

## 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 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012

課題番号：24659489

研究課題名（和文）先天性骨髄不全症候群 iPS 細胞による白血病発症の分子基盤の解明と発症予防法の開発

研究課題名（英文）Investigation into the molecular mechanisms for the occurrence of leukemia using iPS cells derived from congenital bone marrow failure syndrome and establishment of the methods to prevent its occurrence

研究代表者

辻 浩一郎 (TSUJI KOHICHIRO)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：50179991

研究成果の概要（和文）：先天性骨髄不全症候群のひとつである重症先天性好中球減少症(SCN)患者体細胞から iPS 細胞(SCN-iPS 細胞)を樹立した。SCN-iPS 細胞由来骨髄球系細胞は前骨髄球段階で成熟障害をきたし、SCN の病態をよく再現した。SCN-iPS 細胞由来骨髄球系細胞では Wnt3a/ $\beta$ -catenin 経路関連遺伝子発現が低下しており、Wnt3a は SCN-iPS 細胞由来骨髄球系細胞の成熟障害を改善した。以上の結果は、SCN における骨髄球系細胞の成熟障害には Wnt3a/ $\beta$ -catenin 経路の障害が関与しており、本経路を活性化することは SCN 治療となる可能性が示した。SCN-iPS 細胞は、SCN における白血病発症機構の解明、発症予防法の開発に有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We established iPS cells from somatic cells of a patient with severe congenital neutropenia (SCN), one of congenital bone marrow failure syndrome (SCN-iPS cells). Myeloid cells derived from SCN-iPS cells revealed the maturation arrest at a promyelocyte stage, reflecting the symptom of SCN patients. The gene expression analysis showed the decreased expression of Wnt3a/ $\beta$ -catenin pathway-related genes, and exogenous Wnt3a induced the improvement in the maturation arrest of SCN-iPS cell-derived myeloid cells. These results indicated the involvement of impaired Wnt3a/ $\beta$ -catenin pathway in the maturation arrest of myeloid cells in SCN patients and the possibility of novel therapies by activating the pathway. In addition, SCN-iPS cells were expected to be useful for the investigation into the mechanisms causing the occurrence of leukemia and the establishment of the methods to prevent it in SCN.

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	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・小児科学

キーワード：小児血液学、iPS 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1)重症先天性好中球減少症 (SCN)、Fanconi 貧血、Diamond-Blackfan 症候群、Shwachman-Diamond 症候群などの先天性骨髄不全症候群 (CBMFS) は、小児に特有の骨髄不全症で、CBMFS の患者は急性骨髄性白血病 (AML) を非常に高率に発症する。これは、先天的に有する遺伝子異常を背景として、付加的遺伝子異常が発生することによって、AML が発症するためと考えられるが、その発症のメカニズムはほとんど解明されておらず、そのため発症予防法も確立していない。

(2)一方、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、皮膚繊維芽細胞などの体細胞から樹立される、胚性幹細胞 (ES 細胞) と同質の性状を有する多能性幹細胞である。特に、ヒト iPS 細胞の樹立法が開発されたことにより、種々の疾患患者の体細胞から iPS 細胞を樹立し、それらの疾患特異的 iPS 細胞からその疾患の主座となる細胞を分化誘導することにより、その疾患の発生過程を再現し、その病態を解析することが可能となった。

(3)我々は、これまでにヒト ES 細胞から造血/血液細胞を分化誘導することに成功した。また、このヒト ES 細胞の分化誘導法を応用して、ヒト iPS 細胞から造血/血液細胞を分化誘導することも可能となった。さらに、我々はヒト末梢血からの iPS 細胞樹立法も確立した。そこで、これら技術を融合して、CBMFS における AML の発症メカニズムを解明し、その発症予防法を開発することを着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、SCN、Fanconi 貧血などの CBMFS 患者体細胞から iPS 細胞を樹立し、これらの CBMFS 患者 iPS 細胞から造血/血液細胞へ分化誘導することにより、種々の CBMFS の発生メカニズムの分子基盤を明らかにし、これを標的とする CBMFS における治療法を開発することにより、SCN における AML の発症機序とその予防法の開発に資する。

## 3. 研究の方法

(1)SCN 患者骨髄細胞由来 iPS 細胞の樹立  
まず SCN 患者骨髄細胞からストローマ細胞を培養した。その SCN 患者骨髄細胞由来ストローマ細胞に、レトロウイルスベクターを用いて Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 遺伝子を導入することにより iPS 細胞の樹立を試みた。樹立された SCN-iPS 細胞クローンについては、免疫染色により未分化マーカーの発現、RT-PCR 法により導入遺伝子のサイレンシン

グ、免疫不全マウスへの移植による奇形種形成により多分化能を確認した。また、樹立された iPS 細胞の遺伝子解析を行い、ドナーとなった SCN 患者と同じ ELANE 遺伝子変異を有しているかどうかを検討した。

(2)SCN-iPS 細胞から造血細胞への分化誘導  
SCN-iPS 細胞および健常人由来 iPS 細胞をマウス胎仔 AGM 領域由来ストローマ細胞 (AGM-S3 細胞) と共培養することにより、造血細胞へ分化誘導した後、ビーズ法により CD34 陽性細胞に分画した。

(3)SCN-iPS 細胞由来造血細胞の分化増殖能の検討

SCN-iPS 細胞由来 CD34+細胞の分化増殖能を血液コロニー培養法および液体培養法を用いて、健常人由来 iPS 細胞のそれと検討した。

(4)SCN-iPS 細胞由来造血細胞における遺伝子発現の検討

液体培養にて骨髄球系細胞に分化誘導された SCN-iPS 細胞および健常人 iPS 細胞由来造血細胞における遺伝子発現を、網羅的に解析した後、その解析結果を RT-PCR 法で確認した。

(5)Wnt3a の SCN-iPS 細胞由来造血細胞から骨髄球系細胞への分化に及ぼす影響の検討  
SCN-iPS 細胞由来 CD34+細胞の液体培養による分化誘導系に Wnt3a を添加することにより、その骨髄球系細胞の分化増殖に及ぼす影響を検討した。

## 4. 研究成果

(1)SCN 患者骨髄細胞由来 iPS 細胞の樹立  
SCN 患者骨髄細胞由来ストローマ細胞に、レトロウイルスベクターを用いて Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 遺伝子を導入することにより iPS 細胞 (SCN-iPS 細胞) を樹立した。樹立された SCN-iPS 細胞クローンのうち 3 クローンを選択し、iPS 細胞であることを確認した。その結果、免疫染色により、Nanog、Sox2 などの未分化マーカーを発現していること、RT-PCR 法により導入遺伝子のサイレンシングが認められたこと、免疫不全マウスへの移植により 3 胚葉からなる奇形種が形成されたことより、確かに iPS 細胞が樹立されたことが確認された。また、樹立された iPS 細胞は、3 クローンともドナー患者と同じ ELANE 遺伝子変異を有していたことより、SCN 患者由来の iPS 細胞 (SCN-iPS 細胞) が樹立されたと考えられた。

(2)SCN-iPS 細胞から造血細胞への分化誘導  
SCN-iPS 細胞および健常人由来 iPS 細胞をマ

ウス胎仔 AGM 領域由来ストローマ細胞 (AGM-S3 細胞) と 12-14 日共培養すると、いずれの iPS 細胞からも造血細胞が分化誘導された。そこで、ビーズ法により、分化誘導された iPS 細胞から CD34 陽性細胞に分画した。

### (3) SCN-iPS 細胞由来造血細胞の分化増殖能の検討

SCN-iPS 細胞および健常人由来 CD34+細胞を血液コロニー培養すると、赤血球系コロニーおよび混合コロニー形成能に両者に大きな差は認められなかったが、骨髓球系コロニー形成は、SCN-iPS 細胞由来 CD34+細胞のそれは健常人 iPS 細胞由来 CD34+細胞と比較して著しく減少しており、特に好中球造血はほとんど認められなかった。

また、液体培養でも、健常人 iPS 細胞由来 CD34+細胞は少なくとも 4 週間は著明に増殖し続けたが、SCN-iPS 細胞由来 CD34+細胞はほとんど増殖しなかった。また、液体培養 26 日目の培養細胞を比較検討してみると、健常人 iPS 細胞由来の CD34+細胞では多数の成熟好中球が認められたが、SCN-iPS 細胞由来 CD34+細胞ではほとんど成熟した好中球は認められなかった。

以上の結果は、我々の樹立した SCN-iPS 細胞は、SCN 患者の病態をよく反映していると考えられた。

### (4) SCN-iPS 細胞由来造血細胞における遺伝子発現の検討

液体培養にて 2 日間分化誘導された SCN-iPS 細胞 CD34+細胞における遺伝子発現を網羅的に解析したところ、健常人 iPS 細胞由来 CD34+細胞と比較して、Wnt3a/ $\beta$ -catenin 経路に関連する遺伝子の発現が著明に低下していた。このことは、RT-PCR 法でも確認することができた。

(5) Wnt3a の SCN-iPS 細胞由来造血細胞から骨髓球系細胞への分化に及ぼす影響の検討  
SCN-iPS 細胞由来 CD34+細胞の液体培養による分化誘導系に Wnt3a を添加することにより、分化誘導された SCN-iPS 細胞由来 CD34+細胞の Wnt3a/ $\beta$ -catenin 経路の活性化をこころみた。その結果、骨髓球系細胞の成熟障害が改善され、成熟した好中球が分化誘導された。

### (6) 考察

以上の結果から、我々の樹立した SCN-iPS 細胞は、SCN 患者の病態をよく再現していることが示された。また、SCN における骨髓球系細胞の成熟障害には Wnt3a/ $\beta$ -catenin 経路の障害が関与しており、本経路を活性化することは SCN 治療に効果的である可能性が示された。今後、我々の樹立した SCN-iPS 細胞を用いて、SCN における AML 発症の分子基盤を

明らかにし、これを標的とする AML の発症予防法が開発されることが期待される。

### 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 10 件)

- (1) Hiramoto T, et al. Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 査読有、in press 2013 DOI: 10.1073/pnas.1217039110
- (2) Ebihara Y, et al. Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of hemophilic arthropathy. Haemophilia 査読有、19 巻、2013、e84-e102 DOI:10.1111/hae.12056
- (3) Lin HT, et al. Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 査読有、368(1609)巻、2013、20110334、DOI:10.1098/rstb.2011.0334.
- (4) Kunishima S, et al. ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia. Am J Hum Genet. 査読有、92(3)巻、2013、431-438 DOI:10.1016/j.ajhg.2013.01.015.
- (5) Ebihara Y, et al. Generation of red blood cells from human embryonic/induced pluripotent stem cells for blood transfusion. Int J Hematol. 査読有、95 巻、2012、610-616. DOI:10.1007/s12185-012-1107-9
- (6) Yamamoto S, et al. Acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1 fusion in an adult male with Down syndrome. Acta Haematol 査読有、128 巻、2012、242-243 DOI: 10.1159/000340049
- (7) Nishimura S, et al. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. Blood. 査読有、119(8)巻、2012、e45-56、DOI:10.1182/blood-2011-09-381400
- (8) Nakanishi M, et al. Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine.

- Curr Gene Ther. 査読有、12(5)巻、2012、410-416  
DOI:http://dx.doi.org/10.2174/156652312802762518
- (9) Kumano K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. Blood. 査読有、119(26)巻、2012、6234-6242.  
DOI:10.1182/blood-2011-07-367441
- (10) Baba Y, et al. In vitro cell subtype-specific transduction of adeno-associated virus in mouse and marmoset retinal explant culture. Biochimie. 査読有、94(12)巻、2012、2716-2722、  
DOI : 10.1016/j.biochi.2012.08.010.

〔学会発表〕(計 16 件)

- (1) 海老原康博、他 同種骨髄移植後に発症した air leak syndrome の 2 例 第 35 回日本造血細胞移植学会総会 2013 年 3 月 7-9 日 金沢
- (2) 大津 真 もっと知りたい iPS 細胞 第 31 回市民公開医療懇談会 2013 年 2 月 27 日 東京
- (3) Makoto Otsu leiotropic nature of hematopoietic stem cell responses to an inflammatory niche environment. The 2nd Joint Global COE Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE, The Univ of Tokyo and Chiba Univ Global COE. 2013 年 1 月 28 日 東京
- (4) M. Otsu et al. Protection of hematopoietic stem cells from stress-induced functional impairment by very low-dose interleukin-1 stimulation. European Society of Gene & Cell Therapy 20th Anniversary Congress with the SFTCG. 2012 年 12 月 25 日-29 日 Paris, France
- (5) Masatoshi Sakurai, et al. Impaired Hematopoietic Differentiation of iPSCs Derived From Patients with FPD/AML ASH meeting 2012 年 12 月 6-11 日 Atlanta, U. S. A
- (6) 山本将平、他 治療抵抗性 8q11 骨髄増殖症候群の 1 例 第 54 回日本小児血液・がん学会 2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日 横浜
- (7) Shohei Yamamoto, et al. Refractory 8p11 myeloproliferative syndrome : a case report 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 18-20 日 京都
- (8) Masatoshi Sakurai, et al. Impaired hematopoietic differentiation of iPSCs derived from a patient with FPD/AML 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 18-20 日 京都
- (9) Yuichiro Nakata, et al. Acquired expression of c-Cbl Q367P mutation induces myeloid cell proliferation 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 18-20 日 京都
- (10) Akiko Nagamachi, et al. A20, a ubiquitin-modifying enzyme for NF-kappaB, plays an important role in normal hematopoiesis 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 18-20 日 京都
- (11) 海老原康博、他同種骨髄移植後に発症した air leak syndrome の 2 例 第 45 回日本小児呼吸器疾患科学会 2012 年 9 月 28-29 日 旭川
- (12) 平本貴史、他 重症先天性好中球減少症患者由来 iPS 細胞の遺伝子発現の検討 重症先天性好中球減少症患者由来 iPS 細胞の樹立とその解析 : 第 2 報 第 33 回日本炎症・再生医学会 2012 年 7 月 5-6 日 福岡
- (13) Takafumi Hiramoto, et al. Suppressed neutrophil development in hematopoiesis of induced pluripotent stem cells derived from a severe congenital neutropenia patient with ELA2 mutation. 東大生命科学シンポジウム 2012 年 6 月 30 日 東京
- (14) Takafumi Hiramoto, et al. Suppressed neutrophil development in hematopoiesis of induced pluripotent stem cells derived from a severe congenital neutropenia patient with ELA2 mutation. ISSCR meeting 2012 年 6 月 13-16 日 横浜
- (15) Lin HT, et al. In vitro modeling of neutrophil development and function using iPSCs: clinical values in understanding the pathophysiology and applications in the treatment of chronic granulomatous disease. ISSCR annual meeting 2012 年 6 月 13 日-16 日 横浜
- (16) 海老原康博、他 重症先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞の樹立とその解析 第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4 月 20-22 日 福岡

〔図書〕(計 4 件)

- (1) 辻浩一郎 医学書院 臍帯血移植の基礎と臨床 2013 印刷中
- (2) 大津真 診断と治療社 小児科診療: 遺伝子治療. -特集: 知っておきたい最新の免疫不全症分類-診断から治療まで

- 2013 vol. 76、No. 3、 481-486
- (3) 大津真 東京医学社 小児内科:夢の万能細胞 iPS 細胞の臨床応用への道-遺伝病を中心に。-特集:ここまで治せるようになった先天代謝異常症 2012  
vol. 44、No. 10、1697-1702
- (4) 大津真 日本臨床 -造血器腫瘍学-基礎と臨床の最新研究動向-ES/iPS 細胞技術と造血幹細胞移植. 2012 vol. 70、増刊号 2、146-150

[その他]

ホームページ等

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞プロセッシング分野

<http://stemcell-u-tokyo.org/scp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

辻 浩一郎 (TSUJI KOHICHIRO)  
東京大学・医科学研究所・准教授  
研究者番号: 50179991

### (2) 研究分担者

海老原 康博 (EBIHARA YASUHIRO)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号: 40302608

研究分担者

望月 慎史 (MOCHIZUKI SHINJI)  
東京大学・医科学研究所・特任助教  
研究者番号: 90349473

研究分担者

大津 真 (OHTSU MAKOTO)  
東京大学・医科学研究所・特任准教授  
研究者番号: 30361330