

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15402

研究課題名(和文) ダウン症候群iPS細胞およびES細胞を用いた白血病発症機序解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of pathogenesis of leukemia in Down syndrome patients using human ES and iPS cells

研究代表者

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

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)：OCT3/4, SOX2, KLFの3遺伝子、それらにc-MYCを加えた4遺伝子を導入することにより樹立されたダウン症候群患者由来iPS細胞を用いて、AGM-3細胞との共培養法により血球分化させた後、フローサイトメトリーによるヒトCD45+細胞の比率及び血液コロニー形成法による造血細胞活性を検討したところ、CD45+細胞の比率、血液コロニー形成数が健常人由来iPS細胞の2～3倍であった。また網羅的遺伝子発現解析により発現が上昇している造血関連遺伝子は21番染色体に含まれる遺伝子で18あり、その中に含まれるGATA-1、RUNX1については定量的RT-PCRにおいてもその発現上昇が確認された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism causing hematological disorders and leukemia in DS patients, we employed induced pluripotent stem (iPS) cells derived from patients with DS and control iPS cells from healthy donor reprogrammed by the defined 3 or 4 factors (OCT3/4, KLF4, SOX2, and with or without c-MYC). We generated blood cells from DS and control iPS cells co-cultured with murine aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cell line. The harvested cells were analyzed for the presence of hematopoietic markers and the potentials of hematopoietic colony formation. Our results indicated that DS iPS cells could differentiate into identify the responsible genes for the acceleration of hematopoiesis in DS iPS cells, we carried out micro array analysis of hematopoietic cells derived from DS or control iPS cells. We then detected the high expression of 18 genes on chromosome 21 including RUNX1.

研究分野：医歯薬学

キーワード：遺伝・先天異常学 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

21 番染色体のトリソミーに起因するダウン症候群の患者では、胎児・新生児期から発症する白血病をはじめとした血液・造血の異常の頻度が非常に高いことが知られている。しかし、これらの合併症の発症機序と 21 番染色体上の遺伝子過剰の関係についてはほとんど解明されていないため、その発症予防法もいまだ確立されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

ダウン症候群患者由来 iPS 細胞および 21 番染色体を導入されたヒト ES 細胞から造血/血液細胞を分化誘導し、これらの細胞に追加的に遺伝子導入することにより、血液異常の発生を再現し、その発生過程をプロスペクティブに細胞生物学的および分子生物学的に解析することにより、造血異常や白血病の発症機序の分子基盤を解明し、これらを標的とする新規治療法を開発することを計画した。

## 3. 研究の方法

ダウン症患者由来 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 細胞の分化と以下のように比較検討した。

(1) OCT3/4、SOX2、KLF4 の 3 遺伝子、あるいはそれらに c-MYC を加えた 4 遺伝子を導入することにより樹立されたダウン症候群患者由来 iPS 細胞を、AGM-3 細胞株と 12 日共培養した後、フローサイトメトリーによるヒト CD45+細胞の比率、及び血液コロニー形成法による造血細胞活性を検討した。

(2) 網羅的遺伝子発現解析により 21 番染色体に含まれる造血関連遺伝子の発現上昇の有無を確認し、さらに定量的 RT-PCR においてそれらの発現を確認した。

## 4. 研究成果

DS-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。

DS-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 GATA1 および RUNX1 の発現が亢進しており、このことはリアルタイム PCR 法による解析においても GATA1 および RUNX1 の 3 種全てのアイソフォームで確認された。

これらの成果をふまえて、21trisomy における造血障害の更なる病態解析や関連する一過性骨髄異常増殖症や急性白血病などの血液疾患の病態の再現を試みており、特に RUNX1 の機能解析を現在行っており、その血液・造血異常の病因の解明と特異的・新規治療法を開発を進めている。

## 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)

[雑誌論文](計 9 件)

Konuma T, Kato S, Ooi J, Ebihara Y, Mochizuki S, Ishii H, Takei T, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Second allogeneic transplantation using unrelated cord blood for relapsed hematological malignancies after allogeneic transplantation. *Leuk Lymphoma*. 査読有 2015 25:1-7. [Epub ahead of print]

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*. 査読有 2015 24;10(3) :e0120841.

Konuma T, Kato S, Ooi J, Ebihara Y, Mochizuki S, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Third allogeneic stem cell transplantation (SCT) using unrelated cord blood for relapsed acute leukemia after second allogeneic SCT. *Int J Hematol*. 査読有 2015 101(4):392-7.

Saito T, Yano F, Mori D, Kawata M, Hoshi K, Takato T, Masaki H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Chung UI, Tanaka S. Hyaline cartilage formation and tumorigenesis of implanted tissues derived from human induced pluripotent stem cells. *Biomed Res.* 査読有 2015;36(3):179-86.

Takeuchi Y, Takeuchi E, Ishida T, Onodera M, Nakauchi H, Otsu M. Curative haploidentical BMT in a murine model of X-linked chronic granulomatous disease. *Int J Hematol.* 査読有 2015 102(1):111-20.

Toriumi T, Takayama N, Murakami M, Sato M, Yuguchi M, Yamazaki Y, Eto K, Otsu M, Nakauchi H, Shirakawa T, Isokawa K, Honda MJ. Characterization of mesenchymal progenitor cells in the crown and root pulp of primary teeth. *Biomed Res.* 査読有 2015;36(1):31-45.

Yokoi K, Akiyama K, Kaneshiro E, Higuchi T, Shimada Y, Kobayashi H, Akiyama M, Otsu M, Nakauchi H, Ohashi T, Ida H. Effect of donor chimerism to reduce the level of glycosaminoglycans following bone marrow transplantation in a murine model of mucopolysaccharidosis type II. *J Inherit Metab Dis.* 査読有 2015 38(2):333-40.

Nakazawa Y, Kawai T, Uchiyama T, Goto F, Watanabe N, Maekawa T, Ishiguro A, Okuyama T, Otsu M, Yamada M, Hershfield MS, Ariga T, Onodera M. Effects of enzyme replacement therapy on immune function in ADA deficiency patient. *Clin Immunol.* 査読有 2015 pii: S1521-6616(15)00217-X. [Epub ahead of print]

Otsu M, Yamada M, Nakajima S, Kida M, Maeyama Y, Hatano N, Toita N, Takezaki S, Okura Y, Kobayashi R, Matsumoto Y, Tatsuzawa O, Tsuchida F, Kato S, Kitagawa M, Mineno J, Hershfield MS, Bali P, Candotti F, Onodera M, Kawamura N, Sakiyama Y, Ariga T. Outcomes in two Japanese adenosine deaminase-deficiency patients treated by stem cell gene therapy with no cytoreductive conditioning. *J Clin Immunol.* 査読有 2015 35(4):384-98.

〔図書〕(計1件)

大津真、中外医学社、Annual Review 血液 2016、造血幹細胞 疾患特異的 iPS 細胞を利用した造血研究、2016 14~20

〔学会発表〕(計5件)

ヒト人工多能性幹細胞由来の筋細胞は再生筋線維と同様のサイトカイン産生能をもつ  
長谷川 久紀, 川畑 仁人, 高木 春奈, 大津真, 上阪 等  
第44回日本臨床免疫学会 札幌市:札幌コンベンションセンター 2015年11月18日~20日

造血幹細胞研究の最前線 骨髄炎症環境における造血幹細胞保護法の確立  
大津真, 石田 隆  
第25回日本サイトメトリー学会 お茶の水:ソラシティカンファレンス 2015年7月11日~12日

iPS細胞の今後の展開 先天性免疫不全症研究におけるiPS細胞の活用  
大津真  
第25回日本サイトメトリー学会 東京:お茶の水ソラシティカンファレンス 2015年7月11日~12日

幹細胞 iPS の ABC  
大津真  
第60回日本リウマチ学会 横浜市:パシフィコ横浜 2015年4月21日~23日

多発性筋炎・皮膚筋炎の Update ヒトiPS細胞由来筋細胞は筋芽細胞同様に筋炎を増悪し得るサイトカインを産生する  
長谷川 久紀, 川畑 仁人, 高木 春奈, 大津真, 上阪 等  
第60回日本リウマチ学会 横浜市:パシフィコ横浜 2015年4月21日~23日

〔その他〕

ホームページ等

<http://stemcell-u-tokyo.org/scp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

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

### (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

### (3)研究分担者

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