

# 疾患特異的 iPS 細胞を用いた先天性免疫不全症の病態解析

中畑 龍俊

京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門疾患再現研究分野

## 研究要旨

先天性免疫不全症の病因解明、病態解析のため、疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析系の構築に取り組んでいる。本年度は、血球分化系の改善として、従来より開発している二次元の無血清、フィーダー細胞を用いない血球分化法を拡張し、新たなスキャフォールドを用いた 3 次元培養法を確立した。PET 線維で補強したコラーゲンスポンジを基材として用いることにより、従来の血球系より長期間の培養が可能になり、またニッシュ細胞を 3 次元構築することが可能になった。この系で単球系細胞や顆粒球系細胞の大量培養が可能になると期待される。また、各種免疫不全症の疾患 iPS 細胞を樹立し、疾患の病態解析を開始した。このうち、*LYST* 変異を持つ Chediak-東症候群 (以下 CHS) 2 例より iPS 細胞を樹立し、好中球へ分化させたところ、好中球が持つ顆粒は対照に比べ有意に大きく、病態再現を行えたと考えた。CHS ではまた、現在好中球への分化特性の解析を行っている。*AK2* 変異を持つ細網異形成症患者 2 例より iPS 細胞を樹立して解析を行ったところ、好中球の成熟障害と T 細胞分化不全を認め、血球分化不全の再現に成功した。

## A. 研究の目的

先天性免疫不全症は、易感染性を呈し、適切な診療を行わなければ致命的になりうる疾患であるが、早期の介入により予後の改善が期待できる。しかし、病因や発症のメカニズムが判明していない患者が多数存在し、これらの患者の病態解明が行えれば臨床的な貢献は大きいと考えられる。そこで我々は、先天性免疫不全症の iPS 細胞を用いた解析を行い、病態解明を行うことを目的としている。iPS 細胞は京都大学の山中らによって見出された多能性幹細胞で、皮膚や血球などから樹立することができ、様々な体細胞に分化させることができる。患者 iPS 細胞を各種免疫担当細胞に分化させ、その分化過程や形成された細胞の機能を正常人 iPS 細胞由来の細胞と比較、解析することにより、先天性免疫不全症の病態解明や創薬に向けた手がかりを目指す。

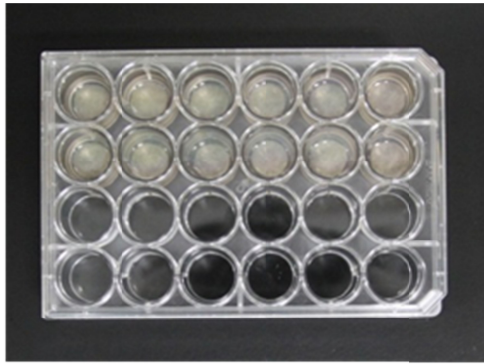
## B. 研究方法

### 血球分化系開発

ヒト ES/iPS 細胞コロニーをコラゲナーゼで解離し、非接着培養用に処理した培養皿で浮遊培養を行う。基礎培地としては主に臍帯血の *ex vivo* 増幅に用いられる無血清培地を用いる。サイトカインは主に ES/iPS 細胞の中胚葉分化に VEGF、造血分化に SCF, TPO, FL, IL3, EPO を用い、それらの濃度と投与期間を変えて検討した。3 次元スキャフォールドとして、PET 繊維補強コラーゲンスポンジ (PETcol-24W) を MedGEL CO., LTD から購入して使用した。

### 疾患特異的 iPS 細胞の解析

前年度までに樹立した細網異形成症患者 2 例より樹立した iPS 細胞株及び CHS 患者 2 例より樹立した iPS 細胞株を血球分化させ、各種検討を行った。なお、血球前駆細胞および成熟骨髓球系細胞への分化については我々の血球分化系を、T 細胞への分化については OP9-DL1 系を用いた。



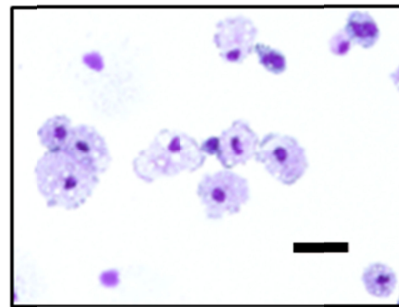
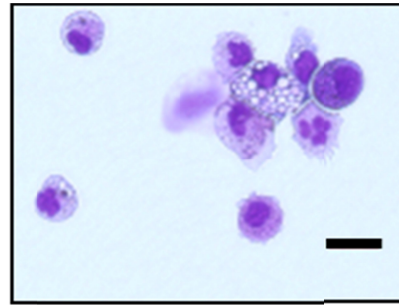
## 24穴プレートで培養中のCS

尚、iPS 細胞に関する本研究における患児の遺伝子情報の取り扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”及び文部科学省研究振興局長通知に定める細則に沿って、京都大学医の倫理委員会の審査承認を受けている（実施責任者：中畑龍俊、当初承認日：平成 20 年 6 月 4 日、変更・追加承認日：平成 24 年 7 月 19 日）が、人権及び利益の保護について、十分配慮しながら実験を行った。患者からの疾患関連 iPS 細胞作製にあたり、「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究」について、京都大学医の倫理委員会の承認を頂いている（実施責任者：中畑龍俊、当初承認日：平成 20 年 6 月 4 日、変更・追加承認日：平成 24 年 7 月 19 日）。

### C. 研究結果

#### 血球分化系開発

最初に、我々が以前に開発した二次元・マトリゲル上の血球分化系（以下 2D-MG 系）を応用して、CS 上の血球分化を行えるかを検討した。すると、従来の方法と同様に、Day 6 の flow cytometry では、KDR+CD34+の中胚葉系の血球前駆細胞と考えられる分画が生じていた。その割合は、クローン毎に様々であったが、2D-MG 法と同程度であった。



## 好中球様細胞(上)と 単球様細胞(下)

次に、上述の造血前駆細胞分画から各種血球細胞を得るために幾つかのサイトカインの組み合わせを用いて血球分化を行った。概ね day 20 頃からスポンジから浮遊細胞の出現が顕著になり、well の底に溜まっていく。これらの細胞は、スポンジを取り出して残りの培養上清を遠心することにより簡単かつ繰り返し回収することができる。得られた血球細胞の細胞表面マーカーと形態を観察すると、サイトカインカクテルの組み合わせにより、好中球系細胞、単球系細胞あるいは赤芽球系細胞を作り分けることが可能であった。

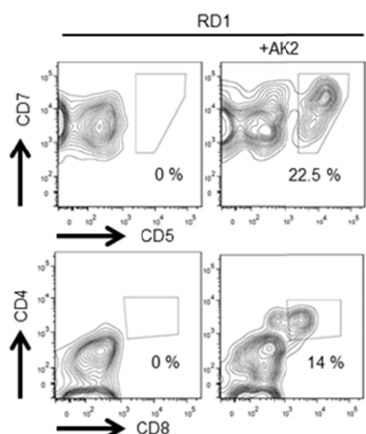
#### 疾患特異的 iPS 細胞の解析

##### 細網異形成症患者由来 iPS 細胞の機能解析

昨年度までに樹立した細網異形成症患者由来の iPSC とその AK2 補充クローンについて、徳島大学の野間隆文先生のご協力を頂き、AK2 活性を測定した。

AK2 活性は、患者 iPS 細胞クローンで著明に低下しており、AK2 の補充により回復した。これにより、

AK2 の酵素活性が患者由来細胞では確かに低下していることが確認できた。

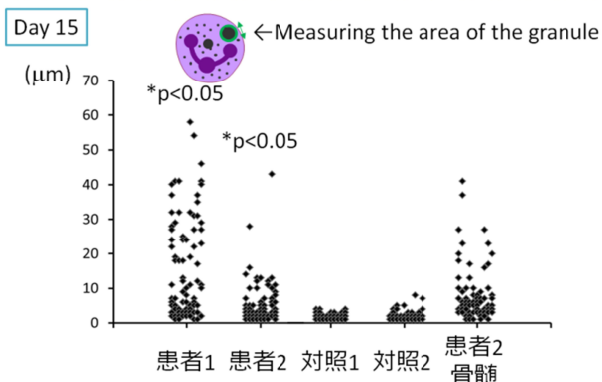


前年度までに検討した各種血球分化能の評価に加えて、T 細胞分化能の評価を行った。結果は上図の通りであり、患者 iPS 細胞由来クローンの T 細胞分化は発生の早い段階で阻害されており、CD34+CD7+CD5+ の ProT1 細胞は出現するものの、CD34+CD7+CD5+ ProT2 細胞への移行が阻害されていることが明らかになった。この分化障害は、AK2 の補充により、改善した。

#### CHS 由来 iPS 細胞の機能解析

CHS 患者由来 iPS 細胞を好中球へ分化させ、MPO 陽性顆粒の大きさを比較した。下図の様に、患者由来 iPS 細胞より分化させた好中球では有意に細胞内顆粒が大きく、患者の病態の一部を再現し得たと考えられた。

### 各細胞が持つ最大の顆粒の面積を比較



#### D. 考察

このような 3 次元スキャフォールドを用いた多能性幹細胞からの血球分化系は過去に報告がない。この分化系は、従来の 2D-MG 系などに比べて長期間維持が可能であることや、ニッシュと血球系前駆細胞を一塊として可搬性のある基材上で誘導できることから、複数の CS を浮遊培養に持ち込むことにより大量の血球細胞を継続的に得ることが可能になるかもしれない。また、ニッシュと血球系前駆細胞を一塊として免疫不全マウスに移植するという応用も考えられる。

もちろん現時点ではニッシュの機能は不十分ではあるものの、今後改善を重ねて系を改良することにより、より有用な系が開発できるものと期待される。

細網異形成症の原因分子である AK2 タンパクは、ミトコンドリア膜間隙に存在し、 $ATP \cdot Mg^{2+} + AMP \rightarrow ADP \cdot Mg^{2+} + ADP$  という可逆性の反応を触媒するキナーゼであり、細胞内のエネルギー状態をモニタリング・調節しているとされる。さらに、AK2 タンパクはアポトーシスにも関連するという報告があり、このような重要な分子の異常細胞からの iPS 細胞樹立は予想以上に困難であった。しかし、レンチウイルスベクターにて AK2 を過剰発現させた後に、リプログラミング因子を導入することによって、世界で初めて細網異形成症患者由来の iPS 細胞樹立に成功した。

細網異形成症由来 T リンパ球の分化実験では、ヒト iPS 細胞を用いることにより、T 細胞免疫不全症の分化障害のステージの特定が可能であることが示された。従って、原発性免疫不全症の解析に置いて、iPS 細胞の有用性は高いものと考えられる。

CHS については、昨年度にも巨大顆粒の再現を報告したが、解析数を増やすことにより、統計学的な差異を明らかにし、定量的な評価が可能となった。

#### E. 結論

免疫不全疾患の解析や移植実験に有用な、新たな多能性幹細胞からの分化誘導系を開発することがで

きた。また、細網異形成症と CHS の iPS 細胞を用いた病態解析について、進展が見られた。

#### F. 研究危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T: Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica*. 99: 19-27, 2014
2. Nakazawa Y., Saito S., Yanagisawa R., Suzuki T., Toshiro Ito T., Ishida F., Muramatsu H., Matsumoto K., Kato K., Ishida H., Umeda K., Souichi Adachi S., Nakahata T., Koike K.: Recipient seropositivity for adenovirus type 11 is a highly predictive factor for the development of AdV11-induced hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 48:737-739, 2013.
3. Saida S, Watanabe KI, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T: Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood*.; 121(21):4377-87, 2013.
4. Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK: Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions. *PLoS One*. 8: e59243, 2013
5. Tomizawa D., Akio Tawa A., MD/PhD, Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe K., Nakahata T., Adachi S.: Excess reduction of anthracyclines results in inferior event-free survival in core binding factor acute myeloid leukemia in children; a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). *Int Hematol*. 98(5):578-88. 2013
6. Kodera Y, Yamamoto K, Harada M, Morishima Y, Dohy H, Asano S, Ikeda Y, Nakahata T, Imamura M, Kawa K, Kato S, Tanimoto M, Kanda Y, Tanosaki R, Shiobara S, Kim SW, Nagafuji K, Hino M, Miyamura K, Suzuki R, Hamajima N, Fukushima M, Tamakoshi A; for the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Halter J, Schmitz N, Niederwieser D, Gratwohl A.: PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. *Bone Marrow Transplant*. [Epub ahead of print]
7. 斎藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞。再生医療 12(1):19-29,2013.
8. 中畑龍俊、岡野光夫、高橋政代：再生医療の現状と将来。HUMAN SCIENCE Vol.24 No.3:4-13, 2013年7月 ヒューマンサイエンス振興財団発行
9. 中畑龍俊：総論 疾患 iPS 細胞の樹立と臨床病態解析への応用。Medical Science Digest(MSD)

学会発表

1. 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞研究が切り開く未来の医療．日本学術会議公開学術講演会「未来社会を築く生命科学と医療のフロンティア」2013年8月3日 京都大学薬学部記念講堂
2. 中畑龍俊：教育講演、iPS 細胞の臨床応用．第55回日本小児血液・がん学会学術集会．2013年11月29日-12月1日(30日) ヒルトン福岡シーホーク
3. 中畑龍俊：基調講演、iPS 細胞を用いた今後の医療の可能性．日本製薬医学会第4回年次大会2013年7月19日 エーザイ株式会社本社5階ホール
4. 中畑龍俊：基調講演、iPS 細胞を活用した医療の可能性と倫理．第10回 STS フォーラム「科学技術が拓く人間の未来」公開シンポジウム2013年10月5日 京都商工会議所ビル講堂
5. 横山宏司、西小森隆太、池谷真、那須輝、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男：罹患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の分子機構の解明．第34回日本炎症・再生医学会 2013年7月2-3日(ポスター) 国立京都国際会館
6. Hasegawa D., Hama A., Nozawa K., Salaguchi H., Yabe M., Ito E., Ito M., Kojima S., Nakahata T., Manabe A.: Hematological and morphological characteristics of inherited bone marrow failure syndromes (IBMFS). The 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2013年10月11-13日(12日) さっぽろ芸文館
7. Suzuki N., Hira A., Niwa A., Matsuo K., Takata M., Yabe M., Nakahata T., Saito M.: Mesodermal development from reprogrammed Fanconi anemia cells is affected by ALDH2 enzymatic activity. 11<sup>th</sup> Annual Meeting of international Society for Stem Cell Research (ISSCR). 7/12-7/15, Boston, MA, USA.
8. 中畑龍俊：特別講演、さい帯血造血幹細胞発見秘話と iPS 細胞ストックの臍帯血活用の未来像．さい帯血移植 1 万例突破記念事業「さらなる飛躍へのステップ」記念講演会 2013年9月28日 TKP 田町カンファレンスセンター
9. Saida S., Watanabe K., Sato-Otsubo A., Terui K., Yoshida K., Okuno Y., Toki T., Wang R., Shiraishi Y., Miyano S., Kato I., Umeda K., Hiramatsu H., Fujino H., Adachi S., Nakahata T., Ito E., Ogawa S., Heike T.: Xenograft model of TAM reveals the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. The 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (第75回日本血液学会学術集会) 2013年10月11-13日(12日) さっぽろ芸文館,札幌
10. Honda Y., Tsuchida M., Masunaga A., Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 17 children with JMML who developed blast crisis. The 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (第75回日本血液学会学術集会) 2013年10月11-13日(12日) 札幌市教育文化会館

【H.知的財産権の出願・登録状況】

特になし。