

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591360

研究課題名（和文）iPS細胞による Shwachman-Diamond 症候群の発症機構・治療基盤研究

研究課題名（英文）Investigation of pathogenesis and novel therapy for Shwachman-Diamond syndrome using iPS cells.

研究代表者

渡邊 健一郎 (WATANABE KENICHIRO)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20324634

研究成果の概要（和文）：疾患特異的 iPS 細胞を用いた先天性骨髄不全症候群の病態解析のため、正常ヒト iPS 細胞からの好中球分化誘導の系を確立した。この技術を用い Shwachman-Diamond 症候群の病態解析を行うため、まず好中球のみ減少を来す先天性骨髄不全である HAX1 遺伝子異常による先天性好中球減少症の患者から iPS 細胞を作成し、好中球へ分化させた。健常人 iPS 細胞と比較し、患者 iPS 細胞から得られる成熟好中球の割合は明らかに減少しており、患者でみられる症候を再現していた。Shwachman-Diamond 症候群をはじめとする好中球減少を主徴とする先天性骨髄不全においても、この解析系が有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In an attempt to elucidate the pathogenesis of congenital marrow failure syndromes, we established a neutrophil differentiation system from human iPS cells. To evaluate this system as a tool to investigate pathogenesis of Shwachman-Diamond syndrome, we generate iPS cells from a patient with severe congenital neutropenia caused by HAX-1 gene mutation, and differentiate neutrophils from these iPS cells. The proportion of mature neutrophils was remarkably decreased by differentiation from HAX1-iPS cells compared to iPS cells derived from a healthy donor. Our differentiation system using patient-derived iPS cells recapitulates the phenotype of the patient with severe congenital neutropenia. These results suggest our model is useful to investigate the pathogenesis of bone marrow failure syndromes with neutropenia including Shwachman-Diamond syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 小児科学

キーワード：再生医学、発生・分化、幹細胞、骨髄不全

1. 研究開始当初の背景

Shwachman-Diamond 症候群は、骨髄不全、腭外分泌不全、骨格異常を主徴とする先天性骨髄不全症候群で、骨髄異形成症候

群、白血病を発症しやすいことが知られている。近年原因遺伝子として *SBDS* が同定された。*SBDS* はリボソーム生成に重要な蛋白であることがわかったが、Diamond

-Blackfan 貧血など他の先天性骨髄不全症候群でもリボソーム関連遺伝子の変異が認められることから、その病態の解明はリボソーム異常を原因とする複数の疾患に対する治療開発、白血化の機構の解析に寄与する可能性があると考えられた。

一方、ヒト細胞から体を構成するあらゆる細胞を作り出せる多能性をもった新しい幹細胞である iPS 細胞の作成法が報告されていた。この細胞は、再生医療だけでなく、患者の細胞から iPS 細胞を作成することにより、従来のモデルではなし得なかった疾患解析を行うことができ、新規治療法の開発にも貢献することが期待された。

2. 研究の目的

患者細胞から作成した iPS 細胞を用い、本疾患の病態を解明し、骨髄不全症に対する治療開発の基盤を確立する。

3. 研究の方法

1) 健康人由来 iPS 細胞から好中球分化系の確立

当研究室ではマウス、サルの ES 細胞から血球を分化させる系を確立し、その成果を報告してきた(Shinoda G, Heike T, et al. Blood 2007, Ma F, Heike T et al. Stem Cells, 2008)。その方法を応用し、既に樹立されている健康人由来 iPS 細胞から好中球を分化させる系を確立する。その分化の過程を May-Giemsa 染色による細胞の形態、フローサイトメトリーによる表面抗原、骨髄球分化に関与する転写因子の RT-PCR、ラクトフェリン等細胞内顆粒蛋白により解析する。また得られた好中球については、電子顕微鏡で微細構造を観察するだけでなく、NBT 還元能やボイデン・チャンバー法により殺菌能、遊走能等機能評価を行う。

2) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立

当教室では、京都大学医学部医の倫理委員会承認後、すでにヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成を開始している。山中らの方法に従い、患者より採取した皮膚細胞にレトロウイルスを用いて遺伝子を導入し、iPS 細胞を作成する。未分化マーカーの発現や多分化能を評価し iPS 細胞として品質基準を満たしているか確認する。

3) 疾患特異的 iPS 細胞からの好中球分化

上記により確立した好中球分化系を用いて、疾患特異的 iPS 細胞から好中球分化を行う。細胞の形態、表面抗原、骨髄球分化に関与する転写因子の RT-PCR、ラクトフェリン等細胞内顆粒蛋白の解析を行い、患者でみられるように好中球減少が観察されるかを検討する。

4) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた好中球分化系による病態解析

疾患特異的 iPS 細胞から分化させても、患者でみられるのと同様好中球が減少することが確認できれば、その原因を探索する。フローサイトメトリーによる AnnexinV/Propidium Iodide を用いた細胞死の解析、細胞死に関わる蛋白について Western blotting、好中球減少に細胞死が関与しているかどうかを検討する。

4. 研究成果

1) 健康人由来 iPS 細胞から好中球分化系の確立

ヒト iPS 細胞を小さなクラスターとし、VEGF の存在下に OP9 細胞と 10 日間共培養した。10 日目に出現する中胚葉マーカーである VEGFR2^{high} CD34⁺分画を sorting し、再び新しい OP9 細胞上に播き直し、SCF, IL-3, TPO, G-CSF といったサイトカイン存在下にさらに約 30 日間培養すると、浮遊細胞として分化した血球が得られた。これらの浮遊細胞の形態を May-Giemsa 染色により評価すると約 40%が成熟好中球であり、他の細胞も大部分が顆粒球系の未熟な細胞であった。これらの細胞は MPO 染色、NAP 染色などの好中球特異的な特殊染色陽性であり、表面マーカー解析においても好中球系細胞に特徴的なマーカーが陽性であった。さらに、これらの iPS 細胞由来好中球を電子顕微鏡や免疫染色にて詳細に解析することにより、一次顆粒、二次顆粒、三次顆粒といった好中球特殊顆粒を全て備えていることを確認した。これらの iPS 細胞由来好中球の機能評価としては、遊走能、貪食能、殺菌能(活性酸素産生能、MPO 活性の測定)の評価を行い、これら全ての機能を有していることを確認した。最後にこれらのヒト iPS 細胞由来好中球の分化過程の経時的評価を行った。形態学的には sorting 後の 30 日間の培養において、その形態の変化を May-Giemsa 染色を用いて観察したところ、培養初期は骨髄芽球や前骨髄球などの幼弱な細胞が多数を占めていたが、培養後期には分葉核好中球等の成熟好中球が多数を占めるといった経時変化が観察された。表面マーカーの経時的解析では培養初期に未熟血球のマーカーの発現が高く、培養後期には未熟血球マーカーの発現は低下し、成熟好中球マーカーの発現が増加する傾向が見られた。

RT-PCR による遺伝子発現解析では、PU.1 や C/EBP α , ϵ , MPO などの好中球特殊顆粒蛋白遺伝子の発現パターンが正常ヒト骨髄造血でみられるパターンと一致していることが確認された。これらの結果より、ヒト iPS 細胞からは形態・機能的に成熟した好

中球が分化可能であり、さらにその分化において正常ヒト骨髓造血と同様の分化過程をたどることが示された。

2) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立

Shwachman-Diamond 症候群の病態解析を行うため、まず好中球のみ減少を来す先天性骨髓不全である HAX1 遺伝子異常による先天性好中球減少症の患者 iPS 細胞を樹立し、好中球へ分化させ、疾患モデルとして有用であるか検討した。HAX1 遺伝子異常症の患者より採取した皮膚細胞から得られた線維芽細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の初期化 4 因子もしくは c-Myc を除いた 3 因子を、レトロウイルスを用いて遺伝子導入し、iPS 細胞株を計 4 株樹立した。得られた患者由来 iPS 細胞はヒト ES 細胞様の形態を呈しており、ヒト ES 細胞と同じ培養条件で維持可能であった。これらの iPS 細胞株は NANOG や SSEA-4 等の未分化マーカーを ES 細胞と同様に発現しており、qPCR で iPS 細胞作製時に使用した transgene がしっかりと silencing されていることが確認された。多分化能に関しては、免疫不全マウスの皮下に注射することにより teratoma を形成し、三胚葉成分全てに分化可能であることが確認された。染色体検査では正常核型を示しており、HAX1 遺伝子検査では患者と同じ遺伝子異常を保持していた。このように、HAX1 遺伝子異常症の患者細胞より iPS 細胞が樹立され、それらの細胞は iPS 細胞としての一定の品質水準を満たしていることが確認された。

3) 疾患特異的 iPS 細胞からの好中球分化

次に HAX-1 先天性好中球減少症患者由来 iPS 細胞と正常人由来 iPS 細胞を好中球に分化させ、両者の比較を行った。iPS 細胞の好中球分化系としては、前述の OP9 細胞との共培養系ではなく、その後新たに我々の研究室で開発した feeder-free, serum-free の血球培養系(Niwa et al, PLoS One. 2011)を好中球分化に modify して使用した。具体的には、iPS 細胞のクラスターをマトリゲルコートディッシュ上に播いて無血清培地で培養し、BMP4, VEGF, SCF, IL-3, TPO, G-CSF 等のサイトカインを経時的に変更していくことで培養開始から約 25 日後に浮遊細胞として成熟好中球を含む骨髓球系の細胞が得られた。結果は、May-Giemsa 染色での比較では正常 iPS 細胞では得られた細胞の 40%以上が成熟好中球であったのに対し、患者 iPS 細胞から得られた細胞では成熟好中球の割合は 10%以下であり、未熟な骨髓球系の細胞が多くを占めていた。これらの細胞の表面マ

ーカー解析では正常 iPS 細胞由来血球に比べて患者 iPS 細胞由来血球では未熟血球マーカーである CD34 の陽性率が高く、骨髓球系の分化マーカーである CD11b の発現が低いという結果であった。また、好中球特殊顆粒の免疫染色では患者 iPS 細胞由来血球では正常 iPS 細胞由来血球に比較して二次顆粒・三次顆粒の構成成分タンパクである lactoferrin, gelatinase の陽性率が低かった。これらの結果から、HAX1 遺伝子異常症患者由来 iPS 細胞からの好中球分化系は患者でみられる症状と類似した表現形を示しており、疾患モデルとして有用であると考えられた。

4) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた好中球分化系による病態解析

さらに、Annexin V を用いて両者の iPS 細胞由来血球の apoptosis の割合を解析したところ、患者 iPS 細胞由来血球では正常と比較して apoptosis を起こしている細胞の割合が高いことがわかった。今後は Shwachman-Diamond 症候群など好中球減少を来す疾患に今回確立した実験系を応用し、病態解析を進める。

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 6 件)

- ① Morishima T, Watanabe K, Niwa A, et al. Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *J Cell Physiol.* 2011; 226(5):1283-91. (査読あり)
DOI:10.1002/jcp.22456
- ② 森嶋達也、平家俊男 ヒト iPS 細胞からの好中球分化誘導. *血液内科.*2011; 63: 332-338. (査読なし)
DOI:該当なし
- ③ 渡邊健一郎 先天性造血不全—Shwachman-Diamond 症候群 第 52 回日本小児血液学会総会教育セッションテキスト 2010:8-10.(査読なし)
DOI:該当なし
- ④ Watanabe K, Ambekar C, Wang H, et al. SBDS-deficiency results in specific hypersensitivity to Fas stimulation and accumulation of Fas at the plasma membrane. *Apoptosis.* 2009 ;14(1):77-89. (査読あり)
DOI:10.1007/s10495-008-0275-9
- ⑤ Niwa A, Heike T, Umeda K, et al. A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PloS One* 6:e22261, 2011.

(査読あり)

DOI: 10.1371/journal.pone.0022261

- ⑥ Niwa A, Umeda K, Heike T, et al.: Orderly hematopoietic development of induced pluripotent stem cells via Flk-1(+) hemoangiogenic progenitors. *J Cell Physiol* 221:367-377, 2009. (査読あり)
DOI:10.1002/jcp.21864

[学会発表] (計 3 件)

- ① Morishima T, Watanabe K, Niwa A, et al. Reduced production of mature neutrophils from induced pluripotent stem cells derived from a severe congenital neutropenia patient with HAX1 gene deficiency. 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, 2011 年 12 月 10-13 日 San Diego, USA.
- ② Morishima T, Watanabe K, Kanegane H, et al. Nationwide study of Shwachman-Diamond syndrome in Japan. 6th International Congress on Shwachman-Diamond syndrome, 2011 年 6 月 28-30 日 New York, USA
- ③ 渡邊健一郎 先天性造血不全—Shwachman-Diamond 症候群 第 52 回日本小児血液学会総会教育セッション 2010 年 12 月 17 日 大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊健一郎 (WATANABE KENICHIRO)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20324634

(2) 研究分担者

平家俊男 (HEIKE TOSHIO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90190173