

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591373

研究課題名(和文)患者由来iPS細胞を利用した骨髄異形成症候群病態解析モデルの構築

研究課題名(英文)Establishment of a patient-derived iPS cells for simulating myelodysplastic syndrome

研究代表者

東條 有伸(Tojo, Arinobu)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：00211681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：疾患特異的iPS細胞樹立のため、新規構築した2種類のレンチウイルスベクター(EF1プロモーターまたはTet-Onプロモーターで4種類の初期化因子を発現する)のいずれかをMDS-RCMD3例、RARS1例、MDS/MPD1例、CML1例から採取したCD34+細胞に感染させた。ウイルス感染後iPS細胞類似の形態を示す細胞塊が出現したものの、継代を重ねるとコロニーは退縮し、細胞株の樹立に至らなかった。そこで、初期化因子の発現をセンダイウイルスベクター(SeDV)システムに変更したところ、1例のMDS-RCMD患者CD34+細胞からiPSCの樹立に成功した。

研究成果の概要(英文)：Lentiviral vectors expressing 4 reprogramming factors (Oct4, Sox3, Klf4 and c-Myc) driven by constitutive (EF1a) or inducible (Tet-on) promoter were newly prepared. We tried to reprogram CD34+ cells from 5 patients with MDS (RCMD 3, RARS 1, and MDS/MPD 1) as well as 1 patient with CML-CP by infection with either lentiviral vector. In each case, a number of cell mass resembling iPSC colony appeared over the MEF layer within 3 weeks of culture, but, unfortunately, none of these iPSC-like colonies developed stable cell lines. Then, we took alternative method using a Sendai virus that does not integrate into the host genome. As a result, a patient-derived iPSCs were successfully established from a male patient with RCMD at the very end of the research periods. Since the patient's bone marrow cells revealed normal karyotype, comparative genetic examination between the patient's granulocytes (MDS clone), T cells (normal clone) and iPSCs are required to identify the true origin of iPSCs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：iPS細胞 骨髄異形成症候群(MDS) 初期化因子 レンチウイルスベクター センダイウイルスベクター
- CD34+細胞

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(MDS)は、無効造血で代表される慢性難治性の血球減少症(造血障害)と急性骨髄性白血病(AML)への高率な進展を特徴とするが、多くの病型に分類される不均一な疾患群であり、さらに同じ病型でも個々の臨床像や予後はきわめて多彩である。MDSの発症基盤には病的幹細胞からのクローン性増殖と分化成熟過程でのアポトーシス亢進、ゲノム不安定性が存在することが示唆されてきた。MDS症例の約半数で染色体異常が認められ、5qの欠失やトリソミー8、3q転座または逆位、7、20q、17pそれぞれの欠失が比較的高頻度に検出される。しかし、本研究を開始する時点で、MDS発症に関与する遺伝子異常は、5q-症候群におけるRPS14の発現低下や3q26転座におけるEVI1の過剰発現などを除いてあまり解明されていなかった。いっぽう、DNAメチル化やヒストンアセチル化などエピゲノムの制御異常と造血微小環境の変化がMDSの病態形成に関与している可能性が注目されつつあった。例えば、MDSではがん抑制遺伝子p15^{INK4B}プロモーター領域のメチル化頻度が疾患の進行に伴って増加するという報告やMDS骨髄ストローマ細胞によるTNF α 、VEGFなどのサイトカイン産生能異常を指摘する報告がある。さらに、DNAメチル化阻害剤(5-アザシチジンとデシタピン)ならびに免疫超節薬レナリドミドがMDSにおいて血液学的改善効果を示し、AMLへの進行を抑制するという臨床成績が示され、特に後者は細胞遺伝学的効果をもたらすほど著効を示す点が病態生理の観点から注目された。

以上のようにMDSの病態解明へ向けてさまざまなアプローチがなされていたが、病態形成の根幹である病的幹細胞の特性に関する知見はAMLと比較してあまり進歩が見られていない。その理由として、①MDSクローン由来の幹細胞分画を必要数純化することが物

理的に困難であること、②幹細胞分画に混入する正常クローンの割合が症例毎に異なる可能性、③試験管内コロニー形成法や長期培養法におけるMDSクローンの増殖は症例毎に不良～亢進と極めて多様であり、②の理由もあって正確な評価ができないこと、④免疫不全マウスへの生着率が低く造血再構築が困難であること(特に非進行期MDSの場合)などが挙げられる。

このようなMDS研究における制約を考えると、その病態解明にはMDSクローン由来の病的幹細胞を用いて血球分化誘導系を構築することが望まれる。以前は実現不可能であった当該課題もiPS細胞技術を利用すれば可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、RCMDなど造血障害を主体とする非進行期MDSを対象として病的細胞クローン由来iPS細胞を樹立し、これらを試験管内で造血幹～前駆細胞や成熟血球へ分化誘導するシステムを構築することを主目的とする。

3. 研究の方法

①患者細胞の収集

文書による研究協力への同意が得られたMDS症例(可能であればFISH法で識別可能な染色体異常を有する非進行期例)より骨髄液ならびに末梢血液を取得し、CD34⁺前駆細胞(MDSクローン)とTリンパ球(正常クローン)をそれぞれ調整する。本研究は、東京大学医科学研究所ゲノム倫理審査委員会より承認された課題「難治性造血器疾患由来iPS細胞の樹立とiPS細胞を用いた病態解析(承認番号21-9-0618)」にもとづく。

②初期化因子導入用レンチウイルスベクターの構築

EF1 α プロモーターによる恒常的発現レンチウイルスベクターCSII-EF-MCSならびにドキシサイクリン(DOX)誘導性レンチウイルスベクターCSII-TetO-MCSの3'LTR内にloxP配列をそれぞれ挿入したベクター(CSII-EF-MCS-loxPおよびCSII-TetO-MCS-loxP)は既に当教室にお

いて構築されたものを用いた。ゲノムに挿入された後 loxP に挟まれたベクター配列が Cre リコンビナーゼで切り出されることも当該ベクターで樹立したマウス iPS 細胞において確認している。豚テシヨーウイルス 1(PTV1)由来の 2A 配列を挟んで 4 種類のヒト初期化因子(Oct4、Klf4、Sox2、Myc) cDNA をタンデムにつないだ融合 cDNA を Chang (Stem Cells 27:1042-9, 2009) らの方法に準じて作製し、上記ベクターのプロモーター下流に挿入した。[2A 配列の作用で融合 cDNA の転写産物から 4 つの初期化因子が翻訳される。パッケージングプラスミドおよび VSV-G 外被タンパク質発現プラスミドと共に 293T 細胞へ導入して感染ウイルスを調整した。同時に、DOX 応答配列に結合するリバーステトラサイクリン・トランスアクチベーター(rtTA)を EF1 α プロモーターから発現するレンチウイルスベクター (CS-EF-rtTA-loxP)も調整した。[レンチウイルスが感染細胞のゲノムに陥入すると両端の LTR 内に loxP が配置されるため、Cre リコンビナーゼの一過性発現によって loxP に挟まれたベクター由来配列がゲノムから除去される。]

③レンチウイルスによる初期化因子の導入

293T 細胞の培養上清中に含まれるレンチウイルス粒子を超遠心にて濃縮精製し、DNA titer 測定後に凍結保存したロットを 6 ヶ月以内に使用した。2x10⁴~10⁵ 個程度の細胞に MOI=1~5 で約 2 時間感染させ、これを 12 時間間隔で 2 回繰り返した。CD34⁺細胞は予め SCF(50ng/ml)、Flt3L(10ng/ml)、TPO(20ng/ml)で 1~2 日間刺激しておき、感染 3 日後にフィーダー細胞上に撒き、5 日後に β FGF 含有 ES 培養液に交換して以後 2~3 日おきに培地交換しながら培養を継続した。

④センダイウイルスベクターによる初期化

医科学研究所ステムセルバンク（大津 真准教授）との共同研究として、産業技術総合研究所より提供された初期化因子を発現するセンダイウイルス (SeV) ベクターを用いて既報 (Proc Jpn Acad Ser B85, 2009) に準

じて行った。作製効率をあげるためヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害活性を有するバルプロ酸を添加し、iPS 細胞から SeV を完全に除去するためウイルス特異的 siRNA 処理を 2 回行った。

⑤iPS 細胞の樹立

感染約 3 週間後よりヒト ES 細胞様の単層コロニーが出現し始めたら顕微鏡下でピックアップし、別の培養皿に用意したフィーダー細胞上に撒く。細胞増殖が認められたら週に 2 回程度継代した。

4. 研究成果

①患者細胞の調整

疾患特異的 iPS 細胞作製の趣旨を理解して同意書に署名された患者さんから提供いただいた検体のうち、これまで MDS-RCMD 3 例、RARS 1 例、MDS/MPD 1 例、CML-CP 2 例から採取・分離保存した骨髄 CD34⁺細胞を、前述したいずれかのウイルスベクターによる iPS 細胞作製に用いた。また、マウス胎仔から iPS 細胞支持用の線維芽細胞 (MEF) を多数調整し、凍結保存した。

②初期化因子導入用レンチウイルスベクターの調整

当教室で作製した CS-EF-4F3A-loxP は、豚テシオウイルス由来の 2A ペプチドを挟んで 4 つの初期化因子 (Oct4、Klf4、Sox2、c-Myc) を連結したポリシストロンを EF-1 α プロモーターを用いて発現するレンチウイルスベクターである (図 1)。

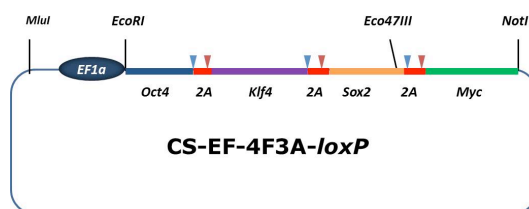


図 1 CS-EF-4F3A-loxP の模式図

これをパッケージングプラスミドおよび VSV-G 発現プラスミドと共に 293T 細胞へ導入して感染ウイルスを調整後、濃縮したロットを凍結保存した。

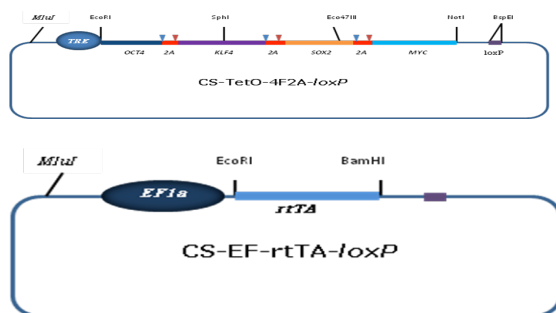


図 2 CSII-TetO-4F3A-loxP と CS-EF-rtTA-loxP の模式図

同様の手法により、DOX 添加により初期化因子の発現を誘導するベクターCSII-TetO-4F3A-loxP を構築した。同時に、DOX 応答配列に結合するリバーステトラサイクリン・トランスアクチベーター(rtTA)を EF1 α プロモーターから発現するレンチウイルスベクター (CS-EF-rtTA-loxP)も調整した(図 2)。

③疾患特異的 iPS 細胞の作製

MDS、特に RCMD や RARS に代表される低悪性度 MDS に由来する iPS 細胞の報告はこれまでなく、MDS/MPD のように悪性度の高い病型に限られている。そこで、今回のシステムがうまく働くかどうか検証する目的も含めて、既に報告されている CML-CP 由来 CD34+細胞の初期化を試みた。CML 患者の骨髓 CD34+細胞から CML-iPSC の樹立を試みた。TKI 投与後の経過より、ニロチニブ感受性の症例とニロチニブを含む 3 種類の TKI 抵抗性 (primary resistant で ABL キナーゼドメイン変異は検出できない) の各 1 症例から採取したサンプルを用いて、CS-EF-4F3A-loxP ウイルスを感染させた。いずれのサンプルを用いた場合も、iPSC 様細胞が出現した(図 3)が、新たな MEF 上に播種継代して細胞株を樹立する過程で、いずれも増殖が止まり iPSC の樹立に至っていない(図 4)。RARS 1 例、MDS/MPD 1 例についても樹立を試みたが、同様の結果であった。本ベクターシステムによる iPSC 樹立がこれらの患者細胞で上手くいかなかった原因が、細胞特性の差異に因るか否かは現時点で不明である。

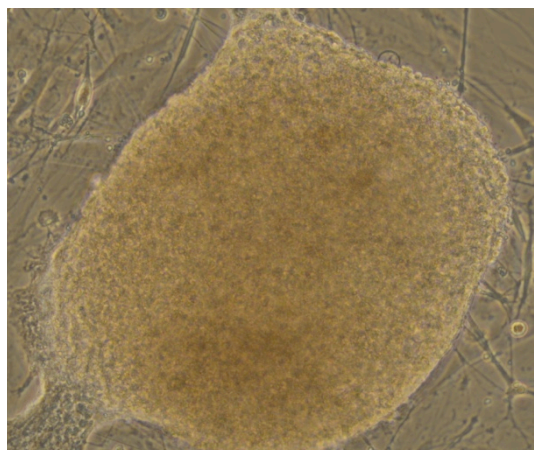


図 3 MEF 上で 2 回継代後の CML-iPS 様細胞

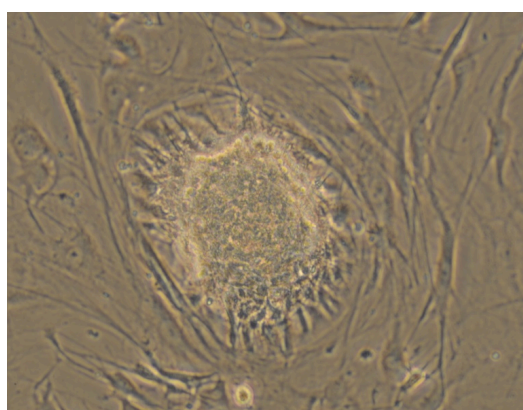


図 4 5 回継代後に増殖停止した CML-iPS 様細胞

EF-1 α プロモーターは ES 細胞や iPSC でも働くことから、内在性の発現と併せて初期化因子の発現レベルが高いことが CML-iPSC 樹立を阻害する可能性を考慮して、これ以降 Tet-On (ドキシサイクリン依存性の発現) システム(図 2)に変更した。

そこで、2 例の MDS-RCMD 患者由来 CD34+細胞に対して Tet-on システムを用いた。やはりウイルス感染後 iPSC 類似の形態を示す細胞塊が出現したものの、いずれも継代を重ねると P2~3 でコロニーは退縮し、iPS 細胞の樹立はできなかった。同一検体を用いて 2 度繰り返したが、同様の結果であった。この理由が、MDS 特有のエピゲノムの変化を含む細胞特性の差異に因るか否かは不明であるが、この時点でレンチウイルスをあきらめ、センダイウイルスベクター (SeDV) に変更し、医科

研システムセルバンクとの共同研究として行った。本研究期間の期限ぎりぎりに MDS-RCMD 患者 CD34+細胞由来 iPSC の樹立に成功した。しかしながら、本症例はマーカーとなる染色体異常がないため、樹立された iPSC が MDS クローン由来か、残存する正常細胞由来かの判別は遺伝子解析を要する。現在、RCMD で比較的高頻度に検出されるスプライシング関連遺伝子等の変異の有無を患者 DNA 検体についてスクリーニングしている。

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 10 件)

1. Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Oyaizu N, Asanuma S, Yamagishi M, Yamochi T, Watanabe N, Tojo A, Watanabe T, Uchimaru K. CADM1 expression and stepwise down-regulation of CD7 is closely associated with clonal selection of HTLV-1-infected T cells potentially evolving into adult T cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res*. 20(11):2851-2861, 2014
2. He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Yuzawa M, Yamamoto Y, Yorozu P, Tojo A. Stage-Specific Embryonic Antigen 4 is not a marker for proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 20(7-8): 1314-24, 2014
3. Yokoyama K, Yokoyama N, Izawa K, Kotani A, Harashima A, Hozumi K, Tojo A. *In vivo* leukemogenic potential of an interleukin-7 receptor- α mutant in hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*. 22(26):4259-63, 2013
4. Okuyama K, Ikawa T, Harnprasopwat R, Lu J, Yamashita R, Ha D, Toyoshima T, Chanda B, Kawamata T, Yokoyama K, Gertner B, Wang S, Ando K, Lodish HF, Tojo A, Kawamoto H, Kotani A. miR-126-mediated control of cell fate in B cell-myeloid progenitors as a potential alternative to transcriptional factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(33):13410-5, 2013
5. Chen MH, Soda Y, Izawa K, Kobayashi S, Tani K, Maruyama K, Tojo A, Asano S. A versatile drug delivery system using streptavidin-tagged pegylated liposomes and biotinylated biomaterials. *Int J Pharm*. 454(1):478-85, 2013
6. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimaru K. The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I. *PLoS One*. 8(1):e53728, 2013
7. Hinohara K, Kobayashi S, Kanauchi H, Simizu S, Nishioka K, Tsuji E, Tada K, Umezawa K, Mori M, Ogawa T, Inoue J, Tojo A, Gotoh N. ErbB/NF- κ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:6584-9, 2012
8. Kawamata T, Jun L, Sato T, Tanaka M, Nagaoka H, Agata Y, Toyoshima T, Yokoyama K, Oyaizu N, Nakamura N, Ando K, Tojo A, Kotani A. Imatinib mesylate directly impairs class switch recombination through downregulation of AID. *Blood*. 119:3123-7, 2012
9. Tsai HJ, Kobayashi S, Izawa K, Ishida T, Watanabe T, Umezawa K, Lin SF, Tojo A. Bioimaging analysis of NF- κ B activity in Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cells unveils its synergistic up-regulation by TNF α -stimulated changes to the microenvironment. *Cancer Sci*. 102:2014-21, 2011
10. Inoue Y, Sheng F, Kiryu S, Watanabe M, Harnprasopwat R, Izawa K, Tojo A, Ohtomo K. Gaussia luciferase for bioluminescence tumor monitoring in comparison with firefly luciferase. *Mol Imaging*. 10:377-85, 2011

[学会発表] (計 16 件)

<国内>

1. 東條有伸、『造血幹細胞移植医療の最先端と課題』第 100 回日本病理学会総会(横浜)ワークショップ 13 2011 年 4 月 30 日
2. 東條有伸、『CML イマチニブ治療の現状と展望』第 73 回日本血液学会学術集会(名古屋)教育講演 2011 年 10 月 16 日
3. 小林誠一郎、東條有伸、他. 口演 「CD7 vs CADM1 in FACS reflects multi-step oncogenesis of ATL and discriminates HTLV-1 infected cells」2012/10/19 (金) 第 74 回血液学会学術集会
4. 何海萍、東條有伸、他. ポスター 「Characterization of stem cell in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells」2012/10/19 (金) 第 74 回血液学会学術集会
5. Chanda Bidisha、東條有伸、他. 「Impairment of T cell development in chronic myeloid leukemia, partial explanation by in vitro model」2012/10/20 (土) 第 74 回血液学会学術集会

6. マイクロ RNA 制御性ワクシニアウイルスは多発性骨髄腫細胞選択的に細胞死をもたらす. 二見 宗孔、中村 貴文、東條 有伸. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013. 10. 3-5. 横浜
7. 湯地晃一郎、佐藤広太、城 憲秀、小林真之、磯部優理、島田直樹、石橋通宏、小沼貴晶、大野伸広、小林誠一郎、小柳津直樹、内丸 薫、東條有伸. Mantle cell lymphoma with hypersensitivity to mosquito bites in the elderly: a distinct entity Mantle cell lymphoma with hypersensitivity to mosquito bites in the elderly: a distinct entity. 第 75 回日本血液学会学術集会、2013. 10. 11-13、札幌
8. 佐藤広太、湯地晃一郎、津田真由子、大野伸広、内丸 薫、東條有伸. Marked Eosinophilia Caused by Interleukin-5-producing Cardiac Myxoma. 第 75 回日本血液学会学術集会、2013. 10. 11-13、札幌
9. 小林真之、佐藤広太、川俣豊隆、湯地晃一郎、大野伸広、高橋 聡、内丸 薫、東條有伸. Clinical profile of adult Langerhans cell histiocytosis: A single-institute experience in Japan 第 75 回日本血液学会学術集会、2013. 10. 11-13、札幌
10. Haiping He、長村登紀子、角田 肇、湯沢美紀、山本由紀、東條有伸. SSEA4 is not a marker for proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived MSCs. 第 75 回日本血液学会学術集会、2013. 10. 11-13、札幌
<国外>
11. Tojo A. "New insights into Bcr-Abl-mediated transformation of hematopoietic cells using regulatable Bcr-Abl". The seasonal combined conference of the Hematology Society and Blood and BM transplantation Society of Taiwan. Dec 12, 2011. <Keynote Speech>. Kaohsiung, Taiwan
12. Bidisha C, Izawa K, Harnprasopwat R, Takahashi K, Kobayashi S, Kanegae Y, Saito I, Tojo A. Bcr-Abl impairs T cell development from murine induced pluripotent stem cells; a possible explanation for T cell escape from leukemic clone in chronic myeloid leukemia. 9th ISSCR (International Society for Stem Cell Research) Annual Meeting. Jun 16, 2011 <Poster Presentation>. Toronto, Canada
13. Yokoyama K, Yokoyama N, Izawa K, Kotani A, Harnprasopwat R, Harashima A, Kobayashi S, Tojo A. The in vitro and in vivo oncogenic activity of homodimeric mutant of interleukin-7 receptor a chain (IL7R α) highlights the significance of the IL7R α /Jak1 pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia. 53rd American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition. Dec 11, 2011 <Oral Presentation>. San Diego, USA
14. Bidisha C, Izawa K, Harnprasopwat R,

Takahashi K, Kobayashi S, Kanegae Y, Saito I, Tojo A. Bcr-Abl impairs T cell development from murine induced pluripotent stem cells and hematopoietic stem cells; a partial explanation for the concept that Ph⁺ clone never involves T cell lineage in CML. 53rd ASH (American Society of Hematology) Annual Meeting and Exposition. (San Diego, USA) Dec 12, 2011 <Poster Presentation>

15. He H, Nagamura-Inoue T, Yamamoto Y, Mori Y, Tsunoda H, Tojo A. The immunosuppressive effect of Wharton Jelly-derived mesenchymal stem cells in vitro. The 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2013.12.7-10, New Orleans, USA

16. Izawa K, Yamamoto M, Tojo A. Long-term ex vivo maintenance of murine iPSC-derived hematopoietic stem/progenitor cells by conditional HoxB4. The 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2013.12.7-10, New Orleans, USA

[図書] (計 3 件)

1. 東條有伸 イマチニブ (相羽恵介編) 「抗がん剤の臨床薬理」南山堂 pp458-65, 2013
2. 東條有伸 造血因子 (直江知樹、小澤敬也、中尾真二編) 「血液疾患 最新の治療 2014-2016」南江堂 pp62-65, 2013
3. 東條有伸 序にかえて～G-CSF の発見から臨床応用へ～ (東條有伸編) 「G-CSF の基礎と臨床」医薬ジャーナル社 pp1-6, 2013

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東條 有伸 (TOJO, Arinobu)

東京大学医科学研究所 分子療法分野・教授
研究者番号: 00211681

(2) 連携研究者

小林 誠一郎 (KOBAYASHI Seiichiro)

東京大学医科学研究所 分子療法分野・助教
研究者番号: 70376622

(3) 連携研究者

伊澤 清子 (IZAWA Kiyoko)

東京大学医科学研究所 分子療法分野・特任
研究員
研究者番号: 20534415