

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題  
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) ブタ等大型動物を利用する iPS 細胞技術の開発  
(英語) Development of iPS-cell technology using large animals

研究開発担当者 (日本語) 自治医科大学 先端医療技術開発センター センター長・教授 花園 豊  
所属 役職 氏名： (英語) Yutaka Hanazono, MD, PhD, Director and Professor, Center for Development  
of Advanced Medical Technology, Jichi Medical University

実施期間： 平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月 31日

分担研究 (日本語) ヒト iPS 細胞由来の血液細胞をもつ動物の作製  
開発課題名： (英語) Generation of sheep having human hematopoietic cells derived from iPS cells

研究開発分担者 (日本語) 自治医科大学 先端医療技術開発センター 幹細胞・創薬基盤研究部門  
助教 阿部朋行  
所属 役職 氏名： (英語) Tomoyuki Abe, PhD, Research Associate, Division of Stem Cell Research  
and Drug Development, Center for Development of Advanced Medical  
Technology, Jichi Medical University

II. 成果の概要 (総括研究報告)

・ 研究開発代表者による報告の場合

<和文>

我々は、動物体内でヒト iPS 細胞由来の血液細胞、特に造血幹細胞を作製することを目指している。これまでに、ヒツジ骨髄内にヒト臍帯血造血幹細胞を生着させることに成功している。この系を応用して、ヒツジ胎仔肝臓を利用してヒト iPS 細胞から造血幹細胞の作製を試みた。

ヒト iPS 細胞を OP9 細胞とサイトカイン存在下で 6 日間培養し、移植に用いた。陽性対照群として、臍帯血（理研 BRC）由来の CD34 陽性細胞を用いた。それぞれの細胞は、移植 6 日前にブスルファンで前処置したヒツジ胎仔（胎齢 47-63 日、満期 147 日）の肝臓内に移植した（ヒト iPS 細胞移植群  $n=7$ , 臍帯血移植群  $n=6$ ）。その後、ヒト iPS 細胞移植群の一部の胎仔から肝臓および骨髄を採取し、免疫染色によって移植細胞の性状を観察した。また、満期に自然分娩した後、仔ヒツジから骨髄を経時的に採取し、造血コロニー PCR 法を用いてヒツジ骨髄中の全造血前駆細胞中に占めるヒト造血前駆細胞の割合（ヒト造血比率）を求めた。

試験管内での分化培養では、造血系への本来の発生を再現するように、Brachyury、Etv2、Scl や Runx1 などの転写因子が波状に発現し、PDGFR $\alpha$  や CD34 などの細胞表面抗原が順を追って発現したが、培養期間を延長しても血液細胞マーカー CD45 は発現しなかった。移植 1-2 ヶ月後、移植細胞の一部は胎仔肝臓内で CD45 陽性となり、骨髄内への移行が観察された。移植 3 ヶ月後（出生後）、ヒト iPS 細胞移植群では 7 頭中 4 頭の産仔が得られ、そのヒト造血比率は 2.3-6.3% だった。一方、臍帯血移植群では 6 頭中全例で産仔が得られ、ヒト造血比率は 1.1-2.3% だった。1% のヒト造血比率の獲得に必要な CD34 陽性細胞数を算出すると、両群ともほぼ同数の細胞数が必要という結果から、ヒト iPS 細胞由来造血細胞は臍帯血 CD34 陽性細胞と同等の造血生着能をもつことが示された。また、ヒト iPS 細胞由来造血細胞は、現在、移植 26 ヶ月という長期間にわたってヒツジ骨髄中に維持されていることから、自己複製能をもつことが示唆された。以上より、ヒツジ胎仔肝臓内を介して、ヒト iPS 細胞を造血細胞へ分化させることに成功した。

<英文>

Generating definitive and engraftable human hematopoietic stem cells (HSCs) from pluripotent stem cells (PSCs) has been a major challenge in hematology. We have tried to generate such cells from human iPSCs. To this end, we tried to differentiate human iPSCs to HSCs on murine stromal OP9 cells with multiple cytokine milieu. The hematopoietic transcriptional factors Brachyury, Etv2 and Runx1, and the surface markers PDGFR $\alpha$  and CD34 expressed during the differentiation as time went on, recapitulating the mouse *in vivo* hematopoietic development. However, the hematopoietic essential marker CD45 failed to express over even further extended culture period. Therefore, we hypothesized some key environmental factors are missing *in vitro*, thus limiting hematopoietic differentiation from iPSCs. To test this hypothesis, we transplanted human iPSC-derived intermediates at day 6 of the *in vitro* differentiation into the liver of busulfan-conditioned fetal ovine (day 47 - 63, full term 147 days). On day 6, the expression of Etv2 was just about to decline, Scl expresses at the highest level, and Runx1 was just about to express. At 1 - 2 months post-transplantation, the transplanted cells expressed CD45 in the fetal liver. Notably, human CD45<sup>+</sup> cells were also observed in the bone marrow of the fetuses,

suggesting that the transplanted cells were homing from the fetal liver to the bone marrow, which occurs during normal development. At 3 months post-transplantation, when the transplanted ovine was born, human CFUs were detected in the bone marrow of the lambs at levels of 2.3% to 6.3% ( $n = 4$ ) and they were still detectable at 2 years post-transplantation. Considering that many researchers have long failed to generate human iPSC-derived engraftable HSCs *in vitro*, the data here imply that the *in vivo* microenvironment such as in the fetal ovine liver is required for the acquisition of long-term hematopoietic engraftment ability of human iPSC-derived HSCs. Molecules responsible for the hematopoietic engraftment remain to be elucidated.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ヒト iPSC 細胞由来造血細胞のヒツジ体内での長期生着，口頭，阿部朋行，柴田宏昭，魚崎英毅，原弘真，大貫貴広，ボラジギン・サラントラガ，福森理加，長尾慶和，花園豊，第 19 回日本異種移植研究会，2017/2/25，国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

1. PCT/JP2016/075743