

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591548

研究課題名(和文)先天性好中球減少症の疾患特異的 iPS 細胞を用いた新規病態解析・治療開発基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel disease model using disease specific iPS cells of congenital neutropenia

研究代表者

渡邊 健一郎 (Watanabe, Kenichiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・臨床教授

研究者番号：20324634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：HAX1遺伝子異常症の患者よりiPS細胞を樹立し(HAX1-iPS)、好中球に分化させると、健康人由来iPS細胞に比べ、成熟好中球の割合が減少していた。iPS細胞由来血球のアポトーシスを解析したところ、患者iPS細胞由来血球では正常と比較してアポトーシスを起こしている細胞の割合が高かった。さらに、HAX1-iPSにレンチウイルスベクターを用いて正常HAX1蛋白を発現させ、好中球分化、細胞死の解析を行うと、HAX1-iPSで認められた好中球分化障害、アポトーシスの亢進が回復した。これらの結果から、HAX1-iPSからの好中球分化系は病態を再現しており、疾患モデルとして有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We generated induced pluripotent stem cell lines from a patient presenting for severe congenital neutropenia with HAX1 gene deficiency and analyzed their in vitro neutrophil differentiation potential. Cytostaining and flow cytometric analyses of myeloid cells differentiated from patient-derived induced pluripotent stem cells showed arrest at the myeloid progenitor stage and apoptotic predisposition, both of which replicated abnormal granulopoiesis. Moreover, lentiviral transduction of the HAX1 cDNA into patient-derived induced pluripotent stem cells reversed disease-related abnormal granulopoiesis. This in vitro neutrophil differentiation system, which uses patient-derived induced pluripotent stem cells for disease investigation, may serve as a novel experimental model and a platform for high-throughput screening of drugs for various congenital neutrophil disorders in the future.

研究分野：血液学

キーワード：疾患特異的iPS細胞 骨髄不全 細胞死 疾患モデル

### 1. 研究開始当初の背景

先天性骨髄不全症候群は様々な遺伝子変異に起因する遺伝性造血不全である。中でも Kostman らによって最初に記載された重症先天性好中球減少症は、生後間もなくより細菌感染を繰り返す重篤な疾患である。しかし、未だ病態に特異的な根本的な治療法がないのが現状で、G-CSF や抗生剤の使用など支持療法が中心となる。さらに、特に G-CSF を大量、長期に用いた症例に予後不良の急性白血病を発症しやすいことが知られており、造血細胞移植が必要となる。本疾患では、骨髄において骨髄球以降の成熟段階の骨髄球系細胞がみられない、前骨髄球段階での“maturation arrest”の所見を特徴とする。先天性好中球減少症の原因遺伝子は ELA2 をはじめとしていくつかが同定されているが、Kostman らが記載した家系で、HAX1 遺伝子の変異が同定された。HAX1 は、アポトーシス抑制作用をもつ Bcl-2 と homology domain をもつ蛋白であるが、HAX1 欠損と病態の関連は未だ十分明らかになっていない。

先天性骨髄不全症候群では、骨髄が低形成になっていることが多く、解析に十分な臨床検体を得ることが困難である。また骨髄細胞を長期に増殖、培養、維持する方法も確立していない。さらにノックアウトマウスでは必ずしも表現型を再現できてないことが問題であった。実際 HAX1 ノックアウトマウスの報告では、中枢神経系の異常、リンパ球減少は認められたものの好中球減少は認められなかった。こうした事態を開解するためには、新たな解析モデルが必要と考え、我々は iPS 細胞(induced pluripotent stem cell)に着目した。iPS 細胞は自己増殖能と多分化能をもち、多様な組織に分化させることが可能である。iPS 細胞は、再生医療への応用と共に、ある疾患の患者の体細胞から iPS 細胞を樹立し、罹患臓器の細胞に分化させることにより病態を再現することで新たな疾患モデルとして注目されている。

好中球減少を伴う先天性疾患の解析を iPS 細胞を用いて行うため、先ず、健常ヒト由来 iPS 細胞から好中球を分化させる系を確立した(Morishima et al. J Cell Physiol, 2011)。さらに、我々は HAX1 変異に伴う先天性好中球減少症患者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞(HAX1-iPS)を作成に成功した。以上の学術的背景、これまでの研究成果から、HAX1-iPS を用いて、従来系ではなし得なかった骨髄不全症の病態解析・治療開発が可能であると考えた。

### 2. 研究の目的

HAX1-iPS を用いて HAX1 欠損症における好中球減少の機構を解析し、新たな治療薬開発の基盤を確立し、先天性骨髄不全症の疾患モデルの樹立を目的とした。

### 3. 研究の方法

- 1) 我々が確立した好中球分化系を応用し、HAX1-iPS を好中球に分化させ、患者と同様な、骨髄球系の成熟障害が認められるか解析する。
- 2) 認められた成熟障害が、HAX1 欠損に特異的な事象かどうか確認するために、HAX1-iPS にレンチウイルスベクターを用いて正常 HAX1 蛋白を発現させることにより表現型が修復されるかどうか検討する。以上により、HAX1-iPS が HAX1 欠損による好中球減少症のモデルとなり得ることを示す。
- 3) 好中球減少の機序について、細胞死の関与をアポトーシスに関連する蛋白の発現や活性化、生化学的な解析により明らかにする。
- 4) 疾患特異的 iPS 細胞が他の先天性好中球減少症の解析にも応用可能か検討する。

#### ・HAX1-iPS 細胞の樹立

SCN 疾患モデル作製のため、HAX1 遺伝子異常(256C>T, R86X)を持つ SCN 患者<sup>20)</sup>より皮膚片を採取し、これより得られた皮膚線維芽細胞に OCT3/4, SOX2, KLF4 の 3 遺伝子、ないしは cMYC を加えた 4 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、iPS 細胞(HAX1-iPS)を樹立した。得られたクローンのうち、ランダムに選んだ 3 クローン(HAX1 3F3, HAX1 3F5, HAX1 4F5)を実験に用いた。

#### ・iPS 細胞からの好中球分化

好中球分化には Niwa らが開発したストローマ細胞を用いない無血清二次元血球分化システムを使用した。このシステムでは、ヒト ES/iPS 細胞コロニーをマトリゲルでコートしたデッシュ上で無フィーダー培養し、無血清造血幹細胞用培地(Sigma Stemline II)に分化 4 日目までは BMP4 (20ng/ml)、4~6 日目は VEGF (40ng/ml)、6 日目以降は造血を刺激、分化誘導するサイトカインカクテルを加えて培養する。これにより、血清、ストローマ細胞を用いず、ヒト ES/iPS 細胞から原条、中胚葉、造血前駆細胞と段階を経て、赤血球、好中球といった血球が誘導できることが示された。われわれは、この ES/iPS 細胞からの二次元血球分化システム<sup>4)</sup>を、好中球系への分化に特化させる形で改変し、6 日目以降は SCF (50ng/ml)、TPO (5ng/ml)、IL-3 (50ng/ml)、G-CSF (50ng/ml)といったサイトカインを加えて培養し使用した。

#### ・好中球分化の評価

HAX1-iPS を我々が確立した iPS 細胞から好中球分化系を応用し好中球に分化させ、正常ヒト iPS 細胞からの好中球分化と比較し、患者と同様な、骨髄球系の成熟障害が認められるか、形態、細胞内顆粒の免疫染色、フローサイトメトリーによる CD11b、33、34、16 といった骨髄球系表面抗原解析、RT-PCR による CEBP など好中球分化に関与する転写因子発現を用いて解析した。

#### ・HAX1-iPS への HAX1 遺伝子導入

HAX1 を導入するためのレンチウイルスベクターを作成する。正常ヒト iPS 細胞を用いて導入効率を検討し、HAX1 発現を確認する。GFP、puromycin 耐性遺伝子を組み込んだベクターを用い、細胞を選択できるようにした。HAX1-iPS にレンチウイルスベクターを用いて正常 HAX1 蛋白を発現させる。HAX1-iPS に HAX1 を発現させることにより、骨髄球系の成熟障害が回復するかどうかを、形態、フローサイトメトリーによる表面抗原解析、RT-PCR による CEBP など好中球分化に關する転写因子発現で検討した。

#### ・アポトーシスの評価

HAX1-iPS、HAX1 を導入した HAX1-iPS、正常ヒト iPS の好中球分化の過程で、AnnexinV/Propidium Iodide を用いたフローサイトメトリーで細胞死をおこしている細胞の割合を検討する。アポトーシスに伴う生化学的な変化について、ミトコンドリア膜電位、活性酸素産生についてはフローサイトメトリーで解析する。

#### ・他の先天性骨髄不全症への応用

他の好中球減少を主徴とする先天性骨髄不全症候群 Shwachman-Diamond 症候群 (SDS) の疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、解析を行う。

## 4. 研究成果

### 1) HAX1-iPS による病態再現

作製した HAX1-iPS 細胞と健常人由来 iPS 細胞 (コントロール iPS 細胞; 253G4, 201 B6) を *in vitro* で好中球に分化させ比較した。コントロール iPS 細胞からは分化開始 26 日前後で浮遊細胞の形で血球細胞が得られ、これらを回収して May-Giemsa 染色を行い観察すると約 40%の細胞が成熟好中球であり、残りの細胞のほとんどが好中球系の未分化細胞であった。これに対し HAX1-iPS 細胞から分化した血球細胞の形態を観察すると、成熟好中球は約 10%と少数にとどまり、約 50%が骨髄芽球や前骨髄球といった未熟な骨髄球系細胞の形態を呈していた (Fig.2 A,B)。また、フローサイトメトリーによる表面抗原の解析においても、HAX1-iPS 細胞由来血球では CD34 陽性細胞の割合がコントロールに比べて有意に高く、成熟好中球に発現する好中球特殊顆粒の構成タンパクである lactoferrin や gelatinase の陽性率も HAX1-iPS 細胞由来血球では control に比べて有意に低かった。さらに、前骨髄球段階で生成され好中球一次顆粒に含まれるプロテアーゼの一種の好中球エラスターゼの陽性率も HAX1-iPS 細胞由来血球ではコントロールに比較して有意に低く、SCN 患者においてその遺伝子発現やタンパク発現が低下しているとの報告に合致していた。これらのことより、HAX1-iPS 細胞由来の *in vitro* 好中球分化系では、SCN 患者と同様に成熟好中球が減少しており、SCN 患者骨髄検体でみられる maturation arrest が *in vitro* で再現されていることが確認された。

次に、HAX1-iPS 細胞由来骨髄球系前駆細胞のコロニー形成能を評価するため、分化開始 16 日目の細胞を用いてコロニーアッセイを行った。その結果、HAX1-iPS 細胞由来骨髄球系前駆細胞から形成される顆粒球系コロニーの数はコントロールに比べ有意に少なかった。また、G-CSF に対する反応性を検討すると、HAX1-iPS 細胞由来骨髄球系前駆細胞から形成されるコロニーの数は G-CSF 添加によってわずかに増加するものの、その数は G-CSF 未添加のコントロールのコロニー数に比べても有意に少なかった。この結果は HAX1-iPS 細胞由来血球では G-CSF に対する反応が不良であることを示しており、SCN 患者において十分量の G-CSF 投与によって好中球数は増加するものの、依然低値であるという事実と矛盾しない結果であった。

### 2) HAX1-iPS による病態解析

HAX1 タンパクはミトコンドリアに局在し、アポトーシスの制御に関わっていると言われており、HAX1 遺伝子異常を持つ SCN 患者の好中球ではミトコンドリア膜電位の低下に伴いアポトーシスを起こしやすいことが示されている。そこで、HAX1-iPS 細胞由来血球において同様の解析を行ったところ、コントロールと比べて Annexin V 陽性のアポトーシス細胞の割合が有意に高く、ミトコンドリア膜電位の解析でも膜電位の低下を示す細胞の割合は有意に高かった。一方、未分化 iPS 細胞においてミトコンドリア膜電位の解析を行ったところ HAX1-iPS 細胞とコントロールとの間に差は見られなかった。これらの結果より HAX1 遺伝子異常を持つ SCN 患者と同様に、HAX1-iPS 細胞からの *in vitro* 血球分化系においても血球におけるミトコンドリア膜電位低下によるアポトーシスの増加により成熟好中球数の低下を来している可能性が示唆された。

### 3) HAX1-iPS への HAX1 遺伝子導入の効果

SCN 患者の HAX1 遺伝子異常はそのほとんどが premature stop codon となる nonsense mutation であるため<sup>23)</sup>、HAX1 タンパクの発現低下、機能欠失が SCN の病態を引き起こしていると考えられている。このことを明らかにするため、我々は EGFP をマーカー遺伝子とし、HAX1 cDNA を発現するレンチウイルスベクターを作成し、HAX1-iPS 細胞に感染させて遺伝子導入を行った。EGFP 陽性となった HAX1 遺伝子導入細胞株 (HAX1 3F5+HAX1) が HAX1 タンパクを発現していることは Western Blotting で確認を行った。

こうして得られた HAX1 遺伝子導入細胞株と EGFP のみを導入したコントロール細胞株 (HAX1 3F5+GFP) を *in vitro* で好中球に分化させ、両者を比較した。HAX1 3F5+HAX1 由来血球では HAX1 3F5+GFP 由来血球と比較して成熟好中球の比率が高く (Fig.2 A,B)、フローサイトメトリーによる解析でも CD34 陽性細胞の割合が有意に低く、lactoferrin や gelatinase の免疫染色においても陽性率が

有意に高かった。NE を染めるエラストラーゼ染色においても、HAX1 3F5+HAX1 由来血球では HAX1 3F5+GFP 由来血球と比較して NE 陽性細胞の割合は有意に高かった。これらの結果より、HAX1-iPS 細胞に HAX1 遺伝子を導入し発現させると、成熟好中球の割合が増加し、maturation arrest が改善することが明らかとなった。

コロニーアッセイについて検討すると、HAX1 3F5+HAX1 由来骨髄球系前駆細胞から形成されるコロニーの数はコントロール iPS 細胞由来細胞と同等のレベルまで増加が認められ、アポトーシスの解析では HAX1 3F5+HAX1 由来血球では HAX1 3F5+GFP 由来血球と比較して Annexin V 陽性のアポトーシス細胞の割合が有意に低下し、ミトコンドリア膜電位低下を示す細胞の割合も有意に低下していた。

これらの結果より、HAX1 cDNA を遺伝子導入し正常 HAX1 蛋白を発現させることのみで HAX1-iPS 細胞好中球分化系での maturation arrest やコロニー形成能の低下といった異常が改善し、ミトコンドリア膜電位低下に起因するアポトーシス亢進も改善することが明らかになった。このことは、HAX1 遺伝子異常を伴う SCN は確かに HAX1 蛋白の発現低下、機能喪失によっておこっていることを示唆している。

以上から、HAX1-iPS 細胞からの好中球分化系は、HAX1 遺伝子異常による SCN の疾患モデルとして有用であると考えられた。

#### 4) 他の先天性骨髄不全症への応用

次に、好中球減少を主体とする先天性骨髄不全症候群である Shwachman-Diamond 症候群 (SDS) の疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、解析を行った。SDS 患者から末梢血を採取し Oct3/4、shp53、Sox2、Klf4、L0Myc、Lin28 をエピソーマルベクターを用いて導入し iPS 細胞株 (SDS-iPS) を樹立した。SDS-iPS 細胞を in vitro 好中球分化系で分化させると、健常人由来の iPS 細胞と比較し、好中球分化、コロニー形成能が低下していた。また、SDS-iPS 細胞から分化した好中球の遊走能は障害されていた。好中球のアポトーシスに差はなかったが、CD34+CD45+血液前駆細胞や血液前駆細胞と内皮細胞に分化する前段階の hemangioblast のアポトーシスを比較すると、SDS-iPS 由来の細胞の方が健常人由来 iPS 細胞由来の細胞と比較してアポトーシスが亢進していた。以上の結果から、SDS 患者における血液学的異常は血球分化の初期段階でおきている可能性が示唆された。

#### 5) 成果のまとめ

以上のように、患者由来 iPS 細胞からの好中球分化系は、先天性好中球減少症の病態を再現でき、病態解析に有用と考えられた。iPS 細胞が樹立できれば、繰り返し骨髄液を採取しなくても、また骨髄検体が得られなくても造血系の解析が可能となり、造血の初期段階から分化過程を観察することもできるという利点がある。SCN や SDS のみならず、Fanconi

貧血、Dyskeratosis Congenita をはじめとする先天性骨髄不全症候群では、好中球減少を来することが多い。患者由来 iPS 細胞からの好中球分化系は、こういった疾患の病態解析にも有用と考えられる。SCN は好中球以外の血球減少を伴わないが、他の先天性骨髄不全症候群では、貧血、血小板減少を伴うこともある。iPS 細胞は、赤血球、血小板への分化も可能であり、多系統の造血細胞に異常をおこす疾患の解析にも応用可能である。

先天性骨髄不全症候群の原因遺伝子には、DNA 修復、テロメアの維持、リボソーム生成といった生命維持に基本的な機能をもつものが多い。従って、多くの先天性骨髄不全症候群では造血系だけでなく、骨格系や神経系など、多臓器にまたがる多彩な症候を合併する。iPS 細胞は様々な臓器に分化できる多能性を持っているため、患者由来 iPS 細胞を用いた疾患モデルでは、複数臓器の異常について病態を解析することが可能となる。HAX1 遺伝子異常による SCN においても発達遅延やてんかんなどの中枢神経系の症状を合併することがしばしばあり、我々が体細胞の提供を受けた患者もこれらの症状を合併している。これらの中枢神経系の症状の一部も Hax1 ノックアウトマウスでは再現できておらず、今後の展開としては患者由来 iPS 細胞に神経系細胞への分化系を組み合わせることで、HAX1 遺伝子異常による神経症状の病態解析を行うことができる。

疾患特異的 iPS 細胞は、新規治療の標的分子を同定し、薬剤スクリーニングや治療開発への応用も可能と期待されている。本研究で樹立した疾患モデルを用いて、血液難病の病態解明を行い、新たな治療法の開発につながる知見を得ていきたい。

#### 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 1 件)

Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, et al. Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica* 99, 19-27, 2013.

[学会発表](計 3 件)

- 1) 森嶋達也、渡邊健一郎他 Induced pluripotent stem cell model of severe congenital neutropenia with HAX1 gene deficiency. ISSCR 10<sup>th</sup> Annual Meeting Yokohama, Japan, 2012
- 2) 森嶋達也、渡邊健一郎他 iPS 細胞を用いた先天性好中球減少症 (HAX1 遺伝子異常) の疾患モデル 第 8 回 Kyoto Hematology Forum 京都 2013
- 3) 渡邊健一郎 疾患特異的 iPS 細胞による

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

渡邊健一郎 (京都大学大学院医学研究科)  
研究者番号：20324634

##### (2) 研究分担者

梅田雄嗣 (京都大学大学院医学研究科)  
研究者番号：80397538

平家俊男 (京都大学大学院医学研究科)  
研究者番号 90190173

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：