

令和元年6月11日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09847

研究課題名(和文) リプログラミング技術を用いた骨髄異形成症候群の腫瘍内遺伝的・機能的多様性の解明

研究課題名(英文) Reprogramming technology revealed the genetic and functional diversity present in an individual myelodysplastic syndrome patient

研究代表者

蝶名林 和久 (Chonabayashi, Kazuhisa)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：00646010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は骨髄異形成症候群及び二次性急性骨髄性白血病症例(MDS/sAML)の異常クローンから複数のiPS細胞の樹立に成功した。MDS-iPS細胞から分化した造血前駆細胞は正常iPS細胞と比較して、MDS症例ではコロニー形成能が有意に低下したが、sAML症例ではコロニー形成能が有意に亢進し免疫不全マウスに生着し致死性のAMLを引き起こした。MDS/sAML症例由来iPS細胞の全エクソームシーケンスを行い、いくつかのMDS-iPS特異的遺伝子変異を同定した。さらにiPS細胞を分化して得られた造血前駆細胞の網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、疾患に特異的な遺伝子発現異常が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良のクローン性造血障害であるMDS/sAMLには病態を再現し解析するモデルが殆どなく、治療法の開発を可能にするツールが殆どないのが現状である。我々は患者から樹立した複数のMDS-iPS細胞株の網羅的ゲノム解析と、MDS-iPS細胞から再誘導された造血前駆細胞の分化能・造腫瘍能などの機能解析を組み合わせることにより、MDS/sAMLの腫瘍内多様性及び発症・進展機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We successfully generated multiple iPS cell lines from abnormal clones of patients with myelodysplastic syndromes or secondary AML (MDS/sAML) evolved from MDS. Hematopoietic progenitor cells (HPCs) differentiated from MDS-derived MDS-iPS cell lines showed decreased colony formation, whereas HPCs differentiated from sAML-derived MDS-iPS cell lines showed increased colony formation, compared with isogenic normal iPS cell lines, and induced lethal AML in transplanted immunodeficient mice. Next, we performed whole-exome analysis to find that some of the somatic mutations detected in bulk cells of MDS/sAML patients are shared in MDS-iPS cell lines but not in isogenic normal iPS cell lines. Furthermore, we performed comprehensive gene expression analysis in hematopoietic progenitor cells differentiated from MDS-iPS cell lines and isogenic normal iPS cell lines, identifying disease-specific expression change.

研究分野：血液腫瘍学、幹細胞生物学

キーワード：骨髄異形成症候群 二次性急性骨髄性白血病 リプログラミング iPS細胞 腫瘍内多様性 新規治療薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MDS はクローナルな後天性造血障害で、臨床的には貧血、血小板減少、白血球減少などを来し、骨髄造血細胞に様々な程度で形態異常が生じることを特徴とする疾患である。比較的高齢者に多く、また悪性腫瘍に対する化学療法や放射線療法後に発症する確率が数倍～数十倍に増加するのが特徴で、近年の社会の高齢化や積極的化学療法の広がりや相まって、MDS 症例は増加の一途をたどっている。MDS の本態は、造血幹細胞にゲノム及びエピゲノム異常が蓄積することで生じた異常幹細胞クローンが、徐々に優位性を獲得し骨髄内を占拠していくこととされ、この異常クローンの持つ分化異常や病的なアポトーシスが、血球の正常な成熟を障害し、結果として血球減少や骨髄細胞の異形成を引き起こすと考えられている。さらに、この異常クローンがさらなるゲノム・エピゲノムレベルでの異常を蓄積することで質的に変貌し、AML へ高頻度に進展する。つまり、MDS は前白血病状態とも考えられている。

de novo AML では、遺伝子改変などにより有用な白血病マウスモデルが開発され、またヒト白血病細胞を免疫不全マウスに移植するヒト化白血病マウス系の確立により、白血病幹細胞が同定されている。一方、MDS/sAML では、病態解明に有用なモデルマウスがなく、有効な治療法を開発するためのツールが無いのが現状である。根治は同種造血幹細胞移植でしか得られないが、その適応は若年者に限られ、移植治療の恩恵が受けられるのは極少数の患者のみである。大多数の高齢患者では輸血等の対症療法が主体となり、数年内に感染症や臓器不全によって大半が死の転帰をとり、予後不良である。近年アザシチジン(ピダーザ)が開発され臨床応用されているが、その効果は中央生存期間で約9ヶ月の延長が得られるに過ぎない。

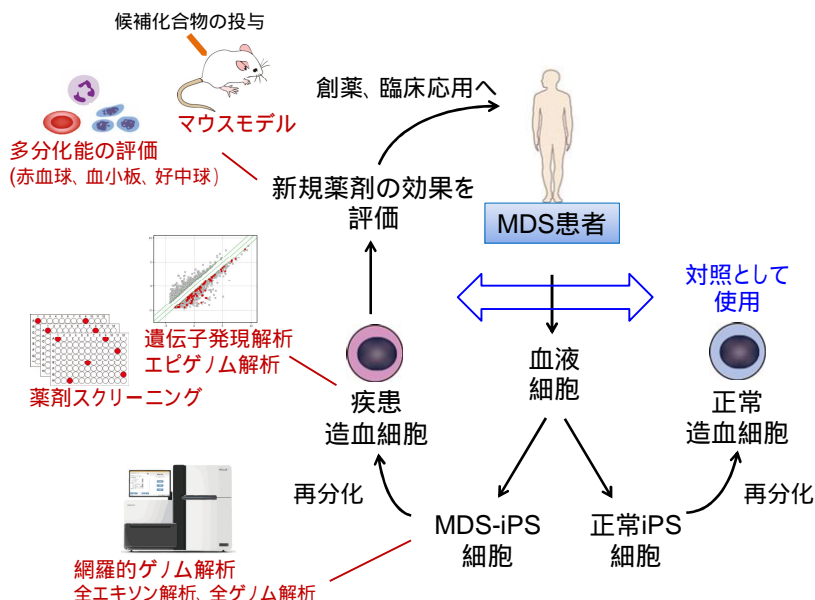
以上のように、MDS/sAML の病態が再現・解析でき、将来の治療法を開発を可能にするツールの開発、及び新規治療薬の開発が切望されている。iPS 細胞は ES 細胞と同様に未分化性を維持したまま増幅可能かつ生体を構成する種々の細胞に分化することが可能であり、患者検体を得ることが困難な神経疾患領域などで iPS 細胞を利用した遺伝性疾患研究への応用が精力的に行われている。

MDS のような後天性の遺伝子異常を伴う疾患においても、疾患特異的な iPS 細胞が樹立できれば、iPS 細胞を再分化させることによって患者から直接採取することの出来ない多量の疾患細胞を必要な分化段階で得ることができる。また、同一の症例から樹立した複数の iPS 細胞株を解析することで MDS/sAML の腫瘍内多様性及び発症・進展機構の解明や、新しい治療薬の開発などが可能になると考えられる。

2. 研究の目的

樹立した MDS/sAML 細胞由来 iPS (MDS-iPS) 細胞と正常 iPS 細胞で、順次全エクソン又は全ゲノムシーケンスを行い、新規の遺伝子変異などを探索する。また、再誘導して得られた造血前駆細胞分画(CD45+CD34+CD38-)などをソーティングにより選別して、網羅的遺伝子発現解析や網羅的エピゲノム解析を行う。同定した候補因子を、順次 MDS-iPS 細胞に導入もしくはノックダウンして、その機能を解析する。造血誘導した際に MDS/sAML 病態を抑えることができる因子を選定する。同定した候補遺伝子に対する阻害剤などを探索する。また、化合物ライブラリーを用いて、上記の MDS/sAML 病態再現系でスクリーニングして、MDS/sAML 病態を抑制する薬剤/化合物を同定する。

3. 研究の方法



(1) MDS-iPS 細胞の作製

MDS/sAML 患者の骨髓もしくは末梢血の単核細胞から MDS-iPS 細胞を作製する。樹立が困難な核型や病型の MDS/sAML に関しては、関連施設にも依頼して患者検体を収集し、できるだけ多くの症例から樹立を試みる。iPS 細胞作製過程の影響を排除するため、可能な限り複数クローンを樹立し、以後の実験に供することを目指す。同一患者の T 細胞等を用いて、同様の方法で正常 iPS 細胞を作製する。正常 iPS 細胞は MDS-iPS 細胞の対照として使用する。MDS-iPS 細胞は、FISH 解析、核型解析、SNP アレイ、遺伝子解析などで元の患者検体と同一クローンであることを確認し、正常 iPS 細胞も核型解析、SNP アレイなどで iPS 細胞作製過程で欠失などが起きていないことを確認する。得られた MDS-iPS 細胞、正常 iPS 細胞において奇形腫形成能および多能性幹細胞マーカー遺伝子の発現を確認する。

(2) MDS/sAML の病態再現

(1) で作製した iPS 細胞を OP9 細胞共培養系及び胚様体形成法による分化誘導系を用いて in vitro で造血誘導し、その後、GM-CSF、G-CSF、IL3、IL-6、SCF、EPO 存在下でコロニーアッセイを行い、コロニー形成能力を評価すると共に、分化能力(CFU-G、-M、GM、-GEMM、-E など)も評価する。また EPO、G-CSF、TPO などの各サイトカイン単独での成熟血球誘導を行い、赤血球、好中球、巨核球などへの分化異常・異形成を、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原マーカー解析や、ギムザ染色による形態学的手法などで評価する。さらに免疫不全マウスを用いた異種移植実験系を用いて、MDS/sAML モデルマウスを作成する。

(3) MDS/sAML 特異的原因因子の探索

近年、MDS を対象としたエキソーム解析により、de novo AML とは異なる遺伝子異常が次々に発見され始めており、治療標的としての可能性など臨床への応用も加速すると期待されている (Yoshida K et al., Nature 2011;478:64-69)。本研究においては、MDS/sAML 症例の血液単核細胞及び MDS-iPS 細胞のゲノム DNA を材料に、同一患者の T 細胞、口腔粘膜細胞及び正常 iPS 細胞を対照として、全エキソーム・全ゲノムシーケンズを行い、網羅的に遺伝子変異を探索する。アレル頻度が低いなどの理由で検出が困難な変異に関しては、既報の MDS 関連遺伝子を標的としたターゲットリシーケンズを行い、深いカバレッジで解析を行う。遺伝子発現解析やエピゲノム解析は、造血誘導した後、造血前駆細胞分画 (CD43+CD34+CD38-) などでソートして分画をそろえた上で、MDS-iPS 細胞と正常 iPS 細胞での比較を行う。網羅的ゲノム解析の結果と (2) で得られた機能解析の結果とを組み合わせる事により、各症例の腫瘍内多様性及びクローン進化の評価を行い、MDS/sAML の発症・進展に関わる候補因子を絞り込む。

(4) 新規薬剤スクリーニング

利用可能な化合物を、上記の MDS/sAML 病態再現系でスクリーニングして、病態を抑制するような薬剤/化合物を選定する。MDS-iPS 細胞から各血球への誘導過程で、薬剤で処理すると、分化異常の改善や異常クローンの増殖抑制などが期待される。同定された薬剤に関しては、コロニーアッセイ、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原マーカー解析、ギムザ染色による形態学的手法、MTS 細胞増殖アッセイ、(2) の MDS/sAML モデルマウスなどで薬効を評価する予定である。

(5) 候補因子の機能解析

(3) で同定した候補因子について、順次 MDS-iPS 細胞に導入もしくはノックダウンして、造血誘導を行い、分化異常の改善や異常クローンの増殖抑制などの効果を確認する。有望な標的因子については阻害剤などの探索を開始する。(4) の場合と同じく、コロニーアッセイ、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原マーカー解析、ギムザ染色による形態学的手法、MTS 細胞増殖アッセイや、MDS/sAML モデルマウスなどを用いて評価する予定である。

4 . 研究成果

(1) MDS-iPS 細胞の作製 : MDS 及び MDS から移行した secondary AML 症例 (MDS/sAML) 患者の末梢血及び骨髓の細胞からエピソームプラスミド法で iPS 細胞樹立を行い、FLT3 変異陽性 sAML 症例など複数の症例から MDS-iPS 細胞株と正常細胞由来 iPS 細胞株の樹立に成功した。樹立した MDS-iPS 細胞は G バンド法、SNP-CGH アレイ解析などにより MDS/sAML と同一の核型を保持していることを確認した。また、MDS-iPS 細胞、正常 iPS 細胞いずれについても多能性幹細胞マーカー遺伝子の発現を確認し、またテラトーマ形成法によりテラトーマ形成能を確認した。

(2) MDS/sAML の病態再現 : MDS 症例由来の MDS-iPS 細胞から再分化した造血前駆細胞は、同一患者由来の正常 iPS 細胞から再分化した造血前駆細胞と比較して、コロニー形成能及び赤血球系分化能の有意な低下が見られた。sAML 症例由来の MDS-iPS 細胞から分化した造血前駆細胞では、同一患者由来の正常 iPS 細胞と比較して、顆粒球・単球系コロニー形成能の有意な亢進が見られ (図 1)、免疫不全マウスに生着し致死性の AML を引き起こした。さらに移植したマウスの末梢血及び骨髓内に芽球や好中球の過分葉、pseudo-pelger 核異常など、MDS/sAML に合致した形態異常の所見が認められた (図 2)。

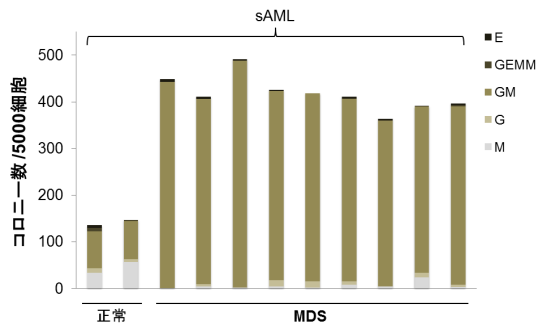


図1. 二次性AML症例由来の正常iPS細胞及びMDS-iPS細胞から分化した造血前駆細胞のコロニー形成能の違い

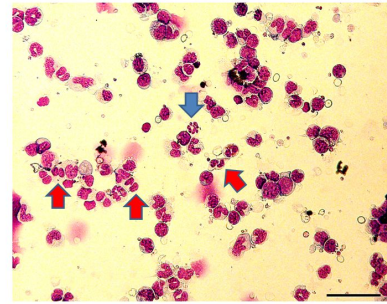


図2. 二次性AML症例由来のMDS-iPS細胞から分化した造血前駆細胞の Maus 移植における末梢血所見
末梢血及び骨髄に幼弱な骨髄球系細胞の増多とともに過分葉好中球(青矢印)やPseudo Pelger-Huet異常(赤矢印)などが認められた。

(3) MDS/sAML 特異的原因因子の探索: 樹立した MDS-iPS 細胞のうち、sAML 症例由来 MDS-iPS 細胞の全エキソシーケンスなどを行い網羅的に遺伝子変異を探索し、FLT3 変異を含むいくつかの MDS-iPS 特異的遺伝子変異を同定した(図3)。また、sAML 症例由来 MDS-iPS 由来造血前駆細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、疾患で特異的に変動している遺伝子群を同定した。元の症例の腫瘍内多様性を反映して、MDS-iPS 細胞には FLT3 変異を有する株(FLT3 変異株)と FLT3 変異を有さない株(FLT3 野生型株)が認められた。各々から誘導した造血前駆細胞をマウスに移植したところ、FLT3 変異株由来細胞を移植したマウスでは早期に AML 様病態を呈し死亡した(図4)。

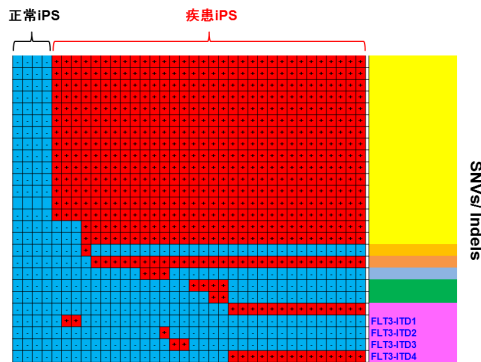


図3. 同一二次性AML症例由来のiPS細胞株の遺伝的多様性

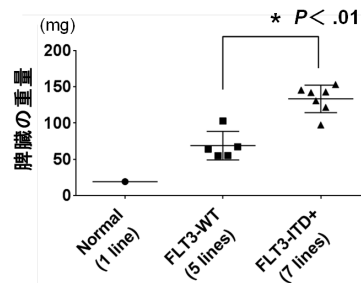


図4. 同一二次性AML症例由来のMDS-iPS細胞株で構築した白血病マウスにおける由来サブクローンによる表現系の差異
白血化したマウスの脾臓の重量は、FLT3野生型(WT)のMDS-iPS細胞株と比較して、FLT3変異陽性(ITD+)のMDS-iPS細胞株において有意に高かった。

(4) 新規薬剤スクリーニング: 分化誘導系としては、血液前駆細胞を効率良く作成できる胚様体形成法を選択した。さらにスクリーニングの効率を上げるために、血液前駆細胞を大量に得られるよう細胞密度、サイトカインコンビネーションや分化誘導時間などの分化誘導方法の最適化を行った。sAML 症例由来 MDS-iPS 細胞から分化した血液細胞株を用いて化合物スクリーニングを行い、細胞増殖を抑制するような化合物をいくつか同定した。今後候補化合物の絞り込みを行う予定である

(5) 候補因子の機能解析:(3)により当該 sAML 症例においては、MDS から sAML への進展に FLT3 変異が関わっている可能性が高いと考えられたため、FLT3 野生型 iPSC 株より誘導した造血前駆細胞に retrovirus vector を用いて変異型 FLT3 を導入しマウスに移植したところ、白血病化が著明に促進された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

- 1) Elbadry MI, Mizumaki H, Hosokawa K, Espinoza JL, Nakagawa N, Chonabayashi K, Yoshida Y, Katagiri T, Hosomichi K, Zaimoku Y, Imi T, Nguyen MAT, Fujii Y, Tajima A, Ogawa S, Takenaka K, Akashi K, Nakao S. Escape hematopoiesis by HLA-B5401-lacking hematopoietic stem progenitor cells in men with acquired aplastic anemia. Haematologica. 2019 Mar 19. pii: haematol.2018.210856. doi: 10.3324/haematol.2018.210856.
- 2) Espinoza JL, Elbadry MI, Chonabayashi K, Yoshida Y, Katagiri T, Harada K, Nakagawa N, Zaimoku Y, Imi T, Takamatsu H, Ozawa T, Maruyama H, Hassanein HA, Khalifa A Noreldin A, Takenaka K, Akashi K, Hamana H, Kishi H, Akatsuka Y, Nakao S. Hematopoiesis by iPSC-derived hematopoietic stem cells of aplastic anemia that escape cytotoxic T-cell attack. Blood Adv. 2018 Feb 27;2(4):390-400. doi: 10.1182/bloodadvances.2017013342.
- 3) Chonabayashi K, Yoshida Y, Takaori-Kondo A. Reprogramming technology reveals genetic and functional diversity of subclones in myelodysplastic syndromes. Rinsho Ketsueki. 2017;58(7):787-791. doi: 10.11406/rinketsu.58.787.

〔学会発表〕(計 2件)

1) Kazuhisa Chonabayashi, Akira Watanabe, Akifumi Takaori-Kondo, and Yoshinori Yoshida. iPS technology revealed the genetic and functional diversity present in a myelodysplastic syndrome patient. International Society for Stem Cell Research 16th Annual Meeting. June 2018. Melbourne, Australia.

2) Kazuhisa Chonabayashi, Masahiro Kawahara, Akira Watanabe, Masahiro Nakamura, Masatoshi Nishizawa, Akifumi Takaori-Kondo, Shinya Yamanaka, and Yoshinori Yoshida. iPS technology revealed the genetic and functional diversity present in a secondary AML patient. The 58th Annual Meeting of the American Society of Hematology. December 2016. San Diego, CA.

〔その他〕

吉田研究室

www.cira.kyoto-u.ac.jp/yoshida/

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：吉田 善紀

ローマ字氏名：Yoshida Yoshinori

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。