

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860856

研究課題名(和文) ヒトES/iPS細胞への順遺伝学的手法適用による、白血病の新規発症機序解明

研究課題名(英文) Phenomic Screen to Explore Novel Pathogenesis of Leukemia Using PSC-Derived Hematopoietic Cells

研究代表者

丹羽 明 (Niwa, Akira)

京都大学・iPS細胞研究所・助教

研究者番号：20546999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞にClassI(Kit, FLT3ITD)、ClassII(AML1-MTG8)既知白血病遺伝子の誘導発現カセットを導入し、造血細胞へ分化させた。in vitro、in vivoの解析により、iPS細胞由来の造血細胞がそれらの既知白血病遺伝子によって疾患表現型を呈することを確認した。次に、AML1-MTG8遺伝子を単独で導入したiPS細胞へShRNAライブラリーウイルスを感染させ、同様に疾患表現型を呈する細胞を解析する手法で、AML1-MTG8遺伝子に関連して白血病の病態形成に関わる遺伝子群を網羅的に抽出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate unknown pathogenesis of AML1-ETO (AE) gene in leukemia, we induced hematopoietic cells from PSCs harbouring inducible AE fusion gene cassettes with or without other pathogenic genes such as RTK mutations, and performed in vitro and in vivo assay. First, serial replanting assays in methylcellulose-containing semisolid media as well as liquid culture revealed the strong tendency toward increased colony forming efficacy and suppressed differentiation. In addition to in vitro assays, we next evaluated the in vivo phenotype by transplanting hematopoietic cells into immunodeficient NOG mice. Also in these experiments, we successfully observed the cooperation between AE and RTK mutations for increased engraftment with leukemia-like phenotypes when transplanting immature HSPCs. Those results indicated the successful recapitulation of pathogenic cooperation between AE and RTK mutations in our PSC-derived hematopoietic cells.

研究分野：小児科学

キーワード：白血病 造血発生 ES/iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)の発症機構として、未熟な造血幹前駆細胞に複数の遺伝子変異が入り細胞の恒常性が破綻して腫瘍化するとの、いわゆる多段階モデルが広く受け入れられている。しかし既知の遺伝子変異以外にどのような因子が発症や重症度に関わるか、その全容は解明されていない。新たな疾患関連遺伝子を同定し、病態形成に関わるパスウェイを解明することは、新しい治療手段開発にも極めて重要である。

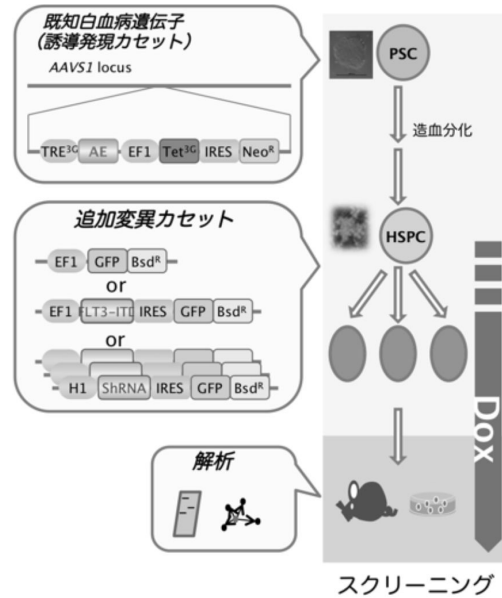
2. 研究の目的

代表的な t(8;21)転座型 AML1-ETO(AE)陽性白血病をモデルとし、AE 遺伝子 (Reverse genetics) とランダム変異を導入 (Forward genetics) したヒト ES/iPS 細胞由来造血細胞を解析する新たなスクリーニング系を構築する。その上で、既知遺伝子とのシグナルクロストークの解明を通じ、新規の白血病化責任遺伝子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

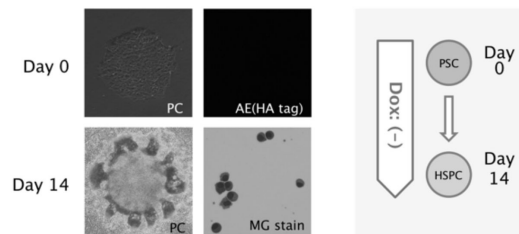
- (1) 遺伝子導入 : ClassI (FLT3ITD)、ClassII (AML1-ETO) 白血病遺伝子の誘導発現カセットを作成し iPS 細胞に導入する。
- (2) 造血分化 : 変異導入 iPS 細胞を造血分化培養に供する。
- (3) 網羅的遺伝子変異導入 : 誘導した造血前駆細胞を分取し、未知関連遺伝子を網羅的に探索するための shRNA 発現ライブラリーをウイルスで導入する。
- (4) スクリーニング : in vitro (分化成熟異常・血球産生量の亢進・メチルセルロースアッセイでの自己複製) in vivo (免疫不全マウスへの連続移植) の解析により、既知白血病遺伝子に関連して病態形

成に関わる遺伝子を同定する。



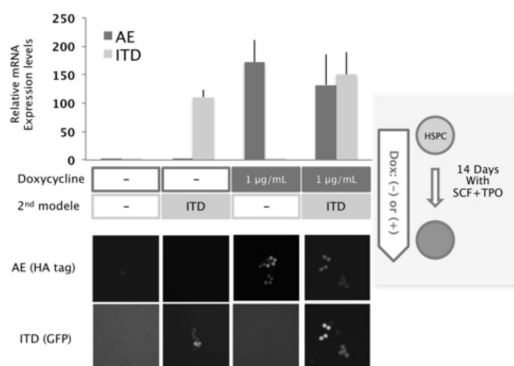
4. 研究成果

- (1) 遺伝子導入 iPS 細胞の作製 : ClassI (FLT3ITD)、ClassII (AML1-ETO) 白血病遺伝子の誘導発現カセットを iPS 細胞へ導入することに成功した。まず、ドキシサイクリン (Dox) 依存性に遺伝子の発現を誘導できるカセットベクターを作製し、FLT3ITD および AE 遺伝子をクローニングした。次に、それらのプラスミドを iPS 細胞へ Piggybac システムを用いて導入した。それらの iPS 細胞は、Dox 非存在下で正常に維持増殖可能であった。

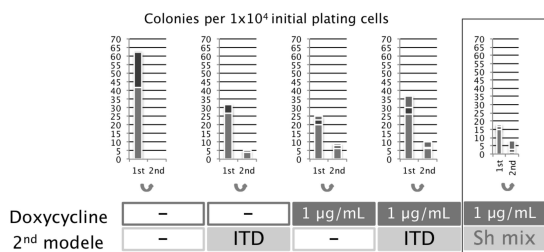


- (2) 変異導入細胞の造血分化能の確認 : 変異導入 iPS 細胞を、申請者らが以前に報告した 2 次元分化法を用いて造血細胞へ誘導した。BMP4、VEGF をステップワイズに加える事により、未分化な iPS 細胞

から原始線条、側板中胚葉に相当するステージを経て血管内皮と血球の共通前駆細胞（ヘマンジオブラスト）まで、白血病遺伝子非誘導条件で正常な分化能を示した。さらに、造血サイトカインである SCF と TPO を加えることにより、正常な造血前駆細胞を誘導することが可能であった。そこで、造血前駆細胞の段階で Dox を加えて予め導入済みの白血病遺伝子を発現誘導すると同時に、追加的に別の白血病遺伝子を導入して造血細胞を観察した。興味深いことに、FLT3ITD と AE を共発現させた細胞ではコロニー形成能が有意に増強し白血病細胞様の形態を呈したが、FLT3ITD、AE それぞれの単独導入細胞においては同様の表現型を呈さなかった。これらの



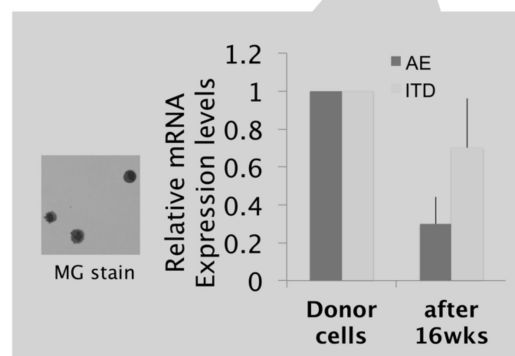
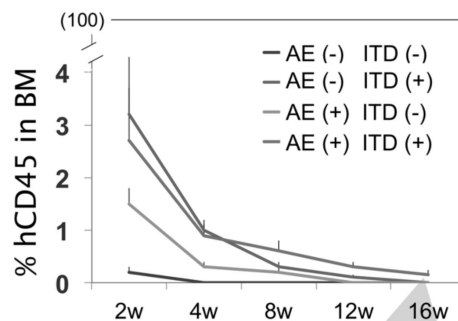
結果により、iPS 細胞由来の造血細胞へ特定の白血病遺伝子を組み合わせると導入すれば疾患病型のモデルを構築できること、またこれらの細胞が未知の疾患遺伝子をスクリーニングするツールとして使用可能であることが明らかになった。



(3) 網羅的遺伝子変異導入：FLT3ITD、AE そ

れぞれを単独導入した iPS 細胞に由来する造血前駆細胞を分取し、未知関連遺伝子を網羅的に探索するための shRNA 発現ライブラリーをウイルスで導入した。

- (4) スクリーニング：前項で作製した細胞を用いて、in vitro (分化成熟異常・血球産生量の亢進・メチルセルロースアッセイでの自己複製) in vivo (免疫不全マウスへの連続移植) の解析を行った。ShRNA 導入細胞の一部から、in vitro のコロニー形成能亢進、in vivo 連続移植能の獲得など、白血病様の表現型を獲得したクローンが得ることに成功した。現在、それらのクローンでどのような細胞内シグナル経路の摂動が加わっているのかについて、より詳細な解析を進めている。



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)

〔学会発表〕(計1件)

1: Niwa A, Nakahata T and Saito M.

**Phenomic Screen to Explore Novel
Pathogenesis of AML1-ETO-Positive
Leukemia Using PSC-Derived
Hematopoietic Cells**

American Society of Hematology, 55st
Annual Meeting. 2014.12.6-9; San
Francisco, CA, USA.

6 . 研究組織

(1)研究代表者 丹羽 明 (NIWA Akira)

京都大学・iPS 細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号 : 20546999