

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791007

研究課題名（和文） ヘモグロビンクラススイッチの解明とヘモグロビン異常症の
新たな治療戦略の基礎的研究

研究課題名（英文） The basic study of mechanism in the hemoglobin class switch and
development of new strategies for treatment of hemoglobinopathy

研究代表者

早川 潤 (HAYAKAWA JUN)

日本医科大学 医学部・講師

研究者番号：10386196

研究成果の概要（和文）：

ヒト化免疫不全マウスを用い erythroid 系に分化する実験系を in vivo と in vitro (erythroid culture) 併用することで確立した。移植した臍帯血はヒト生体内で生直後からおこる月齢変化と同様な時間経過で HbF から HbA に変化した。異常ヘモグロビンや GFP 遺伝子導入した細胞も移植後 erythroid 系に分化した。クラススイッチを制御する BCL11A、KLF1、MYB といった遺伝子群をノックインして in vivo で再現する実験はマウスの飼育環境の制約で実施に至らなかった。

先天性造血不全症、後天的造血不全（赤芽球癆）と健常検体の erythroid 系への分化の違いを血清マイクロアレイで比較検討し疾患特異的にサイトカインがどのように変化するかを検討した。

研究成果の概要（英文）：

We reproduced the hemoglobin class switch in humanized mice by using the combination of in vivo and in vitro assay. Our practical approach to model human erythropoiesis in the xenograft mouse should prove useful in the both the study of human erythroid disorders as well as therapeutic interventions. As for in vivo assay of the gene transduction (BCL11A, KLF1, MYB etc.) to control the hemoglobin switch, we could not achieve the project due to the facility problems in the mice transplantation.

We also perform the cytokine analysis of the patient's serum to evaluate the difference between healthy donor and hemoglobin disorder patient.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児血液学

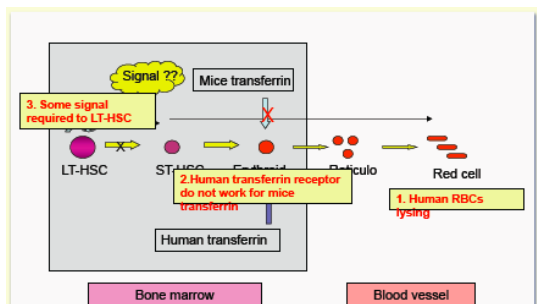
1. 研究開始当初の背景

ヘモグロビン異常症はヘモグロビン遺伝子異常によって生じ、その重傷例では造血幹

細胞移植を余儀なくされる。また先天性造血不全症は頻回の輸血を必要としその生命予後は厳しいものがある、しかし造血幹細胞移

植はドナーの確保や治療の危険性の問題から一概に有用とはいえず、造血幹細胞を標的とした遺伝子治療が期待されている。マウスではすでに遺伝子治療の効果が確認されているがサルでは問題点が多くヒトへの応用にはまだ時期尚早である。そこで、もし他の手段でヘモグロビン異常症の患者に HbF を数%出現させられれば輸血依存症は離脱でき、おおきな臨床的な改善が期待できる。しかし胎児期から出生後おこる HbF から HbA へのクラススイッチについては十分な理解がなされていない。

ヒト臍帯血を免疫不全マウスに移植し免疫系をヒト細胞に置き換えたヒト化マウスの実験系はすでに多方面に応用されているが、ヒト erythroid 系を免疫不全マウスで再構築させた詳細な報告はなされていなかった。早川は以前、ヒト化マウスは 1) LT-HSC から erythroid 系に分化させるためにはネズミの体内の環境では不十分であること。2) マウストランスフェリンがヒトトランスフェリンに作用しないこと。3) できた赤血球が溶血してしまうこと。を報告した。



図：ヒト化マウスでヒト赤血球が発現しない理由

しかしヒト化マウスの実験系は現時点では唯一 LT-HSC からの分化を観察できる説得力のある実験系であり、われわれは in vivo と in vitro の実験を組み合わせることで、Erythroid 系の評価をヒト化マウスで行う方法を開発することを目指した。しかし本研究はヒト化マウスの実験系や造血不全症の患者血清を解析することで、ヘモグロビンのクラススイッチの仕組みを明らかにしその人工的な制御法の確立をめざした。サラセミアなどの赤血球異常症や造血不全症の病態の把握と治療に貢献することを目指した。

2. 研究の目的

21 世紀になりグローバル化が加速するなかで、ボーダレスワールドが進行している。日本国では、もはや国際結婚が珍しくなくなり、今後人種の融合がますます加速することが予想される。欧米では、とくにアフリカンアメリカンの間でサラセミアや Sickle cell Disease といったヘモグロビン異常症の患者が多く、その研究が盛んである。

その重症例では頻回の輸血を余儀なくされ、最終的に造血幹細胞移植が必要になる症例も多い。しかし造血幹細胞移植は治療のリスクやドナーの問題もあり実施可能な症例は限られている (Tisdale JF, Semin Hematol 2004)。そこで新たな治療法としてヘモグロビン異常症に対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療の試みは様々な施設で試みられてきた。すでにモデルマウスを用いた評価系では良好な結果が報告されている (May C, Nature, 2000)。しかし自分が米国国立衛生研究所 (NHLBI, MCHB, John Tisdale lab) に留学中に FDA と合同で行ったアカゲサルを用いた Pre-Clinical Trial では、ヒト β -グロビン遺伝子をもつ治療用ベクター (TNS9 vector) をサルの造血幹細胞に高率に遺伝子導入することに成功したにもかかわらず、短期間には導入遺伝子の発現を認めたものの、長期間の治療効果を得ることができなかった (Hayakawa J, Hum Gene Ther. 2009)。現在、臨床応用をめざしさらなるベクターの改良や効率の良い遺伝子導入法の開発がすすめられているが (Uchida N, Hayakawa J, J Virol. 2009) 残念ながらヒトに応用するまでには問題点が多く、しばらく時間がかかりそうである。またすでにフランスで XSCID の患者に対し行われたヒトへの臨床応用では治療効果では得られたものの、その後数名の患児が遺伝子導入が契機となって oncogene が刺激され、白血病を発症した (Fischer A, N Engl J Med. 2004)。LAM-PCR 法をもちいた integration site analysis などの遺伝子治療の安全性の評価とより安全な遺伝子導入法の開発が急務である (Hayakawa J, PLoS One. 2009)。

そこで新たなアプローチとして、本研究では HbA から HbF へのヘモグロビンクラススイッチを成人造血幹細胞で効率よく誘導することが可能かを考えたい。もし重傷ヘモグロビン異常症の患者において数%でも HbF を発現を誘導することができれば、造血幹細胞移植や遺伝子治療せずとも臨床的には劇的な改善が期待される。しかし胎生期から乳児期におこる HbF から HbA へのクラススイッチのメカニズムはいまだ充分には解明されておらず、その機序が明らかになり Hb クラススイッチを自在に誘導することが可能になればヘモグロビン異常症の治療にブレイクスルーをもたらすであろう。実際、臨床の現場では Hypoxia や Hydroxyurea の投与などのストレスにより成人でも一時的に HbF の出現を認めることがある。まずはヒト臍帯血やヒト化免疫不全マウスでのヒト造血幹細胞のヘモグロビンクラススイッチの理解をさらに深めることを足場にして、そこで得られた知見を応用して成人造血細胞の遺伝子発現をコントロールすることで HbF の発現を in

in vitro さらに in vivo で誘導できるかを確かめることが本研究のゴールである。

また今まで先天性免疫不全症の患者の解析が生体内での免疫ネットワークの仕組みを解明するのに大きく貢献したように、先天性造血不全症の患者や後天的造血不全の患者の血清サイトカインプロファイルを検討することで未知の erythroid 系細胞の造血制御のメカニズムの発見を目指す。

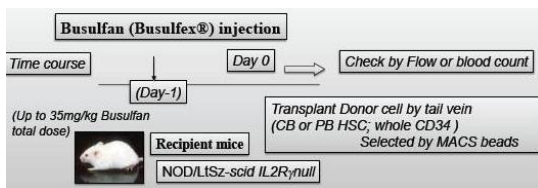
3. 研究の方法

1 :

ヒト化免疫不全マウスを用いた臍帯血ヘモグロビンクラススイッチの検討

1) 免疫不全マウスを用いたヒト化マウスの作成

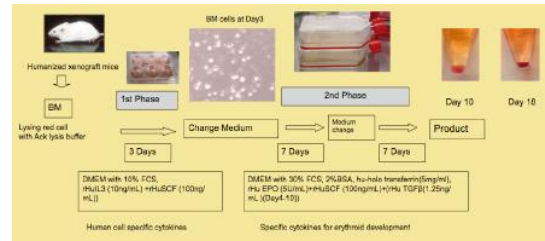
ヒト化免疫不全マウスはマウスの体内へのヒト細胞の生着、分化が長期間にわたって確認できることから造血幹細胞の分化が観察できるだけでなく、唯一のヒト LT-HSC の assay 系として有用である。われわれは 6-8 週齢の免疫不全マウスに骨髄破壊の前処置をし、ヒト臍帯血を移植する。その移植後早期 (1 ヶ月) から 12 ヶ月まで 3 ヶ月ごとにマウスキメリズムを検討し免疫系細胞の再構築を確認する。キメリズムはフローサイトメーターで確認する。



図：ヒト化マウス作成の手順

2) 2Phase culture を用いたヒト化マウス骨髄検体からのヒト erythroid 細胞の培養。

移植したヒト化マウスから骨髄採取を行い、我々の開発した” 2 phase culture ” を用いて、培養する。下図に示した 2 種類のサイトカインの組み合わせで培養する。具体的には採取した骨髄細胞を 3 日間ヒト特異的サイトカイン (IL3, SCF) で刺激した後、14 日間 Erythroid に分化誘導 (EPO, SCF, TGF β) するサイトカイン下で培養する。得られた細胞をフローサイトメーターを用いてヒト CD45 抗体とヒト CD71 あるいは GPA 抗体で染色しヒト細胞が赤芽球系細胞に分化したかを確認する。



図：2 phase culture

3) 2Phase culture 後のヒト erythroid 細胞のヘモグロビン分画の同定

得られた細胞を抗体ビーズ法でヒト GPA+ の分画だけ選択して電気泳動で Hb の状態を確認する (2Phase culture)。また異常ヘモグロビンの患者造血幹細胞をもちいてヒト化マウスを作成し異常ヘモグロビン分画が発現してくるか検討する。

またその細胞を用いてマイクロアレー法で移植早期と長時間経過した検体の遺伝子発現を解析し、HbF から HbA へのクラススイッチに関与すると思われる遺伝子を絞り込む。またある程度遺伝子が絞り込めた時点で RT-PCR でその発現の変異を定量化して確認する。

4) 造血幹細胞のヘモグロビンクラススイッチに関わる遺伝子の同定と遺伝子を導入することにより強制的にヘモグロビンクラススイッチがおこるかどうかの検討

マウスに臍帯血を移植し移植後 3 ヶ月ごとに 12 ヶ月まで骨髄を採取しマイクロアレー法で遺伝子の発現を比較する。また再生不良性貧血の患者や骨髄異形成症候群の患者など HbF が高い病態の患者の骨髄の遺伝子発現を見てみる。マウスから得られた検体は 2phase culture を行い、erythroid 系細胞になったのちに遺伝子発現を検討する。

2: 造血ストレスのある患者臨床検体の血清サイトカイン分析

erythroid 系の細胞への骨髄レベルでの造血障害がある状態では赤血球、分化成熟障害がおこる。疾患によってその成因はことなるが、骨髄にストレスがかかる骨髄異形成症や再生不良性貧血などの無効造血を繰り返し徐々に血液分化障害をとともなう疾患と ITP やウイルス感染に伴う血球貪食症などの感染で急激に血液分化障害を起こした患者の血清サイトカインを比較することによる erythroid 系分化への影響や、異常分娩で生まれた児の臍帯血と正常分娩で生まれた児の臍帯血を比較することで HbF の発現や erythroid 系細胞への分化の状況を解析する

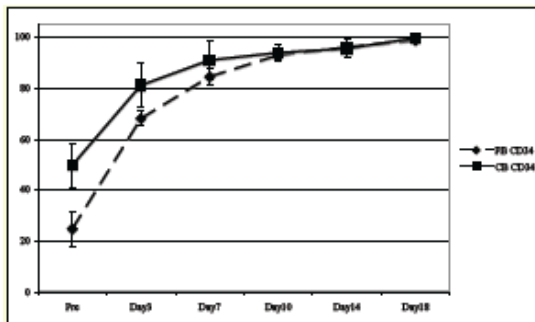
ことの検討を試みる。これにより造血制御因子やヘモグロビンクラススイッチがおこる状況が未だ未発見の pathway による可能性があるかサイトカインを定量してみても病態の把握に努める。

造血ストレスがある状況でのヘモグロビン分画の変化、血清サイトカインアレープロファイルを測定し、臨床所見と比較することで病状の把握と erythroid の造血との因果関係を考える。

4. 研究成果

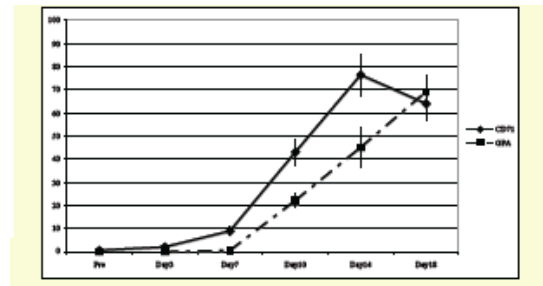
1) ヒト化免疫不全マウスを用いた臍帯血ヘモグロビンクラススイッチの検討

1) 2) Buslfan を前処置として免疫不全マウスにヒト臍帯血を移植した。我々の使用した系でも従来報告があったようにヒト化マウスとして十分なキメラズムを確認した。移植後 12 ヶ月までマウスの生存を確認し、そこでも 40~60% のヒト CD45 陽性細胞を認めため LT-HSC の生着分化がなされていると判断した。2Phase culture に関しては移植後 3 ヶ月たったヒト化マウスから骨髄を採取し Human IL3 と SCF で 3 日間刺激したあと EPO, SCF, TGF β で刺激を重ねてマウスの骨髄からほぼ 100% 近くのヒト CD45 陽性細胞を得ることができた。これは特に IL3 と SCF が選択的にネズミ・ヒト細胞の両者が混在した状況に選択的に働いてヒト細胞が純化されたものと考えられる。



図：2Phase culture における培養細胞のヒト CD45 の陽性率

また 2Phase Culture 中に得られた細胞を経時的に測定すると、培養開始から 7 日から 1 日でまず CD71 が陽性になり、その後 GPA が陽性になっている。本研究中に他の施設でヒト細胞の脱核に関してはマクロファージの存在が必須であるということもあり、我々の得た赤芽球系細胞は完全な赤血球ではないと考えられる。

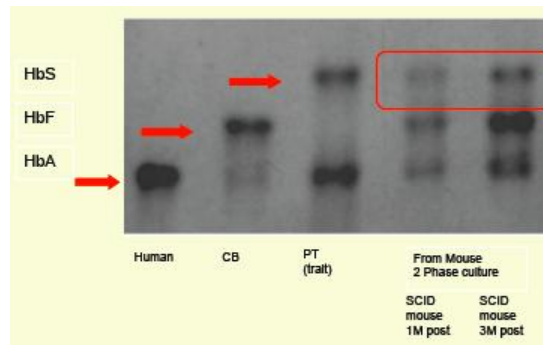


図：2 Phase Culture におけるヒト CD71 とヒト GPA 陽性率

またこの GPA 陽性細胞を HPLC-mass spectroscopy を用いて解析したところ human globin-chain (α , β , γ) を確認することができた。移植した造血幹細胞が時間の経過とともに最初は HbF の比率が高いのが徐々に低下して来るのを確認した。

3) 2Phase culture 後のヒト erythroid 細胞のヘモグロビン分画の同定。

我々は HbS をもつヒト骨髄を用いて我々の開発した 2Phase Culture で異常ヘモグロビンが発現してくるかを解析したところ、HbS や HbC も発現することを確認した。このことは異常ヘモグロビンの解析の解析実験にも我々の系が有用であることを示している。



図：HbS を発現する患者骨髄を用いてヒト化マウスを作成し 2Phase Culture で採取した細胞を電気泳動してヘモグロビンバンドを確認した。

また臍帯血を移植後、長期にわたって定期的にヒト化マウスから骨髄を採取し 2Phase Culture をおこなったところマウス体内でも HbF から HbA へのクラススイッチがヒト誕生後から 1 年目に起こる変化と同様におこっているところを確認した。このことはヘモグロビンクラススイッチは外部要因も重要だが、細胞自身にも何らかのクラススイッチのプログラムが存在することを示唆している。

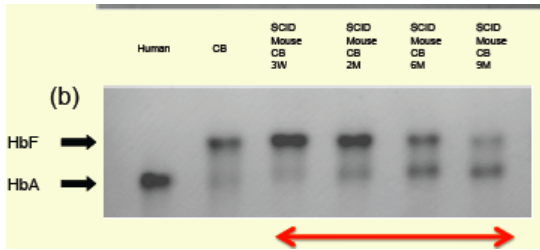
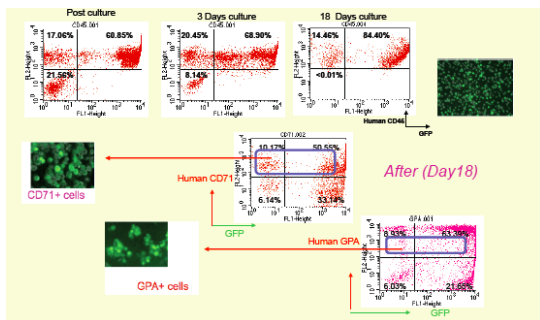


図:時間の経過とともに臍帯血がHbFからHbAのスイッチを認めた。

4) 2phase culture 法が確立してマイクロアレーの準備をしている期間に欧米からの重大な報告が相次ぎ BCL11A, KLF1, MYB, SOX6, HDAC1/2 といった遺伝子群がヘモグロビンをクラススイッチを制御する重要な因子であることが判明した。どの報告も最終的にヘモグロビンをクラススイッチの制御を in vivo で実現することを目標にする我々にとって重要な報告であるが、in vitro でのシグナル伝達を証明した報告であり、我々のもつ in vivo の系を用いて、これらの造血因子を制御することで HbF を人工的に増加させてヒトへの臨床応用を実現することができるかを目標に実験した。BCL11A, KLF1, MYB, SOX6, HDAC1/2 の5つの遺伝子に着目しレンチウイルスベクターを使用し造血幹細胞に遺伝子導入したのちマウスに移植することを計画した。

第一段階として造血幹細胞にレンチウイルスベクターで GFP 遺伝子を遺伝子導入し、それが我々の erythroid culture を行った後も導入した GFP 遺伝子がヒト CD71 ないしは GPA 陽性細胞に分化しているかを確認した。このことはレンチウイルスベクターで導入した遺伝子がヒト化マウスで Erythroid 系細胞にも導入されており、分化増殖が可能であることを示している。



しかし BCL11A, KLF1, MYB, SOX6, HDAC1/2 に関してはその評価系を作成するためのプライマー作りや遺伝子導入法、DNA ライブラリーの作成にとまどり、本研究機関では達成できなかった。

2 造血ストレスのある患者臨床検体の血清サイトカイン分析

骨髄にストレスがかかる骨髄異形成症や再生不良性貧血などの無効造血を繰り返し徐々に血液分化障害をともなう疾患と ITP やウイルス感染に伴う血球貪食症などの感染で急激に血液分化障害を起こした患者の血清サイトカインを比較することによる erythroid 系分化への影響や、異常分娩で生まれた児の臍帯血と正常分娩で生まれた児の臍帯血を比較することで HbF の発現や erythroid 系細胞への分化の状況を解析することの検討を始めるよう準備を進めた。

臍帯血については極小未熟児の臍帯血の入手が適切と考えたが入手に困難を極めてヒト化マウスの実験にいたらず、電気泳動で HbF が出ることを確認したのみであった。造血不全症の患者検体に関しては、インフォームドコンセントが得られた患者血清(血球貪食症、骨髄異形成症、赤芽球癆など)の患者血清検体に Bio-Plex のシステムで血清サイトカインアレーを施行した。とくに STAT1 獲得機能異常症でフォローしている患児が経過中に血球貪食症・赤芽球癆になりそのサンプルを経時的にそくせいしたところ IL17 が過去の症例では低値であったのが本症例では高値になっており、とくに血球貪食症が重症化するとき高値になったことが興味深い。

Sample No.	Hu IL-5 Obs Conc	Hu IL-6 Obs Conc	Hu IL-15 Obs Conc	Hu IL-17 Obs Conc	Hu G-CSF Obs Conc	Hu GM-CSF Obs Conc	Hu TNF-α Obs Conc
STAT1 mutant 28-Feb							
serum	5.9	22.3 OOR <		85.49	23.91 OOR <		36.87
bone marrow	4.70	13.13 OOR <		66.45	21.59 OOR <		30.07
VAHIS 17-Apr	46.13	49.4	20.44	223.78	496.34	118.32	30.03

図: STAT1 異常症の患者のサイトカインプロフィール

今後他の症例(たとえば再生不良性貧血や他のタイプの免疫不全症)のデータを重ねて行く予定である。

患者遺伝子プロフィールに関して上記疾患の患児の発現をやはり DNA アレーをもちいて検討しようとしたが、大学の規定により遺伝子倫理委員会に研究計画を提出する必要があり、準備の段階に時間がかかり本研究期間では残念ながら実施することができなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- Hayakawa J, Hsieh MM, Washington KN, Uchida N, Phang O, Tisdale JF. The assessment of human erythroid output in NOD/SCID mice reconstituted with human hematopoietic stem cells. Cell Transplant. 2010;19(11):1465-73.

2. Uchida N, Hsieh MM, Hayakawa J, Madison C, Washington KN, Tisdale JF.

Optimal conditions for lentiviral transduction of engrafting human CD34(+) cells. Gene Ther. 2011 Nov;18(11):1078-86

[学会発表] (計1件)

1. 早川潤: "A practical method for the assessment of human erythroid output in humanized model mice" 日本血液学会. (20100925). パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 潤 (HAYAKAWA JUN)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号: 22791007