

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23791154

研究課題名（和文）疾患 iPS 細胞を用いたヒト TPO/c-MPL の造血幹細胞制御機構の解明

研究課題名（英文）CAMT-iPS Cells Exhibiting Defective MPL Signaling Dysregulate hematopoiesis

研究代表者 高山 直也 ( NAOYA TAKAYAMA )

京都大学 iPS 細胞研究所・助教

研究者番号：10584229

## 研究成果の概要（和文）：

疾患特異的 iPS 細胞は、発症機序解明、創薬開発が期待されている。申請者らは、造血因子であるトロンボポイエチン (TPO) 受容体 c-MPL の遺伝子異常疾患 (CAMT; Congenital Amegakaryocytic Thrombocytopenia) 患者から iPS 細胞を樹立し、正常 c-MPL の発現を付加する系を用いて、ヒト TPO/c-MPL シグナルの造血前駆細胞の発生及び分化機構への関与を検証し、以下の点を明らかにした。1. CD34 陽性造血前駆細胞において、その細胞の維持、および増殖能に MPL シグナルが重要な役割を果たしている、2. MPL 欠損により CD34 陽性造血前駆細胞から、各種骨髓球系細胞への分化は障害されるが、巨核球/赤芽球共通前駆細胞段階での障害が顕著であり、この 2 系統への分化には必須である。これらは CAMT 患者の臨床経過を再現している、3. レトロウイルスベクターによる Wild type MPL の強制発現により遺伝子を修復した CAMT-iPS 細胞では、これら分化能の障害は一部改善され、疾患治療モデルとしての有効性を示す、4. 正常 MPL の強制発現による過剰な TPO/MPL シグナルにより、正常 iPS 細胞および CAMT-iPS 細胞の巨核球分化において、重要な機能分子一つであるフォンウィルファクターレセプター (GPIX、GPIIb など) の発現が低い未成熟な巨核球が一部産生され、機能の低い血小板が産生される。遺伝子治療の際には、正確な位置への相同組み換えなどを用いた厳格な MPL の発現コントロールが重要である

## 研究成果の概要（英文）：

Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT) is caused by the loss of thrombopoietin receptor (MPL)-mediated signaling, which causes severe pancytopenia leading to bone marrow failure with onset of thrombocytopenia and anemia prior to leukopenia. We used an in vitro disease tracing system with iPSCs derived from a CAMT patient (CAMT-iPSCs) and normal iPSCs to investigate the role of MPL signaling in hematopoiesis.

In this study, we found that

1) MPL signaling is essential for maintenance of the CD34<sup>+</sup> multipotent hematopoietic

progenitor (MPP) population and

2) for development of the CD41<sup>+</sup>Glycophorin-A (GPA)<sup>+</sup>megakaryocyte-erythrocyte progenitor (MEP) population

3) complementation of appropriate expression level of MPL into CAMT-iPSCs using a retroviral vector improved potential of MK and erythrocyte differentiation

4) excessive MPL expression led to aberrant megakaryopoiesis and generation of GPIIb and GPIV null platelets.

These results recapitulate the clinical course seen in CAMT-patients in vitro and suggest importance of appropriate gene complementation as cell therapy for CAMT-patients.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、小児血科学

キーワード：疾患特異的 iPS 細胞、CAMT、c-MPL、巨核球分化、赤血球分化

### 1. 研究開始当初の背景

Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT) は、トロンボポイエチン (TPO) のレセプターである MPL の遺伝的欠損でおきる、先天性な造血障害である。生下時からの血小板減少症、引き続いて起きる貧血、さらに後期には汎血球減少を示し、生後数年以内に致死的な経過をたどる。現在有効な治療法は骨髄移植だけであるが、ヒト白血球型抗原 (Human Leukocyte antigen; HLA) の一致した骨髄ドナー確保が極めて困難であり、自己の細胞を用いた遺伝子治療の確立が期待されている。MPL の遺伝子改変マウスモデルでは CAMT 患者のこれらの臨床経過を完全に再現することはできておらず、ヒト血液細胞を用いた MPL シグナルの解析、新たな遺伝子治療モデルの確立が重要である。

### 2. 研究の目的

疾患特異的 iPS 細胞の利点の一つは、試験管内で段階的に障害部位を検証可能なことである。CAMT 患者由来の iPS 細胞を用いて、病態を試験管内で詳細に再現し、病因を明らかにする。さらに最適な正常 MPL 遺伝子補完法 (遺伝子治療法) を検証する。

### 3. 研究の方法

CAMT 患者より皮膚線維芽細胞を提供をして頂き、レトロウイルスを用いた iPS 因子導入により、CAMT 疾患 iPS 細胞を樹立した。これまで確立してきた試験管内での多能性幹細胞からの血液分化法を用いて、CAMT-iPS 細胞と健常者皮膚線維芽細胞由来の iPS 細胞を分化させ、MPL 遺伝子欠損が影響する分化段階を詳細に解析した。さらにレトロウイルスベ

クターを用いた遺伝子補完法の有効性、問題点を検証した。

#### 4. 研究成果

疾患を試験管内で再現することで、多能性造血前駆細胞の維持および巨核球・赤血球共通前駆細胞への分化移行にMPLシグナルが必須であることを明らかにした。さらに遺伝子治療としてレトロウイルスベクターを用いた正常MPL補完法は、一部の造血障害を改善するが、その発現量が正確に制御されないと、異常な巨核球が産生されることを明らかにした。発現量を正確にコントロールする方法として、相同組み替えが最適と考えられ、今後有効性を確認をする必要がある。

#### 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6件)

1. Hirata S., Takayama N. (Corresponding author), Jono-Ohnishi R., Endo H., Nakamura S., Dohda T., Nishi M., Hamazaki Y., Ishii E., Kaneko S., Otsu M., Nakauchi H., Kunishima S., and Eto K. CAMT-iPS Cells Exhibiting Defective MPL Signaling Dysregulate Megakaryopoiesis and Erythropoiesis. *Journal of Clinical Investigation* 2013 (in press) 査読有
2. Ishimura T, Kaneko S, Kawana A, Tajima Y, Goto H, Zhu D, Nakayama K, Uemura Y, Takayama N., Yamada D, Nishimura K, Ohtaka M, Watanabe N, Takahashi S, Iwamoto A, Koseki H, Nakanishi M, Eto K, Nakauchi H. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell StemCell.*

12:114-126, 2013.

10.1016/j.stem.2012.11.002.

査読有

3. Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Miyagi S, Endoh M, Endo TA, Takayama N., Eto K, Toyoda T, Koseki H, Nakauchi H, Iwama A. Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood.* 121:447-458, 2012. 10.1182/blood-2012-05-431403. 査読有
4. Kajiwar M, Aoi T, Okita K, Takahashi R, Inoue H, Takayama N., Endo H, Eto K, Toguchida J, Uemoto S, Yamanaka S. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:12538-12543. doi: 10.1073/pnas.1209979109. 査読有
5. Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N., Otsu M, Nagae G, Ueda K, Nakazaki K, Kamikubo Y, Eto K, Aburatani H, Nakauchi H, Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood.* 119:6234-6242, 2012. doi: 10.1182/blood-2011-07-367441. 査読有
6. Takayama N., Eto K. Pluripotent stem cells reveal the developmental biology of human megakaryocytes and

provide a source of platelets for  
clinical application. *Cell Mol Life*  
Sci. 69: 3419- 3428, 2012

10.1007/ s00018- 012- 0995- 4.

査読有

## 6. 研究組織

(1) 高山 直也 ( NAOYA TAKAYAMA )

京都大学 iPS 細胞研究所・助教

研究者番号：1 0 5 8 4 2 2 9