

令和 4 年 5 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16774

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞を用いた新規急性骨髄性白血病モデルマウス作製法の開発

研究課題名（英文）Establishment of AML mouse model using human iPSC

研究代表者

二井 偉暢（Nii, Takenobu）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10743990

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では急性骨髄性白血病（AML）患者細胞を用いたAMLマウスモデルの作製効率を改善する研究を行った。マウスとヒトでは骨髄環境が異なるため、ヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）を用いることで、ヒトの骨髄環境をマウス体内に作製することを試みた。本研究期間内に作製したヒトiPS細胞由来ヒト骨髄の組織学的解析、およびヒトAML細胞の生着能の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該研究はAML患者細胞の骨髄への生着能を理解する研究のうち、マウスとヒトの骨髄環境の違い、及びヒト骨髄微小環境におけるECの重要性の解明に大きく貢献する初めての報告となりうる。また、本研究で開発された技術はヒトiPS細胞を利用した薬のスクリーニング方法の一つとして産業応用される可能性がある。作製されたAML-PDXマウスを非臨床試験で使用し、臨床試験での再現性が高まることで開発成功率の向上、開発費用の削減につながると考えられ、製薬企業に費用対効果の高い解決策を提供できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to improve efficiency of establishment of acute myeloid leukemia (AML) mouse model using AML patient sample. we used human induced pluripotent stem cell (iPSC) for establishment of human bone marrow microenvironment in mouse because the bone marrow microenvironment are different from between human and mouse. During this project, we analyzed the bone marrow-like tissue derived from human iPSC histologically and transplantation ability of human AML cell in the bone marrow-like tissue.

研究分野：幹細胞学

キーワード：白血病 骨髄微小環境 マウスモデル iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

これまでがん治療薬開発の非臨床試験において、がん細胞株を移植したがんモデルマウスが使用されてきたが、実際にはがん患者で行われる臨床試験で再現できないことが多く、これが研究開発の費用と期間の増長をもたらすため大きな問題となっている。この解決策として、がん患者由来細胞を用いた Patient Derived Xenograft (PDX) マウスが注目されている。PDX マウスを用いた研究では非臨床試験と臨床試験データの一致率が高いため、研究開発の効率化が期待されている。これを受け、米国立がん研究所ではがん治療薬開発の非臨床試験では PDX マウスを使用することを決定している。

しかし PDX マウスの使用にも未だ課題が残る。現在、急性骨髄性白血病 (AML) 患者細胞の免疫不全マウスへの生着率は 0-50% であり、未だ PDX マウスの作製困難な AML 患者細胞が多く存在する。これは AML 細胞が生着する骨髄微小環境がマウスとヒトでは異なることが主な原因であると考えられる。本研究の学術的「問い」は、マウス体内にどのようにヒト骨髄微小環境を再現して高効率で研究の再現性の高い AML-PDX マウスを作製できるかである。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト骨髄微小環境を再現した AML-PDX マウスの作製方法を開発することを目的とする。申請者はこれまで、骨髄微小環境を構成している間葉系間質細胞 (MSC) と血管内皮細胞 (EC) をヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から作製することに成功している。本研究ではこれら iPS 細胞由来の細胞 (MSC および EC) を免疫不全マウス皮下に移植し、ヒト骨髄微小環境を作製することでこれまで困難であった高効率で研究の再現性の高い AML-PDX マウスの作製を行う

## 3. 研究の方法

### ヒト iPS 由来の MSC (iPS-MSC) と EC (iPS-EC) の遺伝子発現解析 (2019 年度)

**[方法]** 申請者はすでにヒト iPS 細胞から iPS-MSC と iPS-EC の分化誘導法を確立しており、本研究に応用する。分化誘導した iPS-MSC と iPS-EC、及び BM-MSC と BM-EC を定量 RT-PCR や RNA-seq で解析し遺伝子発現パターン比較することで、iPS 細胞からの分化状態を確認する。

### iPS-MSC/EC のマウス皮下移植による異所性ヒト骨髄の作製 (2019 年度)

**[方法]** iPS-MSC と iPS-EC を生着率の向上を目的にマトリゲルと共に同時に免疫不全マウス (NSG マウス) 皮下へ移植し、異所性ヒト骨髄を作製する。陽性コントロールとして BM-MSC と BM-EC を用いる。異所性ヒト骨髄を作製後、切片を作製し、免疫染色を行うことで *in vivo* での骨形成能や血管形成能を確認する。

**[計画通りに進まない場合]** 移植細胞数や分化状態の異なる細胞での遺伝子発現パターンを参考にし、より未分化な状態、より分化した状態の細胞を移植することで改善を試みる。

### 異所性ヒト骨髄への AML 患者細胞の移植 (2019~2020 年度前半)

**[方法]** 異所性ヒト骨髄を作製した NSG マウスに AML 患者細胞を尾静脈から移植する。白血病患者細胞は研究協力者の Michael Andreeff 教授及び赤司浩一教授 (九州大学) から提供される。移植後、定期的にマウス末梢血を採取し、AML 患者細胞の生着能を確認する。生着能の確認は、ヒト CD45 (白血球共通抗原) 陽性細胞のフローサイトメトリーでの解析、及び異所性ヒト骨髄の切片を作製し、ヒト CD45 抗体を用いた組織免疫染色により行う。この際、マウス骨髄も同様に解析を行い、AML 患者細胞の生着能の差を異所性ヒト骨髄と比較する。

また、iPS-EC の AML 患者細胞生着能向上への貢献度を解析するため、iPS-MSC のみを用いた異所性ヒト骨髄を作製し、AML 患者細胞生着能の比較検討を行う。

**[計画通りに進まない場合]** AML 患者細胞移植数や移植細胞分画 (幹細胞分画など) を変更し改善を試みる。また、造血幹細胞の維持には動脈性 EC (CD184 陽性) が重要であることがわかっているため、異所性ヒト骨髄作製時の iPS-EC の性質について動脈性 EC を移植することについても検討を行う。さらに iPS-MSC/EC を移植して異所性ヒト骨髄作製すると同時に AML 患者細胞を移植することでの生着能向上の検討も行う。

### AML-PDX マウスの非臨床試験への有効性の評価 (2020 年度)

**[方法]** 新規 AML 治療薬 ONC212 を本研究に使用する。すでに申請者が従来法で作製した AML-PDX マウスを用い、ONC212 の有効性を確認済みである。ONC212 投与は 50 mg/kg/day を週 1, 3, 5 回投与する治療群と未治療群の計 4 群 (n=10) で行なう。

#### 4. 研究成果

申請者はこれまで、骨髄微小環境を構成している細胞をヒト iPS 細胞から作製することに成功している。本研究期間にヒト iPS 細胞由来細胞からマウス皮下に異所性ヒト骨髄の作製にも成功した(図1)。さらに骨髄微小環境を構成している細胞の iPS 細胞からの分化誘導効率の改善、作製した異所性ヒト骨髄の組織学的な解析、および AML 細胞の生着能の解析を行った。

本研究期間内に臍帯血由来造血幹細胞と AML 患者由来 AML 細胞の異所性ヒト骨髄への生着能を検討する予定であった。しかし、新型コロナウイルスの影響によって提携病院から臍帯血と AML 患者細胞の入手が困難となったため研究の遂行が困難な状況になった。今後、新型コロナウイルスの影響がなくなり、提携病院からの細胞が入手できるようになりしだい、研究を進めていく。

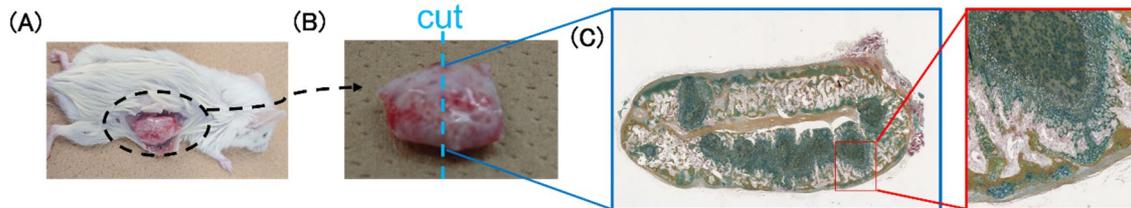


図1 未発表データ: ヒトiPS細胞由来MSCとECからの異所性ヒト骨髄

(AとB) マウス皮下に作製した異所性ヒト骨髄の写真。(C) 異所性ヒト骨髄のモバット5重染色。

核:黒青、弾性繊維:黒青、コラーゲン:黄色、ムチン:青、フィブリン:赤、筋肉:赤、細胞質:ピンク

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Nii Takenobu, Konno Katsuhiko, Matsumoto Masaki, Bhukhai Kanit, Borwornpinyo Suparerk, Sakai Kazuhiro, Hongeng Suradej, Sugiyama Daisuke  | 4. 巻<br>26                |
| 2. 論文標題<br>The Bioactive Peptide SL-13R Expands Human Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem and Progenitor Cells In Vitro   | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Molecules   | 6. 最初と最後の頁<br>1995 ~ 1995 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/molecules26071995   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する              |
| 1. 著者名<br>NII Takenobu, SWAIN Anthony, MINE Yuichi, TAKAI-YUMINE Ayako, SUGIYAMA Daisuke  | 4. 巻<br>2                 |
| 2. 論文標題<br>Establishing a translational research network in the Asia-Pacific Region through Industry-Academia-Government Collaboration: The Japan Medical Innovation Program  | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Translational and Regulatory Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>42 ~ 46     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.33611/trs.2020-004   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>NII Takenobu, SITTAMPALAM Sitta G., MINE Yuichi, SUGIYAMA Daisuke   | 4. 巻<br>2                 |
| 2. 論文標題<br>Establishment of a Translational Science and Medicine Training Program in Japan  | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Translational and Regulatory Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>36 ~ 41     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.33611/trs.2020-005   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する              |
| 1. 著者名<br>Takenobu Nii, Varun Prabhu, Vivian Ruvolo, Neel Madhukar, Ran Zhao, Hong Mu, Lauren Heese, Yuki Nishida, Kensuke Kojima, Mathew Garnett, Ultan McDermott, Cyril Benes, Neil Charter, Sean Deacon, Olivier Elemento, Josh Allen, Wolfgang Oster, Martin Stogniew, Jo Ishizawa, Michael Andreeff. | 4. 巻<br>33                |
| 2. 論文標題<br>Imipridone ONC212 activates orphan G protein-coupled receptor GPR132 and integrated stress response in acute myeloid leukemia  | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Leukemia  | 6. 最初と最後の頁<br>2805-2816   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41375-019-0491-z.  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Jo Ishizawa, Sarah F. Zarabi, R. Eric Davis, Ondrej Halgas, Takenobu Nii, Ran Zhao, Yulia Jitkova, Lauren E. Heese, Yuki Nishida, Emil Pai, Aaron D. Schimmer, Michael Andreeff. | 4. 巻<br>35            |
| 2. 論文標題<br>Mitochondrial ClpP-mediated proteolysis induces selective cancer cell lethality   | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Cell  | 6. 最初と最後の頁<br>721-737 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ccell.2019.03.014.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takenobu Nii, Katsuhiko Konno, Mami Shigeto, Ayako Kaneyuki, Motoko Sumasu, Toshiyuki Owaki, Daisuke Sugiyama. |
| 2. 発表標題<br>BIOACTIVE PEPTIDE SL-13R EXPANDS HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD HEMATOPOIETIC STEM CELLS                           |
| 3. 学会等名<br>International Society for Stem Cell Research (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

|                               |                  |               |
|-------------------------------|------------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>胚の培養方法            | 発明者<br>目野主税 二井偉暢 | 権利者<br>同左     |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、2022-047454 | 出願年<br>2022年     | 国内・外国の別<br>国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|