

## 三次元培養法を利用した多能性幹細胞由来血液系細胞生産プロセス構築のための諸検討

中野, 優

<https://hdl.handle.net/2324/1937168>

---

出版情報 : 九州大学, 2018, 博士 (システム生命科学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

三次元培養法を利用した多能性幹細胞由来  
血液系細胞生産プロセス構築のための諸検討

平成 30 年 3 月

中野 優

## 目次

第1章 緒言 .....	4
1.1 本研究の背景および目的 .....	4
1.2 本研究の方針 .....	5
1.3 本研究のオリジナリティ .....	6
1.4 本論文の構成 .....	6
第2章 既往の研究 .....	7
2.1.1 血液とは .....	7
2.1.2 生体内における造血幹細胞 .....	8
2.1.3 造血の発生過程 .....	10
2.2 造血幹細胞の細胞源候補 .....	10
2.2.1 生体内に存在する細胞源 .....	10
2.2.1.1 骨髄由来造血幹細胞 .....	10
2.2.1.2 末梢血由来造血幹細胞 .....	11
2.2.1.3 臍帯血由来造血幹細胞 .....	11
2.2.2 生体外における細胞源 - 多能性幹細胞の利用 .....	12
2.2.2.1 胚性幹細胞 (embryonic stem cells) .....	12
2.2.2.2 人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells) .....	14
2.2.2.3 他の成体細胞からのダイレクトリプログラミング .....	15
2.3 造血幹細胞及び成熟血球細胞の生体外増幅 .....	16
2.3.1 多能性幹細胞から造血幹細胞への分化誘導に関する既往の研究 .....	16
2.3.2 造血幹細胞から成熟血球細胞への分化誘導に関する既往の研究 .....	19
2.3.3 本研究室における既往の研究 .....	20
第3章 マウス ES 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討 .....	22
3.1 胚様体培養および中空糸培養を用いたマウス ES 細胞から造血幹細胞への分化誘導 .....	22
3.1.1 実験方法 .....	23
3.2.1.1 培養培地及び試薬の調製 .....	23
3.2.1.2 中空糸培養法 .....	26
3.2.1.3 胚様体培養 .....	29
3.2.1.4 評価方法 .....	29
3.1.2 実験結果 .....	32
3.2 中空糸を用いた分化培養の最適化に関する検討 .....	36
3.2.1 実験方法 .....	36

3.2.2 実験結果.....	37
3.3 考察.....	43
3.4 本章のまとめ.....	45
第4章 ヒト iPS 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討 .....	46
4.1 単一分散状態のヒト iPS 細胞三次元培養のための条件設定.....	46
4.1.1 本節の目的.....	46
4.1.2 実験方法.....	47
4.1.2.1 培地および試薬の調整.....	47
4.1.2.2 ヒト iPS 細胞の分散と播種方法.....	50
4.1.2.3 評価方法.....	51
4.1.3 実験結果.....	52
4.2 胚様体培養および中空糸培養を用いたヒト iPS 細胞から造血幹細胞への分化培養..	56
4.2.1 本節の目的.....	56
4.2.2 実験方法.....	57
4.2.2.1 中空糸培養.....	57
4.2.2.2 胚様体培養.....	57
4.2.2.3 培養条件.....	58
4.2.2.4 評価方法.....	58
4.2.3 実験結果.....	60
4.3 細胞増殖期を加えた造血幹細胞の効率的取得のための培養プロセス構築に関する検討 .....	68
4.3.1 本節の目的.....	68
4.3.2 実験方法.....	69
4.3.2.1 培養方法.....	69
4.3.2.2 培養条件.....	69
4.3.2.3 評価項目.....	70
4.3.3 実験結果.....	71
4.4 考察.....	77
4.5 本章のまとめ.....	80
第5章 結言.....	81
5.1 総括.....	81
5.2 今後の展望.....	82
参考文献.....	83
謝辞.....	88

## 第1章 緒言

### 1.1 本研究の背景および目的

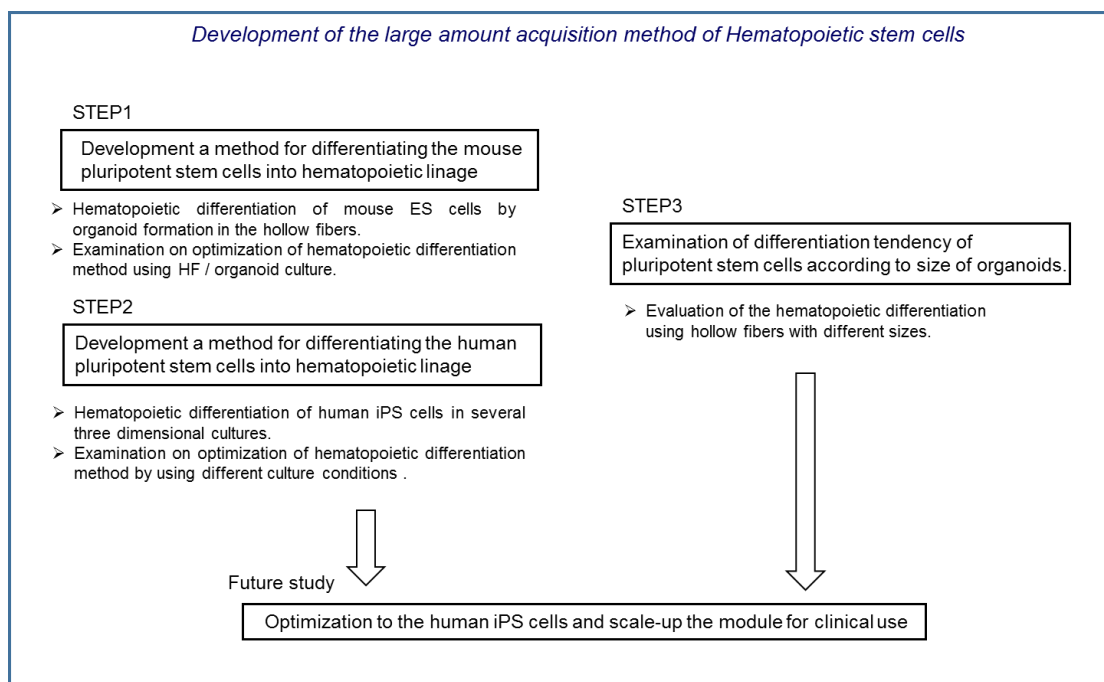
わが国では外科手術補助、事故等による失血に対する治療に輸血療法が広く用いられており、その実施予測患者数は年間で100万人を超えている。また血液疾患、悪性腫瘍等の治療にはこの輸血療法に加え、血球の源となる細胞である造血幹細胞を用いた造血幹細胞移植治療が効果的に用いられており、移植件数は年間で約5500件に及ぶ。このように我が国において血液、血球そして造血幹細胞は臨床現場において欠かすことのできない重要な細胞材料となっている。しかしながら、輸血療法では、その供給は献血に依存しており、希少血液型への対応、大規模災害への対応、また安全性の確保などが問題である。造血幹細胞移植では慢性的なドナー不足や、G-CSF投与や骨髄穿刺といったドナーへの負担等が問題として挙げられている。このような背景から、輸血療法、造血幹細胞移植療法ともに従来の供給源に変わる安定供給法の確立が望まれている。その一つの方法として、あらゆる血液細胞に分化する造血幹細胞の生体外における大量培養およびそこから成熟血球を獲得するための分化プロセスの開発が期待されている。一方、生体骨髄中での造血幹細胞の存在比は10万分の1以下といわれ、培養に用いるための生体由来の造血幹細胞の大量確保は非常に困難とされている。この問題を解決する方法としては、造血幹細胞の生体外における効率的な増幅法の開発や、他の生体細胞への遺伝子導入によるダイレクトリプログラミング等いくつかの方向性が挙げられる。その中でも近年注目を集めているのがES細胞やiPS細胞といった多能性幹細胞から造血幹細胞を産生し、さらにはそこから分化する血液系細胞を生み出すという方法である。

多能性幹細胞は特徴的な自己複製能と分化多能性を有しており、この性質を利用して目的細胞への効率的な分化誘導法を確立することにより、目的細胞の安定供給に向けた細胞源となり得る。特に、iPS細胞は体細胞への遺伝子導入によって作製されるため、患者自身の細胞から樹立する事が可能である。すなわち、拒絶反応の無い目的臓器細胞の作製が可能となり、再生医療分野での利用がひとときわ期待がされている。

そこで、本研究では血液機能を担う細胞、特に造血幹細胞を取得する手段として、多能性幹細胞であるES細胞、iPS細胞からの分化誘導に着目し、*in vitro*での効率的な分化誘導法の条件を調査した。本研究ではまず、中空糸を用いた独自の三次元培養をマウスES細胞の分化誘導に応用し、その過程において造血幹細胞への分化傾向および分化効率を検討した。加えて、播種細胞密度、酸素雰囲気等の要素が造血幹細胞への自発的分化に与える影響を明らかにし、造血幹細胞の大量調製プロセスの基盤技術を確立することを目的とした。一方で、臨床における細胞源候補はヒト多能性幹細胞である。そこで、ヒトiPS細胞への応用を念頭に、本研究ではまず基礎検討として、種々の三次元分化培養におけるヒトiPS細胞の造血幹細胞への分化傾向を明らかにすることを目的とした。

## 1.2 本研究の方針

造血幹細胞は最も積極的に臨床応用されている成体幹細胞の一つである。一方、生体中での存在数は極めて少なく、また *in vitro* での培養・増幅技術の確立も不十分であることから、効率の良い取得法、増幅法の確立が求められている。本研究ではこのような造血幹細胞の大量獲得法として、多能性幹細胞からの分化誘導に着目した。さらに、多能性幹細胞の分化誘導法として三次元培養に着目し、造血幹細胞への分化誘導過程における種々の環境因子の影響を明らかにすることとした。Fig. 1.1 に本研究の研究方針を示す。三次元培養法として、一般的な胚様体培養、並びに、独自手法である血漿分離用中空糸の内部空間を培養容器として用いることによって、高密度培養を実現可能な中空糸/オルガノイド培養法を用いることとした。最初にこの二つの三次元培養法を用いてマウス ES 細胞から造血幹細胞への分化誘導を行い、それぞれの培養法の特徴付けを行うこととした。次に、ヒト iPS 細胞を用いて分化誘導に向けた酵素処理と組織体形成に関する検討を行い、ヒト iPS 細胞を用いた検討に向けた基礎データを収集した。その後、ヒト iPS 細胞を用いた三次元培養での分化誘導の検討を行い、造血幹細胞大量獲得のための細胞源としてのヒト iPS 細胞の有用性を評価するとともに、分化誘導プロセスの効率化を試みた。



**Fig. 1.1 Research overview of this study.**

### 1.3 本研究のオリジナリティ

本研究のオリジナリティを以下に示す。

- 1, マウス ES 細胞から造血幹細胞への分化誘導を行う際、中空糸を用いた三次元培養を用いることで効率的に行った。
- 2, ヒト iPS 細胞から造血幹細胞への分化誘導を行う際、種々の三次元培養を行うことで分化培養条件の最適化を行った。
- 3, ヒト iPS 細胞の増殖活性を補うために、細胞増殖期間を用いた三次元培養を行い、造血幹細胞獲得効率を向上させた。

### 1.4 本論文の構成

第 1 章では、本研究の背景として血液細胞およびその臨床応用に関する現状を示した。さらに本研究の目的、および目的達成に向けた研究方針を示した。また、本研究のオリジナリティ、論文構成について示した。

第 2 章では、本研究を行うにあたって関連した分野の既往の研究を紹介した。まず血液および造血幹細胞の概要、造血幹細胞の細胞源候補について記した。さらに、多能性幹細胞から造血幹細胞、造血幹細胞から成熟血球細胞への分化誘導の既往の研究についてそれぞれ概説した。

第 3 章では、マウス ES 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討を行った。検討では、まず種々の三次元培養法による造血幹細胞への分化誘導を行なった。その後、造血幹細胞の効率的取得が期待された中空糸培養法を用いた、分化培養の最適化を図る検討を行った。

第 4 章では、ヒト iPS 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討を行った。検討は 4 節に分けて、単一分散状態の細胞を用いた三次元培養のための条件設定、種々の三次元培養法を用いたヒト iPS 細胞から造血幹細胞への分化誘導、造血幹細胞の効率的取得のための細胞増殖期を加えた培養プロセス構築に関する検討を行い、分化誘導に与える効果を評価した。

第 5 章では、結言を述べた。本論文の総括を行うとともに、本研究の成果に基づく今後の展望について述べた。

## 第2章 既往の研究

### 2.1 造血幹細胞の概要

#### 2.1.1 血液とは

血液とは動物の体内を循環する体液であり、ヒトを含む脊椎動物では有形成分である赤血球、白血球および血小板と、それらを浮遊させている液体成分である血漿によって構成されている。血液は生体細胞の生存に必要不可欠であり、その成分それぞれが生体内で重要な役割を果たすことにより生体内の恒常性を保っている。例えば、赤血球は酸素と二酸化炭素の運搬、血小板は血液凝固の開始の機能を有している。また白血球は多くの細胞を含んでおり、大きく分けて顆粒球とリンパ球に分かれるが、更にその中に細菌を捕食する好中球や抗体を産生する B 細胞などが存在する。

血液は主に次のような機能を持つ。①呼吸:肺から各組織への酸素の運搬、及び二酸化炭素の搬出 ②栄養:吸収された栄養素の運搬 ③排出:老廃物の腎臓、肝臓、肺、皮膚、腸管への搬出 ④体内酸塩基平衡の維持 ⑤水分代謝の調節:血圧、組織圧、血漿および組織液浸透圧 ⑥体温の調節 ⑦外来の障害作用に対する防御:外傷に対する血小板凝集、血液凝固因子の活性化によるフィブリン凝塊の形成による止血、細菌に対する貪食、異種物質に対する液性および細胞性抗体の生成 ⑧ホルモン、その他の作用物質の運搬とこれによる代謝の調節 ⑨代謝産物の運搬[1]。血液はこれらの重要な役割を担うことで生体の恒常性に大きく寄与し、多様な機能をもって、生命維持に貢献している。そのため、血液が体内から失血や造血機能の障害等によって失われるとさまざまな障害が引き起こされることとなり、その場合その不足を補うために体外から治療を施す必要が生じる。その治療法として挙げられるのが大きく分けて輸血療法、ならびに造血幹細胞移植療法である。

#### 輸血療法

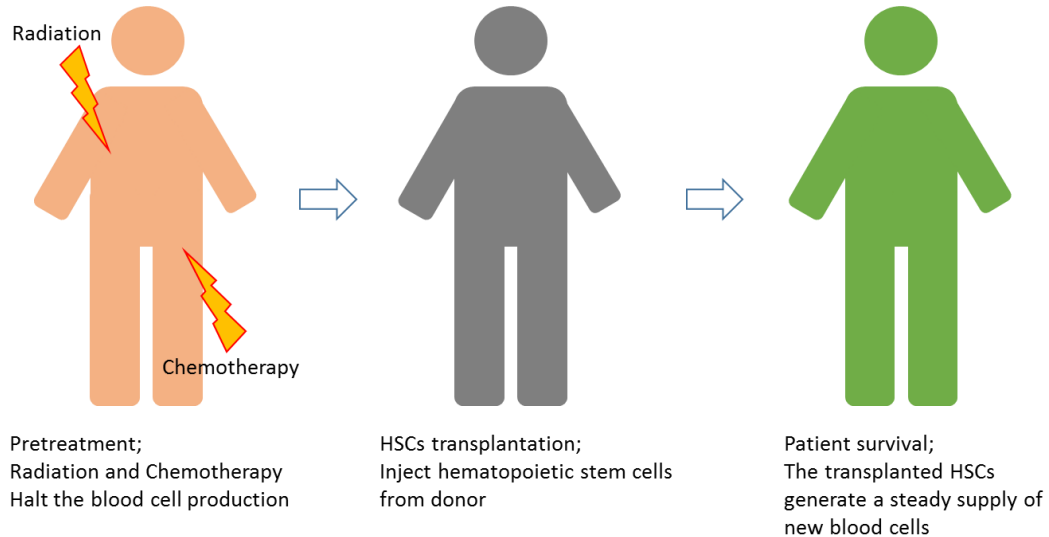
輸血療法とは、臓器移植の一種であり生体内の赤血球、血小板、凝固因子成分の機能が低下したり、量が減少したりした時に自己血もしくは同種血の健康な血液成分を補充することでその機能を補う治療法である。血液はそのまま輸血するだけでなく、赤血球製剤、血漿製剤、血小板製剤、全血製剤という種々の血液製剤が存在する。それぞれの血液製剤には使用期限があり、最も短い血小板製剤では採血後 4 日間という短いものになっている。また安全性の向上も進んでいるが、副作用や、B 型肝炎、C 型肝炎、HIV 等への感染のリスクが依然存在している。

#### 造血幹細胞移植療法

造血幹細胞移植とは化学療法、放射線療法などの骨髄破壊的な治療を行った後、正常な造血幹細胞を輸注し、血球の回復を図る治療法である[2]。用いる造血幹細胞の獲得源は、骨髄、末梢血そして臍帯血などが挙げられる。造血幹細胞はヒトで抗 CD34 抗体を用いて純化され



る。しかしながらこの細胞群は均質ではなく、種々の抗体を用いて更に細かく分画する事が出来る。



**Fig. 2.1 Schematic diagram of hematopoietic stem cell transplantation**

### 2.1.2 生体内における造血幹細胞

体内の血球成分は赤血球、白血球、血小板に分かれるがこれらの寿命は赤血球で約 120 日、血小板で約 7 日、好中球では血中に 8 時間とどまったのち、組織内へ移動し消失する。これらの損失を補うため成人の体内では、約 2000 億個の赤血球、700 億個の好中球、1000 億個の血小板が毎日生産されている。これらの細胞成分はすべて共通の起源である造血幹細胞から分化してくる。造血幹細胞は主として椎骨、胸骨、肋骨、腸骨などの骨髄中に存在し、この骨髄中の 10 万分の 1 の頻度で造血幹細胞が存在する[3,7]。

造血幹細胞は自己と同一の娘細胞を生じる「自己複製能」と全ての機能的な成熟血球へ分化できる「多分化能」を併せ持った高い増殖能を有する細胞であると定義される。この概念は、Till および McCulloch によって、in vivo での造血系再構成研究によって最初に提案された。この研究では、同種骨髄 (BM) 細胞をレシピエントマウスに移植し、その 10 日後にレシピエントマウスの脾臓に形成された脾臓コロニーを観察する脾臓コロニーアッセイによって造血幹細胞を先述のように定義している[8]。このように定義された造血幹細胞から成熟血球への分化成熟を頂点とした造血システムでは、造血幹細胞に様々なサイトカインが協調して作用することにより、Fig.2.2 に示すように、段階的に分化が進み最終的に種々の成熟血球に分化するという階層性が存在する[4]。この階層の段階において造血に関わるサイトカインは、これまでに多種見出されクローニングされている。例えば赤血球の産生を促進するエリスロポエチン(EPO)、好中球の産生を促進する顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、血小板の産生を促進するトロンボポエチン(TPO)などがあり、臨床においても使用されている。

マウス造血およびヒト造血の両方において、この複雑な階層システムは、分化した成熟血球細胞の増幅を可能にすると同時に、造血幹細胞の恒常性を正確に調節する。

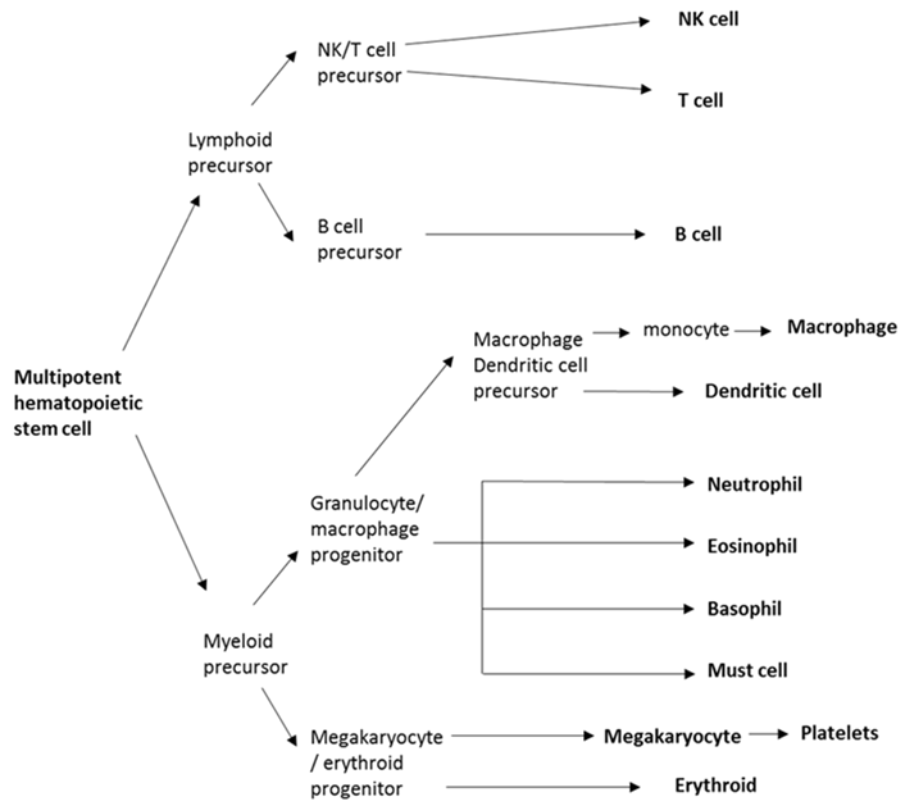


Fig. 2.2 Hematopoietic stem cell differentiation pathways

### 2.1.3 造血の発生過程

脊椎動物では多くの種において、主要な造血部位が個体発生に伴い遷移することが知られている。その過程は大きく二つに分けることができ、一つは胚の時期にだけ現れる一次造血(胚型赤血球系譜)で、もう一つは生涯に渡って存続する二次造血(成体型血液細胞系譜)である。一次造血は卵黄囊で行われる。卵黄囊の血島に最初の血球が出現し、血島が発達すると内部に大型の核を有する多染性赤芽球の、胚型赤血球で満たされる。胚型赤血球は胚型ヘモグロビンを産生する有核で大型の細胞であり、卵黄囊循環の開始に伴って胚体にも流入する。この一次造血は妊娠初期の特定の期間のみ行われ、産生される血球は EPO 非依存性の胚型赤血球であり、合成されるヘモグロビンの種類が二次造血とは異なる。その後発生の過程で造血の場合はパラ大動脈臓側中胚葉(para-aortic splanchnopleural mesoderm;P-Sp)領域、大動脈・生殖隆起・中腎 aorta gonad mesonephros(AGM)領域へと移動し、さらに胎児肝へと移動する。肝臓で生まれる赤血球は成人型ヘモグロビンを産生し、脱核して血液中を循環する。肝臓以降の造血を二次造血と呼ぶ。その他には脾臓にも遷移し、最終的に個体の一生を支える造血器官である骨髄へと移動し、一生涯の造血を骨髄で営む[8]。

## 2.2 造血幹細胞の細胞源候補

### 2.2.1 生体内に存在する細胞源

造血幹細胞は生体マウスの場合、致死量放射線照射マウスを用いた造血再構築アッセイにより、Lin<sup>c</sup>-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>細胞が造血幹細胞であると示されている[3, 5]。ヒトの場合は免疫不全マウスでの長期造血再構築能アッセイを用いた造血幹細胞の機能評価によって Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞が示された。ただし、このアッセイにより測定される造血幹細胞は厳密には同種移植により検出される造血幹細胞と同一であることが証明されていないので SRC(SCID mouse repopulating cell)と呼ばれている [9]。CD34<sup>+</sup>細胞は成人では骨髄細胞の約 1%、末梢血の約 0.01%、臍帯血単核球の約 1%程度存在する[65]。この CD34<sup>+</sup>細胞を選択的に分離濃縮して移植する造血幹細胞移植はすでに多くの臨床実績があり、白血病等の血液疾患患者に対して患者の造血能、免疫能を再構築させる根本治療として位置づけられている。造血幹細胞の採取部位としては、骨髄、末梢血、臍帯血のいずれかがあげられ、それぞれでその採取方法は異なる。また同種移植においてはヒト白血球抗原 (human leucocyte antigen;HLA) が一致する必要がある。

以下により詳しく造血幹細胞の生体内での細胞源について説明する。

#### 2.2.1.1 骨髄由来造血幹細胞

骨髄は骨の中心部にある造血組織であり、血球(白血球、赤血球、血小板)はここで造られ、血管を通じて全身に運ばれる。この骨髄中の造血幹細胞を患者に輸注することで、血球の再生産を促す。この時、移植後確実に生着を得るためにはドナーの骨髄液が 1,000 mL 程度必要であるとされている。自家移植の場合、CD34<sup>+</sup>細胞を選択的に分取し、他家骨髄移植の場

合は全身麻酔下で腸骨より採取を行う。その場合移植に必要な造血幹細胞数  $2\sim 4\times 10^8$  cells/kg を目標に、繰り返し穿刺が行われる。採取にあたっては全身麻酔下で行う必要があり、それによってドナーに大きなリスクがある。また移植する際には HLA 型が一致することが必要であり、HLA 型一致ドナー不足が課題となっている。

#### 2.2.1.2 末梢血由来造血幹細胞

通常骨髄に比べると、末梢血中の造血幹細胞は少なく末梢血を集めても生着に十分な細胞数は確保できない。しかし、抗がん剤の投与、抗がん剤投与後のサイトカインの投与、サイトカインの単独投与などの方法によって骨髄中の造血幹細胞が末梢血に動員されることが判明している。臨床では、造血因子である顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を生体へ投与することによって、骨髄より末梢血へ多量の造血幹細胞を動員する[3]。この末梢血中には骨髄に比して数倍の造血幹細胞が含まれているだけでなく、5~10 倍もの T 細胞、NK 細胞、B 細胞が存在している。他にも末梢血造血幹細胞移植には骨髄移植と比較して、移植後の白血球と血小板の回復が早い、移植後の輸血量や抗生剤の使用が少ない、総費用が安い、造血幹細胞の採取に全身麻酔が不要といった利点が存在する。しかしリスクとして、自家移植では採取の際に残存腫瘍細胞が混入してしまう可能性や、G-CSF に大量投与によるドナーへの長期的副作用等が存在する。日本造血幹細胞移植学会の報告によると、G-CSF 投与の副作用として発熱、骨痛、さらに重篤な場合には脾臓破裂等の副作用が報告されている[6]。

#### 2.2.1.3 臍帯血由来造血幹細胞

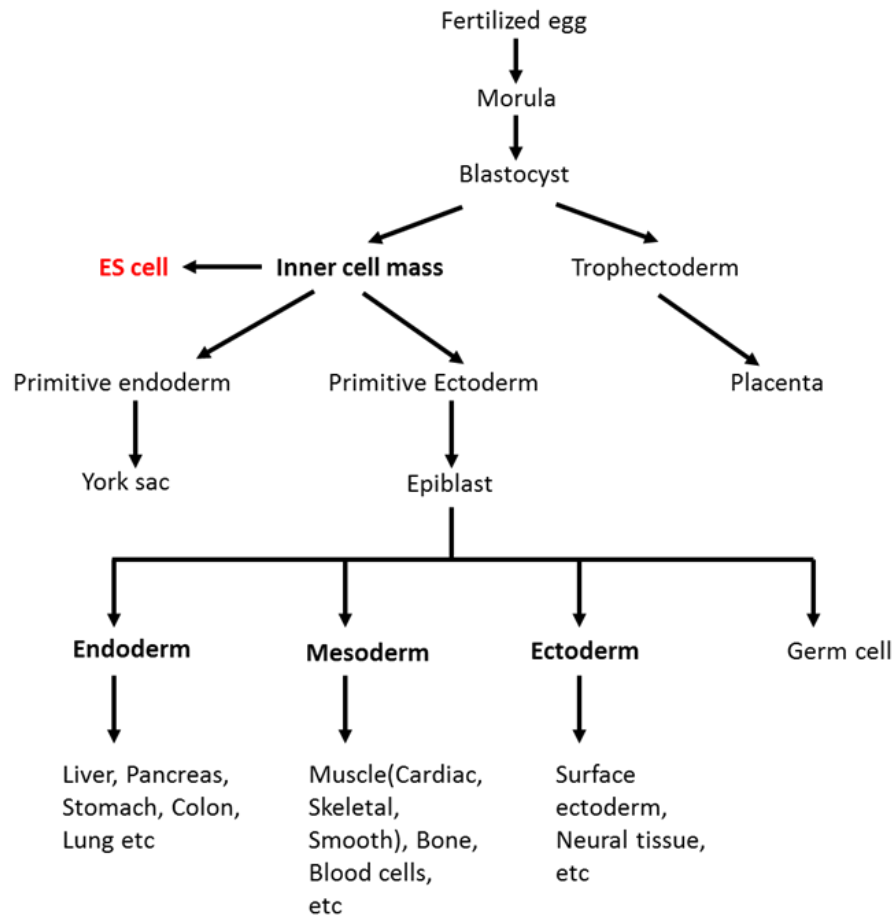
1980 年代、臍帯血中に  $CD34^+$  未分化造血前駆細胞が多数存在することが示され、1988 年には Fanconi 貧血の小児に対する最初の臍帯血移植が報告された[10]。臍帯血は通常、胎盤娩出後早期に臍帯静脈を穿刺して採取する。この本来破棄されていた出産後の胎盤・臍帯を利用する点で、ドナーの負担・リスクがないこと、さらに移植片対宿主病(GVHD)の頻度が少なく、HLA が一部不一致であっても安全な移植が可能とされており、独自の重要性がある。しかし臨床的な課題として、多数の臍帯血を保存する施設の維持コストがかかることや、他の細胞源による移植例と比較して、造血幹細胞の生着が遅く、血球回復に時間を要すること、一人のドナーから獲得できる量が少ない、移植関連合併症死の比率が高いといった問題点を解決する必要がある。

### 2.2.2 生体外における細胞源 - 多能性幹細胞の利用

今回の研究では、特に大量獲得法の開発という点に焦点を絞りつつ論を進めていく。多能性幹細胞はすべての細胞へ分化する分化多能性を持ち、それに加えて旺盛な増殖能も有する。このことはたとえ造血幹細胞への分化率が低くとも、効率よく多能性幹細胞を増やす事が出来れば大量の造血幹細胞の獲得が望めることを意味する。

#### 2.2.2.1 胚性幹細胞 (embryonic stem cells)

受精卵から胚の初期発生の過程および ES 細胞 (embryonic stem cells ; 胚性幹細胞)樹立の概念を Fig. 2.3 に示す。精子と卵子が結合して形成される受精卵は全能性をもっており、体そのものだけでなく、卵黄嚢や胎盤といった胚体外組織にも分化する。受精卵では発生が開始され、卵割が進むことで受精後 3 日目には桑実胚期と呼ばれる状態になり、分化能に制限が生じ始める。この間に受精卵は、輸卵管内壁の繊毛運動によって卵管内を移動し、受精後およそ 1 週間で子宮内膜上皮に着床する。その後胚の細胞群は、胚盤胞期と呼ばれる時期に達し、栄養膜と呼ばれる将来胎盤を形成する外層と、将来胎児となる内部細胞塊に分かれる。この時、胚盤胞の内部細胞塊側の外壁が子宮内膜に接すると、そこから胚盤胞が子宮内膜に侵入し、同時に外、中、内胚葉の三胚葉への分化が進み、受精後 9 日目には羊膜、しょう膜、原子卵黄嚢、胚盤が形成される。ES 細胞は、この過程のうちに、内部細胞塊から樹立される多能性の幹細胞である[11]。この細胞は未分化状態を保ちつつ、ほぼ無限に増殖可能であり、実験素材として広く利用されている。また、全能性を有する ES 細胞は再生医療などへの応用も期待されている。以下に ES 細胞の樹立について詳細を述べる。



**Fig. 2.3 Concept of ES cell establishment and early mouse development depicting**

### ES 細胞の樹立

1981年、Evans と Kaufman らによりマウス ES 細胞の樹立が発表された[12]。マウス ES 細胞はマウスの胚盤胞の内部細胞塊を取り出して、増殖不活性化したマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) などの Feeder 細胞上で培養し、出現したコロニーを選択的に分離して継代を繰り返すことで樹立された。この ES 細胞の分化は、白血病抑制因子 (Leukemia Inhibitory Factor ; LIF) によって抑制され、LIF は現代でもマウス ES 細胞の未分化維持培養において必須となっている。マウス ES 細胞の未分化性は、アルカリフォスファターゼ、SSEA-1 表面抗原、Oct-3/4 遺伝子、Nanog 遺伝子などいくつかの特異的マーカーによって評価される。また、ES 細胞の多能性の評価にはマウス ES 細胞の場合、胚様体を作成させ分化マーカーの発現解析を行う、テラトーマ形成能を評価する、胚盤胞に注入してキメラマウスが作成可能か調べる、等の手法が広く用いられている。

マウスでの ES 細胞樹立後、霊長類 ES 細胞への展開が行われ、Thomson らが、1995 年にアカゲザル、1996 年にマーモセットの胚盤胞から胚内部細胞塊を取り出し、マウス ES 細胞の

樹立とほとんど同様の手法を用いて霊長類 ES 細胞の樹立に成功した[13,14,15]。さらに、1998 年にはヒト胚盤胞からも同様に ES 細胞の樹立に成功した[16]。また日本では 2001 年に京都大学の Suemori らがカニクイザルの ES 細胞を樹立している[17,18]。ヒト ES 細胞の未分化性も、アルカリフォスファターゼ、SSEA-4 や TRA-1-60 等の表面抗原、Oct4 遺伝子、Nanog 遺伝子などいくつかの特異的マーカーによって評価される。

これらの霊長類 ES 細胞の樹立を契機に、ES 細胞の再生医療を始めとした臨床応用への可能性が大きくひろがり、さらに注目されるようになった。しかしながら、ES 細胞樹立のためには受精卵の破壊が必須であり、そこに生命倫理的問題が存在する。また ES 細胞は受精卵の内部細胞塊から作り出されるため、ドナーとレシピエント間での拒絶反応が起こるといいう可能性もあり、移植時の拒絶反応という問題を解決できてはいない。このような倫理面、医療面でのリスクの存在が再生医療研究および臨床応用への妨げとなっている。

#### 2.2.2.2 人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells)

2006 年、京都大学の Yamanaka らにより、ES 細胞と類似の形態と増殖能、分化多能性を示し、ES 細胞のマーカーを発現する、iPS 細胞(induced pluripotent stem cells:人工多能性幹細胞)が、本来未分化性を喪失しているマウス皮膚繊維芽細胞より樹立された [19]。マウス iPS 細胞樹立後、翌年には Yamanaka らによってヒト皮膚線維芽細胞からも iPS 細胞が樹立された [20]た。さらに、繊維芽細胞以外にもニューロン[21]、造血細胞[22]、心筋細胞[23]などの様々な成体細胞由来 iPS 細胞の樹立が報告されている。最初期の iPS 細胞は、レトロウイルスベクターを用いて、線維芽細胞へ山中因子とも呼ばれる 4 つの遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)を導入することによって作製され、その作製効率の低さやレトロウイルスベクター使用の危険性、導入遺伝子の異常によるガン化が問題視されていた。実際にマウス iPS 細胞を用いた検討においては低頻度ではあるが腫瘍形成が観察されるという報告もなされている。また、ここには未分化 iPS 細胞の混入という側面も存在する。しかし、その後このような問題を解決するために、プラスミドベクターを用いて遺伝子を一過的に発現させることによる iPS 作製法[24]が報告された。また遺伝子ではなくタンパク質を細胞に導入させることによって iPS 細胞を樹立させる方法[25]や、マイクロ RNA を用いて転写因子を必要としない iPS 細胞の樹立を行う方法[26]など、現在ではより高効率で安全な iPS 細胞を作製することが可能になっている。

iPS 細胞は分化多能性を有しており、理論上、体を構成する全ての組織や臓器に分化することが可能である。特に患者自身から樹立したヒト iPS 細胞を細胞源として使用することにより、拒絶反応の無い移植用組織や臓器の作製が可能となる。さらに iPS 細胞ではヒト ES 細胞の使用における受精卵を使用しなければならないという生命倫理的問題を解決しうる。造血幹細胞移植においても、ヒト iPS 細胞を造血幹細胞取得に用いた場合、造血幹細胞移植における、HLA 型が一致し免疫反応の問題は解決できると考えられる。しかし一方で iPS 細

胞から作製された細胞についての免疫原性の有無については議論が行われており[27][28]、造血幹細胞へ分化誘導後の機能評価が重要である。

既往の造血幹細胞への多能性幹細胞からの分化誘導法については次節に述べる。

### 2.2.2.3 他の成体細胞からのダイレクトリプログラミング

繊維芽細胞を始めとした成体細胞から、ダイレクトリプログラミングによって造血幹細胞を作製させようという試みも広く報告されている。Batta らの報告では、マウス繊維芽細胞での転写因子 ERG、GATA2、LMO2、RUNX1c および SCL の異所性発現によって、間質細胞上で安定的に増殖し *in vivo* での短期間の再構成能を有する造血前駆細胞に効率的にリプログラミングされ得ることが示された[29]。また繊維芽細胞以外にも、マウス B リンパ球の前駆細胞である pre-/pro-B 細胞へ Run1t1、Hlf、Lmo2、Prdm5、Pbx1、Zfp37、Mycn および Meis1 の 8 つの造血幹細胞特異的転写因子を導入することで、クローンレベルで分化および自己再生能を有する iHSC を作製可能であることが報告されている。一方ダイレクトリプログラミングにおいては、ヒト細胞での報告が少ない、レトロウイルスベクターを用い遺伝子導入が主流である、その誘導効率が iPS 細胞作成時と比べ低い等の解決すべき課題が多く存在する。



## 2.3 造血幹細胞及び成熟血球細胞の生体外増幅

### 2.3.1 多能性幹細胞から造血幹細胞への分化誘導に関する既往の研究

#### Feeder 細胞との共培養システム

共培養システムは、適切な培養培地中のフィーダー細胞上で ES/iPS 細胞と一緒に培養することによって造血系統への分化に向かう細胞（胚葉細胞）へサポートを与える培養法である。よく知られているフィーダー細胞としては、OP9 ストローマ細胞があげられる。この細胞は骨大理石症モデルマウスである *op/op* マウスから樹立されたストローマ細胞株であり、OP9 細胞は脂肪細胞に分化し、造血幹細胞の増殖、ES 細胞から血球系、リンパ球系への細胞分化を支持する機能を持っている[30]。この細胞を用いた OP9 システムでは、OP9 ストローマ細胞と ES 細胞・iPS 細胞を共培養法することによって、血球細胞への分化を促す。またこの他にも、AGM (aortic splanchnopleura mesoderm) 領域から樹立された間質細胞もよく用いられている。マウス ES 細胞の AGM ストローマ細胞との共培養は、Mac-1<sup>+</sup> 骨髄細胞および B220<sup>+</sup> B 細胞の両方からの細胞分化を含む CD45<sup>+</sup> 造血細胞を誘導することができ、AGM ストローマ細胞株が造血分化を支持することを示唆している。また AGM 領域由来細胞株ではなく、初代 AGM 領域とヒト ES 細胞との共培養を行った際、その CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> 細胞誘導効率が 19~22 倍となることが示されている[31]。

#### 胚様体(embryoid body;EB)形成法

多能性幹細胞を浮遊培養することによって多能性幹細胞は自発的に凝集し、球状の細胞凝集塊である、胚様体(embryoid body;EB)を作製することができる。胚様体の構造は、細胞凝集体中における細胞間接着、ギャップジャンクションの形成による細胞間相互作用を促進させており、その結果、胚様体内では外胚葉、内胚葉、中胚葉組織のマーカーがそれぞれ自発的に発現していることが確認されている[32,33]。このためマウス由来胚性幹細胞及びヒト由来多能性幹細胞の *in vitro* における分化のトリガーとして胚様体は広く用いられてきた。胚様体形成法の主な形成法を以下に記す。

#### ハンギングドロップ法

ハンギングドロップ法とは、培養ディッシュの蓋等に、細胞を一定数懸濁した培地を液滴として吊り下げることで、培地を一定量、物理的に分離し、均一なサイズの EB を作成するという培養法である。この方法では、細胞は重力によって液滴の先端部に凝集しそれによって組織体の凝集が促される。この技術は、造血細胞だけではなく、神経細胞、心筋細胞、血管細胞および軟骨細胞の分化誘発に有用であると報告されている。しかし、この手法ではディッシュ蓋上に置くことのできる液滴の数の限界や、培地交換が非常に困難であること、またピペットによる形成された EB の回収やペトリ皿への未熟な EB の付着などの様々な煩雑な操作が必要であり、質的に安定した EB を大量に作製するのが困難である。また、EB の形成過程を顕微鏡で観察しにくいことも実験上の問題として挙げられる。

半固形培地を用いた封入培養法

この培養法では、半固形培地中で細胞を浮遊培養することによって、個々に分離した EB の形成を促す。半固形培地としては、メチルセルロース、ヒアルロン酸、アルギン酸、アガロース等が用いられている。実際にメチルセルロースを用いた培養法によりマウス ES 細胞由来血球細胞の獲得が報告されている[34,35]。しかしながら個々の EB 形成の効率は低くなっており、さらにヒドロゲルから EB を回収することも培地によっては複雑になる恐れがある。

マルチウェルプレートを用いた培養法

2-methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine (MPC)[36]やグリコサミノグリカン(CS)等を用いたり、プラスチック表面への微細加工を行ったりすることによって[37]、細胞非接着性のプレートを作成できることが示されている。これによって作製された非接着性 96 穴マルチウェルプレートでは細胞懸濁液をウェルに播種し培養することによって、EB を形成することができる。このようなマルチウェルプレートは容易に顕微鏡で観察することができ、細胞播種密度の調製を行うことによって、大きさの異なる EB を意図的に形成することができる。

バイオリアクター培養法

幹細胞を用いた再生医療を臨床に応用するためには、幹細胞の大量確保が必要である。そのために大量培養を可能とするバイオリアクターが作製されている。培養環境を制御することによって、EB の大量培養が可能となる[38]。バイオリアクターとしては、スピナーフラスコ、三角フラスコ、dish 等の旋回培養やスピナーフラスコやカプセル化の組み合わせ、マイクロキャリアとマイクロカプセルの組み合わせなど様々な培養法が報告されている [39]。

低酸素雰囲気中での分化培養

生体骨髄内では、造血幹細胞は低酸素下で存在することが分かっている。そこで Salvaggio らはヒト ES 細胞及びヒト iPS 細胞を用いて、各種サイトカイン添加した培養培地で低酸素分圧(5% CO<sub>2</sub>)及び通常酸素分圧(20% CO<sub>2</sub>)にて培養を行った。その結果、低酸素分圧で培養を行った系では通常酸素分圧で培養を行った系と比較して、培養 6 日目における CD43<sup>+</sup>造血前駆幹細胞の発現率が高いことを報告している[40]。また、多能性幹細胞から誘導した造血幹細胞を臨床で用いるためには、血清などの規格化が困難な成分を排除した合成培地での培養が望まれる。Niwa らは Feeder 細胞を必要としない無血清单層培養システムを開発した。造血幹細胞増殖培地である StemLine II に各種サイトカイン(SCF,TPO,IL3,FLT-3,FP6)を添加し培養することによって、10~15 日培養したヒト ES 細胞から CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>造血前駆幹細胞を取得することに成功した[41]。

造血関連遺伝子の発現による分化誘導:HOXB4 および CDX4 の異所性発現

マウス ES 細胞においては、細胞に HoxB4 遺伝子を強制発現させることによって、長期骨髄再構築能を持つ成人型造血幹細胞を誘導、増幅させることが可能である。Hanna らはマウ

ス ES 細胞由来の胚様体を作製した後、培養 6 日目の胚様体内に発生する CD41<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>造血前駆幹細胞に HoxB4 を強制発現させながら、OP9 ストローマ細胞上で 6 日間培養することにより、長期骨髄再構築能を有する造血幹細胞を誘導することを報告した[42]。この HoxB4 遺伝子導入を応用して、遺伝子治療のマウスモデルの作製が行われた。Hanna らは、鎌状赤血球マウス貧血症のモデルマウスの繊維芽細胞より iPS 細胞を樹立し、相同組替えにより変異遺伝子を修復した後、HoxB4 遺伝子を用いて造血幹細胞を誘導した。得られた造血幹細胞を貧血マウスに移植することにより貧血を治療可能であることが報告した。このような多能性幹細胞を用いた治療モデルは、遺伝子の相同組み換えを利用することが可能であり、現在行われている造血幹細胞の遺伝子治療よりも安全性が高いと期待されている[43]。また HoxB4 の代わりに、Cdx4 の異所性発現を行うことで、OP9 ストローマ細胞上でより効率的にマウス ES 細胞の一次造血から二次造血へのスイッチが促進されることも明らかにされている。またさらに Cdx4 と HoxB4 を組み合わせることによって、致死量の放射線を照射した成体マウスの多系統造血生着を増強することも示されている[44]。

#### Lhx2,LIM-ホメオボックス転写因子による iPS 細胞への形質導入による造血幹細胞への分化誘導

Kitajima らは、*in vitro* でマウス ES 細胞の分化培養を行い、その中から造血前駆細胞のみを選択的に増やすことを試みた。マウス ES 細胞を OP9 細胞上で共培養し中胚葉系細胞に分化させたのち、培養 5 日目に得られた中胚葉系細胞へレトロウイルスベクターを用いて LIM ホメオボックス型転写制御因子である遺伝子 Lhx2 を強制発現させた。その後 OP9 細胞との共培養により造血系へ分化誘導したところ、培養 20 日目においてコントロール培養系と比べて造血幹細胞の表現型である c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>細胞が多く得られた。この効率は、同様の活性が報告されている HoxB4 を遺伝子導入した場合より、約 7 倍高かった。この Lhx2 導入によって誘導した造血前駆細胞を放射線照射した同系マウスに移植したところ、T 細胞を除くすべての系統の成熟血液細胞がドナーから *in vivo* 分化し、長期にわたり維持された。これらの傾向はマウス iPS 細胞を用いた場合にも同様に観察されている[45]。

#### 多能性幹細胞から造血幹細胞への分化を促進するサイトカイン

腹側中胚葉誘導因子であるサイトカイン(SCF, Flt3L, IL-3, IL-6, G-CSF)と骨形成因子-4(Bone Morphogenetic Protein 4; BMP-4)の組み合わせによって EB 中のヒト ES 細胞(H1, H9)の造血分化を強く促進することが、Chadwick らによって報告されている[46,47]。

#### マウステラトーマ形成を用いた造血幹細胞分化誘導

Suzuki らは iPS 細胞を OP9 細胞とともに免疫不全マウスに移植し、そこへ種々のサイトカインを添加することでテラトーマを形成させた。このテラトーマ形成後、造血幹細胞のホーミングを利用し、iPS 細胞を注射後 12 週でマウスの骨髄から造血幹細胞を獲得することに

成功した。この骨髄を別の免疫不全マウスに移植した場合の治療効果も確認されており、この方法を用いることで機能性を持つ造血幹細胞の獲得が可能であることを示唆した[48]。またこの際 Gfi1b,c-Fos,Gata2 を iPS 細胞に過剰発現させることでより効率の良い分化がなされることが Tsukada らによって報告されている[49]。

### ニッチシステムの模倣による機能的造血細胞の産生

Xu らはヒト iPSC 由来の機能的造血細胞を *in vitro* で誘導するために、骨髄由来間質細胞および成長因子を播種したナノファイバーを含む合成 3D 造血ニッチシステムを開発している[50]。この培養システムでは約 70%という分化効率で、ヒト CD34<sup>+</sup>造血細胞が CD43<sup>+</sup>前駆細胞を伴って誘導されており、この iPSC 由来の造血細胞は、移植後レシピエント NOD / SCID マウスのリンパ系統および骨髄系統血球細胞を産生した。

## 2.3.2 造血幹細胞から成熟血球細胞への分化誘導に関する既往の研究

### 無核細胞(赤血球、血小板)への分化誘導研究

無核細胞には成熟した赤血球および血小板が含まれている。これらの細胞には核が存在しないため、半減期が短く、長期保存がきかない。そのため iPS 細胞由来の無核細胞供給には高い需要が存在する。赤血球への分化誘導においては、フィーダー細胞上で培養したヒト ES 細胞から作製された CD34<sup>+</sup>細胞を回収し、SCF、BMP-4、IL-3、EPO といった赤血球分化誘導因子を添加した培地を使用し培養を行うことで、培養 21 日間を通して、その細胞数は約 100 倍にまで増殖したことが報告されている[51]。またこの時、培養 30 日間でヘモグロビン濃度が生体内における末梢血のものと同様にまで増幅したことも確認された。

血小板への分化誘導においては、Nakamura らが 14 日間培養したヒト ES 細胞由来の CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>細胞を回収し、その細胞へ二種の遺伝子 c-MYC、BMI1 を過剰発現させ、更にその 14~21 日後にアポトーシスを抑制する遺伝子 BCL-XL を過剰発現させることによって、4、5 ヶ月以上自己複製可能である巨核球を作製することに成功している。この巨核球からは 100mm dish/10 mLmedium のスケールで、200~400 万個の血小板を獲得でき、さらに血小板としての性質も優れていたことが報告された[52]。

### 樹状細胞/マクロファージ

Yanagimachi らは、ヒト ES 細胞およびヒト iPSC 細胞由来の CD14<sup>+</sup>細胞を用いて、樹状細胞、マクロファージそれぞれへ、14 種のサイトカイン、3 種の培地、培養基質の異なる組み合わせによる 5 段階のステップに分け分化誘導を行っている。このうち 4 段階目までは両細胞への分化に共通のサイトカイン、培地、培養基質を用いているが、5 段階目において、すべての条件を変えることによって、樹状細胞、マクロファージへの分化をそれぞれ促すことに成功している[53]。

### B リンパ球への分化誘導研究

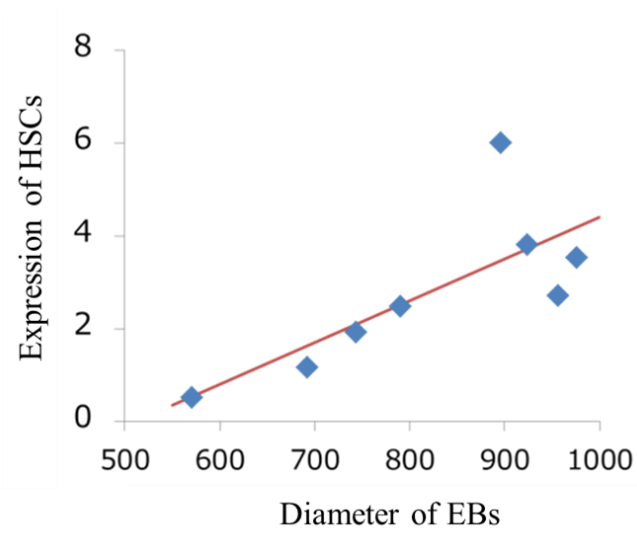
iPS 細胞をゼラチンディッシュ上で 10 日間程度 OP9 ストローマ細胞と共培養することで CD34<sup>+</sup>細胞が誘導されることが知られている。Carpenter らはその CD34<sup>+</sup>細胞を MACS によって分取後、MS-5 ストローマ細胞上でサイトカインとともにさらに 21 日間共培養し CD45<sup>+</sup>細胞を MACS により分離した。この細胞に対し FACS での解析を行ったところ、これらは CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>細胞であり、加えて B 細胞の識別を補助するゲノムも発現していた。[54]。

### ナチュラルキラーT(NKT)細胞への分化誘導研究

Wakao らは粘膜関連インバリアント T 細胞由来の iPS 細胞を樹立し、その iPS 細胞からの粘膜関連インバリアント T 細胞への細分化を試みた。粘膜関連インバリアント T 細胞は NKT 細胞とよく似た性質をもった細胞である。再分化は OP9 ストローマ細胞上での共培養によって iPS 細胞由来 CD34<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup>細胞を獲得し、さらにその細胞を OP9/DL1 細胞上で培養することによって行われた。再分化された細胞は CD45RA、CD62L、CD95、IL-7 受容体や CXCR5 等を発現していた。この T 細胞はホルボールエステルおよびイオノマイシン処理により、ヒト末梢血中の粘膜関連インバリアント T 細胞と同様に、IL-17 とインターフェロン  $\gamma$  を産出していた[55]。

### 2.3.3 本研究室における既往の研究

本研究室では、既往の検討としてマウス ES 細胞を用いた胚様体培養法による造血細胞への分化培養を行ってきた。その中で胚様体を介したマウス ES 細胞から造血幹細胞へと分化誘導を行う際、播種条件、組織体大きさによってその分化傾向に差異が生じることを見出した。以下に概要を述べる。この研究では、超低接着界面をもつ 96 穴マルチウェルプレート (PrimeSurface®96U プレート) にマウス ES 細胞の細胞懸濁液を播種し、浮遊培養を行うことでマウス ES 細胞の接着依存性により細胞同士が凝集し胚様体が形成された。培養 7 日目における胚様体の粒径と造血幹細胞の分化誘導効率である発現率の関係を Fig. 2.4 に示す。播種細胞数を増減させることで形成された異なる粒径をもつ胚様体は、そのサイズが大きくなるに従い高い造血幹細胞発現率を示すという傾向が明らかとなった。その考察としては、粒径が大きくなるに従い、胚様体中心部において、低酸素状態、培地成分の枯渇、細胞から排泄される老廃物の蓄積等が発生し、これらのいずれか、あるいは複数の条件が重なり合って発現率に影響が表れたことが言える。この結果より、胚様体粒径を大きくすることによって、より高い発現率を得ることができると考えられる。しかしながら、同時に粒径が大きくなるにつれ細胞死が引き起こされ、細胞数が減少するという現象も引き起こされた。これらの結果より、細胞数を維持したまま効率よく造血幹細胞を得るためには、胚様体の粒径を制御する、つまり凝集体の形状を制御することが必要である。



**Fig. 2.4 Relationship between diameter of embryoid bodies and expression of hematopoietic stem cells**

### 第3章 マウス ES 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討

#### 3.1 胚様体培養および中空糸培養を用いたマウス ES 細胞から造血幹細胞への分化誘導

##### 本節の目的

多能性幹細胞から造血幹細胞への分化誘導を行う際、胚様体を介して分化誘導を行う手法が広く用いられている。前章で述べた通り、本研究室での既往の検討において、胚様体を介したマウス ES 細胞の分化誘導において、造血幹細胞の発現率は粒径と正の相関にあることが見出されている。一方、胚様体内部への酸素・栄養素の供給は分子拡散に依存しており、胚様体の粒径が一定値を超えると、中心部での枯渇が生じる。その結果、増殖停止や細胞死が引き起こされる。すなわち、培養プロセスは胚様体径に制限されることとなる。

そこで本章では、胚様体培養に代わる新たな分化培養法として、中空糸/オルガノイド培養法に着目し検討を行うこととした。中空糸/オルガノイド培養法は、血漿分離用中空糸内部を培養空間として多能性幹細胞を充填し培養を行う手法であり、その組織体直径は中空糸の内径に依存する。これによって直径が制御されたまま、一方向へと細胞増殖が可能のため、組織体全体に対して十分な物質供給を行いながら、よりサイズの大きい組織体を作製することが可能となる。したがって、胚様体培養よりも高い細胞増殖挙動を示すと推測した。本章では、中空糸/オルガノイド培養を用いたマウス ES 細胞の分化培養を行い、得られた細胞数および造血幹細胞画分発現率の数値から獲得可能な造血幹細胞数を算出し、胚様体培養と比較することにより、造血幹細胞の大量調製法としての適性について検討を行った。次に、分化培養条件の最適化に関する検討を行った。本検討では培養条件のうち、初期の細胞凝集体の大きさを調節するための播種細胞密度、および培養環境である酸素分圧に着目して比較検討を行うことで、これらのパラメーターがマウス ES 細胞の造血幹細胞分化にどのような影響を与えるのか調査を行った。

### 3.1.1 実験方法

#### 3.2.1.1 培養培地及び試薬の調製

##### マウス ES 細胞

129Sv 系マウス由来の R1 Type ES 細胞 CMTI-1 株 (Cell & Molecular Technologies)を用いた。

##### Feeder 細胞

Feeder 細胞として、マイトマイシン C 処理を行い不活性化したマウス胎仔繊維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast : MEF)を用いた。

##### Feeder 細胞用培地

Feeder 細胞用培地の組成を Table 3.1 に示す。

**Table 3.1 Components of Feeder medium**

Basal medium	DMEM
FBS	10 %
Sodium Pyruvate	1 mM
Non-essential Amino Acid	1 %
Penicillin	100 unit/mL
Streptomycin	100 µg/mL
β-mercaptoethanol	1 %
HEPES	1 %

##### 継代用培地

KnockOut-DMEM (KO-DMEM)( Life Technologies Japan : 10829-018)を基礎培地として、ES cell-qualified FBS (Gibco Invitrogen : 16141-079)、NEAA (Merck Millipore : R-TMS-001C)、L-Glutamine Solution (Merck Millipore : R-TMS-002C)、Nucleosides (Merck Millipore : R-ES-008D)、β-mercaptoethanol (Merck Millipore : R-ES-007E)、Penicillin/Streptomycin (Merck Millipore : R-TMS-AB2C)、HEPES (同仁化学 : 342-01375)、mouse Leukemia Inhibitory Factor (mLIF ; Merck Millipore : ESG1107)を Table.3.2 の組成となるように添加した。

**Table 3.2 Components of mouse ES cell medium**

Basal medium	KO-DMEM
FBS	10 %
Non-essential Amino Acid	1 %
Nucleosides	1 %
L-Glutamine	2 mM
β-mercaptoethanol	1 %



### 第3章 マウス ES 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討

Penicillin	100 unit/mL
Streptomycin	100 µg/mL
HEPES	1 %
mLIF	1000 U/mL

#### 分化誘導用培養培地

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM ; SIGMA : I3390)を基礎培地として、FBS、NEAA、L-Glutamine (粉末)(SIGMA : G8540-25G)、Penicillin (Wako : 023-07731)、Streptomycin (明治製菓)、Monothioglycerol(SIGMA : M1645)を Table 3.3 の濃度で添加した。

**Table 3.3 Components of differentiation medium for mouse ES cell**

Basal medium	IMDM
FBS	20 %
Monothioglycerol	300 µM
L-Glutamine	2 mM
Non-essential Amino Acid	1 %
Penicillin	100 unit/mL
Streptomycin	100 µg/mL

#### 0.1 % ゼラチン溶液

ゼラチン 500 mg +2 次蒸留水 Total 500 mL で調製し、オートクレーブ溶解・滅菌後、4 °C で保存した。

#### リン酸緩衝液 (PBS : phosphate buffered saline)

PBS は、細胞や組織体に付着する培地成分を除くための洗浄液として用いた。また、トリプシン液やトリパンプルーの溶媒にも使われる。Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>を含まない CMF-PBS または PBS (-)と Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>を含む PBS (+)、2 種類がある。PBS の組成は Table 3.4 に示す。

**Table 3.4 Composition of PBS**

	g/L	mmol/L
NaCl	8.0	136.89
KCl	0.2	2.68
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> を用いる場合)	2.9 (1.15)	8.10 (8.10)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	1.47
CaCl <sub>2</sub>	0.1	0.90
MgCl <sub>2</sub>	0.1	0.90

### 第3章 マウス ES 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討

#### PBS (-)の調製法

1 L の 2 次蒸留水に NaCl、KCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を入れて、攪拌した。その後、滅菌済みのビンに移して、 $121^\circ\text{C}$ 、20 分でオートクレーブ滅菌を行った。

#### 2%中性 EDTA 液の調製

2 g の EDTA  $\cdot$  2Na を 2 次蒸留水に溶かして 100 mL とした。pH メーターを用いながら pH 7.4 に合わせ、高圧滅菌した。その後、PBS (-) またはトリプシン溶液に 1/100 量になるように加え、0.02 %EDTA の濃度とした。

#### 0.25 %トリプシン/0.02 %EDTA 溶液の調製

89 mL の PBS (-) に 10 mL の 10 倍濃縮トリプシン原液 (SIGMA : T4549) と 1 mL の 2 %中性 EDTA 液を加え、0.25 %トリプシン/0.02 %EDTA 溶液を調製した。

#### マウス胎仔繊維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast; MEF) の樹立

マウス ES 細胞及びマウス iPS 細胞を培養する際に Feeder 細胞として使用する MEF を、胎齢 12.5 日目の ICR マウス胎仔から調製した。以下に簡略に述べる。ICR 系妊娠メスマウス (Sea: ASEI0121) を頸椎脱臼により安楽死させた後、このマウスを 70 %エタノールに浸すことで消毒し、クリーンベンチ内へ持ち込んだ。手術用ハサミを用いて開腹し、子宮ごと胎仔を摘出し、ディッシュ内で子宮を切り開き、そこから羊膜、胎盤を取り除くことで胎仔のみを取り出した。この胎仔から四肢、頭部、尾部、内臓(肝臓、脾臓、腎臓)を取り除き、残った後背部のみをハサミで十分細かくなるまで細切りにした。そこへ胎仔 1 匹につき 1 mL の 0.25 % Trypsin/0.02 % EDTA を加え、50 mL チューブに回収し、 $37^\circ\text{C}$  の恒温槽で、5 分毎にオートピペッターで攪拌しながら、20 分間加温した。そこへ Feeder 細胞培養培地を Trypsin の倍量加え Trypsin の効果を止めた。その細胞懸濁液を  $40\ \mu\text{m}$  cell strainer (FALCON: 352340) に通し、余計な細胞塊を取り除き、シングルセルのみを 50 mL チューブに回収した。遠心洗浄 (1000rpm, 3 min) を行い、細胞数計数及びトリパンブルーを用いて生存率の評価を行った。その後  $5.0 \times 10^6$  cells/dish となるように、100 mm 細胞培養用ディッシュに播種し、インキュベーター ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) 内に移した。培地交換は Feeder 細胞培養培地で行い、コンフルエント状態になるまで培養を続けた。

#### Feeder 細胞の作製 (mitomycin C 処理)

MEF を Feeder 細胞として使用する場合、あらかじめ MEF の細胞増殖活性を抑制する必要がある。一般的には、薬剤処理や  $\gamma$  線照射処理を行うことで細胞増殖を抑制する。本実験では mitomycin C (SIGMA: M4287) 処理によって細胞増殖を抑制した。以下に詳細を示す。コンフルエント状態の MEF を用意し、培養培地を、mitomycin C を最終濃度  $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加した Feeder 細胞培養培地に交換し、インキュベーター ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) 内で

### 第3章 マウス ES 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討

2 時間半静置した。その後 PBS (-) で 2 回洗浄し、0.05 % Trypsin-EDTA (Invitrogen: 25300-054) を加え、細胞が剥離しているのを確認した後 Feeder 細胞培養培地を加え、回収した。回収した細胞は細胞数を計測し、セルバンカー (日本全薬: 630-01601 (BLC-1)) で  $1.0\text{-}5.0 \times 10^6$  cells/mL に懸濁し、 $-80^\circ\text{C}$  のフリーザーで凍結保存した。

#### マウス細胞の培養

Feeder 細胞を播種した 60 mm ディッシュ ( $1.0 \times 10^6$  cells/dish) にマウス ES 細胞を  $5.0 \times 10^5$  cells 播種後、 $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  でインキュベートし、毎日培地交換を行った。その後培養 2 日ごとに 0.25 % Trypsin/0.02 % EDTA を用いて継代操作を行った。継代時には細胞数計数及び生存率の評価を行い、細胞を増やす場合は  $1.0 \times 10^6$  cells/100 mm dish となるように Feeder 細胞上にマウス ES 細胞を播種した。以後、同様の操作で培養を継続し、継代を 2 回以上行った後、分化誘導培養に用いた。

#### マウス ES 細胞の凍結保存

培養したマウス ES 細胞は、分化誘導培養に用いる以外に凍結保存も行った。凍結は継代時の懸濁液を遠心分離し洗浄後、細胞数を計測し、セルバンカーでクライオチューブ 1 本あたり 500  $\mu\text{L}$  を目安に懸濁した。細胞懸濁液をクライオチューブに 500  $\mu\text{L}$  入れ、 $-80^\circ\text{C}$  のフリーザーで冷凍保存した。

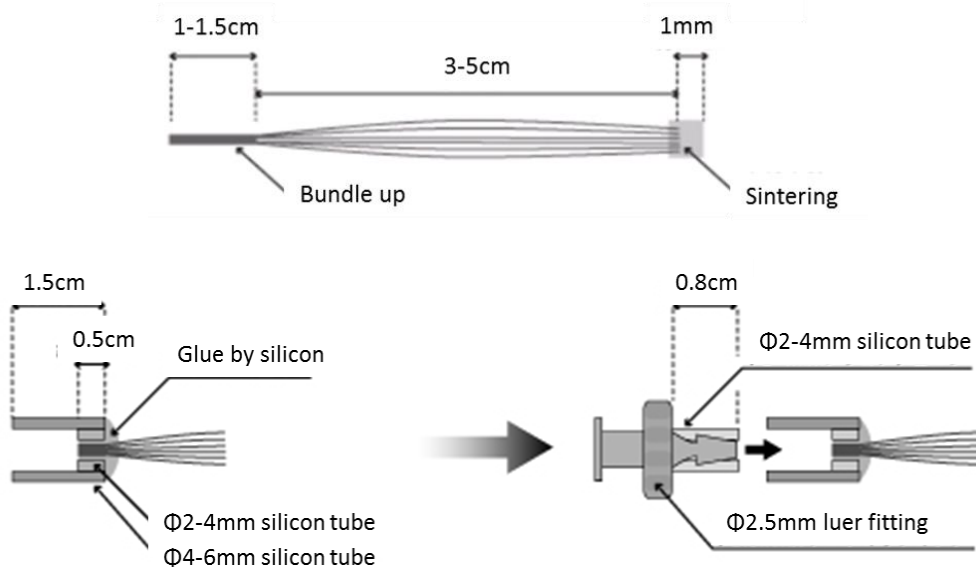
#### 3.2.1.2 中空糸培養法

##### 中空糸バンドルの作製

中空糸として、セルローストリアセテート製中空糸 (内径: 285  $\mu\text{m}$ 、膜厚: 51  $\mu\text{m}$ 、孔径: 0.2  $\mu\text{m}$ 、東洋紡績) を使用した。

##### 中空糸バンドルの作製方法

中空糸を 6 本ずつにまとめ、一端を焼き閉じた。封止部から 3.5 cm の部分を 1 cm に切断した  $\phi$  2-4 mm のシリコンチューブ内に入れ、シリコンで固めた。一晚乾燥させた後、シリコンチューブごと中空糸を切断し開口面を得た。中空糸開口面に対し、 $\phi$  4-6 mm のシリコンチューブを介してメスルアーフィッティングを接続し、細胞播種口とした (Fig. 3.2)。



(a) A schematic illustration of hollow fiber bundle making process



(b)Hollow fiber bundle

Fig. 3.2 A schematic illustration of hollow fiber bundle making process and fabricated hollow fiber bundle

### 播種方法

中空糸バンドルには疎水性の中空糸を用いているため、播種前に親水化を行う必要がある。親水化操作は中空糸をチューブバンドルユニットに接続し、ユニットのルアーフィッティングに 5 mL シリンジを接続し、70 % EtOH に中空糸を浸した状態でシリンジを引くことで、中空糸膜へ 70 % EtOH を浸透させ行った。親水化後の中空糸バンドルは二次水に浸かった状態で、121 °C、20 分の条件でオートクレーブ滅菌した。播種前に中空糸バンドル内の二次水を IMDM(SIGMA : I3390)によって置換した。

分化誘導培地に  $2.0 \times 10^5$  cells/mL となるように懸濁し、播種細胞懸濁液を調製した。チューブのふたをゆるめ、1 mL シリンジで 1 mL の細胞懸濁液を中空糸バンドル内に注入した。

### 第3章 マウス ES 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討

その後 1000 rpm で 180 秒間遠心付加を行った。遠心後の中空糸バンドルをチューブバンドルユニットから取り外し、細胞数計測用の中空糸バンドルは先端部から 3 cm で切断し、半田ごてを用いて切断部を閉じた。また、細胞回収用の中空糸バンドルはφ4-6 mm シリコンチューブにφ4 mm、長さ 1 cm の栓をして閉じた。その後分化誘導培地が 6 mL 添加されたφ60 mm dish に中空糸バンドルを移し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下において 45 rpm で巡回培養を行った (Fig. 3.3)。

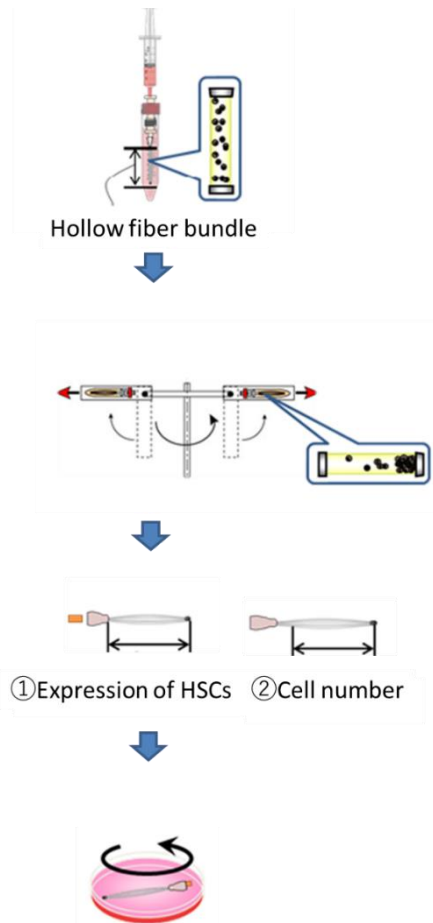


Fig. 3.3 A schematic illustration of a HF/organoid culture method.

### 培養方法

中空糸バンドルに  $2.0 \times 10^5$  cells のマウス ES 細胞を播種後、60 mm ディッシュへ移し  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  雰囲気下で7日間旋回培養を行った。培地交換は培養期間中毎日行った。

#### 3.2.1.3 胚様体培養法

本検討では対照群として、96穴マルチウェルプレートへ1wellあたり  $1.0 \times 10^5$  cells のマウス ES 細胞を播種することで、胚様体培養も行った (Fig. 3.4)。

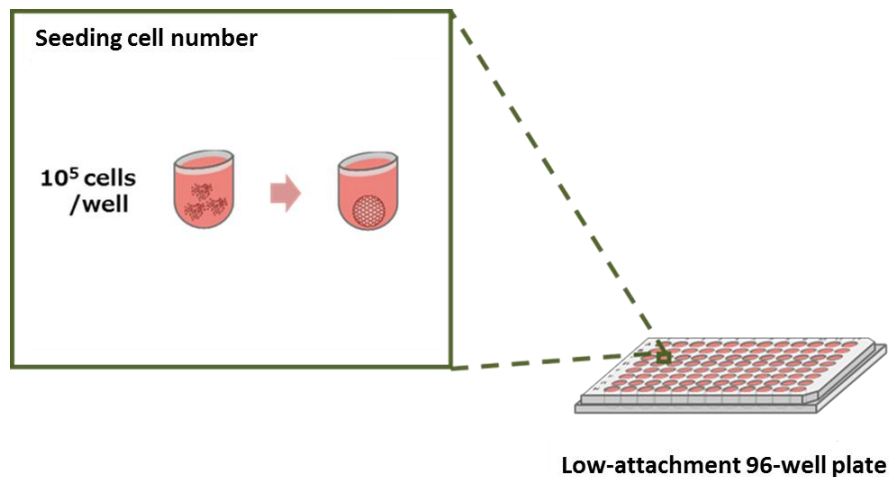


Fig. 3.4 A schematic illustration of a EB culture method.

### 培養条件

96穴マルチウェルプレートへマウス ES 細胞を播種後、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  雰囲気下で7日間静置培養を行った。播種後2日目から毎日培地の半量交換を行った。

#### 3.2.1.4 評価方法

##### 細胞数計数

核数計数には NucleoCounter™ (Chemometric)、NucleoCasset™ (Chemometric : 941-0002)を用いた。サンプルカセット内部には、ヨウ化プロピディウム(PI)が封入されており、サンプルの吸引と同時に細胞核の染色が行われる。装置内では、緑色励起光により DNA 内の PI が赤色光を放出する。これを CCD カメラで測定する。

#### NucleoCounter™による核数計数

胚様体培養では 96 穴マルチウェルプレートから胚様体を 1 個回収し、クライオチューブに加えた。細胞処理試薬 ReagentA (Chemometric) を 100~300  $\mu$ L 加えピペッティングによって胚様体を崩したのち、等量の細胞処理試薬 ReagentB (Chemometric) を加えた。

中空糸培養では培養終了後の中空糸バンドルをハサミによって細断したのち、クエン酸溶液(21 mg/mL)中で超音波ホモジナイザーによってホモジナイズし、細胞中より核を遊離させた。その後クエン酸溶液と等量の細胞処理試薬 ReagentB (Chemometric) を加えた。それぞれのサンプルを NucleoCasset で吸入し、NucleoCounter で測定を行った。

細胞には 2 核の細胞が存在するため、今回用いたマウス ES 細胞では 2 核の割合を 1.07 とし、核数を細胞数に換算した。

#### 造血幹細胞の定量評価

本実験ではセルファンクションアナライザー(Guava PCA; GE Healthcare)を使用した。Guava PCA には MicroLOCTM という独自のキャピラリー方式が採用されており、個々の細胞を迅速に解析することができる。検出器は高感度レーザー方式である。目的の細胞を蛍光標識したサンプルをキャピラリー内に通過させ、キャピラリーにレーザーを照射することで蛍光標識がレーザー光により励起され、特定波長の蛍光を発する。

操作手順を以下に記す。

#### 中空糸内部の細胞の回収

Guava PCA による評価手法を行うためには、中空糸内部に存在する細胞を回収する必要がある。回収方法、手順を以下に示す(Fig. 3.5)。分化誘導培地の入った 60 mm ディッシュから細胞回収用の中空糸バンドルを取り出し、PBS(-)で培地を洗い流したのち、細胞を中空糸壁面から剥離させるために 0.25 % Trypsin/0.02 % EDTA が 6 mL 入った 60 mm ディッシュに中空糸バンドルを移し、10 分間回転しながらインキュベートした(45 rpm, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>)。

酵素処理後、分化誘導培地が 6 mL 入った 60 mm ディッシュに中空糸バンドルを移し酵素反応を停止させた。酵素処理後の中空糸バンドルから栓を取り外して、2.5 mL シリンジをはめた。中空糸の先端部を培地につけ、はさみで先端部を切断してシリンジを軽く引き、培地ごと吸引することで中空糸内部から細胞を回収し、空の 15 mL チューブに押し出した。

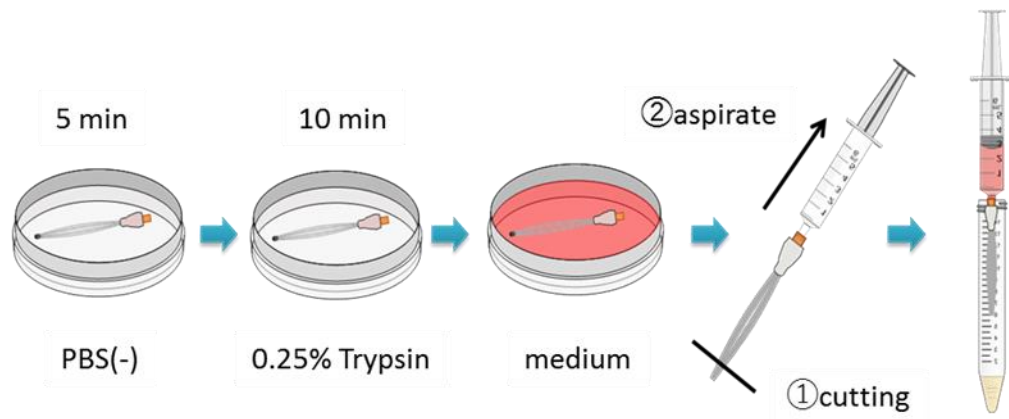


Fig. 3.5 A schematic illustration of harvesting cell from hollow fiber bundle

c-kit, sca-1 抗体処理

・ PBS(-)に Mouse serum(CEDARLANE : CL8000)を加え 5 % Mouse serum/PBS を調整した。これを medium A とした。

・ PBS(-)に 10 % BSA Diluent/Brocking Solution (KPL : 50-61-01)を加え 0.5 % BSA/PBS を調整した。これを medium B とした。

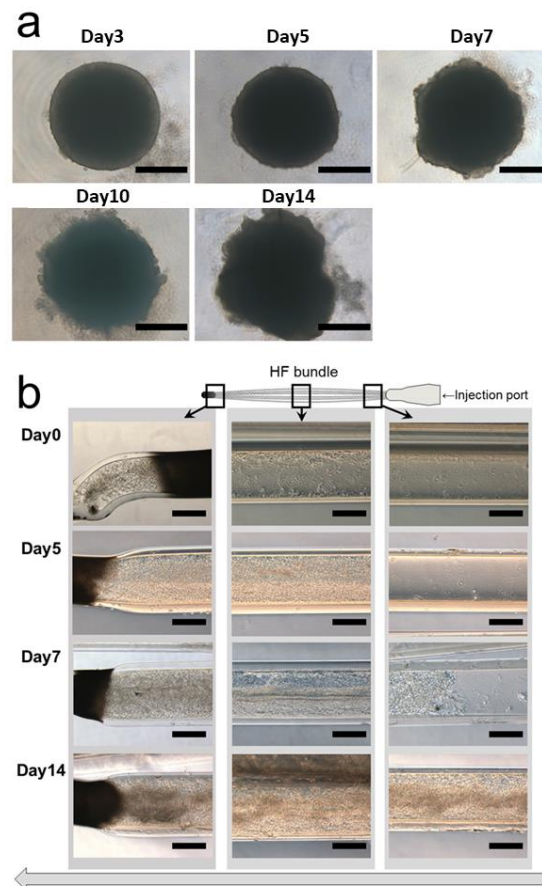
前述した酵素処理によって回収した分散状態のマウス ES 細胞を細胞計数し、 $2.0 \times 10^5$  cells に medium A を  $10 \mu\text{L}$  加えたものを 2 本作製し、それぞれアイソタイプコントロールおよびポジティブコントロールサンプルとした。それぞれのサンプルへアイソタイプコントロールとして PE Rat IgG<sub>2b</sub> Isotype Control (CLCR2B04)、PE-Cy5 Rat IgG<sub>2b</sub> Isotype Control (CLCR2B06)をそれぞれ  $2 \mu\text{L}$  ずつ、ポジティブコントロールとして PE labeled Anti-Mouse Sca-1 Monoclonal Antibody (D052-5)を  $16 \mu\text{L}$ 、PE-Cy5 Anti Mouse CD117 Monoclonal Antibody (CL8943TC)を  $0.5 \mu\text{L}$  添加した。その後暗所、室温で 30 分間インキュベートし抗体処理を行った。処理後、medium A を  $200 \mu\text{L}$  加え、遠心洗浄を 3 回行い、medium B  $300 \mu\text{L}$  ~  $500 \mu\text{L}$  に再懸濁し、Guava PCA で解析を行った。



### 3.1.2 実験結果

#### 培養経過に伴う形態変化

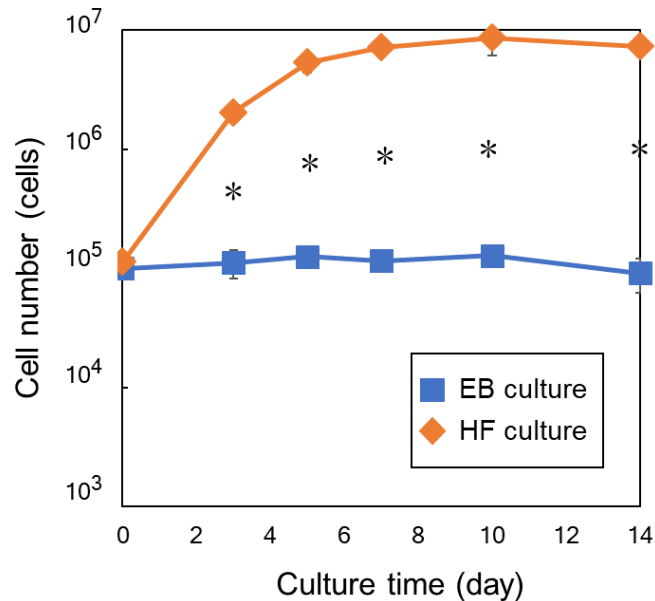
各培養期間における胚様体の形態を Fig. 3.6(a)に示す。マウス ES 細胞は、培養 1 日目までに胚様体を形成し、その直径は培養期間を通じ約 1000  $\mu\text{m}$  を保った。その一方で、胚様体の輪郭は培養 7 日目から徐々に崩れていった。この結果、組織体中心における酸素および栄養分の枯渇から、約 1000  $\mu\text{m}$  が胚様体を維持できる限界径であること、また輪郭の崩れにより胚様体内部で分化が進行していることが示唆された。次に、中空糸内部で培養された細胞の形態を Fig. 3.6(b)に示す。中空糸への播種直後、バンドル先端部において細胞組織体の形成が観察された。形成された細胞組織体は、培養期間を通じて中空糸内腔に沿って播種口側へ成長した。このことより、中空糸の内径が組織体直径を制御し、組織体の大きさは中空糸内径および長さによって制御できることが示された。



**Fig. 3.6 Organoid morphology in each three-dimensional culture system. (a) Representative images of EBs consisting of mouse ES cells in suspension culture on days 3, 5, 7, 10, and 14. Scale bars = 500  $\mu\text{m}$ . (b) Representative images of cylindrical organoids inside transparent zed HF formed by HF/organoid culture on days 0, 5, 7, and 14. Scale bars = 200  $\mu\text{m}$ . ES, embryonic stem; EB, embryoid body; HF, hollow fiber**

培養経過に伴う形態変化

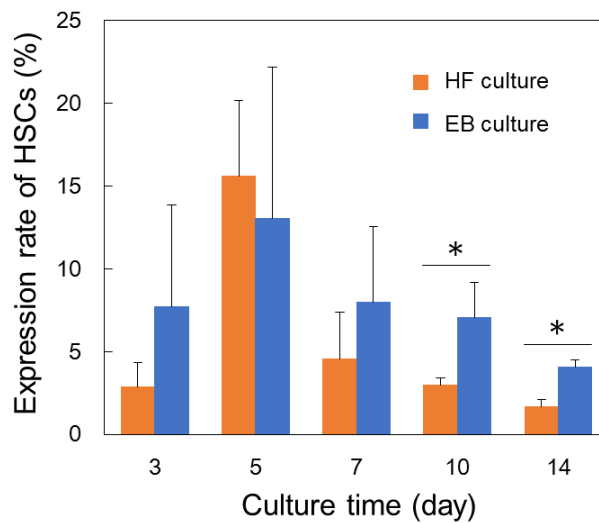
胚様体培養および中空糸培養における細胞数変化の比較を Fig. 3.7 に示す。胚様体培養では、細胞数は培養期間を通して細胞数はほぼ一定であった。これは胚様体の粒径変化の結果と一致している。一方で、中空糸培養では、培養が進むとともに細胞数は増加したが、その速度は中空糸内を細胞が充填していくのに従って低下した。結果的に培養 14 日目には約 80 倍にまで増殖した。



**Fig. 3.7 Cell number variation in each three-dimensional culture system. Data are presented as the mean ± standard deviation. Asterisk (\*) indicates significant difference between EB and HF culture systems at the same time point ( $p < 0.05$ ). In each culture system, cell numbers were evaluated on days 3, 5, 7, 10, and 14. Square: EB culture; diamond: HF/organoid culture.**

### 造血幹細胞マーカー発現率

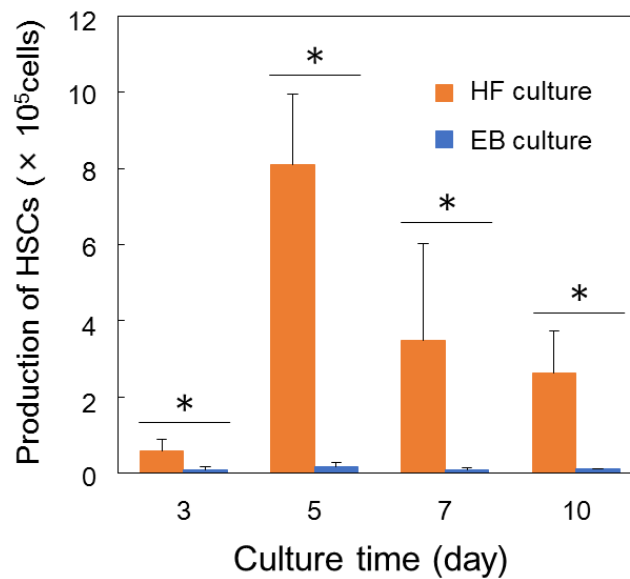
両培養系における造血幹細胞画分の発現率を Fig.3.8 に示す。造血幹細胞マーカーの発現は、細胞表面抗原 c-kit および Sca-1 の二重染色によって評価した。培養 5 日目に発現率のピークが観察され、その値は約 15%であり有意差は見られなかった。一方で、培養 10 日目および 14 日目では、胚様体培養での発現率は中空系培養に比べ有意に高かった。しかし、両培養法で 5 日目をピークとして、造血幹細胞の発現率が減少に転じるという同様の傾向が観察された。



**Fig. 3.8 HSC populations in each culture system. The hematopoietic population was determined by double staining for cell surface antigens, c-kit and Sca-1, followed by flow cytometric analysis. In each culture, hematopoietic populations were measured on days 3, 5, 7, 10, and 14. Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation. Asterisk (\*) indicates significant difference between EB and HF culture systems at the same time point ( $p < 0.05$ ). HSCs, hematopoietic stem cells**

### 造血幹細胞の収量

細胞数変化と造血幹細胞マーカー発現率に基づき、各培養期間で獲得可能だと推定される造血幹細胞の収量を算出した(Fig. 3.9)。各培養期間において、いずれも中空糸培養法の方が大量の造血幹細胞を獲得できることが明らかとなった。特に、発現率のピークである5日目まで最大40倍もの差異が確認できた。これは、中空糸/オルガノイド培養法による細胞増殖活性による影響が大きい。



**Fig. 3.9** Production of HSCs in each culture system. HSC production was calculated from total cell numbers and HSC populations on days 3, 5, 7 and 10. Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation. Asterisk (\*) indicates significant difference between EB and HF culture systems at the same time point ( $p < 0.05$ ).

## 3.2 中空糸を用いた分化培養の最適化に関する検討

前節において、中空糸培養法がマウス ES 細胞由来造血幹細胞の大量分化誘導プロセスの確立につながることを示したが、これは両培養法における細胞増殖活性の違いによるものであった。そこで本節ではそれに加えて、造血幹細胞画分の発現率を上げることで、より効率的な培養条件を目指すことを目的とした。検討として、初期の播種細胞密度および酸素分圧の変更という条件を用いて、培養条件が分化効率に与える影響を評価した。

### 3.2.1 実験方法

#### 酸素分圧に検する検討

前節で述べた手法と同様に播種を行った。中空糸バンドルは CTA を用いて作成し、バンドルへに  $2.0 \times 10^5$  cells のマウス ES 細胞を播種後、60 mm ディッシュへ移し 7 日間巡回培養を行った。この時インキュベーター内の酸素分圧を 5% に設定することで低酸素分圧環境に調節した。対照群として、通常酸素分圧 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件) での培養を並行して行った。

#### 播種密度に関する検討

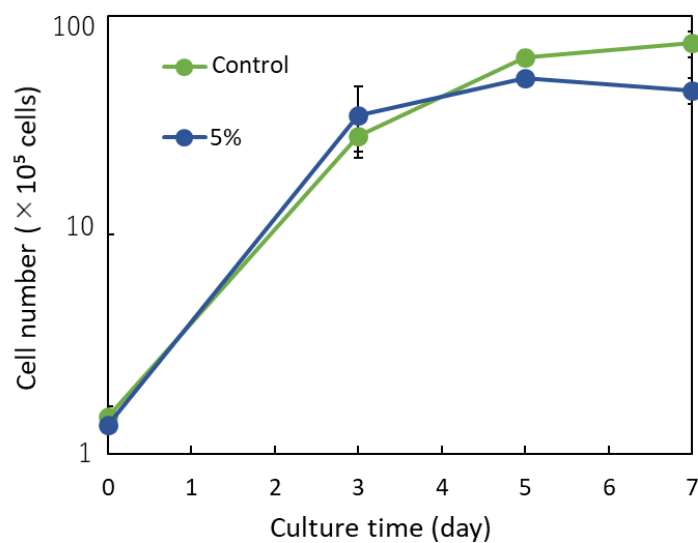
前節で述べた手法と同様に播種を行った。中空糸バンドルは CTA を用いて作製し、培養担体として利用した。播種細胞密度として  $2.0 \times 10^6$  cells/mL と、対照群として前節と同様の  $2.0 \times 10^5$  cells/mL の 2 種類の細胞懸濁液を準備し、それぞれ中空糸内部に固定化し、通常酸素分圧 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件) で培養を行った。その後、細胞数計測、造血幹細胞の定量評価と同様の解析を行った。

### 3.2.2 実験結果

#### 培養経過に伴う細胞数変化

##### 酸素分圧に関する検討

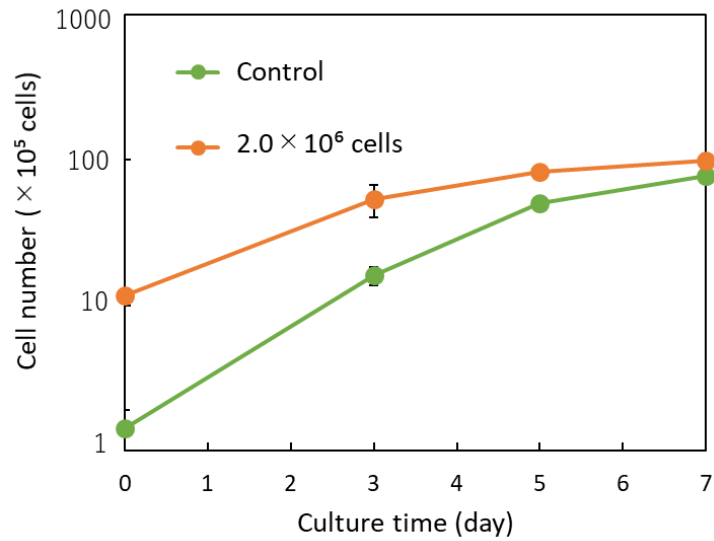
培養経過に伴う細胞数変化を Fig. 3.10 に示す。細胞数は培養初期にはほぼ同様の挙動を示した。一方で、培養後半になると低酸素分圧下では増殖活性が減少しており、増幅率では control で約 55 倍、低酸素分圧条件では約 33 倍であった。



**Fig. 3.10** Changes in the cell number of the differentiating mouse ES in various oxygen conditions. Blue circle: 5% O<sub>2</sub> condition, Green circle: Control condition. Data are presented as the means ± S.D.

##### 播種細胞数に関する検討

両培養系における細胞数変化を Fig. 3.11 に示す。いずれも良好な細胞増殖が行われ、細胞数は7日間で約  $1 \times 10^7$  cells に達し、ほぼ中空糸内腔に充満した状態となった。培養初期においては播種細胞数により増殖挙動に差が見られたが、それは中空糸内部体積に対する初期の播種細胞数の割合が関係しており、細胞組織体が中空糸内腔を満たすにつれ増殖速度が低下し、その結果培養7日間でどちらも律速段階に達したと推測される。

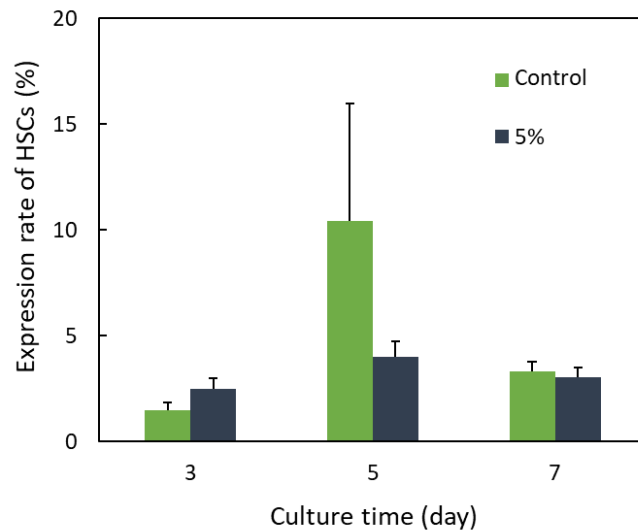


**Fig. 3.11** Changes in the cell number of the differentiating mouse ES in various oxygen conditions. Green circle: Control condition, Red circle:  $2 \times 10^6$  cells. Data are presented as the means  $\pm$  S.D.

### 造血幹細胞マーカー発現率

#### 酸素分圧に関する検討

低酸素分圧下における造血幹細胞発現率の変化を Fig. 3.12 に示す。造血幹細胞への分化は対照群と同様に培養 5 日目をピークにして、減少へと転じた。しかしながら、そのピーク値は対照群に対し 2 分の 1 程度であった。また 5 日目のピークの後、減少へと転じた理由としては、未分化細胞群が造血幹細胞へと分化を始め、5 日目に最も造血幹細胞の割合が高くなった後、より成熟した血球系細胞へと分化が進行し、造血幹細胞の割合としては減少していったためだと考えられる。

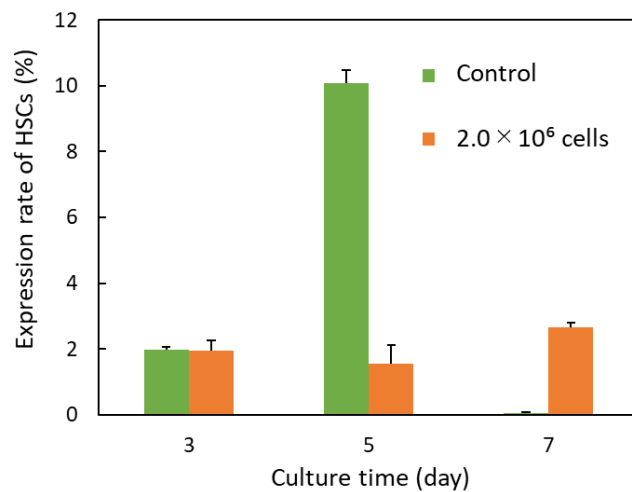


**Fig. 3.12** Changes in the expression of HSCs of the differentiating mouse ES in various oxygen conditions. Blue bar: 5% O<sub>2</sub> condition, Green bar: Control condition. Data are presented as the means ± S.D.

#### 播種細胞数に関する検討

両培養系における発現率の推移を Fig. 3.13 に示す。control である、播種細胞密度  $2.0 \times 10^5$  cells/mL の系では、5 日目をピークに造血幹細胞の発現率が減少に転じるという従来と同様の傾向を示した。それに対して、播種細胞密度  $2.0 \times 10^6$  cells/mL の系では、5 日目のピークが現れなかった。このことから、始めにマウス ES 細胞を中空糸内部空間に対して高密度で充填した後培養をしても、造血幹細胞へと分化誘導されないことが明らかとなった。マウス ES 細胞から造血幹細胞へと分化させる場合には、初期に増殖を伴って分化させることが重要であると推測される。



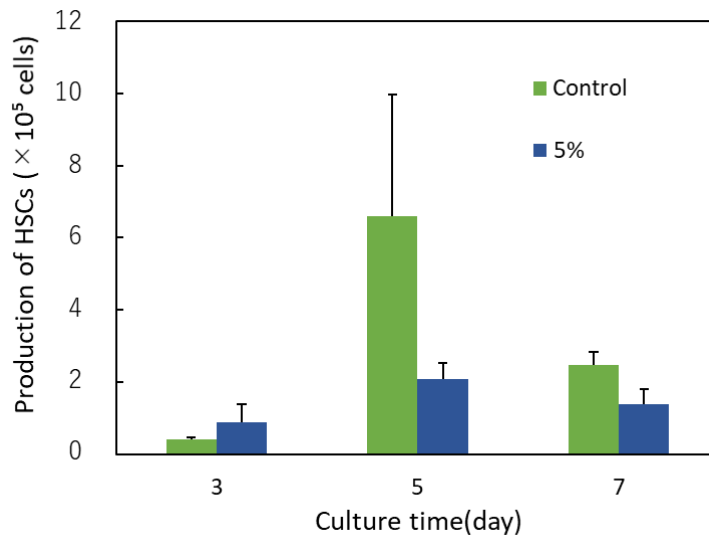


**Fig. 3.13** Changes in the expression of HSCs of the differentiating mouse ES in various oxygen conditions. Green bar: Control condition, Red bar: 2×10<sup>6</sup>cells. Data are presented as the means ± S.D.

### 造血幹細胞の推定収量

#### 酸素分圧に関する検討

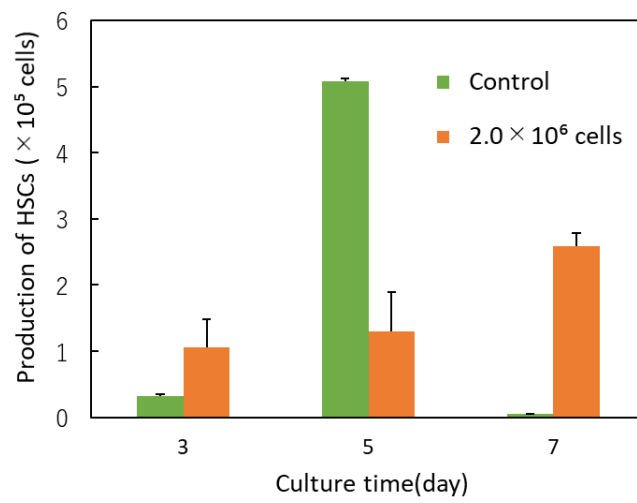
酸素分圧変更条件における造血幹細胞獲得数の変化を Fig. 3.14 に示す。造血幹細胞の数は、組織体の構成細胞数と造血幹細胞の発現率から算出した。酸素分圧を変更することで、細胞数が低下するだけでなくその発現率も低下していたため、それに相関する形で、獲得される造血幹細胞数も推移した。このことから低酸素分圧環境は造血幹細胞の大量取得法としては不向きであることが分かった。



**Fig. 3.14** Changes in the production of HSCs of the differentiating mouse ES in various oxygen conditions. Blue bar: 5% O<sub>2</sub> condition, Green bar: Control condition. Data are presented as the means ± S.D.

#### 播種細胞数に関する検討

播種細胞数変更条件における造血幹細胞獲得数の推移を Fig. 3.15 に示す。両培養系で収量のピークが示された  $2.0 \times 10^5$  cells/mL の系の 5 日目と  $2.0 \times 10^6$  cells/mL の系の 7 日目を比較したとき、前者の方が約 2 倍の造血幹細胞を獲得することが出来ることが示された。さらに初期に固定化したマウス ES 細胞の数を考慮したとき、 $2.0 \times 10^5$  cells/mL の系では、培養 5 日間で初期マウス ES 細胞の約 3.5 倍、 $2.0 \times 10^6$  cells/mL の系では、培養 7 日間で約 0.2 倍の取得造血幹細胞数となったため、前者の方がより効率的に造血幹細胞の獲得が可能であることが明らかとなった。このことから、高細胞密度条件もまた、造血幹細胞の大量取得法としては不向きであることが分かった。



**Fig. 3.15** Changes in production of HSCs in various oxygen conditions. Green bar: Control condition, Red bar:  $2 \times 10^6$  cells. Data are presented as the means  $\pm$  S.D.

### 3.3 考察

#### 胚様体培養法および中空糸培養法によるマウス ES 細胞の造血幹細胞分化

胚様体培養では、培養初日から胚様体が形成されたが、その直径は増加せず、7日目から徐々に輪郭が崩壊しても約 1000  $\mu\text{m}$  に維持された。一般的に、胚様体中の物質移動には限界があることが知られている。例えば Van Winkle らの報告によれば、大きな胚様体（半径 400  $\mu\text{m}$ ）の中心における酸素濃度は、より小さな胚様体（半径 200  $\mu\text{m}$ ）の酸素濃度より 50% 低いことが示されている[56]。またサイトカイン濃度についても同様の傾向があることが報告されている[57]。さらにこれらの制限に加えてラクターゼ等の老廃物も蓄積するため、このような現象が胚様体内の細胞死を引き起こし、胚様体の細胞数の維持及び輪郭の崩壊が起こったと考えられる。また、この胚様体の崩壊は、胚様体内部で異なる大きさや形態を持つ様々な細胞への自発的分化が進行したことも示唆している[58]。

中空糸培養では、マウス ES 細胞は、培養期間を通して約 80 倍の増殖を行い、高い増殖活性を示した。このような胚様体培養とは異なる中空糸培養での旺盛な細胞増殖は、両培養法で構築された細胞組織体形状の違いに起因すると考えられる。胚様体培養では約 1000  $\mu\text{m}$  の球状オルガノイドが得られたのに対し、中空糸培養では中空糸内腔の形状によって制限された直径約 300  $\mu\text{m}$  の円柱状のオルガノイドを得ることができた。この形状によって中空糸培養では、中空糸内腔が完全に細胞で満たされるまで、酸素や栄養素の枯渇なしに細胞がバンドル先端から播種口側へ向かって増殖することができたと考えられる。

造血幹細胞の発現率に関しては、細胞数変化の結果とは異なり両培養法で同様の傾向が得られた。これは組織体表面からの酸素や栄養素の分子拡散によって、組織体表面からある一定の厚みのみが造血幹細胞の発現に適した範囲であり、そこで分化が起こったため、両培養法で発現率に大きな差が出なかった可能性が考えられる。また両培養法で培養 5 日目に約 15% の発現ピークが観察され、それは培養が進むにつれて減少した。Keller らは、マウス ES 細胞によって作製された胚様体がマウスの造血分化プロセスを模倣すると報告しており[35]、本検討と同様に分化培養 5 日目から 6 日目にかけて造血前駆細胞の頻度がピークに達したのち、減少することを示している。さらに、ピーク後の造血幹細胞マーカー発現の減少は、オルガノイド内部の造血幹細胞の、様々な種類の成熟血液細胞へのさらなる自発的分化を示していることも報告されている[58]。これらの報告は、今回の検討における両培養法で作製された細胞組織体中で、造血幹細胞の更なる分化が起こり、マウス ES 細胞の造血分化を模倣したことを支持している。

さらに、得られた細胞数と造血幹細胞発現率を掛け合わせることで推定される造血幹細胞の獲得数を計算した。その結果、培養 5 日目において胚様体培養と比較して約 40 倍の造血幹細胞を獲得できることが示された。これは結果的に培養開始時に固定化した ES 細胞の約 3-6 倍に相当する造血幹細胞の取得が可能であることを示唆しており、このことは、多能性幹細胞の増殖活性と分化誘導を上手く制御することにより、造血幹細胞の大量取得が可

能なプロセスの確立につながることを示唆する。しかしながら臨床に向けたスケールアップのためには現状の中空糸/オルガノイド培養法での造血幹細胞の取得効率を高めることが重要である。そのためには増殖活性を高める、もしくは分化誘導効率を上げることが必要とされるため、次節で中空糸培養の最適化を目指し検討を行った。

#### マウス ES 細胞の造血幹細胞分化のための中空糸培養法の最適化

本節において酸素分圧について検討した結果、低酸素分圧にすると細胞数、発現率ともに低くなる傾向にあった。低酸素環境が造血幹細胞のニッチであると考え、低酸素下での分化誘導効率が向上すると思われたが、これは仮定とは反する結果であった。

この原因として、低酸素培養下での組織体の形成、増殖不良が考えられる。実際に細胞数変化を見ると低酸素条件ではコントロールと比べ、培養後期での増殖が低下している。これは組織体が形成されていくのに伴い組織体内部の酸素供給量が少なくなっていたことを示唆している。この傾向は、同様の低酸素分圧下で培養したマウス ES 細胞の胚様体培養においても確認している。また、低酸素環境は造血幹細胞のニッチであると同時に多能性幹細胞のニッチであることも知られている。ヒト ES 細胞は、単層培養条件下で 21% O<sub>2</sub> 雰囲気中で培養された場合に自発的に分化することが知られているだけでなく、ヒト ES 細胞を 3% または 5% O<sub>2</sub> 雰囲気中で培養すると、分化の速度は有意に低下することが報告されている。また、より低い 1% O<sub>2</sub> 雰囲気下での培養は、多能性を維持する一方で増殖を有意に減少させ、酸素勾配の勾配が幹細胞における増殖および静止を調節し得ることを示唆している[59]。このことから本研究で用いた 5% O<sub>2</sub> 環境と中空糸培養(内径: 285 μm)の組み合わせでは、中心部の酸素環境が未分化性を維持し、細胞増殖を制限する条件まで低くなっていた可能性がある。

播種密度について検討した結果、 $2.0 \times 10^5$  cells 播種した系は造血幹細胞へと分化が進行した一方で、 $2.0 \times 10^6$  cells 播種した系では分化誘導が見られなかった。この原因としてはマウス ES 細胞の播種細胞数が異なることによる自己分泌因子の濃度の違いや初期の組織体形成の違いが影響したことが考えられる。マウス ES 細胞の胚様体を用いた検討において、その分泌因子が線維芽細胞等の細胞増殖に影響を及ぼすことが報告されており[66]、細胞組織体の分泌する因子の違いや濃度が、マウス ES 細胞自身の自発的分化に影響を与えた可能性が存在する。また、遠心によって組織体形成を促しているものの、播種細胞数が異なることによって 2 つの条件では初期の細胞増殖に大きな差が見られた。このことも分化誘導に影響を与えた可能性がある。これらの点は今後の検討によってより詳細に関係性を明らかにしていく必要がある。今回の検討では中空糸培養を用いた条件検討によって、造血幹細胞への分化誘導効率の向上は達成できなかったものの、マウス ES 細胞培養環境が造血幹細胞への分化誘導に大きな影響をもたらすことを確認することができた。

### 3.4 本章のまとめ

#### 第1節

・胚様体培養法では、その粒径および細胞数とも培養期間を通じてほぼ一定であった。一方中空糸培養法では培養期間を通じて旺盛な細胞増殖が見られ、最終的には約 80 倍にまで増殖した。

・中空糸培養法を用いた場合、造血幹細胞の収量は一般的に用いられる胚様体培養と比較し、培養 5 日目で約 40 倍高くなることが示唆された。このことより、中空糸/オルガノイド培養法は造血幹細胞の大量取得法として適していると言える。

#### 第2節

・酸素分圧について検討した結果、低酸素分圧にするといずれの培養系においても細胞数、発現率ともに低くなる傾向にあった。

・播種密度について検討した結果、 $2.0 \times 10^5$  cells 播種した系は造血幹細胞へと分化が進行したが、 $2.0 \times 10^6$  cells 播種した系では分化誘導がされていなかった。このことから造血幹細胞への分化誘導は初期の細胞増殖を伴って行うことが重要である可能性が示唆された。この点は今後の検討によってより関係性を明らかにしていく必要がある。

・細胞数、発現率ともに培養環境の変化による影響を受けている様子が見て取れたので、培養条件を検討することによって、培養法の最適化を目指すことが可能であると思われる。

### 第4章 ヒト iPS 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討

前章において、マウス ES 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討を行った。その結果、中空糸培養法を用いることでマウス ES 細胞由来造血幹細胞分画の効率的取得につながることが示唆された。一方で臨床への応用を考えると、細胞源としてヒト細胞を用いることが望ましい。そこで第 4 章では、ヒト iPS 細胞を用いて造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討を行った。

#### 4.1 単一分散状態のヒト iPS 細胞三次元培養のための条件設定

##### 4.1.1 本節の目的

第 3 章において、多能性幹細胞のモデル細胞としてマウス ES 細胞を用いて検討を行った。一方、臨床応用を考慮すると、ヒト細胞を用いた検討が不可欠である。そこで第 4 章ではヒト iPS 細胞を用いて検討を進めることとした。

しかしながら、ヒト iPS 細胞とマウス ES 細胞では性質上において様々な相違点が存在し、マウス ES 細胞での検討をそのまま適用することはできない。例えばマウス ES 細胞では LIF (Leukemia Inhibitory Factor: 白血病抑制因子) 存在下で BMP-4 と Stat3 に依存して未分化状態を維持する[60]。一方でヒト iPS 細胞は、FGF-2 依存的に働く MAPK/ERK 経路、Activin/Nodal 経路、TGF- $\beta$  経路といった異なるシグナル伝達によって未分化状態を維持する[61]。したがって、マウス ES 細胞およびヒト iPS 細胞の多能性状態は全く異なるとも言われている。また、マウス ES 細胞は単一分散細胞として継代および増殖することができる。一方、ヒト iPS 細胞は、分散状態においてアポトーシスを起こし生存できない事が知られており[62]、同時に酵素に対する感受性が強く、酵素により障害を受けやすいともいわれている。そのために未分化維持培養中の iPS 細胞の継代時の回収は、EDTA を用いることにより、数十個～数百個の細胞が集合したクラスター状で行うことが好ましいとされている。一方、三次元培養への応用の際には、実験の正確性を考慮すると、細胞を一度単一分散状態にすることが望ましい。

そこで本節では、単層培養からの iPS 細胞の回収に数種の酵素を取り上げ、単一分散状態にした後、胚様体培養を用いてヒト iPS 細胞に対する酵素の影響を明らかにすることを目的に検討を行った。

## 第4章 ヒト iPS 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討

### 4.1.2 実験方法

#### 4.1.2.1 培地および試薬の調整

第3章で用いた試薬に加え、ヒト iPS 細胞培養に使用する培地および試薬について以下に示す。

##### ヒト iPS 細胞

理化学研究所より提供されたヒト皮膚由来のヒト iPS 細胞 (201B7) を用いた。

##### 継代用培地

Essential 8 medium に Essential 8 supplement を添加した培地を継代用培地として用いた。Essential 8 medium はヒト多能性幹細胞の増殖用培地であり、その成分はゼノフリーおよびフィーダーフリーである。以下に示す 8 つの基本的なコンポーネントで構成されている。

**Table 4.1 Components of Essential 8 medium**

DMEM F-12
L-ascorbic acid
Selenium
Transferrin
NaHCO <sub>3</sub>
Insulin
FGF2
TGFβ1

##### 分化誘導用培養培地

分化誘導用培地として、上記の Essential 8 medium より未分化維持因子である FGF2, TGFβ1 を除いた Essential 6 medium (Life Technologies : A1516501) を使用した。

##### ヒト iPS 細胞凍結保存液

DMSO (SIGMA; D2605) を Essential 8 medium で 10 倍希釈し作製した、10% DMSO/Essential 8 medium を凍結保存液として用いた。

##### 0.5 mM EDTA/PBS (-)

EDTA・2Na を PBS (-) に加えることで 50 mM に調製し、0.2 μm シリンジフィルターによる濾過滅菌を行った。その後、50 mM EDTA/PBS (-) を PBS (-) で 100 倍希釈し、0.5 mM EDTA/PBS (-) に調製して使用した。使用量：7 mL/100 mm dish、3 mL/60 mm dish

##### Geltrex 溶液

ヒト iPS 細胞の培養基質として Geltrex でコートをした培養 dish を用いた。Geltrex 溶液は、



## 第4章 ヒト iPS 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討

DMEM F-12(SIGMA : D6421)100 ml に Geltrex™ LDEV-Free hESC-qualified Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (Gibco Invitrogen : A1413301) 1ml を添加することで調製した。これを細胞培養用 dish へ添加し、1 時間程度 37°C でインキュベートすることで Geltrex 層を形成させた。使用量 : 7 mL/100 mm dish、3 mL/60 mm dish

### iPS 細胞分散用酵素

本検討では、以下に示す 3 種類の酵素を細胞分散用として使用した。

#### **アキュターゼ Accutase(Innovative Cell Technologies:AM105)**

Accutase は、哺乳類または細菌由来製品が含まれていない、タンパク質およびコラーゲン分解酵素の細胞分離溶液である。線維芽細胞、ケラチノサイト、血管内皮細胞、肝細胞、血管平滑筋細胞、肝細胞前駆細胞等を含む多種多様な細胞に加え、ヒト ES 細胞、ヒト間葉系幹細胞、ヒト神経幹細胞でも有効であることが示されている。詳細な組成は明らかにされていないが、プロテアーゼ、コラゲナーゼ活性が組み合わされて調製されている。

#### **アキュマックス Accumax(Merck Millipore:SCR005)**

Accumax は、Accutase に DNase 活性が追加された細胞分散溶液である。コラゲナーゼの代替物として利用でき、Accutase と同様に幹細胞培養にも用いられている。Accutase に比べて酵素活性が強く、胚様体などの細胞塊分散にも用いられている。

#### **トリプシン Trypsin**

トリプシンは膵臓から単離された、細胞培養に広く用いられているプロテアーゼである。強力な酵素であり、本研究室ではマウス ES 細胞の培養に 0.25 % Trypsin/EDTA を用いている。霊長類多能性幹細胞の研究においてはより濃度の低い 0.05 % Trypsin が用いられる。しかしながらヒト iPS 細胞はトリプシン感受性が強く、シングルセルへの分散とアポトーシスを引き起こすといわれている。

今回の検討では上記の酵素を用いてヒト iPS 細胞を単層培養より回収し検討を行った。また上記の酵素にくわえ、単一分散状態の霊長類 ES/iPS 細胞の生存を支持することが報告されている、Rho-associated coiled-coil forming kinase inhibitor (ROCK inhibitor)にも着目した[62]。酵素でのディッシュ培養からの細胞の回収時に ROCKi も添加し、胚様体形成能・細胞増殖能を調査した。この実験によって今後の実験で使用する細胞回収条件を決定した。

### ROCK inhibitor (Y-27632)

Y-27632 (和光純薬 :257-00511)をヒト iPS 培養培地に対して、最終濃度 10  $\mu$ M となるように添加した。

※ROCK inhibitor の標的となる Rho-associated キナーゼ(ROCK)は、細胞質に存在するセリン-スレオニンキナーゼの一種であり、GTP 結合タンパク質 Rho などいくつかの低分子タンパク質の結合により活性化される。Rho シグナリングは、ミオシンフォスファターゼのリン酸化や LIM キナーゼのリン酸化を介して、細胞増殖、細胞分化、細胞質分裂、細胞運動性、

## 第4章 ヒト iPS 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討

細胞接着、および細胞骨格配の制御において重要な役割を果たしている。ヒト ES 細胞では単一分散状態において、ROCK 依存的にミオシンの過剰活性化が引き起こされ、この過剰活性化はブレンピングと呼ばれる細胞表面の突起を伴って、アポトーシスをもたらす[62]。

### ヒト iPS 細胞の継代培養

本実験に必要な細胞数を獲得するために、ヒト iPS 細胞の継代培養を行った。またヒト iPS 細胞は CELL BANK から入手時には on feeder 培養になっているため、入手直後は on feeder 培養を行い、その後、on feeder 培養からフィーダーフリー条件へ移行するため、Gelrex を培養基質として用いて継代を続けた。以下に詳細を示す。

#### ◆On feeder でのヒト iPS 細胞継代培養

##### SNL feeder 細胞上での培養

SNL 細胞を、100 mm dish に  $1.0 \times 10^6$  cells/100 mm dish になるように播種し、コンフルエントになるまで  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  でインキュベートした。SNL feeder dish は培養培地を除去後、SNL feeder 細胞用培地/ mytomycin C 溶液を 100 mm dish 1 枚あたり 4 mL ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間半インキュベートすることで細胞増殖を停止させ、feeder 層として用いた。

ヒト iPS 細胞を播種する際は、播種前日から 0.1 %ゼラチンコート 60 mm dish に、 $1.0 \times 10^6$  cells/dish で SNL feeder 細胞を播種した dish をあらかじめ用意しておき、そこへ  $2.0 \times 10^6$  cells のヒト iPS 細胞を播種した。その後  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  でインキュベートし、毎日培地交換を行った。

#### ◆Feeder-free (On Geltrex) でのヒト iPS 細胞継代培養

本研究では無血清およびフィーダーフリーでの培養を行うために、on feeder 培養から feeder-free (on Geltrex) 培養へ移行させる必要がある。

##### On feeder 培養から feeder-free (On Geltrex) 培養へ移行

あらかじめ Geltrex でコートした dish を継代前に 1 時間  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  にてインキュベートした。SNL feeder 細胞上で培養しているコンフルエントなヒト iPS 細胞を準備し、培地を PBS(-)で洗い流したのち、0.5 mM EDTA/PBS (-)を dish に加え、 $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  で 3~4 分インキュベートした。0.5 mM EDTA/PBS (-)を除去し、dish 底面に新しい Essential 8 medium を吹き付けるように流すことで、ヒト iPS 細胞を適当なコロニーの大きさに dish からはがし、回収した。その後細胞懸濁液を Gelterx-coated dish へ播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  でインキュベートし、翌日から毎日培地交換を行った。

##### ヒト iPS 細胞の継代培養 (on Geltrex)

on Geltrex 間での継代においても on feeder 培養からの移行と同様に、5 mM EDTA/PBS(-)を用いて操作を行った。継代後は 100 mm dish 1 枚あたり 12 mL の Essential 8 medium を用い

## 第4章 ヒト iPS 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討

て 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 雰囲気下でインキュベートし、毎日培地交換を行った。継代操作は iPS 細胞の状態を観察し、3~4 日に一度程度の頻度で行った。なお継代スケールは細胞の増殖具合に応じて、1:4 -1:12 の範囲で行った。

### ヒト iPS 細胞の凍結保存

ヒト iPS 細胞の凍結保存では、継代時と同様の操作によって細胞をコロニーで回収したのち、10 % DMSO/ Essential 8 medium で再懸濁し、クライオバイアルへ移し、液体窒素中に移し保存した。保存する際は、バイアル 1 本当たり 60 mm dish 1 枚となるように再懸濁を行った。

### 4.1.2.2 ヒト iPS 細胞の分散と播種方法

#### 培養ヒト iPS 細胞の分散

80%コンフルエント状態のヒト iPS 細胞を準備した。この時、播種前日の培地交換時に培地を除き、10 $\mu$ M ROCKi (和光純薬工業 : 257-00511) を添加した iPS 細胞用培地を加え、37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> で一晩インキュベートした。継代直前に培地を回収し、PBS(-) で洗浄し、培地を取り除いた。それぞれの dish に三種の酵素を用いて Table. 4.2 に示した条件でインキュベートした。その後 10  $\mu$ M ROCKi を添加した培地を 3mL 加えヒト iPS 細胞を回収し、細胞数計数および生存率の評価を行った。

**Table 4.2 Reaction conditions of each enzyme**

	Accutase	Accumax	0.25%Trypsin/EDTA
Volume /100 mm dish	3 mL	3 mL	1 mL
Reastion time	15 min	15 min	3 min
Reaction temparature	R/T	R/T	37 °C

### 胚様体の培養条件

Fig. 4.1 に、浮遊培養による胚様体形成の概要図を示す。分化培養前日から ROCKi を添加したヒト iPS 細胞をアキュターゼ、アキュマックス、トリプシンの 3 種の酵素によって分散状態にした後、細胞低接着性の 96 穴マルチウェルプレート(住友ベークライト : MS-9096U) に播種した。1 ウェルあたりの播種細胞数はそれぞれ 1.0 $\times$ 10<sup>3</sup>, 1.0 $\times$ 10<sup>4</sup>, 1.0 $\times$ 10<sup>5</sup> cells とした。培養培地には分化誘導用培地 Essential 6 medium を用い、培養 2 日目以降 ROCKi 非添加 Essential 6 medium で毎日培地を半量交換し、37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 7 日間培養を行った。

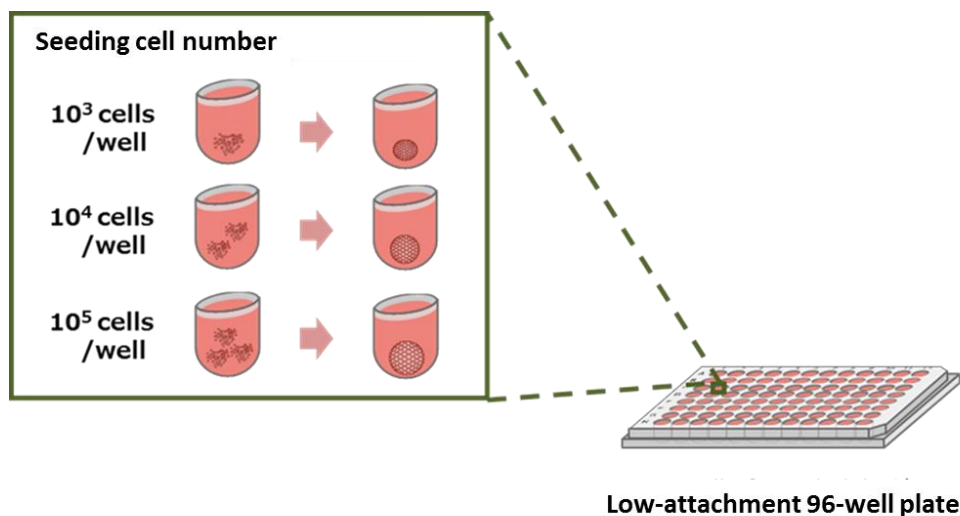


Fig. 4.1 A schematic illustration of suspension culture for forming of embryoid bodies

#### 4.1.2.3 評価方法

##### 胚様体の形態観察

インキュベーターから 96 穴マルチウェルプレートを取り出し、倒立型位相差顕微鏡 (DMIRB; Leica Microsystems, Tokyo, Japan) につけられたデジタルカメラを使って、胚様体の写真撮影を行った。

##### 胚様体の粒径測定

胚様体の形態写真を準備し、デジタル画像計測ソフトマイクロアナライザー Ver.1.1c (日本ポラデジタル株式会社) を用いて胚様体の外径と内径を測定した。胚様体の外径と内径の平均を胚様体 1 つあたりの粒径とした。

##### 細胞数計数

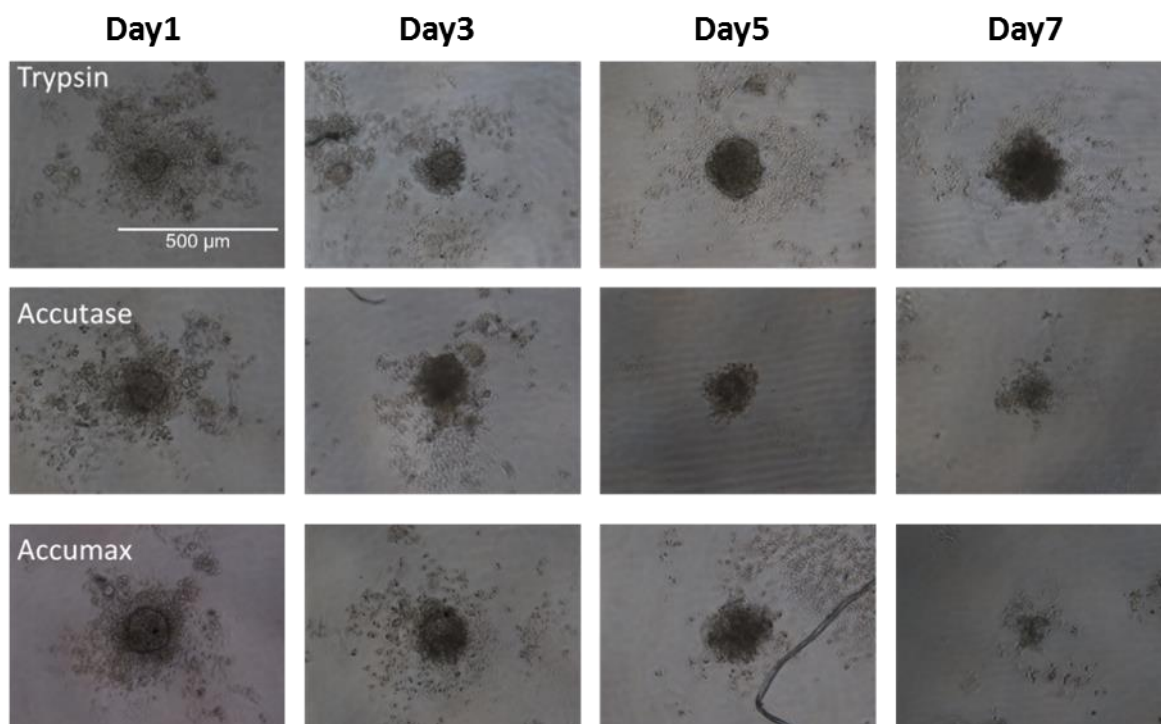
核数計数には NucleoCounter<sup>TM</sup> (Chemometric)、NucleoCasset<sup>TM</sup> (Chemometric : 941-0002) を用いた。マウス ES 細胞では 2 核の割合を 1.07 として換算していたが、ヒト iPS 細胞ではそのまま細胞数=核数として計算を行った。

### 4.1.3 実験結果

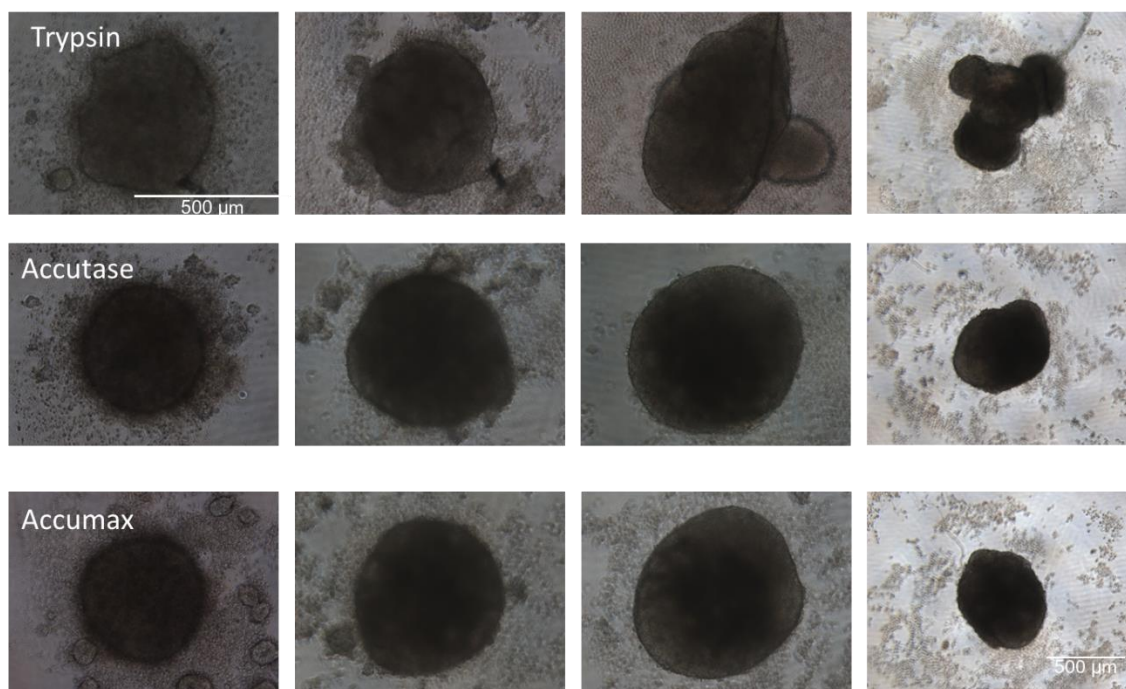
#### 培養経過に伴う胚様体の形態変化

各培養期間における胚様体の形態を Fig. 4.2 に示す。 $1.0 \times 10^3$  cells を播種することで作製した胚様体では、胚様体は培養 3 日目から徐々に崩れていき、アキュターゼ、アキュマックスの系では最終的には凝集体をほとんど形成していなかった。一方で  $1.0 \times 10^4$  cells を播種することで作製した胚様体では、すべての酵素の系で粒径は増え続け、培養 5 日目からその輪郭が崩れ始めていた。 $1.0 \times 10^5$  cells を播種することで作製した胚様体については、トリプシン、アキュマックスの系では、初期の胚様体粒径は  $1000 \mu\text{m}$  をこえる大きなものであったが、培養期間が経過するにつれ粒径が減少していき最終的に直径約  $800 \mu\text{m}$  程度になった。一方アキュターゼの系においては培養初期からほとんど粒径は変わらず、培養期間を通じて直径約  $800 \mu\text{m}$  のまま維持されていた。一方、培養 5 日目以降、球の輪郭が崩れていく様子が確認された。これは胚様体内部で形態の異なる種々の細胞への分化が進行していくことで、球状を保てなくなったためだと考えられる。

(a)



(b)



(c)

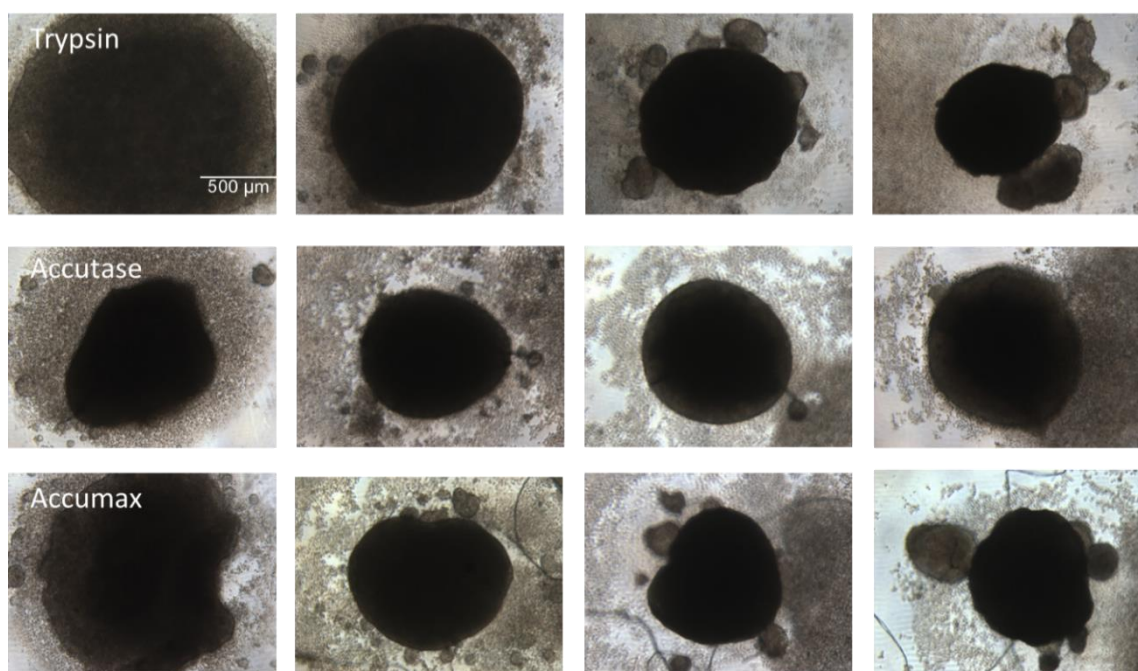


Fig. 4.2 Morphology of embryoid bodies in the various seeding cell conditions (a) $1.0 \times 10^3$  cells condition (b) $1.0 \times 10^4$  cells condition (c) $1.0 \times 10^5$  cells condition

培養経過に伴う胚様体の粒径変化

培養経過に伴う胚様体粒径変化を Fig. 4.3 に示す。

$1.0 \times 10^3$  cells を播種した系ではすべての酵素条件において胚様体の粒径が安定しなかった。 $1.0 \times 10^4$  cells を播種した系ではすべての条件において培養期間を通して粒径が増加し続けていた。一方  $1.0 \times 10^5$  cells を播種することで作製した胚様体については、各酵素条件によって差が見られた。トリプシン、アキュマックスの系では、初期の胚様体粒径は  $1000 \mu\text{m}$  をこえていたが、培養期間が経過するにつれ粒径が減少していき、最終的に粒径は直径約  $800 \mu\text{m}$  程度になった。一方アキュターゼの系において培養 7 日間で粒径はほぼ一定のままであった。これはアキュターゼを用いた場合、初期の細胞凝集、細胞間結合が良好であったことを示唆している。また、組織体中心部への物質供給を考えたとき、粒径約  $800 \mu\text{m}$  が拡散の限界であったと推測される。

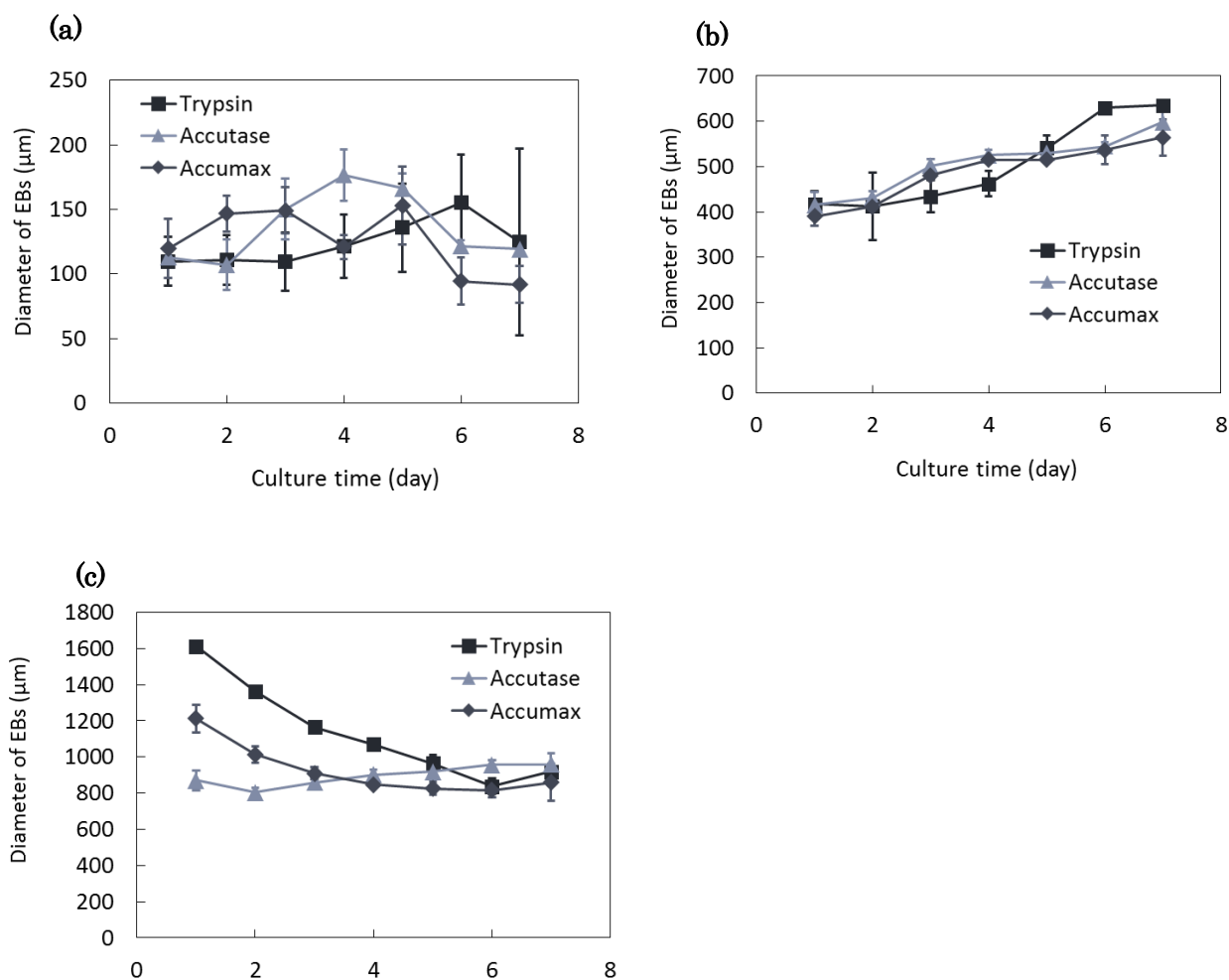


Fig. 4.3 Changes in diameter of EBs throughout the culture process under each condition (a)  $1.0 \times 10^3$  cells condition (b)  $1.0 \times 10^4$  cells condition (c)  $1.0 \times 10^5$  cells condition

培養経過に伴う胚様体一つあたりの細胞数変化

培養経過に伴う胚様体 1 つあたりの細胞数の推移を Fig. 4.4 に示す。

$1.0 \times 10^4$  cells の系では培養期間を通して胚様体の構成細胞数の増加が観察された。一方  $1.0 \times 10^3$  cells,  $1.0 \times 10^5$  cells では培養初期に細胞数が減少し、培養 5 日目以降から細胞数の増加が観察された。これは、初期の組織体形成時に凝集しきれなかった分散細胞が存在し、組織体構成細胞数が播種細胞数よりも少なくなっており、加えて分散細胞が培地交換によって取り除かれたためだと考えられる。また粒径変化と合わせて考えると、アキュターゼを用いた系で培養初期の細胞密度が高くなっており、細胞間の接着、凝集が良好に行われたことが示唆された。

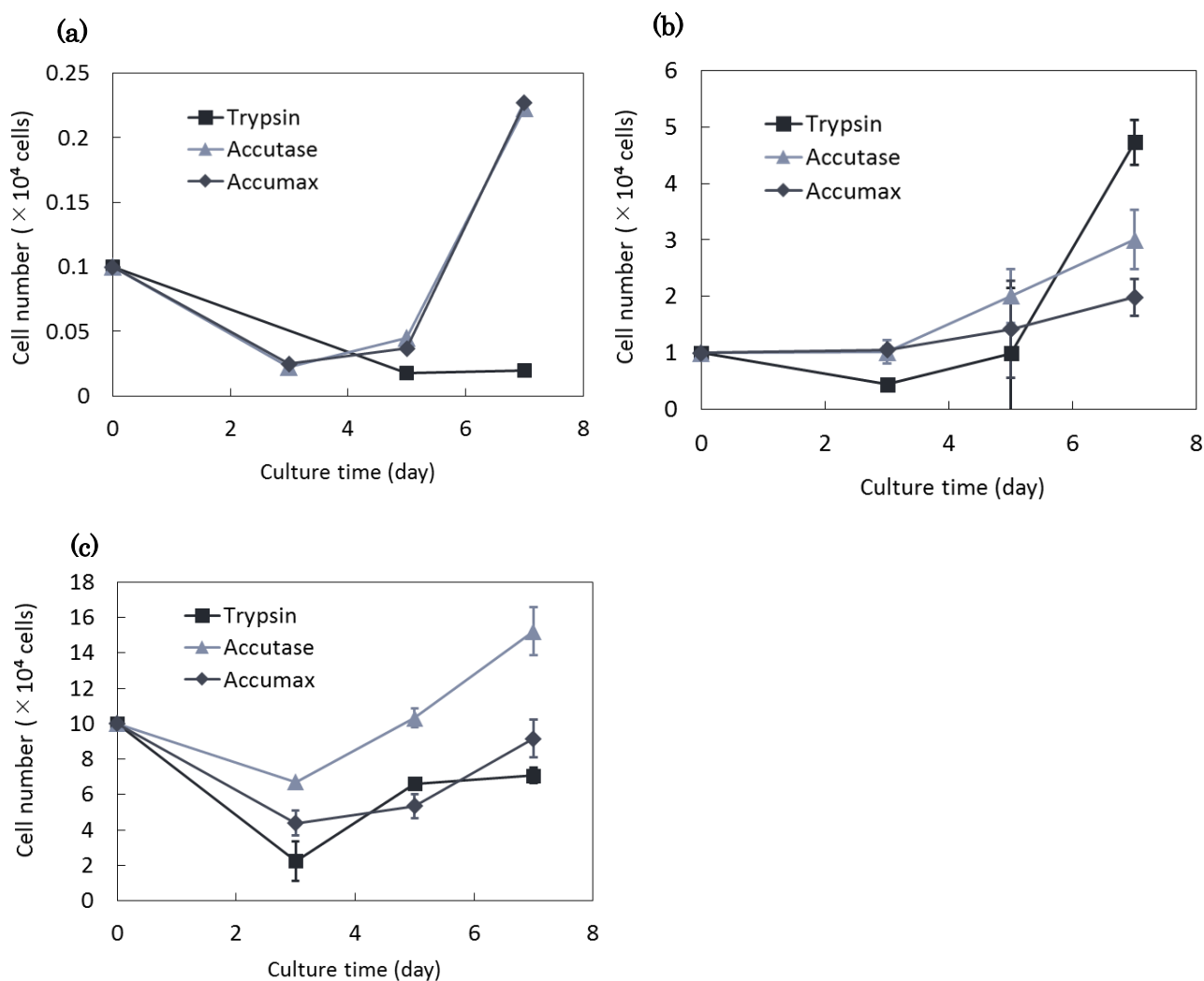


Fig. 4.4 Changes in the cell number of EBs throughout the culture process under each condition (a)  $1.0 \times 10^3$  cells condition (b)  $1.0 \times 10^4$  cells condition (c)  $1.0 \times 10^5$  cells condition



### 4.2 胚様体培養および中空糸培養を用いたヒト iPS 細胞から造血幹細胞への分化培養

#### 4.2.1 本節の目的

前節において、ヒト iPS 細胞での三次元培養を行う際、酵素アキュターゼを用いることで、分散状態のヒト iPS 細胞から初期の組織体形成が良好に行われることを確認した。一方、ヒト iPS 細胞を用いた検討において、更に大きな問題となるのはマウス多能性細胞と比べて非常に低いヒト iPS 細胞の細胞増殖性である。また臨床を目的とすると大量のヒト iPS 細胞が要求され、その大量培養法に関する検討が必須である。

単層培養において多量の細胞を得ようとした場合、その細胞密度の低さに伴い、スケールアップとともに広い培養面積を必要とするため、大量培養法に適しているとはいえない。そのため培養体積当たりの細胞数を増やすことのできる三次元培養が着目される。ヒト多能性幹細胞を用いた三次元培養としては、マイクロキャリアや細胞凝集体を用いたスピナーフラスコ等による攪拌培養、機能性ポリマーを用いたスフェア培養法、また近年ではナノファイバーにより作製されたメッシュ上での培養等が注目されている。これらの研究の中のいくつかでは、細胞を効率良く増幅をさせるためには、初期の播種細胞数が重要であることが報告されている。また、多能性幹細胞の分化誘導における運命決定制御に関する既往の研究において、培養初期の組織体形状がその後の細胞増殖、三胚葉への自発的分化に大きく関わっていることが示唆されている[63,64]。この中で Moon らは、物理的環境を制御するために、サイズ調整可能な異なる直径(300  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$  および 1000  $\mu\text{m}$ )もつ凹型マイクロウェルを作製し、それによってヒト ES 細胞から形成される胚様体のサイズを調節した。ここで用いられた ES cell line H9-および CHA15-hESC の分化パターンは、増殖因子の非存在および存在下で胚様体サイズによって影響を受け、Nanog、Oct3/4 の減少は分化 10 日目に 300  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 1000  $\mu\text{m}$  の順で確認された[63]。このように組織体形状による分化誘導への影響を評価することは、今後の分化誘導法の最適化において大きな役割を果たすと考えられる。

そこで本章では分化培養における初期固定化細胞密度に着目し、これを変化させることで胚様体培養法ならびに中空糸培養法という 2 種類の三次元培養での細胞増殖能向上に向けた検討およびそれに伴うヒト造血幹細胞表面抗原である CD34 発現率の確認を行った。

### 4.2.2 実験方法

#### 4.2.2.1 中空糸培養法

第3章と大筋は同様に行ったが、相違点を以下に示す。

##### 播種条件

播種細胞密度として、① $2.0 \times 10^5$  cells/mL ② $5.0 \times 10^5$  cells/mL ③ $1.0 \times 10^6$  cells/mL ④ $2.0 \times 10^6$  cells/mL ⑤ $3.0 \times 10^6$  cells/mL の細胞懸濁液を準備し、それぞれ中空糸内部に固定化し培養を行った。

##### 中空糸バンドルの作製

中空糸として、エチレン・ビニルアルコール共重合体をコートしたポリエチレン製中空糸 (PE/EVAL; 内径 330  $\mu$ m、膜厚 50  $\mu$ m、孔径 0.3  $\mu$ m、旭化成メディカル) を使用した。第3章と同様の手法により、3 cm の中空糸 6 本を用いた中空糸バンドルを作製し、培養に使用した。

##### 中空糸バンドルの親水化および置換処理

70% EtOH を浸透済の中空糸バンドルの入った 3 L ビーカー二次水で満たし、アルミでふたをして、115  $^{\circ}$ C、15 分の条件でオートクレーブ滅菌し、徐冷させた。親水化後の中空糸バンドルは、播種前に DMDM-F12(SIGMA : I3390) によって置換した。

##### 中空糸バンドルへの播種方法

アキュターゼによって回収した分散状態ヒト iPS 細胞を、① $2.0 \times 10^5$  cells/mL ② $5.0 \times 10^5$  cells/mL ③ $1.0 \times 10^6$  cells/mL ④ $2.0 \times 10^6$  cells/mL ⑤ $3.0 \times 10^6$  cells/mL となるように播種用の細胞懸濁液を調製した。1 mL シリンジで 1 mL の細胞懸濁液を吸い取り、中空糸バンドル内に細胞懸濁液を注入した。その後、200 $\times$ G で 180 秒間遠心付加を行った。細胞の固定化された中空糸バンドルを 60 mm dish に移し、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下において 45 rpm で巡回培養を行った。

#### 4.2.2.2 胚様体培養

第3章と大筋は同様に行ったが、相違点を以下に示す。

継代培養したヒト iPS 細胞を、アキュターゼを用いた酵素処理によって分散回収した後、細胞低接着性 96 穴マルチウェルプレート PrimeSurface(住友ベークライト)に、1 ウェルあたりの播種細胞数を  $1.0 \times 10^4$  cells,  $5.0 \times 10^4$  cells,  $1.0 \times 10^5$  cell として播種した。

### 4.4.2.3 培養条件

両培養法とも Essential 6 medium 中で分化培養を行った。中空糸/オルガノイド培養法は中空糸播種翌日(day1)までは培地へ 10  $\mu$ M ROCKi を添加し、その後 ROCKi 非添加 Essential 6 medium で毎日培地交換を行った。胚様体培養法では培養 2 日目から培地交換を開始し、その後は ROCKi 非添加 Essential 6 medium で毎日培地の半量交換を行った。37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub> 雰囲気下で両培養法とも 7 日間培養を行った(Fig. 4.5)。

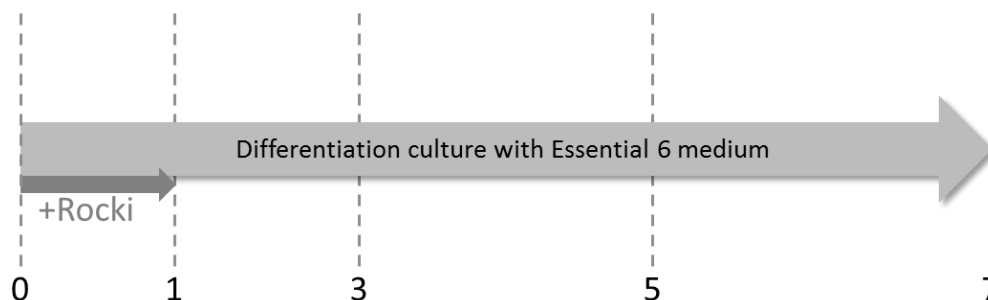


Fig. 4.5 Culture condition of both culture method

### 4.2.2.4 評価方法

#### 核数計数

核数計数には NucleoCounter<sup>TM</sup> (Chemometric)、NucleoCasset<sup>TM</sup> (Chemometric : 941-0002)を用いた。ヒト iPS 細胞では 2 核の割合が低いため、マウス ES 細胞の場合とは異なり、細胞数 = 核数として計測している。

#### 造血幹細胞画分の定量評価

第 3 章に示した Guava PCA による細胞表面抗原を利用した評価手法を行うためには、胚様体ならびに中空糸内部に存在する細胞凝集体構成細胞を分散状態で回収する必要がある。これはマウス ES 細胞を用いた培養の場合と同様であるが、ヒト iPS 細胞では回収用酵素として 0.25 % トリプシンに代わり、アキュマックス Accumax (Innovative Cell Technologie:AM105) を用いる。またヒト細胞では造血幹細胞細胞マーカーとして CD34 を用いることとする。回収方法、手順を以下に示す。

#### 中空糸/オルガノイド培養法での回収

分化誘導培地の入った 60 mm ディッシュから細胞回収用の中空糸バンドルを取り出し、PBS(-)が 6 mL 入った 60 mm ディッシュに中空糸バンドルを移して、10 分間巡回しながら

## 第4章 ヒト iPS 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討

インキュベートした(45 rpm, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>)。PBS(-)が入った 60 mm ディッシュから中空糸バンドルを取り出し、細胞を中空糸壁面から剥離させるためにアキュマックスが 3 mL 入った 60 mm ディッシュに中空糸バンドルを移して 5~15 分程度巡回しながらインキュベートした(45 rpm, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>)。この時のインキュベート時間は培養後半になるごとに長くしていった。酵素反応を停止させるために、アキュマックスが入った 60 mm ディッシュから中空糸バンドルを取り出し、PBS(-)が 6 mL 入った 60 mm ディッシュに中空糸バンドルを移した。中空糸バンドルから栓を取り外して、φ4-6 mm シリコンチューブに 2.5 mL シリンジをはめた。中空糸の全体を PBS(-)につけ、はさみで先端部を切断し、シリンジで PBS(-)ごと吸引して中空糸内部から分散状態になった細胞を回収し、空の 15 mL チューブに押し出した。1000 rpm, 3 min で遠心し、PBS(-)を取り除いたのち、基礎培地 DMEM-F12 で再懸濁を行った。これを細胞計数し、 $5.0 \times 10^5$  cells の細胞を回収し、Flowcytometry 用 Buffer を 50 μL 加えたものを 2 本作製した

### 胚様体培養法での回収

96 穴マルチウェルプレートから胚様体を培地ごと 50 mL 遠心チューブに回収し、1000 rpm で 5 分間遠心した。上清除去後、PBS(-)を加え遠心し、取り除くことで洗浄した。この操作を 2 回繰り返して培地を取り除いた。あらかじめ温めておいたアキュマックスを 1 mL 加え、37 °C で 5~10 分程度インキュベートした。その後遠心しアキュマックスを取り除き PBS(-)をピペッティングにより、胚様体を崩した。1000 rpm で 3 分間遠心後、培地を 5 mL 加え、再懸濁した。細胞計数後、 $5.0 \times 10^5$  cells の細胞を回収し、Flowcytometry 用 Buffer を 50 μL 加えた。これを 2 本作製した。

### CD34 抗体処理

抗体処理を行うため、室内を暗くし、アルミホイルで遮光した。アイソタイプコントロールのサンプルに 5 μL Mouse IgG2a isotype control antibodies, PE (Miltenyi Biotec:130-091-835)を、ポジティブコントロールのサンプルに 5 μL CD34-PE antibodies, human (Miltenyi Biotec:130-081-002)を加え、暗所、4 °C で 10 分間静置した。その後 Flowcytometry Buffer を 1 mL 加え、遠心洗浄を 2 回行った。Flowcytometry Buffer 0.5 mL~1.5 mL に懸濁し、Guava PCA で解析を行った。

### Flowcytometry Buffer

PBS(-)へ 0.5 % BSA(10 % BSA Diluent/Blocking Solution, KPL,50-61-00)および 2 mM EDTA (EDTA・2NA), Dojindo, 343-01861)を添加し、Flowcytometry Buffer として用いた。

### 4.2.3 実験結果

#### 培養経過に伴う胚様体の形態変化

培養経過に伴う胚様体の形態変化を Fig. 4.6 に示す。この結果から、 $1.0 \times 10^4$  cells/well 条件では培養 1 日目から胚様体の形成が行われたことが示された。またその粒径は培養経過に伴い大きくなっていった。一方で、 $5.0 \times 10^4$  cells/well および  $1 \times 10^5$  cells/well 条件では、培養初期に胚様体の周囲に分散細胞が存在し、その輪郭も不明瞭であったことから細胞の凝集が不十分であり胚様体形成の不良が引き起こされたことが示唆された。その後は培養 3 日目までにすべての条件で胚様体が形成された。粒径は培養初期と後期で大きく変化はしなかった。

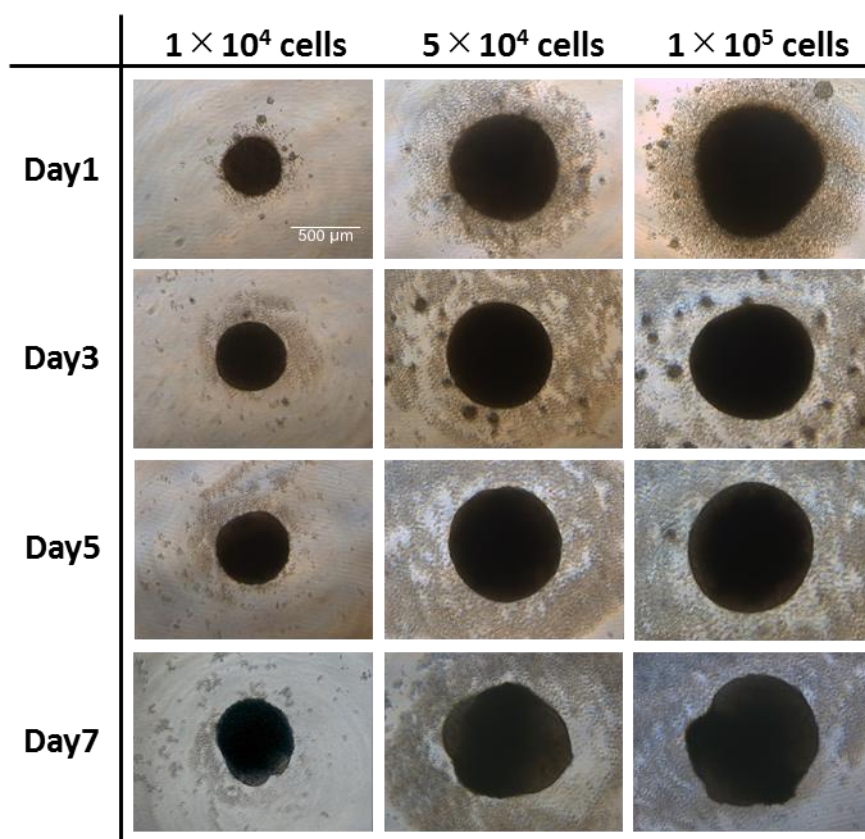


Fig. 4.6 Morphology of EBs with different seeding cell density. Representative images of EBs consisting of human iPS cells in suspension culture on days 1, 3, 5 and 7. Scale bar = 500  $\mu$ m.

培養経過に伴う胚様体の粒径変化

培養経過に伴う胚様体の粒径の推移を Fig. 4.7 に示す。この結果から、 $1.0 \times 10^4$  cells/well の条件では培養経過に粒径が増大したことが示された。一方で、 $5.0 \times 10^4$  cells/well および  $1.0 \times 10^5$  cells/well の条件では、培養初期に一度粒径が小さくなったのち、増大したことが示されたが、その変化幅は  $1.0 \times 10^4$  cells/well 条件に比べ小さくなっていった。特に、 $1.0 \times 10^5$  cells/well 条件では粒径は  $900 \mu\text{m}$  程度からほとんど変化しなかった。これは物質拡散の影響によって、胚様体サイズが制限されたことによると考えられる。

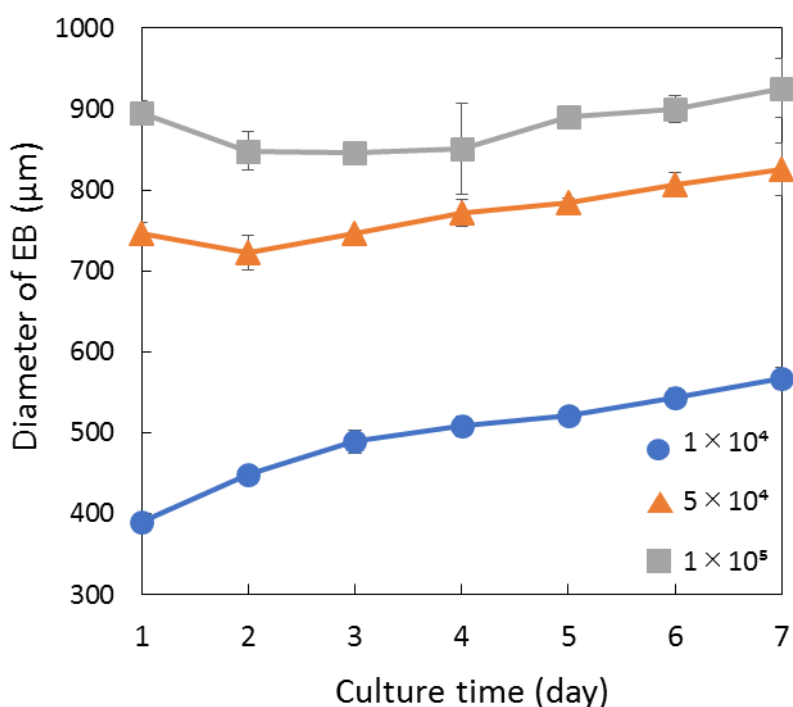


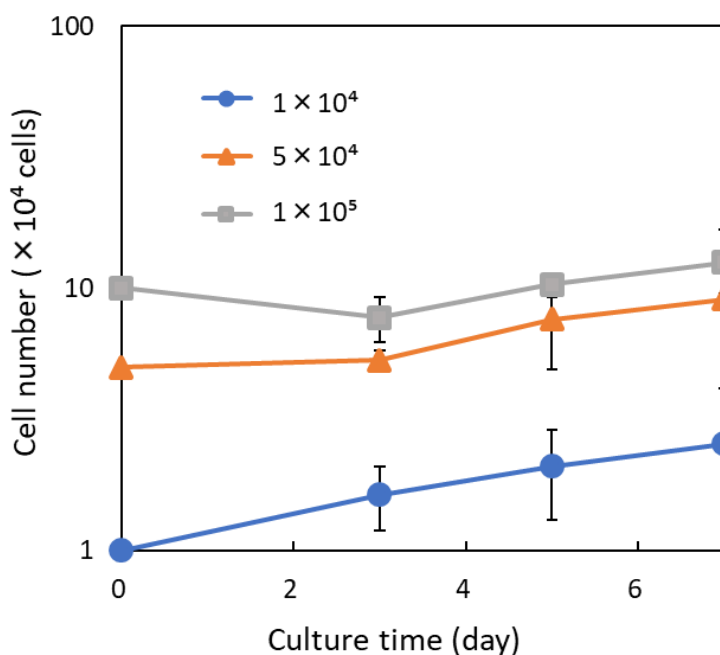
Fig. 4.7 Changes in the diameter of EBs with different seeding cell density. Blue line:  $1.0 \times 10^4$  cells, Orange line:  $5.0 \times 10^4$  cells, Grey line :  $1.0 \times 10^5$  cells. Data are presented as the means  $\pm$  S.D.

両培養法における細胞数変化

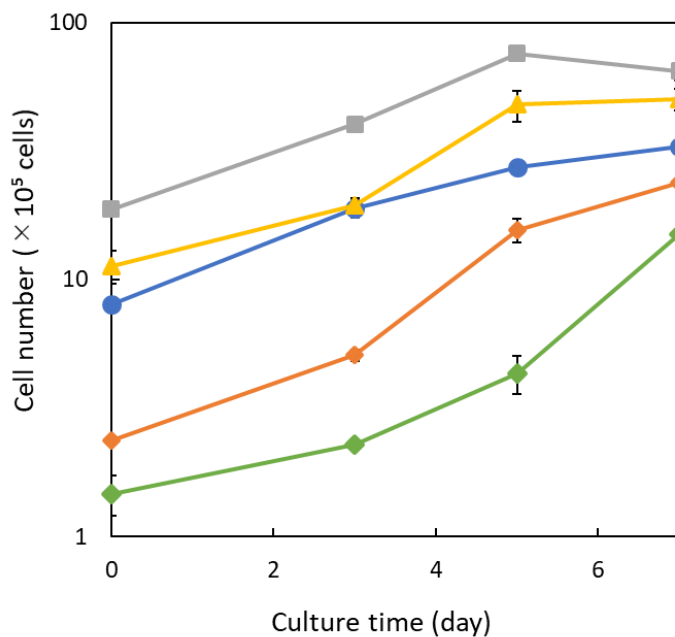
胚様体培養法の細胞数の推移を Fig. 4.8(a)に、比増殖速度を Table 4.3(a)に示す。この結果から、 $1.0 \times 10^4$  cells/well の条件で最も良好な細胞増殖が行われることが示唆された。これは粒径変化において、他条件ではその胚様体の成長が制限されたために、細胞数においても同様の傾向が示されたと考えられる。

続いて中空糸培養法」での細胞数」の推移を Fig. 4.8(b)に、比増殖速度を Table 4.3(b)に示す。すべての系において、培養期間を通じて細胞の増殖がみられることが分かった。しかしながらその比増殖速度の推移には違いが見られた。 $2.0 \times 10^5$  cells、 $5.0 \times 10^5$  cells 播種条件では培養後期にかけて比増殖速度が上昇したのに対し、 $1.0 \times 10^6$  cells、 $2.0 \times 10^6$  cells、 $3.0 \times 10^6$  cells 播種条件ではその速度が低下した。

(a)



(b)



**Fig. 4.8 Changes in cell number of both culture methods with different seeding cell density. (a) EB culture method with different seeding cell density. Blue line :  $1.0 \times 10^4$  cells, Orange line :  $5.0 \times 10^4$  cells, Grey line :  $1.0 \times 10^5$  cells. (b) HF culture method with different seeding cell density. Green line:  $2.0 \times 10^5$  cells, Orange line :  $5.0 \times 10^5$  cells, Blue line :  $1.0 \times 10^6$  cells, Yellow line:  $2.0 \times 10^6$  cells, Grey line :  $3.0 \times 10^6$  cells. Data are presented as the means  $\pm$  S.D.**



(a)

	Specific growth rate( $h^{-1}$ ) 0-5(day)	Specific growth rate( $h^{-1}$ ) 0-7(day)
$1 \times 10^4$ cells	$0.00613 \pm 0.00043$	$0.00554 \pm 0.00053$
$5 \times 10^4$ cells	$0.00043 \pm 0.00042$	$0.00355 \pm 0.00004$
$1 \times 10^6$ cells	$0.00025 \pm 0.00012$	$0.00134 \pm 0.00027$

(b)

	Specific growth rate( $h^{-1}$ ) 0-5(day)	Specific growth rate( $h^{-1}$ ) 0-7(day)
$2 \times 10^5$ cells	0.00903	0.01387
$5 \times 10^5$ cells	0.01573	0.01373
$1 \times 10^6$ cells	0.01025	0.00840
$2 \times 10^6$ cells	0.01203	0.00890
$3 \times 10^6$ cells	0.01161	0.00735

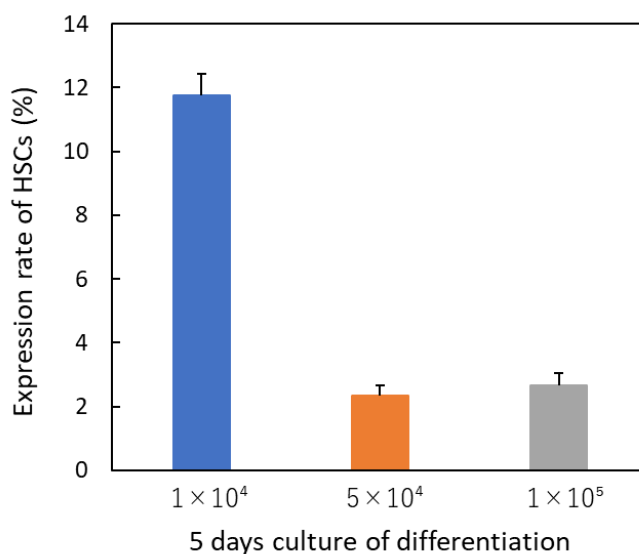
**Table 4.3** Specific growth rate of both culture methods with different seeding cell density (a) EB culture method (b) HF culture method

#### 両培養法における造血幹細胞マーカー発現率

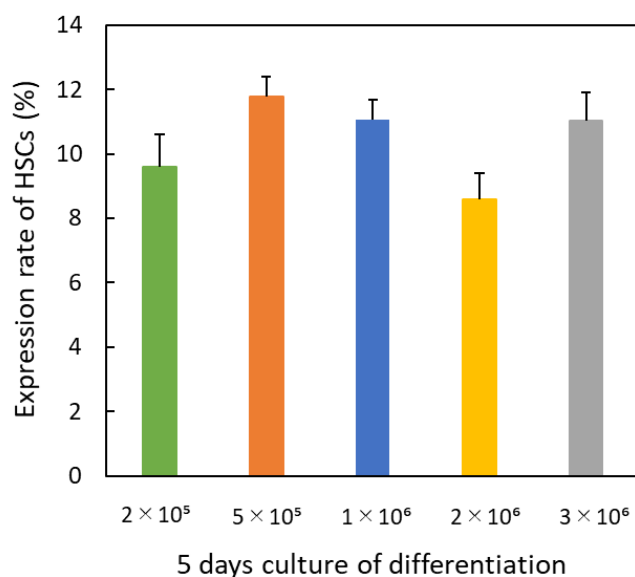
続いてヒトの造血幹細胞マーカーとして広く用いられている CD34<sup>+</sup>細胞の発現率を示す。

胚様体培養の結果を Fig. 4.9 に、中空糸培養の結果を Fig. 4.10 に示している。

胚様体培養法では各培養期間における CD34 発現は、 $1.0 \times 10^4$  cells/well 条件でのみ 5 日目をピークとして観察され、その最大の発現率は約 12 %ほどであった。その後造血幹細胞の発現率は減少に転じた。一方中空糸培養では、CD34 発現率はすべての播種細胞数条件において 10 %前後であった。



**Fig. 4.9** The expression of HSCs on day 5 of culture in EB culture method. Blue bar :  $1.0 \times 10^4$  cells, Orange bar :  $5.0 \times 10^4$  cells, Grey bar :  $1.0 \times 10^5$  cells.



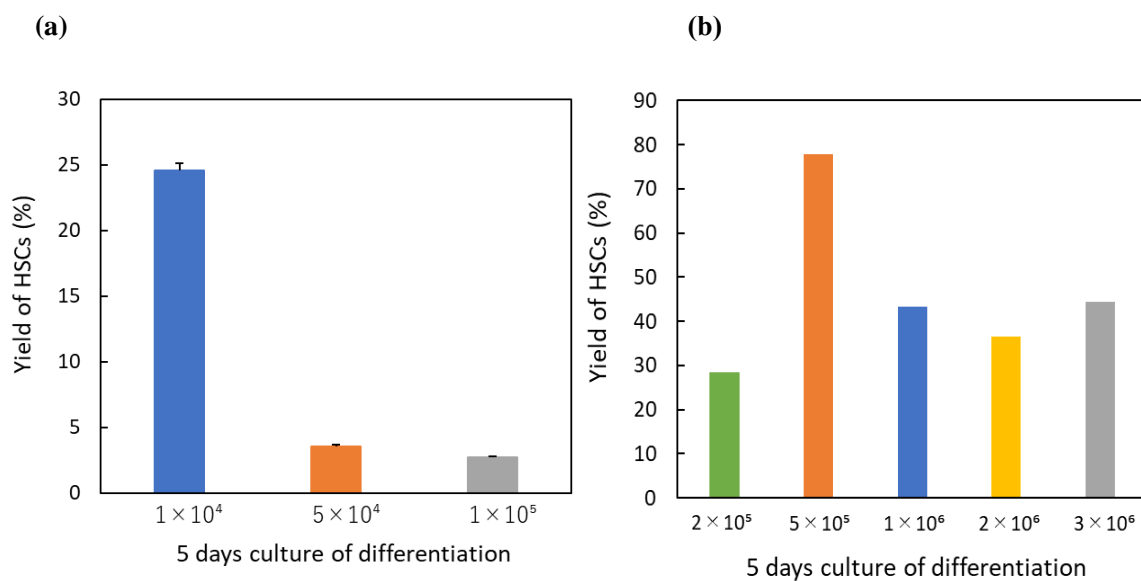
**Fig. 4.10** The expression of HSCs on day 5 of culture in HF culture method. Green bar:  $2.0 \times 10^5$  cells, Orange bar :  $5.0 \times 10^5$  cells, Blue bar :  $1.0 \times 10^6$  cells, Yellow bar:  $2.0 \times 10^6$  cells, Grey bar :  $3.0 \times 10^6$  cells. Data are presented as the means  $\pm$  S.D.

#### 両培養法における造血幹細胞マーカー陽性細胞の収率

両培養系の初期細胞数に対して獲得可能造血幹細胞数(CD34<sup>+</sup>細胞数)がどれだけの割合になるのか、造血幹細胞獲得収率を推定した(Fig. 4.11)。今回の検討では、それぞれの条件において播種細胞数が大きく異なるため、各培養点による収量を算出したのち、それを固定化細胞数で割ることによって初期播種細胞数に対する収率を推定した。その結果胚様体培養法(Fig. 4.11(a))では培養 5 日目で、 $1.0 \times 10^4$  cells で播種した系が最も高い収率を示し、その割合は初期播種細胞数の約 25 %程度となっている。

中空糸オルガノイド培養(Fig. 4.11(b))では、収率は細胞数変化と CD34<sup>+</sup>細胞発現率両方の差を反映するため、グラフの形状は発現率の差を拡大したものとなっていた。特に、 $5.0 \times 10^5$  cells 播種の系では、培養 5 日目までの比増殖速度が最も大きくなっていたため、すべての系の中で最も高い、約 80 %の収率を得た。

これらの結果より、マウス ES 細胞での検討と同様に、造血幹細胞の収率に関しては中空糸培養法が胚様体培養法より優れていたことが示された。しかしながら、マウス ES 細胞では中空糸培養において初期播種細胞数に対して 6 倍程度(600%)の造血幹細胞収率が示されており、これと比べると 1/8 程度という低い効率であった。



**Fig. 4.11** Estimated yield of HSCs in both culture methods compared with seeding cell number. (a) EB culture method with different seeding cell density. Blue bar :  $1.0 \times 10^4$  cells, Orange bar :  $5.0 \times 10^4$  cells, Grey bar :  $1.0 \times 10^5$  cells. (b) HF culture method with different seeding cell density. Green bar:  $2.0 \times 10^5$  cells, Orange bar :  $5.0 \times 10^5$  cells, Blue bar :  $1.0 \times 10^6$  cells, Yellow bar:  $2.0 \times 10^6$  cells, Grey bar :  $3.0 \times 10^6$  cells. Data are presented as the means  $\pm$  S.D.

### 4.3 細胞増殖期を加えた造血幹細胞の効率的取得のための培養プロセス構築に関する検討

#### 4.3.1 本節の目的

前節において、ヒト iPS 細胞を単層での維持培養後、酵素で回収しそのまま三次元での分化培養に移行するという 1 段階培養を用いて初期固定化細胞数と細胞増殖、CD34<sup>+</sup>細胞への分化誘導の関係を検討した。その結果、中空糸培養においては播種細胞密度を中空糸体積の 10%程度まで上げることで、培養初期から細胞増殖が良好に行われた。またその際の CD34<sup>+</sup>細胞率はすべての条件においてほぼ同等であった。一方、胚様体培養法では、 $1.0 \times 10^4$ ,  $5.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^5$  cells/well という条件で検討を行ったが、こちらでは播種細胞数が小さいほど細胞増殖は良好であった。これは物質拡散の影響によって胚様体サイズが制限されたことによると考えられる。また、CD34<sup>+</sup>細胞の発現に関しては  $1.0 \times 10^4$  cells/well の条件のみで、中空糸培養と同等の発現が得られた。

これらの結果より、ヒト iPS 細胞の 3 次元 1 段階培養での自発的分化誘導培養においては 10%程度の発現を得られると考えられた。これは第 3 章で検討したマウス ES 細胞での三次元培養における c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>細胞の発現率の結果と同等であった。しかしながら、CD34<sup>+</sup>細胞の獲得効率は、マウス ES 細胞では初期播種細胞数に対して得られる造血幹細胞数(c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>cells)が 6 倍程度であるのに対して、ヒト iPS 細胞では中空糸培養で 0.8 倍程度、胚様体培養では 0.25 倍程度となっておりその効率は非常に低い。また胚様体培養では初期の播種細胞数を増やすことで組織体の形成不良が起きることが確認されている。そのため分化開始時の組織体形状による分化誘導への差が分かりにくいという問題も発生した。

そこで本節では、三次元培養に移行する際、そのまま分化培養に移るのではなく三次元での未分化培養によって十分細胞数を増やしたのち、分化培養に移るという 2 段階培養法での検討を行うこととした。この時、三次元培養での分化開始までに組織体形成を行わせておくことで、組織体形状の差を反映した分化培養も加えて狙った。

### 4.3.2 実験方法

#### 4.3.2.1 培養方法

##### 中空糸培養

アキュターゼによって回収した分散状態のヒト iPS 細胞を、 $1.0 \times 10^6$  cells/mL となるように懸濁液に調製し、1 mL の細胞懸濁液を中空糸バンドルに注入し、播種を行った。

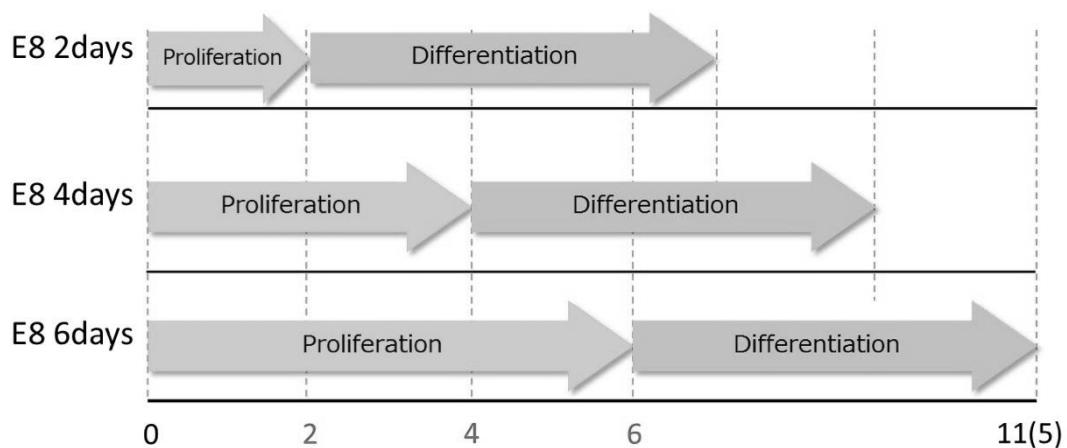
##### 胚様体培養

ヒト iPS 細胞をアキュターゼを用いた酵素処理によって分散回収した後、非接着性 96 ウェルプレート(PrimeSurface®96U プレート, 住友ベークライト)へ 1well あたりの播種細胞数を  $1.0 \times 10^4$  cells として播種し培養を行った。

#### 4.3.2.2 培養条件

両培養法とも三次元培養に移行後、未分化維持培地 Essential 8 medium 中で初期培養を行った。この時、中空糸培養法、胚様体培養法ともに、培養翌日(day1)までは ROCKi を添加した。中空糸培養では未分化培養期間を 2,7 日、胚様体培養では 2,4,6 日と振り、培地交換時に未分化維持用培地 Essential 8 medium を用いることで未分化培養期間の検討をおこなった。維持培養によって細胞増殖を促したのちは、両培養法とも培養培地を分化用培地 Essential 6 medium に変更することで細胞組織体の自発的分化を促した (Fig. 4.12)。

(a)



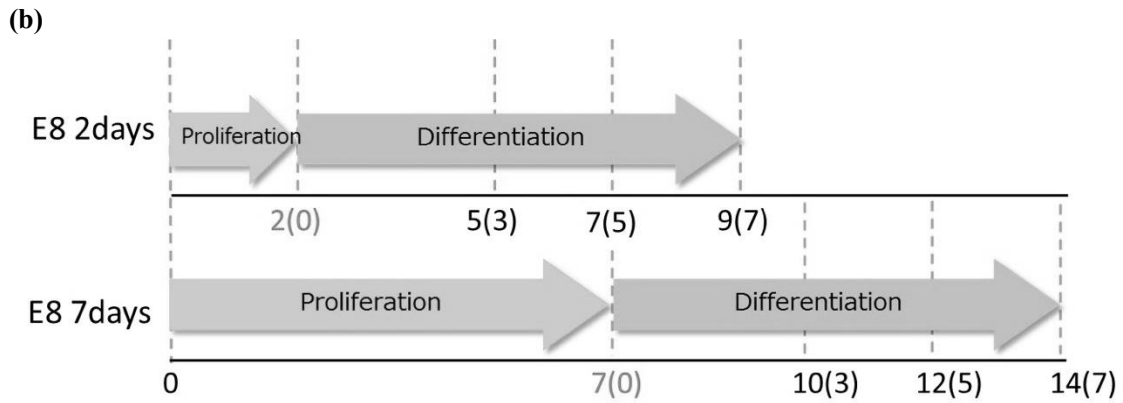


Fig. 4.12 Culture conditions in 2-step culture. (a)EB culture method (b)HF culture method

#### 4.3.2.3 評価方法

##### 細胞数計数

核数計数には NucleoCounter™ (Chemometric)、NucleoCassette™ (Chemometric : 941-0002)を用いた。マウス ES 細胞とは異なり、細胞数=核数として計測している。

##### 造血幹細胞画分の定量評価

Guava PCA による CD34<sup>+</sup>細胞の発現率評価を行った。この評価手法を行うためには、胚様体構成細胞ならびに中空糸内部に存在する細胞凝集体を分散状態で回収する必要がある。これはマウス ES 細胞と同様であるが、ヒト iPS 細胞では回収用酵素としてアキュマックスを用いた。

### 4.3.3 実験結果

#### 培養経過に伴う胚様体の形態変化

すべての前培養条件において、培養 1 日目から胚様体が形成され、その粒径は、Essential 8 medium での前培養が長くなるほど増大していることが示された。また前培養期間の長さにかかわらず培養 7 日目から胚様体の輪郭が崩れ始めた。

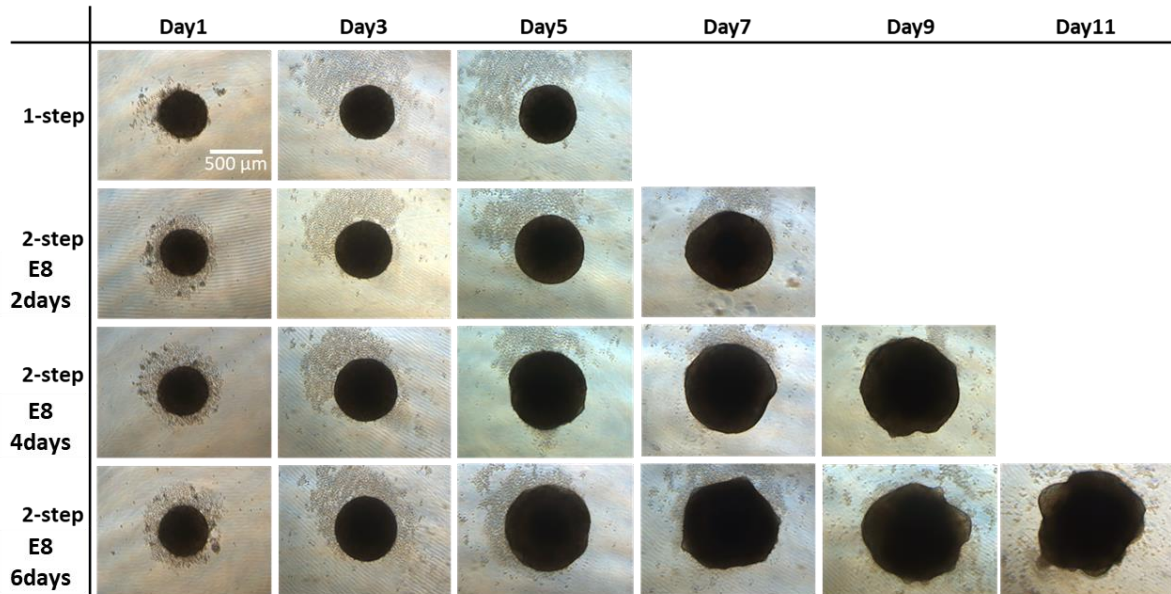


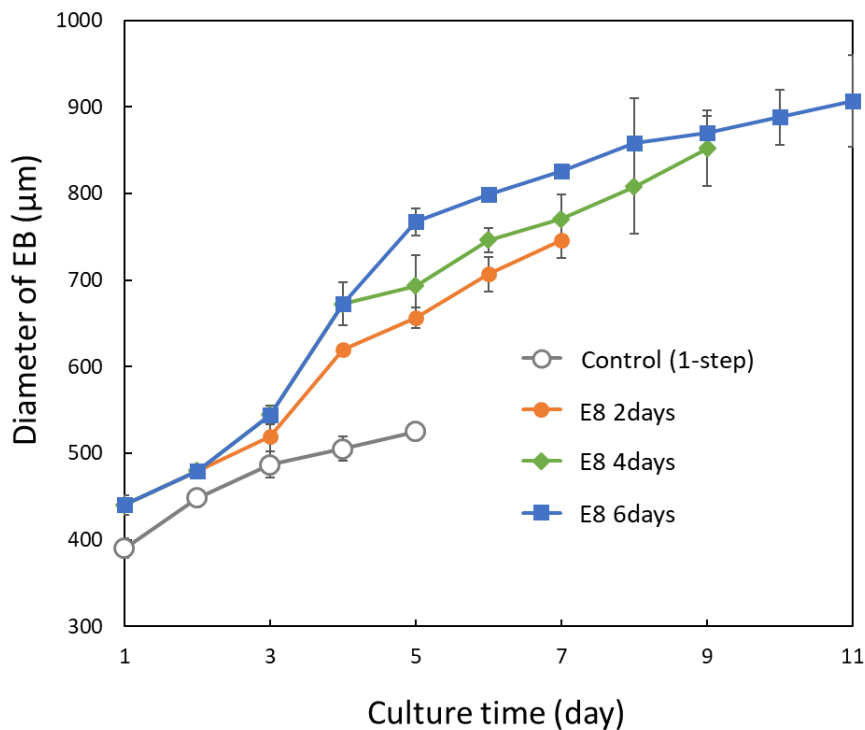
Fig. 4.13 Morphology of EBs with different pre-culture period. Representative images of EBs consisting of human iPS cells in suspension culture on days 1, 3, 5, 7, 9 and 11. Scale bar = 500  $\mu\text{m}$ .



### 培養経過に伴う胚様体の粒径変化

培養系経過に伴う胚様体の粒径変化を Fig. 4.14 に示す。すべての条件において培養経過とともに胚様体の粒径は増大した。この時、細胞増殖期間の長さに応じて胚様体の粒径が大きくなっており、分化培養開始時に異なる粒径の胚様体を用いた検討を行えたことも確認できた。

また、培養開始時から分化用培地 Essential 6 medium を用いた Control の系と比較し、初期培養を未分化維持用培地 Essential 8 medium で行った場合、胚様体形成時からその粒径が大きくなっていた。



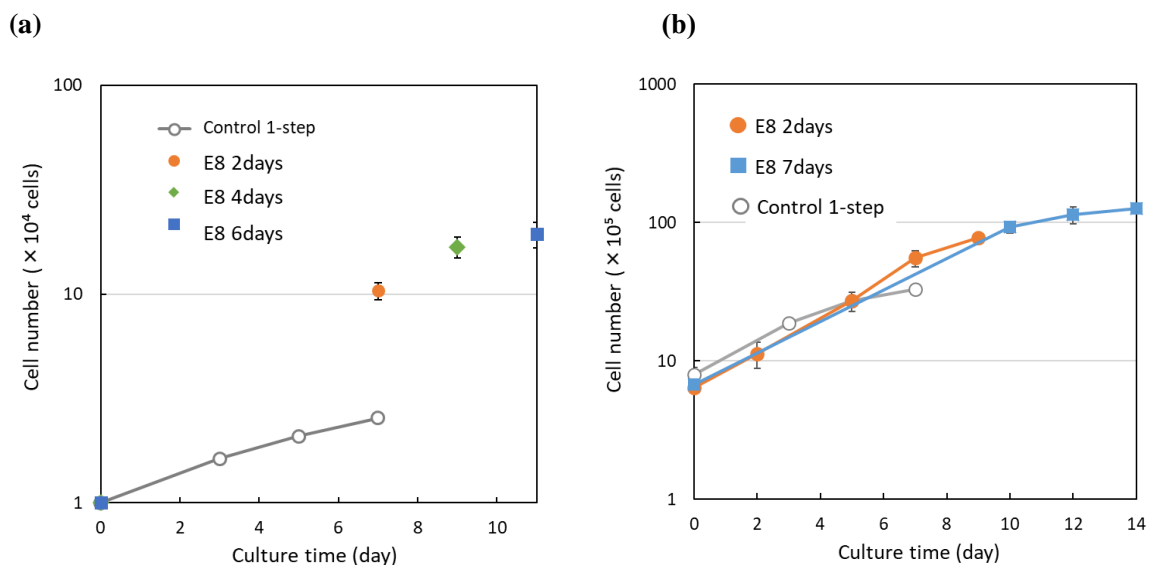
**Fig. 4.14** Changes in the diameter of EBs with different pre-culture period. Orange line: pre-culture 2days, Green line: pre-culture 2days, Blue line : pre-culture 6days, Gley line : 1-step culture as control.

両培養法における細胞数変化

胚様体培養においてはすべての前培養期間において、1 段階培養よりも旺盛な増殖が示された(Fig. 4.15(a))。具体的には、2 日間前培養の場合分化培養でおよそ 12 倍、4 日間前培養の場合およそ 19 倍、6 日間前培養の場合およそ 22 倍であった。これを比増殖速度で表すと Table 4.4 となり、いずれも 1 段階培養の場合と比べ早くなっている。

中空糸培養法においても、Essential 8 medium で細胞増殖を促した場合、初めから Essential 6 medium を用いて分化培養を行う 1 段階培養と比べ、分化培養中の細胞増殖が向上していた。具体的には 2 日間前培養を行った場合、分化培養 5 日目で 8.9 倍、7 日間前培養を行った場合、分化培養 5 日目で 16.9 倍に増殖しており、1 段階培養に比べ高い比増殖速度を示している(Fig. 4.15(b))。しかしながら前培養期間の長さの違いによる細胞増殖への影響は観察されず、また 1 段階培養と 2 段階培養の差は胚様体培養法と比べると小さいものであった。

加えて 2 段階培養にしたことで、細胞の増殖活性は胚様体培養と中空糸培養ではほぼ同等になっていた。



**Fig. 4.15** Changes in cell number in both culture methods. (a) EB culture method with different pre-culture days. Orange line: pre-culture 2days, Green line : pre-culture 2days, Blue line : pre-culture 6days (b) HF culture method with different pre-culture days. Orange line : pre-culture 2days, Blue line : pre-culture 7days. Data are presented as the means  $\pm$  S.D.

(a)

	Day5 from differentiation	Specific growth rate( $h^{-1}$ )
E8 2days	0-7(day)	$0.01399 \pm 0.00056$
E8 4days	0-9(day)	$0.01302 \pm 0.00051$
E8 6days	0-11(day)	$0.01117 \pm 0.00054$

(b)

	Day5 from differentiation	Specific growth rate( $h^{-1}$ )
E8 2days	0-7(day)	$0.01278 \pm 0.00110$
E8 7days	0-12(day)	$0.00980 \pm 0.00056$

Table 4.4 Specific growth rate in both culture methods. (a) EB culture method with different pre-culture days (b) HF culture method with different pre-culture days

両培養法における造血幹細胞マーカー発現率

造血幹細胞マーカーCD34<sup>+</sup>細胞の発現率について、胚様体培養法の結果を Fig. 4.16(a)に、中空糸培養法の結果を Fig. 4.16(b)に示す。胚様体培養法においては前培養 2 日間の系において、分化培養 5 日目で約 35 %という発現率を示した。これは 1 段階培養時の発現率の約 3 倍となっており、分化誘導効率の向上が示された。一方で前培養期間を 4 日間、6 日間と延長した場合、その効率は下がったが、1 段階培養と同様の約 10 %という値を示した。一方で中空糸培養法では、前培養期間にかかわらず、分化培養期間中にほとんど CD34<sup>+</sup>細胞の発現は見られず、1 段階培養においてピークを示した 5 日目においても、発現が示されることはなかった。

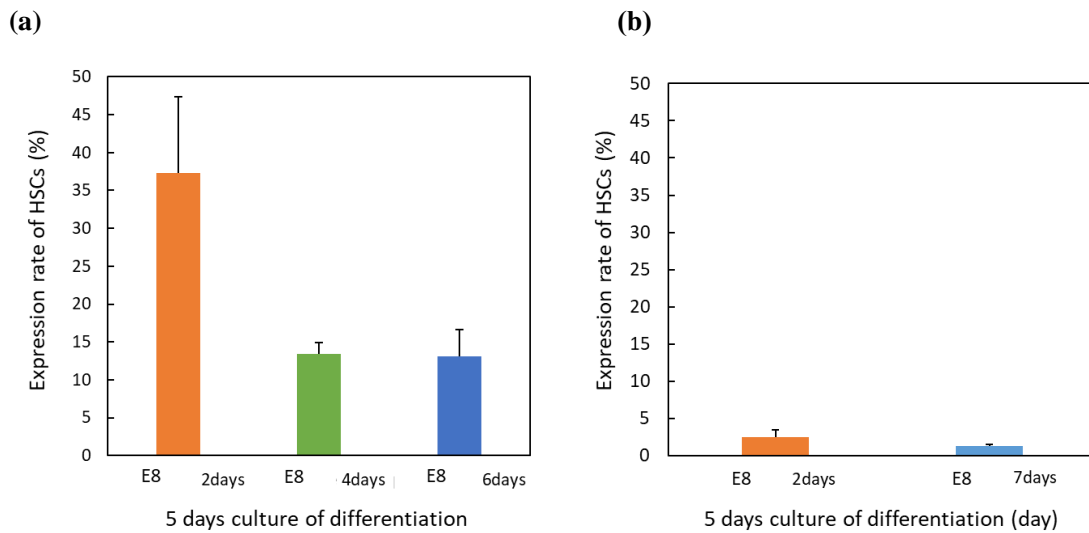
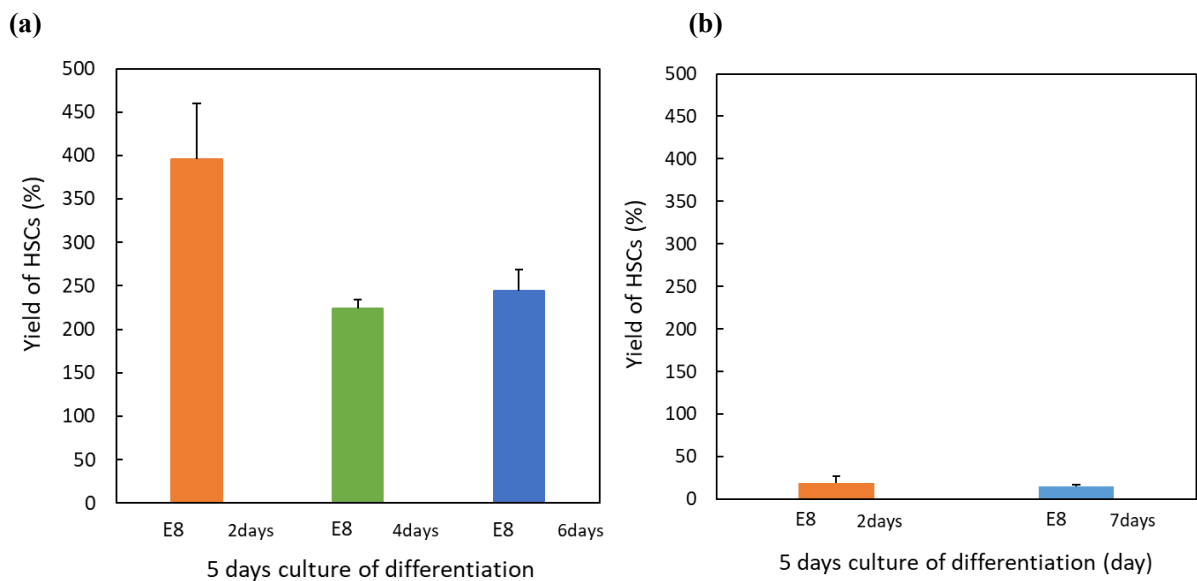


Fig. 4.16 The expression rate of HSCs in both culture methods. (a) EB culture method with different pre-culture days on day 5 from differentiation. Orange bar: pre-culture 2 days, Green bar: pre-culture 4days, Blue bar: pre-culture 6days. (b) HF culture method with different pre-culture days on day 5 from differentiation. Orange bar: pre-culture 2 days, Blue bar: pre-culture 7 days. Data are presented as the means  $\pm$  S.D.

両培養法における造血幹細胞マーカー陽性細胞の推定収率

両培養系の初期細胞数に対し、獲得可能造血幹細胞数(CD34<sup>+</sup>細胞数)がどれだけの割合になるのか、造血幹細胞獲得収率を推定した(Fig. 4.17)。その結果胚様体培養法(Fig. 4.17(a))では分化培養 5 日目において、前培養 2 日目で初期播種細胞数の 400%(4 倍)程度という最も高い収率が示された。他の前培養期間においては、その発現率が低下したことにより、初期細胞数の 2.5 倍程度にとどまった。一方、中空系オルガノイド培養(Fig. 4.17(b))では、前培養期間にかかわらず CD34 発現がほとんど見られなかったため、その収量は初期播種細胞数の 15~20 %程度にとどまった。



**Fig. 4.17** Estimated yield of HSCs in both culture methods compared with seeding cell number. (a) EB culture method with different pre-culture days on day5 from differentiation. Orange bar: pre-culture 2days, Green bar: pre-culture 4days, Blue bar: pre-culture 6days. (b) HF culture method with different pre-culture days. Orange bar: pre-culture 2days, Blue bar: pre-culture 7days. Data are presented as the means  $\pm$  S.D.

### 4.4 考察

#### 単一分散状態の細胞を用いた三次元培養のための条件設定

今回の検討では、すべての酵素条件、細胞数条件において播種翌日から胚様体の形成を確認することが可能であった。しかしながら、それらの形態は酵素によって大きく異なるものであった。特に粒径変化においては、 $1.0 \times 10^5$  cells 播種の系でトリプシン、アキュマックスを用いた場合、組織構成細胞数は同等ながらも、その胚様体粒径はアキュターゼに比べて大きくなっていった。このことから初期に形成された胚様体の細胞密度ではアキュターゼの系が最も高いと言え、アキュターゼを用いた場合に分散細胞の再凝集が最も速やかに行われていたと考えられる。これはアキュターゼの温和な酵素条件によって細胞表面への障害が抑えられたためだと思われる。初期の組織体形成後、 $1.0 \times 10^5$  cells 播種の系では培養経過に伴い胚様体粒径が小さくなっている一方で、 $1.0 \times 10^5$  cells 播種の系ではその粒径は増加した。これらの培養最終日である 7 日目の値は初期の粒径に比べて近いものとなっており、この結果はヒト iPS 細胞の胚様体培養法における粒径の閾値が  $800 \mu\text{m}$  程度であることを示唆している。これは胚様体中心部への酸素供給、栄養供給の制限によると考えられる。しかしながら、最も粒径の小さかった  $1.0 \times 10^3$  cells 播種の系では、その径は培養期間を通じて安定せず、安定した組織体の形成にはある程度以上の細胞数が必要であることも同時に示唆された。

培養経過に伴う細胞数変化では  $1.0 \times 10^3$  cells,  $1.0 \times 10^4$  cells 播種の系においては、酵素ごとの差は見られなかったが、 $1.0 \times 10^5$  cells 播種の系ではアキュターゼの系での増殖率が最も高かった。これも初期の組織体形成が良好に行われたことで、細胞の生存が促されたためだと思われる。これらの結果より、ヒト iPS 細胞の単層培養からの分散状態での回収にはアキュターゼを用いることで細胞へのダメージの軽減が可能であることが示された。

#### 胚様体培養および中空糸培養を用いたヒト iPS 細胞から造血幹細胞への分化誘導

胚様体培養法では、播種細胞数が  $1.0 \times 10^4$  cells の系でのみ、10 %程度の CD34<sup>+</sup>細胞発現率が示された。 $5.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^5$  cells を播種した場合、形態観察において培養一日目の胚様体の組織体形成が良好でないことが確認された。またこれは培養 3 日目の細胞数においても示されている。 $1.0 \times 10^4$  cells 播種の系では、1.63 倍に細胞が増幅しているのに対し、 $5.0 \times 10^4$  cells では 1 倍程度、 $1.0 \times 10^5$  cells に関しては 0.77 倍程度と、播種時に細胞の一部が組織体形成を行っていないことが示唆された。この組織体形成不良がその後の細胞増殖ならびに分化傾向に影響を及ぼしたと考えられる。

中空糸培養法では、胚様体培養の結果とは異なり、すべての播種細胞数において 10 %程度の CD34 発現率が示された。細胞数変化については、播種細胞密度の高い系において培養後半になるにつれその比増殖速度の低下が確認された。これは細胞数が増えることにより組織体密度が上がったためだと考えられる。一方  $2.0 \times 10^5$  cells,  $5.0 \times 10^5$  cells 播種の系で培

## 第4章 ヒト iPS 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討

養後半に大きく比増殖速度が上昇したのは、組織体がある一定の大きさに達し、細胞増殖が安定したためだと考えられる。これらの結果より、培養初期から良好な細胞増殖を行わせるためには、初期播種細胞密度が中空糸内腔体積の 5~10 % 程度(約  $1.0 \times 10^6$  cells)必要であることが示唆された。造血幹細胞収率に関しては、今回の検討において  $5.0 \times 10^5$  cells を播種した系で、初期播種細胞数に対して約 80%という最も高い値を示したが、これはマウス ES 細胞での検討と比べ 1/10 程度という低い効率となっていた。この原因としてはヒト iPS 細胞の低い細胞増殖活性が関係している。そのため次の検討として細胞増殖期間を設けた 2 段階培養を行い、その活性の低さを補うこととした。

この細胞増殖期を加えた三次元培養では、培養初期から良好な細胞増殖を行わせるために、初期播種細胞数密度を胚様体培養法で  $1.0 \times 10^4$  cells / well、中空糸培養法で  $1.0 \times 10^6$  cells / bundle とし、検討を行った。

### 細胞増殖期を加えた造血幹細胞の効率的取得のための培養プロセス構築に関する検討

本検討においては 1 段階培養による造血幹細胞分化誘導時とは異なり、胚様体培養と中空糸培養において大きく結果が異なった。

胚様体培養では *Essential 8 medium* による細胞増殖期間を 2 日間とした場合でマウス ES 細胞に近い、初期播種細胞数に対して約 4 倍という造血幹細胞の獲得効率を得られた。この理由としては、2 段階培養による初期の良好な胚様体形成による細胞増殖能および CD34<sup>+</sup>細胞の発現率向上があげられる。また細胞の細胞増殖期間によって異なる発現率から、前培養期間に形成された胚様体の大きさや形態によって分化開始のタイミングが異なった可能性が考えられる。加えて、播種後 1 日目の粒径が同細胞数を播種した 1 段階培養の場合よりも大きくなっていったことから、培地条件によって細胞が分泌する細胞接着因子が異なることが示唆された。今後はより詳細に、細胞増殖期間および分化培養時における発現率の推移等を評価する必要がある。

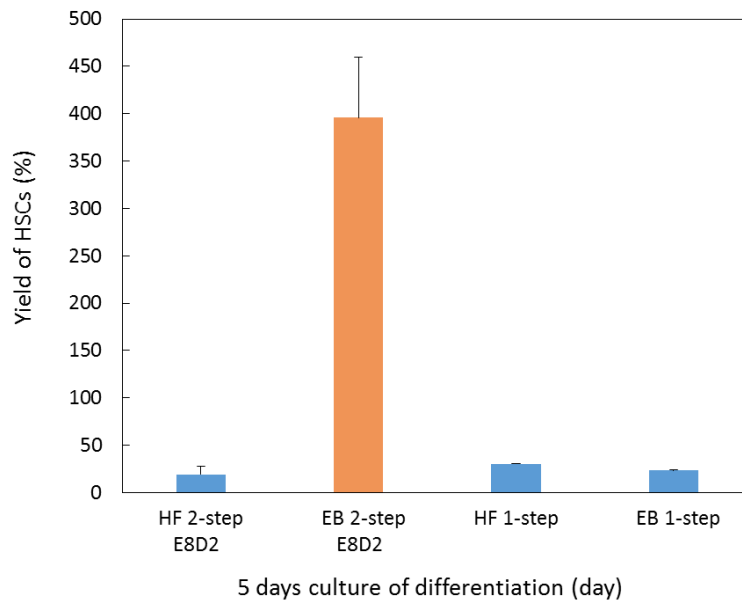
中空糸培養では胚様体培養での結果とは異なり、細胞増殖期間の違いにかかわらず、CD34<sup>+</sup>細胞の発現が見られなかった。中空糸培養では遠心力によって組織体形成を促しており、1 段階培養と 2 段階培養による初期の組織体形成には大きく差が出なかったと考えられる。そのため培地条件によって、培養初期の細胞分泌因子や結合様式等に違いが生じ、発現率に差が出たという可能性が示唆された。

また、2 段階培養における両三次元培養法での差は、組織体形成法の違いに影響を受けた可能性がある。初期の組織体形成において、中空糸培養では遠心付加を用いる一方で、胚様体培養では自発的凝集を用いているため、ここでも培養初期の細胞間接着因子等の分布が異なった可能性が考えられる。加えて、中空糸培養では組織体の直径が培養初期から中空糸によって厳密に制御されており、分化誘導時にその組織体形状が大きく変わる胚様体とは異なる。このことが組織体内部での培養環境因子の濃度勾配と関連し分化誘導への影響をもたらしたことが考えられる。ここにもラミニン等の ECM の分布や、カドヘリン等

#### 第4章 ヒト iPS 細胞を用いた造血幹細胞取得のための培養プロセス構築に関する諸検討

の発現分布を評価するなど、より詳しい調査が必要である。またデータは示していないが、この時未分化マーカーである Oct3/4 および Nanog 発現を評価したところ、両培養法で低下しており、中空糸培養においても細胞組織体の自発的分化は進行していたと考えられる。そのため初期の培養条件を更に検討することで中空糸培養でも造血幹細胞系統への分化を誘導できる可能性が示唆された。

これらの結果より、細胞増殖期間を加えた 2 段階培養においては 1 段階培養とは異なり、胚様体培養法が造血幹細胞の収率に関して、大きく優れていることが示唆された。また、この値は初期に播種したヒト iPS 細胞に対して約 4 倍(400%)となっており、マウス ES 細胞で中空糸培養において示された約 6 倍(600%)という収率に近づいた(Fig. 4.18)。つまりヒト iPS 細胞においても、胚様体培養法と 2 段階培養を組み合わせることによってマウス ES 細胞に近い獲得効率を達成できたといえる。



**Fig. 4.18** Estimated yield of HSCs in several 3-dimensional culture methods compared with seeding cell number. Data are presented as the means  $\pm$  S.D.



### 4.5 本章のまとめ

#### 第1節

- ・単層培養状態のヒト iPS 細胞の回収において種々の酵素を検討した結果、アキュターゼを用いた場合において胚様体の形成が最も良好であった。
- ・播種細胞数、粒径変化を評価した結果、ヒト iPS 細胞の胚様体培養法における成長可能な粒径の閾値が 800  $\mu\text{m}$  程度であることが示唆された。

#### 第2節

- ・培養期間を通じて中空糸培養法ではすべての播種細胞数において細胞増殖が観察された。一方でその増幅率は初期播種細胞数の違いによって異なる。胚様体培養法では  $1.0 \times 10^4$  cells 播種の系でのみ、培養期間を通じた細胞増殖が観察された。他の播種細胞数では、初期の細胞増殖が見られない、または減少しており、このことから初期播種細胞数がその後の細胞生存に大きく関わることを示唆された。
- ・両培養系における造血幹細胞マーカーである CD34<sup>+</sup>細胞の発現率を評価した結果、胚様体培養系法では培養 5 日目にピークに達し、その発現率は中空糸培養法の培養 5 日目と同等の値を示した。
- ・両培養系での細胞数と CD34<sup>+</sup>細胞発現率から、初期播種細胞数に対する CD34<sup>+</sup>細胞獲得収率に換算すると、培養 5 日目において胚様体培養法では約 25 %、中空糸培養では約 80 %であった。

#### 第3節

- ・中空糸培養および胚様体培養法の双方で、通常の分化培養に比べ高い細胞増殖が示された。
- ・両培養系における CD34<sup>+</sup>細胞の発現率を評価した結果、胚様体培養系法では前培養日数を 2 日間の場合、分化培養 5 日目で約 35 %という高い発現を示した、一方で中空糸培養法では前培養期間にかかわらず CD34<sup>+</sup>細胞の発現は見られなかった。
- ・両培養系での細胞数と CD34<sup>+</sup>細胞発現率から、初期播種細胞数に対する CD34<sup>+</sup>細胞獲得収率に換算すると、最適な前培養期間後の分化培養 5 日目において胚様体培養法では約 400 %、中空糸培養では約 25 %であった。

## 第5章 結言

### 5.1 総括

本研究で明らかになった結果を以下に示す。

1. マウス ES 細胞から中空糸/オルガノイド培養法を用いて造血幹細胞へと分化誘導を行うことで旺盛な細胞増殖が観察され、造血幹細胞の収量は一般的に用いられる胚様体培養と比較し、培養 5 日目で約 40 倍高くなることが示唆された。
2. ヒト iPS 細胞の操作において、酵素処理条件とアポトーシスを抑制する細胞生存因子の添加条件を検討することにより、ヒト iPS 細胞の細胞培養用酵素アキュターゼによる分散状態での回収とその後の速やかな増殖、組織体形成の誘導が可能な操作条件を確立した。
3. ヒト iPS 細胞を用いた胚様体培養、中空糸培養による造血幹細胞の 1 段階での分化培養を行った結果、初期の播種細胞密度が細胞の増殖性及び造血幹細胞の発現率に大きく関与することが示唆された。
4. ヒト iPS 細胞を用いた胚様体培養、中空糸培養による造血幹細胞の 2 段階での分化培養を行った結果、胚様体培養では、細胞の増殖活性ならびに造血幹細胞への分化率ともに 1 段階培養に比べて大きく向上した。一方中空糸培養では、初期培養を未分化維持培地によって行った場合、細胞増殖活性は向上するが、造血幹細胞への分化の進行が抑制されることが示された。

## 5.2 今後の展望

本研究では、マウス ES 細胞から造血幹細胞への分化誘導を行う場合、中空糸/オルガノイド培養法を用いることで従来の分化培養法である胚様体培養法に比べて、約 40 倍の効率で造血幹細胞を獲得可能であることを示した。これは臨床利用に向けた、大量の細胞源確保という課題の解決法となりうる。またマウス ES 細胞からの造血幹細胞分化において、中空糸培養法での培養環境を調節することで細胞増殖活性および発現率に影響を与える可能性を示した。また、実際に臨床の現場で多能性幹細胞由来造血幹細胞を用いるために、マウス ES 細胞の造血幹細胞分化誘導で得た知見をもとにヒト iPS 細胞での検討を行った。その中で、ヒト iPS 細胞ではマウス ES 細胞とは異なる結果が確認された。

また非常に興味深いことに、ヒト iPS 細胞を用いて、1 段階分化培養と 2 段階培養という異なる培地条件のもとに胚様体培養法と中空糸培養法を行った結果、造血幹細胞マーカーの発現に大きな差が見られた。簡潔には、1 段階培養では両培養法で発現率において違いが見られなかった一方で、2 段階培養では胚様体培養法でのみ高い造血幹細胞の発現率が得られ、中空糸培養ではその発現が消失した。この 2 つの三次元培養法と培地条件の組み合わせにおいてなぜこのような結果が出るのか、ヒト iPS 細胞の性状を含めてさらに調査していく必要がある。

以下に各多能性幹細胞での造血幹細胞獲得の効率について述べる。本研究において多能性幹細胞から造血幹細胞の生産を試みた結果、マウス ES 細胞を用いた検討では 5 日間の培養において用いた ES 細胞の約 3~6 倍に相当する造血幹細胞の生産が可能であった。

ヒト iPS 細胞では 1 段階培養を用いて 5 日間の分化培養を行った場合、胚様体培養法において用いた iPS 細胞の約 25%、中空糸/オルガノイド培養法において約 80%に相当する造血幹細胞(CD34<sup>+</sup>細胞)の生産が可能であった。この造血幹細胞獲得効率の差の要因としては、特にヒト iPS 細胞を用いた検討での細胞増殖活性が低いことが理由として挙げられる。そこで細胞増殖期間を加えた 2 段階培養による検討を行った結果、最適な前培養期間後の分化培養 5 日目において胚様体培養法では約 400%(4 倍)、中空糸培養では約 25%という獲得効率が得られた。この胚様体培養の結果を用いて、臨床現場において求められる生着に必要な  $2.0 \times 10^6$  cells / kg、成人一人当たりの体重を 50 kg とした場合で約  $10^8$  cells の造血幹細胞を得ようと考えると、初期に必要なヒト iPS 細胞は  $2.5 \times 10^7$  cells 程度となる。これは 100 mm dish 3,4 枚程度で獲得できる量である。

今後は、培養法のさらなる改良としてサイトカイン等の添加による中胚葉系統および造血系統への積極的分化誘導に関する検討が有効である。さらに、生産された造血幹細胞のコロニーアッセイ法等による性能評価や分化能評価、作製された組織体から MACS 等を用いることによる造血幹細胞の分取と、その造血幹細胞を用いた血球系細胞への分化誘導プロセスを確立することにより、多能性幹細胞を細胞源とした造血幹細胞と血球系細胞の生産プロセスとしての確立が期待される。

## 参考文献

1. 今堀和友, 山川民夫 監修 (2007) 生化学辞典 第4版, 東京化学同人
2. 細胞の分子生物学 第5版 (2010), ニュートンプレス
3. 三浦恭定 (1998) 造血幹細胞 分子から臨床まで, 南江堂
4. 平野俊夫 (2000) 疾患とのかかわりを探る サイトカインの最前線, 羊土社
5. 小沢敬也 (2002) 造血幹細胞 基礎から遺伝子治療・再生医療へ, 中外医学社
6. 造血細胞移植 同種末梢血幹細胞移植のための健常人ドナーからの末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン(2010年6月30日 改訂第4版) 日本造血細胞移植学会, 日本輸血・細胞治療学会
7. Ogawa M (1993) Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993;81(11):2844-2853.
8. Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L (1964) A Stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964;51:29-36
9. Wang JC, Doedens M, Dick JE (1997) Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID repopulating cell assay. *Blood*. 1997;89:3919-24.
10. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, et al (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989;321(17):1174-8.
11. Keller G (2005) Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev*. 2005;19(10):1129-55.
12. Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
13. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995. 92(17): pp. 7844-7848.
14. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Hearn JP (1996) Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biology of Reproduction*. 1996; 55(2):254-259.
15. Thomson JA and Marshall VS (1997) Primate embryonic stem cells. *Current topics in developmental biology*. 1997;38: 133-165.
16. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391): 1145-1147.

17. Nakatsuji N, Suemori H (2002) Embryonic stem cell lines of non human primates. *Scientific World Journal*. 2002;2:1762-1773.
18. Suemori H, Tada T, Torii R, Hosoi Y, Kobayashi K, Imahie H, Kondo Y, Iritani A, Nakatsuji N (2001) Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Developmental Dynamics*. 2001;222(2): 273-279.
19. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
20. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 31:861-872
21. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Golland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 2008;321: 1218-1221.
22. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R (2007) Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007; 318: 1920-1923.
23. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, Thomson JA, Kamp TJ (2009) Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res*. 2009;104: 30-41.
24. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 2008;322: 949-953.
25. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS (2009) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*. 2009;4(6):472-6.
26. Chang HM, Gregory RI (2010) MicroRNA-induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010; 7(1): 31–35.
27. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011; 474: 212–215.
28. Araki R, Uda M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Ando S, Sugiura M, Ideno H, Shimada A, Nifuji A, Abe M (2013) Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*. 2013; 494: 100–104.
29. Batta K, Florkowska M, Kouskoff V, Lacaud G (2014) Direct reprogramming of murine fibroblasts to hematopoietic progenitor cells. *Cell Rep*. 2014;9(5):1871-84.
30. Nakano T, Kodama H, Honjo T (1994) Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science*. 1994;265(5175):1098-101.
31. Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, Lai MI, Sugiyama D (2013) Hematopoietic cell

- differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(3):71.
32. Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M (2000) Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Experimental Physiology.* 2000;85(6):645-651.
  33. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N (2000) Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular Medicine.* 2000;6(2): 88-95.
  34. Wiles MV, Keller G (1991) Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem cells in culture. *Development.* 1991;111(2):259-267.
  35. Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV (1993) Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol.* 1993;13(1):473-486.
  36. Koike M, Kurosawa H, Amano Y (2005) A Round-bottom 96-well Polystyrene Plate Coated with 2-methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine as an Effective Tool for Embryoid Body Formation. *Cytotechnology.* 2005;47(1-3):3-10.
  37. Saha K, Mei Y, Reisterer CM, Pyzocha NK, Yang J, Muffat J, Davies MC, Alexander MR, Langer R, Anderson DG, Jaenisch R (2011) Surface-engineered substrates for improved human pluripotent stem cell culture under fully defined conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(46):18714-9.
  38. Wiles MV (1993) Embryonic stem cell differentiation in vitro. *Methods Enzymol.* 1993;225:900-918.
  39. Rungarunlert S, Techakumphu M, Pirity MK, Dinnyes A (2009) Embryoid body formation from embryonic and induced pluripotent stem cells: Benefits of bioreactors. *World J Stem Cells.* 2009;1(1):11-21.
  40. Salvagiotto G, Burton S, Daigh CA, Rajesh D, Slukvin II, Seay NJ (2011) A defined, feeder-free, serum-free system to generate in vitro hematopoietic progenitors and differentiated blood cells from hESCs and hiPSCs. *PLoS One.* 2011;6(3):e17829
  41. Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T, Saito MK (2011) A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS ONE.* 2011;6(7): e22261.
  42. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R (2007) Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science.* 2007;318(858):1920-1923.
  43. Wang Y, Yates F, Naveiras O, Ernst P, Daley GQ (2005) Embryonic stem cell-derived hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 19081–19086.

44. Ogawa M (1993) Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993; 81:2844-2853,
45. Kitajima K, Minehata K, Sakimura K, Nakano T, Hara T (2011) In vitro generation of HSC-like cells from murine ESCs/iPSCs by enforced expression of LIM-homeobox transcription factor Lhx2. *Blood*. 2011; 117: 3748–3758.
46. Chadwick K, Wang L, Li L, Menendez P, Murdoch B, Rouleau A, Bhatia M (2003) Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood*. 2003 ;102(3):906-15.
47. Woods NB, Parker AS, Moraghebi R, Lutz MK, Firth AL, Brennand KJ, Berggren WT, Raya A, Izpisua Belmonte JC, Gage FH, Verma IM (2011) Brief report: efficient generation of hematopoietic precursors and progenitors from human pluripotent stem cell lines. *Stem Cells*. 2011; 29: 1158–1164.
48. Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, Okabe M, Masaki H, Takaki S, Otsu M, Nakauchi H (2013) Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther*. 2013; 21: 1424–1431.
49. Tsukada M, Ota Y, Wilkinson AC, Becker HJ, Osato M, Nakauchi H, Yamazaki S (2017) *Stem Cell Reports*. 2017;9(4):1024-1033.
50. Xu Y et al. (2016) A synthetic three-dimensional niche system facilitates generation of functional hematopoietic cells from human-induced pluripotent stem cells. *J Hematol Oncol*. 2016 ;9(1):102.
51. Olivier EN, Qiu C, Velho M, Hirsch RE, Bouhassira EE (2006) Large-scale production of embryonic red blood cells from human embryonic stem cells. *Exp Hematol*. 2006;4:1635–1642.
52. Nakamura S, Takayama N et al. (2014) Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2014;14(4):535-48.
53. Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Honda-Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y et al. (2013) Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell-free conditions. *PLoS One*. 2013; 8: e59243.
54. Carpenter L, Malladi R, Yang CT, French A, Pilkington KJ, Forsey RW, Sloane-Stanley J, Silk KM, Davies TJ, Fairchild PJ, Enver T, Watt SM (2011) Human induced pluripotent stem cells are capable of B-cell lymphopoiesis. *Blood*. 2011; 117: 4008–4011.
55. Wakao H, Yoshikiyo K, Koshimizu U, Furukawa T, Enomoto K, Matsunaga T et al. (2013) Expansion of functional human mucosal-associated invariant T cells via reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell*. 2013; 12: 546–558.
56. Van Winkle AP, Gates ID, Kallos MS (2012) Mass transfer limitations in embryoid bodies during human embryonic stem cell differentiation. *Cells Tissues Organs*. 2012;196(1):34-47.
57. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA (2010)

- Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol.* 2010;148(1):3-15.
58. Keller GM (1995) In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7(6):862-9.
59. Ezashi T, Das P, Roberts RM (2005) Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(13):4783-8.
60. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A (2003) BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* 2003;115(3):281-92.
61. Dalton S (2013) Signaling networks in human pluripotent stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2013 ;25(2):241-6.
62. Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, Aramaki T, Nishiyama A, Muguruma K, Nakano T, Suga H, Ueno M, Ishizaki T, Suemori H, Narumiya S, Niwa H, Sasai Y (2010) Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010;7(2):225-239.
63. Moon SH, Ju J, Park SJ, Bae D, Chung HM, Lee SH (2014) Optimizing human embryonic stem cells differentiation efficiency by screening size-tunable homogenous embryoid bodies. *Biomaterials.* 2014;35(23):5987-97.
64. Choi YY, Chung BG, Lee DH, Khademhosseini A, Kim JH, Lee SH (2010) Controlled-size embryoid body formation in concave microwell arrays. *Biomaterials.* 2010;31(15):4296-303.
65. Tsumagari S, Otani I, Tanemura K, Namba S, Ohtaki T, Kamata H, Kanayama K (2007) Characterization of CD34<sup>+</sup> cells from canine umbilical cord blood, bone marrow leukocytes, and peripheral blood by flow cytometric analysis. *J Vet Med Sci.* 2007;69(11):1207-9.
66. Ngangan AV, Waring JC, Cooke MT, Mandrycky CJ, McDevitt TC (2014) Soluble factors secreted by differentiating embryonic stem cells stimulate exogenous cell proliferation and migration. *Stem Cell Res Ther.* 2014 ;24;5(1):26.



## 謝辞

本研究を行うにあたり、的確な御指導を賜るとともに、専門的な立場からときに優しく、ときに厳しく、丁寧かつ的確に御指導頂きました九州大学大学院工学研究院化学工学部門 水本博准教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の審査にあたり、種々の有益な御助言を賜りました九州大学大学院工学研究院化学工学部門 井嶋博之教授、九州大学大学院工学研究院応用化学部門 片山佳樹教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、的確な御指導を賜るとともに、広い視野を持つことの重要性和、常に高いレベルを意識することの大切さを教えて下さった九州大学大学院工学研究院化学工学部門 梶原稔尚教授に厚く御礼申し上げます。

研究を行うことの意義を教えて頂き、異なる視点からアドバイスを下さった九州大学大学院工学研究院化学工学部門 名嘉山祥也准教授に厚く御礼申し上げます。

研究室に所属した当初から、いつも身近な先輩として相談に乗って頂き、時には厳しく指導して下さった網本直記氏(現 ヘリオス(株))、奥平達也氏(現 アステラス製薬株式会社)に深く感謝申し上げます。

研究室生活から博士論文執筆まで親切に協力して頂いた、藤井祐輔氏(本学大学院博士課程)に深く感謝申し上げます。

また後輩の指導にも精力的に協力し、共に研究活動に勤しんだ、松下沙希子氏、劉懷旭氏(本学大学院博士課程)、中野壮一郎氏、赤岡智彬氏、江本雄一氏、藪田涼平氏、森汐理氏、中尾建太氏、岳玥氏、徐炎氏、王相維氏(本学大学院修士課程2年)、伊藤恵氏、大賀美帆氏、小出慎之佑氏、千歳皓平氏、吉田隆晃氏、盛建凱氏、李伊童氏(本学大学院修士課程1年)に深く感謝いたします。

また本年度より本研究室に配属された石橋知樹氏、佐々木浩二氏、志藤千紘氏、塚本壮太郎氏、宮嶋麻由氏(本学4年)、呂博氏(本学研究生)には感謝するとともに今後の活躍を期待しております。

最後に学生生活を支えてくれた、またこれからの社会人生活も支えてくれる両親をはじめ、親族の皆様、友人に感謝し謝辞といたします。