HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	多能性幹細胞を用いた組織・細胞移植医療における免疫制御法の開発に関する研究
Author(s)	辻, 飛雄馬
Description	配架番号：2470
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13456号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13456
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77050
Type	doctoral thesis
File Information	Hyuma_Tsuji.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

多能性幹細胞を用いた組織・細胞移植医療における

免疫制御法の開発に関する研究

(Development of an immune-regulation
in the era of regenerative medicine using pluripotent stem cell)

2019 年 3 月

北海道大学

辻　飛雄馬

学　位　論　文

多能性幹細胞を用いた組織・細胞移植医療における

免疫制御法の開発に関する研究

(Development of an immune-regulation
in the era of regenerative medicine using pluripotent stem cell)

2019 年 3 月

北海道大学

辻　飛雄馬

目次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1 項

要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2 項

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5 項

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7 項

第 1 部：コモンマーモセット ES 細胞を用いた免疫制御性細胞の誘導

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11 項
方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13 項
結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17 項
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・29 項

第 2 部：免疫寛容誘導に資する多能性幹細胞由来造血幹細胞作製の試み
~細胞周期を指標とした検討~

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・33 項
方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・35 項
結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39 項
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・58 項

結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・61 項

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・62 項

利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・63 項

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・64 項

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿した。

Hyuma Tsuji, Haruka Wada, Ryo Otsuka, Tomoki Murata, Airi Sasaki, Muhammad Baghdadi, Erika Sasaki, Ken-ichiro Seino

Induction of macrophage-like immunosuppressive cells from common marmoset ES cells by modifying histone methyltransferase

Scientific reports in submission

本研究の一部は以下の学会に発表した。

・辻飛雄馬、佐々木元、和田はるか、大塚亮、清野研一郎
iPS 細胞由来アログラフトの生着延長を目指した新規免疫抑制性細胞治療
第 13 回日本免疫学日本免疫治療学研究会学術集会　2016 年 2 月　東京

・辻飛雄馬、和田はるか、大塚亮、清野研一郎
iPS 細胞由来他家移植片の生着延長を目指した新規免疫細胞治療の試み
第 8 回血液疾患免疫療法学会　2016 年 9 月　札幌

・辻飛雄馬、和田はるか、大塚亮、ムハンマド・バグダーディー、清野研一郎
iPS 細胞由来造血幹細胞作製法の開発と免疫寛容誘導
Sapporo stem cell conference　2017 年 8 月　北広島

・辻飛雄馬、和田はるか、大塚亮、ムハンマド・バグダーディー、村田智己、佐々木愛里、佐々木えりか、清野研一郎
ヒストン修飾因子を用いたコモンマーモセット ES 細胞由来免疫制御細胞の誘導
第 18 回日本再生医療学会総会　2019 年 3 月　神戸

要旨

【背景と目的】
現在想定されている多能性幹細胞を用いた再生医療では、HLA ホモの iPS 細胞を使用することが計画されている。しかしながら、この iPS 細胞ではカバーできない HLA 型保持者やマイナー抗原による拒絶反応が危惧され、移植時には免疫抑制が必要になる可能性が示唆されている。我々は、移植医療に多能性幹細胞を用いる時代を想定し、多能性幹細胞から移植片および拒絶反応抑止に資する免疫抑制性細胞を同時に作製し、アロ移植系に適用するというモデルを発案した。これまでに、マウス ES/iPS 細胞から誘導したマクロファージ様免疫抑制性細胞を拒絶反応抑止目的の細胞として用いることにより、同 ES/iPS 細胞から誘導した心筋細胞のアロ移植における拒絶反応を抑えることに成功している。

上記モデルの前臨床試験として、小型霊長類コモンマーモセットの ES 細胞よりマクロファージ様免疫抑制細胞が誘導可能かどうか検討した。コモンマーモセットは新世界ザルに分類される小型の霊長類であり、ヒトに近縁なことや、体サイズが実験上の取り扱いに適していることなど、医学研究において有用な形質をもつことから近年新たな実験動物として注目されている。

また、上記モデルをさらに発展させるため、マウス iPS 細胞より造血幹細胞の誘導を試みた。造血幹細胞を用いた mixed chimerism は現時点では最も安定した免疫寛容誘導法であり、再生医療時代の免疫制御においても適応可能と考え、mixed chimerism の誘導に必要な iPS 細胞由来造血幹細胞の作製を目的として研究を行った。

【方法と結果】
コモンマーモセット ES 細胞よりミエロイド系の血球を誘導するため BMP4、VEGF、SCF、GM-CSF を添加して培養した。分化誘導後 20 日目には培養ディッシュに弱く付着する単球様の細胞が得られた。この細胞をマクロファージに成熟させるため CSF-1 を、抑制性の機能を獲得させるため IL-4 を添加してさらに 5 日間培養した。その結果、培養ディッシュに強く付着するマクロファージ様の細胞（M(IL-4)）が得られたが、免疫抑制をするような機能は有していなかった。しかし、エピジェネティックな変化を誘発する低分子化合物 DZNep を添加することにより抑制型の表現型を示すマクロファージを誘導することに成功した（M(DZNep)）。M(IL-4)と M(DZNep)の細胞表面抗原をフローサイトメトリーで比較すると両者で CD45、CD14、CD11b が発現しており、マクロファー

ジ様の細胞であることが示唆された。また、抑制性の因子である PD-L1 の発現が M（DZNep）でのみ認められた。次に qPCR で遺伝子発現を比較すると *tgfβ1* が M(IL-4)に比べ M(DZNep)で有意に高く、*il-10* の発現が M(DZNep)でのみみられた。M(DZNep)が抑制性の因子を発現していることがわかったため、コモンマーモセットの細胞に抑制能を発揮できるかどうか、アロジェニックな PBMC 同士による MLR で検討した。M(DZNep)を PBMC 同士の混合培養に加えた場合、PBMC 同士および M(IL-4)を加えた混合培養に比べ、有意に増殖を抑制することが示された。

マウスの iPS 細胞を用いた先行研究や発生学の知見を参考に、BMP4 や VEGF 等のサイトカインの添加により血球を誘導した。誘導した細胞は、汎血球マーカーである CD45、造血幹細胞の細胞表面マーカーである cKit や Sca1 を示す集団を含んでいた。この細胞集団はストローマ細胞との共培養により造血幹細胞の特徴である血球多系列への分化能を有していることが認められた。この誘導した細胞を、放射線照射で前処置したコンジェニックマウスへの移植実験を行い、生体への生着能力を検討した。移植から 1 カ月後に末梢血を解析したところ、移植した iPS 細胞由来の血球が検出された。しかし、chimera 率は著しく低く、免疫寛容を誘導しうるほどの生着は見られなかった。造血幹細胞はその cell cycle の差異により生体への生着能力に違いがあるという報告がある。そのため、生着能力の低さを改善するため、cell cycle に着目した。Cell cycle の観察を簡便化するため、Fucci システムが遺伝子導入されているマウスより iPS 細胞を作製した。Fucci-iPS 細胞より造血幹細胞を分化誘導したところ、S/G2/M 期の割合が高く、cell cycle が亢進していることが認められた。Cell cycle の違いで細胞を分取したところ、cell cycle が亢進している細胞と cell cycle が亢進していない細胞では T 細胞への分化能と各種ミエロイド系列への多分化能に差異があることがわかった。

【考察】

本研究では、コモンマーモセットの ES 細胞から抑制性マクロファージの作製にエピジェネティックな変化を誘発する低分子化合物 DZNep を使用した。DZNep はマクロファージの細胞株を抑制型へ傾けるだけではなく、効率的な iPS 細胞の作製に有用であることが報告されている。DZNep の機能はユークロマチン化を引き起こし、様々な遺伝子の活性化を促進するものである。これらの報告を考慮すると、本研究で確立した IL-4 と DZNep を共に添加するプロトコルは、IL-4 で誘導される抑制型を特徴づけるクロマチン構造を、DZNep がユー

クロマチン化を促進することによって、より抑制型の表現型を増強したと考えられる。また、なぜ DZNep の添加により種々の抑制因子が発現・産生されるようになるのか解明する必要がある。今後、ヒト多能性幹細胞からも同様の誘導プロトコルで免疫抑制性マクロファージが産生可能か検討する必要がある。

マウス iPS 細胞由来造血幹細胞を作製したところ、cell cycle が亢進しているがわかった。造血幹細胞はその stemness の維持に quiescence が重要であると報告されているため、誘導時の培地に添加した血清やサプリメント、サイトカインなどの増殖因子により cell cycle が亢進し、生着能力が低下している可能性が指摘される。そのため、この部分を調節できれば生着能力が上昇する可能性がある。さらに、なぜ cell cycle 動態により分化能に差異が生まれるのか、機序の解明が望まれる。また、ヒト多能性幹細胞でも同様の現象が見られるのか検討する必要がある。

【結 論】

コモンマーモセット ES 細胞から、アロジェニック刺激を受けた PBMC の増殖を抑制可能な、免疫抑制性マクロファージを分化誘導した。コモンマーモセット ES 細胞から免疫抑制性マクロファージを分化誘導できるようになったことにより、多能性幹細胞を用いた再生医療における、細胞移植による免疫制御法の研究が非ヒト霊長類モデルで検討できるようになった。

マウス iPS 細胞から造血幹細胞に近い表現型を持つ細胞を作製したがマウス生体には生着しなかった。また、この細胞が cell cycle 動態により T 細胞への分化能と各種ミエロイド系列への多分化能に差異があることがわかった。この知見により効率的な iPS 細胞由来血液製剤の産生に繋がる可能性がある。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AG　mAzami-green
arg1　arginase-1
bFGF　basic fibroblast grows factor
BMP4　bone morphogenetic protein 4
BM-DC　bone marrow-derived dendritic cell
CMESC　common marmoset ESC
cDNA　complementary DNA
DZNep　3-deazaneplanocin A
EB　embryoid body
ESC　embryonic stem cell
Flt3L　FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
Fucci　Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator
GM-CSF　granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HSC　hematopoietic stem cell
HSPC　hematopoietic stem/progenitor cell
HLA　human leukocyte antigen
IFNg　Interferon gamma
il-6　interleukin-6
il-10　interleukin-10
iNOS　inducible nitric oxide synthase
iPSC　induced pluripotent stem cell
KO　mKusabira-orange
LSK　lineage-Sca1+cKit+
LIF　leukemia inhibitory factor
LPS　lipopolysaccharide
MEF　mouse embryonic fibroblast
MHC　major histocompatibility complex
Mo　monocyte
MLR　mixed lymphocyte reaction
NO　nitric oxide
oct4　octamer-binding transcription factor 4

PBMC　peripheral blood mononuclear cell
PSC　pluripotent stem cell
RT-qPCR　reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction
SCF　stem cell factor
sox2　sex determining region Y-box 2
tgfβ1　transforming growth factor-β1
tnfα　tumor necrosis factor-α
TPO　Thrombopoietin
VEGF　vascular endothelial growth factor
VPA　sodium valproate

緒言

昨今、再生医療は大きな注目を集めているが、これは多能性幹細胞（PSC: pluripotent stem cell）の登場によるところが大きい。PSC とは三胚葉すべてへの分化能を有する細胞であり、理論上、人体のほぼ全ての細胞に分化することができる。この特長をいかし、ヒト疾患の研究や治療法の開発など、様々な応用が考えられている。特に移植医療におけるドナー不足を克服するために大変有用であると期待され、様々な研究が展開されている。

前世紀より、臓器不全の患者に対する治療として組織および臓器移植医療は大きな発展を遂げてきた。しかしながら、この治療を行うための組織および臓器のドナー不足は依然として大きな問題となっているのが現状である。1998 年にヒト胚性幹細胞（ESC: embryonic stem cell）が、2006 年にはマウス、2007 年にはヒト人工多能性幹細胞（iPSC: induced pluripotent stem cell）が報告されて以来、PSC をソースとした移植医療を目指し、様々な細胞や組織への分化誘導が行われている(Takahashi and Yamanaka, 2006; Thomson, 1998)。実際にドーパミン産生細胞(Doi et al., 2014; Kondo et al., 2014)や肝細胞(Takebe et al., 2014)、膵臓のβ細胞(Shahjalal et al., 2014)、心筋(Burridge et al., 2012)などの作製が報告されている。しかしながら、PSC をソースとした移植片を用いることでドナー不足は解決できるかもしれないが、PSC 由来移植片を用いた移植医療においても、未だ別の問題点が残存している。それは、拒絶反応の問題である。

ESC は受精卵の胚盤胞期内部細胞塊に由来している。そのため、ESC から作製された移植片はたいていのレシピエントにとってアロジェニックとなり、拒絶反応が生じる。免疫学的に隔離されている神経組織や角膜、HLA（Human leukocyte antigen）を発現していない赤血球や血小板であれば、ESC 由来移植片を用いることも可能であるが、多くの組織の場合は拒絶反応の制御が重要な課題となる。

iPSC を用いた場合、患者本人から iPSC を作製して移植片を誘導・移植する自家移植のため、このような拒絶反応の問題は生じないと当初は考えられていた。しかしながら、緊急性を要する疾患や遺伝性疾患の場合など、他人由来の iPSC に頼らざるを得ない事態が想定される。また、その都度患者本人より iPSC を作製することは、細胞の維持や安全性の検証に膨大なコスト・日数を要するため、安全性の検証された複数の iPSC をストックしておく iPS 細胞バンク構想が進められている(Cyranoski, 2012; Nakatsuji et al., 2008)。この構想は、HLA ハ

プロタイプホモ接合型の iPSC をあらかじバンクにストックしておき、治療が必要な患者と HLA 型が合致した細胞をバンクより選び出し、組織・臓器に分化誘導後、移植を行う戦略となっている。このバンク構想を免疫学的視点より考察すると、たとえ HLA 型を合わせ拒絶反応の生じにくい細胞を選出したとしても、他人由来の細胞のため、マイナー抗原などの僅かなタンパク質抗原の差異がアロ抗原として認識され、拒絶反応が生じることが指摘される。よって、iPSC をソースとした移植医療においても拒絶反応の制御が重要な課題となる。

これまで、拒絶反応の問題を克服するためにカルシニューリン阻害薬やステロイド、ミコフェノール酸モフェチル、リツキシマブなどのモノクローナル抗体等様々な免疫抑制剤が開発されてきた(Halloran, 2005)。先人たちの研究により開発されてきた免疫抑制剤により移植臓器の生着率はその黎明期に比べ格段に向上したものの、その長期間の服用により、感染症や新規腫瘍発生のリスク、カルシニューリン阻害薬の内服においては腎機能障害などの副作用の問題が浮き彫りとなってきている。また、現在の免疫抑制剤では超長期的には慢性拒絶反応による移植片の欠落に至ることもある。そのため、移植された臓器に対する長期かつ特異的な免疫抑制、つまりは免疫寛容の誘導が求められている。

細胞療法は免疫寛容を誘導することが可能性となりうる、有望な戦略の 1 つである。基礎研究においては、抑制性マクロファージ(Riquelme et al., 2013)や制御性 T 細胞(Sakaguchi et al., 2008)、NKT 細胞(Seino et al., 2001)など様々な種類の細胞療法が免疫寛容の促進に効果的であることが報告されている。さらに、臨床においては、腎臓移植および肝移植における拒絶の制御に、細胞療法の有用性が報告されている(Bashuda et al., 2005; Kawai et al., 2008; Riquelme et al., 2018)。しかしながら、PSC 由来移植片を使用した移植医療における、細胞療法による免疫制御の報告はほとんどない。

そこで我々は、着実に現実のものとなってきている PSC を用いた移植医療において、細胞療法を用いた新しい免疫制御法の開発が重要であると考えた。

これまでに我々は PSC の分化多能性という特徴に着目し、移植片を作製する PSC から移植片だけではなく免疫を制御する細胞も作製し、同時に移植するというコンセプト（新時代移植医療における免疫制御）を提唱してきた（図 1)。我々はマウス ESC およびマウス iPSC を用いた移植モデルを構築してこのコンセプトの有効性を検証してきた(Kudo et al., 2014; Sasaki et al., 2015)。PSC より iNOS（inducible nitric oxide synthase）を高発現する抑制性マクロファージを誘

導し、マウスへ投与することで、アロジェニックレシピエントにおける同 PSC 由来心筋様細胞の生着を延長することに成功した。この研究は、PSC を用いた再生医療時代における移植医療を想定した先駆的な免疫制御研究であり、再生医療普及のための基盤技術となりうる。

本研究は 2 部構成となっている。第 1 部において、上記コンセプトの前臨床研究として非ヒト霊長類であるコモンマーモセットの ESC を用い、抑制性マクロファージが誘導可能か検討した。また、第 2 部においては上記コンセプトのさらなる発展を目指し、マウス iPSC から免疫寛容に資する造血幹細胞の作製を試みた。

図1

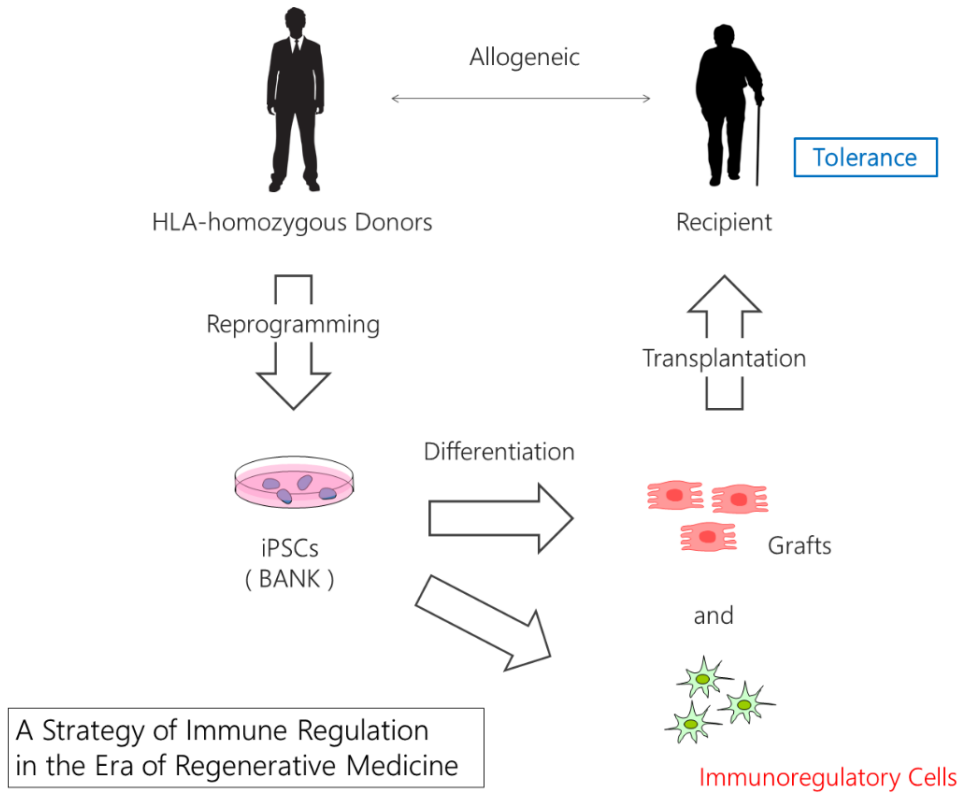


図1 再生医療を用いた新時代移植医療における免疫制御戦略の模式図を示した。多能性幹細胞から移植片と、免疫制御細胞も作製し、共に移植することで免疫寛容を誘導する。

第 1 部

コモンマーモセット ES 細胞を用いた免疫制御性細胞の誘導

緒言

実験動物を用いた研究は、基礎研究と臨床をつなげる重要な過程である。現在、多くの研究室で採用されている実験動物はマウスであり、これまでの生物医学研究に対して莫大な貢献をしてきている。しかしながら、これまでのマウスでの基礎研究が必ずしもヒトへの臨床応用につながらないことから、げっ歯類と霊長類の間には、想像以上に生物学的に差があることが指摘されており(Poswillo et al., 1972)、様々なヒト生理機能を模倣する非ヒト霊長類モデルの確立が望まれている。

コモンマーモセット（*Callithrix jacchus*）は新世界ザルに分類される小型の霊長類である。体サイズが実験上の取り扱いに適していることや、ヒトに近縁なことなどから(Abbott et al., 2003; Mansfield, 2003)、免疫学（Genain and Hauser, 1997; Genain et al., 1994; Quint et al., 1990)や神経科学(Ando et al., 2008; Yaguchi et al., 2009)、薬理学（Klug et al., 1994; Zühlke and Weinbauer, 2003)などの分野においてモデル動物として近年注目されている。また、近年、ESC (Sasaki et al., 2005)や iPSC (Tomioka et al., 2010)も樹立されており、さらには、霊長類で唯一トランスジェニック動物の作製に成功していることが報告されている(Sasaki et al., 2009; Sato et al., 2016)。また、コモンマーモセットは性成熟が早い点や、生涯産仔数の点でも医学研究において有用である。具体的には、一般的に実験動物として使用されている旧世界ザルのカニクイザル（*Macaca fascicularis*）やアカゲザル（*Macaca mulatta*）は性成熟まで約 3 年かかり、生涯で残す子孫が約 10 匹であるのに比べ、コモンマーモセットは性成熟まで 12 から 18 ヶ月であり、生涯で残す子孫が 40 から 80 匹である(Mansfield, 2003)。このように医学研究において有用な形質を有しており、新たな前臨床実験動物として注目されている。

我々は、以前に PSC 由来移植片の移植時における新たな免疫制御法のコンセプトを示した。マウス PSC から誘導した拍動心筋をアロジェニックなマウスに移植する際に、同 PSC から誘導した iNOS を高発現する免疫抑制性マクロファージも並行して移植する。これにより、無治療対照群に比べ移植片の生着を有意に延長させることができることを報告し、新時代移植医療における新しい免疫制御法のコンセプトを示した(Kudo et al., 2014; Sasaki et al., 2015)。

そこで本研究では、前臨床研究としてコモンマーモセットの ESC を用い、抑制性マクロファージが誘導可能かどうか検討した。現在の移植医療における免疫寛容の誘導法として使用されている細胞種として、造血幹細胞や制御性 T 細

胞、抑制性マクロファージがある。PSC からの造血幹細胞の誘導が大変困難であることや、リンパ球系に比べミエロイド系の分化誘導のほうがより簡便かつ効率的であることから、PSC を用いた移植医療時に適用する、免疫寛容を誘導しうる細胞種としては抑制性マクロファージが適していると考えた。

方法

マウス

6 週齢メスの C3H/He マウスおよび BALB/c マウスは日本 SLC 株式会社から購入した。これらの動物は北海道大学動物実験に関する規定に基づいて取り扱った（承認番号：17-0110)。

細胞培養

コモンマーモセット ES 細胞（NO.40）は佐々木博士（実験動物中央研究所）に供与していただき、ES 細胞培地（Knock-Out DMEM（GIBCO）に 15% StemSure（WAKO)、0.6% L-グルタミン（ナカライテスク)、0.1 mM 非必須アミノ酸（ナカライテスク)、100 U/ml ペニシリン（ナカライテスク)、100 μg/ml ストレプトマイシン（ナカライテスク)、0.2 mM 2-メルカプトエタノール（ナカライテスク)、組換えヒト Leukemia Inhibitory Factor: LIF（in house）を添加した培地）を使い、マウス胎仔線維芽細胞（Mouse embryonic fibroblast：MEF）上で 5% CO2 、37℃インキュベーターで維持した。コモンマーモセット ES 細胞の継代方法は以下の方法で行った。入っていた培地を除去して 5 ml の PBS で Wash し、Trypsin を 500 μL 入れ dish 全体に広げてから除去、37℃、5% CO2、5-10 min インキュベートした。未分化な ES コロニーが MEF から浮いてきた後、MEF 培地（D-MEM（WAKO）に 10% FBS（ニチレイ)、0.6% L-グルタミン、0.1 mM 非必須アミノ酸、100 U/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン、0.2 mM 2-メルカプトエタノール）5 mL で Trypsin を中和した。培地を吹き付けて MEF シートを Dish から剥がし、ピペットで 50 回ほどシートを破壊しすぎないように注意しつつピペッティングした。MEF シートを残しチューブに回収して、200 g、4℃、5min で遠心した。上清を完全に除去し、100 μL の培地をペレットに添加し、40-50 回ピペッティングして、コロニーを適度なサイズに破壊した後、新しい MEF の上に播き直し、ES 細胞培地で再び培養した。

コモンマーモセット末梢血は井上博士（実験動物中央研究所）に供与していただいた。頂いた末梢血は lymphocyte separation medium（MP biomedicals） で末梢血単核細胞（Peripheral blood mononuclear cell：PBMCs）を分離して使用した。

マクロファージ様抑制性細胞への分化誘導

分化誘導時の細胞死を防ぐため 24 時間、Rho-associated kinases 阻害剤（Y-

27632（WAKO)）で処理した(Watanabe et al., 2007)。ミエロイド系細胞への分化のため、トリプシン（Difco laboratories）処理で単細胞懸濁液にした ESC を中胚葉誘導培地（α-MEM（GIBCO）に 20% ウシ胎仔血清（HyClone)、0.1 mM 非必須アミノ酸、1 mM ピルビン酸ナトリウム、100 U/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン、55 μM 2-メルカプトエタノールを添加した培地）に 20 ng/mL の Bone morphogenetic protein 4（BMP4)、20 ng/mL の Vascular endothelial growth factor（VEGF）を添加して低付着性細胞培養皿（Locus）で 5 日間浮遊培養し、Embryoid body（EB）を誘導した。5 日目に上記培地から BMP4 を除き、20 ng/mL の Stem cell factor（SCF）および 20 ng/mL の Granulocyte macrophage colony-stimulating factor（GM-CSF）を添加して培養した。10 日目に VEGF を除去し、SCF と GM-CSF で 15 日目まで培養した。15 日目から血球誘導培地（RPMI（WAKO）に 10% ウシ胎仔血清（GIBCO)、0.1 mM 非必須アミノ酸、1 mM ピルビン酸ナトリウム、100 U/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン、55 μM 2-メルカプトエタノールを添加した培地）に 20 ng/mL GM-CSF を添加し、20 日目まで培養した。20 日目から血球誘導培地に 20 ng/mL GM-CSF、20 ng/ml Colony-stimulating factor 1（CSF-1)、20 ng/mL Interleukin 4（IL-4）および 0.1 μM 3-Deazaneplanocin A（DZNep）（Cayman chemical）を添加し、5 日間培養してマクロファージ様抑制性細胞を誘導した。全てのサイトカインは Biolegend から購入した。

メイギムザ染色

スライドガラスに塗沫した細胞を冷風乾燥し、100% メタノール（Sigma）で固定した。メタノールを除去し、冷風乾燥した後、ギムザ染色液（WAKO）をサンプル面に満載して 15 分室温静置した。流水水洗し、カバーガラスで封入した後、実体顕微鏡で観察した。

貪食活性試験

マクロファージ様細胞を 5×10^4 個/well で μ-Slide 8 well（ibidi）に播種した。pHrodo Green *E. coli* BioParticles Conjugate for Phagocytosis（Thermo Fisher Scientific）を、10%FBS を含む培地中で 24 時間オプソニン処理した。 オプソニン処理した Particle を細胞培養している well に添加し、5% CO2 、37℃で 120 分間インキュベートした。 インキュベーション後、培養細胞を 4%パラホルムアルデヒド（WAKO）で固定し、PBS で洗浄、DAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole 、Cayman chemical）を室温で 30 分間染色した。 その後、observer

z1 顕微鏡（Zeiss）を用いて蛍光画像を取得した。

RT-qPCR

Messenger RNA は PureLink RNA mini kit（Life technologies）を用いて抽出した。抽出した RNA を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix（TOYOBO）を用いて相補的 DNA（Complementary DNA：cDNA）合成した。合成した cDNA を元に KAPA SYBR Fast qPCR Kit（日本ジェネティック）を用いて、以下のプライマーで qPCR を行った。

arginase 1: forward 5'-TTCTCAAAGGGACAGCCACG-3', reverse 5'-TAGGGATGTCAGCAAAGGGC-3'

transforming growth factor-β1: forward 5'-CCCCTACATTTGGAGCCTGG-3', reverse 5'-CACGTAGTACACGATGGGCA-3

intereleukin-10: forward 5'-GGTGCAGGTGAAGAATGCTG-3', reverse 5'-GAGTCTATGGAGTCGCCGC-3'

interleukin-6: forward 5'- GATTCAATGAGGAGACTTGCC-3', reverse 5'-TGTTCTGGAGGTACTCTAGGTA-3'

tumor necrosis factor-α: forward 5'- AGCCTGTAGCCCATGTTGTAG-3', reverse 5'- CTCTCAGCTCCACGCCATTG-3'

octamer-binding transcription factor 4: forward 5'-AAACCCACACTTCAGCAGATCA-3', reverse 5'-CACACGGACCACATCCTTCTC-3'

sex determining region Y-box 2: forward 5'-GAGAACCCCAAGATGCACAAC-3', reverse 5'-TCTCGGACAGCAGCTTCCA -3'

actin-β: forward 5'-TCCTGACCCTGAAGTACCCC-3', reverse 5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC-3'

フローサイトメトリーおよび抗体

フローサイトメトリーは FC500（Beckman Coulter）で行い、解析は FlowJo ソフトウェア（Tree Star）を使用した。解析の際にはプロピジウムイオジドの取り込み、および Forward、Side Scatter で生細胞および死細胞を選択した。蛍光色素結合モノクローナル抗体およびアイソタイプコントロール抗体は以下のものを使用した。Anti-common marmoset CD45（6C9）、 anti-human CD14（M5E2),、anti-mouse/human CD11b（M1/70）、 anti-human CD86（2331）、anti-human HLA-ABC（G46-2.6）、 anti-human HLA-DR（L243）、 anti-human

PD-L1 (29E.2A3)、anti-mouse IL-10 (JES5-16E2)、mouse IgG1 κ isotype control、mouse IgG2a isotype control、rat IgG2b isotype control、rat IgG2b κ isotype control。これらの抗体は Biolegend か Becton dickinson から購入した。

リンパ球混合試験

C3H/He マウスの脾臓より CD4 マイクロビーズ（Miltenyi Biotech）を用いて単離した T 細胞を Responder とし、骨髄細胞より誘導した樹状細胞（Bone marrow-derived dendritic cell：BM-DC）(Inaba et al., 1992)を 35 Gy の放射線照射で不活化し Stimulator とした。共培養は 96-well 丸底培養プレートの 1 well に Responder を 1×10^5 個、Stimulator を 2×10^4 個、抑制性細胞は 35 Gy の放射線照射で不活化して 2×10^4 個加えた。4 日間の培養後、1 μCi の 3H 標識チミジンを各 Well に添加して 8 時間培養し、FilterMate セルハーベスター（PerkinElmer）を用いて、Printed Filtermat A ガラスフィルターに細胞を吸着させた。^{3}H の測定のため MeltiLex™ A (Perkin Elmer) でシンチレーションし、Micro Beta 2 (Perkin Elmer) で ^{3}H 活性を測定した。培養液は DMEM (WAKO) に 10% ウシ胎仔血清（ニチレイ)、0.1 mM 非必須アミノ酸、1 mM ピルビン酸ナトリウム、100 U/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン、55 μM 2-メルカプトエタノールを添加した培地である。

統計解析

統計学的有意性は以下の方法にて検討した。比較対象が 2 群の場合 unpaired Student t test にて 2 群間の平均値の差の検定を実施した。比較対象が 3 群以上の場合、Tukey Honest Significant Difference test にて多重比較を行った。本研究における有意水準は 5%とし、P 値が 5%を下回る場合に統計学的に有意差ありと判断した。各図内には、$P<0.05$ の場合にアスタリスク（＊）1 つ、$P<0.01$ の場合にアスタリスク（＊＊）2 つ、$P<0.001$ の場合にアスタリスク（＊＊＊）を 3 つ付与し、有意差の認められなかった群間には NS（Not significant）を付与した。

結果

コモンマーモセット ES 細胞からミエロイド系細胞への誘導

PSC から血球系細胞への分化誘導には、フィーダー細胞を使用する方法としない方法がある。マウスの PSC を用いた研究では、一般的にフィーダー細胞を用いることが多い(Schmitt et al., 2004; Wada et al., 2011)。これは現在樹立されている血球誘導用のフィーダー細胞がマウスに由来しているため、効率よく分化誘導が可能であるからと考えられている。しかしながら、ヒトの PSC から血球系への分化誘導では、フィーダー細胞を使用した誘導プロトコルと、使用していない誘導プロトコルでは分化誘導の効率に差がないと言われている(Chen, 2014)。コモンマーモセットの場合、ヒトと同様に血球誘導用に適したフィーダー細胞が樹立されていない。また、臨床応用する際には他種由来の細胞やタンパク質成分が混入することは好ましくないことから、我々はフィーダー細胞を用いない誘導プロトコルを選択した。

ヒトの ESC から樹状細胞の誘導報告を参考にし(Tseng et al., 2009)、コモンマーモセット ESC（CMESCs）から血球系細胞を誘導する新規のプロトコルを確立した（図 2A)。まず、中胚葉誘導のために BMP4、血管血球共通前駆細胞誘導のために VEGF を添加して胚様体を誘導した。その後、分化誘導 5 日目に引き続き VEGF と細胞数拡大および血球系への方向付けのために SCF、ミエロイド系誘導のために GM-CSF を添加して培養した。10 日目からは GM-CSF と SCF で培養し、15 日目から 20 日目までは GM-CSF のみで培養し単球を誘導した。分化誘導後 10 日目には胚様体が多数みられ、20 日目まで誘導された細胞はディッシュに弱く張り付いている細胞や、クラスターを作り浮遊している細胞などが観察された（図 2B)。分化誘導後 20 日目の細胞をメイギムザ染色し顕微鏡下で観察したところ、腎形の核や cytoplasm/nucleus の比率が高いなど形態的には単球／ミエロイド系の特徴を示していた（図 2C)。

次に、分化誘導後 20 日目の細胞表面抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析した。CMESCs 由来細胞は Forward および Side Scatter により大きい細胞サイズを示していることがわかり、主要組織適合遺伝子複合体抗原（MHC）class I である HLA-ABC、汎白血球マーカーである CD45、単球のマーカーである CD14、共刺激分子である CD86 を発現していた。また、マクロファージマーカーである CD11b と MHC class II である HLA-DR をわずかに発現していた（図 2D)。しかし、免疫抑制分子である PD-L1 の発現はみられなかった。これらのことから、この細胞は単球様の表現型を示していることがわかった。今後こ

の CMESCs 由来分化誘導後 20 日目の細胞を Mo（Monocyte）と呼称する。

図2

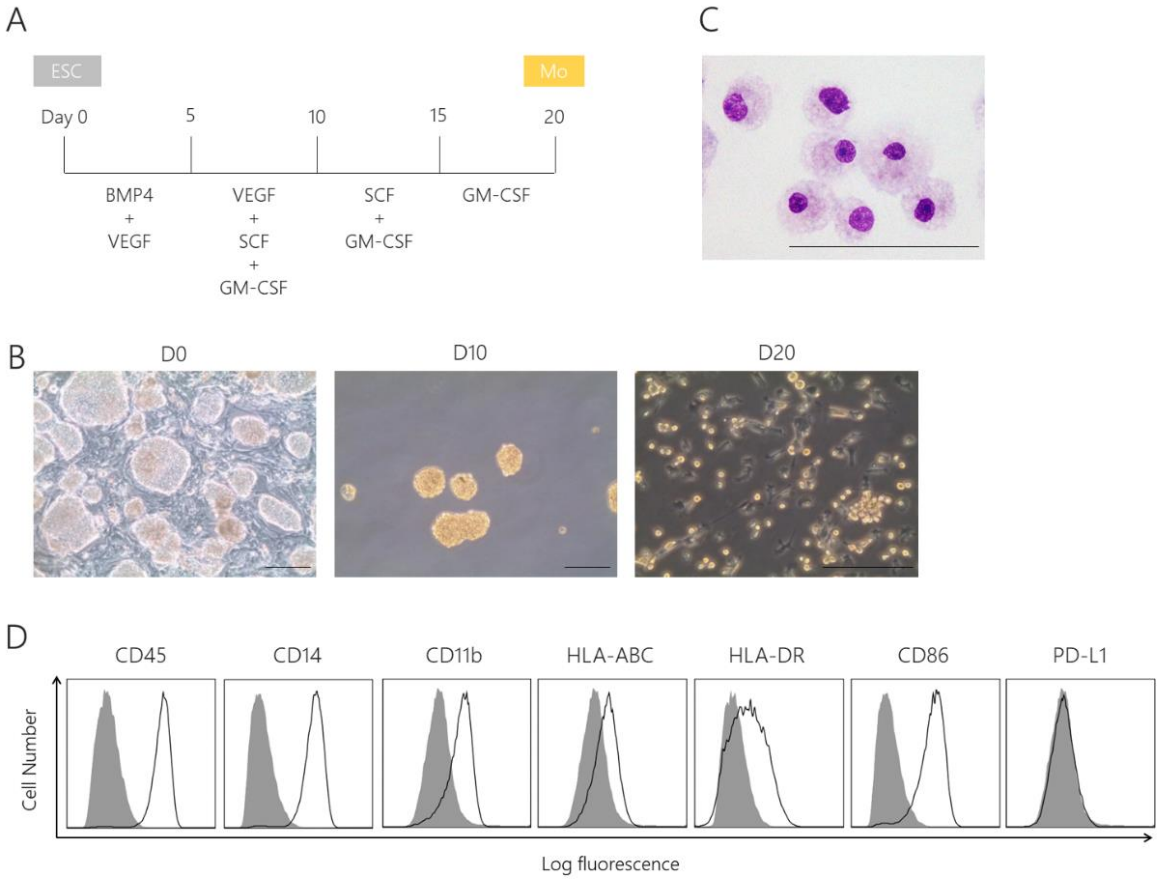


図2 CMESCs由来単球様細胞の解析

（A）ESCから単球様細胞を誘導するためのプロトコルを示した。ESCはES細胞を、Moは単球を示している。（B）ESCから単球様細胞へ分化誘導する過程の形態的変化を位相差顕微鏡を用いてを観察した。D0はES細胞を、D10およびD20はそれぞれ分化誘導後10日目と20日目の細胞を示している。Scale bars: 100 μm.（C）分化誘導後20日目の細胞をメイギムザ染色した。 Scale bars: 100 μm.（D）分化誘導後20日目の細胞の細胞表面抗原をフローサイトメトリーで解析した。灰色のヒストグラムがisotype controlを実線はspecific antibodyを示している。

我々はこれまでにフィーダー細胞を使用しない血球系への分化誘導プロトコルを確立した。しかし、分化誘導効率化の可能性を鑑み、マウス由来のフィーダー細胞である OP9 を用いて血球系への分化誘導を試みた。分化誘導プロトコルは図 3A に示した。Trypsin 処理でシングルセルにした CMESCs を OP9 の上に播種し 7 日間培養した後、新しい OP9 上に播種しさらに 7 日間培養した。その後、6 日間 GM-CSF 存在下で培養した後、マクロファージへの方向付けのため GM-CSF、CSF-1 および IL-4 の存在下で培養した。位相差顕微鏡を用いて観察した形態的変化を図 3B に示した。フィーダー細胞を使用しない誘導プロトコルと同様に 20 日目にはディッシュに弱く張り付いている細胞や、クラスターを作り浮遊している細胞などが観察された。また、分化誘導 25 日目には仮足を伸ばしてディッシュに強く付着している細胞が観察された。

図3

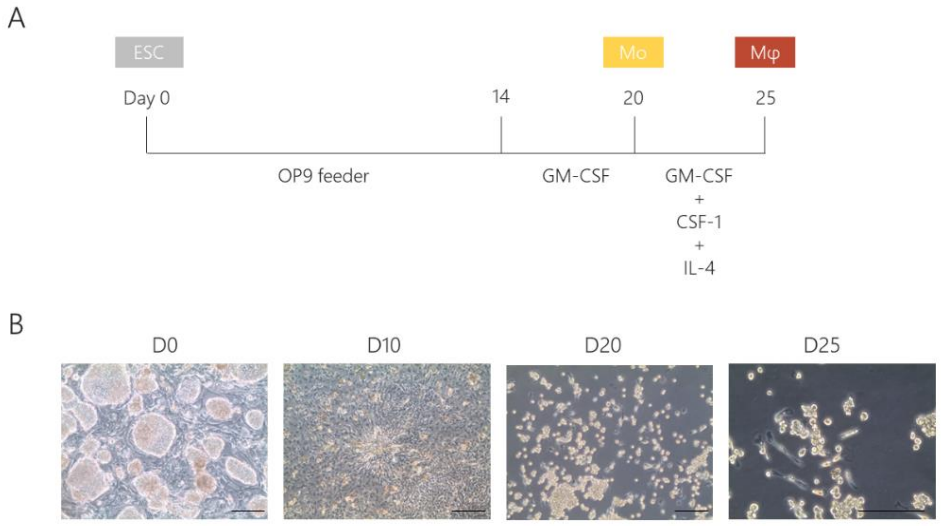


図3 OP9を用いて分化誘導したCMESCs由来単球様細胞の解析
（A）OP9を用いてESCから単球様細胞を誘導するためのプロトコルを示した。ESCはES細胞を、Moは単球を、Mφはマクロファージを示している。（B）ESCから単球様細胞へ分化誘導する過程の形態的変化を位相差顕微鏡を用いて観察した。D0はES細胞を、D10、D20およびD25はそれぞれ分化誘導後10日目、20日目、25日目の細胞を示している。Scale bars: 100 μm.

以上のように、OP9 フィーダー細胞を用いる誘導プロトコルでも単球／ミエロイド系の分化誘導が可能であることが示された。しかし、OP9 はマウス由来であり、他種由来の細胞やタンパク質成分が混入することは好ましくないこと、分化誘導の効率に顕著な差が無かったことから（Data not shown)、今後の実験はフィーダー細胞を用いない誘導プロトコルを選択した。

コモンマーモセット ES 細胞から抑制性マクロファージ様細胞への誘導

CMESCs より誘導した単球様細胞をマクロファージへ成熟させるため、CSF-1 を添加して培養した。また、マクロファージの免疫抑制性機能の獲得には Th2 サイトカインが重要であることから(Murray et al., 2014)、IL-4 を同時に添加し、5 日間培養した (図 4A)。GM-CSF、CSF-1 および IL-4 を添加した培養により、仮足を伸ばしてペトリディッシュに強く付着し、細胞質にファゴソーム様構造物のみられるマクロファージ様の細胞（M(IL-4)）が得られた（図 4B)。

この細胞が免疫抑制能を有するか検討するため、簡便なマウス T 細胞を用いたリンパ球混合試験（Mixed lymphoid reaction：MLR）で解析した。具体的には、C3H/He マウスより単離してきた $CD4^+$ T 細胞および、BALB/c マウス由来 BM-DC を共培養する MLR に、M(IL-4)を添加する系で解析した。その結果、T 細胞と BM-DC を共培養することに T 細胞の増殖がみられたが、ここに M(IL-4)を添加しても、T 細胞増殖の抑制はみられなかった（図 4C)。

図4

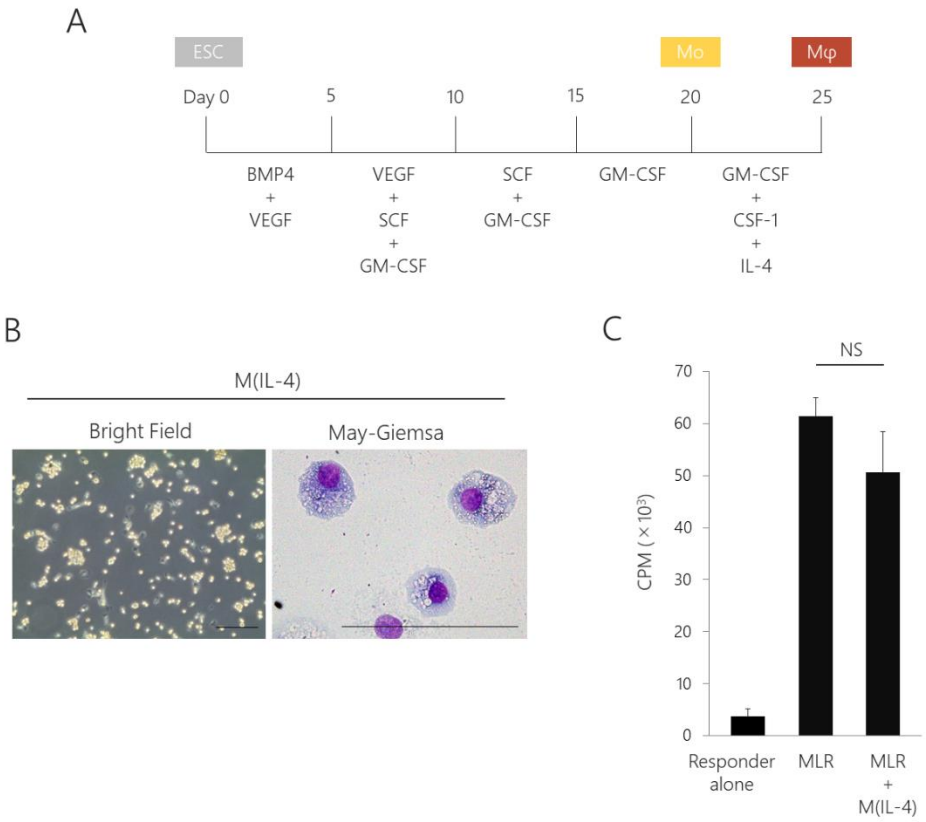


図4 IL-4を用いたCMESCs由来免疫抑制性マクロファージの分化誘導検討
（A）ESCからマクロファージ様細胞を誘導するためのプロトコルを示した。ESCはES細胞を、Moは単球を、Mφはマクロファージを示している。（B）M(IL-4)の位相差顕微鏡での形態観察、およびメイギムザ染色。Scale bars: 100 μm.（C）マウスリンパ球混合試験によるM(IL-4)の免疫抑制能の検討。Mean±SD, CPM: count per minutes, NS: not significant.

我々は以前に、マウス PSC よりミエロイド系細胞に誘導した後にリポ多糖（Lipopolysaccharide：LPS）および IL-4 で刺激することで NO 依存的に免疫抑制能を発揮するマクロファージ様細胞を誘導可能であると報告した(Kudo et al., 2014; Sasaki et al., 2015)。そこで、CMESCs からも同様の誘導プロトコルで抑制性細胞を誘導できるか検討した（図 5A)。CMESCs から分化誘導の 20 日目に LPS を添加することで、マウス PSC 由来免疫抑制性マクロファージと同様にペトリディッシュに強く接着する細胞が得られた（図 5B)。しかし、この細胞の培養上清には NO の産生がみられず、LPS で刺激していない細胞と同程度であっ

た（図 5C）。そのため、この LPS で刺激した CMESCs 由来マクロファージ様細胞は免疫抑制能は有していないと判断し、別の誘導プロトコルを検討することとした。

図5

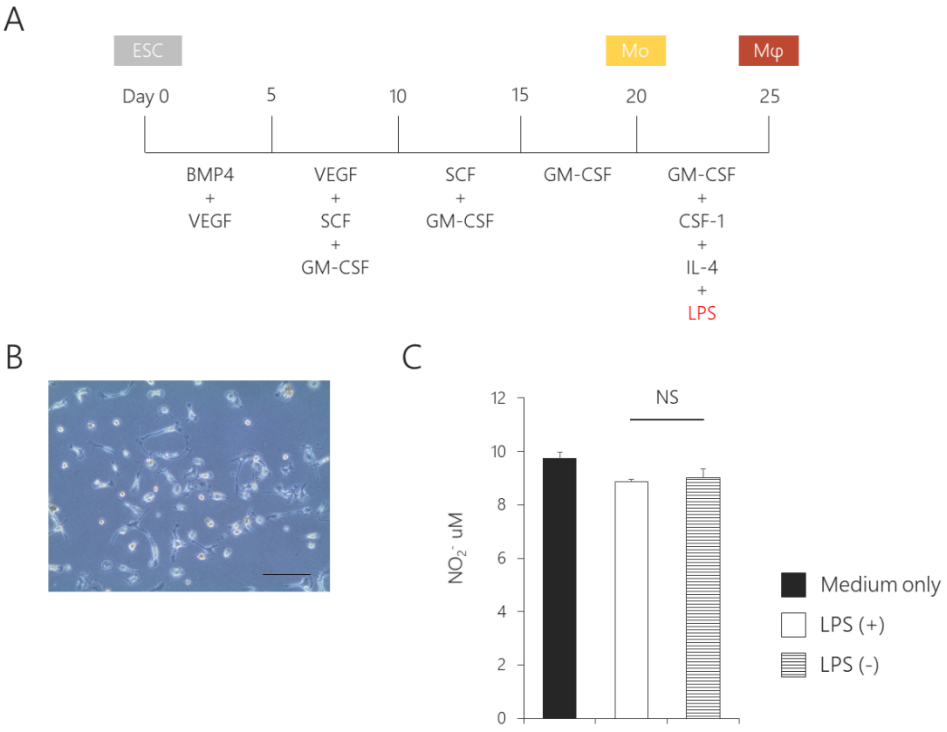


図5 LPS刺激によるCMESCs由来免疫抑制性細胞誘導の検討
（A）ESCからLPS刺激免疫抑制性細胞を誘導するためのプロトコルを示した。ESCはES細胞を、Moは単球を、Mφはマクロファージを示している。（B）25日目の細胞形態を位相差顕微鏡を用いて観察した。Scale bars: 100 μm.（C）LPSで刺激したCMESCs由来マクロファージ様細胞培養上清中のNO濃度測定。Mean±SD, NS: not significant.

近年、マクロファージの細胞株である RAW264.7 や、骨髄細胞由来マクロファージにエピジェネティックな変化を誘発する低分子化合物を添加することにより、抑制型の表現型を示すマクロファージが誘導されることが報告されている（Jeong et al., 1996; Wu et al., 2012）。そこで、上記のような化合物が CMESCs

から誘導したマクロファージにも同様の効果を及ぼすのか検討した。分化誘導20 日目より、GM-CSF、CSF-1 および IL-4 と同時にエピジェネティックな変化を誘発する低分子化合 3-deazaneplanocin A（DZNep: ヒストンメチルトランスフェラーゼ EZH2 の阻害剤）を培養系に添加した（図 6A)。その結果、形態的には M(IL-4)と類似した、仮足を伸ばしてペトリディッシュに強く付着し、細胞質にファゴソーム様構造物のみられるマクロファージ様の細胞が得られた（M(DZNep)）(図 6B)。この M(DZNep)の免疫抑制能をマウス T 細胞の MLR を用いて免疫抑制効果について検討したところ、M(IL-4)に比べ有意に T 細胞の増殖を抑制することが認められた（図 6C)。

図6

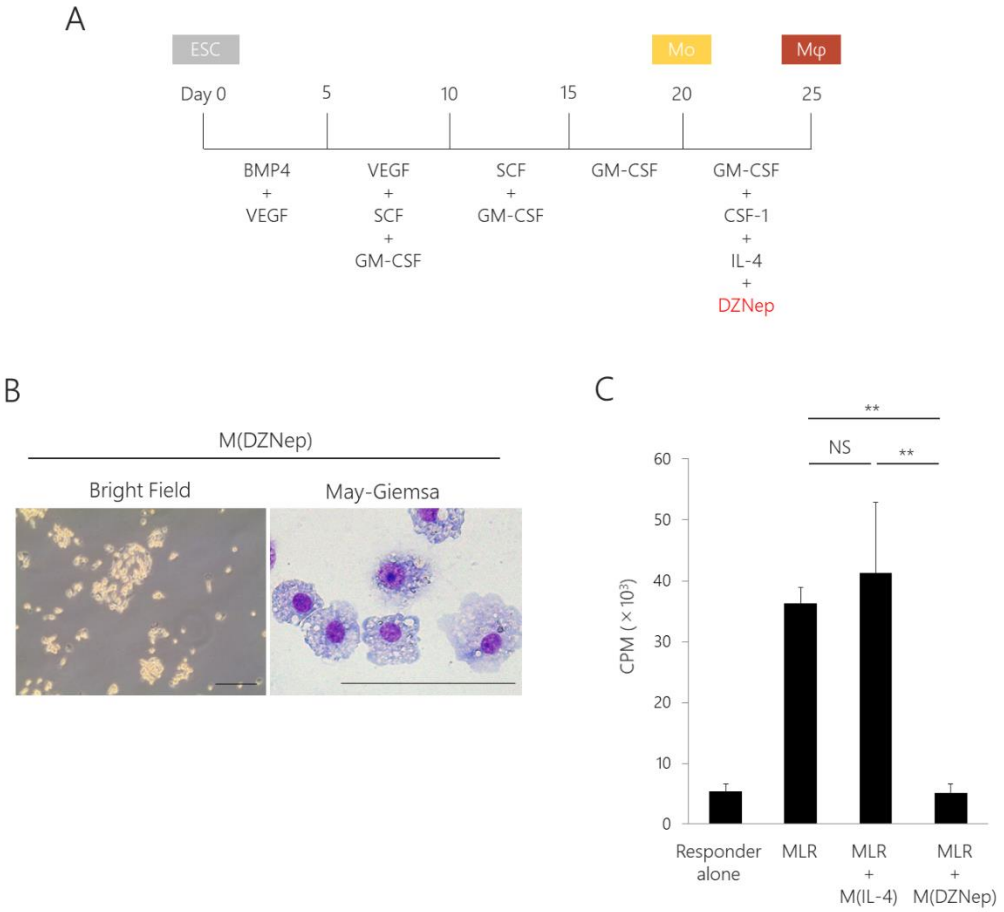


図6 DZNepを用いたCMESCs由来免疫抑制性マクロファージの分化誘導検討
（A）ESCからマクロファージ様細胞を誘導するためのプロトコルを示した。ESCはES細胞を、Moは単球を、Mφはマクロファージを示している。（B）M(DZNep)の位相差顕微鏡での形態観察、およびメイギムザ染色。Scale bars: 100 μm.（C）マウスリンパ球混合試験によるM(DZNep)の免疫抑制能の検討。Mean±SD, CPM: count per minutes, $^{**}P<0.001$, NS: not significant.

CMESCs 由来免疫抑制性細胞の表現型解析

M(IL-4)と M(DZNep)のマクロファージとしての機能を調べるため、酸性環境下でのみ発光する蛍光物質が結合された *E. coli* particles を用い、貪食活性試験を行った。その結果、M(IL-4)、M(DZNep)共に、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 と同程度の貪食活性を有していることが示された（図 7）。

図7

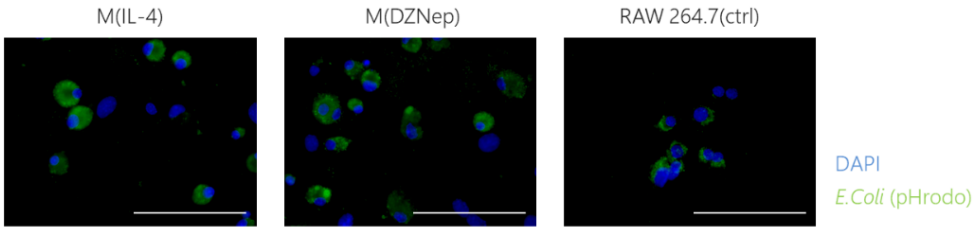


図7 CMESCs由来細胞の貪食活性試験
M(IL-4)、M(DZNep)およびRAW264.7の貪食活性をpHrodo Green *E. coli* BioParticle用いて調査した。核はDAPIで染色した（青色）。Scale bars: 100 μm.

次に、M(IL-4)と M(DZNep)の比較のため、分化誘導後 25 日目の各細胞をフローサイトメトリーで表面抗原分子発現解析した。M(IL-4)および M(DZNep)は共に HLA-ABC、汎白血球マーカーである CD45、単球のマーカーである CD14、マクロファージマーカーである CD11b、共刺激分子である CD86 が発現していたことからマクロファージ様細胞であることが示唆された。また、HLA-DR をわずかに発現しており、抗原提示能を有することが示唆された（図 8）。重要なことに、抑制性の因子である PD-L1 の発現が M(DZNep)でのみみられた。

図8

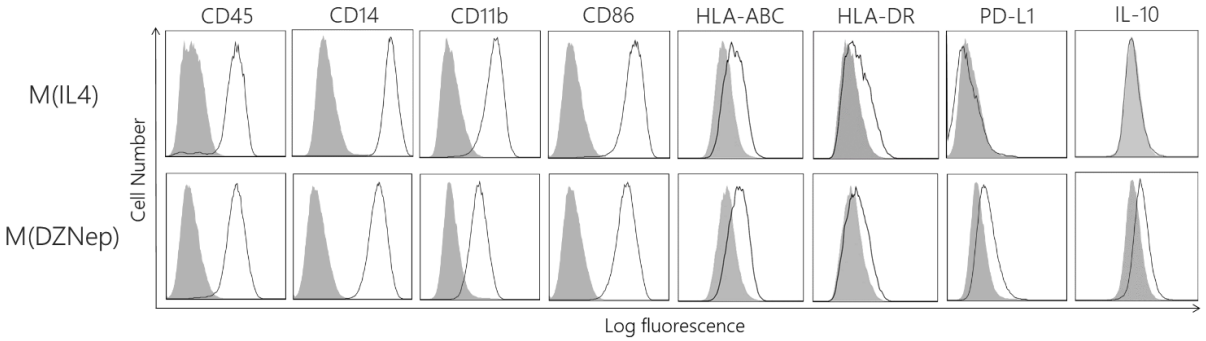


図8 M(IL-4)およびM(DZNep)の細胞表面抗原解析
フローサイトメトリーを用いM(IL-4)とM(DZNep)の細胞表面抗原を解析した。縦軸：細胞数、横軸：蛍光強度、灰色のヒストグラムがisotype controlを実線はspecific antibodyを示している。

次に、RT-qPCR でマクロファージが発現する因子に関して ES 細胞（ESC)、CMESCs 分化誘導後 20 日目の単球様細胞（Mo)、M(IL-4)および M(DZNep)において遺伝子発現を解析した(図 9)。抑制因子として知られる *arginase-1*（*arg1*）の発現は M(IL-4)と M(DZNep)の間で有意な差はみられなかったが、*transforming growth factor-β1*（*tgfβ1*）の発現は有意に M(DZNep)で高かった。抑制性のサイトカインである *interleukin-10*（*il-10*）は、Mo および M(IL-4)ではみられなかった。一方、以前に報告があるように ESC では発現がみられ、M(DZNep)においては ESC に比べ約 10 倍高発現していた(Robertson et al., 2007)。また、IL-10 の発現はフローサイトメトリーによる細胞内染色においても認められた（図 8)。マクロファージが発現する炎症性サイトカインである *interleukin-6*（*il-6*）の発現は M(IL-4)および M(DZNep)で共にみられず、*tumor necrosis factor-α*（*tnfα*）は M(IL-4)と M(DZNep)の間で有意な差はみられなかった。また、未分化マーカーである *octamer-binding transcription factor 4*（*oct4*）や *sex determining region Y-box 2*（*sox2*）の発現は ESC で高く、Mo では ESC に比べ発現が低く、M(IL-4)および M(DZNep)では共に発現がみられなかった(図 9)。

これらの結果から、M(DZNep)が PD-L1、IL-10 および TGF-βなどの抑制因子の発現により抑制能を発揮している可能性が示唆された。

図9

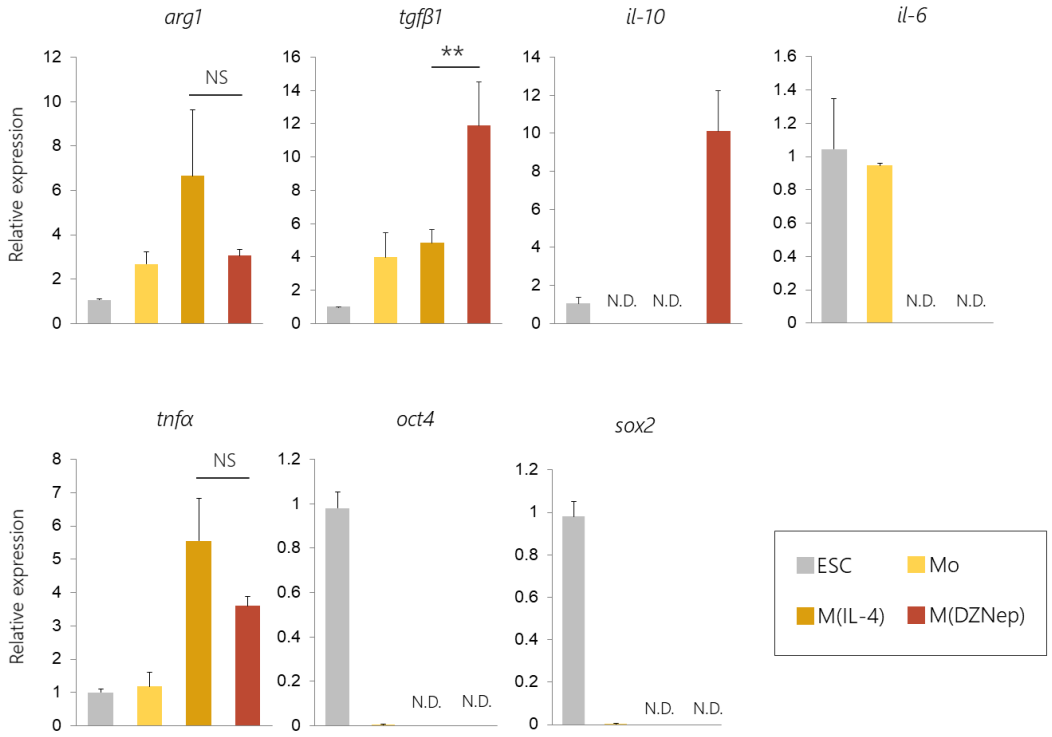


図9 M(IL-4)およびM(DZNep)の遺伝子発現解析
RT-qPCRでCMESC、分化誘導後20日目の単球様細胞（Mo）、M(IL-4)およびM(DZNep)の遺伝子発現を解析した。それぞれの遺伝子発現は*β-actin*で標準化し、mean±SDで示した。ESC=1, ***P* <0.01, NS: not significant, N.D.: not detected.

CMESCs 由来免疫抑制性細胞の抑制機能解析

M(DZNep)が PD-L1 や IL-10、TGF-βを発現していることが判明し、免疫制御能を有していることが示唆された。そのため、実際にコモンマーモセットの細胞に対しても M(DZNep)の抑制能が発揮されるか検討した。遺伝的背景が異なるアロジェニックなコモンマーモセットの PBMCs の一方を Responder とし、もう一方を Stimulator として 35Gy 放射線照射で増殖停止処理して共培養した。そこに M(IL-4)および M(DZNep)を加え、^{3}H 標識チミジンの取り込みで免疫抑制能を評価した（図 10A）。単一の PBMCs のみの培養では Responder の増殖はみられないが、アロジェニックなコモンマーモセットの PBMCs 同士を共培養すると Responder の増殖がみられた（図 10B）。この培養系に M(IL-4)を加えたところ、Responder の増殖は抑制されないため、M(IL-4)は抑制能を有してい

ないことが示唆された。しかしながら、M(DZNep)を加えた場合、PBMCs 同士の培養や M(IL-4)を加えた培養より有意に細胞の増殖が抑えられた（図 10B)。以上のことより、M(DZNep)はコモンマーモセットの細胞に対しても免疫制御能を発揮することが示唆された。

図10

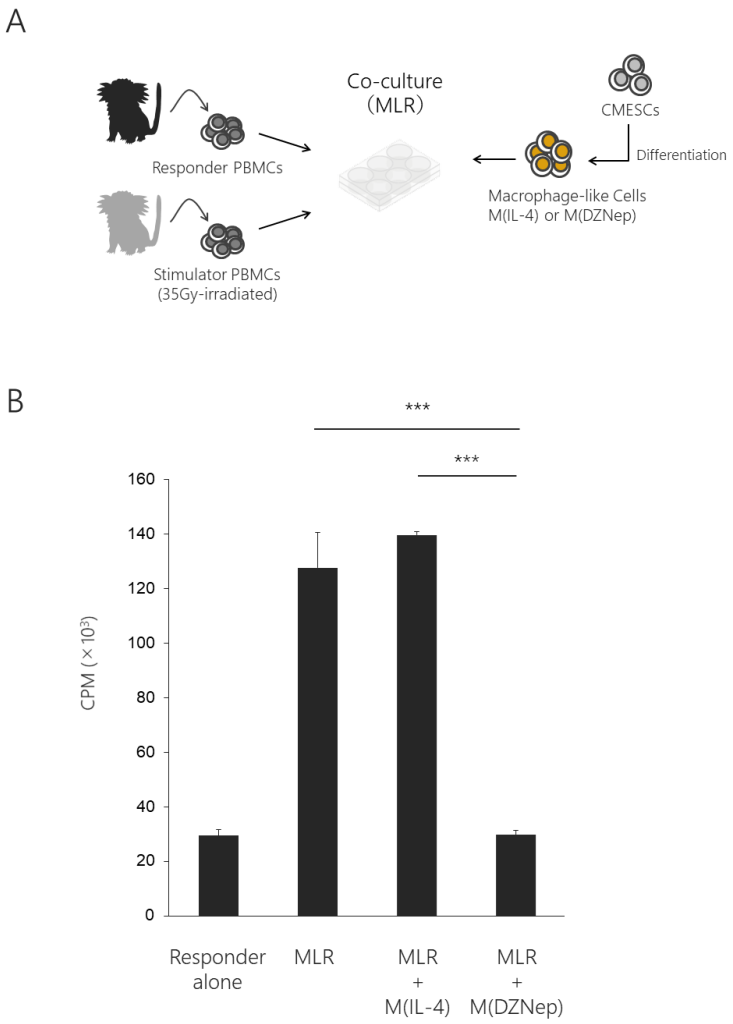


図10 CMESCs由来免疫抑制性マクロファージによる活性化PBMCsの抑制能解析
（A）本実験の概略図。（B）遺伝的背景が異なるコモンマーモセットのPBMCsを共培養し、そこにM(IL-4)あるいはM(DZNep)を加えた。グラフはmean±SDで示した。
CPM: count per minutes, ***P<0.001.

考察

2014 年、PSC を用いた再生医療に大きな進展があった。iPSC より誘導した網膜色素上皮細胞を、加齢黄斑変性症の女性に移植する臨床試験が行われた（Nature doi : 10.1038/nature.2014.15915 ）(Mandai et al., 2017)。これは患者本人から作製された iPSC を使用しており、更には、未分化な細胞を除去してから移植しているため免疫学的な拒絶反応が生じる可能性は低い(Araki et al., 2013; Morizane et al., 2013)。また、網膜色素上皮細胞以外の組織・細胞でも臨床試験の段階では患者本人より作製された iPSC を使用することが想定されている。しかしながら、より多くの患者に iPSC を用いた再生医療を適用する際には、それぞれの細胞の安全性や品質のチェックに膨大な費用と時間を要することから、他人由来の iPSC を使用することが想定されている(Nakatsuji et al., 2008)。実際に、まだ学術論文としての発表は無いものの、2017 年に他人由来の iPSC を用いた網膜色素上皮細胞移植が 60 歳代の男性を対象に行われた（http://www.riken.jp/pr/topics/2017/20170328_2/）。このような他人由来の PSC を用いた場合、拒絶反応が問題になることが予想されるが、PSC 由来の移植片に対する免疫制御、抑制の検討がされた研究は少ないのが現状である。移植片移植後早期の拒絶反応は T 細胞が強く関与しており、本研究でコモンマーモセットの ESC より誘導した M(DZNep)はアロリアクティブ T 細胞の増殖を抑制する活性を有していた。また、アロジェニック PBMCs の増殖を抑制することにも成功した。

コモンマーモセットの PSC からの血球誘導報告は Kurita らが報告した論文が最初である(Kurita et al., 2006)。Kurita らは Tal1/Scl を ESC に導入することで、コモンマーモセットの ESC から初めて血球系の分化誘導に成功した。今回、我々は遺伝子導入を伴わずに血球、とくにミエロイド系の細胞の分化誘導に成功した（図 2)。Kurita らと我々の間には ESC の維持方法に差異がある。Kurita らは ESC の維持・培養に Basic fibroblast grows factor (bFGF) を使用しており、一方で我々は LIF を使用している。LIF で多能性を維持し自己複製する PSC はマウスなど齧歯類に代表されるナイーブ型幹細胞の特徴であり、bFGF で多能性を維持し自己複製する PSC はヒトなどの霊長類に代表されるプライム型幹細胞の特徴の 1 つである(Tesar et al., 2007)。ナイーブ型とプライム型の間には、エピゲノムのメチル化の差やそれによる分化バイアスなど様々な差があることが知られている(Nichols and Smith, 2009)。霊長類であるコモンマーモセットの

PSC はプライム型に分類されるが、bFGF で培養している Kurita らに比べ、LIF で維持・培養している我々の ESC の状態がナイーブ型に近く、少なくとも血球系への分化誘導には適していた可能性が示唆される。このことが、本研究のでコモンマーモセットの ESC から、遺伝子導入を用いずに血球系への分化誘導に成功した要因であることが考えられる。最近、同グループが PI3K の阻害剤を使用することで、CMESCs から遺伝子導入を用いずに血球系へと分化誘導に成功したという報告がなされた(Nii et al., 2015)。これらの知見を組み合わせることにより、さらに効率的なコモンマーモセットの PSC から血球系への分化誘導が可能となることが期待される。

今回確立した誘導プロトコルはウシ胎仔血清を使用している。しかしながら、患者に誘導された細胞を移植する際にウシ胎仔血清成分が混入するとこは、異常な免疫反応を起こす要因となりうるため、臨床応用時にはウシ胎児血清の使用は回避したい。ヒトの ESC より樹状細胞を誘導した報告では、血清代替品を用いた報告もあるため(Tseng et al., 2009)、本研究で確立した誘導プロトコルにも適用可能かどうか検討が望まれる。また、PSC から血球を誘導する際に Wnt/β カテニンシグナルを促進することで誘導効率が上昇する報告(Sturgeon et al., 2014)や、最適なサイトカイン濃度の検討など、より安価・安全・高効率な誘導プロトコルの開発が今後の研究の課題である。

我々は以前にマウスの PSC より抑制性のマクロファージを誘導し、同様の PSC より誘導した移植片をアロジェニックなマウスに、共に移植した際に生着日数を延長できることを示した(Kudo et al., 2014; Sasaki et al., 2015)。この先行研究で誘導したマクロファージはミエロイド系に誘導した後、IL-4 と LPS で刺激しており、その抑制能は iNOS 依存的である。本研究でも同様にミエロイド系に誘導した後、IL-4 と LPS で刺激したが、抑制能を示すマクロファージ様の細胞は得られなかった (図 5)。IL-4 および LPS 添加によって抑制能を有するマクロファージ様細胞が CMESCs より得られない理由として、LPS への感受性の差が要因として挙げられる。マウスとヒトの間で LPS への感受性に差があること(Amura et al., 1998)、さらにはヒトとコモンマーモセットの間で LPS への感受性が類似していることから(Seehase et al., 2012)、マウスとコモンマーモセット間には LPS の感受性に差があると示唆される。この差によって、マウス PSC と同様の方法、あるいは濃度では、CMESCs から抑制能を有するマクロファージ様細胞を得られなかったと考えられる。そのため、LPS の濃度を調整すること

によりマウス PSC 由来の抑制性マクロファージ様細胞と同様の細胞が、CMESCs からも誘導できるかもしれない。

本研究では、マクロファージ様細胞の抑制性の獲得にエピジェネティックな変化を誘発する低分子化合物 DZNep を使用した（図 6）。DZNep はマクロファージの細胞株を抑制型へ傾けるだけではなく(Jeong et al., 1996)、効率的な iPSC の作製に有用であることが報告されている(Hou et al., 2013)。また、マクロファージの表現型を抑制型へ変化させる低分子化合物としてバルプロ酸ナトリウム（Sodium valproate：VPA）が報告されている(Wu et al., 2012)。VPA はヒストン脱アセチル化酵素インヒビターとして知られており、効率的な iPSC の作製に有用であることが報告されている(Huangfu et al., 2008)。DZNep と VPA は共にリプログラミングへの寄与の報告があり、その機能はユークロマチン化を引き起こし、様々な遺伝子の活性化を促進するものである。これらの報告を考慮すると、本研究で確立した IL-4 と DZNep を共に添加するプロトコルは、IL-4 で誘導される抑制型を特徴づけるクロマチン構造を、DZNep がユークロマチン化を促進することによって、より抑制型の表現型を増強したと考えられる。この推測を検討するためには、M(IL-4)と M(DZNep)の間で差がみられた *Pd-l1* や *il-10*、*tgf-β*のプロモーター領域のヒストンメチル化を検証する必要がある。また、DZNep 以外のユークロマチン化を引き起こすような、VPA などの低分子化合物を添加する分化誘導プロトコルでも同様の現象が再現されるか興味深い。

ここ数年間で、ESC/iPSC を含む再生医療分野の基礎研究は目覚ましい発展を遂げた。さらには、早くもヒトへの応用が行われた例もあり、再生医療分野の研究は基礎研究から臨床研究の舞台へと移り変わっている。このような背景の中で、今まで実験動物として扱われてきた非ヒト霊長類に比べ、前臨床実験動物として様々な有用な形質をもつコモンマーモセットで再生医療分野の研究を行うことは大変有効であろう。本研究で、我々はコモンマーモセットの ESC より免疫抑制能を有するマクロファージ様細胞の誘導に成功した。この抑制性マクロファージ様細胞を、同様の ESC より誘導した移植片と共にアロジェニックなコモンマーモセットに移植した際に、拒絶反応を抑えることができるかが今後の課題である。

第 2 部

免疫寛容誘導に資する多能性幹細胞由来造血幹細胞作製の試み
~細胞周期を指標とした検討~

緒言

これまでに我々は PSC の分化多能性という特長に着目し、移植片を作製する PSC から移植片だけでなく免疫を制御する細胞も作製し、同時に移植するというコンセプト（新時代移植医療における免疫制御）を提唱してきた。まず、マウス ESC(Kudo et al., 2014)およびマウス iPSC(Sasaki et al., 2015)を用いた移植モデルを構築してこのコンセプトの有効性を検証してきた。PSC より抑制性マクロファージを誘導し、投与することで、アロジェニックレシピエントにおける PSC 由来心筋様細胞の生着を延長することに成功した。また、コモンマーモセットの ESC を用い、前臨床研究として上記コンセプトを検証した。コモンマーモセット ES 細胞より、アロジェニック刺激による PBMCs の増殖を抑制する、免疫抑制性マクロファージの誘導に成功した（第一部)。

上述のように、我々は iPS/ES 細胞由来免疫抑制性マクロファージで移植片の生着延長に成功したが、２つの問題点が残存している。1 つ目は免疫抑制の特異性が低いことである。特異性が低いということは免疫抑制剤の使用と同様に感染症や発がんリスクの増大が懸念される。2 つ目は免疫抑制の有効期間が限定的なことである。以上のことを解決するためには、長期の移植片（抗原）特異的な免疫抑制状態の誘導、つまりは免疫寛容の誘導が必要であると考えた。

免疫寛容とは本来、免疫系の自己組織への非攻撃性を意味する言葉である。他家移植という局面においては、自己に加え他人由来移植片、つまりはアロ抗原への免疫寛容誘導が望まれており、これを実現する試みが様々な戦略で行われている。中でも臨床応用まで進んでいるのが mixed chimerism による免疫寛容誘導である(Kawai et al., 2008)。Mixed chimerism は骨髄移植の手法により、レシピエントの骨髄においてレシピエントとドナーの造血幹細胞（Hematopoietic stem cell: HSC）を生着させることでドナーへの寛容が誘導される現象である。その機序として、レシピエント・ドナー両者の HSC 由来抗原提示細胞が胸腺において、レシピエント・ドナー両者の抗原に高親和性の T 細胞クローンを排除することで、両者に低反応性の T 細胞が末梢に放出されるためと考えられている。この臨床応用まで進んでいる mixed chimerism による免疫寛容は、現時点では最も安定した免疫寛容誘導法であり、再生医療時代の免疫制御においても適応可能と考え、mixed chimerism の誘導に必要な iPSC 由来 HSC の作製を目的として研究を行った。

PSC 由来 HSC の誘導報告の中で、生体への長期生着が認められているものは、遺伝子導入を伴ったもの(Kyba et al., 2002)や、奇形腫を利用したもの(Amabile et al., 2013)があるが、真に臨床応用可能とは言い難いのが現状である。そこで、臨床応用への障壁が低い誘導プロトコルで、生体に長期生着可能な iPSC 由来 HSC を誘導することを目指した。

方法

マウス

C57BL/6（CD45.2）は日本 SLC より購入した。C57BL/6（CD45.1）は当研究室で繁殖したものを使用した。B6.Cg-TG（Fucci S/G_2/M）#492Bis および B6.Cg-TG（Fucci G_1）#639Bis は理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。また、6-12 週齢の雄を使用した。これらの動物は北海道大学動物実験に関する規定に基づいて取り扱った（承認番号：14-0110, 17-0110）。

細胞培養

マウス iPSC は以前に樹立したものを使用した(Wada et al., 2011)。iPS 細胞培地（DMEM（WAKO）に 15% StemSure（WAKO)、0.1 mM 非必須アミノ酸（ナカライテスク)、100 U/ml ペニシリン（ナカライテスク)、100 μg/ml ストレプトマイシン（ナカライテスク)、0.2 mM 2-メルカプトエタノール（ナカライテスク)、組換えヒト LIF（in house）を添加した培地）を使い、MEF 上で 5% CO2 、37℃インキュベーターで維持した。マウス iPSC の継代方法は以下の方法で行った。入っていた培地を除去して 5 ml の PBS で Wash し、トリプシンを 1000 μL 入れ dish 全体に広げ、37℃、5% CO2、4 min でインキュベートした。MEF 培地 5 mL でトリプシンを中和した。培地を吹き付けて単細胞懸濁液化した。40μm のフィルターを通してチューブに回収し、200 g、4℃、5min で遠心した。上清を完全に除去し、必要な細胞数を新しい MEF の上に播き直し、iPS 細胞培地で再び培養した。

OP9/Dll1 および OP9/Dll4 は、第一部で記載した中胚葉誘導培地で単層培養し、使用した。

マウス iPSC 分化誘導

トリプシン処理で単細胞懸濁液にした iPSC を 5×10^5 個/10cm で分化誘導培地（α-MEM（GIBCO）に 15%ウシ胎仔血清（HyClone)、1%メチルセルロース (東京化成工業)、0.1 mM 非必須アミノ酸、100 U/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン、55 μM 2-メルカプトエタノールを添加した培地）に 10 ng/mL の BMP4、5 ng/mL の bFGF を添加して低付着性細胞培養皿（Locus）で 2 日間浮遊培養し、EB を誘導した。2 日目に 3 μM の CHIR99021（Cayman chemical)を直接培養皿に添加した。3 日目に分化誘導培地に 10 ng/mL の VEGF、5 ng/mL の bFGF を添加してさらに 3 日間浮遊培養した。6 日目に EB を回収、

200g、3min、4℃で遠心して大きい EB を集めた。トリプシンで 5min 処理、ピペッティングし、単細胞懸濁液にした。前日に播いておいた OP9/Dll1 の上に 5×10^6 個/10cm の濃度で播き、中胚葉培地に 20 ng/mL の SCF、20 ng/mL の IL-6、20 ng/mL の FMS-like tyrosine kinase 3 ligand（Flt3L）を添加して 3 日間培養した。また、他に使用したサイトカインは以下の通り。10 ng/mL の Thrombopoietin（TPO)、10 ng/mL の Interferon gamma（IFNγ)。全てのサイトカインは Biolegend から購入した。

Fucci-iPSC の作製

既報に従い作製した(Yamanaka et al., 2007)。Day 0 に 6 well plate に 6×10^5 個/well の PLAT-E 細胞を、10% FBS、1% L-グルタミン、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、1% 非必須アミノ酸、1%ピルビン酸、0.1%2ME 含有 DMEM 培地を用いて播種しておく。Day 1 に、OPTI-MEM（Invitogen）100 µL/well に 3 µg/well の pMXs プラスミドベクターDNA（Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)を入れ撹拌し、15 µL/well の Polyethyleneimine を入れ 15 分間室温で静置し、PLAT-E 細胞培養液中に添加した。Day 3 に PLAT-E 細胞の培養液交換を行い、Day 4 にそれぞれの PLAT-E 細胞培養上清を回収し、0.45 µm フィルターを通し、final 10 µg/mL の polybrene（Sigma-Aldrich)を添加した。細切後にコラゲナーゼ処理し増殖させた Fucci（(Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator)）マウス由来 ear tip fibroblast を予め 6 well plate に準備しておき、4 因子（Oct3/4、 Sox2、Klf4、c-Myc）及び感染効率モニター用 GFP のウイルスを含む培養上清を添加し、室温 1 時間 2000 rpm で遠心し、37℃で 4 時間静置した。静置後の培養上清を捨て、再度培養上清を添加し 37℃で一晩培養した。24 時間後に培養上清を除去し、新鮮な 10% FBS 培地と交換した。48 時間後に再び新鮮な 10% FBS 培地と交換した。Day 8 に、6 well plate の放射線照射済み MEF 上に細胞を移し、継代した。Day 25 に ES 様コロニーを iPS 細胞 cell line として pick up し、新たに 24 well plate の MEF 上に移した。培養維持は iPS 細胞培地を用いた。

アルカリフォスファターゼ染色

アルカリフォスファターゼ染色は、Leukocyte Alkaline Phosphatase kit (Sigma-Aldrich)を用いて解析した。

T 細胞 potential 試験および frequency 試験

OP9/Dll1 細胞を、使用の 1 日前に 6 well plate あるいは 96 well plate に播種した。分取した iPS-HSPC を、10 ng/mL の SCF、5 ng/mL の IL-7、5 ng/mL の Flt3L を含む中胚葉培地にそれぞれの細胞数（図に記載）で懸濁し、1 週間培養した。 6 日後に新たな OP9/Dll1 を準備し、 7 日目にこの上に iPS-HSPC を同様の培地で継代した。14 日目にフローサイトメトリーにより解析、あるいは顕微鏡での観察によりコロニーを判断した。全てのサイトカインは Biolegend から購入した。

骨髄移植

レシピエントマウスに C57BL/6（CD45.2)、ドナー骨髄細胞として C57BL/6（CD45.1）マウスを、造血補助用骨髄細胞として C57BL/6（CD45.2）マウスを用いた。骨髄細胞は大腿骨と脛骨から採取した。レシピエントには、骨髄移植当日に 8Gy の全身放射線照射を行い、1×10^6 個のドナー骨髄細胞および 2×10^5 個の造血補助用骨髄細胞を経尾静脈的に投与した。iPS-HSPC 投与群は、$1\sim2\times10^6$ 個の iPS-HSPC および 2×10^5 個の造血補助用骨髄細胞を経尾静脈的に投与した。

Colony forming unit assay

分取した iPS-HSPC を、10 ng/mL の SCF、10 ng/mL の IL-3、20 ng/mL の Erythropoietin、50 ng/mL の TPO のを含む colony forming unit assay 用培地（α-MEM（GIBCO）に 30%ウシ胎仔血清（HyClone)、2%メチルセルロース（東京化成工業)、0.1 mM 非必須アミノ酸、100 U/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン、55 μM 2-メルカプトエタノールを添加した培地）で 3000 個ずつ 3 cm ディッシュに播種した。7 日後にコロニーを 1 つずつ拾い、メイギムザ染色してコロニーの種類を判別した。全てのサイトカインは Biolegend から購入した。

メイギムザ染色

各細胞単層塗抹標本は、サイトスピン（Thermo Fisher Scientific）を用いて作製した。染色は、鑑別用血液染色液 Diff-Quik（シスメックス）を用いて行った。

RT-qPCR

Messenger RNA は PureLink RNA mini kit（Life technologies）を用いて抽出した。抽出した RNA を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix（TOYOBO）を用

いて cDNA 合成した。合成した cDNA を元に KAPA SYBR Fast qPCR Kit（日本ジェネティック）を用いて、以下のプライマーで qPCR を行った。
Sox17: forward 5'- AGAAACTGCAGACCAGAAGCTATCA -3', reverse 5'- GCTCATTGTATCCATGAGGTGACA -3'
Gapdh: forward 5'- CAATGTGTCCGTCGTGGATCT -3', reverse 5'- GTCCTCAGTGTAGCCCAAGATG-3'

フローサイトメトリーおよび抗体

フローサイトメトリーは FC500（Beckman Coulter）、BD FSCSCanto 2 あるいは BD FACSAria 2（Becton dickinson）で行い、解析は FlowJo ソフトウェア（Tree Star）を使用した。解析の際にはプロピジウムイオジドの取り込み、および Forward、Side Scatter で生細胞および死細胞を選択した。蛍光色素結合モノクローナル抗体およびアイソタイプコントロール抗体は以下のものを使用した。Anti-mouse CD45 (Ly-5)、 anti-mouse CD34 (HM34)、anti-mouse Sca1 (D7)、anti-mouse cKit (2B8)、 anti-mouse/human SSEA1 (MC480)、 anti-mouse Flk1 (89B3A5)、 anti-mouse Cxcr4 (L276F12)、anti-mouse CD41 (MWReg30)、anti-mouse CD45.1 (A20)、anti-mouse CD45.2 (104)、anti-mouse Fas ()、anti-mouse F4/80 (BM8)、anti-mouse CD3ε(145-2C11)、anti-mouse CD4 (GK1.5)、anti-mouse CD8α (53-6.7)、mouse IgG1 κ isotype control、mouse IgG2a isotype control、rat IgG2b isotype control、rat IgG2b κ isotype control、armenian Hamster IgG isotype control。これらの抗体は Biolegend か Becton dickinson から購入した。

統計解析

統計学的有意性は以下の方法にて検討した。比較対象が 2 群の場合 unpaired Student t test にて 2 群間の平均値の差の検定を実施した。比較対象が 3 群以上の場合、Tukey Honest Significant Difference test にて多重比較を行った。本研究における有意水準は 5%とし、P 値が 5%を下回る場合に統計学的に有意差ありと判断した。各図内には、$P<0.05$ の場合にアスタリスク（＊）1 つ、$P<0.01$ の場合にアスタリスク（＊＊）2 つ、$P<0.001$ の場合にアスタリスク（＊＊＊）を 3 つ付与し、有意差の認められなかった群間には NS（Not significant）を付与した。

結果

生体に生着可能な HSC の誘導およびマーカーの探索

哺乳類の造血は大きく 2 つに分けることができる。1 つが、マウスでは胎齢 7.5 日の yolk sac から始まるといわれている、赤血球や原始的なマクロファージを作り出す primitive hematopoiesis である。もう 1 方が、胎齢 10.5 日付近に aorta gonad mesonephros で始まる definitive hematopoiesis と呼ばれる造血である(Orkin and Zon, 2008)。この definitive hematopoiesis は後に胎齢 14 日付近での胎児肝臓や成獣の骨髄でも行われ、HSC を生み出す。Definitive hematopoiesis より作られる HSC は成体での血球系を構築し、さらに、放射線照射等の前処置をした他個体に生着可能である(Arora et al., 2014)。この他個体にも生着しうる HSC を細胞表面抗原分子で同定しようという試みが数多く行われている(Medvinsky et al., 2011; Rybtsov et al., 2014)。 そこで、これらの知見を指標にして iPSC から HSC への分化誘導を行った。

まず、我々が以前に作製した C57BL/6（CD45.1）マウス由来 iPSC を用いて HSC への誘導を試みた(Wada et al., 2011)。先行研究を参考に、中胚葉の誘導体である BMP4 や bFGF、血球血管共通前駆細胞を誘導しうる VEGF、HSC の誘導および拡大に重要とされている SCF と Flt3L の添加により血球を誘導した(Irion et al., 2010; Pearson et al., 2015)（図 11A)。誘導された細胞は未分化マーカーである SSEA1 を発現している細胞が少数であり、中胚葉系のマーカーである Flk1 を 8%程の細胞が発現していた（図 11B)。また、造血幹/前駆細胞（Hematopoietic stem/progenitor cell: HSPC）のマーカーである CD34 や汎白血球マーカーであり CD45、HSC のマーカーとして使われる cKit、Sca1 を発現している細胞がみられた。さらに、胎齢 12 日目相当の HSC の細胞表面マーカーである $CD34^{+}CD45^{+/-}cKit^{+}Sca1^{+}$を示す集団を含んでいた（図 11C)。胎齢 12 日目の HSC は生体に生着が可能であると報告されていることから(Arora et al., 2014)、iPSC から分化誘導した細胞をセルソーターを用いて CD34 で分取し、HSPC として放射線照射した C57BL/6（CD45.2）マウスへ移植した。移植から 4 週間後に、レシピエントマウスの末梢血を採取しフローサイトメトリーで解析したところ、iPSC 由来の細胞は検出されなかった（Data not shown)。iPSC より誘導した $CD34^{+}$細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、移植した細胞が骨髄へ homing するのに重要とされている CXCR4 の発現がみられなかった(Peled et al., 1999)（図 11C)。そのため、移植した iPS-

HSPC が骨髄に homing し、生着することができず、レシピエントの血液系を再構築できなかったと考えられる。

図11

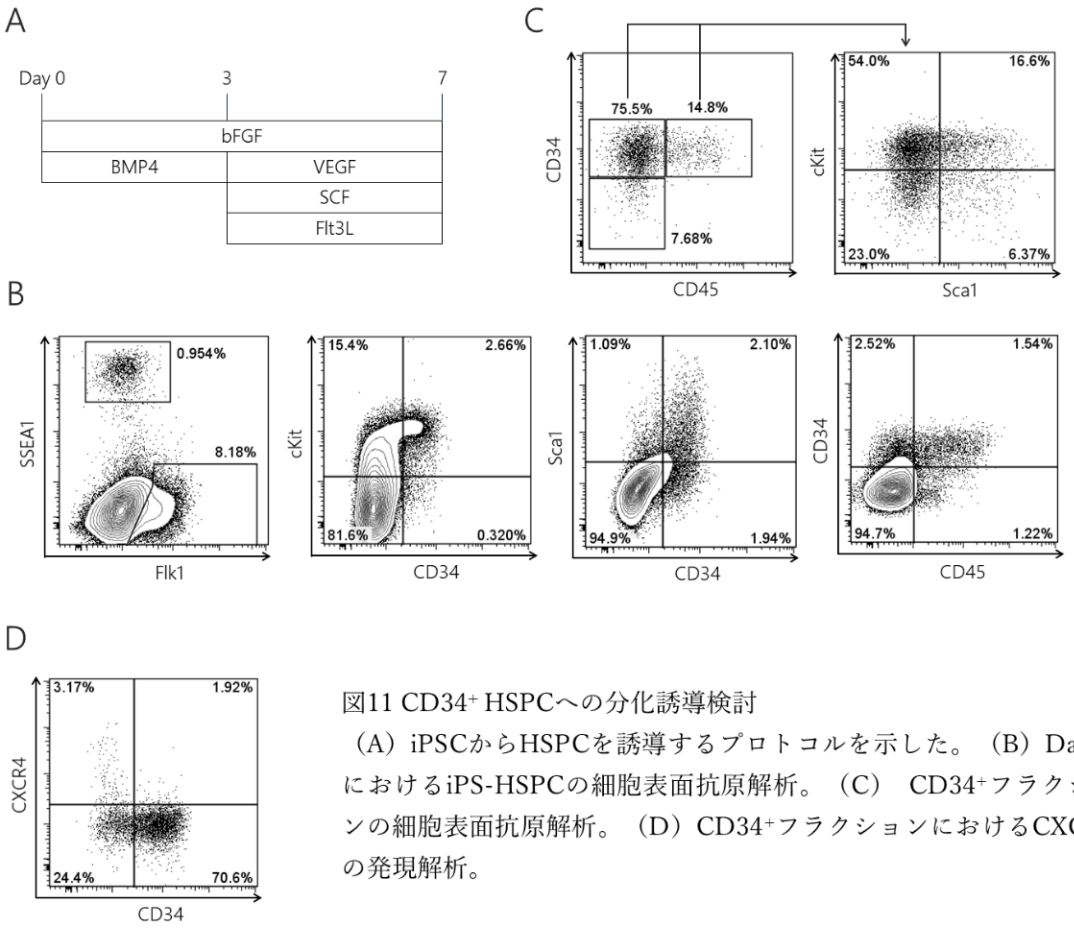


図11 CD34⁺ HSPCへの分化誘導検討
（A）iPSCからHSPCを誘導するプロトコルを示した。（B）Day 7におけるiPS-HSPCの細胞表面抗原解析。（C） CD34⁺フラクションの細胞表面抗原解析。（D）CD34⁺フラクションにおけるCXCR4の発現解析。

CD34 をマーカーとした分化誘導法では生体に生着しうる HSPC を誘導することはできなかったため、次に、より分化の進んだ HSC のマーカーとして使用されている CD45 を採用することとした。そのため、図 11 で使用した誘導プロトコルに比べ 2 日間の誘導期間を追加した。近年、Wnt シグナルにより primitive hematopoiesis と definitive hematopoiesis を制御することができるという報告がなされた(Sturgeon et al., 2014)。この知見を参考に、分化誘導 2 日目に Wnt シグナルのアゴニストである CHIR99021 を添加し、分化誘導効率を

検討した（図 12A）。PSC より分化誘導後 5-6 日目に Flk1 が発現していると definitive hematopoiesis であるという報告があるため(Irion et al., 2010)、フローサイトメトリーでこの誘導プロトコルの効果を検討した。分化誘導後 6 日目に Flk1 の発現を解析したところ、CHIR99021 を添加したプロトコルでは添加していないプロトコルに比べ Flk1 の発現が高いことがわかった（図 12B）。また、definitive hematopoiesis は Sox17 を発現するという報告があるため(Clarke et al., 2013)、RT-qPCR で検討した。その結果、CHIR99021 を添加したプロトコルでは添加していないプロトコルに比べ分化誘導 6 日目において、Sox17 の発現が高いことが示された（図 12C）。また、分化誘導 9 日目においては $CD45^+$細胞の割合や $CD41^+$細胞の割合、$CD45^+$細胞中の $CXCR4^+$の割合などが CHIR99021 を添加したプロトコルでは高かった（図 12D）。これらの結果より、CHIR99021 の添加は、iPSC より HSPC を誘導することに有用であることが示唆された。

図12

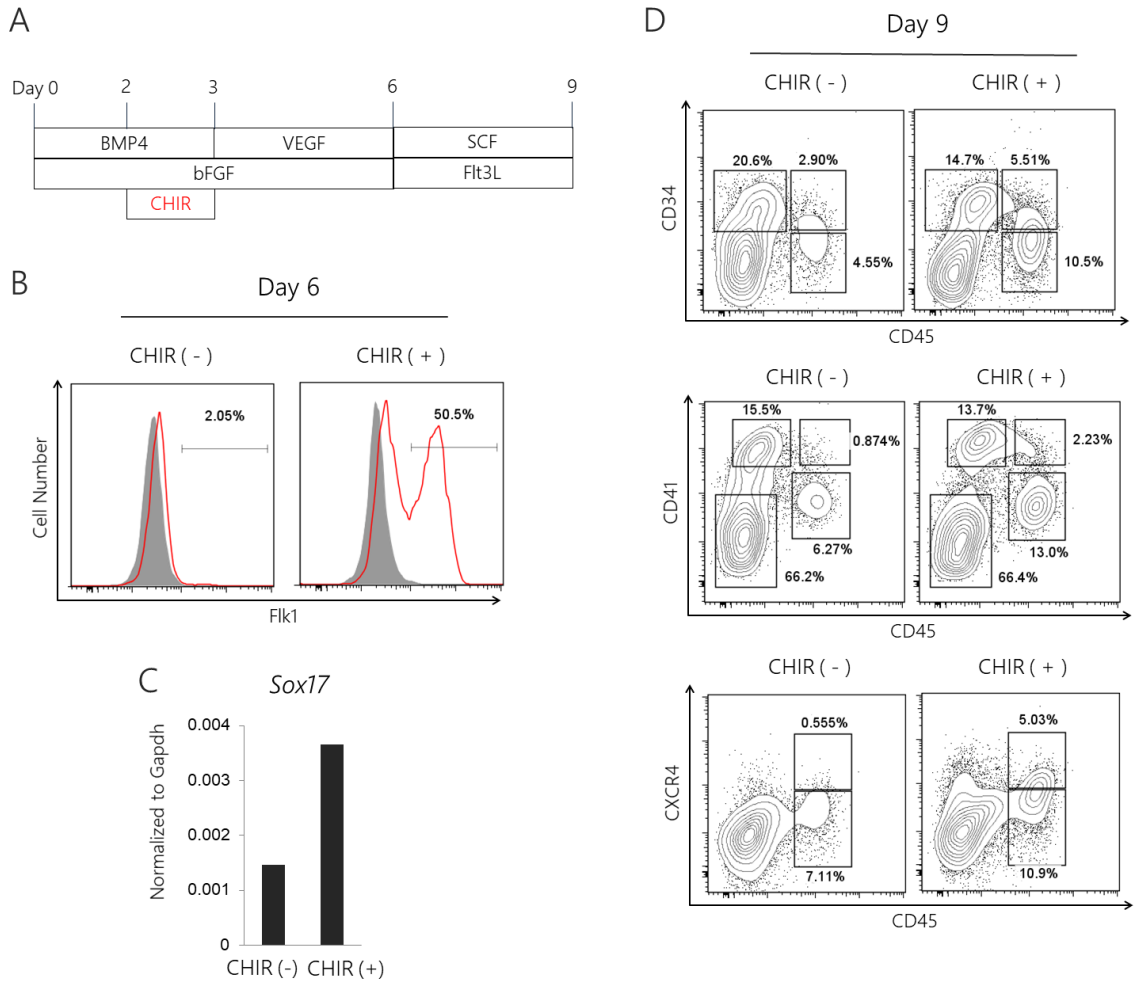


図12 HSPC誘導におけるCHIR99021の効果の検討
（A）iPSCからHSPCを誘導するプロトコルを示した。（B）Day 6におけるiPS-HSPCの細胞表面抗原解析。灰色のヒストグラムがisotype controlを、実線はspecific antibodyを示している。（C）Day 6におけるiPS-HSPCの*Sox17*遺伝子発現解析。（D）Day 9におけるiPS-HSPCの細胞表面抗原解析。

近年、HSC の発生には炎症性のシグナルが重要であるという報告がされている。ゼブラフィッシュやマウスを用いた報告で Hemogenic endothelium から HSC が出現する過程で、IFNαや IFNγ、TNFαシグナルが重要であるという報告である(Espín-Palazón et al., 2014; Kim et al., 2016; Li et al., 2014; Sawamiphak et al., 2014)。そこで、この知見を iPSC から HSPC を誘導するプ

ロトコルに適用できるかを検討した。分化誘導 6 日目から 3 日間、SCF と Flt3L に加えて IFNγを添加した（図 13A）。その結果、HSPC の数や割合に変化は無かったものの、HSC のマーカーである Sca1 の発現上昇が認められた（図 13B）。図 12 の結果と合わせて、CD45 や CXCR4、Sca1 の発現が見られたため、分化誘導した細胞をセルソーターを用いて CD45 で分取し、HSPC として放射線照射した C57BL/6（CD45.2）マウスへ移植した。移植から 4 週間後にレシピエントマウスの末梢血を採取しフローサイトメトリーで解析したところ、コントロールとして C57BL/6（CD45.1）マウスの骨髄を移植したレシピエントマウスではドナー由来の細胞は認められたものの、iPS-HSPC を移植したレシピエントマウスではドナー由来の細胞は検出されなかった（図 13C）。

以前に、IFNγの添加により骨髄の生着効率が低下するという報告がある（Chen et al., 2015）。この報告では、IFNγで処置した骨髄細胞は Fas の発現が上昇することによりレシピエントマウスに生着できなくなると結論している。そのため、IFNγを用いて分化誘導した iPS-HSPC の Fas の発現をフローサイトメトリーで検討した。その結果、IFNγの添加の有無で比較すると、IFNγを添加した細胞では Fas の発現が上昇していることが認められた（図 13D）。IFNγを用いたプロトコルで誘導した iPS-HSPC は Fas の上昇により、レシピエントマウスに生着できなかった可能性が示唆された。

図13

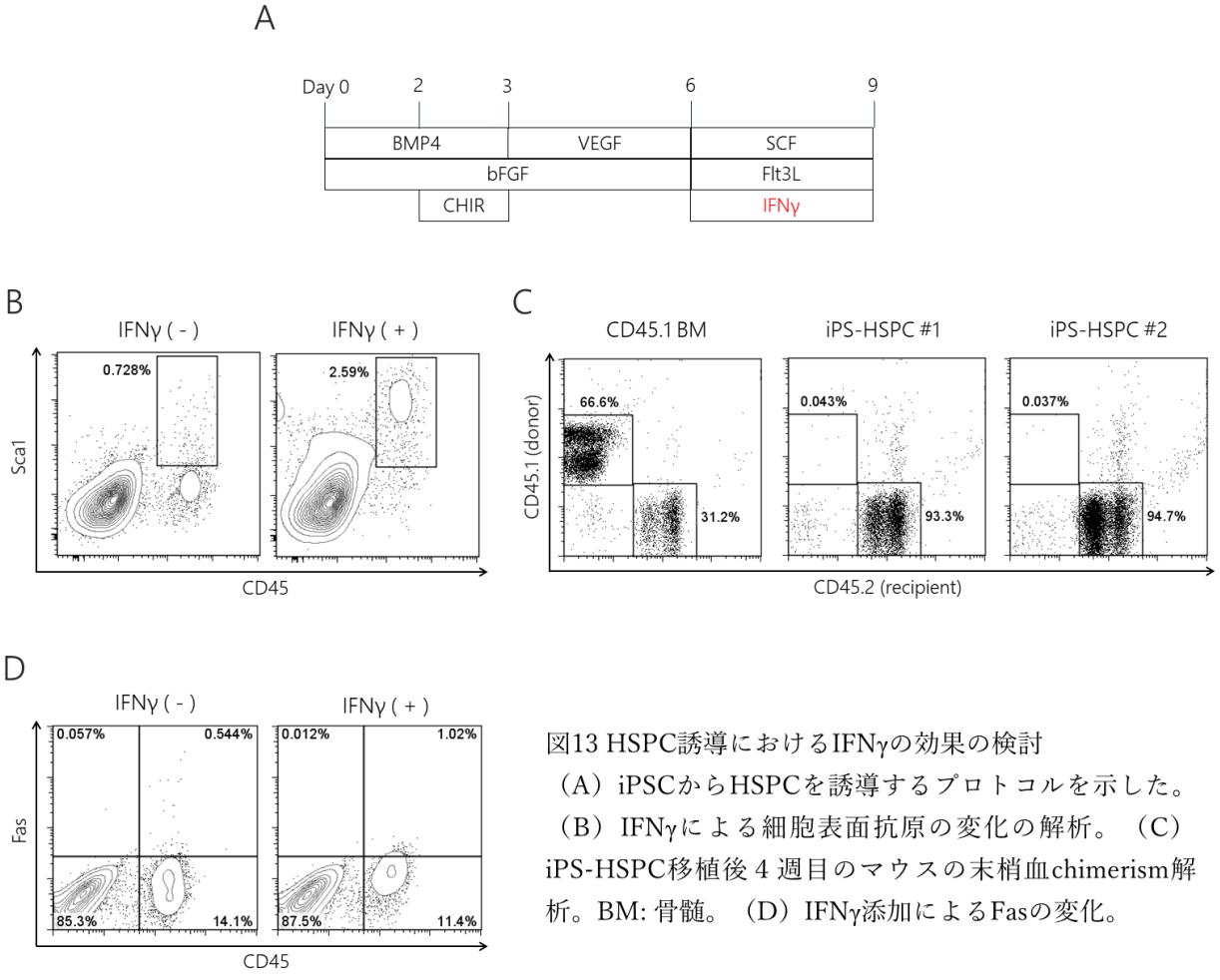


図13 HSPC誘導におけるIFNγの効果の検討
（A）iPSCからHSPCを誘導するプロトコルを示した。（B）IFNγによる細胞表面抗原の変化の解析。（C）iPS-HSPC移植後4週目のマウスの末梢血chimerism解析。BM: 骨髄。（D）IFNγ添加によるFasの変化。

フィーダー細胞を用いた iPS-HSPC の誘導の検討

PSC から血球系の細胞を分化誘導する際には、OP9 と呼ばれるフィーダー細胞を用いることが多い(Schmitt et al., 2004; Wada et al., 2011)。そのため、OP9 を用いた HSPC への分化誘導プロトコルを検討することとした。また、HSC の発生には Notch-Delta のシグナリングが重要であるとされている(Hadland et al., 2015; Solaimani Kartalaei et al., 2015)。そのため、OP9 に Delta-like1 あるいは Delta-like 4 が遺伝子導入されている、OP9/Dll1 および OP9/Dll4 を HSPC 誘導のフィーダー細胞として検討した（図 14A)。分化誘導 6 日目から 3 日間、OP9/Dll1 あるいは OP9/Dll4 を使用して分化誘導したところ、CD45 と cKit で展開した際に、4 つの細胞群に分かれていた（図

14B)。その中でも、CD45 と cKit の両方、あるいは片方を発現している 3 つの細胞群に関して他のマーカーの発現を検討した。$CD45^{-}cKit^{hi}$（赤）の細胞群は、マクロファージマーカーである F4/80 や Fas の発現は無かったものの、CD45 の発現は無く、HSC マーカーである Sca1 の発現はみられないため、未分化あるいは未熟な細胞だと考えられた。$CD45^{+}cKit^{hi}$（青）の細胞群は、F4/80 と Fas を一部の細胞が発現していたものの、Sca1 の発現が認められ、HSPC 用の表現型を示していた。$CD45^{+}cKit^{int}$（緑）の細胞群は、cKit の発現が弱いのに加え、大部分が F4/80 を発現しており、マクロファージ様の細胞であることが示唆される。実際に、$CD45^{+}cKit^{int}$ と $CD45^{+}cKit^{hi}$ の細胞群を分取して 1 日間培養すると、$CD45^{+}cKit^{hi}$ の細胞は浮遊しているのに比べ、$CD45^{+}cKit^{int}$ の細胞はディッシュに付着していた（図 14C)。以上のことをまとめると、OP9/Dll1 あるいは OP9/Dll4 を使用して分化誘導した際に生じる、$CD45^{+}cKit^{hi}$ を示す細胞群が最も HSPC に近いと考えられた。そして、OP9/Dll1 と OP9/Dll4 を比較すると、$CD45^{+}cKit^{hi}$ の細胞群は OP9/Dll1 を使用した誘導プロトコルの方が多かった。さらに、OP9/Dll1 あるいは OP9/Dll4 を使用して分化誘導した iPS-HSPC の分化能を比較すると、OP9/Dll1 の方が、少なくとも T 細胞への potential は高いことが判明した（図 14D)。よって、HSPC の誘導に用いるフィーダー細胞は OP9/Dll1 を採用することとした。

図14

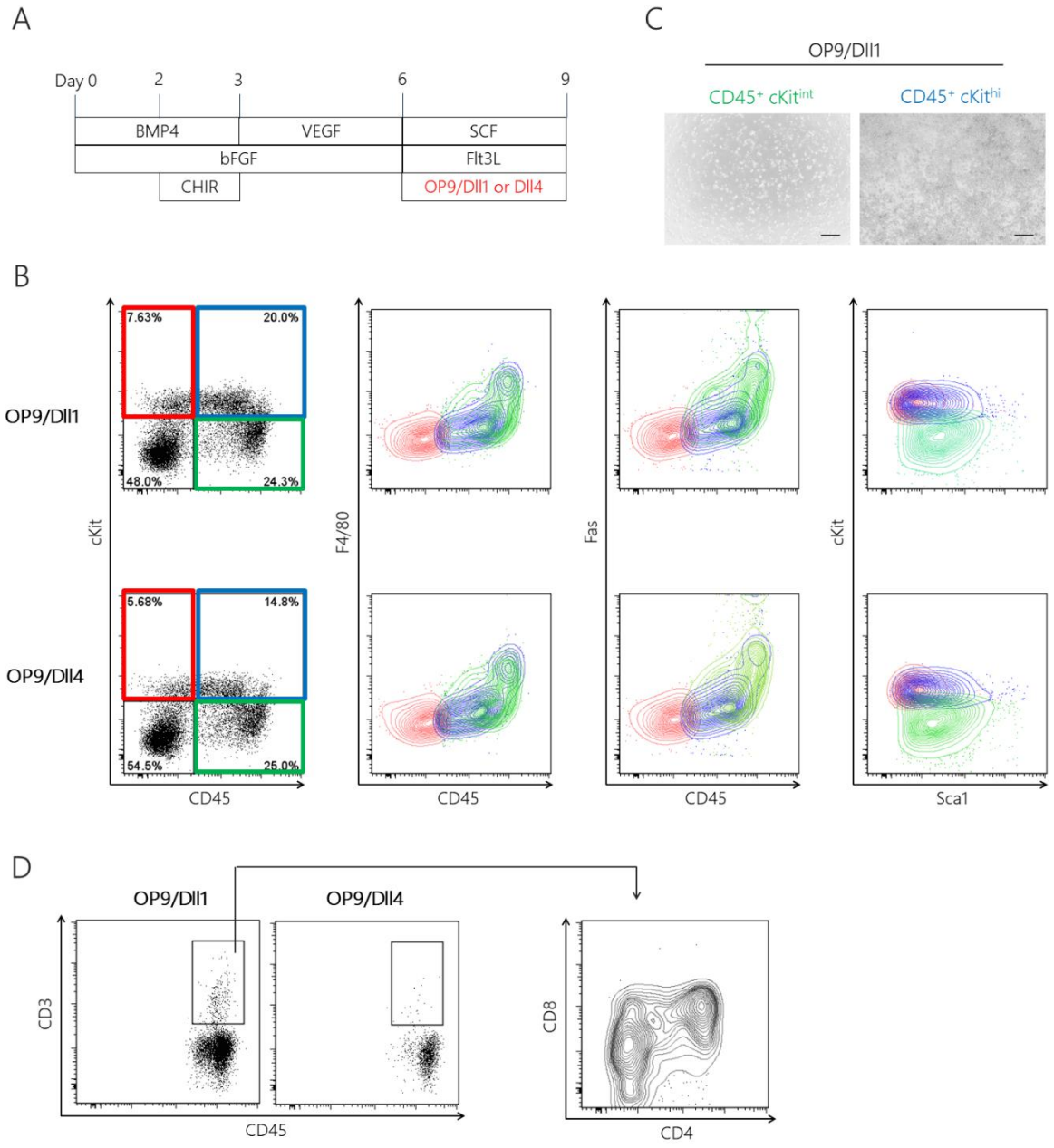


図14 HSPC誘導におけるOP9/Dll1およびOP9/Dll4の効果の検討

（A）iPSCからHSPCを誘導するプロトコルを示した。（B）OP9/Dll1およびOP9/Dll4を使用し、分化誘導したiPS-HSPCの細胞表面抗原解析。（C）OP9/Dll1を使用し分化誘導したiPS-HSPC のCD45^{+} cKit^{int} / CD45^{+} cKit^{hi}フラクションの形態観察。Scale bars: 100 μm.（D）OP9/Dll1またはOP9/Dll4を用いてHSPCを誘導し、それぞれのHSPCでのT細胞potentialを検討した。

iPS-HSPC 誘導における有効なサイトカインの検討

次に、骨髄由来の HSC の拡大培養を目指した報告や PSC から血球系を誘導した報告を参考に、iPS-HSPC 誘導における効果的なサイトカインの検討を行った(Boitano et al., 2010; Ieyasu et al., 2017; Noda et al., 2008)。先行研究を参考に、これまでの分化誘導に使用していた SCF と Flt3L に加え、TPO と IL-6 用いて分化誘導 6 日目からのサイトカインの組み合わせを検討した（図 15A)。SCF-TPO-Flt3L、SCF-TPO-IL6、SCF-Flt3L-IL6 の 3 種の組み合わせで分化誘導を行い誘導効率を検討した。3 種の組み合わせを比較すると、HSPC 様の表現型である $CD45^{+}cKit^{hi}$ が最も誘導できていたのは SCF-Flt3L-IL6 の組み合わせだった（図 15B)。

図15

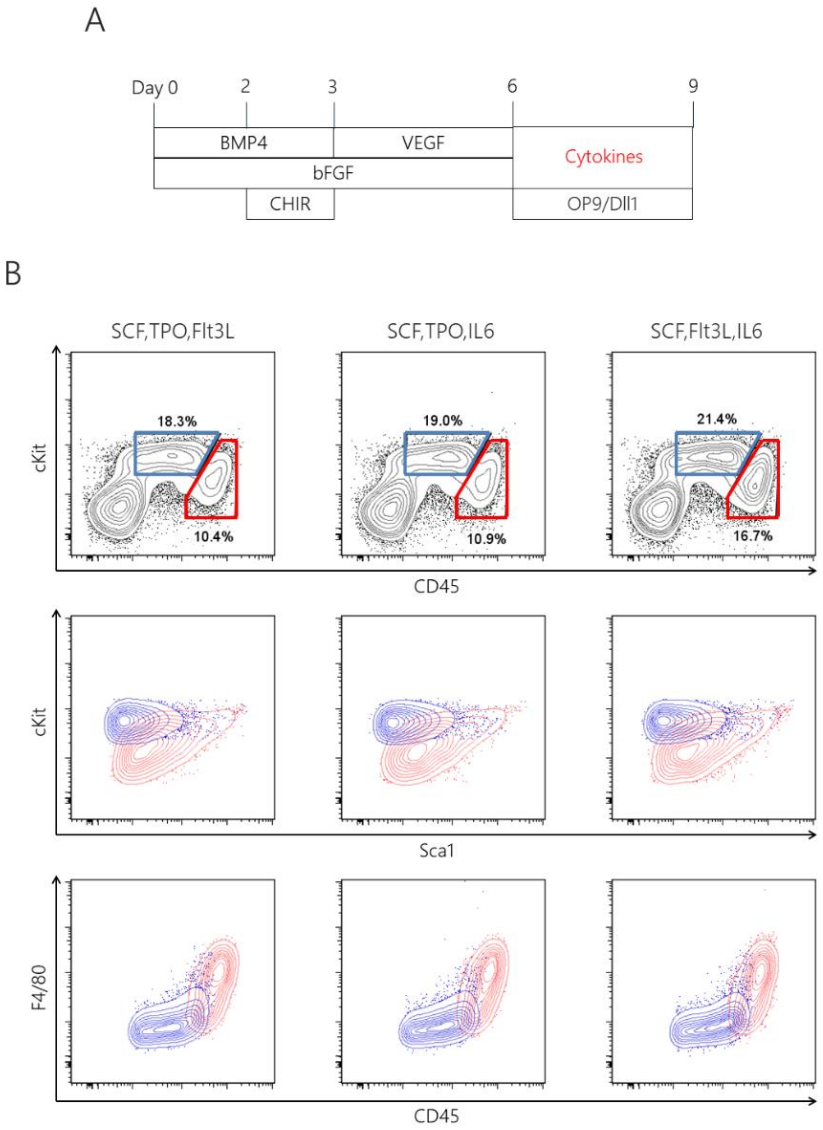


図15 HSPC誘導における各種サイトカインの効果の検討
（A）iPSCからHSPCを誘導するプロトコルを示した。（B）サイトカインの各種組み合わせで分化誘導したiPS-HSPCの細胞表面抗原解析。

iPS-HSPC のコンジェニックマウスへの移植

HSPC への分化誘導プロトコルが確立できたため、実際にマウス生体への移植を試みた。8Gy の全身放射線照射をした C57BL/6（CD45.2）マウスに、セルソーターで分取した iPS-HSPC $CD45^{+}cKit^{hi}$ の細胞群を $1\sim2\times10^{6}$ 個と、造血

補助用の C57BL/6（CD45.2）マウス由来骨髄細胞 2×10^5 個を混ぜ、尾静脈投与した（図 16A）。ポジティブコントロールとして C57BL/6（CD45.1）マウス由来骨髄細胞 2×10^6 個を移植した。移植から 4 週間後にレシピエントマウスの末梢血をフローサイトメトリーで解析したところ、C57BL/6（CD45.1）マウス由来骨髄細胞を移植した群ではドナー由来の細胞が検出された（図 16B）。また、iPS-HSPC を移植した群では僅かではあるがドナー由来の細胞が検出された。しかしながら、iPS-HSPC を移植した群でドナー由来の細胞が検出されたのは 4 匹中 1 匹のみで、末梢血における chimera 率を C57BL/6（CD45.1）マウス由来骨髄細胞群と比較すると、大きな差があった（図 16C）。

図16

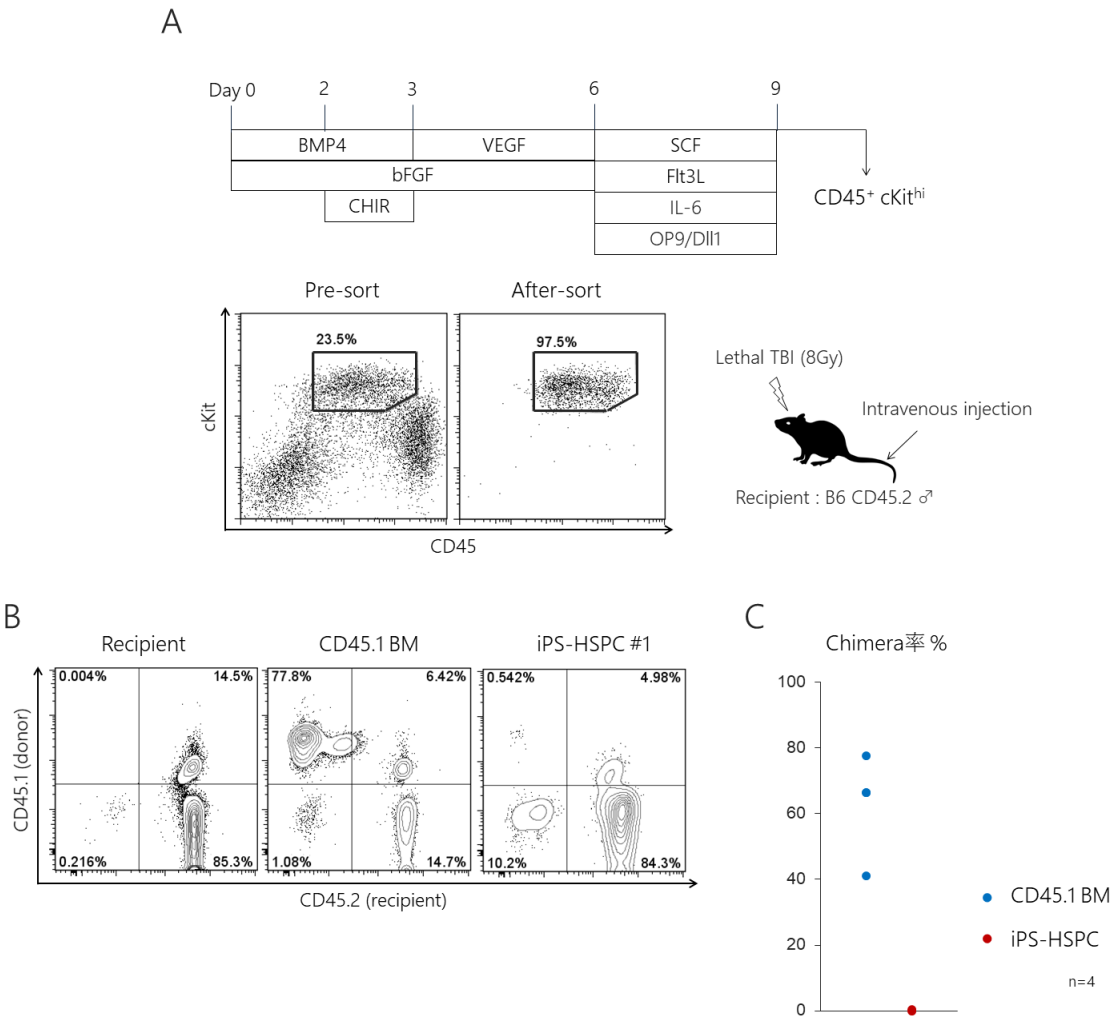


図16 iPS-HSPCのコンジェニックマウスへの移植

（A）iPSCからHSPCを誘導するプロトコルおよびSorting strategyを示した。（B）移植後４週目のレシピエントマウス末梢血の解析。（C）CD45.1 BMあるいはiPS-HSPCを移植されたレシピエントマウスの末梢血chimera率の割合。

iPS-HSPC は cell cycle が亢進している

上述のように、僅かではあるがマウス生体に生着能力を有する HSPC の分化誘導に成功した。しかしながら、生体由来の骨髄細胞と比較するとその生着能力は著しく低かった（図 16C)。この問題点を解決するために、cell cycle に着目した。最近 Yo らは、HSC はその cell cycle の差異により生体への生着能力

に違いがあることを示した(Yo et al., 2015)。この報告では、細胞を非破壊的にcell cycle を可視化する Fucci テクノロジーを用い、より cell cycle が亢進していない HSC 集団において生着能力が高いことを示している。また、これまでの様々な HSC 研究の中で、*in vitro* で HSC の機能を維持したまま拡大培養を目指したものがある(Boitano et al., 2010)。*in vitro* での HSC の培養は、本来の環境下（ニッチ）にない影響や、サイトカインなどの増殖因子の影響から徐々に生体への生着能力を失っていくことが知られている。しかし、その中でもある特定の cell cycle 動態をとる HSC 中に生着能力を残しているものがあることがわかっている(Lambert et al., 2003)。さらに、骨髄から単離してきた HSC を *in vitro* で培養することで cell cycle に差が生じた集団が現れ、その中でも cell cycle が亢進していない集団がより生着能力が高いことが報告されている(Noda et al., 2008)。これらの知見より、*in vitro* での iPSC からの HSPC 分化誘導において、cell cycle を制御することで生着能力の低さを改善できるのではないかと考えた。

まず、iPSC から誘導した HSPC が実際に cell cycle が亢進しているのか検討した。iPS-HSPC と比較としてマウス骨髄から分取してきた $Lineage^{-}$ $Sca1^{+}cKit^{+}$（LSK）の HSC を用いた。PI を使用した cell cycle 動態解析の結果、iPS-HSPC では骨髄の LSK 細胞より S/G2/M 期の細胞の割合が高く、cell cycle が亢進していることが判明した（図 17)。

図17

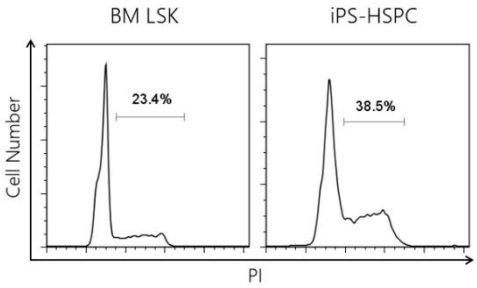


図17 iPS-HSPCのCell cycle動態
BM LSKとiPS-HSPCのcell cycle動態をPIを用いたフローサイトメトリーで解析した。BM: 骨髄、LSK: Lineage$^-$ Sca1$^+$ cKit$^+$。

Fucciマウス由来iPS細胞の作製

iPSC由来のHSPCはcell cycleが生体由来のものと比較して亢進していることが判明した。また、先行研究よりcell cycleが亢進していないHSCの方が長期生着の能力が高いことから(Noda et al., 2008)、cell cycleを指標として、HSPCの分化誘導を行うこととした。cell cycle観察の簡便化のためFucciシステムを用いた。Fucciシステムは細胞周期依存的な蛍光タンパク質の発現により、リアルタイムでcell cycleを可視化するテクノロジーである(Sakaue-sawano et al., 2008)。このFucciシステムが遺伝子導入されたマウスより、iPSCを作製した。Fucciマウスより ear tip fibroblastを作製し（図18A)、レトロウイルスにより山中4 因子（Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc）を遺伝子導入した。遺伝子導入から数日後に、マウス ESC様の形態を示す複数のコロニーが認められた（図18B)。この細胞の未分化性を評価するためにアルカリフォスファターゼ染色を行ったところ 、陽性が検出された（図18B)。また、浮遊培養によりEBを誘導したところ、Fucciの蛍光が認められ、分化してもFucciシステムが有効であることがわかった（図18C)。以上のことより、Fucci-iPSCが樹立されたと考えられた。

図18

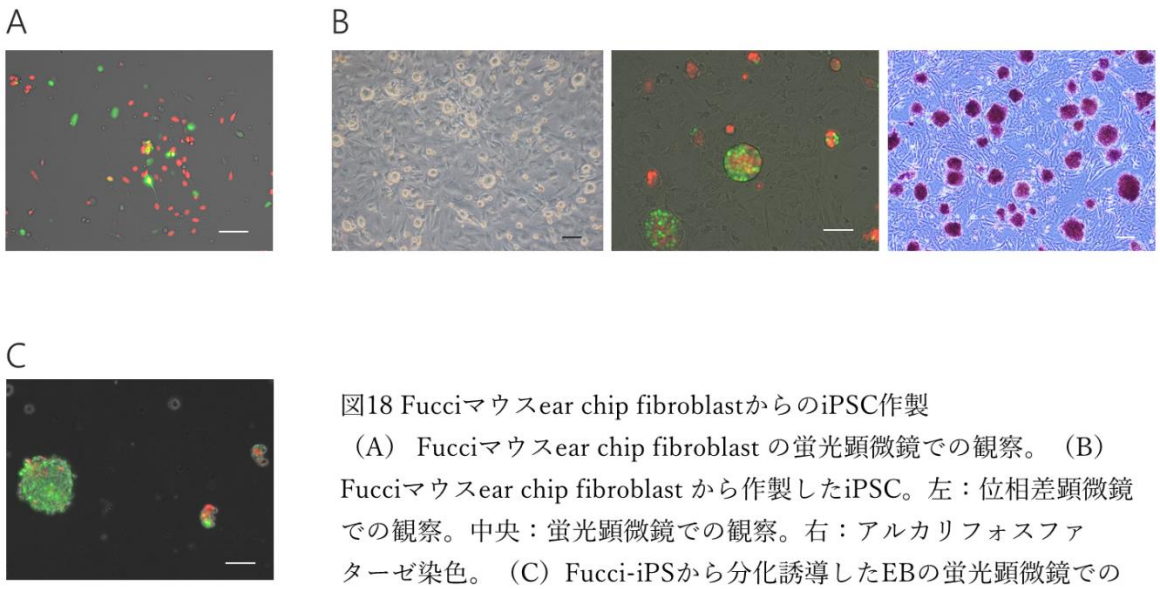


図18 Fucciマウスear chip fibroblastからのiPSC作製
（A） Fucciマウスear chip fibroblast の蛍光顕微鏡での観察。（B）Fucciマウスear chip fibroblast から作製したiPSC。左：位相差顕微鏡での観察。中央：蛍光顕微鏡での観察。右：アルカリフォスファターゼ染色。（C）Fucci-iPSから分化誘導したEBの蛍光顕微鏡での観察。Scale bars: 100 μm。

Fucci-iPSC を用いた HSPC への分化誘導

Fucci-iPSC より HSPC への分化誘導を試みた。これまでに確立したプロトコルで HSPC を誘導し、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原の発現解析を行った（図 19A）。C57BL/6（CD45.1）マウス由来 iPSC と同様に、$CD45^{+}cKit^{hi}$ の細胞群が認められた（図 19B）。この細胞群の cell cycle 動態を Fucci システムによる蛍光で解析したところ、G_0/G_1 期を示す KO（mKusabira-orange）と $S/G_2/M$ 期を示す AG（mAzami-green）の蛍光が共に認められた。また、KO、AG それぞれの細胞群をセルソーターで分取したところ、分取後の Purity check でも同様の cell cycle 動態を示していた。しかし、Fucci の特徴上、本来ならば全ての細胞がどちらかの蛍光を示すはずであるが、どちらの蛍光も示さない細胞が 7 割近くを占めていた（図 19B）。そのため、KO、AG それぞれの細胞群を分取して、マウスに投与できるだけの細胞数を確保することはできなかった。

図19

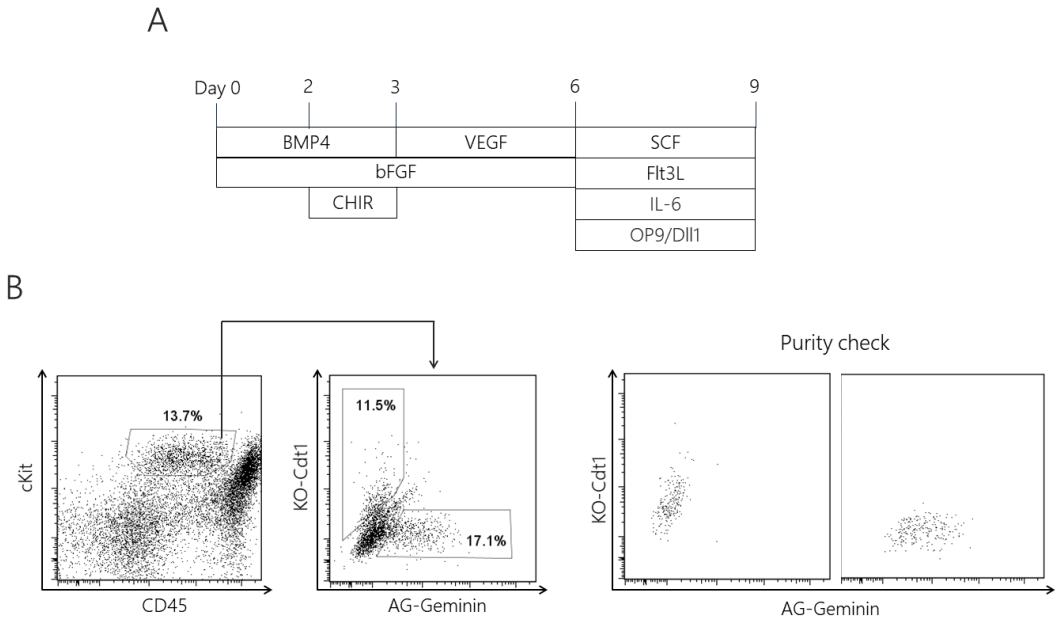


図19 Fucci-iPSCからHSPCへの分化誘導
（A）Fucci-iPSCからHSPCを誘導するプロトコルを示した。（B）Fucci-iPSCから誘導したHSPCをフローサイトメトリーで解析した。

Cell cycle 動態の差異による T 細胞 potential の検討

Fucci-iPS より誘導した HSPC の T 細胞 potential を検討した。Fucci-iPS 由来 HSPC の $CD45^{+}cKit^{hi}$ フラクション内の KO^{+}あるいは AG^{+}の細胞群を分取し、T 細胞への分化を支持するフィーダー細胞上にサイトカインと共に播種した。その結果、T 細胞のマーカーである CD3 の発現が共に認められ、CD4、CD8 の発現もみられた。興味深いことに、AG^{+}の細胞群は KO^{+}の細胞群に比べ、有意差は認められなかったものの T 細胞が作られやすい傾向があった（図 20B）。先行研究において、cell cycle が亢進していない方が HSC としての特徴を有していると報告されていたため、iPS-HSPC も KO^{+}の方が HSC としての特徴を持ち、分化能も高いと予想していた。しかしながら、少なくとも T 細胞への分化能は cell cycle が亢進している AG^{+}の方が高いことがこの結果より判明した。

図20

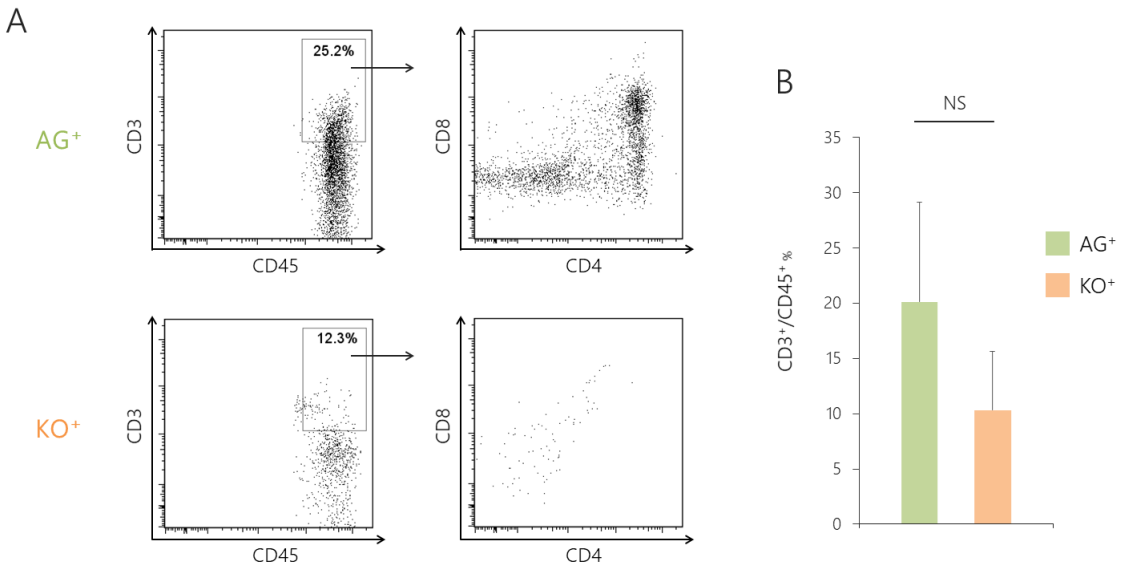


図20 Fucci-iPSC由来HSPCのT細胞potentialの解析
（A）Fucci-iPSC由来HSPCをT細胞へ分化誘導し、フローサイトメトリーで解析した。
（B） Fucci-iPSC由来HSPCをT細胞へ分化誘導した結果を、$CD45^+$細胞中の $CD3^+$の割合で示した。n=3, mean±SD, NS: not significant.

上記結果をより詳細に検討するため、KO^+およびAG^+の T 細胞 frequency 解析を行うことにした。T 細胞 frequency 解析は播種する細胞を limiting dilution することで、その細胞群内に存在する T 細胞 potential を持つ細胞の頻度を推測する手法である(Huang and Auerbach, 1993)。Fucci-iPSC より HSPC を分化誘導し、$CD45^+cKit^{hi}$ フラクション内の KO^+あるいは AG^+の細胞群を分取し、細胞数を振って 96 well plate 上のフィーダー細胞上に播種した。その結果、AG^+の方が少ない細胞数を播種した際にも、T 細胞のコロニーを形成することが認められた（図 21A)。また、それぞれの細胞を 900 個播種した際の T 細胞が形成された割合を比較すると、有意な差が認められ、AG^+の細胞群の方が T 細胞 potential を持つ細胞が存在する頻度が高いことがわかった（図 21B)。

図21

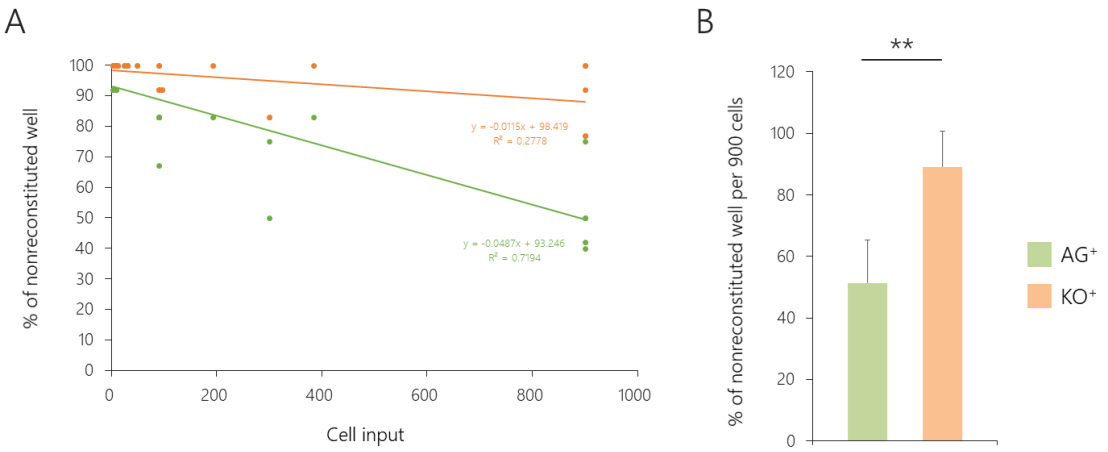


図21 Fucci-iPSC由来HSPCのT細胞frequency解析
（A）Fucci-iPSC由来HSPCをT細胞へ分化誘導し、検出された割合を調べた。
（B）Fucci-iPSC由来HSPCを900個播いた際に、T細胞が生じたwell数を割合で示した。
mean±SD, $^{**}P < 0.01$.

Cell cycle 動態の差異による多分化能の比較

Fucci-iPS より誘導した HSPC の T 細胞 potential が、cell cycle 動態により差異が認められたため、次に、他の血球系列への多分化能を比較した。Fucci-iPS 由来 HSPC の $CD45^{+}cKit^{hi}$ フラクション内の KO^{+}あるいは AG^{+}の細胞群をサイトカインが添加されたメチルセルロース培地上に播種し、colony forming unit assay を行った。コントロールとして、マクロファージ様の表現型を示していた $CD45^{+}cKit^{-}$細胞群を使用した。KO^{+}、AG^{+}共に、CFU-G、CFU-M、CFU-GM、CFU-GEMM のコロニーを形成していた（図 22A）。しかし、KO^{+}と AG^{+}を比較すると、AG^{+}の方が形成したコロニーの数が多く、CFU-GM、CFU-GEMM の複数の系統の細胞種から形成されているコロニー数も多かった（図 22B）。T 細胞 potential と同様に、血球多系列への分化能も KO^{+}と AG^{+}を比較すると、AG^{+}の方が高いことが認められた。

図22

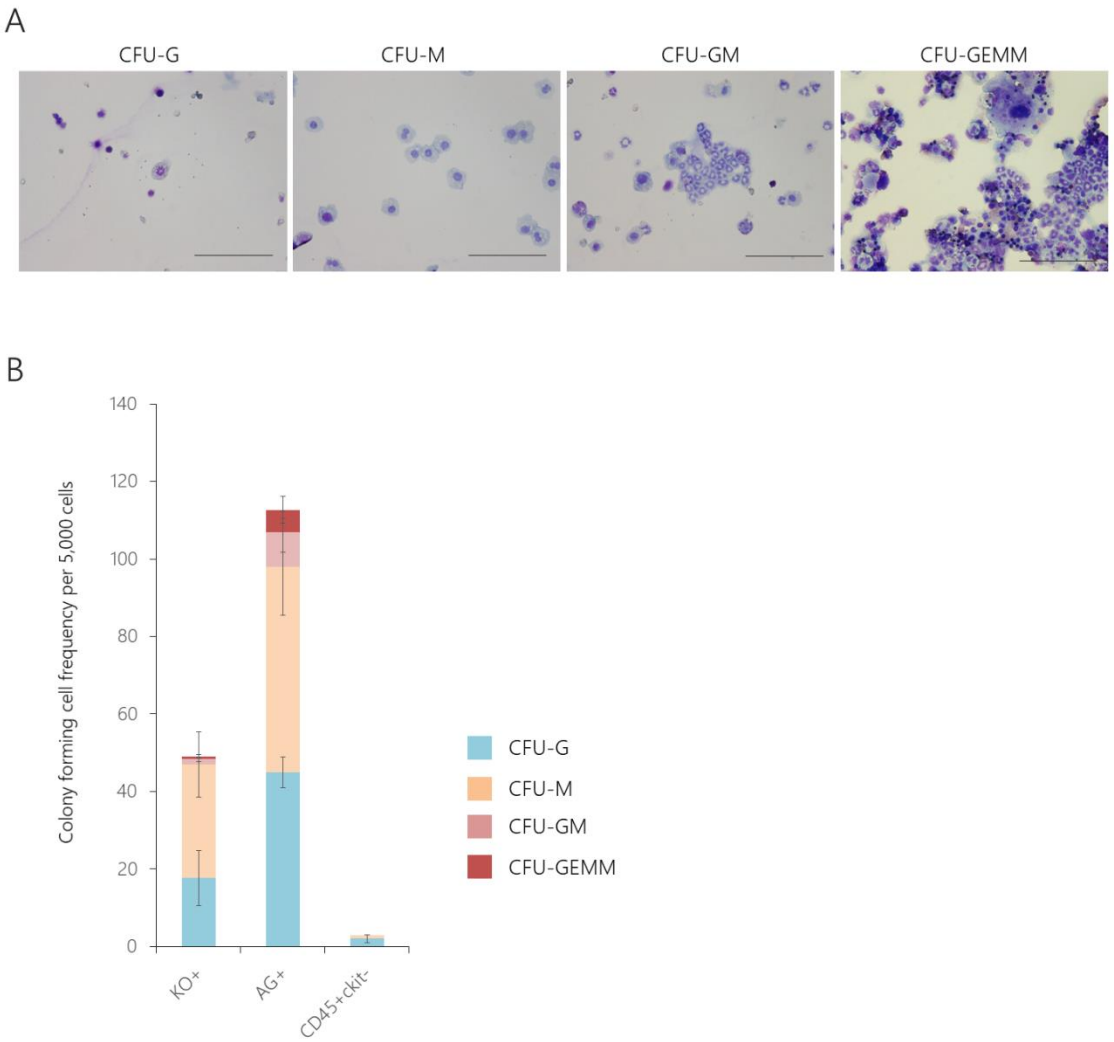


図22 Fucci-iPSC由来HSPCのcolony forming unit assay
（A）1つのcolonyのみを抽出し、メイギムザ染色して観察した。 Scale bars: 100 μm.
（B） colony forming unit assayの結果をヒストグラムで示した。n=3, mean±SD.
CFU-G: colony forming unit granulocyte, CFU-M; colony forming unit macrophage,
CFU-GM: colony forming unit granulocyte-macrophage, CFU-GEMM: colony forming unit granulocyte-macrophage-erythroid-megakaryocyte.

骨髄由来の HSC を使った先行研究においては、cell cycle が亢進していない方が HSC としての特徴を有していると報告されていた。しかしながら、本研究で用いた iPS-HSPC の場合、少なくとも分化能は cell cycle が亢進している AG^+の方が高いことがこれらの結果より判明した。

考察

近未来の医療として考えられていた iPSC を用いた再生医療は着実に現実のものとなってきている。しかしながら、iPSC を用いた再生医療においても拒絶反応が問題となると着目し、これに対する免疫制御戦略を検討している報告は極めて稀である。第 1 部ではコモンマーモセットの ESC から免疫抑制能持つマクロファージ様の細胞を誘導し、アロジェニック刺激を受けた PBMC の増殖を抑制できることを示した。我々が発表したマウスでの先行研究もマクロファージ様の抑制性細胞を使用しているが(Kudo et al., 2014; Sasaki et al., 2015)、マクロファージ様の細胞では免疫制御に関して問題がある。その問題が抑制の特異性と期間であるが、これを解決するために iPSC 由来の HSC を作製する方法を模索した。

胎児肝臓由来 HSC や成獣骨髄由来 HSC のマーカーを指標として分化誘導を行ったが、コンジェニックレシピエントマウスにすら僅かな生着しかしなかった (図 16)。本研究で確立した誘導プロトコルでは、より生着の難しいアロジェニックレシピエントマウスには生着しないと推測され、mixed chimerism による免疫寛容は難しいと考えられる。本研究と同様に PSC から HSC への誘導を目指した報告は複数あるが、生体に生着が認められたものは少ないのが現状である(Vo and Daley, 2015)。マウス PSC では、遺伝子導入を利用した方法と奇形腫を利用して作製する方法で作られた HSC が生体に長期生着したと報告されている(Kyba et al., 2002; Suzuki et al., 2013)。ヒトの PSC では、奇形腫を利用した方法で長期生着が、4 個の遺伝子を導入した方法が短期の生着として報告されている(Amabile et al., 2013; Doulatov et al., 2013)。遺伝子導入を用いた方法は、臨床への応用に障害となりえる上、各血球系列への分化に偏りがでるという弊害もあり、問題が残っている。奇形腫を用いる方法は、異種の生体を利用するため、異種の細胞・タンパク質が混入し、レシピエントに過剰な免疫反応が起こる可能性が危惧される。そのため、本研究では遺伝子導入を利用せず、液性因子やフィーダー細胞のみでの HSC 誘導を目指したが満足のいく結果は得られなかった。最近、ヒト PSC に 7 個の遺伝子を導入して誘導した HSC が、免疫不全マウスに長期で生着したという報告がなされた(Sugimura et al., 2017)。生体に生着可能な HSC の誘導に 7 個の遺伝子が必要なことを考えると、PSC 由来移植片の拒絶対策に mixed chimerism は不適かもしれない。

しかし、mixed chimerism は誘導できなくても、類似した免疫寛容は誘導できるかもしれない。Mixed chimerism による免疫寛容は、そのメカニズムが完全に

解明されている訳ではないが、必ずしも永続的な chimera は必要ないと言われており、制御性 T 細胞が誘導されてくることが重要と報告されている(Hotta et al., 2016)。さらには、リンパ球系の chimera が重要という報告もあり(Thaiss et al., 2018)、HSC を誘導しなくても、これらの細胞を PSC から誘導することで、PSC 由来移植片への免疫寛容の成立が可能となるかもしれない。

本研究では、PSC 由来 HSC の誘導において cell cycle に着目した。生体由来の HSC の cell cycle に関する報告は複数あるが、その中で多いのが *in vitro* で拡大培養した HSC の cell cycle と生着能力に関する報告である(Lambert et al., 2003; Noda et al., 2008)。HSC を拡大培養する際に cell cycle が亢進し、生着能力が低くなるという報告である。HSC はその stemness の維持に dormant や quiescent が重要であると報告されているため、拡大培養時に様々な増殖因子の添加により cell cycle が亢進することが原因だと考えられる(Tesio et al., 2015)。PSC から HSC の誘導でも、培地に添加した血清やサプリメント、サイトカインにより cell cycle が亢進し、生着能力が低下しているのだと推測した。そのため、Fucci-iPSC を作製し検討したが、移植に必要な細胞数を確保できなかったため断念した。しかしながら、推測どおり $S/G_2/M$ 期である AG^+ の割合は多く(図 19)、先行研究では cell cycle が亢進していない HSC の方が長期生着の能力が高いと報告しているため、この部分を調節すれば生着能力が上昇する可能性はある。そのため、cell cycle の進行抑制を引き起こす因子の添加が考えられる。HSC の cell cycle の進行を抑制・遅延するシグナルとして、p38MAPK pathway や Tgfβ signal などが知られている(Tesio et al., 2015)。そのため、低分子化合物やサイトカインの添加でこれらの signal を活性化し、cell cycle の進行抑制を試みる方法が考えられる。他にも、一般的に cell cycle の進行を抑制する因子として知られる血清飢餓(Resnitzky et al., 1994)や DMSO の添加(Sawai et al., 1990)も候補となりえる。

生体由来の HSC の cell cycle に関する報告はいくつかあるが、PSC 由来 HSC の cell cycle に着目した論文は無い。PSC 由来 HSC の cell cycle の制御により、遺伝子導入を用いずに、生体に生着可能な HSC の作製が可能となるかもしれない。

Fucci-iPSC から誘導した HSPC で、その cell cycle 動態の差異で血球分化能に差が認められた(図 20, 21, 22)。G_0/G_1 期である KO^+ に比べ、$S/G_2/M$ 期に位置している AG^+ の方が、T 細胞への分化能および、ミエロイド系列への分化能

をみる colony forming unit assay でのコロニー形成数や多分化コロニーの数が多かった。一般的に幹細胞ほど多分化能が高いこと、そして、HSC は cell cycle が亢進していないほうが幹細胞としての特徴を有していることから(Yo et al., 2015)、KO^{+}の方が多分化能が高いと推測していたが、異なる結果となった。

Cell cycle と血球分化に関する報告は少ない。B 細胞とマクロファージに関する報告や(Kueh et al., 2013)、T 細胞のエフェクター・メモリーに関する報告(Kinjyo et al., 2015)はあるものの、PSC 由来細胞での血球分化と cell cycle に関する報告は無い。ESC から三胚葉への分化における cell cycle を指標とした報告のように(Pauklin and Vallier, 2014)、本研究の知見を発展させることで、より効率的な PSC 由来血球細胞の作製が可能となるかもしれない。

ここ数年間で、ESC/iPSC を含む再生医療分野の基礎研究は目覚ましい発展を遂げ、臨床への応用も日々行われている。現行の臓器移植の様に、免疫寛容が求められる日が来ることも考えられる。本研究では、PSC 由来移植片に対する免疫寛容の誘導はできなかったが、将来の需要を見据え、免疫寛容を目指すことは重要であろう。また、本研究で得られた cell cycle と PSC 由来 HSPC の血球分化に関する知見は、PSC 由来移植片に対する免疫制御だけではなく、PSC 由来血液製剤の開発や様々な血液疾患への応用に繋がることが期待される。

結論

本研究全体から得られた新知見

- コモンマーモセットの ESC から免疫抑制性のマクロファージを分化誘導した。また、この細胞により、アロジェニック刺激を受けた PBMCs の増殖抑制に成功した。
- マウス iPS 由来 HSPC に IFNγを添加することで HSC マーカーである Sca1 が上昇することを発見した。
- マウス iPS 由来 HSPC が cell cycle 動態により、T 細胞への分化能に差異があることを発見した。
- マウス iPS 由来 HSPC が cell cycle 動態により、各種ミエロイド系列への多分化能に差異があることを発見した。

新知見の意義

コモンマーモセットの PSC から免疫抑制性マクロファージを分化誘導できるようになったことにより、PSC を用いた再生医療における、細胞移植による免疫制御法の研究が非ヒト霊長類モデルで検討できるようになった。

PSC 由来 HSPC の cell cycle 動態により分化能に差異が生まれることを発見したことにより、より効率的な PSC 由来血球系細胞の産生に繋がる可能性がある。

新知見から今後どのような研究が展開されうるか

コモンマーモセットの生体を用いて、PSC 由来移植片を使用した免疫制御の検討が展開されうる。

臨床応用が進んでいる iPSC 由来血小板や iPSC 由来 T 細胞製剤の cell cycle を指標にした、より効率的な産生の検討が展開されうる。

今後の課題

DZNep の添加によりなぜ種々の抑制因子が発現・産生されるようになるのか解明する必要がある。また、ヒト PSC からも同様の誘導プロトコルで免疫抑制性マクロファージが産生可能か検討する必要がある。

なぜ、cell cycle 動態により分化能に差異が生まれるのか、機序の検討が望まれる。また、ヒト PSC でも同様の現象が見られるのか検証する必要がある。

謝辞

本研究の一部は、独立行政法人日本学術振興会特別研究員奨励費（課題番号：16J02565）の助成を受けたものである。

本研究の遂行にあたり、機会を与えて下さいました北海道大学遺伝子病制御研究所病態研究部門免疫生物分野 清野研一郎教授に深甚なる謝意を申し上げます。また、様々な多大なるご指導を頂きました同所属 和田はるか講師およびムハンマド・バグダーディー講師に深く御礼を申し上げます。また、ご協力を頂きました実験動物中央研究所 佐々木えりか・井上貴史両博士、および北海道大学遺伝子病制御研究所病態研究部門免疫生物分野の皆様に感謝いたします。

利益相反

この研究内容に関する利益相反事項はありません。

引用文献

Abbott, D.H., Barnett, D.K., Colman, R.J., Yamamoto, M.E., and Schultz-Darken, N.J. (2003). Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. Comp. Med. *53*, 339–350.

Amabile, G., Welner, R.S., Nombela-Arrieta, C., D'Alise, A.M., Di Ruscio, A., Ebralidze, A.K., Kraytsberg, Y., Ye, M., Kocher, O., Neuberg, D.S., et al. (2013). In vivo generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells. Blood *121*, 1255–1264.

Amura, C.R., Kamei, T., Ito, N., Soares, M.J., and Morrison, D.C. (1998). Differential regulation of lipopolysaccharide (LPS) activation pathways in mouse macrophages by LPS-binding proteins. J. Immunol. *161*, 2552–2560.

Ando, K., Maeda, J., Inaji, M., Okauchi, T., Obayashi, S., Higuchi, M., Suhara, T., and Tanioka, Y. (2008). Neurobehavioral protection by single dose l-deprenyl against MPTP-induced parkinsonism in common marmosets. Psychopharmacology (Berl). *195*, 509–516.

Araki, R., Uda, M., Hoki, Y., Sunayama, M., Nakamura, M., Ando, S., Sugiura, M., Ideno, H., Shimada, A., Nifuji, A., et al. (2013). Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. Nature *494*, 100–104.

Arora, N., Wenzel, P.L., McKinney-Freeman, S.L., Ross, S.J., Kim, P.G., Chou, S.S., Yoshimoto, M., Yoder, M.C., and Daley, G.Q. (2014). Effect of developmental stage of HSC and recipient on transplant outcomes. Dev. Cell *29*, 621–628.

Bashuda, H., Kimikawa, M., Seino, K., Kato, Y., Ono, F., Shimizu, A., Yagita, H., Teraoka, S., and Okumura, K. (2005). Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates. J. Clin. Invest. *115*, 1896–1902.

Boitano, A.E., Wang, J., Romeo, R., Bouchez, L.C., Parker, A.E., Sutton, S.E., Walker, J.R., Flaveny, C.A., Perdew, G.H., Denison, M.S., et al. (2010). Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonists Promote the Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells. Science *329*, 1345–1348.

Burridge, P.W., Keller, G., Gold, J.D., and Wu, J.C. (2012). Production of de novo cardiomyocytes: Human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. Cell Stem Cell *10*, 16–28.

Chen, U. (2014). Do We Have a Workable Clinical Protocol for Differentiating Lympho-Hematopoietic Stem Cells from the Source of Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells in Culture? Scand. J. Immunol. *80*, 247–249.

Chen, J., Feng, X., Desierto, M.J., Keyvanfar, K., and Young, N.S. (2015). Regular Article IFN- g -mediated hematopoietic cell destruction in murine models of immune-mediated bone marrow failure. Blood *126*, 40–43.

Clarke, R.L., Yzaguirre, A.D., Yashiro-Ohtani, Y., Bondue, A., Blanpain, C., Pear, W.S., Speck, N.A., and Keller, G. (2013). The expression of Sox17 identifies and regulates haemogenic endothelium. Nat. Cell Biol. *15*, 502–510.

Cyranoski, D. (2012). Stem-cell pioneer banks on future therapies. Nature *488*, 139.

Doi, D., Samata, B., Katsukawa, M., Kikuchi, T., Morizane, A., Ono, Y., Sekiguchi, K., Nakagawa, M., Parmar, M., and Takahashi, J. (2014). Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. Stem Cell Reports *2*, 337–350.

Doulatov, S., Vo, L.T., Chou, S.S., Kim, P.G., Arora, N., Li, H., Hadland, B.K., Bernstein, I.D., Collins, J.J., Zon, L.I., et al. (2013). Induction of Multipotential Hematopoietic Progenitors from Human Pluripotent Stem Cells via Respecification of Lineage-Restricted Precursors. Cell Stem Cell *13*, 459–470.

Espín-Palazón, R., Stachura, D.L., Campbell, C.A., García-Moreno, D., Del Cid, N., Kim, A.D., Candel, S., Meseguer, J., Mulero, V., and Traver, D. (2014). Proinflammatory signaling regulates hematopoietic stem cell emergence. Cell *159*, 1070–1085.

Genain, C.P., and Hauser, S.L. (1997). Creation of a model for multiple sclerosis in Callithrix jacchus marmosets. J. Mol. Med. *75*, 187–197.

Genain, C.P., Lee-Parritz, D., Nguyen, M.H., Massacesi, L., Joshi, N., Ferrante, R., Hoffman, K., Moseley, M., Letvin, N.L., and Hauser, S.L. (1994). In healthy primates, circulating autoreactive T cells mediate autoimmune disease. J. Clin. Invest. *94*, 1339–1345.

Hadland, B.K., Varnum-finney, B., Poulos, M.G., Moon, R.T., Butler, J.M., Rafii, S., and Bernstein, I.D. (2015). Endothelium and NOTCH specify and amplify aorta- gonad-mesonephros – derived hematopoietic stem cells. J. Clin. Invest. *125*, 1–14.

Halloran, P. (2005). Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. N

Engl J Med *352*, 1056–1056.

Hotta, K., Aoyama, A., Oura, T., Yamada, Y., Tonsho, M., Huh, K.H., Kawai, K., Schoenfeld, D., Allan, J.S., Madsen, J.C., et al. (2016). Induced regulatory T cells in allograft tolerance via transient mixed chimerism. JCI Insight *1*.

Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., et al. (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. Science *341*, 651–654.

Huang, H., and Auerbach, R. (1993). Identification and characterization of hematopoietic stem cells from the yolk sac of the early mouse embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 10110–10114.

Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. Nat. Biotechnol. *26*, 795–797.

Ieyasu, A., Ishida, R., Kimura, T., Morita, M., Wilkinson, A.C., Sudo, K., Nishimura, T., Ohehara, J., Tajima, Y., Lai, C.Y., et al. (2017). An All-Recombinant Protein-Based Culture System Specifically Identifies Hematopoietic Stem Cell Maintenance Factors. Stem Cell Reports *8*, 500–508.

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R.M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J. Exp. Med. *176*, 1693–1702.

Irion, S., Clarke, R.L., Luche, H., Kim, I., Morrison, S.J., Fehling, H.-J., and Keller, G.M. (2010). Temporal specification of blood progenitors from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. Development *137*, 2829–2839.

Jeong, S.Y., Lee, J.H., Kim, H.S., Hong, S.H., Cheong, C.H., and Kim, I.K. (1996). 3-Deazaadenosine analogues inhibit the production of tumour necrosis factor-alpha in RAW264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide. Immunology *89*, 558–562.

Kawai, T., Cosimi, A.B., Spitzer, T.R., Tolkoff-Rubin, N., Suthanthiran, M., Saidman, S.L., Shaffer, J., Preffer, F.I., Ding, R., Sharma, V., et al. (2008). HLA-Mismatched Renal Transplantation without Maintenance Immunosuppression. N. Engl. J. Med. *358*, 353–361.

Kim, P.G., Canver, M.C., Rhee, C., Ross, S.J., Harriss, J. V, Tu, H.-C., Orkin,

S.H., Tucker, H.O., and Daley, G.Q. (2016). Interferon- signaling promotes embryonic HSC maturation. Blood *128*, 204–216.

Kinjyo, I., Qin, J., Tan, S.-Y., Wellard, C.J., Mrass, P., Ritchie, W., Doi, A., Cavanagh, L.L., Tomura, M., Sakaue-Sawano, A., et al. (2015). Real-time tracking of cell cycle progression during CD8+ effector and memory T-cell differentiation. Nat. Commun. *6*, 6301.

Klug, S., Neubert, R., Stahlmann, R., Thiel, R., Ryffel, B., Car, B.D., and Neubert, D. (1994). Effects of recombinant human interleukin 6 (rhIL-6) in marmosets (Callithrix jacchus). 1. General toxicity and hematological changes. Arch. Toxicol. *68*, 619–631.

Kondo, T., Funayama, M., Tsukita, K., Hotta, A., Yasuda, A., Nori, S., Kaneko, S., Nakamura, M., Takahashi, R., Okano, H., et al. (2014). Focal transplantation of human iPSC-derived glial-rich neural progenitors improves lifespan of ALS mice. Stem Cell Reports *3*, 242–249.

Kudo, H., Wada, H., Sasaki, H., Tsuji, H., Otsuka, R., Baghdadi, M., Kojo, S., Chikaraishi, T., and Seino, K. (2014). Induction of Macrophage-Like Immunosuppressive Cells from Mouse ES Cells That Contribute to Prolong Allogeneic Graft Survival. PLoS One *9*, e111826.

Kueh, H.Y., Champhekar, A., Nutt, S.L., Elowitz, M.B., and Rothenberg, E. V. (2013). Positive feedback between PU. 1 and the cell cycle controls myeloid differentiation. Science *341*, 670–673.

Kurita, R., Sasaki, E., Yokoo, T., Hiroyama, T., Takasugi, K., Imoto, H., Izawa, K., Dong, Y., Hashiguchi, T., Soda, Y., et al. (2006). Tal1/Scl Gene Transduction Using a Lentiviral Vector Stimulates Highly Efficient Hematopoietic Cell Differentiation from Common Marmoset (Callithrix jacchus) Embryonic Stem Cells. Stem Cells *24*, 2014–2022.

Kyba, M., Perlingeiro, R.C.R., and Daley, G.Q. (2002). HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. Cell *109*, 29–37.

Lambert, J.-F., Liu, M., Colvin, G.A., Dooner, M., McAuliffe, C.I., Becker, P.S., Forget, B.G., Weissman, S.M., and Quesenberry, P.J. (2003). Marrow Stem Cells Shift Gene Expression and Engraftment Phenotype with Cell Cycle Transit. J. Exp. Med. *197*, 1563–1572.

Li, Y., Esain, V., Teng, L., Xu, J., Kwan, W., Frost, I.M., Yzaguirre, A.D., Cai, X., Cortes, M., Maijenburg, M.W., et al. (2014). Inflammatory signaling regulates embryonic hematopoietic stem and progenitor cell production. Genes Dev. *28*,

2597–2612.

Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., et al. (2017). Autologous Induced Stem-Cell–Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. N. Engl. J. Med. *376*, 1038–1046.

Mansfield, K. (2003). Marmoset models commonly used in biomedical research. Comp. Med. *53*, 383–392.

Medvinsky, A., Rybtsov, S., and Taoudi, S. (2011). Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. Development *138*, 1017–1031.

Morizane, A., Doi, D., Kikuchi, T., Okita, K., Hotta, A., Kawasaki, T., Hayashi, T., Onoe, H., Shiina, T., Yamanaka, S., et al. (2013). Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of IPSC-derived neural cells in the brain of a nonhuman primate. Stem Cell Reports *1*, 283–292.

Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., et al. (2014). Perspective Macrophage Activation and Polarization : Nomenclature and Experimental Guidelines. Immunity *41*, 14–20.

Nakatsuji, N., Nakajima, F., and Tokunaga, K. (2008). HLA-haplotype banking and iPS cells. Nat. Biotechnol. *26*, 739–740.

Nichols, J., and Smith, A. (2009). Naive and Primed Pluripotent States. Cell Stem Cell *4*, 487–492.

Nii, T., Marumoto, T., Kohara, H., Yamaguchi, S., Kawano, H., Sasaki, E., Kametani, Y., and Tani, K. (2015). Improved hematopoietic differentiation of primate embryonic stem cells by inhibition of the PI3K-AKT pathway under defined conditions. Exp. Hematol. *43*, 901–911.

Noda, S., Horiguchi, K., Ichikawa, H., and Miyoshi, H. (2008). Repopulating Activity of Ex Vivo-Expanded Murine Hematopoietic Stem Cells Resides in the CD48 − c-Kit + Sca-1 + Lineage Marker − Cell Population. Stem Cells *26*, 646–655.

Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. Cell *132*, 631–644.

Pauklin, S., and Vallier, L. (2014). The Cell-Cycle State of Stem Cells Determines Cell Fate Propensity. Cell *156*, 1338.

Pearson, S., Cuvertino, S., Fleury, M., Lacaud, G., and Kouskoff, V. (2015). In

vivo repopulating activity emerges at the onset of hematopoietic specification during embryonic stem cell differentiation. Stem Cell Reports *4*, 431–444.

Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., Nagler, A., Ben-Hur, H., Many, A., Shultz, L., et al. (1999). Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. Science *283*, 845–848.

Poswillo, D.E., Sopher, D., and Mitchell, S. (1972). Experimental induction of foetal malformation with "blighted" potato: A preliminary report. Nature *239*, 462–464.

Quint, D.J., Buckham, S.P., Bolton, E.J., Solari, R., Champion, B.R., and Zanders, E.D. (1990). Immunoregulation in the common marmoset, Calithrix jaccus: functional properties of T and B lymphocytes and their response to human interleukins 2 and 4. Immunology *69*, 616–621.

Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., and Reed, S.I. (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. Mol. Cell. Biol. *14*, 1669–1679.

Riquelme, P., Tomiuk, S., Kammler, A., Fändrich, F., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., and Hutchinson, J.A. (2013). IFN- γ -induced iNOS Expression in Mouse Regulatory Macrophages Prolongs Allograft Survival in Fully Immunocompetent Recipients. Mol. Ther. *21*, 409–422.

Riquelme, P., Haarer, J., Kammler, A., Walter, L., Tomiuk, S., Ahrens, N., Wege, A.K., Goecze, I., Zecher, D., Banas, B., et al. (2018). TIGIT+ iTregs elicited by human regulatory macrophages control T cell immunity. Nat. Commun. *9*, 2858.

Robertson, N.J., Brook, F. a, Gardner, R.L., Cobbold, S.P., Waldmann, H., and Fairchild, P.J. (2007). Embryonic stem cell-derived tissues are immunogenic but their inherent immune privilege promotes the induction of tolerance. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 20920–20925.

Rybtsov, S., Batsivari, A., Bilotkach, K., Paruzina, D., Senserrich, J., Nerushev, O., and Medvinsky, A. (2014). Tracing the Origin of the HSC Hierarchy Reveals an SCF-Dependent, IL-3-Independent CD43− Embryonic Precursor. Stem Cell Reports *3*, 489–501.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. Cell *133*, 775–787.

Sakaue-sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., et al. (2008). Resource

Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. Cell *132*, 487–498.

Sasaki, E., Hanazawa, K., Kurita, R., Akatsuka, A., Yoshizaki, T., Ishii, H., Tanioka, Y., Ohnishi, Y., Suemizu, H., Sugawara, A., et al. (2005). Establishment of Novel Embryonic Stem Cell Lines Derived from the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). Stem Cells *23*, 1304–1313.

Sasaki, E., Suemizu, H., Shimada, A., Hanazawa, K., Oiwa, R., Kamioka, M., Tomioka, I., Sotomaru, Y., Hirakawa, R., Eto, T., et al. (2009). Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. Nature *459*, 523–527.

Sasaki, H., Wada, H., Baghdadi, M., Tsuji, H., Otsuka, R., Morita, K., Shinohara, N., and Seino, K.I. (2015). New immunosuppressive cell therapy to prolong survival of induced pluripotent stem cell-derived allografts. Transplantation *99*, 2301–2310.

Sato, K., Oiwa, R., Kumita, W., Henry, R., Sakuma, T., Ito, R., Nozu, R., Inoue, T., Katano, I., Sato, K., et al. (2016). Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing. Cell Stem Cell *19*, 127–138.

Sawai, M., Takase, K., Teraoka, H., and Tsukada, K. (1990). Reversible G1 arrest in the cell cycle of human lymphoid cell lines by dimethyl sulfoxide. Exp. Cell Res. *187*, 4–10.

Sawamiphak, S., Kontarakis, Z., and Stainier, D.Y.R. (2014). Interferon Gamma Signaling Positively Regulates Hematopoietic Stem Cell Emergence. Dev. Cell *31*, 640–653.

Schmitt, T.M., de Pooter, R.F., Gronski, M.A., Cho, S.K., Ohashi, P.S., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2004). Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro. Nat. Immunol. *5*, 410–417.

Seehase, S., Lauenstein, H.D., Schlumbohm, C., Switalla, S., Neuhaus, V., Förster, C., Fieguth, H.G., Pfennig, O., Fuchs, E., Kaup, F.J., et al. (2012). LPS-Induced Lung Inflammation in Marmoset Monkeys - An Acute Model for Anti-Inflammatory Drug Testing. PLoS One *7*.

Seino, K., Fukao, K., Muramoto, K., Yanagisawa, K., Takada, Y., Kakuta, S., Iwakura, Y., Van Kaer, L., Takeda, K., Nakayama, T., et al. (2001). Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. Proc. Natl. Acad. Sci. *98*, 2577–2581.

Shahjalal, H.M., Shiraki, N., Sakano, D., Kikawa, K., Ogaki, S., Baba, H., Kume, K., and Kume, S. (2014). Generation of insulin-producing beta-like cells from human iPS cells in a defined and completely xeno-free culture system. J. Mol. Cell Biol. *6*, 394–408.

Solaimani Kartalaei, P., Yamada-Inagawa, T., Vink, C.S., de Pater, E., van der Linden, R., Marks-Bluth, J., van der Sloot, A., van den Hout, M., Yokomizo, T., van Schaick-Solernó, M.L., et al. (2015). Whole-transcriptome analysis of endothelial to hematopoietic stem cell transition reveals a requirement for Gpr56 in HSC generation. J. Exp. Med. *212*, 93–106.

Sturgeon, C.M., Ditadi, A., Awong, G., Kennedy, M., and Keller, G. (2014). Articles Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. Nat. Biotechnol. *32*, 554–561.

Sugimura, R., Jha, D.K., Han, A., Soria-Valles, C., Da Rocha, E.L., Lu, Y.F., Goettel, J.A., Serrao, E., Rowe, R.G., Malleshaiah, M., et al. (2017). Haematopoietic stem and progenitor cells from human pluripotent stem cells. Nature *545*, 432–438.

Suzuki, N., Yamazaki, S., Yamaguchi, T., Okabe, M., Masaki, H., Takaki, S., Otsu, M., and Nakauchi, H. (2013). Generation of Engraftable Hematopoietic Stem Cells From Induced Pluripotent Stem Cells by Way of Teratoma Formation. Mol. Ther. *21*, 1424–1431.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell *126*, 663–676.

Takebe, T., Zhang, R.R., Koike, H., Kimura, M., Yoshizawa, E., Enomura, M., Koike, N., Sekine, K., and Taniguchi, H. (2014). Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. Nat. Protoc. *9*, 396–409.

Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D.G. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. Nature *448*, 196–199.

Tesio, M., Tang, Y., Müdder, K., Saini, M., von Paleske, L., Macintyre, E., Pasparakis, M., Waisman, A., and Trumpp, A. (2015). Hematopoietic stem cell quiescence and function are controlled by the CYLD–TRAF2–p38MAPK pathway. J. Exp. Med. *212*, 525–538.

Thaiss, C.C., Oura, T., Sasaki, H., Dehnadi, A., Matsunami, M., Rosales, I.A., Cosimi, B.A., and Kawai, T. (2018). Importance of Hematopoietic Mixed

Chimerism for Induction of Renal Allograft Tolerance in Nonhuman Primates. Transplantation. Epub ahead of print.

Thomson, J.A. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. Science *282*, 1145–1147.

Tomioka, I., Maeda, T., Shimada, H., Kawai, K., Okada, Y., Igarashi, H., Oiwa, R., Iwasaki, T., Aoki, M., Kimura, T., et al. (2010). Generating induced pluripotent stem cells from common marmoset (Callithrix jacchus) fetal liver cells using defined factors, including Lin28. Genes to Cells *15*, 959–969.

Tseng, S.-Y., Nishimoto, K.P., Silk, K.M., Majumdar, A.S., Dawes, G.N., Waldmann, H., Fairchild, P.J., Lebkowski, J.S., and Reddy, A. (2009). Generation of immunogenic dendritic cells from human embryonic stem cells without serum and feeder cells. Regen. Med. *4*, 513–526.

Vo, L.T., and Daley, G.Q. (2015). De novo generation of HSCs from somatic and pluripotent stem cell sources. Blood *125*, 2641–2648.

Wada, H., Kojo, S., Kusama, C., Okamoto, N., Sato, Y., Ishizuka, B., and Seino, K. (2011). Successful differentiation to T cells, but unsuccessful B-cell generation, from B-cell-derived induced pluripotent stem cells. Int. Immunol. *23*, 65–74.

Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K., et al. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. Nat. Biotechnol. *25*, 681–686.

Wu, C., Li, A., Leng, Y., Li, Y., and Kang, J. (2012). Histone Deacetylase Inhibition by Sodium Valproate Regulates Polarization of Macrophage Subsets. DNA Cell Biol. *31*, 592–599.

Yaguchi, M., Tabuse, M., Ohta, S., Ohkusu-Tsukada, K., Takeuchi, T., Yamane, J., Katoh, H., Nakamura, M., Matsuzaki, Y., Yamada, M., et al. (2009). Transplantation of dendritic cells promotes functional recovery from spinal cord injury in common marmoset. Neurosci. Res. *65*, 384–392.

Yamanaka, S., Takahashi, K., Okita, K., and Nakagawa, M. (2007). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. Nat. Protoc. *2*, 3081–3089.

Yo, M., Sakaue-Sawano, A., Noda, S., Miyawaki, A., and Miyoshi, H. (2015). Fucci-guided purification of hematopoietic stem cells with high repopulating activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. *457*, 7–11.

Zühlke, U., and Weinbauer, G. (2003). The Common Marmoset (Callithrix jacchus) as a Model in Toxicology. Toxicol. Pathol. *31*, 123–127.