

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860474

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた顆粒球輸血療法確立を目指した科学的基盤形成

研究課題名(英文) Establishment of scientific basis for iPS cell-derived granulocyte transfusion strategy

研究代表者

吉見 昭秀 (Yoshimi, Akihide)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80609016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：がんに対する化学療法・移植療法施行時には白血球(顆粒球)が減少し、重症感染症をきたす危険が極めて高く、治療成績を左右する。このような状況下においては、新たな対策が必要とされており、顆粒球輸血はその一つの有力な候補である。しかしながら、臨床的効果を得るには連日の輸血が必要と考えられており、ドナーの負担やリスクの点から広く臨床応用には至っていない。今回我々はiPS細胞に様々な遺伝子導入あるいは薬剤を添加することによって、ドナー負担のないiPS細胞に由来する顆粒球の作成に成功した。また、これらの顆粒球を無限に採取する方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：When the patients with cancer receive chemotherapies, white blood cells usually decrease and they have high risk for severe infection, which affect the treatment outcome. We need to have some novel strategies against this problem and granulocyte transfusion therapy is one of the excellent candidates to solve the issue. However, it is currently not widely used in the clinical setting because of physical and psychologic burdens and risk of donors. We developed a novel strategy to limitlessly obtain iPS cell-derived granulocytes by combining several gene transduction and cytokines for iPS cells.

研究分野：血液・腫瘍

キーワード：iPS細胞 顆粒球輸注 顆粒球輸血 サイトカイン がん 化学療法

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍に対する化学療法・造血幹細胞移植施行時、あるいは固形がんに対する化学療法施行時の長期間の高度好中球減少は、重症細菌感染症・深部真菌感染症をきたす危険が極めて高い。最近の抗菌薬や抗真菌薬の進歩、G-CSFの投与にもかかわらず、高度好中球減少期の感染症はコントロール困難であり、予後を左右する。このような状況下においては、好中球減少期の重症感染症に対して新たな対策が必要とされており、顆粒球輸血 (granulocyte transfusion ; 以降GTX) はその一つの有力な候補である。しかしながら、臨床的効果を得るには連日のGTXが必要と考えられており、ドナーの負担やリスクの点から広く臨床応用には至っていない。

今回、我々が提案する人工多能性幹細胞 (iPS細胞) から誘導した好中球を用いた細胞療法 (以下iPS-GTX療法と呼ぶ) には、こうした現状を克服する次のような利点がある。

(1) ドナー負担の軽減、ドナーの確保 : iPS細胞をストック化することで、ドナー負担を最小限に抑え、ドナー確保の問題の解決にもつながる。また、患者由来iPS細胞から顆粒球に再分化させて自家輸注する形態も想定しているが、その際には原病によって患者の体内で産生不能な顆粒球を体外増幅することとなり、再生医療ならではの利点を生かすことができる。

(2) 治療効果の向上 : 十分量の顆粒球を連日輸血することが可能となり、GTX療法本来の効果、つまりこれまでの臨床研究では主に細胞数確保の困難さゆえに示されなかった臨床的効果が示される可能性がある。

(3) 顆粒球輸血の適応拡大 : iPS-GTX療法が確立されれば、様々な疾患・病態に臨床応用が可能である。例としては、感染症の合併が高頻度に見られる造血幹細胞移植

(特に生着前) や急性白血病の化学療法、高齢者がんの化学療法、また活動性のある感染症を合併した造血器腫瘍患者の化学療法など、感染症ハイリスクの症例が iPS-GTX 療法のよい適応となると考えられる。これらの症例で効果的な iPS-GTX 療法が可能になれば、化学療法や造血幹細胞移植時の感染症死亡を画期的に減少させることができる。さらに、顆粒球造血の回復がすぐには見込めない再生不良性貧血や各種の重症先天性好中球減少症に感染症を合併した場合などは従来の GTX 療法は適応とならなかったが、iPS 細胞由来顆粒球が長期にわたり安定的に供給可能となれば iPS-GTX 療法のよい適応となる。上記の技術が確立されれば、化学療法や造血幹細胞移植、または造血不全患者の診療の安全性を大きく改善すると期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、(1) iPS細胞から効率よく顆粒球へ再分化させる技術、(2) それを支える大量細胞培養技術の開発、(3) iPS細胞由来顆粒球の機能評価系の確立、の3項目をそれぞれ推進してiPS-GTX療法を確立するための基盤を形成し、iPS-GTX療法の臨床応用が実現可能かどうかを明らかにする。顆粒球輸血療法の有用性が臨床的に示唆され、かつ様々な問題から限界があり臨床応用が進まない状況下において、上記の理由からiPS-GTX療法はそれぞれの限界を突破し得る理想的な有力候補であるが、iPS細胞を用いた顆粒球輸血療法の検討は世界でもまったく注目されておらず、コンセプト自体が非常に独創的であり、かつ解決すべきそれぞれの課題は、これまでの学術的な基盤を応用することで検討・解決することが可能である点が注目すべき特色である。本研究によりiPS-GTX療法の臨床応用の可能性が示されれば、原病や化学療法・造血幹細胞

移植により感染症罹患リスクに悩む造血器腫瘍をはじめとする多くの担がん患者において、飛躍的に安全な治療が可能となることが予想され、世界中で広く活用される有効かつ安全な化学療法・造血幹細胞移植療法時の支持療法が確立され、その臨床的・社会的インパクトは絶大である。究極的には「無菌管理のいらぬ化学療法・造血幹細胞移植療法」の確立を目指し、世界に発信する。iPS-GTX療法の臨床応用の可能性が示された場合、その臨床的・社会的意義は上記のように明らかかつ非常に大きなものであるため、将来的には同血液・腫瘍内科/無菌治療部を拠点として他施設を含めた臨床試験を展開し、その有用性・安全性を検討すると同時に適応疾患・適応病態の拡大を目指していく。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞から顆粒球への再分化を効率的に行う技術開発

成人への GTX 療法を行う際に、循環血液量を 5l と仮定し、10 日間の連続輸注により毎日 100/m l の好中球数上昇を目指す場合、計算上計 5.0×10^8 個/日の顆粒球が必要となる。なお、臨床応用に際しては、まずは好中球数がほぼ 0 となるような急性白血病に対する化学療法等を想定するが、臨床的には白血球数が 0 から 100-200/m l 程度に上昇すると各種抗生物質・抗真菌薬に抵抗性であった発熱・炎症所見が改善することがしばしば経験されるため、好中球の目標上昇数としてはまず 100/m l を想定する。現在、iPS 細胞を 10cm dish で培養する際には、顆粒球の増幅を特に意図しない場合でも約 $10^6 \sim 10^7$ 個の顆粒球を得ることができることから、計算上は臨床応用に向けて 1 日当たり約 100 倍の顆粒球を獲得することが必要となる。例えば(1)により 10 倍の効率化が得られれば、dish 10 枚で顆粒球

分化を誘導すればよい計算になる。

十分な顆粒球を得るためには、iPS 細胞レベル、造血幹細胞レベル、前駆細胞から顆粒球のレベルのそれぞれで増幅できることが理想的であり、また iPS-GTX 療法の実現にとって最も重要な検討項目である。下記のようないくつかの計画を並行して進め、最も効率的な方法を選択することを達成目標とする。

a) 一過性の遺伝子導入: HOXB4 および CSF3R_T617N 変異 (G-CSF 受容体の活性化変異) につき、Tet-on システムによる発現 On-Off を可能にする。iPS 細胞にこれらの遺伝子を導入し、造血幹細胞や前駆細胞、顆粒球の増幅を検討する。

b) サイトカインミックスの内容検討: SCF、M-CSF、TPO、FLT3、CXCL12、ANGPTL2、ANGPTL3、G-CSF、GM-CSF 等のサイトカイン添加の至適量、至適タイミングについて検討する。

c) 小分子化合物等の添加: Wnt 活性化剤と mTOR 阻害剤添加の効果について検討する。

d) 骨髄球系以外の系統への分化ブロック: 骨髄球系への分化のマスターレギュレーターである PU.1 や CEBP a を一過性に遺伝子導入する、あるいは赤芽球系や巨核球系の分化制御因子である GATA1、GATA3、PAX5、IKAROS 等の発現を RNA 干渉を用いてノックダウンすることにより、骨髄球系への分化を亢進させることが可能かを検討する。

(2) iPS 細胞、または iPS 細胞由来の骨髄球系前駆細胞、顆粒球の大量培養のための技術開発

(1)による大量培養の効率化が可能な場合には本項目は必須ではないが、研究が当初の予定通りに進まない場合には本項目について精力的に検討する。本項目の目標の達成に必要と考えられる浮遊培養・三次元培養では困難な iPS 細胞から造血細胞への再分化のステップであり、今日の技術開発

レベルでは世界的にみても未だに達成困難な課題である。フィーダー細胞を用いた現在の iPS 細胞からの造血細胞への再分化技術では三次元培養が困難であることから、再分化の際にフィーダー細胞から iPS 細胞へ分泌されるサイトカインプロファイルを transcriptome やサイトカインアレイを用いて解析し、候補サイトカインを浮遊細胞の系に添加する等の検討をもとに、三次元培養を実現する。

(3) iPS 細胞由来顆粒球の機能評価系の確立

具体的に下記の 5 項目について実施する。

1) Oxidative Burst : Oxidative Burst は顆粒球が微生物を殺傷した際に重要な機能だが、不適切な Oxidative Burst は正常組織の傷害につながる。そこで、Dihydrorhodamine123 を rhodamine に変換する機能を Flow cytometry で計測する。2) 貪食能および NBT 還元能 : NBT でコートした酵母を好中球に加え、Safranin-O 染色により顕微鏡的に貪食および NBT 還元能を評価する。3) 遊走能 : modified Boyden chamber method により評価する。4) 生体内における機能評価 : マウスに緑膿菌やリステリア菌を静注して人工的に菌血症を起こすモデルを用いて、あらかじめ免疫不全マウスに静注した iPS 細胞由来顆粒球による菌血症に対する反応 (肝臓・脾臓に浸潤した細菌が寒天培地で形成するコロニー数の比較や腹腔内への遊走能) を正常ヒト好中球と比較する。5) その他、形態学的評価、細胞表面マーカーの評価を行う。

4. 研究成果

(1, 2) iPS 細胞から顆粒球への再分化を効率的に行う技術開発

iPS-GTX 療法に必要な顆粒球を連続的に得るために、iPS 細胞レベル、造血幹細胞レベル、前駆細胞から顆粒球のレベルの各段

階において増幅を試みた。

1) 一過性の遺伝子導入 : 慢性好中球性白血病の 60%で見られる CSF3R T618I 変異 (G-CSF 受容体活性化型変異) を iPS 細胞および iPS 細胞から分化させた造血前駆細胞に導入した。レンチウイルス感染により iPS 細胞への遺伝子導入は可能であったが、顆粒球分化効率の向上はなかった。また、iPS 細胞から分化させた造血前駆細胞 (CD34 陽性 CD43 陽性細胞) にも遺伝子導入を行ったが、全体の 40%が顆粒球に分化したが、通常の顆粒球分化効率と変わらない結果であった。

2) 遺伝子導入による細胞株化 : iPS 細胞から顆粒球に分化させるのに 4 週間を要するため、現状では必要時にすぐに顆粒球を準備することは困難である。顆粒球輸血の実用化に際しては、必要時に十分量の顆粒球を常に供給できるシステムを構築しておく必要がある。このために、顆粒球前段階で細胞株化させ、大量に産生させながら、必要時に顆粒球に分化させる仕組みが可能であるかを検証した。具体的には、iPS 細胞を分化させて得られた造血前駆細胞に tet-on システムを用いてテトラサイクリン投与下でのみを BMI1、cMyc が発現するようにし、細胞株化が可能であるか、また、テトラサイクリンフリーの状況で顆粒球に分化するかどうかを確認した。その結果、BMI1、cMyc の発現下で、増殖可能な細胞株が得られた。この細胞株は未分化の血球マーカーである CD34・CD43 の発現はなく、顆粒球・単球のマーカーである CD11b が発現していた。BMI1,cMyc の発現を off (tet-off)にすると形態学的には分葉核を持つ好中球様の細胞も見られたが、好中球機能評価系の一つで活性酸素産生能を評価する DHR assay (後述)では末梢血好中球と比較して 10%程度の機能しかなく、末梢血単球

と同程度の活性酸素産生能であった。また、tet-off 後の細胞は、細胞表面マーカーでは単球系マーカーである CD14 が発現しており、エステラーゼ染色でも非特異的エステラーゼ陽性かつ、NaF で阻害されており、単球に近い性質であると考えられた。リアルタイム PCR で好中球分化に関わる遺伝子の発現を BMI1、cMyc 発現 on 細胞 (tet-on)、発現 off 細胞 (tet-off)、iPS 由来好中球と比較したところ、遺伝子発現の on/off 前後で好中球分化に関わる Gfi1、ELA2 の発現が低下することが判明したため、今後はこれらの遺伝子を導入し、好中球分化が進むかどうかを確認していく予定である。

2) サイトカインミックスの添加：iPS 細胞から血球への分化段階で、血球分化開始 4 日目から 7 日目にかけて SCF、7 日目以降 TPO, IL3, IL6, FLT3 ligand を添加すると、非添加時と比較して 6 倍の造血前駆細胞が得られた。一方で、造血前駆細胞に GM-CSF のみを添加すると、G-CSF のみの場合と比較して 34 倍も細胞数が増加したが、その半数以上が好酸球に分化していた。GM-CSF 添加のタイミングや G-CSF と併用しても好中球への分化効率の向上はなかった。

(3) iPS 細胞由来顆粒球の機能評価系の確立

顆粒球の機能評価系を確立し、iPS 細胞から再分化誘導した顆粒球の機能を確認した。具体的には、Oxidative Burst を評価した。酸化されると蛍光を発する DHR (dihydrorhodamine123) を用いて好中球の活性酸素産生能を評価した。CD13 で末梢血、iPS 細胞由来好中球を sort し、好中球刺激因子 PMA を入れた際の活性酸素産生能を DHR が酸化される際に発する蛍光で評価した。iPS 由来好中球は末梢血好中球と同等の活性酸素産生能があることが示された。

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

吉見 昭秀 (YOSHIMI, Akihide)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80609016

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：