

## 学位論文

テラトーマ形成を介した人工多能性幹細胞からの機能的な  
造血幹細胞の分化誘導

鈴木 奈穂

## 目次

略語一覧	...	2
序論	...	4
結果		
1. $\text{Lnk}^{-/-}$ GFP (LG-) iPS 細胞を用いた造血幹細胞誘導条件の検討	...	11
2. GFP (G-) iPS 細胞からの機能的な造血幹細胞の誘導	...	17
3. <i>In vivo</i> 誘導法を用いた X-SCID マウスの免疫不全治療モデル	...	21
4. ヒト iPS 細胞を用いた機能的な造血幹細胞の誘導	...	25
5. テラトーマ組織における造血幹細胞分化機序の解明	...	29
考察	...	31
材料と方法	...	37
引用文献	...	48
図	...	57
謝辞	...	69

## 略語一覽

HSCs	hematopoietic stem cells
HPCs	hematopoietic progenitor cells
ESCs	embryonic stem cells
iPSCs	induced pluripotent stem cells
BM	bone marrow
PB	peripheral blood
SCF	stem cell factor
TPO	thrombopoietin
EPO	erythropoietin
GFP	green fluorescent protein
FACS	fluorescence-activated cell sorter
AGM	aorta-gonad-mesonephros
X-SCID	X-linked severe combined immunodeficiency
Tg	transgenic
IVF	in vitro fertilization
B6	C57BL/6
TRE	tetracycline responsive element
Lin	lineage
LTR	long terminal repeat
IRES	internal ribosomal entry site
ICM	inner cell mass
PCR	polymerase chain reaction

RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
HE	Hematoxylin-Eosin
DAPI	4, 6-diamidino-2-phenylindole
APC	allophycocyanin
PE	phycoerythrin
FITC	fluorescein isothiocyanate
BSA	bovine serum albumin
GpA	glycophorin A

## 序論

現在、白血病やその他の血液疾患に対して、造血幹細胞移植が最も有効な治療手段として行われている。一方で、造血幹細胞移植は慢性的なドナー不足や生着不全などの深刻な問題を抱えている。そのため、再生医療の分野では体外で造血幹細胞を増殖させる技術や造血幹細胞を作製する技術の開発に期待が寄せられている。しかし、現在まで、マウス造血幹細胞の系において、サイトカインを組み合わせた培養の例がいくつか報告されているが (Huynh et al., 2008; Takano et al., 2004)、機能的な造血幹細胞を *ex vivo* で無限に増殖させることは未だ困難である (Zhang and Lodish, 2005)。そこで、新たな細胞ソースとして期待されているのが生体内の全ての細胞系譜に分化する能力を持つ多能性幹細胞である。多能性幹細胞としては、ヒト受精卵から樹立することのできる胚性幹細胞 (Embryonic Stem cells : ES 細胞) が早くから報告され(Thomson et al., 1998)、多くの研究が進められてきたが、ES 細胞は受精後の初期胚から作成されるため患者から作成することは難しい。

近年開発された体細胞のダイレクトリプログラミング技術は、患者自身から ES 細胞とほぼ同等の能力を持つ、多能性細胞を樹立することを可能にした (Okita et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006)。この人工多能性幹細胞 (iPS 細

胞) は、自己複製能と増殖能を合わせ持ち、様々な血液細胞を含む全ての細胞種に分化することが可能である (Choi et al., 2009; Kim et al.; Takayama et al.)。この iPS 細胞を造血幹細胞に誘導する技術が開発されれば、骨髄や臍帯血に替わる新たな移植ソースとして血液疾患の治療に用いることができる。従って、iPS 細胞からの機能的な造血幹細胞の分化誘導は幹細胞を利用した再生医療の実現のために求められる重要な課題であると言える。これまでに、*in vitro* において、ES 細胞から造血幹細胞への分化誘導に関する知見は多数報告されている。1995 年に Sauvageau らにより造血幹細胞の自己複製を促進させる遺伝子としてホメオドメイン転写因子である *HoxB4* が同定された (Sauvageau et al., 1995)。さらに同グループによりマウス ES 細胞に *HoxB4* を強制発現させることで *in vitro* において多分化能を持つ造血細胞が誘導できることを (Helgason et al., 1996)、その後の研究により *in vivo* において移植可能な造血前駆細胞が分化誘導できることが報告された (Chan et al., 2008; Kyba et al., 2002; Pilat et al., 2005) (図 A)。しかし、*HoxB4* を強制発現させることにより ES 細胞から誘導された細胞は、発生学的には骨髄に存在する成熟した造血幹細胞とは異なり、より未熟な表現型を示すことが知られている (Matsumoto et al., 2009; McKinney-Freeman et al., 2009) (図 B)。また、誘導された造血幹細胞は、移植後のレシピエントマウス内で骨髄系細胞の増加及びリンパ球の減少などの造血異常を誘発する (Pilat et al., 2005)。さらに、

遺伝子を導入することなく ES/iPS 細胞から移植可能な造血幹細胞を分化誘導した例はない。そこで本研究ではレポーター遺伝子以外のいかなる遺伝子導入を行わずに iPS 細胞を移植可能な造血幹細胞に分化誘導させる方法の確立を目的とした。

これまで、多能性幹細胞から造血幹細胞の分化誘導に対する試みは *in vitro* における二次元培養の例がほとんどであった。しかしながら、現在のところ生体内において造血幹細胞が発生し、その性質を維持していくのに必要とされる因子やメカニズムが解明されていないため、生体内における造血幹細胞の発生過程を *in vitro* で完全に模倣するのは不可能であると考えられる。そこで私は、造血幹細胞の新たな誘導場所としてテラトーマに着目した。テラトーマは、ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞を免疫不全マウスに移植した際に得られる良性腫瘍であり、三胚葉系の様々な組織へ分化した細胞が含まれている。既に過去の知見により、テラトーマやテラトカルシノーマの中には ES 細胞由来の赤血球や巨核球、血管を構成する細胞が形成されることが報告されている(Cudennec and Nicolas, 1977; Cudennec and Johnson, 1981; Cudennec and Salaun, 1979; Li et al., 2009)。以上より私は、テラトーマを作製する過程で造血幹細胞の維持に必要なとされるサイトカインや造血を支持するストローマ細胞を投与することで、テラトーマ内に造血幹細胞が発生するための微小環境が形成され、iPS 細胞由来の造

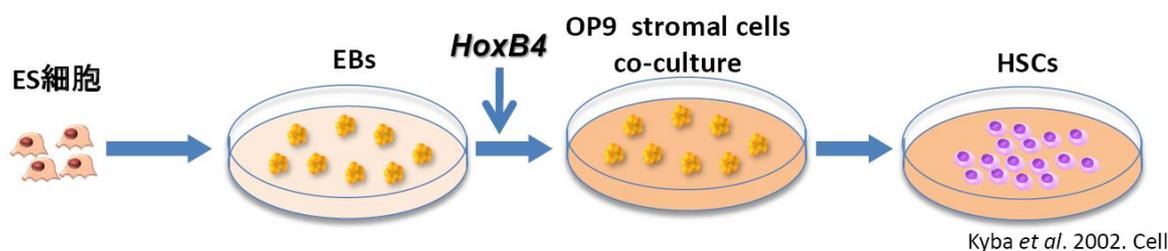
血幹細胞を誘導できるのではないかと考えた (図 C)。また、造血幹細胞は発生過程において、胎生期には Yolk sac、AGM、Fetal liver へと造血の場を移動し、生後は成熟した造血幹細胞に分化するとともに骨髄ニッチにホーミングし、以後は骨髄において造血し続ける。骨髄ニッチに存在する造血幹細胞も、毎日全体の 1~5% は血中へ移行し、血管内を循環して再び骨髄中の空のニッチへホーミングすることや (Bhattacharya et al., 2006)、骨髄移植あるいはパラビオーシスの実験からより純度の高い成熟造血幹細胞が高いホーミング能を示すことが報告されている (Bhattacharya et al., 2009; Czechowicz et al., 2007; Wagers et al., 2002)。さらに、*in vitro* において ES 細胞から造血幹細胞の誘導が困難である理由には、ホーミング能を獲得することができないためであるという報告もある (Burt et al., 2004)。従って、ホーミング能の獲得は、成熟した造血幹細胞の特徴であり、未熟な細胞から成熟した造血幹細胞へ分化するための必要条件であるともいえる。以上の報告から、私は、テラトーマ中に誘導した iPS 細胞由来の造血幹細胞もホストマウスの骨髄に移行しうるのではないかと仮説を立てた (図 D)。

本研究において、私は iPS 細胞から機能的な成体型造血幹細胞を誘導するために、テラトーマ形成を利用した新たな *in vivo* 誘導システムを開発した。私は、初めにシステムを最適化するために、造血幹細胞活性の高い Lnk<sup>-/-</sup> マウスより樹立した iPS 細胞を用いて誘導条件の検討を行った。iPS 細胞をヌードマウスの皮

下に注入してテラトーマを形成させるとともに、サイトカイン投与やストローマ細胞の共移植を組み合わせることで造血幹細胞を誘導した。誘導条件の検討には、テラトーマが形成されたマウス末梢血における iPS 細胞由来の血液細胞を経時的に解析して誘導効率を比較した。また、テラトーマが形成されたマウスの骨髄細胞中における iPS 細胞由来の造血幹細胞の有無を細胞の表面抗原マーカーにより解析し、表現型から造血幹細胞の誘導を評価した。さらに造血幹細胞とは多分化能と自己複製能を有する細胞であると定義される。そのため、誘導された造血幹細胞の機能解析には、single cell colony assay および骨髄移植実験により、多分化能と長期骨髄再建能を検討した。次に、最適化した条件をもとに、野生型の iPS 細胞として GFP マウスより樹立した iPS 細胞を用いて、造血幹細胞の誘導を試みた。そして、本システムをより臨床に応用していくために、遺伝子治療を施した X-SCID マウス由来の iPS 細胞を用いて、X-SCID マウスの免疫不全症治療モデルを構築した。また、本システムの最終的なゴールとして、ヒト iPS 細胞より誘導した造血幹細胞を新たな移植ソースとして幹細胞治療に応用していくことが挙げられるため、ヒト iPS 細胞を用いて機能的なヒト造血幹細胞の誘導を試みた。以上を実験的に証明することで、テラトーマ形成を用いた iPS 細胞からの機能的な造血幹細胞誘導の原理とその応用に向けた将来的な可能性について言及する。

図 (序論)

A



B

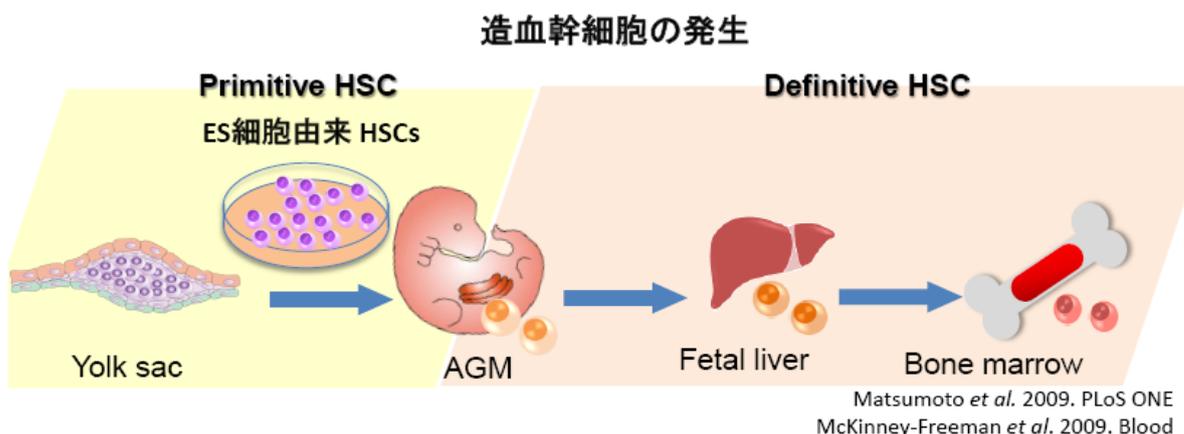
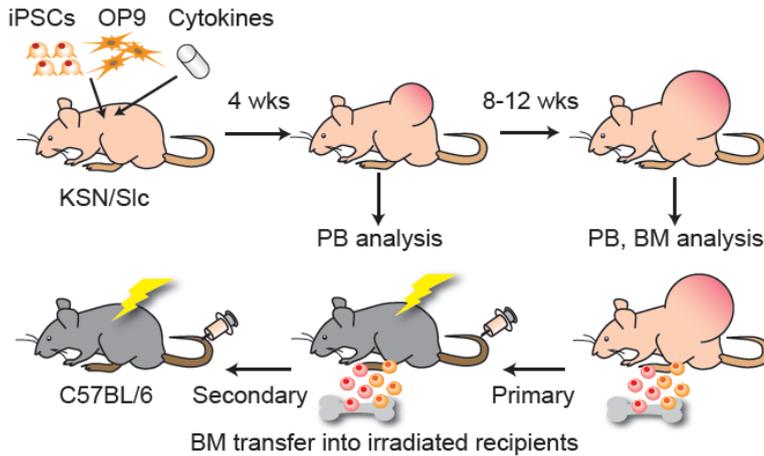


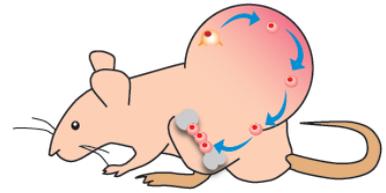
図 (序論) . ES 細胞から造血幹細胞への誘導方法の現状

(A) 従来の *in vitro* における ES 細胞からの造血幹細胞誘導方法。ES 細胞から Embryoid body (EB) を作製し、*HoxB4* 遺伝子を導入後、OP9 ストローマ細胞と共培養することで、移植可能な造血幹細胞が誘導可能である。(B) 発生過程における造血幹細胞の分化と、ES 細胞由来の造血幹細胞。従来の方法により *in vitro* で誘導された ES 細胞由来の造血幹細胞は、より未熟な段階の造血幹細胞と性質が類似する。

C



D



### 図（序論）． 本研究のストラテジーと仮説図

(C) テラトーマ形成を介した iPS 細胞からの造血幹細胞の誘導方法。iPS 細胞と OP9 細胞は共に皮下に注入。サイトカインは浸透圧ポンプに入れて皮下に埋め込む。テラトーマが形成されたマウスの骨髄に iPS 細胞由来の造血幹細胞が検出された際は、放射線照射したマウスに骨髄移植を行う。(D) テラトーマ内に iPS 細胞由来の造血幹細胞が誘導された場合、マウスの血管内を循環し、骨髄ニッチにホーミングする様子を示す。

## 結果

### 1. $\text{Lnk}^{-/-}$ GFP (LG-) iPS 細胞を用いた造血幹細胞誘導条件の検討

#### 1-1. $\text{Lnk}^{-/-}$ GFP トランスジェニックマウスの作出と iPS 細胞の樹立

私は、新たな造血幹細胞誘導システムを構築するにあたり、システムが機能するかどうか、また誘導効率の最適化を検討するために、 $\text{Lnk}^{-/-}$  マウスから樹立した iPS 細胞を用いることにした。 $\text{Lnk}$  とは、TPO/c-mpl 経路を介したサイトカインシグナルを負に制御するアダプタータンパク質である (Seita et al., 2007)。2005 年の依馬らの報告により、 $\text{Lnk}^{-/-}$  マウスでは、造血幹細胞が過剰産生されることや造血幹細胞 1 個あたりの骨髄再建能の機能が亢進していることが確認された (Ema et al., 2005; Takaki et al., 2002)。私は  $\text{Lnk}^{-/-}$  iPS 細胞が造血幹細胞に分化されれば、誘導効率が低い場合においても移植時に高い造血能が期待できるため、iPS 細胞由来の造血幹細胞の検出が容易になると考えた。また、ヌードマウスに注入した iPS 細胞が骨髄に移行しているか、あるいは骨髄において造血し末梢血中に iPS 細胞由来の血液細胞が循環しているかを検出するには、iPS 細胞由来の細胞と宿主であるヌードマウスの細胞を区別するため、蛍光タンパク質等で標識された iPS 細胞が必要である。そこで私は、B6 系統である  $\text{Lnk}^{-/-}$  GFP トランスジェニックマウスの精子(国立国際医療センター 高木智先生より供

与) を  $Lnk^{-/-}$  マウスの未成熟卵と IVF を行い、受精卵を仮親卵管へ移植して胎仔を得た。胎仔の中で、GFP の発現が確認された  $Lnk^{-/-}$  GFP マウスの尻尾より iPS 細胞を樹立した。樹立方法を簡単に述べると、まず成体の  $Lnk^{-/-}$  GFP マウス (♂) の尻尾から線維芽細胞を樹立した。そこに iPS 細胞の誘導に必要な 3 遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* : 3 因子) をレンチウイルスにより導入した。使用したレンチウイルスベクターは、TRE 下流に 3 因子を組み込み、ユビキチン-C (UbC) プロモーターによりテトラサイクリン依存性転写調節因子 (rtTA) が発現する Tet-On システムを導入しており、テトラサイクリン誘導体である Doxycycline 存在下でのみ 3 因子を発現する (図 1-1 A)。レンチウイルス導入後 2 日間線維芽細胞の増殖に必要な血清を含む培地で培養後、既報に従い ES 細胞用の培地に切り替えると同時に Doxycycline を添加して培養を継続した。約 20~30 日で出現してきた iPS 細胞様のコロニーをピックアップし、その後継代を繰り返すことで iPS 細胞として株化した。得られた iPS 細胞 (LG-iPS 細胞とする) は、形態的にも ES 細胞と酷似しており、 $Lnk^{-/-}$  GFP マウスより作製したため全ての細胞が GFP 蛍光を示していた (図 1-1 B)。RT-PCR により ES 細胞に特異的な遺伝子群の発現を確認したところ、ES 細胞と同様の遺伝子発現が認められた (図 1-1 C)。iPS 細胞の免疫染色により、ES 細胞に特異的な Nanog や SSEA-1 がタンパク質レベルで発現していることを確認した (図 1-1 B)。また、*in vivo* における多分化

能を確認するために、LG-iPS 細胞をヌードマウスの皮下に注入したところ、約 1 カ月でテラトーマ形成が認められ (図 1-1 D, E)、テラトーマ切片に HE 染色を施して形態を観察することにより組織学的に三胚葉系列の細胞が混在していることがわかった (図 1-1 F) (ただしこの場合は造血幹細胞の誘導は行っていない)。さらにキメラ形成能を確認するため野生型 ICR マウスから採取した胚盤胞に樹立した iPS 細胞を注入し仮親子宮に移植して胎仔を産出させたところ、B6 系統である iPS 細胞由来の黒色と ICR 系統である胚盤胞由来の白色の毛色が全身で混合したモザイク状のキメラマウスが形成された (図 1-1 G)。以上のことから、得られた LG-iPS 細胞は多能性幹細胞であると証明できたため、以下の造血幹細胞誘導実験に使用した。

## 1-2. テラトーマ形成と造血幹細胞誘導の条件検討

私は、*in vivo* で iPS 細胞から造血幹細胞を誘導するために、樹立した iPS 細胞を用いてテラトーマを形成した。まず、テラトーマ形成には LG-iPS 細胞  $5 \times 10^6$  個を KSN/Slc ヌードマウスの皮下に注入した。造血幹細胞の誘導は以下の条件にて行った。1) 比較対照として iPS 細胞のみを投与する群。2) 造血幹細胞の増殖と維持に寄与するサイトカイン (SCF, TPO) を iPS 細胞の注入と同時に浸透圧ポンプに入れ皮下に埋め込み、2 週間継続投与する群。3) ES 細胞から血液細胞

への分化を促すストローマ細胞である OP9 細胞を iPS 細胞と混合してマウスに注入する群。4) サイトカインと OP9 細胞を両方投与する群。以上 4 つの条件下で造血幹細胞を誘導し、テラトーマが形成されたマウスの末梢血を経時的に解析して iPS 細胞由来の血液細胞の頻度を比較した。テラトーマ内で iPS 細胞が造血幹細胞に分化し骨髄ニッチにホーミングして造血した場合、iPS 細胞由来の血液細胞がマウスの末梢血中に現れるはずである。末梢血の白血球共通抗原である CD45<sup>+</sup> 細胞を FACS により解析した結果、1) の対照群を除いて造血幹細胞の誘導を行った各群で iPS 細胞由来の血液細胞である GFP<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> 細胞が検出された (図 1-2 A)。各群において、GFP<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> 細胞の頻度はテラトーマの大きさに伴って経時的に増加し、iPS 細胞注入から 12 週目に最も高くなることがわかった (図 1-2 B, C)。iPS 細胞注入から 12 週目の各群の平均値は、条件 2) 1.02 ± 1.15%、条件 3) 0.87 ± 0.77%であったが、条件 4)では 4.26 ± 3.79%と群を抜いて高かった。また、過去の報告により造血幹細胞は未分化性の程度に伴い特異的な細胞表面マーカーを示すことが知られている (Osawa et al., 1996)。そこで同時期の骨髄細胞の細胞表面マーカーを FACS にて解析した結果、造血前駆細胞といわれる Lin<sup>-</sup> 分画、造血幹前駆細胞である Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> (KSL) 分画、長期骨髄再建能を有する造血幹細胞である CD34<sup>-</sup> KSL の全ての分画に GFP<sup>+</sup> 細胞が検出された (図 1-2 D)。骨髄細胞中の KSL 分画における GFP<sup>+</sup> 細胞の頻度は、条件

4) の群で最も高かった (図 1-2 C)。以上の結果より、LG-iPS 細胞から造血幹細胞の表現型を示す細胞がヌードマウスの骨髄中に誘導されたことが示唆された。また、末梢血中に iPS 細胞由来の血液細胞が検出されたことから、骨髄に誘導された iPS 細胞由来の造血幹細胞が造血している可能性も示唆された。

### 1-3. LG-iPS 細胞から誘導された造血幹細胞の機能解析

FACS による細胞表面マーカーの解析により、テラトーマが形成されたマウスの骨髄中に LG-iPS 細胞由来の造血幹細胞の表現型を示す細胞が誘導されていることが確認された。この細胞が機能的にも造血幹細胞としての造血機能を有しているかを評価するために、iPS 細胞を注入してから 12 週後のテラトーマが形成されたマウスの骨髄中から FACS により GFP<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> KSL 細胞を single cell sort、つまりサイトカインを含む培地を入れた 96 ウェルプレートの 1 ウェルに 1 個ずつ分取し 10 日間培養してコロニーアッセイを行った。その結果、全体の 22.9% が大きなコロニーを形成し、好中球・マクロファージ・赤芽球・巨核球を含む全ての血球系に分化したミックスコロニーを形成した (図 1-3 A, B)。このことは、*in vitro* において LG-iPS 細胞由来の造血幹細胞が多分化能を有していることを示唆している。

さらに、*in vivo* における LG-iPS 細胞由来の造血幹細胞の多分化能および骨髄

再建能を評価するために、テラトーマが形成されたマウスの骨髄細胞を致死量放射線照射した B6 マウスに移植した。移植後のレシピエントマウスの末梢血における GFP<sup>+</sup> 細胞の頻度を経時的に解析し、移植 12 週目には脾臓及び骨髄における再建能 (キメリズム) を FACS により解析した。その結果、移植 12 週後まで、末梢血・脾臓・骨髄において CD45<sup>+</sup> 細胞中の GFP<sup>+</sup> 細胞は高いキメリズムを示し、リンパ球および骨髄球系への分化が確認された (図 1-3 C, D)。また、同時期の骨髄中には、LG-iPS 細胞由来の造血前駆細胞 (GFP<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>) 及び造血幹細胞 (GFP<sup>+</sup> KSL) が検出された (図 1-3 E)。私は、この造血幹細胞が生体内の造血幹細胞と同様により長期に骨髄再建能を有するかを評価するために、一次移植 12 週目のレシピエントマウスの骨髄を再び致死量放射線照射した B6 マウスへ二次移植を行った。驚くことに、二次移植後 12 週目においても CD45<sup>+</sup> 細胞中の GFP<sup>+</sup> 細胞は高いキメリズムを示した (図 1-3 C)。このように、二次移植においても高いキメリズムを示したことは、一次移植 12 週目の骨髄細胞中に高頻度で LG-iPS 細胞由来の造血幹細胞が存在していたためであると考えられる。以上の結果から、LG-iPS 細胞由来の造血幹細胞は機能的にも長期骨髄再建能を有していることが示唆された。また、二次移植後約 12 カ月まで経過を観察しても、白血病やその他の造血異常を発症したマウスは確認されなかった。このことは、LG-iPS 細胞由来の造血幹細胞が正常な造血機能を有することを示唆している。

## 2. GFP (G-)iPS 細胞からの機能的な造血幹細胞の誘導

### 2-1. GFP トランスジェニックマウスからの iPS 細胞の樹立

私は LG-iPS 細胞を用いた造血幹細胞の誘導実験を経て、構築したシステムが野生型の iPS 細胞においても機能するかを検討した。使用する iPS 細胞としては、iPS 細胞由来の細胞とホストであるヌードマウスの細胞を区別するため、成体の B6 系統 GFP トランスジェニックマウス (大阪大学 岡部勝先生より供与) から iPS 細胞を樹立した。樹立方法は LG-PS 細胞と同様であるため省略する。得られた iPS 細胞株 (G-iPS 細胞) は、形態的にも ES 細胞に酷似しており、GFP トランスジェニックマウスから樹立しているため全ての細胞が CAG プロモーターの制御下で GFP 蛍光を示していた (図 2-1 A)。また、iPS 細胞の免疫染色により、ES 細胞に特異的な Nanog や SSEA-1 がタンパク質レベルで発現していることを確認した (図 2-1 A)。また、*in vivo* における多分化能を確認するために G-iPS 細胞をヌードマウスの皮下に注入したところテラトーマ形成が認められた (図 2-1 B)。さらにキメラ形成能を確認するために、野生型 ICR マウスから採取した胚盤胞に樹立した iPS 細胞を注入し仮親子宮に移植して胎仔を産出させたところ、iPS 細胞由来の黒色と胚盤胞由来の白色の毛色が混合したモザイク状のキメラマウスが形成された (図 2-1 C)。以上のことから、得られた G-iPS 細胞は多

能性幹細胞であると証明できたため、以下の造血幹細胞誘導実験に使用した。

## 2-2. G-iPS 細胞からの造血幹細胞誘導

私は、G-iPS 細胞から造血幹細胞を誘導するために、樹立した iPS 細胞を用いてテラトーマを形成した。テラトーマ形成及び造血幹細胞の誘導は LG-iPS 細胞と同様であるため省略する。テラトーマが形成されたマウスの末梢血を FACS により解析した結果、造血幹細胞を誘導した各群で iPS 細胞由来である GFP<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> 細胞が検出された (図 2-2 A)。また、その頻度は iPS 細胞を注入してから経時的に増加し、12 週目に最も高くなることがわかった (図 2-2 B)。さらに、iPS 細胞注入 12 週後の解析により、末梢血における CD45<sup>+</sup> 細胞中の GFP<sup>+</sup> 細胞の割合は条件 4) サイトカインと OP9 細胞を両方投与した群で最も高かった (各群の GFP<sup>+</sup> /CD45<sup>+</sup> 細胞の割合は、条件 1, 0.003±0.006%, 条件 2, 0.01±0.01%, 条件 3, 0.025±0.01%, 条件 4, 0.16±0.09%) (図 2-2 C)。しかし、GFP iPS 細胞における誘導効率も LG-iPS 細胞の効率と比較すると、著しく低い結果となった。同時期のテラトーマが形成されたマウスの骨髄細胞を FACS にて解析し、造血幹・前駆細胞中における GFP iPS 細胞由来の細胞の有無を確認した結果、Lin<sup>-</sup>、KSL、CD34<sup>-</sup> KSL の全ての分画に GFP<sup>+</sup> 細胞が検出された (図 2-2 D)。以上の結果より、LG-iPS 細胞の場合と同様に G-iPS 細胞からも造血幹細胞の表現型を示す細胞が

ヌードマウスの骨髄中に誘導されたことが示唆された。

### 2-3. G-iPS 細胞から誘導された造血幹細胞の機能解析

FACS 解析により認められた G-iPS 細胞由来の造血幹細胞が正常な造血機能を有しているかを評価するために、iPS 細胞注入より 12 週後のテラトーマが形成されたマウスの骨髄中から FACS により GFP<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> KSL 細胞を single cell sort し 10 日間培養してコロニーアッセイを行った。その結果、好中球・マクロファージ・赤芽球・巨核球を含む全ての血球系に分化したミックスコロニーを形成した (図 2-3 A)。このことは、*in vitro* において G-iPS 細胞由来の造血幹細胞が多分化能を有していることを示唆している。

さらに、私は *in vivo* における G-iPS 細胞由来の造血幹細胞の多分化能および骨髄再建能を評価するために、テラトーマが形成されたマウスの骨髄細胞を致死量放射線照射した B6 マウスに移植した。移植後のレシピエントマウスの末梢血における GFP<sup>+</sup> 細胞の頻度を経時的に解析し、移植 12 週目には脾臓及び骨髄におけるキメリズムを FACS により解析した。その結果、移植 12 週後においても、末梢血、脾臓、骨髄において iPS 細胞由来である GFP<sup>+</sup> 細胞の生着が確認され、全ての血球系へ分化していることが確認された (図 2-3 B)。また、レシピエントマウス骨髄及び脾臓の Lin<sup>-</sup> 細胞、KSL 細胞、CD34<sup>-</sup> KSL 細胞にも GFP<sup>+</sup> 細

胞が検出され (図 2-3 D)、G-iPS 細胞由来の造血幹細胞が自己複製能および多分化能を有することが示唆された。私は、この造血幹細胞がより長期に骨髄再建能を有するかを評価するために、一次移植 12 週目のレシピエントマウスの骨髄を再び致死量放射線照射した B6 マウスへ二次移植を行った。その結果、一次レシピエントマウスの全骨髄細胞を  $1 \times 10^7$  個移植した場合は顕著にキメリズムの減少が認められたものの、GFP<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> KSL 細胞を 40 個分取して移植した場合は約 20% の生着が確認された (図 2-3 B, E)。さらに、GFP<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> KSL 細胞を 40 個分取し、サイトカインを含む培地で 1 週間培養した後に移植した場合は、さらなるキメリズムの上昇が認められた (図 2-3 E)。全骨髄を移植した場合にキメリズムが減少する原因としては、LG-iPS 細胞の場合と異なり一次移植レシピエントマウスの骨髄内における G-iPS 細胞の頻度が非常に低かったことから、二次移植の際に一次レシピエントマウス由来の造血幹細胞が優勢になってしまったためであると考えられる。以上の結果より、G-iPS 細胞由来の造血幹細胞は、長期骨髄再建能を有していることが示唆された。

### 3. *In vivo* 誘導法を用いた X-SCID マウスの免疫不全治療モデル

#### 3-1. X-SCID マウスからの iPS 細胞樹立と遺伝子導入

前章までの結果より、テラトーマ形成を介した *in vivo* システムを利用することで正常なマウス iPS 細胞から機能的な造血幹細胞が誘導可能であることを証明した。そこで、私は本システムが遺伝子治療にも応用可能であるかを検討した。治療モデルの対象疾患としては、既に疾患モデルマウスが確立されている X 染色体に関連した重症複合型免疫不全症 (X-linked severe combined immunodeficiency : X-SCID) を対象とした。X-SCID は、X 染色体に位置する IL-2 をはじめとしたインターロイキン受容体に共通する  $\gamma$  鎖に変異があるためリンパ球が産生されず、重症免疫不全 (SCID) を発症する (Buckley et al., 1997)。既に先行研究において、ヒト CD34<sup>+</sup> 細胞にレトロウイルスを介して IL-2 受容体  $\gamma$  鎖の遺伝子を導入し X-SCID 患者に移植する臨床試験が行われ、免疫不全が解消されることが報告された (Gaspar et al., 2004)。しかし、この実験系ではウイルス感染により遺伝子導入された CD34<sup>+</sup> 細胞はヘテロな集団であるため、一部の細胞では導入遺伝子の挿入変異により白血病を誘発することが明らかとなった (Howe et al., 2008)。患者由来の iPS 細胞を用いた遺伝子治療モデルは、安全な部位に遺伝子を導入した iPS 細胞を選別しクローン化して使用することができる

ため、挿入変異による癌化を防ぐことが可能となる (Hanna et al., 2007)。しかしながら、現段階では iPS 細胞からの機能的な造血幹細胞の誘導方法は未だに確立されていないため、臨床応用が困難な状況にある。そこで私は、テラトーマ形成を介した *in vivo* 誘導法により、遺伝子治療を施した X-SCID マウス由来の iPS 細胞から機能的なリンパ球を産生できるかを検討した。

まず、私はテラトーマを形成するための iPS 細胞を用意した。使用する iPS 細胞は当研究室 岡部基人氏により、B6 系統の X-SCID マウス尻尾から作製した線維芽細胞にレトロウイルスを介してリプログラミングに必要な 3 因子を導入することで樹立された。ゲノミック PCR により、樹立した iPS 細胞が 3 因子により樹立されたこと、および  $\gamma$  鎖遺伝子に変異を持つことが示された (図 3-1 A)。また、RT-PCR により ES 細胞マーカーの発現を確認した( 図 3-1 B)。さらに、樹立した X-SCID マウス由来 iPS 細胞にレトロウイルスを介して murine  $\gamma$  鎖遺伝子を導入し、single cell sort により myc-iPS 細胞を株化した。使用したレトロウイルスベクターは、LTR プロモーター下で murine  $\gamma$  鎖遺伝子を発現し IRES 配列下に GFP を連結しているため蛍光により murine  $\gamma$  鎖遺伝子の発現を確認することができる (図 3-1 C)。FACS 解析により陰性対照である B6 マウス由来の iPS 細胞と比較して、myc-iPS 細胞は GFP 及び murine  $\gamma$  鎖の発現が認められたため (図 3-1 D)、myc-iPS 細胞を以降のテラトーマ形成に使用した。

### 3-2. myc-iPS 細胞を用いた X-SCID マウスの治療モデルの構築

私は、テラトーマを形成させるために myc-iPS 細胞を OP9 細胞と共に X-SCID マウスの皮下に注入した。iPS 細胞の注入から 12 週後に、テラトーマが形成されたマウスの末梢血を FACS により解析したところ、myc-iPS 細胞由来であることを示す GFP<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> 細胞が検出された。また、その細胞系譜は T および B リンパ球系、骨髄球系が共に検出されたが、顕著に T 細胞へのコミットメントが認められた (図 3-2)。さらに、野生型マウスと同様に CD3<sup>+</sup> T 細胞中には、より成熟した CD4<sup>+</sup> T 細胞または CD8<sup>+</sup> T 細胞や、ナイーブ T 細胞 (CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) が検出された (図 3-2)。X-SCID マウスに myc-iPS 細胞を注入してテラトーマを形成させることで効率的にリンパ球を誘導できたことから、原理的には免疫不全を治療可能であることが示唆された。誘導された myc-iPS 細胞由来の細胞が T 細胞に傾倒していた理由については、ホストマウスである X-SCID マウスには元来 T 細胞は存在しないが骨髄球系細胞と機能不全の B 細胞が存在するため、myc-iPS 細胞由来の B 細胞及び骨髄球系細胞が分化する“空き”がなく、結果として T 細胞に偏った分化を遂げたと考えられる。今後は、テラトーマが形成されたマウスの骨髄から myc-iPS 細胞由来の正常な造血幹細胞を X-SCID マウスに移植することで、レシピエントの遺伝子異常を持つ造血幹細胞が治療された細

胞に置換され長期に渡って正常なリンパ球形成に伴う治療効果が期待される。

## 4. ヒト iPS 細胞を用いた機能的な造血幹細胞の誘導

### 4-1. ヒト iPS (hiPS) 細胞の樹立

前章までの結果より、本研究はテラトーマ形成を利用することにより miPS 細胞から遺伝子を導入することなく機能的な造血幹細胞を誘導しうることを証明した。また、本システムに遺伝子治療を行った疾患特異的 iPS 細胞を用いることにより X-SCID マウスの免疫不全を治療可能であることを示した。そこで私は最終的な臨床応用のゴールとして、本システムが hiPS 細胞からも機能的な造血幹細胞を誘導する系として利用可能であることを検討した。

使用する iPS 細胞には、当研究室 正木英樹研究員より樹立された hiPS 細胞を用いた。hiPS 細胞の樹立方法を簡単に述べる。購入した健常人角化上皮細胞にレトロウイルスベクターを介して 3 因子を導入し、その 3 日後から既報に従い hES 細胞用培地に置換して 20~30 日程度培養を継続したところ、ヒト多能性幹細胞様のコロニーが得られた。ピックアップ後の継代培養においても自発的に分化することなく維持でき、iPS 細胞として株化した。樹立した hiPS 細胞は、免疫染色により、hES 細胞に特異的な TRA-1-60, TRA-1-81 及び SSEA-4 がタンパク質レベルで発現していることを確認した (図 4-1)。このため、この hiPS 細胞を以降の造血幹細胞誘導実験に用いることとした。

#### 4-2. テラトーマ形成を介した hiPS 細胞からの機能的な造血幹細胞の誘導

私は、hiPS 細胞より造血幹細胞を含むテラトーマを形成させるために、NOD/SCID マウスの精巣へ hiPS 細胞と OP9 細胞を注入し、human recombinant の SCF, TPO を入れた浸透圧ポンプを皮下に埋め込んだ。NOD/SCID マウスは、non-obese diabetic マウスに T 及び B 細胞の発生を損なう SCID 変異を導入したマウスで、ヌードマウスよりも重症な免疫不全を示す。ここで、hiPS 細胞を皮下ではなく精巣に注入した理由としては、hiPS 細胞は miPS 細胞のように皮下に注入してもテラトーマを形成しにくいという性質があり、より血流の多い精巣や腎皮膜下に移植した方がテラトーマ形成率が高いためである。テラトーマ形成から 12 週後に、マウスの末梢血における hiPS 細胞由来の血液細胞の有無を FACS により解析した。その結果、15 匹中 1 匹に明らかに  $mCD45^- hCD45^+$  を示す細胞が検出された (図 4-2 A)。また、骨髄細胞を解析したところ、15 匹中 10 匹に  $mCD45^- hCD45^+$  細胞が検出され、 $mCD45^-$  細胞中にはヒト造血幹細胞分画といわれる  $hCD45^{dull} hCD34^+$  細胞が認められた (図 4-2 B)。

私は、hiPS 細胞由来の造血幹細胞の骨髄再建能を解析するために、テラトーマが形成され、骨髄中に  $mCD45^- hCD45^+$  細胞が検出されたマウスから骨髄移植を行った。レシピエントマウスとしては、NOD/SCID マウスあるいはさらに重

症免疫不全マウスである NOD/SCID/JAK3null マウスに半致死量である 2Gy の放射線を照射して用いた。NOD/SCID/JAK3null マウスは、NOD/SCID の JAK3 を欠損することにより、T, B 細胞に加えて NK 細胞までもが消失した高度免疫不全マウスである。骨髄移植の方法は、テラトーマが形成された全骨髄細胞  $10^7$  個を移植する Total 群、あるいは mCD45<sup>-</sup>かつ hCD45<sup>dull</sup> hCD34<sup>+</sup> 細胞を 600 個と初期造血を補助するための NOD/SCID マウスの骨髄細胞を  $2 \times 10^5$  個を共に移植する Sorted 群で移植を行った。移植から 8 週目にレシピエントマウスの末梢血を FACS により解析した結果、NOD/SCID マウスに移植した群では 28 匹中 1 匹に、NOD/SCID/JAK3null マウスに移植した群では 9 匹中 2 匹に hiPS 細胞由来の血液細胞であることを示す mCD45<sup>-</sup> hCD45<sup>+</sup> 細胞が生着していることが確認された (図 4-2 C)。さらに、生着した血液細胞は T 細胞、B 細胞、骨髄球系細胞への分化が認められた (図 4-2 C)。このキメリズムは、Total 群よりも造血幹細胞分画を濃縮した Sorted 群でより高い結果となった。また、移植 12 週目の末梢血、脾臓、骨髄における hiPS 細胞由来の血液細胞の生着を確認した結果、全体的なキメリズムは低下していたものの脾臓及び骨髄への生着が確認された (図 4-2 D)。また、hCD3<sup>+</sup>細胞にはより成熟した T 細胞であることを示す hCD4<sup>+</sup>hCD8<sup>-</sup>細胞及び hCD4<sup>-</sup>hCD8<sup>+</sup> 細胞が検出された。さらに、hGpA<sup>+</sup> 細胞も検出されたため、hiPS 細胞から赤血球への分化も示された (図 4-2 D)。以上の結果より、テラトーマ

形成を介して hiPS 細胞から多分化能及び骨髄再建能を有する造血幹細胞が誘導されたことが示唆された。

## 5. テラトーマ組織における造血幹細胞分化機序の解明

私は、テラトーマ内で iPS 細胞がどのように造血幹細胞に分化するのか、また iPS 細胞由来の造血幹細胞がテラトーマ中のどのような環境に存在するのかを知るために、テラトーマを構成する細胞を免疫染色および FACS により解析した。まず、miPS 細胞から作製したテラトーマの組織切片を免疫染色した結果、テラトーマ中には iPS 細胞由来である GFP<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> 細胞およびホストマウス由来の GFP<sup>-</sup> CD45<sup>+</sup> 細胞が両方存在することがわかった (図 5-1 A)。さらに、FACS 解析により GFP<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> 細胞中には KSL 細胞が検出されたため、成体型の造血幹細胞と思われる細胞が形成されていることが示唆された (図 5-1 B)。

ところで、ここで造血幹細胞とそのニッチと考えられている細胞については、過去に様々な報告がなされている。幹細胞のニッチとは、概念的に幹細胞と幹細胞に影響を与える支持細胞から構成される幹細胞の居場所と考えられている。造血幹細胞のニッチについて、Zhang あるいは Calvi らは骨髄中の骨芽細胞の増加に伴い造血幹細胞も増加することから骨芽細胞こそが造血幹細胞のニッチであると提言している (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003)。また、Li らは *in vitro* で血管内皮細胞が造血幹細胞の機能を支持することを (Li et al., 2004)、Avecilla らは血管内皮細胞の欠損が造血異常を引き起こすことを報告し

(Avecilla et al., 2004)、血管内皮細胞もニッチを構成する細胞の一つとして提唱している。そこで私は、テラトーマ内にこれらのニッチ細胞が存在するかどうかを免疫染色により評価した。骨芽細胞のマーカースとして **Osteocalcin** を、血管内皮細胞のマーカースとしては **VE-cadherin** を指標として、テラトーマ組織におけるそれらの発現を確認したところ、**Osteocalcin<sup>+</sup>** 細胞あるいは **VE-cadherin<sup>+</sup>** 細胞がかなりの割合で存在することが確認された (図 5-1 C)。さらに、これらのニッチ様細胞と、造血幹細胞を含む **CD45<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup>** 細胞とを共染色した結果、**Osteocalcin<sup>+</sup>** 細胞というよりは **VE-cadherin<sup>+</sup>** 細胞の近傍により多くの **CD45<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup>** 細胞が局在していることがわかった (図 5-1 D, E)。また、hiPS 細胞由来のテラトーマを構成する細胞を FACS にて解析すると、**nCD45<sup>-</sup> hCD45<sup>+</sup>** 細胞中に造血幹細胞分画と言われる **hCD45<sup>dull</sup> hCD34<sup>+</sup>** 細胞が検出された (図 5-2 A)。さらに、**CD45<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup>** 細胞とニッチ様細胞とを共染色した結果、**CD45<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup>** 細胞は **Osteocalcin<sup>+</sup>** 細胞と **VE-cadherin<sup>+</sup>** 細胞の近傍に局在していることが示された (図 5-1 B, C)。以上の結果より、テラトーマの形成過程において、造血幹細胞ニッチと思われる様々な細胞の出現により骨髄と同じような環境が形成され、それに伴って造血幹細胞および血液細胞が誘導する可能性が示唆された。

## 考察

本研究では、テラトーマ形成を介することでマウスまたはヒト iPS 細胞より機能的な造血幹細胞を誘導することに成功した。最も特筆すべきことは、iPS 細胞への遺伝子操作なく機能的な造血幹細胞を誘導しうることを初めて証明した点である。そして、iPS 細胞を単独で注入した場合には造血幹細胞の誘導はほとんど見られないものの、iPS 細胞を OP9 細胞と共注入し造血系サイトカインである SCF と TPO を投与した場合に最も誘導効率が高くなることがわかった。この結果は、テラトーマを作製する過程でサイトカインとストローマ細胞を加えることでテラトーマ内に造血幹細胞ニッチ様の微小環境が形成され、この環境によって iPS 細胞の造血系への分化が促進され、機能的な造血幹細胞を効率的に分化誘導させることができたと考えられる。iPS 細胞注入から 12 週目のテラトーマ組織を観察した結果、その大部分が iPS 細胞由来であり、OP9 細胞の寄与はわずかであった (データ省略)。このことは、注入した OP9 細胞が iPS 細胞から造血幹細胞へ分化するごく初期段階の誘導に機能する可能性を示唆している。発生段階で造血幹細胞の分化を誘導するための分子機序は明らかにされていない部分が多いものの、免疫染色によって確かにテラトーマ組織内には造血幹細胞ニッチと考えられる細胞が存在することが認められたことは私の推察を支持する結果であった。

また、本研究は、X-SCID マウス由来の iPS 細胞に遺伝子治療を施し、X-SCID マウスにテラトーマを形成させることで免疫不全症の根治治療が可能であることを原理的に証明した。この結果は、テラトーマを介した造血幹細胞の誘導法が将来的な免疫・血液疾患に対する有用性を示唆する。将来的に患者自身にテラトーマを形成することは危険性が高いと考えられるため、患者由来の遺伝子治療を施した iPS 細胞を免疫不全ブタ等に注入してテラトーマを形成させ、骨髄より正常な造血幹細胞を分取して患者に移植するという方法をとれば患者への侵襲性が低く安全性が高い。

さらに、本研究では hiPS 細胞をマウスに注入してテラトーマを形成させる異種マウスモデルを用いて、マウス体内に機能的なヒト造血幹細胞を誘導することに成功した。マウスの系で ES/iPS 細胞から機能的な造血幹細胞を誘導するには、*in vitro* での培養による誘導とマウス胚盤胞に ES/iPS 細胞を注入してキメラマウスを作製する胚盤胞補完法が考えられる。*In vitro* 誘導法では、前述しているように生体内での環境を完全に再現できない為、分化させた細胞の機能が不完全である場合が多い。また、胚盤胞補完法では、現段階の hES/iPS 細胞には応用できないという大きな問題がある。最近、hES/iPS 細胞は、ICM と性質が類似したげっ歯類の ES/iPS 細胞よりも、epiblast stem cells (EpiS 細胞)と類似する点が多いことが報告された (Tesar et al., 2007)。EpiS 細胞はほぼキメラ形成能がない

ことを考慮すると (Brons et al., 2007)、hES/iPS 細胞もキメラ形成に貢献できないことが推察され、キメラ形成を前提とした胚盤胞補完法に使用することは不可能である。従って、キメラ形成能を持たなくてもテラトーマ形成能を有する hES/iPS 細胞から機能的な造血幹細胞を誘導するには、私が提唱するテラトーマ形成を介した方法が最も有利であると言える。しかしながら、テラトーマが形成されたマウスの末梢血中に、hiPS 細胞由来の血液細胞が検出されたのは、15 匹中 1 匹のみであった。また、骨髄移植において、レシピエントマウスには hiPS 細胞由来の血液細胞が生着したが、そのキメリズムは経時的に減少傾向を示した。これらの理由としては、hiPS 細胞由来のヒト造血幹細胞は異種レシピエントであるマウスの骨髄ニッチに生着することは可能であるが、マウス骨髄ではヒト造血幹細胞が分化し造血するのに必要なサイトカインや増殖因子などを産生できないことが考えられる。また、骨髄ニッチに存在する造血幹細胞が産生する種々の血液細胞が血管を通じて末梢血中へ流出するメカニズムについてもマウスとヒトとでは異なるのかもしれない。

これまで、ES 細胞や iPS 細胞から正常かつ機能的であるという 2 つの因子を兼ね備えた造血幹細胞を誘導することは非常に困難であった。過去の報告では、ES 細胞から分化した血液細胞は機能が制限されており、*in vivo* での生着や造血再建に耐えられないということが指摘されてきた (Hole et al., 1996)。また、ES

細胞に *HoxB4* を強制発現させて骨髄再建能を獲得させた場合においても、骨髄球系細胞の増殖及びリンパ球系細胞の減少という異常造血を引き起こすことが報告された (Pilat et al., 2005)。一方、今回確立したテラトーマ形成を利用した *in vivo* での分化誘導法は、正常と機能を両方兼ね備えた造血幹細胞を誘導することに成功している。本法の特徴は、テラトーマという *in vivo* 環境下での誘導に着目した点と、テラトーマを作製する過程で造血幹細胞の維持に必要とされるサイトカインや造血を支持するストローマ細胞を加えた点である。これにより三胚葉全ての細胞系譜へ均等に分化能を持つ *iPS* 細胞は中胚葉さらには血液細胞系への分化に傾倒し、機能的な造血幹細胞を効率的に分化誘導させることができたと考えられる。現在までのところ、*iPS* 細胞由来の造血幹細胞を移植したレシピエントマウスにおいて白血病やその他の造血異常を示したマウスは見られない。その理由として、テラトーマを構成する組織の免疫染色による解析において、テラトーマ中には造血幹細胞ニッチと言われる細胞が多く存在し、その近傍に造血幹細胞が局在していたことから、*in vivo* における骨髄環境に類似した環境がテラトーマ内に形成され、*iPS* 細胞が比較的正常に近い造血幹細胞分化のステップとエピジェネティックな変化を遂げたと考えられる。さらに、骨髄にホーミングした *iPS* 由来の造血幹細胞を移植していることも理由の一つである。今のところ *Yolk sac* に存在する未熟な造血幹細胞と骨髄に存在する成熟した

造血幹細胞を区別する分子メカニズムはその多くが明らかにされていない。そのため、先行研究ではホーミング能のない細胞までにしか誘導できていない (Burt et al., 2004)。ホーミング能の獲得は、成熟な造血幹細胞に分化するための必要条件である。そのため、テラトーマ内で完全に分化した造血幹細胞のみが選抜されて骨髄へ移行し、腫瘍形成能を持つ未分化な細胞は除去されたと考えられる。

## 今後の展開と総括

本研究で示したテラトーマ形成を介した造血幹細胞誘導法は、最終的に患者または健常人の iPS 細胞から造血幹細胞を誘導して新たな移植ソースとしての応用が望まれる。先行研究では一般的なことであるが、本法も例外ではなく造血幹細胞の誘導効率も低く、実用化できる程度には至っていない。そのため、さらなる誘導方法の最適化が必要とされる。近年では造血幹前駆細胞や末梢血からも iPS 細胞を誘導することが可能となった (Eminli et al., 2009; Okabe et al., 2009)。血液細胞由来 iPS 細胞はその元となる血液細胞と似たエピジェネティックなゲノムの修飾を持ち、血液細胞に分化しやすいとの報告例もある (Polo et al.; Watarai et al.)。そのため、今回確立した系に造血幹細胞由来の iPS 細胞を用いることでより造血幹細胞への分化効率が上がる可能性があり、今後の検討に

利用していきたい。

以上より、iPS 細胞からの機能的な造血幹細胞の誘導法は、従来の移植治療に新たな移植ソースを提唱する可能性を持つとともに、本システムは iPS 細胞の血液分化能を計るデバイスとしても利用可能であると考えられる画期的な技術であり将来の幹細胞治療に新たな局面をもたらすものと考えられる。

## 材料と方法

### 動物

B6、KSN/Slc、ICR の各系統のマウスは日本 SLC (Shizuoka, Japan)より購入した。Lnk<sup>-/-</sup>マウスは国立国際医療センター 高木智先生より供与頂いた。Lnk<sup>-/-</sup>GFPトランスジェニックマウスは国立国際医療センター 高木智先生より精子を供与頂き、Lnk<sup>-/-</sup>マウス(♀)の未受精卵と IVF を行い得た胎仔から GFP<sup>+</sup>の胎仔を選抜して繁殖させたものを用いた。NOD/SCID マウスは日本クレア (Tokyo, Japan)より購入した。NOD/SCID/JAK3null マウスは三協ラボサービス株式会社(Tokyo, Japan)より購入した。動物を用いた全ての実験は東京大学医科学研究所の実験動物安全委員会の指導に基づいて行った。

### 樹立したマウス iPS 細胞の評価

ゲノム DNA を用いた PCR による導入ウイルスの確認には QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Germantown, MD) で抽出したゲノム DNA を用いた。PCR 反応には以下のプライマーセットを用いた。

*Oct3/4*

Fw : 5' -CCCTGGGGATGCTGTGAGCCAAGG-3'

Rv : 5' -CCCTTTTTCTGGAGACTAAATAAA-3'

*Sox2*

Fw : 5' -GGTTACCTCTTCCTCCCACTCCAG-3'

Rv : 5' -TTATCGTCGACCACTGTGCTGCTG-3'

*Klf4*

Fw : 5' -GCGAACTCACACAGGCGAGAAACC-3'

Rv : 5' *Sox2* の Rv と同じ(レトロウイルスベクターの配列を認識する)

*c-Myc*

Fw : 5' -CAGAGGAGGAACGAGCTGAAGCGC-3'

Rv : 5' *Sox2* の Rv と同じ(レトロウイルスベクターの配列を認識する)

遺伝子発現のために行った RT-PCR のための cDNA は RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Germantown, MD)により抽出した RNA より SuperScript III™ RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて cDNA を合成した。半定量的 RT-PCR には cDNA を Taq-Man 試薬(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)による定量的 PCR において *Gapdh* で標準化したものを用いた。PCR 反応には以下のプライマーセットを用いた。

*Nanog*

Fw : 5' -CAGGAGTTTGAGGGTAGCTC-3'

Rv : 5' -CGGTTCATCATGGTACAGTC-3'

*Eras*

Fw : 5' -CCCTCATCAGACTGCTACT-3'

Rv : 5' -CACTGCCTTGTACTCGGGTAGCTG-3'

*Ecat1*

Fw : 5' -TGTGGGGCCCTGAAAGGCGAGCTGAGAT-3'

Rv : 5' -ATGGGCCGCCATACGACGACGCTCAACT -3'

*gdf3*

Fw : 5' -GTTCCAACCTGTGCCTCGCGTCTT-3'

Rv : 5' -AGCGAGGCATGGAGAGAGCGGAGCAG -3'

*Rex1*

Fw : 5' -ACGAGTGGCAGTTTCTTCTTGGGA-3'

Rv : 5' -TATGACTCACTTCCAGGGGGCACT -3'

*Zfp296*

Fw : 5' -CCATTAGGGGCCATCATCGCTTTC-3'

Rv : 5' -CACTGCTCACTGGAGGGGGCTTGC -3'

テラトーマの形成は下記の方法(テラトーマの形成と造血幹細胞の誘導の項)に従った。テラトーマの組織学的解析には、形成されたテラトーマを採取し、4%パラホルムアルデヒド液で固定後、パラフィン切片を作製し、HE染色を施した。

キメラ形成能の確認のための胚操作は、既報のプロトコールに従って行った (Nagy et al., 2003)。簡単に述べると、マウスの 8 細胞期/桑実胚期の胚を交配後 2.5 日後の卵管及び子宮から M2 培地 (Millipore) に回収した。回収した胚はアミノ酸を含む KSOM 培地 (KSOM-AA 培地: Millipore) に移し、一晚 5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で培養した。マイクロマニピュレーションのために、iPS 細胞は 0.25% トリプシン-EDTA (Invitrogen) 処理によりディッシュから剥がし、それぞれの培地に懸濁した。ピエゾマイクロマニピュレーター (Primetech, Tokyo, Japan) を用いて、顕微鏡下で胚の透明帯及び栄養外胚葉に穴を開け、約 10 個の iPS 細胞を桑実胚期の胚の囲卵腔内、もしくは胚盤胞の ICM 近傍に注入した。注入後、1~2 時間培養後、胚移植を行った。移植レシピエントマウスには偽妊娠雄マウスとの交配後 2.5 日目の ICR 系統の雌マウスを用いた。

## 細胞培養

miPS 細胞の未分化維持には Dulbecco' s modified Eagle' s medium (Sigma) に 15% ノックアウト血清リプレースメント (Invitrogen)、0.1mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸、1mM HEPES 緩衝液 (Invitrogen)、1% L-グルタミン-ペニシリン-ストレプトマイシン、1000U/mL マウス LIF を加えた培地を用い、マイトマイシン-C 処理を施したマウス胎児繊維芽細胞上に播種した。培

地は毎日置換し、過剰増殖を防ぐために2~3日に1度は播き直した。

hiPS細胞の維持には、Dulbecco's modified Eagle's medium-F12 (Sigma)に20% ノックアウト血清リプレースメント (Invitrogen)、0.1mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸、0.2mM L-グルタミン、5ng/mL bFGF (Peprotech, Rocky Hill, NJ)を加えた培地を用い、マイトマイシン-C処理を施したマウス胎児繊維芽細胞上に播種した。培地は毎日置換し、7日に1度播き直した。

いずれのiPS細胞の培養も5% CO<sub>2</sub>存在下、37°Cで培養した。

OP9細胞は、minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM: Invitrogen) に20% 仔ウシ血清 (HyClone, Logan, UT)、1% L-グルタミン-ペニシリン-ストレプトマイシンを加えたものを用いた。

## テラトーマの形成と造血幹細胞の誘導

miPS細胞の場合は、0.25%トリプシン-EDTA処理によりディッシュから剥がし、50 $\mu$ LのPBSに懸濁した5 $\times$ 10<sup>6</sup>個のiPS細胞をKSN/Slcマウス(4-5 weeks old)の皮下に注入した。造血幹細胞の誘導には以下の4条件で行った。1) コントロールとしてiPS細胞のみを注入。2) 200 ng SCF (Peprotech) と 200 ng TPO (Peprotech)をマイクロオズモティックポンプ (ALZET, Cupertino, CA) に入れマウスの皮下に埋め込み2週間継続投与した。3) 1 $\times$ 10<sup>6</sup>個のOP9細胞をiPS細胞

と共注入した。4) サイトカインと OP9 細胞を両方投与した。

hiPS 細胞の場合は、Accutase (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA) 処理した hiPS 細胞を  $1 \times 10^6$  個と  $5 \times 10^5$  個の OP9 細胞を NOD/SCID マウス(5-7 weeks old) の精巣に注入した。サイトカインには 200 ng human SCF (Peprotech) と 200 ng human TPO (Peprotech) をマイクロオズモティックポンプ(ALZET)に入れ NOD/SCID マウスの皮下に埋め込んだ。

## 免疫染色

iPS 細胞の未分化マーカーに対する免疫染色には、iPS 細胞を 4%パラホルムアルデヒドにより室温で 10 分間インキュベートして固定し、MAXblock<sup>TM</sup> Blocking Medium (ACTIVE MOTIF, Carlsbad, CA)により室温で 30 分間ブロッキングを行った。一次抗体反応には、miPS 細胞の場合は、抗-マウス Nanog 抗体(1:100, ウサギ IgG, Cosmo Bio Co, Tokyo)、抗-マウス SSEA-1 抗体 (1:100, マウス IgM, Abcam, UK)、hiPS 細胞の場合は、抗-ヒト TRA-1-81 抗体 (1:100, マウス IgG, Millipore)、抗-ヒト TRA-1-60 抗体(1:100, マウス IgG, Millipore)、抗-ヒト SSEA-4 抗体 (1:100, マウス IgG, Abcam)を用いて室温で 1 時間反応させた。二次抗体には、miPS 細胞の場合は、抗-ウサギ IgG-Alexa Fluor 546 (1:300; Invitrogen)と抗-マウス IgM-APC (1:100; eBioscience, San Diego, CA)、hiPS 細胞の場合は、抗-

ウス IgG-Alexa Fluor 546 (1:300; Invitrogen)を用いて室温で 30 分反応させた。染色後、DAPI (Sigma-Aldrich)により核を染色して 蛍光顕微鏡システム BX-51 and digital camera system DP-71 (OLYMPUS, Tokyo)により観察・撮影した。

テラトーマ組織はOptimal Cutting Temperature (O.C.T.) compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan)により包埋しドライアイス上で凍結させた。この凍結ブロックをCM3050 S クライオスタット(Leica Microsystems, Tokyo, Japan)により7~8  $\mu\text{m}$  の組織切片にして染色に使用した。組織切片は冷エタノールにより固定し、MAXblock<sup>TM</sup> Blocking Medium で固定した。一次抗体には、miPS細胞由来のテラトーマの場合は、全て抗-マウス: CD45 (1:50; ラットIgG, BD Bioscience)、CD117(c-Kit)-Alexa Fluor 488 (1:10; ラットIgG, BioLegend)、Osteocalcin (BGLAP) (1:200; ウサギIgG, LifeSpan Biosciences, Seattle, WA)、VE-cadherin (1:200; ウサギIgG, Abcam)を用いて4°Cで一晩反応させた。hiPS細胞由来のテラトーマの場合は、全て抗-ヒト: CD45-Qdot 605 (1:10; マウスIgG, Invitrogen)、CD34-FITC (1:10, マウスIgG, BD Pharmingen)、BGLAP (1:200; ウサギIgG, LifeSpan Biosciences)、VE-cadherin (1:200; ウサギIgG, Abcam)を用いて4°Cで一晩反応させた。二次抗体反応には、抗-ラット IgG-Alexa Fluor 546、抗-ウサギIgG-Alexa Fluor 647 (Invitrogen)を用いて室温で40分反応させた。染色後、DAPI (Sigma-Aldrich)により核を染色して 共焦点レーザースキャン顕微鏡システム TCS SP2 AOBS (Leica

Microsystems).により観察・撮影した。

### フローサイトメトリーによる解析とソーティング

miPS 細胞由来の血液細胞: 末梢血及び脾臓細胞は以下の抗-マウス抗体により染色した。抗-CD45-APC (BD Biosciences)、抗-CD3e-APC-Cy7 (eBioscience, San Diego, CA)、抗-CD45R-Pacific Blue (eBioscience)、抗-Gr-1- phycoerythrin(PE)-Cy7、抗-Mac-1-PE-Cy7 (BioLegend, San Diego, CA)。テラトーマが形成されたマウスの骨髄細胞は既報に従って解析を行った(Osawa et al., 1996)。簡単に述べると、まず各血液細胞系譜を除くために以下のビオチン付加抗-マウス抗体と反応させた: Gr-1、Mac-1、CD45R、CD4、CD8、IL-7R、TER119 (eBioscience)。次に、MACS 抗-ビオチン マイクロビーズ(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)によりビオチンが付加した細胞を標識し、LS-MACS システム(Miltenyi Biotec)を用いてビオチンが付加した細胞を除去した。残りの細胞は、以下の抗-マウス抗体により染色した。CD34-Alexa Fluor 700、Sca-1-Pacific Blue、c-Kit-APC (eBioscience)。ビオチンが付加した細胞は streptavidin-APC-Cy7 (eBioscience)により染色した。解析及び細胞ソーティングは FACS Aria (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)により行った。

hiPS 細胞由来の血液細胞: テラトーマが形成されたマウスの骨髄細胞は以下の

抗体により染色した。抗-マウス CD45-APC (BD Biosciences)、抗-ヒト CD45-Pacific Blue (BioLegend) 、抗-ヒト CD34-FITC (BD Biosciences)。骨髄移植の末梢血および脾臓、骨髄細胞の解析には以下の抗体により染色した。抗-マウス CD45-APC (BD Biosciences)、抗-ヒト CD45-Pacific Blue (BioLegend) 、抗-ヒト CD3-Alexa Fluor 488 (BD Biosciences) 、抗-ヒト CD19-APC-H7 (BD Biosciences) 、抗-ヒト CD33-PE-Cy7 (BD Biosciences)。

### **Single cell colony assay**

テラトーマが形成されたマウスの骨髄細胞より FACS Aria を用いて CD34<sup>+</sup>KSL 細胞を 96-ウェルプレートに分取した。96-ウェルプレートの 1 ウェルには S-clone SF-O3 メディウム(Sanko Junyaku, Tokyo, Japan)に 1% BSA、マウス SCF (50 ng/mL)、マウス TPO (50 ng/mL)、マウス IL-3 (10 ng/mL)、マウス EPO (1 U/mL; all from PeproTech)を含む培地を 200  $\mu$ L 入れた。分取した細胞は 5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で培養した。培養から 10 日目に、コロニーを形成したウェルを数えるとともに、サイトスピンにより細胞をスライドグラスに接着させ、Hemacolor (MERCK, Darmstadt, Germany)によりスメア染色を行った。

### **骨髄移植**

Lnk<sup>-/-</sup> GFP iPS 細胞由来の造血幹細胞:テラトーマが形成されたマウスの骨髄細胞  $1 \times 10^7$  個を致死量放射線照射(9.5 Gy)した B6 レシピエントマウス 1 匹あたりに移植した。一次移植 12 週目には、レシピエントマウスの骨髄細胞  $1 \times 10^7$  個をさらに他の致死量放射線照射(9.5 Gy)した B6 レシピエントマウスに二次移植した。

GFP iPS 細胞由来の造血幹細胞: 一次移植は Lnk<sup>-/-</sup> GFP iPS 細胞由来の造血幹細胞と同様。二次移植には、レシピエントマウスの骨髄細胞  $1 \times 10^7$  個を移植、骨髄より GFP<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup>KSL 細胞 40 個を分取し初期造血を補助するための B6 マウスの骨髄細胞  $2 \times 10^5$  個と共に移植、さらに、 GFP<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup>KSL 細胞 40 個を 1 週間サイトカイン条件下で培養したものを B6 マウスの骨髄細胞  $2 \times 10^5$  個と共に移植した。

hiPS 細胞由来の造血幹細胞: テラトーマが形成されたマウスの骨髄細胞  $1 \times 10^7$  個(Total 群)あるいは、mCD45<sup>-</sup>hCD45<sup>+</sup>hCD34<sup>+</sup>細胞を 600 個分取し NOD/SCID マウスの骨髄細胞  $2 \times 10^5$  個と共に(Sorted 群)半致死量放射線照射(2 Gy)した NOD/SCID または NOD/SCID/JAK3null マウスに移植した。

## 統計解析

Mean 値は *t* test により算出し比較した。全ての統計解析は Prism 4 software

(Graphpad, San Diego, CA)によって行った。

## 引用文献

Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D.K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T.E., *et al.* (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 10, 64-71.

Bhattacharya, D., Czechowicz, A., Ooi, A.G., Rossi, D.J., Bryder, D., and Weissman, I.L. (2009). Niche recycling through division-independent egress of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 206, 2837-2850.

Bhattacharya, D., Rossi, D.J., Bryder, D., and Weissman, I.L. (2006). Purified hematopoietic stem cell engraftment of rare niches corrects severe lymphoid deficiencies without host conditioning. *J Exp Med* 203, 73-85.

Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., and Vallier, L. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448, 191-195.

Buckley, R.H., Schiff, R.I., Schiff, S.E., Markert, M.L., Williams, L.W., Harville, T.O., Roberts, J.L., and Puck, J.M. (1997). Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *J Pediatr* 130,

378-387.

Burt, R.K., Verda, L., Kim, D.A., Oyama, Y., Luo, K., and Link, C. (2004). Embryonic stem cells as an alternate marrow donor source: engraftment without graft-versus-host disease. *J Exp Med* 199, 895-904.

Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., *et al.* (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-846.

Chan, K.M., Bonde, S., Klump, H., and Zavazava, N. (2008). Hematopoiesis and immunity of HOXB4-transduced embryonic stem cell-derived hematopoietic progenitor cells. *Blood* 111, 2953-2961.

Choi, K.D., Yu, J., Smuga-Otto, K., Salvagiotto, G., Rehrauer, W., Vodyanik, M., Thomson, J., and Slukvin, I. (2009). Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27, 559-567.

Cudennec, C., and Nicolas, J.F. (1977). Blood formation in a clonal cell line of mouse teratocarcinoma. *J Embryol Exp Morphol* 38, 203-210.

Cudennec, C.A., and Johnson, G.R. (1981). Presence of multipotential hemopoietic cells in teratocarcinoma cultures. *J Embryol Exp Morphol* 61, 51-59.

Cudennec, C.A., and Salaun, J. (1979). Definitive red blood cell differentiation in a clonal line of mouse teratocarcinoma cultured in vivo in the chick embryo. *Cell Differ* 8, 75-82.

Czechowicz, A., Kraft, D., Weissman, I.L., and Bhattacharya, D. (2007). Efficient transplantation via antibody-based clearance of hematopoietic stem cell niches. *Science* 318, 1296-1299.

Ema, H., Sudo, K., Seita, J., Matsubara, A., Morita, Y., Osawa, M., Takatsu, K., Takaki, S., and Nakauchi, H. (2005). Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and Lnk-deficient mice. *Dev Cell* 8, 907-914.

Eminli, S., Foudi, A., Stadtfeld, M., Maherali, N., Ahfeldt, T., Mostoslavsky, G., Hock, H., and Hochedlinger, K. (2009). Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 41, 968-976.

Gaspar, H.B., Parsley, K.L., Howe, S., King, D., Gilmour, K.C., Sinclair, J., Brouns, G., Schmidt, M., Von Kalle, C., Barington, T., *et al.* (2004). Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364, 2181-2187.

Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.C., Townes, T.M., and Jaenisch, R. (2007). Treatment of sickle

cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318, 1920-1923.

Helgason, C.D., Sauvageau, G., Lawrence, H.J., Largman, C., and Humphries, R.K. (1996). Overexpression of HOXB4 enhances the hematopoietic potential of embryonic stem cells differentiated in vitro. *Blood* 87, 2740-2749.

Hole, N., Graham, G.J., Menzel, U., and Ansell, J.D. (1996). A limited temporal window for the derivation of multilineage repopulating hematopoietic progenitors during embryonal stem cell differentiation in vitro. *Blood* 88, 1266-1276.

Howe, S.J., Mansour, M.R., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C., Hubank, M., Kempski, H., Brugman, M.H., Pike-Overzet, K., Chatters, S.J., de Ridder, D., *et al.* (2008). Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 118, 3143-3150.

Huynh, H., Iizuka, S., Kaba, M., Kirak, O., Zheng, J., Lodish, H.F., and Zhang, C.C. (2008). Insulin-like growth factor-binding protein 2 secreted by a tumorigenic cell line supports ex vivo expansion of mouse hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 26, 1628-1635.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I., *et al.* Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467,

285-290.

Kyba, M., Perlingeiro, R.C., and Daley, G.Q. (2002). HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* *109*, 29-37.

Li, W., Johnson, S.A., Shelley, W.C., and Yoder, M.C. (2004). Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells. *Exp Hematol* *32*, 1226-1237.

Li, Z., Huang, H., Boland, P., Dominguez, M.G., Burfeind, P., Lai, K.M., Lin, H.C., Gale, N.W., Daly, C., Auerbach, W., *et al.* (2009). Embryonic stem cell tumor model reveals role of vascular endothelial receptor tyrosine phosphatase in regulating Tie2 pathway in tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 22399-22404.

Matsumoto, K., Isagawa, T., Nishimura, T., Ogaeri, T., Eto, K., Miyazaki, S., Miyazaki, J., Aburatani, H., Nakauchi, H., and Ema, H. (2009). Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. *PLoS One* *4*, e4820.

McKinney-Freeman, S.L., Naveiras, O., Yates, F., Loewer, S., Philitas, M., Curran, M., Park, P.J., and Daley, G.Q. (2009). Surface antigen phenotypes of hematopoietic stem cells from embryos and murine embryonic stem cells. *Blood* *114*, 268-278.

Nagy, Z.P., Dozortsev, D., Diamond, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Abdelmassih, R., and

Greco, E. (2003). Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. *Fertil Steril* 80, 67-74.

Okabe, M., Otsu, M., Ahn, D.H., Kobayashi, T., Morita, Y., Wakiyama, Y., Onodera, M., Eto, K., Ema, H., and Nakauchi, H. (2009). Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood* 114, 1764-1767.

Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.

Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242-245.

Pilat, S., Carotta, S., Schiedlmeier, B., Kamino, K., Mairhofer, A., Will, E., Modlich, U., Steinlein, P., Ostertag, W., Baum, C., *et al.* (2005). HOXB4 enforces equivalent fates of ES-cell-derived and adult hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12101-12106.

Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalart, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., *et al.* Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 28, 848-855.

Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Eaves, C.J., Lawrence, H.J., Largman, C., Lansdorp, P.M., and Humphries, R.K. (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev* 9, 1753-1765.

Seita, J., Ema, H., Ooehara, J., Yamazaki, S., Tadokoro, Y., Yamasaki, A., Eto, K., Takaki, S., Takatsu, K., and Nakauchi, H. (2007). Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2349-2354.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

Takaki, S., Morita, H., Tezuka, Y., and Takatsu, K. (2002). Enhanced hematopoiesis by hematopoietic progenitor cells lacking intracellular adaptor protein, Lnk. *J Exp Med* 195, 151-160.

Takano, H., Ema, H., Sudo, K., and Nakauchi, H. (2004). Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. *J Exp Med* 199, 295-302.

Takayama, N., Nishimura, S., Nakamura, S., Shimizu, T., Ohnishi, R., Endo, H., Yamaguchi, T., Otsu, M., Nishimura, K., Nakanishi, M., *et al.* Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced

pluripotent stem cells. *J Exp Med*.

Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448, 196-199.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

Wagers, A.J., Sherwood, R.I., Christensen, J.L., and Weissman, I.L. (2002). Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297, 2256-2259.

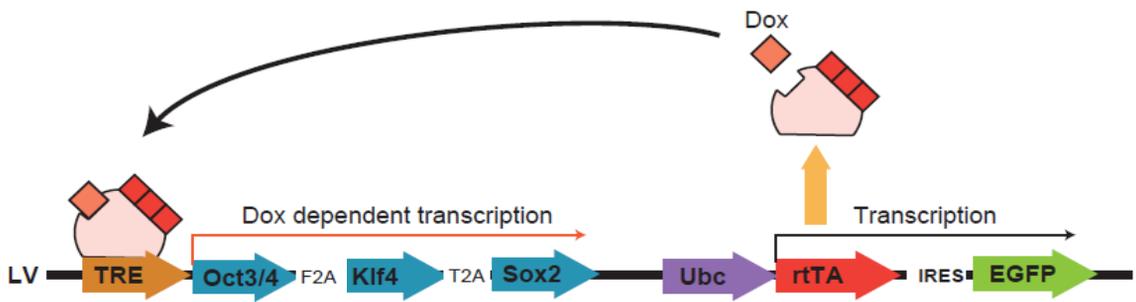
Watarai, H., Fujii, S.I., Yamada, D., Rybouchkin, A., Sakata, S., Nagata, Y., Iida-Kobayashi, M., Sekine-Kondo, E., Shimizu, K., Shozaki, Y., *et al.* Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. *J Clin Invest*.

Zhang, C.C., and Lodish, H.F. (2005). Murine hematopoietic stem cells change their surface phenotype during ex vivo expansion. *Blood* 105, 4314-4320.

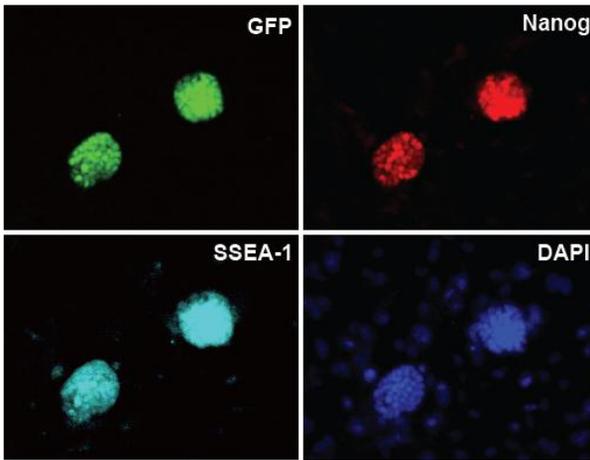
Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., *et al.* (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control

of the niche size. *Nature* 425, 836-841.

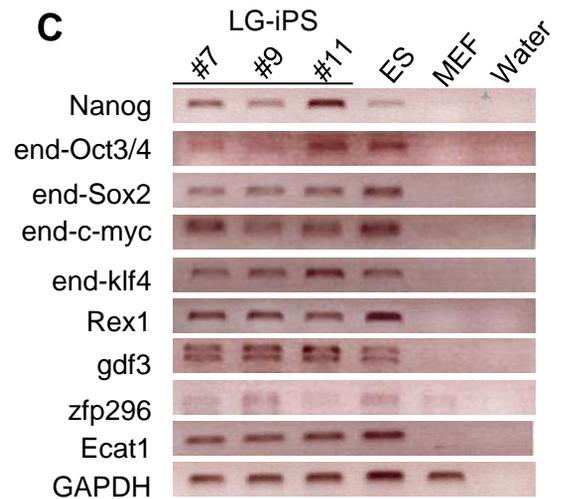
☒  
A



B



C



D



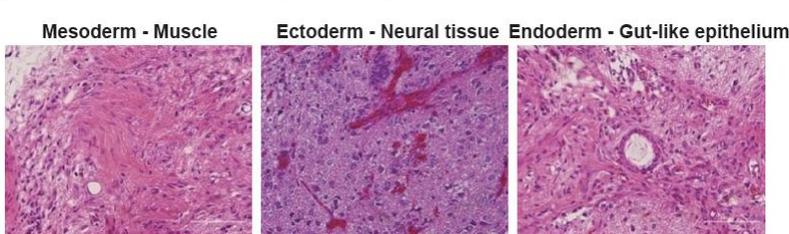
E



G



F



### 図1-1. $Lnk^{-/-}$ GFP (LG-)iPS細胞の特徴

(A) LG-iPS細胞樹立に使用したレンチウイルスベクターの構造。1種類のウイルス感染によりテトラサイクリン依存的に3因子(Oct3/4, Klf4, Sox2)を発現させるため、rtTAの発現をUbcプロモーター下で、3因子の発現をTREプロモーター下で行った。(B) 樹立したiPS細胞のGFP蛍光とESマーカー (Nanog, SSEA-1)の免疫染色。(C) Gapdhの転写産物を内部標準とした半定量的RT-PCRによるESマーカーの発現解析。(D) テラトーマを形成したヌードマウス。(E) テラトーマ。スケールバーは1.25cmを示す。(F) 形成されたテラトーマの組織学的解析。(G) キメラ形成能の確認。

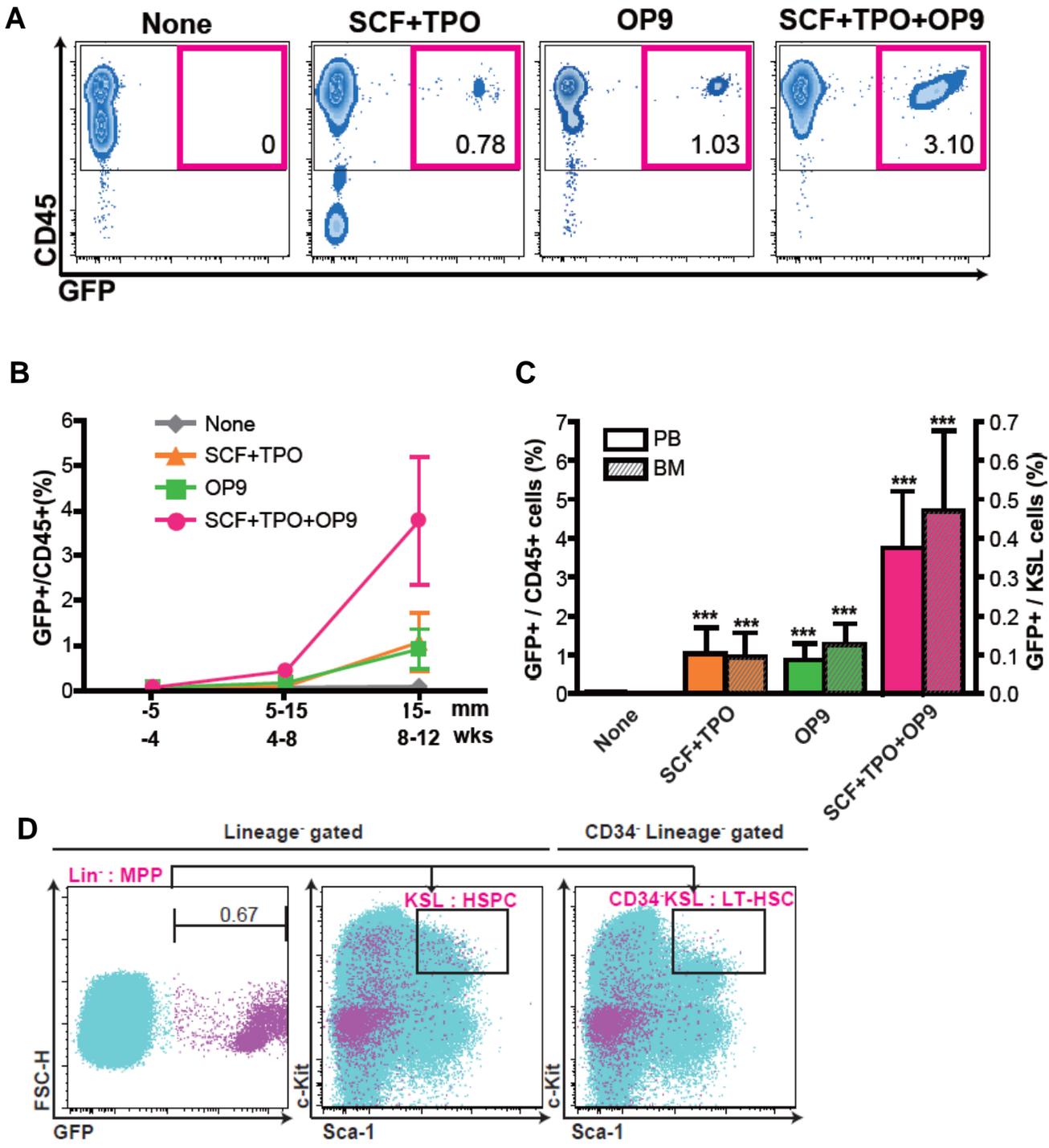


図1-2. LG-iPS細胞を用いた造血幹細胞の誘導及び条件検討

(A) iPS細胞注入から12週目の各群におけるテラトーマが形成されたマウスの末梢血のFACS解析。(B) 末梢血中のGFP+/CD45+細胞の頻度と経時的変化。(C) 左y軸: iPS細胞注入から12週目の各群における末梢血中のGFP+/CD45+細胞の頻度。右y軸: 同時期の骨髄中におけるGFP+/KSL細胞の頻度。(各群 n=5, エラーバーはSEMを示す。\*\*\*はp<0.001)

(D) 条件4群(サイトカイン+OP9細胞群)のマウスにおける12週目の骨髄細胞のFACS解析。

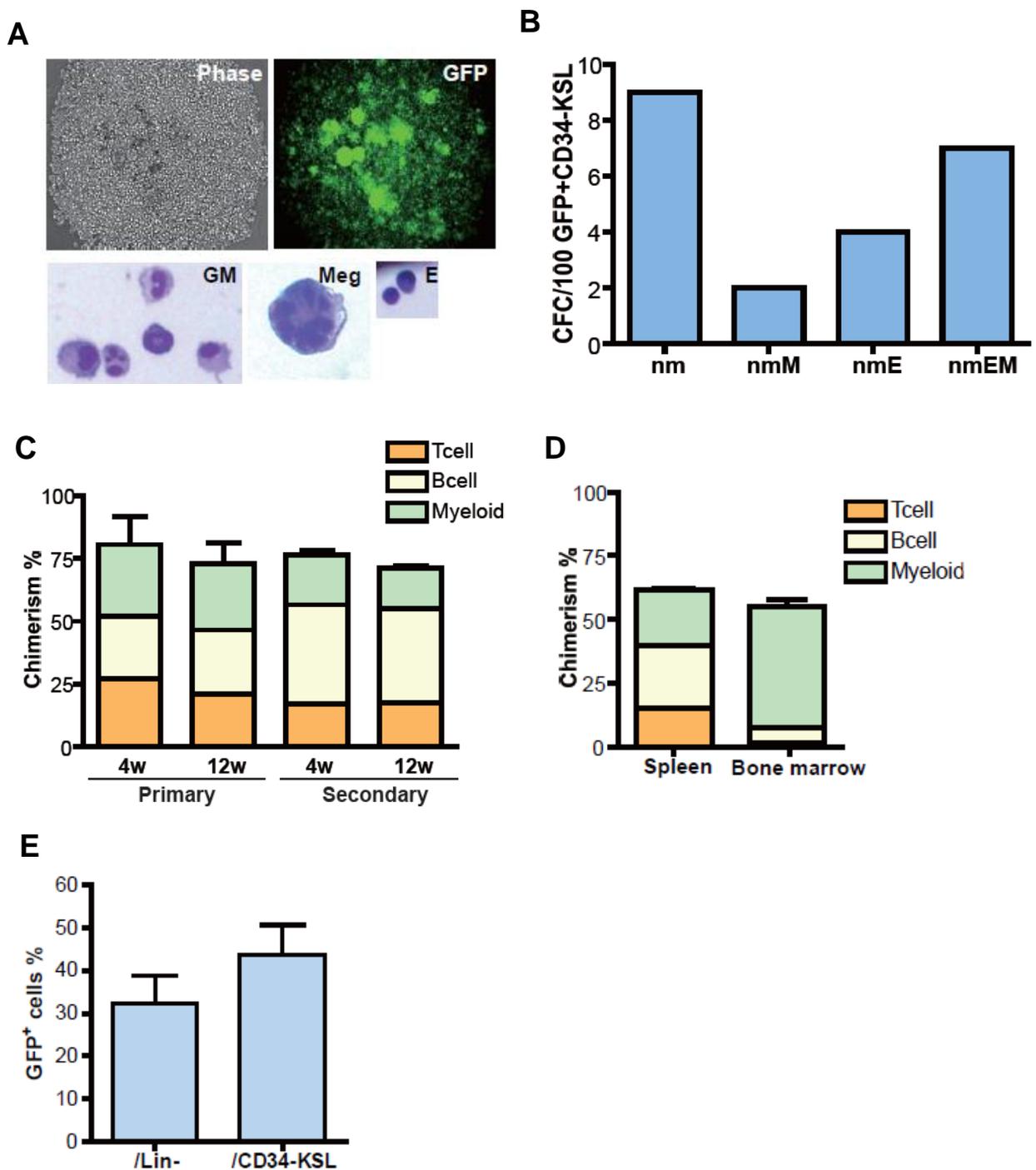
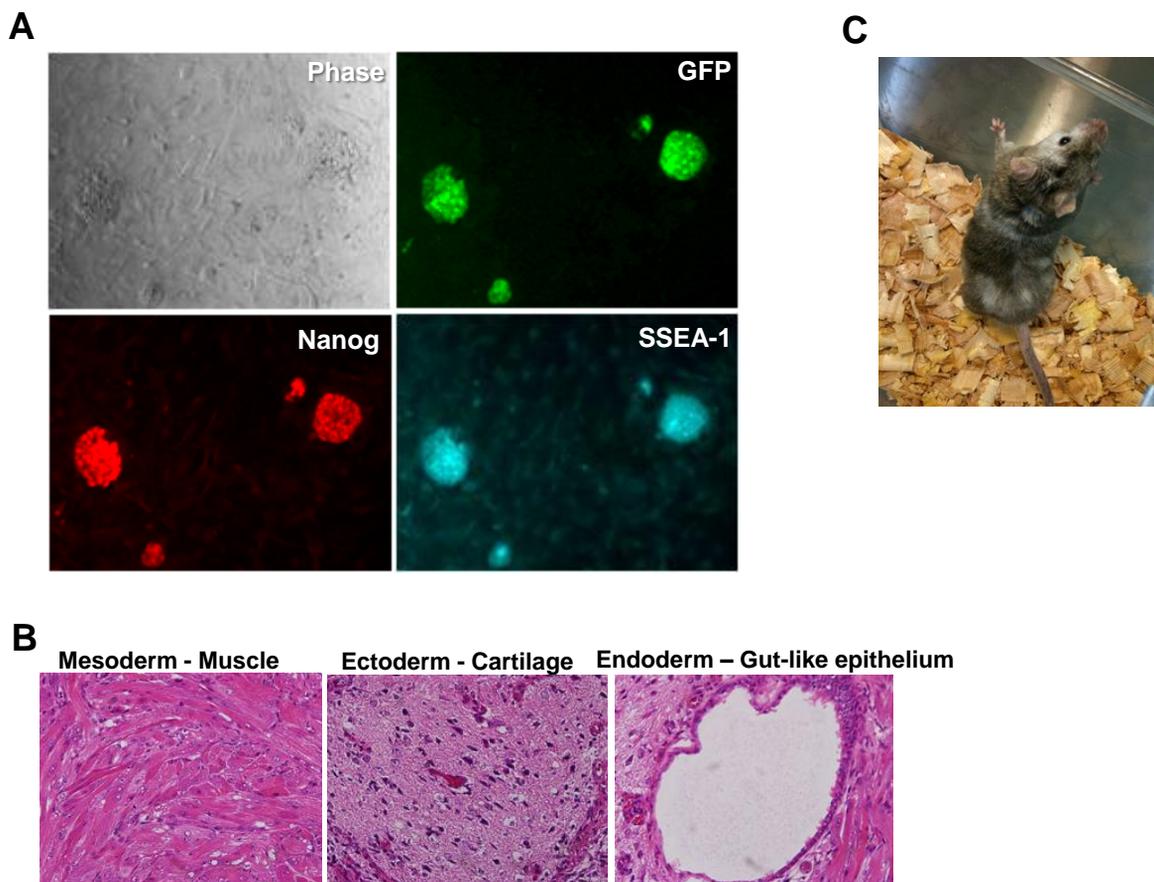


図1-3.  $Lnk^{-/-}$  GFP iPS細胞から誘導された造血幹細胞の機能解析

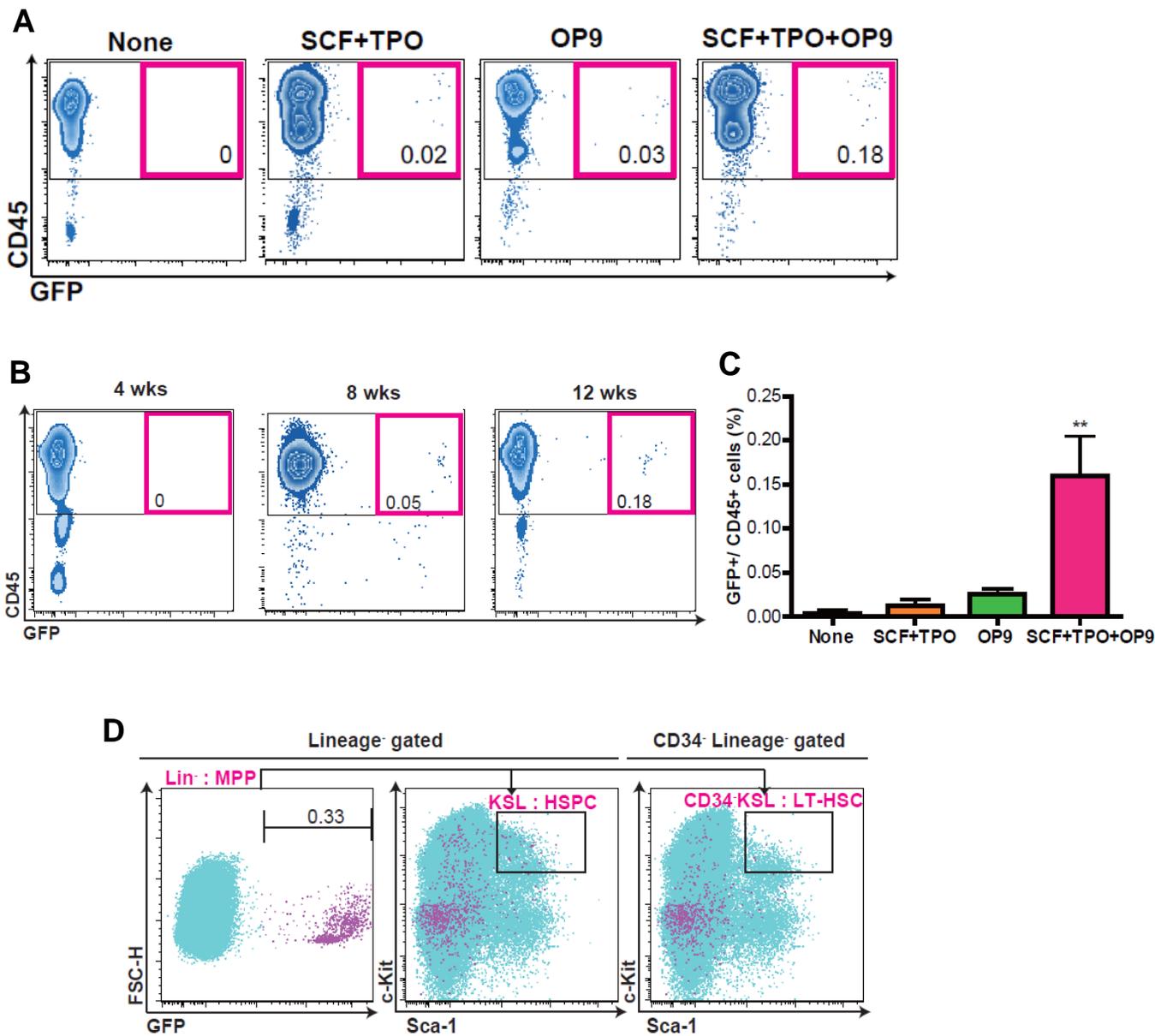
(A, B)  $Lnk^{-/-}$  GFP iPS細胞由来のGFP<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> KSL細胞のSingle cell colony assay (A) 得られたコロニー及びギムザ染色。GMは顆粒球、マクロファージ、Megは巨核球、Eは赤芽球を示す。(B) 100細胞あたりのコロニーの内容。n, m, E, Mは各々、好中球、マクロファージ、赤芽球、巨核球を示す。(C-E) 骨髄移植による骨髄再建能の評価。(一次n=4, 二次n=10) (C)レシピエントマウスの末梢血におけるGFP<sup>+</sup>細胞のキメリズム。(D) 一次移植12週目のレシピエントマウスの脾臓、骨髄におけるGFP<sup>+</sup>細胞のキメリズム。(E) 一次移植12週目のレシピエントマウス骨髄における造血幹前駆細胞中のGFP<sup>+</sup>細胞の頻度。



### 図2-1. GFP (G-)iPS細胞の特徴

(A) 樹立したiPS細胞のGFP蛍光とESマーカー(Nanog, SSEA-1)の免疫染色。

(B) 形成されたテラトーマの組織学的解析。 (C) キメラ形成能の確認。



## 図2-2. G- iPS細胞を用いた造血幹細胞の誘導

(A) iPS細胞注入から12週目の各群におけるテラトーマが形成されたマウスの末梢血FACS解析。(B) 条件4群(サイトカイン+OP9細胞群)のマウスの末梢血中におけるGFP+/CD45+細胞の経時的変化。(C) iPS細胞注入から12週目の各群における末梢血中のGFP+/CD45+細胞の頻度。各群 n=4, エラーバーはSDを示す。\*\*はp<0.01) (D) 条件4群のマウスにおける12週目の骨髄細胞のFACS解析。

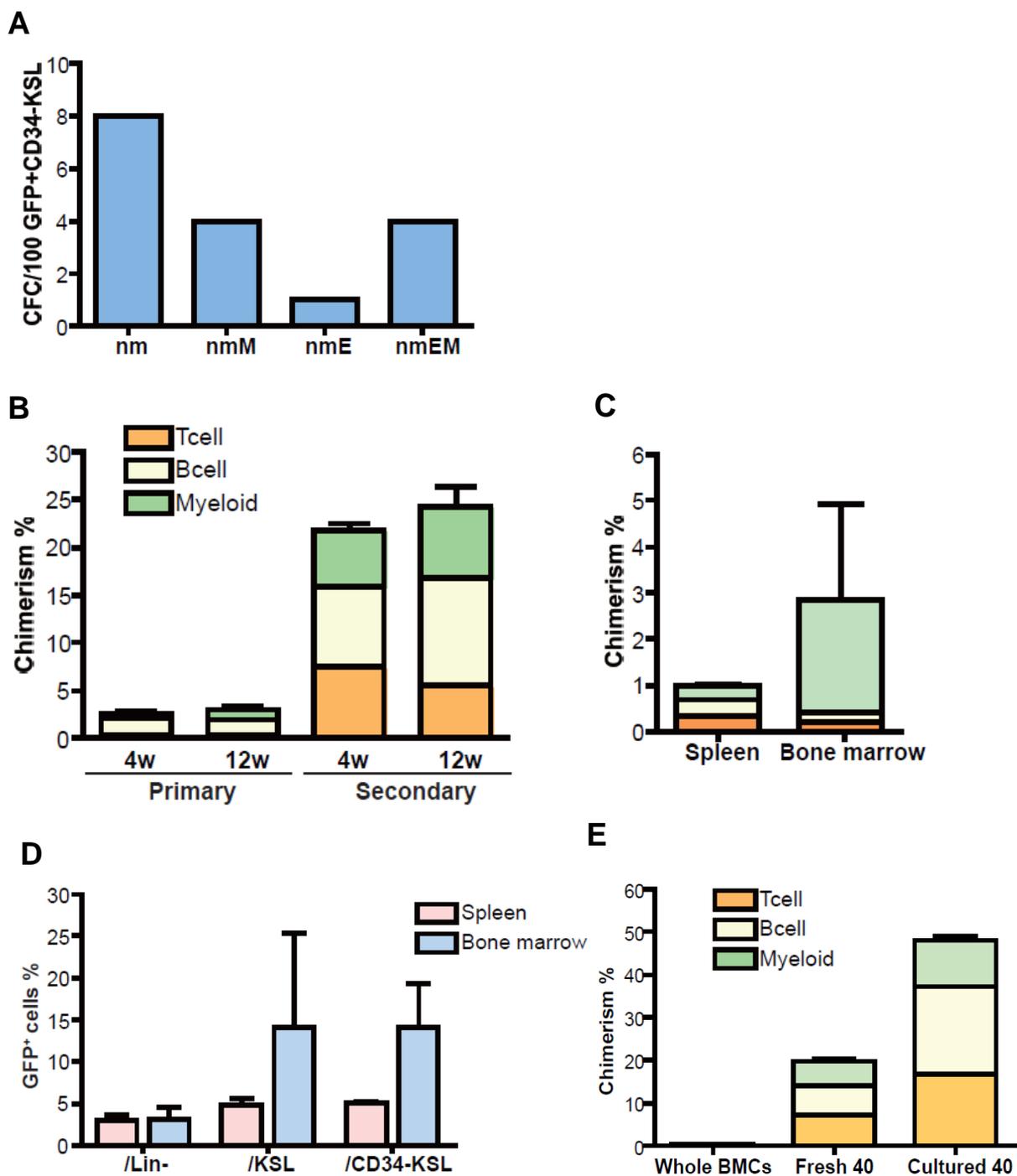


図2-3. G- iPS細胞から誘導された造血幹細胞の機能解析

(A)G-iPS細胞由来GFP<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KSL細胞のSingle cell colony assayにおける100細胞あたりのコロニーの内容。n, m, E, Mは各々、好中球、マクロファージ、赤芽球、巨核球を示す。(B-E) 骨髄移植による骨髄再建能の評価 (一次n=6, 二次n=5) (B) レシピエントマウスの末梢血キメリズム。二次移植の結果は40個分取して移植したキメリズムを示す。(C) 一次移植12週目のレシピエントマウスの脾臓、骨髄におけるキメリズム。(D) 同時期のレシピエントマウス骨髄における造血幹前駆細胞中のGFP<sup>+</sup>細胞の頻度。(E)二次移植4週目における各移植群のキメリズム。

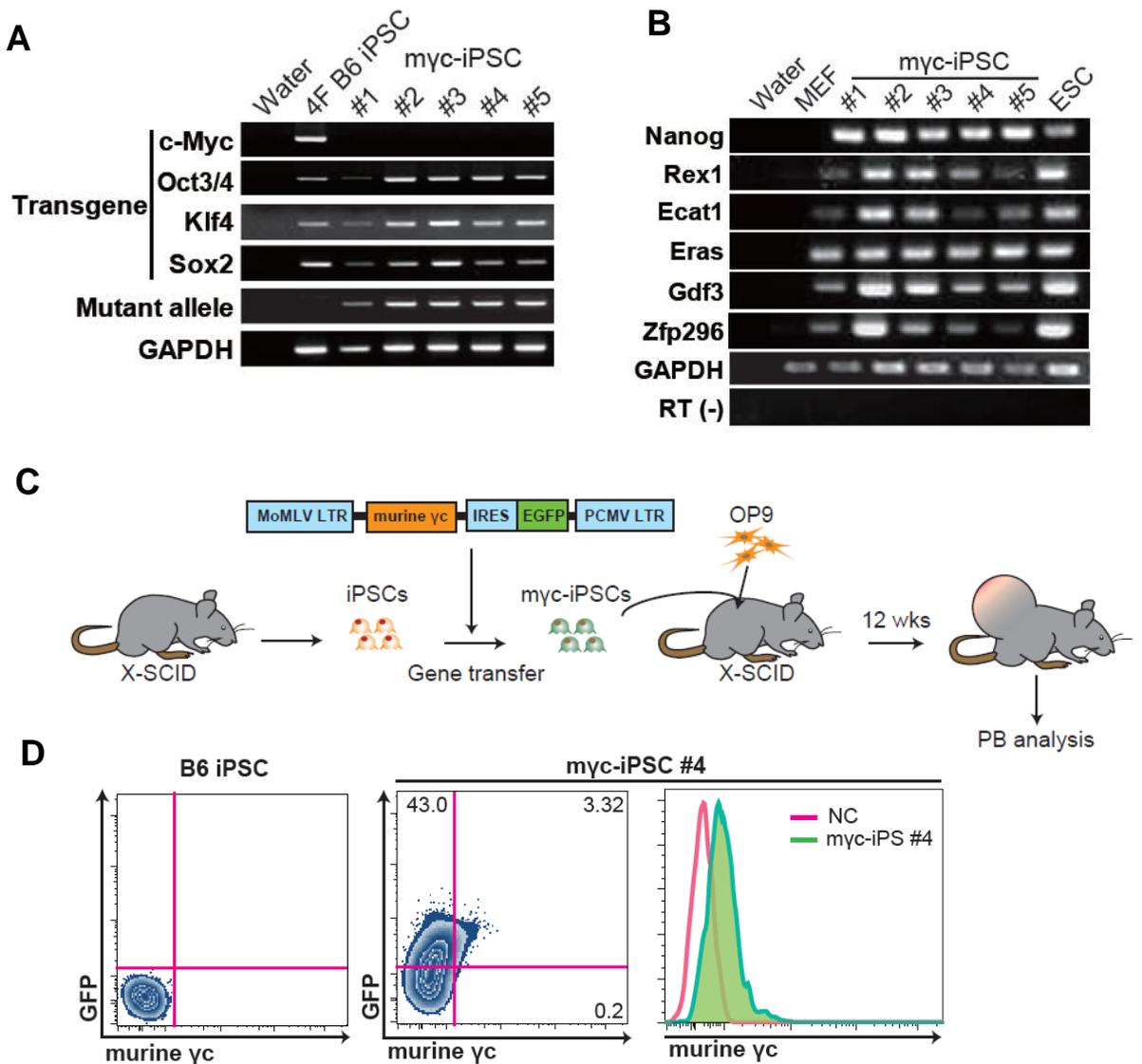


図3-1. X-SCIDマウスからのiPS細胞樹立と遺伝子導入

(A) X-SCIDマウスから樹立したiPS細胞のゲノミックPCRによる3因子(Oct3/4, Klf4, Sox2)の導入及び $\gamma$ 鎖遺伝子変異の確認。比較対照として、Water、4F B6 iPS (4因子によりB6マウスから樹立したiPS細胞)を置いた。(B) Gapdhの転写産物を内部標準としたESマーカー遺伝子の発現解析。比較対照として、Water、MEF (マウス胎仔繊維芽細胞)、ESCを置いた。(C) 遺伝子治療モデルの戦略及び導入ウイルスベクターの構造。X-SCIDマウスから樹立したiPS細胞に、レトロウイルスを用いて正常なmurine  $\gamma$ 鎖遺伝子を導入してmyc-iPS細胞を作製。これをX-SCIDマウスにOP9細胞と共に注入することでテラトーマを形成させ、X-SCIDマウスの末梢血中にリンパ球が形成されるかを確認する。(D) FACSを用いたmyc-iPS細胞におけるGFPおよび $\gamma$ 鎖遺伝子の発現解析。陰性対照はB6マウス由来のiPS細胞。

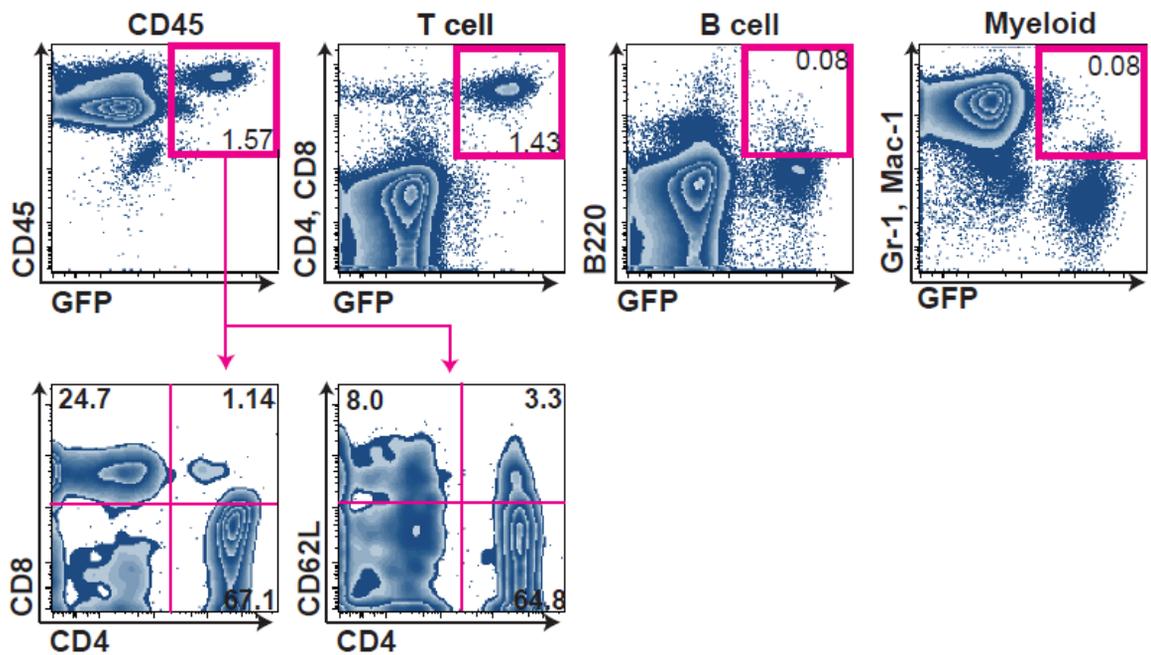
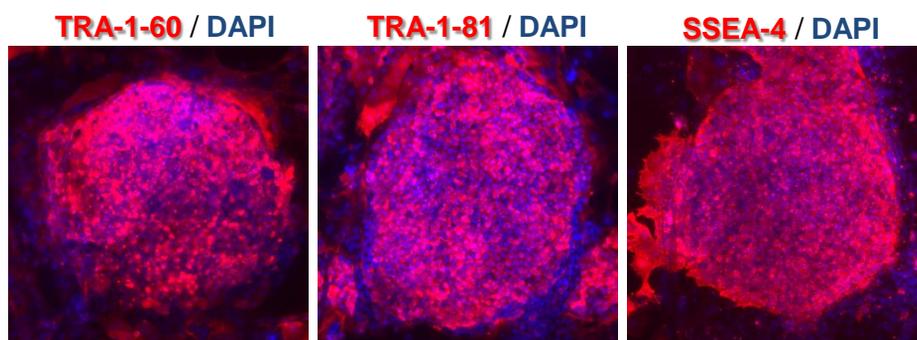


図3-2. myc-iPS細胞を用いたX-SCIDマウスの治療モデルの構築

myc-iPS細胞由来のテラトーマが形成されたX-SCIDマウスの末梢血FACS解析 (iPS細胞注入より12週目)。CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> およびCD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> 細胞は成熟T細胞をCD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>細胞はナイーブT細胞を示す。



#### 図4-1. hiPS細胞の特徴

免疫染色による、樹立したhiPS細胞におけるhES細胞マーカー (TRA-1-60、TRA-1-81、SSEA-4)の発現解析。

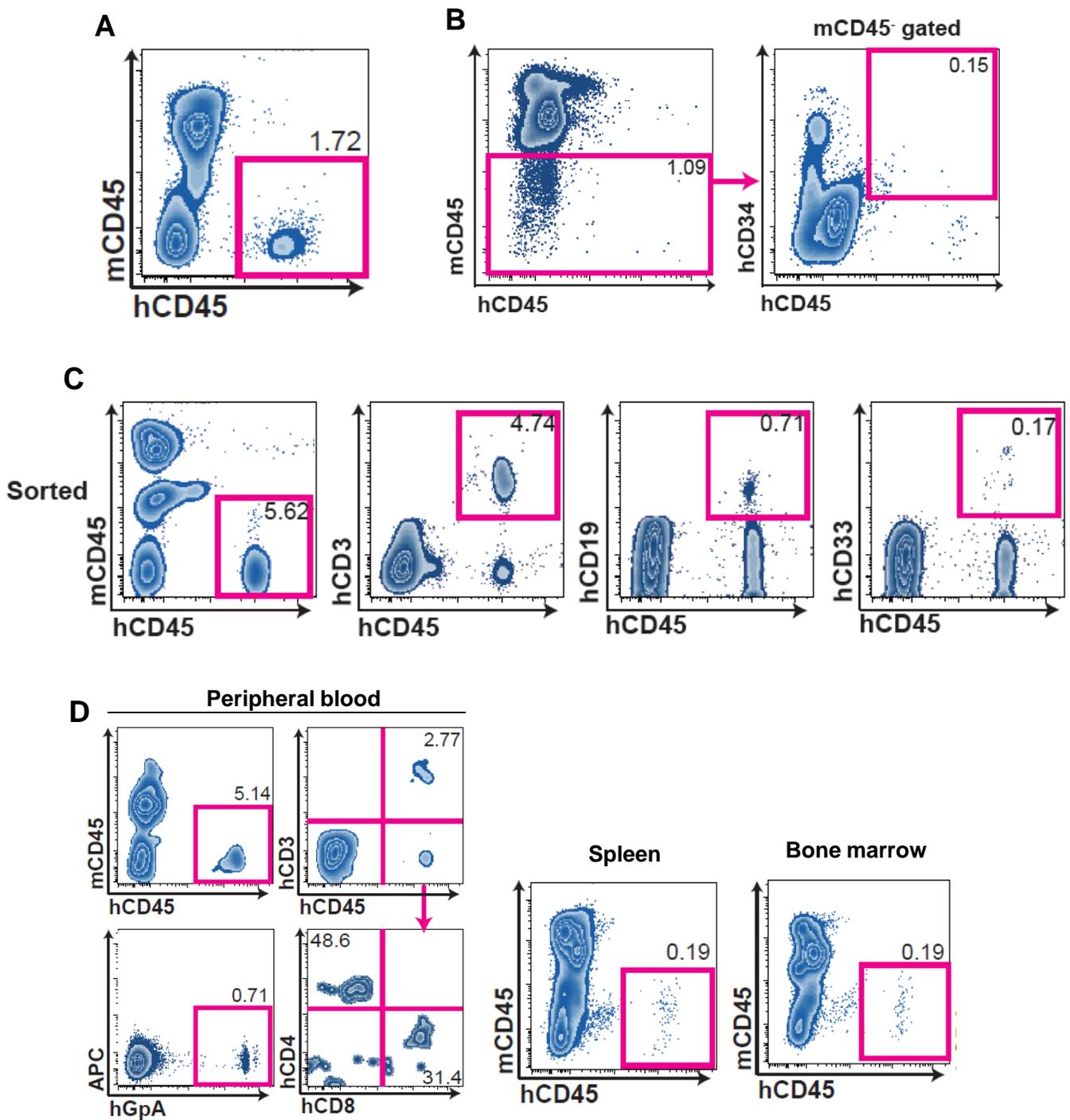


図4-2. テラトーマ形成を介したhiPS細胞からの機能的な造血幹細胞の誘導

(A) テラトーマが形成されたマウスの末梢血FACS解析。(B)テラトーマが形成されたマウスの骨髄FACS解析。(C) 骨髄移植8週目のレシピエントマウスの末梢血キメリズム (Sorted群)。(D) 骨髄移植12週目の末梢血・脾臓・骨髄のキメリズム。

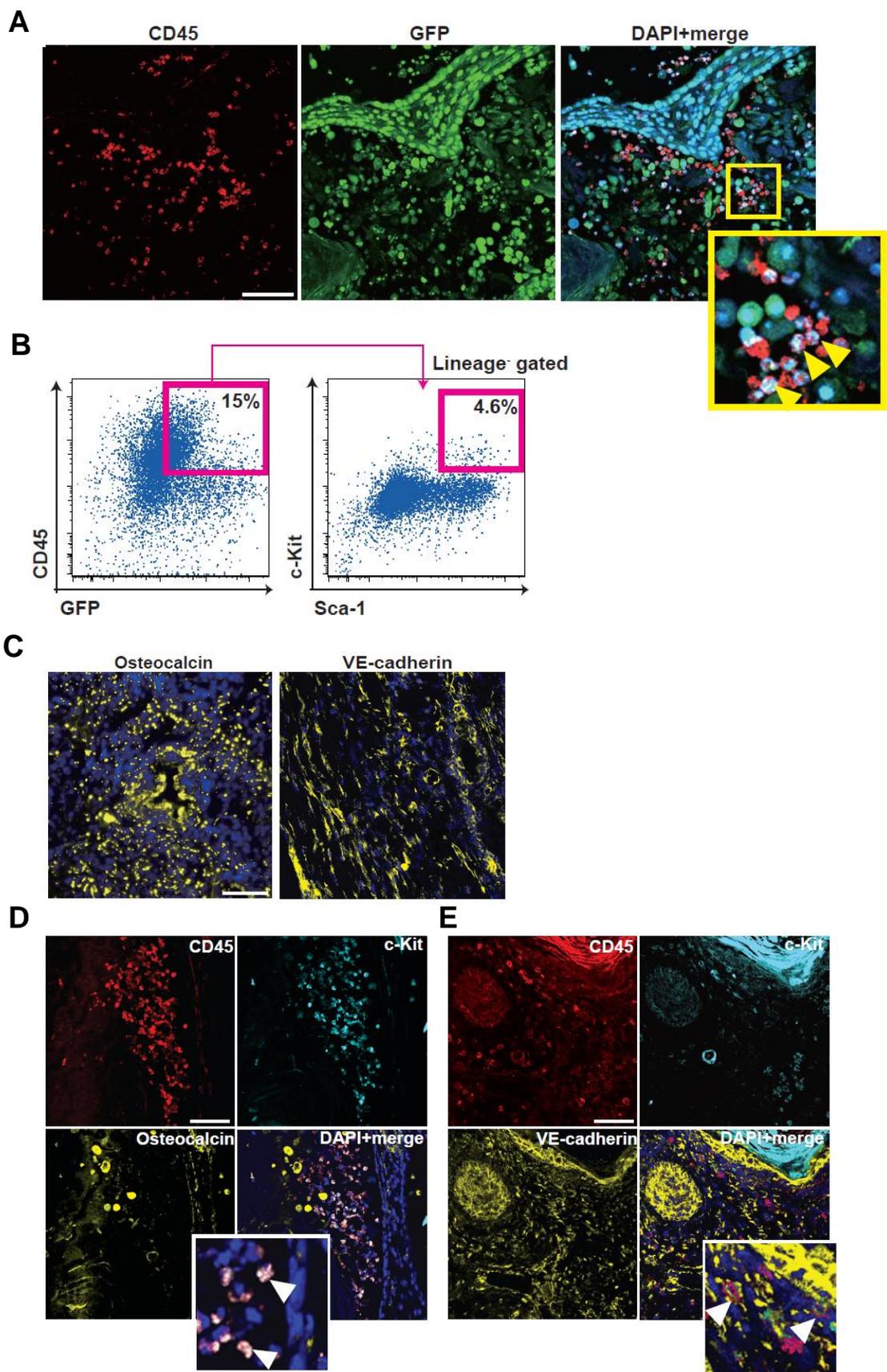
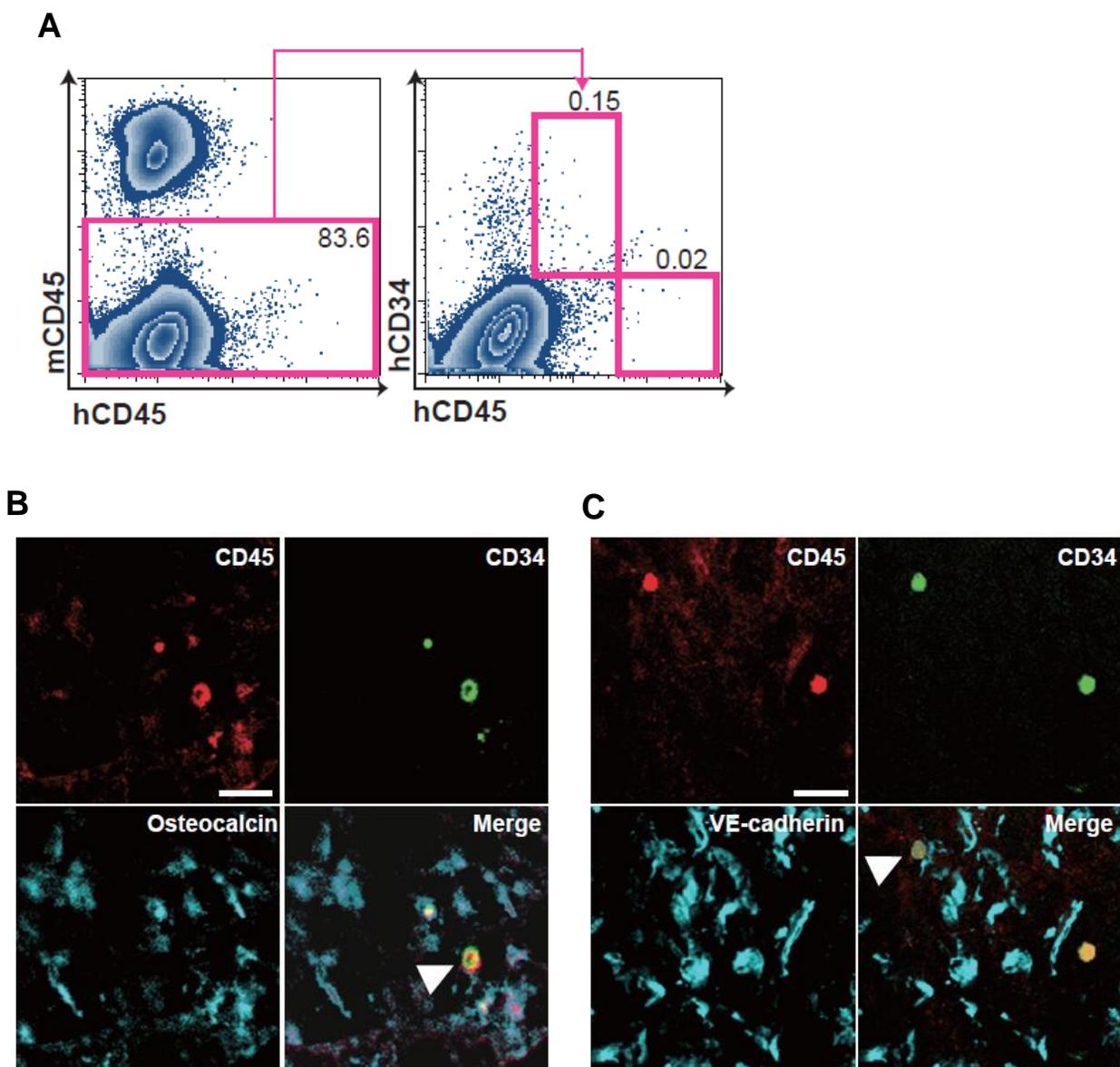


図5-1. miPS細胞由来のテラトーマ組織の解析

(A) テラトーマ組織におけるCD45免疫染色とGFP蛍光。矢印はGFP<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> 細胞を示す。(B)テラトーマを構成する細胞のFACS解析。(C) テラトーマ組織における造血幹細胞nicheの免疫染色。(D, E) 造血幹細胞とniche細胞の局在。骨芽細胞(D)、血管内皮細胞(E)。矢印はCD45<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup> 細胞を示す。スケールバーは全て75 $\mu$ m。



**図5-2. hiPS細胞由来のテラトーマ組織の解析**

(A) テラトーマを構成する細胞のFACS解析。(B, C) テラトーマ組織における造血幹細胞とniche細胞の局在。骨芽細胞(B)、血管内皮細胞(C)。矢印はhCD45<sup>+</sup> hCD34<sup>+</sup> 細胞を示す。スケールバーは30 $\mu$ m。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教官として本研究の実施の機会を与えて頂き、その遂行にあたって終始ご指導を賜りました、東京大学 医科学研究所 幹細胞治療研究部門 中内啓光教授に心より感謝申し上げます。

本研究全般に渡り入学当初よりご指導頂いた JST ERATO 中内幹細胞制御プロジェクト 山崎聡氏、並びに本研究第 1 章の実験でベクターを開発して頂いた山口智之博士、第 4 章の実験で細胞樹立をして頂いた正木英樹博士、第 3 章の実験で細胞樹立および遺伝子治療モデルの構築をして頂いた幹細胞治療研究部門 大津真先生、岡部基人氏に深く感謝の意を表します。

また、論文をまとめるにあたり貴重なご意見を賜りました依馬秀夫先生、葛西正孝先生、実験を遂行する上でご協力頂きました石井有実子氏、投稿論文の作成にご協力頂きました Stephanie Napier 氏、そして幹細胞治療研究部門および JST ERATO 中内幹細胞制御プロジェクトの皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、大学院進学を支持し応援してくれた家族に心からの謝意を記します。

2011 年 3 月

鈴木 奈穂