

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 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790442

研究課題名（和文） カニクイザル白血病モデルの作製

研究課題名（英文） A Establishment of a leukemia model of cynomolgus macaque

研究代表者

石垣 宏仁（ISHIGAKI HIROHITO）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90432301

研究成果の概要（和文）：

特定の MHC haplotype である Mafa-HT1 を homozygous に有するカニクイザル由来 induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) から CD34 陽性造血幹細胞を効率よく誘導する方法を確立した。また iPS 細胞から誘導した CD34 陽性細胞（以下、iCD34 細胞）に既知の白血病遺伝子（AML/ETO+FLT3mutant、又は BCR/ABL）を遺伝子導入し白血病細胞株の誘導を試みた。遺伝子導入 iCD34 細胞はサイトカイン無添加メチルセルロース培地にて長期間培養でき、NOD/Shi-*scid*, IL-2R γ ^{null} mouse (NOG マウス) に生着した。現在、Mafa-HT1 heterozygous カニクイザルに AML/ETO+FLT3mutant 導入 iCD34 細胞を移植準備中である。

研究成果の概要（英文）：

We successfully induced CD34 positive hematopoietic stem cells (iCD34) from induced pluripotent stem cells (iPS cells) of a cynomolgus macaque which homozygously have a certain haplotype of major histocompatibility complex (Mafa-HT1). Next, we transduced well-known leukemic genes, AML1/ETO and FLT3mutant, or BCR/ABL, to the iCD34 by retrovirus. These two types of iCD34 (leukemic iCD34) cells with the leukemic genes could form many colonies in methylcellulose media and be cultured for long term without any cytokines. These leukemic iCD34 could be alive in NOD/Shi-*scid*, IL-2R γ ^{null} mouse (NOG mouse) after intrabonemarrow-bonemarrow transplantation (IBM-BMT). We are preparing experiments in which a bonemarrow transplantation of the leukemic iCD34 with AML1/ETO+FLT3mutant to a cynomolgus macaque with heterozygous MHC.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：iPS 細胞、白血病、動物モデル

1. 研究開始当初の背景

より効果的で革新的な白血病治療の開発の為に、ヒトに近い実験動物であるカニクイザルを用いた白血病モデルでの実験的検討が必要不可欠である。現在、NOD-SCIDマウスにヒトの白血病細胞を移植するモデルは既に確立されている。しかし、マウスからヒトへの直接的な応用は、遺伝学的相同性（平均して85%程、カニクイザルとヒトの遺伝学的相同性は95%）から、困難な事が多いと言わざるを得ない。当大学では主要組織適合遺伝子複合体（MHC）の特定のハプロタイプ（Mafa-HT1）のhomozygousカニクイザルを飼育している。理論上、Mafa-HT1 homozygousサルiPS由来細胞は、Mafa-HT1 heterozygousサルに拒絶反応を起こす事なく移植可能である。

2. 研究の目的

解剖学的にも、遺伝学的にもヒトにより近いとされるカニクイザルを用いて白血病モデルを作製し、白血病の新規治療の開発に役立てる。

3. 研究の方法

レトロウイルスもしくはセンダイウイルスを用いて山中4因子（cMYC、OCT4、KLF4、SOX2）を導入し作成したMafa-HT1 homozygousのカニクイザルiPS細胞を用いて実験を行なった。

（1）移植可能なiPS細胞を用いて、既存の報告されている方法を用いてCD34陽性造血幹細胞（iCD34）を誘導した。

（2）誘導したiCD34に白血病遺伝子を導入する事で白血病細胞を作製した。

（3）誘導した白血病細胞の*vitro*での白血病の形成能、*vivo*での白血病の形成能をそれぞれ、メチルセルロース培地と免疫不全マ

ウス（NOD/Shi-*scid*, IL-2R γ ^{null} mouse、NOGマウス）を用いて確認した。

4. 研究成果

（1）最初に、これまでに報告されたマウスのES/iPS細胞を造血幹細胞に分化誘導する方法と同様の方法で、M-CSF欠損マウス由来の骨髄間葉系細胞の細胞株であるOP9細胞とサルiPS細胞を共培養したが誘導の成否にばらつきがあり安定した結果を得る事が出来なかった。そこで、別のマウス由来骨髄間葉系細胞株10T $_{1/2}$ を用いて同様の実験を行なったところ、安定してCD34陽性造血幹細胞を得る事が出来た。

また、CD34陽性細胞の誘導効率をあげるために、胚葉体（embryonic body, EB）を作製した後に10T $_{1/2}$ と共培養を行ったところ、培養2週間でCD34陽性細胞を分化誘導させる事が出来た。培養時に添加するサイトカインについても検討を行い、VEGFとSCFを添加した時が最も効率よくCD34陽性造血幹細胞を得る事が出来た。

更にCD34陽性細胞の誘導効率をあげるために、10T $_{1/2}$ との共培養の最初の一週間を低酸素環境（3%O $_2$ ）で培養したところ、効率よく分化誘導させる事が出来た（図1）。最後に、線維芽細胞由来iPS細胞と末梢血T細胞由来iPS細胞の比較を行なった。培養維持と分化誘導の容易さは、今回用いた細胞株に関しては、線維芽細胞由来のiPS細胞の方が効率的であった。以降の実験は、線維芽細胞由来iPS細胞を用いて行なった。

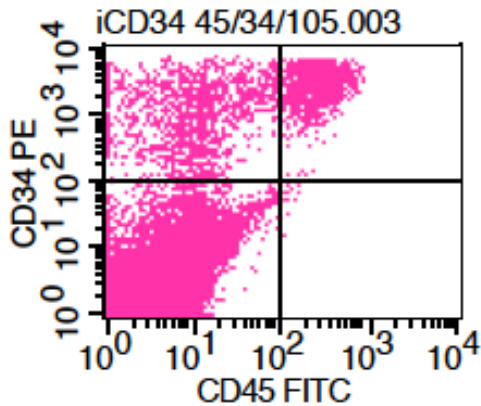


図 1 ; 線維芽細胞由来 iPS 細胞を用いた培養 1 4 日目。浮遊細胞の FACS DATA、CD34 陽性細胞は 10%程である。

(2) 次に、iPS 細胞から誘導した CD34 陽性細胞 (以下、iCD34 細胞) にレトロウイルスを用いて癌遺伝子を導入し、白血病細胞株の樹立を行なった。最初に、マウスで報告のある cMYC 遺伝子を iCD34 細胞に導入したが、白血病細胞は誘導出来なかった。次に HOXB4 遺伝子を導入したが、同様であった。

そこで、ヒトの白血病患者で報告のされている既知の白血病遺伝子を iCD34 細胞に導入し白血病細胞株の誘導を試みた。

AML/ETO+FLT3mutant (or c-kit mutant)、BCR/ABL の二つの組み合わせで行なったが、いずれもサイトカイン無添加メチルセルロース培地にて 4 週間以上培養する事が出来た (図 2)。遺伝子導入しない iCD34 細胞は維持出来なかった。特に

AML/ETO+FLT3mutant の組み合わせでは、4 ヶ月にわたり培養維持する事が出来た。しかしこれらの細胞は培養維持することが出来ても、増殖させる事は出来なかった。

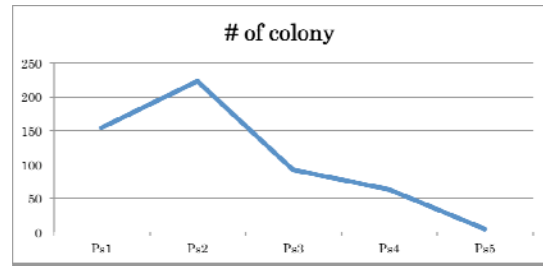


図 2 ; AML1+FLT3mutant 導入 iCD34 細胞のサイトカイン無添加メチルセルロース培地でのコロニー数の推移。

次にこれらの遺伝子導入 iCD34 細胞を NOG マウスに移植し、白血病を発症するかどうかを確かめた。白血病遺伝子を導入した iCD34 細胞を、2Gy の放射線を照射した NOG マウスに骨髄内骨髄移植を行なった。移植後 4 週にはカニクイザル由来細胞の生着を確認でき、移植後 12 週ではキメリズムは 10-20%程に達した。

また移植後 2 週間目までヒト IL-3 を腹腔内投与する事で生着率を上昇させる事が出来た。マウスの IL-3 はサルに働かない事がわかっており、ヒトの IL-3 を加える事で生着率を上昇させる事が出来たと考えられた。BCR/ABL 導入 iCD34 細胞に比べ、AML/ETO+FLT3mutant 導入 iCD34 細胞の方が、よりキメリズムが高い傾向にあった (図 3)。

現在、Mafa-HT1 heterozygous カニクイザルに AML/ETO+FLT3mutant 導入 iCD34 細胞を移植準備中である。

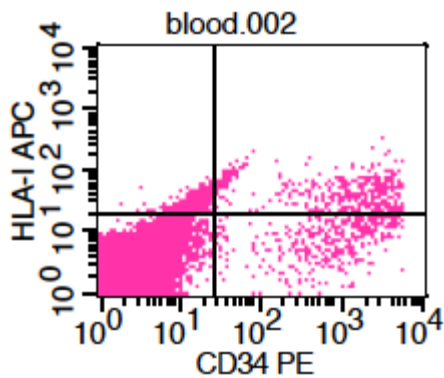


図3 ; iPS 由来白血病細胞

(AML1/ETO+FLT3mutant) 移植 1 2 週後の NOG マウス末梢血の FACS DATA。この時のカニクイザル由来の細胞はおよそ 10% であり、これらは PCR でもカニクイザル由来である事が確認出来ている。

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 2 件)

(1) Ishigaki, H, Miyauchi J, Yokoe A, Nakayama M, Yanagi T, Taga T, Ohta S, Itoh Y, Ogasawara K: Expression of megakaryocytic and myeloid markers in blasts of transient abnormal myelopoiesis in a stillbirth with Down syndrome: report of histopathological findings of an autopsy case. Human Pathol. 42, 141-145, 2011.

(査読あり)

(2) Arikata M, Itoh Y, Okamatsu M, Maeda T, Shiina T, Tanaka K, Suzuki S, Nakayama M, Sakoda Y, Ishigaki H, Takada A, Ishida H, Soda K, Pham VL, Tsuchiya H, Nakamura S, Torii R, Shimizu T, Inoko H, Ohkubo I, Kida H, Ogasawara K. Memory immune responses against pandemic (H1N1) 2009 influenza virus

induced by a whole particle vaccine in cynomolgus monkeys carrying Mafa-A*052:02. PLoS ONE 7, e37220, 2012.

(査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

(1) 石垣宏仁、仲山美沙子、伊藤靖、小笠原一誠：カニクイザル iPS 細胞由来癌細胞株を用いた、担癌カニクイザルモデルの作製、第 102 回病理学会総会（札幌），2013

[図書] (計 1 件)

(1) 片桐洋子、石垣宏仁、清河信敬、ラフトによる自然免疫の増強、臨床免疫・アレルギー科、55, 269-275, 2011.

[その他]

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqpatho2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石垣 宏仁 (ISHIGAKI HIROHITO)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90432301

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：