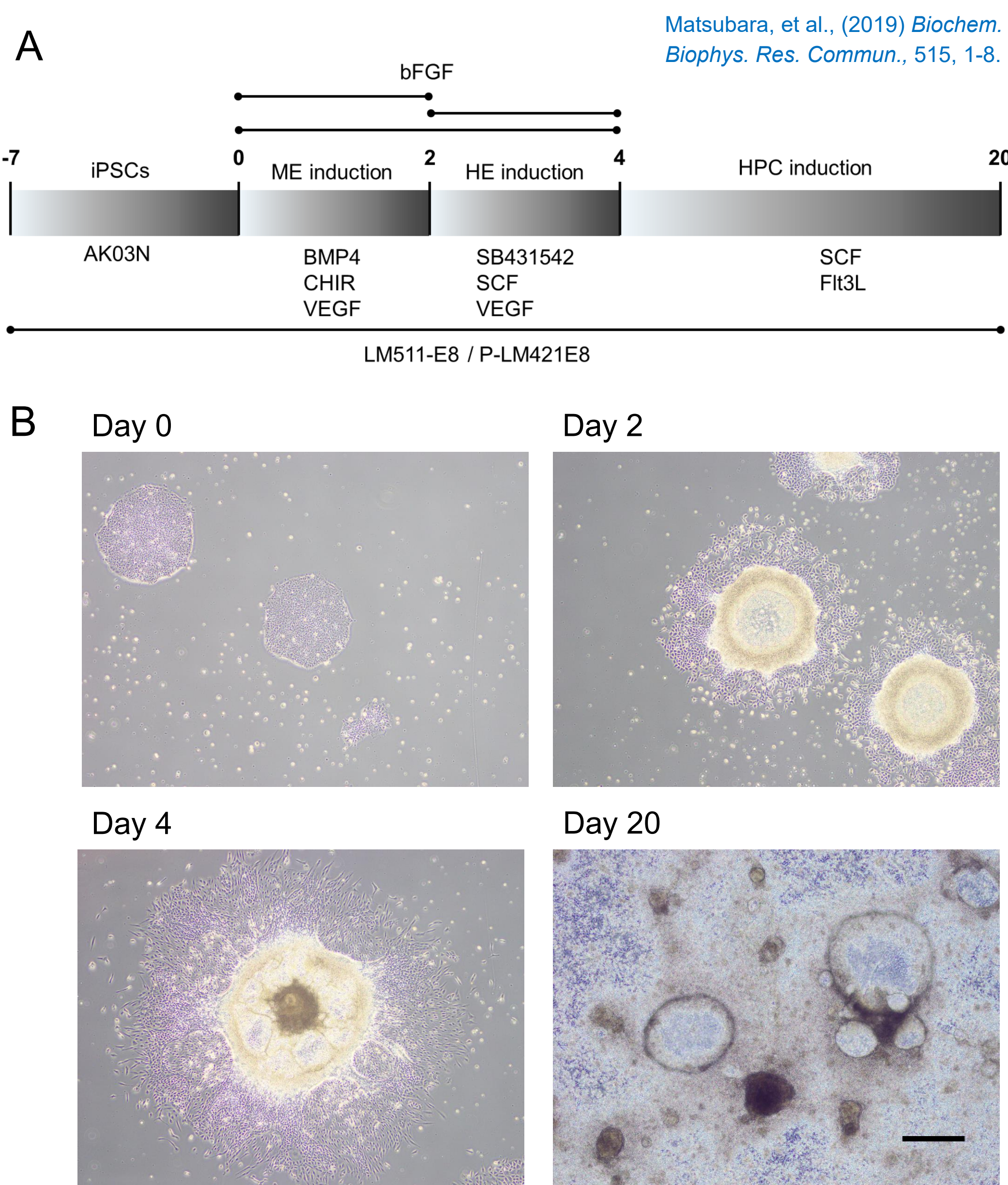


ヒトiPSCのHPC分化を促進する新規基質ヘパラン
硫酸結合型ラミニンフラグメントHeparan Sulfate-Linked Laminin Fragment Promotes HPC
Differentiation from hiPSCs in a Defined System山田雅司¹、二宮直登¹、佐々木薫¹、香取良祐¹、清水泰博²、
藤田和将²、谿口征雅²、國枝泰子²、田村康一¹、関口清俊²、木村博信¹¹ 株式会社ヘリオス・神戸研究所、² 大阪大学・蛋白質研究所

要 旨

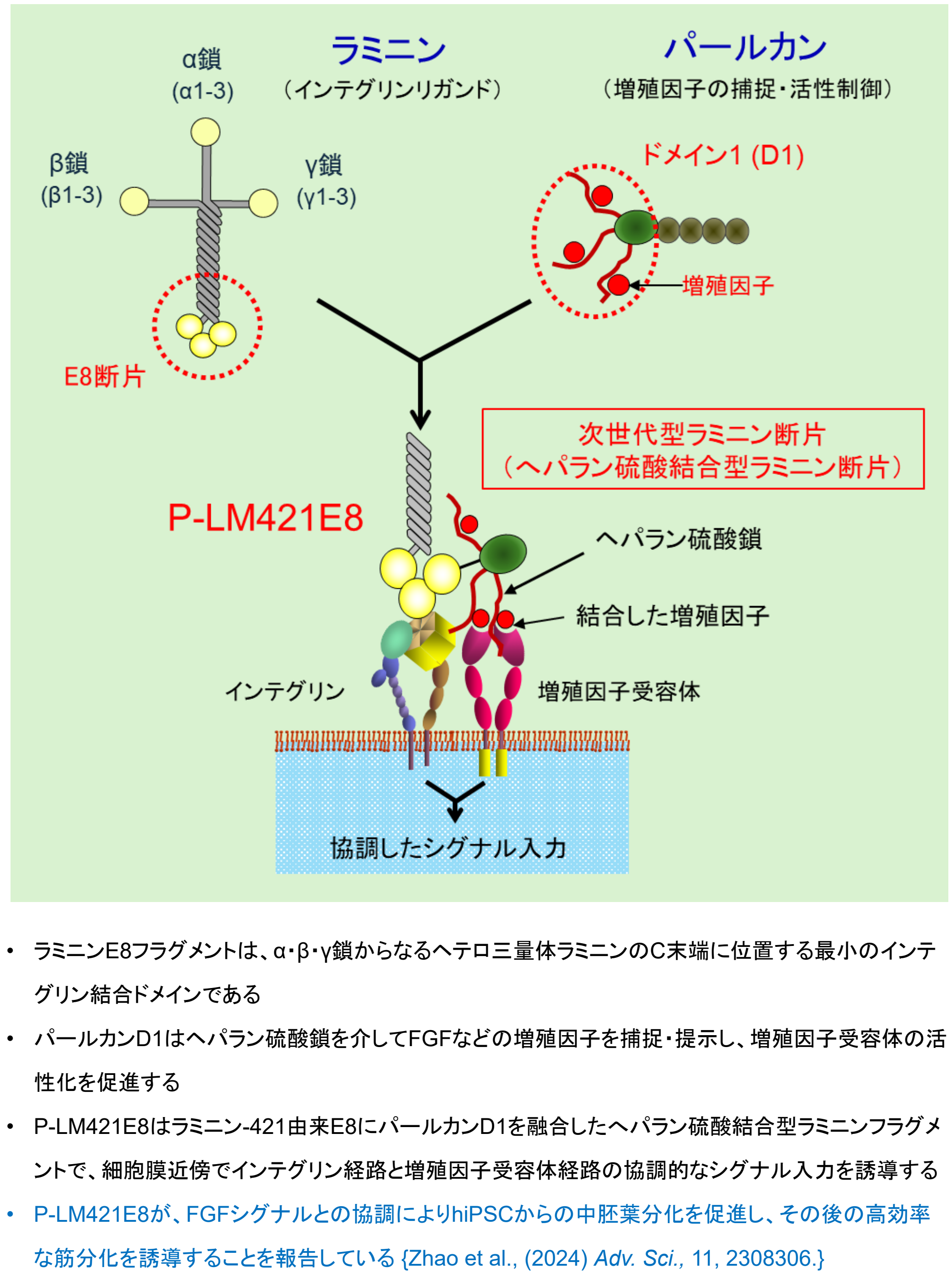
ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) は、再生医療や免疫療法における造血細胞の供給源として有望なプラットフォームである。本研究では、hiPSCから造血前駆細胞 (HPC) への分化を誘導するための、完全合成・成分既知の培養プロトコルを開発・最適化した。その結果、中胚葉誘導期および造血性内皮誘導期の両方において塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を添加すると、CD34^{high}CD117⁺ HPCの産生が促進されることが明らかとなった。さらに、ラミニン421-E8フラグメントとパールカンのドメイン1 (D1、ヘパラン硫酸 (HS) 鎖を有する) からなる組換え融合タンパク質であるP-LM421E8フラグメント (P-LM421E8) の効果を検討した。その結果、P-LM421E8はHPC分化を効果的に誘導し、bFGF処理条件と同等の安定したCD34^{high}CD117⁺細胞集団を得ることができた。特に、P-LM421E8をコーティングした培養系で得られたHPCは、ナチュラルキラー (NK) 細胞への分化能が亢進していた。一方、P-LM421E8とbFGFの併用による上乗せ効果は認められず、P-LM421E8が外因性bFGFを必要とせずにHPC分化を効果的に誘導できることが示唆された。これは、D1上のヘパラン硫酸鎖による内因性FGFの保持・提示に起因すると考えられる。以上の結果から、P-LM421E8は化学的に定義された培養条件下でHPC分化を誘導する有用な基質であり、臨床応用に資するHPCの産生を通じて、造血疾患やがん免疫療法への応用が期待される。

1. iPSCからのHPC分化誘導法



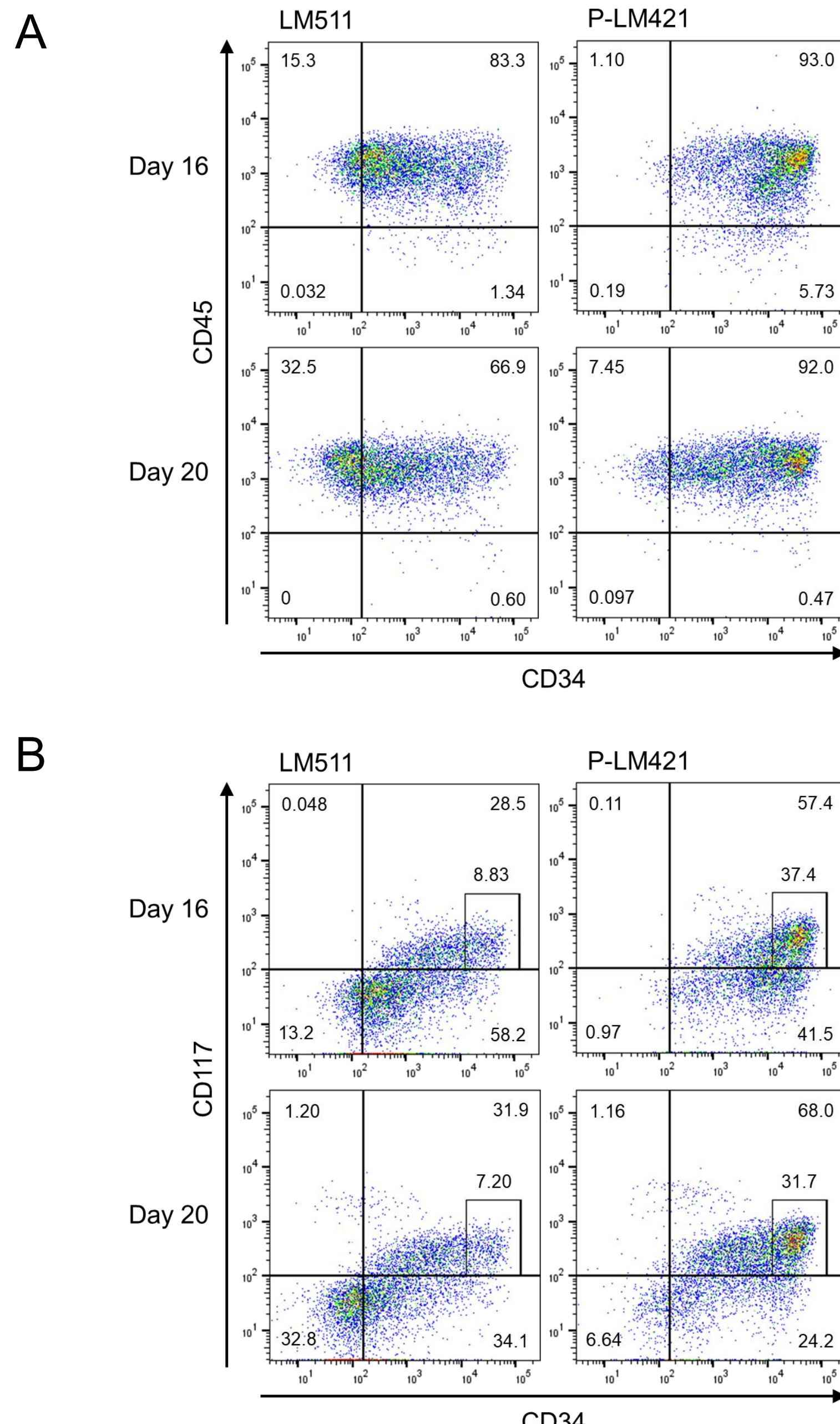
hiPSCを低密度で7日間培養後、2日間の中胚葉 (ME) 誘導、2日間の造血性内皮 (HE) 誘導、16日間のHPC誘導の順に分化させた。(B) 各段階の位相差像: iPSC培養 (Day 0)、ME誘導 (Day 2)、HE誘導 (Day 4)、HPC誘導 (Day 20)。スケールバー: 500 μm。

2. 新規基質ヘパラン硫酸結合型ラミニンフラグメント

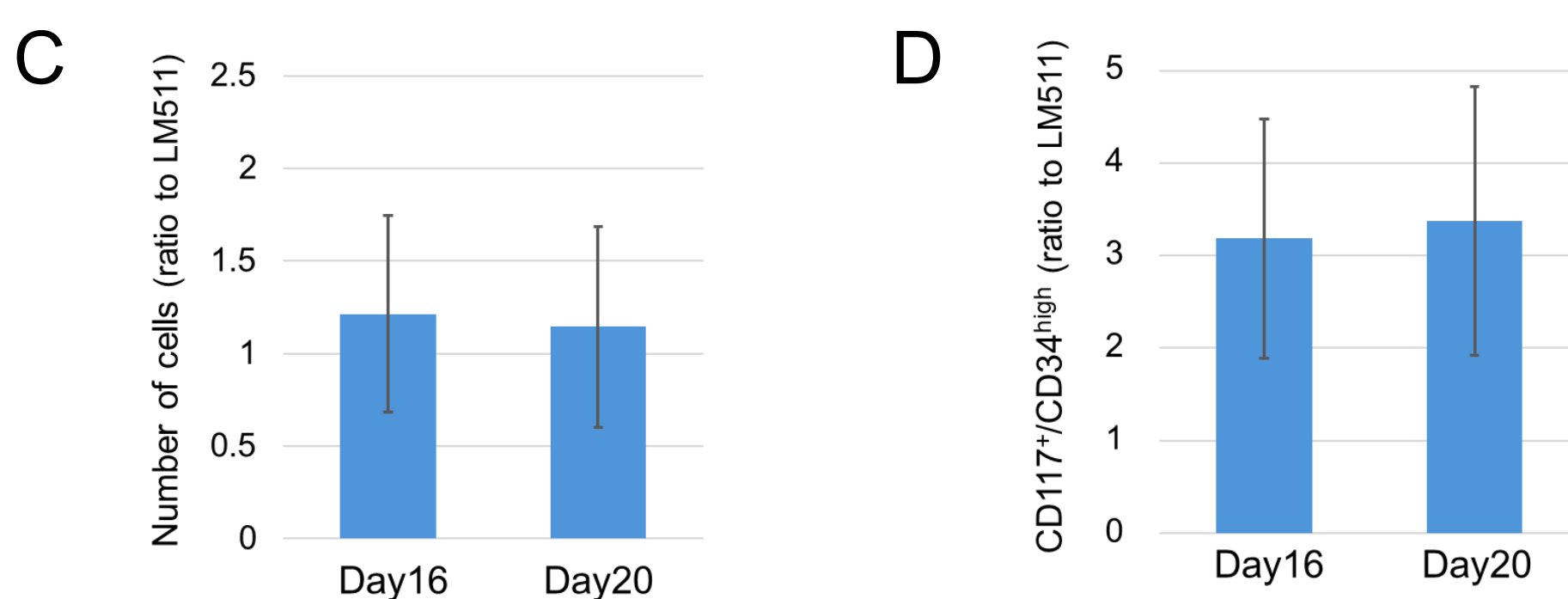
日本血液学会
COI開示

- ① 企業・法人組織や営利を目的とした団体の役員: 関口清俊 (株式会社マトリクソーム)
- ② 株式の保有: 関口清俊 (株式会社マトリクソーム)
- ③ 企業・組織や団体からの医学系研究 (共同研究、受託研究、治験など) に対する研究費の受領: 関口清俊 (株式会社マトリクソームおよび株式会社マンダム)
- ④ 企業・組織や団体が提供する寄附講座の代表: 関口清俊 (株式会社ニッビ)
- ⑤ 企業・法人組織や営利を目的とした団体の被雇用者: 清水泰博、谿口征雅、國枝泰子 (株式会社マトリクソーム)、藤田和将 (株式会社ニッビ)、山田雅司、二宮直登、佐々木薫、香取良祐、田村康一、木村博信 (株式会社ヘリオス)

3. P-LM421E8のHPC誘導に対する効果

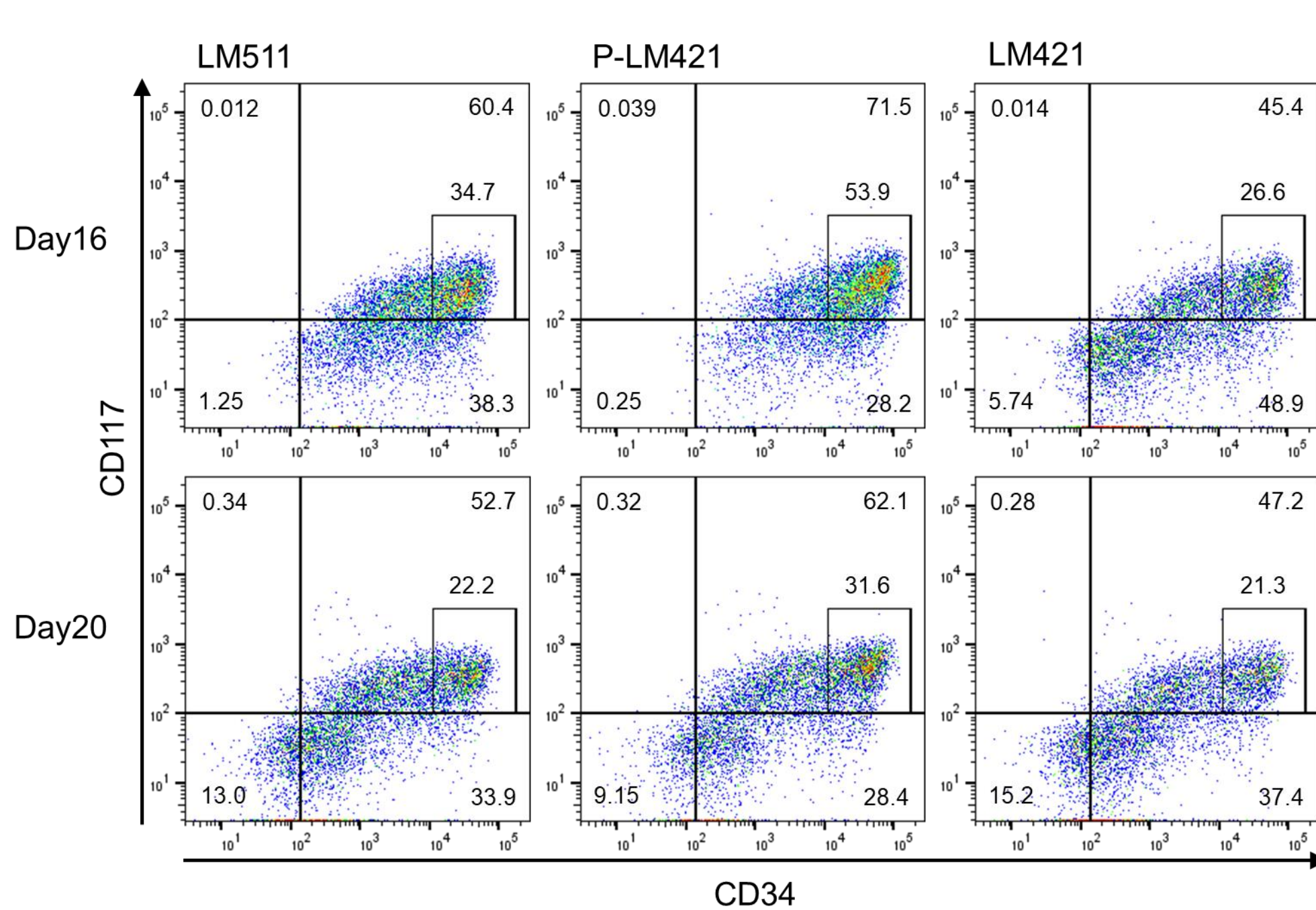


LM511-E8またはP-LM421E8コート条件で7日培養後、ME・HE誘導を経てHPCIに分化誘導。分化16日目と20日目の浮遊細胞を抗CD34・抗CD45抗体 (A)、抗CD34・抗CD117抗体 (B) で染色。枠内はCD34^{high}/CD117⁺のHPC集団。



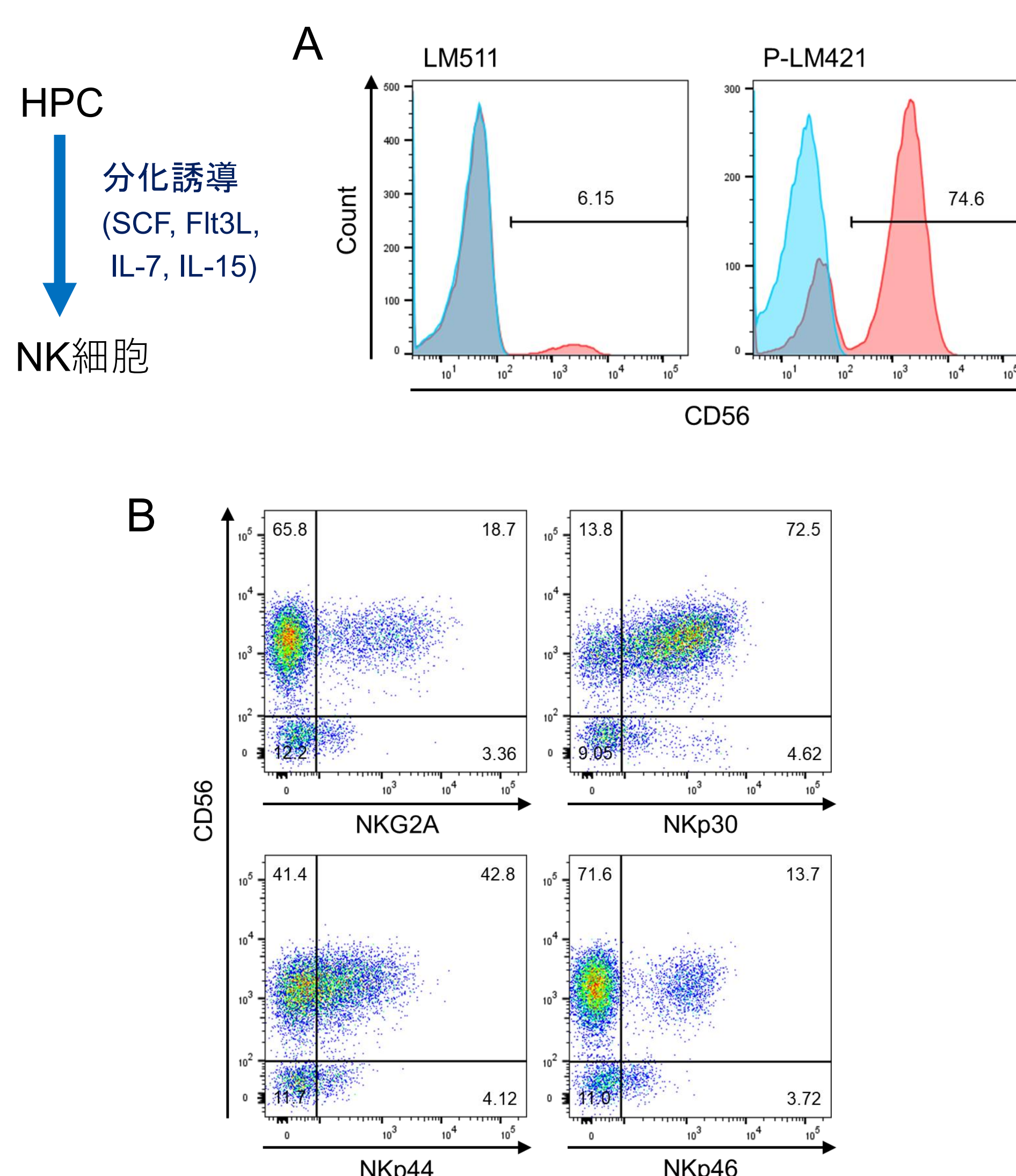
LM511-E8またはP-LM421E8コート条件でHPCへ分化させ、16日目と20日目に浮遊細胞を回収。総細胞数 (C) とCD34^{high}/CD117⁺ HPC集団の割合 (D) を定量。データはLM511-E8条件に対する相対値を示す (n=5)。

4. P-LM421E8におけるパールカン由来ドメインの役割



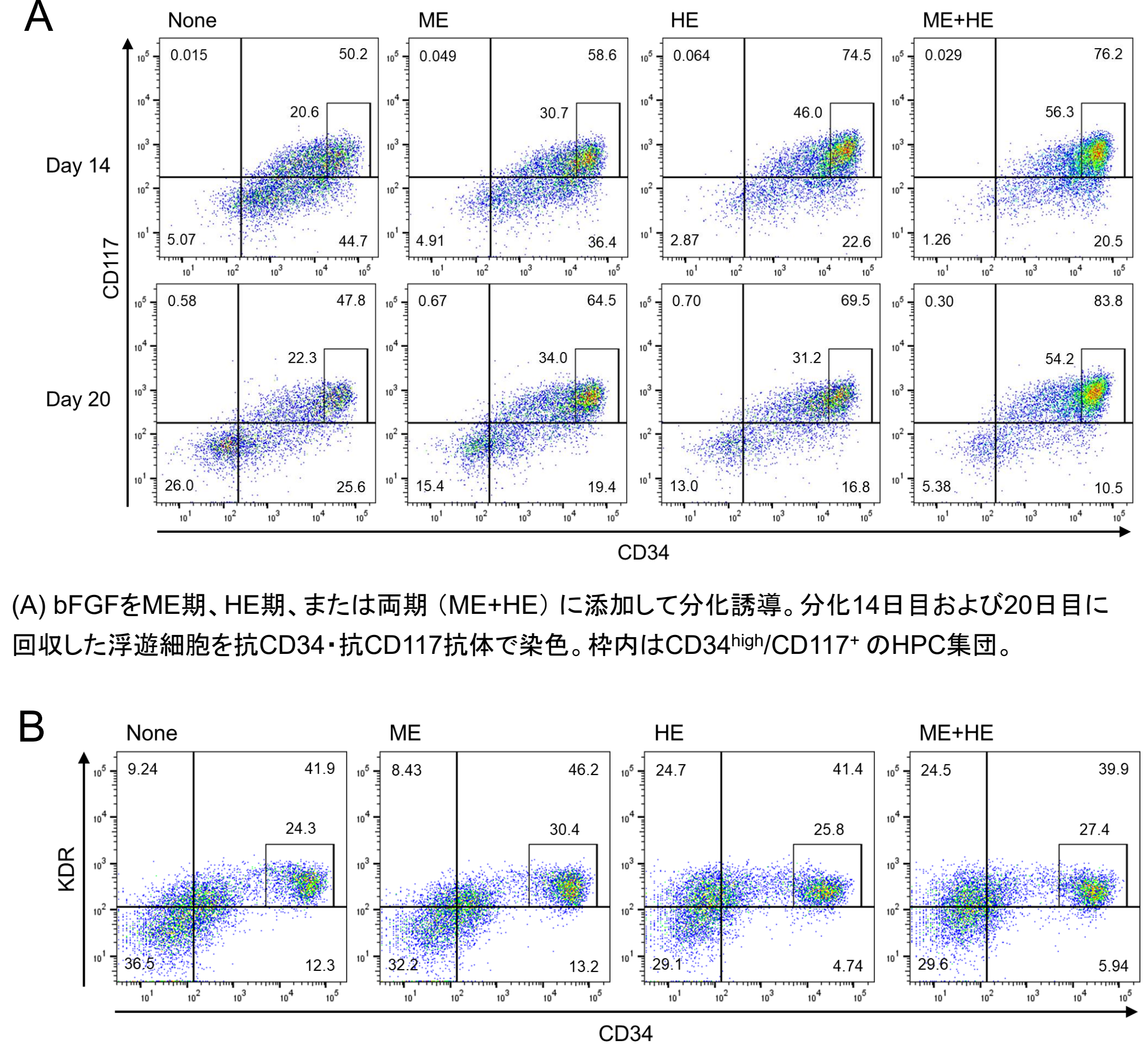
LM511-E8、P-LM421E8またはLM421E8コート条件で7日培養後、ME・HE誘導を経てHPCIに分化誘導。分化16日目と20日目の浮遊細胞を抗CD34・抗CD117抗体で染色。枠内はCD34^{high}/CD117⁺のHPC集団。

5. P-LM421E8上で誘導したHPCのNK分化誘導



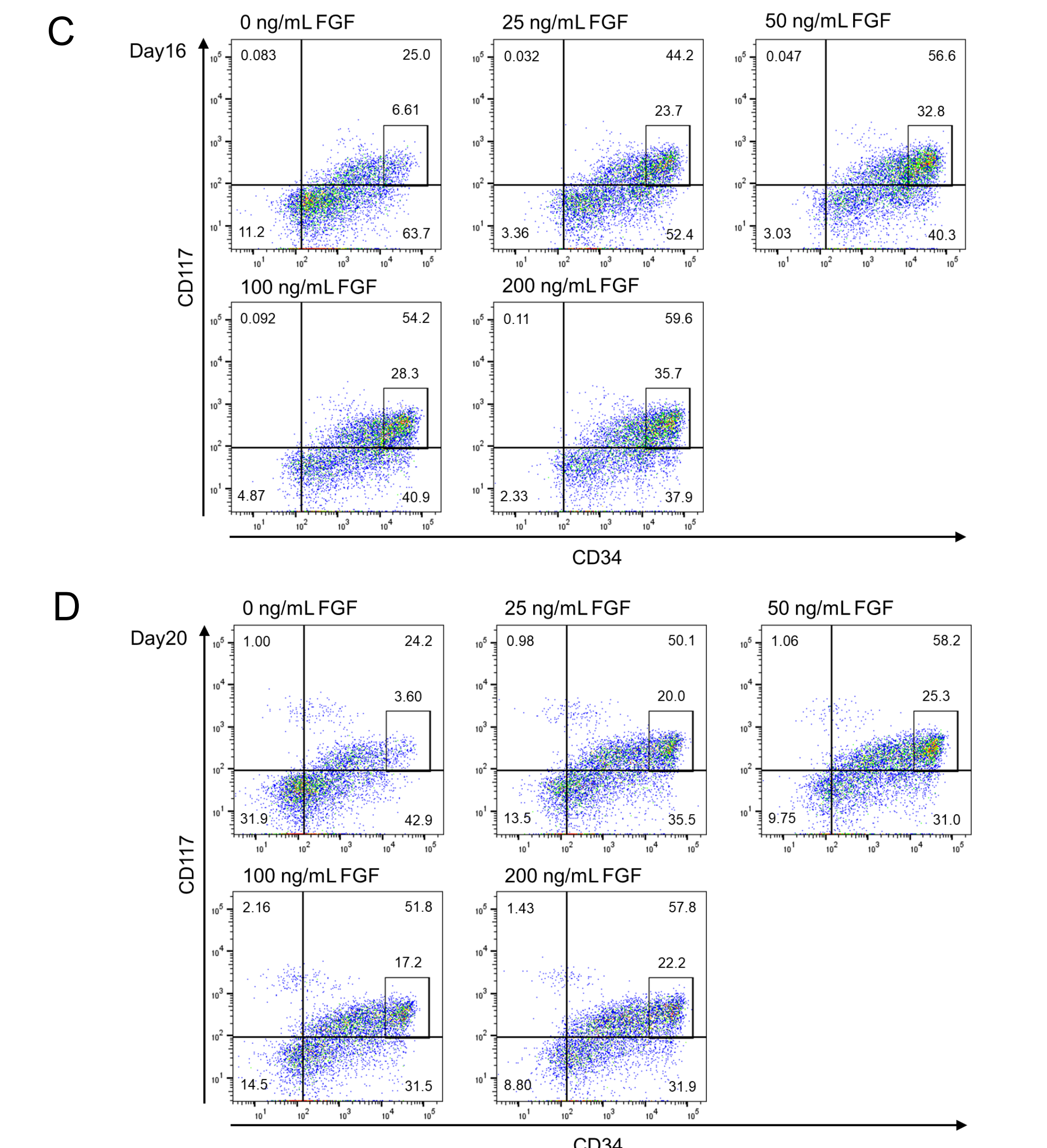
LM511-E8またはP-LM421E8コート条件で得たHPCを、NK分化条件で42日培養。(A) 抗CD56抗体で染色。青線: アイソタイプ対照、赤線: 抗CD56染色。(B) P-LM421E8コート条件で得たHPCから分化したNK細胞を、CD56と各種NK機能マーカー (NKG2A, Nkp30, Nkp44, Nkp46) で共染色。

6. bFGFのHPC分化誘導に対する効果

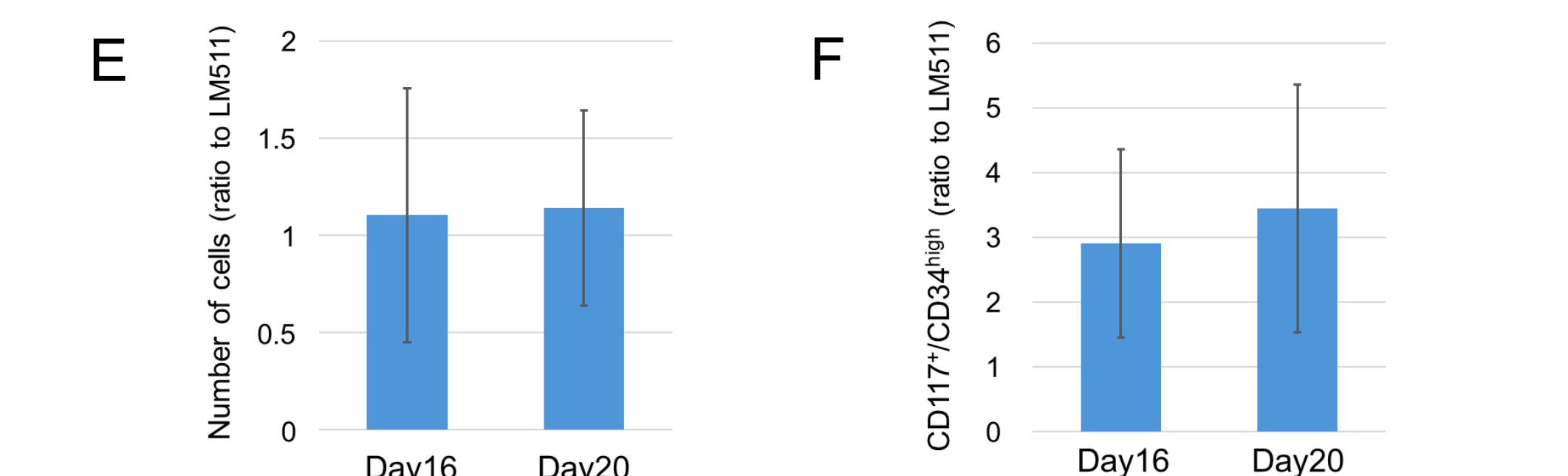


(A) bFGFをME期、HE期、または両期 (ME+HE) に添加して分化誘導。分化14日目および20日目に回収した浮遊細胞を抗CD34・抗CD117抗体で染色。枠内はCD34^{high}/CD117⁺のHPC集団。

(B) HE誘導後に接着細胞を剥離し、抗CD34・抗KDR抗体で染色。枠内はCD34⁺/KDR⁺のHE細胞集団。

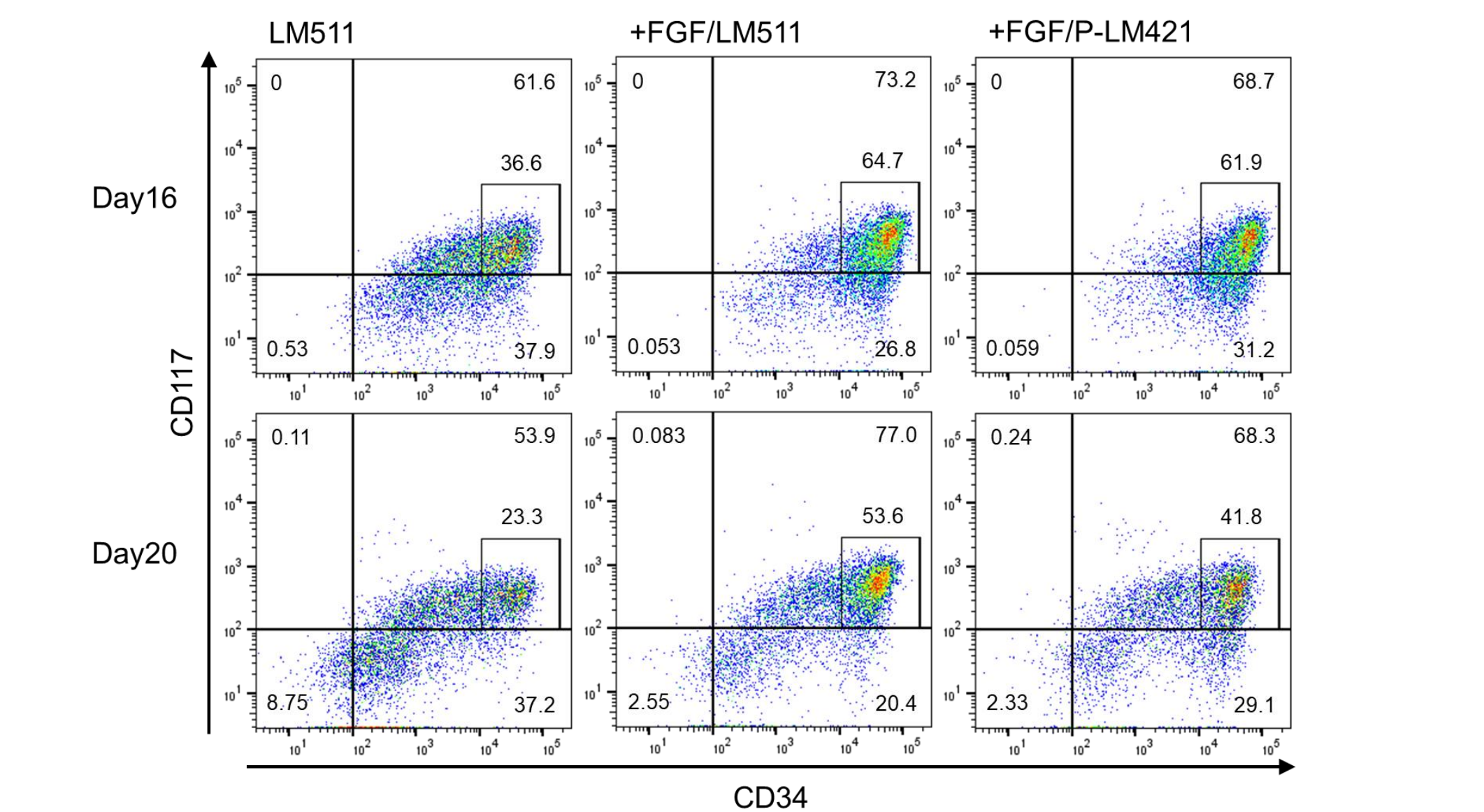


ME期・HE期の両方にbFGFを0, 25, 50, 100, 200 ng/mLで添加。分化16日目 (C) と20日目 (D) に回収した浮遊細胞を抗CD34・抗CD117抗体で染色。枠内はCD34^{high}/CD117⁺のHPC集団。



ME期・HE期に50 ng/mL bFGFを添加有無で分化誘導し、16日目と20日目に浮遊細胞を回収。総細胞数 (E) とCD34^{high}/CD117⁺ HPC集団の割合 (F) を定量。データはbFGF無添加条件に対する相対値を示す (n=5)。

7. P-LM421E8とbFGFの併用効果の検討



LM511-E8コート・bFGF無添加 (LM511)、LM511-E8コートでME・HE期に50 ng/mL bFGF添加 (+FGF/LM511)、P-LM421E8コートでME・HE期に50 ng/mL bFGF添加 (+FGF/P-LM421)の3条件で分化誘導。分化16日目と20日目の浮遊細胞を抗CD34・抗CD117抗体で染色。枠内はCD34^{high}/CD117⁺のHPC集団。

8. まとめ

- P-LM421E8はCD34^{high}/CD117⁺ HPCを安定に誘導する (総浮遊細胞数の増加は伴わない)
- P-LM421E8上で得たHPCはNK細胞への分化能が高く、CD56陽性率が顕著に上昇すると共に、NKG2A・Nkp30・Nkp44・Nkp46など機能関連分子を発現する
- bFGFをME誘導期・HE誘導期の双方に添加することで、CD34^{high}/CD117⁺のHPCを優位に誘導することができる (総浮遊細胞数の増加は伴わない)
- P-LM421E8とbFGFの併用による上乗せ効果は認められない (P-LM421E8は内因性FGFシグナルの増幅により作用している可能性がある)

P-LM421E8は、高品質なHPCを製造できる有望な基盤マトリックスであり、iPSC由来免疫療法の発展に大きく貢献することが期待される