

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト多能性幹細胞を用いた赤血球分化モデルの構築

氏名

越智清純

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。

しかしながら、これらの多能性幹細胞から分化誘導された赤芽球/赤血球の問題点として、酸素運搬能を担うヘモグロビンを構成しているグロビン蛋白が、発生学的に未熟な段階に留まっていることが報告されている。これらの未熟なグロビン蛋白は成人型のグロビン蛋白と比べて酸素との結合能が強いことが知られており、現在用いられている血液製剤に比べ末梢組織への酸素運搬効率が低いことが危惧される。さらに、成人型の造血を示す臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球と比較することで、これらの細胞におけるグロビン発現様式の未熟性の原因を分子レベルで解明することを目指した。

さらに、これらの多能性幹細胞から得られた赤血球を輸血製剤として用いる場合には、赤血球製剤 1 パックあたり $1.0 \sim 2.0 \times 10^{12}$ 個の赤血球が必要となる。そのため、従来行われている分化方法では、達成は極めて困難である。そのため、これらの多能性幹細胞由来赤芽球に遺伝子操作を行い、長期間に渡り赤芽球としての性質を維持しながら長期間増殖が可能な不死化赤芽球株の樹立を試みた。

以上のように、ヒト多能性幹細胞を用いた赤血球分化モデルの構築を目指し、下記に示す 2 つのテーマに取り組んだ。

テーマ① 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

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 2 本の α 様グロビン(α 鎖グロビン)と、2 本の β 様グロビン(β 鎖グロビン)から成る。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。ヒトにおいて β 様グロビン遺伝子は 5 つの遺伝子(ϵ - γ - $A\gamma$ - 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。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が、ヒト ES 細胞及びヒト iPS 細胞由来赤芽球では、それらのグロビン発現に関して、 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。しかしながら、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。

今回、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うえで、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。

なお、赤芽球分化に優れたヒト ES/iPS 細胞を選別するために、2 種類のヒト ES 細胞(KhES-3 株, H1 株)と樹立元の細胞が異なる 8 株のヒト iPS 細胞を赤芽球に分化させ、グロビン遺伝子の発現を確認したところ、ヒト ES 細胞 H1 株及びヒト血液細胞由来 iPS 細胞において β グロビン発現を確認した。そこで、これらのヒト ES/iPS 細胞の赤芽球とヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球に対し、フローサイトメーターを用いてグロビン蛋白の発現を解析したところ、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球においては、 γ グロビンの抑制が確認できたのに対し、ヒト ES/iPS 細胞由来赤芽球においては、これらの減少が確認できなかった。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。

そこで、 γ グロビン制御に関与が指摘されている BCL11A 遺伝子に注目し、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球において高い発現がみられた BCL11A 遺伝子のアイソフォームの一つである BCL11A-L 遺伝子をヒト ES/iPS 細胞へ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たところ、赤芽球分化の初期段階で BCL11A-L 遺伝子を発現させた条件において、遺伝子発現レベル及び蛋白レベルにおいて γ グロビンの抑制が確認できた。これらの結果から、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。

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。

テーマ② 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

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 や UT-7/EP0 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

ピン発現解析、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 つの遺伝子をドキシサイクリン (DOX) 誘導レンチウイルスベクターシステムを用いてヒト ES 細胞由来血液前駆細胞へ導入することで、赤芽球前駆細胞の性質を維持しながら 6 ヶ月以上に渡り安定した増殖を示す不死化赤芽球株の樹立に成功した。これらの株は 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。

これら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、ヒト ES 細胞 KhES-3 株より、前赤芽球様 (クローン A)、好塩基性赤芽球様 (クローン B)、H1 株より多染性赤芽球様 (クローン C) の形態を示す赤芽球株が得られた。これらのクローンはそれぞれの形態的な成熟度に対応した KLF1 や GATA1 遺伝子発現及びヘモグロビン合成能を持つことがわかった。さらに導入に用いた外来性遺伝子の発現量がそれぞれのクローンで異なっていることから、それらの発現量の違いが表現型へ影響を与えていると考えられる。

これらヒト ES 細胞由来赤芽球株の特徴として、高いヘモグロビン合成能を持ち、また成人型 β グロビンの高い発現を示した。また、赤血球分化の最終段階でみられる脱核を認めた。このことから、赤芽球分化のモデル細胞としてヒト赤芽球分化のための研究ツールとしてだけでなく、大規模なスクリーニングアッセイ、さらには新たな赤血球製剤の細胞ソースとしての応用が期待される。

今後の課題として、赤血球製剤の細胞ソースとして用いる際には血液型が問題となるが、O 型 Rh(D) 陰性血液型ドナーからヒト iPS 細胞を樹立し、同様の方法を用いてヒト iPS 細胞由来不死化赤芽球株することで、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と考えられる。また、現状では脱核効率が悪いため、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。

以上の、2 つのテーマを通して、私は、多能性幹細胞から誘導された赤芽球を用いて、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。