていた。しかしながら、末梢血中の血球構成や遺伝子導入効率の低さなどから、末梢血細胞からの iPS 細胞誘導のためには、線維芽細胞からの誘導法に対して改良が必要であった。末梢血液細胞からの iPS 細胞株樹立の報告は、ほぼ同時期に著者らを含む複数のグループからなされる結果となった (表5-1)。結果を比較した時に、著者らの方法の優位性は以下の点に挙げられる。①用いる細胞数が少ない一方で得られるコロニー数が多い。②TCR 等の再構成を伴っていない非リンパ球系のクローンが多数取得できる。③前培養期間が短い。④コロニー出現までの日数が短い。末梢血中に存在する増殖性の血球細胞の多くは T 細胞であることから、他のグループでは T 細胞に由来するクローンを多く取得しているものと推察される。T 細胞に由来する iPS 細胞はどの細胞に分化させても TCR についてはモノクローナルになるため、治療目的で使用する場合には遺伝子再構成前のナイーブな細胞から iPS 細胞を取得できることが望ましい。

著者らが非リンパ球系の細胞から効率のよいリプログラミングに成功した理由として、骨髄球系の細胞を標的にしたサイトカイン組合せと gp130 の活性化を目的とした FP6 を用いた点が挙げられる。マウス ES 細胞においては、LIF により活性化される gp130 の下流に存在するシグナル因子である Stat3 の活性化が ES 細胞の多能性維持に必須とされている。また Stat3 を人為的に活性化することで LIF 非存在下においても、Klf4、Sox2、Oct3/4 といった多能性の維持に重要な転写因子の発現が維持されることが報告されている (図5-1) (Niwa et al., 2009)。これらの因子は iPS 細胞誘導のためのリプログラミング因子に他ならず、Stat3 の活性化はリプログラミングに対しても促進効果が期待できるのではないかと考えた。FP6 は可溶化型 IL6R と IL6 とのキメラ蛋白であり、gp130 を発現する細胞であれば受容体の α 鎖を発現していなくとも gp130 を効率よく活性化し、Stat3 シグナルを活性化することが可能である。血球系細胞には gp130 を発現する細胞が多く、これらの細胞に FP6 で刺激を加えることによりリプログラミングの促進効果を期待した。ヒト ES 細胞はマウス ES 細胞のように LIF 依存性がないとの報告もあるが、近年従来のヒト ES 細胞はマウスの Epiblast ステージの細胞に近いとされ、マウス ES 細胞型のヒト ES 細胞をナイーブ ES 細胞として従来の細胞と区別されるようになっている。リ

プログラミング 4 因子がヒトとマウスで同じであったことを併せて考えると、ヒトの多能性幹細胞についてもマウスと同様の多能性転写因子ネットワークによりコントロールされている可能性は高い。

表5-1 末梢血液細胞からの iPS 細胞誘導法の比較

研究グループ	Nagao	Fukuda	Daley	Daley	Jaenisch
細胞種	末梢血単核球細胞	末梢血単核球細胞由来CD3陽性	末梢血由来CD34陽性細胞(非動)	末梢血単核球細胞	末梢血単核球細胞
使用細胞数	5×10^5	1.5×10^6	$1 \times 10^5 \sim 10^6$	$1 \times 10^5 \sim 10^6$	末梢血30ml相当
前培養日数	2日間	5日間	4日間	4日間	5日間
前培養への添加サイトカイン	SCF TPO IL-3 FP6 Flt3L GM-CSF M-CSF	anti-CD3 mAb IL-2	hSCF hFlt3L IL-3	hSCF hFlt3L IL-3	IL-7 もしくは G-CSF GM-CSF IL-3 IL-6
遺伝子導入法	レトロウイルス	センダイウイルス	レンチウイルス	レンチウイルス (8日後に再感染)	レンチウイルス
フィーダー細胞との共培養開始時期 (ウイルス感染か)	2日	2日	3日	3日	3日
hES用培地への交換時期	6日	3日	5日	5日	8日
最初のコロニー出現時期	10日	15日	21日	35日	25日
取得コロニー数: 由来細胞系譜	21-29: 非リンパ球	50: T細胞	(リプログラミング 効率: 0.002%)	1-6: T細胞 1-2: 非リンパ球 (効率: 0.0008- 0.001%)	1-7 1-2: 非リンパ球 1-7: T細胞
文献		1	2	2	3

1) (Seki et al., 2010)、2) (Loh et al., 2010)、3) (Staerk et al., 2010)

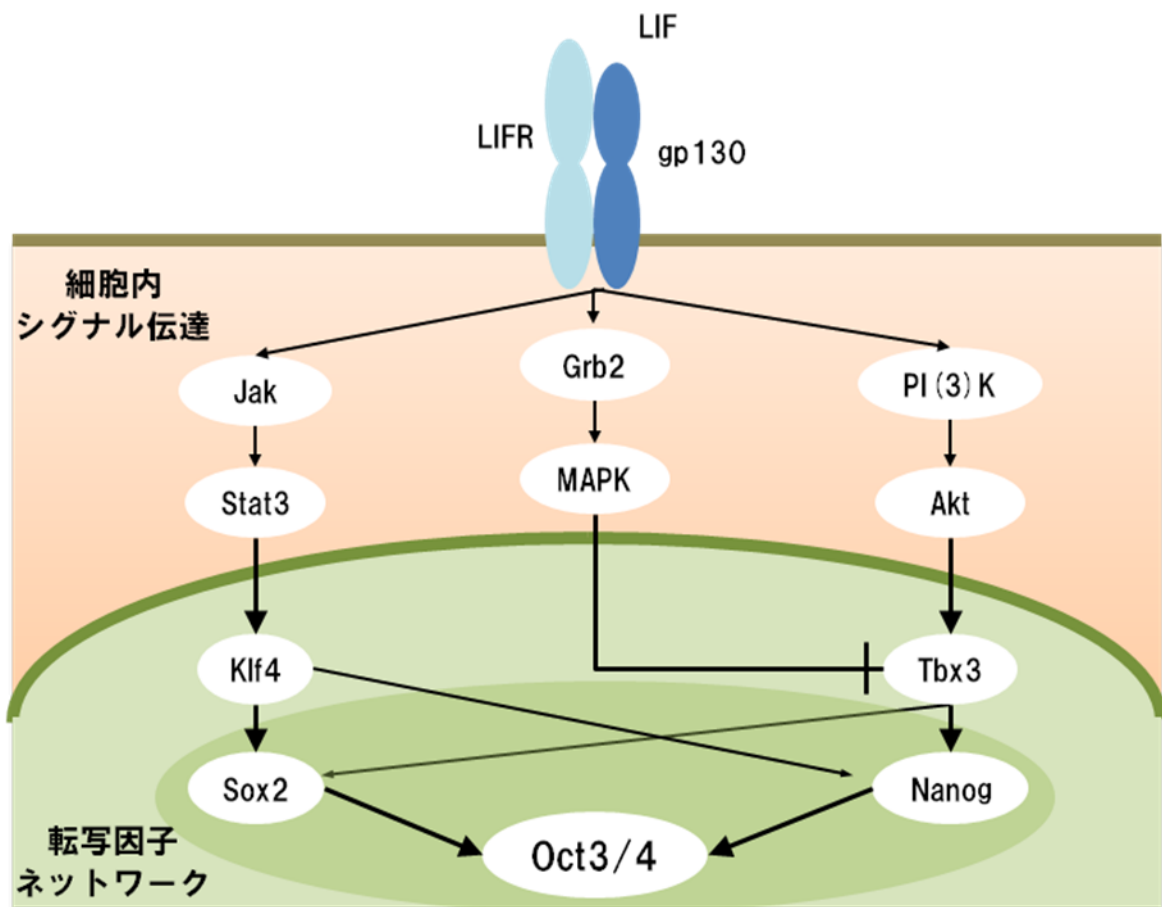


図5-1 多能性維持のための転写因子ネットワーク (Niwa et al., 2009)

Jak-Stat3 経路は Klf4 の活性化を介して、主に Sox2 を活性化する。PI(3)K-Akt 経路は Tbx3 の転写を活性化し、主に Nanog を活性化する。Sox2、Nanog の活性化は Oct3/4 の発現を維持し、これらの転写因子の活性は、Oct3/4、Sox2、Nanog によってポジティブに制御されている。

5-3 今後の治療応用へ向けた展開

iPS 細胞を用いた臨床応用を考える上で、短期的に最も期待されるのは患者由来の細胞から樹立した疾患 iPS 細胞を用いた病態解明、治療法の開発である。iPS 細胞作製方法は再現性が高く、既に世界中の多くの大学病院で患者由来 iPS 細胞樹立の試みがなされている。iPS 細胞を疾患モデルとして使用するためには、まず iPS 細胞が樹立可能であること、樹立した細胞あるいは分化誘導した細胞が病態を模倣できること、などが条件となる。細胞レベルで病態を模倣できるかどうかは、病態発症の過程における遺伝的背景への依存度が大きく影響する。少数の遺伝子変異に起因する家族性の疾患については、細胞レベルで病態を再現できる可能性が高く、多因子が影響する孤発性疾患では環境因子による病態進行への影響が小さくないことから、より多くの細胞を用いて時間をかけた解析が必要となってくる。しかしながら、これまで病態解明のための研究材料が全くなかったような希少疾患においては、iPS 細胞を用いたメカニズム解析により発症原因、病態進行に関わる新たなメカニズムを見出せる可能性がある。本研究において開発した少量の血液からの iPS 細胞誘導法は、小児や炎症性疾患の患者といった皮膚などの検体を採取することが難しい患者に対しても利用することが可能であり、難病とされているそのような疾患に対する新たな治療法の開発に繋がるものと期待する。

iPS 細胞による治療応用の実現のためには安全性の確保が大きなハードルとして立ちはだかっている。iPS 細胞自身は奇形腫形成能を有しているため、移植に際しては未分化な細胞の除去や分化抵抗性の細胞の除去が必須となる。未分化細胞の可視化などによりそれら細胞を効率的に除去する手法の開発なども試みられている。一方で治療応用のための iPS 細胞バンクの設置も検討されている。安全性を確保した細胞株の樹立までに数カ月を要する iPS 細胞を急性期疾患の治療に使用することは難しい。予め複数の HLA ハプロタイプに対応した細胞をバンク化することで急性期疾患への対応が可能となる。また、遺伝性疾患の場合は自己の細胞では治療効果の期待が低いことから、同種他家の細胞を用いることが望ましい。日本国においては HLA 3 座をホモに持つドナー 50 人より iPS 細胞を樹立できれば、日本国人口の 75% に対して 3 座一致で移植対応が可能である (Okita et al.,

2011)。しかしながら、現在治療用の細胞樹立のためには 1 株単位で多額のコストがかかることが予想されていることから、樹立のためのより効率良い誘導法、安全性担保のための品質評価法の確立が重要となってくる。

iPS 細胞の発見は新たな多能性幹細胞を提供するとともに、体細胞に複数の転写因子を発現させることで、従来変えることができないと考えられていた細胞運命を変換しうることを示した。細胞運命を規定するマスター因子により、線維芽細胞のような細胞から神経、心筋、肝臓といった細胞への変換が実際に報告されつつある。神経細胞へは、マウスにおいては *Ascl1*、*Brn2*、*Myt1l* の 3 因子で、ヒト線維芽細胞からはこの 3 因子に *NeuroD1* という転写因子を加えることで誘導できることが示されている (Pang et al., 2011)。心筋細胞については、マウス線維芽細胞に *Gata4*、*Mef2c*、*Tbx5* という 3 因子を導入することで誘導される (Ieda et al., 2010)。また肝細胞へはマウス線維芽細胞へ *Hnf4a* と *Foxa1*、2、3 のいずれか一因子を導入することで直接変換が可能である (Sekiya and Suzuki, 2011)。ES 細胞や iPS 細胞のような多能性幹細胞から分化誘導した細胞とダイレクトリプログラミングにより誘導された細胞と、どちらが治療応用に適するかを比較されることが多いが、現時点では優劣をつけることは不可能である。今後安全性や薬効が厳しく検証される過程で、どの疾患治療にはどの方法が適するか、判断されるものと考えられる。

本研究によって、新たな造血前駆細胞の増幅法およびマウス、ヒト造血系組織細胞からの高効率なリプログラミング方法を確立した。今後は本研究において樹立したストローマ細胞を造血環境解析ツールとして用いてさらに研究を進めることにより、生体内における造血幹細胞の自己複製メカニズムについての理解、さらには造血幹細胞の自己複製の制御につながるものと期待される。また、本研究において確立した造血系組織細胞からの多能性幹細胞誘導法と、リプログラミングを効率化する他の手法とを組み合わせることにより、臨床応用へ向けたより安全で効率のよいリプログラミング法の開発につながるものと期待される。

今後、造血幹細胞移植以外の移植医療を含めたアンメットメディカルニーズを満たす最適な細胞を用意するために、体性幹細胞を増幅する方法と iPS 細胞のような多能性幹細胞を利用する方法と、

どちらの方法が適切であるか現時点で一概に判断することはできない。どちらの方法も臨床応用の可能性があり、単純に優劣をつけることは難しい。疾病の発症メカニズムへの理解や治療効果の高い細胞の同定、解析が進む中、様々な疾患に対して、それぞれに好適な細胞調製方法を選択できることが理想であると言える。真に治療効果の高い細胞を手にするためには、いずれかに偏った研究を進めるのではなく、様々な研究がそれぞれの利点を磨き、時に融合し、既成概念にとらわれない自由な発想をもって様々な課題に挑戦することが重要であるとする。

参考文献

Anderlini, P.: Effects and safety of granulocyte colony-stimulating factor in healthy volunteers. *Curr Opin Hematol*, 16: 35-40. 2009.

Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T. and Yamanaka, S.: Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, 321: 699-702. 2008.

Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G. Y. and Suda, T.: Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118: 149-161. 2004.

Beerman, I., Bhattacharya, D., Zandi, S., Sigvardsson, M., Weissman, I. L., Bryder, D. and Rossi, D. J.: Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 5465-5470. 2010.

Blelloch, R., Venere, M., Yen, J. and Ramalho-Santos, M.: Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell*, 1: 245-247. 2007.

Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G. G., Lengner, C. J., Wernig, M., Suh, H. and Jaenisch, R.: Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*, 2: 151-159. 2008.

Broxmeyer, H. E., Kohli, L., Kim, C. H., Lee, Y., Mantel, C., Cooper, S., Hango, G., Shaheen, M., Li, X. and Clapp, D. W.: Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G(alpha)i proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *J Leukoc Biol*, 73: 630-638. 2003.

Byrne, J. A., Pedersen, D. A., Clepper, L. L., Nelson, M., Sanger, W. G., Gokhale, S., Wolf, D. P. and Mitalipov, S. M.: Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 450: 497-502. 2007.

Campbell, K. H., McWhir, J., Ritchie, W. A. and Wilmut, I.: Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380: 64-66. 1996.

Chan, E. M., Ratanasirinrawoot, S., Park, I. H., Manos, P. D., Loh, Y. H., Huo, H., Miller, J. D., Hartung, O., Rho, J., Ince, T. A., Daley, G. Q. and Schlaeger, T. M.: Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol*, 27: 1033-1037. 2009.

Coombe, D. R., Watt, S. M. and Parish, C. R.: Mac-1 (CD11b/CD18) and CD45 mediate the adhesion of hematopoietic progenitor cells to stromal cell elements via recognition of stromal heparan sulfate. *Blood*, 84: 739-752. 1994.

Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A. and Eggan, K.: Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 309: 1369-1373. 2005.

Daheron, L., Opitz, S. L., Zaehres, H., Lensch, M. W., Andrews, P. W., Itskovitz-Eldor, J. and Daley, G. Q.: LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 22: 770-778. 2004.

Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G. and Morrison, S. J.: Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 481: 457-462. 2012.

Do, J. T. and Scholer, H. R.: Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. *Stem Cells*, 22: 941-949. 2004.

Eminli, S., Foudi, A., Stadtfeld, M., Maherali, N., Ahfeldt, T., Mostoslavsky, G., Hock, H. and Hochedlinger, K.: Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet*, 41: 968-976. 2009.

Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P., Kallen, K. J., Wollmer, A., Grotzinger, J. and Rose-John, S.: I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol*, 15: 142-145. 1997.

Fuchs, E., Tumber, T. and Guasch, G.: Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 116: 769-778. 2004.

Gupta, P., Oegema, T. R., Jr., Brazil, J. J., Dudek, A. Z., Slungaard, A. and Verfaillie, C. M.: Structurally specific heparan sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche. *Blood*, 92: 4641-4651. 1998.

Hacker, U., Nybakken, K. and Perrimon, N.: Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 530-541. 2005.

Han, D. W., Do, J. T., Gentile, L., Stehling, M., Lee, H. T. and Scholer, H. R.: Pluripotential reprogramming of the somatic genome in hybrid cells occurs with the first cell cycle. *Stem Cells*, 26: 445-454. 2008.

Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B. W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, M. P., Steine, E. J., Cassady, J. P., Foreman, R., Lengner, C. J., Dausman, J. A. and Jaenisch, R.: Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 133: 250-264. 2008.

Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C. J., Creighton, M. P., van Oudenaarden, A. and Jaenisch, R.: Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*, 462: 595-601. 2009.

Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C. W., Meissner, A., Cassady, J. P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L. C., Townes, T. M. and Jaenisch, R.: Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 318: 1920-1923. 2007.

Heike, T. and Nakahata, T.: Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim Biophys Acta*, 1592: 313-321. 2002.

Hochedlinger, K. and Jaenisch, R.: Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med*, 349: 275-286. 2003.

Hochedlinger, K. and Jaenisch, R.: Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*, 441: 1061-1067. 2006.

Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K. and Yamanaka, S.: Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*, 460: 1132-1135. 2009.

Huang, E., Nocka, K., Beier, D. R., Chu, T. Y., Buck, J., Lahm, H. W., Wellner, D., Leder, P. and Besmer, P.: The hematopoietic growth factor KL is encoded by the *Sl* locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the *W* locus. *Cell*, 63: 225-233. 1990.

Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A. E. and Melton, D. A.: Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*, 26: 795-797. 2008.

Hueber, A. O., Pierres, M. and He, H. T.: Sulfated glycans directly interact with mouse Thy-1 and negatively regulate Thy-1-mediated adhesion of thymocytes to thymic epithelial cells. *J Immunol*, 148: 3692-3699. 1992.

Ieda, M., Fu, J. D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G. and Srivastava, D.: Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 142: 375-386. 2010.

Jaenisch, R. and Young, R.: Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 132: 567-582. 2008.

Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y. V., Menendez, S., Morera, L. B., Raya, A., Wahl, G. M. and Belmonte, J. C.: Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*, 460: 1140-1144. 2009.

Kim, J. B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Arauzo-Bravo, M. J., Ruau, D., Han, D. W., Zenke, M. and Scholer, H. R.: Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 454: 646-650. 2008.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M. J., Ji, H., Ehrlich, L. I., Yabuuchi, A., Takeuchi, A., Cunniff, K. C., Hongguang, H., McKinney-Freeman, S., Naveiras, O., Yoon, T. J., Irizarry, R. A., Jung, N., Seita, J., Hanna, J., Murakami, P., Jaenisch, R., Weissleder, R., Orkin, S. H., Weissman, I. L., Feinberg, A. P. and Daley, G. Q.: Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 467: 285-290. 2010.

Kitamura, T., Koshino, Y., Shibata, F., Oki, T., Nakajima, H., Nosaka, T. and Kumagai, H.: Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol*, 31: 1007-1014. 2003.

Kodama, H., Nose, M., Niida, S., Nishikawa, S. and Nishikawa, S.: Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Exp Hematol*, 22: 979-984. 1994.

Kyba, M., Perlingeiro, R. C. and Daley, G. Q.: HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell*, 109: 29-37. 2002.

Ledran, M. H., Krassowska, A., Armstrong, L., Dimmick, I., Renstrom, J., Lang, R., Yung, S., Santibanez-Coref, M., Dzierzak, E., Stojkovic, M., Oostendorp, R. A., Forrester, L. and Lako, M.:

Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell*, 3: 85-98. 2008.

Lerou, P. H. and Daley, G. Q.: Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev*, 19: 321-331. 2005.

Li, H., Collado, M., Villasante, A., Strati, K., Ortega, S., Canamero, M., Blasco, M. A. and Serrano, M.: The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature*, 460: 1136-1139. 2009.

Loh, Y. H., Agarwal, S., Park, I. H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G. C., Kim, K., Miller, J. D., Ng, K. and Daley, G. Q.: Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood*, 113: 5476-5479. 2009.

Loh, Y. H., Hartung, O., Li, H., Guo, C., Sahalie, J. M., Manos, P. D., Urbach, A., Heffner, G. C., Grskovic, M., Vigneault, F., Lensch, M. W., Park, I. H., Agarwal, S., Church, G. M., Collins, J. J., Irion, S. and Daley, G. Q.: Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell*, 7: 15-19. 2010.

Lowry, W. E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A. D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A. T. and Plath, K.: Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 2883-2888. 2008.

Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., Plath, K. and Hochedlinger, K.: Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 1: 55-70. 2007.

Marion, R. M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M. and Blasco, M. A.: A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature*, 460: 1149-1153. 2009.

Masaki, H., Ishikawa, T., Takahashi, S., Okumura, M., Sakai, N., Haga, M., Kominami, K., Migita, H., McDonald, F., Shimada, F. and Sakurada, K.: Heterogeneity of pluripotent marker gene expression in colonies generated in human iPS cell induction culture. *Stem Cell Res*, 1: 105-115. 2007.

Medvinsky, A. and Dzierzak, E.: Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*, 86: 897-906. 1996.

Meissner, A., Wernig, M. and Jaenisch, R.: Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 25: 1177-1181. 2007.

Mizuguchi, H., Mizuno, H., Yasukawa, K., Ishiguro, T., Fukui, K., Imanaka, T. and Takagi, M.: Enhanced signal transduction by a directly fused protein of interleukin-6 and its receptor. *J Biosci Bioeng*, 91: 299-304. 2001.

Morita, S., Kojima, T. and Kitamura, T.: Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther*, 7: 1063-1066. 2000.

Morrison, S. J. and Spradling, A. C.: Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 132: 598-611. 2008.

Muller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F. and Dzierzak, E.: Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity*, 1: 291-301. 1994.

Nishikawa, M., Tahara, T., Hinohara, A., Miyajima, A., Nakahata, T. and Shimosaka, A.: Role of the microenvironment of the embryonic aorta-gonad-mesonephros region in hematopoiesis. *Ann N Y Acad Sci*, 938: 109-116. 2001.

Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. and Smith, A.: Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, 12: 2048-2060. 1998.

Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D. and Adachi, K.: A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, 460: 118-122. 2009.

Ogawa, M.: Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, 81: 2844-2853. 1993.

Ohbo, K., Yoshida, S., Ohmura, M., Ohneda, O., Ogawa, T., Tsuchiya, H., Kuwana, T., Kehler, J., Abe, K., Scholer, H. R. and Suda, T.: Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice small star, filled. *Dev Biol*, 258: 209-225. 2003.

Okita, K., Ichisaka, T. and Yamanaka, S.: Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448: 313-317. 2007.

Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., Shibata, T., Kunisada, T., Takahashi, M., Takahashi, J., Saji, H. and

Yamanaka, S.: A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*, 8: 409-412. 2011.

Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K. and Nagasawa, T.: The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*, 33: 387-399. 2010.

Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. and Nakauchi, H.: Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 273: 242-245. 1996.

Osawa, M., Nakamura, K., Nishi, N., Takahasi, N., Tokuomoto, Y., Inoue, H. and Nakauchi, H.: In vivo self-renewal of c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin(low/-) hemopoietic stem cells. *J Immunol*, 156: 3207-3214. 1996.

Pang, Z. P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D. R., Yang, T. Q., Citri, A., Sebastiano, V., Marro, S., Sudhof, T. C. and Wernig, M.: Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*, 476: 220-223. 2011.

Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K. and Daley, G. Q.: Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 134: 877-886. 2008.

Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W. and Daley, G. Q.: Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451: 141-146. 2008.

Schofield, R.: The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4: 7-25. 1978.

Seki, T., Yuasa, S., Oda, M., Egashira, T., Yae, K., Kusumoto, D., Nakata, H., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., Okada, Y., Seimiya, H., Fusaki, N., Hasegawa, M. and Fukuda, K.: Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*, 7: 11-14. 2010.

Sekiya, S. and Suzuki, A.: Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature*, 475: 390-393. 2011.

Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T. and Hochedlinger, K.: Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell*, 2: 230-240. 2008.

Staerk, J., Dawlaty, M. M., Gao, Q., Maetzel, D., Hanna, J., Sommer, C. A., Mostoslavsky, G. and Jaenisch, R.: Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 7: 20-24. 2010.

Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. and Nagasawa, T.: Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25: 977-988. 2006.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131: 861-872. 2007.

Takahashi, K. and Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676. 2006.

Takenaka, C., Nishishita, N., Takada, N., Jakt, L. M. and Kawamata, S.: Effective generation of iPS cells from CD34+ cord blood cells by inhibition of p53. *Exp Hematol*, 38: 154-162. 2010.

Takeuchi, M., Sekiguchi, T., Hara, T., Kinoshita, T. and Miyajima, A.: Cultivation of aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic stem cells in the fetal liver microenvironment amplifies long-term repopulating activity and enhances engraftment to the bone marrow. *Blood*, 99: 1190-1196. 2002.

Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E. and Scott, E. W.: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416: 542-545. 2002.

Tesar, P. J., Chenoweth, J. G., Brook, F. A., Davies, T. J., Evans, E. P., Mack, D. L., Gardner, R. L. and McKay, R. D.: New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, 448: 196-199. 2007.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147. 1998.

Ueda, T., Tsuji, K., Yoshino, H., Ebihara, Y., Yagasaki, H., Hisakawa, H., Mitsui, T., Manabe, A., Tanaka, R., Kobayashi, K., Ito, M., Yasukawa, K. and Nakahata, T.: Expansion of human

NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest*, 105: 1013-1021. 2000.

Utikal, J., Polo, J. M., Stadtfeld, M., Maherali, N., Kulalert, W., Walsh, R. M., Khalil, A., Rheinwald, J. G. and Hochedlinger, K.: Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature*, 460: 1145-1148. 2009.

van Dongen, J. J., Langerak, A. W., Bruggemann, M., Evans, P. A., Hummel, M., Lavender, F. L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurink, E., Garcia-Sanz, R., van Krieken, J. H., Droese, J., Gonzalez, D., Bastard, C., White, H. E., Spaargaren, M., Gonzalez, M., Parreira, A., Smith, J. L., Morgan, G. J., Kneba, M. and Macintyre, E. A.: Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, 17: 2257-2317. 2003.

Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson, K. R. and Yanagimachi, R.: Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394: 369-374. 1998.

Wakayama, T. and Yanagimachi, R.: Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev*, 58: 376-383. 2001.

Wang, J. C., Doedens, M. and Dick, J. E.: Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. *Blood*, 89: 3919-3924. 1997.

Watsuji, T., Okamoto, Y., Emi, N., Katsuoka, Y. and Hagiwara, M.: Controlled gene expression with a reverse tetracycline-regulated retroviral vector (RTRV) system. *Biochem Biophys Res Commun*, 234: 769-773. 1997.

Watt, S. M., Williamson, J., Genevier, H., Fawcett, J., Simmons, D. L., Hatzfeld, A., Nesbitt, S. A. and Coombe, D. R.: The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. *Blood*, 82: 2649-2663. 1993.

Weisel, K. C., Gao, Y., Shieh, J. H. and Moore, M. A.: Stromal cell lines from the aorta-gonadomesonephros region are potent supporters of murine and human hematopoiesis. *Exp Hematol*, 34: 1505-1516. 2006.

Weissman, I. L.: Medicine: politic stem cells. *Nature*, 439: 145-147. 2006.

Wernig, M., Lengner, C. J., Hanna, J., Lodato, M. A., Steine, E., Foreman, R., Staerk, J., Markoulaki, S. and Jaenisch, R.: A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol*, 26: 916-924. 2008.

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B. E. and Jaenisch, R.: In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 448: 318-324. 2007.

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H.: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385: 810-813. 1997.

Xu, M. J., Tsuji, K., Ueda, T., Mukoyama, Y. S., Hara, T., Yang, F. C., Ebihara, Y., Matsuoka, S., Manabe, A., Kikuchi, A., Ito, M., Miyajima, A. and Nakahata, T.: Stimulation of mouse and human primitive hematopoiesis by murine embryonic aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cell lines. *Blood*, 92: 2032-2040. 1998.

Yang, X., Smith, S. L., Tian, X. C., Lewin, H. A., Renard, J. P. and Wakayama, T.: Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet*, 39: 295-302. 2007.

Ye, Z., Zhan, H., Mali, P., Dowey, S., Williams, D. M., Jang, Y. Y., Dang, C. V., Spivak, J. L., Moliterno, A. R. and Cheng, L.: Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood*, 114: 5473-5480. 2009.

Yu, J., Vodyanik, M. A., He, P., Slukvin, II and Thomson, J. A.: Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion. *Stem Cells*, 24: 168-176. 2006.

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, II and Thomson, J. A.: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318: 1917-1920. 2007.

Zhao, Y., Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., Zhang, Q., Xiang, C., Hou, P., Song, Z., Liu, Y., Yong, J., Zhang, P., Cai, J., Liu, M., Li, H., Li, Y., Qu, X., Cui, K., Zhang, W., Xiang, T., Wu, Y., Zhao, Y., Liu, C., Yu, C., Yuan, K., Lou, J., Ding, M. and Deng, H.: Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell*, 3: 475-479. 2008.

Zsebo, K. M., Williams, D. A., Geissler, E. N., Broudy, V. C., Martin, F. H., Atkins, H. L., Hsu, R. Y., Birkett, N. C., Okino, K. H., Murdock, D. C., Jacobsen, F. W., Langley, K. E., Smith, K. A., Takeishi, T., Cattanaach, B. M., Galli, S. J. and Suggs, S. V.: Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell*, 63: 213-224. 1990.

原著論文

Nagao, K., Ohta, T., Hinohara, A., Tahara, T., Hagiwara, T., Maeda, Y., Yoneya, T., Sohma, Y., Heike, T., Nakahata, T., Inagaki, Y. and Nishikawa, M.: Expression profile analysis of aorta-gonad-mesonephros region-derived stromal cells reveals genes that regulate hematopoiesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377: 205-209. 2008.

Kunisato, A., Wakatsuki, M., Kodama, Y., Shinba, H., Ishida, I. and Nagao, K.: Generation of induced pluripotent stem cells by efficient reprogramming of adult bone marrow cells. *Stem Cells and Development*, 19: 229-238. 2010.

Kunisato, A., Wakatsuki, M., Shinba, H., Ota, T., Ishida, I. and Nagao, K.: Direct generation of induced pluripotent stem cells from human nonmobilized blood. *Stem Cells and Development*, 20: 159-168. 2011.

謝辞

本研究をまとめるにあたり、終始親切なご鞭撻を賜りました東京大学農学生命科学研究科応用生命工学専攻 依田幸司 教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文はキリンビール株式会社医薬カンパニー医薬探索研究所、キリンファーマ株式会社フロンティア研究所および協和発酵キリン株式会社フロンティア研究所で行った研究をまとめたものです。本研究を行うにあたり、直接のご指導とご鞭撻を賜りました現帝京平成大学薬学部 石田功 教授ならびに現大塚製薬株式会社 西川光郎 博士に謹んで感謝の意を表します。

また本研究のきっかけを与えて頂き、共同研究者として終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都大学 iPS 細胞研究所 中畑龍俊 教授ならびに京都大学大学院医学系研究科発生発達医学講座 発達小児科学(小児科) 平家俊男 教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究に多大なるご協力とご助力を賜りました協和発酵キリン株式会社 國里篤志 博士、田原知幸 博士、日野原敦氏、太田貴之氏、萩原哲也 博士、前田宜丈 博士、相馬良明 博士、米屋隆博士、稲垣好昌 博士、太田紀夫 博士に感謝の意を表します。また本研究を行う機会を与えてくださいました、元キリンファーマ株式会社 代表取締役社長 浅野克彦 博士、元キリンビール株式会社 医薬カンパニー 医薬探索研究所長 小梅川純一 博士に感謝の意を表します。

最後に、日頃よりさまざまなご援助とご助力を賜りました協和発酵キリン株式会社 若月真理子氏、榛葉春菜氏、平野光美氏、山田洋子氏、元キリンファーマ株式会社 俵典子氏、多胡直子氏、清水弘美氏、ほか皆様に厚く御礼申し上げます。