

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011

課題番号：23659514

研究課題名（和文） 疾患特異的 iPS 細胞を用いた若年性骨髄単球性白血病の病態解析と治療法の開発

研究課題名（英文） Analysis of pathogenesis of juvenile myelomonocytic leukemia and establishment of its treatment using disease-specific iPS cells

研究代表者

海老原 康博 (EBIHARA YASUHIRO)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：40302608

研究成果の概要（和文）：恒常的活性化 RAS が若年性骨髄単球性白血病（JMML）の特異な病態を惹起するメカニズムを解明するために、NF1 遺伝子のヘテロ変異を有する 1 型神経線維腫症患者の体細胞から iPS 細胞（NF1-iPS 細胞）を作製することを試みたが、その樹立は困難であった。今後、センダイウイルスベクターの使用、さらには導入遺伝子の変更などにより NF1-iPS 細胞の樹立を目指していく予定であるが、今回の結果は、NF1 遺伝子変異が核のリプログラミングが起こりにくい状況を形成している可能性を示唆しているのかもしれない。

研究成果の概要（英文）： To clarify the mechanisms in which the continuous activation of GM-CSF receptor-RAS pathway induces juvenile myelomonocytic leukemia (JMML), we tried to establish induced pluripotent stem cells derived from patients with type 1 neurofibromatosis (NF1-iPS cells) possessing a heterozygous mutation of NF1. However, NF1-iPS cells were not established in spite of several times of transduction experiments. We are now using Sendai virus vectors for the transduction of various reprogramming factors into somatic cells of NF1 patients, but our result may suggest a possibility that NF1 mutation may suppress the nuclear reprogramming.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：若年性骨髄単球性白血病、iPS 細胞、1 型神経線維腫症、NF1

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 若年性骨髄単球性白血病（JMML）は、乳幼児期に特有のまれな造血器腫瘍で、骨髄異形成症候群（MDS）と骨髄増殖性疾患（MPD）の両者の性状を併せ持つ特異な病態を呈する。予後は極めて不良で、現時点で、造血幹細胞移植が唯一の有効な治療法であるが、その移植患者も約半数は移植後再発するため、新たな治療法の開発が切望されている。

JMML 細胞の異常増殖は、GM-CSF に対する高感受性に起因し、この特性は、大部分の JMML 患者の腫瘍細胞が GM-CSF 受容体-RAS シグナル経路に係る分子をコードする遺伝子の変異を有することにより、RAS が恒常的に

活性化されていることで説明される。中でも、活性化型 RAS を不活化する GTP 加水分解酵素である neurofibromin をコードしている NF1 遺伝子の変異は、JMML 患者の約 30% に認められる。しかし、恒常的に活性化された RAS 蛋白が JMML の病態を惹起するメカニズムについてはほとんど解明されておらず、このことが JMML の治療法の開発の大きな障害となっている。

(2) 我々は、これまでに、JMML 患者の診療を行い (J Pediatr hematol Oncol, 2004)、病因・病態の解析、特に JMML における恒常活性化 RAS の機能について研究してきた (Br J

Haematol, 2005; Blood, 2005)。しかし、そうした経験から、最終的な異常の結果としての JMML 細胞の解析だけでは JMML の本態を解明することは困難であり、in vitro でプロスペクティブに JMML の病態を構築することが、病態解析の大きなブレイクスルーになるのではないかと考えた。特に JMML 患者では、遺伝子変異は胎生期からすでに発生していると考えられることから、我々は、胎生期造血における JMML の原因遺伝子の変異を再現することにより、JMML の病態をプロスペクティブに構築することが、JMML の本態を解明し、新たな治療法の開発に繋がるのではないかと着想した。

(3) 一方、我々は、胎生期の未分化な幹細胞から樹立されるヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) や、体細胞の核リプログラミングによって作製される、ヒト ES 細胞と同様の性質を有する人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の研究を行い、その樹立や造血/血液細胞への分化誘導について研究してきた (Proc Natl Acad Sci USA, 2008; Stem Cells, 2008, Int J Hematol, 2007)。そこで、1 型神経繊維腫症は、JMML の原因遺伝子である *NFI* 遺伝子のヘテロ変異を有することから (実際、1 型神経繊維腫症患者では JMML の発症頻度が高い)、我々がこれまでに培ってきたヒト ES 細胞や iPS 細胞の基盤技術を応用して、1 型神経繊維腫症患者由来 iPS 細胞を用いて、JMML の研究を行うことを計画した。

## 2. 研究の目的

1 型神経繊維腫症患者の体細胞から樹立した iPS 細胞 (NF1-iPS 細胞) の NF1 遺伝子発現をノックダウンした KD-NF1-iPS 細胞を作製し、これを造血/血液細胞へ分化誘導することにより JMML の病態発生を再現し、これを解析することにより、JMML 発症の本態を解明し、これを基盤とする治療法を開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) 1 型神経繊維腫症患者由来 iPS 細胞 (NF1-iPS 細胞) の樹立

米国 Indiana 大学小児科 Yang Feng-chun 教授と連携研究者の辻との共同研究により入手された 1 型神経繊維腫症患者由来繊維芽細胞に、Oct3、Sox2、Klf4 の 3 因子、あるいは Oct3、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 因子を導入して、1 型神経繊維腫症患者由来 iPS 細胞の樹立する。

### (2) 樹立された NF1-iPS 細胞の *NFI* 遺伝子ノックダウン

樹立された NF1-iPS 細胞から、shRNA 法などを用いて、*NFI* 遺伝子ノックダウン 1 型神経繊維腫症患者由来 iPS 細胞 (KD-NF1-iPS 細胞)

を樹立する。

### (3) KD-NF1-iPS 細胞からの造血/血液細胞の分化誘導

マウス胎仔造血組織由来ストローマ細胞との共培養法により (Ebihara Y, et al: Proc Natl Acad Sci USA, 2008)、ヒト ES 細胞、健康人由来 iPS 細胞、NF1-iPS 細胞、KD-NF1-iPS 細胞から造血/血液細胞を分化誘導する。

### (4) 造血/血液細胞の分化過程の解析

NF1-iPS 細胞、KD-NF1-iPS 細胞の造血/血液細胞への分化過程を、ヒト ES 細胞、健康人由来 iPS 細胞をコントロールとして、以下のような方法で、比較検討する。

#### 細胞生物学的解析

##### 1) 造血幹細胞への分化の検討

分化誘導された細胞を、免疫不全マウス (nod-scid マウス、または NOG マウス) に移植して、レシピエントマウスにおけるヒト造血の生着を、フローサイトメトリー、RT-PCR 等を用いて解析することにより、その造血幹細胞活性を比較検討する。ヒト造血の生着が確認されたレシピエントマウスについては、末梢血細胞や骨髄細胞のフローサイトメトリーなどにより、造血幹細胞の各血液細胞系列への分化能について検討する。さらに、ヒト GM-CSF を投与し、JMML の発症について検討する。

##### 2) 造血前駆細胞への分化の検討

分化誘導された細胞を血液コロニー形成法で培養し、その造血前駆細胞活性を比較検討する。また、分化誘導された造血前駆細胞については、ヒト GM-CSF に対する感受性について解析し、JMML 細胞の出現について検討する。

##### 3) 成熟血球への分化の検討

分化誘導された細胞を種々の造血因子 (stem cell factor、インターロイキン 3、flk2/flk3 リガンド、エリスロポエチン、トロンボポエチン、顆粒球コロニー刺激因子など) 存在下で液体培養し、その成熟血球産生能を、形態学的観察、細胞組織染色、フローサイトメトリーなどにより比較検討する。さらに、ヒト GM-CSF を種々の濃度で添加し、JMML 細胞の出現について検討する。

#### 分子生物学的解析

分化誘導された iPS 細胞に発現している造血/血液細胞の分化に関わる種々の遺伝子、特に GM-CSF 受容体-RAS シグナル経路に関連する遺伝子の発現を、RT-PCR、網羅的遺伝子発現解析、リアルタイム PCR などにより比較検討する。特に、ヒト GM-CSF 刺激により、JMML 細胞が発生した場合は、その発生に関わる遺伝子 (群) を、上記と同様の方法で検出する。

#### (5) JMML の新規治療法の開発

上記の検討から明らかとなった JMML の発症メカニズムを標的として、KD-NF1-iPS 細胞から造血/血液細胞への分化を正常化（ヒト ES 細胞、あるいは健常人由来 iPS 細胞をコントロールとする）する薬剤、分子生物学的方法を検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究は、東京大学医科学研究所倫理審査委員会の承認を得て、実施された（承認課題番号：21-64-0218）。米国 Indiana 大学小児科 Yang Feng-chun 教授と連携研究者の辻との共同研究により入手された 1 型神経繊維腫症患者由来繊維芽細胞に、レトロウイルスベクターを用いて、Oct3、Sox2、Klf4 の 3 因子、あるいは Oct3、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 因子を導入して、NF1-iPS 細胞の樹立を数回にわたり試みたが、樹立できなかった。

(2) そこで、1 型神経繊維腫症患者由来繊維芽細胞の播種細胞数、ウイルスタイターなどを様々に変更して、iPS このことは、NF1 遺伝子の変異によって核のリプログラミングが惹起されにくい状況が引き起こされている可能性が示唆された。

(3) 今後は、センダイウイルスベクターなどのレトロウイルスベクター以外のベクターを用いたリプログラミング遺伝子の導入、さらには導入遺伝子の変更などにより、NF1-iPS 細胞の樹立を目指していく予定である。

#### 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 8 件）

- ① Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, et al. (11 名 1 番目) : Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent and young adult patients with hematologic malignancies: A single institute analysis. *Leuk Res.* 査読有 36: 128-131, 2012  
DOI: 10.1016/j.leukres.2011.09.016
- ② Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., et al. : (20 名 19 番目) In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling.

*Blood* 査読有 119:e45-56, 2012

DOI: 10.1182/blood-2011-09-381400

- ③ Umamoto T, Yamato M, Ishihara J, et al. (15 名 14 番目) : Integrin  $\alpha v \beta 3$  regulates thrombopoietin-mediated maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 査読有 119:83-94, 2012  
DOI: 10.1182/blood-2011-02-335430
- ④ Takayama N, Eto K: In vitro generation of megakaryocytes and platelets from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol* 査読無 788:205-217, 2012  
DOI: 10.1007/978-1-61779-307-3\_15
- ⑤ Tsuda, M., Ebihara, Y., Mochizuki, S., et al. (6 名 2 番目) : Reduced dose chemotherapy for acute promyelocytic leukaemia with adult Down syndrome. *Br J Haematol.* 査読有 155: 130-132, 2011  
DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08655.x
- ⑥ Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Tamura D, et al. (21 名 7 番目) : Seroprevalence of pandemic 2009 (H1N1) influenza A virus among schoolchildren and their parents in Tokyo, Japan. *Clin Vaccine Immunol.* 査読有 18: 860-866, 2011  
DOI: 10.1128/CVI.00428-10
- ⑦ Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, et al. (12 名 5 番目) : Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the  $\alpha IIb \beta 3$  receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood* 査読有 117:5479-5484, 2011  
DOI: 10.1182/blood-2010-12-323691
- ⑧ Takayama N., Eto K., Nakauchi H. : Potential usefulness of human iPS cells on the generation of platelets. *Nihon Rinsho* 査読無 69:2161-2165, 2011  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22242314>

〔学会発表〕（計 27 件）

- ① 望月慎史 他: 3 回の同種臍帯血移植後の再発 ALL に対し非寛解期での T 細胞非除去 HLA 半合致移植を施行した一例 第 34 回日本造血細胞移植学会 2012 年 2 月 24-25 日 大阪: 大阪国際会議場
- ② 前浩史 他: 成人臍帯血移植患者におけるポリコナゾールとシクロスポリン併用療法の安全性評価 第 34 回日本造血

- 細胞移植学会 2012年2月24-25日  
大阪：大阪国際会議場
- ③ 前浩史 他:成人臍帯血移植患者におけるアンホテリシンBリポゾーム製剤投与の有効性と安全性の評価. 第34回日本造血細胞移植学会 2012年2月24-25日 大阪：大阪国際会議場
- ④ Hiramoto T., et al. : Suppressed neutrophil development in hematopoiesis of induced pluripotent stem cells derived from a severe congenital neutropenia patient with ELA2 mutation. 53<sup>rd</sup> ASH Annual Meeting December 10-13, 2011 San Diego, USA
- ⑤ Takahashi S., et al. : Matchie HLA Haplotype Contributes to Reduce Severely Acute GVHD with Conserving GVL Effect in HLA-Mismatched Cord Blood Transplantation. 53<sup>rd</sup> ASH Annual Meeting December 10-13, 2011 San Diego, USA
- ⑥ Nakamura S., et al. : Platelet Production System Using an Immortalized Megakaryocyte Cell Line Derived From Human Pluripotent Stem Cells. 53<sup>rd</sup> ASH Annual Meeting (招待講演) December 10-13, 2011 San Diego, USA
- ⑦ Takayama N., et al. Modeling Congenital Amegakaryocytic Thrombocytopenia Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells 53<sup>rd</sup> ASH Annual Meeting December 10-13, 2011 San Diego, USA
- ⑧ Ishihara J., et al. Nov/CCN3 Enhances Long-Term Repopulating Activity of Mouse Hematopoietic Stem Cells Via Intergin  $\beta$ 3 Signaling Collaborating with Thrombopoietin. 53<sup>rd</sup> ASH Annual Meeting December 10-13, 2011 San Diego, USA
- ⑨ Hirata S., et al. Direct and Continuous Inhibition of ADAM17 Using a Novel Selective Inhibitor Restores Functional Platelet Yield From Human Pluripotent Stem Cells. 53<sup>rd</sup> ASH Annual Meeting December 10-13, 2011 San Diego, USA
- ⑩ Endo H., et al. Stepwise Signaling and Low Oxygen Promote Hematopoietic Progenitor Emergence From Human Pluripotent Stem Cells. 53<sup>rd</sup> ASH Annual Meeting December 10-13, 2011 San Diego, USA
- ⑪ Nishimura T., et al. In Vitro Generation of Mature T Lymphocytes From Human Ips Cells and Genetic Analysis of TCR Gene Rearrangements. 53<sup>rd</sup> ASH Annual Meeting December 10-13, 2011 San Diego, USA
- ⑫ Eto K. Production of platelets from stem cells. The XXI<sup>Ind</sup> Regional Congress of the ISBT November 20-23, 2011 Taipei, Taiwan
- ⑬ Eto K. : Potential application of human iPS cell-derived blood cells and evaluation system in mouse xenogeneic transplantation models. The 3<sup>rd</sup> International Workshop on Humanized Mice(招待講演) October 28-31, 2011 Pittsburgh, USA
- ⑭ 江藤浩之 : まれな血液型およびHLAタイプ患者のためのiPS細胞技術を用いた新しい輸血システム開発 第18回日本血液代替物学会年次大会 2011年10月27日 北海道：北海道大学医学部学友会館フラテ
- ⑮ Nakamura S., et al. : Platelet transfusion system using an immortalized megakaryocyte cell line derived from hESCs/iPSCs 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14-16日 名古屋：名古屋国際会議場
- ⑯ 望月慎史 他: Analysis of impaired hematopoiesis in Down syndrome using patient iPSCs. 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14-16日 名古屋：名古屋国際会議場
- ⑰ 河北敏郎 他: GVL effect” closely related with moderate aGVHD on CBT. 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14-16日 名古屋：名古屋国際会議場
- ⑱ 望月慎史 他: 患者由来iPS細胞を用いたダウン症候群における造血障害の解析 第114回日本小児科学会学術集会 2011年8月12-14日 東京：高輪プリンスホテル
- ⑲ Takayama N., et al. : Transient activation of C-MYC expression is critical, for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. 57<sup>th</sup> ISTH Annual SSC Meeting July 23-28, 2011 京都：京都国際会館
- ⑳ 江藤浩之 : iPS細胞バンクを有効利用した血液疾患治療法の開発 第24回日本動物細胞工学会 2011年度大会(招待講演) 2011年7月22-23日 東京：東京大学山上会館
- ㉑ Eto K. : Potential application of human iPS cell-derived hematopoietic cells for disease treatment. 7<sup>th</sup> IABS Symposium on Advances in

Transfusion Safety July 15-17, 2011  
Singapore

- ②② 海老原康博: 動物細胞・動物血清を用いないヒト iPS 細胞から血液細胞への分化誘導 第 21 回日本サイトメトリー学会 2011 年 6 月 25 日 京都: 京都国際交流会館
- ②③ Takayama N., et al.: Suspected incomplete reprogramming in blood derived human induced Pluripotent stem cells is advantageous for adult-type erythrocyte generation with globin switching. 9<sup>th</sup> ISSCR Annual Meeting June 15-18, 2011 Toronto, Canada
- ②④ Ebihara Y., et al.: Induction of hematopoiesis from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) in coculture with autologous hiPSC-derived mesenchymal stem cells under animal serum-free conditions. 9<sup>th</sup> ISSCR Annual Meeting June 15-18, 2011 Toronto, Canada
- ②⑤ 平本貴史 他: 重症先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞の樹立とその解析 第 32 回日本炎症・再生医学会 2011 年 6 月 2-3 日 京都: 京都国際会館
- ②⑥ 中村壮 他: 輸血医療革命をもたらす多能性幹細胞由来不死化巨核球細胞株樹立技術の開発 第 32 回日本炎症・再生医学会 2011 年 6 月 2-3 日 京都: 京都国際会館
- ②⑦ Eto K.: Blood generation from iPS cells toward clinical applications. 第 32 回日本炎症・再生医学会 (招待講演) 2011 年 6 月 2-3 日 京都: 京都国際会館

[図書] (計 7 件)

- ① 江藤浩之: 中外医学社: Annual Review 血液 2012 214-219, 2012
- ② Ma, F., et al.: Intech, Vienna :Embryonic Stem Cells 239-250, 2011
- ③ Ma, F., et al.: Springer Science, New York: Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. 266-335, 2011
- ④ 江藤浩之 他: 日本脈管学会: 脈管学 339-345, 2011
- ⑤ 江藤浩之: 日本血栓止血学会: 日本血栓止血学会誌 291-294, 2011
- ⑥ 遠藤大 他: ニューサイエンス社: 細胞 367-370, 2011
- ⑦ 高山直也 他: 医歯薬出版: 医学のあゆみ 1385-1389, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 6 件)

- ①名称: 多能性幹細胞からの巨血球及び／又は血小板の製造方法  
発明者: 江藤浩之  
権利者: 東京大学  
種類・番号: 特願 2011-219545  
出願年月日: 2011 年 10 月 3 日  
国内外の別: 国内
- ②名称: ヒト由来の多能性幹細胞を分化させる方法  
発明者: 辻浩一郎、海老原康博  
権利者: 東京大学  
種類・番号: PCT/JP2011/072609  
出願年月日: 2011 年 9 月 30 日  
国内外の別: 国外
- ③名称: 血小板の機能を維持するための組成物  
発明者: 江藤浩之  
権利者: 東京大学  
種類・番号: PCT/JP2011/071190  
出願年月日: 2011 年 9 月 16 日  
国内外の別: 国外
- ④名称: 多能性幹細胞からの血液細胞分化に関する培養方法  
発明者: 江藤浩之  
権利者: 東京大学  
種類・番号: PCT/JP2011/070563  
出願年月日: 2011 年 9 月 9 日  
国内外の別: 国外
- ⑤名称: 血小板産生方法及び血小板産生装置  
発明者: 江藤浩之  
権利者: 東京大学  
種類・番号: 特願 2011-143383  
出願年月日: 2011 年 6 月 28 日  
国内外の別: 国内
- ⑥名称: 血小板産生の場構築の為の巨核球細胞の多核化の促進法  
発明者: 江藤浩之  
権利者: 東京大学  
種類・番号: 特願 2011-108253  
出願年月日: 2011 年 5 月 13 日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

東京大学医科学研究所  
幹細胞治療研究センター  
幹細胞プロセッシング分野  
<http://stemcell-u-tokyo.org/scp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海老原 康博 (EBIHARA YASUHIRO)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：40302608

(2) 研究分担者

江藤 浩之 (ETO KOUJI)  
京都大学・iPS細胞研究所・教授  
研究者番号：50286986

研究分担者

望月 慎史 (MOCHIZUKI SHINJI)  
東京大学・医科学研究所・特任助教  
研究者番号：90349473