

黒川 峰夫

東京大学 大学院医学系研究科 教授

## iPS細胞を用いた造血器腫瘍の病態解明と治療法の探索

### §1. 研究実施の概要

本年度は、様々なヒト白血病・MDS症例由来の腫瘍細胞（以下、白血病細胞と表記）より、iPS細胞作製を試みた。その結果 CML 患者細胞より iPS 細胞を樹立することに成功した（以下 CML-iPS 細胞と表記）。CML-iPS 細胞は bcr-abl を発現しているものの、abl 阻害薬である imatinib に対し耐性を示した。しかしながら再度血球系へ分化させたところ、原病と同様に imatinib に対する感受性が回復した。CML-iPS 細胞における imatinib 耐性のメカニズムを明らかにするために、bcr-abl の下流シグナル分子のリン酸化に対する imatinib による影響を検討した。その結果 RAS-MAPK, PI3K-Akt などの bcr-abl と iPS 細胞の生存に共通するシグナル分子のリン酸化は imatinib 投与後も変化が見られず、CML-iPS 細胞においては bcr-abl に対する依存性が喪失していると考えられた。現在 CML-iPS 細胞由来の血液細胞を免疫不全マウスへ移植することにより疾患モデルの作成中である。今後は白血病幹細胞や病期の進展のモデルなどのさらなる病態解析を行う予定である。

その他、原発性骨髄線維症や本態性血小板血症などの骨髄増殖性疾患からの iPS 細胞の樹立に成功しており、今後は CML-iPS 細胞と同様に血液系への分化誘導により、その病態についての検討を行う予定である。さらには急性白血病や MDS などからの iPS 細胞の樹立の最適化について検討中である。また Runx1 の遺伝子変異による家族性血小板異常症患者の皮膚より疾患 iPS 細胞の樹立を試みている。

### §2. 研究実施体制

(1)「黒川」グループ(東京大学)

① 研究分担グループ長:黒川 峰夫 (東京大学 大学院医学系研究科、教授)

② 研究項目

- ・ iPS 細胞化技術の最適化による疾患 iPS 細胞作製と解析
- ・ 白血病 iPS 細胞の血球系への分化誘導
- ・ 白血病 iPS 細胞を用いた白血病発症機構の解析

### §3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

#### 白血病 iPS 細胞化技術の最適化による疾患 iPS 細胞作製

本年度は主に白血病 iPS 細胞化技術の症例に応じた最適化による疾患 iPS 細胞作製を目指すことを目的とし、以下の検討を行った。

最初にヒト白血病・MDS 症例由来の腫瘍細胞（以下、白血病細胞と表記）より、iPS 細胞を作製するため、本研究ではレトロウイルスを用いて Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4 を同時に白血病細胞に導入し、3 日後に MEF フィーダー上に継代、6 日後からヒト ES 細胞培地で培養し、リプログラミングを行う。細胞数に余裕のあるものについては、白血病幹細胞が含まれる CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> 分画などの各分化段階の細胞集団を純化し、iPS 細胞化の効率を比較した。この方法により、われわれは実際に CML 患者細胞の CD34 陽性細胞より効率的に iPS 細胞を樹立することに成功した（以下 CML-iPS 細胞と表記）。他の造血器腫瘍においても同様な方法により iPS 細胞の樹立を試みたが、骨髄線維症や本態性血小板血症などの骨髄増殖性疾患においては iPS 細胞化に成功したが、現状では急性白血病症例においては iPS 細胞化に成功していない。造血器腫瘍細胞由来の場合は、さまざまなエピゲノムの変化により正常体細胞と比較して iPS 細胞の樹立が困難である可能性があると考えられ、iPS 細胞の樹立を促進することが知られている小分子化合物（バルプロ酸や酪酸など）の添加や shRNA による p53 経路の阻害を試みる予定である。さらには ES 細胞や iPS 細胞で特異的に発現するさまざまな遺伝子を対象に、リプログラミングを促進する遺伝子群をスクリーニングし、それらの遺伝子群の導入により iPS 細胞の樹立をめざす。また白血病の原因となる遺伝子異常そのものが、iPS 細胞化を妨げる可能性もあるので、既知の遺伝子異常を持つものに関しては、それらをレンチウイルスによる誘導的な shRNA を用いて一過性に抑制することにより iPS 細胞化を試みる。このようにして、病型に応じた最適なリプログラミング法を確立することを目指す。

その他遺伝性の血液疾患である Runx1 遺伝子異常による家族性血小板異常症の患者の皮膚細胞から iPS 細胞の樹立を試みている。

#### 白血病 iPS 細胞の血球系への分化誘導

白血病 iPS 細胞からの造血細胞への誘導には、ES 細胞で用いられている造血細胞への分化誘導方法を利用した。OP9 細胞や 10T1/2 細胞などの間葉系細胞株との共培養法を用いて、ヒト iPS 細胞から多能性の血液前駆細胞を濃縮する嚢状の構造物（iPS cell-derived sac）を誘導し、さらに内部の血液前駆細胞を解析する方法を用いた。本方法により CML-iPS 細胞より従来の胚様体形成法に比べ高率に血球への誘導が可能であった。得られた細胞は血液細胞のマーカーである CD45 と未分化マーカーである CD34 を発現していた。これらの細胞は造血コロニー形成能が認められ、bcr-abl の発現が確認され imatinib に対

する感受性があり、原病の CML のモデルとしての適格性を持つと考えられた。

次に誘導した血液細胞は NOD/SCID などの免疫不全マウスへの移植実験を行い、造血細胞の再構築、特に白血病の再現が可能か検証中である。

#### 白血病 iPS 細胞を用いた白血病発症機構の解析

樹立された iPS 細胞について以下の検討を行った。

まずリプログラミング後のエピゲノム状態を評価するために、CML-iPS 細胞と正常細胞由来の iPS 細胞のメチル化状態を、メチル化アレイを用いて網羅的に検討した。その結果 CML-iPS 細胞と正常細胞由来の iPS 細胞は、きわめて類似したメチル化状態を示していることがわかった。

CML-iPS 細胞は *bcr-abl* を発現しているものの、*abl* 阻害薬である *imatinib* に対し耐性を示した。しかしながら再度血球系へ分化させたところ、原病と同様に *imatinib* に対する感受性が回復した。そこで CML-iPS 細胞における *imatinib* 耐性のメカニズムを明らかにするために、以下の検討を行った。

*bcr-abl* の発現量が高い症例では、*imatinib* に対し耐性を示すことが知られているが、樹立された CML-iPS 細胞では、元の *imatinib* に対し感受性のある CML 細胞と比較し発現量が上昇していることはなかった。

次に *bcr-abl* の下流シグナル分子のリン酸化に対する *imatinib* による影響を検討した。その結果 RAS-MAPK, PI3K-Akt などの *bcr-abl* と iPS 細胞の生存に共通するシグナル分子のリン酸化は *imatinib* 投与後も変化が見られなかったが、STAT5 や CrkL など正常の iPS 細胞においては活性化が見られないものについては、CML-iPS 細胞においてのみリン酸化が減弱した。この結果 CML-iPS 細胞においては、*bcr-abl* に対する依存性が喪失していると考えられた。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

### (4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)