

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893048

研究課題名(和文) リプログラミング技術を用いたヒト型慢性骨髄単球性白血病マウスモデルの作成と解析

研究課題名(英文) The mouse model using patient-derived iPSCs recapitulates chronic myelomonocytic leukemia

研究代表者

田岡 和城 (Taoka, Kazuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30529178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：CMMoL患者からOCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、p53-shRNAを導入し、iPS細胞(CMMoL-iPS)を樹立した。CMMoL-iPS細胞由来血球は造血能の亢進を示しており、表面抗原の特性も再現した。CMMoL-iPS細胞を免疫不全マウスの皮下に移植すると、奇形腫内で造血幹細胞が生じ、その細胞を免疫不全マウスに2次移植したところ、CD13陽性の単球細胞やCD34陽性細胞のCMMoL様細胞が産生され、CMMoLヒト型マウスモデルを樹立することに成功した。CMMoL-iPS細胞由来血球はERKの活性化を来しており、RAS阻害剤やMEK阻害剤により増殖が阻害された。

研究成果の概要(英文)：We established patient-derived iPSCs of chronic myelomonocytic leukemia (CMML) by introducing episomal vectors with butyrate under hypoxic conditions. In a CMML patient, an unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10) and mutations in EZH2, RUNX1, NRAS, and TP53 were detected in all CMML iPSCs clones. CMML iPSC-derived hematopoietic progenitor cells (HPCs) formed an increased number of hematopoietic colonies and recapitulated the profiles of the surface antigens of CMML in vitro. Phosphorylation of ERK was increased in CMML iPSC-derived HPCs, and a MEK or RAS inhibitor suppressed the colony-forming capacity. The human CMML mouse model was established by secondary transplantation of human CD45+ cells from teratomas generated from CMML iPSCs, which exhibited monocytosis and proliferation of blasts in the bone marrow. This novel CMML model generated using patient-derived iPSCs produced HPCs that recapitulated the properties of CMML.

研究分野：iPS

キーワード：iPS 白血病

1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄単球性白血病 (chronic myelomonocytic leukemia: CMMoL) CMMoL は、骨髄異形性症候群と骨髄増殖性疾患の両方の性質をもったクローン性増殖性疾患である。現在、CMMoL は原因は未解明であり、治療法も確立されていない難治性造血器腫瘍である。高齢者に多く、骨髄移植が出来ない場合には根治治療がなく予後不良である。これまで細胞株の樹立や適切なマウスモデルもないことから、これまで十分な病態解析や治療法の開発が困難であった。この問題を克服するため、CMMoL 患者由来細胞をリプログラミングさせ、疾患由来 iPS 細胞を樹立し、再び血球に再分化誘導することで、疾患を再現することで、これまで困難であった CMMoL 患者の病態をより反映した解析が可能となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、まず申請者が樹立した難治性疾患である CMMoL 患者由来 induced pluripotent stem cells (CMMoL-iPS) を用いて、in vitro および in vivo で CMMoL 患者の病態を再現することである。特に、疾患モデルとして、CMMoL-iPS をストローマ細胞と一緒に免疫不全マウスに皮下移植することにより、奇形腫内や末梢血、骨髄に iPS 由来の CMMoL 細胞が産生され、CMMoL の病態の再現を構築するヒト型 CMMoL マウスモデルの作成を行なう。作成したヒト型 CMMoL マウスモデルを用いた CMMoL の細胞表面分子やシグナル伝達異常などの病態解明をおこない、その結果をもとに化合物ライブラリーを用いて治療につながる薬剤スクリーニングを行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CMMoL-iPS を用いた in vitro での疾患病態の再現 及び解析

まず、CMMoL-iPS 細胞を用いて、CMMoL の病態を再現し疾患モデルとなりえるか in vitro

で検討する。すでに、コロニーアッセイでは、CMMoL の病態を再現することが示された。平成 25 年度前半で、コロニーアッセイ系だけでなく共培養系で疾患病態の再現も評価する。具体的には、骨髄球系は CMMoL-iPS 細胞由来の造血前駆細胞をサイトカイン付加で 10T1/2 共培養で 14 日培養したのち血球回収した後、増殖能、形態、表面マーカーを評価する。赤芽球系培養系は、申請者がヒト造血前駆細胞から赤芽球分化誘導の実験を報告しており (Int J Hematol, 2012, Feb) その赤芽球分化誘導系をもちいて評価する。巨核球系分化誘導は、東京大学医科学研究所の指導のもと、10I/2 共培養系で巨核球系分化誘導が確立しており (blood, 2007 Jun) それぞれの系で血球分化誘導したのち増殖能、形態、表面マーカーを評価する。

(2) CMMoL-iPS を用いた in vivo での疾患病態の再現 および解析

(2)- : CMMoL-iPS を用いた疾患モデルマウスの作成

Amabile らによって、免疫不全マウスに iPS を OP9 細胞と共に免疫不全マウスに皮下移植することで、テラトーマや骨髄中に造血前駆細胞が再現されることが報告された。(Blood. 2013 Feb 21) 現在、免疫不全マウスの準備をおえており、平成 25 年に CMMoL-iPS の皮下移植を行い 8 週後、テラトーマや骨髄、血液中に CMMoL 細胞が形成されるか解析を行う。

(2)- : CMMoL 疾患モデルマウスの解析

平成 25 年に奇形腫内、末梢血、骨髄に CMMoL の細胞が存在するか、病理学的検査及び CMMoL 疾患特異的な表面マーカーである CD13、CD14、CD68、CD64 で表現型を確認する。健常者 iPS 細胞を皮下移植して作成したコントロールマウスと比較して、造血幹細胞分画、増殖能、コロニー形成能、遺伝子及び蛋白質発現レベルなどを評価する。

(2)- : CMMoL 疾患モデルマウスでの 2 次移

植

CMMoL-iPS 細胞を皮下移植した 8 週後、奇形腫内の造血細胞を CD34+CD45+ で分離し造血幹細胞を回収する。免疫不全マウスに 2 次移植を行う。Amabile らの報告によると、長期の造血が保持されていることが報告されており、CMMoL が 2 次移植で再現されるか、さらに芽球の増加がみられるか（白血化）を同様に病理学的検索、表面マーカー等で評価する。

(3) In vitro 系の CMMoL 再現系での薬剤スクリーニング

iPS 細胞を使う大きな利点として、繰り返し様々な実験が可能であることである。CMMoL-iPS から血球分化誘導した CD34 + CMMoL 幹細胞を用いて薬剤スクリーニングを行う。薬剤スクリーニングの方法としては、細胞増殖性や細胞周期、細胞内 ATP 量を測定するホタル・ルシフェラーゼ発光法で評価を行う。東京大学には創薬オープンイノベーションセンターで大規模な化合物ライブラリーが構築されており、薬剤スクリーニングを行う。更に、異なる複数の CMMoL-iPS において、見出した新規治療法が複数のクローンに対して有効であるかを検証する。将来はスクリーニングで見出した薬剤候補を、in vivo の CMMoL モデルで検討し新規薬剤の開発を行うことを目指す。

4. 研究成果

申請者はリプログラミング手法を改良してこれまで iPS 化できなかった CMMoL 患者からの iPS 細胞の樹立を成功した。免疫染色で SSEA4、Tra1-60 陽性である。また、幹細胞マーカー（Nanog, Oct4, Sox2, Klf-4, c-myc）の発現を確認した。CMMoL 患者の染色体異常（46,XY,+1,der(1;7)(q10;p10)）が CMMoL-iPS においても認められることを確認した。（図 1）元の CMMoL 細胞は染色体転座(46XY, +1, der(1;7)(q10;p10))および EZH2 I713T 変異、RUNX1 F97C 変異、NRAS G13D 変異、P53 P72R

変異を有していたが、CMMoL-iPS 細胞由来血

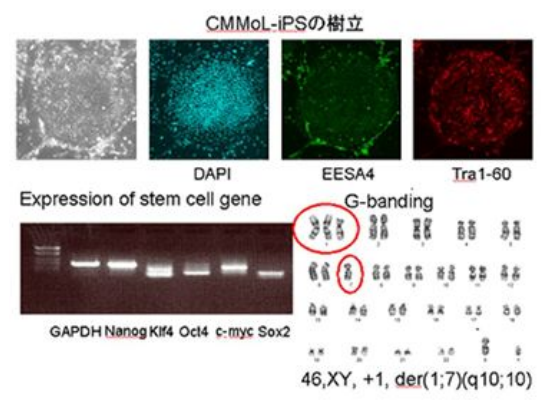


図 1

球においても同様の染色体異常および遺伝子異常が存在することを確認した。

さらに、CMMoL-iPS 細胞を用いて、CMMoL の病態を再現し疾患モデルとなりえるか in vitro で検討した。血球分化後に造血幹・前駆細胞が多数含まれる CD34 陽性 CD43 陽性細胞を用いて、半固形培地 (MethoCult™ H4434 Classic: SCF, GM-CSF, IL-3, EPO を含む) にてコロニー形成能を評価した結果、CMMoL-iPS 細胞由来血球は Normal-iPS 細胞由来血球と比較して、多数のサイズの大きい造血コロニー (特に CFU-GM コロニーと CFU-GEMM コロニー) を形成した (図 2)。さらに、Normal-iPS 由来造血コロニーはほとんどマクロファージなど分化した細胞で構成されていたのに対し、CMMoL-iPS 由来造血コロニーは多数の単芽球により構成されていた。表面マーカー解析を行った結果、CMMoL-iPS 由来造血コロニーでは CD34 陽性の造血幹・前駆細胞、CD13 陽性の骨髄系細胞の増加を認めた (図 3)。特に CD13 陽性細胞の中でも CD14

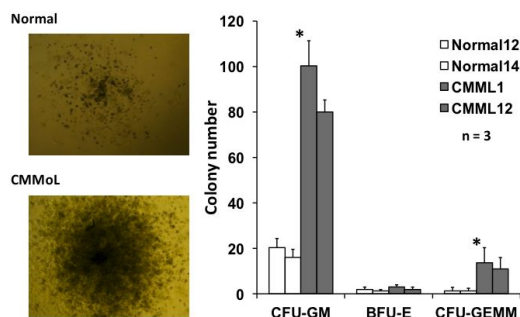


図 2

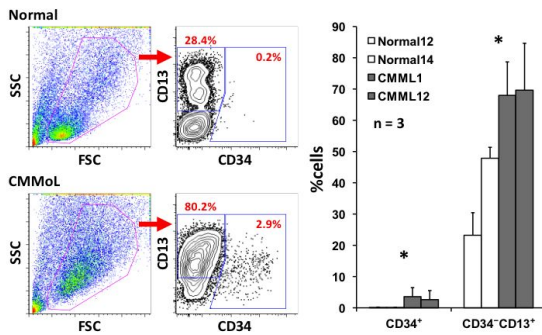


図 3

陽性の単球系細胞および CD14 陰性 CD24 陽性の未熟な顆粒球系細胞の増加を認めた。末梢血における CD14 陰性 CD24 陽性細胞の増加は CMMoL に特徴的な所見であり (Blood. 115:78-88, 2010)、これらの結果は CMMoL-iPS 細胞由来血球が CMMoL の特徴を反映していると考えられた。半固形培地を用いて colony replating assay を行った結果、Normal-iPS 細胞由来血球は 3 継代目以降ほとんどコロニー形成が認められなかったが、CMMoL-iPS 細胞由来血球は 4 継代目以降も多数の造血コロニーを産生した。さらに、サイトカインを含まない半固形培地 MethoCult™ H4230) にてコロニー形成能を評価した結果、Normal-iPS 細胞由来血球はほとんどコロニー形成不可能であったが、CMMoL-iPS 細胞由来血球は多数の自発的コロニー形成を認めた。これらの結果は、CMMoL-iPS 細胞由来血球が元の CMMoL 細胞の白血化能を反映していることを示していると考えられた。以上より、世界初の CMMoL ヒト疾患モデルの作製に成功した。

急性骨髄性白血病と異なり、CMMoL の患者検体は直接、免疫不全マウスに移植しても生着しなかった。また、in vitro で CMMoL-iPS 細胞から誘導した造血前駆細胞を免疫不全マウスに移植したが生着が認められなかった。そこで、CMMoL-iPS 細胞を免疫不全マウスに OP9 と一緒に皮下移植し、奇形腫を作成したところ、奇形腫内に CD34 陽性 CD45 陽性の造血前駆細胞を認めた。また、奇形腫内の造血前駆細胞はマウス骨髄にも生着を認めた。奇形腫内の造血前駆細胞を免疫不全マウスの骨

髄内へ 2 次移植を行ったところ、マウス骨髄内にヒト CD45 陽性細胞を認め、CD34 陽性細胞では芽球様細胞が、CD13 陽性 CD34 陰性では単球が認められた (図 4)。これらの血球は患者検体と同様の EZH2 変異、NRAS 変異、RUNX1 変異を持っており、CMMoL-iPS 細胞由来マウスモデルを作製することに成功した。この疾患 iPS 細胞由来奇形腫を介した、ヒト化マウスモデルの手法は、CMMoL-iPS のみならず、その他の疾患にも応用可能であり、汎用性があると考えられた。MEK や RAS 系は CMMoL において重要な役割を果たすことがこれまで知られており、本患者では N-RAS 変異を認めた。CMMoL-iPS 細胞由来血球は、ERK の活性化を来しており、RAS 阻害剤や MEK 阻害剤による RAS/MEK/ERK シグナルの阻害により、増殖が阻害されたことから、疾患の本態を反映するモデルと考えられた (図 5)。

[謝辞] 東京大学医科学研究所 中内啓光先生、大津真先生、京都大学 iPS 細胞研究所 CiRA 中畑龍俊先生、江藤浩之先生に感謝申し上げます。

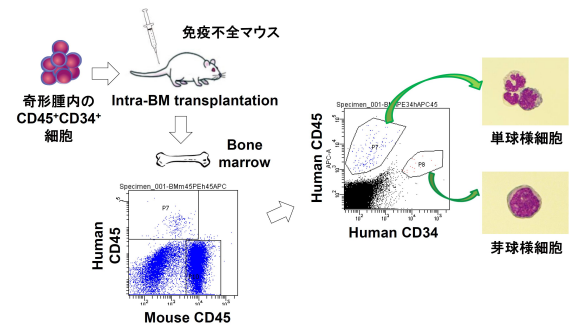


図 4

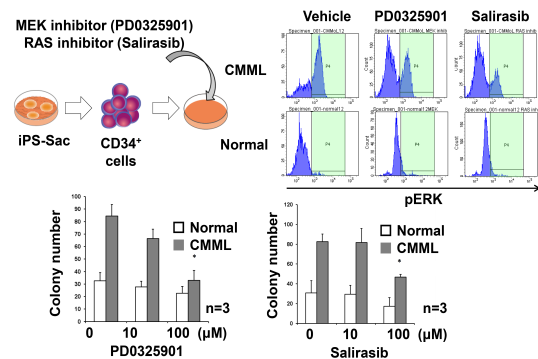


図 5

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)

Hosoi M, Kumano K, Taoka K, Arai S, Kataoka K, Ueda K, Kamikubo Y, Taokayama N, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells derived from primary and secondary myelofibrosis patient samples. Exp Hematol. 2014 Sep;42(9):816-25. (査読有)

Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N, Otsu M, Nagae G, Ueda K, Nakazaki K, Kamikubo Y, Eto K, Aburatani H, Nakauchi H, Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples.

Blood;119(26):6234-42. Jun 28 2012

[学会発表] (計 4 件)

Taoka K, Arai S, Hosoi M, Nakamura F, Miyauchi M, Yamazaki S, Honda A, Kobayashi T, Kataoka K, Kumano K, Yoshimi A, Eto K, Nakauchi H, Nakahata T, Kurokawa M. Modeling chronic myelomonocytic leukemia through patient-derived induced pluripotent stem cells. 第 76 回日本血液学会学術総会、大阪、2014 年 11 月 1 日

Taoka K, Arai S, Hosoi M, Nakamura F, Miyauchi M, Yamazaki S, Honda A, Kobayashi T, Kataoka K, Kumano K, Yoshimi A, Eto K, Nakauchi H, Nakahata T, Kurokawa M. Modeling chronic myelomonocytic leukemia through patient-derived induced pluripotent stem cells. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014 年 9 月 27 日

Taoka K, Arai S, Hosoi M, Nakamura F, Miyauchi M, Yamazaki S, Honda A, Kobayashi T, Kataoka K, Kumano K, Yoshimi A, Eto K, Nakauchi H, Nakahata T, Kurokawa M.

Modeling chronic myelomonocytic leukemia through patient-derived induced pluripotent stem cells. Scientific Exchange Training Program, Hematopoietic stem cells 2014, Nov.1, JSH.

Kataoka K, Taoka K et al, Modeling Chronic Myelomonocytic Leukemia Through Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells, the ASH Program Committee for presentation in an Oral Session at the 55th ASH Annual Meeting and Exposition (December 7-10, 2013) in New Orleans, LA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.u-tokyo-hemat.com/research_ips.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

東京大学医学部附属病院

血液腫瘍内科 助教

田岡和城 (Taoka Kazuki)

研究者番号 : 30529178