

ヒト胚性幹細胞、ヒト誘導型多能性 幹細胞からの血液細胞誘導

高山 直也

目次

1. 略語表

2. 緒言

3. カニクイザル及びヒト胚性幹（Embryonic Stem: ES）細胞からの機能性血液細胞誘導法の確立

3-1. 緒言

3-2. 材料と方法

3-3. 結果

3-4. 考察

4. ヒト誘導型多能性幹（Induced Pluripotent Stem: iPS）細胞の樹立と血液細胞誘導法の確立

4-1. 緒言

4-2. 材料と方法

4-3. 結果

4-4. 考察

5. 謝辞

6. 参考文献

7. 図表

1. 略語表

ADP adenosine diphosphate

APC allophycocyanin

EB embryoid body

ES Embryonic stem

F-actin fibrous actin

FBS fetal bovine serum

FITC fluorescein isothiocyanate

GFP green fluorescence protein

GP glycoprotein

HLA Human Leukocyte Antigen

HRP horse radish peroxidase

IL interleukin

iPS induced pluripotent stem

PBS Phosphate-buffered saline

PFA paraformaldehyde

PCR polymerase chain reaction

PE phycoerythrin

RT-PCR reverse transcriptase-PCR

SM Staining Medium

2. 緒言

胚性幹（embryonic stem: ES）細胞とは着床前の胚盤胞中の内部細胞塊から樹立した細胞株で、未分化状態を維持したまま半永久的に培養することが可能であり、すべての細胞に分化する全能性を有している¹。マウス ES 細胞を胚盤胞内へ戻すと、マウス ES 細胞と内部細胞塊が混ざり合った状態で発達し、宿主由来の細胞と ES 細胞由来の細胞が混在するキメラマウスを作成することができる。さらに生殖細胞系列が ES 細胞由来の細胞に置き換わったマウスを交配することで個体すべての細胞が ES 細胞由来となったマウスの系統を樹立することも可能である²。1981 年のマウス ES 細胞の樹立以降、遺伝子操作を組み合わせることで、遺伝子の欠損マウスや組み換えマウスを作成する実験が進み、様々な遺伝子の機能が明らかになってきた。さらに ES 細胞は生体外で様々な細胞、組織へ分化することができる。この ES 細胞の多能性および遺伝子操作の容易さは、組織発生・個体発生の基本的な生物現象を遺伝子レベルで理解する上で役立つばかりではなく、変性疾患や、癌、遺伝病における細胞代償療法への応用に向けた限らない可能性を示している。

血液学の分野においては、血液細胞発生初期の機序を解明し、成熟した血液細胞を誘導する方法を見出すための多くの基礎研究がマウス ES 細胞を用いて行われてきた。一方で、1998 年にヒト ES 細胞が樹立されたことによって³、ヒト ES 細胞から生体外で分化誘導した細胞を用いた血液疾患患者への治療はいっそう現実味を増してきた。

しかし、ES 細胞由来の細胞を移植治療のソースとして用いる場合にはいくつかの問題点がある。第一に現在移植治療で問題となっているように、レシピエントとドナーのヒト白血球型抗原（Human Leukocyte Antigen; HLA）が異なれば免疫学的拒絶を受けてしまうため、核移植等の

技術を用いて、レシピエントと同じ HLA を持った ES 細胞を樹立しなければならないという点である。もう一点は、ES 細胞の持つ高い増殖能と多分化能のために、三胚葉系（外胚葉；神経細胞など、中胚葉；心筋・血液細胞など、内胚葉；肝細胞・膵細胞など）の細胞成分が無秩序に混在した腫瘍であるテラトーマ（奇形腫）を形成する能力を持ち合わせている点である。この為、移植細胞に ES 細胞が残存していると将来的に腫瘍化する可能性が懸念される⁴。以上のような背景から、私は現段階で最も臨床応用が近いヒト ES 細胞を用いた細胞療法のソースの一つとして、血小板に注目した。

血小板は生体内のホメオスタシスを保つ為に必須の無核の機能細胞である。各種悪性腫瘍に対する抗がん剤治療、骨髄移植後の致命的な血小板減少、先天性血小板減少症の大量出血時に対しては、血小板輸血が現段階の唯一の対症療法であるが、これらは現在全て献血に依存している^{5,6}。しかも、血小板は赤血球等他の血液細胞と比較すると寿命が最大約7日、献血後の濃厚血小板の使用期間は4日間と短く、冷蔵保存も不可能である為、慢性的な血小板製剤不足に悩まされている⁷。血小板の大きな利点は無核の細胞であるため、遺伝情報が永久に保存されることがなく、さらに残存する有核細胞を取り除く為に輸血前に放射線照射を行うことも可能⁸であり、ES 細胞を移植医療へ応用する際の問題点である腫瘍化の可能性を考慮する必要がないという事である。また抗血小板抗体を保持している特殊な患者以外では、HLA の一致を考えずに輸血が可能である。以上の利点、臨床的な需要の高まりを考慮すると ES 細胞から分化誘導した血小板は、現段階において ES 細胞由来の細胞療法として実現度が高いと思われる。マウス ES 細胞からは既に血小板の前駆細胞である巨核球及び、その最終分化形態である血小板へ誘導する系が確立された⁹⁻¹²。このシステムでは試験管内で未分化な ES 細胞から中胚葉系の細胞

へ分化を経て、血球前駆細胞、巨核球、さらにその終末分化細胞である血小板へと分化する一連の発生過程を観察することが可能である。さらに、試験管内で ES 細胞から分化誘導した血小板様断片が試験管内で薬物刺激により活性を示すことが明らかとなった。

また、この報告では ES 細胞の遺伝子操作の簡便性を利用して、機能改変血小板を作成することにより、この実験系が遺伝子機能解析のツールとしても有用であることを示した。核を持たない血小板レベルでの遺伝子操作は不可能である為、血小板における標的遺伝子の機能解析には、トランスジェニックマウスやノックアウトマウス等の遺伝子改変マウスをまず作製し、そこから得られた血小板を利用して解析を行なうのが一般的であったが、ES 細胞を用いれば試験管内で遺伝子改変血小板を分化誘導し、比較的簡便に機能解析が行なえる事から、実験モデルとしての有用性も注目された¹³。

当然臨床応用に向けてはヒト ES 細胞から血小板を誘導しなければならないがマウス以外の ES 細胞から血小板の誘導に成功した報告はこれまでに成されていなかった。Gaur らは Wisconsin 大学で樹立されたヒト ES 細胞株 H9 より、従来のマウス ES 細胞から血小板を誘導する方法と同様に OP9 細胞との共培養法を用いて巨核球を誘導することに成功した¹⁴が、血小板の産生は確認できなかった。そこでまず初めに私はヒト ES 細胞を利用した再生医療の実現へ向けて、ヒト ES 細胞から血小板を試験管内で産生する系を構築することを目指した。しかし一方で、臨床応用に際しては懸念事項が存在した。

血小板輸血に関して臨床の現場で問題となるのは、Bernard Soulier 症候群、先天性無巨核球形血小板減少症、血小板無力症、再生不良性貧血など生涯にわたり血小板輸血の頻度が高い患者が、血小板輸血の度に血小板に発現している同種 HLA による感作を受けて、血小板に対す

る抗体を産生し、血小板輸血不応性になってしまう事である¹⁵。一度 HLA に対する抗体ができてしまうと、献血時にレシピエントと同じ HLA を持つドナーからの献血製剤しか有効で無くなってしまふ。血小板輸血を繰り返す患者にとっては、ヒト ES 細胞から十分量の血小板製剤が産生できても、単一の ES 細胞由来の血小板では早晚無効になる可能性が高い。そのためには患者と HLA が一致したヒト ES 細胞またはそれに準ずる能力のある細胞を樹立していかなければならない。

しかし近年マウス及びヒトの皮膚細胞に複数の遺伝子を導入することで ES 細胞と非常に類似した多能性で増殖能の高い細胞（誘導型多能性幹細胞；iPS 細胞）を誘導できるとする非常に画期的な報告がなされた^{16 17 18 19}。この方法を用いれば、患者本人と同一の HLA を持つ多能性細胞が樹立可能で、ヒト ES 細胞樹立に伴う倫理的な問題点を回避できる。iPS 細胞の樹立は現段階ではレトロウイルスを用いて細胞初期化遺伝子を導入しているため、腫瘍化の可能性を排除できない。事実 iPS 細胞から作製したキメラマウスの多くで再活性化を起こした c-Myc による固形癌の発生が報告され、問題提起された¹⁷。しかし、低分子化合物²⁰、蛋白による導入、ゲノムに組み込まれないウイルスによる iPS 細胞の作成など加速的に研究が進んでおり、近い将来臨床応用可能な安全なヒト iPS 細胞が樹立されると思われる。

このような背景のもと、私は以下の2つの命題を課題とした。

①将来的に安定した血小板製剤の供給を目指し、いまだ成功していないヒト ES 細胞から、血小板を産生する系を確立する、②免疫学的な拒絶を受けにくい献血ソースとして、患者個人または患者と同一の HLA を持つドナーからヒト iPS 細胞を樹立して、献血ソースとなる血小板、赤血球などを産生できる系を樹立する

以上の2つの命題の解決を目指して私は研究を開始した。

3. カニクイザル及びヒト胚性幹 (Embryonic Stem: ES) 細胞からの機能性血液細胞誘導法の確立

3-1. 緒言

血小板減少症に対して現段階では血小板輸血が唯一の治療法である。しかし、過去には血小板減少症に対して、体性幹細胞である骨髓造血幹細胞や臍帯血造血幹細胞を用いて、試験管内で血小板を誘導する試み²¹や体内に血小板産生促進因子のトロンボポエチン (TPO) を投与して血小板産生を促す試みがなされてきた²²。しかし、現状ではそもそも造血幹細胞自体を体外増幅することは困難であるため、造血幹細胞から試験管内で輸血に必要な量の血小板産生を完成させることは難しい。また TPO の生体への投与は、TPO に対する中和抗体が産生され、失敗に終わった。

一方 ES 細胞の大きな利点は *in vitro* で半永久的に増殖可能であり、体性幹細胞で問題となる増殖制限が無く、ドナー不足の問題を解消できる点にある。1981 年にマウス ES 細胞が樹立されて以来、多くの施設で ES 細胞から血液細胞を誘導する方法が試みられてきた (表 1)。

ES 細胞から血液細胞を分化誘導するには主に 2 つの異なる実験方法が用いられてきた。ひとつは胚様体 (Embryoid body: EB) 形成法である²³。この方法は 1985 年にマウス ES 細胞から初めて血球を分化させた方法として報告された。ES 細胞の未分化性を維持するのに必要なサイトカイン、成長因子や支持細胞を取り除き、適切な培地で浮遊培養を行うことで ES 細胞は EB を形成する。EB は嚢胞性の構造を示し、内部に外胚葉、中胚葉、内胚葉いずれもの細胞系譜が出現する。マウス ES 細胞の場合、10 日目ごろ EB の周囲に赤血球塊、すなわち血島を観察することができ、その中から赤血球および骨髓球が出現する。分化した血液細胞が観察される一方、

長期骨髄再建能を持つ成体型造血幹細胞を同定することは困難であり、胚様体が胚形成のごく初期過程を *in vitro* で再現している可能性を示唆する。

ES 細胞から血液細胞を分化誘導する代表的な他の方法はストロマ細胞との共培養法である。ストロマ細胞とは骨髄などの間質に由来する細胞株で、様々なサイトカインを発現し造血を支持することができる。最も一般的に使われるストロマ細胞株は OP9 である^{9,24}。骨大理石病の疾患モデルマウスである *op/op* マウスはマクロファージコロニー刺激因子の遺伝子異常を有しており、このマウスの新生児の頭蓋冠から樹立された細胞株 OP9 は造血に抑制的に働く単球やマクロファージ細胞の出現を抑制する。この OP9 細胞上で共培養したマウス ES 細胞は適切なサイトカインを投与することで赤血球、巨核球、血小板、骨髄球、NK 細胞および B 細胞を効率よく産生することが確認されている(表 1)。また、*Notch* リガンドのひとつである *Delta-1* を発現させた OP9 上で T 細胞を分化させられることも報告された²⁵。一連の報告により、サイトカインと OP9 ストロマ細胞との共培養法の適切な組み合わせが目的とする終末分化血液細胞を ES 細胞から比較的容易に得ることができることが示された。

マウス ES 細胞によって確立された分化誘導法はヒト ES 細胞の分化誘導法の開発において重要な手掛かりを提示するが、マウスとヒトによる種間の差異も大きいことが予想される。未分化状態の ES 細胞でもマウスとヒトでは形態、未分化維持に必要な増殖因子や細胞表面マーカーなど異なっているところが多く存在する³。

ヒト ES 細胞においても血球分化法として、EB 形成法やストロマ細胞との共培養法が用いられ、赤芽球、好中球、マクロファージ、NK 細胞、T 細胞、B 細胞など多系統の血液細胞の誘導が報告されてきている(表 2)。

巨核球/血小板への分化誘導に関しては、マウス ES 細胞を用いて確立された系をもとに、Gaur らは OP9 ストロマ細胞とヒト ES 細胞株 H9 との共培養法により血小板産生細胞である巨核球までは誘導できることを報告していた¹⁴。しかし彼らの報告ではヒト ES 細胞 1 つあたりから産生される巨核球数は少なく、さらに血小板放出は確認されなかった。培養期間や必要なサイトカイン、共培養に用いる細胞などヒトとマウスでは異なることが予想され、血小板放出まではさらなる条件の検討が必要であることが予想された。

そこでまず私はヒト ES 細胞から巨核球の誘導を目指し、京都大学で樹立されたヒト ES 細胞株 (KhES1,2,3)²⁶ を用いて H9 細胞株と同じ方法を試みたが、報告とは異なり巨核球への優先的な分化は観察できなかった(データは示さない)。一方、梅田らはヒトと同じ霊長類であるカニクイザル ES 細胞株 (CMK6) からの成体型赤血球分化に OP9 細胞と血管内皮増殖因子 (VEGF) の組み合わせが重要であると報告した²⁷。更に寛山らは、CMK6 を VEGF 存在下でマウス間葉系細胞株 10T1/2 との共培養を行うと、浮遊細胞の中にコロニー形成能の高い血液前駆細胞が含まれていることを報告した²⁸。

そこで私は以上の先行研究の知見をもとに、培養期間、ストロマ細胞株、増殖刺激因子の組み合わせに注目して、カニクイザル及びヒト ES 細胞から血小板誘導を試みた。

3-2. 材料と方法

3-2-a. 細胞株と試薬

別記したもの以外の試薬は、全て Sigma-Aldrich 社より購入した。ヒト ES 細胞株は京都大学で樹立された KhES-1,2,3 を京都大学 再生医科学研究所 末盛 博文博士より供与して頂き、実験には 50 継代以内で使用した。実験は東京大学の倫理委員会の承認を得た後に、ヘルシンキ宣言を遵守して行った。カニクイザル由来 ES 細胞株 (CMK6) はつくば理化学研究所から購入し、60 継代数以内で使用した。

リコンビナントヒト血管内皮増殖因子 (VEGF)、リコンビナントヒト胎盤増殖因子 (PIGF)、リコンビナントヒト骨形成蛋白-4 (BMP4) は R&D systems 社 (Minneapolis, MN, 米国)、リコンビナントヒトインスリン様増殖因子-II (IGF-II)、リコンビナントヒト幹細胞因子 (SCF)、リコンビナントヒトロンボポエチン (TPO)、リコンビナントヒトインターロイキン-6 (IL-6)、リコンビナントヒトインターロイキン-11 (IL-11)、リコンビナントヒト fms 様チロシンキナーゼリガンド (Flt3-L) は Peprotech 社 (Rocky Hill, NJ, 米国) より購入した。ヘパリン酸ナトリウムは味の素社 (日本) より購入した。ローダミン-ファロイジンは Invitrogen/Molecular Probes 社 (東京, 日本) のものを使用した。ヒトフィブリノゲンは、American Diagnostica 社 (Greenwich, 米国) のものを使用した。抗ヒト CD9-PE 抗体、CD31-PE、-unconjugated 抗体、CD34-APC、-PE 抗体、抗ヒト CD38-APC 抗体、抗ヒト CD41a (インテグリン α IIb)-Unconjugated、APC 抗体と、抗ヒト CD42a (GPIX)-FITC 抗体、抗ヒト CD42b (GPIIb β)-PE 抗体、抗ヒト CD45-Alexa405 抗体、抗ヒト VE-Cadherin-Unconjugated 抗体、抗ヒト VEGF-レセプター2 (VEGF-R2) -APC 抗体は Pharmingen 社 (La Jolla, 米国) のものを用いた。GM6001 は Calbiochem 社 (San Diego, 米国) より入手した。PAC1 (抗ヒト活性化型

CD41a/61)-FITC 抗体は BD Biosciences 社 (San Jose、米国) のものを用いた。抗ヒト c-MPL 抗体は株式会社キリンより供与して頂いたものを用いた。阻害型抗 VEGF 中和抗体 (Bevacizumab) は Roche 社 (Basel、スイス) より購入した。ヒトインテグリン α II β 3 特異的阻害剤ティロフィバンは Merck 社 (Whitehouse Station、NJ、米国) より購入した。

3-2-b. 細胞培養

ヒト ES 細胞は 20 %KSR (Invitrogen, 米国)、0.1 mM 非必須アミノ酸 (NEAA; Invitrogen/GIBCO 社 日本)、0.11 mM 2-メルカプトエタノール (GIBCO)、2 mM L-グルタミン (GIBCO)、5ng/ml リコンビナントヒト線維芽細胞増殖因子 (bFGF) (Upstate、Lake Placid、NY、米国) を添加した DMEM/F12 Ham を用いて培養した。ヒト ES 細胞は 50Gy の放射線照射し、増殖を止めた ICR マウス由来胎児繊維芽 (MEF) 細胞上で培養を行った。培地は毎日交換し、未分化状態を維持するため 4 日おきに継代し、2%CO₂ インキュベーター内部で培養した。継代時は PBS に 0.25 % トリプシン、1mM 塩化カルシウム、20%KSR を添加した細胞剥離液を用いて、コロニーを細かく砕いた後に、全体量の 1/5~1/3 量 (1:3-1:5) を MEF 上に播種した。

カニクイザル ES 細胞株 (CMK6) は培地に bFGF を添加しない事以外はヒト ES 細胞と同様の培養条件で維持した。

マウス C3H10T1/2 細胞株は理研 BioResource Center より購入した。Eagle Basal Medium (Invitrogen) に 10%FBS (Invitrogen)、2 mM L-グルタミンを添加した培地を用いて培養した。継代は 3 日おきに全体量の 1/8 (1:8) で行った。細胞の形質を変化させない為に、購入後継代数 15 回以内の細胞を実験に用いた。

OP9 細胞は 15 %FBS、2 mM L-グルタミンを添加した α -Minimum Essential Medium

(α -MEM; GIBCO) で継代培養した。培地は一日ごとに交換し、細胞の形質を変化させない為に、初代培養から継代培養数 30 回以内の細胞を実験に用いた。

3-2-c. ES-sac を介したヒト ES 細胞からの血液前駆細胞誘導

細胞株は京都大学で樹立された KhES-1,2,3 を使用した。これら 3 つの細胞株はいずれも血液分化は可能であるが予備実験の段階で KhES-3 が最も血液コロニー形成能及び血小板産生効率が良かったので主に KhES-3 細胞株を実験に用いた。分化実験の 3-4 日前にヒト ES 細胞を同じ細胞数になるように 6cm 培養皿 2 枚に継代した。ヒト ES 細胞は単一細胞にすると、生存率、増殖能、血液分化能が落ちることを確認していたため、同じ細胞数で用意した 6cm 培養皿の 1 枚は細胞数計測に使用した。0.25%トリプシン-EDTA を用いて細胞を単一分離し、トリパンプルで生細胞数を計測した。もう一枚のヒト ES 細胞培養皿に細胞剥離液 (PBS に 0.25 % トリプシン、1mM 塩化カルシウム、20%KSR を添加した液) 1ml 加え、37°Cにて 5 分間インキュベートした。培養皿よりヒト ES 細胞を剥がしてコロニーのまま細胞を調節した。ヒト ES 細胞の分化メディウムは、15%FBS (Collect gold; ICN Biomedicals, Aurora, NY, 米国)、10 μ g/ml インスリン、5.5 μ g/ml ヒトトランスフェリン、5ng/ml 亜セレン酸ナトリウム、2mM L-グルタミン、0.45mM モノチオグリセロール、50 μ g/ml アスコルビン酸を Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) に添加したものを基本培地とし、各種サイトカインを添加して培養した。

実験には以下のプロトコールを比較した (図 1)。プロトコール 1 は既に Gaur らが 2006 年に報告した手法で、ヒト ES 細胞株 H9 を用いて巨核球の誘導に成功しているが、血小板放出は確認できなかった方法である。

プロトコール 1: 前日ゼラチンコートした 10cm 培養皿に 7 \times 10⁵ で OP9 細胞を播種した。OP9 細

胞は薬剤や放射線照射などによる増殖阻害を行わずに用いた。翌日 OP9 細胞上にヒト ES 細胞を数百個からなるコロニーで播き、TPO 100ng/ml 存在下で培養を行った。細胞が過増殖とならないように、培養 7 日目、11 日目に新たに用意した OP9 細胞上に播き直し、15-17 日目に巨核球及び血小板の解析を行った。さらにこの手法を基本にサイトカインを TPO に加え SCF、IL-6、IL-11 を添加して比較した。

プロトコール2: 前日 50Gy 放射線照射し増殖を止めた OP9 細胞株または 10T1/2 細胞株をゼラチンコートした 10cm 培養皿に 7×10^5 細胞数で播種し、フィーダー細胞として用いた。

培養 14-15 日目まで ES 細胞が過増殖状態にならないように、細胞数が $5-10 \times 10^4$ /10cm 培養皿となるようにフィーダー細胞上に播種した。培養 14-15 日まで播きなおしを行わず、培地を 9 日目までは 3 日毎、9 日目から 15 日目までは 2 日毎に交換した。血液前駆細胞は、培養 7 日目、10 日目、15 日目の浮遊細胞と、培養 14-15 日目に出現する嚢状構造体内部の血液前駆細胞をそれぞれ新たに用意したフィーダー細胞上で培養して比較した。嚢状構造体は顕微鏡下で血球様細胞の存在を確認した上で、ピペット (P1000) を用いて回収した。ピペッティングを繰り返すことで機械的に嚢状構造体を崩し、40 μ m セルストレイナーを通して、内部の血液前駆細胞のみを回収した。

前日 6 ウェルプレート 1 枚に 7×10^5 細胞の濃度で播いた 10T1/2 細胞株または OP9 細胞株上にヒト ES 細胞由来の血液前駆細胞を 3×10^5 個/ウェルで播いた。分化用培地に SCF、TPO、IL-6、IL-11、ヘパリン酸ナトリウムを添加して血小板産生効率の高い組み合わせを比較した。播き直した後、3、5、7、9、11、13 日目に 2ml 培地を捨て、新たな培地を 2ml 加えた。サイトカインは 4ml 分を加えた。血液前駆細胞播種後、5、7、9、11、13 日目に巨核球数、血小板数をあらかじめ既知数

のマイクロビーズが含まれている True Count Tube (BD Bioscience、米国) に混合して、FACS Aria を用いて細胞数を計測した。DMSO で溶解したメタロプロテアーゼ阻害剤 (GM6001) は血小板回収の 2 日前に添加した。

3-2-d. コロニーアッセイ

ES-sac 内部の血液前駆細胞を上記方法で回収した。接着系の細胞も多く含まれ、血球コロニー形成を阻害するため、新たに用意したフィーダー細胞上で SCF、TPO、Flt3-L 各 50ng/ml 存在下で 24 時間培養し、接着細胞をフィーダー細胞に張り付け、上清のみを回収することで、血球細胞のみを回収した。1×10⁴ 細胞を Methocult H4434+TPO 50ng/ml 1.5ml で懸濁し、35mm 培養皿にまいた。37°C、5%CO₂ インキュベーターで培養を行い、コロニー数は 14 日目に観察した。コロニーを一つずつ 96 穴プレートに回収し、サイトスピン後、Hemacolor (Merck、Darmstadt、ドイツ) を用いてギムザ染色を行い、形態を顕微鏡で観察した。

3-2-e. ES-sac の免疫染色と切片、フローサイトメーターによる解析

ES-sac の免疫染色は培養 14 日目に行った。100%メタノールで固定後、0.1%Tween 20 入りの PBS で洗浄し、抗体の非特異的結合を防ぐため 5%ヤギ血清を用いてブロッキングを室温で 20 分行った。抗ヒト CD31 抗体及び抗ヒト VEGF-R2 抗体、UEA-I レクチン-FITC は 1:100 の濃度で、4°C、16 時間反応させた。洗浄後、2 次抗体 (抗マウス IgG-PE) を 1:500 の濃度で室温、1 時間反応させることで染色させた。観察には Leica DM IRBE (Leica Microsystems、Wetzlar、ドイツ) を用いた。

ES-sac 内部の構造を観察するため、ES-sac を 15%ホルムアルデヒドで固定後、パラフィンに包埋した。2mm 厚の切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した。UEA-I レクチン染

色は、ビオチン化 UEA-I レクチン (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, 米国) を 1:100 で 16 時間、4°C で反応後、ペルオキシダーゼ-ストレプトアビジン (ニチレイ、日本) を室温 30 分で反応させ、染色した。観察には ECLIPSE50i (Nikkon、日本) を用いた。

ES-sac 内部の血液前駆細胞は回収し、3%FBS 入りの PBS で $1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ に調節した。抗ヒト CD31-PE、CD34-FITC、CD41a-APC、CD45-Alexa405、VE-cadherin、VEGF-R2-APC 抗体で氷上、遮光で 30 分染色した。3%FBS 入りの PBS 2ml を加えて洗浄後、遠心にて上清を吸引除去した。Propionium Iodide (PI) を加えた 3%FBS 入りの PBS 300 μl で再懸濁し、FACS Aria を用いて表面抗原を解析した。

3-2-f. フローサイトメーター、免疫染色を用いた巨核球表面マーカーの確認

培養 23 日目 (ES-sac よりまき直して 8 日目) の浮遊細胞をチューブに回収し、440g、5 分間遠心した。上清を吸引除去後、3%FBS 入りの PBS で懸濁し、細胞を $1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ に調節した。抗 CD41a (integrin αIIb subunit)-APC 抗体 5 μl 、抗 CD42b (glycoprotein Ib α)-PE 抗体 5 μl 、抗 CD42a (glycoprotein IX)-FITC 抗体 5 μl 、抗 CD9-PE 抗体を加え、30 分間氷上、遮光で反応させた。3%FBS 入りの PBS 2ml を加えて、440g、5 分間遠心後上清を捨てた。PI を加えた 3%FBS 入りの PBS 300 μl で懸濁して、フローサイトメーターで解析した。

巨核球の免疫染色は、以下の方法で行った。12well プレートにフィブリノゲン固層化したスライドグラスを入れ、その上に血清を含まない DMEM 培地で巨核球を 16 時間、インキュベーターで培養し、スライドグラス上に張り付けた。2%PFA で固定後、抗ヒト CD41a 抗体 1:50 で 1 時間反応を行い、その後二次抗体-Alexa488 1:500 で 1 時間反応させることで染色を行った。DAPI を加えて、Leica TCS SP2 AOBS (TCS SP2, Leica Japan, 日本) で観察した。

3-2-g. フローサイトメーターを用いた血小板解析

細胞上清を 15ml チューブに回収し、さらに PBS 1ml を培養皿に加えて洗い、同じ 15ml チューブに回収した。ACD 液（最終濃度 8.5 mM クエン酸ナトリウム, 6.5 mM クエン酸, 10.4 mM グルコース）を 1/10 量加え、血小板の活性化及び凝集を抑制した。均一になるように転倒混和して、200 μ l を FACS チューブに入れた。抗ヒト CD41a-APC 抗体 5 μ l を加え、室温、遮光で 30 分間反応させた。血小板懸濁液をあらかじめ個数が分かっている True Count Tube（BD Bioscience、米国）に入れ、均一に混ざるように混和した。フローサイトメーター上では、血小板は他の血球細胞と大きさにより容易に分離することができる¹¹。血小板用のゲートは、ヒト末梢血由来の血小板を用いて決定した後、ES 細胞由来の CD41a 陽性マイクロパーティクルを FACS Aria（BD）を用いて解析した。

3-2-h. 半定量 RT-PCR

RNA を $2-5 \times 10^4$ 個の細胞から TRIzol Reagent (Invitrogen、米国) で抽出し、cDNA への逆転写反応を ThermoScript RT-PCR System Kit (Invitrogen) で行った。GAPDH を用いて標準化した cDNA を用いて半定量的 RT-PCR を行った。遺伝子発現を同定するために用いたプライマーは表 3 の通りである。PCR の反応条件は、変性 95 °C 15 秒、会合 57 °C 15 秒、伸長 72 °C 30 秒を 30 から 40 サイクル行った。

3-2-i. ヒト ES 細胞由来血小板のインテグリン活性化能の測定

細胞上清を回収し、ACD 液を 1/10 量になるように加え、血小板の自然凝集を抑制した。900rpm (150g)、10 分間、ブレーキなし条件で遠心し、有核細胞と血小板を比重により分離した（このステップでは有核細胞成分は沈殿となり、血小板成分はに上清中に残る）。血小板が含ま

れた上清を新たなチューブに入れ、1500rpm (400g)、10 分間、ブレーキなし条件で遠心し、血小板を沈殿させた。ペレットは、Tyrode-Hepes 緩衝液 (pH 7.4, 10 mM HEPES, 12 mM 炭酸水素ナトリウム, 138 mM 塩化ナトリウム, 5.5 mM グルコース, 2.9 mM 塩化カリウム, 1 mM 2 塩化マグネシウム, 1mM 塩化カルシウム) で、再溶解し実験に用いた。ES 細胞由来血小板のインテグリン α IIb β 3 の活性化能を評価する為、活性化型 CD41a/CD61 (インテグリン α IIb/ β 3) 複合体を特異的に認識し結合する PAC1 抗体²⁹を用いて、個々の血小板のインテグリン活性化能を調べた。50 μ l のサンプル液を抗ヒト CD42b 抗体 5 μ l と PAC1-FITC 10 μ l を添加した上で血小板の主な生理的活性化物質の一つである Adenosine diphosphate (ADP) で刺激を加え 15 分室温で反応させた。刺激に反応した ES 細胞由来血小板の PAC1 に対する結合度は、FACS Aria を用いて Mean Fluorescence Intensity (MFI) で評価した。非特異的 PAC1 抗体結合は、最終濃度 10 μ M の CD41a/CD61 特異的阻害剤ティロフィバンを血小板に 15 分間反応させたサンプルで計測した。

血小板はインテグリン α IIb/ β 3 の活性化に引き続き、細胞骨格を起こし安定した血栓を形成するので、次にヒト ES 細胞由来血小板の骨格変化 (Outside-in signaling) を観察した。100 μ g/ml のフィブリノゲンを固層化したスライドガラス上で ES 細胞由来血小板を最終濃度 1 U/ml のトロンビンまたは 50 μ M の ADP で、45 分間刺激した後、4 % PFA で固定した。抗体の非特異的結合を防ぐため、10 % のヤギ血清と 30 分間反応させた後、ローダミン-ファロイジンと、抗ヒト CD41a 抗体/2 次抗体; 抗マウス IgG-Alexa488 で染色し、最後に混入した小型の有核細胞を識別する為に、VectaShield (DAPI 添加済み、Vector laboratories、米国) を加えスライドガラスを作成した。観察は共焦点顕微鏡 (TCS SP2, Leica Japan, 日本) で行なった。

3-2-j. 透過型電子顕微鏡

ES 細胞由来血小板の超微細構造を観察する為、次のような過程で電子顕微鏡により観察を行なった。ES 細胞由来血小板の沈殿を前述したプロトコールで作製した後、0.5 %グルタルアルデヒドと 2 %PFA の混合液を用い、4 °Cで1 時間固定した。更に 1 %オスミウム酸で後固定した後、エポン樹脂に包埋して超薄切片を作製した。酢酸ウランとクエン酸鉛で染色した後、透過型電子顕微鏡（JOEL-1200EX、JOEL、日本）で観察した。

3-3. 実験結果

3-3-a. 巨核球への分化能を持つ多能性血液前駆細胞は ES-sac 内部に濃縮されていた

これまでマウス ES 細胞と OP9 細胞との共培養法を用いて、巨核球/血小板誘導系が確立されてきた^{9,11}。さらにこの系とほぼ同様の系を用いて 2006 年に Gaur らが Wisconsin 大学で樹立されたヒト ES 細胞株 H9 から巨核球の誘導に成功した¹⁴。しかし、血小板放出の一形態である胞体突起（プロプレイトレット）³⁰ といった成熟巨核球の形態変化は観察されず、また血小板放出は確認できないようであった。プロトコール 1 は Gaur らが報告した手法であり、まず初めにこの系を用いて我々は KhES1,2,3 の分化実験を行った。しかし極少数の血球細胞の観察は行えたが、誘導効率は悪く、血小板放出も確認できなかった。巨核球誘導効率を上げる目的で、TPO 以外の巨核球誘導、成熟刺激因子である SCF や IL-6、IL-11^{31,32} を加えて検討したが、やはり巨核球誘導効率は改善しなかった（データは示さない）。

次に私は同じ霊長類 ES 細胞であるカニクイザル ES 細胞と放射線照射した C3H10T1/2 細胞株を共培養することで、血液前駆細胞の誘導に成功したとする過去の報告²⁸ に注目した。この報告によるとカニクイザル ES 細胞と 10T1/2 細胞を共培養した 7 日目の浮遊細胞中にはコロニー形成能の高い血液前駆細胞が存在しており、彼らは培養 7 日目の浮遊細胞のみを回収して、新鮮な 10T1/2 細胞に播き直す事で、顆粒球、マクロファージ、成体型のグロビン鎖を保持した赤血球など多系統への血球分化に成功している。多分化能を有する血液前駆細胞を誘導できているため、サイトカインの組み合わせを巨核球誘導因子に変える事で、巨核球/血小板が誘導できるのではないかと仮説のもと、私は同様の系を用いて、カニクイザル ES 細胞とヒト ES 細胞から巨核球及び血小板の分化誘導を試みた。

カニクイザル ES 細胞の系では報告と同様に、培養 7 日目には造血前駆細胞が誘導された。新たな 10T1/2 細胞に播きなおし、100ng/ml TPO 存在下で培養を継続すると、培養 14 日目には大型の細胞が観察された(図 2A)。表面マーカーの解析では、巨核球マーカーである CD41a 陽性/CD42a 陽性の細胞が約 30%確認された(図 2B)。さらに、CD41a 陽性の血小板と思われる小細胞片も観察された(図 2C)。ヒト ES 細胞でも培養 7 日目の浮遊している血液前駆細胞を同様に培養することで、CD41a 陽性/CD42a 陽性の細胞を得ることができたが、カニクイザル ES 細胞と比較すると得られた細胞数は 1/10 以下であった。ヒト ES 細胞の分化が遅い可能性を考慮して、浮遊細胞を 7 日目、10 日目、15 日目と段階的に回収し、さらに 7 日間新たなフィーダー細胞で培養したところ、得られる CD41a 陽性細胞は軽度増加するものの十分な数は得られず(図 3)、血小板も確認できなかった。

しかし私は、15 日間播き直さず培養を継続していると、ヒト ES 細胞由来のコロニーが隆起して数 mm 大の囊状構造が出現してくる事に気付いた。顕微鏡で注意深く観察したところ、一部の囊状構造体は内部に血球様の球状細胞を多数含んでいることを発見した(図 4)。私はこのヒト ES 細胞由来の囊状構造物を ES-sac と名付けた。

次に ES-sac の性状解析を試みた。血液細胞は発生初期には血管内皮細胞と共通の祖先であるヘマンジオブラストを経て発生することが知られている³³。ES-sac は血管内皮細胞で構成されており、その内部に血球細胞を維持しているのではないかという仮説を立て、血管内皮抗原である CD31 と VEGF-R2 に対する抗体、及び内皮細胞特異的に結合する UEA-I レクチン³⁴による免疫染色を行った。ES-sac の囊状組織は VEGF-R2 陽性であり、CD31 は囊状組織と血球様細胞両方で陽性であった。また囊状組織の UEA-I レクチンの結合も観察し、内皮細胞の特徴を

持つ嚢状組織であることを確認した(図 5A)。

次に内部を詳細に観察するためパラフィン切片を作成し観察したところ、ES-sac は多数の小胞から構成されており、小胞周囲の単層細胞は UEA-I レクチン結合能を有していた。さらに小胞内部には血球様の球状細胞が存在した(図 5B)。

顕微鏡観察を注意深く行くと、内部に多数の球状細胞が密集している sac と単に内皮細胞様の膜だけで構成されている sac が散見されたので、球状細胞が密集した sac のみを選択して、顕微鏡下で P1000 を用いて回収し、40 μ m セルストレイナーを通して、内部の球状細胞のみを回収した。

内部の細胞の表面抗原をフローサイトメーターを用いて解析したところ、未熟な血管内皮、血液前駆細胞の共通抗原となる CD31 陽性/CD34 陽性の細胞が観察された。巨核球前駆細胞と報告されている CD34 陽性/CD41a 陽性細胞集団³⁵も観察された(図 6)。過去に Bhatia らはヒト ES 細胞を EB 法で分化させ、得られる血液前駆細胞集団は CD45 陰性/CD31 陽性/VEGF-R2 陽性/VE カドヘリン陽性であると報告³⁶していたが、私が観察した限り、Sac 内部の細胞では VEGF-R2 は陰性であった。

この血球様細胞の分化・増殖能を解析するため、血球増殖因子を含んだメチルセルロース半固形培地に播いたところ、顆粒球、マクロファージ、赤芽球、混合コロニーなど多系統の血球コロニーが観察できた(図 7A)。数回の実験でコロニー形成細胞の頻度は約 100 個に 1 個程度であることが確認され(図 7B)、この内部の球状細胞は造血前駆細胞であると考えられた。しかし、ギムザ染色上明らかな巨核球と思われる細胞は極少数しか確認できなかった。

メチルセルロース上で巨核球が確認できない原因として、この条件では巨核球の成熟を促進

できていない可能性が考えられたため、次に私は 100ng/ml TPO 存在下で血液前駆細胞を新たな 10T1/2 細胞と共培養し、巨核球誘導を試みた。8 日間後に大型の血球細胞の増殖が観察でき、さらに一部で胞体突起を形成する細胞が散見された (図 8Ai)。フィブリノゲンを固層化したスライドグラスに接着させ、CD41a 抗体を用いて免疫染色を行うと、胞体突起を形成する多核の細胞は CD41a 陽性であった (図 8Aii-iv)。巨核球の頻度を調べるため表面抗原をフローサイトメーターで解析したところ、成熟巨核球の抗原である CD41a 陽性/CD42a 陽性/CD42b 陽性細胞が約 50-60%を占めることが分かった (図 8B)。ギムザ染色を行い形態を観察すると、大型、多核で好塩基性の細胞質を持つ巨核球様細胞が散見された (図 8C)。CD41a 陽性細胞の誘導効率は、浮遊細胞を用いた誘導効率より劇的に改善され、浮遊細胞より ES-sac 内に高い巨核球への分化能を持つ血液前駆細胞が存在することが証明された (図 3)。フィーダー細胞を OP9 と 10T1/2 細胞と比較したが、ES-sac、その後の巨核球の誘導効率は 2 つのフィーダー細胞間では有意差を認めなかった。

3-3-b. ES-sac 内の巨核球前駆細胞の解析

先行研究によると動員末梢血及び臍帯血由来の巨核球前駆細胞は CD34 陽性/CD41a 陽性細胞から CD34 陰性 CD41a 陽性細胞集団へと進み、最終的に CD41a 陽性/CD42b 陽性成熟巨核球へと分化することが知られていた³⁵。ES-sac 内部の血液前駆細胞も CD34 陽性/CD41a 陰性、CD34 陽性/CD41a 陽性、CD34 陰性/CD41a 陽性細胞集団がそれぞれ存在したため (図 6)、分化段階の異なる巨核球前駆細胞集団が存在しているのではないかという仮説を立てた。ES-sac 内部の細胞を CD34 抗体と CD41a 抗体で染色し、CD34 陰性/CD41a 陰性、CD34 陽性/CD41a 陰性、CD34 陽性/CD41a 陽性、CD34 陰性/CD41a 陽性の 4 分画をフローサイトメータ

一を用いて分離、回収した（図 9A）。100ng/ml TPO 存在下で、フィーダー細胞上で培養を 8 日間継続すると CD34 陰性/CD41a 陰性分画以外の 3 分画からは CD41a/CD42b 陽性の巨核球が誘導可能であった。しかし、その頻度を解析すると、CD34 陽性/CD41a 陰性分画では 50%未満が巨核球に分化したのに対し、CD34 陽性/CD41a 陽性、CD34 陰性/CD41a 陽性の両分画では 70%前後が巨核球に分化した（図 9B）。さらに CD34 陰性/CD41a 陽性分画は他の分画と比較して増殖能は低下していた（データは示さない）。

巨核球は分化の各段階で必要な遺伝子群が異なることが報告されている^{37,38}。最近マウス ES 細胞から巨核球への分化系での遺伝子群の変化についても報告された（図 10）¹²。そこで次に私は各分画の遺伝子の発現を半定量 RT-PCR で解析した。GATA-1、Fli-1、NF-E2 などの巨核球系の遺伝子は CD34 陽性/CD41a 陰性分画では発現が弱く、CD34 陽性/CD41a 陽性分画で発現が上昇していた（図 9C）。

3-3-c. VEGF は ES-sac の誘導を促進した

ES-sac 内には巨核球への分化能が高い血液前駆細胞が濃縮されていることが確認されたため、次に私は ES-sac の形成を促進する因子の検索を試みた。過去の報告から中胚葉系への誘導を促進するとされる VEGF^{27,28} に注目した。増殖因子無添加の培養と比較し、VEGF では 20ng/ml で約 2 倍の ES-sac 形成の増加が観察されたが、100ng/ml に増量しても変化は無く、VEGF は 20ng/ml で十分であることが分かった（図 11A-i）。

VEGF 中和抗体である bevacizumab³⁹ を加えることで VEGF の ES-sac 形成促進は抑制され、VEGF 特異的な現象であることが証明された（図 11B）。しかし、VEGF 無しでも ES-sac は効率 は落ちるものの形成された。ES-sac の形成に VEGF 以外の要素も影響している可能性を考え、

他の増殖因子の検索も行った。

過去にヒト及び霊長類 ES 細胞で血液細胞への分化促進因子として報告された BMP-4³⁶、IGF-II²⁸ を培養系に添加して、ES-sac の形成数を比較した。

VEGF20ng/ml に IGF-II を加えても産生される ES-sac 数は変わらず、驚くべきことに 50ng/ml BMP-4 を加えると、我々の系では有意に ES-sac の形成が阻害された (図 11A-i)。ES-sac が内皮細胞の特徴を持っているため、VEGF 以外にも、内皮細胞増殖因子である bFGF⁴⁰、VEGF ファミリーの PlGF⁴¹ を試みた。bFGF では用量依存的に ES-sac への分化は阻害されたが、50ng/ml PlGF のでは軽度の ES-sac 形成促進が観察された (図 11A-ii)。

3-3-d. ヒト ES 細胞由来の血小板産生

培養中に多数の胞体突起を形成する巨核球が観察されたため (図 8A-i)、培養上清中の血小板放出の有無についてフローサイトメーターを用いて解析した。ヒト末梢血由来血小板を用いてフローサイトメーターの forward 及び side scatter (FSC と SSC) ゲートを設定し、培養上清を解析したところ、CD41a 陽性の血小板と思われる小細胞片が観察された。次に産生された血小板の表面抗原の発現について機能分子を中心に解析すると (図 12Ai, ii)、CD41a を発現している小細胞片では、高ずり応力下でコラーゲンとの接着に重要な役割を果す、GPIb-V-IX 複合体のうち GPIX (CD42a) や血小板運動関連蛋白の一つである CD9 の発現はほぼ保たれていた。しかし GPIb α の発現はヒト末梢血由来血小板における発現と比べて低下していた。過去の報告で試験管内での GPIb α の切断は血小板自己活性化により放出されるメタロプロテアーゼ (MP) が原因である事が報告されていたため¹²、次に私は血小板回収の2日前から培養液中に MP 阻害剤 (GM6001) を加えたところ、GPIb α の切断が抑制された (図 12A-iii)。

次に、血小板が最も放出される時期を調べるため、フィーダー細胞へ播き直し後より 5、7、9、11、13、15、17 日目に培養上清を回収し、True count tube とフローサイトメーターを用いて CD41a 陽性マイクロパーティクル数を計測したところ、最も得られる血小板数が多いのは播き直し後 9 日目であった (図 12B)。

さらに培養 9 日目に産生される血小板数を増やすために、血液前駆細胞を播き直し後のサイトカインの組み合わせを検討した。過去に臍帯血由来の血液細胞から巨核球分化で用いられた SCF³¹、Heparin³²、マウス ES 細胞からの巨核球誘導で特に成熟に関わると報告されている IL-6³¹、IL-11³² を加えて検討したところ、50ng/ml SCF、100ng/ml TPO、25U/ml Heparin の組み合わせで最も血小板数を増加させることが可能であった (図 13)。

次に電子顕微鏡を用いて産生された血小板の内部構造を詳細に観察したところ、ヒト末梢血由来血小板と比較し、やや顆粒は少ないものの、開放管系や微小管構造などは同様に保たれていた (図 14B と C)。また血小板の大小不同が目立った。

3-3-e. ヒト ES 細胞由来血小板はインテグリン活性化能を示す

次に私は産生されたヒト ES 細胞由来の血小板が、血小板としての機能を有するかを確認した。血小板の最終的な機能は生体内で血栓を形成することであるが、血小板が血栓を形成する際、CD42b (GPIb α) が障害内皮上に露出した vWF と結合する事により血小板内に活性化シグナルが入り、その結果インテグリン α IIb/ β 3 複合体の活性化、構造変化、クラスタリングが次々とおきて(インサイドアウトシグナル)、フィブリノゲンに結合するようになる。フィブリノゲンにより血小板が架橋されるとともに、血小板内部にアクチン繊維の再重合、葉状仮足、糸状仮足を含めたダイナミックな骨格変化を起こし(アウトサイドインシグナル)、連続的に血栓を形成するモデルが提

唱されている（図 15）⁴²。

このように血栓形成のステップにはインテグリンの活性化及びインテグリン依存性の細胞骨格変化が必須である。個々の血小板のインテグリン活性化能を調べるため、活性化型 CD41a/CD61（インテグリン αIIb/β3）複合体を特異的に認識し結合する PAC1 抗体²⁹を用いてフローサイトメーターで解析した。ヒト血小板の最も重要な刺激因子の一つである ADP の刺激により、CD41a/CD61 複合体の活性化（PAC1 抗体陽性の血小板の増加）が観察され、容量依存的に反応は増加した（図 16A、B）。この反応は CD41a/CD61 複合体特異的阻害剤であるティロフィバン⁴³により、打ち消されることも観察できた。

次に骨格変化を観察するため、フィブリノゲンを固層したスライドグラス上で、APD、トロンビンを用いて刺激を行った。血小板抗原である CD41a 抗体と血小板アクチンのほとんどを構成する F-アクチン繊維に結合するファロイジンによる免疫染色を行うと、血栓形成に必須である、アクチン再重合を伴う葉状仮足、糸状仮足を形成した血小板の伸展を観察することができた（図 16C）。

3-4. 考察

本研究では、再生医療実現に向けて、ヒト ES 細胞から試験管内で安定且つ効率よく血小板を誘導する系を確立することを研究目的として実験を行なった。

Gaur らの先行研究では、マウス ES 細胞からの血小板誘導系とほぼ同様の方法で巨核球誘導に成功していたが、血小板の産生には至らなかった。私は彼らの方法と今回確立した ES-sac を介する巨核球/血小板誘導法を比較して考察してみた。私の系では OP9 と 10T1/2 ではどちらからも血小板産生は可能であったため、フィーダー細胞の違いは大きな要因では無いことが判った。しかし Gaur らの使用したプロトコール 1 (図 4) ではやはり巨核球数も少なく、血小板は確認できなかったが、私の考案したプロトコール 2 では巨核球、血小板ともに確認できた。この 2 つのプロトコールの異なる点として以下の考察が挙げられる。①巨核球産生に至る培養期間は Gaur らが 15-17 日であるのに対し、我々の系では 23-24 日要することから、誘導されている巨核球の成熟状態が異なる可能性、②培養 15 日目の ES-sac という環境を通じて増殖能/多系統への分化能の高い血液前駆細胞が誘導できる (図 7) が、Gaur らの方法では ES-sac が形成される前に数回播き直しを行うため、ES-sac は観察されず、分化能の高い造血前駆細胞が誘導できていない可能性である。

②に関しては、彼らの報告では 1 つのヒト ES 細胞から $0.1-0.4 \times 10^5$ 個の巨核球が誘導されているのに対し、私の系では培養 24 日目に巨核球が $2-5 \times 10^5$ 個産生されており、増殖能の高い血液前駆細胞が誘導されたと考察できる。①に関しては、私の系では彼らが観察できなかった血小板放出の一形態である胞体突起を示す成熟巨核球も多数観察され (図 8A)、より成熟した巨核球が誘導できていると考えられた。PI による核染色を行い (Ploidy アッセイ)、核の多核化を調

べることや、巨核球電顕像で血小板放出直前に観察される Demarcation membrane system³⁰を
観察することで判断する事も可能であり、今後さらに詳細に検討していく予定である。

上記理由より ES-sac を形成することが、巨核球を含む多系統への分化能を有する血液前駆
細胞を誘導することに重要であると判断したため、次に私は ES-sac の形成を促進する因子の検
索を試みた。これまでに中胚葉分化を促進すると報告されている VEGF に関しては ES-sac の形
成を上昇させた (図 11)。驚くべきことに 50ng/ml BMP-4 を加えると、我々の系では有意に
ES-sac の形成が阻害された (図 11A-i)。過去に複数の先行研究が、BMP-4 はヒト ES 細胞か
ら血液系の分化に促進的に働くと報告している^{44,45}。今回私は Bhatia らの報告⁴⁴を基に、
50ng/ml と比較的高濃度の BMP4 を培養液に 14-15 日間入れ続けた。しかしヒト ES 細胞では 24
時間 BMP4 を加えると中胚葉系への分化が促進するが、7 日以上 BMP4 を加えると栄養膜細胞
へと分化してしまうとする報告⁴⁶もあり、今後入れる時期、濃度を検討していく必要があると考え
られる。

ES-sac が内皮細胞の特徴を持っているため、VEGF 以外にも、内皮細胞増殖因子である
bFGF⁴⁰、VEGF ファミリーの PIGF⁴¹を試みた。bFGF では ES-sac への分化は阻害されたが、
bFGF 自体がヒト ES 細胞への未分化維持因子^{3 26}であるため、ES-sac の内皮細胞の増殖では
なく、容量依存的に分化自体が阻害されたと考えられる。PIGF は VEGF ファミリーの一つである
⁴¹。VEGF が VEGF レセプターの 1 と 2 (VEGF-R1,2) の両方に結合するのに対し、PIGF はレセ
プターの 1 (Flt-1) のみに結合してシグナルが伝わる⁴⁷。VEGF 単独と比較し、PIGF 単独では
ES-sac 形成率の上昇は弱く、ES-sac 形成に重要なシグナルは VEGF-R2 と関与していること
が確認された。VEGFR-2 のみの刺激で十分であるのか、VEGF-R1 と 2 からのシグナルがともに

重要であるのかは VEGF レセプター1 と 2 のそれぞれの阻害抗体を用いる事で証明可能であり、今後明らかにする予定である。

次に私の系で産生される巨核球の性状について解析を行った。まず私はどのような細胞表面抗原を発現している細胞集団から巨核球が誘導されるかを調べるため、ES-sac 内部の血液前駆細胞集団に注目した。過去の報告で骨髄及び臍帯血由来の巨核球前駆細胞は CD34 陽性/CD41a 陽性細胞から CD34 陰性 CD41a 陽性細胞集団へと進み、最終的に CD41a 陽性/CD42b 陽性成熟巨核球へと分化することが知られていた³⁵。ES-sac 内部の血液前駆細胞も CD34 陽性/CD41a 陰性、CD34 陽性/CD41a 陽性、CD34 陰性/CD41a 陽性細胞集団がそれぞれ存在したため（図 6）、分化段階の異なる巨核球前駆細胞集団が存在しているのではないかと仮説を立てた。そこで私は ES-sac 内部の血液前駆細胞を CD34/41a の発現により 4 分画に分け、TPO 存在下で培養を行った。CD34 陰性/CD41a 陰性分画以外の 3 分画からはいずれも CD41a/CD42b 陽性の巨核球が誘導可能であった。しかし、その頻度を解析すると、CD34 陽性/CD41a 陰性分画では 50%未満が巨核球に分化したのに対し、CD34 陽性/CD41a 陽性、CD34 陰性/CD41a 陽性の両分画では 70%前後が巨核球に分化した（図 9B）。さらに培養継続により、CD34 陽性/CD41a 陰性分画及び、CD34 陽性/CD41a 陽性分画の増殖は観察されたが、CD34 陰性/CD41a 陽性分画は既に増殖能は失われていた（データは示さない）。CD34 陽性/CD41a 陰性分画は他の血球系への分化能を保持しているが、CD34 陽性/CD41a 陽性及び CD34 陰性/CD41a 陽性分画は既に巨核球系への分化が決定してしまった細胞集団であることが推察された。骨髄由来の巨核球分化に必須といわれている GATA-1、FOG-1、Fli-1、NF-E2 の発現（図 10）は、巨核球への分化とともに上昇し、未分化な血液前駆細胞に発現の強い GATA-2 は逆に

発現が減少した。各分画の巨核球特異的な遺伝子の発現と上記分化能を合わせて考察すると、CD34 陽性/CD41a 陰性分画は CD34 陽性/CD41a 陽性分画より、分化の上流に位置し、より未熟な巨核球前駆細胞を含んでいる集団であると考えられた。また骨髄由来の巨核球やマウス ES 細胞からの巨核球分化と同様の遺伝子群の変化がヒト ES 細胞由来の巨核球分化でも起きている事が証明され、巨核球/血小板産生のための主流となる遺伝子群の変化は共通である可能性が示唆された。

次に産生された巨核球、血小板は発生のどの段階を模倣しているかを考察した。これまで卵黄囊造血の主流は胎児型赤芽球とマクロファージと考えられてきたが、近年卵黄囊には胎児型の巨核球が存在するという報告がなされている。Xuらは、マウス卵黄囊巨核球が存在する事を示し、胎児型巨核球であると主張している⁴⁸。彼らは同時に存在する赤芽球コロニーが Primitive type globin (β H1, ϵ) を発現していることで、卵黄囊に存在する巨核球を胎児型巨核球と定義した。さらに最近、マウスでは卵黄囊、胎児肝から胎児型の血小板が産生され、卵黄囊→胎児肝→成体骨髄へと血小板の起源が移行するに伴い血小板の大きさは小さくなっていくと報告された⁴⁹ (図 14A)。形態学的には成体型と比べ胎児型の血小板は大型で顆粒に乏しいとされている。以上から卵黄囊造血に巨核球/血小板も含まれることが明らかになってきた。試験管内でマウス ES 細胞から誘導された血小板は発生過程を模倣して、胎児型と成体型の両方の血小板が産生される事が報告された¹²。今回、私が考案したプロトコールにより分化誘導した ES 細胞由来血小板は、ヒト末梢血由来血小板と比べ大小不同が目立ち、内包している顆粒はやや少ないものが散見した。同時期に分化する赤芽球のグロビン鎖を RT-PCR で確認すると、血小板産生が最も多い培養 24 日目は胎児型 (ϵ , γ) と成体型 (β) のグロビン鎖が混在している (データ

は示さない) ことから考えると、私が考案したプロトコールで作製されたヒト ES 細胞由来血小板も、発生過程を模倣し、胎児型と成体型の巨核球/血小板が混在している事が考えられた。

α 顆粒にはフィブリノゲン・フィブロネクチン・トロンボスポンジン・von Willbrand 因子などの粘着性蛋白、濃染顆粒にはADP、セロトニン、ピロリン酸などの生理活性物質を含有している為⁵⁰、顆粒に乏しい胎児型血小板の機能は成体型のものに比して低下している事が考えられ、後述するES細胞由来血小板機能解析の結果にも関連している可能性がある。臨床応用に用いる為には成体型血小板を更に効率よく誘導する為のプロトコール改良が必要と考えられ、今後の研究課題として挙げられた。

次に産生された血小板の表面抗原の発現について機能分子を中心に解析すると(図 12)、フィブリノゲンやvWF の受容体であるインテグリン α IIb (CD41a) を発現している小細胞片では、GPIb-V-IX 複合体のうち GPIX (CD42a)や血小板運動関連蛋白の一つである CD9 の発現はほぼ保たれていた。しかし、GPIb α (CD42b) の発現はヒト末梢血由来血小板における発現と比べて発現が低下していた。GPIb/IX/V (CD42b/CD42a/CD42d) 複合体は4つのサブユニットからなる hetero-oligomeric receptor である。GPIb α のN末端は傷害内皮に結合したvWF と結合することで、血小板の活性化を引き起こし、血栓形成の初期段階を制御する重要な分子である⁵¹。

生体内や濃厚血小板の保存液中では、自己活性化により血小板自体が含有するメタロプロテアーゼ(主に ADAM17) が放出され、GPIb α の細胞外部位は切断される。結果としてインテグリン活性化能及び細胞骨格変化が障害され血栓形成能を失う⁵²。私の系で産生されたヒトES細胞由来の血小板は前述の通り、ADPに反応しインテグリン α IIb/ β 3 活性化及び引き続いて起きる血小板内の骨格変化を引き起こした(図 16)。しかしADPへの反応はヒト新鮮末梢血と比較して、

30%-60%程度の反応であった。この反応性の低下については電顕像から推察するように、成体の血小板と比較し、 α 顆粒や濃染顆粒が少ないことが原因の一つと考えられるが、もう一点重要な事は産生された血小板にとって培養液中は適切な環境ではないため、上述の様に血小板の自己活性化による失活化が起きている事が原因と考えられる。血栓形成能を持った機能的な血小板を誘導する為には、試験管内で血小板を分化誘導する際にも何らかの試験管内での自己活性化を抑制する処理が必要であると考えられる。最近マウスES細胞から試験管内で作成された血小板もメタロプロテアーゼ（MP）を介して、GPIb α が切断されるという報告がなされた¹²。この報告では、MPの阻害薬（GM6001、TAPI-1）によってMP活性を制御して、ES細胞由来血小板のGPIb α の細胞外部位の発現を保持する事で、ES細胞由来血小板のex vivoでの血栓形成能を改善する事、ES細胞由来血小板の生体内クリアランスの改善を可能にする事につながり、臨床的にES細胞由来血小板を応用するための貴重な手がかりを示した。現段階までに私は同様にGM6001を培養系に添加する事で、ヒトES細胞由来血小板のGPIb α の切断抑制に有効であることを確認しているが、機能の保存の有無は未確認である。今後先行研究を基に、産生されたヒトES細胞由来血小板の機能を保護する培養条件を探索していかなければならない。

他にも私の系で産生された血小板に関しては改善すべき点も多い。生体内では巨核球1個から数千個の血小板が放出されていると考えられている³⁰。しかし、私の系では数十個程度であった。ここにはいまだ解明されていない巨核球からの血小板放出の機序が大きく影響していると考えられる。最近Science誌にマウス骨髄内の巨核球から血流による剪断応力により血小板が放出される映像が報告された⁵³。剪断応力が血小板放出の全ての機序とはいえないが、大きな誘因の一つと考えられ、今後は培養系に剪断応力を加える系なども検討している。もう一つの大き

な戦略としては、ES 細胞 1 つから誘導する巨核球前駆細胞を増やすことで、産生される血小板数を増加することである。現在レトロウイルスを用いて巨核球を増殖させる転写因子群の強制発現によるスクリーニングを行っている。最終的には Tet-on システムなどの薬剤で遺伝子の発現が制御できる手法を用いれば、巨核球前駆細胞レベルで細胞を大量に増やし、その後遺伝子の発現を下げることで、成熟した巨核球/血小板を得ることは可能であると考えている。今回の研究で個々の血小板レベルでのインテグリンの活性化能は示したが、新鮮末梢血由来の血小板と比較して、劣っていることが確認された。しかし血小板の最終的な機能は前述した通り生体内で血栓を形成することであり、多少機能が劣っていても輸血量を増やすことで目的を果せることが十分予想される。

最近 Nishimura らは、マウス脂肪組織の微小血管内での局所の血小板の活性化を共焦点顕微鏡を用いてリアルタイムで撮影する技術を確立した (in vivo imaging)⁵⁴。現在我々は彼らと共同研究を行い、NOG マウスにヒト末梢血由来血小板を尾静脈から輸血し、生体内での血栓形成をリアルタイムで撮影する系の確立を試みている。今後ヒト ES 細胞から in vitro で産生できる血小板数を増やし、この系で産生された血小板が真に有効であるかを慎重に検証していく必要がある。

4. ヒト誘導型多能性幹（Induced Pluripotent Stem: iPS）細胞の樹立と血液細胞誘導法の確立

4-1. 緒言

ES 細胞の大きな利点は *in vitro* で半永久的に増殖可能であり、体性幹細胞で問題となる増殖制限が無く、ドナー不足の問題を解消できる点にある。しかし、一方で ES 細胞は発生初期の胚盤胞から内部細胞塊を分離して樹立されるため、胚の破壊は避けられないことから樹立・応用に際して倫理的な問題を伴う。また患者自身からの ES 細胞は樹立できない。ES 細胞を用いて細胞療法を行う際、ES 細胞固有の HLA が移植された患者 HLA と異なると患者体内で拒絶されてしまう。HLA の一致する ES 細胞を樹立するには、従来の考えでは体細胞核移植技術を用いてクローン胚を作製し、そこから患者由来の HLA を持つ ES 細胞を樹立する事が必要であった。患者由来の体細胞核を移植したクローン ES 細胞は基本的には患者のゲノムを保持していることから、移植時に拒絶されないと考えられる。しかし、クローン人間を作り出してしまう可能性と、ヒト胚を破壊するという倫理的問題が臨床へ応用する際の障壁となっていた。

しかし、近年この問題を乗り越える画期的な研究成果が報告された。誘導型全能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cell : iPS 細胞) の樹立である。山中らのグループはマウスとヒトの体細胞に 4 つの遺伝子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) を、レトロウイルスを用いて発現させて、ES 細胞とほぼ同等の細胞へ初期化することに成功した^{16,18}。この方法を用いれば初期胚の利用を介さないため倫理的問題点は解決され、また患者個人から採取した細胞を用いて多能性幹細胞を誘導することが理論上可能となる (図 17)。これまでに進められてきたヒト ES 細胞を用いた細胞療法の知見と組み合わせることで、難治性疾患に対する自己細胞を用いた再生医療の可能

性が実現味を帯びてきた。しかしマウス iPS 細胞から作製したキメラマウスの多くで再活性化を起こした c-Myc による固形癌の発生が問題となっており¹⁷、ヒト iPS 細胞から試験管内で誘導した機能細胞を移植医療に用いる際に大きな障壁になることが予想された。臨床応用を考えるとより安全な iPS 細胞の樹立が必須であり、ウイルス遺伝子を染色体に永続的に組み込むのではなく、一過性の発現で iPS 細胞が樹立できれば理想である。Jaenisch らのグループは、テトラサイクリン存在下で4つの遺伝子の発現を調節できるマウス線維芽細胞を用いて、4つの遺伝子に依存している時期を検討し、最低 12-16 日間の発現があれば iPS 細胞樹立には十分である事を証明した⁵⁵。つまり遺伝子操作しなくとも、この時期だけ4因子から作られる蛋白質を体細胞へ導入できれば樹立可能ということを示唆している。さらに4つの遺伝子を発現させ続けた状態では、樹立した iPS 細胞を移植して形成された奇形腫はきちんと三胚葉系へと分化しておらず、iPS 細胞の多分化能にも影響を及ぼしてしまうと報告している。

最近山中らは、環状の発現ベクターに 3 つの因子をシストロニックに連続で結合したベクターを作製し、一過性のトランスフェクションにより、遺伝子が核内に組み込まれないマウス iPS 細胞の樹立に成功した⁵⁶。ヒト iPS 細胞も同様の方法を用いて試みられ、近い将来臨床応用可能な安全なヒト iPS 細胞が樹立されると思われる。

iPS 細胞の最大の利点は患者の体細胞から樹立することで、拒絶を受けない理想的な細胞療法を行える事である。Jaenisch らのグループは鎌状赤血球症のモデルマウスから iPS 細胞を作製し、相同組み換え技術を用いて病因となる遺伝子を修復した。この iPS 細胞から分化誘導した血液前駆細胞をもとのマウスに移植することで鎌状赤血球症の治療に成功した⁵⁷。このように、単一遺伝子異常からなる難治性疾患は iPS 細胞を用いた細胞療法の良い標的になると考えら

れる。

遺伝病以外にも iPS 細胞が応用可能な治療は多く存在する。例えば繰り返し血小板輸血が必要となる骨髄移植後や強力な化学療法後に生じる致命的な血小板減少症、先天的血小板機能異常症などである。血小板に関しては前述した通り、レシピエント側に HLA に対する抗体が無ければ、異なる HLA を持つ血小板は拒絶されない。しかし、繰り返し血小板輸血を行う必要がある患者では、将来的に HLA に対する抗体を産生し、血小板輸血不応となってしまうことが予想される¹⁵。このため、長期的には HLA が一致する血小板を輸血することが理想である。前述した通り、私はヒト ES 細胞から機能的血小板を誘導する系を確立したが、限られた数のヒト ES 細胞から作成した血小板製剤では、HLA 抗体が産生されてしまう危険が高い。一方、患者と同一の HLA を持ったドナー由来の iPS 細胞を樹立することや、患者本人から iPS 細胞を樹立し、遺伝子修復後に血小板製剤を作れば、免疫拒絶の受けにくい理想的な血小板製剤が産生可能である（図 18）。さらに患者由来の iPS 細胞を作成し、血液分化系を用いて解析することで血液疾患の病態解明にも大いに役立つことが予想される。

以上の背景より、私はヒト皮膚細胞より iPS 細胞を樹立し、血小板を含む血液細胞への分化誘導系を確立することを目指した。ヒト ES 細胞と形態、テラトーマ形成などの 3 胚様系への分化能、遺伝子発現などは非常に類似していると報告¹⁸されているが、ヒト ES 細胞同様、血液前駆細胞を含んだ囊状構造体を形成してくるかに興味を持ち、ヒト ES 細胞と同様の培養法を試みた。

4-2. 材料と方法

4-2-a. 細胞株と試薬

別記したものの以外の試薬は、全て Sigma-Aldrich 社より購入した。

ヒト iPS 細胞株は京都大学 再生医科学研究所 高橋和利博士、山中伸弥博士より供与して頂いた 201B6、201B7 (Oct3/4、Sox2、Klf-4、c-Myc の 4 因子より作成)、253G1、253G4 (Oct3/4、Sox2、Klf-4 の 3 因子より作成) と、下記方法により我々の研究室で新規に樹立した Tk3-1, 2, 4, 5, 9, 20 (4 因子)、Tk4-M (3 因子) 細胞株を用いて行った。継代数はいずれも 30 継代以内に使用した。

ヒト繊維芽細胞は Cell Application より成人白人女性の皮膚繊維芽細胞 (HDFa)、及び新生児皮膚繊維芽細胞 (HDFn) を購入して、継代数 6 回以内で使用した。培地は 10%FBS、2 mM L-グルタミン、100 U ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシンを添加した DMEM 培地で培養し、3-4 日おきに 1/3 ずつ細胞を播種し、継代した。

ラット由来 STO 細胞株を LIF (Leukemia Inhibitory factor) 産生株に改変した SNL 細胞株^{16 18} は京都大学 再生医科学研究所 山中伸弥博士より供与して頂いた。培地は 10%FBS、2 mM L-グルタミン、100 U ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシンを添加した DMEM 培地で培養し、3 日おきに 1/10 ずつ細胞を播種し、継代した。

ヒト iPS 細胞は 50Gy の放射線照射した MEF 細胞上で培養を行った。培地は 20 %KSR (Invitrogen,米国)、0.1 mM 非必須アミノ酸 (NEAA; Invitrogen/GIBCO 社. 日本)、0.11 mM 2-メルカプトエタノール (GIBCO)、2 mM L-グルタミン (GIBCO)、5ng/ml リコンビナントヒト bFGF (和光、日本) を添加した DMEM/F12 Ham を用いて培養した。培地は毎日交換し、未分化状態を維持

するため4日おきに継代し、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。継代時は0.25%トリプシン、1mM塩化カルシウム、20%KSRを用いて、コロニーを細かく砕いた後に、MEF上に1:3-1:5で播種した。

マウスC3H10T1/2細胞株は3-2で記載した方法で維持した。

ヒトiPS細胞の分化培地は、ヒトES細胞と同じ3-2で記載した分化培地を基本培地とし、iPS-sac形成までは20ng/ml VEGFを加え、血液前駆細胞から巨核球/血小板への分化時には50ng/ml SCF、100ng/ml TPO、25U/ml ヘパリン酸ナトリウム（味の素、日本）を加えて用いた。

293gp細胞株は10%FBS、2 mM L-グルタミン、100 U ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシンを添加したDMEM培地を用いた。3日毎に細胞を1/5ずつ播種し、継代した。

293gpg細胞株はマサチューセッツ工科大学Richard Mulligan博士より供与して頂いたものを用いた⁵⁸。この細胞はレトロウイルスのgag/pol、及びエンベロップ蛋白であるVSVGが293T細胞に導入された細胞株である。VSVG蛋白は細胞毒性が強いため、ウイルス非産生時はテトラサイクリンを加えることでVSVGの発現を抑えている（Tet-off system）。ウイルス回収時は、テトラサイクリンを培養液から除き、VSVGを発現させると、産生されたウイルスゲノムがエンベロップに包まれ、感染能を持つレトロウイルスとなる。3日毎に細胞を1/3ずつ播種し、継代した。ウイルス非産生時は10%FBS、2 mM L-グルタミン、100 U ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシンを添加したDMEM培地に1μg/ml テトラサイクリン、2μg/ml ピューロマイシン、0.3mg/ml ネオマイシンを加えて培養した。ウイルス産生時は10%FBS、2 mM L-グルタミン、100 U ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシンを添加したDMEM培地で培養した。

抗体、サイトカインは 3-2 で記載したものをを用いた。

4-2-b. ウイルス産生 293gp_g 細胞の樹立

pMX-retrovirus vector にヒトの 4 つの因子 (Oct3/4、Sox2、Klf-4、c-Myc) を組み込んだレトロウイルスベクターは京都大学 山中伸弥博士より供与して頂いたものをを用いた。293gp_g パッケージング細胞に遺伝子を一つずつpcDNA3.0-VSVG ベクターとともに磷酸カルシウム法を用いて、一過性トランスフェクションを行い、48 時間後にウイルスを回収した。6000g、16 時間、4°Cの遠心で 40ml のウイルスを 250 μ l に濃縮した。293gp_g レトロウイルスパッケージング細胞をテトラサイクリン存在下で 6well の 1well に 1x10⁵ 細胞まき、翌日濃縮ウイルス 100 μ l+Protamine 10 μ g/ml を培養液に加えて、37°C、10%CO₂ で培養した。24 時間後に2度目のウイルス感染を行い、37°C、10%CO₂ で培養した。24 時間後にウイルス入りの培地を吸引除去し、新たにウイルス抜き培地を加え、以後細胞を増殖させた。ウイルス産生まで培養液にテトラサイクリンは加えて、VSVG エンベロープの発現を抑えた。

4-2-c. レトロウイルスの作製

293gp_g 細胞を Poly-L-lysine 処理した培養皿にまき、テトラサイクリン存在下、37°C、10%CO₂ で培養を行った。細胞が培養皿の 80%を覆うようになったら PBS で 2 回洗い、テトラサイクリン抜きの培地を加え、VSVG を発現させて、完全なウイルスの産生を開始した。3 日後にテトラサイクリン抜きの新たな培養液に交換し、24 時間後より 3 日間毎日ウイルスを回収した。回収したウイルスを 6000g、16 時間、4°Cの遠心で 40ml のウイルスを 250ml に濃縮し、-80°Cでストックした。

4-2-d. ヒト iPS 細胞の作製

成人白人女性の皮膚繊維芽細胞(HDFa)、及び新生児皮膚繊維芽細胞(HDFn)を DMEM、

10%FBS、PSG 培地で増殖し、iPS 細胞作成には継代数 4-6 回の細胞を使用した。HDF からのヒト iPS 細胞の作成過程を図 19 で示す。ウイルス感染の前日 (day-1) にゼラチンコートした 10cm 培養皿に HDF を 8×10^5 細胞数で播種した。翌日 (day0) 培地に最終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように Protamine を加え、各濃縮ウイルス $100 \mu\text{l}$ ずつ添加し、2 日間繰り返した (day0 と 1)。最後の感染から 24 時間後 (day2)、培地を吸引除去し、新たな培地を加えた。3 日毎に新鮮培地に変えた。Day5 にフィーダーに用いる MEF 細胞または SNL 細胞に 50Gy 照射し、増殖を止め、ゼラチンコートした 10cm 培養皿に 1.5×10^6 細胞数で播種した。ウイルス感染から 5 日目 (day6) に、HDF 細胞を 0.05%トリプシン EDTA 処理により単一細胞とし、 5×10^4 細胞で前日用意したフィーダー細胞上に播種した。翌日 (day7) 培地をヒト ES/iPS 細胞用の培地 (DMEM/F12、20%KSR、2mM L-glutamine、NEAA、2ME、5ng/ml basic FGF) に変更した。以後 2 日毎に培地交換を行った。培養 21 日目頃より、ヒト ES 細胞様の単層のコロニーが観察されたため、顕微鏡下でピペット (P200) を用いて回収し、前日用意しておいた MEF フィーダー細胞上に播種した。細胞を MEF 細胞上で増殖させ、継代数の少ない状態で凍結ストックを作成した。継代 10-20 回のヒト iPS 細胞株を血液分化誘導の実験に用いた。

4-2-e. ヒト iPS 細胞の免疫染色

ヒト iPS 細胞株を ES cell characterization キット (Chemicom、米国) を用いて染色した。4% PFA で固定後、0.1% Tween 20 入りの PBS で洗浄し、抗体の非特異的結合を防ぐため 5% ヤギ血清を用いてブロッキングを室温で 20 分を行った。抗ヒト SSEA-4 抗体は 1:100 の濃度で、 4°C 、1 時間染色した。洗浄後、2 次抗体 (抗マウス IgG-Alexa488 抗体) を 1:500 の濃度で室温、1 時間で染色した。観察には Leica DM IRBE (Leica Microsystems、Wetzler、ドイツ) を用いた。

4-2-f. 半定量 RT-PCR

RNA を 1×10^6 個の細胞から TRIzol Reagent (Invitrogen、米国) で抽出し、cDNA への逆転写反応を ThermoScript RT-PCR System Kit (Invitrogen) で行った。GAPDH を用いて標準化した cDNA を用いて半定量的 RT-PCR を行った。遺伝子発現を同定するために用いたプライマーは表 4 の通りである。PCR の反応条件は、変性 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 15 秒、会合 $57\text{ }^\circ\text{C}$ 15 秒、伸長 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 30 秒を 26 から 30 サイクル行った。

4-2-g. iPS-sac を介したヒト iPS 細胞からの血液前駆細胞誘導

細胞株は京都大学で樹立された 201B6、201B7 (4 因子)、253G1、253G4 (3 因子)、及び東京大学で樹立された TkDA3-1, 2, 4, 5, 9, 20 (4 因子)、TkDN4-M (3 因子) を使用した。分化培養は 3-2 と同様に行った。

4-2-h.. コロニーアッセイ

培養 15 日目の j*iPS*-sac 内部の血液前駆細胞を 3-2 と同様の方法を用いてコロニーアッセイを行った。

4-2-i. ヒト iPS 細胞由来多能性血液前駆細胞からの巨核球/血小板の分化誘導

3-2 と同様の方法を用いて培養を行った。分化培地には TPO100ng/ml、SCF50ng/ml、Heparin sodium 25U/ml を加えた。ヒト ES 細胞の系では巨核球、血小板は播き直し後 8-9 日目がピークとなったので、培養 8-9 日目に回収し、解析を行った。DMSO で溶解したメタロプロテアーゼ阻害剤 (GM6001) は血小板回収の 2 日前に添加した。

4-2-j. ヒト iPS-sac の免疫染色と FACS

iPS-sac の免疫染色は培養 14 日目に行った。染色法は 3-2 と同様に行った。

培養 14-15 日目の iPS-sac 内部の血液前駆細胞を回収し、3-2 と同様に抗体で染色後 FACS Aria を用いて表面抗原を解析した。

4-2-k. フローサイトメーターを用いた巨核球表面マーカーの確認

培養 23 日目 (iPS-sac よりまき直して 8 日目) の浮遊細胞をチューブに回収し、440g、5 分間遠心した。上清を捨て、3%FBS 入りの PBS で懸濁し、細胞を $1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ に調節した。抗 CD41a (インテグリン αIIb)-APC 抗体 5 μl 、抗 CD42b (glycoprotein Ib α)-PE 抗体 5 μl 、抗 CD42a (glycoprotein IX)-FITC 抗体 5 μl 、CD9 -PE 抗体 5 μl を加え、30 分間氷上、遮光で反応させた。3%FBS 入りの PBS 2ml を加えて、440g、5 分間遠心後上清を捨てた。PI を加えた 3%FBS 入りの PBS 300 μl で懸濁して、フローサイトメーターで解析した。

4-2-l. フローサイトメーターを用いた血小板解析

細胞の調整は 3-2 と同様に行った。抗 CD41a-APC 抗体 5 μl 、抗 CD42b-PE 抗体 5 μl 、抗 CD42a-FITC 抗体 5 μl 、抗 CD9-PE 抗体 5 μl を加え、室温、遮光で 30 分間インキュベートした。解析には、FACS Aria を用いた。血小板用のゲートは、ヒト末梢血由来の血小板を用いて決定した。

4-2-m. IPS 細胞由来血小板のインテグリン活性化能の測定

培養 23-24 日目の培養上清液を用いて行った。3-2 と同様に細胞を回収し、PAC1 アッセイを行った。

4-2-n. 透過型電子顕微鏡

3-2 と同様に行った。

4-3. 結果

4-3-a. エコトロピックレセプターを導入しないヒト iPS 細胞の樹立

以前報告されている通り、山中らはウイルス産生株に PLAT-E を用いた。この細胞からはげっ歯類の細胞にのみ感染能を持つエコトロピックなエンベロープを持つウイルスが産生される。報告によると PLAT-A によるレトロウイルス（アンフォトロピックなエンベロープを持つウイルスが産生されるので、ヒトを含めた霊長類、マウスまで広く感染可能である）を当初用いたが、感染率が悪く、樹立が困難であった。彼らはヒト細胞に PLAT-E により産生させたウイルスを感染させるため、3 因子（Oct3/4、Sox2、Klf-4）または 4 因子（Oct3/4、Sox2、Klf-4、c-Myc）に加え、レンチウイルスによりエコトロピックレセプターを導入して、ヒト iPS 細胞を誘導していた¹⁸。基本的には以前山中らが報告した方法を模倣したが、私の系ではウイルスエンベロープを物理的に強く濃縮可能な VSVG エンベロープに変えた。VSVG は細胞のリン脂質と結合して感染するため、基本的に全ての細胞種に感染可能（パントロピック）であり、また濃縮により高いウイルス導入効率が期待できた⁵⁸。そこで私は山中らの方法であるレンチウイルスによるエコトロピックレセプターの導入は行わず、4 因子または 3 因子の遺伝子導入でヒト繊維芽細胞からヒト iPS 細胞の誘導を試みた。

山中らが報告した通り、ヒト繊維芽細胞株 HDF（Human Dermal Fibroblast）にレトロウイルスを 24 時間おきに 2 回感染させ、感染6日後に HDF を MEF または SNL 細胞上へ移して、培養を継続した。感染より 15 日後から、単層なヒト ES 細胞様のコロニーが出現するようになった。物理的に剥離し、MEF 上に移して培養を継続した。これらのコロニーはヒト ES 細胞株とほぼ変わらず試験管内で高い増殖能を示し、未分化様の形態を維持していた。ヒト ES 細胞マーカーの一つで

ある SSEA4 の発現はヒト ES 細胞と差は無かった (図 20)。c-Myc を除いた 3 因子でのヒト iPS 細胞の作製にも成功した。TkDA3-4 (4 因子)、TkDN4-M (3 因子) の 2 株の染色体を確認したところ、46XY 正常核型であった (図 21)。次に ES 関連 (ECAT) 遺伝子の発現を半定量 RT-PCR で確認すると、ヒト ES 細胞同様の発現を認めた。さらに iPS 細胞作成時に使用した 3 または 4 因子の遺伝子の発現は一部発現が認められるものの、強力に抑制されていた (図 22)。奇形腫形成能については現在検証中である。

4-3-b. ヒト iPS 細胞からの iPS-sac を介した血液前駆細胞の誘導

前述したヒト ES 細胞から血液細胞を誘導した同じ系を用いて、ヒト iPS 細胞の分化を試みた。ES 細胞では VEGF が ES-sac 形成を促進したため、14 日間の培養期間中は 20ng/ml の VEGF を添加した。ヒト ES 細胞の分化時と同様に培養 8 日前後より平坦な iPS コロニーが隆起を始め、14 日目には血球様の球状細胞を多数含んだ嚢状構造物 (私はこの構造物を iPS-Sac と名付けた) が多数出現した (図 23)。免疫染色を行うと ES-sac 同様、CD31 陽性 (データは示さない)、VEGF-R2 陽性 (図 23) であり、内皮細胞により構成されていることが確認できた。京都大学で樹立されたヒト iPS 細胞株及び私が樹立したヒト iPS 細胞株計 11 株の分化能力を比較したところ、分化能力には差があることが確認された (図 24)。

次に内部の血球様細胞の表面抗原を、フローサイトメーターを用いて解析した。未熟な血管内皮-血液細胞マーカーである CD31/CD34 陽性となる細胞が 20%前後存在していた。さらに前回私が報告したように巨核球前駆細胞と考えられる CD34 陽性/CD41a 陽性の細胞集団も 10%前後存在した (図 25)。

これらの血液前駆細胞は、メチルセルロース半固形培地上で好中球、マクロファージ、赤芽球、

ミックスコロニーを形成した（図 26）。血球コロニー形成細胞の存在頻度はおよそ 100-200 個に 1 個程度であった（図 26）。この血液前駆細胞は増殖能が高く、多系統の血液細胞へ分化する能力を保持している事が確認できた。

4-3-c. ヒト iPS-sac 内の血液前駆細胞は巨核球を産生した

次に私は分化能の高いヒト iPS 細胞株 253G4、TkDN4-M、TkDA3-4 及び、ヒト ES 細胞株 KhES-3 を用いて巨核球への分化能を確認した。iPS-sac 内の血液前駆細胞を回収し、新たに用意した 10T1/2 細胞上で TPO、SCF、Heparin 存在下で培養すると、フィーダー細胞の下に潜り込み、Cobble stone を形成して増殖する細胞が確認され、増殖能の高い血液細胞である事が示唆された（図 27A）。その後血球細胞は増殖を続け、培養 23 日目（まき直して 8 日目）には大型の細胞の増殖を確認し、一部の細胞はプロプレイトレット様の形態変化をとっていた（図 27B）。表面抗原をフローサイトメーターを用いて解析すると、成熟巨核球特異的なマーカーである CD41a⁺/CD42b⁺の細胞がどの細胞株からも 40-60%前後誘導可能であることが確認できた（図 27C）。これらの細胞には他の巨核球特異的なマーカーで運動関連蛋白である CD9 や CD42b と共に機能性の複合体を形成する CD42a の発現もヒト ES 細胞由来の巨核球と同様に認められた。これらの細胞は大型、多核、好塩基性の巨核球様の形態であった（図 27D）。

4-3-d. ヒト iPS 細胞由来血小板の内部構造、インテグリン活性化能はヒト ES 細胞由来血小板と同等であった

次に培養上清中の血小板放出を、フローサイトメーターを用いて確認した。ヒト末梢血由来の血小板をコントロールとして、FSC、SSC ゲートを決定した。培養上清中には血小板特異的な機能分子である CD41a⁺のマイクロパーティクルが存在した。他の機能分子である、CD42a、CD9

については CD41a とほぼ同程度発現が認められたが、CD42b (GPIb α) に関しては、ヒト ES 細胞由来血小板と同様一部の CD41a 陽性の血小板で発現が低下していた (図 28A)。ヒト ES 細胞由来血小板と同様、血小板解析の 2 日前に培養液に GM6001 を加えると GPIb α の切断は抑制された (図 28B)。

電子顕微鏡による内部構造の観察では、ヒト ES 細胞同様に α 顆粒、微小管構造、Open canalicular system (OCS) は保たれていたが、やはり末梢血由来血小板と比較し、顆粒の少ない血小板、大小不同の血小板が散在していた (図 29)。また巨核球から血小板が放出される像も一部で観察された。

次に産生されたヒト iPS 細胞由来の血小板の機能をフローサイトメーターを用いて解析した。ヒト ES 細胞由来血小板同様、ADP に反応し、PAC1 陽性血小板が増加した。さらにインテグリン α IIb/ β 3 複合体特異的な阻害剤であるティロフィバンにより反応は抑制された (図 30)。末梢血より機能は劣るものの、ヒト iPS 由来の血小板はヒト ES 細胞由来の血小板と同等のインテグリン活性化能を保持していることが証明された。

4-4. 考察

本研究では、①凍結保存したウイルスを用いて、ヒト iPS 細胞の作成が可能であるか、②皮膚から作成したヒト iPS 細胞がヒト ES 細胞同様に胚葉を越えて血球への分化能を保持しているか、③皮膚から作成したヒト iPS 細胞由来の血小板がヒト ES 細胞由来の血小板同様の機能を保持しているか、④3 因子と 4 因子由来のヒト iPS 細胞に血球分化能の差は生じるか、⑤血球分化後に導入した遺伝子の再活性化を起こしていないかという点に注目しつつ研究を行った。

ヒト iPS 細胞の樹立に関して、私はウイルスロット間の影響の少ない安定した樹立法を目指して、凍結保存したウイルスでの作成を試みた。VSVG エンベロープは幅広い種類の細胞へのウイルス感染が可能であり、また物理的に強い性質であるため、凍結保存や遠心による 100-200 倍の濃縮も可能という利点がある。VSVG エンベロープを用いたヒト iPS 細胞作成は他のグループからも報告されている⁵⁹が、産生されたウイルス液をそのまま使用しており、凍結保存したウイルスからヒト iPS 細胞作成は世界初である。蛍光蛋白などのマーカーのついていないヒト iPS 細胞を作成するため、多くの施設でのベクターには GFP などのマーカーはついていない。このためウイルスの感染効率は、ウイルスのロットにより変わってしまい、安定した作成が困難である。しかし私が用いた系であれば、一度に大量のウイルスを作成し、-80℃で保存しておけば、比較的安定した効率でヒト iPS 細胞の誘導が可能である。さらに、濃縮ウイルスのため高い感染効率が期待できるので、感染しにくい細胞種（例えば血液細胞）からの iPS 細胞作成にも期待できる。しかし、欠点として VSVG は研究者に感染してしまう可能性もあるため注意して取り扱う必要がある。

外胚葉系の皮膚細胞から誘導した iPS 細胞は残存するメチル化などの影響で、血球を含む他

の細胞系譜への分化能が劣る可能性も懸念された。そこで私は①作成したヒト iPS 細胞株と②京都大学で樹立されたヒト iPS 細胞、③コントロールとして血球分化の良いヒト ES 細胞株 KhES-3 を用いて、血球分化能を比較した。どのクローンからも培養 14-15 日目に内部に血液前駆細胞を含む iPS-sac が形成されたが、iPS-sac の形成にはやはりクローン間で差を認めた(図 24)。253G4、TkDA3-4、TkDN4-M は比較的効率よく iPS-sac を形成し、KhES-3 の 80%前後の効率を示したが、201B6、201B7、253G1 に関しては形成効率が悪かったため、実験には主に TkDA3-4、TkDN4-M を用いた。Sac 内部の血液前駆細胞の血球分化能をコロニーアッセイ、及びフィーダー細胞との共培養による巨核球分化により比較した。TkDA3-4、TkDN4-M 由来の血液前駆細胞は KhES-3 とほぼ同程度に好中球、マクロファージ、赤芽球など多系統からなる血球コロニーを形成した(図 26)。巨核球へも 30-60%分化しており、Sac 内部の血液前駆細胞の血球分化能に関しては、ES 細胞とほぼ同程度(図 27)であった。

産生された血小板は、ヒト ES 細胞由来の血小板同様、CD9、CD42a などは CD41a とほぼ一致していたが、CD42b に関してはやはり一部の血小板で発現の低下が見られた。さらに作成したヒト iPS 細胞由来の血小板の内部構造、インテグリン活性化能は、ヒト ES 細胞由来血小板とほぼ同じであった。

同じ皮膚細胞から同じロットのウイルスで産生したヒト iPS 細胞株でもクローン間の分化能は異なった。原因の一つとして、最初の皮膚細胞自体が分化段階の不均一な細胞⁶⁰である事、ウイルス遺伝子が組み込まれる際に内在性の遺伝子に影響を与えている事、初期化の状態が不均一である事が考えられた。

最後に血球分化後に導入した遺伝子の再活性化を起こしていないかに関しては、血小板に関

して考察すれば、使用前にフィルターや放射線により有核細胞を除去できるため、問題とはならないが、他の血球の利用を考えると考慮しなければならない。マウス iPS 細胞で作成したキメラマウスでは高率に Myc 再活性化によるガン化が起きており、ヒト iPS 細胞から試験管内で誘導した血球に関しても注意深く観察しなければならない。今後私は分化させた血球を回収し、RT-PCR により遺伝子の再活性化の有無を調べ、安全性を確認する予定である。

本研究を通して、私は皮膚から作成されたヒト iPS 細胞でも適切なクローンを選択する事で、ヒト ES 細胞と同様に機能を保持した血液細胞を産生できることを証明でき、理論的には拒絶を受けないオーダーメイドの血小板を産生できることを証明した（図 18）。繰り返し血小板輸血が必要となる患者では、同一の HLA を保持しているドナー由来の iPS 細胞を樹立する、または自己の iPS 細胞を樹立後、異常な遺伝子の修復を行い、血小板を誘導するという戦略が将来的に可能となることを示した。

5. 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、終始親身なご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター 幹細胞治療部門教授 中内 啓光博士に謹んで感謝の意を表します。また実験を行うにあたり、親身な御指導、貴重な御助言を賜りました東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター 幹細胞治療部門准教授 江藤 浩之博士に心から感謝申し上げます。本研究を行うにあたって御協力頂いた、東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター 幹細胞治療部門 津久井 弘子 氏、中村 壮 氏、大西 棕子 氏、宮崎大学医学部解剖学講座准教授 澤口 朗 博士、つくば理化学研究所 細胞材料開発室 寛山 隆 博士、筑波大学血液内科 錦井 秀和 博士、筑波大学腎臓内科講師 臼井 丈一 博士に感謝申し上げます。ヒト ES 細胞を御供与いただいた京都大学再生医科学研究所准教授 末盛 博文 博士、ヒト iPS 細胞を御供与いただいた京都大学再生医科学研究所教授 山中 伸弥 博士、助教 高橋 和利 博士に感謝申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、貴重な御助言を賜りました東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター 幹細胞治療部門 准教授 依馬 秀夫 博士、助教 大津 真 博士、助教 紙谷 聡英 博士、助教 金子 新 博士、山崎 聡 氏、魚返 拓利 氏、小林 俊寛 氏、清水 崇史 氏をはじめとした皆様に感謝申し上げます。

本研究のために命を失った数多くのマウスたちに哀悼の意を捧げます。

最後に精神的援助をしていただいた両親、兄弟、妻に感謝いたします。

6. 参考文献

1. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292:154–156.
2. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 1984;309:255–256.
3. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145–1147.
4. Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. In vivo tumor formation from primate embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*. 2006;329:459–467.
5. Webb IJ, Anderson KC. Risks, costs, and alternatives to platelet transfusions. *Leuk Lymphoma*. 1999;34:71–84.
6. McCullough J. Current issues with platelet transfusion in patients with cancer. *Semin Hematol*. 2000;37:3–10.
7. Hoffmeister KM, Felbinger TW, Falet H, et al. The clearance mechanism of chilled blood platelets. *Cell*. 2003;112:87–97.
8. van der Meer PF, Pietersz RN. Gamma irradiation does not affect 7-day storage of platelet concentrates. *Vox Sang*. 2005;89:97–99.
9. Eto K, Murphy R, Kerrigan SW, et al. Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling. *Proc Natl Acad*

Sci U S A. 2002;99:12819–12824.

10. Eto K, Leavitt AL, Nakano T, Shattil SJ. Development and analysis of megakaryocytes from murine embryonic stem cells. *Methods Enzymol.* 2003;365:142–158.

11. Fujimoto TT, Kohata S, Suzuki H, Miyazaki H, Fujimura K. Production of functional platelets by differentiated embryonic stem (ES) cells in vitro. *Blood.* 2003;102:4044–4051.

12. Nishikii H, Eto K, Tamura N, et al. Metalloproteinase regulation improves in vitro generation of efficacious platelets from mouse embryonic stem cells. *J Exp Med.* 2008;205:1917–1927.

13. Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, et al. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science.* 2003;302:103–106.

14. Gaur M, Kamata T, Wang S, Moran B, Shattil SJ, Leavitt AD. Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells: a genetically tractable system to study megakaryocytopoiesis and integrin function. *J Thromb Haemost.* 2006;4:436–442.

15. Schiffer CA. Diagnosis and management of refractoriness to platelet transfusion. *Blood Rev.* 2001;15:175–180.

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

17. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007;448:313-317.
18. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861-872.
19. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008;26:101-106.
20. Shi Y, Do JT, Desponts C, Hahm HS, Scholer HR, Ding S. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;2:525-528.
21. Matsunaga T, Tanaka I, Kobune M, et al. Ex vivo large-scale generation of human platelets from cord blood CD34+ cells. *Stem Cells*. 2006;24:2877-2887.
22. Li J, Yang C, Xia Y, et al. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood*. 2001;98:3241-3248.
23. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*. 1985;87:27-45.
24. Nakano T, Kodama H, Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science*. 1994;265:1098-1101.
25. Schmitt TM, de Pooter RF, Gronski MA, Cho SK, Ohashi PS,

Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro. *Nat Immunol.* 2004;5:410–417.

26. Suemori H, Yasuchika K, Hasegawa K, Fujioka T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N. Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;345:926–932.

27. Umeda K, Heike T, Yoshimoto M, et al. Development of primitive and definitive hematopoiesis from nonhuman primate embryonic stem cells in vitro. *Development.* 2004;131:1869–1879.

28. Hiroyama T, Miharada K, Aoki N, et al. Long-lasting in vitro hematopoiesis derived from primate embryonic stem cells. *Exp Hematol.* 2006;34:760–769.

29. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem.* 1985;260:11107–11114.

30. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest.* 2005;115:3348–3354.

31. Cortin V, Garnier A, Pineault N, Lemieux R, Boyer L, Proulx C. Efficient in vitro megakaryocyte maturation using cytokine cocktails optimized by statistical experimental design. *Exp Hematol.* 2005;33:1182–1191.

32. Feng Y, Zhang L, Xiao ZJ, et al. An effective and simple expansion system for megakaryocyte progenitor cells using a combination of heparin with thrombopoietin and interleukin-11. *Exp Hematol.* 2005;33:1537-1543.
33. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* 1998;125:725-732.
34. Terayama N, Terada T, Nakanuma Y. A morphometric and immunohistochemical study on angiogenesis of human metastatic carcinomas of the liver. *Hepatology.* 1996;24:816-819.
35. Schipper LF, Brand A, Reniers N, Melief CJ, Willemze R, Fibbe WE. Differential maturation of megakaryocyte progenitor cells from cord blood and mobilized peripheral blood. *Exp Hematol.* 2003;31:324-330.
36. Wang L, Li L, Shojaei F, et al. Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity.* 2004;21:31-41.
37. Shivdasani RA. Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation. *Stem Cells.* 2001;19:397-407.
38. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest.* 2005;115:3339-3347.
39. Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis.* 2004;7:335-345.

40. Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol.* 1998;141:1659-1673.
41. Roy H, Bhardwaj S, Babu M, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of placental growth factor to perivascular tissue induces angiogenesis via upregulation of the expression of endogenous vascular endothelial growth factor-A. *Hum Gene Ther.* 2005;16:1422-1428.
42. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002;8:1227-1234.
43. Peerlinck K, De Lepeleire I, Goldberg M, et al. MK-383 (L-700,462), a selective nonpeptide platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist, is active in man. *Circulation.* 1993;88:1512-1517.
44. Chadwick K, Wang L, Li L, et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood.* 2003;102:906-915.
45. Kennedy M, D'Souza SL, Lynch-Kattman M, Schwantz S, Keller G. Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood.* 2007;109:2679-2687.
46. Zhang P, Li J, Tan Z, et al. Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood.* 2008;111:1933-1941.

47. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 1994;269:25646–25654.
48. Xu MJ, Matsuoka S, Yang FC, et al. Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood.* 2001;97:2016–2022.
49. Tober J, Koniski A, McGrath KE, et al. The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood.* 2007;109:1433–1441.
50. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001;12:261–273.
51. Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, et al. Structures of glycoprotein Ib α and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science.* 2002;297:1176–1179.
52. Bergmeier W, Burger PC, Piffath CL, et al. Metalloproteinase inhibitors improve the recovery and hemostatic function of in vitro-aged or -injured mouse platelets. *Blood.* 2003;102:4229–4235.
53. Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science.* 2007;317:1767–1770.
54. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J Clin Invest.*

2008;118:710–721.

55. Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007;448:318–324.

56. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science*. 2008.

57. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007;318:1920–1923.

58. Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:11400–11406.

59. Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2008;134:877–886.

60. Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci*. 2004;117:667–675.

表1 マウスES細胞からの成熟血球分化誘導法

細胞系譜	培養方法	サイトカイン	参考文献
巨核球、血小板	OP9,EB	TPO IL-6,IL11	Blood. 2000;95: 870-878 Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:12819 Methods Enzymol. 2003;365: 39 Blood. 2003;102: 4044 Methods Enzymol. 2003;365: 142 Genes Cells. 2004;9: 1213
赤血球	OP9,EB	EPO,SCF Insulin,IGF-1,IL-3	Mol Cell Biol. 1993;13: 473 Science. 1994;265: 1098 Science. 1996;272: 722 Methods Enzymol. 2003;365: 39 Blood. 2004;104: 1873
脂肪細胞	EB	IL-3,SCF	EMBO J. 2000; 19: 5387 Int J Hematol. 2002; 75: 345
マクロファージ	OP9,EB	IL-1,IL-3,M-CSF, GM-CSF	Science. 1994;265: 1098 Exp Cell Res. 2004;300: 335 Arter. Thromb Vasc Biol. 1998;18:1647 Blood. 1996;88: 2722
T細胞	OP9,OP9-DL1	Flt-3 ligand,IL-7	Blood. 2003;102: 1649 Nat Immunol. 2004;5: 410
B細胞	OP9	Flt-3 ligand,IL-7	Science. 1994;265: 1098 Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96: 9797 Methods Enzymol. 2003;365: 158
好酸球	OP9	IL-5,IL-3, GM-CSF,eotaxin	Br J Haematol. 2004;124: 819
好中球	EB,OP9	OSM,b-FGF,IL-6,IL-11 ,LIF,SCF,G-CSF ,GM-CSF,	Blood. 2004;103: 852 Methods Enzymol. 2003;365: 129
樹状細胞	EB,OP9	GM-CSF,IL-3, IL-4,TNF- α , LPS, anti-CD40	Blood. 2003;101: 3501 Curr Biol. 2000; 10: 1515 Methods Enzymol. 2003;365: 169
NK細胞	OP9	Flt-3 ligand,IL-7,IL-6 ,IL-15,SCF	Methods Enzymol. 2003;365: 158 J Immunol. 2002;168: 4980

マウスES細胞から成熟血球を分化誘導した主な報告の一覧を示す。

EB:embryoid body、TPO:thrombopoietin、IL-6:interleukin 6、EPO:erythropoietin、SCF:stem cell factor、IGF-1:insulin-like growth factor、M-CSF:macrophage colony-stimulating factor、GM-CSF:granulocyte/macrophage colony-stimulating factor、DL-1:Delta-like-1、LPS:lipopolysaccharide、OSM:oncostatin M、b-FGF:basic fibroblast growth factor、LIF:leukemia inhibitory factor、G-CSF:granulocyte colony-stimulating factor、TNF- α :tumor necrosis factor α

表2 ヒトES細胞からの成熟血球分化誘導法

細胞系譜	培養法	サイトカイン	参考文献
巨核球	OP9 OP9, 10T1/2	TPO VEGF, TPO	J Thromb Haemost2006;4:436 Blood2008;111:5298
赤血球	EB EB FH-B-hTERT, S17 FH-B-hTERT mFLSC	EPO, VEGF EPO, SCF, Flt3L, BMP4, IGF-I	Blood2004;103:2504 Blood2005;106:860 Ex Hematol2005;33:1450 Ex Hematol2006;34:1635 PNAS2008;105:13087
好中球	EB変法	IGF-II, VEGF, SCF, Flt3-L TPO, G-CSF	Stem cells2008
NK細胞	S17→AFT024	IL-15, IL-3 IL-7, SCF, Flt3L	J Immunol2005;175:5095
樹状細胞	OP9	IL-4, GM-CSF	J Immunol2006;176:2924
Bリンパ球	OP9→MS-5	SCF, Flt3L, IL-3, IL-7	Blood2005;105:617
Tリンパ球	OP9→マウス体内		PNAS2006;103:11742

ヒトES細胞から成熟血球を分化誘導した主な報告の一覧を示す。

EB:embryoid body、TPO:thrombopoietin、IL-6:interleukin 6、EPO:erythropoietin、
SCF:stem cell factor、IGF:insulin-like growth factor、M-CSF:macrophage
colony-stimulating factor、GM-CSF:granulocyte/macrophage colony-stimulating factor、
DL-1:Delta-like-1、LPS:lipopolysaccharide、OSM:oncostatin M
b-FGF:basic fibroblast growth factor、G-CSF:granulocyte colony-stimulating factor
VEGF: vascular endothelial growth factor

表3 RT-PCRプライマー1

GAPDH	5'- AAC AGC CTC AAG ATC ATC AGC -3', 5'- TTG GCA GGT TTT TCT AGA CGG -3'
GATA-1	5'- TCA ATT CAG CAG CCT ATT CC -3 5'- TTC GAG TCT GAA TAC CAT CC -3'
GATA-2	5'- TGT TGT GCA AAT TGT CAG ACG -3' 5'- ACT TTG ACA GCT CCT CGA AGC -3'
FOG-1	5'- GCC ACC GCA GTG ATC AAC AAA -3' 5'- AAG TGG CTG TAG AGG ATG TCC -3'
Fli-1	5'- TAA GAA TAC AGA GCA ACG GCC -3', 5'- GGC ATG TAG GAG ATG TCA GAA -3'
NF-E2	5'- ATG AGC TAT TGG CAA GGT ACC -3' 5'- TAC TCT TCA GGA GAG TAG CTG -3'
GPIb α	5'- AAT CCA CTA CTG AAC CAA CCC -3', 5'- GGG TGG AGA AAA GGG TCA TTT -3'

上記プライマーを用いて、ヒトES細胞由来血液前駆細胞及び巨核球の半定量RT-PCRを行った。

表4 RT-PCRプライマー2

5'-ACGATCGTGGCCCCGAAAAGGACC-3'	endo hKlf4
5'-TGATTGTAGTGCTTTCTGGCTGGGCTCC-3'	
5'-GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG-3'	endo hOct3/4
5'-CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC-3'	
5'-GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAGAGG-3'	endo hSox2
5'-TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG-3'	
5'-GCGTCCTGGGAAGGGAGATCCGGAGC-3'	endo hc-Myc
5'-TTGAGGGGCATCGTCGCGGGAGGCTG-3'	
5'-CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC-3'	hNanog
5'-CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTCCACC-3'	
5'-CAGATCCTAACAGCTCGCAGAAT-3'	hREX1
5'-GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA-3'	
5'-TGCGGCAAAACCTACACAAAG-3'	Tg hKlf4
5'-TACAGGTGGGGTCTTTCATTC-3'	
5'-CAACGAGAGGATTTTGAGGCT	Tg hOct3/4
5'-TACAGGTGGGGTCTTTCATTC-3'	
5'-TGCAGTACAACCTCCATGACCA-3'	Tg hSox2
5'-TACAGGTGGGGTCTTTCATTC-3'	
caacaaccgaaaatgcaccagccccag	
5'-CAACAACCGAAAATGCACCAGCCCCAG	Tg hc-Myc
5'-TACAGGTGGGGTCTTTCATTC-3'	

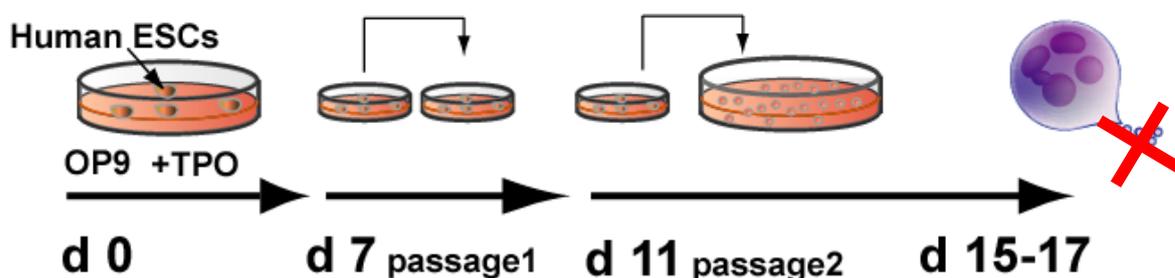
Endo; 内在性遺伝子の発現

Tg; ウイルスによる外来性遺伝子の発現

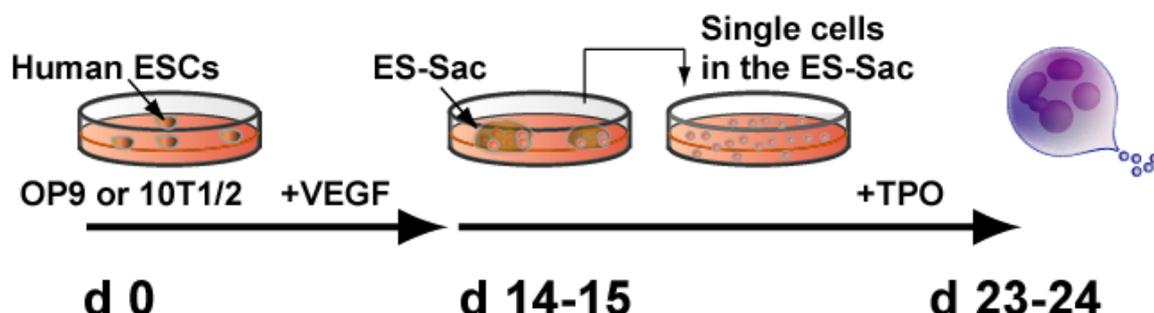
上記プライマーを用いて、ヒト皮膚細胞及びヒト皮膚細胞由来のiPS細胞の半定量RT-PCRを行った。

図1 ヒトES細胞から巨核球/ 血小板への分化誘導法の比較

(i) Protocol 1 (Previous report)

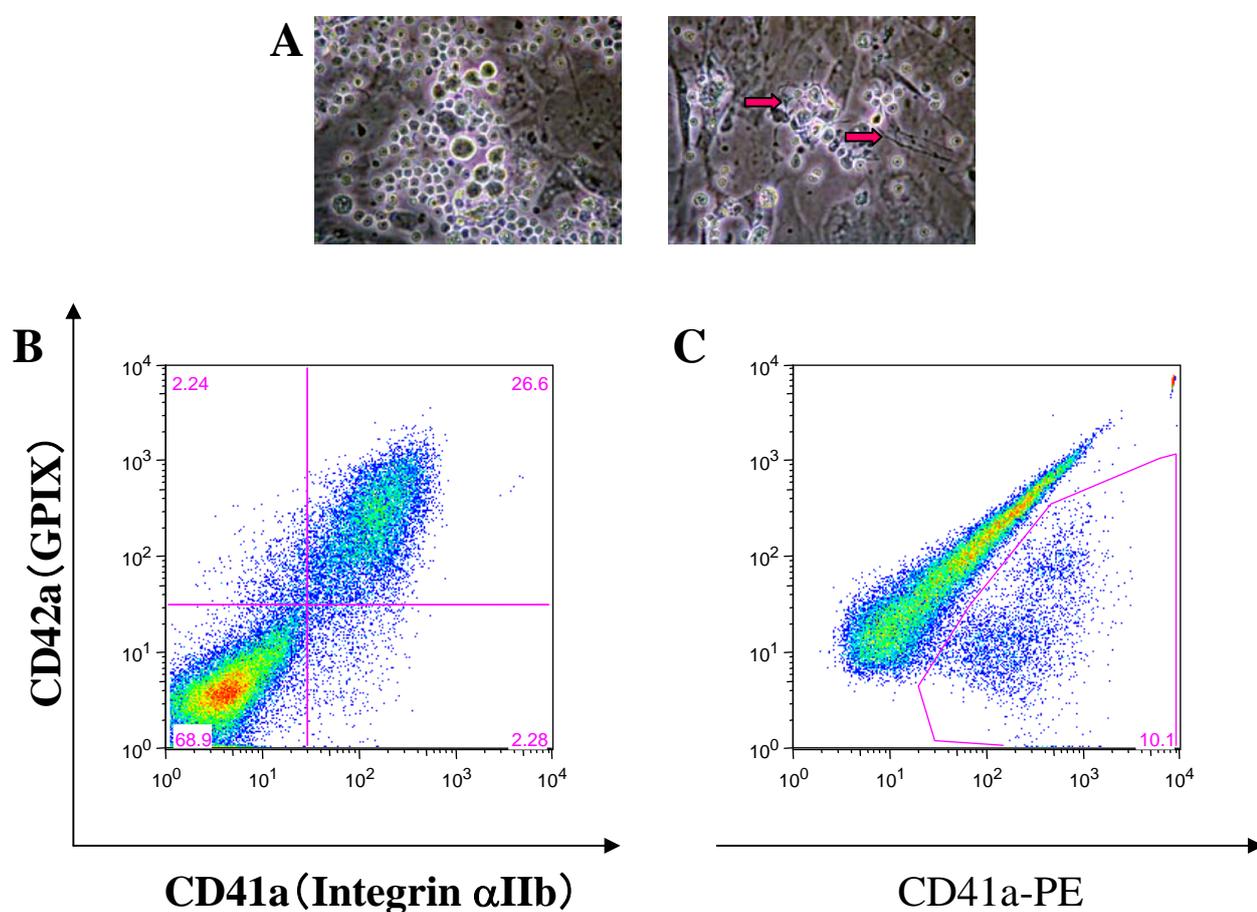


(ii) Protocol 2 (ES-sacs; our protocol in this study)



- i) プロトコール1:マウスES細胞からの血小板誘導法をもとに、2006年に Gaurらが報告した手法。ヒトES細胞をTPO 100ng/ml存在下でOP9細胞株と共培養した。培養7、11日目に新たなOP9細胞上に播き直し、培養15-17日目に解析した。
- ii) プロトコール2: 増殖を止めたOP9または10T1/2細胞株上で、ヒトES細胞を播き直さずに、15日間培養した。培養7、10、15日目の浮遊細胞と、囊状構造体ES-sac内部に含まれる血液前駆細胞を回収し、新たなフィーダー細胞上で、TPO 100ng/ml存在下でさらに8-9日間培養を行った。

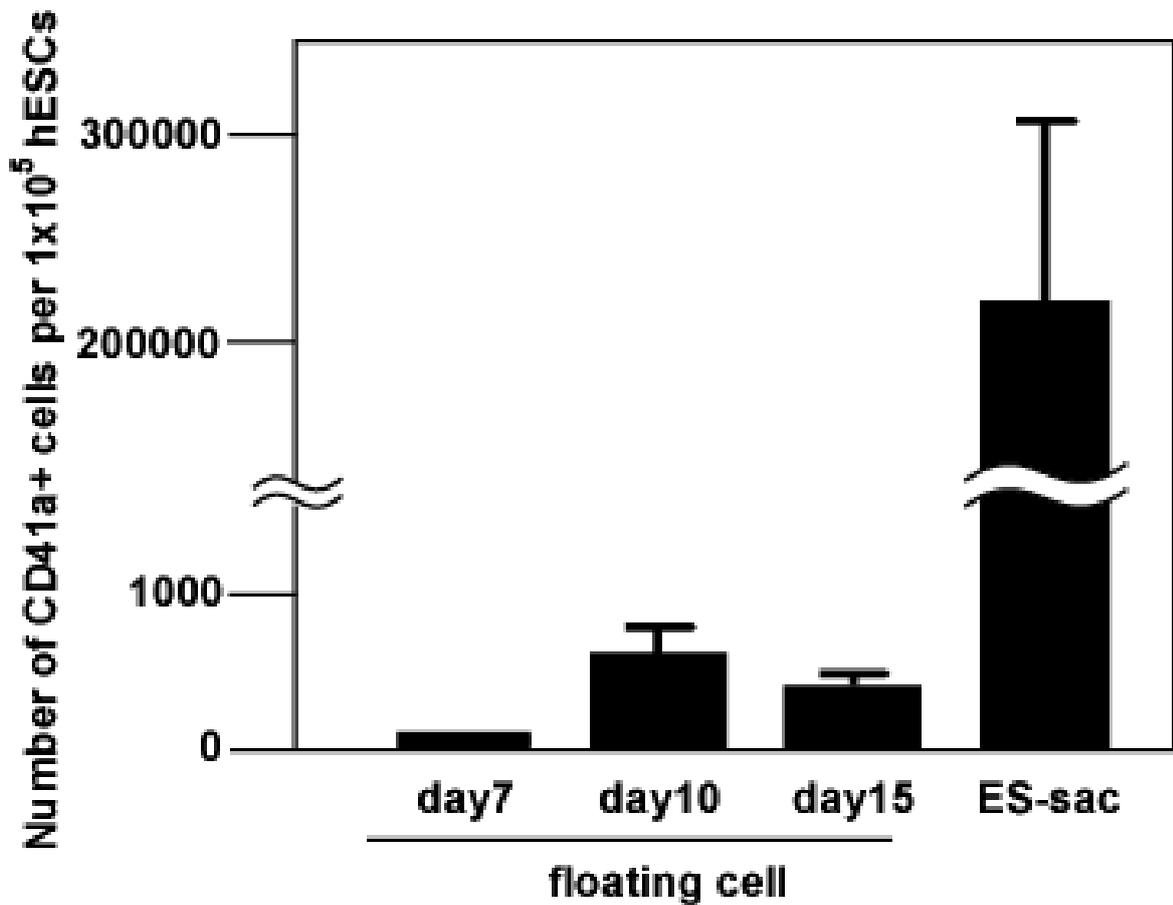
図2 カニクイザルES細胞由来 巨核球/血小板



カニクイザルES細胞 (CMK6) 由来巨核球と血小板

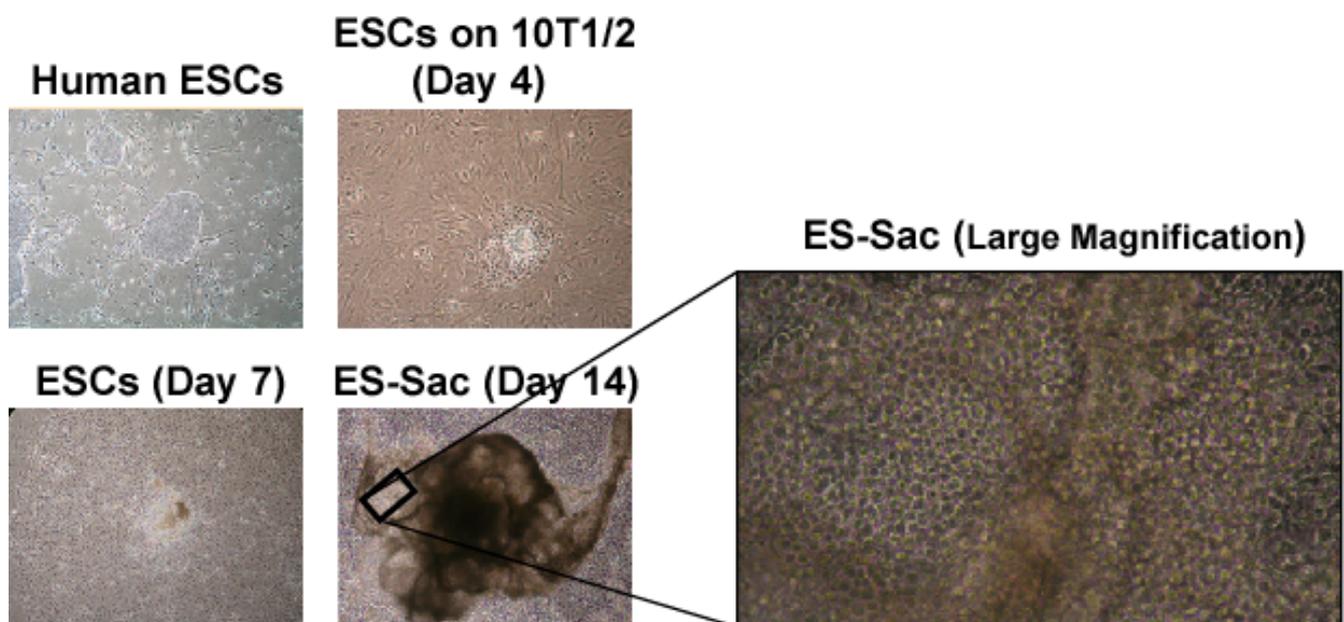
- A. 培養14日目のCMK6由来血液細胞
大型の細胞が増加し、一部に胞体突起形成（プロプレイトレット）を伴う細胞が観察できた。
- B. 培養14日目の血液細胞のフローサイトメーターによる解析
巨核球マーカーであるCD41a陽性/CD42a陽性の細胞が30%存在した。
- C. 培養14日目の培養液中に放出された血小板
ヒト末梢血由来の血小板をコントロールとしてFSC、SSCゲートを設定した。CD41a陽性の血小板と思われる小細胞片が存在した。

図3 ヒトES細胞由来血液前駆細胞のCD41a陽性細胞へ分化能の比較



浮遊している血液前駆細胞に関しては、培養10日目にピークを迎えるが、培養15日目に付着しているヒトES細胞コロニー由来のES-sac内部の血液前駆細胞は浮遊細胞中の血液前駆細胞の数百倍CD41a陽性細胞を産生する能力が高いことが分かった。

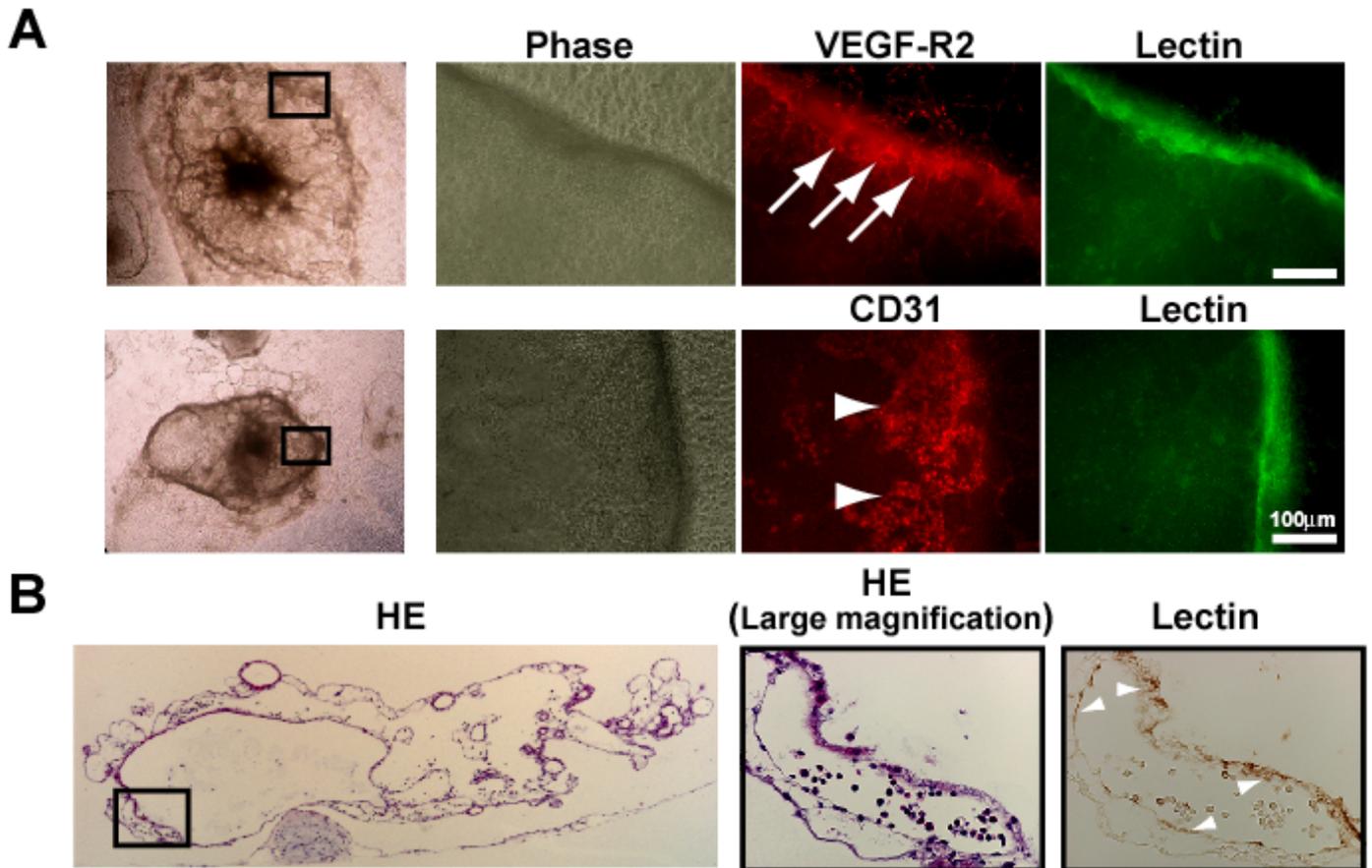
図4 ヒトES細胞由来囊状構造体 ‘ES-sac’



ES-sacの形成過程

単層平坦なヒトES細胞が培養7日目頃より徐々に隆起し、培養14-15日目には内部に血球様の球状細胞を含む囊状構造体‘ES-sac’が多数形成された。

図5 ES-sacの性状解析



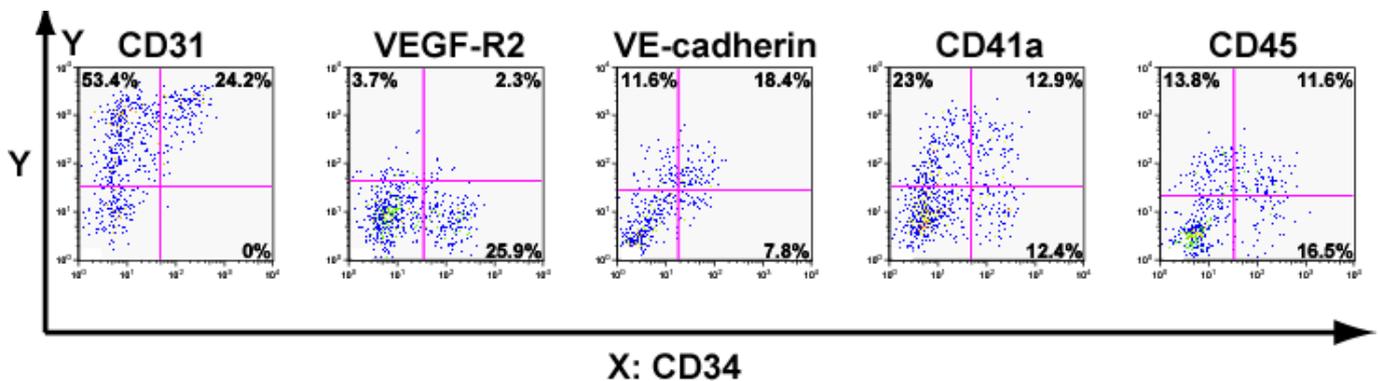
A. ES-sacの免疫染色像

ES-sacの囊状組織には内皮細胞抗原であるCD31やVEGF-R2が発現していた。また内皮細胞特異的であるUEA-Iレクチン結合能を有していた。内部の血球様細胞はCD31陽性であった。

B. ES-sacのホルマリン切片

ES-sac内部は多数の小胞から構成されており、小胞の壁はUEA-Iレクチン結合能を有する単層の細胞から構成されていた。小胞内部には血球様の細胞が確認された。

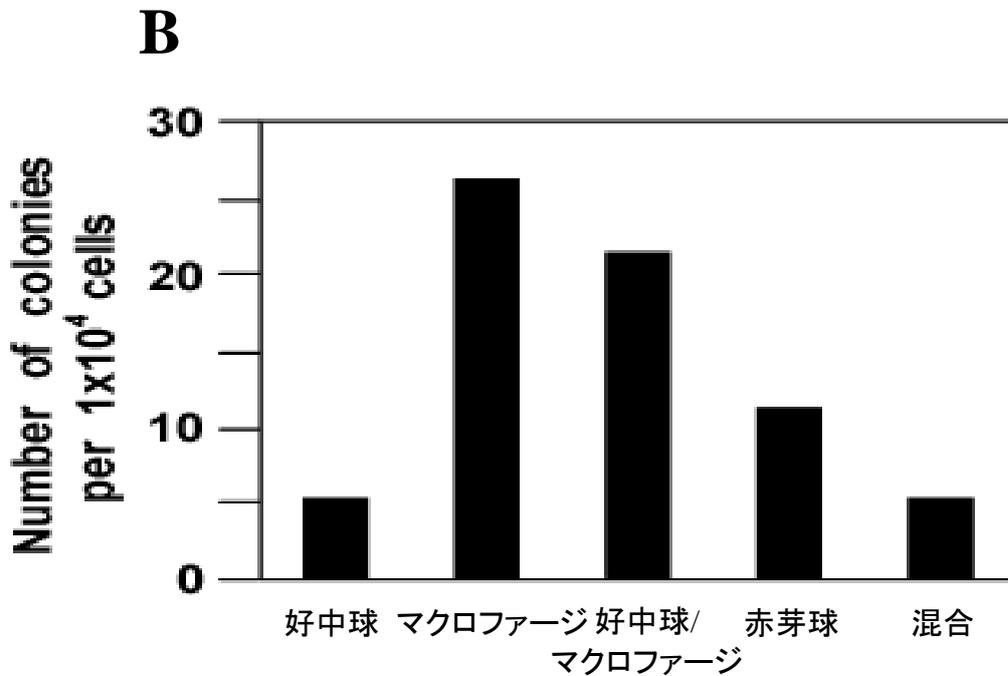
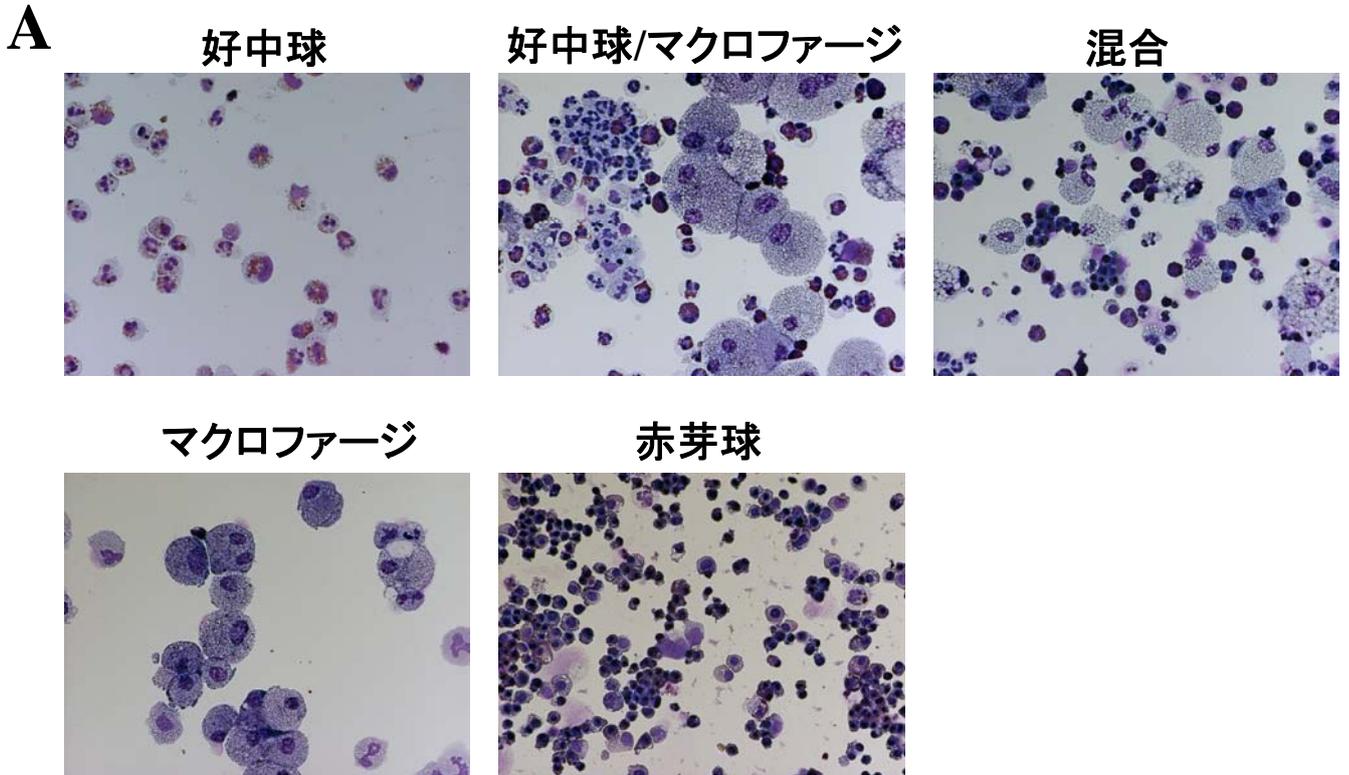
図6 ES-sac内部の血液前駆細胞



ES-sac内部の血液前駆細胞の表面抗原

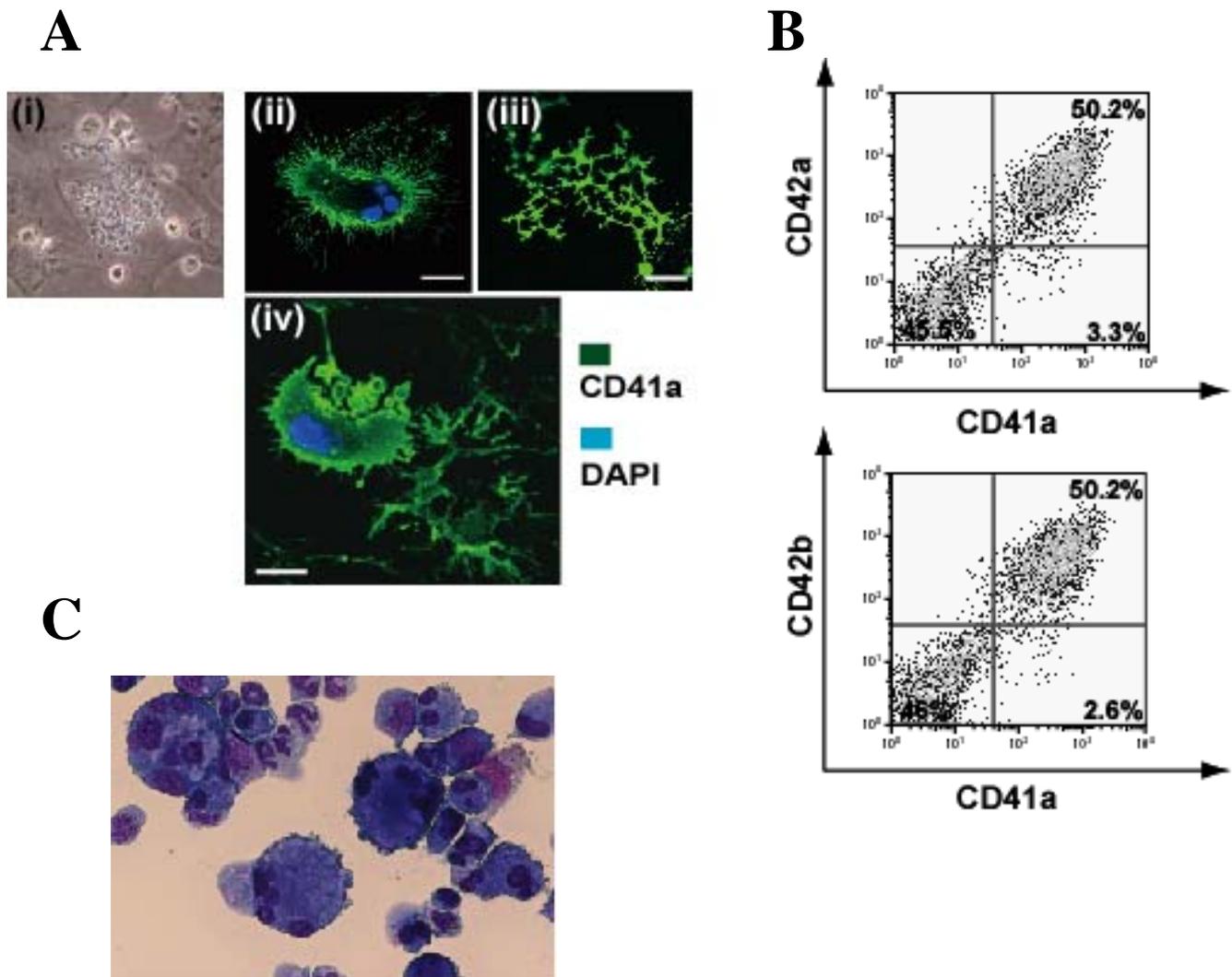
未熟な血管内皮、血液前駆細胞の共通抗原となるCD31陽性/CD34陽性の細胞が観察された。巨核球前駆細胞と報告されているCD34陽性/CD41a陽性細胞集団も観察された。VEGF-R2はほぼ陰性だった。

図7 ヒトES細胞由来血球コロニー



A. 血球コロニーのギムザ染色像
 B. ES-sac内部の血液前駆細胞のコロニー形成細胞数の頻度

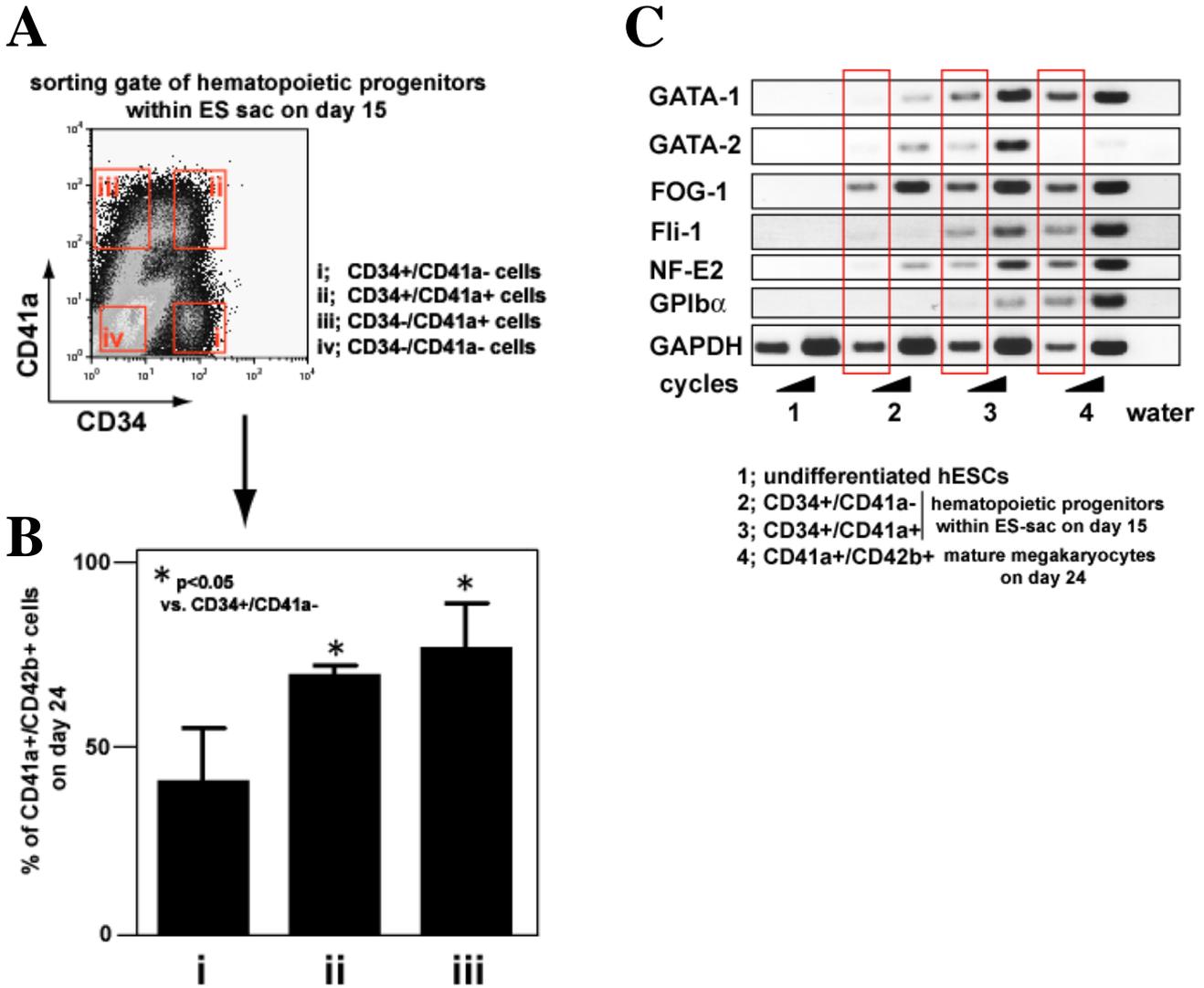
図8 ヒトES細胞由来巨核球



ヒトES細胞由来巨核球

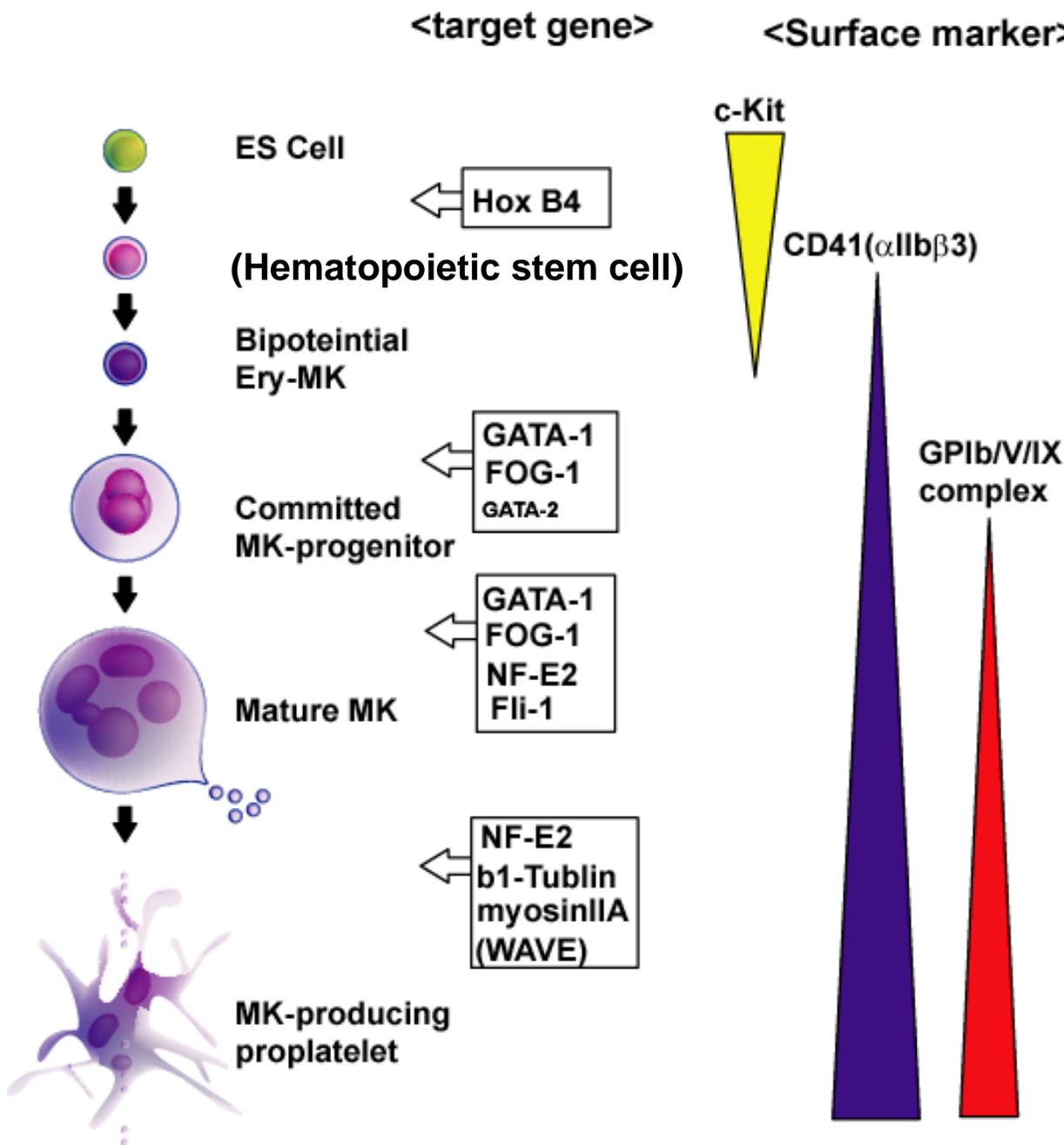
- A. 免疫染色
血小板放出の一形態である胞体突起形成(プロプレイトレット)がCD41a陽性の多核細胞で観察された。
- B. フローサイトメーターによる培養23日目の血液細胞の表面抗原解析
巨核球マーカーであるCD41a陽性/CD42a陽性/CD42b陽性細胞が約50%前後得られた。
- C. ギムザ染色
大型、多核で好塩基性の細胞質を持つ、巨核球様の細胞が散見された。

図9 巨核球前駆細胞



- A. ES-sac内部のCD34/41a分画
CD34+/CD41a+、CD34+/CD41a-、CD34-/CD41a+、CD34-/CD41a-分画をそれぞれフローサイトメーターを用いて、ソーティングし、新たなフィーダー細胞上で、TPO 100ng/ml存在下で8日間培養した。
- B. 播き直し後8日目の血球細胞の表面抗原解析
CD34+/CD41a-細胞からは50%、CD34+/CD41a+とCD34-/CD41a+細胞からは80-90%が成熟巨核球へ分化した。
- C. 巨核球前駆細胞の遺伝子発現(半定量RT-PCR)
GATA-1、Fli-1、NF-E2などの巨核球系の遺伝子はCD34陽性/CD41a陰性分画では発現が弱く、CD34陽性/CD41a陽性分画で発現が上昇していた。

図10 巨核球成熟を調節する遺伝子



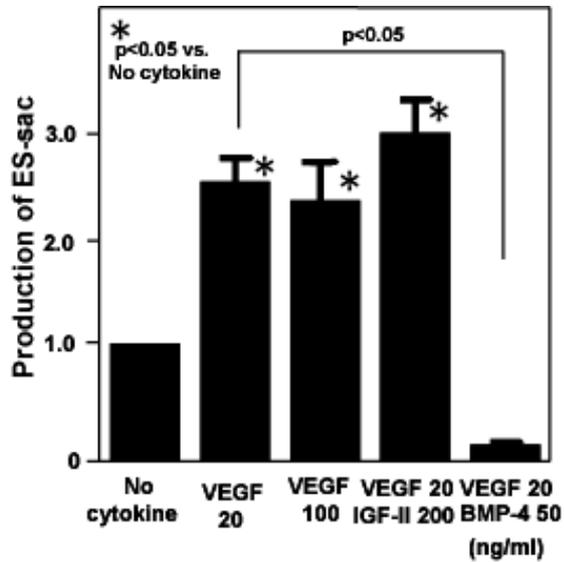
ES細胞から巨核球・血小板への分化経路の概略

マウスES細胞から、巨核球・血小板への分化経路の概略を示す。ES細胞から造血前駆細胞が分化誘導され、試験管内で巨核球・血小板へ分化誘導していく。この過程で骨髄由来の巨核球では分化に必須といわれているGATA-1、FOG-1、Fli-1、NF-E2の発現が上昇していく。

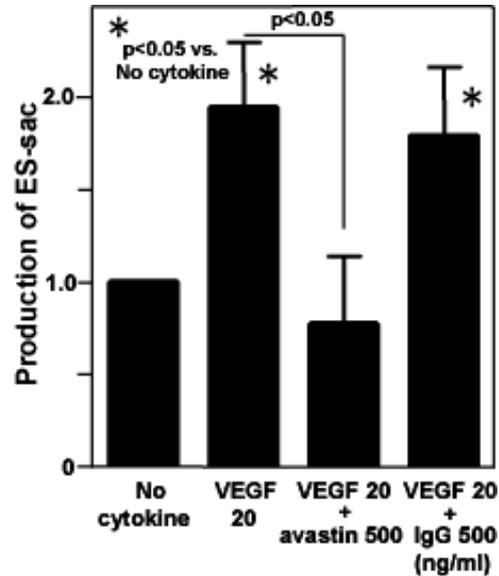
(Nishikii et al. 2008JEM)

図11 各種増殖因子によるES-sac形成への影響

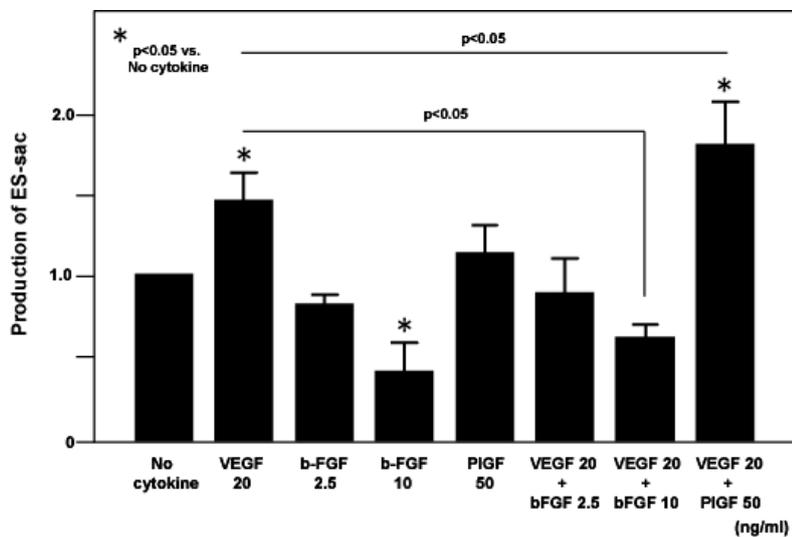
A-i



B

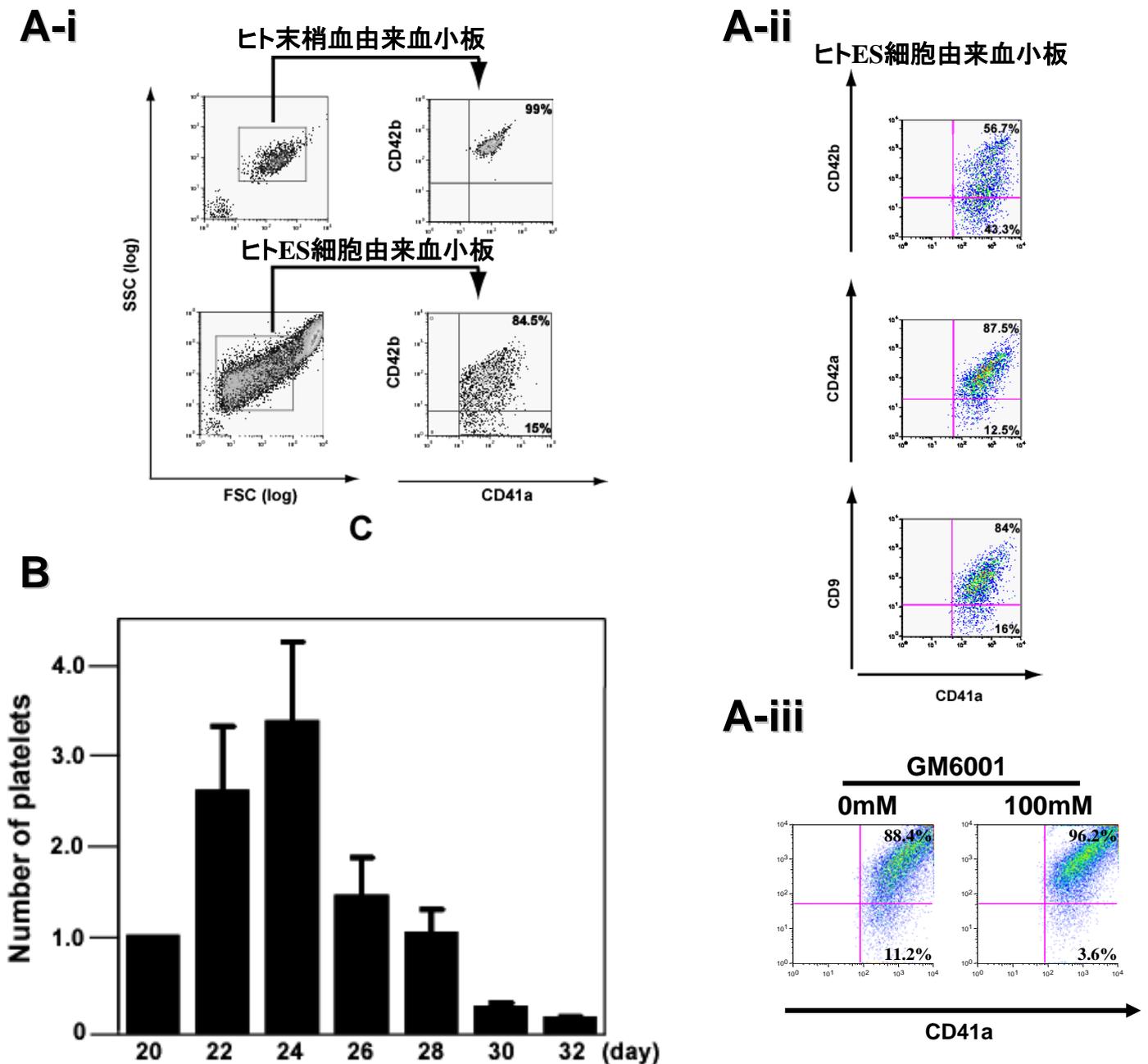


A-ii



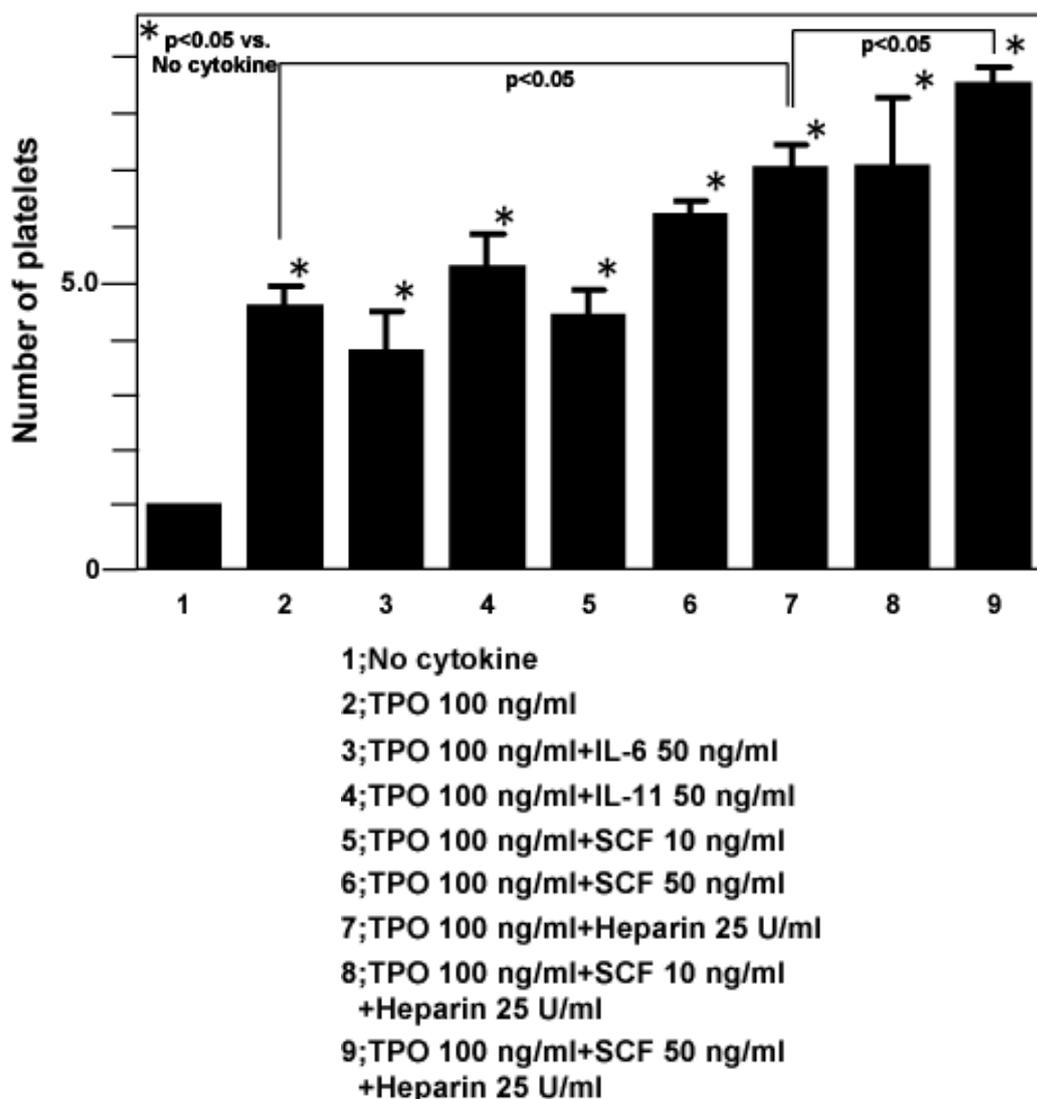
- A-i. ES-sacの形成はVEGF 20ng/mlにより増加した。IGF-IIは影響を与えなかった。BMP-4 50ng/mlを継続して添加すると有意にES-sacの形成を阻害した。
- A-ii. 他の内皮細胞増殖因子であるbFGFは用量依存的にES-sacの形成を阻害した。VEGFファミリーのPIGFは軽度ES-sac形成を促進した。
- B. VEGFによるES-sac形成促進はVEGF中和抗体であるbevacizumabにより阻害された。VEGF特異的な現象であることが確認された。

図12 ヒトES細胞由来血小板



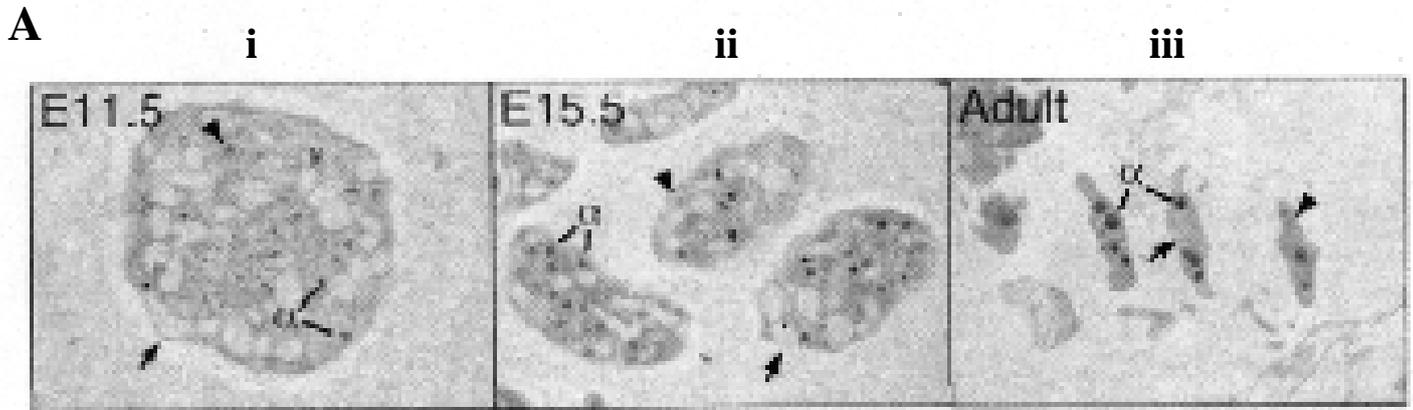
- A. フローサイトメーター培養24日目の上清中の血小板解析
 (i) ヒト末梢血由来血小板のFSC、SSCゲートを基に、培養上清を解析するとCD41a陽性のマイクロパーティクルが存在した。
 (ii) 一部の血小板はCD42bの発現は低下していた。CD42aやCD9の発現はほぼ保たれていた。
 (iii) メタロプロテアーゼ阻害剤によりGPIb α の切断は抑制された。
- B. 培養上清中に放出されるCD41a陽性マイクロパーティクルの経時的変化6
 培養20日目の回収数を1とした。
 血小板数は徐々に増加し、day22-24をピークに減少に転じた。

図13 ヒトES細胞由来血小板を増加させるサイトカイン



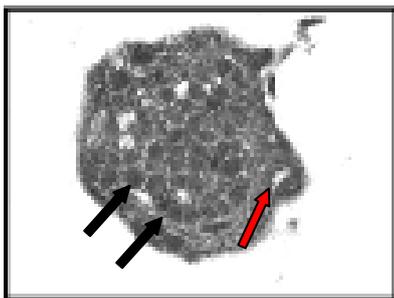
SCF、TPO、Heparinにより血小板数は増加した
 サイトカインを加えない条件での血小板数を1とした。
 TPO 100ng/ml加えると約5倍に増加した。さらに、SCF、Heparinを
 加えると約10倍に増加した。

図14 血小板電顕像

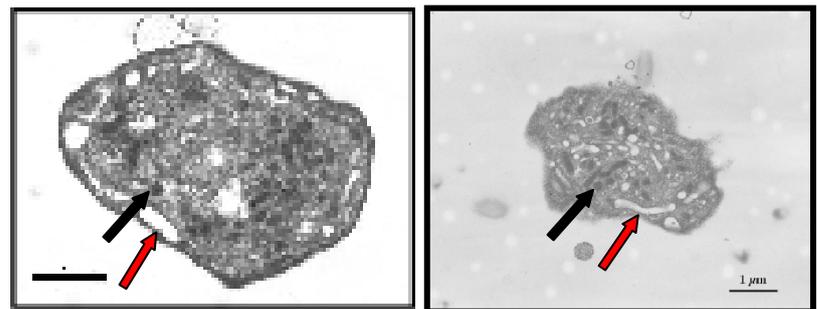


(Tober J et al. 2007 Blood)

B ヒト末梢血由来血小板



C ヒトES細胞由来血小板



← α 顆粒 ← OCS

α 顆粒;FBG,vWV,P2Y1(ADP受容体),GPIV, GPIbα,Integrin αIIb/β3 などを含む

濃染顆粒;Ca²⁺,ADPなどを含む

OCS(開放小管系);ここを通り、顆粒内部の物質が輸送される (血小板生物学より抜粋)

A-i. 胎生11.5日目のマウス卵黄嚢由来血小板

A-ii. 胎生15.5日目のマウス胎児肝由来血小板

A-iii. 成体マウス骨髄由来血小板

卵黄嚢由来の血小板は大型、顆粒が少ない、Open Canalicular System (OCS)が目立つといった特徴が挙げられる。(Tober J et al. 2007 Blood)

B. ヒト末梢血由来血小板

C. ヒトES細胞由来血小板

ヒトES細胞由来血小板は、大小不同、顆粒含まれているものと少ないものが混在する、OCSが目立つといった特徴を持つ。

図15 血栓カスケード

①. 血小板の接着

②. 血小板血栓の成長

③. 血小板血栓の安定化

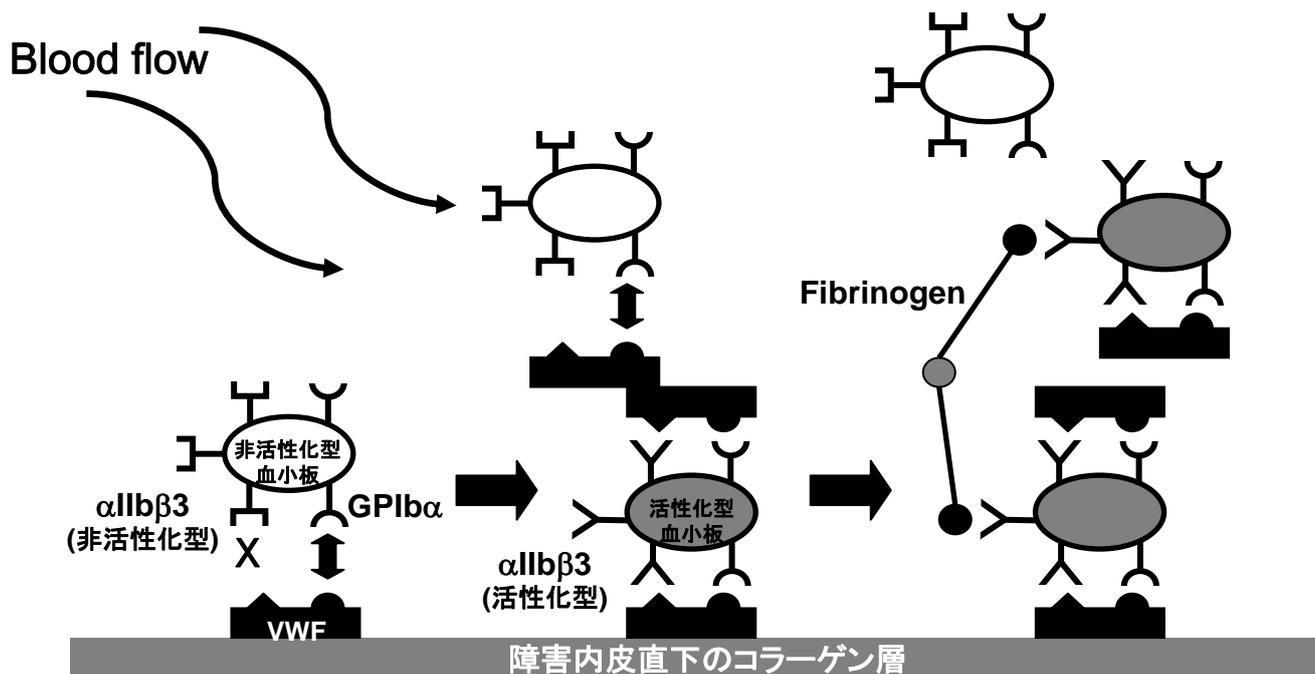


図1. 生体内における血栓形成過程.

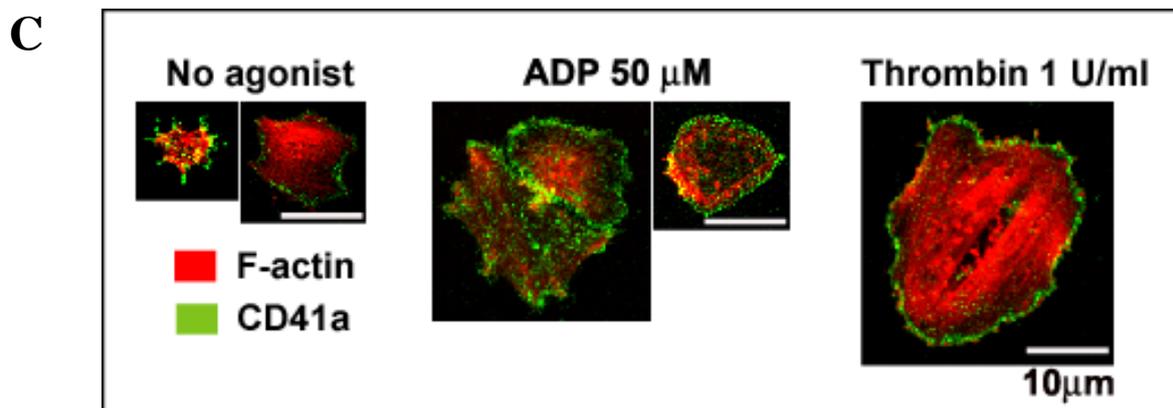
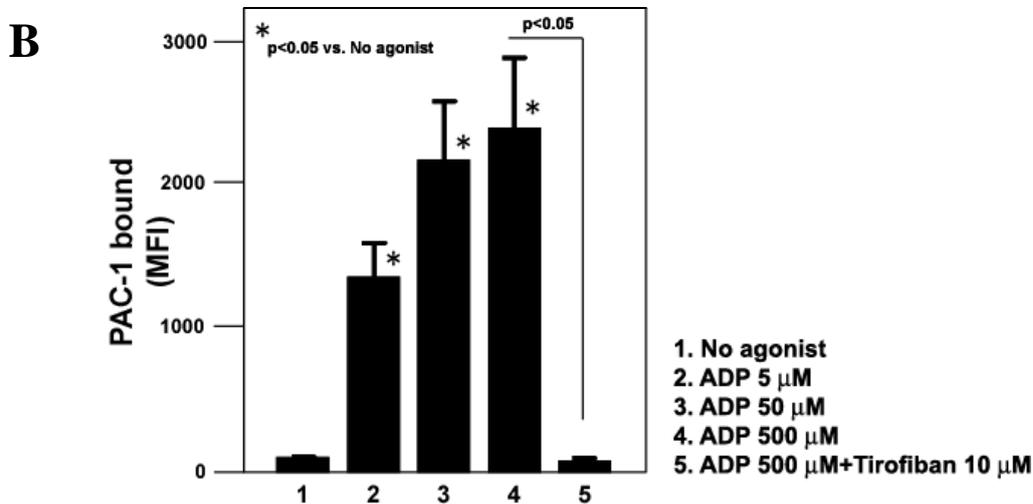
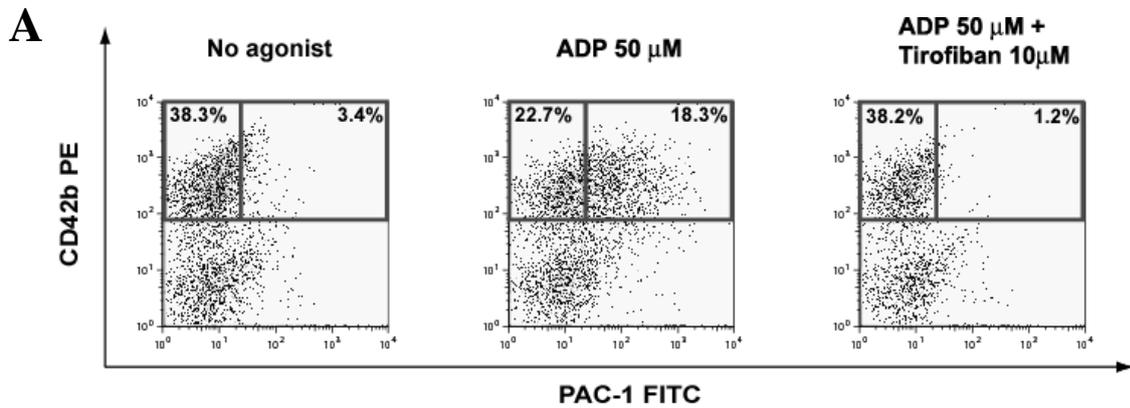
生体内における血栓形成過程を示す。

①まず、障害内皮に露出したコラーゲン層に固層化されたvWF(フォン・ウィル・ブランド因子)と血小板膜表面上のGPIb α が結合し、血小板内に活性化シグナルが伝えられる。

②活性化型に構造変化したインテグリン α IIb β 3(インサイドアウトシグナル)はリガンド結合が可能となる。血小板に結合したvWFを介して流血中の血小板は次々と血小板同士が結合し、血栓は3次的に成長する。

③活性化型となったインテグリン α IIb β 3はフィブリノゲンとも結合し、さらに血小板内部ではダイナミックな骨格変化が引き起こされ(アウトサイドインシグナル)、安定且つ強固な血栓を形成するのを可能にする。

図16 血小板機能解析



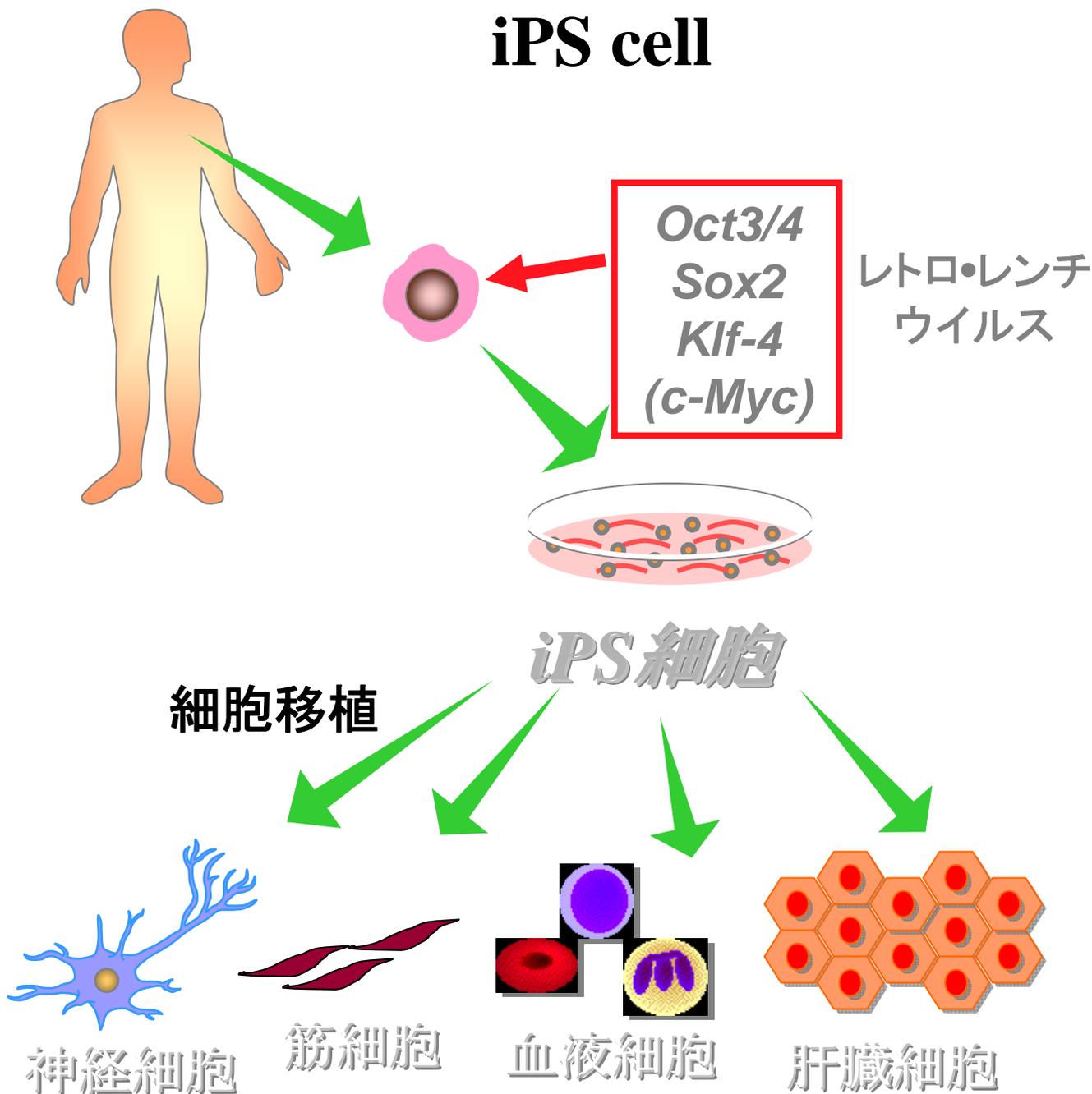
A,B. インサイドアウトシグナル

ヒトES細胞由来血小板のインテグリン活性化能をFACSを用いて解析した。PAC1はヒト活性化型インテグリン α IIb/ β 3複合体を認識して特異的に結合する抗体である。ADP刺激によりPAC1陽性の血小板が増加した。この反応はIntegrin α IIb/ β 3複合体特異的な阻害剤であるティロフィバンで抑制された。

C. アウトサイドインシグナル

インテグリン α IIb活性化に引き続いて起きる骨格変化をフィブリノゲン固層化スライドガラス上で免疫染色を用いて解析した。CD41a陽性の血小板はADP、トロンビンの刺激により、アクチン再重合を伴い糸状仮足、葉状仮足を形成するダイナミックな骨格変化を引き起こした。

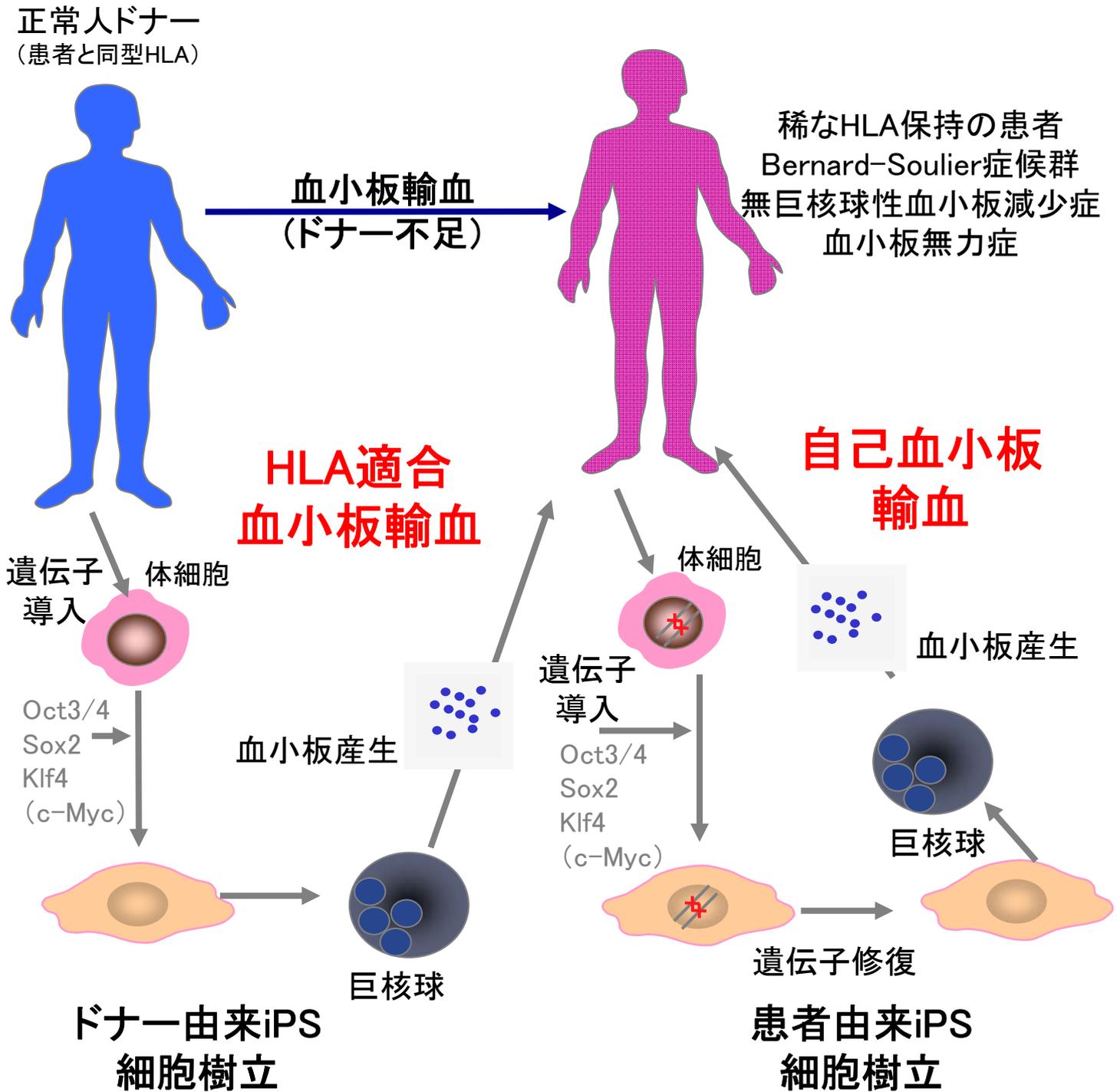
図17 誘導型多能性幹細胞 Induced pluripotent stem cell; iPS cell



山中らのグループはマウスとヒトの体細胞に4つの遺伝子 (*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*) をレトロウイルスを用いて発現させて、ES細胞とほぼ同等の多分化能、増殖能を持つ細胞を誘導した(誘導型多能性幹細胞; iPS細胞)。

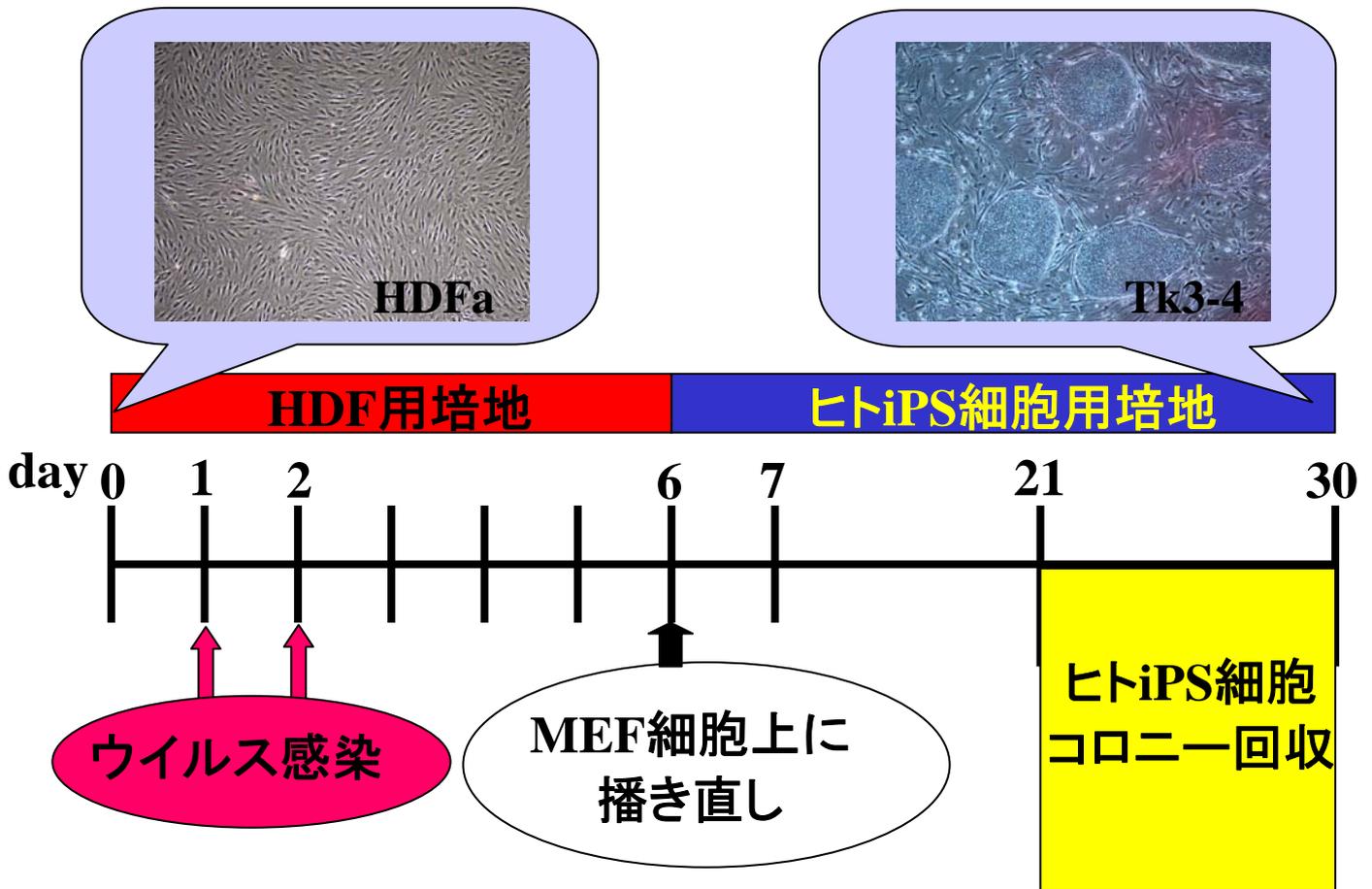
この方法を用いれば初期胚の利用を介さないため倫理的問題点は解決され、また患者個人から採取した細胞を用いて様々な組織を試験管内で作り出すことが理論上可能となった。

図18 オーダーメイド血小板製剤の産生



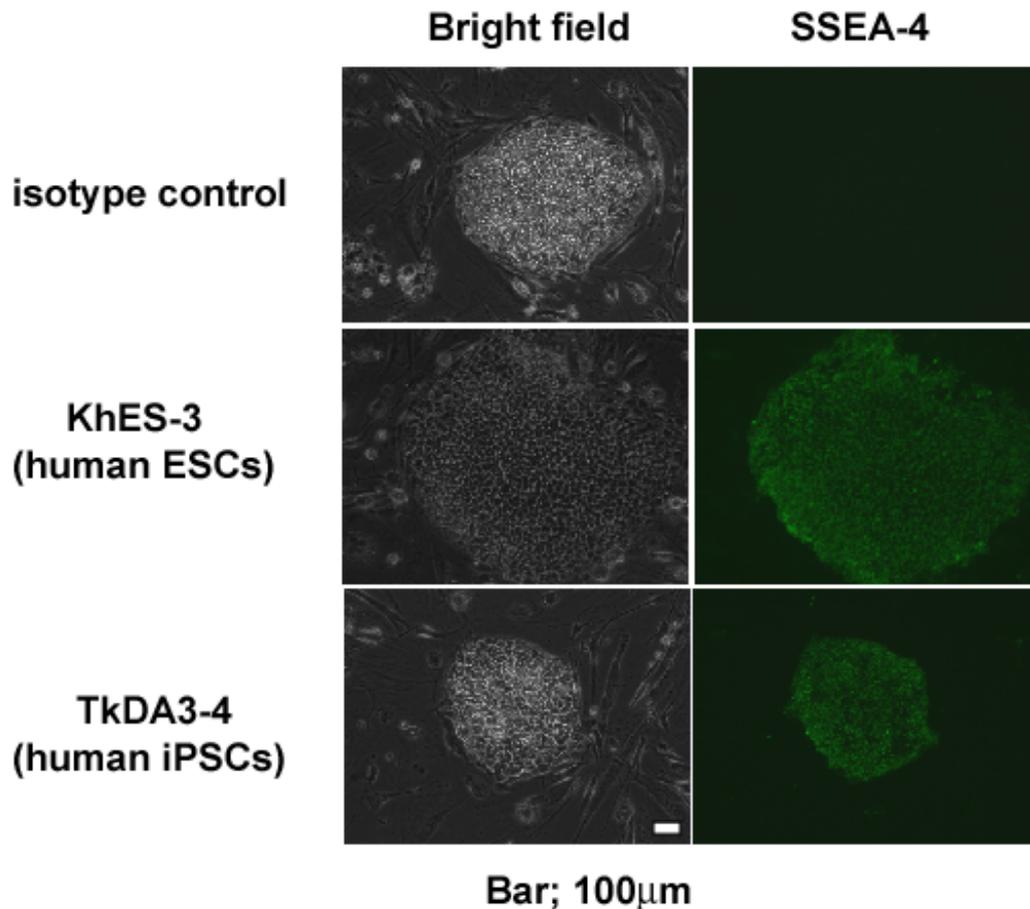
繰り返し血小板輸血が必要な患者に対し、患者と同一のHLAを持ったドナー由来のiPS細胞を樹立することや、患者本人からiPS細胞を樹立し、遺伝子修復後に血小板製剤を作れば、免疫拒絶の受けにくい理想的な血小板製剤が産生可能である。

図19 ヒトiPS細胞樹立 プロトコール



- Day-1: ゼラチンコートした10cmdishにHDFを 8×10^5 細胞数で播種した。
- Day0と1: 培地に最終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにProtamineを加え、各濃縮ウイルスを $100 \mu\text{l}$ ずつ添加し、2日間繰り返した。
- Day2: 最後の感染から24時間後、培地を吸引除去し、新たな培地を加えた。以後3日毎に新鮮培地に変えた。
- Day5: フィーダー細胞に50Gy照射し、増殖を止め、ゼラチンコートした10cm培養皿に 1.5×10^6 細胞数で播種した。
- Day6: ウイルス感染させたHDF細胞を0.05%トリプシンEDTAを用いて単一細胞とし、 5×10^4 細胞で前日用意したフィーダー細胞上に播種した。
- Day7: 培地をヒトES/iPS細胞用の培地に変え、以後2日毎に培地交換を行った。
- Day21-30: ヒトiPS細胞コロニーを回収し、MEF細胞上に播種した。

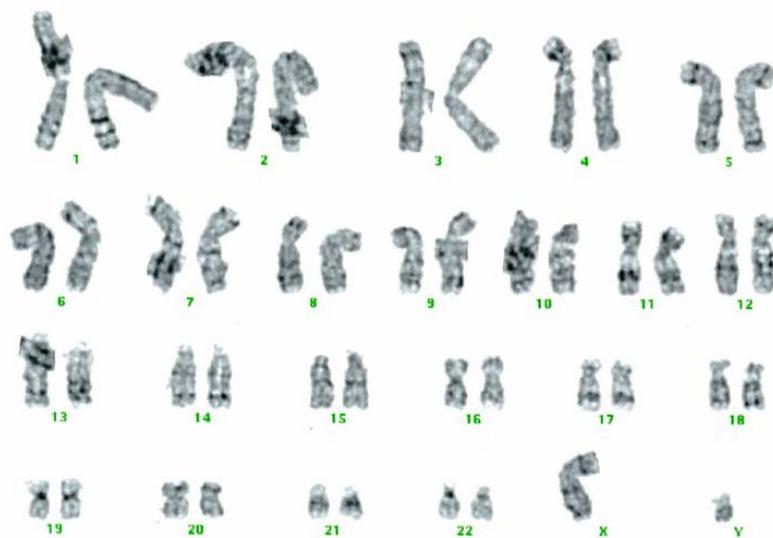
図20 ヒト皮膚細胞由来iPS細胞株 (TkDA-3-4)



成人皮膚細胞から4因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) を導入して樹立したiPS細胞は京都で樹立されたヒトES細胞株 (KhES-3) と同様の平坦で単層のコロニーを呈した。また未分化ES細胞マーカー抗原であるSSEA4抗原の発現は同様に認められた。

図21 ヒトiPS細胞 染色体検査

TkDN4-M



253G1 (3 f); 46XX (50細胞中1細胞で46,XX,der(9)t(9;12)(p24;q13),-12,+mar)

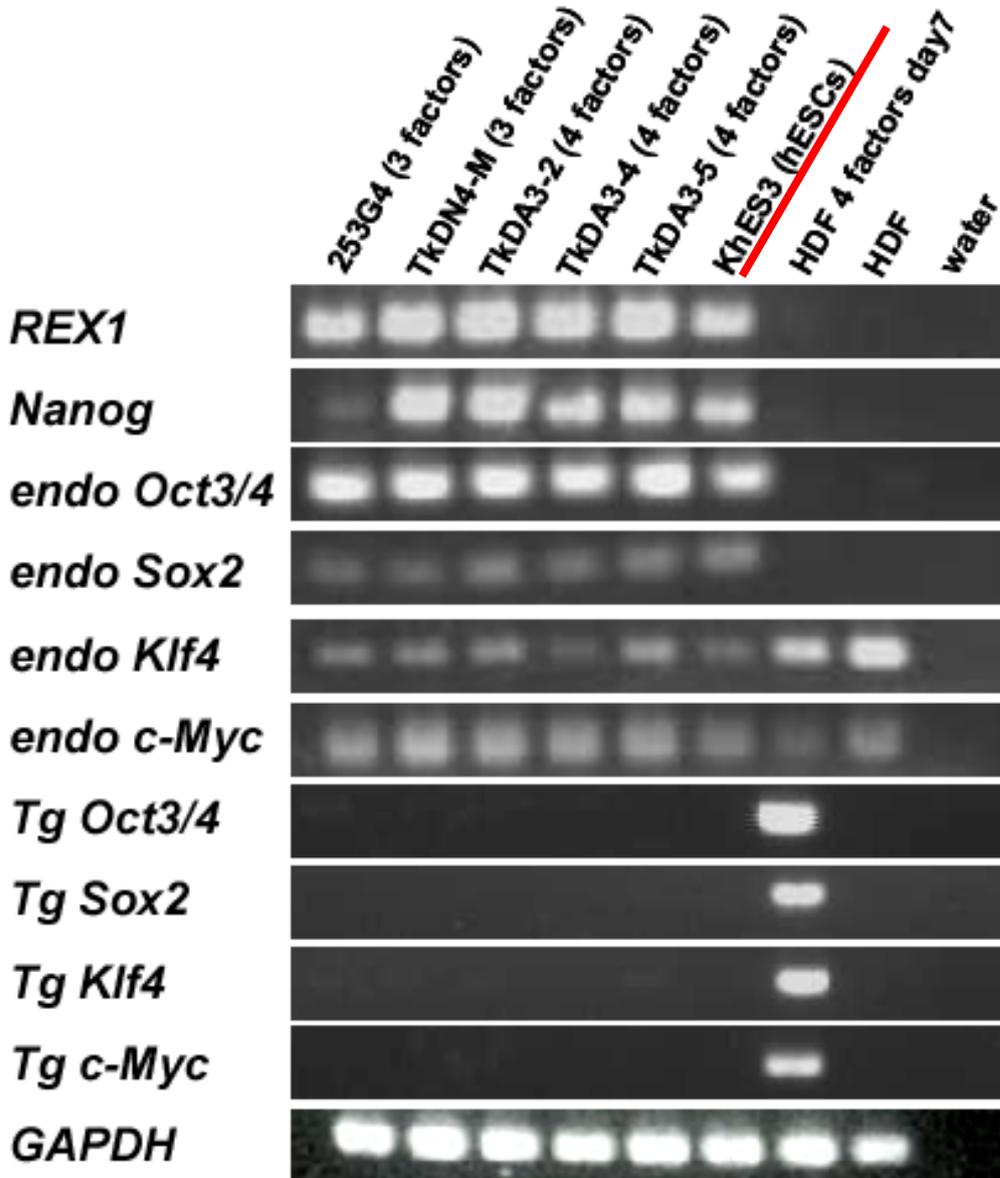
253G4 (3 f); 46XX

TkDA3-4 (4 f); 46XY

TkDN4-M (3 f); 46XY

作成したヒトiPS細胞株の染色体は正常であった。

図22 ES関連遺伝子の発現 (半定量RT-PCR)

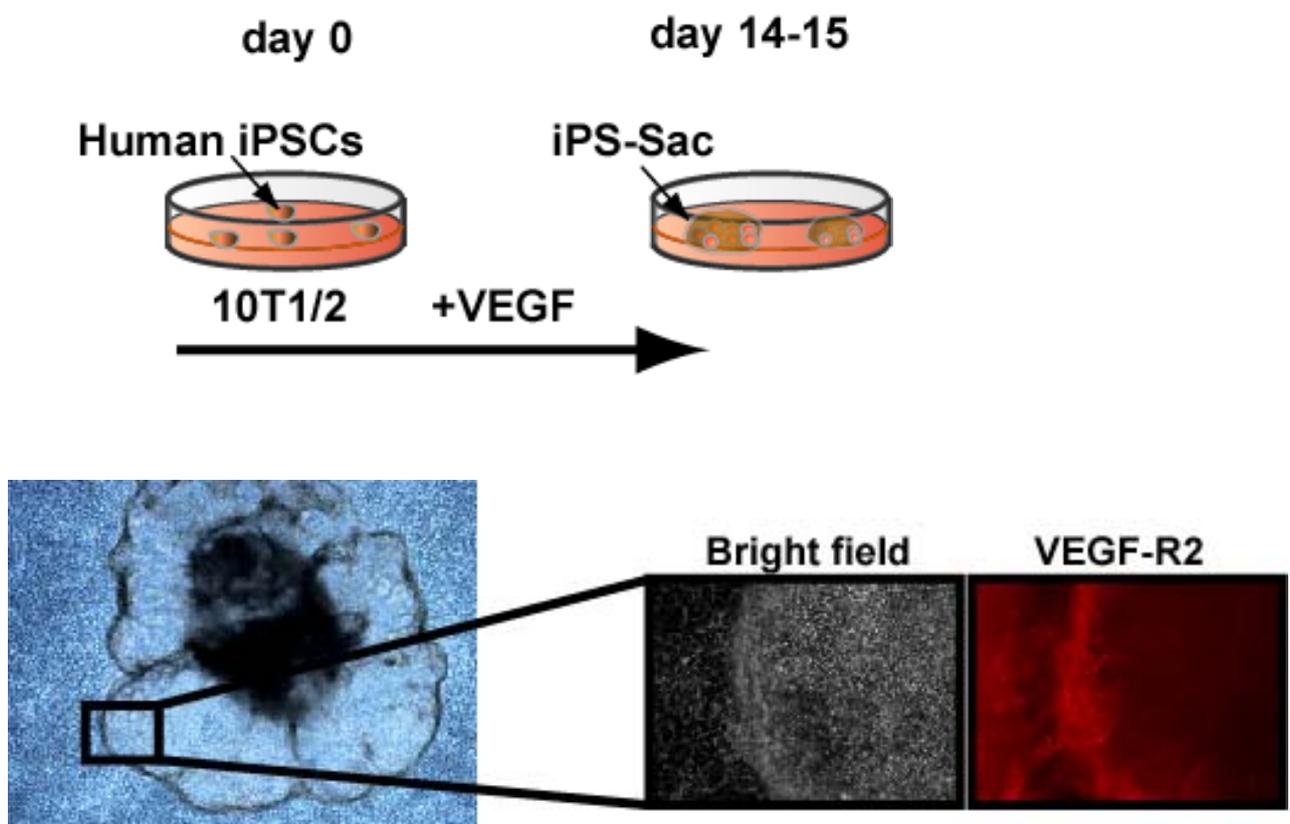


ES関連 (ECAT) 遺伝子の発現を半定量RT-PCRで調べたところ、ヒトES細胞と同程度に発現していることが確認された。

またiPSの樹立に用いた外来性の遺伝子 (Tg; transgene) は一部発現しているものの、強力に抑制されていた。

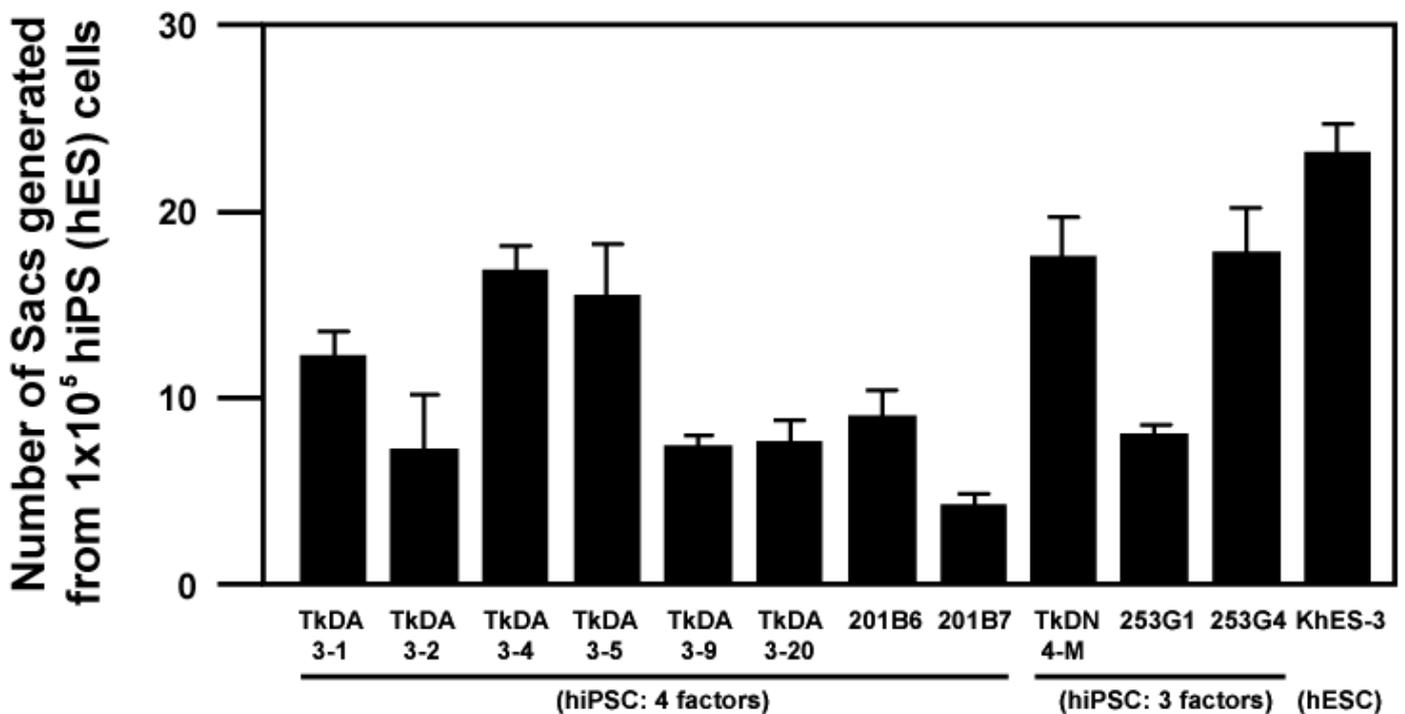
図23 ヒトiPS由来囊状構造物 ‘iPS-sac’

Protocol



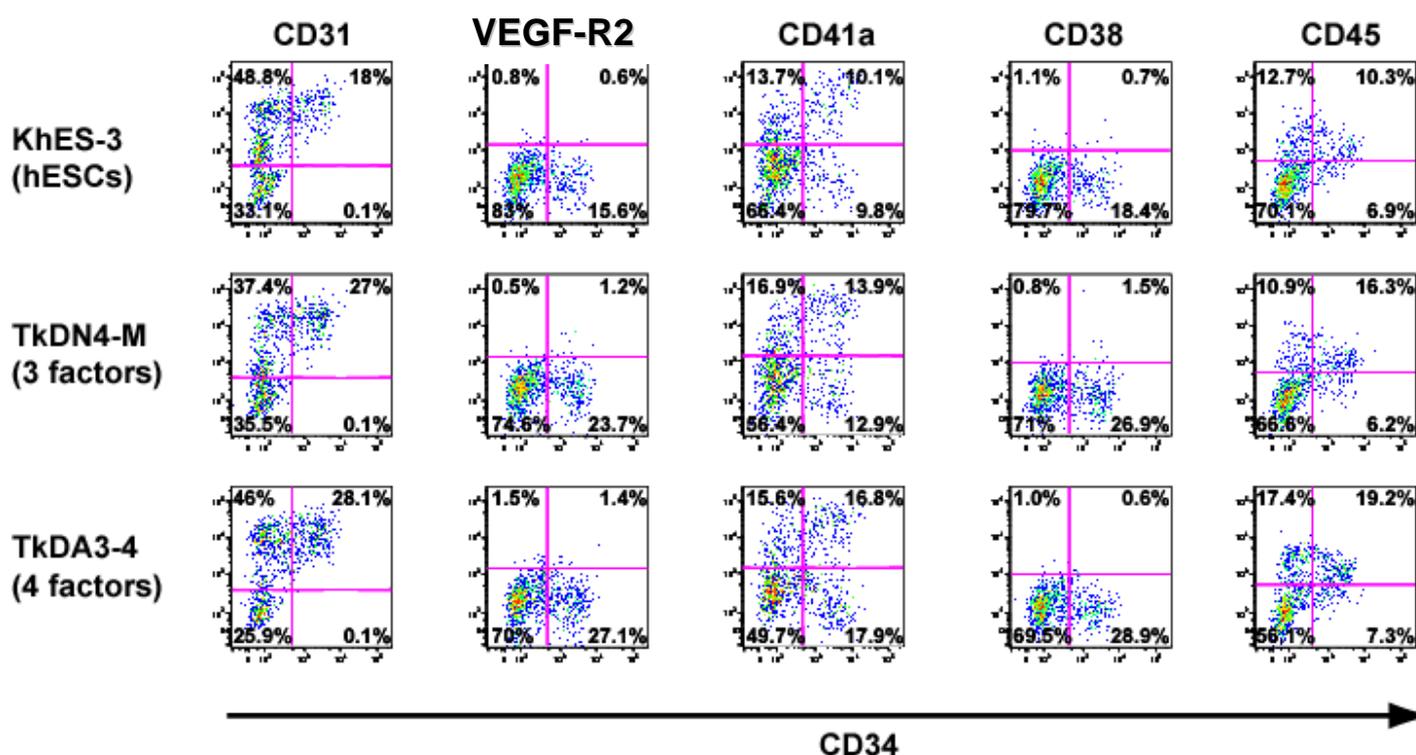
ヒトES細胞由来のES-sac形成時と同様、10T1/2細胞上でVEGF存在下にヒトiPS細胞を培養すると、14-15日目には内部に血球様の細胞を含む囊状構造体(iPS-sac)を形成した。この構造体はES-sac同様VEGF-R2陽性の囊状組織から構成されていた。

図24 iPS-sacの誘導効率



同数の細胞を播いて確認されたES-及びiPS-sacの産生数を示す。コントロールとして分化能の高いヒトES細胞 (KhES-3) を用いた。各細胞株の分化能力は不均一であり、同一の皮膚細胞から作成したiPS細胞間 (TkDA3-1, 2, 4, 5, 9, 20) でも差を認めた。

図25 ヒトES及びiPS細胞由来 血液前駆細胞の表面抗原

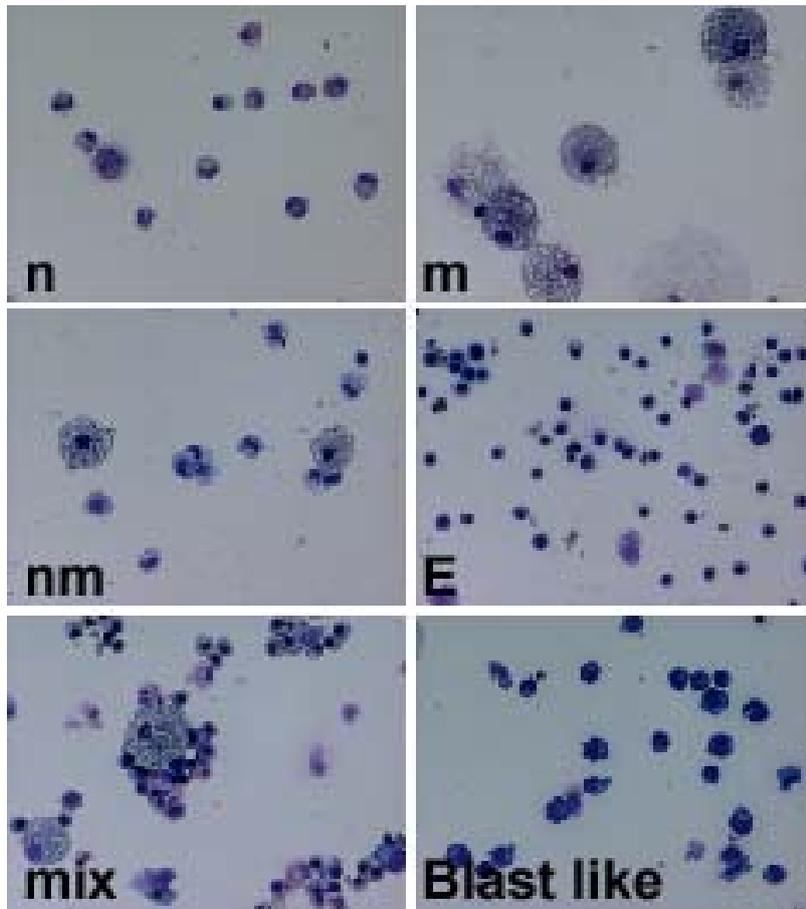


ES-sac及びiPS-sac内部の血液前駆細胞の表面抗原をフローサイトメーターを用いて解析した。未熟な血管内皮-血液細胞マーカーであるCD31/CD34陽性となる細胞が20%前後存在していた。

巨核球前駆細胞と考えられるCD34陽性/CD41a陽性の細胞集団も10%前後存在した。分化能の良い3因子及び4因子から作成したiPS細胞由来の血液前駆細胞はヒトES細胞由来血液前駆細胞の表面抗原の発現パターンと同様であった。

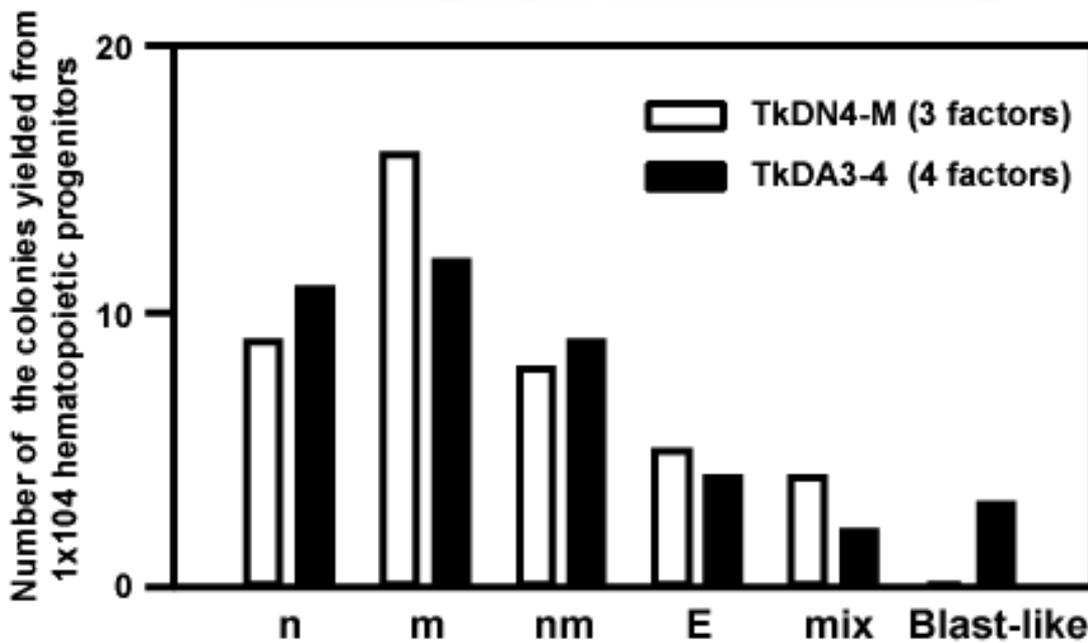
図26 ヒトiPS細胞由来血球コロニー

A



n: 好中球
m: マクロファージ
E: 赤芽球
mix: 混合

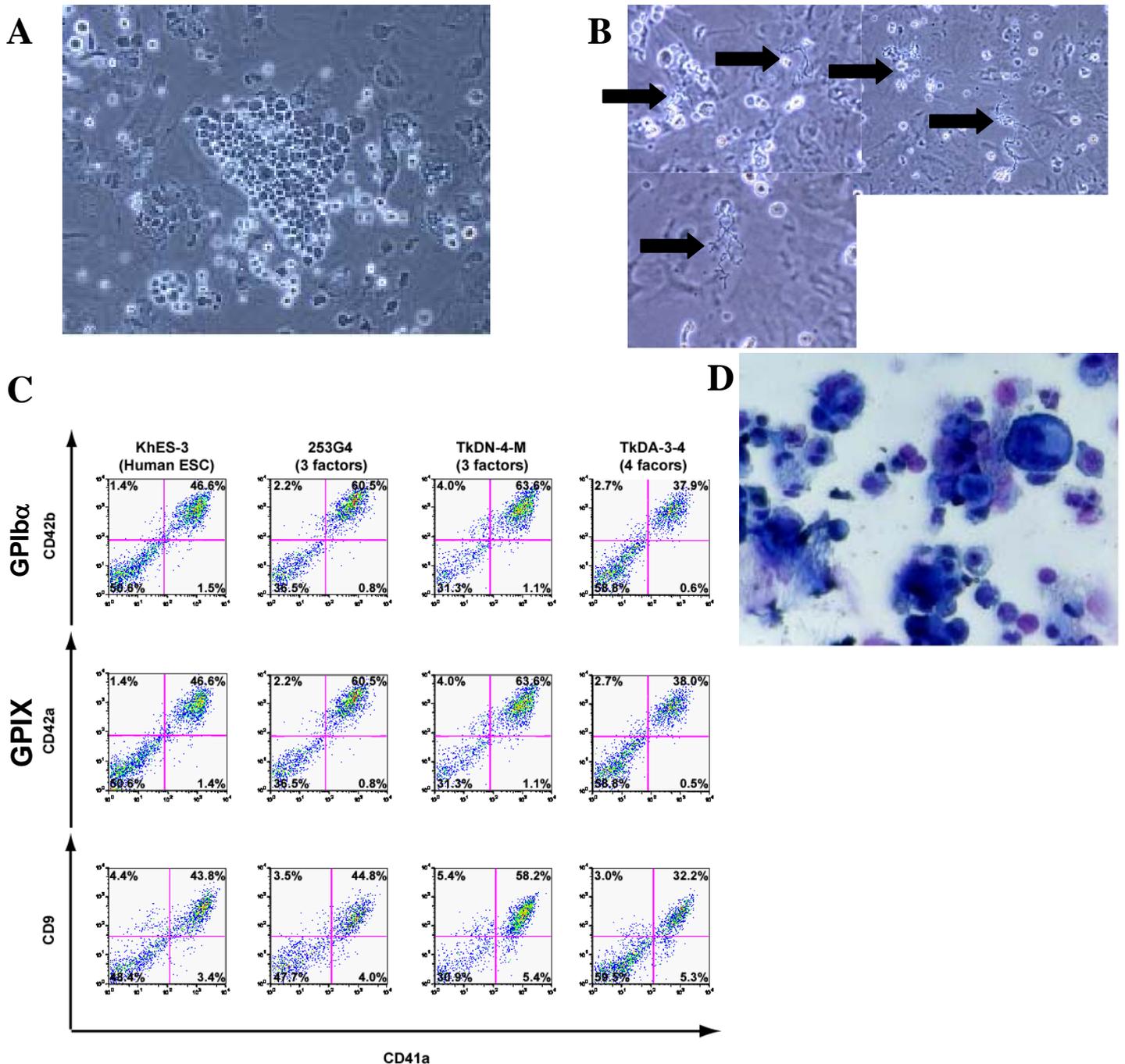
B



A. 血球コロニーのギムザ染色像

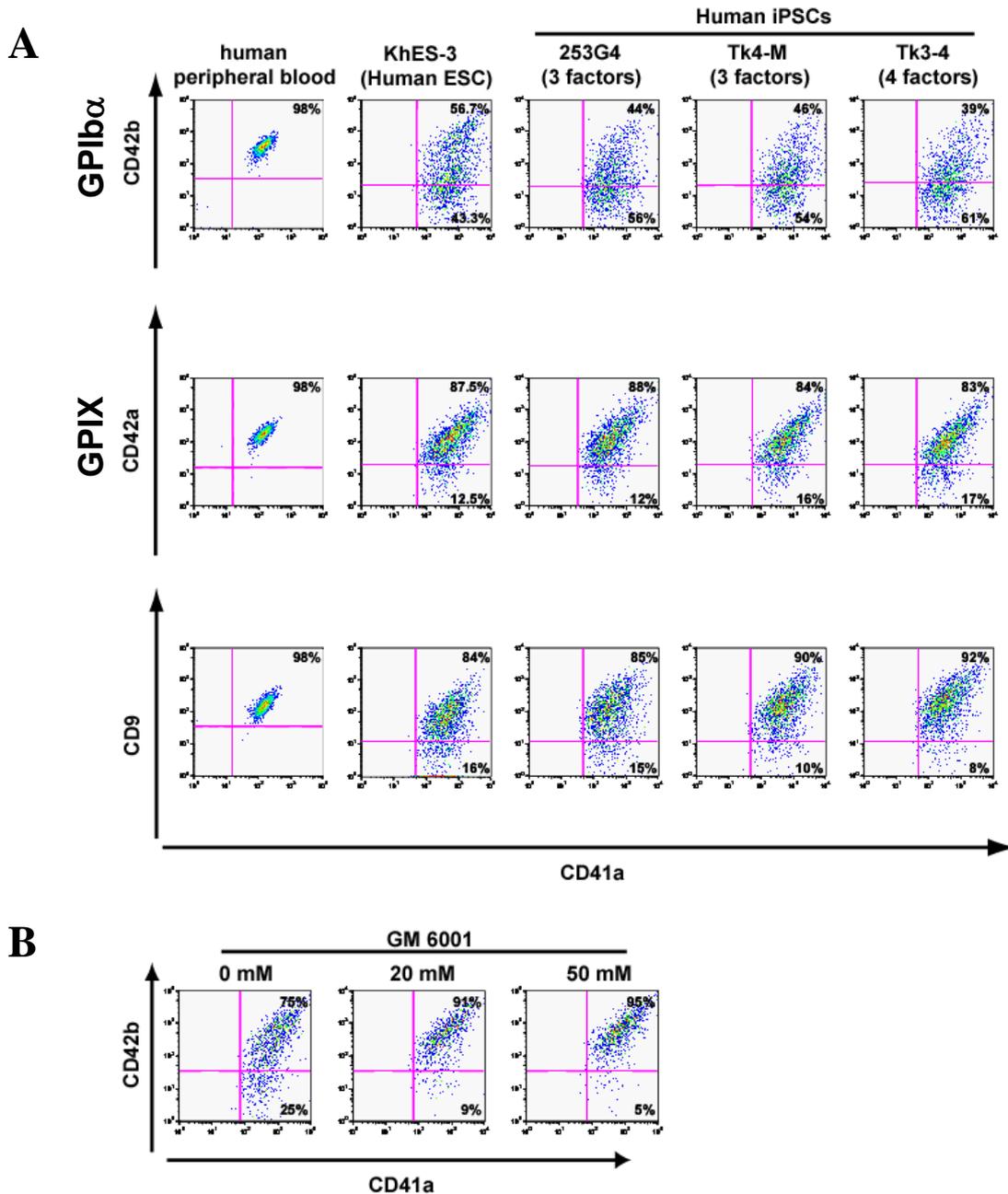
B. iPS-sac内部の血液前駆細胞のコロニー形成細胞数の頻度

図27 ヒトiPS細胞由来巨核球



- A. 培養19日目の血液前駆細胞。フィーダー細胞の下に潜り込み、敷き石状のコロニーを形成していた。
- B. 培養23日目の血球細胞。一部の浮遊細胞は胞体突起 (プロプレイトレット) を形成した。
- C. 培養23日目の血球細胞の表面抗原解析。巨核球マーカである CD41a陽性で、CD42b、CD42a、CD9陽性の細胞が40-60%を占めた。
- D. 培養23日目のiPS細胞由来の浮遊細胞。大型、多核で好塩基性の細胞質を持つ細胞が散見する。

図28 ヒトiPS細胞由来血小板のフローサイトメーターによる解析



A. フローサイトメーターを用いた血小板表面抗原の解析

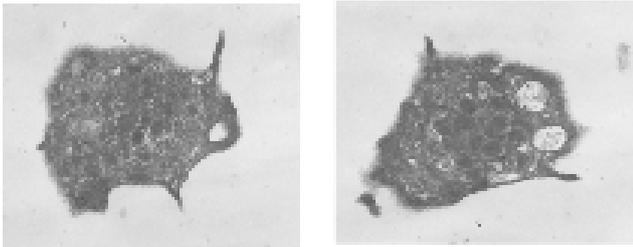
ヒト末梢血由来の血小板をコントロールとして、FSC、SSCゲートを決定した。培養上清中には血小板特異的な機能分子であるCD41a陽性のマイクロパーティクルが存在した。他の機能分子である、CD42a (GPIX)、CD9についてはCD41aとほぼ同程度発現が認められたが、CD42b (GPIb α)に関しては、ヒトES細胞由来血小板と同様一部のCD41a陽性の血小板で発現が低下していた。

B. メタロプロテアーゼ阻害剤 (GM6001) によるGPIb α 切断の抑制

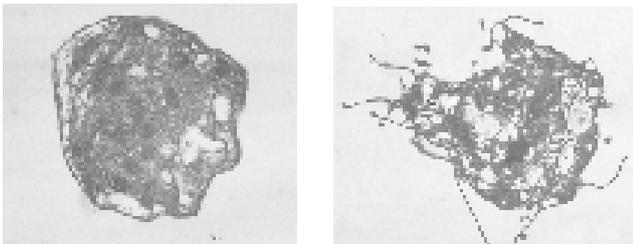
ヒトiPS細胞 (TkDN4-M) 由来血小板の誘導時にメタロプロテアーゼ阻害剤を添加することでGPIb α 切断の抑制効果を確認できた。

図29 ヒトiPS細胞由来血小板 電子顕微鏡像

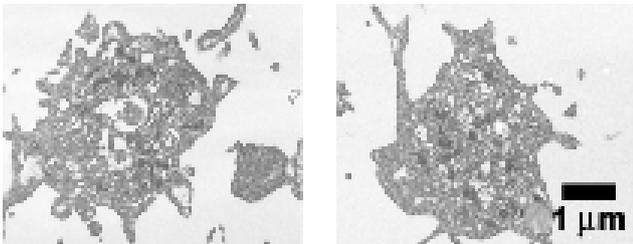
Human PB-derived platelet



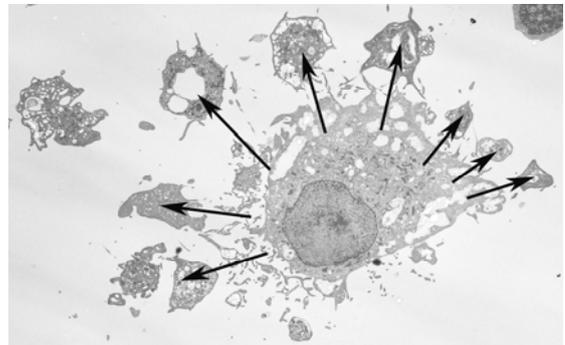
Human ESCs-derived platelets



Human iPSCs-derived platelets

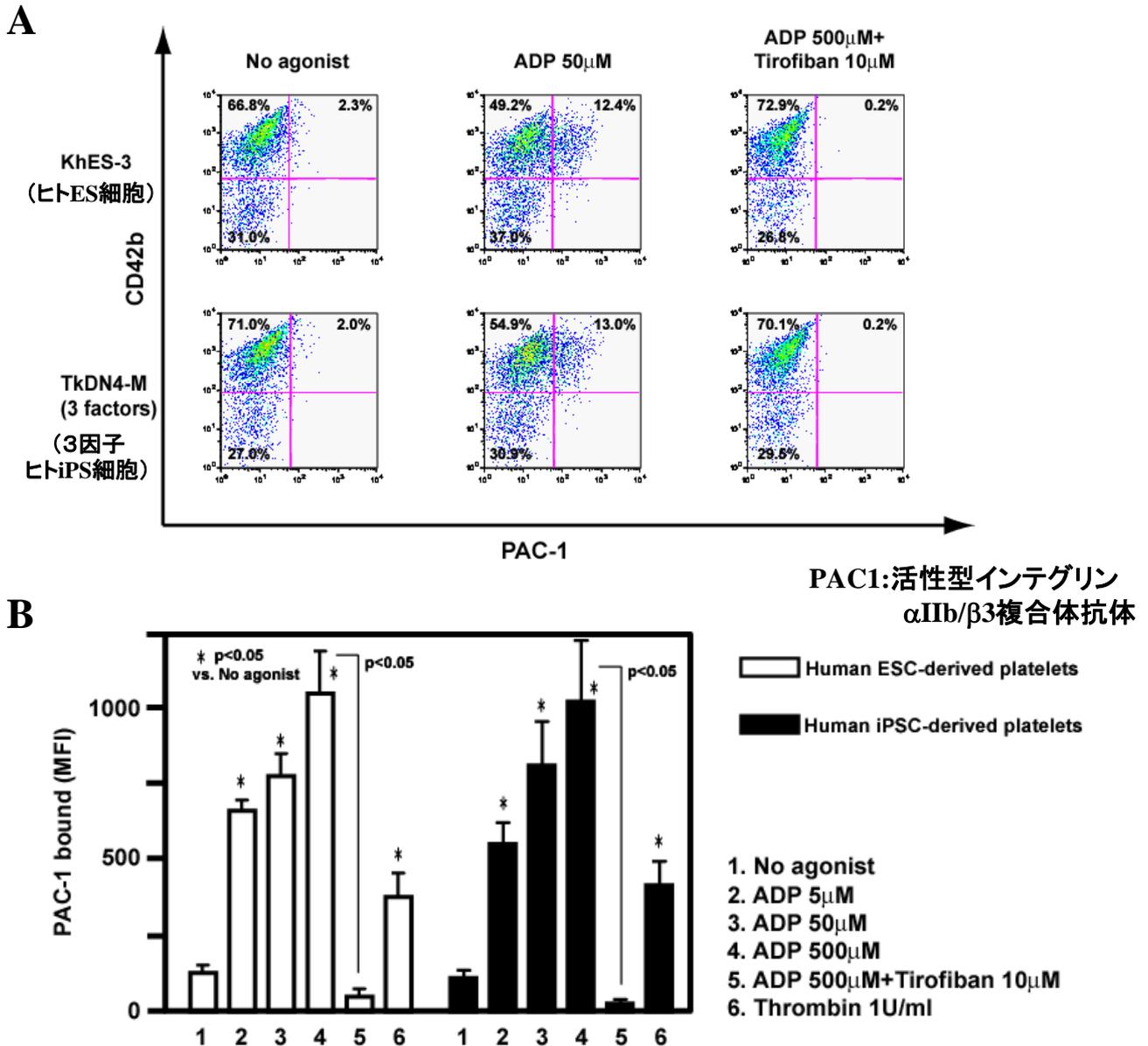


Platelets releasing from megakaryocyte



ヒトES細胞由来血小板同様、顆粒、微小管構造を認めた。末梢血由来血小板と比較し、顆粒は少ない印象であった。また産生された血小板の大きさは大小不同であった。
巨核球から血小板が放出されている像も観察された。

図30 ヒトiPS細胞由来 血小板の機能解析



ヒトiPS細胞由来の血小板の機能をフローサイトメーターを用いて解析した。ヒトES細胞由来血小板同様、ADPに反応し、PAC1陽性血小板が増加した。さらにインテグリンαIIb/β3複合体特異的な阻害剤であるティロフィバンにより反応は抑制された。ヒトiPS由来の血小板はヒトES細胞由来の血小板と同等のインテグリン活性化能を保持していることが証明された。