

「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」
平成 22 年度採択研究代表者

H25 年度 実績報告

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. 研究実施の概要

疾患 iPS 細胞樹立

症例ごとの腫瘍細胞の性質の多様性を iPS 細胞疾患モデルに反映するには多くの症例から iPS 細胞を樹立することが重要であるため、昨年度に引き続きさまざまな造血管腫瘍疾患由来 iPS 細胞の樹立を進めた。主にエピゾーマルベクター(pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL)を用いた手法で、既に樹立に成功していた慢性骨髄性白血病(CML)、慢性骨髄単球性白血病(CMMoL)の異なる患者や、新たに骨髄異形成症候群(MDS)患者の細胞から疾患 iPS 細胞を樹立した。

疾患 iPS 細胞の血球への分化誘導と解析

樹立した疾患 iPS 細胞を用いて、C3H10T1/2 細胞との共培養法によって *in vitro* で血球を分化誘導し、生体造血組織において造血幹・前駆細胞(HSPC)を豊富に含む CD34 陽性 CD43 陽性分画を分離した。最近われわれが樹立した CMMoL 由来の iPS 細胞(CMMoL-iPS 細胞)から分化誘導した HSPC は、半固形培地上で正常のものに比べて多数の未熟な単球系細胞から成るコロニーを形成した。この細胞は未熟な状態を維持したまま無限に増殖可能であり、CMMoL の疾患特性を再現していた。また、NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic 免疫不全マウスに CMMoL-iPS 細胞を移植し、形成された奇形腫から分離した血球分画にも、同様に *in vitro* で無限に増殖可能な単球系幼若細胞が含まれていた。この細胞を免疫不全マウスへ移植して生着を観察中であり、個体レベルで CMMoL を再現する新しいモデルの樹立が期待される。われわれはさらに、CMMoL-iPS 細胞やそこから分化誘導した HSPC を用いて網羅的遺伝子発現解析と DNA メチル化解析を行った。患者検体をそのまま用いた解析に比べてサンプル間の非特異的な差異が縮小してより病態との関連が強い異常が浮かび上がり、CMMoL の病態に関連した高発現遺伝子の候補を新規に同定することができた。現在それらの機能解析を進めている。

遺伝性の血小板減少症である Familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia (FPD)患者の皮膚線維芽細胞から樹立した RUNX1 R174X 変異を有する iPS 細胞由来血球で巨核球系の分化成熟障害が起こることを確認していたが、本年度、われわれは Transcription Activator-Like Effectors Nucleases(TALEN)技術を用いたゲノム編集によって iPS 細胞で同変異を修復し、これを分化誘導した血球で巨核球系の分化成熟障害が解消することを示した。本 iPS 細胞は RUNX1 遺伝子の機能異常をベースにした白血病発症を解析する上での良いツールと考えられ、RUNX1 遺伝子の機能異常と協調する可能性がある遺伝子異常としてわれわれが見出した CDC25C 遺伝子変異との分子生物学的な関係などの解析を進めている。

iPS 細胞を利用した標的治療薬の探索

iPS 細胞の、生理的な状態に近い腫瘍細胞を自由に増幅できる利点を活かして、セルベースの薬効評価アッセイを行った。骨髄線維症(MF) iPS 細胞由来の血球が臨床的に効果のある JAK2 阻害剤で抑制されることを昨年度に観察しているが、今年度は新規標的治療薬の探索として MF に対する効果が未知の化合物を加えてその効果を観察した。現在までに 2 種類の化合物に MF 特異的な抑制作用が認められており、さらに解析を進めている。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

1. Hosoi M, Kumano K, Taoka K, Arai S, Kataoka K, Ueda K, Kamikubo Y, Takayama N, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells derived from primary and secondary myelofibrosis patient samples. *Exp Hematol*, accepted.
2. Kumano K, Arai S, Kurokawa M. Generation of iPS cells from normal and malignant hematopoietic cells. *Int J Hematol*, **98**:145-52, 2013
(doi:10.1007/s12185-013-1385-x)