

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：ブタ等大型動物を利用する iPS 細胞技術の開発
2. 研究開発代表者：花園 豊（自治医科大学先端医療技術開発センター）
3. 研究開発の成果

### <目的>

造血幹細胞は血液の元になる細胞で、骨髄移植治療に使われている。ヒト iPS 細胞から造血幹細胞を作り出す研究は、現在のところ試験管内における分化誘導実験が中心であるが、試験管内の分化誘導率は必ずしも高くなく、試験管内では臓器発生や体内分化を完全には再現できていない。そこで本開発では、ヒト iPS 細胞由来の造血幹細胞を大型動物の体内で作ることを目指す。

### <結果の概要>

#### (1) iPS 細胞の培養・遺伝子操作

ブタ等大型動物での血液分化に適した iPS 細胞の培養法を開発した。すなわち、a) マウス iPS 細胞並みに（現行細胞の 2-3 倍）増殖が早く、マウス iPS 細胞並みの継代効率を実現した。b) ヒト造血初期発生をほぼ忠実に辿る培養法を開発した。また、c) ヒト iPS 細胞の安全な遺伝子操作技術を開発した。具体的には、ヒト iPS 細胞ゲノム上で発癌リスクの低い安全な部位 (AAVS1) への遺伝子導入効率 5% を実現した。

#### (2) ヒト iPS 細胞由来の血液細胞をもつ動物の作製

ヒト iPS 細胞由来の造血幹細胞をヒツジ体内で作製した。具体的には、ヒト iPS 細胞を試験管内で、ある程度血液系に分化させたあと、ヒツジ胎仔肝臓内へ移植した。胎仔期の肝臓は造血器官であり、造血に必要な環境が揃っていると考えられるからである。ヒツジ胎仔を用いるのは、こういった実験をしても流産が少ないからである。なぜ胎仔に移植するか理由は、動物胎仔の肝臓には造血に必要な環境が揃っているばかりではなく、胎仔は免疫システムが未成立のため移植細胞の免疫拒絶を回避できるからである。以上の結果、ヒト iPS 細胞由来の血液細胞をもつヒツジを得られている。現在の課題は、ヒツジ体内で作られるヒト造血幹細胞の量がまだ少ないため、体外への取り出しが難しいことである。ヒツジ体内でヒト造血幹細胞の比率を高めるため、以下の 3 つの工夫を行っている。

- a) 移植前処置：骨髄移植で行われている移植前処置を、ヒツジ胎仔への移植に応用した。すなわち、化学療法剤ブスルファンを移植前のヒツジ胎仔に投与することで、ヒツジ体内におけるヒト造血細胞の生着スペースを拡張でき、その結果、生後のヒツジ骨髄におけるヒト造血細胞の比率ならびにキメラヒツジの出現率を有意に向上させることができた。
- b) グラフトへの処置：造血幹細胞の自己複製遺伝子である *HoxB4* をヒト臍帯血由来造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) に強制発現させることで、ヒツジ体内におけるヒト造血細胞の比率を約 5 倍に上昇させることができた。
- c) 移植後処置：ヒトやサルの造血細胞に増殖効果を及ぼすヒト組換え幹細胞因子 (SCF；ヒツジには交叉しない) を、サル ES 細胞由来の造血細胞を生着したヒツジに投与することで、ヒツジ体内におけるサル造血細胞の選択的増幅を試みた。その結果、一時的ではあるが、ヒツジ骨髄中でのサル造血細胞の比率を最大 10% 前後まで向上させることができた。

### <今後の展望>

本開発により、動物体内でヒト iPS 細胞由来の造血幹細胞の生産が可能となれば、将来、骨髄・臍帯血に次いで、動物が造血幹細胞の第三の移植源になることが期待できる。