

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19600

研究課題名（和文）iPS細胞を用いた先天性骨髄不全症候群からの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 congenital bone marrow failure syndrome using human iPS cells

研究代表者

望月 慎史（Mochizuki, Shinji）

広島大学・医系科学研究科（医）・助教

研究者番号：90349473

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：先天性骨髄不全症候群患者由来iPS細胞樹立系と血液細胞への分化系を確立した。中でも重症先天性好中球減少症(SCN)患者体細胞から樹立したiPS細胞(SCN-iPS細胞)は、その特徴である前骨髄球段階での成熟障害をきたし、SCNの病態をよく再現した。周期性好中球減少症(CyN)からのCyN-iPS細胞ではこれらの異常は認められなかった。またこれらの患者由来iPS細胞にゲノム編集を用いて白血病化に関わるとされる遺伝子のノックインおよびノックアウトを行い血球分化の過程を比較した。以上は、今後のSCNにおける白血病発症機序の解明、発症予防法の開発に有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児にみられる先天性骨髄不全症候群には重症先天性好中球減少症など高率に白血病化することが知られているものが多い。重症先天性好中球減少症と近接した遺伝子変異によるとされる周期性好中球減少症では白血病化は起こらず、また臨床経過も異なる。これら疾患の患者由来iPS細胞の比較・解析は白血病化のメカニズムの解明に有効であると考えられる。特に血液に分化していく過程で白血病化を時間経過ごとに追跡することが可能であるiPS細胞を用いることの意義は大きい。今回これらの解析系の確立、安定化により様々な疾患の解析が可能となった。

研究成果の概要（英文）：We established iPS cells from congenital bone marrow failure syndrome. Myeloid cells derived from severe congenital neutropenia (SCN)-iPS cells revealed the maturation arrest at a promyelocyte stage, reflecting the symptom of SCN patients. One from cyclic neutropenia (CyN) didn't show that. We also knocked-in and -out some genes which are associated with leukemogenesis in SCN by genome-editing technologies and compared the process of the differentiation into blood cells. In addition, SCN-iPS cells were expected to be useful for the investigation into the mechanisms causing the occurrence of leukemia and the establishment of the methods to prevent it in SCN.

研究分野：医歯薬学

キーワード：小児血液学 iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児に特有の重症先天性好中球減少症(SCN:severe congenital neutropenia)、Fanconi 貧血 (FA)などの先天性骨髄不全症候群(CBMFS:congenital bone marrow failure syndrome)の患者は高率に白血病を発症するが、これは先天的に有する遺伝子異常を背景として、付加的遺伝子異常が発生することによって発症するためと考えられるが、そのメカニズムはほとんど解明されておらず、そのため発症予防法も確立していないのが現状である。

一方、ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、多能性幹細胞であるため、種々の疾患患者の体細胞から iPS 細胞を樹立し、それらの疾患特異的 iPS 細胞からその疾患の主座となる細胞を分化誘導することにより、その疾患の発生過程を再現し、その病態を解析することが可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、SCN、FA などの CBMFS 患者体細胞から樹立された iPS 細胞から分化誘導された造血/血液細胞に、白血病関連遺伝子変異を導入し、これらの細胞を CBMFS 患者 iPS 細胞由来ストローマ細胞と共培養することにより白血病細胞の発生を *in vitro* で再現する。さらに、その発生過程を白血病細胞と造血環境の両面から解析することにより、その発生メカニズムの分子基盤を解明し、これを標的とする CBMFS における白血病の発症予防法を開発する。

3. 研究の方法

1) SCN 患者由来 iPS 細胞からストローマ細胞への分化誘導

我々が既に樹立した SCN 患者由来 iPS 細胞および健常人由来 iPS 細胞を、ゼラチンコートしたプレートに播種し、5%platelet lysate を含む培養液で、ストローマ細胞を分化誘導する。

2) SCN 患者由来 iPS 細胞から造血/血液細胞への分化誘導

SCN 患者および健常人 iPS 細胞を、SCN 患者および健常人 iPS 細胞由来ストローマ細胞との様々な組み合わせの共培養により、造血/血液細胞へ分化誘導する。

3)周期性好中球減少症 (CyN) 患者骨髄細胞由来 iPS 細胞の樹立

CyN 患者血液細胞からビーズ法を用いて CD34 陽性細胞を抽出し、センダイウイルスベクターを用いて Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 遺伝子を導入することにより iPS 細胞の樹立を行う。

4)SCN-iPS 細胞と CyN-iPS 細胞の比較

SCN-iPS 細胞と CyN-iPS 細胞を血球分化誘導し、コロニー形成能および G-CSF 反応性その他を比較検討する。

5) SCN 患者 iPS 細胞への遺伝子導入

SCN 患者および健常人由来 iPS 細胞へ、SCN からの白血病化に関連すると言われている遺伝子 (CSF3R、RUNX1 など) や種々の白血病関連遺伝子変異 (恒常活性型 JAK3、恒常活性型 c-Kit、恒常活性型 RAS など) の遺伝子導入・改変を行う。

4. 研究成果

SCN-iPS 細胞は以前に Oct3/4、Sox-2、Klf-4、c-Myc の 4 つの遺伝子を遺伝子導入することで、樹立している。今回、周期性好中球減少症患者の血液細胞からセンダイウイルスベクターを用いて Oct3/4、Sox-2、Klf-4、c-Myc の 4 つの遺伝子を遺伝子導入することで、iPS 細胞を樹立した。今回樹立した CyN-iPS 細胞のうち 3 クローンについて、免疫染色により未分化マーカーの発現、RT-PCR 法により導入遺伝子のサイレンシング、免疫不全マウスへの移植による奇形種形成により多分化能を確認した。また、樹立された iPS 細胞の遺伝子解析を行い、ドナーとなった CyN 患者と同じ ELANE 遺伝子変異を有していることを確認した。

マウス胎仔 AGM 領域由来ストローマ細胞 (AGM-S3 細胞) と iPS 細胞の共培養による血液細胞への分化誘導法に従い、SCN-iPS 細胞、CyN-iPS 細胞と健常人由来の iPS 細胞をそれぞれ AGM-S3 細胞と 12~14 日間共培養すると、敷石上の細胞集団 (cobblestone 領域) が確認され、それぞれの iPS 細胞から造血細胞への分化誘導が確認された。ここで細胞を回収して、ビーズ法を用いてヒト CD34 陽性細胞を分離し、血液細胞コロニー形成や液体培養を施行した。骨髄球系コロニー形成は SCN-iPS 細胞では CyN-iPS 細胞や健常人由来の iPS 細胞に比べて著明に減少しており、形成される骨髄球系コロニーも小さいものがほとんどであった。また、G-CSF のみを添加した場合に形成される顆粒球コロニーは SCN-iPS 細胞では著明に抑制され、ほとんど形成されなかったが、コントロールと CyN-iPS 細胞から形成される顆粒球コロニーにはほとんど差がなく、G-CSF に対する反応はコントロールと同程度と考えられた。一方、赤芽球や混合コロニー形成は 3 者の間で大きな差は認められなかった。次に、CD34 陽性細胞を SCF+FP6+IL-3+G-CSF+TPO 存在下で 2 週間液体培養を行い、好中球系への分化誘導を比較すると、SCN-iPS 細胞由来の細胞はほとんど細胞数が増加しないが、CyN-iPS 細胞由来の細胞はコントロールと同程度増加した。

platelet lysate (PL) は間葉系幹細胞培養において FBS (fetal bovine serum) の代わりに用い

られる。健常人由来の iPS 細胞を 5 %PL を含む培養液にて培養することで、6 - 8 週間で十分に増殖した付着細胞、間葉系幹細胞 (MSC) を回収できた。この付着細胞を解析すると、表面抗原は骨髄や ES 細胞由来の間葉系幹細胞と同様であった。また、この付着細胞を間葉系細胞に分化させると、脂肪細胞、骨芽細胞や軟骨細胞に分化することが確認された。また、brachury や MSX1 の発現を認めたことから、中胚葉由来であることが確認された。

次に、iPS 細胞由来の MSC と iPS 細胞との共培養において、無血清血液細胞誘導培地を用いて血液細胞への分化誘導を試みたところ、共培養 10 - 14 日目に cobblestone 領域の出現を認めた。この細胞を回収すると、CD34 陽性細胞が約 10%認められ、血液細胞コロニーアッセイを施行すると様々な血液細胞コロニーが出現し、種々の血液細胞への分化誘導が確認された。

現在、SCN-iPS、CyN-iPS、健常人由来コントロール iPS 細胞に CRISPR-Cas9 によるゲノム編集で CSF3R, RUNX1 変異のノックインおよびノックアウトを行っている。また iPS 細胞および分化誘導 MSC との由来細胞別それぞれの組み合わせによる血球分化誘導および解析を行っている。さらには CBMFS 患者由来 iPS 細胞の樹立を準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 野間康輔、望月慎史ら	4. 巻 122
2. 論文標題 コルチコステロイド減量により奇異性反応を繰り返した重症結核性髄膜炎・脳結核腫	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本小児科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1213-1219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11501/3401280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 望月慎史	4. 巻 80
2. 論文標題 好中球減少症	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 1203-1209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 望月慎史	4. 巻 49
2. 論文標題 オンコロジック・エマージェンシー 白血球増多症	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 小児内科	6. 最初と最後の頁 1757-1760
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iizuka-Koga Mana, Asashima Hiromitsu, Ando Miki, Lai Chen-Yi, Mochizuki Shinji, Nakanishi Mahito, Nishimura Toshinobu, Tsuboi Hiroto, Hirota Tomoya, Takahashi Hiroyuki, Matsumoto Isao, Otsu Makoto, Sumida Takayuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Functional Analysis of Dendritic Cells Generated from T-iPSCs from CD4+ T Cell Clones of Sjogren's Syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1155 ~ 1163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2017.04.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松村梨紗、望月慎史ら
2. 発表標題 同種造血幹細胞移植後、骨髄再発に先行して骨単独再発を認めた治療抵抗性BCP-ALLの1例
3. 学会等名 第60回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森下祐介、望月慎史ら
2. 発表標題 両側多発性腎腫瘍の一例
3. 学会等名 第60回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江口勇太、望月慎史ら
2. 発表標題 初診時に意識障害、呼吸障害、腎障害など多彩な全身症状を呈したBCP-ALLの一例
3. 学会等名 第121回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 望月慎史ら
2. 発表標題 Efficacy of clofarabine based chemotherapy followed by haplo-HSCT for refractory childhood ALL
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松村梨紗、望月慎史ら
2. 発表標題 補体C1q欠損症に対する同種造血幹細胞移植
3. 学会等名 第40回日本造血細胞移植学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野間康輔、望月慎史、小林正夫、他
2. 発表標題 両側多発性腎腫瘍の一例 A case of bilateral multifocal renal tumors.
3. 学会等名 第59回日本小児血液がん学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野間康輔、望月慎史、小林正夫、他
2. 発表標題 Mixed-phenotype acute leukemia with B, T, and myeloid lineages - a pediatric case -
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 江口勇太、望月慎史、小林正夫、他
2. 発表標題 初診時に意識障害、呼吸障害、腎障害など多彩な全身症状を呈したBCP-ALLの一例
3. 学会等名 第121回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	小林 正夫 (KOBAYASHI Masao) (00162016)	広島大学・医系科学研究科(医)・名誉教授 (15401)	
連携 研究者	大津 真 (OTSU Makoto) (30361330)	北里大学・医学部・助教 (32607)	