

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870396

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた好中球減少症の病態解析

研究課題名(英文) The pathological analysis of neutropenia using by iPS cells

研究代表者

唐川 修平 (Karakawa, Shuhei)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：10642150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、患者由来iPS細胞を用いることで、十分量の顆粒球系細胞が入手できないという従来の問題点を克服し、好中球減少に至る分子病態の基盤を明らかにすることを目的としている。健康者コントロール、SCN(重症先天性好中球減少症)由来、CyN(周期性好中球減少症)由来のiPS細胞を樹立し、血清および支持細胞フリーでのiPS細胞から血液細胞、さらに顆粒球系細胞への分化誘導法を確立した。SCN-iPSにおいてはCD34陽性細胞のコロニー形成能や細胞増殖能が不良であり、早い分化段階からの障害が好中球減少の重症化を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)： We established iPS cells derived from health donor (WT-iPS), severe congenital neutropenia (SCN), and cyclic neutropenia (CyN). And we established differentiation therapy from iPS cells to hematopoietic stem cells and granulocytes without serum and feeder cells.

The colony formation and cell proliferation of CD34 positive cells derived from SCN-iPS were decreased compared with WT-iPS or CyN-iPS, suggesting the possibility that the ability of hematopoiesis and proliferation were impaired in the early stage of hemoangiogenic progenitor. There were no definite difference in the cell localization of elastase and the expression of BIP protein between SCN-iPS, CyN-iPS and WT-iPS. These data suggest that the impairment in the early proliferation stage cause the severe neutropenia.

研究分野：血液

キーワード：好中球減少症 ELANE 重症先天性好中球減少症 周期性好中球減少症

1. 研究開始当初の背景

重症先天性好中球減少症 (SCN) は、乳児期からの反復する重症細菌感染症を伴う慢性好中球減少症であり、前骨髄球、骨髄球での成熟障害を特徴とする。1999年に好中球エラスターゼ(neutrophil elastase: NE)をコードする *ELANE* 遺伝子のヘテロ接合性変異が、2007年に *HAX1* (HCLS1-associated protein X-1) 遺伝子のホモ接合性変異が SCN の原因として同定され、現在のところこの2つの遺伝子における異常が SCN の原因の大部分を占めている。われわれは本邦の SCN、CyN 患者において *ELANE*、*HAX1* 遺伝子変異を約 50 例同定している。

SCN をひきおこすメカニズムは明らかになっていない。*ELANE* 変異 SCN で現在考えられている病態としては、①NE のタンパク輸送が障害され細胞膜に偏位しアポトーシスを誘導することで骨髄顆粒球系前駆細胞の成熟障害をきたしている説、②*ELANE* 変異蛋白が細胞内に蓄積することによるフォールディング病とする説、③*ELANE* mRNA の低下による分化障害が原因とする説、等があるが一致した見解には至っていない。最近 *HAX1* が G-CSF 刺激のシグナル伝達において重要な役割を果たしている可能性が指摘されており、病態解明が期待されているが、いぜん謎の部分も多い。

病態解析が進まない最大の原因は解析すべき顆粒球系細胞が十分得られないことであるが、具体的には、①患者から採取できる多核球細胞が少ないうえに、そのなかには好中球だけではなく反応性に増加した好酸球が多く含まれる、②変異 *ELANE* ノックインマウスでは疾患の再現ができない、③タンパク発現実験の多くは非顆粒球系細胞で行われており

実際の顆粒球系細胞内での病態を反映していない、などがあげられる。また、同じ *ELANE* の変異でありながらその変異部位により、表現型が SCN と CyN となることが現在判明しているが、表現型が異なる原因ははっきりしていない。

2. 研究の目的

本研究は iPS 細胞を用いることにより、“十分量の顆粒球系細胞が入手できない” という従来の問題点を克服するという点で、革新的かつ独創的な研究と考えられる。iPS 細胞という技術的な breakthrough を利用して、これまで解析が困難であった SCN の病態解析を簡易化することで、SCN の分子基盤の新たな側面が明らかになることを目的とする。本研究により分子病態が明らかとなればそれらを target にした創薬にもつながる可能性を有しており意義があると研究と考えられる。

3. 研究の方法

(1) 概要

SCN (*ELANE* 変異)、CyN (*ELANE* 変異) 由来 iPS 細胞を樹立する。これら iPS 細胞より骨髄顆粒球系細胞に分化誘導する系を確立する。その後、健常者および患者由来の iPS 細胞から骨髄顆粒球系細胞への分化課程での異常の有無を検討する。分化誘導後の顆粒球系細胞を用いて、関連遺伝子の発現を qPCR で検討 (*ELANE*, *Bip* etc)、NE の局在の検討 (位相差顕微鏡、ウエスタンブロット)、アポトーシスアッセイ (FACS) などを行う。これらの実験結果を、異なった遺伝的背景を有する患者、健常者と比較することで好中球減少症分子病態の基盤を明らかにする。

(2) iPS 細胞から顆粒球系細胞への分化培

養系の確立

iPS細胞をマウス由来 AGM-3S feeder細胞と共培養し、造血系にコミットさせ、FACS AriaにてCD34陽性細胞に純化する。その後CD34陽性細胞を各種サイトカイン(SCF、IL-3、G-CSF、FLAT3、FP6など)を用いて顆粒球系細胞に分化・増殖させる。サイトカインの種類や量、培養日数、feeder細胞等を工夫し顆粒球分化の最適の条件を見出す。誘導で得られた顆粒球は、形態学的評価、フローサイトメトリーによる表面抗原(CD13、CD33、CD15、CD16、CD11bなど)の解析、細胞内MPO染色、活性酸素産生能などにより多角的な評価を行う。

(3) 顆粒球系細胞での分子病態解析

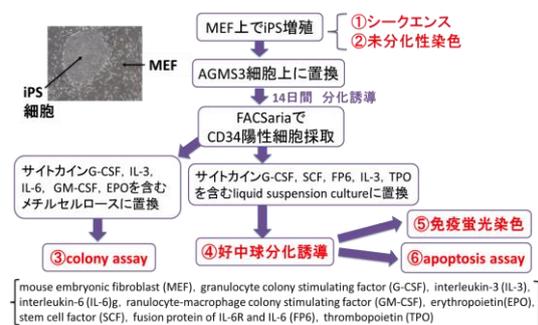
SCN の病態の特徴は、骨髄の前骨髄球での maturation arrest である。そのためわれわれはどの分化段階で critical な障害が生じているかを調べるために、iPS細胞から顆粒球へ分化する過程の、造血幹細胞レベル、前骨髄球レベル、それ以降の骨髄球～顆粒球レベルの3段階の細胞にて解析を行う。これら3段階の細胞はそれぞれ細胞表面マーカーによりFACS Ariaにて sorting することで純化する。われわれは骨髄から得られたCD34陽性細胞からの培養では上記3段階に純化できることを確認している。WT-iPS、SCN-iPS、CyN-iPSの3種類の細胞をそれぞれ3段階の分化過程において、NEの局在の解析、Bip、ELANE、LEF-1、CEBP α などの発現解析、アポトーシス解析などを行い、相違を明らか

にする。

4. 研究成果

(1) iPS細胞の樹立および血液幹細胞、顆粒球系細胞への分化誘導

健常者コントロール、SCN(重症先天性好中球減少症)由来、CyN(周期性好中球減少症)由来のiPS細胞を樹立した。当初は支持細胞存在下でのiPS細胞から血液幹細胞への分化誘導をおこなっていたが、支持細胞によってiPS細胞の分化効率にかなりのばらつきを認め、さらに最終的な好中球への分化に至らなかった。分化効率に差を認めていたが、それが支持細胞の違いによる分化障害なのか、遺伝子変異によるものなのかの検証が困難であった。そのため分化誘導法を見直した。最終的には血清および支持細胞フリーでのiPS細胞から血液細胞、さらに顆粒球系細胞への分化誘導法を確立した。

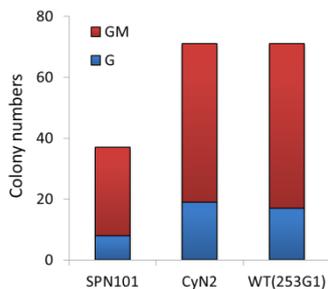


(2) 分化培養 (CD34～骨髄球段階)

iPS細胞からCD34陽性血液幹細胞に分化させた後、そのコロニー産生能や細胞増殖能を解析した。granulocyte colony および granulocyte-macrophage colony とともにSCNでは低下がみられたが、CyNにおいてはほぼWTと同様のコロニー形成能を認めた(A)。液体培養系では、CyNはWTとほぼ同様に経過するが、SCNの細胞数の増加は緩やかで、10日目ではSCNの細胞数はCyNの1/3にと

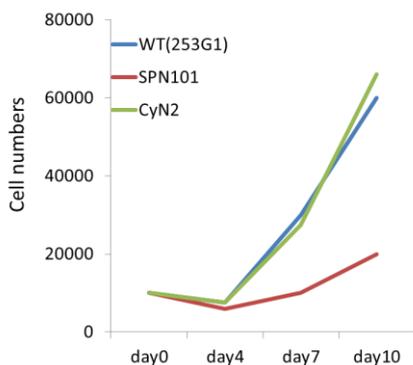
どまっていた (B)。SCN-iPS において WT や CyN と比較してコロニー産生能 (A) や細胞増殖能 (B) が不良であった。このことから SCN においては造血幹細胞レベルにおいて造血能や分化能が障害されていることが示唆された。

A. Colony assay



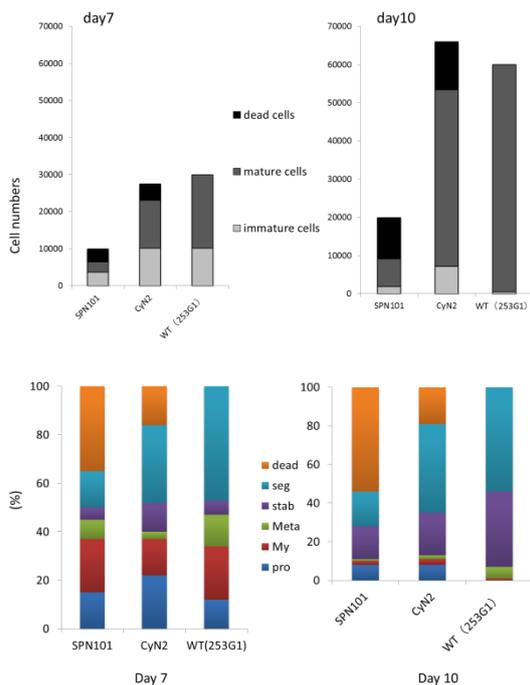
G: granulocyte colony
GM: granulocyte-macrophage colony

B. Liquid assay



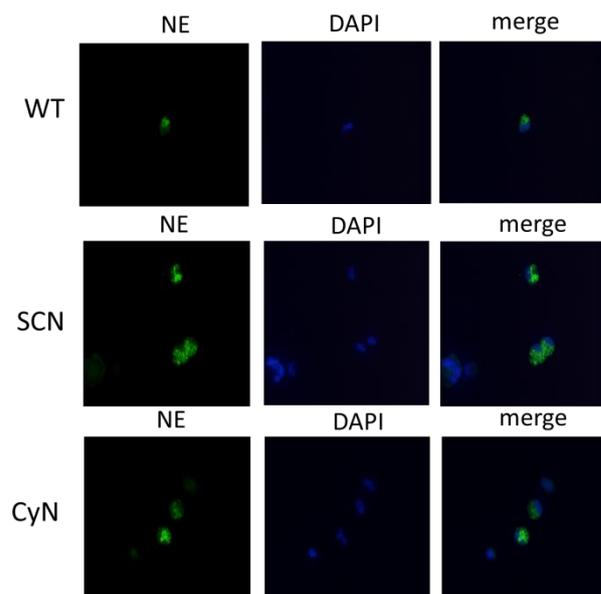
(3) 分化培養 (骨髓球～顆粒球)

培養 7 日目では、前骨髓球や骨髓球といった骨髓前駆細胞の割合は、WT では 20%であるのに対し、CyN と SCN では 50~60%を占めていた。CyN や SCN では細胞質にいくつかの空胞を形成した細胞 (=空胞形成細胞) や、核や細胞質が濃く染まり、細胞質には大きな顆粒を伴う細胞 (=死細胞) が見られた。10 日目には、WT ではほぼすべての細胞が後骨髓球以降の成熟細胞であるのに対し、CyN では成熟細胞は全体の 30%で、SCN では全体の 10%しかみられなかった。



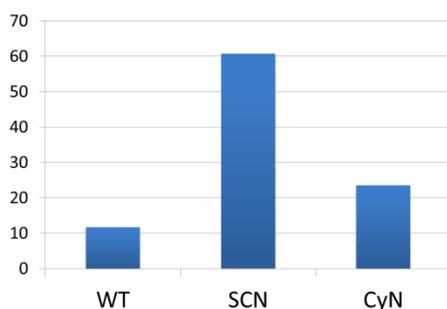
(4) 好中球エラスターゼ (NE) 局在

免疫蛍光染色により NE の発現について検討した。WT では細胞質全体に均一に NE がみられるのに対し、SCN では細胞質に小さな顆粒状に集まった NE が多くみられ、CyN では顆粒状の NE と均一な NE 両方がみられた。



(5) アポトーシス解析

好中球分化誘導開始から 10 日目に、apoptosis のマーカーである Annexin V の発現を FACS で解析した。CyN は SCN と比べて apoptosis を起こしている細胞割合は少なかった。



(6) 結果のまとめ、考察

CyN は 21 日の周期で好中球の減少を繰り返す。周期的に好中球減少が起こる原因はまだ明らかになっていないが、成熟した好中球の寿命が何らかの原因で短くなっており、それを補うために未熟な骨髄前駆細胞が増えるが、成熟細胞の減少に骨髄前駆細胞の産生が追いつけなくなり、好中球が減少してしまうことが、周期的な減少を引き起こしている可能性が推測される。好中球分化誘導で 10 日目までの細胞数の推移が WT と同様の経過であり、細胞数は正常と変わらないが、その成熟割合をみると、WT と CyN では骨髄前駆細胞と成熟細胞の比率が異なり、CyN では骨髄前駆細胞の占める割合が増加していた。生体内において好中球減少期以外は成熟細胞の割合が増えることから成熟障害の所見はなく、骨髄前駆細胞の産生と成熟細胞の寿命のバランスが崩れることが好中球減少期が存在する原因ではないかと思われる。一方、SCN では、前骨髄球までの段階で成熟が障害され、成熟早期の段階で細胞が死んでしまうことが分かっており、実際に細胞数が少なく、骨髄前駆

細胞の割合が多いことも確認できた。両者は同じ *ELANE* の変異であるが、表現型だけでなく、好中球減少の病因・機序が異なっていると考えられる。CyN 患者の骨髄細胞を用いた colony assay においても、コロニー数は健康人とあまり変わりなく、未熟な骨髄前駆細胞が多くみられることが確認されている。iPS 細胞を用いた今回の実験系はほぼ同様の結果が得られており、患者骨髄細胞の再現ができているといえる。

免疫蛍光染色での NE の存在様式は WT と両疾患 iPS では異なっていた。CyN, SCN とともに細胞質に顆粒状の NE がみられ、特に SCN で顕著であった。NE はゴルジ装置で産生され、小胞体から細胞膜を經由して、リソソームなどの細胞質顆粒内へと移行する。NE の輸送障害により NE が細胞膜に偏ったり、顆粒内にとどまることが、これらの疾患に関与しているのではないかという報告もあることから、NE の異常集積が好中球の細胞死に関わっているのではないかと考えられる。NE の異常集積がどのような機序で細胞に影響を及ぼすのか今後の検討としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

6. 研究組織

研究代表者

唐川 修平 (Karakawa Shuhei)

広島大学医歯薬保健学研究院 助教

研究者番号 10642150