

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390321

研究課題名（和文）

ヒト iPS 細胞を用いた先天性骨髄不全症候群の病因・病態の解明と治療法の開発

研究課題名（英文）

Analysis of pathogenesis of 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・助教

研究者番号：40302608

研究成果の概要（和文）：

1) 重症先天性好中球減少症患者由来 iPS 細胞 (SCN-iPS 細胞) の解析

SCN-iPS 細胞由来造血細胞では好中球の成熟障害が認められ、SCN の病態をよく再現していた。また、SCN-iPS 細胞由来造血細胞では WNT/ β -Catenin 経路関連遺伝子の発現が低下していたため、WNT3a を加えて分化誘導すると好中球が成熟したことより、WNT3a による治療の可能性が示された。

2) ダウン症候群患者体細胞由来 iPS 細胞 (DS-iPS 細胞) の解析

DS-iPS 細胞を造血細胞へ分化誘導すると造血が亢進していた。また、DS-iPS 細胞由来造血細胞では 21 番染色体上の RUNX1 の発現が亢進していた。この結果は、DS 患者の造血障害には RUNX1 の発現亢進が関与している可能性を示唆しており、これを標的とする治療法の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

1) Analysis of severe congenital neutropenia-derived iPS cells (SCN-iPS cells)

Clonal hematopoietic assay indicated that SCN-iPS cells had a significantly decreased capability to generate neutrophil colonies, which contained few mature neutrophils, reflecting the feature of SCN. Since the expression of WNT/ β -Catenin pathway-related genes were decreased, we added WNT3a to hematopoiesis-induction culture. WNT3a stimulated the maturation of SCN-iPS cell-derived neutrophils. These results suggested the possibility of treatment of SCN using WNT3a.

2) Analysis of Down syndrome-derived iPS cells (DS-iPS cells)

Clonal hematopoietic assay indicated that DS-iPS cells had increased capabilities to generate all types of definitive hematopoietic/blood cells. Microarray analysis also demonstrated an increased expression of RUNX1 on chromosome 21, which was confirmed by RT-PCR. These results indicated that hematopoietic abnormalities in DS patients might relate with the increased expression of RUNX1, which could be a target gene for the treatment of hematopoietic disorders in patients with Down syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：iPS 細胞、先天性骨髄不全症候群、重症先天性好中球減少症、ダウン症候群、RUNX1、WNT3a

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児においては、重症先天性好中球減少症 (SCN: severe congenital neutropenia)、Fanconi 貧血、Diamond-Blackfan 症候群、Pearson 症候群、Shwachman-Diamond 症候群、先天性角化異常症等の様々な遺伝的背景を有する骨髄不全症が存在し、先天性骨髄不全症候群 (CBMFS: congenital bone marrow failure syndrome) と呼ばれ、小児の骨髄不全の大きな特徴となっている。これらの疾患の原因遺伝子については、その一部は特定されているが、同定されていないものも多数存在し、特定された遺伝子についても、骨髄不全を惹起するメカニズム、さらには白血病、悪性腫瘍へ進展するメカニズムについてはほとんど解っていない。

(2) 一方、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、皮膚繊維芽細胞などの体細胞から樹立される、胚性幹細胞 (ES 細胞) と同質の性状を有する多能性幹細胞である。特に、ヒト iPS 細胞の樹立法が開発されたことにより、その臨床応用が期待されている。我々は、平成 22 年度までの基盤研究において、ヒト ES 細胞の分化について研究し、ヒト胎児における造血発達について解明し、特にヒト ES 細胞から多能性造血細胞への分化誘導にも成功した (Int Nat J Hematol, 2007; PNAS, 2008)。そこで、これまで我々がヒト ES 細胞研究で培ってきた技術を、ヒト ES 細胞類似の性質を有するヒト iPS 細胞に応用し、CBMFS の病因・病態を解明し、新たな治療法の開発に資することを着想した。

2. 研究の目的

(1) 種々の CBMFS 患者から iPS 細胞を樹立し、その造血/血液細胞への分化誘導法を開発する。

(2) 樹立された CBMFS 患者由来 iPS 細胞を造血/血液細胞へ分化誘導し、その分化過程を細胞生物学及び分子生物学的に解析することにより、CBMFS における骨髄不全の病因・病態を明らかにする。

(3) 上記の結果に基づき、CBMFS の新規治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞から造血/血液細胞への分化誘導法の確立

① ストローマ細胞の樹立

我々が既に確立した方法で (Blood, 2001)、マウス胎仔組織からストローマ細胞を樹立する。

② ヒト iPS 細胞とストローマ細胞の共培養
京都大学山中伸弥博士から供与されたヒト iPS 細胞と樹立されたストローマ細胞を共培養する (Int J Hematol, 2007; PNAS, 2008)。

③ 共培養されたヒト iPS 細胞の血液細胞コロニー培養

10~14 日共培養されたヒト iPS 細胞を、我々が確立した方法で (Blood, 2005)、血液コロニー培養する。

(2) CBMFS 患者の皮膚由来繊維芽細胞からの iPS 細胞の樹立

① 倫理審査委員会への申請

本研究計画について、東京大学医学研究所倫理審査委員会の承認を得る。

② CBMFS 患者からの皮膚繊維芽細胞の培養
CBMFS 患者に本研究計画の内容を十分に説明し、文書による同意を得た後、CBMFS 患者から皮膚繊維芽細胞を樹立する。

③ CBMFS 患者由来 iPS 細胞の樹立

山中らの方法を用いて、CBMFS 患者由来繊維芽細胞から iPS 細胞を樹立する。

(3) CBMFS 患者由来 iPS 細胞から造血/血液細胞への分化の解析

CBMFS 患者由来 iPS 細胞を造血/血液細胞へ分化誘導し、その分化過程を、細胞生物学方法 (種々の分化マーカーの発現や機能解析等) 及び分子生物学的的方法 (発現遺伝子解析等) で追跡し、ヒト ES 細胞、あるいは健常人から樹立されたヒト iPS 細胞の分化と比較検討する。

(4) CBMFS の新規治療薬のスクリーニング

患者 iPS 細胞から造血細胞への分化系に種々の薬剤を添加し、ヒト ES 細胞あるいは健常人由来ヒト iPS 細胞の分化を、細胞生物学及び分子生物学的指標として、CBMFS 由来 iPS 細胞を正常分化に誘導する新規治療薬をスクリーニングする。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞から造血/血液細胞への分化誘導法の確立

マウス胎仔の二次造血の発生部位である AGM 領域から樹立されたストローマ細胞株

(AGM-S3 細胞)との共培養(12~14 日)により、健常人由来 iPS 細胞から安定的に造血細胞が分化誘導された。分化誘導された造血細胞を血液細胞コロニー培養すると、様々な血液細胞を含む血液細胞コロニーが形成され、分化誘導された赤血球は胎仔型ヘモグロビン(HbF)と成人型ヘモグロビン(HbA)を発現していたことより、二次造血由来の造血/血液細胞が分化誘導されたと考えられた。

(2)CBMFS 患者由来 iPS 細胞の樹立

東京大学医科学研究所・倫理審査委員会の承認を得た後、CBMFS に属する SCN 患者から文書による同意を得て、患者体細胞を採取し、これにレトロウイルスを用いて、OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC の4 遺伝子を導入することにより、iPS 細胞(SCN-iPS 細胞)の樹立に成功した。

(3)SCN-iPS 細胞の解析

①SCN-iPS 細胞を AGM-S3 細胞と共培養した後、血液細胞コロニー形成法を用いて血液細胞への分化誘導を検討した。その結果、SCN-iPS 細胞は、マウス AGM-S3 細胞との共培養により分化誘導された造血細胞による血液コロニー形成は、健常人由来 iPS 細胞と比較して、赤芽球コロニーや混合コロニー形成には変わらないが、好中球系コロニーは小さなコロニーが多く、コロニー数も著しく減少していた。また、G-CSF の過剰量投与により SCN-iPS 細胞からの好中球系コロニーの大きさと数は増加した。さらに、SCN-iPS 細胞から分化誘導された造血細胞の好中球分化を液体培養法で詳しく検討したところ、著名な好中球の成熟障害が認められた。これらの結果は、樹立された SCN-iPS 細胞は、血液細胞へ分化誘導することにより SCN の病態をよく再現することを示しており、本疾患の病態解明のために有用であると考えられた。

②SCN-iPS 細胞における好中球造血の障害を惹起している分子メカニズムについて検討した。マイクロアレイおよびリアルタイム PCR により、LEF-1、C/EBP- ϵ 、ELA2、BCL-2 遺伝子等の発現が低下していた。また、WNT/ β -Catenin 経路により制御されている Cyclin D1 や C/EBP- α 等の遺伝子の発現も低下していたため、WNT3a 蛋白を加えて分化誘導したところ、SCN-iPS 細胞由来の好中球が成熟した。以上の結果は、SCN の病態には WNT/ β -Catenin 経路が関与しており、WNT3a による治療の可能性が示された。

(4)ダウン症候群患者由来 iPS 細胞(DS-iPS 細胞)の解析

①DS-iPS 細胞及び健常人由来 iPS 細胞を、AGM-S3 細胞と共培養した後、血液細胞コロニー法を用いて、その造血/血液細胞への分

化能を比較検討した。その結果、DS-iPS 細胞からの分化誘導系においては、健常人由来 iPS 細胞からの分化誘導系と比較べて、全血球系において造血が亢進していることが明らかとなった。また、分化誘導された赤血球の解析から、二次造血、特に成人型造血の亢進が明らかとなった。

②DS-iPS 細胞と健常人由来 iPS 細胞から造血/血液細胞への分化過程における遺伝子発現をマイクロアレイで解析したところ、21 番染色体上の RUNX1 の発現が亢進しており、このことはリアルタイム PCR 法による解析でも確認された。以上の結果は、ダウン症候群患者の造血障害には、21 番染色体トリソミーによる RUNX1 の発現亢進が深く関与している可能性を示唆しており、これを標的とするダウン症候群における造血障害に対する新規治療法の可能性が示された。

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 17 件)

- ① Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, et al. (11 名 1 番目): Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent and young adult patients with hematologic malignancies: A single institute analysis. *Leuk Res*. 査読有 36: 128-131, 2012
DOI: 10.1016/j.leukres.2011.09.016
DOI: 10.1182/blood-2011-09-381400
- ② Umamoto T, Yamato M, Ishihara J, et al. (15 名 14 番目): Integrin $\alpha v \beta 3$ regulates thrombopoietin-mediated maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 査読有 119:83-94, 2012
DOI: 10.1182/blood-2011-02-335430
- ③ Takayama N, Eto K: In vitro generation of megakaryocytes and platelets from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol* 査読無 788:205-217, 2012
DOI: 10.1007/978-1-61779-307-3_15
- ④ Tsuda, M., Ebihara, Y., Mochizuki, S., et al. (6 名 2 番目): Reduced dose chemotherapy for acute promyelocytic leukaemia with adult Down syndrome. *Br J Haematol*. 査読有 155: 130-132, 2011
DOI:10.1111/j.1365-2141.2011.08655.x
- ⑤ Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T,

- Tamura D, et al. (21名 7番目): Seroprevalence of pandemic 2009 (H1N1) influenza A virus among schoolchildren and their parents in Tokyo, Japan. *Clin Vaccine Immunol.* 査読有 18: 860-866, 2011
DOI: 10.1128/CVI.00428-10
DOI: 10.1182/blood-2010-12-323691
- ⑥ Takayama N., Eto K., Nakauchi H.: Potential usefulness of human iPS cells on the generation of platelets. *Nihon Rinsho* 査読無 69:2161-2165, 2011
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22242314>
- ⑦ Funayama K, Saito-Kurimoto Y, Ebihara Y, et al. (7名 3番目): Adhesion-mediated self-renewal abilities of Ph+ blastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 396:193-198, 2010
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.03.172
- ⑧ Nagamachi A*, Htun PW*, Ma F*, et al. (12名 11番目): A 5' untranslated region containing the IRES element in the Runx1 gene is required for angiogenesis, hematopoiesis and leukemogenesis in a knock-in mouse model. *Dev Biol* 査読有 354:226-236, 2010
DOI:10.1016/j.ydbio.2010.07.015
- ⑨ Hayashi Y, Chan T, Warashina M, et al. (14名 9番目): Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or Cultured under Feeder- and Serum-Free Defined Conditions. *PLoS One* 査読有 5:E14099, 2010
DOI:10.1371/journal.pone.0014099
- ⑩ Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, et al. (16名 16番目): Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *Journal of Experimental Medicine* 査読有 207:2817-2830, 2010
DOI:10.1084/jem.20100844
- ⑪ Kulkeaw K, Mizuochi C, Horio Y, et al. (6名 5番目): Application of whole mouse embryo culture system on stem cell research. *Stem Cell Rev & Rep.* 査読有 5:175-180, 2009
DOI:10.1007/s12015-009-9064-2
- ⑫ Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, et al. (6名 4番目): TGF- β induces hibernation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Blood* 査読有 113:1250-1256, 2009
DOI:10.1182/blood-2008-04-146480
- ⑬ Matsumoto K, Isagawa T, Nishimura T, et al. (10名 5番目): Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. *PLoS ONE* 査読有 4:e4820, 2009
DOI:10.1371/journal.pone.0004820
- ⑭ Ogaeri T, Eto K, Otsu M, et al. (5名 2番目): The actin polymerization regulator WAVE2 is required for early bone marrow repopulation by hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 査読有 27:1120-1129, 2009
DOI: 10.1002/stem.42
- ⑮ Okabe M, Otsu M, Ahn DH, et al. (10名 8番目): Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood* 査読有 114:1764-1767, 2009
DOI:10.1182/blood-2009-02-203695
- ⑯ Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. (12名 4番目): CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine* 査読有 15:914-920, 2009
DOI:10.1038/nm.1964
- ⑰ Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, et al. (17名 17番目): Lnk/Sh2b3 regulates integrin α IIb β 3 outside-in signaling in mouse platelets leading to stabilization of developing thrombus in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 査読有 120:179-190, 2009
DOI:10.1172/JCI39503
- [学会発表] (計 16 件)
- ① Hiramoto T., et al.: Suppressed neutrophil development in hematopoiesis of induced pluripotent stem cells derived from a severe congenital neutropenia patient with ELA2 mutation. 53rd ASH Annual Meeting December 10-13, 2011 San Diego, USA
- ② 望月慎史 他: Analysis of impaired hematopoiesis in Down syndrome using patient iPSCs. 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14-16日 名古屋: 名古屋国際会議場
- ③ 望月慎史 他: 患者由来iPS細胞を用いたダウン症候群における造血障害の解

- 析 第114回日本小児科学会学術集会
2011年8月12-14日 東京：高輪プリンス
ホテル
- ④ 海老原康博：動物細胞・動物血清を用い
ないヒトiPS細胞から血液細胞への分化
誘導 第21回日本サイトメトリー学会
2011年6月25日 京都：京都国際交流会館
- ⑤ Ebihara Y., et al.: Induction of
hematopoiesis from human induced
pluripotent stem cells (hiPSCs) in
coculture with autologous hiPSC-
derived mesenchymal stem cells
under animal serum-free conditions.
9th ISSCR Annual Meeting June 15-18,
2011 Toronto, Canada
- ⑥ 平本貴史 他：重症先天性好中球減少
症患者由来のiPS細胞の樹立とその
解析 第32回日本炎症・再生医学会
2011年6月2-3日 京都：京都国際会館
- ⑦ 海老原康博、他：ヒトiPS細胞から血液
細胞への動物血清・細胞非依存的分化誘
導：自己iPS細胞由来間葉系幹細胞との
共培養。第10回日本再生医療学会総会
2011年3月1-2日 東京
- ⑧ Nishihama N, et al.: Hematopoiesis
of human induced pluripotent stem
cells derived from patients with
Down syndrome. 52nd ASH Annual Meet
ing December 4-7, 2010 Orlando,
Florida, USA
- ⑨ Yang W, et al.: Differentiation of
mature eosinophils derived from
human embryonic and induced
pluripotent stem cells. 52nd ASH
Annual Meeting December 4-7, 2010
Orlando, Florida, USA
- ⑩ Ma F, et al.: Generation of mature
eosinophils from human embryonic
and induced pluripotent stem cells.
39th Annual Scientific Meeting of
ISEH August 15-18, 2010 San Francis
co. USA
- ⑪ Ebihara Y, Ma F, Hanada S, et al.:
Human ES cell-derived MSC maintainin
g human ES and iPS cells under anim
al serum-free conditions. 第71回日
本血液学会総会 2009年10月23-25日京
都
- ⑫ Tsuji K. (Invited Speaker): Regener
ative medicine and hematopoietic
stem cells. Educational Symposium
for Current Pediatric Hematology
Sep 18, 2009 Tianjin, China
- ⑬ Ma F: Regenerative medicine based
on human ES/ iPS cells. Educational
Symposium for Current Pediatric
Hematology Sep 18, 2009 Tianjin,

- China
- ⑭ Ma F, Ebihara Y, Nakauchi H, Tsuji
K.: Derivation of mature blood cells
from human induced pluripotent stem
cells. 38th Annual Scientific
Meeting of the International
Society of Experimental Hematology
Sep 9-12, 2009 Athens, Greece
- ⑮ Ebihara Y, Ma F, Hanada S, Tomizawa
D, Tsuji K., et al.: Human embryonic
stem (ES) cell-derived mesenchymal
stem cells capable of efficiently
maintaining human ES and induced
pluripotent stem cells under animal
serum-free conditions. 7th Annual
Meeting of the International
Society of Stem Cell Research July
8-11, 2009 Barcelona, Spain
- ⑯ Ma F, Ebihara Y, Nakauchi H, Tsuji
K.: Derivation of multipotential
hematopoietic progenitors and
mature blood cells from human
induced pluripotent stem cells.
7th Keio Stem Cell Research
Symposium May 15-16, 2009 Tokyo,
Japan

[図書] (計4件)

- ① Ma F., et al. Transworld Research
Network, Kerala :Stem Cells in
Medicine 51-70, 2011
- ② Ma F., et al. Intech, Vienna :
Embryonic Stem Cells 239-250, 2011
- ③ Ma F., et al. Springer Science, New
York: Springer Protocol Handbooks
266-335, 2011
- ④ 海老原康博 真興交易医書出版部：小
児がん。 がん患者の心に寄り添うた
めのサイコオンコロジーの基礎と実践。
43-47, 2009

[産業財産権]

○出願状況 (計9件)

- ①名称：多能性幹細胞からの好酸球の製造方法
発明者：辻浩一郎、馬峰、斎藤博久、
松本健治、中畑龍俊
権利者：京都大学
種類・番号：PCT/JP2011/077955
出願年月日：2011年12月2日
国内外の別：国外
- ②名称：多能性幹細胞からの巨血球及び／又
は血小板の製造方法
発明者：江藤浩之
権利者：東京大学
種類・番号：特願 2011-219545

出願年月日：2011年10月3日
国内外の別：国内

③名称：ヒト由来の多能性幹細胞を分化させる方法

発明者：辻浩一郎、海老原康博
権利者：東京大学
種類・番号：PCT/JP2011/072609
出願年月日：2011年9月30日
国内外の別：国外

④名称：血小板の機能を維持するための組成物

発明者：江藤浩之
権利者：東京大学
種類・番号：PCT/JP2011/071190
出願年月日：2011年9月16日
国内外の別：国外

⑤名称：多能性幹細胞からの血液細胞分化に関する培養方法

発明者：江藤浩之
権利者：東京大学
種類・番号：PCT/JP2011/070563
出願年月日：2011年9月9日
国内外の別：国外

⑥名称：血小板産生方法及び血小板産生装置

発明者：江藤浩之
権利者：東京大学
種類・番号：特願 2011-143383
出願年月日：2011年6月28日
国内外の別：国内

⑦名称：血小板産生の場構築の為の巨核球細胞の多核化の促進法

発明者：江藤浩之
権利者：東京大学
種類・番号：特願 2011-108253
出願年月日：2011年5月13日
国内外の別：国内

⑧名称：ヒト由来の多能性幹細胞を分化させる方法

発明者：辻浩一郎、海老原康博
権利者：東京大学
種類・番号：特願 2010-222583
出願年月日：2010年9月30日
国内外の別：国内

⑨名称：Method for producing mast cells from pluripotent stem cells

発明者：辻浩一郎、馬峰、中畑龍俊
権利者：京都大学
種類・番号：PCT/JP2010/065893
出願年月日：2010年9月8日
国内外の別：国外

[その他]
ホームページ等

東京大学医科学研究所
幹細胞治療研究センター
幹細胞プロセッシング分野
<http://stemcell-u-tokyo.org/scp/>

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・助教
研究者番号：40302608

(2) 研究分担者

辻 浩一郎 (TSUJI KOHICHIRO)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：50179991

(3) 研究分担者

江藤 浩之 (ETO KOUJI)
京都大学・iPS細胞研究所・教授
研究者番号：50286986