

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590660

研究課題名(和文)細胞外マトリックスを使用したヒト骨髓異形成症候群特異的 iPS 細胞長期培養系樹立

研究課題名(英文)Development of long-term culture system for human MDS specific iPS

研究代表者

半田 寛 (HANDA, HIROSHI)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90282409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：骨髓異形成症候群(MDS)は末梢血球減少と骨髓中造血細胞形態異常、染色体異常によって特徴づけられ、正常な造血が行われなくなる骨髓不全症と前白血病状態の二つの側面を持つ致死性の疾患である。本研究では、in vitroで再現困難なMDSのモデル作製を目的とし、cell free系である細胞外マトリックスを使用した疾患特異的iPS細胞の長期培養維持の基礎的検討を行った。同意を得て採取したMDS患者の骨髓細胞から単離したCD34陽性造血幹細胞分画にOCT-4, SOX-2, KLF-4, LIN28, NONOGの5つの遺伝子を導入、MDS-iPS細胞を作製したが、細胞維持・成長に成功しなかった。

研究成果の概要(英文)：Myelodysplastic syndrome (MDS) is the disease characterized by peripheral blood cytopenia, morphological abnormality of hematopoietic cells and chromosomal abnormality. MDS is also a lethal disease having two sides; bone marrow failure and pre-leukemia. In order to develop in vitro model system for MDS, we performed basic study to develop long term culture system of the disease specific iPS cell using cell free with extra-cellular matrix. Bone marrow specimens obtained from MDS patients after informed consent were separated and CD34 positive hematopoietic progenitor fraction was purified. Five transcription factors; OCT-4, SOX-2, KLF-4, LIN28, NANOG, were transfected to the purified hematopoietic progenitor cells to produce MDS-iPS, however we failed to maintain, grow and differentiate this iPS cells.

研究分野：医歯学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：iPS細胞 骨髓異形成症候群 細胞外マトリックス 長期培養

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (MDS) は、末梢血の 1~3 系統の血球減少と骨髄中の造血細胞形態異常、染色体異常によって特徴づけられる難治性造血器疾患である。MDS は、造血幹細胞の遺伝子に何らかの異常が発生し、正常な造血が行われなくなる骨髄不全症と白血病へ移行しうる前がん状態の二つの側面を持ち、ほとんどは造血不全か白血病への移行によって死に至る。白血病に移行した場合も *de novo* の白血病と異なり、抗がん剤治療抵抗性で予後不良である。染色体異常を認めない MDS においても何らかの遺伝子異常やエピジェネティックな異常を持つことが考えられており、実際にさまざまな異常が発見されているが、形態異常や既知の遺伝子異常を持たない MDS の診断はしばしば困難である。MDS がどのように遺伝子異常を蓄積させ、白血病に移行していくのかについてはいまだに不明の点が多い。MDS 造血幹細胞の *in vitro* での長期培養が非常に困難であり、MDS の病態を再現できる細胞株や動物モデルがほとんどないことも、その病態解明を送らせている理由の一つでもある。疾患モデル作製が困難であるため、有効な薬剤の開発も、*in vitro* での検討ができず、もっぱら患者プライマリー検体を用いて検討が行われている。

我々はこれまで、多数の MDS 患者において CD34 陽性細胞特に CD34 陽性 CD38 陰性の幹細胞分画でテロメラーゼ逆転写酵素の発現が増していることを示してきた (Leukemia Res 34:2010)。特に High risk MDS 患者でその発現量が増加していることを示したが (Hematologica 2010)、一人の患者において疾患進行とともに増加していくのかについては、明らかにできなかった。またそのプロセスについても、長期間の追跡とサンプリングをしない限りは明らかにすることは困難である。

生物医学研究においては、正常あるいは疾患における細胞のプロセスを明らかにするために細胞を *in vitro* で培養することが重要な位置を占めている。しかし今日使用されているほとんどの細胞株は癌細胞から取られたものであろうと、正常細胞を遺伝子操作することによって不死化させたものであろうとに関わらず、継代培養によって様々な遺伝子異常や epigenetic な異常を蓄積させている。また、ヒトから採取されたプライマリーな細胞の多くは *in vitro* では、ほとんど増殖せず限られた期間の寿命しかもっていないため、ヒトにおける発病メカニズムや発生に対する疑問に答えるための有用なモデルを提供しきれていない。

腫瘍を再現するモデルの場合、遺伝子操作したマウスや、ヒトのプライマリー細胞をマウスに植え込む系が使用されているが、マウスはヒトとは異なる遺伝子、代謝経路などを持っており、ヒトの疾患を完全に再現できるものばかりではない。

ヒト embryonic stem (ES)細胞は、胚より作製され不死化と多分化能を持つ万能細胞とも呼ばれる細胞である。ES 細胞は発生を忠実になぞることができ、*in vitro* でヒト発生やヒト疾患モデルを作成する可能性を持つ細胞である。しかし胚より作製されるため倫理的問題を持っている。また、さまざまなバリエーションを持つヒトの疾患を再現することは困難である。ヒト induced pluripotent stem (iPS)細胞は、Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc の 4 つの転写因子を皮膚線維芽細胞細胞に導入しリプログラミングすることにより、多分化能と不死性を持たせることに成功した、ES 細胞と同じ多能性幹細胞である。近年の iPS 細胞研究の発達により、これが疾患治療と疾患モデル作製に利用できる可能性が出てきている。Park らは Gaucher 病やダウン症の患者から採取した線維芽細胞から iPS 細胞を作製し疾患特異的な iPS 細胞を樹立している

(Cell 134: 877-, 2008)。さらに臍帯血や正常骨髄の CD34 陽性造血幹細胞、G-CSF によって動員された CD34 陽性末梢血幹細胞に遺伝子導入し iPS 細胞を作製することに成功している。骨髄増殖性疾患であり JAK2-V617F という特徴的な遺伝子異常を持つ真性多血症患者の末梢血循環 CD34 陽性造血前駆細胞から上記 4 つの転写因子を導入して作製された iPS 細胞が真性多血症と同じく赤血球系細胞の増加を示し、患者の持つ疾患と同じキャラクターを持つことが示され、慢性骨髄増殖性疾患の in vitro モデルを提供できることが示唆された (Blood 114: 5473-5480)。

ES 細胞、iPS 細胞を培養するには、通常 feeder cell や血清等を必要とするが、これらの要素は、免疫原性を持つことや、ウイルスあるいは細菌汚染の原因となり、血清や feeder cell の使用はそのロット間の差が時折実験結果に影響を与える。最近の研究により細胞外マトリックスである Laminin のうち Laminin-511 を feeder として使用することにより、cell free 系で長期の iPS 細胞維持が可能となることが示された (Nature Biotech 28: 611-, 2010)。MDS は人口の高齢化とともに増加しつつあり、その複雑な病態と治療抵抗性から今後の血液疾患治療研究において、重要な疾患と考えられる。論文化されたものとしては同様の研究はこれまでにはなく、臨床にも結び付けられ、今後の研究方向を決定できうる非常に有意義な研究と考えられる。

## 2 . 研究の目的

本研究では、in vitro で再現困難な骨髄異形成症候群 (MDS) のモデル作製を目的とし、cell free 系である細胞外マトリックスを使用した疾患特異的 iPS 細胞の長期培養維持の基礎的な検討を行う。樹立された iPS 細胞の薬剤に対する in vitro での反応性が治療効果を予測できるかの検討を行う。創薬の seeds となる物質や microRNA などの遺伝子、可能性

のある薬剤をこの細胞に投与し、in vitro のモデルを難治性造血器疾患に対する創薬を助けるツールとして使用可能かを検討する。

## 3 . 研究の方法

抗 CD34 抗体 StemSep CD34+ cell と FACS を用いて造血幹細胞分画を単離する。Oct-4, Sox-2, Klf-4, LIN28, NANOG の 5 つの転写因子遺伝子を 1 つの ORF に自己切断性 2A ペプチドを介してインフレームで融合したレトロウイルスベクターを Takara の Retrovirus Constructing System (レトロウイルス調整細胞 G3T-hi 細胞と RetroNectin) を用いて CD34 陽性造血幹細胞に遺伝子導入する。リプロセル社の霊長類 ES 細胞用培地と MEF フィーダー細胞を用いて、iPS 細胞の培養を行う。このスタートアップの際にはリプロセル社のヒト iPS 細胞培養スタートアップ支援サービスを使用し、スタートアップを確実に進行。同社のスタートアップ支援サービスは細胞の状態をチェックし必要な技術情報を提供することにより細胞の立ち上げを可能にするというものである。

Oct-4, Sox-2, Klf-4, NANOG の発現をリアルタイム RT-PCR およびウェスタンブロット法にて確認を行う。iPS 細胞の幹細胞マーカー発現プロファイルを明らかにするため、R & D 社の Proteome Profiler ヒト多能性幹細胞アレイキットを用いて解析を行う。

造血幹細胞由来の iPS 細胞が順調に継代培養できることを確認できたのち、フィーダー細胞である MEF 細胞を使用しない系の立ち上げを開始する。

フィーダーレス培地への移行と高純度リコンビナント Laminin-511 を使用した、幹細胞維持の系の作製を行う。これと同時に、同意を得た MDS 患者の骨髄細胞から抗 CD34 抗体 StemSep CD34+ cell と FACS を用いて造血幹細胞分画を単離する。Oct-4, Sox-2, Klf-4, LIN28, NANOG の 5 つの転写因子遺伝子を 1 つの ORF に自己切断性 2A ペプチドを介し

てインフレイムで融合したレトロウイルスベクターを Takara の Retrovirus Constructing System (レトロウイルス調整細胞 G3T-hi 細胞と RetroNectin) を用いて CD34 陽性造血幹細胞に遺伝子導入する。

リプロセル社の霊長類 ES 細胞用培地と MEF フィーダー細胞を用いて、疾患特異的 iPS 細胞の培養を行う。フィーダー細胞である MEF 細胞を使用しない系、フィーダーレス培地と高純度リコンビナント Laminin-511 を使用した、疾患特異的 iPS 細胞維持系の作製を行う。

培養した疾患特異的造血細胞 iPS 細胞がどのような形態的、遺伝子的特徴を持つか、またそれがもとの患者細胞と同じであるかについて、形態学的、細胞表面抗原解析および染色体、遺伝子検査などで検討を行う。

疾患モデルとなりうる事が確認できれば、MDS 治療薬、Azacytidine, Lenalidomide など in vitro で培養を行い、治療反応性予測モデルとなりうるかについて検討を行う。

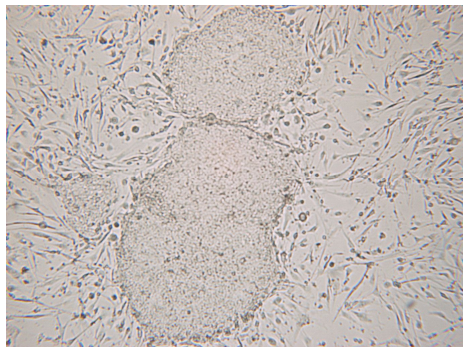
培養条件を変えることによって、多分化能を確認する。

#### 4. 研究成果

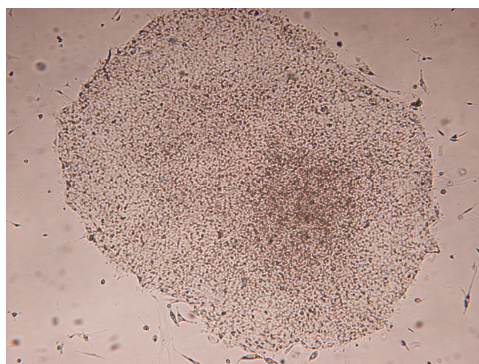
初年度においては、iPS 細胞のハンドリングを確実にするために、理化学研究所バイオリソースセンターより iPS 細胞を供与してもらい、iPS 細胞の保存と培養、さらにフィーダー細胞 MEF を使用せず細胞外マトリックス Laminin511 を用いて iPS 細胞の長期培養を行った。次に OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG の 5 つの転写因子をレトロウイルスベクターにて造血幹細胞に導入した。導入効率が悪く不安定であったため、iPS 細胞の作製・維持になかなか成功しなかった。ウイルスベクターをセンダイウイルスベクターなどに変更し、iPS 細胞と思われる形態の細胞の作製には成功した。iPS 細胞作製の技術自体が年々進歩しており、現在では episomal vector を

用いた作製法が iPS 研究所より提示されているため方法を変更した。MDS 患者より得られた造血幹細胞分画への転写因子導入も行った。

フィーダー細胞上の iPS 細胞



フィーダー細胞なしの iPS 細胞



次に血球への分化実験を施行し、MDS 疾患モデルを作製する予定であったが、この iPS 細胞の維持が著しく困難であり、成長、成熟させるところにまで至らず、幹細胞性確認のための実験にも使用できなかった。

その理由として考えられるのは、MDS 造血細胞に特有の遺伝子異常、特にスプライシングやエピジェネティクスに関わる遺伝子異常の蓄積による細胞成熟障害、細胞死誘導が原因ではないかと考えられた。慢性骨髄増殖性疾患である真性多血症のような疾患の場合は造血細胞に growth advantage があるため、増殖・維持が比較的楽にできると思われる。現在までのところ、MDS-iPS 細胞作製に近いものの報告としては RUNX1 遺伝子変異を持つ FPD/AML の iPS 細胞のみである。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

半田 寛 (HANDA HIROSHI)  
群馬大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：90282409

(2)研究分担者

村上 博和 (MURAKAMI HIROKAZU)  
群馬大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号：40166260

(3)連携研究者

( )

研究者番号：