

博士論文

ヒト多能性幹細胞を用いた赤血球分化モデルの構築

越智 清純

目次

1. はじめに	P2
2. ヒト多能性幹細胞におけるグロビン蛋白発現機序の解析	P2
2-1. 要旨	P2
2-2. 序文	P3
2-3. 方法	P7
2-4. 結果	P13
2-5. 考察	P21
3. ヒト多能性幹細胞由来不死化赤芽球株を用いた 赤芽球分化モデルの構築	P26
3-1. 要旨	P26
3-2. 序文	P26
3-3. 方法	P28
3-4. 結果	P31
3-5. 考察	P37
4. 参考文献	P42
5. 謝辞	P46
6. 図表	P46

1. はじめに

ヒト胚性幹(Embryonic stem, ES)細胞ならびにヒト人工多能性幹(induced pluripotent stem, iPS)細胞は適切な培養条件下で様々な細胞へと分化させることができる多能性、遺伝子操作の容易さ、再現性やリソースとしての豊富さからヒト造血発生研究においても有用なツールと考えられる。さらに、これらを移植ソースとして用いた細胞移植療法への活用も期待されている。私は、これらの多能性幹細胞から誘導された赤芽球を用いて、ヘモグロビン発現解析に有用な解析法を確立し、さらには大量に赤血球を供給できる赤芽球の細胞株化を成功させ、赤血球の分化モデルの構築を行った。

2. ヒト多能性幹細胞におけるグロビン蛋白発現機序の解析

2-1. 要旨

ヒトヘモグロビンの構成蛋白である β 様グロビン蛋白の発現は、発生学的に胚型から胎児型、さらに成人型へとその発現が切り替わっていくことが知られ、“グロビンスイッチング”と呼ばれる。しかしながら、ヒト胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞由来赤芽球においては、このスイッチングが未熟な段階で止まっていることが多数報告されている。

そこで、私はフローサイトメーターを用いて単一細胞における各グロビン発

現を同時に観察できる系を新たに開発、応用することで、グロビンスイッチングが未熟な原因を明らかにした。

2-2. 序文

輸血は現代医療において非常に重要な治療法の一つと考えられる。しかしながら、現在の輸血システムでは、その血液製剤のほとんどが健常者ドナーからの献血に依存している。近年、日本を始めとする先進諸国においても少子高齢化の進展や若年者の献血への関心の低下により、その供給において不安を抱えているのも事実である。そのため、将来における輸血製剤の安全性の保証と安定供給は国際的な関心事となっている。

この問題を克服するために、ドナーに依存せずに血液製剤が供給できるようなシステムとしてヒト臍帯血由来造血幹細胞[1]やヒトES細胞及びヒトiPS細胞[2]のような細胞ソースから培養赤血球を産生し、赤血球製剤としての利用が試みられている。とくに、近年、山中らにより作製されたヒトiPS細胞[3]はヒトES細胞と比べて大きな利点を持つ。ヒトiPS細胞はその樹立されたドナー細胞の遺伝情報を保持しているため、O型Rh(D)陰性血液型ドナーからヒトiPS細胞を樹立することで、これらから産生された赤血球は理論上、ほぼ全てのすべての患者へ供給することが可能となる。さらにD-, Fy(a-b-), Di(b-), Jr(a-)といった稀少な血

液型、いわゆるまれ血(稀血)[4]に関しても、これらの血液型の登録ドナーは、年々高齢化しドナープールは減少しつつあることが危惧されているが、同様にヒトiPS細胞を樹立することが可能である。しかし、実用化に向けての問題点として、ヒトiPS細胞はその樹立元の細胞や樹立方法、さらに、分化方法等によって得られる赤芽球／赤血球の性質が異なることが知られている。とくに赤血球の酸素運搬能を担うヘモグロビンの構成蛋白であるグロビン蛋白発現様式は、クローン間や分化方法により大きく異なる。そのため、将来、ヒトiPS細胞由来赤血球を輸血製剤として用いるためには、分化能の高いクローンを選別する方法、ならびにこれらの赤芽球におけるグロビン蛋白の発現を詳細に評価できる方法を開発することが重要である。

ヘモグロビンとは赤血球中に存在し、酸素と結合し酸素運搬体として機能することで、肺から末梢組織への酸素運搬を担っている。ヘモグロビンは、ヘムとグロビン蛋白が結合して構成されており、そのグロビン蛋白は141個のアミノ酸より構成される2本の α 様グロビン(α 鎖グロビン)と、146個のアミノ酸より構成される2本の β 様グロビン(β 鎖グロビン)からなる四量体を形成している。とくに β 様グロビンをコードする遺伝子座は、ヒト11番染色体上に存在し、 β グロビン遺伝子座(β -like globin gene cluster)と呼ばれている。この遺伝子座には70kbという広範囲に広がり、そこには β 様グロビン遺伝子($\epsilon, G\gamma, A\gamma, \delta, \beta$)とそれ

らの発現調節に関係する遺伝子が集積している。これらの β 様グロビン遺伝子は 5'側から 3'側へ順番に配列されている。このうち ϵ グロビン(HBE1 遺伝子)は妊娠初期胚の卵黄嚢由来造血由来赤芽球において、 $G\gamma$ 及び $A\gamma$ (γ グロビン, HBG1 遺伝子及び HBG2 遺伝子)は妊娠中期・後期の胎児肝・脾造血由来赤芽球／赤血球において、そして β グロビン(HBB 遺伝子)は出生後の骨髄造血幹細胞由来赤芽球／赤血球において転写・発現している。また、これらの遺伝子の 5'上流領域には遺伝子制御領域(Locus control region, LCR)と呼ばれる配列が存在し、これら β 様グロビン遺伝子の発現を調節・制御していることが知られている。これらのグロビンは、それぞれ酸素との親和性が異なることが知られており、とくに未熟な段階のグロビン蛋白において酸素との結合力が強い(酸素との親和性: $\epsilon > A\gamma, G\gamma > \beta, \delta$)。このことは、各発生段階に応じた遺伝子が発現することで、成長過程の個体が置かれた酸素要求度に対応していると考えられている。このようにグロビンの発現が変化していく現象は、グロビンスイッチング(globin switching)と呼ばれている。

これらのグロビン遺伝子の発現様式は赤血球における発生段階また分化段階を知る重要な指標と考えられる。従来報告では、ヒト ES 細胞及びヒト iPS 細胞由来赤芽球では、 ϵ グロビン及び γ グロビンの発現が主体であり、 β グロビンの発現はほとんど認められないことから、これらの細胞は発生学的にも未熟な

段階の赤芽球と考えられている[5]。しかしながら、このグロビンスイッチングがなぜヒト ES/iPS 細胞由来赤芽球において完全に起こらず、未熟なままで留まっているのかについてはまだ不明な点が多い[6,7,8,9,10,11,12,13,14]。この不明な点が多い理由として、従来までのバルク解析による遺伝子発現解析では、個々の細胞におけるグロビン発現を解析することが出来ず、詳細な検討が出来なかったことにあると考えた。

そこで、私はヒト ES/iPS 細胞由来赤芽球におけるグロビン発現を正確に解析するために、ヒト ES/iPS 細胞由来 CD34 陽性細胞と臍帯血 CD34 陽性細胞(コントロール)を用い、これらを同様の分化方法で赤芽球へ分化させ両者のグロビン発現の比較を行った。さらに解析手法として、従来のバルク解析による遺伝子発現解析に加え、これらの細胞の固定・浸透方法を最適化した上で、それぞれのグロビン蛋白を異なる蛍光標識抗体を用いて多重染色を用い、フローサイトメーターを用いて解析することでこれまで観察が困難であった単一細胞レベルでのグロビン発現解析を可能とした。この方法を用いて、ヒト ES/iPS 細胞由来赤芽球におけるグロビン発現様式を明らかにし、さらに、分子生物学的な介入を行うことで、ヒト臍帯血由来赤芽球及びヒト成人末梢血赤血球と同様のグロビン発現を持つ赤血球を産生することを目標とし研究を行った。

2-3. 方法

2-3-1. 細胞株と試薬

試薬は、別記したものを除きSigma-Aldrich社より購入した。ヒトES細胞KhES-3株は文部科学省の審査・承諾を得た上で、京都大学再生医科学研究所 末盛博文先生よりご提供頂いた。またヒトES細胞H1株については、WiCell社(Madison, WI)より提供されたものを京都大学 iPS細胞研究所 中畑龍俊先生よりご提供頂いた。ヒト検体を用いた実験を含むこれら全ての実験はヘルシンキ宣言における研究倫理規範を順守した上で施行した。

ヒトiPS細胞は4つの転写因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC)を組み込んだセンダイウイルス[15]を用いて樹立された。ヒトiPS細胞#1株及び#2株はヒト新生児真皮線維芽細胞(Lonzaより購入)より、ヒトiPS細胞#3株-#6株はヒト臍帯血CD34陽性細胞(Lonzaより購入)より、ヒトiPS細胞#7株及び#8株はヒト成人末梢血有核細胞より樹立された。これらの多能性幹細胞株の培養維持は過去の報告に従った[16,17,18]。マウス間葉系細胞株C3H10T1/2細胞(C3H10T1/2 cell line)の培養方法は過去の報告に従った[16,17,18]。

2-3-2. ヒトES/iPS細胞からのサック形成を用いた赤芽球分化

ヒトES細胞からの血液前駆細胞への分化誘導方法は、過去の報告に従った

[16,17,18]。フィーダー細胞として用いたマウス間葉系細胞株C3H10T1/2細胞は、事前にマイトマイシンC(mitomycin C)処理を行ったものを用いた。トリプシン溶液(0.25 % トリプシン, 1 mM 塩化カルシウム, 20 % knock-out serum replacementを含むPBS溶液)にて処理されたヒトES細胞(約100個程度の細胞塊)はC3H10T1/2細胞上(細胞 : 8.0×10^5 個/100mm dish)へ播種され、20 ng/mL VEGF (血管内皮細胞増殖因子 vascular endothelial growth factor)を含む分化培地にて14日間培養を行った(分化第-14日目～分化第0日目)。培地は原則3日ごとに交換を行った。第0日目に、形成されたヒトES-sacはピペットにて軽く懸濁を行いながら50 mLチューブに回収したのち、40 μ mセルストレーナーを通し、血液前駆細胞(hematopoietic progenitor cells, HPCs)を含む細胞懸濁液を得た。

これらの細胞は、phycoerythrin (PE)-Cy7 conjugated anti-human CD34 antibody (343516, BioLegend, San Diego, CA)にて氷上で30分染色操作を行った上で、洗浄処理を行いフローサイトメーター(FACS AriaII, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)を用いてCD34陽性細胞をソーティングし回収した。回収されたCD34陽性細胞は 5.0×10^4 個ずつ新しいC3H10T1/2細胞(細胞 : 2.0×10^4 個/well, 6-well plate)上に播種され、50 ng/ml ヒトステムセルファクター (human stem cell factor, SCF; R&D systems, Minneapolis, MN), 50 ng/mL ヒトロンボポエチン (human thrombopoietin, TPO; R&D systems), 及び 5 IU/mL ヒトエリスロポエチン

(human erythropoietin, EPO; Kyowa-Kirin, Tokyo, Japan)を含む分化培地にて6日間培養を行った(分化第0日目～分化第6日目)。さらに、分化第6日目に細胞を回収し、新しいC3H10T1/2細胞(細胞： 8.0×10^5 個/100 mm dish)上に播種し、5 IU/mL EPOを含む分化培地にてさらに12日間(分化第6日目～分化第18日目)培養を行った。これらの分化期間は、原則として3日毎に培地交換を行い、非接着細胞のみを回収し解析を行った(分化第3, 6, 12, 18日目)。

2-3-3. ヒト臍帯血CD34陽性細胞からの赤芽球分化

ヒト臍帯血CD34陽性細胞から赤芽球分化を行うにあたり、CD34陽性細胞はC3H10T1/2細胞フィーダー(細胞： 8.0×10^5 個/100 mm dish)上に播種され、50 ng/ml SCF, 50 ng/mL TPO, 及び 5 IU/mL EPOを含む分化培地にて分化第0日目から6日間培養を行った(分化第0日目～分化第6日目)。さらに、分化第6日目に細胞を回収し、新しいC3H10T1/2細胞(細胞： 8.0×10^5 個/100 mm dish)上に播種し、5 IU/mL EPOを含む分化培地にてさらに12日間(分化第6日目～分化第18日目)培養を行った。これらの分化期間の間は、原則として3日毎に培地交換を行い、非接着細胞のみを回収し解析を行った(分化第3, 6, 12, 18日目)。

2-3-4. フローサイトメーターによる細胞表面抗原解析

回収された非接着細胞は3% ウシ胎児血清(FBS, fetal bovine serum)を含む PBS 溶液にて懸濁され以下の蛍光標識抗体を用いて氷上にて30分染色操作を行った。用いた細胞表面抗原用蛍光標識抗体：Pacific Blue conjugated anti-human CD235a (306612, BioLegend), PE conjugated anti-human CD71 (334106, BioLegend), and APC conjugated anti-human CD43 (343206, BioLegend)。染色操作の後、PBS で洗浄しフローサイトメーターにて解析を行った。

ヒト ES/iPS 細胞における SSEA-4 発現を確認するために、トリプシン処理された細胞は回収し、PE conjugated anti-SSEA-4 antibody (FAB1435P, R&D systems) にて染色操作を行った上で同様に解析を行った。

2-3-5. フローサイトメーターを用いたグロビン蛋白解析法

フローサイトメーターを用いてヒトグロビン蛋白の発現を解析するために、 1.0×10^6 個/mLの細胞を4% パラホルムアルデヒド(paraformaldehyde, PFA) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan)にて60分間処理(室温)を行った。その後、氷冷した100% メタノール (methanol, MtOH)にて5分間処理(室温)を行った。これらの固定処理を行ったサンプルは0.5% サポニン (saponin)にて浸透処理(室温)を行った。固定・浸透処理されたサンプルは 2.0×10^5 個ずつ分注し、それぞれに対し蛍光標識された抗ヒトグロビン抗体にて氷上にて30分間染色操作を行

った(細胞内染色)。用いた抗ヒトグロビン抗体：1 μg (20 μL) PE conjugated anti-human hemoglobin β (mouse monoclonal IgG₁, sc-21757 PE, Santa Cruz Biotechnology, Santa Clara, CA), 5 μL TRI-COLOR conjugated (tandem R-PE-Cy5-conjugated) anti-human fetal hemoglobin (HbF) (mouse monoclonal IgG₁, HFH-06; Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 μg (0.1 μL) fluorescein isothionate (FITC) conjugated anti-human hemoglobin ϵ (mouse monoclonal IgG₁ kappa, 61C-CR8008M1F; Fitzgerald, MA)。

上記の抗ヒトグロビン抗体で染色を行った上で、Pacific Blue conjugated anti-human CD235a (349108, BioLegend, mouse IgG2a, κ)を用いて氷上にて30分間染色操作を行った(細胞表面抗原染色)。フローサイトメーターにて解析するにあたり、サンプルはCD235陽性分画のみ解析を行った。なお、下記のマウスIgG抗体をアイソタイプコントロールとして用いた。用いたマウスIgG抗体：20 μL normal mouse IgG₁-PE-Cy5 (sc-2877; Santa Cruz Biotechnology), normal mouse IgG₁-PE (sc-2866; Santa Cruz Biotechnology), normal mouse IgG₁-FITC (sc-2855; Santa Cruz Biotechnology)。

以上の全ての操作は3% FBSを含むPBS溶液にて洗浄操作を行った後に行った

また、固定・浸透処理を行った細胞のGFP蛋白(Green Fluorescent Protein)の発現を確認するために、anti-GFP Alexa Fluor 488 (sc-9996 AF488; Santa Cruz

Biotechnology)を用いた。

2-3-6. リアルタイムPCR

RNA は RNeasy Micro kit (Quiagen, Tokyo, Japan)にて抽出を行った上で、oligo-dT primer(Invitrogen, Oregon, USA)を用いて RT-PCR システム(Thermo Fisher Scientific K.K, Kanagawa, Japan)にて相補的 DNA(complementary DNA, cDNA)合成を行った。リアルタイム PCR は取扱説明書に従い SYBR Premix Dimer Eraser (Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて行った。解析には ABI7900HT Real-Time PCR System (Life Technologies Corporation, CA, USA)を用いた。GAPDH を内部標準として用いた。解析には $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて行い、分化第 18 日目のヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球をキャリブレーターとして用い fold-change を算出した。表 1 に記載のプライマーセットを用いた。

2-3-7. ドキシサイクリン(DOX)制御BCL11A-L発現レンチウイルスベクターシステムとその感染方法

ヒトBCL11A-L発現ドキシサイクリン誘導レンチウイルスベクターシステムはAll-in-one inducible lentiviral vector (Ai-LV) (東京大学医科学研究所 山口智之先生より提供)[19]を基に、mOKSカセット配列とBCL11A-Lとを置換したものを

いた。導入した遺伝子はドキシサイクリン(DOX)により発現制御が可能である。ウイルス粒子作成は過去の報告に従った[20]。

BCL11A-L遺伝子はヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球よりクローニングを行った。なお、ウイルス感染後のヒトES/iPS細胞のクローニング及び維持は過去の報告に従った[16,17,18]。

2-3-8. 画像解析

位相差顕微鏡像観察及び蛍光画像撮影はBZ-9000 microscope (Keyence, Osaka, Japan)を用いた。また画像解析及び測定はBZ-Analyzer software (Keyence)を用いた。

2-3-9. 統計解析

すべての試行はトリPLICATE(n=3)で行い、少なくとも3回以上の施行を行った。図には代表的な結果を示す。全てのデータは平均(mean)±標準偏差(standard deviation, SD)で示し、P値<0.05を有意差有りと判断した。

2-4. 結果

2-4-1. ヒトES/iPS細胞及びヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球におけるグロ

ビン蛋白発現解析のための細胞の固定・浸透方法の最適化

我々の研究室では、ヒト ES/iPS 細胞とマウス C3H10T1/2 細胞との共培養により、巨核球、赤芽球、リンパ球へ分化が可能な血液前駆細胞の分化誘導方法を確立している[16,17,18,21]。この分化誘導方法を用いて、ヒト ES 細胞 H1 株及び KhES-3 株(図 1-A)、及びヒト臍帯血 CD34 陽性細胞(図 1-B)から赤芽球への誘導を行った。

これらの分化プロトコルを用いて得られた細胞の細胞表面抗原(CD235a, CD43, CD71)解析は、フローサイトメーターを用いて経時的に観察した(分化第 3, 6, 18 日目)。今回、解析に用いた細胞表面抗原について、CD235a 抗原はヒト赤芽球系統細胞の膜に発現するシアロ糖タンパク質であり、ヒト赤芽球から成熟赤血球に発現が認められる。CD43 抗原は O-結合型糖鎖に富むシアリル化単糖膜糖タンパク質であり、ヒト造血前駆細胞ならびに幼若な赤芽球において発現が認められる[22]。CD71 抗原はトランスフェリン受容体として知られており、増殖期の細胞ならびに赤芽球系統細胞においては赤芽球及び網状赤血球に発現が認められるが、成熟赤血球では発現は認められないことが知られている。解析の結果、ほとんどの細胞が CD235a 陽性 CD71 陽性分画及びさらに一部は成熟のすすんだ CD235a 陽性 CD71 陰性分画にいたことが確認できた(図 1-C, ヒト ES 細胞 H1 株及びヒト臍帯血 CD34 陽性細胞)。このことから、これらのプロトコ

ルを用いて効率的に赤芽球への分化が行えることが確認できた。

ヒト ES/iPS 細胞由来赤芽球及びヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球におけるグロビン発現を解析する上で、ヒト iPS 細胞株においてクローン間の差が考慮される。とくに、エピジェネティックメモリー(epigenetic memory)と呼ばれるメチル化の残存による分化指向性への影響が懸念される[23,24]。そのため、センダイウイルス(Sendai virus)を用いて異なる細胞ソースから8つのヒト iPS 細胞株(ヒト iPS 細胞 #1 株-#8 株)を樹立した。これらのヒト iPS 細胞においては外来性遺伝子の発現を無いことを確認した。これらのヒト iPS 細胞株は以下に示すヒト細胞ソースより樹立した。hiPS 細胞 #1 株及び#2 株：ヒト新生児真皮線維芽細胞(human neonatal dermal fibroblasts), #3 株-#6 株：ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞(human CB CD34⁺ cells), #7 株及び#8 株:ヒト末梢血有核細胞(human adult peripheral blood cells) (図 2-A). 図 2-B に示すように、分化第 18 日目の赤芽球におけるグロビン遺伝子の発現を解析すると、ヒト血液(ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞及び末梢血有核細胞)由来 iPS 細胞(hiPS 細胞 #5 株, #6 株, #7 株, #8 株)において、ヒト新生児線維芽細胞由来 iPS 細胞(hiPS 細胞 #1 株, #2 株)より HBB 遺伝子発現が高いことがわかった。

以上の結果から、これ以降の解析は HBB 遺伝子発現が高い hES 細胞 H1 株(hESC H1)と hiPS 細胞 #8 株(hiPSC #8)を用いることとした。次に、これらの 2

クローンから得られた CD34 陽性細胞を赤芽球へ分化させ、それらのグロビン遺伝子発現を経時的に解析し、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球と比較して図 2-C に示す。その結果、これらのクローンは HBE1 遺伝子発現において、分化第 6 日目をピークにその後発現が低下していることがわかる。ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞由来赤芽球においてはほとんど発現が認められなかった。また、HBG1/HBG2 遺伝子においてはヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球と比べて高い発現が認められたが、HBE1 遺伝子にみられるような分化後期における発現低下は認められなかった。さらに HBB 遺伝子においてはヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球では初期より高い発現が維持されているのに対し、これらのクローンでは分化第 6 日目から徐々に発現上昇が認められ、分化第 18 日目ではヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球と比べて 40%~50% 程度の発現量を示すことがわかった。このことから、従来ヒト ES/iPS 細胞では成人型 β グロビン遺伝子 (HBB 遺伝子) の発現は認められないか、発現しても非常に低いとされていたが、このようにクローンを選別することで比較的高い発現を示すクローンが存在することがわかった。

次に、これらヒト ES/iPS 細胞並びにヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球において、単一細胞における β 様グロビン蛋白(ϵ , γ , β グロビン)の発現を、フローサイトメーターと蛍光標識された抗ヒトグロビン蛋白抗体を用いて解析するた

めに、細胞の固定・浸透方法の最適化を行った。図 3-A に示すように、はじめに 4% パラホルムアルデヒドで処理した後、100% メタノールで処理し、最後に 0.5% サポニンで浸透処理を行ったところ、フローサイトメーターにおける解析において最も良い検出感度が得られた。なお、ヒト赤芽球細胞におけるグロビン蛋白発現を解析するために、赤芽球細胞表面抗原 CD235a と組み合わせて解析を行った。これらの β 様グロビン蛋白の発現を区別するために、 ϵ -, γ -, β グロビンはそれぞれ FITC-, TRI-COLOR-, PE-conjugated anti-human globin subtype antibodies を用いた(図 3-B)。なお、フローサイトメーターにおける解析においては、ヒト ES 細胞 H1 株分化第 18 日目の検体を用いてゲーティングの一例を示す。図 3-C に示すように、forward scatter(SSC)及び side scatter(SSC)にて主要な細胞集団をゲートし(P1)、これらの細胞のうち CD235a 陽性細胞 (P3)のグロビン発現を解析することとした。なお、グロビン発現は抗ヒトグロビン抗体の免疫蛍光強度として示す。この方法を用いることで、異なる蛍光標識で標識された抗ヒトグロビン抗体を用いることで、それぞれの蛍光抗体が持つ特有の蛍光波長を区別して解析することが可能となった。また、発現強度は平均蛍光強度(mean fluorescence intensity, MFI)として表現した。なお、これらの抗体の非特異的な発現を除外するために、Jurkat 細胞(Jurkat cells), hES 細胞 H1 株由来赤芽球(分化第 6 日目), ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球(分化第 6 日目), 及びヒト末梢血

赤血球における単染色結果を示す(補足図 A,B)。これらは過去の報告と合致する結果を得た[5] [25]。

ヒト ES 細胞 H1 株及びヒト iPS 細胞#8 株由来赤芽球において、分化第 3 日目には ϵ グロビン及び γ グロビンの発現が確認された。分化第 6 日目及び第 18 日目においては、これらに加え β グロビンの発現が確認できた。このとき、分化第 6 日目に ϵ グロビン陽性を示していた集団のうちの一部において ϵ グロビンの発現強度がやや減弱し弱陽性集団への移動が確認された。一方でヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球においては初期より γ グロビン及び β グロビンの発現がみられ、 ϵ グロビンの発現は確認出来なかった。さらに分化第 6 日目及び第 18 日目において γ グロビン及び β グロビン陽性集団の一部から γ グロビンの陰転化が確認できた(図 3-D)。ヒト ES 細胞 H1 株及びヒト iPS 細胞#8 株由来赤芽球において分化第 18 日目には mRNA レベルでは HBE1 発現が低下していたのにも関わらず、蛋白レベルでは ϵ グロビンが完全に陰転化しない理由として、タンパク質の半減期が長いことや抗体の感度が高いことが考えられる。これらのグロビン陽性細胞の割合をまとめた結果を図 3-E に示す。

これらの結果から、ヒト ES/iPS 細胞由来赤芽球ではクローンを選別することで β グロビンを発現するクローンを存在することを示した。またこれらのクローンにおける β グロビン発現は遺伝子発現レベル及び蛋白レベルで確認するこ

とができた。しかしながらこれらのクローンにおいてもヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球においてみられるような γ グロビンから β グロビンへのスイッチング(γ グロビン抑制)が起きていないことが示された。このことから、ヒト ES/iPS 細胞由来赤芽球では γ グロビン抑制に関するなんらかの遺伝子制御が十分に働いていないためと考えた。

2-4-2. BCL11A 遺伝子の発現低下がヒト ES/iPS 細胞由来赤芽球における γ グロビンの抑制できない原因として関連性を持つ

ヒト ES/iPS 細胞においてはこれらのグロビンスイッチングが不完全であり、とくに γ グロビンの抑制が弱いことがわかった。そこで、これらヒトグロビン遺伝子、とくに γ グロビンと β グロビンの発現調節に関与している遺伝子[26]を探索した (図 4)。

今回、BCL11A、KLF1、GATA1、c-MYB、SOX6 について解析を試みたところ、BCL11A の variant form の一つである BCL11A-L がヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球と比べて、ヒト ES/iPS 細胞由来赤芽球では優位に低いことがわかった。BCL11A は複数の variant form を持ち、Shorter variant である BCL11A-S では、卵黄嚢由来赤芽球のような一次造血由来赤芽球に、Longer variant である BCL11A-L は、ヒト骨髄及び臍帯血由来赤芽球に代表される二次造血由来赤芽球に発現し

ていることが知られている。とくに、BCL11A-Lはヒトにおける γ グロビンの発現抑制に関与することが報告されている[27,28]。

また、cMYB及びKLF1はBCL11Aの上流にて、GATA1やSOX6についてはBCL11Aと複合体を形成してグロビンスイッチングを制御していると考えられている[26]。KLF1やGATA1については、ヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球より比較的高い発現を、cMYBとSOX6については同程度の発現を示した。これらの結果から、ヒトES/iPS細胞由来赤芽球において γ グロビンの抑制が認められない原因はBCL11A-Lの発現が低いことが原因ではないかと仮説を立てた。

この仮説を証明するために、ドキシサイクリン制御レンチウイルスベクター(図5-A)を用いてBCL11A-L遺伝子を発現するヒトES/iPS細胞株(hESC H1-BCL11A-L-GFP株及びhiPSC #8-BCL11A-L-GFP株)を樹立した。これらの細胞株は常時GFPを発現しているが、ドキシサイクリン(DOX)を添加した時のみBCL11A-L遺伝子を発現するように制御されている。これらの細胞株の未分化性及びベクターの導入を確認するために図5-B及び5-Cに示すように、SSEA-4及びGFPの発現を確認した。

今回、BCL11A-Lの発現の違いをみるとヒト臍帯血由来赤芽球では分化初期から高い発現を示していることからヒト赤芽球分化における γ グロビンの抑制にはBCL11A-L遺伝子を発現させるタイミングが重要だと考え、図6-Aに示すよ

うに BCL11A-L 遺伝子の発現するタイミングを変えた 3 つのプロトコルを試すこととした。図 6-B に示すように、分化第 0 日目から DOX-OFF の状態(Protocol-i)では BCL11A-L 遺伝子の発現は低く、HBG1/HBG2 遺伝子の抑制は認められなかったのに対し、分化第 0 日目から DOX-ON の状態(Protocol-iii)では他のグロビン遺伝子の発現に影響を与えることなく HBG1/HBG2 遺伝子の抑制が確認できた。しかしながら、分化第 6 日目から DOX-ON の状態(Protocol-ii)ではこれらの変化はほとんど認められなかった。 γ グロビンの抑制はフローサイトメーターを用いたグロビン蛋白発現解析にても同様の結果が得られた(図 6-C 及び 6-D)。これらの BCL11A 遺伝子のアイソフォームが γ グロビンの発現制御に関連しているという過去の報告とも一致する[29] [27]。これらの結果は、ヒト ES/iPS 細胞由来赤芽球において BCL11A-L 遺伝子及びこれらと複合体を形成する遺伝子群の発現が低いことが、 γ グロビン抑制が起こらない原因の一つとして強く示唆される結果を得た。

2-5. 考察

ヒトにおいて β 様グロビン遺伝子は5つの遺伝子(ϵ -G γ -A γ - δ - β)で構成されるが、これらの遺伝子は発生段階に応じてその発現遺伝子が切り替わっていくことが知られており、この現象はグロビンスイッチングと呼ばれている[5]。そのため、

赤芽球におけるグロビン発現様式は発生段階の重要な指標となる [5,26]。しかしながら、このグロビンスイッチングという現象は種により大きく異なり、同じ哺乳類であるヒトとマウスにおいてもその発現様式が大きく異なることが知られている。ヒトにおいては発生段階において2回のグロビンスイッチングを認める。一回目は ϵ グロビン(HBE1遺伝子)から γ グロビン(HBG1/HBG2遺伝子)へ、二回目は γ グロビン(HBG1/HBG2遺伝子)から β グロビン(HBB遺伝子)もしくは δ グロビン(HBD遺伝子)への変化である。しかしながら、マウスにおいては β グロビン遺伝子座には4つの β 様グロビン遺伝子($\epsilon\gamma$ - β H1- β 1- β 2)を持つ。 β H1はヒトにおける γ グロビン(HBG1/HBG2遺伝子)と共通の祖先遺伝子(ancestral gene)に由来すると考えられているが、ヒトにおいて γ グロビン(HBG1/HBG2遺伝子)が妊娠中期・後期の胎児肝・脾造血由来赤芽球/赤血球(二次造血)において発現しているのに対し、マウスでは胚生7.5日齢における卵黄嚢由来造血由来赤芽球(一次造血)においてすでに $\epsilon\gamma$ 遺伝子とともに発現していることが知られている。そのため、ヒトにおいて観察される γ グロビン(HBG1/HBG2遺伝子)から β グロビン(HBB遺伝子)の段階に相当するグロビンスイッチングは認められない[30] [31]。このように、ヒトとマウスではグロビン遺伝子の発現様式が異なるため、これらのグロビン遺伝子の制御を研究する上ではヒト細胞を用いた研究する必要がある。そこで私は、*in vitro*の赤芽球分化系における細胞モデルとしてヒトES/iPS細胞に注目し、

これらにおける β 様グロビンの発現様式を解析した。

そのために、従来のバルクでの遺伝子発現解析に加え、赤芽球における固定・浸透方法を最適化した上で、グロビン蛋白に対する多重染色方法を用いて標識し、フローサイトメーターを用いて解析することで単一細胞レベルでのグロビン発現解析を可能とした(図 1-3)。これらの実験手法を用いてヒト ES/iPS 細胞由来赤芽球におけるグロビン遺伝子発現を解析すると、多くが主に ϵ グロビン遺伝子(HBE1 遺伝子)及び γ グロビン遺伝子(HBG1/HBG2 遺伝子)を発現し、 β グロビン遺伝子(HBB 遺伝子)の発現を認めるクローンはほとんど認められなかった。このことからこれらの赤芽球は一次造血を反映していると考えられる。しかしながら、ヒト血液(ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞及び末梢血有核細胞)由来 iPS 細胞(hiPS 細胞 #5 株-#8 株)において、 β グロビン遺伝子(HBB)の発現が他のクローンと比べ高いことが明らかになった(図 3-D 及び 3-E)。このことは、ヒト ES/iPS 細胞の樹立元となる細胞のエピジェネティックメモリーがグロビン遺伝子発現に影響していることを示唆する[23]。

しかしながら、これらの β グロビンを発現するクローンにおいても、ヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球に観察されるような γ グロビン抑制が観察されなかったことから、 γ グロビンの抑制に関与していると考えられるBCL11A遺伝子の発現に注目し、これらの細胞における発現を解析することとした。BCL11A遺伝

子はジンクフィンガー型の転写因子(zinc-finger transcription factor)であり、ヒトにおける胎児型ヘモグロビン(HbF)の発現量を制御していることが知られている[29]。さらにBCL11A遺伝子のisoform variantの一つであるBCL11A-L遺伝子は、ヒト発生段階における初期赤芽球には発現しておらず、これらの赤芽球においては γ グロビン遺伝子の高い発現が認められる[5,25,27]。逆に、BCL11A-L遺伝子は成人赤芽球(とくに骨髄由来赤芽球)に高い発現を示し、同時にこれらの細胞における γ グロビン遺伝子の抑制に働いていることが知られている[27]。今回の実験においてもヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球においては γ グロビンの発現は、遺伝子レベル及び蛋白レベルにおいて発現が抑制されているのが確認できたが、ヒトES/iPS細胞由来赤芽球においてはそれらが認められなかった(図3-E)。そこで、BCL11A-L遺伝子をヒトES/iPS細胞由来赤芽球へ分化の初期より強制発現したところ遺伝子レベル(図6-B)及び蛋白レベル(図6-C及び6-D)において、 β グロビン遺伝子の発現に影響を与えることなく γ グロビンの発現抑制が確認できた(図6-D, 左)。

今回の検証で、ヒトES/iPS細胞由来CD34陽性血液前駆細胞から赤芽球への分化の初期段階でBCL11A-L遺伝子を強制発現した条件下(図6-A, Protocol-iii)においてのみ γ グロビン抑制が確認できた。また、ヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球においては分化第3日目からすでにBCL11A-L遺伝子の発現が高くなっている

ことがわかる(図6-B)。つまり、 γ グロビンの抑制には赤芽球分化の初期段階から発現されることが重要であると考えられる。同時に、従来まで報告されてきたBCL11A遺伝子の作用を、ヒトES/iPS細胞においてもin vitroの実験系で再現することができた。

これらの結果から、ヒトES/iPS細胞においても、その多くのクローンの中から β グロビンを発現するクローンを選別し、さらにBCL11A-L遺伝子を強制発現することで γ グロビンの発現を抑制することが可能となった。このことはヒトES/iPS細胞由来赤芽球をヒト臍帯血由来赤芽球と近いグロビン発現をもつ赤芽球を産生できる可能性を示した、このことは、将来的にヒト成人末梢血赤血球と同様の機能をもつ赤血球を体外で産生するための重要なステップとして考えられる。今後の課題として、赤血球の脱核率を向上させる培養系の確立、またグロビン発現の制御についてもヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球では、 γ グロビンとともに ϵ グロビンも初期から抑制されていることがわかる。このことから、ヒトES/iPS細胞由来赤芽球では残存する ϵ グロビンの影響が無視できないため、これらを低く制御する方法の開発が望まれる。

最後に、これらのフローサイトメーターを用いたグロビン蛋白の発現解析法はヒトES/iPS細胞由来赤芽球における γ グロビンの抑制が起こっていないという現象に対する新しい知見と解決方法を与えた。また、これらの成果はヒトES/iPS

細胞由来赤血球が将来のドナーに依存しない輸血供給システムにおける新しい赤血球のソースとして利用できる可能性を広げるとともに、赤血球産生に適したヒトiPS細胞クローンの選別に役立つものと考えられる。

3. ヒト多能性幹細胞由来不死化赤芽球株を用いた赤芽球分化モデルの構築

3-1. 要旨

c-MYC と BCL-XL の 2 つの遺伝子をドキシサイクリン制御レンチウイルスベクターシステムを用いてヒト胚性幹細胞由来血液前駆細胞へ導入することで、不死化赤芽球株の樹立に成功した。これらの株はドキシサイクリン依存的に外来性遺伝子の発現調節をすることで、増殖と分化の制御が可能である。また、樹立したクローンは、外来性遺伝子の発現量に依存してそれぞれ形態的に異なる分化段階を示し、成熟段階に応じた遺伝子発現やヘモグロビン合成能を示した。

従来株には認められない成人型グロビンの発現や脱核する能力を持つことから、これらの細胞株は赤芽球分化のモデル細胞としてだけでなく、赤血球製剤の新たな細胞ソースとしても応用が期待できる。

3-2. 序文

ヒト赤芽球分化モデル細胞として従来からヒト白血病由来細胞株である K562[32,33]や UT-7/EPO[34]等の細胞株が用いられてきた。しかし、それらの細胞株はその分化の未熟性から赤芽球分化の初期段階を再現するに過ぎず、赤血球の分化中期から後期にみられるヘモグロビン合成、成人型 β グロビン発現解析、脱核のような赤血球特異的な表現型を解析するための適切なモデル細胞が存在しなかった。

私は、c-MYC と BCL-XL という 2 つの遺伝子をヒト ES 細胞由来血液前駆細胞へドキシサイクリン(DOX)制御レンチウイルスベクターシステムを用いて導入し、DOX 依存的に外来性遺伝子の発現を調整することで自己複製と分化・成熟という相異なる段階を制御することに成功した[35]。これらの細胞株は赤芽球マーカーである CD235a (Glycophorin A) を発現しながら、6 ヶ月以上に渡り安定した増殖を示した。さらに DOX 非存在下において細胞は一定の分化・成熟を示した。

今回、私はこの手法を用いてヒト ES 細胞 KhES-3 株及び H1 株から複数のクローンを樹立したところ、これらのクローンは形態的に異なる分化段階で維持されていることがわかった。今回、これらのクローン間における表現型の違いを検証するとともに、これらの株を用いた今後の応用についても考察を行った。

3-3. 方法

3-3-1. 細胞株と試薬

試薬は、別記したものを除きSigma-Aldrich社より購入した。ヒトES細胞KhES-3株は文部科学省の審査・承諾を得た上で、京都大学再生医科学研究所 末盛博文先生よりご提供いただいた。またヒトES細胞H1株については、WiCell社(Madison, WI)より提供されたものを京都大学 iPS細胞研究所 中畑龍俊先生よりご提供いただいた。ヒト検体を用いた実験を含むこれら全ての実験はヘルシンキ宣言における研究倫理規範を順守した上で施行した。

3-3-2. c-MYC 及び BCL-XL 発現ドキシサイクリン誘導レンチウイルスベクターシステム

ドキシサイクリン誘導レンチウイルスベクターシステムは上記と同様のものを用いた(方法 2-3-7.参照)。ヒト c-MYC 及び BCL-XL は基となるベクターにおける mOKS カセット配列とそれぞれ置換したものを用いた。

3-3-3. ウイルス感染方法とコロニーアッセイによるクローニング

ヒト ES 細胞からの血液前駆細胞への分化誘導方法は、前述の方法と同様に行った(方法 2-3-2.参照)。回収された血液前駆細胞は、 5.0×10^4 個ずつ、C3H10T1/2

細胞(6-well plate, 1well あたり細胞 1.5×10^5 個)上へ移し、そこへ c-MYC 及び BCL-XL 発現ドキシサイクリン誘導レンチウイルスベクターウイルス粒子を感染させた。感染は、過去の報告と同様にスピニンフェクション法[6]を用いた(感染効率 multiplicity of infection, MOI=20)。樹立第 0 日目から樹立第 12 日目まで、50 ng/mL SCF, 5 IU/mL EPO, 及び 1.0 μ g/mL DOX を含む分化培地にて培養を行った。樹立第 12 日目には増殖性の高いクローンを選択するためにウイルス感染を行った細胞は、1.0 μ g/mL DOX を含む半固形培地(MethoCult 4434, Veritas, Tokyo, Japan)へ播種し、引き続き 12 日間培養を行った(樹立第 12 日目～樹立第 24 日目)。樹立第 24 日目にクローン性の増殖を認めるコロニーをピックアップし、50 ng/mL SCF, 5 IU/mL EPO、1 μ g/mL DOX を含む分化培地にて引き続き維持・増殖を行った。

なお、樹立第 12 日目～樹立第 24 日目の半固形培地での培養、また樹立第 24 日目以降の培養はフィーダーフリー条件下にて培養を行った。樹立第 24 日目以降の培地交換時は、非接着細胞のみを回収し継代を行った。

3-3-4. フローサイトメーターを用いた細胞表現マーカー解析

前述の方法と同様(方法 2-3-4.参照)。細胞表面抗原用蛍光標識抗体として下記の抗体を用いた：Pacific Blue conjugated anti-human CD235a (306612, BioLegend),

PE conjugated anti-human CD71 (334106, BioLegend), and APC conjugated anti-human CD43 (343206, BioLegend)。染色操作の後、PBS で洗淨しフローサイトメーターにて解析を行った。

3-3-5. リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

前述の方法と同様(方法 2-3-6.参照)。解析には表 2 に記載のプライマーセットを用いた。

3-3-6. ギムザ染色方法及び細胞形態観察

細胞形態観察のために、回収された細胞は Shandon Cytospin 4 Cyto centrifuge (ThermoFisher Scientific)を用いてスライドガラス上へ塗抹させ、Hemacolor (Merck, Whitehouse Station, NJ)を用いて染色を行った。観察にはオールインワン蛍光顕微鏡(BZ-9000 microscope, Keyence, Osaka, Japan)を用いた。画像解析には BZ-Analyzer software (Keyence)を用いて細胞(直径)、核(直径)、及び N/C 比測定を行った。測定値は mean±SD で示した。

3-3-7. 統計解析

前述の方法と同様(方法 2-3-9.参照)。

3-4. 結果

3-3-1. ヒト ES 細胞由来不死化赤芽球樹立及びその分化能の比較

ヒト ES 細胞から血液前駆細胞を誘導するにあたり、前述のヒト ES 細胞とマウス間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞との共培養法を用いた。今回、ヒト ES 細胞 KhES-3 株及び H1 株から血液前駆細胞を誘導した(樹立第-14 日目～樹立第 0 日目)。樹立第 0 日目にこれらの血液前駆細胞へ c-MYC と BCL-XL の 2 つの遺伝子を、ドキシサイクリン誘導レンチウイルスベクターシステム(図 7-A)を用いて遺伝子導入し SCF, EPO, DOX を含む分化培地にて 12 日間培養を行った(樹立第 0 日目～樹立第 12 日目)。樹立第 12 日目に、ウイルス感染細胞を回収し半固形培地へ播種し、引き続き 12 日間培養を行った(樹立第 12 日目～樹立第 24 日目)。樹立第 24 日目には、半固形培地上に白～赤色を呈す複数のコロニーの出現を認めた。これらのコロニーをピックアップし、SCF, EPO, DOX を含む分化培地を用いてフィーダーフリー条件下にて引き続き培養を行った(樹立第 24 日目～)(図 7-B)。今回、これらの樹立方法を用いて得られたクローンのうち、CD235a 陽性を示し、6 ヶ月以上に渡り安定して増殖を認めたものを不死化赤芽球株と定義した。

今回、ヒト ES 細胞 KhES-3 株よりクローン A 及び B、H1 株よりクローン C

の樹立に成功した(図 8-A)。これらのクローンの DOX-ON 状態における GFP 発現及び細胞表面抗原マーカーをフローサイトメーターにて解析したところ、共通して GFP 陽性並びに CD235a 陽性 CD71 陽性を示し、これらは赤芽球前駆細胞としての性質を持つことがわかった(図 8-B)。しかしながらこれらのクローンは、それぞれ FSC/SSC 展開において異なった分布を示す細胞集団として認められた。また、GFP 発現強度については、クローン A が他のクローンより高い傾向を示した。

また、これらのクローンは DOX 存在下の培養条件(DOX-ON 状態)において、図 8-C に示すように、長期間に渡り安定した増殖を示すものの、各クローンにおける倍加時間(クローン A : 57.6 ± 2.1 時間, クローン B : 46.9 ± 1.8 時間, クローン C : 99.1 ± 4.5 時間)は異なっており、クローン B において最も早い倍加時間を示した。

次に、各クローンの細胞形態をギムザ染色で評価した(図 9-A)。DOX を添加した状態(DOX-ON 状態)において各クローンは異なる形態的特徴を有していることがわかった(図 9-A, 上段)。クローン A では、好塩基性の細胞質と大きな核を持ち核/細胞質比(N/C 比)が高く、前赤芽球様の形態を示した。また、クローン B はクローン A と同様に好塩基性の細胞質を持つものの核はクローン A と比較してやや小型であることから、やや成熟が進んだ好塩基性赤芽球様の形態を示し

た。クローン C ではさらに細胞質と核の成熟が観察され、多染性赤芽球様の形態を示した。さらに、これらのクローンは DOX 非存在下において 72 時間培養する(DOX-OFF 状態)ことで、それぞれさらに細胞質の成熟及び核の濃縮を認められた(図 9-A, 下段)。とくに、クローン C の DOX-OFF 状態においては強い核の濃縮が起こり、N/C 比は小さく、また核の局在化(図 9-A : 挿入図 i)、脱核後の核(図 9-A : 挿入図 ii)、脱核赤血球(図 9-A : 挿入図 iii)を認めた。これらの細胞サイズ(直径, μm)、核サイズ(直径, μm)、N/C 比を表 2 に示す。

図 9-B に、DOX-ON/-OFF 状態における細胞増殖能を示す。分化第 0 日目において細胞 1.0×10^6 個(CD235a 陽性細胞)を播種し、DOX-ON 状態もしくは DOX-OFF 状態において培養を行い、それぞれ分化第 1, 3, 5, 7 日目における細胞数(CD235a 陽性細胞)を示した。その結果、クローン A,B においては DOX-OFF 状態において分化第 3 日目まではわずかに増加するものの、その後は減少に転じた。またクローン C においては初期より細胞数は減少に転じた。このことから、DOX-OFF 状態においてクローン A,B は初期にわずかに増殖能を持ち、細胞分裂をしながら形態的な成熟を認めるのに対し、クローン C はほとんど細胞分裂をせず、成熟に転じていることが示唆される。

また、DOX-ON 並びに DOX-OFF 状態における KLF1, GATA1, GCN5 遺伝子発現を解析した(図 9-C)。今回、赤血球分化に重要な転写因子 KLF1, GATA1 遺伝子、

遺伝子転写促進するヒストンアセチル化トランスフェラーゼ遺伝子 GCN5 遺伝子を解析した。KLF1,GATA1 遺伝子において DOX-ON 状態から DOX-OFF 状態において発現上昇が確認された。また DOX-OFF 状態における発現量はクローンごとに発現量が異なりクローン A<B<C の順に高いことがわかった。また、GCN5 遺伝子は核の濃縮にも関連が報告されており [36]、全てのクローンにおける DOX-OFF 状態で発現低下が認められた。

これらの結果は、DOX-ON 状態では細胞は増殖・自己複製の状態にあり、このときには赤血球分化に重要な転写因子 KLF1, GATA1 は低く抑制されていることがわかる。しかしながら、DOX-OFF 状態のときにこれらの遺伝子はそれらの形態的な成熟段階に対応したレベルまで発現が上昇することがわかった。なお、これらのクローンは DOX-OFF 状態における形態的な核の濃縮に関連して GCN5 遺伝子の低下を認めた。

3-3-2. ヒト不死化赤芽球株はヘモグロビン合成能を持ち成人型 β -グロビンを発現する

遠心操作を行ったときの各クローンの細胞ペレット色調を示す(図 10-A)。これらのペレットにおける赤い色調はヘモグロビンの存在及びその発現量と関連していると想定される。クローン A は DOX-ON 状態において白色～わずかに赤

色を呈し、DOX-OFF 状態では、赤色を呈した。またクローン B 及び C においても同様の傾向を認めたが、B, C クローンでは DOX-ON 状態においてすでに赤色を呈しており、DOX-OFF 状態ではその傾向がさらに強くなることがわかった。

このことから、各クローンはヘモグロビン合成能を有しているものの、その能力がそれぞれ異なることが示唆される。次に図 10-B に ALAS2, TFRC, HBE1, HBG1/HBG2, HBB 遺伝の発現を解析した。ALAS2 遺伝子は、赤芽球におけるヘム生合成系の律速酵素である赤芽球型アミノレブリン酸合成酵素 (erythroid specific 5-aminolevulinate synthase, ALAS2) をコードする遺伝子である。また、TFRC 遺伝子はトランスフェリン受容体をコードする遺伝子である。これらの遺伝子は DOX-ON 状態で発現が低く抑えられているが、各クローンにおいて DOX-OFF 状態では発現が上昇することがわかった。KLF1, GATA1 と同様にその発現量は異なりクローン $A < B < C$ の順に高いことがわかった。このことは、図 10-A でそれぞれのクローンのペレット色調が異なることと同様の傾向を得た。

つぎにグロビン遺伝子(HBE1, HBG1/HBG2, HBB)の発現を解析した。これらのグロビン遺伝子の発現は、ヒトの発生段階において、発生段階ごとに異なることが知られており、 ϵ グロビン(HBE1 遺伝子)は、妊娠初期胚の卵黄嚢由来造血由来赤芽球において、 γ グロビン(HBG1/HBG2 遺伝子)は妊娠中期・後期の胎児肝・脾造血由来赤芽球/赤血球において、そして β グロビン(HBB 遺伝子)は出生

後の骨髄由来造血由来赤芽球/赤血球において転写・発現している。クローン A では主に HBE 遺伝子 1 及び HBG1/HBG2 遺伝子を低いレベルで発現しているのに対し、クローン C では HBB 遺伝子を強く発現していることがわかる。成人型グロビンである HBB 遺伝子の発現は従来広くグロビン遺伝子発現研究に用いられてきたヒト赤白血病由来細胞株 K562 やヒト EPO 受容体発現白血病由来細胞株 UT-7/EPO には認められない特徴である。

3-3-3. c-MYC 及び BCL-XL の発現量とクローン間の表現型との関連

これらの株はヒト ES 細胞由来造血前駆細胞から c-MYC 及び BCL-XL 遺伝子導入により樹立された。しかしながら、これらのクローンは異なる表現型を示しつつも共通して赤芽球前駆細胞としての性質を持ちながら、長期間安定して増殖するという特徴を持っている。そのクローン間の違いを説明する原因として、樹立に用いた外来性遺伝子の発現量がこのクローン毎の表現型を規定しているのではないかと考えた。そこで、Total c-MYC, Total BCL-XL, Endogenous BCL-XL の発現量を比較した(図 11-A)。その結果、DOX-ON 状態において Total c-MYC の発現量はクローン毎に異なることがわかった。特にクローン A において高い発現が認められた。また Total BCL-XL ではクローン A においてやや高い発現を認めるものの他のクローンでは発現が比較的低いことがわかった。しかしなが

ら、DOX-OFF 状態において Total c-MYC の発現はすべてのクローンにおいて発現が低下したのに対し、Total BCL-XL ではクローン B 及び C において発現上昇が認められた。このとき、外来性 BCL-XL(Exogenous BCL-XL)の発現は低下していることが確認できたことから、内因性 BCL-XL(Endogenous BCL-XL)の発現が上昇していたと考えられる。BCL-XL は抗アポトーシス作用を有するとともに赤芽球分化、とくにヘム合成や成熟に関連することが知られている [37,38]。

DOX-OFF 状態で BCL-XL の上昇が確認されたのはこの影響であると考えられる。

以上より、DOX-ON 状態では c-MYC の発現は赤血球分化関連遺伝子(GATA1, KLF1, 内因性 BCL-XL)やヘモグロビン合成関連遺伝子(ALAS2 及び TFRC)の発現を抑制していると考えられる。しかしながら、DOX-OFF 状態においては c-MYC による抑制が解かれることで、これらの遺伝子の上昇を認めるとともに、形態的な成熟が導かれたと考えられる(図 11-B)。

3-5. 考察

ヒト ES 細胞 KhES-3 株及び H1 株由来血液前駆細胞へ c-MYC 及び BCL-XL の 2 つの遺伝子をドキシサイクリン誘導レンチウイルスベクターシステムを用いて導入し、形態的に分化段階が異なる 3 つのクローンの樹立に成功した(図 7-AB, 図 8-ABC)。

これらの方法で樹立されたクローンは、異なる遺伝子発現及びヘモグロビン合成能を持ち(図 9-ABC, 図 10-AB)、とくに最も分化段階の高いと考えられるクローン C においては DOX-OFF 状態にて細胞質の成熟と核の濃縮を認め、脱核する能力を有していることが示された(図 9-A : 挿入図 iii)。さらに、従来の細胞株にはみられない成人型 β グロビンの高い発現を認めた。このことから遺伝子操作により樹立された赤芽球株においても、ドキシサイクリン誘導レンチウイルスベクターシステムを用いて外来性遺伝子発現を制御することで、赤血球分化の最終分化段階までを再現することが可能となった。

次に、これらのクローンにおける表現系を規定する要因として、樹立に用いた外来性遺伝子 c-MYC 並びに BCL-XL の発現量に注目し、これらの遺伝子発現を解析したところクローン間に発現量の差を認め、分化度の低いクローンにおいて高く、分化度の高いクローンにおいて低いという傾向を認めた。これらのことから、樹立に用いた遺伝子である c-MYC と BCL-XL の発現量の違いがクローンにおける表現型の違いに強く影響していることが示唆される。とくに c-MYC については、多くの血液細胞の分化においてその分化・成熟に非常に重要であり、その発現量は分化段階に応じて緊密に調整されていることが知られている[18,21,39]。とくに赤芽球成熟において脱核との関連[39]も指摘されている。このことから、c-MYC 自体の発現量の違いがこれらのクローン間の表現形の違

いに強く影響していると考えられる。しかしながら、c-MYC 単独もしくは BCL-XL 単独での樹立は出来ないことから[35]、c-MYC は単独ではなく、BCL-XL とも強調しながら、これらの株の特徴である自己複製と、分化段階の維持に関与しているものと推察される。そもそも BCL-XL 自体は抗アポトーシス作用がよく知られているが、c-MYC と同様に赤芽球分化において成熟、とくへム合成に重要であるとの報告があり[37]、DOX-OFF 状態における BCL-XL(Total BCL-XL)の上昇は、内因性の BCL-XL(Endogenous BCL-XL)の発現上昇と考えられる。今後、これらの DOX-ON 状態及び DOX-OFF 状態におけるこれらの導入遺伝子並びにその下流遺伝子の挙動を詳細に検証することで、赤芽球における自己複製と分化・成熟の関係が明らかになると期待される。

また、これまで赤芽球の分化モデルとして用いられてきた K562 や UT-7/EPO と比べ、これらの株は、成人型 β グロビンの発現や高いヘモグロビン合成能、さらには赤芽球分化に関与する KLF1 や GATA1 等の遺伝子発現を高く発現していることから、より生理的な赤芽球に近い特徴を反映しており、赤芽球分化モデル細胞としても優れた性質を持つことがわかる。さらに、株化されたことで凍結・解凍にも対応でき[35]、培養にフィーダー細胞が必要ないことから、安定した表現型を長期間に渡り維持することが可能である。これらの特徴から従来のプライマリー細胞では困難であった、大規模スクリーニングへの応用も可能

であると考えられる。

また、これらの細胞株はモデル細胞としての利用だけでなく、赤血球製剤における新たな細胞ソースとしての応用が期待される。従来の健常人ドナー由来赤血球に代わる細胞ソースとして、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞[1,40]、ヒト末梢血 CD34 陽性細胞、ヒト末梢血 CD34 陽性細胞[41]及びヒト ES/iPS 細胞[42]などが試みられてきた。とくにヒト末梢血 CD34 陽性細胞においては体外培養にて得られた培養赤血球を免疫不全マウスへ輸血しマウス末梢血中における循環を確認したとの報告がある[41]。しかしながら、これらの細胞ソースは有限であり、現在用いられている赤血球製剤 1 パックあたりに含まれる赤血球数 $1.0\sim 2.0 \times 10^{12}$ 個を大量培養により確保することは容易ではない。さらにソースとしてのロット差による分化の不均一性から赤血球としてのクオリティーの確保などの課題を抱え現実的な運用はまだなされていない。しかしながら、私の樹立した不死化赤芽球株は 6 ヶ月以上に渡り赤芽球としての性質を維持しながら指数関数的な増殖能を示し、さらに外来性の遺伝子の発現調整により同調した分化・成熟が可能である。また臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球と同等の酸素運搬能を持つことが示された[35]。また、樹立に際し c-MYC と BCL-XL というがん化との関連性が指摘される遺伝子[43,44]を用いているものの、赤血球分化最終段階において脱核させることが出来れば、これらのがん原性リスクを極力低くすること

が可能である。万が一、少量の残存した有核細胞が混入した際にも、従来の輸血製剤と同様に放射線照射(ガンマ線照射)を行うことで、核を不活化することで最終的な安全性の担保を図ることが可能である。しかしながら、これらの細胞株における脱核率は現在のところ低く(約1~3%程度)、今後の実用化における大きな課題である。そこで、脱核率の向上を図るべく培養方法の工夫や遺伝子・化合物によるインターベンションが必要であると考えられる。脱核を促進する化合物や遺伝子の同定にあたり、これらの株を用いたスクリーニング系を現在検討中である。

また、赤血球の輸血においては、その血液型を考慮する必要がある。しかしながら、ヒト iPS 細胞からこれらの細胞株が樹立出来れば、これらの課題も解決出来る。ヒト iPS 細胞は、樹立元となる細胞の遺伝情報を保持するという特徴を有する。そのため、特定の血液型ドナー、例えば O 型 Rh(D)陰性血液型ドナーからヒト iPS 細胞を樹立し[45]、さらに今回と同様の方法を用いてヒト iPS 細胞由来不死化赤芽球株を樹立することで、これらから産生された赤血球は理論上、ほぼ全てのすべての患者へ供給することが可能となる。しかしながら、ヒト ES 細胞と同様に、ヒト iPS 細胞を用いた株の樹立効率は非常に低いことから、今後これらの効率を高めるための工夫が必要である。

以上のような取り組みから、これらの赤芽球株を用いて効率よく O 型 Rh(D)

陰性脱核赤血球を産生することが出来るようになれば、ドナーに依存しない次世代の血液供給システムの実現が近づくこととなり、今後の医療・医学の発展にも大いに貢献できると考えられる。

4. 参考文献

- [1] K. Miharada, T. Hiroshima, K. Sudo, T. Nagasawa, Y. Nakamura, Efficient enucleation of erythroblasts differentiated in vitro from hematopoietic stem and progenitor cells, *Nat Biotechnol* 24 (2006) 1255-1256.
- [2] A.R. Migliaccio, C. Whitsett, G. Migliaccio, Erythroid cells in vitro: from developmental biology to blood transfusion products, *Curr Opin Hematol* 16 (2009) 259-268.
- [3] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell* 131 (2007) 861-872.
- [4] S.T. Nance, How to find, recruit and maintain rare blood donors, *Curr Opin Hematol* 16 (2009) 503-508.
- [5] V.G. Sankaran, J. Xu, S.H. Orkin, Advances in the understanding of haemoglobin switching, *Br J Haematol* 149 (2010) 181-194.
- [6] C. Cerdan, A. Rouleau, M. Bhatia, VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells, *Blood* 103 (2004) 2504-2512.
- [7] J. Dias, M. Gumenyuk, H. Kang, M. Vodyanik, J. Yu, J.A. Thomson, Slukvin, II, Generation of red blood cells from human induced pluripotent stem cells, *Stem Cells Dev* 20 (2011) 1639-1647.
- [8] D.S. Kaufman, E.T. Hanson, R.L. Lewis, R. Auerbach, J.A. Thomson, Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 10716-10721.
- [9] O. Klimchenko, M. Mori, A. Distefano, T. Langlois, F. Larbret, Y. Lecluse, O. Feraud, W. Vainchenker, F. Norol, N. Debili, A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis, *Blood* 114 (2009) 1506-1517.
- [10] M.H. Ledran, A. Krassowska, L. Armstrong, I. Dimmick, J. Renstrom, R. Lang, S. Yung, M. Santibanez-Coref, E. Dzierzak, M. Stojkovic, R.A. Oostendorp, L. Forrester, M. Lako, Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on

- stromal cells derived from hematopoietic niches, *Cell Stem Cell* 3 (2008) 85-98.
- [11] F. Ma, Y. Ebihara, K. Umeda, H. Sakai, S. Hanada, H. Zhang, Y. Zaïke, E. Tsuchida, T. Nakahata, H. Nakauchi, K. Tsuji, Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 13087-13092.
- [12] A.R. Migliaccio, C. Whitsett, T. Papayannopoulou, M. Sadelain, The potential of stem cells as an in vitro source of red blood cells for transfusion, *Cell Stem Cell* 10 (2012) 115-119.
- [13] E.N. Olivier, C. Qiu, M. Velho, R.E. Hirsch, E.E. Bouhassira, Large-scale production of embryonic red blood cells from human embryonic stem cells, *Exp Hematol* 34 (2006) 1635-1642.
- [14] T. Peyrard, L. Bardiaux, C. Krause, L. Kobari, H. Lapillonne, G. Andreu, L. Douay, Banking of pluripotent adult stem cells as an unlimited source for red blood cell production: potential applications for alloimmunized patients and rare blood challenges, *Transfus Med Rev* 25 (2011) 206-216.
- [15] K. Nishimura, M. Sano, M. Ohtaka, B. Furuta, Y. Umemura, Y. Nakajima, Y. Ikehara, T. Kobayashi, H. Segawa, S. Takayasu, H. Sato, K. Motomura, E. Uchida, T. Kanayasu-Toyoda, M. Asashima, H. Nakauchi, T. Yamaguchi, M. Nakanishi, Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming, *J Biol Chem* 286 (2011) 4760-4771.
- [16] T. Nishimura, S. Kaneko, A. Kawana-Tachikawa, Y. Tajima, H. Goto, D. Zhu, K. Nakayama-Hosoya, S. Iriguchi, Y. Uemura, T. Shimizu, N. Takayama, D. Yamada, K. Nishimura, M. Ohtaka, N. Watanabe, S. Takahashi, A. Iwamoto, H. Koseki, M. Nakanishi, K. Eto, H. Nakauchi, Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation, *Cell Stem Cell* 12 (2013) 114-126.
- [17] N. Takayama, H. Nishikii, J. Usui, H. Tsukui, A. Sawaguchi, T. Hiroyama, K. Eto, H. Nakauchi, Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors, *Blood* 111 (2008) 5298-5306.
- [18] N. Takayama, S. Nishimura, S. Nakamura, T. Shimizu, R. Ohnishi, H. Endo, T. Yamaguchi, M. Otsu, K. Nishimura, M. Nakanishi, A. Sawaguchi, R. Nagai, K. Takahashi, S. Yamanaka, H. Nakauchi, K. Eto, Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells, *J Exp Med* 207 (2010) 2817-2830.
- [19] T. Kobayashi, T. Yamaguchi, S. Hamanaka, M. Kato-Itoh, Y. Yamazaki, M. Ibata, H.

- Sato, Y.S. Lee, J. Usui, A.S. Knisely, M. Hirabayashi, H. Nakauchi, Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells, *Cell* 142 (2010) 787-799.
- [20] K. Eto, H. Nishikii, T. Ogaeri, S. Suetsugu, A. Kamiya, T. Kobayashi, D. Yamazaki, A. Oda, T. Takenawa, H. Nakauchi, The WAVE2/Abi1 complex differentially regulates megakaryocyte development and spreading: implications for platelet biogenesis and spreading machinery, *Blood* 110 (2007) 3637-3647.
- [21] S. Hirata, N. Takayama, R. Jono-Ohnishi, H. Endo, S. Nakamura, T. Dohda, M. Nishi, Y. Hamazaki, E. Ishii, S. Kaneko, M. Otsu, H. Nakauchi, S. Kunishima, K. Eto, Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia iPS cells exhibit defective MPL-mediated signaling, *J Clin Invest* 123 (2013) 3802-3814.
- [22] M.A. Vodyanik, J.A. Thomson, Slukvin, II, Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures, *Blood* 108 (2006) 2095-2105.
- [23] K. Kim, R. Zhao, A. Doi, K. Ng, J. Unternaehrer, P. Cahan, H. Huo, Y.H. Loh, M.J. Aryee, M.W. Lensch, H. Li, J.J. Collins, A.P. Feinberg, G.Q. Daley, Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells, *Nat Biotechnol* 29 (2011) 1117-1119.
- [24] K. Kim, A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, J. Kim, M.J. Aryee, H. Ji, L.I. Ehrlich, A. Yabuuchi, A. Takeuchi, K.C. Cunniff, H. Hongguang, S. McKinney-Freeman, O. Naveiras, T.J. Yoon, R.A. Irizarry, N. Jung, J. Seita, J. Hanna, P. Murakami, R. Jaenisch, R. Weissleder, S.H. Orkin, I.L. Weissman, A.P. Feinberg, G.Q. Daley, Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells, *Nature* 467 (2010) 285-290.
- [25] V.G. Sankaran, S.H. Orkin, The switch from fetal to adult hemoglobin, *Cold Spring Harb Perspect Med* 3 (2013) a011643.
- [26] D.E. Bauer, S.C. Kamran, S.H. Orkin, Reawakening fetal hemoglobin: prospects for new therapies for the beta-globin disorders, *Blood* 120 (2012) 2945-2953.
- [27] V.G. Sankaran, J. Xu, T. Ragozy, G.C. Ippolito, C.R. Walkley, S.D. Maika, Y. Fujiwara, M. Ito, M. Groudine, M.A. Bender, P.W. Tucker, S.H. Orkin, Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A, *Nature* 460 (2009) 1093-1097.
- [28] D. Zhou, K. Liu, C.W. Sun, K.M. Pawlik, T.M. Townes, KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching, *Nat Genet* 42 (2010) 742-744.
- [29] V.G. Sankaran, T.F. Menne, J. Xu, T.E. Akie, G. Lettre, B. Van Handel, H.K. Mikkola, J.N. Hirschhorn, A.B. Cantor, S.H. Orkin, Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A, *Science* 322 (2008) 1839-1842.

- [30] J. Palis, J. Malik, R.L. Emerson, T.P. Bushnell, K.E. McGrath, M. Bulger, P.D. Kingsley, "Maturational" globin switching in primary primitive erythroid cells, *Blood* 106 (2005) 1012a-1012a.
- [31] A. Hill, S.C. Hardies, S.J. Phillips, M.G. Davis, C.A. Hutchison, 3rd, M.H. Edgell, Two mouse early embryonic beta-globin gene sequences. Evolution of the nonadult beta-globins, *J Biol Chem* 259 (1984) 3739-3747.
- [32] C.B. Lozzio, B.B. Lozzio, Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome, *Blood* 45 (1975) 321-334.
- [33] L.C. Andersson, K. Nilsson, C.G. Gahmberg, K562--a human erythroleukemic cell line, *Int J Cancer* 23 (1979) 143-147.
- [34] N. Komatsu, M. Yamamoto, H. Fujita, A. Miwa, K. Hatake, T. Endo, H. Okano, T. Katsube, Y. Fukumaki, S. Sassa, et al., Establishment and characterization of an erythropoietin-dependent subline, UT-7/Epo, derived from human leukemia cell line, UT-7, *Blood* 82 (1993) 456-464.
- [35] S. Hirose, N. Takayama, S. Nakamura, K. Nagasawa, K. Ochi, S. Hirata, S. Yamazaki, T. Yamaguchi, M. Otsu, S. Sano, N. Takahashi, A. Sawaguchi, M. Ito, T. Kato, H. Nakauchi, K. Eto, Immortalization of Erythroblasts by c-MYC and BCL-XL Enables Large-Scale Erythrocyte Production from Human Pluripotent Stem Cells, *Stem Cell Reports* 1 (2013) 499-508.
- [36] P. Ji, M. Murata-Hori, H.F. Lodish, Formation of mammalian erythrocytes: chromatin condensation and enucleation, *Trends Cell Biol* 21 (2011) 409-415.
- [37] K. Hafid-Medheb, Y. Augery-Bourget, M.N. Minatchy, N. Hanania, J. Robert-Lezenes, Bcl-XL is required for heme synthesis during the chemical induction of erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells independently of its antiapoptotic function, *Blood* 101 (2003) 2575-2583.
- [38] L. Haughn, R.G. Hawley, D.K. Morrison, H. von Boehmer, D.M. Hockenbery, BCL-2 and BCL-XL restrict lineage choice during hematopoietic differentiation, *J Biol Chem* 278 (2003) 25158-25165.
- [39] S.R. Jayapal, K.L. Lee, P. Ji, P. Kaldis, B. Lim, H.F. Lodish, Down-regulation of Myc is essential for terminal erythroid maturation, *J Biol Chem* 285 (2010) 40252-40265.
- [40] M.C. Giarratana, L. Kobari, H. Lapillonne, D. Chalmers, L. Kiger, T. Cynober, M.C. Marden, H. Wajcman, L. Douay, Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells, *Nat Biotechnol* 23 (2005) 69-74.
- [41] M.C. Giarratana, H. Rouard, A. Dumont, L. Kiger, I. Safeukui, P.Y. Le Pennec, S. Francois, G. Trugnan, T. Peyrard, T. Marie, S. Jolly, N. Hebert, C. Mazurier, N. Mario, L. Harmand, H. Lapillonne, J.Y. Devaux, L. Douay, Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells, *Blood* 118 (2011) 5071-5079.

- [42] H. Lapillonne, L. Kobari, C. Mazurier, P. Tropel, M.C. Giarratana, I. Zanella-Cleon, L. Kiger, M. Wattenhofer-Donze, H. Puccio, N. Hebert, A. Francina, G. Andreu, S. Viville, L. Douay, Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine, *Haematologica* 95 (2010) 1651-1659.
- [43] S. Pelengaris, M. Khan, G. Evan, c-MYC: more than just a matter of life and death, *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 764-776.
- [44] F. Tzifi, C. Economopoulou, D. Gourgiotis, A. Ardavanis, S. Papageorgiou, A. Scorilas, The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias, *Adv Hematol* 2012 (2012) 524308.
- [45] J. Zou, P. Mali, X. Huang, S.N. Dowey, L. Cheng, Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease, *Blood* 118 (2011) 4599-4608.

5. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、終始親身なご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター 幹細胞治療部門教授 中内啓光 教授に謹んで感謝の意を表します。また実験を行うにあたり、親身な御指導、貴重な御助言を賜りました京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 江藤浩之 教授に心から感謝申し上げます。

6. 図表

以下に図表を添付する。

図1-A

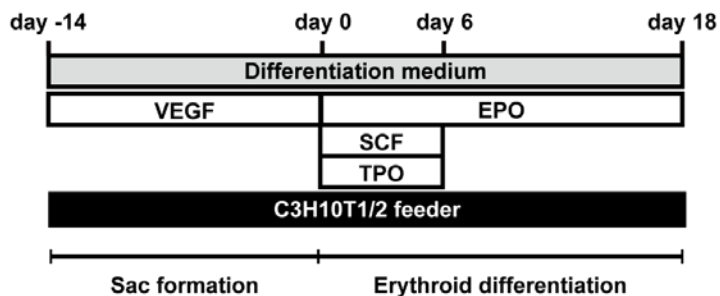


図1-B

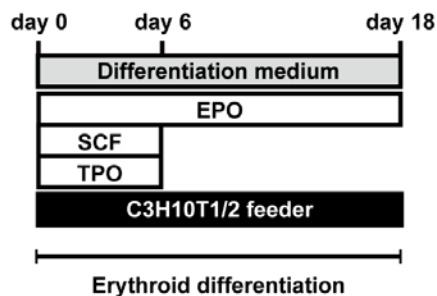


図1-C

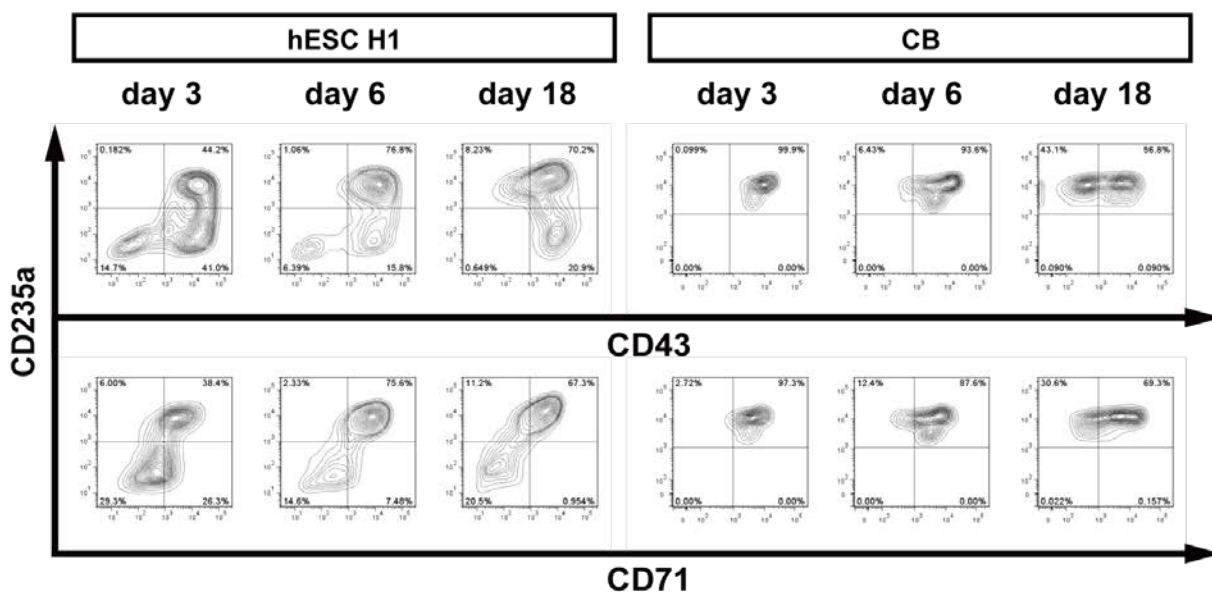


図1. ヒト多能性幹細胞からの赤芽球分化

(A) ヒトES/iPS細胞からのサック形成を用いた赤芽球分化プロトコル: ヒトES/iPS細胞はVEGFを含む分化培地を用いてマウス間葉系細胞株C3H10T1/2細胞と共培養することで囊胞状の構造物(hES/iPS-sac)を形成し、CD34陽性血液前駆細胞を誘導できる。(B) ヒト臍帯血CD34陽性細胞からの赤芽球分化プロトコル (C) フローサイトメーターにおける細胞表面抗原(CD235a, CD43, CD71)発現解析: ヒトES細胞H1株及びヒト臍帯血CD34陽性細胞から分化された赤芽球。図中の日付はそれぞれCD34陽性細胞から赤芽球分化を行ったときの経過(day)を示す。

differentiation medium : 分化培地, VEGF : vascular endothelial growth factor 血管内皮細胞増殖因子, EPO : erythropoietin エリスロポイエチン, SCF : stem cell factor ステムセルフアクター, TPO : thrombopoietin トロンボポエチン, C3H10T1/2 feeder : マウス間葉系細胞株C3H10T1/2, sac formation : sac形成, erythroid differentiation : 赤芽球分化, CB:ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞

図2-A

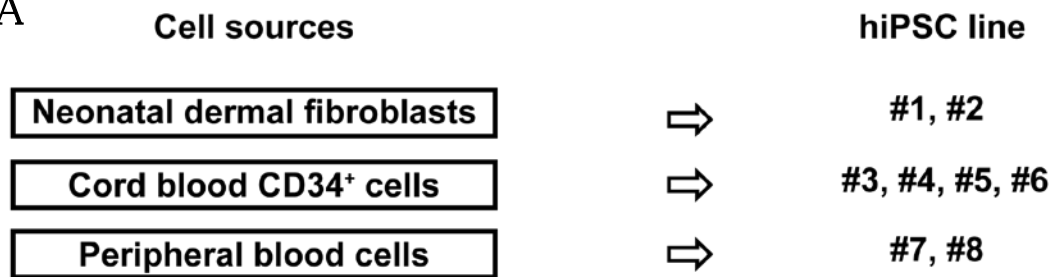


図2-B

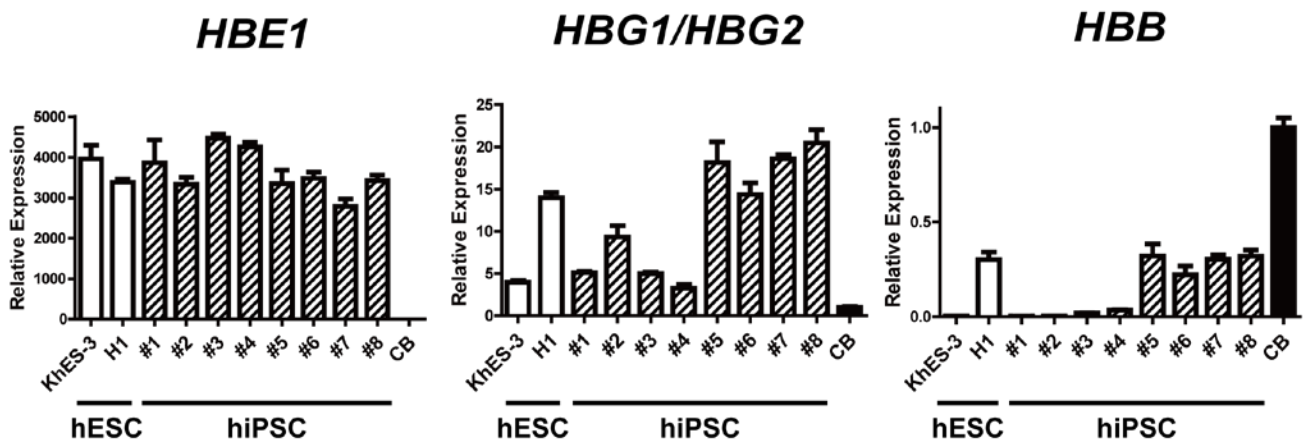


図2-C

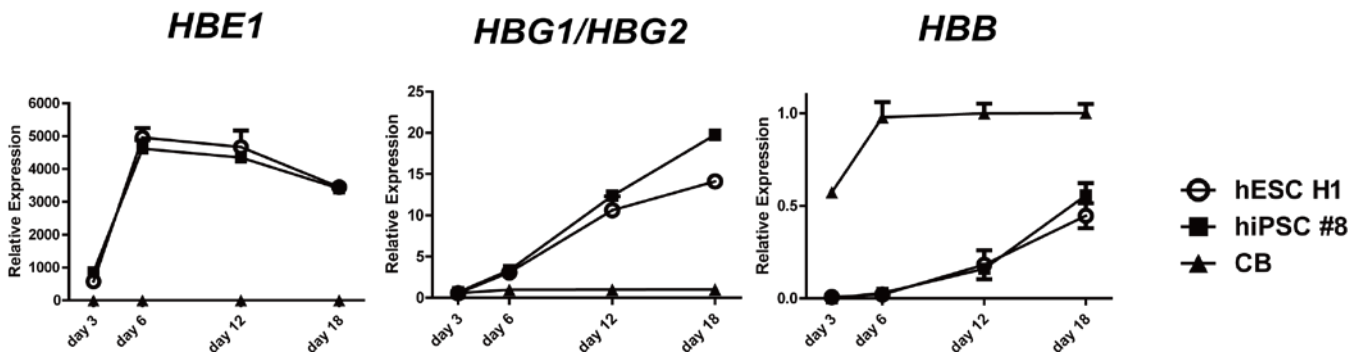


図2 ヒトES/iPS細胞及びヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球におけるグロビン発現

(A) ヒトiPS細胞樹立に用いた由来細: ヒトiPS細胞樹立はセンダイウイルスを用いた遺伝子導入により樹立を行った。左には由来細胞、右にヒトiPS細胞のクローン名を示す。(B) ヒトES細胞(KhES-3株, H1株)、ヒトiPS細胞株(#1-#8)、ヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球(各分化第18日目)におけるグロビン遺伝子(HBE1, HBG1/HBG2, HBB)の発現:ヒトES細胞H1株、ヒトiPS細胞#5-#8株においてHBB遺伝子の発現を認める。(n=3, mean ± SD) (C) ヒトES細胞H1株及びヒトiPS細胞#8株の赤芽球分化における経時的グロビン遺伝子発現:ヒトES/iPS細胞由来赤芽球においてHBE1遺伝子、HBG1/HBG2遺伝子及びHBB遺伝子の発現を認める。HBE1遺伝子について分化第6日目以降の発現抑制を認める。(n=3, mean ± SD)

図3-A

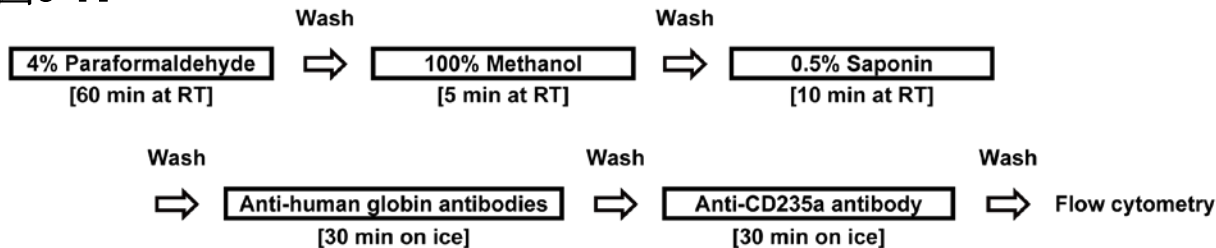


図3-B

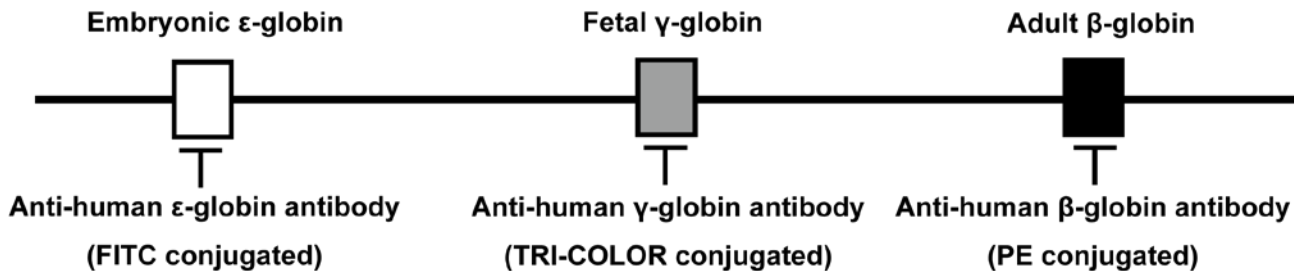


図3-C

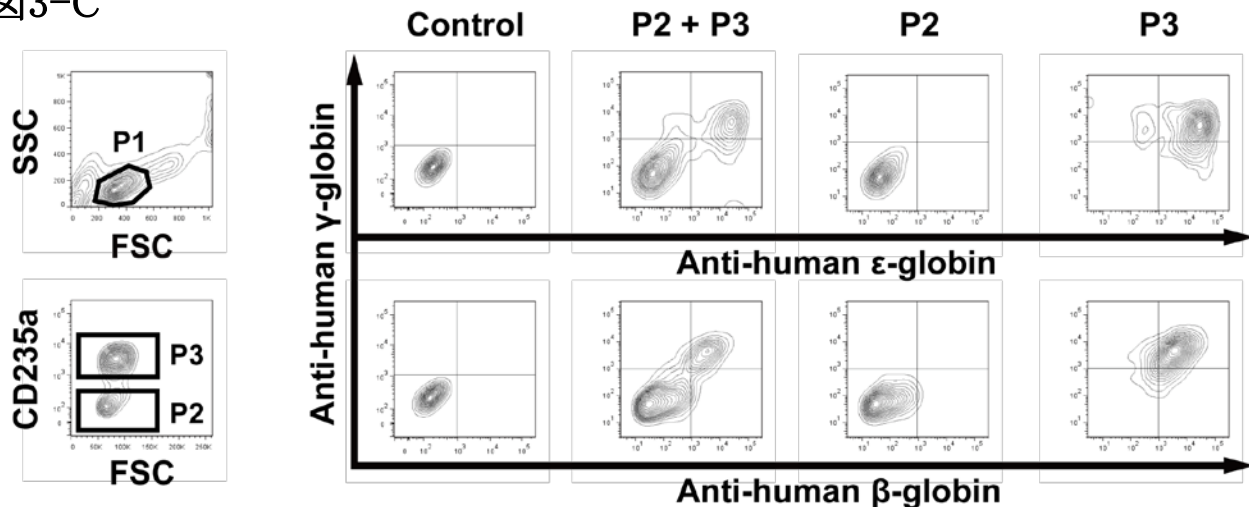
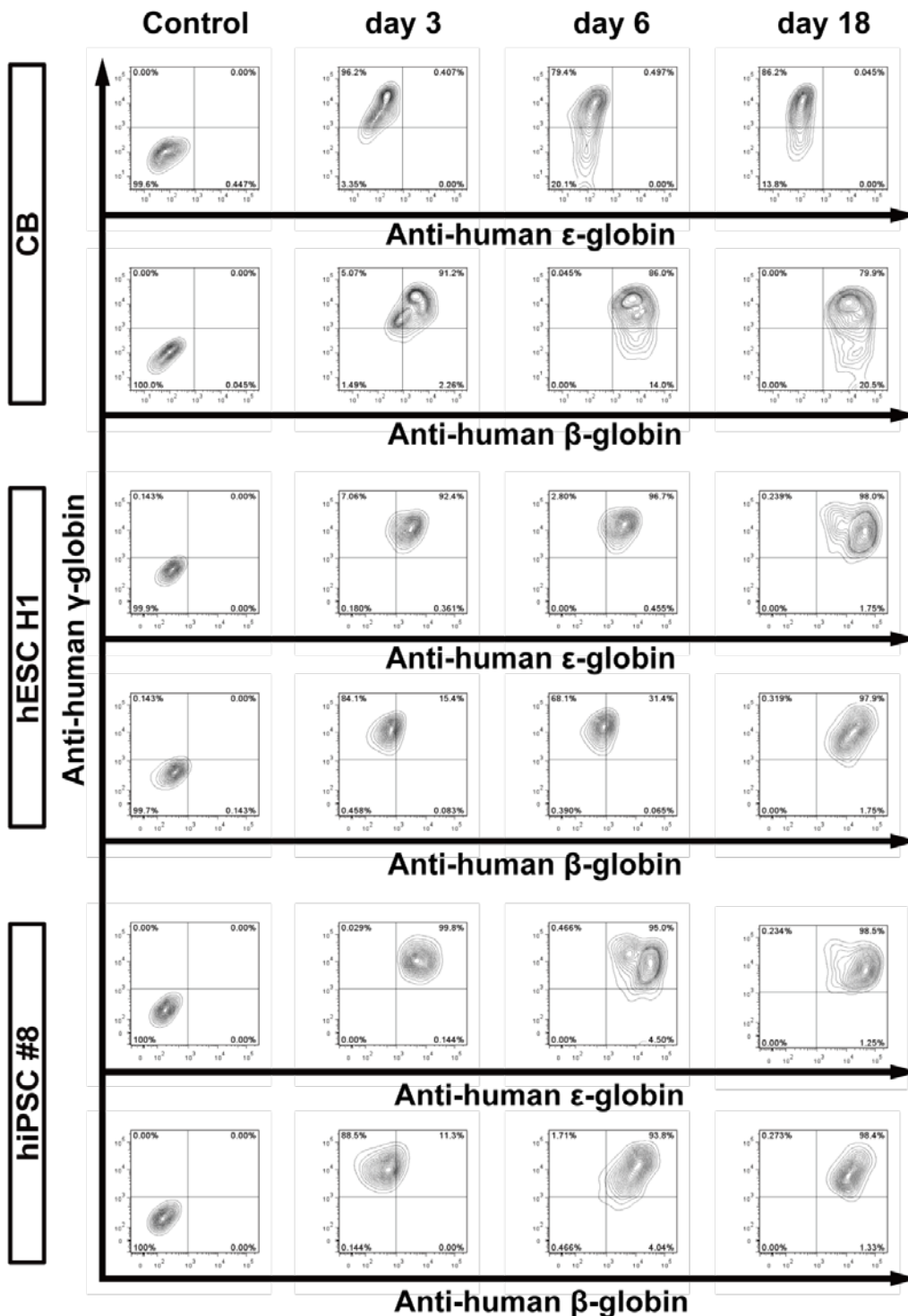


図3 グロビン蛋白に対する細胞内染色法とフローサイトメーターを用いた解析方法

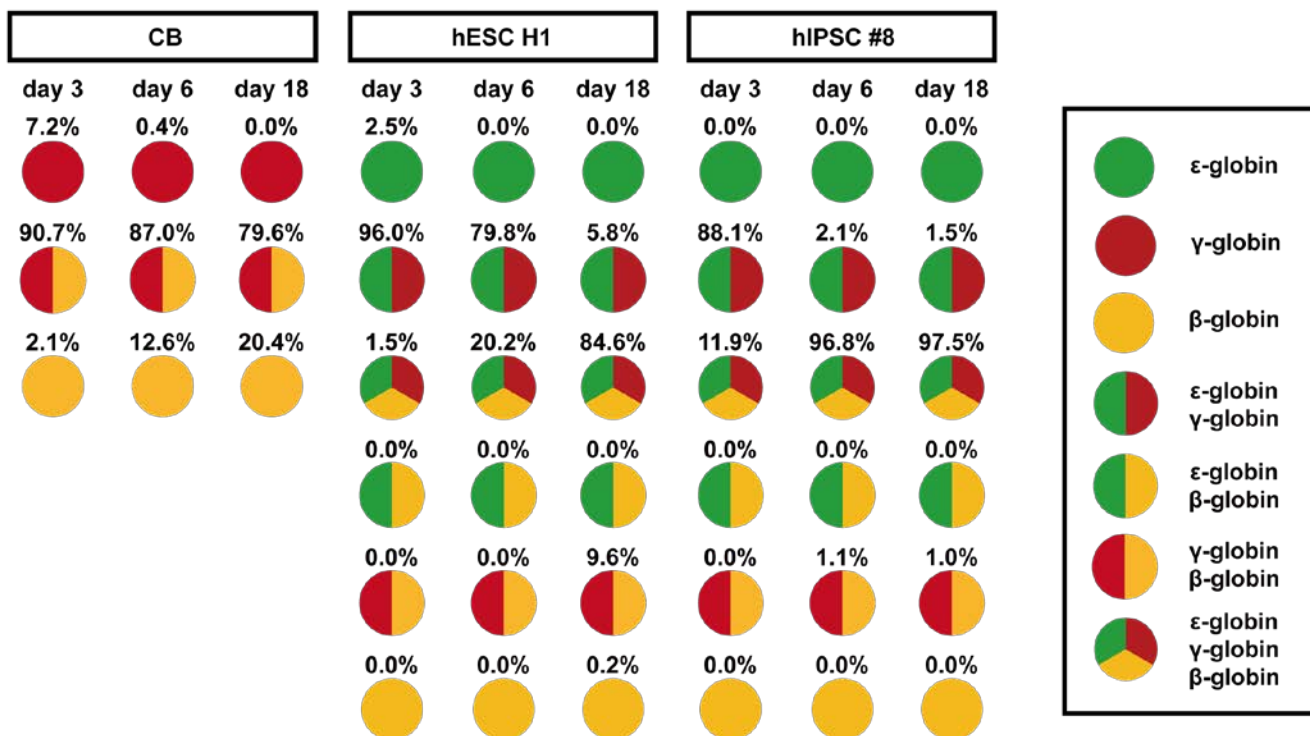
(A) 細胞内染色法プロトコル (B) 各ヒトグロビン蛋白(ϵ -, γ -, β グロビン)に対する蛍光標識抗体の組み合わせ (C) フローサイトメーターによる赤芽球グロビン発現解析手順 正常細胞と死細胞を区別するためにSSC/FSCの展開においてP1ゲートで示すような細胞集団を選択した。さらに Pacific Blue conjugated anti-CD235a陽性細胞もしくはCD235a陰性細胞はそれぞれP3及びP2にてゲートした。なお、Pacific Blue conjugated anti-CD235a抗体については、350 nmレーザーにて解析を行った。さらに、それらの集団のうち、FITC陽性(ϵ グロビン抗体陽性)細胞は488 nmレーザーにて、TRI-COLOR陽性(γ グロビン抗体陽性)細胞は633 nmレーザーにて、PE陽性(β グロビン抗体陽性)細胞は561 nmレーザーにて解析を行った。アイソタイプコントロールとして、下記のマウスIgG抗体を用いた。normal mouse IgG1-FITC, normal mouse IgG1-PE-Cy5 and normal mouse IgG1-PE. 図にはそれぞれの集団で展開した時の各グロビン抗体の発現を二次元展開で示す(上図: x軸 抗ヒト ϵ グロビン抗体, y軸 抗ヒト γ グロビン抗体, 下図: x軸 抗ヒト β グロビン抗体, y軸 抗ヒト γ グロビン抗体)。検体としてヒトES細胞H1株 分化第18日目を用いた。

図3-D



(D) ヒトES細胞H1株、ヒトiPS細胞#8株、ヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球におけるフローサイトメーターを用いた経時的グロビン蛋白発現解析:ヒトES/iPS細胞由来赤芽球では、 γ グロビン陽性 β グロビン陽性を認める。 ϵ グロビンについては一部陰転化を認める。ヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球においては、 ϵ グロビンの発現は認められず、 γ グロビン陽性 β グロビン陽性を示す。さらに、 γ グロビンの陰転化を認める。図中の日付はそれぞれCD34陽性細胞から赤芽球分化を行ったときの経過(day)を示す。

図3-E



(E) ヒトES/iPS細胞及びヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球における抗ヒトグロビン抗体陽性細胞の模式図 数字は各抗ヒトグロビン抗体陽性細胞の割合を示す。(数字は各グロビン発現細胞の割合を%で示す。(n=3, mean))

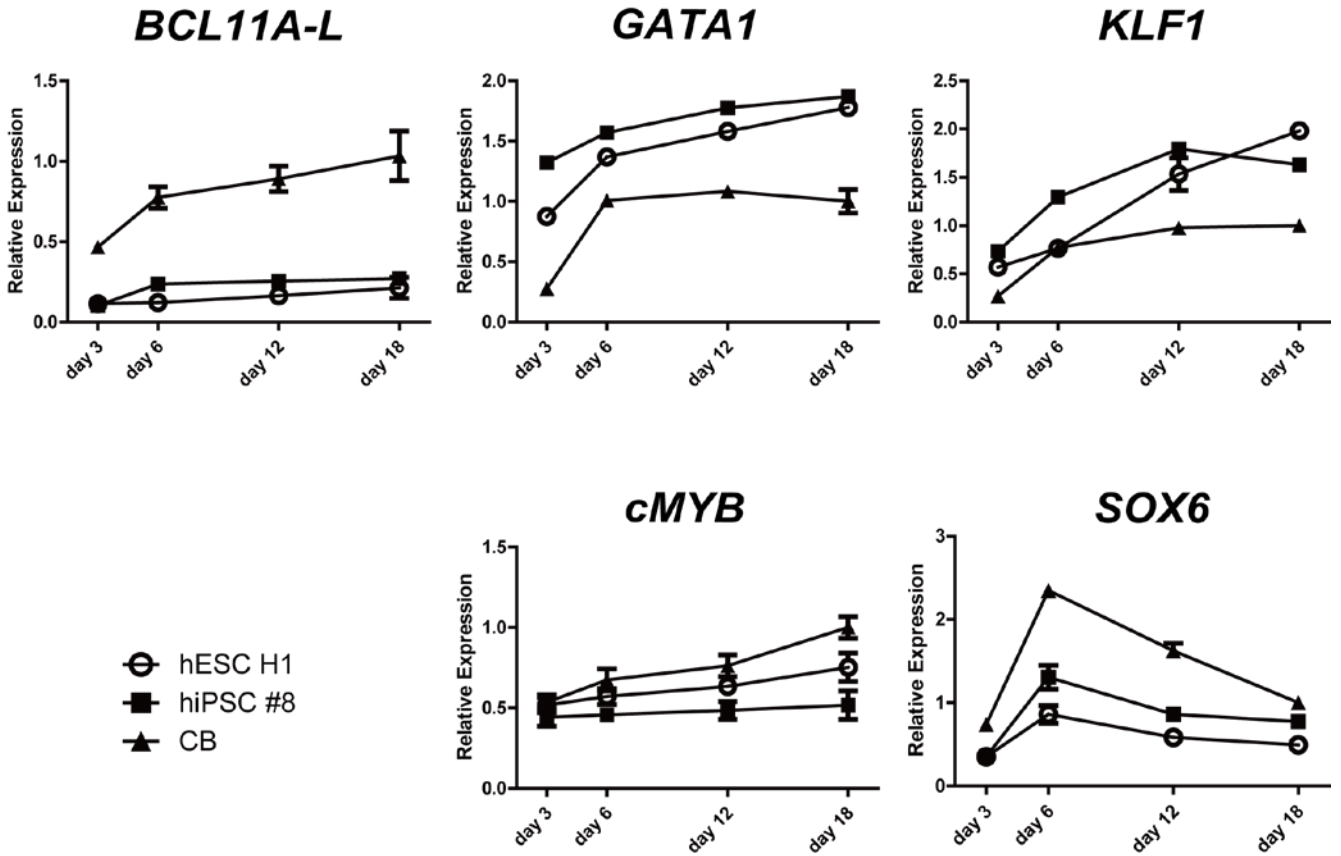


図4 ヒトES/iPS細胞(hESC H1株及びhiPS細胞 #8株)及びヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球におけるグロビンスイッチングに関連する遺伝子の経時的発現解析
 ヒトES/iPS細胞(hESC H1株及びhiPS細胞 #8株)及びヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球の分化第3, 6, 12, 18日目におけるBCL11A-L, GATA1, KLF1, cMYB, SOX6遺伝子の発現解析。ヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球と比較してヒトES/iPS細胞(hESC H1株及びhiPS細胞 #8株)では、BCL11A-L遺伝子の発現が低いことがわかる。(n=3, mean ± SD)

図5-A

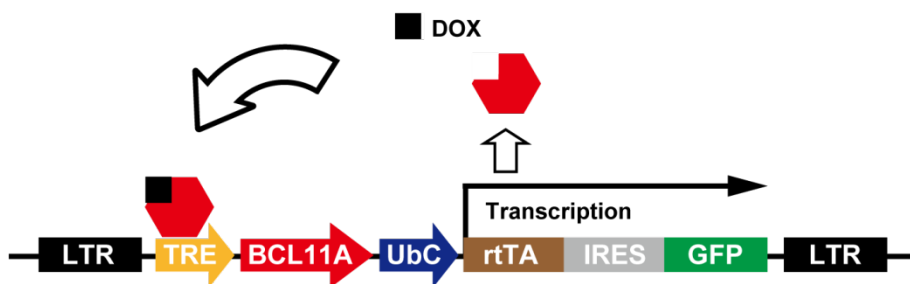


図5-B

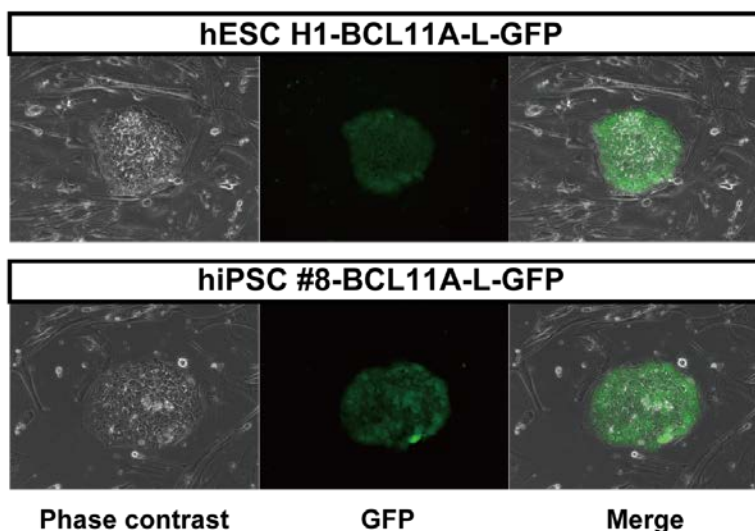


図5-C

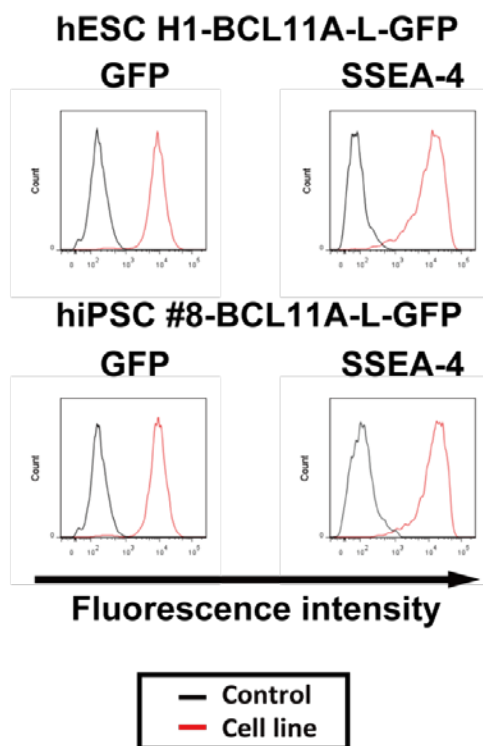


図5 BCL11A-L遺伝子のヒトES/iPS細胞への導入

(A) BCL11A-L発現ドキシサイクリン誘導レンチウイルスベクター (B) ベクターが導入された BCL11A-L発現ヒトES細胞H1株(hESC H1-BCL11A-L-GFP)及びBCL11A-L発現ヒトiPS細胞#8株 (hiPSC #8-BCL11A-L-GFP)の写真。フィーダーとしてマウス胚性線維芽細胞(mouse embryonic feeder cells)を用いている。左:位相差顕微鏡像, 中央:GFP像, 右:マージ画像。 Bar:100 μ m (C) BCL11A-L遺伝子発現ヒトES/iPS細胞株におけるGFP及びSSEA-4発現

DOX : doxycycline ドキシサイクリン, LTR : long terminal repeat, TRE : tetracycline response element テトラサイクリン応答配列, UbC : ユビキチンCプロモーター, rtTA : テトラサイクリン制御性トランス活性化因子, IRES : internal ribosome entry site 内部リボソーム導入部位, GFP : 緑色蛍光タンパク質 green fluorescent protein

図6-A

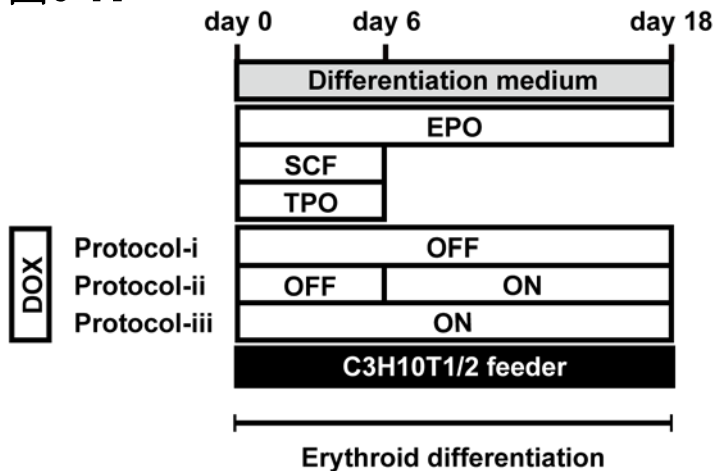


図6-B

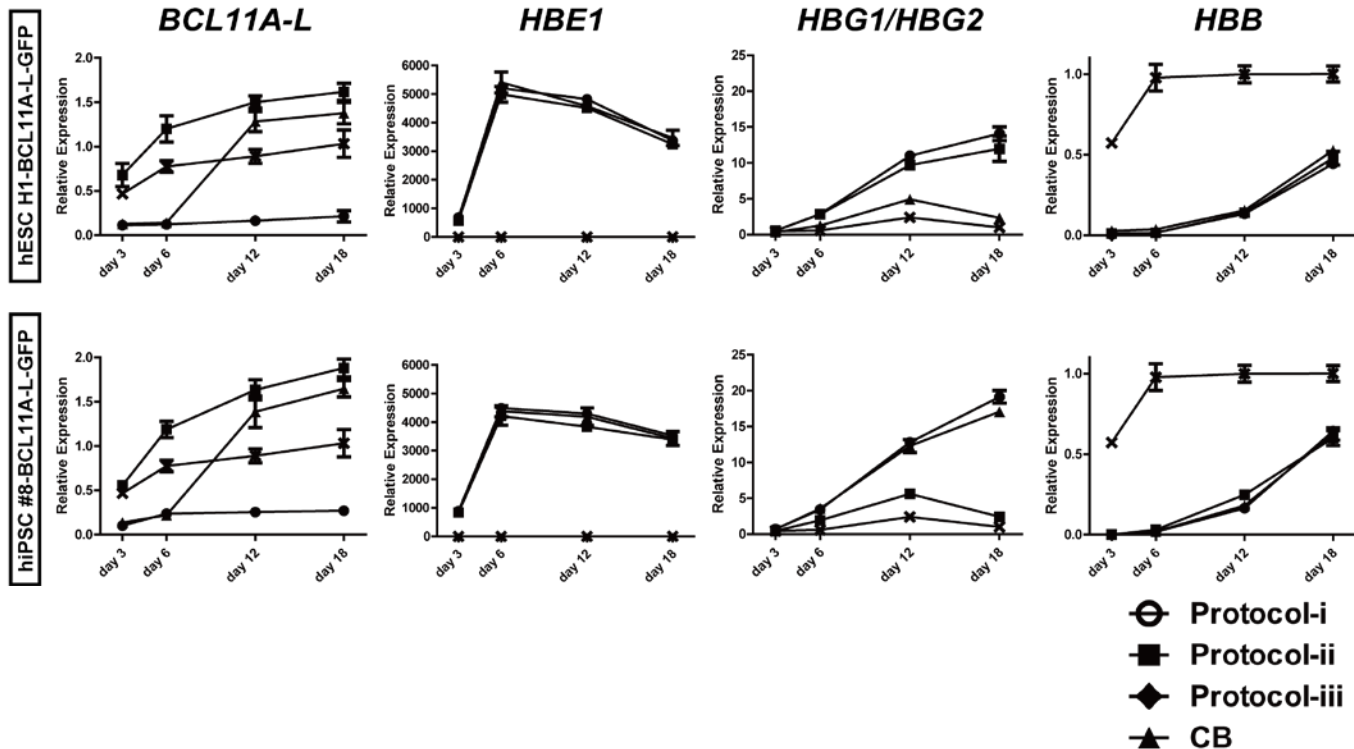
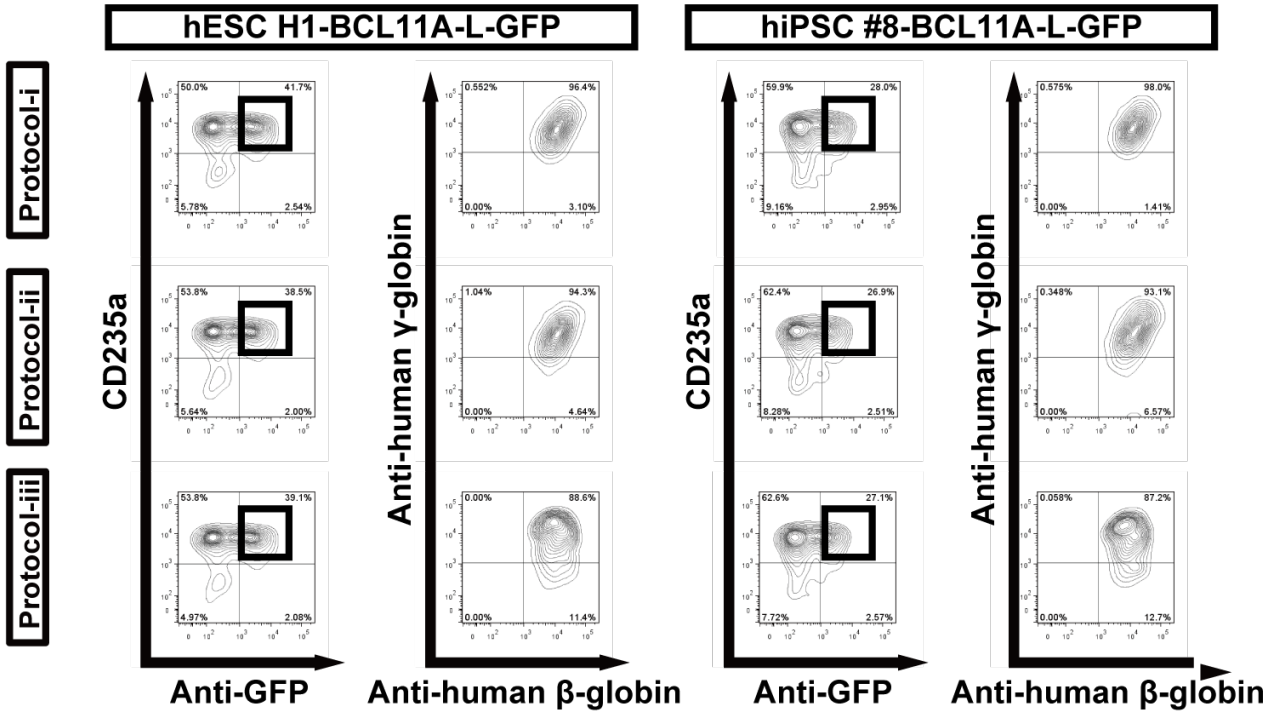


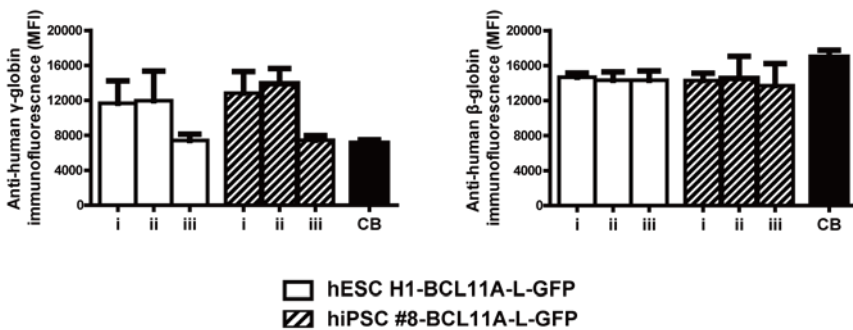
図6 ヒトES/iPS細胞由来赤芽球におけるBCL11A-L強制発現

(A) BCL11A-L遺伝子発現ヒトES/iPS細胞株からの赤芽球分化とDOX制御による遺伝子強制発現プロトコル: 培養中のDOXの添加は以下のプロトコルに従った。Protocol-i: DOXを加えずに培養、Protocol-ii: 分化第6日目から第18日目までDOXを加えて培養、Protocol-iii: 分化第0日目から第18日目までDOXを加えて培養。(B) BCL11A-L遺伝子発現ヒトES/iPS細胞株由来赤芽球におけるBCL11A-L, HBE1, HBG1/HBG2, HBB遺伝子の発現解析: Protocol-iiiにおいてHBG1/HBG2の抑制を認めた。(n=3, mean ± SD)

☒6-C

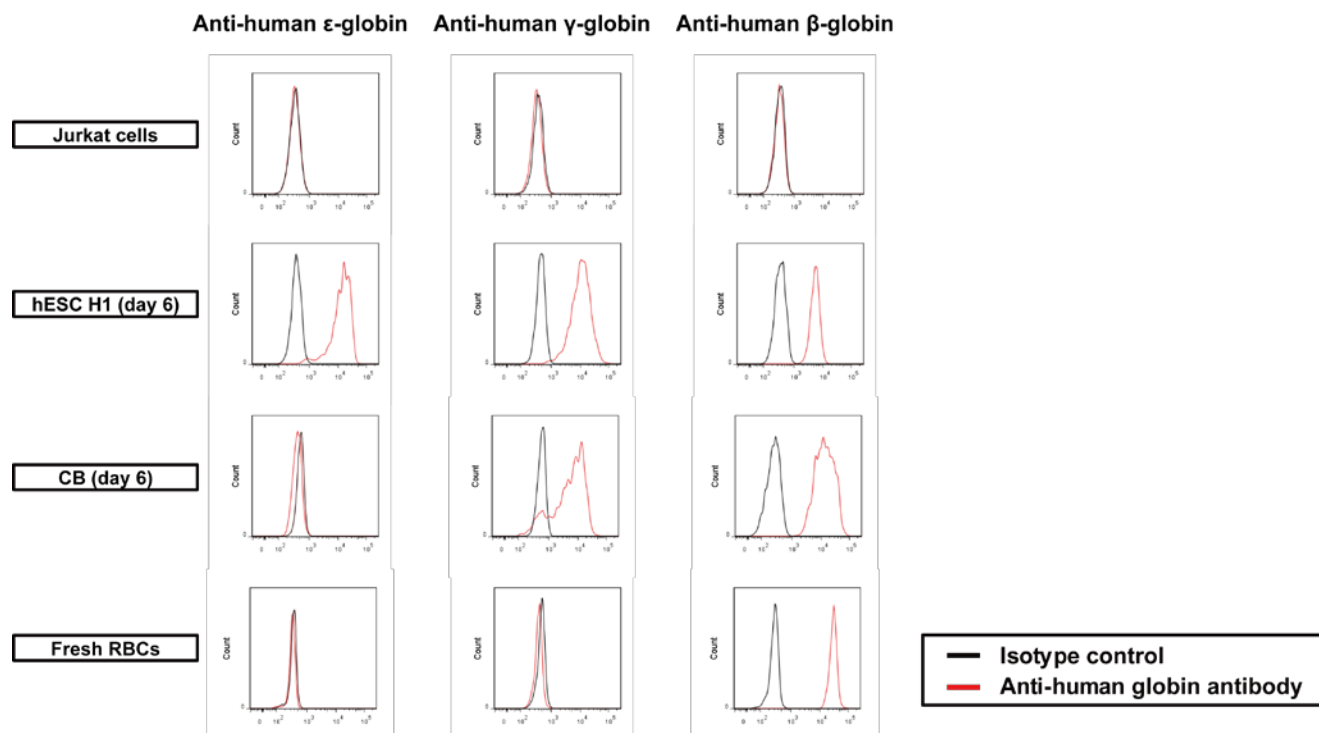


☒6-D

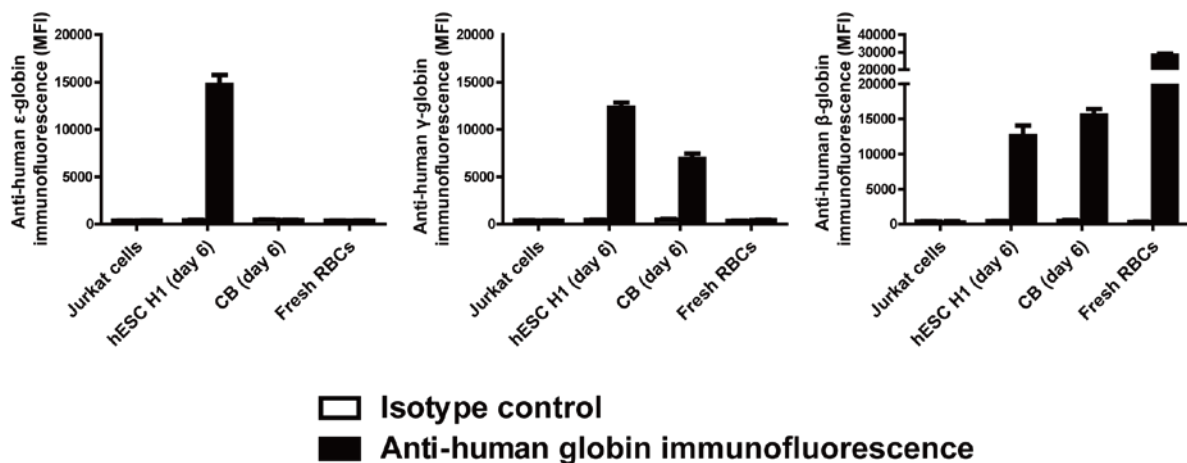


(C) BCL11A-L遺伝子発現ヒトES/iPS細胞株由来赤芽球におけるフローサイトメーターを用いたグロビン蛋白発現解析: CD235陽性かつGFP陽性細胞をゲートし解析を行った(分化第18日目)。Protocol-iiiにおいて γ グロビンの抑制を認める。(D) 上記の結果を平均発現強度(mean fluorescence intensity, MFI)にて示す。(n=3, mean \pm SD)

補足図-A



補足図-B



補足図 抗ヒトグロビン抗体の特異性の確認

(A) 各抗ヒトグロビン抗体の特異性を確認するために、Jurkat細胞(Jurkat cells)、ヒトES細胞H1株(分化第6日目)、ヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球(分化第6日目)及びヒト末梢血赤血球を用いて、同様の固定・浸透処理を行った上で、それぞれを各ヒトグロビン抗体(ϵ -, γ -, β グロビン)にて単染色で評価した。なお、ヒトES細胞H1株(分化第6日目)、ヒト臍帯血CD34陽性細胞由来赤芽球(分化第6日目)及びヒト末梢血赤血球については、Pacific Blue conjugated anti-human CD235aにて染色し、陽性細胞を解析した。Jurkat細胞については主要な集団を解析した。(B) 各抗体の蛍光発現強度を平均発現強度(MFI)にて示す。(n=3, mean \pm SD)。

表1

Gene	Sequence
<i>ε-globin (HBE1)</i>	Fw : GCA AGA AGG TGC TGA CTT CC Rv : ACC ATC ACG TTA CCC AGG AG
<i>γ-globin (HBG1/HBG2)</i>	Fw : TGG ATG ATC TCA AGG GCA C Rv : TCA GTG GTA TCT GGA GGA CA
<i>β-globin (HBB)</i>	Fw : CTG AGG AGA AGT CTG CCG TTA Rv : AGC ATC AGG AGT GGA CAG AT
<i>BCL11A-L</i>	Fw : CAG CTC AAA AGA GGG CAG AC Rv : GAG CTT CCA TCC GAA AAC TG
<i>GATA1</i>	Fw : AGC AGC TTC CTC CAC TGC Rv : TGG GTA CAC CTG AAA GAC TGG
<i>KLF1</i>	Fw : ACA CCA AGA GCT CCC ACC T Rv : GTA GTG GCG GGT CAG CTC
<i>c-MYB</i>	Fw : AGC AAG GTG CAT GAT CGT C Rv : GAT CAC ACC ATG ATG AAG AAT CAG
<i>SOX6</i>	Fw : ACA AAA GCA GCA TCC CTA GC Rv : GGC AGG GGA GTT GAG ACT AGA
<i>GAPDH</i>	Fw : AGC CAC ATC GCT CAG ACA C Rv : GCC CAA TAC GAC CAA ATC C

表1 リアルタイムPCRに用いたプライマーセット (5'側から3'側への配列を示す。)

図7-A

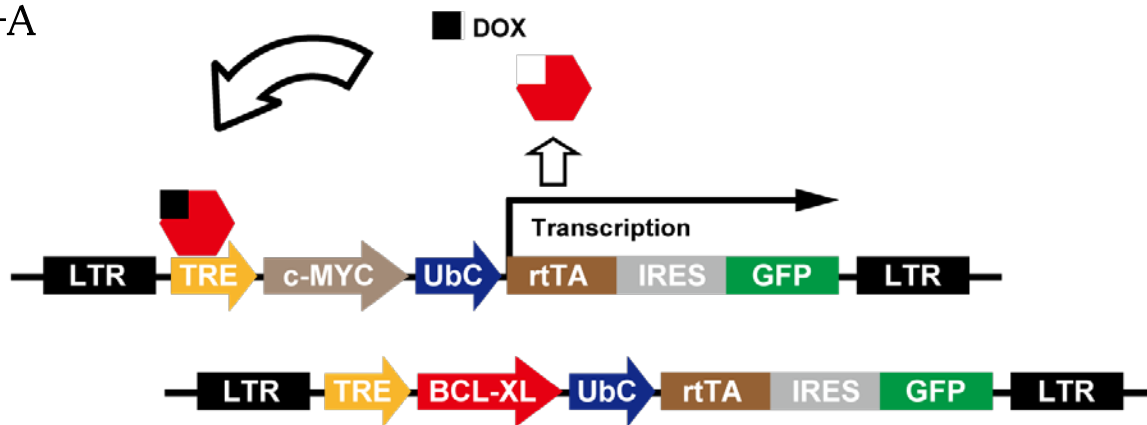


図7-B

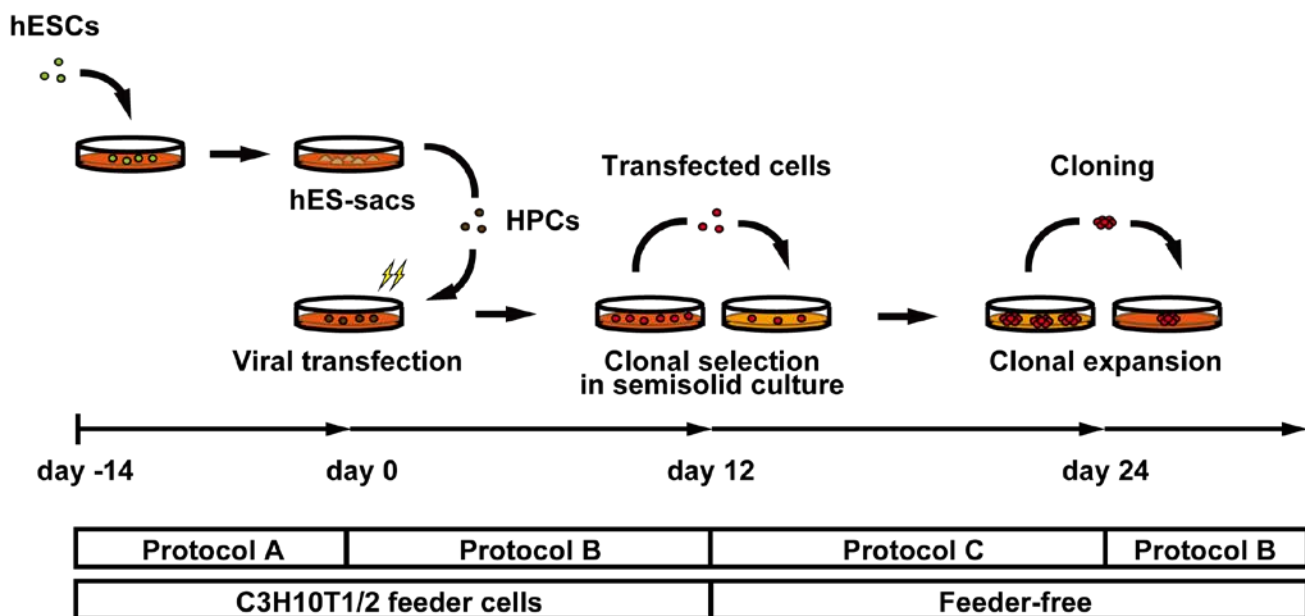


図7. ヒト胚性幹細胞由来不死化赤芽球株樹立方法

(A) 遺伝子導入に用いたドキシサイクリン制御性遺伝子発現ベクター構造
 ヒトc-MYCもしくはBCL-XP発現ドキシサイクリン誘導レンチウイルスベクターはGFPを発現し、ドキシサイクリン(DOX)によりc-MYCもしくはBCL-XL遺伝子の発現制御が可能である。

(B) 不死化赤芽球株樹立プロトコル
 ヒトES細胞は細胞塊の状態 Maus間葉系幹細胞株C3H10T1/2細胞と共培養を行う(樹立第-14日目～樹立第0日目)。樹立第0日目にヒトES-Sacより造血液前駆細胞(HPCs)を回収し、ウイルス感染を行う。その後、12日間培養を行い、樹立第12日目にウイルス感染を行った細胞を半固形培地へ播種し、さらに12日間培養を行う。樹立第24日目に半固形培地上のコロニーをクローニングし、引き続き新しいディッシュにて維持・増殖を行う。各分化段階においては以下の培養条件を用いた。培養条件A: 20 ng/mL VEGFを含む分化培地, 培養条件B: 50 nm/mL SCF, 5 IU/mL EPO, 1.0 μg/mLDOXを含む分化培地, 培養条件B: 1.0 μg/mLを含む半固形培地(MethoCult H4434)。

図8-A

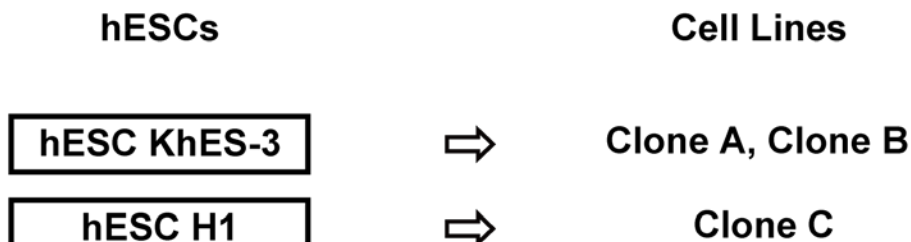


図8-B

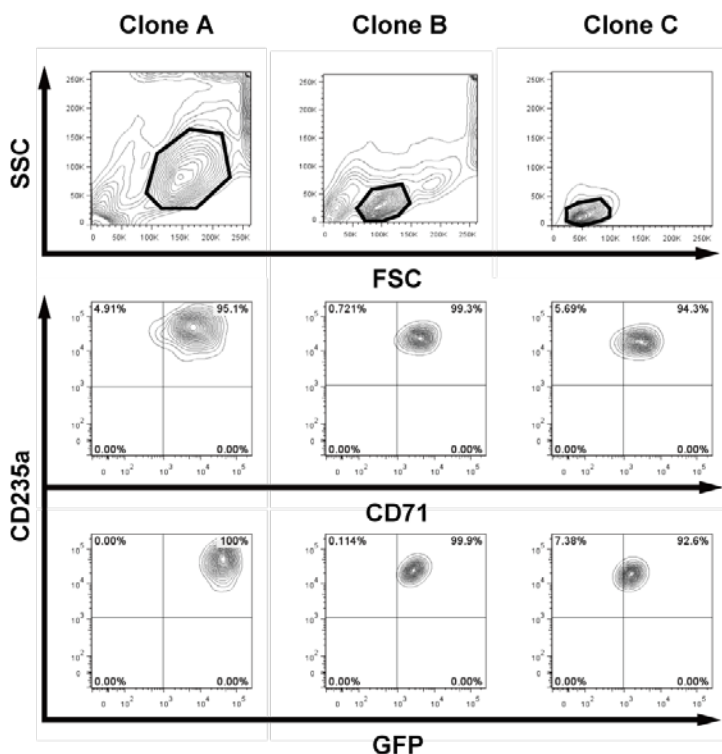


図8-C

図8. ヒト不死化赤芽球株は表面抗原CD235aを発現しながら指数関数的細胞増殖を示す

(A) ヒト不死化赤芽球株の由来

ヒト不死化赤芽球株クローンA及びBはヒトES細胞KhES-3株、クローンCはヒトES細胞H1株より樹立された。

(B) フローサイトメーターによる細胞表面抗原解析

クローンA,B,CにおけるFSC/SSC, 細胞表面抗原CD235a, CD71, GFP発現についてフローサイトメーターによる解析データを示す。各クローンにおいて、FSC/SSCに示すゲートで囲まれた細胞集団について解析を行った。全てのクローンにおいてCD235a, CD71, GFPを発現している。

(C) 累積細胞増殖曲線

クローンA,B,CにおけるDOX-ON状態におけるCD235a陽性細胞の累積細胞増殖曲線を示す。各クローンは異なる細胞増殖速度を示し、クローンB>A>Cの順に高い増殖速度を示した。(n=3, mean±SD)

図9-A

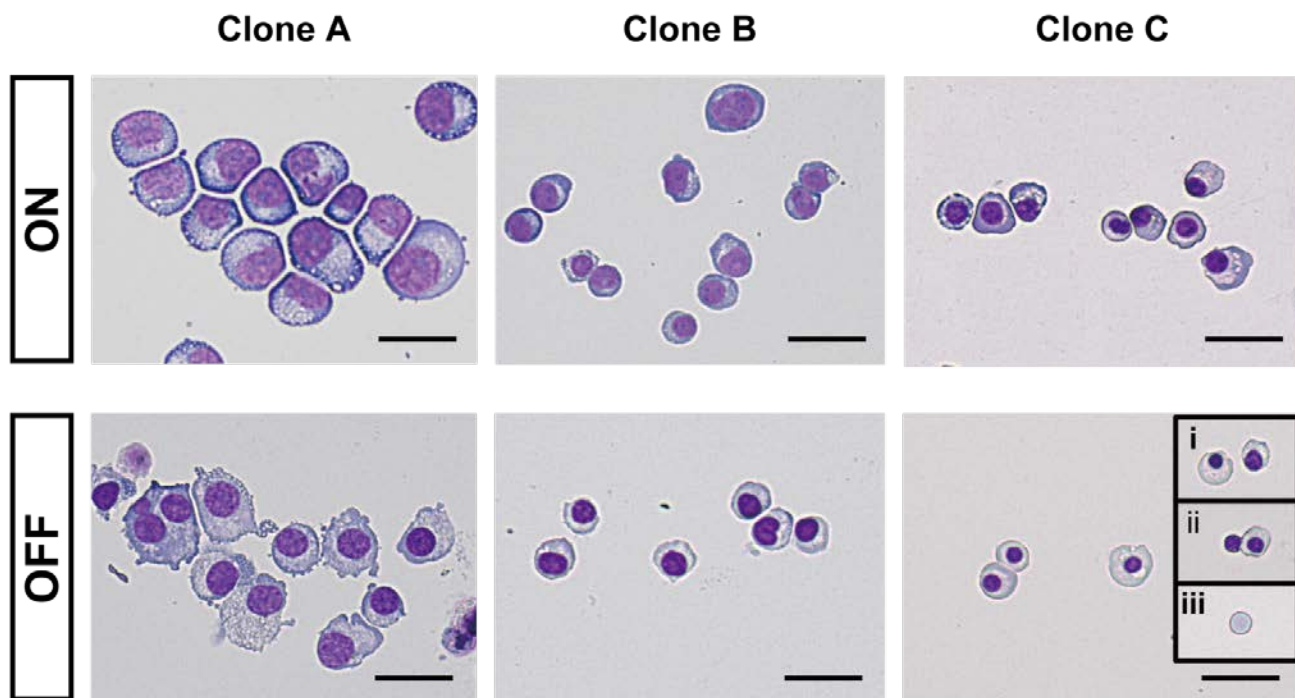


図9. 不死化赤芽球株はクローン毎に形態的に異なる分化段階を示し、DOX-OFF状態にて形態的な分化成熟を認める

(A)クローンA,B,CにおけるDOX-ON/-OFF状態のギムザ染色による細胞形態観察

左からクローンA、B、Cを示す。上段はDOX-ON状態(ON)、下段はDOX-OFFにおいて72時間培養した状態(OFF)の細胞のギムザ染色である。各クローンはON状態において異なる細胞形態を示した。クローンAでは、好塩基性の細胞質と大きな核を持ち核/細胞質比(N/C比)が高く、前赤芽球様の形態を示した。また、クローンBはクローンAと同様に好塩基性の細胞質を持つものの核はクローンAと比較してやや小型であることから、やや成熟が進んだ好塩基性赤芽球様の形態を示した。クローンCではさらに細胞質と核の成熟が観察され、多染性赤芽球様の形態を示した。これらのクローンはOFFにおいて一定の形態的な成熟を認める。とくに、クローンCのOFFでは強い核の濃縮が起こり、N/C比は小さく、また核の局在化(挿入図i)、脱核後の核(挿入図ii)、脱核赤血球(挿入図iii)を認めた。(Scale Bar : 30 μ m)

図9-B

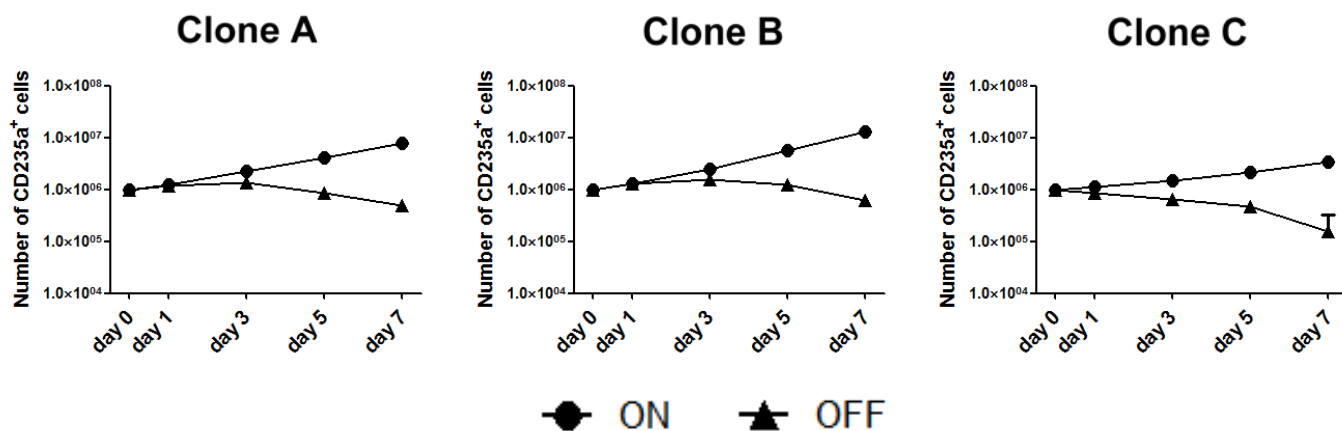
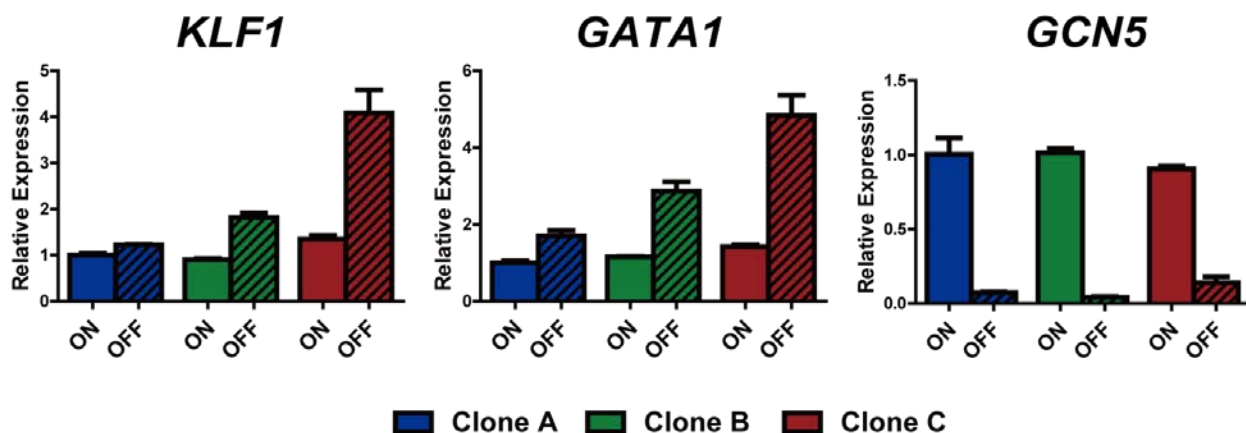


図9-C



(B) 各クローンにおけるDOX-ON/-OFF状態による増殖曲線

各クローンにおいてCD235a陽性細胞を各 1.0×10^6 個ずつDOX-ONもしくはDOX-OFF状態で培養を行い、分化第1, 3, 5, 7日目におけるCD235a陽性細胞数をカウントした。(n=3, mean \pm SD)

(C) DOX-ON/-OFF状態におけるKLF1, GATA1, GCN5遺伝子発現解析

リアルタイムPCRによるKLF1, GATA1, GCN5遺伝子の発現解析結果を示す。赤血球分化に重要な転写因子KLF1, GATA1においてON状態からOFF状態において発現上昇が確認された。またOFF状態における発現量はクローンA<B<Cの順に高いことがわかった。また、核の濃縮に関連し、遺伝子転写促進するヒストンアセチル化トランスフェラーゼ遺伝子GCN5はOFF状態において発現抑制が認められた。(n=3, mean \pm SD)

図10-A

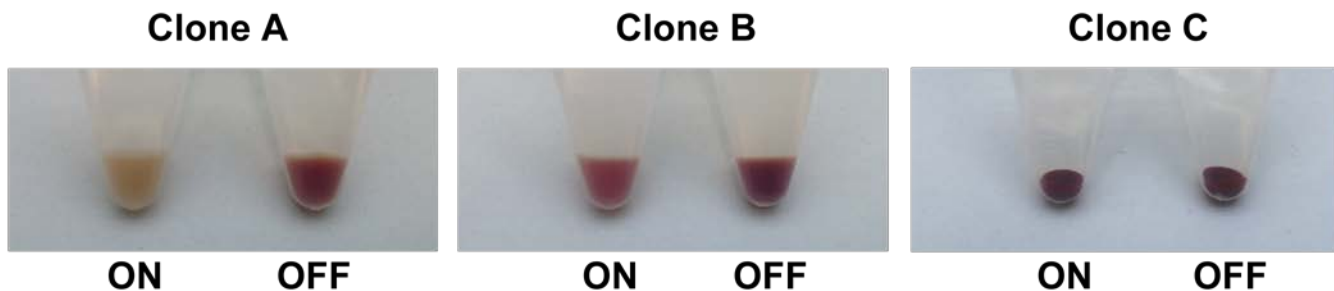


図10-B

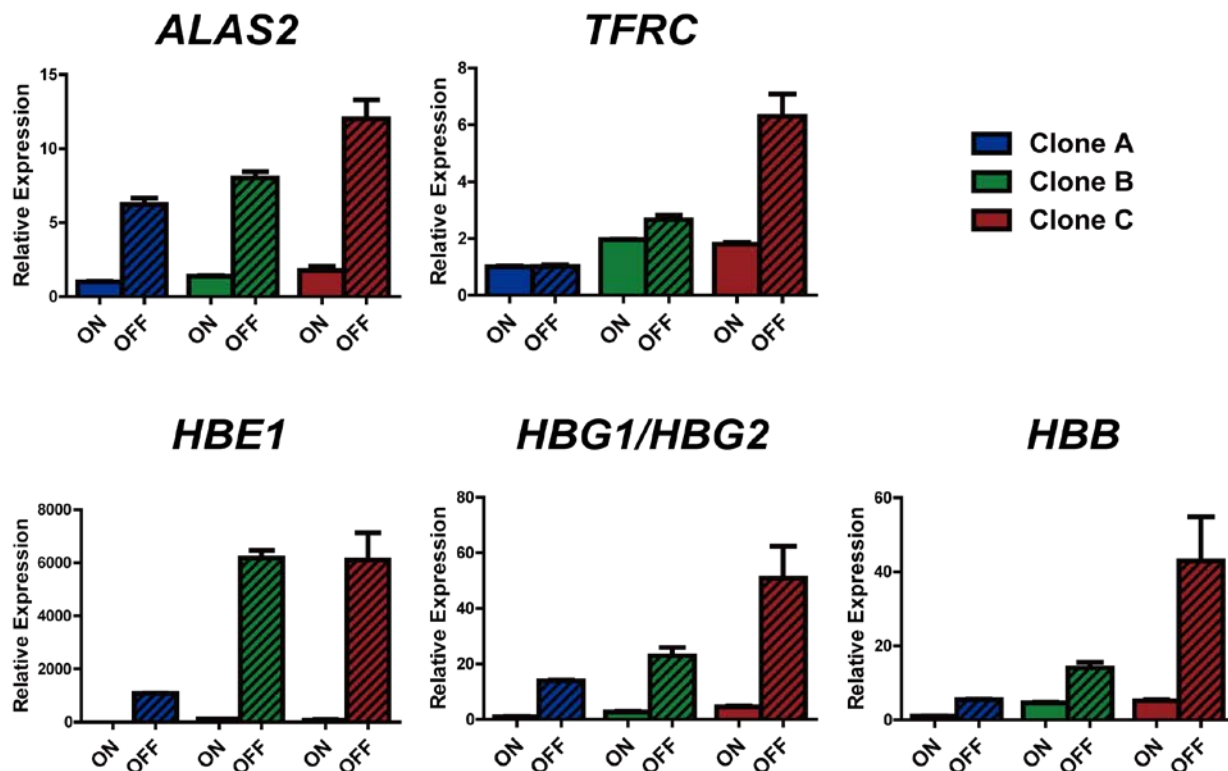


図10. 不死化赤芽球株はクローン毎に異なるヘモグロビン合成能を示し、成人型βグロビンの発現を認める

(A) 細胞ペレット色調

遠心操作を行ったときの細胞ペレットの色調を観察した。左からクローンA,B,Cを示し、各図において左 DOX-ON (ON), 右 DOX-OFFにおいて72時間培養した状態(OFF)を示す。ONからOFF状態においてペレット色調が赤く変化していることがわかる。これらの細胞株がヘモグロビン合成能を有していることがわかる。特にクローンB,Cにおいて強く赤変が認められた。

(B) DOX-ON/-OFF状態におけるALAS2, TFRC遺伝子及びグロビン関連遺伝子発現解析リアルタイムPCRによるALAS2, TFRC遺伝子及びグロビン遺伝子(HBE1, HBG1/HBG2, HBB)の発現解析結果を示す。ヘム合成に関連する遺伝子ALAS2及びトランスフェリン受容体遺伝子TFRCは各クローンにおいてON状態からOFF状態において発現上昇が確認された。また、各クローンにおいてグロビン関連遺伝子の発現がみられ、特にクローンCにおいて成人型βグロビン(HBB)の高い発現が確認された。(n=3, mean±SD)

図11-A

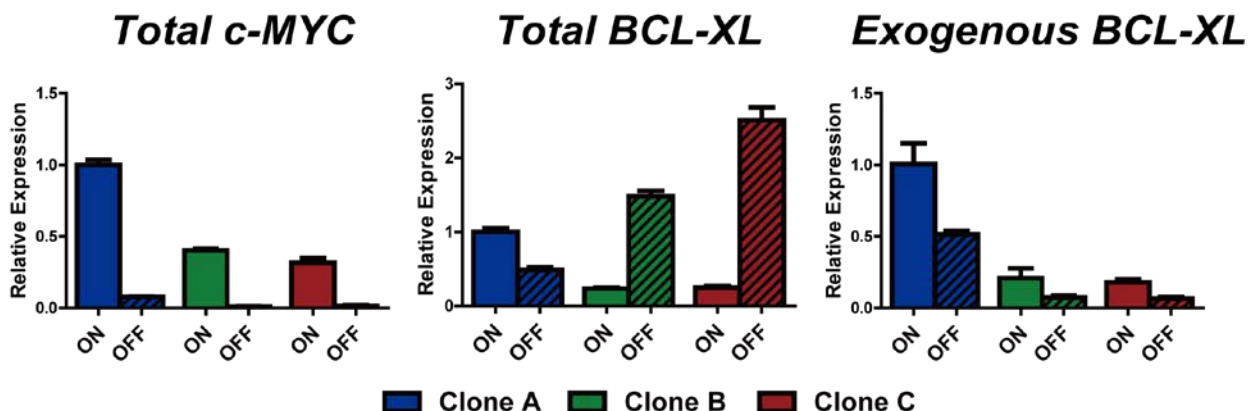


図11-B

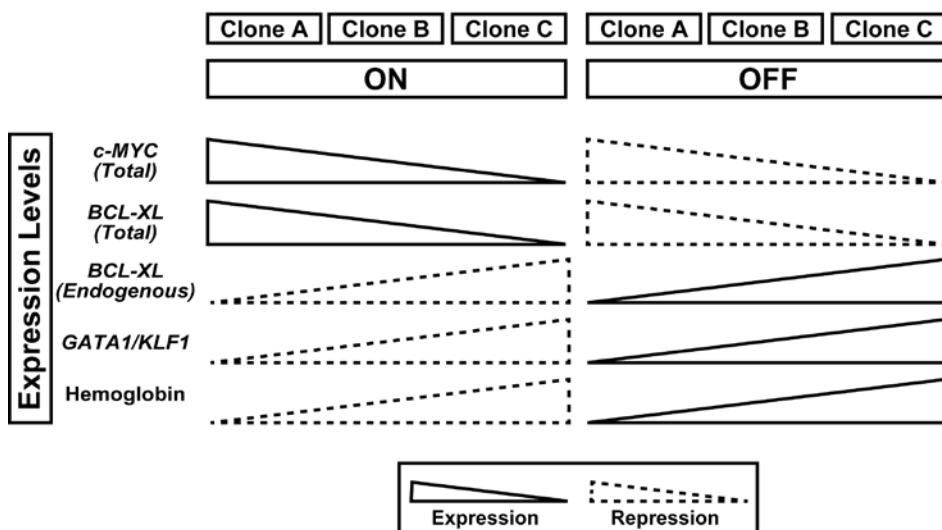


図11. クローン間におけるc-MYC及びBCL-XL発現量の違い

(A) リアルタイムPCRによるTotal c-MYC, Total BCL-XL, Exogenous BCL-XL遺伝子の発現解析結果を示す。Total c-MYCにおいてON状態では各クローンにおいて高い発現が確認され、発現量はA>B>Cの傾向を示した。これらの発現はOFF状態において発現の低下が認められた。Total BCL-XLではクローンAにおいてON状態からOFF状態において発現低下が認められるのに対し、クローンB及びCではOFF状態において発現上昇が確認される。Exogenous BCL-XLにおいては各クローンにおいて、OFF状態において発現が低下していることが確認された。(n=3, mean±SD)

(B) 各クローンにおけるON及びOFF状態における外来性遺伝子発現量とそれに関連した遺伝子群の挙動

各クローンにおいてc-MYC及びBCL-XL遺伝子の発現量及びKLF1, GATA1, ヘモグロビン合成能の変化を示す。ON状態において、c-MYC及びBCL-XLの発現量はクローンA>B>Cの傾向を示し、このことが各クローンのON状態における分化段階の違い(自己複製を行う状態)を規定する因子として示唆される。また外来性遺伝子の発現下においては、KLF1, GATA1, ヘモグロビン合成能は異なるレベルで抑制されていると考えられる。しかしながら、OFF状態においては、外来性遺伝子の低下とともに抑制が解かれ、内因性BCL-XL, KLF1, GATA1, ヘモグロビン合成能は上昇に転じることが示される。さらに発現量はA>B>Cの傾向を示した。

表2

	DOX	Cell (ϕ , μm)	Nuclear (ϕ , μm)	N/C ratio
Clone A	ON	25.87 \pm 2.56	21.96 \pm 1.88	0.85 \pm 0.07
	OFF	21.95 \pm 3.33	14.17 \pm 2.19	0.65 \pm 0.06
Clone B	ON	17.78 \pm 1.96	12.43 \pm 1.45	0.70 \pm 0.03
	OFF	15.82 \pm 0.94	10.43 \pm 0.82	0.64 \pm 0.06
Clone C	ON	16.19 \pm 1.34	10.79 \pm 1.30	0.66 \pm 0.03
	OFF	14.48 \pm 1.02	5.26 \pm 0.62	0.37 \pm 0.05

表2. 不死化赤芽球株におけるDOX-ON/-OFF時の細胞サイズ(直径)、核サイズ(直径)及びN/C比

クローンA,B,CのDOX-ON/-OFF状態における細胞サイズ(直径, μm)、核サイズ(直径, μm)及びN/C比を示す。それぞれのクローンにおいてDOX-ONから-OFFになると細胞サイズ及び核サイズ、N/C比が低くなる。さらにクローン間においてもDOX-ON/-OFF状態で、これらの数値はクローンA>B>Cの関係を示す。(各条件下において、500細胞を計測し、その結果をmean \pm SDで示す。)

表3

Gene	Sequence
<i>KLF1</i>	Fw : ACA CCA AGA GCT CCC ACC T Rv : GTA GTG GCG GGT CAG CTC
<i>GATA1</i>	Fw : AGC AGC TTC CTC CAC TGC Rv : TGG GTA CAC CTG AAA GAC TGG
<i>GCN5</i>	Fw : TCC TCA CTC ACT TCC CCA AA Rv : TTG GAG AGT TTG CCC CAT AG
<i>ALAS2</i>	Fw : AAG ATG TGA AGG CTT TCA AGA C Rv : GGA AAA TGG CTT CCT TAG GC
<i>TFRC</i>	Fw : TGG CAG TTC AGA ATG ATG GA Rv : AGG CTG AAC CGG GTA TAT GA
<i>ε-globin (HBE1)</i>	Fw : GCA AGA AGG TGC TGA CTT CC Rv : ACC ATC ACG TTA CCC AGG AG
<i>γ-globin (HBG1/HBG2)</i>	Fw : TGG ATG ATC TCA AGG GCA C Rv : TCA GTG GTA TCT GGA GGA CA
<i>β-globin (HBB)</i>	Fw : CTG AGG AGA AGT CTG CCG TTA Rv : AGC ATC AGG AGT GGA CAG AT
<i>Total c-MYC</i>	Fw : CAC CAG CAG CGA CTC TGA Rv : GAT CCA GAC TCT GAC CTT TTG C
<i>Total BCL-XL</i>	Fw : CCA AAC AGG AAC ACA TAG CAG A Rv : GAG CTC CAT GTG CAG AAC G
<i>Exogenous BCL-XL</i>	Fw : TTA GTG AAC CGT CAG ATC GC Rv : GTC TCC ATC TCC GAT TCA GT
<i>GAPDH</i>	Fw : AGC CAC ATC GCT CAG ACA C Rv : GCC CAA TAC GAC CAA ATC C

表3. リアルタイムPCRに用いたプライマーセット (5'側から3'側への配列を示す。)