

## 細網異形成症患者および重症先天性好中球減少症患者由来 iPS 細胞樹立およびそれを用いた病態解析

研究分担者 中畑 龍俊(京都大学 iPS 細胞研究所 特定拠点教授)

研究協力者 丹羽 明 (京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門)

齋藤 潤 (京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門)

森嶋 達也(京都大学大学院医学研究科発達小児科学)

平家 俊男(京都大学大学院医学研究科発達小児科学)

### 研究要旨

細網異形成症および重症先天性好中球減少症はともに重症の好中球成熟障害を伴う免疫不全症であり、患者は易感染性を示す。根本治療は造血幹細胞移植であり、移植前の血球も著明に減少していることから、患者から血液細胞を採取し、病態解析を行うことは非常に困難である。このため、患者由来 iPS 細胞樹立はこれらの疾患の病態解析にとって、非常に有望と考えられる。我々は本研究において、AK2 変異を伴う2名の細網異形成症患者および HAX1 変異をともなう1名の重症先天性好中球減少症患者から iPS 細胞を樹立することに成功した。患者由来 iPS 細胞からの好中球への分化アッセイを行ったところ、正常 ES/iPS 細胞や正常原因遺伝子修復後の患者由来 iPS 細胞からの好中球と比較して、著明な好中球分化障害を認めた。細網異形成症については、T 細胞分化欠損も確認された。引き続き、両疾患の病態を解明するための研究を進めていく予定である。

### A. 研究の目的

細網異形成症および重症先天性好中球減少症はともに重症の好中球成熟障害を伴う免疫不全症であり、患者は易感染性を示す。根本治療は造血幹細胞移植であり、移植前の血球も著明に減少していることから、患者から血液細胞を採取し、病態解析を行うことは非常に困難である。このため、患者由来 iPS 細胞樹立はこれらの疾患の病態解析にとって、非常に有望と考えられ

る。本研究では、細網異形成症や重症先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞を樹立し、血球分化解析を行うことによって、両疾患の病態解析・解明を行うことを目的とする。

### B. 研究方法

平成 24 年度までに樹立した細網異形成症患者及び重症先天性好中球減少症患者由来の線維芽細胞から iPS 細胞を作製し、これを血液前駆細胞に分化させ、コロニー

アッセイ、骨髄系細胞やリンパ球への分化アッセイ、アポトーシス解析などの in vitro 解析を行う。さらに細網異形成症の原因遺伝子である AK2 遺伝子または重症先天性好中球減少症の原因遺伝子である HAX1 をそれぞれの患者由来 iPS 細胞へを導入し、本疾患の血球分化障害が回復するかどうか検討する。

細網異形成症患者由来の iPS 細胞の樹立は、標準的手法である 4 因子 (Oct, Klf, c-Myc, Sox4) をレトロウイルスベクターやセンダイウイルスベクターで導入する方法では樹立不能であったため、線維芽細胞の段階で正常 AK2 遺伝子をレンチウイルスベクターで導入後に、iPS 細胞の樹立を行った。この際、iPS 細胞からの血球分化実験などの際に、導入した AK2 遺伝子を除去できるように、AK2 遺伝子を loxP サイトで挟んだ。一方、重症先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞樹立は、4 因子 (Oct, Klf, c-Myc, Sox4) もしくは 3 因子 (Oct, Klf, Sox4) をレトロウイルスベクターで導入する方法を用いた。

2 名の細網異形成症患者 (RD-1 と RD-2 とする) および重症先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞を樹立後、iPS 細胞としての品質を評価するために、染色体検査、AK2 および HAX1 遺伝子の変異の確認、トランスジーンサイレンシングの確認、および免疫不全症マウスを用いた奇形腫作成能等の評価を行った。

iPS 細胞からの血球分化は、当研究室で開発された、動物由来の不確定要素を含まない無血清培地を用いて、中胚葉前駆細胞を経て造血細胞を産生する培養法を用いた。血球分化の評価は、メイギムザ

染色による血球の形態の確認とフローサイトメトリーによる血球の表面マーカーを用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、疾患を有する患者さんから検体を頂き iPS 細胞を作製して行う研究であるため、患者さんの同意・協力を必要とする研究である。また、作製する iPS 細胞を用いた疾患解析においては、遺伝子解析が必須であり、個人情報取り扱いの配慮を必要とする研究である。この2点に対して、京都大学医学部医の倫理委員会に、ヒトを対象とした医学の研究および臨床応用実施申請書として「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」およびヒト遺伝子解析申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」の2申請を行った。その後、京都大学医学部医の倫理委員会での審査を頂き、平成20年6月4日付けで、実施に関して承認を頂いた。本研究においては、その内容を忠実に順守して行った。

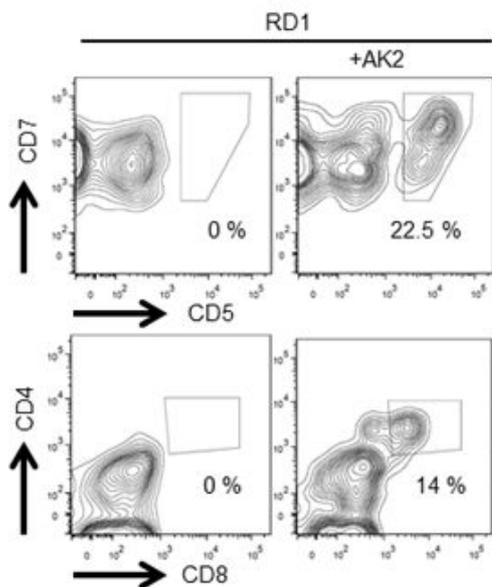
## C. 研究結果

### 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。

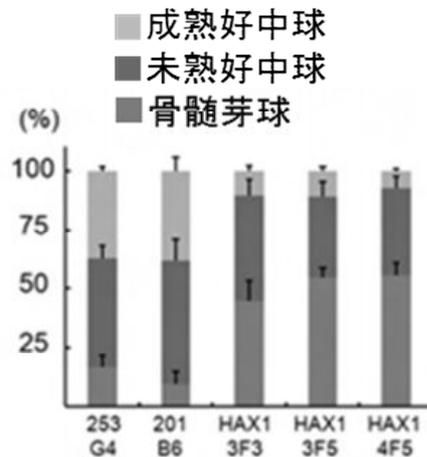
AK2 活性は、患者 iPS 細胞クローンで著明に低下しており、AK2 の補充により回復した。これにより、AK2 の酵素活性が患者由来細胞では確かに低下していることが確認できた。

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。結果は下図の通りであり、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。



### 重症先天性好中球減少症患者由来 iPS 細胞の機能解析

京都大学小児科平家俊男先生との共同研究により、昨年度までに樹立した SCN 患者 iPS 細胞を血球へ分化させたところ、成熟好中球への分化が阻害されていた(右上図)。



SCN 患者由来 iPS 細胞から分化させた好中球は、ラクトフェリン、ゲラチナーゼ、好中球エラスターゼの発現が有意に低下していた。また、未熟血球細胞のコロニー形成能が有意に低かった。

これらの血球分化異常は、HAX1 遺伝子を強制発現することにより回復した。

### D. 考察

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、 $ATP-Mg^{2+} + AMP \rightarrow ADP-Mg^{2+} + ADP$  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。一方で、重症先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞樹立は従来法にて成功した。樹立された両疾患由

来の iPS 細胞は品質としても問題はなく、維持培養も容易に行えている。

両疾患において、血球分化による病態再現をすることに成功した。両疾患ともに、正常コントロールや原因遺伝子の強制発現クローンに比べて、明らかに好中球分化が障害されていた。具体的には患者 iPS 細胞由来の血液像では、骨髄芽球が多くを占め、成熟好中球は認めなかった。これは、実際の患者の移植前骨髄像と所見が一致しており、病態再現に成功したと考えられる。このように全く異なる遺伝子が原因であるにも関わらず、同様の結果が示されたことは興味深い。

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。

## E. 結論

上記結果で示したように、2 名の細網異形成症患者および 1 名の先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞からの血球分化系において、病態の再現に成功した。今後、さらに踏み込んだ病態解析を行う予定である。

## F. 研究発表

### 1. 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. 2013 Aug.23. doi:10.3324/haematol.2013.083873 in press

- 2) 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. May 23; doi:10.1182/blood-2012-12-474387.
- 3) 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.* 4/3/ 2013; 8(4): e59243. doi:10.1371/journal.pone.0059243
- 4) Tomizawa D., Tawa A., 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.: Appropriate dose modification in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia; a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). *Int. Hematol.* 2013 Nov;98(5):578-88. doi: 10.1007/s12185-013-1429-2.
- 5) Honda Y., Tsuchida M., Zaike Y., Masunaga A., Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic leukemia who

developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology (JSPHO). Brit. J. Haematol. In press.

- 6) 齋藤潤、中畑龍俊:疾患特異的 iPS 細胞. 再生医療 12(1):19-29,2013.

## 2. 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:特別講演、iPS 細胞の小児医療への応用. 第38回東日本小児科学会 2013年11月23日 大宮ソニックスシティ(さいたま市)
- 3) 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
- 4) 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(塩野義製薬)
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2013年10月11-13日(12日) さっぽろ芸文館

- 8) 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. 11th Annual Meeting of international Society for Stem Cell Research (ISSCR). 7/12-7/15, Boston, MA, USA.
- 9) 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 75th 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)札幌市教育分化会館
- 10) 中畑龍俊:iPS 細胞による疾患モデル樹立と創薬への展望. 日経バイオテクプロフェッショナルセミナー「次の10年間 iPS 細胞実用化をリードする iPS 細胞創薬の現状と課題」2013年6月19日 コクヨホール(東京) 日経 BP

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし