

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. 研究実施体制

### (1) 「黒川」グループ

① 研究代表者: 黒川 峰夫 (東京大学 大学院医学系研究科、教授)

### ② 研究項目

- ・白血病 iPS 細胞化技術の最適化による疾患 iPS 細胞作製
- ・樹立した疾患 iPS 細胞からの血球系細胞への分化誘導
- ・誘導した血液細胞による造血細胞の再構築や白血病の発症機構を解析
- ・白血病幹細胞に特異的な分子病態・シグナル異常の同定、及び分子標的療法や細胞表面分子に対する抗体療法の開発
- ・白血病 iPS 細胞のゲノムワイドの網羅的解析による新たな白血病発症機構の同定

## § 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)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

本年度は昨年度に引き続き白血病 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、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>lin</sup><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、われわれは昨年度に樹立に成功した CML 患者細胞由来 iPS 細胞(以下 CML-iPS 細胞と表記)に加え、骨髄線維症(MF)や本態性血小板血症(ET)などの骨髄増殖性疾患において iPS 細胞化に成功した。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、現状では急性白血病症例に

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 経路の阻害を試みたが、依然として樹立には至っていない。さらにリプログラミングを促進する遺伝子として LIN28, Glis1 などの遺伝子群の追加導入により iPS 細胞の樹立を試みたが、不完全にリプログラミングされたコロニーを得るに留まった。そこで来年度は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り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 細胞の樹立に成功した。

またレトロウイルスを用いた iPS 細胞の樹立では外来遺伝子がゲノムに挿入されてしまい、それにより腫瘍細胞の特性が変化してしまう可能性があるため、ゲノムに挿入されずに iPS 細胞の樹立が可能である sendai virus の系を用いて CML 患者検体より iPS 細胞の樹立に成功した。

### 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。しかしながら誘導された血液細胞の中で CD34+CD38-CD90+ の未分化な細胞集団は imatinib に対して抵抗性を示し CML 幹細胞の特性を示した。今後この imatinib 抵抗性の分子機構について検討する予定である。

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したが、一過性の生着は示したものの、白血病の発症は確認できなかった。

また MF-iPS 細胞の血球分化を同様に iPS-Sac 法によって行った。MF-iPS のうち、特に JAK2 V617F ホモ陽性株は、この系において正常 iPS と比して血球前駆細胞を多く産生した。これらの前駆細胞は半固形培地上で顆粒球・マクロファージを主とする血球コロニーの形成能を有したが、MF-iPS から産生された血球前駆細胞はコロニー形成能が正常 iPS 由来前駆細胞より有意に劣っており、割合としては未分化な血球成分の割合が減少していることが示唆された。この説明としては、V617F ホモクローンにおいては血球分化時に血球の増殖と同時に一部は分化が亢進するなどコロニー形成能を失う形での増殖をきたしていることが考えられた。この結果は、サイトカイン非

依存性に増殖が亢進し、成熟した細胞まで分化は問題なく起こる JAK2 V617F 陽性骨髄増殖性疾患の特徴を反映しており、この細胞は実際には入手が限られる患者細胞の代替として研究対象となりうるものと考えられた。

### **白血病 iPS 細胞を用いた白血病発症機構の解析**

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。これらの現象は Feeder 細胞である MEF を除いた培養系や上記の sendai virus により樹立された iPS 細胞を用いても同様の結果が再現された。

## **§ 3. 成果発表等**

### **(3-1) 原著論文発表**

### **(3-2) 知財出願**

- ① 平成 23 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)