

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19552

研究課題名(和文) 霊長類ES/iPS細胞由来造血幹・前駆細胞を用いた白血病幹細胞発生機序の解明

研究課題名(英文) Mechanical dissection of leukemic stem cell generation by using primate ES/iPS cell-derived hematopoietic stem/progenitor cells

研究代表者

小原 洋志 (Kohara, Hiroshi)

東京大学・医科学研究所・特任講師

研究者番号：40528733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトES細胞およびiPS細胞由来の未分化造血細胞にがん遺伝子を強制発現させるため、Adeno-associated virus integration site 1 (AAVS1) 領域を標的としてtet-onシステムによりがん遺伝子(KRas G12V等)を発現制御できる誘導型遺伝子発現カセットをゲノム編集により挿入した。ES/iPS細胞より分化誘導したCD34陽性未分化造血細胞を分離し、KRAS G12Vを発現誘導し7日間培養したところ、発現量に依存して細胞数が変化した。同細胞を放射線照射した免疫不全マウスに移植し、正常細胞に対する競合優位性を検討している。

研究成果の概要(英文)：Inducible gene expression cassette of oncogenes including KRAS G12V were successfully inserted into adeno-associated virus integration site 1 (AAVS1) locus of human ES cells and iPS cells by genome editing technique. CD34-positive hematopoietic cells were induced from these ES/iPS cells. After additional 7 day culture of these hematopoietic cells with KRAS G12V induction resulted in altered cell growth. Now CD34-positive hematopoietic cells were transplanted into irradiated immune-deficient mice in order to investigate in vivo competitive repopulation ability in comparison with normal hematopoietic cells derived from ES/iPS cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：白血病 ES細胞 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

白血病は化学療法および造血幹・前駆細胞移植療法の導入により治癒がもたらされる疾患になってきているものの、未だに国内で年間約 55,000 人(がんの統計'13、がん研究振興財団)がなくなっており、新たな治療法の導入が強く望まれている。白血病では少数の白血病幹細胞(LIC)より白血病細胞が供給されていると考えられているが、LICは細胞周期を休止状態(G<sub>0</sub>期)に維持している(Holyoake T et al., Blood, 1999) ために従来の化学療法に抵抗性を示すことから、根治療法としてLICを標的とした新規治療法の開発が必須である。

LICの発生は、遺伝子変異(がん遺伝子の発現)やエピジェネティック異常による造血幹細胞における増殖能の亢進、あるいは造血前駆細胞における自己複製能の再獲得の結果と考えられている(Huntly B et al., Nature Reviews Cancer, 2005)。場合、多くのLICの細胞周期はG<sub>0</sub>期にあることと併せると、造血幹細胞は増殖と静止という相反する性質を獲得していることになるが、がん遺伝子の発現を増殖・静止の両方に結びつける分子メカニズムは十分には明らかになっていない。マウス造血幹細胞において単一の遺伝子(Nras)変異が増殖能と自己複製能を同時に亢進させることが報告された(Li Q et al., Nature, 2013)が、霊長類細胞に関しては国内外ともに未だほとんど報告がない。

2. 研究の目的

霊長類 胚性幹(ES)/人工多能性幹(iPS)細胞由来の未分化造血細胞へがん遺伝子を導入し、次の点を明らかにする。

- 1) がん遺伝子の発現量の差が、in vitro で造血細胞の増殖・自己複製・細胞周期へ与える影響。
- 2) がん遺伝子の発現量の差が、免疫不全マウス体内において正常細胞に対する競争優位性に与える影響。
- 3) 遺伝子改変細胞による、免疫不全マウス・CM 個体における白血病の発症の有無。

3. 研究の方法

本研究では、霊長類 ES/iPS 細胞を用いたがん遺伝子導入 ES/iPS 細胞(発現誘導型)の樹立と in vitro および in vivo での機能評価を行う計画であり、以下の項目について 2 年間で実施する。

- 1) がん遺伝子導入ベクターおよびゲノム編集ベクターの作製
- 2) 正常および p53 欠損 ES/iPS 細胞由来の造血細胞へのがん遺伝子の導入
- 3) 2)で得たヒト細胞の機能評価 1 (in vitro での増殖能・自己複製能・細胞周期の評価)
- 4) 2)で得たヒト細胞の機能評価 2 (in vivo(免疫不全マウス)での白血病の発症と正常細胞

胞に対する競争優位性の評価

- 5) 2)で得たコモンマウスセット(CM)細胞の機能評価(in vivo(CM)での白血病の発症の有無の検討)

4. 研究成果

- 1) がん遺伝子導入ベクターおよびゲノム編集ベクターの作製

Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN)法を用いて、ES/iPS 細胞の機能が遺伝子導入の影響を受けにくいと考えられている adeno-associated virus integration site 1 (AAVS1) 遺伝子座にがん遺伝子(KRAS G12V 等)を tet-on システムにより発現誘導可能な誘導型遺伝子発現カセットを挿入するためのプラスミドベクターを構築した(図1)。

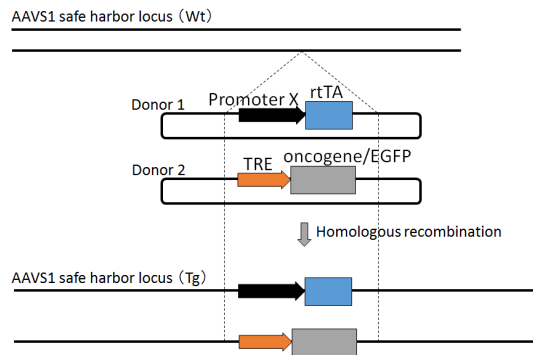


図1 誘導型遺伝子発現カセット

- 2) 正常および p53 欠損 ES/iPS 細胞由来の造血細胞へのがん遺伝子の導入

続いて、エレクトロポレーション法によりプラスミドベクターをヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞に導入した。目的の遺伝子発現カセットが挿入された細胞は薬剤耐性により選択し、次の機能評価を行った。Tet-on システムでは、培地中にドキシサイクリン(Dox)を添加することにより、その添加量に応じてトランスジーン(本研究ではがん遺伝子)の発現を誘導することが可能である。一般に多能性幹細胞ではプロモーターがサイレンシングを受けて遺伝子発現カセットが機能しなくなる可能性が報告されているが、本研究で樹立したゲノム編集 iPS 細胞にがん遺伝子とともに導入したレポーター遺伝子である緑色蛍光タンパク質 GFP を指標として品質評価を実施したところ、Dox 量および添加時間に応じて GFP 発現を誘導可能であることが確認できた(図2)。

がん遺伝子誘導型遺伝子発現カセットを正常 ES 細胞および iPS 細胞に挿入可能であることが確認できたため、既に所属研究室において樹立済みの代表的がん抑制遺伝子である p53 を欠損したヒト ES 細胞につい

ても同様の実験を行い、ゲノム編集細胞を得た。p53 欠損 ES 細胞はアポトーシス誘導刺激に対する抵抗性をもつことを確認した。このことから、樹立したゲノム編集 ES/iPS 細胞はがん抑制遺伝子の欠損、がん遺伝子の発現およびその重ね合わせの効果を ES/iPS 細胞由来の様々な細胞種において検討することに利用可能であると考えられる。

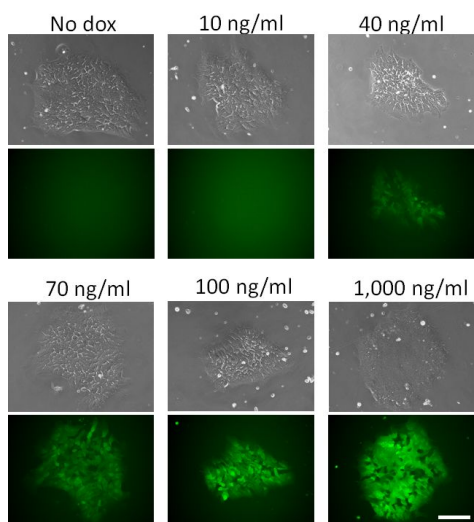


図 2 tet-on 発現誘導 iPS 細胞の機能評価  
ドキシサイクリン (Dox) 添加濃度により、  
トランスジーン発現量をコントロール可能  
であることを確認した。

3) 2)で得たヒト細胞の機能評価 1 (in vitro での増殖能・自己複製能・細胞周期の評価)

ゲノム編集 ES/iPS 細胞を胚様体形成法により約 2 週間の分化誘導を行い、誘導した CD34 陽性未分化造血細胞分画を磁気ビーズ細胞分離法により濃縮した。未分化造血細胞分画は OP9-DL1 ストローマ細胞上でサイトカインの存在下で培養すると CD3 陽性 CD4 陽性 CD8 陽性 T リンパ球へ分化すること、および異なるサイトカインの組み合わせの下で培養すると骨髄球系および赤芽球系細胞を誘導可能であることを in vitro 分化誘導系において明らかにした。この CD34 陽性未分化造血細胞分画を Dox 存在下で 1 週間培養し、その数および細胞周期状態をフローサイトメトリ解析により検討したところ、Dox 添加により細胞増殖状態を変化させることが可能であった。様々な Dox 濃度で同様の実験を行い、がん遺伝子の発現量が細胞増殖等に与える影響について引き続き解析を行う。

4) 2)で得たヒト細胞の機能評価 2 (in vivo(免疫不全マウス)での白血病の発症と正常細胞に対する競争優位性の評価)

ヒト細胞の移植には、実績がある NOD.Cg-Prkdcscid112rgtm1Wjl/SzJ(NSG) マウスを利用した。NSG マウスは NOD マウス、scid マウス、IL-2 共通 鎖欠損マウスの表

現型を併せ持つので、T リンパ球・B リンパ球・機能的 NK 細胞を欠損しており、IL-2 などのサイトカインシグナルに応答しない。従って、重度の免疫不全マウスであり、ヒト細胞の移植実験に適していると考えられている。亜致死量の放射線を照射した NSG マウスに前述のとおり樹立した p53 欠損 ES 細胞、がん遺伝子発現 ES/iPS 細胞、および p53 欠損・がん遺伝子発現 ES 細胞を移植し経過を評価している。陽性コントロールとしてヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を移植した群においては末梢血において約 10%のキメリズムが確認されたが、ゲノム編集 ES/iPS 細胞を移植した群において現在までに白血病の発症は認められない。引き続き、正常対照 ES/iPS 細胞を競合的に移植した場合の競争優位性について、骨髄における生着率等を指標に検討を実施する。

5) 2)で得た CM 細胞の機能評価 (in vivo( CM )での白血病の発症の有無の検討)

研究代表者の所属研究室では CM ES 細胞を所有しており、血液系細胞の分化誘導系も確立しているが、研究計画全体の遅延を避けるためにヒト ES/iPS 細胞に注力してゲノム編集実験を実施したため、CM ES 細胞のゲノム編集の成功には至っていない。従って CM への移植実験についても実施していない。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Hiroshi Kohara, Liao Jiyuan, Shohei Miyamoto, Yoko Nagai, Tomotoshi Marumoto, Kenzaburo Tani Role of P53 on T Lymphopoiesis from Human Embryonic Stem Cells, American Society of Gene & Cell Therapy 19th Annual Meeting, 2016/5/4-7

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小原 洋志 (KOHARA, Hiroshi)  
東京大学・医科学研究所・特任講師  
研究者番号：40528733

### (2) 研究分担者

該当なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

該当なし ( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

該当なし ( )