

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

- ・iPS細胞化技術の最適化による造血器腫瘍疾患由来 iPS細胞作製
- ・樹立した疾患 iPS細胞からの血球系への分化誘導
- ・誘導した血液細胞による造血系の再構築や白血病発症機構の解析
- ・疾患 iPS細胞を用いた白血病幹細胞特異的な分子病態・シグナル異常の同定、および分子標的療法の開発

§ 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)

iPS細胞化技術の最適化による造血器腫瘍疾患由来 iPS細胞作製

本年度も昨年度に引き続き、iPS細胞化技術の最適化によって効率的に造血器腫瘍疾患由来 iPS細胞を樹立する取り組みを進めた。われわれは既に、慢性骨髄性白血病(CML)細胞や JAK2V617F 変異陽性骨髄線維症(MF)をはじめとする骨髄増殖性腫瘍(MPN)の細胞、家族性血小板異常症(FPD)患者の皮膚線維芽細胞から、レトロウイルスベクターによる OCT3/4, SOX2, C-MYC, KLF4 の導入によって疾患 iPS細胞を樹立することに成功している。昨年度から今年度にかけて、われわれは新たにセンダイウイルスベクター(CytoTune™-iPS)やエピゾーマルベクター(pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL)を用いた iPS細胞樹立法を導入し、ゲノムへの外来遺伝子の組み込みがなく形質転換などのリスクが最小限に抑えられた疾患由

来 iPS 細胞を樹立することに成功した。なかでもエピゾーマルベクターを用いた方法がわれわれの検討では最も iPS 細胞樹立効率が高かったことを踏まえ、来年度はこの手法を用いてさまざまな造血器腫瘍、特に疾患由来 iPS 細胞を用いた病態解明の意義が高いと考えられる骨髄異形成症候群(MDS)、骨髄異形成/骨髄増殖性腫瘍(MDS/MPN)を中心に疾患由来 iPS 細胞の樹立を進める。また、疾患 iPS 細胞樹立の効率化のため、現在用いていない Glis1 などのリプログラミング因子の併用や、p53 経路や p16 経路の阻害、エピゲノム修飾試薬の併用といった取り組みを行う。特に急性骨髄性白血病細胞(AML)からの iPS 細胞樹立にはいまだ成功していない。AML において高頻度に見られるキメラ遺伝子による血球分化抑制機能がリプログラミングに対しても阻害的に働いていると考えられるため、キメラ遺伝子特異的な shRNA を作製し、Tet-on レンチウイルス shRNA 発現ベクターなどを用いてその発現を抑制して、iPS 細胞樹立を目指す。特に t(8;21) 転座による RUNX1-ETO 陽性 AML を対象とする。

・樹立した疾患 iPS 細胞からの血球系への分化誘導

樹立した疾患 iPS 細胞を用いて、間葉系細胞株 10T1/2 細胞との共培養によって多能性の血液前駆細胞を濃縮した囊状の構造物(iPS cell-derived sac)を形成させる手法により、効率的に造血細胞を誘導することが可能になっている。われわれはこれまでに、CML 由来の iPS 細胞は血球に分化するに伴い CML 治療薬イマチニブへの感受性を生じることを確認した。また、造血系に重要な転写因子である RUNX1 の変異を先天性に有し血小板減少を特徴とする FPD 患者の皮膚線維芽細胞から樹立した iPS 細胞を用いた解析の結果、FPD 由来 iPS 細胞から分化した血球では巨核球系への分化の効率が悪く、巨核球の分化成熟に障害が見られること、すなわち iPS 細胞由来の造血細胞で原疾患の病態が再現されることを見出した。われわれはこの新しい iPS 細胞を用いて、RUNX1 変異の造血器腫瘍成立における意義を追究している。まず、FPD は AML へ高頻度に進展することが知られているので、FPD 由来 iPS 細胞に白血病遺伝子の候補を導入して血球に分化させ、RUNX1 変異 AML のモデルを確立する。また、ゲノム編集技術を用いて RUNX1 変異を修復することによって、FPD 由来 iPS 細胞の血小板分化障害を根本的に治せるかどうか解析している。われわれは今年度、人工酵素 TAL エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)を用いてヒト細胞の RUNX1 部位特異的にゲノムを切断し欠失変異を挿入することに成功した。来年度は iPS 細胞における TALEN を用いたゲノム編集を確立し、FPD 由来 iPS 細胞の RUNX1 変異修復が FPD の治療として成り立つかどうか明らかにする。

・疾患 iPS 細胞を用いた白血病幹細胞特異的な分子病態・シグナル異常の同定、および分子標的療法の開発

われわれはこれまでに樹立した CML 由来 iPS 細胞を用いて細胞内シグナル解析を行ない、CML に特異的なキメラ遺伝子 BCR-ABL によって活性化されるリン酸化シグナルが、STAT5, CRKL リン酸化のように CML の特効薬であるイマチニブによって阻害されるものと、ERK1/2, AKT リン酸化のようにイマチニブによって阻害されないものに分かれることを見出した。ここから

iPS 細胞にはそれ自体に AKT や ERK1/2 をリン酸化する機構が備わっていると考えられた。さらに、CML 由来 iPS 細胞を血球に分化させた際に、他の分画はイマチニブに反応しアポトーシスが誘導されるのに対し、CD34 陽性 CD38 陰性 CD90 陽性の細胞は iPS 細胞同様のイマチニブ耐性を示すことを明らかにした。この分画では iPS 細胞のような AKT, ERK1/2 の活性化機構が存在する可能性があり、イマチニブでは除去しきれない CML 細胞の特性に関する興味深い所見と考えられた。これらの成果を *Blood* 誌に報告した¹⁾。

疾患由来 iPS 細胞とそこから分化した造血細胞は患者サンプル自体に比べてサンプル間のばらつきが小さく、疾患に関係する分子生物学的な特徴が表れやすいと考えられる。この点をいかして、これまでに樹立した疾患由来 iPS 細胞を用いて網羅的な遺伝子発現解析やエピゲノム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析などを行ない、疾患に特異的な異常を同定する。

今年度は、疾患由来 iPS 細胞から均質な血球を十分な量得られる長所をいかし、分化血球を用いた治療薬候補探索スクリーニングを開始した。われわれが樹立した JAK2 変異陽性 MF 由来 iPS 細胞から分化した血球において、JAK2 阻害剤を投与すると JAK2 シグナルの活性化型変異 V617F を有する血球が高率にアポトーシスに陥ることを見出した。来年度はこの阻害剤以上に MF に対する抑制効果を示す化合物を、ライブラリなどを活用して探索する。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

1. Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N, Otsu M, Nagae G, Ueda K, Nakazaki K, Kamikubo Y, Eto K, Aburatani H, Nakauchi H, Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood.*, 2012, **119**(26):6234-42.

(DOI:10.1182/blood-2011-07-367441)