

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670511

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた先天性骨髄不全症候群からの白血病発症機序解明とその治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of occurrence of leukemia from congenital bone marrow failure syndrome and establishment of its treatment using human iPS cells

研究代表者

海老原 康博 (EBIHARA, Yasuhiro)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：40302608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ELANE遺伝子変異を持つ重症先天性好中球減少症(SCN)と周期性好中球減少症(CyN)はともに先天性骨髄不全症候群の一つである。SCN患者から樹立したiPS(SCN-iPS)細胞は、好中球系への分化抑制を認め、SCNの病態を反映している。一方、CyNはSCNとは異なり、白血病への進展は認められない。CyN患者から樹立したiPS(CyN-iPS)細胞は、SCN-iPS細胞とは異なり、健常人由来iPS細胞と同程度の好中球を含む血液細胞が誘導された。以上より、CyN-iPS細胞とSCN-iPS細胞からの血液細胞への分化誘導を比較することは、SCNの白血病進展機構の解明に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Severe congenital neutropenia (SCN) and cyclic neutropenia (CyN) are belonged to congenital bone marrow failure syndrome (CBMFS). Acute myelogenous leukemia (AML) was sometimes developed in the patients with some CBMFS including SCN. No AML occurred in the patients with CyN. To investigate the mechanism of AML occurrence, we established iPS cells from the patients (both had mutation in ELANE gene region) with SCN (SCN-iPS cells) or CyN (CyN-iPS cells), respectively. Myeloid cells derived from CyN-iPS cells revealed that the capability to differentiate into hematopoietic cells including neutrophils was almost similar to control iPS cells. SCN-iPS cells showed decreased capability into neutrophils, reflecting the disease status of SCN patients. To compare the mechanism of hematopoietic differentiation from SCN- and CyN-iPS cells was expected to be useful to analyze the mechanism of the onset of AML and treatment of these AML.

研究分野：小児血液

キーワード：先天異常学

1. 研究開始当初の背景

(1) 重症先天性好中球減少症(SCN: severe congenital neutropenia)、Fanconi 貧血、Diamond-Blackfan 症候群、Shwachman-Diamond 症候群などの先天性骨髄不全症候群では、白血病を非常に高率に発症する。これは、先天的に有する遺伝子異常を背景として、新たな遺伝子異常が付加されることにより、白血病に進展すると考えられている。しかし、その発症の詳細なメカニズムについてはほとんど解明されていない。そのため、有効な治療法も同種造血幹細胞移植以外確立されていない。一方、同じような遺伝子異常の背景を持っているにもかかわらず、白血病を発症しない先天性骨髄不全症候群も知られている。

(2) ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、リプログラミングによりもたらされる多能性幹細胞であるため、種々の体細胞からiPS細胞を樹立することが可能である。このことから、ある疾患患者の体細胞からiPS細胞を樹立し、それらの疾患特異的iPS細胞からその疾患の異常を来した細胞に分化誘導することでその疾患を再現することができる。このことにより、その疾患の発生過程を再現し、その病態のメカニズムを解析できると考えられる。

(3) 我々は、これまでにヒトES細胞やiPS細胞をマウスストローマ細胞と共培養することにより、造血/血液細胞を分化誘導させる方法を確立している。そこで、先天性骨髄不全症候群患者からiPS細胞を樹立し、血液細胞への分化誘導法を応用することで、白血病の発症メカニズムを解明し、その治療法を開発することを検討した。

2. 研究の目的

本研究では先天性骨髄不全症候群の患者体

細胞を用いてiPS細胞を樹立し、マウス胎仔aorta-gonad-mesonephros (AGM)領域由来ストローマ細胞であるAGM-S3細胞との共培養により、iPS細胞から造血/血液細胞を分化誘導する。特にSCNに着目し、先天性骨髄不全症候群の中でSCNと同じ遺伝子異常が認められる周期性好中球減少症(CyN: cyclic neutropenia)では白血病の発症が認められないことより、周期性好中球減少症患者からiPS細胞を樹立して、この両者の血液細胞への分化誘導過程を比較検討することで、白血病発症の機序を検討する。

3. 研究の方法

(1) 疾患特異的iPS細胞の樹立

SCN患者骨髄細胞からのiPS細胞はすでに樹立されてあるiPS細胞(SCN-iPS細胞)を用いた。

新たに周期性好中球減少症患者骨髄細胞からストローマ細胞を分化誘導し、培養中のストローマ細胞にセンダイウィルスベクターを用いてOct3/4、Sox-2、Klf-4、c-Mycの4つの遺伝子を遺伝子導入することで、iPS細胞を作製した。作製したiPS細胞についてその性状を解析した。

(2) iPS細胞からの血液細胞への分化誘導
SCN-iPS細胞、CyN-iPS細胞と健常人由来のiPS細胞を我々が樹立したマウス胎仔AGM領域由来ストローマ細胞(AGM-S3細胞)と共培養することにより、血液細胞へ分化誘導を開始し、その後、CD34陽性細胞を分離して、さらに血液細胞への分化能を検討した(我々はES細胞やiPS細胞をこのマウスストローマ細胞(AGM-S3細胞)との共培養することにより、種々の血液細胞へ分化誘導できることを報告している)。また、液体培養培地にサイトカインを添加して好中球分化増殖能を検討した。

4. 研究成果

(1) SCN-iPS 細胞は以前に Oct3/4、Sox-2、Klf-4、c-Myc の4つの遺伝子を遺伝子導入することで、樹立している。また、患者本人と同じ好中球エラスターゼ (ELANE) 遺伝子変異を有していることも確認されている。今回、周期性好中球減少症患者骨髄細胞からストローマ細胞を分化誘導、骨髄ストローマ細胞にセンダイウィルスベクターを用いて Oct3/4、Sox-2、Klf-4、c-Myc の4つの遺伝子を遺伝子導入することで、iPS 細胞を作製した。今回作製した CyN-iPS 細胞のうち3クローンを選んで以下の検討を行った。今回作製した CyN-iPS 細胞3クローンとも、ウィルスの残存はなく導入遺伝子のサイレンシングが確認された。また Nanog や Oct3/4 などの未分化マーカーが発現していることが確認できた。次に今回樹立した CyN-iPS 細胞が、患者本人と同じ ELANE 遺伝子変異を有していることを確認した。以上のことから、周期性好中球減少症患者由来の iPS 細胞が樹立できたと考えられた。

(2) 我々が開発したマウス胎仔 AGM 領域由来ストローマ細胞 (AGM-S3 細胞) と iPS 細胞の共培養による血液細胞への分化誘導法に従い、SCN-iPS 細胞、CyN-iPS 細胞と健常人由来の iPS 細胞をそれぞれ AGM-S3 細胞と 12-14 日間共培養すると、敷石上の細胞集団 (cobblestone 領域) が確認され、それぞれの iPS 細胞から造血細胞への分化誘導が確認された。ここで細胞を回収して、磁気ビーズ法を用いてヒト CD34 陽性細胞を分離し、血液細胞コロニー形成や液体培養を施行した。ビーズ法にて分離した CD34 陽性細胞を用いて SCF+FP6+IL-3+G-CSF+GM-CSF+TPO+Epo 存在下でのコロニー形成を比較すると、骨髓球系コロニー形成は SCN-iPS 細胞では CyN-iPS 細胞やコントロール由来の iPS 細胞に比べて著明に減少しており、形成される骨

髄球系コロニーも小さいものがほとんどであった。また、G-CSF のみを添加した場合に形成される顆粒球コロニーは SCN-iPS 細胞では著明に抑制され、ほとんど形成されなかったが、コントロールと CyN-iPS 細胞から形成される顆粒球コロニーにはほとんど差がなく、G-CSF に対する反応はコントロールと同程度と考えられた。一方、赤芽球や混合コロニー形成は3者の間で大きな差は認められなかった。このことから SCN-iPS 細胞と異なり CyN-iPS 細胞はコントロールと同等のコロニー形成能を有していると考えられた。次に、同様にビーズ法にて分離した CD34 陽性細胞を SCF+FP6+IL-3+G-CSF+TPO 存在下で2週間液体培養を行い、好中球系への分化誘導を比較すると、SCN-iPS 細胞由来の細胞はほとんど細胞数が増加しないが、CyN-iPS 細胞由来の細胞は約60倍とコントロールと同程度の増加を認めた。このことから、SCN-iPS 細胞では好中球分化はかなり抑制されているが、CyN-iPS 細胞はコントロールと同程度の好中球分化能を有していると考えられた。

(3) 今回形成された CyN-iPS 細胞を用いた解析では、SCN-iPS 細胞とは異なり、コントロールと同程度の好中球分化能を含めた造血細胞への分化能を有していると考えられた。SCN-iPS 細胞とは異なった性状により、周期性好中球減少症は同じ ELANE 遺伝子変異を持っているにもかかわらず、白血病を発症しない可能性が考えられる。今後、SCN-iPS 細胞と CyN-iPS 細胞から血液細胞を分化誘導してその過程で発現される遺伝子を比較することにより、ELANE 遺伝子変異とは別の重症先天性好中球減少症や周期性好中球減少症の病態に関与する遺伝子の発見や重症先天性好中球減少症の白血病発症機構の解明とその治療法の開発に寄与するものと期待される。

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 13 件)

1. Yamamoto S, Otsu M, Matsuzaka E, Konishi C, Takagi H, Hanada S, Mochizuki S, Nakauchi H, Imai K, Tsuji K, Ebihara Y. Screening of Drugs to Treat 8p11 Myeloproliferative Syndrome Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells with Fusion Gene CEP110-FGFR1. PLoS one. 2015 10(3) 巻 e0120841. DOI: 10.1371/journal.pone.0120841.
2. Ebihara Y, Ishikawa K, Mochizuki S, Tanaka R, Manabe A, Iseki T, Maekawa T, Tsuji K. Allogeneic stem cell transplantation for patients with acute myeloid leukemia developing from severe congenital neutropenia. Br J Haematol. 査読有 164 巻 2014 451-464, DOI: 10.1111/bjh.12638 164:451-464,2014
3. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Tojo A, Takahashi S. Impact of sex incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. Bone Marrow Transplant. 査読有 49 (5)巻 2014,634-9 DOI: 10.1038/bmt.2014.10.
4. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Tojo A, Takahashi S. Effect of ABO blood group incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation following myeloablative conditioning. Biol Blood Marrow Transplant. 査読有 20(4)巻 2014 577-81, DOI:10.1016/j.bbmt.2013.12.563.
5. Nagamachi A, Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Ebihara Y, Tsuji K, Honda Z, Takubo K, Suda T, Oda H, Inaba T, Honda H. Acquired deficiency of A20 results in rapid apoptosis, systemic inflammation, and abnormal hematopoietic stem cell function. PLoS One. 査読有 9(1)巻 2014 e87425 DOI:10.1371/journal.pone.0087425.
6. Sakurai M, Kunimoto H, Aatanabe N, Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, Nishimura T, Sadahira K, Fukuda K, Okano H, Nakauchi H, Morita Y, Matsumura I, Kudo K, Ito E, Ebihara Y, Tsuji K, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. Leukemia, 査読有 28(12)巻 2014 2344-54 DOI: 10.1038/leu.2014.136.
7. Sakashita K, Kato I, Daifu T, Sada S, Hiramatsu H, Nishinaka Y, Ebihara Y, Ma F, Matsuda K, Saito S, Hirabayashi K, Kurata T, Uyen LT, Nakazawa Y, Tsuji K, Heike T, Nakahata T, Koike K. In vitro expansion of CD34+CD38- cells under stimulation with hematopoietic growth factors on AGM-S3 cells in

- juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 査読有 29(3)巻 2014 606-14 DOI: 10.1038/leu.2014.239.
8. Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Otsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Crawford BE, Brown JR, Ohashi T. Enzyme augmentation therapy enhances the therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type II mice. *Mol Genet Metab*. 査読有 111(2)巻 2014 139-46 DOI: 10.1016/j.ymgme.2013.09.01
 9. Nakahara F, Kitaura J, Uchida T, Nishida C, Togami K, Inoue D, Matsukawa T, Kagiya Y, Enomoto Y, Kawabata KC, Chen-Yi L, Komeno Y, Izawa K, Oki T, Nagae G, Harada Y, Harada H, Otsu M, Aburatani H, Heissig B, Hattori K, Kitamura T. Hes1 promotes blast crisis in chronic myelogenous leukemia through MMP-9 upregulation in leukemic cells. *Blood*. 査読有 123(25)巻 2014 3932-3942 DOI:10.1182/blood-2013-01-476747
 10. Matsunawa M, Yamamoto R, Sanada M, Sato-Otsubo A, Shiozawa Y, Yoshida K, Otsu M, Shiraishi Y, Miyano S, Isono K, Koseki H, Nakauchi H, Ogawa S. Haploinsufficiency of Sf3b1 leads to compromised stem cell function but not to myelodysplasia. *Leukemia*. 査読有 28(9)巻 2014 1844-50 DOI: 10.1038/leu.2014.73
 11. Lai CY, Yamazaki S, Okabe M, Suzuki S, Maeyama Y, Iimura Y, Onodera M, Kakuta S, Iwakura Y, Nojima M, Otsu M, Nakauchi H. Stage-specific roles for CXCR4 signaling in murine hematopoietic stem/progenitor cells in the process of bone marrow repopulation. *Stem Cells*. 査読有 32(7)巻 2014 1929-1942 DOI: 10.1002/stem.1670
 12. Hosoi M, Kumano K, Taoka K, Arai S, Kataoka K, Ueda K, Kamikubo Y, Takayama 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*. 42(9)巻 2014 816-25 DOI: 10.1016/j.exphem.2014.03.010
 13. Higuchi T, Kawagoe S, Otsu M, Shimada Y, Kobayashi H, Hirayama R, Eto K, Ida H, Ohashi T, Nakauchi H, Eto Y. The generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from patients with infantile and late-onset types of Pompe disease and the effects of treatment with acid-alpha-glucosidase in Pompe's iPSCs. *Mol Genet Metab*. 112(1)巻 2014 44-48 DOI:10.1016/j.ymgme.2014.02.012
- 〔学会発表〕(計1件)
1. 海老原 康博, 望月 慎史, 大津 真, 辻 浩一郎 RCCに対して同種臍帯血移植を施行した2例 日本小児血液・がん学会(2014年11月28日~30日・岡山コンベンションセンター、岡山県岡山市)
- 〔図書〕(計1件)
1. 海老原 康博 メディカルドゥ 遺伝子医学 MOOK iPS細胞を用いた難病研究-臨床病態解明と創薬に向けた研究の

6. 研究組織

(1)研究代表者

海老原 康博 (EBIHARA, Yasuhiro)
東京大学・医科学研究所・特任准教授
研究者番号：40302608

(2)研究分担者

大津 真 (OTSU, Makoto)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：30361330

望月 慎史 (MOCHIZUKI, Shinji)
東京大学・医科学研究所・特任助教
研究者番号：90349473