

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461418

研究課題名(和文)患者由来iPS細胞を用いた骨髄異形成症候群における骨髄微小環境の役割に関する解析

研究課題名(英文)The analysis of bone marrow microenvironment in myelodysplastic syndrome using patient-derived iPS cells

研究代表者

江副 幸子 (EZOE, Sachiko)

大阪大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90379173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群の病態における骨髄微小環境細胞の役割について解析するため、患者骨髄細胞よりiPS細胞を樹立した。iPS細胞から造血幹細胞と間葉系幹細胞にそれぞれ分化させ、共培養により造血細胞の分化や形態に及ぼす影響を検討した。7-染色体異常を持つ造血細胞は、骨髄球系細胞の分化と増殖が阻害されていた。また、骨髄造血細胞と間葉系幹細胞を共培養し、造血細胞の分化について検討したところ、7-を有する骨髄造血細胞の形態異常を認めたが、正常造血細胞においても7-を有するMSCとの共培養において成熟異常を認めた。骨髄異形成症候群においては、異常クローンの骨髄間葉系幹細胞からの影響もあり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： The myelodysplastic syndrome(MDS) is characterized as the expansion of abnormal hematopoietic stem cell clone. For the purpose of exaggerating the interaction between hematopoietic stem cells and bone marrow microenvironment in MDS patients, we established iPS cell lines derived from MDS patients bone marrow cells. We observed some abnormalities in differentiation and morphology of hematopoietic cells differentiated from disease specific iPS cells having 7-karyotype, and we also detected morphological abnormalities in normal hematopoietic cells co-cultured with MSCs derived from patient specific iPS cells, which suggests that abnormal stromal cells in MDS might have some important roles in the pathology of MDS.

研究分野：血液内科学

キーワード：iPS細胞 骨髄異形成症候群 疾患特異的 骨髄微小環境

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(MDS)は、骨髄造血幹細胞の異常クローンが増殖し、成熟の過程でアポトーシスを生じる事から、成熟血球の減少を来す疾患である。

MDS の遺伝子異常は造血幹細胞のレベルで起こるとされているが、詳細は明らかではない。また、造血幹細胞と骨髄間葉系細胞との可塑性も報告されている。以上のことから MDS の骨髄間葉系細胞に造血細胞と同様の遺伝子異常を持つクローンが存在することは容易に想像できるが、骨髄間葉系細胞は、多様な細胞の集団であり、それらの中で希少な細胞集団全てを検索することは困難である。そこで、我々は、患者骨髄細胞由来の iPS 細胞を作成することにより、そこから骨芽細胞を含む骨髄間葉系細胞に分化させることによって、その造血細胞に及ぼす影響について解析したいと考えた。

2. 研究の目的

我々は、既に骨髄造血幹細胞から iPS 細胞を作製する技術を習得した。また、これまで20年以上にわたって MDS 患者の骨髄細胞を集積保存しており、既に100例以上の骨髄を保存している。

これらを用いて iPS 細胞株を樹立する。その中で、FISH や PCR を用い、疾患由来の iPS 細胞であるクローンを選択する。それらのクローンを期間内に20クローン樹立し、それらから分化した間葉系細胞の形態異常や機能異

常がないか解析する。また、そのようにして樹立した間葉系細胞と造血幹細胞との共培養系を確立する。

患者造血細胞と患者 iPS 細胞由来間葉系細胞、正常造血細胞と患者 iPS 細胞由来間葉系細胞、他の患者の造血細胞と患者 iPS 細胞由来間葉系細胞との共培養により、造血細胞の増殖、アポトーシス、および形態について解析し、患者 iPS 細胞由来間葉系細胞の造血支持能について明らかにする。

3. 研究の方法

1) MDS 疾患特異的 iPS 細胞の樹立

申請者らは、臍帯血や骨髄造血前駆細胞を用いて、iPS 細胞株を樹立する方法を習得した。さらにそれらを間葉系細胞に分化する系も構築した。

これまで患者の包括同意を得て、MDS 患者由来骨髄細胞の蓄積を行っており、その中の、5q-や del7 など MDS に特徴的な染色体異常を伴うものを用いて疾患特異的な iPS 細胞株を樹立する。疾患特異的な細胞株を区別するため、特異的な染色体異常を有する症例につき株の樹立を行う事とする。

2) 樹立した疾患特異的 iPS 細胞の性質についての解析

iPS 細胞の増殖能について観察する。

iPS 細胞からの分化能について解析する。

脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨剤某、間葉系幹細胞などへの分化についてその違いを解析する。

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

MDS においては、造血細胞の成熟障害を認めるが、iPS 細胞からの血球分化培養系においても同様の結果が得られるかについて解析する。

赤芽球系、巨核球から血小板、および骨髓球系、リンパ球系への分化培養系により分化誘導する。MDS においては、造血細胞の成熟障害を認めるが、iPS 細胞からの血球分化培養系においても同様の結果が得られるかについて解析する。

iPS から誘導された間葉系細胞および、造血細胞において成熟過程でのアポトーシスについても解析する。特に、特有な形態異常を有するかについても解析する。

正常細胞による iPS 細胞由来間葉系細胞と患者造血細胞、患者特異的 iPS 細胞由来の間葉系細胞と正常造血細胞、正常細胞による iPS 細胞由来間葉系細胞と正常造血細胞、患者特異的 iPS 由来の間葉系細胞と患者造血細胞のそれぞれ共培養を行う。その上で、造血細胞の分化や増殖、アポトーシスに及ぼす影響を解析する。また、造血細胞の形態について観察する。

4. 研究成果

1) MDS 患者骨髓細胞を用いて iPS 細胞の樹立を試みた。5 q-、または 7-の染色体異常を有する患者 10 例について CD34 陽性細胞を用いて iPS 細胞の樹立を試みた。5 q-の 2 症例中 2 症例について iPS 細胞を樹立することができたが、いずれも 5 q-染色体異常を持たないクローンであった。7-の染色体異常を持つ患者 8 症例中 6 症例において iPS 細胞を

樹立することができたが、1 症例のみ 7-由来の iPS 細胞を樹立することができた。

2) 7-の染色体異常をもつ iPS 細胞と同症例における 7-を持たない iPS 細胞の性質について解析した。

増殖能に明らかな違いを認めなかった。また、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞への分化についても明らかな違いは認めなかった。

3) iPS 細胞を用いて造血細胞への分化誘導を行った。OP9 上で造血細胞誘導性サイトカイン存在下で共培養し、CD34 陽性、CD45 陽性細胞を分離し、それらをコロニーアッセイに供した。コロニーアッセイの結果、7-のコロニーでは、赤芽球、巨核球への分化コロニーの増加を認めたが、myeloid のコロニーはむしろ減少していた。

4) iPS 細胞を用いて MSC への分化誘導を行った。

bFGF 含有メディウムで培養し、MSC のマーカーで確認した。正常クローン、7-クローンいずれにおいても MSC を得ることができた。

5) 造血細胞への分化において OP9 の代わりに 4) で得られた MSC と共培養をしたところ、造血細胞への分化を得られなかった。

また、正常造血細胞と正常 MSC、7-由来造血細胞と正常 MSC、正常造血細胞と 7-由来 MSC、7-由来造血細胞と 7-由来 MSC との共培養を行い、造血細胞の形態について観察した。その結果、正常造血細胞と正常 MSC では認められない赤芽球などの形態異常を正常造血細胞と 7-由来 MSC との共培養においても認めた。以上より、MDS における形態異常には異常クローンによる微小環境が関与している可能性

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

が示唆された。

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7件)

Ishibashi T, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y, et al. ESAM is a novel human hematopoietic stem cell marker associated with a subset of human leukemias. *Exp Hematol*,44:44269-44281. 2016. doi: 10.1016/j.exphem.2015.12.010

Sata H, Shibayama H, Ezoe S, Mizuki M, Oritani K, Kanakura Y, et al. Quantitative polymerase chain reaction analysis with allele-specific oligonucleotide primers for individual IgH VDJ regions to evaluate tumor burden in myeloma patients. *Exp Hematol*.43:374-381. 2015. doi: 10.1016/j.exphem.2015.01.002

Tanimura A, Shibayama H, Ezoe S, Oritani K, Kanakura Y, et al. The anti-apoptotic gene Anamorsin is essential for both autonomous and extrinsic regulation of murine fetal liver hematopoiesis. *Exp Hematol*. 42:410-422.2014 doi: 10.1016/j.exphem.2014.01.002

Sugiyama D, Ezoe S, Kanakura Y, et al. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:17945-17950. 2013 doi: 10.1073/pnas.1316796110.

[図書](計2件)

江副幸子、ヒト iPS 細胞による造血管腫瘍の病態解明への応用、血液内科、第67巻、2013、232-236 頁

6. 研究組織

(1)研究代表者

江副 幸子 (EZOE, Sachiko)
大阪大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90379173

(2)研究分担者

金倉 譲 (KANAKURA, Yuzuru)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20177489

柴山 浩彦 (SHIBAYAMA, Hirohiko)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：60346202

織谷 健司 (ORITANI, Kenji)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70324762

水木 満佐央 (MIZUKI, Masao)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：80283761