

博士論文（要約）

人工多能性幹細胞からの造血幹細胞の分化誘導と
生体内増幅モデルの構築

塚田 端夫

論文の内容の要旨

人工多能性幹細胞からの造血幹細胞の分化誘導と

生体内増幅モデルの構築

氏名 塚田 端夫

人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cells : iPS 細胞) から造血幹細胞 (Hematopoietic Stem cell : HSC) を誘導する技術開発は将来的に多くの血液疾患を根治する有効な治療方法につながると血液学分野で考えられている。年々、高齢化に伴い根治治療である造血幹細胞移植を必要とする患者が増加し、慢性的なドナー不足の問題を抱えている。そのため造血幹細胞を供給する細胞ソースとして期待されているのが iPS 細胞である。ヒト体細胞から胚性幹細胞 (Embryonic Stem cell : ES 細胞) と同等の能力を有する人工性多能性幹細胞が樹立できるようになり 10 年近くが経過した。iPS 細胞は生体内のすべての細胞に分化することが可能であり、臨床応用への安全性に向けた技術開発が進んでいる。これまでに *in vitro* において ES/iPS 細胞から HSC を誘導する試みに関する研究はいくつか報告されている。しかし、現在までに臨床応用に用いることが可能かつ生体内に存在する HSC と同等の能力を持つ長期骨髄再構築能を有した HSC の誘導方法は未だ確立されていない。その原因に *in vitro* の二次元培養では生体内における HSC 発生の模倣や HSC を維持する骨髄微小環境の構築が困難であること等が考えられる。そこで私は *in vitro* では機能的な HSC を誘導することは困難と考え、iPS 細胞

が持つテラトーマ形成能を応用した *in vivo* による造血幹細胞の誘導を試みた。

以前に我々と Amabile らは、iPS 細胞からテラトーマ形成を介することで移植可能な HSC を誘導することを報告している。しかし、テラトーマ内からどのように発生しているか不明な点と生体内で誘導できる HSC の数に限りがあるという問題点が存在した。そこで私は *in vitro* で血液を誘導する転写因子と骨髄ニッチに発現している転写因子をテラトーマ内で発現させれば効率よく HSC が誘導できるのではないかと考え、以下の実験を行った。

(1) テラトーマから造血幹細胞を誘導する転写因子の同定

私は造血系細胞を誘導する転写因子の組み合わせとして *Gfi1-cFos-Gata2 (GFG)* と *Erg-HoxA9-Rora (EAR)* を選択し、骨髄様構造を誘導する転写因子としては *Foxc1* を選択した。強制発現系としては薬剤誘導レンチウイルスシステム (Tet-on システム) を用い、C57BL/6 (Ly5.1) マウス由来の iPS 細胞に導入した。樹立された各転写因子を発現する iPS 細胞を C57BL/6 (Ly5.2) マウスの皮下に注射した。テラトーマの大きさが 2 cm 以上になった時期に Doxycycline (Dox) により転写因子を発現させた。その 4 週間後の末梢血解析を行った結果、*GFG-iPS* 群ではコントロール群と比較して有意に iPS 細胞由来の血液細胞が多く誘導されることが確認された。また組織学的解析、免疫学的染色、可視化画像解析技術を駆使した結果、テラトーマ組織内に HSC が最初に発生すると考えられている血球産生血管内皮 (hemogenic endothelium : HE) が検出された。これらの結果から iPS 細胞由来の HSC が hemogenic endothelium を介して発生したことが推察される。

テラトーマに *GFG* を発現させることで hemogenic endothelium を介して HSC が誘導されたと考えられるが、その効率は高いものではなかった。そこで以下の 3 つに着目した。(1) HSC は 1 細胞においても骨髄再構築が可能であり高いキメリズムを認められる (2) テラトーマを介して出現した HSC は宿主マウスの骨髄内にホーミングし、増幅する (3) *c-Kit* 抗体を用いることで造血幹細胞ニッチが空き非放射線照射下で造血幹細胞移植が可能になる。以上の報告から iPS 細胞から HSC を数多く誘導できなくとも *in vivo* により増幅させることは可能である。そこで

テラトーマを形成させる宿主マウスの造血幹細胞ニッチを空けることを利用し、*in vivo*でHSCが増幅できるのではないかと考え、以下の実験を行った。

(2) 造血幹/前駆細胞の誘導型欠損マウスによるiPS細胞由来の造血幹細胞の増幅

私はテラトーマを形成させる宿主マウスに造血幹/前駆細胞 (Hematopoietic Stem / progenitor cell : HSPC)が欠損する *c-Kit*^{flx/flx} マウスを使用することにした。宿主マウスの造血幹細胞ニッチを空けることでiPS細胞由来のHSCがホーミングし、骨髄内で増幅できるのではないかと仮説を立てた。そこでiPS細胞由来の血液細胞が誘導された時期に合わせて宿主の造血幹細胞ニッチを空けた。その結果、テラトーマから誘導された血液細胞は野生型と比べて末梢血と骨髄内で10倍以上に増幅したことが確認された。また誘導された血液細胞に長期骨髄再建能を含む機能的なHSCが存在するかを評価するために全骨髄細胞を採取し、二次移植を行った。移植後の経時的な末梢血解析の結果、移植後6ヶ月後までiPS細胞由来のHSCから骨髄球系、B細胞系、T細胞系の3系統への分化を認め、徐々に比率が上昇していることが確認された。これらの結果はiPS細胞由来のHSCが生体内に存在するHSCとほぼ同等の自己複製能と多分化能を有していることを示唆している。

以上より、私はHSCの発生過程をテラトーマ内に模倣することで機能的なHSCを誘導し、生体内で増幅させることに成功した。この原理を応用すれば、ヒトiPS細胞からテラトーマを介して誘導されたHSCは*c-Kit*欠損した大動物を宿主にすることで生体内増幅が可能になるかもしれない。将来的に大動物を使用したHSCを含むすべて血液細胞の誘導法は現在、不足している新たな移植ソースや輸血バンクとしての供給源となりうることを期待したい。