

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860727

研究課題名(和文) リプログラミング技術を用いた骨髄異形成症候群の病態解明と新規治療薬の探索

研究課題名(英文) Search for pathogenesis and novel therapeutics of acquired myelodysplastic syndromes using reprogramming technology

研究代表者

蝶名林 和久(Chonabayashi, Kazuhisa)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：00646010

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)：我々は核型異常を有する複数の骨髄異形成症候群(MDS)症例の異常クローンから複数のiPS細胞(MDS-iPS細胞)の樹立に成功した。MDS-iPS細胞から分化誘導した造血前駆細胞は正常iPS細胞と比べてコロニー形成能の低下、赤芽球系及び顆粒系分化能の低下が見られた。MDS-iPS細胞と同一患者由来の正常iPS細胞を再誘導して得られた造血前駆細胞分画の網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、MDS-iPS細胞に特異的な遺伝子発現異常が認められた。MDS-iPS細胞と元の症例の血液単核細胞の全エキソシークエンスを行い、網羅的に遺伝子変異を探索し、いくつかのMDS特異的な遺伝子変異を同定した。

研究成果の概要(英文)：We successfully generated multiple iPS cell lines from MDS clones (MDS-iPSC lines) of several MDS patients with abnormal karyotypes. We assessed hematopoietic differentiation potential of MDS-iPSC lines and isogenic normal T-iPSC lines. Hematopoietic colony formation in methylcellulose culture and further differentiation in erythroid and neutrophil culture were severely impaired in all tested MDS-iPSC lines. Next, we performed microarray analysis in hematopoietic progenitor cells re-induced from MDS-iPSC lines and isogenic normal iPSC lines, identifying MDS-specific expression changes. Finally, we performed whole-exome analysis to find that some of the somatic mutations detected in bulk cells of this MDS patient are shared in MDS-iPSC lines but not in isogenic normal iPSC lines.

研究分野：血液腫瘍学、幹細胞生物学

キーワード：骨髄異形成症候群 血液分化異常 リプログラミング iPS細胞 病態解明 新規治療薬

### 1. 研究開始当初の背景

MDS はクローナルな後天性造血障害で、臨床的には貧血、血小板減少、白血球減少などを来し、骨髄造血細胞に様々な程度で形態異常が生じることを特徴とする疾患である。比較的高齢者に多く、また悪性腫瘍に対する化学療法や放射線療法後に発症(二次性 MDS)する確率が数倍～数十倍に増加するのが特徴で、近年の社会の高齢化や積極的化学療法の拡がりや相まって、MDS 症例は増加の一途をたどっている。MDS の本態は、造血幹細胞にゲノム及びエピゲノム異常が蓄積することで生じた異常幹細胞クローンが、徐々に優位性を獲得し骨髄内を占拠していくこととされ、この異常クローンの持つ分化異常や病的なアポトーシスが、血球の正常な成熟を障害し、結果として血球減少や骨髄細胞の異形成を引き起こすと考えられている。さらに、この異常クローンがさらなるゲノム・エピゲノムレベルでの異常を蓄積することで質的に変貌し、急性骨髄性白血病 (AML) へ高頻度に進展する。つまり、MDS は前白血病状態とも考えられている。

MDS では、病態解明に有用なモデルマウスがなく、免疫不全マウスにも MDS 細胞は生着しないので、有効な治療法を開発するためのツールが無いのが現状である。根治は同種造血幹細胞移植でしか得られないが、その適応は若年者に限られ、移植治療の恩恵が受けられるのはごく少数の患者のみである。大多数の高齢患者では輸血などの対症療法が主体となり、数年内に感染症や白血病化によって大半が死の転帰をとり、予後不良である。近年、アザシチジン(ビダーザ)が開発され臨床応用されているが、その効果は中央生存期間で約9ヶ月の延長が得られるに過ぎない。以上のように、MDS の病態が再現・解析でき、将来の治療法を開発を可能にするツールの開発、及び新規治療薬の開発が切望されている。

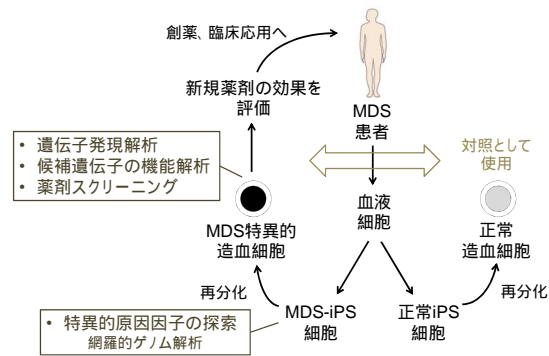
iPS 細胞は未分化性を維持したまま増幅可能かつ生体を構成する種々の細胞に分化することが可能であり、患者検体を得ることが困難な神経疾患領域などで iPS 細胞を利用した遺伝性疾患研究への応用が精力的に行われている。MDS のような後天性の遺伝子異常を伴う疾患においても、疾患特異的な iPS 細胞が樹立できれば、iPS 細胞を再分化させることによって患者から直接採取することの出来ない多量の疾患細胞を必要な分化段階で得ることができ、疾患の発症・進展における変異遺伝子の機能解析や、新しい治療薬の開発などが可能になると考えられる。

### 2. 研究の目的

樹立した MDS-iPS 細胞と正常 iPS 細胞で、順次全エキソンシーケンスを行い、新規の遺伝子変異などを探索する。また、再誘導して得られた造血前駆細胞分画などをソーティングにより選別して、網羅的遺伝子発現解

析を行う。同定した候補因子を、順次 MDS-iPS 細胞に導入もしくはノックダウンして、その機能を解析する。造血誘導した際に MDS 病態を抑えることができる因子を選定する。同定した候補遺伝子に対する阻害剤などを探索する。また、化合物ライブラリーを用いて、上記の MDS 病態再現系でスクリーニングして、MDS 病態を抑制する薬剤/化合物を同定する。

### 3. 研究の方法



#### (1) MDS-iPS 細胞の作製

MDS 患者の骨髄もしくは末梢血の単核細胞から MDS-iPS 細胞を作製する。iPS 細胞作製過程の影響を排除するため、可能な限り複数クローンを樹立し、以後の実験に供することを目指す。同一患者の T 細胞を用いて、同様の方法で正常 iPS 細胞を作製する。正常 iPS 細胞は MDS-iPS 細胞の対照として使用する。MDS-iPS 細胞は、FISH 解析、核型解析、SNP アレイなどでその患者検体と同一クローンであることを確認し、正常 iPS 細胞も核型解析、SNP アレイなどで iPS 細胞作製過程で欠失などが起きていないことを確認する。得られた MDS-iPS 細胞、正常 iPS 細胞において奇形腫形成能および多能性幹細胞マーカー遺伝子の発現を確認する。

#### (2) MDS の 病態再現

(1) で作製した iPS 細胞を OP9 細胞共培養系及び胚様体形成法による分化誘導系を用いて invitro で造血誘導し、その後、GM-CSF, G-CSF, IL3, IL-6, SCF, EPO 存在下でコロニーアッセイを行い、コロニー形成能力を評価すると共に、分化能力 (CFU-G, -M, GM, -GEMM, -E など) も評価する。また EPO, G-CSF, などの各サイトカイン単独での成熟血球誘導を行い、赤血球、好中球などへの分化異常・異形成を、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原マーカー解析や、ギムザ染色による形態学的手法などで評価する。

#### (3) MDS 特異的原因因子の探索

MDS-iPS 細胞および正常 iPS 細胞の全エキソンシーケンスを用いた網羅的ゲノム解析、iPS 細胞から誘導される造血幹細胞分画 (CD34+CD38-CD43+Lineage-) での網羅的遺伝子発現解析などを行い、MDS 特異的原因因子を探索する。

#### (4) 新規薬剤スクリーニング

利用可能な化合物を、上記の MDS 病態再現系でスクリーニングして、MDS 病態を抑制するような薬剤/化合物を選定する。

(5) 候補因子の機能解析

候補標的因子の強発現、ノックダウンなどを MDS-iPS 細胞で行った上で、血球を再誘導して MDS 病態への影響を評価し、有望な標的因子について、阻害剤の探索を行う。

4. 研究成果

(1) MDS-iPS 細胞の作製：MDS 患者の血液細胞からエピソーマルプラスミド法で iPS 細胞樹立を行い、20q 欠失症例など計 6 症例において MDS 細胞由来 iPS 細胞株と正常細胞由来 iPS 細胞株の樹立に成功した。樹立した MDS-iPS 細胞は G バンド法、SNP-CGH アレイ解析などにより MDS と同一の染色体異常を保持していることを確認した。また、MDS-iPS 細胞、正常 iPS 細胞いずれについても多能性幹細胞マーカー遺伝子の発現を確認し、またテラトーマ形成法によりテラトーマ形成能を確認した。

(2) MDS の病態再現：MDS-iPS 細胞から分化誘導した造血前駆細胞は正常 iPS 細胞と比較して、コロニー形成能の低下及び BFU-E、CFU-E、CFU-GEMM の減少を認めた(図1)。また造血前駆細胞から赤芽球系、顆粒球系への特異的分化誘導を行い、細胞表面抗原の解析を行ったところ、MDS-iPS 細胞由来のものではそれぞれ赤芽球特異的 CD235a、顆粒球特異的 CD66 b が低下していた(図2)。

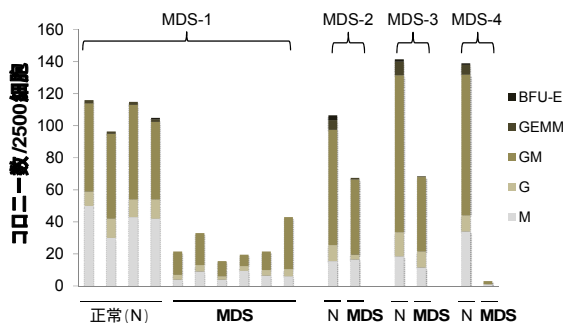


図1. 正常iPS細胞及びMDS-iPS細胞から再分化した造血前駆細胞のコロニー形成能の違い

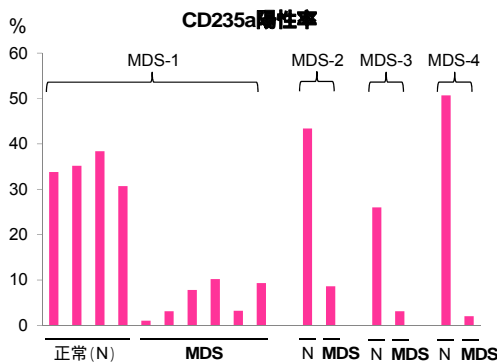


図2. 正常iPS細胞及びMDS-iPS細胞から再分化した造血前駆細胞の赤血球系分化能の違い

(3) MDS 特異的原因因子の探索：樹立した

MDS-iPS のうち、20q 欠失 MDS-iPS 細胞と同一患者由来の正常 iPS 細胞を再誘導して得られた造血前駆細胞分画をソーティングにより選別して、網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、20q 欠失 MDS-iPS 細胞では欠失領域 20q11.2-13.1 にある遺伝子群の低下などを含む特異的な遺伝子発現異常が認められた(図3)。20q 欠失 MDS 症例の血液単核細胞及び MDS-iPS 細胞のゲノム DNA を材料に、同一患者から樹立した正常 iPS 細胞を対照として全エキソンシーケンスを行い、網羅的に遺伝子変異を探索し、MDS-iPS 特異的遺伝子変異を同定した。

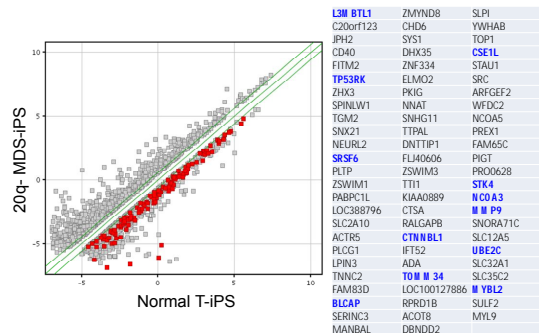


図3. 20q欠失MDS-iPS由来造血前駆細胞での欠失領域20q11.2-13.1にある遺伝子群の低下

(4) 新規薬剤スクリーニング

上記の MDS 病態再現系で血液異常を改善できるような薬剤スクリーニング系の構築を行った。スクリーニングの効率を上げるために、造血前駆細胞を大量に得られるよう細胞密度、サイトカインコンビネーションや分化誘導時間などの分化誘導方法の最適化を行い、胚様体形成法を用いた大量培養/分化誘導法を確立した。同時に iPS 細胞の維持培養方法や保存方法の改良、また実際に用いる MDS-iPS 細胞株、健康 iPS 細胞株の選択を行い、薬剤スクリーニングを開始した。

(5) 候補因子の機能解析

(3) で同定した候補因子のうちいくつかを MDS-iPS 細胞に導入し、造血誘導を行い、分化異常の改善効果を確認した。

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 1 件)

蝶名林 和久、吉田 善紀、高折 晃史。リプログラミング技術を用いた骨髄異形成症候群の病態解明と新規治療の可能性。iPS 細胞を用いた難病研究-臨床病態解明と創薬に向けた研究の最新知見。遺伝子医学 MOOK27 号。メディカルドゥ社。査読なし。2015:27:147-151

〔学会発表〕(計 3 件)

1) Kazuhisa Chonabayashi, Masahiro Kawahara, Akira Watanabe, Masahiro

Nakamura, Masatoshi Nishizawa, Akifumi Takaori-Kondo, Shinya Yamanaka, and Yoshinori Yoshida. Generation of engraftable leukemic stem cells from iPS cells derived from a secondary AML patient. The 77th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. October 2015. Kanazawa City.

2) Kazuhisa Chonabayashi, Masahiro Kawahara, Keisuke Okita, Masatoshi Nishizawa, Norimitsu Kadowaki, Akifumi Takaori-Kondo, Shinya Yamanaka, Yoshinori Yoshida. Patient-specific induced pluripotent stem cells recapitulate the maturation defect of myelodysplastic syndromes. The 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology. December 2014. San Francisco, CA.

3) Kazuhisa Chonabayashi, Masahiro Kawahara, Akira Watanabe, Naoki Amano, Keisuke Okita, Masatoshi Nishizawa, Norimitsu Kadowaki, Akifumi Takaori-Kondo, Shinya Yamanaka, Yoshinori Yoshida. iPS technology revealed the genetic and functional diversity present in a single MDS patient. The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. October 2014. Osaka.

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：骨髄異形成症候群等の治療/予防薬のスクリーニング方法

発明者：山中伸弥/吉田善紀/蝶名林和久

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：特願 2015-518306（国内）14/893,470（米国）

出願年月日：2013/5/23

国内外の別：国内、外国出願（米国）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

蝶名林 和久（CHONABAYASHI KAZUHISA）

京都大学 iPS 細胞研究所・特定研究員

研究者番号：00646010