

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16606

研究課題名(和文) 疾患iPS細胞を用いた発作性夜間血色素尿症の病態解析：新規治療法の開発を目指して

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) : Strategy to develop a novel therapy

研究代表者

廖 紀元 (Liao, Jiyuan)

東京大学・定量生命科学研究所・特任研究員

研究者番号：90781857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：PNHは主にPIG-A遺伝子変異による溶血性貧血を主徴とする後天性造血幹細胞疾患であるが、合併する造血障害の病態には未知の点が多いため、根治療法開発は困難である。そこで、患者由来iPS細胞(iPSC)を利用し、病因解明を目指すこととした。PIG-A変異型iPSCおよび同一患者由来正常型iPSCに由来する造血幹細胞の分化増殖能を検討したところ、PNH型細胞では著明な低下が認められた。また、PIG-A変異修復後の分化増殖能の改善は限定的であった。これらの結果より、PNH造血障害の病因として、PIG-A変異以外の内因性異常の存在が示唆されたため、今後、遺伝子解析を進め、病因遺伝子異常の同定を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PNHにおける造血障害は、本邦を含むアジア各国で合併する事が極めて多いため、病因の特定と治療法開発は重要な課題である。本研究では、PNH造血障害におけるPIG-A変異の関与について、世界で初めて樹立したPNH-iPSCおよび同一患者由来N-iPSCを用いて検討を行ったが、PIG-A変異以外に内因性の病因(遺伝子異常等)が存在することを直接証明できた点で学術的意義が大きい。また、本研究成果は、PNH造血障害の病因遺伝子異常同定を進めるための重要な基礎であり、将来、造血障害発症予防法や治療法最適化法、さらに根治療法の開発に繋がる事が期待される社会的意義の大きいものである。

研究成果の概要(英文)：Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is an acquired clonal hematopoietic stem cell (HSC) disorder and characterized by complement-induced hemolysis. The cause of bone marrow failure remains unclear, which makes difficult to develop radical therapies. Therefore, we aimed to elucidate the pathogenesis of PNH using PNH patient-derived induced pluripotent stem cells (PNH-iPSCs). PNH-iPSC-derived hematopoietic stem cells (HSCs) with PIG-A gene mutation showed highly impaired proliferation and differentiation potential compared to HSCs differentiated from PIG-A gene normal iPSCs (N-iPSC) established from the same patients. Unexpectedly, the reduced proliferation and differentiation ability was not fully recovered by correction of the mutated PIG-A gene, which suggest that additional genetic abnormality causes the hematopoietic disorder. We conduct genetic analyses to identify the causative abnormal genes.

研究分野：再生医療学

キーワード：PNH ゲノム編集 PIG-A 造血幹細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

PNH は、造血幹細胞(HSC)に生じる X 染色体上の Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class A (PIG-A)遺伝子変異のため、細胞膜上の glycosylphosphatidylinositol anchor protein (GPI-AP)が欠損しているクローナルな後天性造血幹細胞疾患である。GPI-AP である補体制御因子 CD55 及び CD59 が欠損し、赤血球細胞膜上で補体活性が異常亢進し溶血性貧血を発症する。さらに、再生不良性貧血(AA)や骨髄異形成症候群(MDS)等の骨髄不全との合併や移行が多く、出血や重症感染症によって予後が悪化する。近年、抗補体 C5 抗体薬エクリズマブが臨床応用されているが、溶血症状を軽減する対症療法であり、本邦に特に多い、AA や MDS 等を合併・移行する例は十分な恩恵を受けられない。唯一の根治療法は造血幹細胞移植療法であるが、ドナー確保や高リスクであるため、実施可能例は限られる。このような状況のため、根治療法の開発が待望されているが、PNH クローンが拡大し、造血障害が発生する機序には不明な点が多いため、治療法開発も進んでいない。現在提唱されている PNH クローン拡大機序は以下の通りである。 PNH クローン HSC は GPI-AP を欠損しているため、自己免疫による攻撃を回避し、正常造血細胞に対して優位となる。 遺伝子異常に起因する内因性増殖異常によりクローン拡大が起こる。しかし、自己免疫標的分子や遺伝子異常については同定されていない。病態解明が進んでいない大きな原因は、動物モデルが無いため、利用できる検体が患者造血細胞に限られているものの、特に造血障害合併例では解析に十分な量の検定を確保することが困難であることが挙げられる。また、病因候補遺伝子異常が挙げられても、HSC に対して分化能を維持させたまま遺伝子操作を行うことは困難なため、その遺伝子異常が造血に及ぼす影響について検討ができないことも原因である。これらの問題点を解決する方法として、iPSC の利用が有効であると考えられる。即ち、iPSC は多分化能を維持したまま増殖可能であり、HSC を含む種々の細胞へ分化能を持つため、PNH に関して疾患 iPSC を利用すれば、分量の HSC を確保できる。また、iPSC に対しては、ゲノム編集等の遺伝子操作が容易なため、遺伝子操作後に分化させた HSC を利用すれば、病因候補遺伝子異常について機能解析が可能である。さらに、iPSC は単一細胞由来クローンのため、遺伝子解析を行う際に、バックグラウンドの低いデータを得ることが可能である。

従って、本研究で、PNH-iPSC を利用した造血能評価系および病因候補遺伝子の機能解析系を確立することにより、造血障害病因遺伝子異常の同定が可能になると期待されるため、得られる成果は PNH 根治療法開発における重要な礎であると考えられる。

### 2. 研究の目的

これまでの研究にも関わらず、PNH の病態には不明な点が多く、根治療法の開発は進んでいない。研究の障壁となっていた問題点、すなわち PNH 患者 HSC の量的確保や幹細胞性を維持させたままの遺伝子操作の困難さ等を克服するためには、iPSC の利用が有効であると考えられるが、これまでに PNH クローンの iPSC 樹立報告は無かった。そこで、本研究では、世界で初めて樹立に成功した PNH-iPSC を利用して、PNH のクローン拡大や造血障害の原因遺伝子を同定するための機能解析系の確立を目指した。具体的には、先ず、PNH-iPSC から分化させた PNH-HSC の造血能解析系を確立することを目的とした。次に、PNH-iPSC において PIG-A 遺伝子変異を修復し、分化させた HSC の造血能を解析し、PIG-A 遺伝子変異の造血異常への関与について検討することを目的とした。造血能の回復が十分に認められなければ、PIG-A 変異以外の遺伝子異常が病因として関与していることが示唆されるため、遺伝子解析により病因遺伝子異常の同定が可能と考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) iPSC の品質評価

PNH 患者ならびに健常人より得た複数クローンの iPSC を用いて、未分化幹細胞マーカの発現、核型および多分化能について解析を行った。PNH-iPSC の GPI-AP 発現確認は、CD55、CD59 および CD90 のフローサイトメトリー(FCM)解析により行った。また、PIG-A 遺伝子変異の同定は、PNH-iPSC から抽出したゲノム DNA もしくは cDNA のサンガーシーケンスにより行った。

#### (2) PNH-HSC の造血能解析

胚様体(EB)形成法により、PNH-iPSC および同一患者由来の N-iPSC、さらに健常人由来(H-) iPSC を分化誘導し、その後、HSC(CD34+CD43+)をソーティングした。得られた HSC について、SCF、IL-3、EPO および GM-CSF を添加したメチルセルロース半固形培地で培養し、14~21 日後に形成された CFU-G、-M、-GM、-GEMM、-E などのコロニー数を計測して、造血能を評価した。また、各コロニー形成細胞について、May-Giemsa 染色標本を鏡し、血球細胞の形態異常について評価した。

#### (3) PIG-A 遺伝子変異修復が造血能に与える影響の検討

CRISPR-Cas9 ゲノム編集法を用いて、PNH-iPSC の PIG-A 遺伝子変異を正常化し、PIG-A 修復 iPSC

(PC-iPSC)を樹立した。PIG-A 配列正常化の確認はサンガーシーケンスによって行い、修復前に欠損していた GPI-AP 発現の回復は CD55、CD59 および CD90 の FCM で確認した。PC-iPSC の品質は、(1)と同様に、未分化幹細胞マーカーの発現解析、核型解析、分化能解析により評価し、造血能は、(2)と同様に評価した。また、PNH-HSC および N-HSC のデータと比較して、造血能の変化について検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) iPSC の品質評価

樹立した PNH-iPSC、N-iPSC 何れについても未分化幹細胞マーカーを発現し、正常核型を保持していることが確認された。PNH-iPSC は PIG-A 遺伝子に変異を持ち、GPI-AP である CD55 および CD59 の陰性が確認された。一方、同一患者由来の N-iPSC については、PIG-A 配列に異常は無く、GPI-AP も陽性であった。また、iPSC 由来 EB では各系統の遺伝子発現が認められ、多分化能を持つことが確認された。

##### (2) PNH-HSC の造血能解析

同一患者より樹立した N-および PNH-iPSC を用いて *in vitro* で HSC ならびに成熟血球細胞への分化能を検討した。血球分化培地にヒト血清及び SCF, TPO, FLT-3L 等細胞成長因子を添加して、HSC と赤芽球系細胞へ 2 段階の分化誘導を行った。複数例患者由来の iPSC を用いた検討の結果、N-iPSC と比べ、PNH-iPSC は赤芽球への分化効率が低い傾向が認められた。また、iPSC 由来 HSC の成熟血球分化能については、コロニー形成アッセイを行ったが、PNH-iPSC 由来 HSC (PNH-HSC) では、N-iPSC 由来 HSC (N-HSC) と比べ、コロニー形成能が著しく低下していた。一方、N-HSC のコロニー形成能も、健常人 iPSC 由来 HSC (H-HSC) と比べて、著明に低下していた。

##### (3) PIG-A 遺伝子変異修復が造血能に与える影響の検討

PIG-A 遺伝子変異が造血細胞の分化能に関与しているか検討するため、PNH-iPSC において CRISPR-Cas9 法を用いて PIG-A 遺伝子変異の修復を行った。修復後の PC-iPSC では、修復前には欠損していた GPI-AP の発現が回復し、未分化幹細胞マーカーの発現も維持され、さらに核型も正常であり、PC-iPSC の樹立に成功した。また、シーケンスの結果、X 染色体両アレルで正常 PIG-A 遺伝子配列が確認され、オフターゲット領域として予測された部位には遺伝子変異が生じていないことも確認された。得られた PC-iPSC 由来 HSC の造血能は、修復前の PNH-HSC と比べ僅かに上昇したに過ぎず、また、H-HSC と比べ著明に低いままであった。PIG-A 遺伝子変異修復前後の iPSC は同一クローン由来であり、遺伝学的な背景に差が無く、造血能を直接比較できると考えられるため、PNH の造血障害では、PNH 発症 (PIG-A 遺伝子変異獲得) 以前に起きた未知の遺伝子異常が関与している可能性が強く示唆された。

以上のように、本研究では、PNH 患者由来 iPSC を用いた造血能解析系を用いることにより、病変候補遺伝子異常の造血能への影響も評価できる系を確立することができた。また、PIG-A 遺伝子変異が造血障害の主因では無いことを明らかにすることができた。これらの結果より、PNH-iPSC を用いて遺伝子解析を進めることにより、PNH 造血障害の病因遺伝子異常の同定が可能になるものと考えられ、将来、造血障害発症予防法および根治療法開発に繋がることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Jia Y, Miyamoto S, Soda Y, Takishima Y, Sagara M, Liao J, Hirose-Yotsuya L, Hijikata Y, Miura Y, Hara K, Iwanaga A., Ota Y, Tani K	4. 巻 12
2. 論文標題 Extremely low organ toxicity and strong antitumor activity of miR-34-regulated oncolytic coxsackievirus B3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Ther Oncolytics	6. 最初と最後の頁 246-258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omto.2019.01.003	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 Hirose L, Hiramoto T, Tian Y, Kohara H, Kobayashi S, Nagai E, Denda T, Tanaka Y, Ota Y, Liao J, Miyamoto S, Miura Y, Hijikata Y, Soda Y, Inoue T, Okahara N, Ito T, Sasaki E, Tojo A, Uchimaru K, Tani K.	4. 巻 49
2. 論文標題 A pilot study to establish human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) carrier model using common marmoset ( <i>Callithrix jacchus</i> )	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Med Primatol	6. 最初と最後の頁 86-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jmp.12454	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 Hiramoto T, Tahara M, Liao J, Soda Y, Miura Y, Kurita R, Hamana H, Inoue K, Kohara H, Hijikata Y, Okano S, Yamaguchi Y, Oda Y, Ichianagi K, Toh H, Sasaki H, Kishi H, Ryo A, Muraguchi A, Takeda M, Tani K	4. 巻 28
2. 論文標題 Non-transmissible measles virus vector with segmented RNA genome establishes different types of iPSCs from hematopoietic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Ther	6. 最初と最後の頁 129-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymthe	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Liao J, Soda Y, Sugawara A, Miura Y, Hiramoto T, Tahara M, Takishima Y, Hijikata Y, Miyamoto S, Takeda M, Tani K
2. 発表標題 Analysis of Human iPSCs Generated by a Non-Integrating Measles Virus Vector
3. 学会等名 American Society of Gene and Cell Therapy 22nd Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kodama K, Soda Y, Liao J, Miyamoto S, Deguchi T, Fujine K, Sakata H, Tomioka M, Tani K
2. 発表標題 Inhibition of sickling by 5-aminolevulinic acid in sickle cell disease mouse models.
3. 学会等名 7th International ALA and Porphyrin Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬理沙、小原洋志、相良京、三浦由恵、土方康基、曾田泰、宮本将平、廖紀元、高橋聡、篠崎大、大田泰徳、渡辺恵理、田中徹、中島元夫、木庭幸子、奥山隆平、福原秀雄、井上啓史、並川努、花崎和弘、谷憲三朗
2. 発表標題 5-ALAを用いた末梢血循環がん細胞の検出法確立にむけたパイロット研究
3. 学会等名 第9回ポルフィリン-ALA学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Liao J, Soda Y, Sugawara A, Miura Y, Hiramoto T, Tahara M, Takishima Y, Hijikata Y, Miyamoto S, Takeda M, Tani K
2. 発表標題 Direct induction of naive-like human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by a non-integrating measles virus vector
3. 学会等名 第25回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Liao J, Soda Y, Sugawara A, Miura Y, Hiramoto T, Tahara M, Takishima Y, Miyamoto S, Hijikata Y, Takeda M, Tani K
2. 発表標題 Measles virus vector is a promising tool for T-cell engineering and establishing naive-like iPSCs
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Liao J, Soda Y, Sugawara A, Miura Y, Hiramoto T, Tahara M, Takishima Y, Miyamoto S, Takeda M, Tani K
2. 発表標題 Non-Integrating Measles Virus Vector is a Promising Tool for Naive iPSCs Generation and T-cell Engineering
3. 学会等名 American Society of Gene and Cell Therapy 22nd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Liao J, Soda Y, Sugawara A, Miura Y, Hiramoto T, Tahara M, Takishima Y, Miyamoto S, Takeda M, Tani K
2. 発表標題 F-Deletion Non-Integrating Measles Virus Vector: A Promising Tool for T-Cell Engineering and Naive iPSCs Generation
3. 学会等名 American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyamoto S, Ito S, Sagara M, Soda Y, Hara K, Sakamoto A, Liao JY, Kodama K, Tani K
2. 発表標題 MicroRNA-Targeted Oncolytic Virotherapy for Triple-Negative Breast Cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kodama K, Soda Y, Liao J, Miyamoto S, Yotsuyanagi H, Tani K
2. 発表標題 Inhibition of sickling by 5-Aminolevulinic Acid in Sickle Cell Disease Mouse Models
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 鎌状赤血球症の改善及び/又は予防剤	発明者 谷憲三郎、曾田泰、 廖紀元、宮本将平、 河田聡史、富岡基	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-170764	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	谷 憲三郎  (Tani Kenzaburo)		
研究協力者	曾田 泰  (Soda Yasushi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------