

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19564

研究課題名(和文)疾患特異的iPS細胞を用いた血球分化におけるGATA2の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis to reveal the role of GATA2 during hematopoietic differentiation based on disease-specific iPS cells

研究代表者

八田 俊介(HATTA, SHUNSUKE)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：80772194

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)：MonoMAC症候群の患者から作製した間葉系幹細胞(MSC)に初期化因子を搭載したエピソーマルベクターを導入する手法でiPS細胞の樹立を試みた。現在の所、MonoMAC症候群患者由来のiPS細胞の樹立に至らなかったが、本検討を通じて確立した手法を用いて、遺伝性鉄芽球性貧血患者由来のiPS細胞を樹立し、赤血球系に再分化させる事で世界に先駆けてin vitroでの環状鉄芽球への誘導に成功した。得られた鉄芽球の解析を通じて、鉄芽球性貧血の病態解明や新規薬剤開発においても有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish induced pluripotent stem (iPS) cells using episomal vectors based on patient-derived mesenchymal stem cells. So far, we have not succeeded to establish the iPS cells, presumably due to increased genome instability caused by GATA-2 mutation. Alternatively, we established iPS cells from patient with X-linked sideroblastic anemia (XLSA). When the iPS cells were differentiated into erythroid cells by co-culturing with stromal cells, the erythroblasts exhibited ringed sideroblasts and abnormal iron deposition in the mitochondria, confirmed by electron microscopy. Further phenotypic analyses would lead to the better understanding of the molecular basis of XLSA as well as the establishment of novel therapeutic strategies.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血液内科学

## 1. 研究開始当初の背景

GATA 転写因子群は GATA1 から GATA6 までの因子から構成されており、GATA1 から GATA3 は造血に関与している。このうち、GATA2 は特に成体型造血において未分化前駆細胞の維持・増殖に必須であることが明らかとなっている (Tsai et al. *Blood* 1997)。GATA2 変異が特定の血液疾患の発症をもたらすかどうかについては不明であったが、**近年、GATA2 遺伝子の胚細胞ヘテロ変異により発症する疾患群として MonoMAC 症候群が同定された** (Hsu et al. *Blood* 2011; Vinh et al. *Blood* 2010)。MonoMAC 症候群は、単球の減少、Mycobacterium avium complex (MAC) 菌をはじめとする細胞内寄生菌に対する易感染性、MDS/AML の発症を特徴とする疾患である。MonoMAC 症候群における MDS/AML の発症メカニズムは不明であるが、GATA2 の先天変異による造血不全・免疫不全の経過中に、遺伝子の変異が蓄積し、発がんへと進展すると考えられる。同症候群では、単球のみならず B 細胞や NK 細胞、そして樹状細胞 (DC) の著しい減少もしくは消失が認められる一方で、マクロファージや顆粒球等は保たれる。MonoMAC 症候群における選択的な血球の欠損や食能障害を鑑みると、GATA2 は**造血幹細胞レベルのみならず、血球分化の後期もしくは最終分化、さらには成熟血球における機能発現においても重要な働きを担っている可能性**が考えられており、依然として GATA2 の血球分化での役割については不明な点が多い。

iPS 細胞の樹立以降、様々な疾患特異的 iPS 細胞が作製され、病態の一部を再現できたという報告が多数なされている (Takahashi, Yamanaka. *Cell* 2006)。そこで、本研究では、**GATA2 変異 MDS 症例の間葉系幹細胞 (MSC) から、iPS 細胞を樹立し、血球系へ再分化させることで、ヒトの血球分化における GATA2 の役割を解明することを目的とする。**

## 2. 研究の目的

本研究では、MonoMAC 症候群の患者から iPS 細胞を樹立し、ヒト疾患モデルを構築する。また、各血球系へと再分化させることで、血球分化における GATA2 の役割について明らかにする。

## 3. 研究の方法

MonoMAC 症候群の患者から作製した MSC に初期化因子を搭載したエピソーマルベクターを導入し iPS 細胞を樹立する。エピソーマルベクターは *OCT3/4*、*SOX2*、Kruppel-like factor 4 (*KLF4*)、Lin-28 homolog (*LIN28*)、Glis family zinc finger 1 (*GLIS1*)、*L-MYC*、p53 short hairpin RNA (*p53-shRNA*) が組み込んである (京都大学 iPS 研究所の沖田圭介先生よりご供与)。多能性や多分化能の評価を行い、iPS 細胞の基準を満たした細胞株を解析に用いる。

## 4. 研究成果

### (1) MonoMAC 症候群患者由来 iPS 細胞樹立

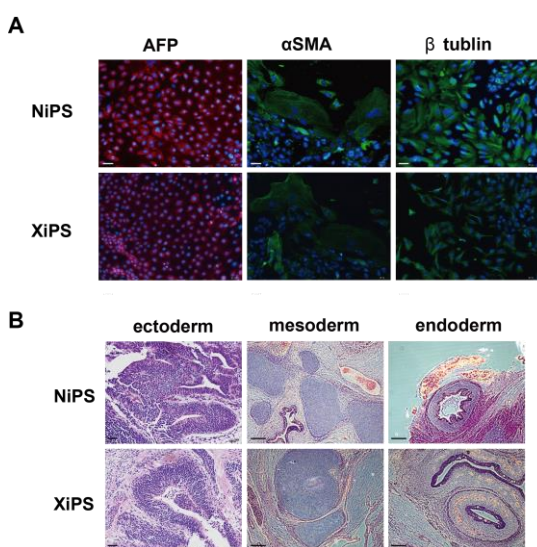
MonoMAC 症候群患者から樹立した iPS 細胞のクローンの中から正常核型を有するクローンの抽出を行うため G 分染法でスクリーニングを進めてきたが、結果的に全ての細胞で染色体異常が検出され、解析可能なクローンの樹立にいたらなかった。この原因として、GATA-2 の機能喪失型変異によりゲノムの不安定性が増している可能性を想定している。現在、既に樹立した健常人由来の iPS 細胞に対し、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術で GATA-2 遺伝子変異を導入する事を試みている。

(2) 遺伝性鉄芽球性貧血 (X連鎖性鉄芽球性貧血: XLSA) 由来 iPS 細胞の樹立

上述のように GATA-2 変異 iPS 細胞の樹立が計画通りに進まない現状から、XLSA 患者由来 iPS 細胞も同手法で樹立し、赤血球に細分化させる事で特性解析を試みた。

XLSA 患者および健常人より樹立した正常核型を有する iPS 細胞株 (それぞれ XiPS 細胞、NiPS 細胞) はアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色陽性であり、未分化細胞であることを確認した。また免疫染色でも幹細胞マーカーである *OCT3/4*, *NANOG*, *SSEA-4*, *TRAI-60*, *TRAI-81* の発現を確認した。

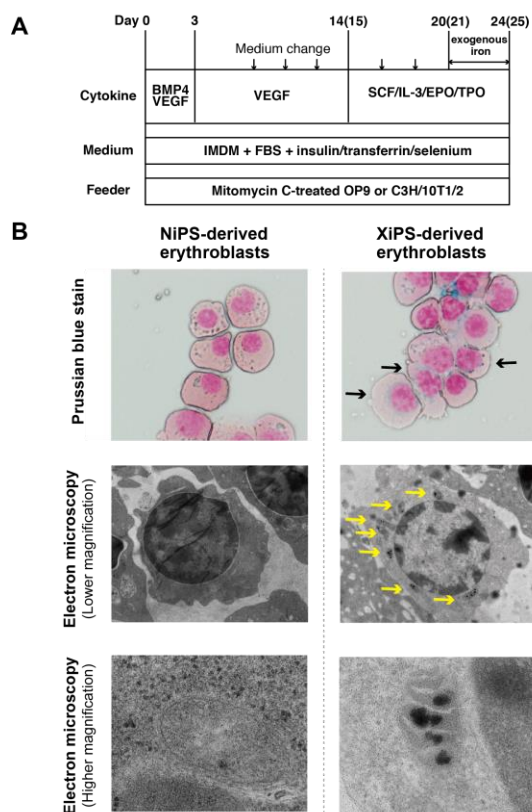
次に、iPS 細胞株の多分化能の評価を行う目的で、まず浮遊培養系にて iPS 細胞株が球状の Embryoid body (EB) を形成することを確認した。さらに、EB を接着培養系に移し、さらに 1 週間程度培養した結果、免疫染色によって AFP (内胚葉)、 $\alpha$ SMA (中胚葉)、 $\beta$ -tubulin (外胚葉) への分化が確認された (図 1A)。また、これらの細胞株を免疫不全マウスに移植し奇形種を形成させたところ、腸管様の上皮構造 (Endoderm)、軟骨 (Mesoderm)、神経組織 (Ectoderm) が観察された (図 1B)。



(図 1) 樹立した iPS 細胞の多分化能の検討

(3) 樹立した XiPS 細胞からの赤血球分化

iPS 細胞から赤血球への分化については図 2A に示すように、OP9 細胞等のフィーダー細胞との共培養により行った。Day 24-25 日に細胞を回収し鉄染色を行った結果、環状鉄芽球の誘導に成功した (図 2B)。図 2B の矢印で示すように、鉄顆粒はミトコンドリアに異常蓄積している事が確認されている。



(図 2) 環状鉄芽球の樹立

## 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 4 件)

1. Ichikawa S, Fukuhara N, Hatta S, Himuro M, Katsushima H, Nasu K, Ono K, Inokura K, Kobayashi M, Onishi Y, Fujii H, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Successful Cord Blood Stem Cell Transplantation for Primary Cutaneous CD8-positive Aggressive Epidermotropic Cytotoxic T-cell

- Lymphoma Complicated with Cerebral Infiltration. Intern Med. 2018 Mar 9. doi:10.2169/internalmedicine.0568-17 (査読あり)
2. Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Saito K, Kamata M, Tamai Y, Kawamata S, Harigae H.  
A defined culture method enabling the establishment of ring sideroblasts from induced pluripotent cells of X-linked sideroblastic anemia. *Haematologica*. (掲載決定済) (査読あり)  
doi: 10.3324/haematol.2017.179770.
  3. Saito K, Fujiwara T, Ota U, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizuka M, Tanaka T, Harigae H.  
Dynamics of absorption, metabolism, and excretion of 5-aminolevulinic acid in human intestinal Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;11:105-111. (査読あり)  
doi: 10.1016/j.bbrep.2017.07.006.
  4. Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H.  
Forced FOG1 expression in erythroleukemia cells: induction of erythroid genes and repression of myelo-lymphoid transcription factor PU.1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;485:380-387. (査読あり)  
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.068.
  5. Inokura K, Fujiwara T, Saito K, Iino T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimoda K, Harigae H.  
Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblasts. *Exp Hematol*. 2017;49:56-67. (査読あり)  
doi: 10.1016/j.exphem.2017.01.002.
- [学会発表] (計6件)
1. Hatta S.  
Generation of induced pluripotent stem cell-derived erythroblasts of X-linked sideroblastic anemia.  
第79回日本血液学会  
2017年10月20日  
東京国際フォーラム (東京)
  2. Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H.  
Exploring the mechanism of FOG1-dependent transcriptional regulation in erythroid cells.  
第79回日本血液学会総会  
2017年10月20日  
東京国際フォーラム (東京)
  3. Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H.  
Exploring the mechanism of FOG1-dependent transcriptional regulation in erythroid cells.  
第22回欧州血液学会  
2017年6月23日  
マドリード (スペイン)
  4. Saito K, Fujiwara T, Morita M, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Shimizu R, Harigae H.  
Establishment of in vivo and in vitro model of X-linked sideroblastic anemia.  
第22回欧州血液学会  
2017年6月23日  
マドリード (スペイン)
  5. Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Kamata

M, Tamai Y, Nakamura Y, Kawamata S,  
Harigae H. GENERATION  
OF INDUCED PLURIPOTENT STEM  
CELL-DERIVED ERYTHROBLASTS FROM A  
PATIENT WITH X-LINKED SIDEROBLASTIC  
ANEMIA.

第7回国際鉄バイオサイエンス学会

2017年5月10日

ロサンゼルス (アメリカ)

6. Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Kamata  
M, Tamai Y, Nakamura Y, Kawamata S,  
Harigae H. Generation of induced  
pluripotent stem cell-derived  
erythroblasts from a patient with  
X-linked sideroblastic anemia.

第58回米国血液学会

2016年12月4日

サンディエゴ (アメリカ)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

血液免疫病学分野ホームページ

<http://www.rh.med.tohoku.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

八田 俊介 (HATTA, SHUNSUKE)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：80772194

### (2) 研究分担者