

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82641

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19681

研究課題名（和文）テラトーマ内の造血環境を利用した小児白血病評価用in vivoモデルの開発

研究課題名（英文）Development of an in vivo model for the evaluation of childhood leukemia using the hematopoietic environment within a teratoma.

研究代表者

高橋 正行（Takahashi, Masayuki）

一般財団法人電力中央研究所・サステナブルシステム研究本部・上席研究員

研究者番号：20556782

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒトiPS細胞由来のテラトーマ内に骨髄様の造血環境が作出可能であることに着目し、小児白血病評価用ヒトiPS細胞を活用することで、テラトーマ内で小児白血病の発症過程にある造血環境の模擬を可能とする。これにより、ヒト細胞/組織から成る小児白血病評価用in vivoモデルの確立を目指した。KMT2A-AFF1発現ヒトiPS細胞を新たに樹立し、保有するETV6-RUNX1発現ヒトiPS細胞と共に、テラトーマ形成に用いた。テラトーマ内にはヒト血液細胞が産生され、転座遺伝子の作用により前白血病状態への移行が示唆された。さらに、既知の白血病リスク因子を作用させ白血病化を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて開発されるヒト細胞/組織から成る新たな小児ALL評価用in vivoモデルは、小児ALLの発症への関与が疑われる因子について因果関係の解明およびリスクの定量的評価に有用であり、小児ALLの予防に繋がる知見の獲得に貢献する。本研究におけるテラトーマ内の造血環境に注目した疾患のモデル化は、多くの造血器疾患への応用が期待出来る。また、テラトーマ内に含まれる種々の組織幹細胞やその周辺環境が関連する疾患のモデル化への活用も期待できる。

以上の通り、本研究は、小児ALLの予防に向けたリスク評価に貢献するだけでなく、疾患in vivoモデル開発の新たなプラットフォームを提案するものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the formation of a bone marrow-like hematopoietic environment within human iPS cell-derived teratomas, and by utilizing human iPS cells harboring leukemia-associated fusion genes, we aimed to mimic the process of pediatric leukemia development within the teratoma. We established a human iPS cell line harboring KMT2A-AFF1 and used it with our existing ETV6-RUNX1-expressing human iPS cells for teratoma formation. Within the teratoma, human hematopoietic cells were produced, and the transition to a pre-leukemic state by the expressions of the fusion genes was suggested. Furthermore, we evaluated the potential of leukemogenesis by administrating known leukemia risk factors.

研究分野：幹細胞工学

キーワード：小児白血病 疾患モデルマウス 疾患モデル細胞 ヒトiPS細胞 造血環境

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

疫学研究により、小児期に発症する急性リンパ性白血病 (小児白血病) と電離 / 非電離放射線、化学物質、感染症との関連性が示唆されてきた。しかし、小児白血病の発症率の低さから症例数の確保が難しく、疫学研究での因果関係の解明には限界があった。両者の因果関係を解明しリスクを定量的に評価するには、小児白血病の発症を模擬する *in vivo* モデルが不可欠である。これまで、小児白血病に特徴的な転座遺伝子: ETV6-RUNX1 (ER) を利用した遺伝子組換えマウスが多く開発された。その殆どで ER の作用により前白血病状態へと移行はするものの白血病化は模擬出来ていない。そもそも白血病はマウスでは自然発症しない疾患である。ヒトとマウスの血液細胞では、大きさや寿命は素より白血球の内訳など多くの点が異なる。小児白血病で異常を示す B 細胞においても、CD 抗原の発現パターンやサイトカイン応答性などが種間で異なることが知られ、これら造血・分化過程における違いがマウスにおける白血病の発症を妨げている可能性が考えられた。

これまでに本研究代表者は、小児白血病の *ex vivo* 評価用のモデル細胞として ER を発現するヒト iPS 細胞を樹立した (Takahashi & Yamazaki, 2019)。当該細胞にてヒト血液細胞や分化過程に注目した評価が可能である。一方、本研究分担者は、ヒト iPS 細胞が形成するテラトーマ内の細胞分化を制御し、テラトーマ内に骨髓様の造血環境を作り出すことに成功した (Suzuki et al., 2013)。テラトーマ内の造血環境およびそこでの造血は大元の iPS 細胞の性質を色濃く反映すると考えられ、ER 発現ヒト iPS 細胞により形成されたテラトーマ内には小児白血病を発症する場が整っていると期待された。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞由来のテラトーマ内に骨髓様の造血環境が作出可能であることに着目し、申請者が樹立した小児白血病評価用ヒト iPS 細胞を応用することで、テラトーマ内で小児白血病の発症過程にある造血環境の模擬を可能とする。これにより、ヒト細胞 / 組織から成る小児白血病評価用 *in vivo* モデルの確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 転座遺伝子: KMT2A-AFF1 発現ヒト iPS 細胞の樹立

乳児白血病患児の 80% 以上において特徴的に検出される転座遺伝子: KMT2A-AFF1 (KA) を発現するヒト iPS 細胞を新たに樹立した (Takahashi, 2023)。ヒト iPS 細胞は、東京大学ステムセルバンクより提供された IMSUTi002-A 株を用いた。KA を組み込んだ Tet-On 発現誘導システム (図 1) を構築し、PiggyBac ベクターへと搭載した。そして、単分散状態にあるヒト iPS 細胞へリポフェクションにより導入した。ハイグロマイシン添加培地での 3 週間の未分化維持培養に続き、FACS Aria III (BD) を用いて 96-well plate へのシングルセルソーティングを実施し、単一細胞クローンを得た。その後、KA 発現誘導システムのゲノムへの挿入確認、未分化マーカーの発現や多分化能の評価による iPS 細胞としての性能保持確認、ドキシサイクリン (DOX) 添加による KA および EGFP の発現誘導の性能評価等を経て、KA 発現ヒト iPS 細胞株を樹立した。

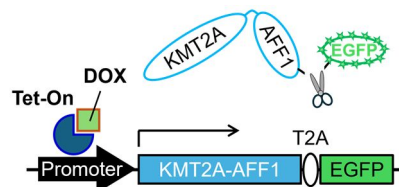


図 1 構築した転座遺伝子: KMT2A-AFF1 発現誘導システムの概要

(2) テラトーマの形成とヒト血液細胞への分化評価

ER 発現または KA 発現ヒト iPS 細胞に由来するテラトーマの形成とテラトーマ内のヒト血液細胞の産生について検討した。テラトーマ形成を利用したヒト iPS 細胞から造血幹細胞への分化誘導法について報告した既報 (Suzuki et al., 2013, Amabile et al., 2013) を参考に、造血支持能を有することが知られるマウス骨髓間質細胞株: OP9 とヒト iPS 細胞を混合しマウスへ移植した。移植細胞の生体内での分散を抑制するため、Matrigel を移植細胞の懸濁液に用いた。また、移植マウスには重度免疫不全マウスである NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) マウスを用い、腓腹筋を移植部位とした。

細胞移植から 2 ヶ月程度経過したのちテラトーマを採取し、内部に含まれた細胞を評価した。数ミリ角にカットしたテラトーマ塊をコラゲナーゼやディスパーゼを用いて酵素処理し、細胞懸濁液を調整した。その後、抗マウス CD45 (mCD45) 抗体、抗ヒト CD45 (hCD45) 抗体、およびその他抗体を用いて蛍光標識し、フローサイトメーターにて解析した。テラトーマの他、大腿骨 / 腓骨・脛骨骨髓、脾臓、末梢血も採材し、含まれた血液細胞のプロファイルを解析した。

(3) 前白血病状態および白血病化の誘導

テラトーマ内に産生された血液細胞に ER または KA の発現を誘導し、前白血病状態への移

行とその後の白血病化を検討した。細胞移植から2週間経過後、10%スクロース水にDOXを溶解した溶液を飲料水とし飲水投与を開始した。テラトーマ形成マウスを評価に供するまでDOX投与を継続した。

また前白血病状態への移行を検討するため、DOXの飲水投与下にあるマウスに対し、既知の白血病リスク因子を作用させた。本研究では、変異原性を有するエチルニトロソウレア (ENU)、および過剰免疫応答を惹起させることを目的にリポ多糖 (LPS) をリスク因子として用いた。これらを、皮下のテラトーマ塊の位置を把握可能となった移植6週目よりテラトーマ内に直接投与し、1週間間隔で評価まで繰り返した。

4. 研究成果

(1) 転座遺伝子: KMT2A-AFF1 (KA) 発現ヒト iPS 細胞の樹立 (Takahashi, 2023)

ハイグロマイシンによる耐性細胞の一次スクリーニング後、シングルセルソーティングを行った結果、1クローンのみが拡大培養を経てストック作成にまで到達した。当該細胞のゲノムDNAを評価した結果、非特異的なゲノム挿入はなく、ITR (inverted terminal repeat) に挟まれた領域のみが挿入されていることを確認した。また、PiggyBac copy number qPCR kit (System Biosciences) による評価の結果、1ゲノム当たり9つのKA発現誘導システムが挿入されていた。オリジナルのiPS細胞と比較し、コロニー形態 (図2A) や増殖速度に顕著な違いはなかった。また、未分化維持培養時の未分化マーカー (NANOG, SOX2, TRA-1-81, SSEA-4) の発現、および各種分化誘導培地に移行した際の分化マーカー (*T* (中胚葉)、*SOX17* (内胚葉)、*PAX6* (外胚葉)) の発現を検出でき、iPS細胞としての性能を保持していることを確認した。その他、G-band染色体解析等、異常を示唆する結果は得られなかった。

次に、組み込んだTet-On発現誘導システムの性能評価を行った。未分化維持培地にDOXを添加し数日培養後、DOX依存的なKAおよびEGFPの発現を評価した。蛍光顕微鏡下で観察した結果、DOX添加培地を用いた時のみEGFP由来の緑色蛍光がコロニー全体に様に確認できた (図2B)。また、遺伝子発現解析の結果、KAについてもDOX依存的に発現が誘導されたことを確認した (図2C)。

以上の結果より、当該細胞株はDOXにより発現を制御可能なKA発現ヒトiPS細胞株であると結論付けた。

(2) テラトーマの形成とヒト血液細胞への分化評価

ヒトiPS細胞とOP9をMatrigelに懸濁した状態でNSGマウスに移植し、テラトーマを形成させた。精巣や皮下へ移植した場合と比較し、腓腹筋中に移植することで再現性高くテラトーマを形成できた。形成したテラトーマから温和な酵素処理により細胞を回収し、フローサイトメーターを用いてヒト血液細胞の産生を評価した。その結果、hCD45⁺mCD45⁻細胞が検出され (図3A)、ヒト白血球の産生を確認した。また、B細胞系 (hCD19⁺hCD33⁻) および骨髄球系 (hCD33⁺hCD19⁻) の分化細胞も確認できた (図3B)。テラトーマ以外に解析した組織では、ヒト血液細胞の含有は確認できなかった。

以上の結果より、本研究で作製したテラトーマ内にはiPS細胞から分化したヒト血液細胞が含まれており、白血病の発症を模擬するための基本条件是満たしていると判断した。

(3) 前白血病状態および白血病化の誘導

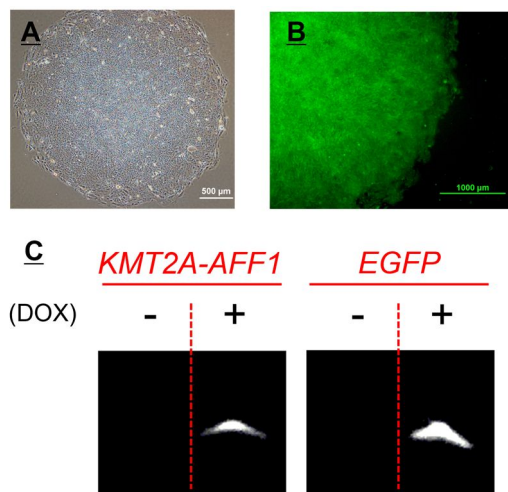


図2 KA発現ヒトiPS細胞株の樹立

- (A) 得られたコロニーの形態観察
- (B) DOX添加培地で培養した細胞の蛍光顕微鏡観察
- (C) DOX添加培地で培養した細胞から抽出したRNAを用いた逆転写PCR

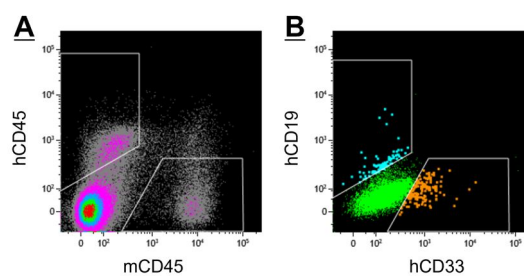


図3 ER発現ヒトiPS細胞由来のテラトーマに含まれた細胞のフローサイトメトリ解析

- (A) 生細胞 (7-AAD⁻) をhCD45およびmCD45で展開した結果
- (B) ヒト白血球 (hCD45⁺mCD45⁻) をhCD19およびhCD33で展開した結果

小児白血病は、胎児期に造血幹細胞もしくはより未分化な細胞にて最初の変異（ファーストヒット）が生じることで前白血病状態へ移行し、出生後に二次的な変異（セカンドヒット）が加わることで発症する。ER や KA といった染色体転座による融合遺伝子の出現はファーストヒットに相当する。そこで、テラトーマ形成マウスへの DOX の飲水投与により、テラトーマ内に産生された血液細胞に ER または KA の発現を誘導し、前白血病状態への移行を試みた。DOX の飲水投与下で飼育しテラトーマを育成させた後、テラトーマに含まれるヒト血液細胞を詳細に解析した結果、ER 発現ヒト iPS 細胞を移植したマウスのテラトーマでは、正常なヒト iPS 細胞由来のテラトーマと比較し、Pro-B 細胞後期から Pre-B 細胞に当たる CD10⁺細胞の割合が顕著に高かった（図 4）。CD19⁺細胞に対する CD10⁺細胞の割合が高かったことから、CD10⁺細胞から CD19⁺細胞への分化段階で障害が生じたと考えられ、ER の発現・作用により前白血病様の状態へと移行したことが示唆された。KA 発現ヒト iPS 細胞についても同様の検討を行った結果、KA 発現誘導下にて形成したテラトーマ内には CD19⁺細胞がほとんど検出されず、ER 発現細胞と比較し、より幼若な段階にて B 細胞分化に障害が生じていることが示唆された。これは、KA 陽性乳児白血病における特徴と一致した。

次に、前白血病様の状態への移行が示唆された ER 発現ヒト iPS 細胞由来のテラトーマに対し、変異原性を有するエチルニトロソウレア（ENU）および免疫原性を有するリポ多糖（LPS）によるセカンドヒットを誘導し、白血病化を検討した。テラトーマ形成マウスに対し ENU および LPS を腹腔内投与した場合にテラトーマ構成細胞にそれら薬剤が効率よく作用しないことが明らかとなったため、シリンジを用いてテラトーマ内部に直接投与した。DOX の飲水投与にて育成したテラトーマに 1 週間間隔で投与を繰り返した結果、コントロールと比較し、テラトーマ内部に顕著に多数の CD34 陽性の CD10⁺CD19⁺細胞が出現しており（図 5）、白血病に至る過程を誘導できた可能性が考えられた。しかし、テラトーマ周辺の骨髓やリンパ節、脾臓等の造血組織への当該細胞を含むヒト細胞の浸潤は確認されず、その他のエンドポイントも含め白血病病態の確認には至っていない。病態模擬にはより長期的にテラトーママウスを飼育することが必要と考えられたが、テラトーマの増大により細胞移植後 3 ヶ月程度で人道的エンドポイントに達するため、テラトーマ小片や細胞の二次移植など長期的モニタリング手法の検討が今後の課題として挙げられた。

以上より、転座遺伝子発現ヒト iPS 細胞を用いて作製したテラトーマ形成マウスを、小児白血病評価用 *in vivo* モデルとして活用するための道筋を得た。一方、テラトーマ内部で生じた変化、出現した細胞をより多面的且つ詳細に解析し、ヒト体内で生じるそれらとの類似性・相違点を慎重に確認していくことが必要と考えられた。

<引用文献>

- Takahashi M, Yamazaki S. Generation of a human induced pluripotent stem cell line, IMSUTi002-A-1, harboring the leukemia-specific fusion gene *ETV6-RUNX1*. *Stem Cell Res.* 2019, 101546.
- Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, Okabe M, Masaki H, Takai S, Otsu M, Nakauchi H. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther.* 2013, 21:1424-31.
- Amabile G, Welner RS, Nombela-Arrieta C, D'Alise AM, Ruscio AD, Ebraliidze AK, Kravtsov Y, Ye M, Kocher O, Neuberg DS, Khrapko K, Silberstein LE, Tenen DG. *In vivo* generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells. *Blood.* 2013, 121:1255-64.
- Takahashi M. Generation of a human induced pluripotent stem cell line harboring the

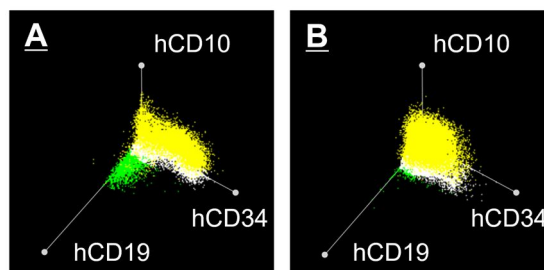


図 4 DOX 投与下で育成したオリジナル iPS 細胞 (A) または ER 発現 iPS 細胞 (B) 由来のテラトーマに含まれた細胞のフローサイトメトリ解析

mCD45⁺hCD33⁺細胞を hCD19, hCD10, hCD34 で展開した結果

緑：hCD19⁺hCD10⁺細胞 黄：hCD10⁺細胞

の分化段階で障害が生じたと考えられ、ER の発現・作用により前白血病様の状態へと移行したことが示唆された。KA 発現ヒト iPS 細胞についても同様の検討を行った結果、KA 発現誘導下にて形成したテラトーマ内には CD19⁺細胞がほとんど検出されず、ER 発現細胞と比較し、より幼若な段階にて B 細胞分化に障害が生じていることが示唆された。これは、KA 陽性乳児白血病における特徴と一致した。

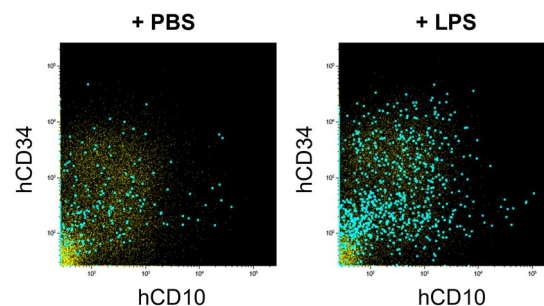


図 5 DOX 投与下で育成した ER 発現 iPS 細胞由来のテラトーマへの免疫原性物質 (LPS) 投与にて出現した細胞評価

mCD45⁺細胞を hCD10, hCD34 で展開した結果
水色：hCD19⁺hCD33⁺細胞

infant leukemia-associated fusion gene, *KMT2A-AFF1* (IMSUTi002-A-2). Stem Cell Res. 2023, 103185.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi Masayuki	4. 巻 71
2. 論文標題 Generation of a human induced pluripotent stem cell line harboring the infant leukemia-associated fusion gene, KMT2A-AFF1 (IMSUTi002-A-2)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 103185 ~ 103185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2023.103185	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔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 Masayuki Takahashi
2. 発表標題 Efforts in CRIEPI to elucidate the causal relationship between power-frequency magnetic field and childhood leukemia
3. 学会等名 CIGRE 2023 Sendai Colloquium (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山崎 聡 (Yamazaki Satoshi) (50625580)	筑波大学・医学医療系・客員教授 (12102)	

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
---------	---------