

博士論文

論文題目 多能性幹細胞から中胚葉系譜への分化経路シグナルの同定

氏名 遠藤 大



## 目次

1. 要旨.....	P3
2. 略語表.....	P4
3. 序文.....	P6
4. 方法.....	P19
5. 結果.....	P33
6. 考察.....	P66
7. 引用文献.....	P74
8. 謝辞.....	P82

## 1. 要旨

ヒト多能性幹細胞(hPSC)から血球前駆中胚葉(HM)への分化系譜およびメカニズムは様々な報告が散見し、現在までに結論が得られていない。本研究は hPSC の血球分化系の再構成によって、HM の分化を最適化する複雑な液性因子およびその系譜を明らかにした。研究戦略として、中胚葉の血球分化能の検証系の確立、文献的考察に基づく Activin A (A), BMP4 (B), WNT (C)の3因子の効果検証を実施し、AB, AC, の2つのパターンが独立して HM 誘導できることを見出した。一方で ABC パターンは HM 分化阻害に機能した。本研究は、HM への分化系譜が複数存在することを証明した。

## 2. 略語表

ESC	Embryonic Stem cell	胚性幹細胞
iPSC	induced pluripotent stem cell	人工多能性幹細胞
PSC	pluripotent stem cell	多能性幹細胞
MEF	Mouse embryonic fibroblast	マウス胎仔線維芽細胞
EPI	Epiblast	エピブラスト/胚盤葉上層/胚体外胚葉
PS	Primitive streak	初期線条
TE	Trophectoderm	栄養外胚葉
PE	Primitive endoderm	原始内胚葉
VE	Visceral endoderm	臓側内胚葉
AVE	Anterior visceral endoderm	前方臓側内胚葉
DVE	Distal visceral endoderm	遠位臓側内胚葉
ExE	Extraembryonic Ectoderm	胚体外外胚葉
ExM	Extraembryonic Mesoderm	胚体外中胚葉
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子
bFGF	Basic fibroblast growth factor	塩基性線維芽細胞増殖因子
TGF $\beta$	Transforming growth factor beta	トランスフォーミング増殖因子
AA	Activin A	アクチビン A
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	骨形成タンパク質 4
WNT	Wingless-type MMTV integration site family member	
SCF	Stem cell factor	幹細胞因子
TPO	Thrombopoietin	トロンボポエチン
EPO	Erythropoietin	エリスロポエチン
FLT3L	Fms-like tyrosine kinase 3 ligand	

HM	Hematopoietic mesoderm	血球前駆中胚葉 (血球になる能力を持った中胚葉)
HB	Hemangioblast	ヘマンジオブラスト/血球血管前駆細胞
HSC	Hematopoietic stem cell	造血幹細胞
HPC	Hematopoietic progenitor cell	造血前駆細胞
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
cDNA	complementary DNA	相補的 DNA
AB	Activin A + BMP4	
AC	Activin A + CHIR99021	
ABC	Activin A + BMP4 + CHIR99021	
ABX	Activin A + BMP4 + XAV939	
ABD	Activin A + BMP4 + DKK-1	
ACN	Activin A + CHIR99021 + NOGGIN	
CHIR	CHIR99021	
SB	SB431542	

### 3. 序文

#### <3-1. 多能性幹細胞>

ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) に代表されるヒト多能性幹細胞 (human pluripotent stem cell; hPSC)の樹立は、ヒト細胞、組織の初期分化研究、再生医療への応用など、多分野に渡って強い影響を及ぼした<sup>1,2</sup>。特に、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPS 細胞)の樹立は ES 細胞の有する問題点 (樹立にヒト胚の破壊を要すること) を解決し、より広い応用可能性をもたらした。

hPSC は特性として、自己複製能(self renewal)と多分化能(pluripotency)を有する。in vitro で半永久的に増殖させられるとともに、体を構成する全ての細胞への分化が可能である。

hPSC はその特性から、再生医療への臨床応用が期待されている。

非可逆的に機能喪失した状態からの回復は、臓器移植以外では達成出来なかった。臓器移植ドナーは、生体間移植ではドナーに大きな負担があり、また脳死ドナーからの移植においても供給数に限界がある。よって、需要を満たすだけの供給は達成できていない。また、同種移植の場合は拒絶のリスクがあり、免疫抑制剤を使用する必要があるが、副作用として易感染性が起こるため、移植患者の健康にとってネガティブである。しかし、hPSC から新しく細胞を誘導することができれば、半永久的に増殖可能である特性から、理論的にはいくらかでも供給することが可能となる。また自己由来の iPS 細胞や、同種であっても HLA が一致した細胞を用いれば免疫抑制剤の使用を回避できるため、副作用の問題もなくなる。そのため、臓器移植に変わる新たな臓器・細胞の供給源として多能性幹細胞は期待されている。

また、疾患モデルの構築と創薬分野においても活用が期待されている<sup>3</sup>。未だに治療法のない疾患に対して、その分子メカニズムを研究するためには患者由来の細胞を生検する必要があった。モデル動物を用いる方法もあるが、マウスで全ての疾患モデルが確立されてはおらず、また絶対に確立可能というわけでもない。患者から大量かつ複数回に渡って生検することは侵襲性が強く、また現実的ではない。特に、神経系の細胞などは

生検が困難である。hPSC を用いれば、この問題を解決できる可能性がある。対象患者から iPS 細胞を樹立しておけば、疾患の特徴を有する細胞を半永久的に誘導することが可能となり、侵襲なく細胞を用意することができる。High-Throughput な系として確立させれば、未知の薬剤の効果・副作用判定などに用いることが可能である。現に、既に幾つかの例で疾患モデルから新しい薬剤の効果が確認されつつある<sup>46</sup>。

さらに基礎生物学への応用も期待されている。発生生物学の分野では、モデル動物を用いて多くの知見を得てきた。しかし、ヒトの発生を直接調べることは、母体内の胎児を解析するわけであるので非侵襲的に行う方法を考慮する必要がある。現在の最先端技術では自ずと得られる情報には限界があり、またマウスなどのモデル動物で得られた知見をヒトで再検証することも不可能である。しかし、発生を模倣すると考えられている hPSC の分化系をモデルとすれば、ヒトとモデル動物の差によるギャップを埋めることができ、より正確なヒトの発生に関する知見を得ることができると期待されている<sup>7</sup>。この場合も、hPSC を樹立してしまえば (iPS 細胞なら少量の採血で済む程度である)、全ては *in vitro* での細胞株の実験になるため侵襲性はない。また、同じ細胞株から繰り返し分化を起こすことができるため、必要なだけ再現性を確認することもでき、さらに、介入の影響を調べる際にもコントロールと介入群の両方を同じ細胞で用意することができる。一方で、使用するヒト細胞の由来、背景によって個体差が生じることが予想される。現在ではゲノム再編集技術が発展してきているため、ヒト細胞個々の特性が存在していても多能性幹細胞段階でのゲノム編集した細胞と元の細胞の分化系を比較する研究も有利に働くとされている。さらには、複数の細胞株を用いての検証により霊長類に特異的とされるトランスポゾン依存的に発生した獲得遺伝形質の差異も同時に明らかになるという利点を有している<sup>8</sup>。

以上のように、hPSC を用いた研究・応用は幅広く期待されている。hPSC を有効に活用するために、その特性を明らかにする試みが精力的になされている。

例えば、*in vitro* での自己複製メカニズムの解析によって、hPSC の維持培養条件が発展してきた。hPSC の場合、外因性シグナルとして Transforming growth factor beta



(TGFβ)/ActivinA と basic fibroblast growth factor (bFGF)を必要とし<sup>9</sup>、また細胞外マトリックスから Integrin alpha6-beta1 を介したシグナル入力が必要である<sup>10</sup>。hPSC の自己複製に必要な十分な培養条件がほぼ判明したため、hPSC の維持方法として伝統的なフィーダー細胞（マウス胎仔線維芽細胞 mouse embryonic fibroblast; MEF など）との共培養から、無血清無フィーダー培養系<sup>11,12</sup>、さらに動物由来成分フリー培養系<sup>13</sup>を実現することに成功した。

また目的の細胞への分化方法に関しても、三胚葉系全てにおいて研究報告が盛んになされている。この中には、臨床研究で使用できるようなプロトコールが確立された細胞（網膜色素上皮細胞）もある<sup>14,15</sup>。

しかし、hPSC の特性についてはまだ理解が不十分な部分が多く残っている。hPSC の分化は発生過程と強い対応関係があると考えられているが、特に発生初期のプロセスには未知の部分が多く、それ故に多能性幹細胞由来の分化メカニズムも不明瞭な点が多い。マウス発生においては、着床前であれば *in vitro* である程度の観察が可能でリアルタイムの実験が可能であるものの、着床後初期の過程は生体内での現象でありまた胚も小さいため、観察には限界や困難があり、得られている研究結果は十分とは言えない<sup>16</sup>。発生学からの知見を hPSC の分化に応用するための正確な情報不足は未だに解決されていない。

分化メカニズムを詳細に解明する必要がある理由は、発生学的に大変興味深いテーマであると同時に、臨床応用への展開に利点を有する。再生医学での細胞療法は患者が失った機能を補填するために、新しい細胞を補充することでこれを達成するものである。新しい細胞というのは、他人からの献血によって製造される輸血製剤、臓器移植で用いられるドナー由来の臓器（造血幹細胞、肝臓、腎臓、心臓、肺、膵臓）、自己由来の細胞（骨髄間葉系幹細胞）などが一般的で、ここに新たに加わろうとしているのが hPSC 由来の細胞製剤である。

再生医療上の細胞製剤において最も重要な達成項目は、安全性と有効性である。hPSC

はそれ自体に造腫瘍性（奇形腫形成能）があること、何らかの理由によって分化が不十分な場合に奇形腫以外の悪性腫瘍化を引き起こす報告があること<sup>17</sup>があり、“Do no harm”の原則からこういったリスクを出来る限り除去して安全性を担保しなければならない。一方で、hPSC から分化誘導した多くの終末分化細胞は機能的に未熟であることが指摘されている<sup>18,19</sup>。多能性幹細胞は発生を模倣する形で分化誘導を施行しており、胎児期・新生児期の細胞と同等の能力であることが懸念されている以外にも、細胞の成熟を阻害している未知の原因については解明されずにいる。

安全性を保証しつつ機能性を担保するためには、様々な基準を設けクリアする必要がある。最低限の前提として、製造する度に同じものが出来なくてはならない。言い換えるなら、hPSC から目的の細胞までの分化過程を再現よくトレースする必要がある。例えば、hPSC の品質も培養方法によって多様な変化をすることから、再構築可能な洗練された培養法に変更することで均一性が増す条件に統一することが必須である<sup>20</sup>。しかし、hPSC からの分化過程はブラックボックスであり、過去の複数の報告により merge 可能な分化系譜を描くことが不可能であった。

### <3-2. 血球系とその発生>

血球系は、ヒトの生命の恒常性に不可欠な細胞系譜である。酸素運搬、免疫機能、傷害からの回復など、生命の維持に必須な機能を担っている。血球は成体を構成する他種類の細胞の中でもユニークで、浮遊状態かつ単一細胞として生存できる特徴を持つ。この特性は、研究者たちが *in vitro* で様々な実験を行うことを可能とした。中でも、細胞の分化段階に階層性があること、その系譜の全体像と、分化のメカニズム、幹細胞の特性は極めて詳細に研究が行われ、この知見は多くの他細胞系譜にも適応されている<sup>21</sup>。一つの造血幹細胞は全ての種類の血球細胞に寄与でき、2次移植可能であることを指標に自己複製能と多分化能を有していることが実験的に証明されてきた歴史を有する<sup>22</sup>。造血幹細胞から終末分化細胞までの系譜は、古典的モデルとして提唱されたのを皮切りに<sup>23,24</sup>、幾つかの改訂を経ているが<sup>25-27</sup>、基本的には木の階層性マップとして表現されている。このモデルは、発生における細胞系譜を表現することに多用される。

血球が由来するのは中胚葉である。発生過程において、中胚葉の形成はよく研究されており、各細胞間の相互作用が重要な役割を果たすことが知られている。哺乳類モデル動物のマウスにおいて、中胚葉がどのように誘導されるか、そこから血球がどのように誘導されるかについて、現在分かっている知見を概説する(Figure.1)。

受精した卵子と精子は受精卵となり、個体のすべての細胞と胎盤を含む胚外組織への分化能を持つ全能性を有した細胞となる。ここから自然に起こる細胞分裂を介して、2, 4, 8, 16, 32 個と細胞数を増やしていき、桑実胚 (Morula)となる。球形の細胞塊は、自然と内外の区別ができ、ここから内細胞塊 (Inner cell mass; ICM)と栄養外胚葉 (Trophectoderm; TE)に運命が分かれる。ICM はさらに Nanog 遺伝子と Gata6 遺伝子のタンパク発現レベルと分布によって primitive endoderm (PE)と Epiblast (EPI)に運命が分かれる。その接着性の差によって、PE は EPI と分離して再配置化される。TE は Extraembryonic Ectoderm (ExE)となり、EPI と接した状態になる。子宮への着床に伴い、TE は母体と接合する。母体から近い順に、ExE, EPI, PE と並んだ状態になる。PE は EPI と接した部分は visceral endoderm (VE)と呼ばれるようになる。発生の進行とともに、胚は円錐状の形

状となり、Egg cylinder となる。VE で最も遠位部にあるものを Distal VE (DVE) と呼ぶ。ここから前後軸の形成が開始される。先ず、EPI で Nodal 遺伝子がタンパク発現し、ExE で BMP4 遺伝子がタンパクとして同様に発現する。ExE の BMP4 は EPI の近位後方部で Wnt3 遺伝子のタンパク発現を促し、これが Nodal の発現をより安定したものにする働きを持つ。EPI 遠位部では DVE は Nodal の刺激を受けて Lefty-1, Dkk-1, Chordin などの Nodal, Wnt, Bmp シグナルアンタゴニストを発現する。これにより、EPI の近位部では Nodal, Wnt3, Bmp4 のシグナルが働く一方で、遠位部ではこれらの作用が阻害される結果となる。Nodal の刺激によって DVE は前方に遊走し、シグナルの強弱グラジエントは前後方向に沿ったものとなる。EPI 後方の Nodal, Bmp4, Wnt3 の発現・シグナル入力によって、この部位の細胞は Epithelial-Mesenchymal transition (EMT) を引き起こす。この結果、初期線条 (Primitive streak; PS) と呼ばれる構造が形成される。この構造は、徐々に前方に延長していき、周囲の細胞に EMT を起こす形で Epiblast と VE の間に細胞が遊走していく。これらの遊走した細胞によって、中胚葉・内胚葉が形成される。遊走した細胞のうち、一部は胚外へと遊走し、卵黄囊の壁内などに侵入していく。これらを胚外中胚葉 (Extraembryonic Mesoderm, ExM) と呼ぶ。卵黄囊の壁内の ExM から、血球血管の前駆細胞である Hemangioblast (HB) が出現し、ここから血島 (Blood island) と呼ばれる構造が作られると考えられている。血島は、血管内皮細胞に裏打ちされた球状の構造物で、内部には有核赤血球が含まれている。これが最初期に確認可能な血球細胞群であり、primitive hematopoiesis と呼ばれる。卵黄囊では有核の赤血球が大多数を占めるが、巨核球やマクロファージも確認されている<sup>28,29</sup>。

この後、ExM に存在する細胞の一部が再度胚内に遊走し、造血幹細胞を含んだ成体造血 definitive hematopoiesis に寄与すると報告されている<sup>30</sup>。成体の血球は造血幹細胞を頂点とする階層構造を形成するが、造血幹細胞の起源は背側大動脈の Hemogenic endothelium に由来すると報告されており、ヒトでも同領域における造血幹細胞の発生が確認されている<sup>31</sup>。

以上を要約すると、発生における血球の起源は、卵黄囊中胚葉にある<sup>32</sup>。最初の血球が出現する卵黄囊中胚葉は、初期線条に由来する中胚葉である。初期線条は EPI の後方から出現する構造である。初期線条を発生させる分子メカニズムは一部解明されているものの、これだけでは不十分である。例えば中胚葉に由来する臓器は様々あるが、心臓になる中胚葉と血球になる中胚葉ではその起源は異なるとされる報告がある<sup>33</sup>。発生学的な知見から模倣をするならば、hPSC は EPI に相当するので、まず初期線条を経て血球分化ポテンシャルのある中胚葉を誘導し、次に HB を誘導し、そこから血球を誘導するという流れを辿ることになる。

Figure.1

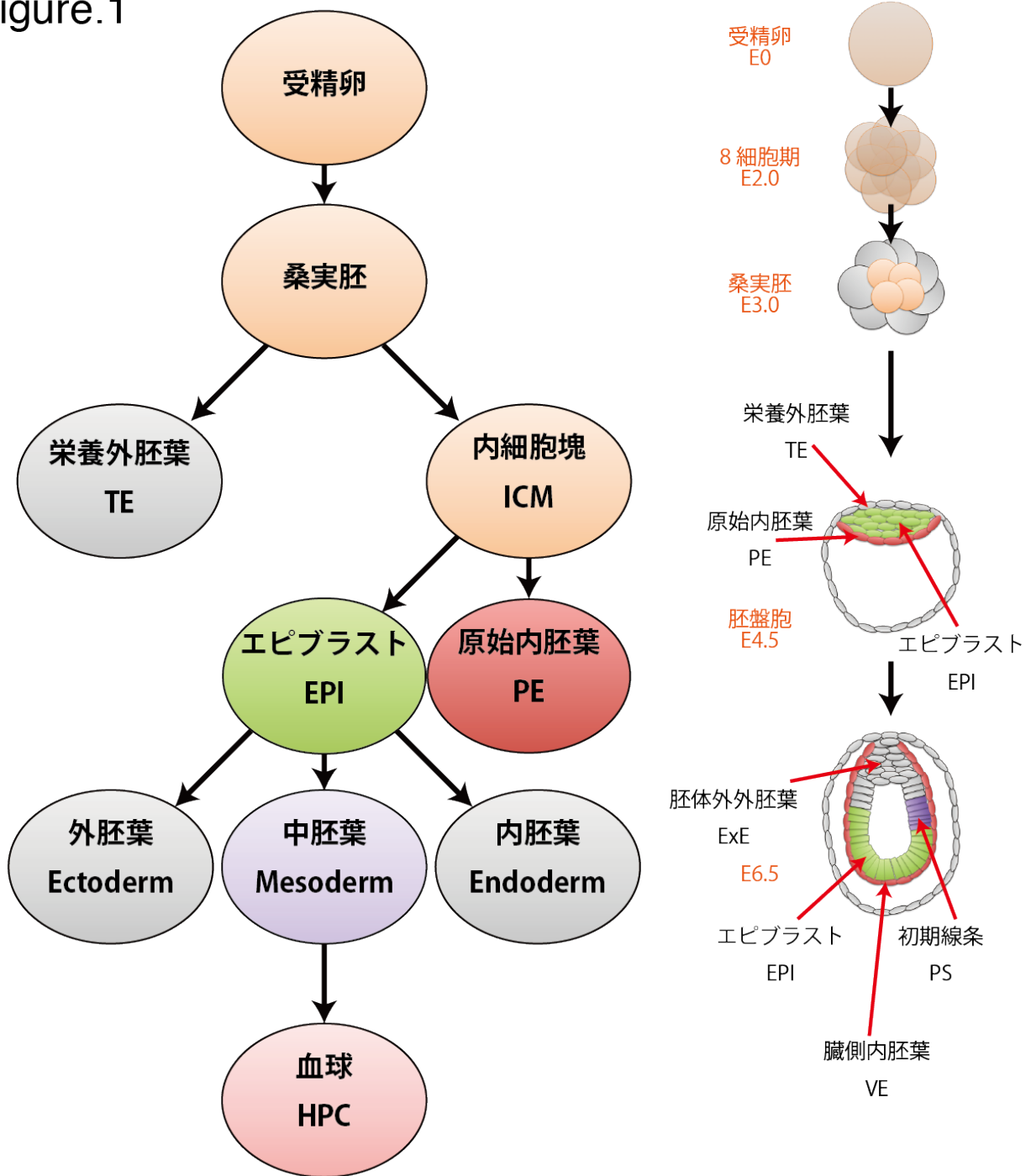


Figure.1 マウスにおける血球発生の系譜

左に発生系譜の階層性マップを樹形図として、右に対応する時期の胚構造の概略を示した。

### <3-3. 血球系系譜発生におけるマウスとヒトの差異>

発生学からの知見は hPSC の分化研究には欠かすことが出来ない。しかし、モデル動物の知見とのギャップが生じる場合も当然あり得る。本項では、ヒトとモデル動物の差について概説する。

遺伝子の働きが、ヒトとマウスでは異なる場合があることが知られている。

HoxB4 遺伝子は、マウス ES 細胞由来の血球前駆細胞を造血幹細胞様にする能力、つまり自己複製能および血液に局限した多分化能を賦与する遺伝子として同定された<sup>34</sup>。しかし、これを hPSC に適応しても、同じ結果は得られなかった<sup>35</sup>。

別の例として、c-MPL がある。c-MPL は TPO 受容体として知られている。c-MPL の先天的な変異による機能喪失は、congenital amegakaryocyte thrombocytopenia (CAMT) という疾患の原因となる<sup>36</sup>。変異の種類によって程度は異なるが、完全な機能喪失では出生直後からの血小板減少症から、汎血球減少症へと進行する。しかし、モデル動物として c-Mpl ノックアウトマウスを作製すると、血小板減少は認められるものの汎血球減少症は呈さず、また生育にも問題がない<sup>37</sup>。つまり、マウスとヒトでは TPO/c-MPL シグナルへの依存度には差があることになる。

また、造血幹細胞の場合でも同様の差異が観察される。マウス造血幹細胞の指標として、細胞膜上の表面抗原が用いられている。分化血球のマーカーを発現していない (Lineage marker negative; Lin-)、c-Kit 陽性、Sca-1 陽性、CD34 陰性細胞が造血幹細胞の指標として代表的である<sup>22</sup>。これに、CD150 陽性 CD48 陰性なども付けられる<sup>38</sup>。しかし、ヒト造血幹細胞は CD34 陽性 CD38 陰性である。これに、CD49f 陽性などが付けられる<sup>39</sup>。また、CD150 や CD48 は造血幹細胞の指標にならない<sup>40</sup>。Sca-1 も発現していない。

本研究で用いている hPSC にもマウス多能性幹細胞(mouse pluripotent stem cell; mPSC) との決定的な違いが存在する。mPSC は Blastocyst に戻すことが可能で、その後の発生に寄与できるため、ICM と等価な状態であると考えられている。mPSC の未分化性維持のために必要が外的因子は leukemia inhibitory factor (LIF) である。一方、hPSC は LIF では維持できないが、bFGF と TGFβ/ ActivinA によって維持することが可能である。その形状

もドーム型と平坦型と異なる。最近、hPSCをマウスと似た形態にする条件に付いて報告があった<sup>41</sup>。マウスでの維持に比べると、hPSCを同状態で維持することには付加的な条件が必要であり、この点もヒトとマウスの差を示している。

これら問題点は、マウスの研究成果を安易にヒトに外挿することができないことを示唆している。ヒトとマウスの違いを考慮したうえで、hPSCでの研究によって補完する必要がある。ヒト自体の研究、モデル動物の研究とヒト細胞の研究は互いに補足し合うことによってはのみ、より正確なヒト発生系譜の原理解明が可能である。



#### <3-4. 多能性幹細胞からの血球誘導法は不明瞭な部分が多い>

hPSC から中胚葉誘導、または hPSC から血球誘導をする方法に関する報告が多数存在する。報告された分化方法は大きく 2 種類に分けることができる。胚様体 (Embryoid body) 形成法と 2 次元培養法である。

血球分化を 2 次元で行う最初期の方法は、フィーダー細胞との共培養であった<sup>42,44</sup>。簡便で再現性良く血球誘導が可能であるが、フィーダー細胞と hPSC の相互作用に未知の部分が多く、やはりその分化メカニズムはブラックボックスであった。

EB 法はフィーダーが不要である一方、細胞間相互作用がより強く起こると考えられること、また培地に添加した因子が胚様体に均一に影響を及ぼす保証がないこと（表層と内部で濃度差を生じる可能性がある）が難点であり、また細胞塊の内部を観察することも簡便ではない。

分化法も様々に工夫がなされ、未知の因子を除去するために無血清・無フィーダーを達成した報告が近年出てきている。Table.1 に、無血清無フィーダーによる分化方法を取っている報告をまとめた。

しかし表で見て分かるように、未だにプロトコールは多様であり統一性に欠ける。あるレビューでは<sup>21</sup>、多数のラボで多数の研究者が、バラバラの目標に沿ってバラバラの細胞株を用いたことが原因であると指摘されている。

ヒト発生過程における詳細な細胞系譜制御のシグナルは不明である。マウス発生においては、中胚葉の形成には Nodal/ActivinA/TGF $\beta$ , WNT3, BMP4 の 3 つの液性因子グループが重要な役割を示していた。しかし、hPSC の血球分化は、中胚葉を経ることは発生的にも正しいと強く示唆されるものの、上記の液性因子グループの組み合わせ、あるいは単独使用など、統一性が存在しない。逆に言えば、血球分化のために経由する中胚葉を誘導する条件には、何らかの柔軟性が有るように見える。固定した外部環境でのみ達成されるものではなく、ある程度のゆとり・振れ幅を許容できるようなシステムになっていることを示唆しているとも考えられる。そのために、幾つものプロトコールがバラバラの条件になってしまっている可能性がある。

References	Target intermediate	Genes evaluated	Factors added	Time	Blood potential check
45	Mesendoderm	MIXL1	ActivinA, Wnt/beta-catenin	3 days	None
46	Mesoderm	BRA, CDX2	BMP4, bFGF	2 days	None
47	Mesendoderm	BRA	BMP4, bFGF	2 days	None
48	Mesoderm	BRA	ActivinA, bFGF -> ActivinA -> ActivinA, bFGF, BMP4	9 days	None
49	Mesoderm	BRA	BMP4	1 day	+
50	HPC	-	BMP4, VEGF, bFGF	6 days	+
51	Mesoderm	BRA, MIXL1, KDR	BMP4	4 days	+
52	Mesoderm	CD56+	ActivinA (1 day), BMP4, VEGF, bFGF,	3.5 days	+
53	BL-CFC	APJ+	bFGF	12 days	+
54	Mesoderm	MIXL1	BMP4	4 days	+
55	Mesoderm	MIXL1	BMP4, VEGF, SCF	3 days	+

Table 1 hPSC からの中胚葉分化、及び血球分化法の報告例

### <3-5. 本研究の目的と要旨>

以上のように、ヒト血球発生過程には未知の部分が多い。特に EPI から血球分化ポテンシャルを持った中胚葉が誘導される過程には統一見解が存在しない。また、これを再現しているはずの hPSC を用いた *in vitro* 血球分化系において、既存の研究でこの過程の詳細な検証に焦点を当てたものではなく、用いられている方法は様々である。

本研究は、こうしたヒトの初期発生の仕組み、特に血液前駆中胚葉の分化系譜に焦点を当てて、そのシグナルメカニズムを明らかにする目的で実施された。

先ず *in vitro* 血球分化系がどのような特徴を保持する細胞集団によって構成されているかを検証し、時系列的に発生を模倣した細胞集団が出現することを細胞表面抗原によって同定することでその発生系譜を再構成できること、それぞれの細胞集団の出現時期によって分化段階を分割できることを証明した。

次に、各分化段階のさらなる分化進行を促進する条件を決定するために、分化系への様々な外部介入を行った。hPSC から初期の中胚葉集団まで（初期ステップ）、中胚葉形成期以降の血球血管前駆細胞・血球まで（中・後期ステップ）に分けて検討を行った。その結果、各段階の重要な因子群を決定した。

上記知見に基づいて分化系の再構築を行なう手法により、未知の因子を *step by step* によって除去することが可能となり、高効率な血球誘導を保ったまま無血清無フィーダー条件の培養方法を達成した。

最終的にはこの未知の因子が含まれない条件で、初期分化系のシグナルを再検証し、血球になる中胚葉と血球にならない中胚葉が誘導可能であることを証明した。

#### 4. 方法

##### <4-1. 材料>

使用した細胞培養用培地・添加物・試薬リスト

Name	Company
Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high glucose (DMEM)	ナカライテスク
DMEM / Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12 Ham)	Sigma
Iscove's Modified Dulbecco's medium (IMDM)	Sigma
Basal Medium Eagle (BME)	Sigma
RPMI1640	Sigma
Minimum Essential Medium Eagle, alpha (alpha MEM)	Sigma
StemFit AK03N	Ajinomoto
Knockout serum replacement (KSR)	Gibco
Fetal Bovine serum (FBS)	Bovogen
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (NEAA)	Gibco
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)	Gibco
2-mercaptoethanol (2-ME)	Gibco
L-glutamine	Gibco
Penicillin-Streptomycin-L-glutamine	Gibco
Alpha-monothioglycerol (MTG)	Sigma
L-Ascorbic acid	Sigma
Recombinant human Stem cell factor (SCF)	R&D systems
Recombinant human Thrombopoietin (TPO)	R&D systems
Recombinant human Erythropoietin (EPO)	Kyowa-Hakko Kirin

Recombinant human interleukin-7 (IL-7)	R&D systems
Recombinant human Flt3-Ligand (FLT3L)	R&D systems
Recombinant human vascular endothelial growth factor (VEGF)	R&D systems
Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF)	WAKO
Recombinant human activin A (AA)	R&D systems
Recombinant human bone morphogenetic protein 4 (BMP4)	R&D systems
Recombinant human NOGGIN	R&D systems
Recombinant human Dickkopf-1 (DKK-1)	R&D systems
SB431542	WAKO
CHIR99021	WAKO
Y27632	WAKO
XAV939	Sigma
0.05% Trypsin EDTA	Gibco
0.25% Trypsin EDTA	Gibco
2.5% Trypsin	Gibco
CTS TrypLE select enzyme	Gibco
Mitomycin C	WAKO
ゼラチン from porcine skin	Sigma
Matrigel Growth Factor Reduced	BD
Methocult H4434 Classic	Stem Cell Technologies
TC プロテクター	DS ファーマ

使用したフローサイトメトリー用抗体・試薬リスト

Name	Clone name	Company
Phycoerythrin (PE) Anti-human CD43	CD43-10G7	BioLegend
Allophycocyanin (APC) Anti-human CD41a	HIP8	BioLegend
PE Anti-human CD42b	HIP1	BioLegend
Pacific blue (PB) Anti-human CD235	HI264	BioLegend
AlexaFluor488 Anti-human CD45	HI30	BioLegend
APC-Cy7 Anti-human CD56	HCD56	BioLegend
PE Anti-human CD326	9C4	BioLegend
PB Anti-human CD326	9C4	BioLegend
PE anti-human TRA-1-60-R	TRA-1-60-R	BioLegend
APC Anti-human APJ	72133	R&D systems
PE Anti-human KDR	7D4-6	BioLegend
APC Anti-human KDR	7D4-6	BioLegend
PE-Cy7 Anti-human CD34	581	BioLegend
PE Anti-human VE-cadherin	BV9	BioLegend
PB Anti-human CD31	WM59	BioLegend
PE Anti-human CD2	RPA2.10	BioLegend
PE-Cy7 Anti-human CD7	CD7-6B7	BioLegend
APC-Cy7 Anti-human CD4	OKT4	BioLegend
PB Anti-human CD8	SK1	BioLegend
Propidium iodide (PI)	-	Sigma

使用した RNA 抽出・解析用キット

Name	Company
RNeasy micro kit	QIAGEN
miRNeasy mini kit	QIAGEN
PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis kit	TaKaRa bio
ReverTraAce	TOYOBO
FastStart PCR Master	Roche
Universal probe libraries	Roche
GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array and GeneChip® WT PLUS Reagent Kit	Affymetrix

使用機器

Name	Company
FACSARIAII	BD Bioscience
FACSVerse	BD Bioscience
StepOnePlus	Applied Bioscience
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific

培地・試薬組成：

hPSC 維持培地 (KSR 培地)

DMEM/F12 Ham	500 mL
KSR	130 mL
100x L-glutamine	6.5 mL
100x NEAA	6.5 mL
2-ME	1.3 mL
bFGF	5 ng / mL

血球分化用培地

IMDM	500 mL
FBS	90 mL
100x L-glutamine	6 mL
100x ITS	6 mL
MTG	450 $\mu$ M
L-Ascorbic acid	50 $\mu$ g / mL

マウス胎仔線維芽細胞用培地 (MEF 培地)

DMEM	500 mL
FBS	56 mL
100x L-glutamine	5.6 mL

C3H10T1/2 用培地

BME	500 mL
FBS	56 mL
100x L-glutamine	5.6 mL

OP9 用培地

Alpha MEM	500 mL
FBS	56 mL
100x L-glutamine	5.6 mL



Chemically defined medium (CDM)

RPMI1640	500 mL
ITS	5 mL
100x L-glutamine	5 mL
MTG	450 $\mu$ M
L-Ascorbic acid	50 $\mu$ g / mL

hPSC トリプシン溶液 (TK 溶液)

PBS + KSR (20%) + Trypsin (0.25%) + CaCl<sub>2</sub> (1mM)

Staining Medium (SM)

PBS + FBS (3%)

PI 入り Staining Medium (SMPI)

SM + PI (10  $\mu$ g / mL)

ゼラチン液

PBS + ゼラチン (0.1%)、オートクレーブで滅菌後に使用

50 倍希釈マトリゲル液

DMEM/F12 Ham 500 mL + Matrigel Growth Factor Reduced 10 mL

Mitomycin C 溶液 (MMC 溶液)

Mitomycin C 10 mg を PBS 10 mL へ溶解し、1mg / mL 溶液とした。

## <4-2. 実験方法>

### 細胞・動物

ヒト ES 細胞 KhES3 株は、京都大学末盛博文博士より提供頂いた。また、ヒト ES 細胞 H1 株は、京都大学中畑龍俊博士より提供頂いた。実験に用いた ICR マウスは日本 SLC より購入した。動物実験に関しては、東京大学及び京都大学の規定に従って行った。ヒト ES 細胞の使用は所定の講習会を受講し、東京大学での使用計画書「ヒト胚性幹細胞からの造血幹細胞および分化血液細胞の誘導」、及び、京都大学 iPS 細胞研究所での使用計画書「ヒト ES 細胞からの血球・神経分化に関する研究」に則って行った。

### ゼラチンコート

60 mm dish では 2 mL / dish, 100 mm dish では 4 mL / dish のゼラチン液を入れ、全体に分布するようにディッシュを揺らし、37°C で 1 時間以上インキュベートしコーティングした。

### マトリゲルコート

コーティングする 6-well plate, 60 mm dish とピペット類は 4°C に予め冷やしておいた。4°C で保存してある 50 倍希釈マトリゲル液を冷えたまま、6-well plate では 2 mL / well, 60 mm dish では 3 mL / dish で添加し、37°C で 1 時間以上インキュベートしコーティングした。

### マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) の樹立

マウス胎仔線維芽細胞は、ICR マウス E12.5 の胎仔を用いて樹立した。

妊娠 12 日目のマウスを安楽死させ、無菌的に子宮を取り出し、用手的に胎仔を胎盤などから分離した。頭部と腹部内臓を用手的に取り除き、鉗を用いて細かくした。0.05% Trypsin EDTA 1 mL / 匹を添加して細胞培養用のフラスコに入れ、室温下に磁気スターラーで 300 rpm で 20 分間攪拌し、細胞を分離した。MEF 培地を 2 倍量添加して反応を止め、50 mL の遠沈管に移し、400g, 10 分遠心分離した後に上清を除去した。ペレットを 1 匹

あたり 10 mL の DMEM + 10% FBS + L-glutamine 培地を用いて懸濁し、1 匹分の細胞を 1 枚の 100 mm dish に播種し、10% CO<sub>2</sub>, 37.0°C でインキュベートした (day0)。day1 に培地を全交換した。day2 で細胞を 0.05% Trypsin EDTA を用いて剥離し回収、1 枚の 100 mm dish から 1.2 枚の 150 mm dish の計算で継代・拡大培養した。day4 に細胞を回収し、4x10<sup>6</sup> cells / tube で TC プロテクターを用いて -80°C に凍結保存した。

MEF を iPS 細胞培養に用いる場合、以下のようにして行った。凍結チューブを解凍し、1 本あたり 1 枚の 100 mm dish に播種した。解凍翌日に 1 mg / mL MMC 溶液を 10 µg / mL の終濃度で添加し、37°C で 2 時間インキュベートして細胞分裂を不活化した。0.05% Trypsin EDTA で細胞を回収し、3x10<sup>5</sup> cells を予めゼラチンコートしておいた 60 mm dish に播種し、翌日以降に用いた。

#### C3H10T1/2 細胞の培養

C3H10T1/2 細胞はサブコンフルエント時に 1 枚から 8-10 枚へ拡大するように希釈し維持継代した。継代は 3-4 日毎に行い、培地交換は 1 日おきに行った。

用いるときは、サブコンフルエントの細胞ディッシュに 1 mg / mL MMC 溶液を 10 µg / mL の終濃度となるように添加し、37°C で 2 時間インキュベートして細胞分裂を不活化した。0.05% Trypsin EDTA で細胞を回収し、8x10<sup>5</sup> cells を予めゼラチンコートしておいた 100 mm dish に播種し、翌日以降に用いた。

#### OP9-DL1 細胞の培養

OP9-DL1 細胞はサブコンフルエント時に 1 枚から 8-10 枚へ拡大するように希釈し維持継代した。継代は 3-4 日毎に行い、培地交換は 1 日おきに行った。

用いるときは、ゼラチンコートしておいた 6-well plate に播種して培養継続し、コンフルエントとしたものを用いた。

### hPSC の MEF を用いた維持培養

培地はKSR培地を用いた。培養中は毎日培地交換を行った。

継代はTK溶液を用いて行った。培養上清を吸引除去後、TK溶液を1 mL / dishで添加し、37°Cで5分インキュベートした。上清を吸引除去し、KSR培地を3-4 mL添加。タッピングによって底面からコロニーをある程度剥離した。ピペットマン (p1000) によるピペッティングである程度コロニーを細かく砕き、必要量を新しいMEFを播種したディッシュ上に播種した。継代翌日に培地交換し、以後毎日培地交換を行った。

### hPSCのマトリゲルを用いた維持培養

培地はStemFit培地を用いた。1日おきに培地交換を行った。

継代時はPBSで2回洗浄した後、TrypLE selectを1 mL / dishで添加して3分 37°Cで反応させ、p1000 ピペットマンでピペッティングして15 mL遠沈管に回収した。MEF培地で反応を止め、遠心し上清除去した後にStemFitを1-2 mL添加して懸濁し、細胞カウントした。播種時は、 $3 \times 10^4 - 1 \times 10^5$  cells / 60 mm dishで継代し、細胞死を防ぐために培地にY27632を10  $\mu$ Mで添加した。

継代翌日にStemFit培地で培地交換し、以後1日おきに培地交換を行った。

### hPSCからのC3H10T1/2を用いた血球分化法

MEFで維持培養していたヒトES細胞を、継代時と同様にコロニーのままディッシュ底面から剥がし、前日に用意しておいた不活化C3H10T1/2ディッシュに播種した。細胞数カウント出来ないためおおよそになるが、 $5 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  cells / 10cm dishとなるようにした。培地は血球分化用培地にVEGFを終濃度20 ng / mLとなるように添加したものを

いた。必要に応じて、0.05% Trypsin EDTAを用いてシングルセルで回収し、細胞数カウントを行い、Y27632 10  $\mu$ Mとなるように添加してシングルセルのまま分化させた。

分化後はday3, day6, day9, day11, day13に培地交換を行った。

分化途中の細胞を解析する際には、培養上清を除去後にPBSで2回洗浄し、0.25% Trypsin EDTAを2mL / dishで添加して37°Cで5分インキュベートした。ピペットマン (p1000)でピペッティングして細胞をシングルセルの状態にし、15 mL遠沈管に回収した。血球分化培地を添加して反応を止め、遠心分離後に上清除去し、必要な培地に懸濁して解析した。

#### hPSCからの無血清無フィーダー系での血球前駆中胚葉分化法

マトリゲルで維持培養していたhPSCを、継代時と同様にシングルセルでディッシュから剥がして回収し、マトリゲルコートした60 mm dishに播種した。培地は、CDMまたはStemFit培地にActivinA 50 ng / mL, BMP4 50 ng / mL, CHIR99021 3  $\mu$ M, NOGGIN 125 ng / mL, DKK-1 100 ng / mL, XAV939 2.5  $\mu$ Mを必要に応じて添加し、day2で同様の組成で培地交換を行った。Day0-2のみ細胞死を抑制するためY27632 10  $\mu$ Mを添加した。

Day4で細胞を回収した。PBSで2回洗浄後に、TrypLE selectを1 mL / dishで添加して37°Cで3分反応させた。ピペットマン (p1000) でピペッティングして細胞を剥離し、15 mL遠沈管に回収した。血球分化用培地を添加して反応を止め、遠心分離し上清を除去後、血球分化用培地で懸濁して細胞数カウントした。この細胞を以下の2種類の方法を用いて血球へと分化させた。

### スフェロイド形成を介した無フィーダー血球分化

day4で回収した細胞を $2 \times 10^6$  cells / 100 mm EZSPHERE dish (AGCテクノグラス)で播種した。血球分化用培地にVEGF 50 ng / mL, bFGF 50 ng / mL, SB431542 10  $\mu$ M, ヘパリン 10単位 / mLを添加したものをを用いた。day7に形成されたスフェロイドをピペッティングで遠沈管に回収し、遠心分離・上清除去後に血球分化用培地で懸濁し、1枚から1-3枚の拡大倍率でPrimeSurface 90 mm dish (住友ベークライト)上に継代した。培地にはVEGF 50 ng / mL, bFGF 50 ng / mL,ヘパリン 10単位 / mLを添加した。以後day10, 12に同組成で培地交換を行った。Day14で、プレート内の細胞全てをピペッティングで攪拌し、40  $\mu$ mのセルストレーナーを通して50mL遠沈管に回収した。遠心後に上清除去し、血球分化用培地で懸濁して細胞数カウントした。

### セルソーターを用いた無フィーダー血球分化

day4で回収した細胞を抗体で反応させた後に、FACS Aria II を用いてマトリゲルコートした6-wellに $3 \times 10^4$  cell / wellで直接ソーティングした。Wellはマトリゲル液を除去した後に、血球分化用培地 + VEGF 50 ng / mL, bFGF 50 ng / mL, SB431542 10  $\mu$ M, ヘパリン 10単位 / mL + Y27632 10  $\mu$ Mを添加したものを2 mL / wellで予め入れておいた。

day7, day10, day12に血球分化用培地にVEGF 50 ng / mL, bFGF 50 ng / mL,ヘパリン 10単位 / mLを添加したもので培地交換を行った。day14で、上清を15 mL遠沈管に回収し、PBSで2回洗浄してこれも同じ遠沈管に回収し、TrypLE select 1mL / wellで添加し、37°Cで5分反応させ、ピペットマン (p1000) でピペッティングして底面から細胞を剥離させ、シングルセルの状態として同じ遠沈管に回収した。遠心分離後に上清除去し、血球分化用培地で懸濁して、その後の解析に用いた。

## 得られた血球からの巨核球・赤芽球・T細胞分化誘導法

誘導したday14の血球を用いて、各血球種への分化誘導を行った。

巨核球誘導では、C3H10T1/2細胞を播種した6-well plateに血球 $1 \times 10^5$  cells / wellで播種。培地は血球分化用培地を用い、SCF 50 ng / mL, TPO 50 ng / mLを添加した。7日間培養した後に回収し、フローサイトメトリーで解析を行った。

赤芽球誘導では、C3H10T1/2細胞を播種した6-well plateに血球 $1 \times 10^5$  cells / wellで播種。培地は血球分化用培地を用い、SCF 50 ng / mL, EPO 3 units / mLを添加した。7日間培養した後に回収し、フローサイトメトリーで解析を行った。

T細胞誘導では、OP9-DL1細胞を播種しコンフルエントとした6-well plateに血球を $1 \times 10^{5-6}$  cells / wellで播種。培地はOP9用培地を用い、SCF 10 ng / mL + FLT3 ligand 5 ng / mL + IL-7 5 ng / mLを添加した。14日間培養した後に回収し、フローサイトメトリーで解析を行った。

## コロニー形成能アッセイ

誘導したday14の血球を用いて、コロニー形成能を測定した。Methocult H4434 classic 4 mLに対して血球 $5 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$ 個を混和し、60 mm dishに播種した後14日間、37°C 5% CO<sub>2</sub>環境下で培養し、形成されたコロニーを顕微鏡下に観察した。

## フローサイトメトリー

シングルセルの状態の細胞を必要量用意し、蛍光ラベルされた抗体を、細胞数に合わせた量を必要に応じて組み合わせて用いた。抗体を必要量添加後に30分以上4°Cでインキュベートして反応させた。その後にSMで希釈し、遠心、上清除去し、必要量のSMPIで

懸濁して解析した。解析時にはhPSC由来の細胞とフィーダー細胞が混在している場合は、FSC, SSCのゲート、及びhPSCに発現させたGFPによって分離した。

### Quantitative Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

回収対象の細胞をRNeasyまたはmiRNeasy (QIAGEN)を用いて、使用説明書に準じてRNAを回収した。RNAはPrimeScript2 (TAKARA Bio)またはReverTraAce (TOYOBO)を用いて、使用説明書に準じてcDNA合成した。

qRT-PCRでは、反応液をRocheのMasterMixとUniversal probeを用いて以下のように調整した。

2xMasterMix	10 $\mu$ L / sample
Probe (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L / sample
Fwd Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L / sample
Rev Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L / sample
Template cDNA	1 $\mu$ L / sample
H2O	7.8 $\mu$ L / sample
Total	20 $\mu$ L / sample

反応・データ取得はStepOnePlusを用いて行った。反応プログラムは以下の通り。

1 <sup>st</sup> step (1 cycle)	95°C	10 minutes
2 <sup>nd</sup> step (40 cycle)	95°C	10 seconds
	60°C	30 seconds

Primer listは以下のとおり。Primer設計はRoche Universal Primer websiteのAssay design centerを用いて設計した。



(<https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?tab=Assay+Design+Center&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1>)

Gene	Universal Probe No.	Fwd	Rev
Beta-actin (ACTB)	27	tcctccctggagaagagcta	cgtggatgccacaggact
NANOG	69	atgcctcacacggagactgt	cagggctgtcctgaataagc
OCT3/4 (POU5F1)	69	gcttcaagaacatgtgaagctg	cacgagggttctgctttg
T	23	gctgtgacaggtaccaacc	catgcaggtgagttgcagaa
APJ	79	ggcagttctttgggtgct	gtggtgcgtaacaccatgac
ETV2	6	gggtgcatggtatgaaatgg	aaggccttctgaatgttctctg
KDR	18	gaacatttggaaatctcttgc	cggaagaacaatgtagtcttgc
RUNX1	21	acaaccaccgcaagtc	catctagtttctgccgatgtctt

### 遺伝子発現アレイ解析

Affymetrix社製のGeneChipを用いた。解析にはGeneSpring 13.0を用いた。

GeneChip® WT PLUS Reagent Kitを用いてサンプルRNAを解析した。使用説明書に準じてサンプル調整した。

Gene Ontology解析はDAVIDを用いて行った<sup>56</sup>。

## 5. 結果

### hPSCからの血球分化系は細胞表面マーカーを用いて各段階を追跡できる

hPSCから血球までの分化過程は、中胚葉、血球血管前駆細胞を経て血球になることが想定されている。以前に報告された方法<sup>44</sup>を用いて、この過程を細胞表面マーカーでトレースできるかをヒトES細胞株のKhES3を用いて検証した。

C3H10T1/2細胞と共培養する系において、hPSCの細胞表面マーカーの変化を追うために、共培養開始 (day0)から血球が出現するまで(day12)を経時的に解析した。培養中の細胞全てを回収し、フローサイトメトリーで細胞表面抗原の発現を調べた。解析した表面抗原は既報を参考とした<sup>52,53,57</sup>。Figure.2Aに実験の概略を図示した。

Figure.2B-Dに結果を呈示する。

共培養開始からday3で新しい細胞集団を確認することができた。この細胞集団は、CD56+APJ+で特徴づけることができた。CD56とAPJはそれぞれ単独で中胚葉のマーカーとして報告されている<sup>52,53,55</sup>。CD56はNCAMとしても知られている接着因子であり、APJはApelin分子などのレセプター(APLNR)として報告されている機能分子である<sup>58,59</sup>。

Day5になって初めて、血球血管前駆細胞のマーカーとして知られるCD34+細胞が出現し、day6,7と細胞集団の割合が増加した。

Day8以降に初期血球マーカーとして知られているCD43+細胞の出現が認められた。これはDay12以降も細胞集団が増加した。

以上の結果から、まずday0-4でCD56+APJ+細胞、day5-7でCD34+、day8以降にCD43+細胞が出現することが分かった。この時間軸は非常に安定しており、再現性良く確認できた。

この結果から、分化過程は4つの細胞状態と、その間の3つのステップから構成されることが分かった。即ち、hPSC、CD56+APJ+細胞、CD34+細胞、CD43+細胞の4つである。これらの間のステップを初期ステップ(day0-4)、中期ステップ(day4-7)、後期ステップ(day7-)と呼ぶこととした。

各細胞集団が実際にどういった細胞であるかを確認するために、細胞をFACSでソートして回収し、定量PCRによって遺伝子発現を確認した。Figure.1Eに結果を示す。多能性幹細胞のマーカであるNANOGやOCT3/4はhPSCでのみ高発現をしており、中胚葉に特徴的な遺伝子であるT (BRACHYURY)やAPJはday4で同定したCD56+APJ+細胞でのみ高く、血球血管前駆細胞で重要なETV2やKDRはday7で同定したCD34+細胞でのみ高い事が明らかになった。また血球発生に必須な重要遺伝子として知られているRUNX1はday4 CD56+APJ+細胞集団以降で上昇し、day7 CD34+細胞でさらに上昇していた。以上のことから、分化過程で同定した各細胞集団は、発生過程で認められる各段階（中胚葉、血球血管前駆細胞、血球）に一致していることが示唆され、分化過程は表面マーカを用いることでトレースできることが分かった。また、RUNX1陽性であるday4 CD56+APJ+細胞は、血球産生中胚葉であることが強く示唆された。

Figure.2

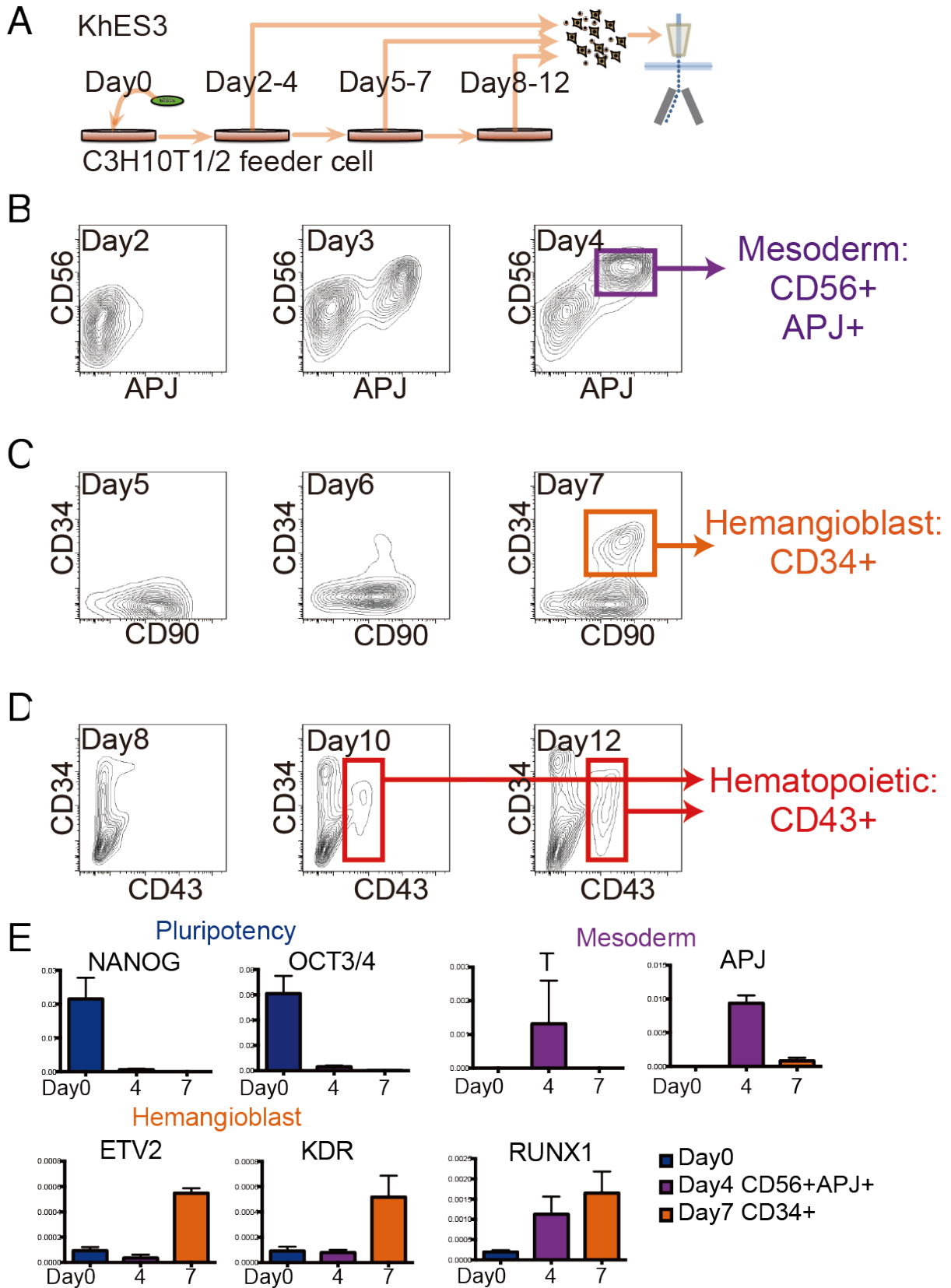


Figure.2 細胞表面マーカーを用いて、発生段階を模した各段階の細胞を同定・追跡可能である。

- A. C3H10T1/2 細胞と KhES3 の共培養による血球分化系を、時系列で細胞回収して表面抗原発現パターンを解析した。
- B. 初期ステップでの CD56+APJ+細胞集団の出現パターンを示した。
- C. 中期ステップでの CD34+細胞集団の出現パターンを示した。
- D. 後期ステップでの CD43+細胞の出現パターンを示した。
- E. 各細胞集団での、発生段階指標となる遺伝子群の発現パターンを qRT-PCR で解析した。結果は平均値と標準偏差で示した (n=3)。

## 既存の血球分化系では中期ステップ以降に改善の余地がある

既存の系で十分な分化誘導効率が得られているかどうかを検証するために、Day4のCD56+APJ+細胞とDay10のCD43+細胞の、分化した細胞全体に対する割合を測定した。その結果、初期のステップでは既にCD56+APJ+細胞は20-40%程度の割合(Figure.3A,B)で誘導可能であった。つまり、フィーダー細胞との共培養のみで十分に中胚葉誘導が獲得できることを示唆した。一方でCD43+細胞は全体の数%に留まっており、非常に低効率であることも分かった(Figure.3C,D)。即ち、中期以降のステップにおいては中胚葉を十分に血球に誘導できていないことが示唆された。本研究の目的のためには中胚葉からの血球分化誘導効率はある程度は高い必要があり、改善すべきであると考えられた。

## Figure.3

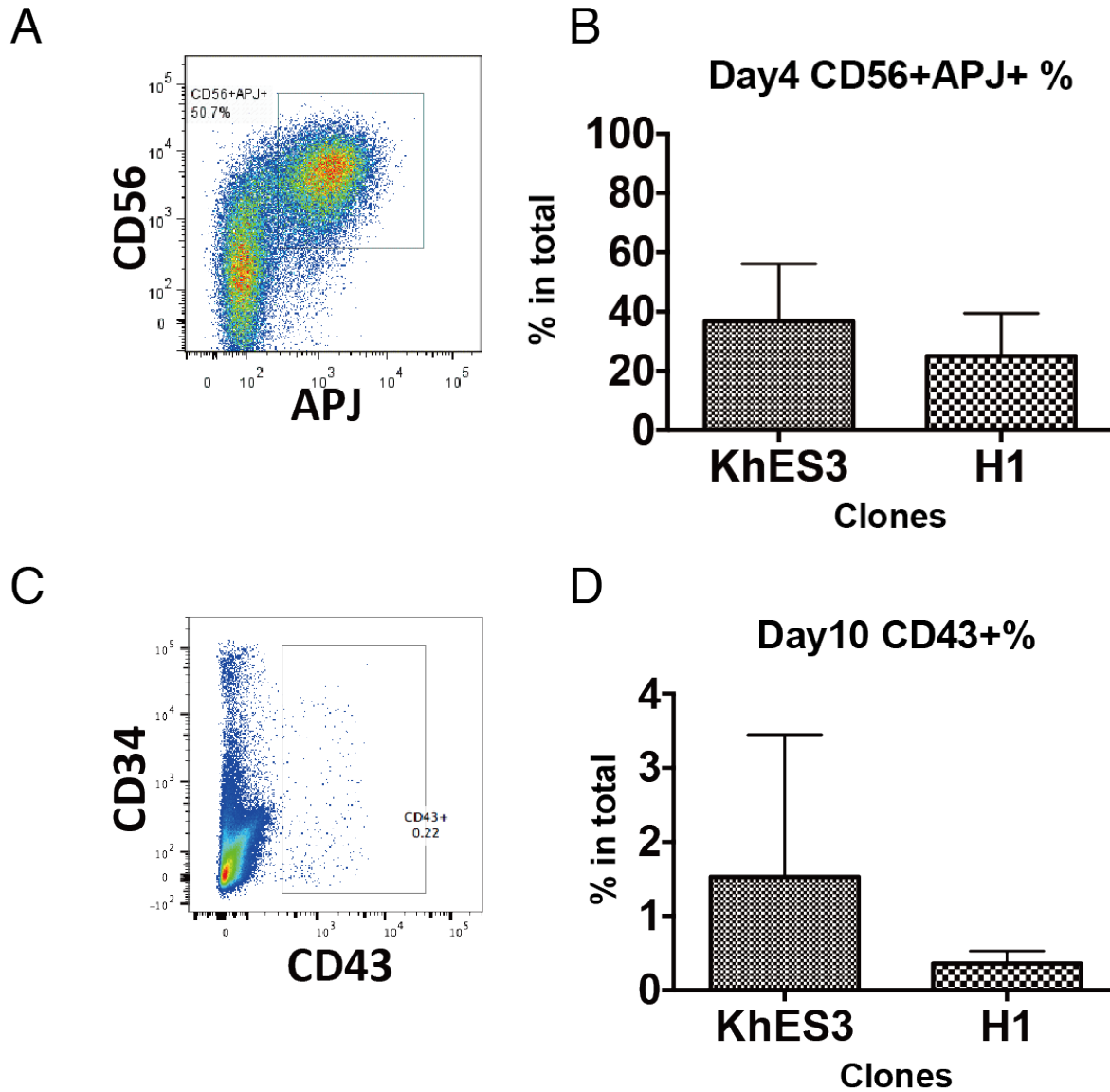


Figure.3 既存の血球分化系においては、中胚葉への分化は十分に達成できているが、血球への分化効率は低い

A. 分化開始4日目のFACS plotを示した。

B. 2つのヒトES細胞株でのCD56+APJ+細胞の割合を、平均値と標準偏差で示した(n=3)。

C. 分化開始10日目のFACS plotを示した。

D. 2つのヒトES細胞株でのCD43+細胞の割合を、平均値と標準偏差で示した(n=3)。

初期ステップでは3つのシグナルが重要な役割を果たし、その重要性には差がある

次に、各ステップ段階ごとに機能する個別の重要なシグナル因子を調べることにした。まず初期のステップに関して検証した。

そこで細胞表面マーカーを評価基準として、初期のステップに介入することで、CD56+APJ+細胞の出現にどういった変化が認められるかをKhES3, H1を用いて検証した。C3H10T1/2細胞と血清を用いた系であり、多数の未知の物質からの影響下にあるため、この検証には発生過程の中胚葉誘導で重要と考えられている3つの因子(Nodal/ActivinA/TGF $\beta$ , BMP4 canonical WNTシグナル)に関して阻害剤及びアンタゴニストを添加することで、3つのシグナルが重要な役割をしているのかどうかを検証する必要性があった。Figure.4Aに実験の概略を示す。各因子の添加濃度は、既報を参考として最高濃度を決定し、そこから希釈した濃度を検討した<sup>60-62</sup>。

Figure.4Bに、各因子添加による、KhES3分化開始day4のCD56+APJ+細胞の出現の様子をFACS plotで示した。

まず、Nodal/ActivinA/TGF $\beta$ の阻害剤であるSB431542を添加することで、初期ステップでのTGF $\beta$ シグナルの必要性を検証した。Figure.4Cに結果を示す。結果として、低濃度の時点からCD56+APJ+細胞の程度の強い減少が確認できた。影響は極めて強いことから、初期ステップでのTGF $\beta$ シグナルは必須因子であることが示唆された。

次に、BMP4の影響を確認するために、BMPの生理的なアンタゴニストであるNOGGINを添加した。Figure.4Dに結果を示す。CD56+APJ+細胞の減少が確認できたが、この影響は限定的であり、高濃度でも消失するまでには至らなかった。

最後に、canonical WNTシグナルの影響を確認するために、canonical WNT経路の阻害因子であるAXINの安定化剤であるXAV939を添加した。これによって、 $\beta$ -cateninの分解が亢進し、canonical WNTシグナルは阻害される。Figure.4Eに結果を示す。すると、CD56+APJ+細胞の減少が確認された。BMP同様に、この影響も限定的であり、高濃度でも消失するまでには至らなかった。



以上のことから、発生学的に同定された中胚葉誘導因子としての3つの異なったシグナルであるNodal/ActivinA/TGF $\beta$ シグナル、BMPシグナル、canonical WNTシグナルはそれぞれがhPSCから中胚葉の過程の分化誘導プロセスに影響を与えていた。その強度には差があり、Nodal/ActivinA/TGF $\beta$ は必須因子であったが、BMP4やcanonical WNTシグナルは中胚葉誘導に関与しているものの、その効果は限定的であった。Figure.4Fに結果の概略を図示した。矢印の大きさがシグナルの影響力を表している。

Figure.4

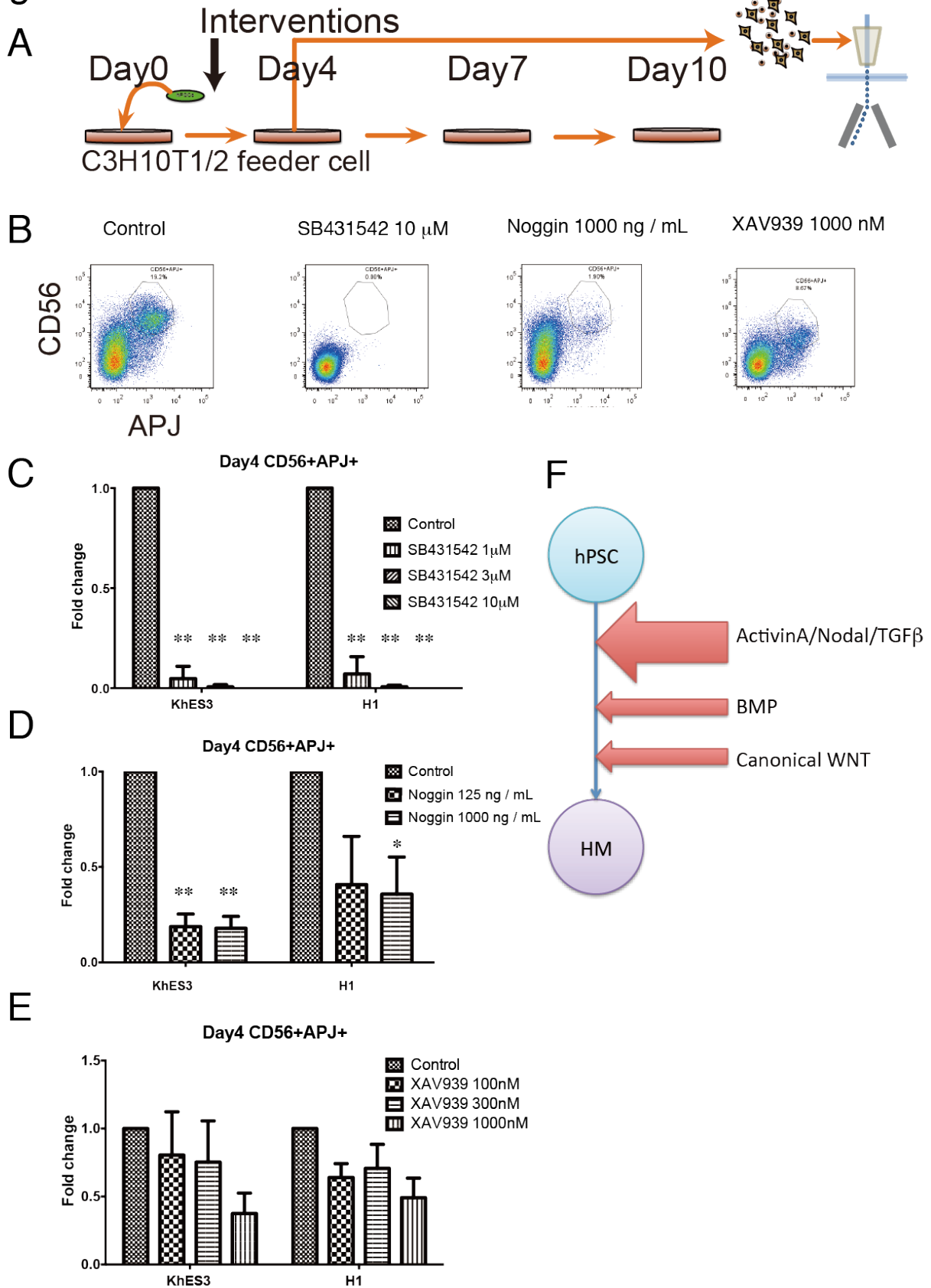


Figure.4 初期ステップへの介入によって、3つの重要なシグナル因子を同定した

- A. 実験の概略。Day0-4 に介入因子を添加し、day4 での中胚葉細胞の出現割合を解析した。
- B. 各因子を添加した条件での day4 CD56+APJ+細胞の出現パターンを示した。
- C. SB431542 (TGFβ阻害薬)による効果を control 群と比較した。結果を平均値と標準偏差で示した。SB431542 添加によって、低濃度条件から有意に中胚葉細胞集団の減少を認めた。(n=3, \*\*p<0.01, paired t test)
- D. NOGGIN (BMP アンタゴニスト)による効果を control 群と比較した。結果を平均値と標準偏差で示した。NOGGIN 添加によって中胚葉細胞集団の減少を認めた。(n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01, paired t test)
- E. XAV939 (canonical WNT シグナル阻害薬)による効果を control 群と比較した。結果を平均値と標準偏差で示した。統計学的に有意ではなかったが、XAV939 添加によって中胚葉細胞集団の減少傾向を認めた。(n=3, paired t test)
- F. 各シグナルの影響力には差があり、TGFβシグナルが最も強く影響していた。矢印の大きさに影響の程度を表現した。

## 中期ステップの改善により血球分化効率が著しく改善した

次に中期ステップについて検証した。既存の系ではday10でのCD43+細胞の出現率は1%未満と低効率であった(Figure.3C,D)。血球への誘導効率が低いことは、中胚葉の血球産生能を評価するためには不都合である。具体的には、血球産生能が高い細胞も低い細胞も、血球になる効率が悪いためどちらも低いと評価してしまう可能性が排除しきれないということである。

そこで、中期過程の培養条件（外的要因）を改善することで、血球誘導効率をより上昇させることを目的として、KhES3, H1を用いて実験を行った。

この過程においては、既存のプロトコールにあるVEGF存在下に、血球誘導を促進する可能性のある分子、及び血球誘導を阻害している可能性のある分子の阻害薬を添加した。実験の概略をFigure. 5Aに示す。

bFGFはHemangioblastを誘導する際に必須の分子として報告がある。BL-CFCの誘導にはbFGFが必須である<sup>63</sup>。そこで、この系にbFGFを添加するとともに、その効果を増強するためにbFGFの安定化作用があるヘパリンを合わせて添加した<sup>64</sup>。結果をFigure.5Bに示す。bFGFとヘパリンの添加によって、day10時点での血球産生効率が上昇した。

TGF $\beta$ シグナルの阻害が血球産生効率を上昇させる報告があることから<sup>52,65</sup>、阻害剤であるSB431542をこの時点で添加した。結果をFigure.5Cに示す。すると既存の報告と一致するように、day10時点での血球産生効率が上昇した。

Figure.5

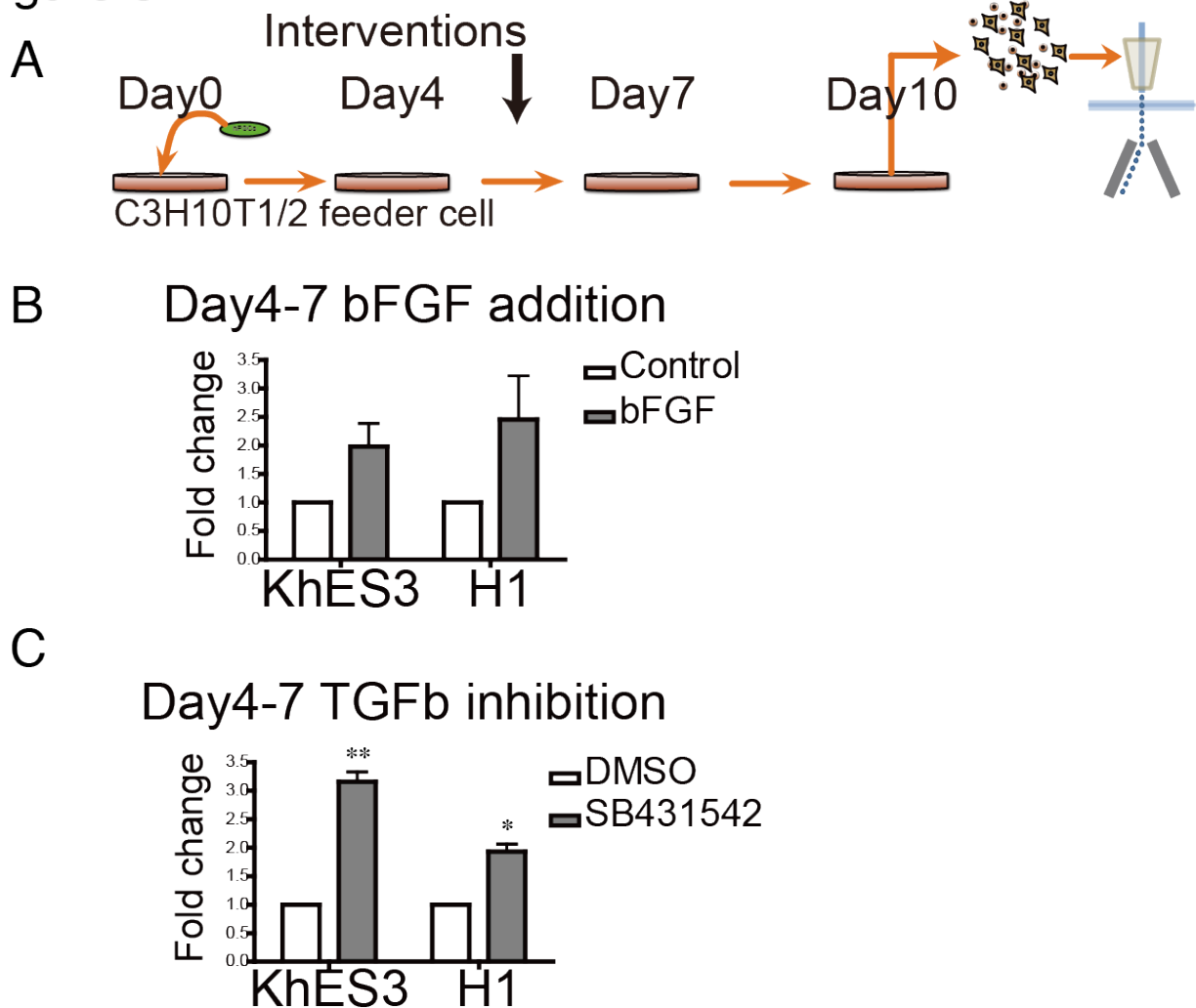


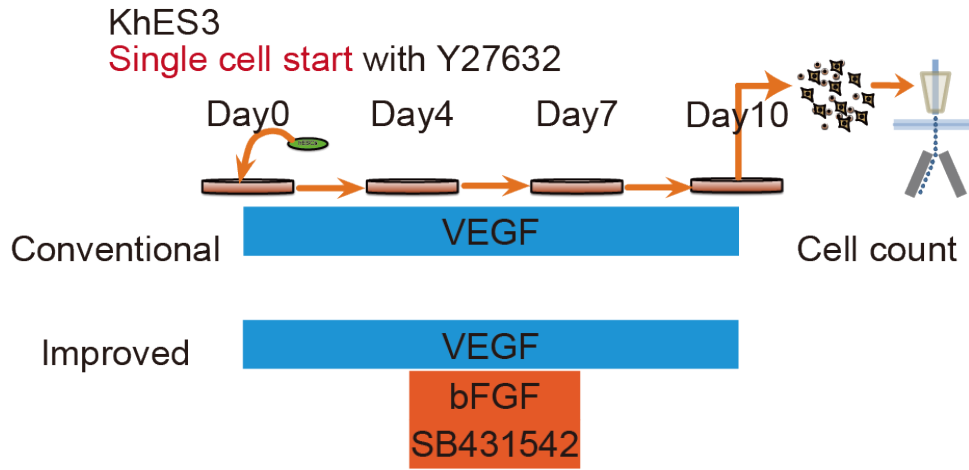
Figure.5 中期ステップでは、2つの因子によって分化の改善が得られた。

- A. 実験の概略。Day4-7の中期ステップに各因子を添加し、day10での血球の出現割合を解析した。
- B. bFGFの添加の効果をcontrol群と比較した。統計学的に有意ではなかったが、bFGFの添加によってday10血球の出現効率を改善する傾向を認めた。結果を平均値と標準偏差で示した。(n=3, paired t test)
- C. SB431542の添加の効果をDMSO群と比較した。SB431542の添加によってday10血球の出現効率を有意に改善した。結果を平均値と標準偏差で示した。(n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01, paired t test)

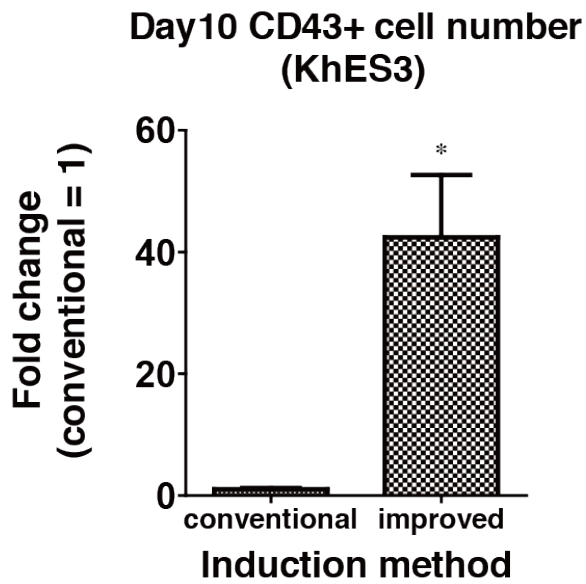
これら2つによってどの程度の血球分化改善が得られるのかを確認するために、得られる血球の絶対数を指標として条件を比較した。初期播種細胞数を同数とするために、敢えて分化開始時の細胞をシングルセルの状態とした。実験プロトコールをFigure.6Aに図示した。結果をFigure.6B,Cに示す。bFGFとSB431542の追加によって、通常の40倍程度に血球産生効率が上昇したことが明らかであった。以上より、VEGF, bFGF, TGF $\beta$ 阻害によって、中胚葉から血球血管前駆細胞過程の効率が上昇することが分かった。またこの結果から、C3H10T1/2との共培養で得られるday4 CD56+APJ+細胞は血球分化ポテンシャルを十分に持つ中胚葉であることが示された。

**Figure.6**

**A**



**B**



**C**

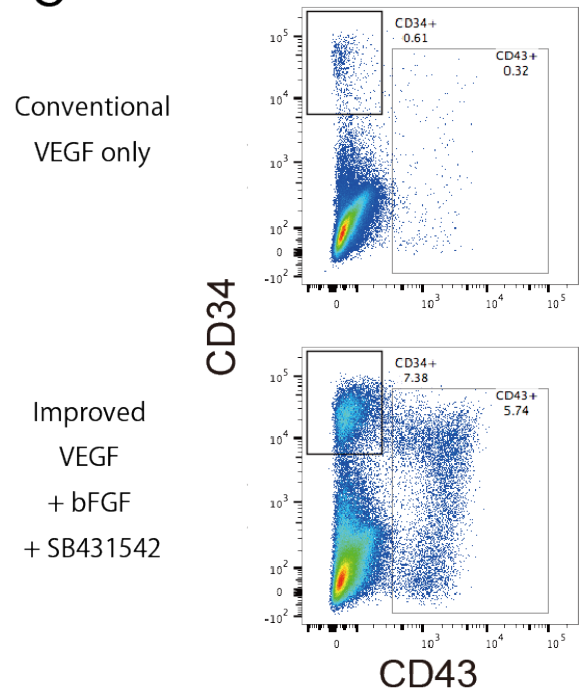


Figure.6 中期ステップでの介入により、血球分化効率の劇的な改善が得られた。

- A. 実験の概略を示す。最終的に得られる血球細胞数を指標とするため、それぞれの条件での初期播種数を一致させる必要があった。そのためにシングルセルの状態での分化開始した。
- B. bFGF と SB431542 は相乗効果を示し、既報と比較して 40 倍程度の血球細胞産生数の増加を達成した。KhES3 のデータを平均値と標準偏差で示した。(n=5, \*p<0.05, paired t test)
- C. Conventional vs. improved method で誘導した分化細胞全ての FACS plot を示す。Conventional method ではほとんどの分化細胞が CD43 陰性であったが、improved method によって CD43+細胞の割合が増加した。KhES3 のデータを示した。



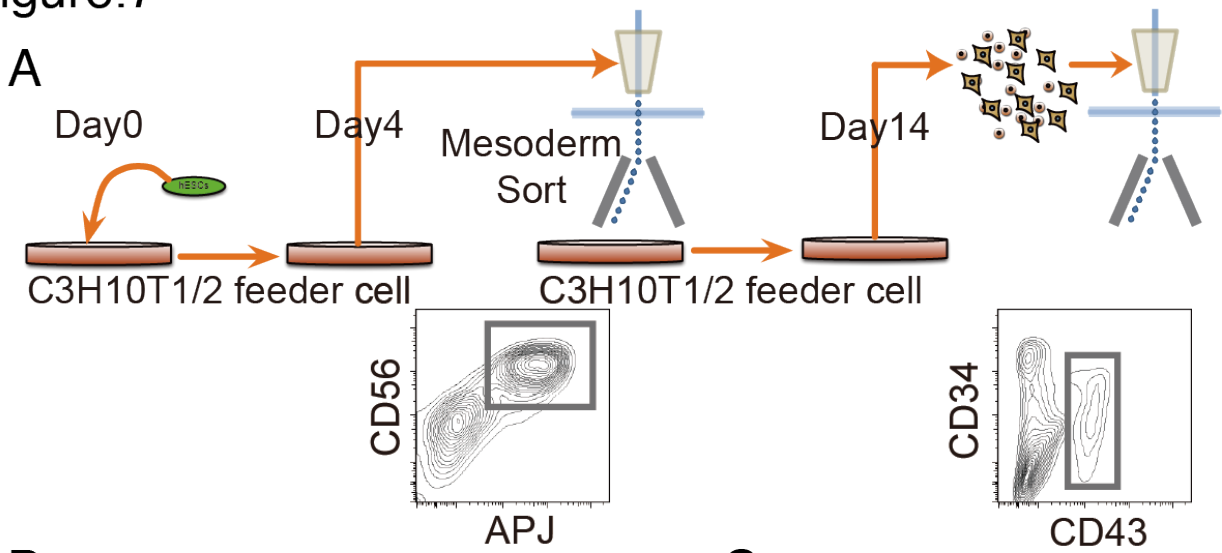
## 中胚葉の純化により、より厳密な血球分化能を評価することができた

初期ステップと中期ステップにおいて重要な因子が複数見つかり、中胚葉の血球分化ポテンシャルを評価する系を立ち上げる準備が出来た。しかし、今までの解析から、day4では半数近くがCD56+APJ+以外の細胞であり、その後も培養環境の中で共存していることから、パラクライン作用などの何らかの作用によって血球分化が影響を受ける可能性が考えられた。CD56+APJ+細胞の割合は試行毎にばらつきがあり (Figure. 7D)、影響が有る可能性は排除する必要があると考えられた。

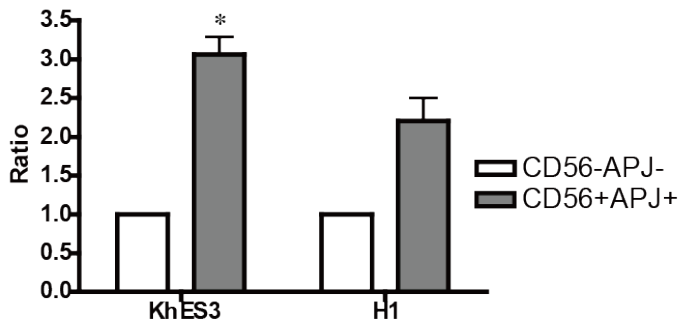
そこで、中胚葉自体の血球分化ポテンシャルをより正確に評価するために、中胚葉を純化して血球誘導を行えるかどうか検証した。Figure.7Aに図示したように、day4時点で中胚葉になった細胞のみをFACSによって純化し、新しい培養皿で規定の条件下で培養を継続し、血球を産生できるかどうかをKhES3, H1を用いて確認した。併せて、CD56-APJ-細胞の血球分化能を同様の方法で評価した。

結果をFigure 7Bに示す。CD56+APJ+細胞はCD56-APJ-細胞よりも高効率に血球を産生することが分かった。Figure 7Cの写真で確認できる通り、ソートした細胞からは球形の細胞がコロニー状に出現してくることが確認できた。また血球マーカーを有した細胞がFCMで認められた。全分化細胞中のCD43+細胞の割合をFigure.7Eに示す。全体の20%から、多い時は60%程度が血球に分化できていることが明らかになった。以上より、CD56+APJ+細胞集団から血球が産生されるものの、その産生にはそれ以外の細胞集団は不要であること、さらには本方法により血球分化を高効率に誘導可能であることを実証した。

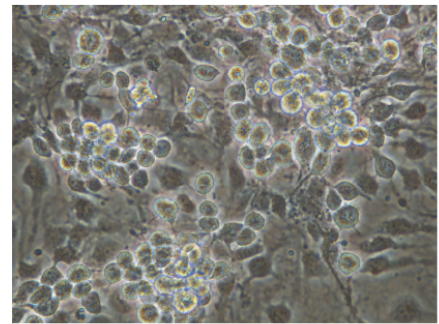
Figure.7



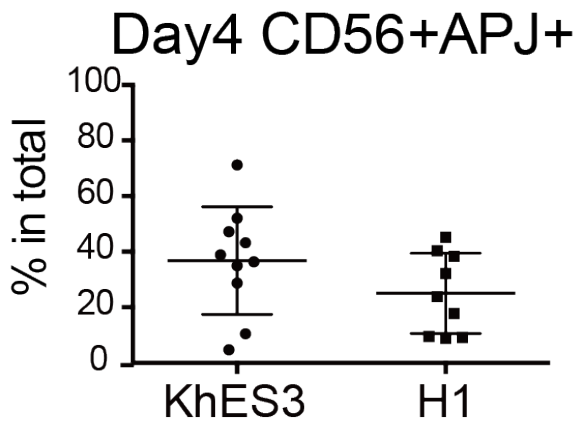
**B** Day12 CD43+ analysis after day4 sorting



**C**



**D**



**E**

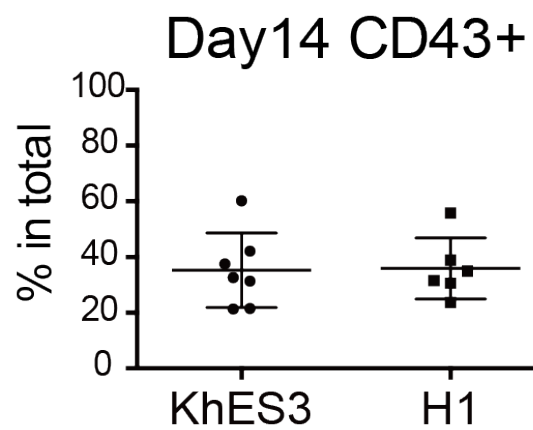


Figure.7 中胚葉を純化することで、安定した血球分化を達成できた

- A. 実験の概略を図示した。Day4 の時点で CD56+APJ+中胚葉細胞のみをソーティングし、新しいフィーダー上に播種した。これを培養継続し、day14 での血球を解析した。
- B. day4 CD56+APJ+細胞は、CD56-APJ-細胞よりも効率良く血球への分化を起こした。結果を平均値と標準偏差で示した。(n=3, \*p<0.05, paired t test)
- C. day14 では球形の細胞がコロニー状に出現する様子が確認できた。
- D. day4 での CD56+APJ+細胞の出現割合を示した。結果をドットで表示し、平均値と標準偏差を示した。試行間に 10%以上のバラつきがある。
- E. Day14 での CD43+血球の出現割合を示した。結果をドットで表示し、平均値と標準偏差を示した。全体の 20-60%が血球系に分化しており、高効率な分化系を構築することができた。

## 血球前駆中胚葉の誘導には単一ではなく複数の経路があることを確認した

今までの結果から、各ステップに必要な因子をFigure.8Aに示した。多能性幹細胞から血球までの経路に中胚葉の段階があること、この中胚葉の誘導に必要と考えられる因子群が3つあること、中胚葉の血球産生能を評価できる系が出来上がったことが示された。これらを組み合わせることで、目的である多能性幹細胞から血球までの経路、特に血球の元になる中胚葉が多能性幹細胞からどのように生じるのかを検討する準備が整った。

より正確にシグナルを調節するためには、未知の物質は限りなく減らした方が良いと考えられた。フィーダー細胞や血清は細胞生存や分化にとって有用であるが、未知の要因である点に関しては不利である。そこで、初期の中胚葉までの過程に関してどのようなシグナルが重要なのかを知るために、初期ステップでのみ無血清無フィーダー環境下で分化可能かどうかを調べた。実験の概略をFigure.8Bに示す。無血清培地とマトリゲルを用いて分化を試みた結果、この条件での血球分化の効率が低いことを確認したため、以後の実験を無血清無フィーダー条件で実施した。中期ステップ以降に関しては、無血清条件を試みたが効率が著しく低下したため、血球産生能を評価するために血清は使用する条件を依然付与した。

そこで、どのような誘導条件であれば血球分化ポテンシャルを持つ中胚葉が出現するのかを検証するために、初期ステップに重要な3つの因子について様々な組み合わせを用いて中胚葉の誘導を試みた。Figure.4の結果からNodal/ActivinA/TGFβのシグナルは必須であると考えられたため、これにBMP4とcanonical WNTシグナルを組み合わせる形で3通りのプロトコルを試した。KhES3とH1を用いて実験を行った。

全ての条件においてCD56+APJ+細胞が確認でき、中胚葉への分化を達成できたものと考えられた。結果をFigure.8Cに示す。各条件での誘導割合には差が認められ、 $AB < AC \leq ABC$ の順で効率よくCD56+APJ+細胞を誘導できた。結果をFigure.8Dに示す。

これらの細胞をFACSで純化し、day14まで血球分化条件で培養して血球誘導効率を評価した。結果をFigure.8E,Fに示す。驚いたことに、ABC条件下では血球誘導効率が著しく低下していた。

より詳細に中胚葉の性質を確認するために、day14で併せて血管内皮細胞マーカーを確認した。結果をFigure.8G,Hに示す。各条件間には大きな差は認められなかった。

ActivinA, BMP4, WNTは互いに発現を誘導し合うとされているため、ABやACに関しては本当に干渉がないことを示すために、それぞれにアンタゴニストや阻害剤を添加することとした。ActivinA + BMP4 + XAV939 (ABにcanonical WNT阻害を追加したもの), ActivinA + BMP4 + DKK-1 (ABにWNTシグナル阻害を追加したもの), ActivinA + CHIR99021 + NOGGIN (ACにBMP4シグナルを阻害したもの)のどの条件下でも、やはり高効率に血球分化を示した (Figure.9)。

以上のことから、無血清無フィーダー条件でも、特定の因子によって血球産生中胚葉を分化させることが可能であることが示された。また、初期ステップに重要であった3つの因子は、全て揃うと血球分化ポテンシャルのない中胚葉が誘導される一方で、2つの因子を組み合わせた2通りの方法では高い血球分化ポテンシャルを有する中胚葉を誘導できることが分かった。

**Figure.8**

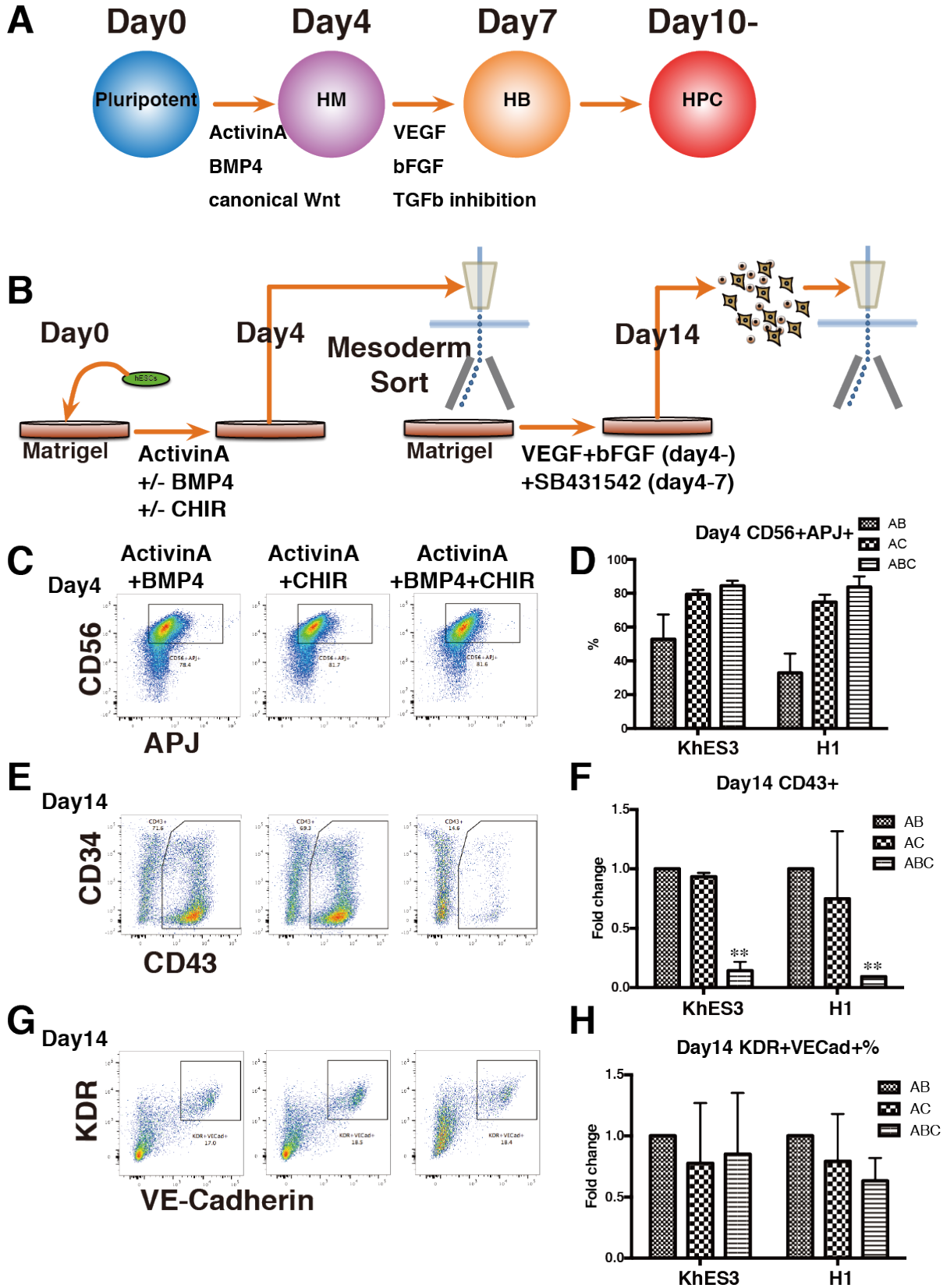


Figure.8 無血清無フィーダー系で初期ステップを行うことで、血球前駆中胚葉細胞の誘導が可能な条件が複数あることを見出した。

- A. 今までの実験結果から分かった各ステップにおいて必要なシグナル因子を図示した。
- B. 実験の概略を図示した。Day0-4での分化をマトリゲルと3つのシグナル因子の組み合わせで行い、day4で細胞をソーティングして新しいマトリゲルコートしたプレートに播種し、培養を継続、day14で全ての細胞を解析し、血球分化効率を評価した。各因子はActivinA 50 ng / mL, BMP4 50 ng / mL, CHIR99021 3  $\mu$ Mで使用した。
- C. day4での各条件におけるCD56+APJ+細胞の出現パターンを示した。
- D. 各条件でのCD56+APJ+細胞の出現割合を棒グラフで示した。どの条件でも出現は認められ、ACとABCが最も効率良く中胚葉細胞を誘導した。
- E. Day14でのCD43+細胞の出現パターンを示した。
- F. 各条件でのCD43+細胞の出現割合を、ABを基準として平均値と標準偏差で示した。ABとACでは効率よく血球に分化しているが、ABCでは血球になる細胞が顕著に減少していた。(n=3, \*\*p<0.01, paired t test)
- G. day14での血管内皮細胞 (KDR+VE-Cadherin+細胞) の出現パターンを示した。
- H. 各条件でのKDR+VE-Cadherin+細胞の出現割合を、ABを基準として平均値と標準偏差で示した。各条件間に統計学的な有意差を認めなかった。(n=3, paired t test)

**Figure.9**

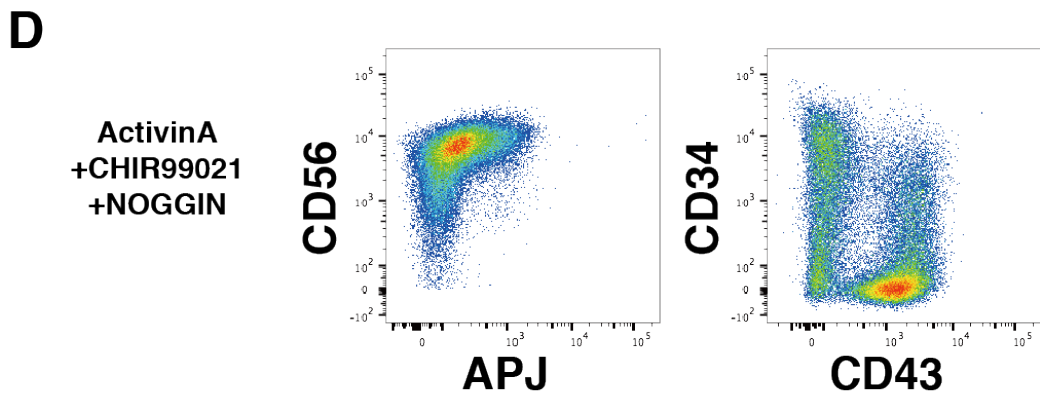
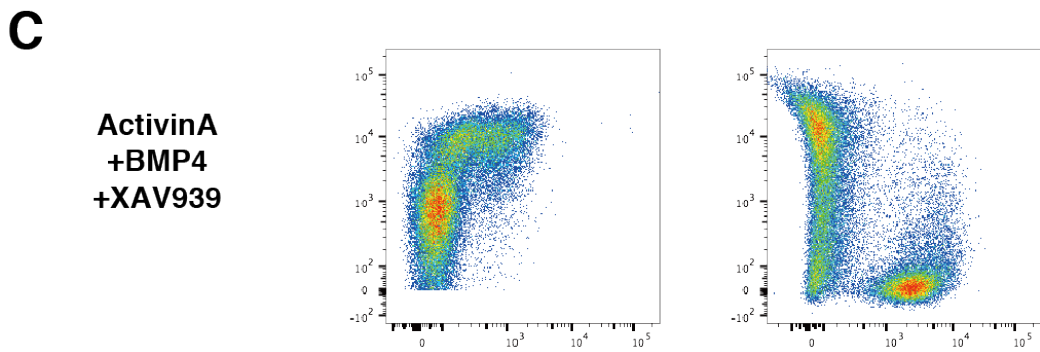
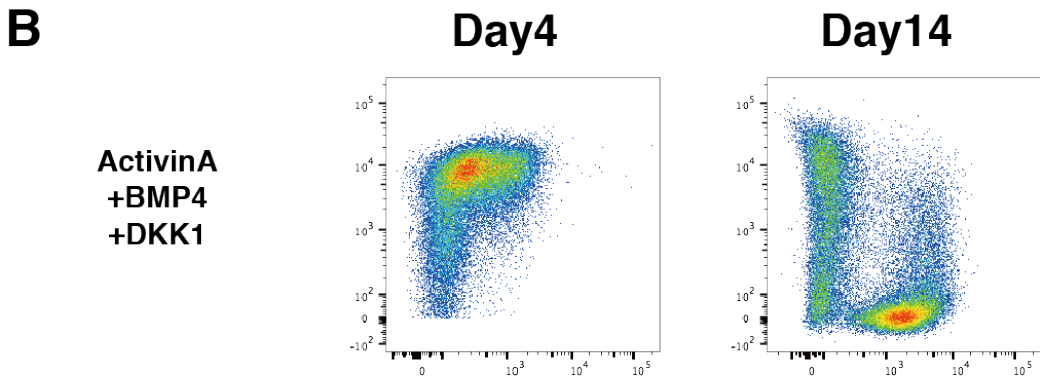
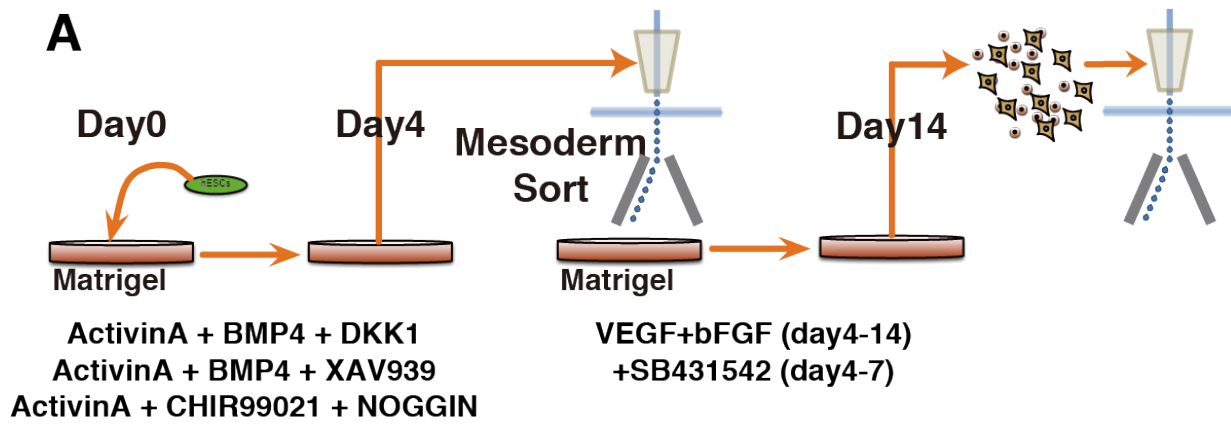




Figure.9 1つのシグナルをブロックしても血球分化に影響はなかった。

- A. 実験の概略を図示した。AB条件ではcanonical WNTシグナルブロックのためにアンタゴニストDKK1 (100 ng / mL)や阻害剤XAV939 (2.5  $\mu$ M)を添加(ABD, ABX条件)、AC条件ではBMPシグナルブロックのためにアンタゴニストであるNOGGIN (125 ng / mL)を添加した (ACN条件)。Day4以降は全て共通の条件で培養を継続した。細胞株はKhES3を用いた。
  - B. ABD条件での分化開始4日目と14日目のFACS plotを示した。
  - C. ABX条件での分化開始4日目と14日目のFACS plotを示した。
  - D. ACN条件での分化開始4日目と14日目のFACS plotを示した。
- 全てにおいて、CD56+APJ+細胞集団とCD43+細胞集団の出現を高効率に認めた。

## 条件の異なる中胚葉、血球間に遺伝子発現の差を認めた

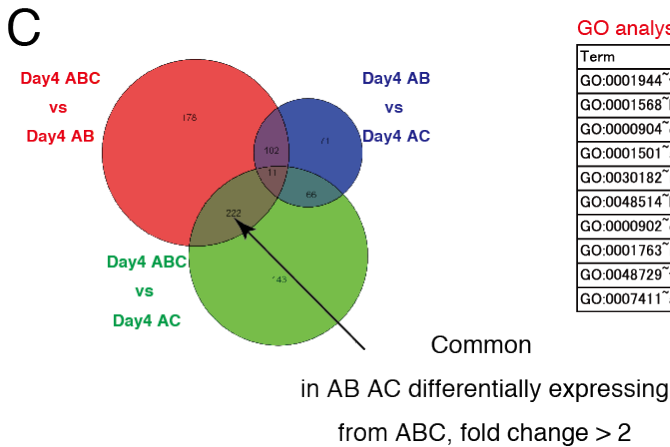
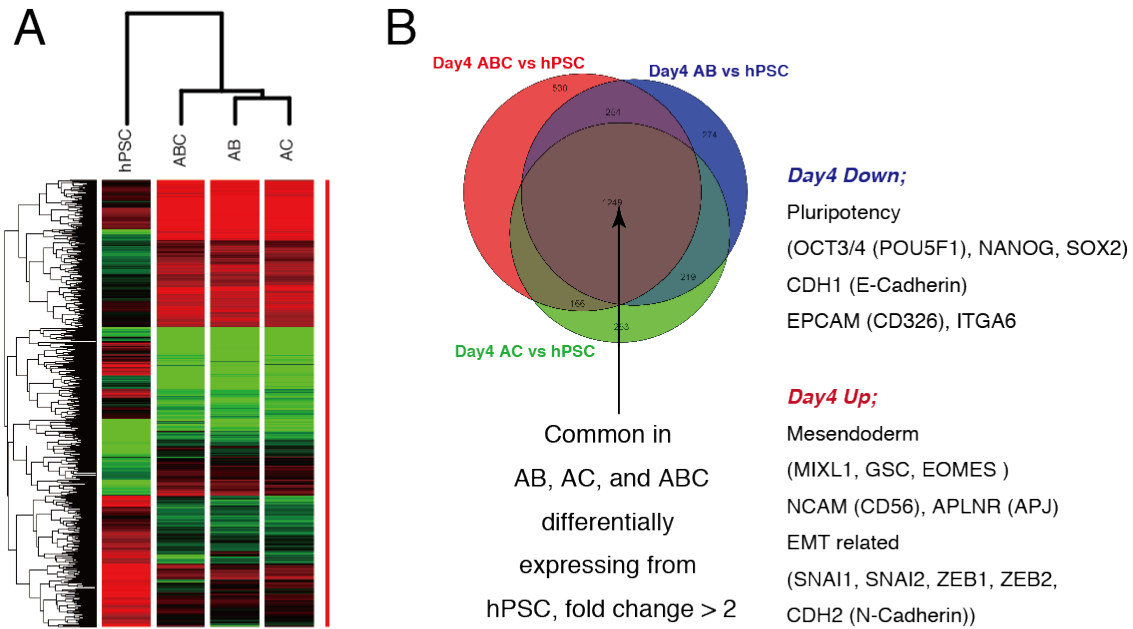
AB, AC で誘導した CD56+APJ+細胞には血球分化ポテンシャルが備わっており、ABC で誘導した CD56+APJ+細胞からは失われていた。この原因を探るために、それぞれの細胞の遺伝子発現パターンを Khes3 を用いて調べた。分化させた細胞から RNA を回収し、遺伝子発現アレイによって解析した結果を Figure 10 に示す。Figure.10A に hPSC と day4 AB, AC, ABC 間で変動した遺伝子群を用いてクラスタリング解析をした結果を示す。

Day0 hPSC と比較して、Day4 AB, AC, ABC 間は非常によく似た発現パターンを示した。各比較間の共通部分を解析した Venn 図を Figure.10B に示す。全ての条件に共通していた遺伝子を詳細に見ると、day4 細胞では多能性に関連する遺伝子群の発現低下が認められるのと同時に、中胚葉系に特徴的な遺伝子群の発現上昇と、Epithelial-Mesenchymal transition (EMT)関連遺伝子の発現上昇が確認できた。よって、AB, AC, ABC 条件で誘導した day4 CD56+APJ+細胞は典型的な中胚葉系細胞の特徴を有していることが分かった。

次に、AB, AC と ABC 間の差を見た結果を Figure.10C に示す。血球分化に関係していると考えられるのは、AB vs. ABC と AC vs. ABC 間で共通して変動し、AB vs. AC 間では変動していない群であるため、この遺伝子群に対して Gene Ontology (GO)解析を行った。Top10 の GO term を示す。血管関係の用語に混じって、筋骨格系や神経系に関連した遺伝子群が確認された。血球分化に関係しない遺伝子群が ABC 条件では上昇していることが、血球分化ポテンシャルを失う原因であることが示唆された。

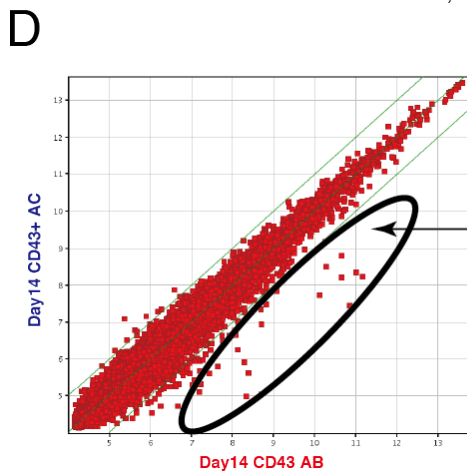
さらに、AB と AC 条件で誘導した CD43+血球間に差があるのかどうかを確認した。遺伝子発現パターンのプロットを Figure.10D に示す。ほとんどの遺伝子が Fold change < 2 以内に収まっており、非常によく似た性質を示していると考えられた。しかし、AB 条件で一部の遺伝子が AC と比較して高発現しており、この遺伝子群を GO 解析したところ、免疫系に関係していることが示唆された。この結果から、AB, AC 間の血球は大変よく似た遺伝子発現パターンを示したが、免疫系への分化に関して能力に差がある可能性が示唆された。

Figure.10



GO analysis

Term	PValue
GO:0001944~vasculature development	4.07E-10
GO:0001568~blood vessel development	2.61E-09
GO:0000904~cell morphogenesis involved in differentiation	1.65E-07
GO:0001501~skeletal system development	5.74E-07
GO:0030182~neuron differentiation	9.88E-07
GO:0048514~blood vessel morphogenesis	1.92E-06
GO:0000902~cell morphogenesis	2.11E-06
GO:0001763~morphogenesis of a branching structure	3.18E-06
GO:0048729~tissue morphogenesis	3.27E-06
GO:0007411~axon guidance	3.69E-06



GO analysis

Term	PValue
GO:0006952~defense response	1.13E-05
GO:0009611~response to wounding	3.07E-05
GO:0051094~positive regulation of developmental process	4.95E-05
GO:0006954~inflammatory response	1.18E-04
GO:0051240~positive regulation of multicellular organismal process	2.88E-04
GO:0045619~regulation of lymphocyte differentiation	4.75E-04
GO:0051241~negative regulation of multicellular organismal process	6.48E-04
GO:0006955~immune response	0.001163051
GO:0051146~striated muscle cell differentiation	0.001260221
GO:0055007~cardiac muscle cell differentiation	0.001413913

Figure.10 遺伝子発現パターン解析により、各条件間の差を見出した

- A. Day0 hPSC と AB, AC, ABC 条件で誘導した Day4 CD56+APJ+細胞の遺伝子発現解析を行い、各条件の Day4 細胞と hPSC を比較して Fold change > 2 であった遺伝子群を抽出し、クラスタリング解析を行った。
- B. Day4 CD56+APJ+細胞と hPSC を各条件で比較し、Fold change > 2 であった遺伝子群で構成した Venn's diagram。各条件で共通して変動していた遺伝子群には、多能性に関連する遺伝子群、中胚葉に関連する遺伝子群、EMT に関連する遺伝子群が含まれていた。
- C. Day4 CD56+APJ+細胞を各条件間で比較し、Fold change > 2 であった遺伝子群で構成した Venn's diagram。AB, AC と ABC 間で変動を認める遺伝子群に関して、GO 解析を行った。TOP 10 terms を表に示す。血球・血管以外の組織に関する遺伝子群の変動が確認できた。
- D. Day14 CD43+細胞を AB, AC 条件で誘導して比較解析した。AB 優位に変動している遺伝子群の GO 解析を行った。TOP 10 terms を表に示す。免疫関係の遺伝子群の変動が確認できた。

## 2つの条件で誘導した血球には機能的な差を認めなかった

ABとACの条件で誘導した血球は良く似た遺伝子発現パターンを示したが若干の差も認めた。この差が2つの条件で誘導した血球の機能に影響を及ぼしているかどうかを検証するために、得られた day14 の血球前駆細胞をさらに分化させることとした。具体的には、血球前駆細胞の標準的な機能アッセイであるコロニー形成能アッセイ、*in vitro* で赤芽球・巨核球・T細胞に分化させるアッセイを行った。結果を Figure.11 に示した。

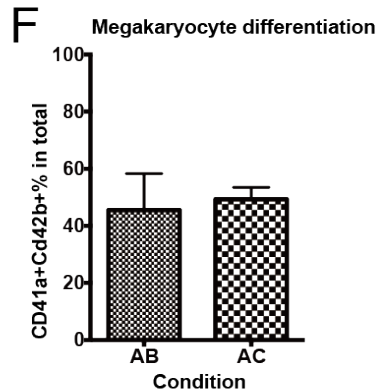
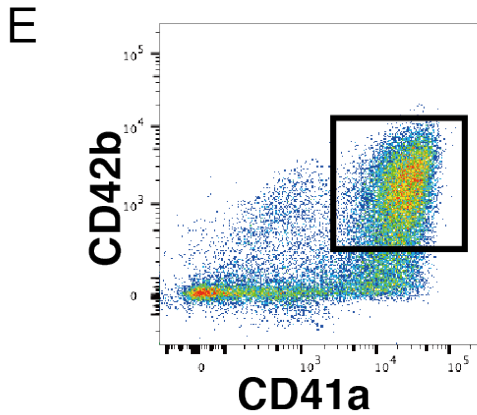
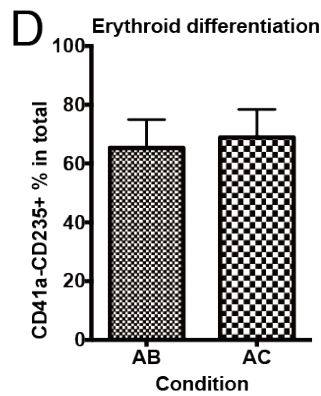
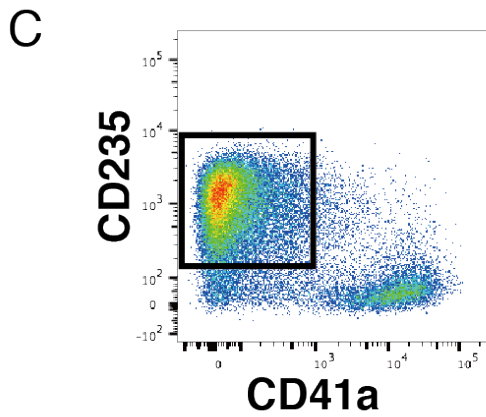
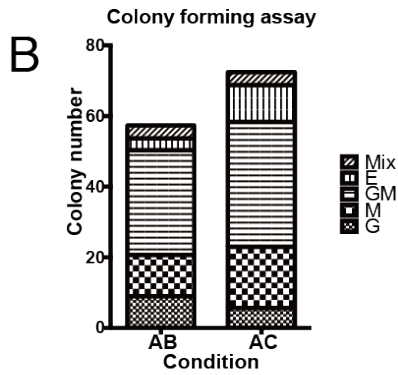
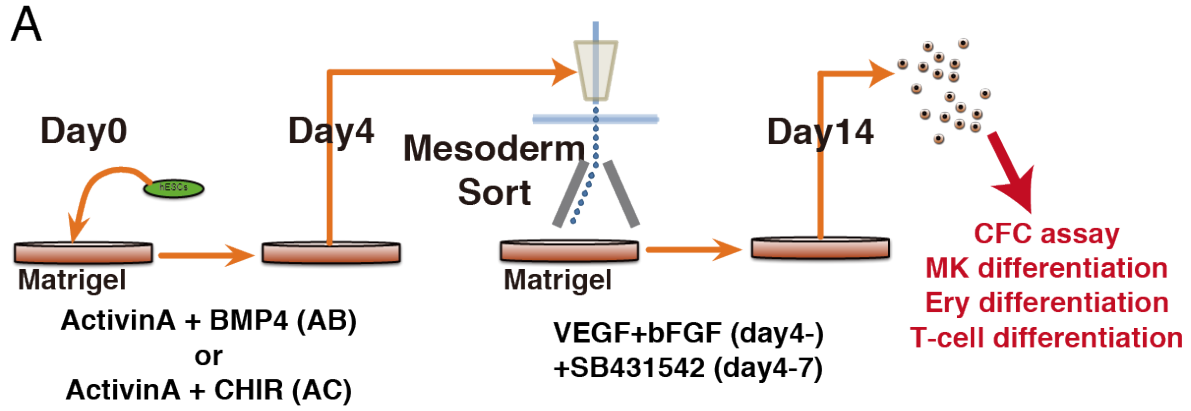
Figure.11A に実験の概略を図示した。Day0-4 の条件を AB また AC 条件とし、得られた中胚葉から誘導した 14 日目の血球を使用して、さらなる分化を行った。

Figure.11B にコロニー形成能の結果を示した。2つの条件で誘導した血球は複数種のコロニーを形成する能力を持ち、種類やコロニー数には有意な差を認めなかった。

赤芽球・巨核球・T細胞への分化は、既存の報告に則って行った<sup>66-68</sup>。赤芽球分化の結果を Figure.11C,D に、巨核球分化の結果を Figure.11E,F に、T細胞分化の結果を Figure.11G,H,I に示した。各細胞種は特有の細胞表面マーカーを用いて検出した。赤芽球分化条件では CD41a-CD235+細胞を赤芽球とし、巨核球分化条件では CD41a+CD42b+細胞を巨核球とした。T細胞に関しては、CD2+CD7+細胞を T細胞として用いた。この際に CD4 と CD8 を同時に解析したところ、CD2+CD7+細胞は全て CD4+CD8+であった。

AB と AC の 2 つの条件で誘導した血球を、各細胞への分化効率を指標とした比較したところ、有意な差を認めなかった。以上より、得られた血球は機能的に近いと考えられた。

**Figure.11**



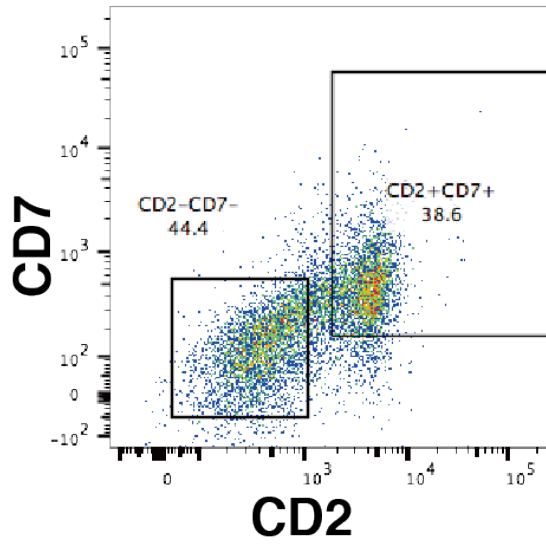
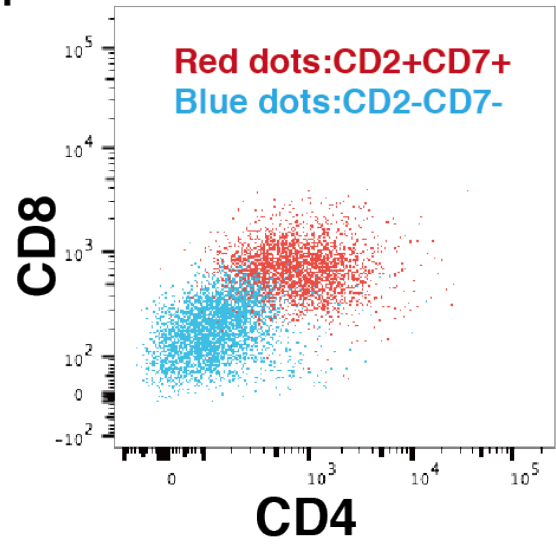
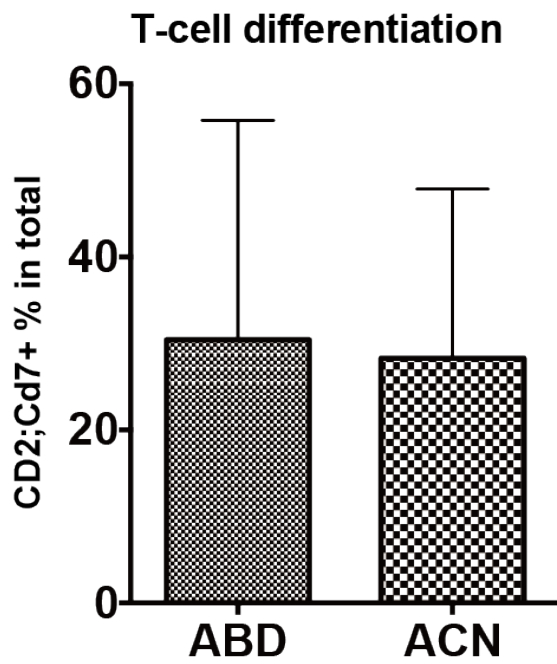
**G****H****I**

Figure.11 2つの条件間には、誘導した血球の能力に差を認めなかった。

KhES3 を用いて実験を行った。

- A. 実験の概略を図示した。初期ステップで2つの条件で誘導した中胚葉を血球に分化させ、得られた血球をそれぞれのアッセイに用いた。
- B. コロニー形成能アッセイの結果を図示した(n=3)。G: Granulocyte colony, M: Macrophage colony, GM: Granulocyte + Macrophage colony, E: Erythroid colony, Mix: E+G or E+M or E+GM. 各コロニーの数に有意な差を認めなかった。
- C,D. 赤芽球分化の結果を図示した。どちらの条件でも FACS では CD41-CD235+の赤芽球集団を認め(C)、その分化効率には有意な差を認めなかった(D) (n=3, paired t test)。
- E,F. 巨核球分化の結果を図示した。どちらの条件でも FACS では CD41+CD42b+の巨核球集団を認め(E)、その分化効率には有意な差を認めなかった(F) (n=3, paired t test)。
- G,H,I. T細胞分化の結果を図示した。どちらの条件でも CD2+CD7+細胞集団を確認でき(G)、CD2+CD7+細胞(赤いドット)は全てが CD4+CD8+であった(H)。その分化効率には有意な差を認めなかった(I) (n=3, paired t test)。



以上の結果を Figure.12 に図示した。ActivinA 存在下で、BMP4 または canonical WNT シグナルのどちらかの入力がある場合に血球前駆中胚葉が誘導され、至適条件下で効率よく血球への分化がなされた。一方で、ActivinA, BMP4, canonical WNT シグナル全てからの入力がある場合には、中胚葉系の細胞には分化するものの非血球系の遺伝子群の上昇を伴い、血球への分化能は失われた状態になった。血管内皮系への分化能はどの条件下でも保たれていた。

Figure.12

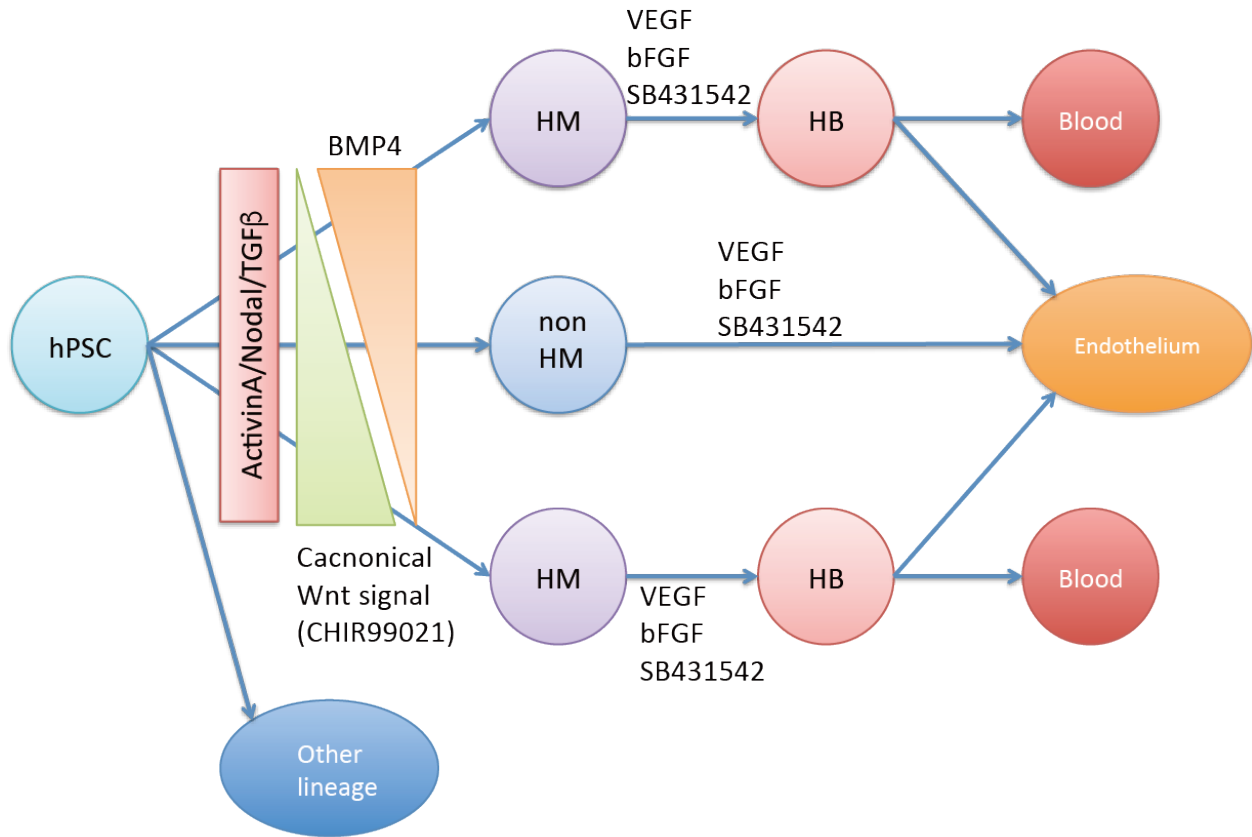


Figure.12 実験結果のまとめを図示した。

ActivinA 存在下に、BMP4 か canonical WNT シグナルのどちらかが入ると血球前駆中胚葉に分化し、その後適切な条件(VEGF, bFGF, SB431542 存在下)で血球へと高効率に分化できた。しかし、ActivinA 存在下に、BMP4 と canonical WNT シグナルの両方が入ると、血管内皮にはなれるものの血球にはなれないポテンシャルを持った中胚葉に分化した。HM: Hematopoietic mesoderm, HB: Hemangioblast, hPSC: human pluripotent stem cell.

## 6. 考察

### 分化初期過程に焦点を当てることで複数の経路の存在を見出した

hPSCからの生体外血球分化系はより効率よく再現可能な分化培養法の提案がされるようになってきているものの、多能性幹細胞から中胚葉までの過程においては、血球の元となる細胞なのかどうかを検証した研究は極めて少なかった。そのため、この過程成立のための必須条件は不明のままであった。この条件設定の欠如から、様々なプロトコールが乱立する結果となり、多能性幹細胞がどのような条件下が最適で分化するのかという視点での検証は注目されず、作製された血球細胞での実験データ解析が優先されてきた。しかし、正しく多能性幹細胞の特性を知り、その上で必要な誘導を行い、不要な誘導を行わないことは、目的の細胞を安定して得るためには重要であり、曖昧な状態を放置することはサイエンスの発展において好ましくない。

この原因としては、ヒト発生の分子メカニズムの個体を用いた研究が不可能であること、モデル動物のマウスもその実態を個体レベルでリアルタイムに可視化することができなかったことが挙げられる。ヒト発生は侵襲的には研究できず、サンプル採取にも限界がある。また、ヒト個体を対象にコントロール群と介入群を用意した実験デザインを組むことは倫理的に不可能である。純系のマウスとは異なり、SNPおよびエピゲノム上の後天的な獲得遺伝形質を含む遺伝的バックグラウンドは個々人で差があるため、この影響も無視出来ない。マウスにおいても、着床後の初期発生過程は容易にアクセスできるわけではなく、細胞の変化をリアルタイムに追うことは難しい。以上の困難さから、事前に得られていた知見は極めて限定的であった。

一方、多能性幹細胞システムは、*in vitro*での分化トレースを可能とした。CRISPR/Cas9などの最新のゲノムediting技術と組み合わせることでコントロール群と介入群を用意した実験デザインを組むこともできれば、何度も同様に実験を繰り返す事ができるようになった。使用する細胞株は同じものであるため、遺伝的バックグラウンドも合わせることが可能である。先人たちの努力と功績によって、多能性幹細胞から血球を分化させる方法はある程度確立されていたため、それを詳細に解析することで、本研究結果の発見に繋がった。

本研究では、ヒト発生過程を研究するためにhPSCを用いて血球分化系譜を解析した。その結果、既報の複数の論文が示唆しているような単一の発生系譜でなく、主要な液性因子が必須であることは再確認されたものの、その組み合わせによって複数の発生系譜を経て、血液細胞が生み出されていることが初めて明らかにされた。またその制御方法は、液性因子の濃度勾配（グラジエント）による緻密なコントロールに依存していることが強く示唆された。

マウス発生では多能性幹細胞と同等性があると考えられているEpiblastは、中胚葉になる際にTGF $\beta$ シグナル、BMPシグナル、canonical WNTシグナルの3つの液性因子シグナルの相互作用が必須である。外胚葉として形成される領域では、これらのアンタゴニストがvisceral endodermから産生され、上記のシグナル遮断が生じることにより、原腸陥入が起こらない。実際に、Figure.2で見たように、TGF $\beta$ シグナル阻害薬、NOGGIN、canonical WNTシグナル阻害薬の添加によって、中胚葉系細胞の誘導は抑制・阻害された。今回の新たな知見としては、この3つのシグナルの阻害効果が一様でなく個別のシグナル強度が分化系譜の運命決定に大きく影響を及ぼすことが明らかとされた。例えば、TGF $\beta$ シグナル阻害が強力な中胚葉分化抑制効果を示す一方で、BMPシグナル阻害やcanonical WNT

シグナル阻害は限定的な効果に留まったことが挙げられる。本研究では、無血清無フィーダーの純化した分化系を新たに開発したことで、さらに興味深いことに3つ全てのシグナルを導入することが逆に血球分化を抑制することも新たに見出した。逆に2因子シグナルの組み合わせであるActivinA + BMP4またはActivinA + CHIR99021 (canonical WNTシグナル) は、おそらくそれぞれが異なった系譜を経由して効率良く血球産生能を有する血球中胚葉集団を誘導した。

既報と異なるこれらの結果は、以下の2つの可能性を示唆する。(1) ヒトとマウスの発生過程には分子メカニズム上の違いがあること、(2) マウスにおいても同様のメカニズムが存在するが今までの研究では見出されていなかったこと、である。シグナル同士の相互作用はSignaling crosstalkと呼ばれており注目されている分野であり<sup>69</sup>、特に中胚葉において幾つかの報告があることから<sup>45,47</sup>、今後細胞内部でのmergeする標的分子の探索を通じて更なる詳細な解析を継続することが必須である。

本分野での別の課題として、分化誘導をした中胚葉がどういったポテンシャルを発揮でき得るのかに関しての詳細な検証もほとんど報告がない。実際に、多分化能を持つ幹細胞の多様性が指摘されている。例えば、造血幹細胞において、全ての幹細胞は全血球への分化能を持つ一方で、骨髄球系とリンパ球系への分化指向性には1つ1つで異なっている<sup>70</sup>、また、最新の研究によって巨核球への分化指向性も存在していることが報告された<sup>71</sup>。こういった現象は造血幹細胞の多様性、Heterogeneityと呼ばれ、細胞集団は必ずしも均一な性質を持たないことを示唆している。中胚葉においても同様のことを考察する必要があり、初期の中胚葉だからといって必ずしも全ての中胚葉系細胞への分化能を持つわけではないことを考慮すべきである<sup>33</sup>。

## hPSCを用いたin vitro分化系によって発生学上の未知の過程に新たな知見を見出した

既存の血球分化プロトコールでは、様々な組み合わせ、様々な方法が用いられていた。特に、EB法では細胞間相互作用がより強く働くため、個々の細胞一つ一つを分離させてコントロールすることが困難であると考えられた。その点では、2次元培養かつ疎な条件下での実験は、一つ一つの細胞の制御をより正確なものとし、増殖因子や阻害剤の作用を均一化することにより安定した評価系の確立に貢献した。細胞間相互作用自体がランダムに血球分化ポテンシャルを持つ中胚葉の誘導を達成する可能性があり、これがプロトコールの冗長性、非統一性に影響していたと考えられる。

本研究が得た結論の一つである“1つの細胞が分化する上で、複数の経路が存在する”という原理にはどういった意義があるのだろうか。例えば、遺伝子における冗長性 (Redundancy) は、複数の分子が同じ役割を果たすことを意味する。ある分子のノックアウトマウスを作製した際に、全く変化が認められなかった場合、他の分子が同様の役割を果たす、あるいは相補的に機能したことがその理由であることがある。血球系は発生初期において極めて重要な細胞であり、血球が出来ない変異のある胎仔は早期に胎生致死となる。そのため、血球発生経路が複数存在することは、単一経路よりもより安定した血球産生に寄与すると考えられる。

他の考察として以下の考え方を併記する。マウス発生の知見では、Epiblastの後方近位部でPrimitive streakが形成されるときにNodal, BMP4, WNT3の発現が重要であった。しかし、primitive streakでepithelial-mesenchymal transitionを起こして潜り込んだ中胚葉細胞が遊走していく中で、各細胞がどういったシグナルを受けているのかに関しては十分に考察されていなかった。卵黄囊中胚葉になった際には既に血球と血管内皮になるか、mesenchymeのままか、血管内皮のみになるのかが運命決定されていた可能性もあり得る。

つまり、発現細胞との接触の仕方によっては、3つのうち2つのみからシグナルをうけるものも多数存在した可能性がある。

実験結果からは、day0-4でのシグナル入力、day7以降になって初めてその影響が結果として現れる、つまり時間差があるということであった。このことから、ある細胞の状態を説明するためには、その細胞の発生学的な系譜、つまりどこに由来してどういったシグナルを受けてきたのかという細胞運命決定のヒストリー（歴史）を知る必要があることを示唆する。必ずしも、細胞の現段階の環境を知るだけでは十分ではないということになる。こういった情報が、ゲノム以外の状態として細胞内に保存されているかもしれない（エピゲノム情報）。

#### 分化系の再構築と効率の改善は既報とよく一致していた

本研究の特異的な点は、2種類のシグナルが入ることで血球になる一方、3種類のシグナルが入ることで血球への運命決定を抑制しているということである。既存のプロトコール<sup>44</sup>では、day10 CD43+細胞は分化由来細胞のうちの1%未満しか存在せず、その他の細胞は全て別の系統に分化しており、分化誘導系の効率が大変低い事が明らかになった

(Figure 3D)。day4のCD56+APJ+細胞は再構築後の分化系では最大60%以上が血球になる能力を示していたことから(Figure.4E)、既存のプロトコールには中期～後期のシグナルに問題があると結論付けられた。プロトコールの改善は、VEGF, bFGF, TGFβ阻害によって確立できた。VEGFやbFGFは血管内皮細胞の増殖を促す因子として知られている。

Hemangioblastはニワトリの胚の観察から提唱された概念であり、血球と血管の共通前駆細胞として定義されている。ES細胞の系ではBlast colony forming cell (BL-CFC)として呼ばれる。BL-CFCの誘導にはbFGFが必須とされる。また、bFGFはVEGFR2の発現を誘導

するとされている<sup>72</sup>。これらのことから、中胚葉からHemangioblastへの特異性獲得、specificationにはこれらが作用していることが予想される。また、TGFβのデータは過去の文献と一貫性がある結果となった (Figure 3C)<sup>52,65</sup>。TGFβのシグナルは、ALK5を介した場合は血球産生を抑制する一方で、ALK1を介した場合は血球産生が亢進し、これにEndoglinが関与しているという報告がある<sup>73</sup>。SB431542はALK5阻害効果を示すため、血球産生の抑制が解除された結果になったと考えられた。

血球分化の効率を出来る限り上昇させた条件によって、フィーダー細胞なしでも血球分化を達成することが出来た。これによって、ようやく中胚葉の血球産生能を評価できる系として使用できるようになった。本研究の本質は、見出したABCプロトコールの検証を通じて、中胚葉集団の中での細胞系譜運命決定の時期に関してはday4までで血球への運命が決まっていると結論つけられる点に集約できる。

また、ヒトPSCを用いた発生学研究は有用であることは事実だが、実際のタイムラインとの整合性は大きな問題と言える。Carnegie stage分類によれば、Blood islandの形成は受精後18日目とされる。Epiblastの形成は受精後7日以降であるため、時系列はよく整合している。しかし、血球発生過程は二相性であることはよく知られた事実である。今回のタイミングでは、初期造血の様子のみを観察していることが予想される。AGM領域で背側大動脈の腹側部に存在するHemogenic endotheliumは造血幹細胞の出現元として知られている。この時点から、definitive hematopoiesisが開始されるとされるのが一般的である。今回の観察系、実験系はdefinitive hematopoiesis過程までを網羅していないと考えられる。しかしながら、definitive hematopoiesisとyolk sac hematopoiesisの関係は断絶しているというよりも、継続していると報告されている<sup>74</sup>。lineage tracingの手法を用いて、yolk



sac hematopoiesisの段階でラベルした細胞は、成体となったあとでラベル付きの血球が確認できることから、継続しているという主張である。また、ExMにあるGata1-Runx1+細胞は、その後にAGM領域に遊走している様子も観察されており<sup>30</sup>、連続性の原理に一致しているように思える。現に、Yolk Sacの細胞はin vitroに移して、in vivoとは条件を変えて培養した場合にはB-cell分化を示し、primitiveの定義とは相容れない挙動を示す<sup>75</sup>。このことを考慮すれば、今回の実験で得られた血球がprimitiveかdefinitiveかに言及することは実は、容易ではないのかもしれない。

### 造血幹細胞の誘導に関して

hPSCから血球を誘導するに当たり、研究者の究極の目標となっているのは造血幹細胞の誘導である。全ての血球に分化可能な造血幹細胞は、造血器疾患を主とした様々な疾患の治療に用いられており、応用可能性は極めて広い。

マウスでは、造血幹細胞の誘導を可能とした方法が幾つか知られている<sup>34,76,77</sup>。培地の工夫や培養法の工夫によって誘導した血球では、造血幹細胞を誘導することには成功していない。しかし、分化誘導した血球に転写因子を外来性に誘導する方法(HoxB4, Lhx2)によって、マウスに生着可能な造血幹細胞を誘導することに成功した。また、マウスiPS細胞によってマウスの体内に奇形腫を作成すると、奇形腫の中で造血幹細胞は分化誘導され、ホーミングによってマウス骨髄中にiPS細胞由来造血幹細胞が検出できるようになる。

hPSCでも同様に、in vivoで奇形腫を介した造血幹細胞様の活性を持つ細胞が誘導可能であることが報告された<sup>77,78</sup>。2つの報告では奇形腫を介するという点で共通点があるため、hPSCから造血幹細胞様の活性を持つ細胞、即ち免疫不全マウスへの生着可能な細胞

を誘導することが可能であることが示されたと言える。しかし、奇形腫を介するという点からは、どのようにして造血幹細胞が誘導されたのかを解明することは困難である。その点では、*in vitro*での研究の方が望ましいと言える。hPSCを*in vitro*で誘導した報告はいくつか存在する<sup>79-81</sup>。どれも方法が異なっており、これらの再現性に関しては検証を要する段階である。本研究で用いた方法で誘導した血球は、誘導効率は劇的に改善しているが、コロニー形成能でMixコロニーの頻度が高いというわけでもないことから、造血幹細胞が多数含まれているとは考えにくい。今後、免疫不全マウスへの移植実験を行う必要があると考えている。

本研究では、hPSCを用いることによって、今までに明らかにすることが出来なかった発生初期過程の細胞特性を新たに見出し、血球分化の経路としてシグナル要求性に複数の条件があり得ることが示された。発生過程に置いて、ある解剖学的な構造において条件は1種類と考えがちであるが、このような明瞭な前提は必ずしも必須ではないと言える。本研究結果は血球に限られるものではなく、他の臓器においてもこのような複数の経路による制御を可能性として内包させることで、よりロバストな恒常性が担保される可能性がある。本研究結果は、再生医療のプロトコールという意味付けにとどまらず、発生過程の頑強性、安定性のメカニズムの一旦を示している。

## 7. 引用文献

1. Thomson, J. A. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).
2. Takahashi, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
3. Bellin, M., Marchetto, M. C., Gage, F. H. & Mummery, C. L. Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol* (2012). doi:10.1038/nrm3448
4. Yamashita, A. *et al.* Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature* **513**, 507–511 (2014).
5. Egawa, N. *et al.* Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Science Translational Medicine* **4**, 145ra104–145ra104 (2012).
6. Kondo, T. *et al.* Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A $\beta$  and differential drug responsiveness. *Cell stem Cell* **12**, 487–496 (2013).
7. Rossant, J. Stem Cells and Early Lineage Development. *Cell* **132**, 527–531 (2008).
8. Denli, A. M. *et al.* Primate-Specific ORF0 Contributes to Retrotransposon-Mediated Diversity. *Cell* **163**, 583–593 (2015).
9. Vallier, L., Alexander, M. & Pedersen, R. A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* **118**, 4495–4509 (2005).
10. Villa-Diaz, L. G., Ross, A. M., Lahann, J. & Krebsbach, P. H. Concise Review: The Evolution of human pluripotent stem cell culture: From feeder cells to synthetic coatings. *Stem Cells* **31**, 1–7 (2013).
11. Ludwig, T. E. *et al.* Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nature Biotechnology* **24**, 185–187 (2006).
12. Chen, G. *et al.* Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Meth* **8**, 424–429 (2011).

13. Nakagawa, M. *et al.* A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports* **4**, 3594 (2014).
14. Kamao, H. *et al.* Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Sheets Aiming for Clinical Application. *Stem Cell Reports* **2**, 205–218 (2014).
15. Schwartz, S. D. *et al.* Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *The Lancet* **385**, 509–516 (2015).
16. Bedzhov, I. & Zernicka-Goetz, M. Self-Organizing Properties of Mouse Pluripotent Cells Initiate Morphogenesis upon Implantation. *Cell* **156**, 1032–1044 (2014).
17. Tsuji, O. *et al.* Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *P Natl Acad Sci Usa* **107**, 12704–12709 (2010).
18. Wu, S. M. & Hochedlinger, K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nature Cell Biology* **13**, 497–505 (2011).
19. Patterson, M. *et al.* Defining the nature of human pluripotent stem cell progeny. *Cell Res* **22**, 178–193 (2012).
20. Nakamura, T. *et al.* SC3-seq: a method for highly parallel and quantitative measurement of single-cell gene expression. *Nucleic Acids Res.* **43**, e60–e60 (2015).
21. Kardel, M. D. & Eaves, C. J. Modeling Human Hematopoietic Cell Development From Pluripotent Stem Cells. *Experimental Hematology* **40**, 601–611 (2012).
22. Osawa, M., Hanada, K.-I., Hamada, H. & Nakauchi, H. Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell. *Science* **273**, 242–245 (1996).
23. Kondo, M., Weissman, I. L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661–672 (1997).

24. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I. L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193–197 (2000).
25. Wada, H. *et al.* Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature* **452**, 768–772 (2008).
26. Yamamoto, R. *et al.* Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* **154**, 1112–1126 (2013).
27. Guo, G. *et al.* Mapping cellular hierarchy by single-cell analysis of the cell surface repertoire. *Cell stem Cell* **13**, 492–505 (2013).
28. Xu M, J. *et al.* Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood* **97**, 2016–2022 (2001).
29. Potts, K. S. *et al.* A lineage of diploid platelet-forming cells precedes polyploid megakaryocyte formation in the mouse embryo. *Blood* **124**, 2725–2729 (2014).
30. Tanaka, Y. *et al.* Circulation-Independent Differentiation Pathway from Extraembryonic Mesoderm toward Hematopoietic Stem Cells via Hemogenic Angioblasts. *Cell Reports* **8**, 31–39 (2014).
31. Ivanovs, A. *et al.* Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Journal of Experimental Medicine* **208**, 2417–2427 (2011).
32. Mikkola, H. K. A. & Orkin, S. H. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* **133**, 3733–3744 (2006).
33. Kouskoff, V., Lacaud, G., Schwantz, S., Fehling, H.-J. & Keller, G. Sequential development of hematopoietic and cardiac mesoderm during embryonic stem cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 13170–13175 (2005).

34. Kyba, M., Perlingeiro, R. C. R. & Daley, G. Q. HoxB4 Confers Definitive Lymphoid-Myeloid Engraftment Potential on Embryonic Stem Cell and Yolk Sac Hematopoietic Progenitors. *Cell* **109**, 29–37 (2002).
35. Forrester, L. M. & Jackson, M. Mechanism of Action of HOXB4 on the Hematopoietic Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **30**, 379–385 (2012).
36. Hirata, S. *et al.* Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia iPS cells exhibit defective MPL-mediated signaling. *The Journal of clinical investigation* **123**, 3802–3814 (2013).
37. Gurney, A. L., Carver-Moore, K., de Sauvage, F. J. & Moore, M. W. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science* **265**, 1445–1447 (1994).
38. Kiel, M. J. *et al.* SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell* **121**, 1109–1121 (2005).
39. Notta, F. *et al.* Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* **333**, 218–221 (2011).
40. Larochelle, A. *et al.* Human and rhesus macaque hematopoietic stem cells cannot be purified based only on SLAM family markers. *Blood* **117**, 1550–1554 (2011).
41. Takashima, Y. *et al.* Resetting Transcription Factor Control Circuitry toward Ground-State Pluripotency in Human. *Cell* **162**, 452–453 (2015).
42. Nakano, T., Kodama, H. & Honjo, T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* **265**, 1098–1101 (1994).
43. Kaufman, D. S., Hanson, E. T., Lewis, R. L., Auerbach, R. & Thomson, J. A. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 10716–10721 (2001).

44. Takayama, N. *et al.* Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood* **111**, 5298–5306 (2008).
45. Singh, A. M. *et al.* Signaling Network Crosstalk in Human Pluripotent Cells: A Smad2/3-Regulated Switch that Controls the Balance between Self-Renewal and Differentiation. *Cell stem Cell* **10**, 312–326 (2012).
46. Bernardo, A. S. *et al.* BRACHYURY and CDX2 mediate BMP-induced differentiation of human and mouse pluripotent stem cells into embryonic and extraembryonic lineages. *Cell stem Cell* **9**, 144–155 (2011).
47. Yu, P., Pan, G., Yu, J. & al, E. FGF2 Sustains NANOG and Switches the Outcome of BMP4-Induced Human Embryonic Stem Cell Differentiation. *Cell stem Cell* **8**, 326–334 (2011).
48. Vallier, L. *et al.* Early Cell Fate Decisions of Human Embryonic Stem Cells and Mouse Epiblast Stem Cells Are Controlled by the Same Signalling Pathways. *PLoS ONE* **4**, e6082 (2009).
49. Zhang, P. *et al.* Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood* **111**, 1933–1941 (2008).
50. Salvaggio, G. *et al.* A Defined, Feeder-Free, Serum-Free System to Generate In Vitro Hematopoietic Progenitors and Differentiated Blood Cells from hESCs and hiPSCs. *PLoS ONE* **6**, e17829 (2011).
51. Niwa, A. *et al.* A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS ONE* **6**, e22261 (2011).
52. Evseenko, D. *et al.* Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells. *P Natl Acad Sci Usa* **107**, 13742–13747 (2010).

53. Vodyanik, M. A. *et al.* A Mesoderm-Derived Precursor for Mesenchymal Stem and Endothelial Cells. *Cell stem Cell* **7**, 718–729 (2010).
54. Davis, R. P. *et al.* Targeting a GFP reporter gene to the MIXL1 locus of human embryonic stem cells identifies human primitive streak-like cells and enables isolation of primitive hematopoietic precursors. *Blood* **111**, 1876–1884 (2008).
55. Yu, Q. C. *et al.* APELIN promotes hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Blood* **119**, 6243–6254 (2012).
56. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44–57 (2008).
57. Vodyanik, M. A., Thomson, J. A. & Slukvin, I. I. Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. *Blood* **108**, 2095–2105 (2006).
58. Hosoya, M. Molecular and Functional Characteristics of APJ. TISSUE DISTRIBUTION OF mRNA AND INTERACTION WITH THE ENDOGENOUS LIGAND APELIN. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 21061–21067 (2000).
59. Ho, L. *et al.* ELABELA Is an Endogenous Growth Factor that Sustains hESC Self-Renewal via the PI3K/AKT Pathway. *Cell stem Cell* **17**, 435–447 (2015).
60. Inman, G. J. *et al.* SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol. Pharmacol.* **62**, 65–74 (2002).
61. Xu, R.-H. *et al.* Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Meth* **2**, 185–190 (2005).
62. Huang, S.-M. A. *et al.* Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* **461**, 614–620 (2009).



63. Kennedy, M., D'Souza, S. L., Lynch-Kattman, M., Schwantz, S. & Keller, G. Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood* **109**, 2679–2687 (2007).
64. Chen, G., Gulbranson, D. R., Yu, P., Hou, Z. & Thomson, J. A. Thermal stability of fibroblast growth factor protein is a determinant factor in regulating self-renewal, differentiation, and reprogramming in human pluripotent stem cells. *Stem Cells* **30**, 623–630 (2012).
65. Wang, C. *et al.* TGF $\beta$  inhibition enhances the generation of hematopoietic progenitors from human ES cell-derived hemogenic endothelial cells using a stepwise strategy. *Cell Res* **22**, 194–207 (2012).
66. Ochi, K. *et al.* Multicolor staining of globin subtypes reveals impaired globin switching during erythropoiesis in human pluripotent stem cells. *Stem Cells Translational Medicine* **3**, 792–800 (2014).
67. Takayama, N. & Eto, K. In vitro generation of megakaryocytes and platelets from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Methods Mol. Biol.* **788**, 205–217 (2012).
68. Nishimura, T. *et al.* Generation of Rejuvenated Antigen-Specific T Cells by Reprogramming to Pluripotency and Redifferentiation. *Cell stem Cell* **12**, 114–126 (2013).
69. Guo, X. & Wang, X.-F. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res* **19**, 71–88 (2009).
70. Morita, Y., Ema, H. & Nakauchi, H. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 1173–1182 (2010).
71. Sanjuan-Pla, A. *et al.* Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature* **502**, 232–236 (2013).

72. Murakami, M. *et al.* FGF-dependent regulation of VEGF receptor 2 expression in mice. *The Journal of clinical investigation* **121**, 2668–2678 (2011).
73. Zhang, L. *et al.* Modulation of TGF- $\beta$  signaling by endoglin in murine hemangioblast development and primitive hematopoiesis. *Blood* **118**, 88–97 (2011).
74. Samokhvalov, I. M., Samokhvalova, N. I. & Nishikawa, S.-I. Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature* **446**, 1056–1061 (2007).
75. Tanaka, Y. *et al.* Early ontogenic origin of the hematopoietic stem cell lineage. *P Natl Acad Sci Usa* **109**, 4515–4520 (2012).
76. Kitajima, K., Minehata, K.-I., Sakimura, K., Nakano, T. & Hara, T. In vitro generation of HSC-like cells from murine ESCs/iPSCs by enforced expression of LIM-homeobox transcription factor Lhx2. *Blood* **117**, 3748–3758 (2011).
77. Suzuki, N. *et al.* Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **21**, 1424–1431 (2013).
78. Amabile, G. *et al.* In vivo generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells. *Blood* **121**, 1255–1264 (2012).
79. Wang, L. *et al.* Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J. Exp. Med.* **201**, 1603–1614 (2005).
80. Ledran, M. H. *et al.* Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell stem Cell* **3**, 85–98 (2008).
81. Gori, J. L. *et al.* Vascular niche promotes hematopoietic multipotent progenitor formation from pluripotent stem cells. *The Journal of clinical investigation* **125**, 1243–1254 (2015).

## 8. 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始親身にご指導頂きました東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞治療分野 中内 啓光 博士、京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 幹細胞応用研究分野 江藤 浩之 博士に謹んで感謝の意を表します。

多くの貴重なご意見、技術指導を賜りました高山 直也 博士、中村 壮 氏、恩田 佳幸 氏に深く感謝申し上げます。また、実験に関して多大なるご支援を頂きました山崎 裕治 氏、石井 有美子 氏、黒瀬 裕子 氏、河野 ともえ 氏をはじめとする中内研究室・江藤研究室の皆様篤く御礼申し上げます。

研究を円滑に進めるためにご尽力頂いた津久井 弘子 氏、岡田 京子氏、宮内 倫代 氏、中村 由希子 氏、萬田 恵子 氏、金子 ゆかり 氏、城野 椋子 氏に深く感謝申し上げます。

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、常に応援してくれた両親に感謝致します。