

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860785

研究課題名(和文)発作性夜間色素性尿症型血球からのiPS細胞樹立及び骨髄造血不全疾患への応用

研究課題名(英文) Establishment of the iPS cells derived from the paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone cells and its application to a study of bone marrow failure.

研究代表者

渡谷 久美(中崎久美)(Watadani, Kumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70550432

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):発作性夜間色素性尿症(PNH)などの骨髄造血不全疾患では、疾患細胞由来iPS細胞樹立は現時点では難しい。本研究では、PNH疾患細胞からiPS細胞の効率的な樹立方法を検討し、造血系に分化誘導したiPS細胞を用いて病態解明を進めることを目的とした。古典型PNH症例の骨髄・末梢血中のCD55陰性・CD59陰性のPNH血球からセンダイウィルス・エピゾーマルベクターを用いたリプログラミングによるiPS細胞樹立を目指した。

研究成果の概要(英文): Establishment of induced pluripotent stem (iPS) cells derived from the affected cells of bone marrow failure including paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is under investigation now. The object of this study is to establish the disease-specific iPS cells derived from PNH clone cells effectively and to promote elucidating the etiology of the disease by analyzing the hematopoietic cells differentiated from the iPS cells. We conducted trying induce iPS cells by reprogramming the PNH clone cells with CD55 negative and CD 59 negative populations of the bone marrow or the peripheral blood of classical PNH cases by use of Sendai virus vectors and non-viral episomal vectors.

研究分野：血液内科

キーワード：発作性夜間色素性尿症 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

2007年、ヒト線維芽細胞由来の多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立方法が報告された。これ以降、特に遺伝性疾患においては、体細胞由来のiPS細胞を樹立し、神経や網膜、肝細胞等に細胞分化誘導を行ない、iPS細胞による疾患モデルを作ることによって、病態解明、治療方法の検討が多数なされている。その一方、後天性の造血器疾患由来のiPS細胞の樹立例の報告は少数であり、樹立にさらに工夫が必要であると推測される。

発作性夜間色素性尿症(PNH)は、造血幹細胞の後天的体細胞突然変異により、補体による血管内溶血が起こる希少血液疾患であり、汎血球減少、血栓症、腎障害、肺高血圧を合併し、白血病化リスクを伴う、予後不良の疾患である。日本では欧米に比べ、汎血球減少に進行する割合が高い。現在唯一の根治的治療は造血幹細胞移植であり、そのほか、ステロイドや免疫抑制剤、2011年には抗補体C5モノクローナル抗体が認可されたが、反応例も長期投与が必要である。全例にPIG-A遺伝子異常が検出され、また複数箇所の変異を持つ例も16%あり、オリゴクローナルな疾患であると推測される。これは、PIG-A遺伝子欠損モデルマウスがこの遺伝子異常だけでは発症しなかったことに合致する。PNHクローンの拡大機序(clonal expansion)として多段階説が考えられ、HMGA-2遺伝子など関連が示唆される候補があるが、十分には明らかではない。本研究では、PNH血球からのiPS細胞樹立により、疾患モデル系作成とクローン拡大機序の解明を目指す。また将来の遺伝子治療の可能性を検討する目的で、PIG-A遺伝子のgene correctionを行なうことを目指す。

PNHではPIG-A遺伝子異常により、赤

血球のみならず全系統の造血器細胞上に分布する一群のglycosylphosphatidylinositol(GPI)アンカー型蛋白が欠落し、中でも、補体活性化・制御に関わるCD55/59の欠損により、溶血が起きる。このCD55-/59-のPNH型血球は、骨髄造血不全を示す、再生不良性貧血(AA)の多くや骨髄異形成症候群(MDS)の一部にも検出され(微少PNH型血球)、また実際に臨床経過中も、PNHはMDSやAAと相互移行がしばしばみられる。しかし細胞数の少なさから、この微少PNH型血球の解析はこれまで困難であった。

本研究ではPNH血球由来のiPS細胞の樹立とその解析を通じ、PNHの更なる病態解明と治療法開発への寄与、更には骨髄造血不全疾患に検出される微少PNH型血球からのiPS細胞樹立を目標とする。

2. 研究の目的

PNH疾患細胞からiPS細胞を樹立する。これまでの経験から、PNH型血球からiPS細胞を作る際に、ヒト線維芽細胞からの樹立に比べ作成効率が悪いことも予想されるので、効率化の工夫をする。樹立が確認されたiPS細胞について、造血細胞へ分化誘導を行ない、PIG-A遺伝子異常の評価、CD55/59を含むGPIアンカー蛋白発現の欠損を確認する。

PNH型血球由来の細胞が樹立することができた場合、これを利用して、PNHクローン拡大を促進する可能性があるPIG-A遺伝子以外の付加的異常についても検索する。

またPNH型血球由来細胞について探求した方法を利用し、微少PNH型血球細胞からiPS細胞作成を目指す。

3. 研究の方法

PNH 臨床症例の骨髓血あるいは末梢血検体から、CD55-/ 59- の PNH 型血球細胞を選択し、PNH 型血球由来の iPS 細胞を樹立する。この時効率的な樹立方法を検討する。PNH は希少疾患であり臨床検体入手の問題や、また将来 AA や MDS の微少 PNH 型血球からの iPS 細胞樹立に応用することを鑑み、骨髓細胞由来だけでは十分なく、末梢血からの樹立を目指した。

PNH 症例の骨髓検体を用いて CD34 陽性 PNH 細胞及び CD13 陽性 CD55 陰性 CD59 陰性細胞の単球系 PNH 細胞をフローサイトメトリーで sorting を行った。また PNH 症例の末梢血からは単核球分離を行ない、単球分画の CD13 陽性・CD55 陰性分画を選択した。前培養は 2 日間 SCF、IL3、GM-CSF、TPO 添加して行い、5%O₂ 低酸素培養条件でブチル酸、ロックインヒビターなどの小分子化合物を付加した。

リプログラミングの方法として、センダイウイルスベクター(Cell Stem Cell. 7:11-14, 2010)による樹立方法やエピゾーマルベクター(Oct4, Sox2, KLF4, L-myc, Nanog, Lin28, shp53)を用いた方法(Nature Methods. 8:409-12, 2011)が報告されている。採取された CD34 陽性 PNH 細胞及び CD13 陽性 CD55 陰性 CD59 陰性 PNH 細胞にそれぞれの方法でリプログラミングを施行した。

エピゾーマルベクターは、京都大学 iPS 細胞研究所 CiRA より入手した。またセンダイウイルスベクターは、CytoTune®-iPS 2.0 を使用した。

本研究は東京大学医学部医学科血液・腫瘍病態学講座研究室にて行った。

臨床検体からの iPS 細胞樹立については、東京大学医学部の設置する倫理委員会に研究の申請を行ない、承認を得ており(承認番号 2771) 骨髓血・末梢血の提供者からは文書にて同意を取得した。

4. 研究成果

古典的 PNH 患者の骨髓血及び末梢血からの多能性幹細胞(iPS 細胞)の樹立を試みた。本研究者は、正常骨髓中の造血幹細胞から、レトロウイルス及びセンダイウイルスを用いて iPS 細胞の樹立を確立している。まず、PNH 患者の骨髓中細胞の前培養を行った。その後、センダイウイルスの Oct4, Sox2, KLF4, L-myc, Nanog, Lin28, Glis1 を遺伝子導入し、iPS を作成した。免疫染色で SSEA4、Tra1-60 陽性であり、stem cell gene の発現も確認した。疾患特有の性質を保持しているか確認するため、10T1/2 の共培養系による血球分化を行った。しかし、iPS から誘導された CD34 陽性細胞は、CD55 陽性 CD59 陽性であり、樹立された iPS は、PNH クローンではなく、正常クローンと考えられた。これまで、疾患由来 iPS を樹立する際に、レトロウイルスやセンダイウイルスで iPS 化を行うと、疾患細胞からは非常に効率が悪く、正常クローンのみ樹立されることが他の血液疾患においても認められた。

PNH 細胞のリプログラミングを改善するため、エピゾーマルベクター(Oct4, Sox2, KLF4, L-myc, Nanog, Lin28, shp53)を用いて iPS の樹立を行っている。また、正常の末梢血単核球からのエピゾーマルベクターを用いた樹立系も確立したため、26 年度は、PNH 患者の末梢血単核球の CD13 陽性 CD55 陰性 CD59 陰性細胞に対して、エピゾーマルベクターを用いて iPS の樹立を施行した。しかしながら、CD13 陽性 CD55 陰性 CD59 陰性の PNH 細胞

から iPS 様のコロニーを樹立することは出来なかった。CD55 陰性 CD59 陰性細胞分画の CD34 陽性 PNH 細胞においても iPS 様のコロニーを樹立することは出来なかった。

これらのことから、従来の山中 4 因子 (Oct4、Sox2、KLF4、c-myc) や Oct4、Sox2、KLF4、L-myc、Nanog、Lin28、shp53、Glis1 などではリプログラミングが難しい因子が PNH 細胞にあると考えられる。今後は、PNH 細胞に特異的な *PIG-A* 遺伝子の変異を正常細胞由来の iPS 細胞に導入することによって、PNH-iPS 細胞の作成を検討している。

[謝辞] 京都大学 iPS 細胞研究所 CiRA 中畑龍俊先生、江藤浩之先生、東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター中内啓光先生、大津真先生に感謝申し上げます。

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 件)

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.u-tokyo-hemat.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
渡谷 久美 (Watadani Kumi)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70550432

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：