

「人工多能性幹細胞（iPS 細胞）作製・制御等の医療基盤技術」
平成 22 年度採択研究代表者

H26 年度
実績報告書

花園 豊

自治医科大学分子病態治療研究センター
教授

ヒト iPS 細胞の高品質化とその検証・応用

§ 1. 研究実施体制

(1)「花園」グループ

① 研究代表者:花園 豊(自治医科大学 分子病態治療研究センター・教授)

② 研究項目

- ・サル・ブタ・ヒト iPS 細胞の高品質化、およびその検証
- ・高品質化の応用その 1:ヒツジにおける造血再構築系の確立
- ・高品質化の応用その 3:ブタ iPS 細胞の移植と免疫反応の解析

(2)「長嶋」グループ

① 主たる共同研究者:長嶋 比呂志(明治大学 農学部・教授)

② 研究項目

- ・ブタ iPS 細胞の高品質化の検証
- ・高品質化の応用その 2:SCID ブタ作製

§ 2. 研究実施の概要

研究のねらい

(1) iPS 細胞は、どこまで初期化されるか、その深さによって二層構造をもつ。すなわち、着床前の段階まで初期化されるもの(ナイーブ型)と着床後の段階まで初期化されるもの(プライム型)である。従来のヒト iPS 細胞はプライム型のみが知られていた。ヒト iPS 細胞のナイーブ型の検証は倫理的に容易でないため、サル・ブタ・マウス iPS 細胞で代替実験を実施した上で、ヒトのナイーブ型 iPS 細胞の作製を試みる。また、(2) iPS 細胞の応用に向けて、齧歯類に加え大型動物を用いた評価が必要である。

平成 26 年度の研究成果

(1) iPS 細胞の高品質化:ナイーブ型と F 型

iPS 細胞はどこまで遡って初期化されるかによって二種類に分けられる。受精卵により近い方はナイーブ型と呼ばれ、着床前の胚盤胞内部細胞塊に相当する。受精卵から遠い方は、着床後のエピブラストに相当する。マウス iPS 細胞はナイーブ型だが、ヒト iPS 細胞はプライム型である。ナイーブ型のヒト iPS 細胞は我が国では作られていない。私どもの作ったブタ iPS 細胞はナイーブ型の諸性質をもつ(平成25年度発表論文 Fujishiro *et al. Stem Cells Dev* 2013)。しかし、この細胞は外来遺伝子依存性であるし、現在までのところ、成体のキメラブタ作りには成功していない。最近、Nature 誌に、マウスにおいてナイーブ様であるが、外来遺伝子依存性がある、キメラを作らず、プライム型とも異なる、多能性幹細胞第三群の存在が報告され、F-class (F 型)と呼ばれている(Tonge PD *et al. Nature* 2014; 516:192-197)。我々の作ったナイーブ様ブタ iPS 細胞と F-class との異同について興味をもたれる。

(2) 大型動物を用いた評価その1(ブタ):iPS 細胞の免疫原性の評価

ヒト iPS 細胞はバンキングされて MHC(ヒトでは HLA)合致のものが移植治療に供される見込みである。ヒト iPS 細胞は自家移植の系では免疫原性をもたないとしても、HLA 合致移植の系において免疫原性をもたないかどうか? これはヒトで検証するわけにはいかない。幸い実験用ミニブタにはクラウン系という MHC (ブタでは SLA)の明らかな近交系が存在する。私どもはこのクラウン系のナイーブ様 iPS 細胞を作ったので(上記)、iPS 細胞の SLA 合致移植が可能になった。SLA の合致する iPS 細胞をブタに移植した場合の免疫反応を体系的に調べた。その結果、iPS 細胞とレシピエントの MHC を合致させても、iPS 細胞は移植後、免疫反応、特に自然免疫を強く惹起することが分かった。これは、iPS 細胞由来移植片中に未分化のままの iPS 細胞が混入したとしても、レシピエントの自然免疫によって排除され、奇形腫発生リスクは小さいことを意味する。

発表論文: Mizukami Y, *et al.* MHC-matched induced pluripotent stem cells can attenuate cellular and humoral immune responses but are still susceptible to innate immunity. *PLOS ONE* 2014; 9:e98319.

(3) 大型動物を用いた評価その2(ヒツジ):ヒツジ胎仔を用いた造血分化定量法の確立

ヒト iPS 細胞からどのくらい造血幹細胞が出来るかどうかを検証するには、動物を用いた造血再構築実験が必須である。従来、免疫不全マウスを用いた評価が一般的であった。今回、ヒツジ胎仔を用いてヒト造血幹細胞を定量的に評価できないか検討した。ヒト臍帯血幹細胞をヒツジ胎仔に移植し、移植後のヒツジ骨髄内のヒト造血比率(コロニー形成細胞 CFU ベース)を調べたところ、HSC 増幅群(HoxB4 遺伝子導入軍)では対照群に比べ 4.8 倍高かった。すなわち、ヒツジ胎仔への移植系を用いることでヒト造血幹細胞を定量評価できた。しかも、この系ではヒト造血を長期的に(3年以上にわたって)観察できた。以上より、ヒト造血幹細胞の定量評価法としてヒツジ子宮内移植系の有効性が示された。

発表論文: Abe T, Hanazono Y, Nagao Y. A long-term follow-up study on the engraftment of human hematopoietic stem cells in sheep. *Exp Anim* 2014; 63:475-481.