

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 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591071

研究課題名（和文）iPS 細胞を利用した遺伝性血液疾患の遺伝子治療法開発

研究課題名（英文）Development of novel gene therapy for congenital blood disorders using induced pluripotent stem cells

研究代表者

菅野 仁 (KANNO HITOSHI)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70221207

研究成果の概要（和文）：

ピルビン酸キナーゼ(PK)異常症モデルマウスを用いて、iPS 細胞を利用した新規の遺伝子治療法を開発した。iPS 細胞から得た胚様体(EB)は赤芽球系細胞へ分化誘導が可能であった。*PKLR* 遺伝子の変異は iPS 細胞の樹立、EB への分化誘導が野生型と同様な効率で可能であり、造血幹細胞移植のソースとなると同時に PK 活性低下による赤芽球細胞死(無効造血)の病因解析のモデル細胞となり得ることが示された。

研究成果の概要（英文）：

We established an induced pluripotent stem (iPS) cells from murine model of red cell pyruvate kinase (R-PK) deficiency (*Pk-I^{slc}*). The iPS cells of *Pk-I^{slc}* could be differentiated into embryoid bodies (EB) and CD71-positive erythroblasts *in vitro*. Since *PKLR* gene expressed exclusively in mature erythroid cells, no harmful effect on stem cells as well as progenitor cells has been observed. The iPS cells of *Pk-I^{slc}* are useful for both hematopoietic stem cell transplantation and screening of novel therapeutic drugs for causative therapy of human PK deficiency associated with congenital hemolytic anemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：先天性溶血性貧血・動物モデル・造血幹細胞移植・赤血球酵素異常症・単一遺伝子疾患

1. 研究開始当初の背景

赤血球は核・ミトコンドリアを持たず、その生理機能維持に必要な ATP の 90%異常を解糖系に依存している。ピルビン酸キナーゼ (PK) 異常症は解糖系酵素異常症の中で最も頻度が高く、赤血球における活性低下は赤血球寿命の短縮を来たして溶血性貧血を発症する。重症例は子宮内胎児死亡や新生児死亡の原因となるが、輸血、脾臓摘出術などの対症療法以外に現在有効な治療法はない。

研究代表者らは 1990 年にヒト赤血球型 PK (R-PK) cDNA のクローニングを世界に先駆けて成功し (*PNAS* 88:8218-8221, 1991)、その後ヒト LR 型 PK 遺伝子の構造を明らかにして、遺伝子診断システムを確立した (*Biochem Biophys Res Commun* 188:516-23, 1992)。また 1995 年には PK 異常症モデルマウス (*Pk-I^{slc}*) を発見し、マウス *LRPK* 遺伝子解析の結果、R-PK の基質結合部位近傍に単一アミノ酸置換 (Gly388Asp) を同定した (*Blood* 86:3205-3210, 1995)。同型の野生型マウス (CBA-N) の骨髓を前処置なしに移植した場合、正常 R-PK 遺伝子を発現する赤芽球が選択的に増殖することを明らかにした (*Blood* 86:4323-4330, 1995)。

分担研究者らは 1994 年にレトロウイルスベクターを用いてヒト肝臓型 PK (L-PK) をマウス骨髓中の造血幹細胞 (*c-kit⁺, Lin⁻, Thy-1^{lo}*) へ遺伝子導入することに成功し、世界で初めて PK 異常症の遺伝子治療モデルを開発した (*Blood* 83:2305-2310, 1994)。

従来、PK 異常症では成熟赤血球の寿命短縮が病態の主体であると考えられていたが、研究代表者は *Pk-I^{slc}* から樹立したフレンド細胞株 (*Jpn J Cancer Res* 90:171-179, 1999)、輸血依存性の重症 PK 異常症患者 (*Am J Hematol* 73:68-72, 2003) 及び *Pk-I^{slc}* マウスにおいて赤芽球がアポトーシスを起こしていることを明らかにし R-PK 異常がアポトーシスを介して赤芽球系造血過程に影響していること、すなわち PK 異常症における貧血の一部は無効造血によることを解明した。

2. 研究の目的

マウスやイヌなどの PK 異常症モデル動物では造血幹細胞移植 (HSCT) が根治的治療となり得ることが示されているが、ヒトではドナー不足などの問題があり、PK 異常症に対する HSCT は国内外で各 1 例以外報告がない。致命的な合併症を併発することがあるため、遺伝性血液疾患の治療において HSCT は未だ標準的な治療法とはなり得ていない。今回我々は、PK 異常症モデルマウス繊維芽細胞から樹立した誘導型多能性幹細胞 (iPS 細胞) に

対してレンチウイルスベクターを用いて遺伝子治療を実施後、*in vitro* で造血幹細胞 (HSC) へ誘導した後に造血幹細胞移植のソースとなり得ることを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PK 異常症モデルマウスからの iPS 細胞株樹立

①マウス繊維芽細胞およびフィーダー細胞の準備: PK 異常症モデルマウス (*Pk-I^{slc}*) および同系の野生型マウス (CBA-N) から繊維芽細胞を得た。同時にフィーダー細胞として用いる SNL 細胞をゼラチンコートしたディッシュに播種し、80-90% confluent になるまで、37°C、5%CO₂ 存在下で培養した。SNL 細胞は使用前日に最終濃度 12 μg/mL マイトマイシン C で 2.5 時間処理した後、トリプシン/EDTA でディッシュから剥がし、細胞数をカウントした上で 5mL の SNL 培地で懸濁して、100mm ディッシュ 1 枚に対して 1×10⁶ 個播種した。

②パッケージング細胞の調整: PLAT-E 細胞をゼラチンコートしたディッシュに播種し、37°C、5%CO₂ 存在下で overnight 培養した。翌日、最終濃度 1 μg/mL プラスチジン S、10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む DMEM 培地に交換後、80-90% confluent になるまで 37°C、5%CO₂ 存在下で培養した。

③レトロウイルスによる PLAT-E 細胞への遺伝子導入: 4 本の 1.5mL マイクロ遠心チューブに 0.3mL の OPTI-MEM 培地を分注した。トランスフェクション用試薬 (Fugene6) を 27 μL 加えて混和後、室温で 5 分間孵置した。9 μg の pMXs プラスミド DNA4 種 (Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc) OPTI-MEM/Fugene6 混合液中にそれぞれ混合し、軽く攪拌後、それぞれ別の PLAT-E 細胞に加えた。

④レトロウイルスの感染: ③の処理の翌日、繊維芽細胞を 6well プレートの 1well に 1×10⁵ 個播種しておく。次の日に③で処理した PLAT-E 細胞の培養上清を回収し、0.45 μm のセルロースアセテートフィルターに通し、これをウイルス液とした。5 μL の 8mg/mL ポリブレン溶液をウイルス液に加えた後、4 種 (Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc) のウイルス液を等量混合し、前日に蒔き直した繊維芽細胞に加えて、37°C、5%CO₂ 存在下で overnight 培養した。

⑤SNL フィーダー細胞への再播種〜コロニー

の単離：レトロウイルス感染後4日目に、感染済み繊維芽細胞をトリプシン/EDTAでディッシュから剥がし、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ の細胞を100mmディッシュ1枚のSNLフィーダー細胞へ再播種した。翌日、培地をマウスES培地へ置換した。7日目から培地に最終濃度1.5 $\mu\text{g/mL}$ ピュロマイシンを加え、その後7日～14日間培養してコロニーを形成したら、目的のコロニーをトリプシン/EDTA内で懸濁し、その後SNLフィーダー細胞へ再播種した。

⑥iPS細胞の継代：ディッシュからトリプシン/EDTAで剥がしたiPS細胞は0.4mLのマウスES培地に懸濁し、6wellplateのSNLフィーダー細胞へ再播種し、1.5mLのES培地を加えて培養した。

(2) iPS細胞からの造血幹細胞の誘導

①iPS細胞をEB分化培地(IMDM, 200 $\mu\text{g/mL}$ ホロトランスフェリン、1%グルタミン、15%FBS、50 $\mu\text{g/mL}$ アスコルビン酸)に移し、37°C、5%CO₂で45分間培養した。先進分離でフィーダー細胞を除いた後、iPS細胞をEB分化培地で48時間培養した。形成される胚様体(embryoid body:EB)を15mLのコニカルチューブに移し、沈殿するEBを再度EB分化培地で懸濁し、更に4日間培養した。

②培養6日目にEBを回収し、コラゲナーゼIV (500mg)・ヒアウロニダーゼ(1g)・40,000 U DNaseを含むDMEMを250 μL 加えて、37°C、20分間孵置した。その後8mLのenzyme-free dissociation bufferを加えてから遠心し細胞を回収した。

③HOXB4-IRES-EGFPを含むプラスミドDNAとOPTI-MEM/Fugene6混合液を混合し、軽く攪拌後回収したEB由来細胞に加えた。最終濃度8 $\mu\text{g/mL}$ のポリブレン溶液をウイルス液に加えた後、OP9ストローマ細胞に加えて37°C、5%CO₂存在下で12-16時間培養した。

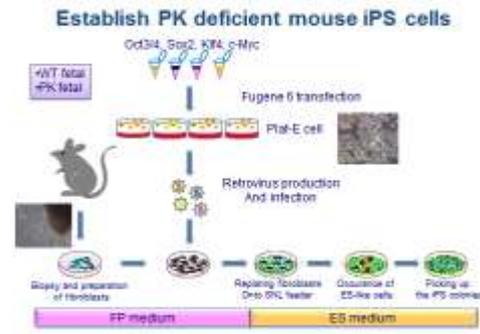
④細胞を回収し、サイトカイン混合液(100ng/mL Flt3L, 100ng/mL SCF, 40ng/mL TPO, 40ng/mL VEGF, 10ng/mL INF γ)を含むIMDMで培養を7日間継続した。

⑤培養後、各血球系への分化誘導状態を分化細胞表面マーカー抗体(抗CD4, CD8, CD5, Gr-1, Mac1, B220およびTER119抗体)を用いたFACS解析で確認した。

4. 研究成果

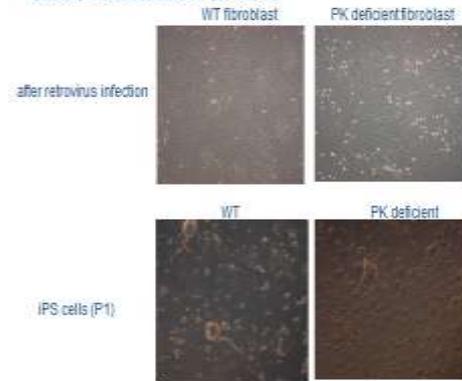
レトロウイルスを用いて、野生型マウス(CBA)胎児(WTF)、PK異常症モデルマウス胎児(PKF)より得られた繊維芽細胞に山中4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc)を導入し、iPS細胞

様のコロニーを得た(図1、2)。(図1)



(図2)

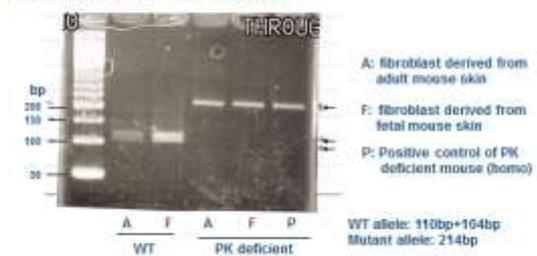
A comparison of fibroblast derived from WT and PK deficient mouse



iPS細胞誘導にあたり、野生型マウス、PK異常症モデルマウスより得られた線維芽細胞を用いて遺伝子タイピングを行い、ホモ欠失であることを確認した(図3)

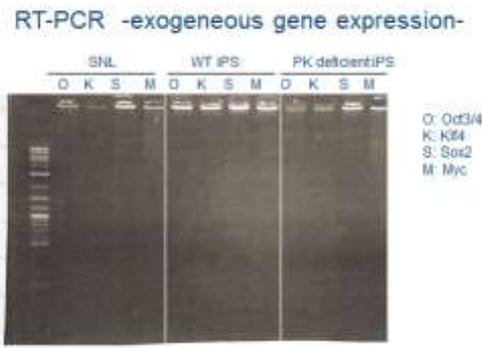
(図3)

PCR-RFLP of fibroblast derived from a WT and PK deficient mouse

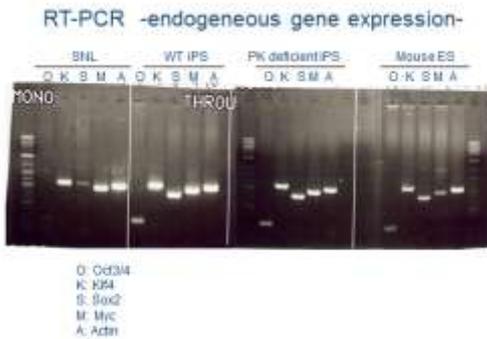


これらのコロニーはSSEA1、Nanog、アルカリフォスファターゼ陽性であり、レトロウイルス由来の外因性4因子の発現は消失しており(図4)、内在性遺伝子の発現が確認された(図5)。

(図4)



(図5)



また各種 ES 細胞マーカーの発現を確認し (図6)、テトラマ形成のためにこれらのコロニーを SCID マウス精巣に移植したところ奇形腫形成が確認された。



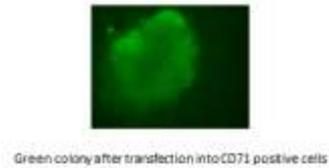
(図6)

次に WTF iPS 細胞を用いて分化誘導を行い、EB 形成 8-12 日目に OP9 細胞上に再播種し、mVEGF、mLGF II を含む分化誘導培地で 5 日間培養した。その後、mSCF、mLL-3、dexamethasone、hEPO を含む培地に置き換え 5 日間培養し、MACS beads を用いて CD71 陽性細胞を分取し、CD71 陽性細胞が 40-60% であることを確認した。

更に CD71 陽性細胞にマイクロプレート (MP-100, 100,000 cells/sample) にて遺伝子

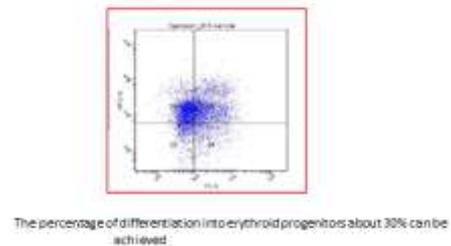
治療用ベクターをトランスフェクションし、OP9 細胞上 (レトロネクチンコート済) に播種し、5-7 日後 GFP 陽性細胞コロニー (図7) をピックアップし、mSCF、mLL-3、dexamethasone、hEPO、mLL-6、selenium を含む分化誘導培地に OP9 細胞と共に培養した。

(図7)



21 日後、CD71 陽性 ter119 陽性細胞の割合を FACS で確認し 30% であることを確認した (図8)。

(図8)



以上の結果から、次のことが推察できた。
1) *PKLR* 遺伝子異常を有する iPS 細胞の樹立過去の研究成果から、*PKLR* 遺伝子は肝臓・膵臓・腎臓に発現する L-PK、赤芽球系細胞にのみ発現する R-PK の二つのアイソザイムをコードしていること、すべての胎児組織および造血幹細胞には別の構造遺伝子である *PKM* がコードする M2 型アイソザイムが発現していることが明らかになっている。

今回の我々の研究により、少なくともマウスレベルでは *PKLR* 遺伝子の変異は iPS 細胞の樹立、造血幹細胞移植のソースとなる EB への分化誘導は野生型と同様な効率で可能であることが確認出来た。次の段階としては PK 異常症患者由来の線維芽細胞あるいは末梢血幹細胞・リンパ球などをソースとして iPS 細胞の樹立を試み、*in vitro* における EB への分化誘導が可能かどうかを確認する必

要があると考えられる。

2) PK 異常症モデルマウス由来赤芽球系細胞の分化誘導

PK 異常症モデルマウスから樹立した iPS 細胞は VEGF、IGF II、SCF、IL-3、dexamethasone そして EPO といった増殖因子・ホルモンの作用により *in vitro* で分化誘導が可能であることが明らかになった。この分化誘導系は我々が今までの研究で明らかにした R-PK 活性低下による赤芽球細胞死のメカニズムを検討するためのモデルとなり得ることが示唆された。研究代表者らは、以前 PK 異常症モデルマウスに対してフレンド細胞を感染させることにより確立した細胞株 (SLC3、SLC4) を用いて、これらの細胞株が酸化ストレス障害を受けやすく、アポトーシスにより細胞死を起こしていることを示した。今回の成果はフレンド細胞より更に R-PK 活性低下による赤芽球細胞死のメカニズムを正確に解析できるモデル細胞を得ることが可能になったことを示し、PK 異常症の無効造血を克服する新規治療薬のスクリーニングに役立つことが期待される。

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 12 件)

1) Akizawa Y, Kanno H, Kawamichi Y, Matsuda Y, Ohta H, Fujii H, Matsui H, Saito K. Enhanced expression of myogenic differentiation factors and skeletal muscle proteins in human amnion-derived cells via the forced expression of MYOD1, *Brain Dev*, 査読有, 35:349-355, 2013

2) Kanno H, Iribe T, Aoki T, Ogura H, Fujii H. Pyruvate supplementation enhanced vascular endothelial growth factor production by bone marrow-derived mononuclear cells.

Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy, 査読有, 58: 26-32, 2012

3) Shimojima K, Inoue T, et al. (12 人中 10 番目) Reduced PLP1 expression in induced pluripotent stem cells derived from a Pelizaeus-Merzbacher disease patient with a partial PLP1 duplication, *J Hum Genet*, 査読有, 57:580-586, 2012

4) Uchiyama T, Kanno H, Ishitani K, Fujii H, Ohta H, Matsui H, Kamatani N, Saito K, An SNP in CYP39A1 is associated with severe neutropenia induced by docetaxel. *Cancer Chemother Pharmacol*, 査読有, 69: 1617-1624, 2012

5) Kawabata H, Doisaki S, et al, (14 人中 9 番目) A case of congenital dyserythropoietic anemia type I in a Japanese adult with a CDAN1 gene mutation and an inappropriately low serum hepcidin-25 level. *Intern Med*, 査読有, 51: 917-920, 2012

6) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, et al. (25 人中 8 番目) Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia, *Blood*, 査読有, 119: , 2376-2384, 2012

7) 斎藤加代子、松尾真理、菅野 仁、浦野真理、相楽有規子、小児科領域における研究と治療の進歩-遺伝子医療, 東京女子医科大学雑誌, 査読有, 81:349-355, 2011

8) Tsuruta T, Aihara Y, Kanno H, Kiyotani C, Maebayashi K, Sakauchi M, Osawa M, Fujii H, Kubo O, Okada Y. High-dose chemotherapy followed by autologous and allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for recurrent disseminated trilateral retinoblastoma. *Childs Nerv Syst*, 査読有, 27:1019-1024, 2011

9) Tsuruta T, Aihara Y, Kanno H, Funase M, Murayama T, Osawa M, Fujii H, Kubo O, Okada Y. Shared molecular targets in pediatric gliomas and ependymomas. *Pediatr Blood Cancer*, 査読有, 57: 1117-1123. 2011,

10) 福島武春、斎藤加代子、菅野 仁、川島眞、肝付浩一郎、遺伝子情報管理の現状と展望 遺伝子検査結果の電子化. 日本遺伝カウンセリング学会誌、査読有、31: 131-135, 2010

11) 菅野 仁、斎藤加代子、遺伝情報管理の現状と展望 電子カルテによる遺伝子情報管理の実際. 日本遺伝カウンセリング学会誌、査読有 31: 127-129, 2010

12) Aihara Y, Tsuruta T, Kawamata T, Kanno H, Maebayashi K, Wada E, Osawa M, Fujii H, Kubo O, Hori T. Double high-dose chemotherapy followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation for primary disseminated medulloblastoma:a report of 3 cases. *J Pediatr Hematol Oncol*, 査読有, 32: e70-4, 2010

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) 菅野 仁、適正使用評価方法の問題点と血液製剤使用量を減少させるための方策. シンポジウム 2「輸血医療 Pros and Cons」III. 輸血管理料. 第 19 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、2012 年 11 月 16 日、岡山コンベンションセンター
- 2) 菅野 仁、濾過濃縮後腹水の安全性と有効性～血漿分画製剤としての視点から. 第 33 回日本アフェレシス学会学術大会 ランチオンセミナー 2、2012 年 11 月 9 日、長崎ハウステンボス
- 3) 菅野 仁、PGx 検査はどこまで医療に浸透したか～がん PGx の現状と本学会が果たすべき役割～. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 シンポジウム S1-4、2012 年 10 月 25 日
- 4) 菅野 仁、遺伝子情報管理：薬理遺伝学を含むゲノム診療体制の実際. 第 19 回日本遺伝子診療学会シンポジウム S2-03、2012 年 7 月 27 日
- 5) 菅野 仁、CART ろ過濃縮後保存の新技术について、第 7 回 CART 研究会 特別講演 I、第 17 回日本緩和医療学会学術大会、2012 年 6 月 22 日
- 6) 菅野 仁：先天性溶血性貧血. 第 56 回日本未熟児新生児学会 教育講演 15. 平成 2011 年 11 月 15 日
- 7) 菅野 仁、斎藤加代子：がん治療における PGx 検査と電子カルテによる遺伝子情報管理. 第 8 回全国遺伝子医療部門連絡会議 特別講演、2010 年 10 月 30 日
- 8) 菅野 仁、山本俊至、大賀正一、立石 浩、濱田貴子、槍澤大樹、小倉浩美、藤井寿一：Diamond Blackfan 貧血に関する新規の病因候補遺伝子同定. 第 72 回日本血液学会総会、2010 年 9 月 25 日
- 9) 菅野 仁、石谷 健、相崎 潤子、濱田 貴子、内山 智貴、浦野 真理、近藤 恵里、松井 英雄、藤井寿一、太田 博明、斎藤加代子：薬物トランスポーター遺伝子多型を用いた薬理遺伝学的検査～ドセタキセル投与における好中球減少症予測. 第 17 回日本遺伝子診療学会大会、2010 年 8 月 7 日
- 10) 菅野 仁、槍澤大樹、小倉浩美、濱田貴子、藤井寿一：免疫寛容導入療法におけるドナー、レシピエント細胞キメラ解析. 第 58 回日本輸血・細胞治療学会総会、2010 年 5 月 30 日

11) 菅野 仁、斎藤加代子：電子カルテによる遺伝子情報管理の実際. 第 34 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 シンポジウム 2、2010 年 5 月 29 日

〔図書〕(計 6 件)

- 1) 菅野 仁、II-4-1 造血機構、新版日本輸血・細胞治療学会認定医制度指定カリキュラム、日本輸血・細胞治療学会認定医制度指定カリキュラム委員会編、2012、pp. 47-49
 - 2) 菅野 仁、VI-3-16 腎疾患、新版日本輸血・細胞治療学会認定医制度指定カリキュラム、日本輸血・細胞治療学会認定医制度指定カリキュラム委員会編、2012、pp. 205-206
 - 3) 菅野 仁、XI-3-2 腎移植、新版日本輸血・細胞治療学会認定医制度指定カリキュラム、日本輸血・細胞治療学会認定医制度指定カリキュラム委員会編、2012、pp. 287-288
 - 4) 菅野 仁、XI-4-1 リンパ球免疫療法－養子免疫療法を含む、新版日本輸血・細胞治療学会認定医制度指定カリキュラム、日本輸血・細胞治療学会認定医制度指定カリキュラム委員会編、2012、pp. 291-293
 - 5) 菅野 仁、先天性溶血性貧血 血液専門医テキスト 日本血液学会編、南江堂、査読無、東京、2011、pp154-158
 - 6) 斎藤加代子、菅野 仁、福島武春、川島眞、院内・検査室における遺伝子情報の管理、Medical Technology(医歯薬出版株式会社)、40、2012、pp1464-1468
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
菅野 仁 (KANNO HITOSHI)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70221207
 - (2) 研究分担者
谷 憲三郎 (TANI KENZABURO)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号：00183864
 - (3) 連携研究者
藤井 寿一 (FUJII HISAICHI)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：70107762

 - 槍澤 大樹 (UTSUGISAWA TAIJYU)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：30337133