

細網異形成症由来 iPS 細胞を用いた病態解析

研究分担者	中畑 龍俊	京都大学iPS細胞研究所
研究協力者	佐伯 憲和 齋藤 潤	京都大学iPS細胞研究所 京都大学iPS細胞研究所

研究要旨

希少な原発性免疫不全症候群(PID)症例の正確な診断を行うため、重症型免疫不全症の一種である細網異形成症患者さんから iPS 細胞を樹立し、表現型解析を行った。結果、本疾患における多系統での分化異常は極めて初期の血液前駆細胞の分化機能異常により引き起こされ、AK2 によるミトコンドリア-核間でのエネルギー分子の分布調節が分化運命決定に重要な役割を担うことを明らかにした。これまで言及されていなかったエネルギー分子ネットワークに着目したことで、未知の病態メカニズムの一端を示し、今後の治療戦略における重要な知見となることが期待される。

A. 研究目的

細網異形成症 (Reticular dysgenesis 通称 RD) は好中球系顆粒球および T、B、NK リンパ球を欠如する重症型免疫不全症の一つで、本邦では 4 例、その他諸外国にても約 60 例程度の報告と非常に希少な疾患の一つである。本疾患はミトコンドリア膜間隙に存在し、エネルギー分子である ATP の細胞内輸送を担う AK2 の機能喪失変異が原因であることが知られているが (Lagresle-Peyrou *et al.*, *Nat. Genet.*, 2009)、AK2 の異常が引き起こす細胞内のエネルギー分子の分配異常が、幅広い免疫細胞の分化異常にどのように関係しているかは不明である。そこで 2 名の RD 患者さんから人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPSCs) を作製し、血液細胞および血液前駆細胞を分化誘導し、解析を行なうことで、AK2 によるエネルギー分子分布調節機構と分化表現系との関係性にアプローチした。

B. 研究方法

本疾患は多系統の血液細胞の分化異常を呈することを特徴としているため、*in vitro*における分化系によって iPS 細胞より骨髄球系、T リンパ球系の血液細胞へ分化誘導を実施し、分化表現系を評価した。さらに分化途中段階の前駆細胞に疾患の原因があることが予想される

ことから、分化段階ごとに細胞表面マーカーの解析を行い、細胞集団の構成を確認し、各前駆細胞の分化能をメチルセルロース下での造血コロニー形成アッセイによって評価した。AK2 の主要な役割であるエネルギー分子の動的な局在変化が、前駆細胞の分化運命決定に強く影響を与えることが考えられるが、これまでの分化段階ごとの代謝解析は細胞全体を平均化した定量方法が主であり、細胞内小器官ごとのエネルギー分子の量に関しては言及されてきていなかった。そこで、ATP 濃度に応じて蛍光共鳴エネルギー移動によって蛍光色が変化し、付与された局在化シグナルによって細胞質、ミトコンドリア、核それぞれの ATP 分布を定量できる蛍光プローブである ATeam (Imamura *et al.*, *PNAS*, 2009) を RD-iPSCs に導入後、分化誘導した前駆細胞を高解像共焦点顕微鏡によって 1 細胞・1 細胞小器官レベルで観察・撮影し、ATP 分布の定量的な評価を実施した。

(倫理面への配慮)

1. 患者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”に沿って、京都大学倫理審査委員会の審査承認を受けているが、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う。
2. 組み換え DNA 実験については、“組み換え DNA 実験指針”に基づき、研究計画が同指針に示されている基準に適合することを確認したう

えで、計画の申請を京都大学に対して行い、承認を受けた後、規定されている封じ込め手段を適切に行う。

3. 疾患関連iPS細胞作製にあたり、”人を対象とする医学系研究に関する倫理指針”に基づいて、「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」について、京都大学医学部倫理委員会の承認を頂いている。その内容を忠実に順守し、患者さんの同意・協力を得て行う。

C. 研究結果

1) RD 患者由来 iPS 細胞の分化表現系評価

作製した RD 患者由来 iPS 細胞から分化誘導を行い、得られた好中球細胞像は、分葉核を持たない未熟なものであった (図 1A)。次に T 細胞分化誘導後の細胞表面マーカーである CD5, 7 および CD4, 8 の発現を解析したところ、その発現は認められなかった (図 1B)。一方で患者由来 iPS 細胞に対してレンチウイルスベクターを用いて正常 AK2 遺伝子を導入し、血液分化誘導すると、これらの分化異常は正常レベルまで改善された。以上の結果から作製した RD 患者さん由来 iPS 細胞は病態を再現するモデルとして有効であることが示された。

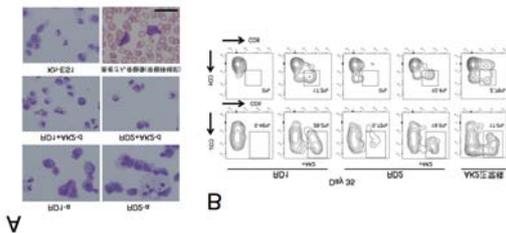


図 1: 細網異形成症患者由来 iPS 細胞から分化誘導した好中球、T リンパ球の分化成熟評価
A: メイ-ギムザ染色像による好中球の成熟評価。上段: 患者由来株 中段: 正常 AK2 導入株 (+AK2) 下段左: Kh-ES1 (健常者コントロール) 下段右: 患者骨髄像 スケールバーは 50 μ m
B: 分化 35 日目における T リンパ球系細胞表面マーカーの解析。患者由来株ではどのマーカーにおいても発現した細胞がほとんどみられないが、AK2 導入株 (+AK2) では正常コントロールと同等の割合まで増加している。

2) RD では初期の造血前駆細胞の段階で分化運命決定に異常がみられる

CD43 陽性の前駆細胞の割合が患者由来 AK2 欠失株において減少していた (図 2A)。次にさらに初期の分化段階である CD34, KDR に関して

解析したところ、CD34, KDR 陽性血液血管共通前駆細胞 (Hemoangiogenic progenitor cells; HAPCs) の割合は逆に増加していた (図 2B)。この増加した HAPCs の血液分化能力を造血コロニー形成細胞アッセイによって評価したところ、著しく分化能が低下していることがわかった (図 2C, D)。この結果から RD では極めて初期の造血前駆細胞において分化障害がおこっていることが示唆された。

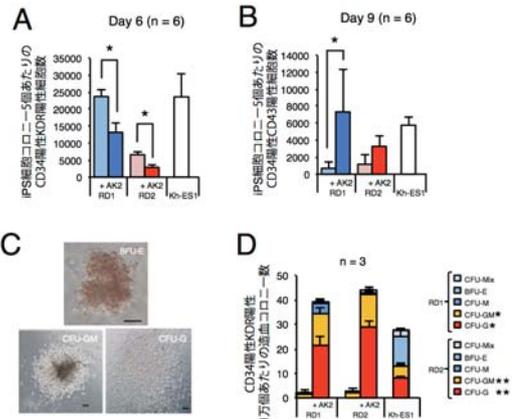


図 2: 血液前駆細胞の表面マーカー解析および分化機能評価

A: 分化 6 日目における CD34, KDR 陽性細胞数。
B: 分化 9 日目における CD34, CD43 陽性細胞数。
C: メチルセルロース中に形成された造血細胞コロニー。
D: CD34, KDR 陽性細胞を用いた造血コロニー形成アッセイ結果。

3) HAPCs における ATP の細胞内分配エラーが細胞内遺伝子プロファイル異常を介して分化障害を引き起こす

Ateam を用いた ATP 分布の定量 (図 3A) を HAPCs に対して実施した結果、患者由来 AK2 欠失株においてミトコンドリアでは ATP 濃度が高く、核では低いことがわかった。この現象は iPS 細胞の段階ではみられず、HAPCs 分化段階に特異的であることが示された (図 3B)。このことから、HAPCs では AK2 の異常によりミトコンドリアから ATP を汲み出せず、その結果、核内 ATP 量が低下することが示唆された。核内の ATP は遺伝子の発現や制御に重要な転写機構に関わることが知られている。そこで、マイクロアレイ解析によって分化ステージごとに遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析し、核内 ATP 量の低下による遺伝子発現への影響を解析した。その結果、患者由来 AK2 欠失株では特に HAPCs の段階で多くの遺伝子発現量に変動

がみられ (図 3 C)、その遺伝子群を遺伝子オン
トロジー解析によって機能を調べると、血液細
胞の分化に関係する遺伝子が有意にエンリッ
チされていた (図 3 D)。

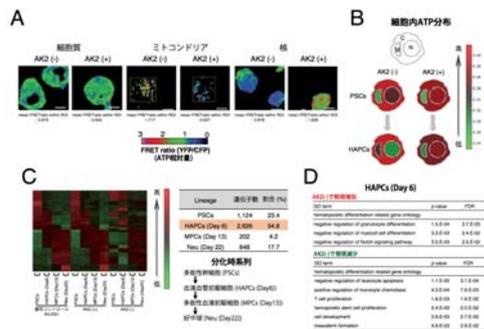


図 4: 血液前駆細胞における細胞内 ATP 分布
の定量解析と遺伝子発現解析

A: 1 細胞中の各細胞小器官における ATP 濃度
定量画像。赤色に近づくほど高い ATP 濃度であ
ることを示す。B: 細胞内 ATP 分布図概略。N: 核、
M: ミトコンドリア、C: 細胞質。多能性幹細胞
の段階では差がみられないが、HAPCs において
は患者由来 AK2 欠失株においてミトコンドリア
では高く、核では低い値を示している。C: 各分
化ステージにおける遺伝子発現プロファイル。患
者由来 AK2 欠失株では発現パターンが異なっ
ており (左)、特に HAPCs において多くの遺
伝子に変動がみられる (右)。D: HAPCs にお
いて発現変動がみられた遺伝子群に多く該当
する血液細胞の分化に関係する機能一覧。

D. 考察

本研究における主たる意義は以下の 2 点で
ある。1) 多系統における分化障害を呈する非
常に稀な疾患に対して、表現系を再現するモデ
ルが得られたこと、またそれによって今まで解
析困難であった多方向に分化能を有する前駆
細胞をステップワイズに解析することで疾患
の原因となり得る分化段階を同定した。2) ATP
一分子定量という、よりミクロな視点によりこ
れまで掴めていなかったエネルギー代謝シス
テムによる分化運命決定機構の一端を示し、ま
たこの機構が RD における多系統分化異常の根
本的な原因である可能性が示唆された。本代謝
解析をさらにマクロな視点であるメタボローム
解析を組み合わせることで、ミトコンドリア
由来 ATP 分子の分布異常に起因する代謝プロ
ファイルの変動を現在解析中であるが、この結
果からボトルネックとなっている代謝経路を同
定し、それをターゲットとした薬剤を用いるこ
とで分化表現系を改善することが見込まれる

(データ未公表)。このように iPS 細胞技術や
様々な視点からの分子プロファイル評価を組
み合わせることで、既存の検査方法では見えな
かった疾患の本質を見出し、新たな治療法の開
発に繋がるかもしれない。

E. 結論

これまで RD に関しては ATP 輸送を担う AK2 が
原因遺伝子としながらも、エネルギー分子の分
布と分化異常との関連性には直接的に言及さ
れてこなかった。本研究は iPSCs による疾患・
血液分化モデルに対して細胞内 ATP の分子イメ
ージングと網羅的遺伝子発現解析を駆使する
ことで、ミトコンドリア-核間での ATP 分布の異
常が、分化異常を引き起こす遺伝子発現プロ
ファイルに制限することを明らかにした。本知見
は今後、エネルギー分子の分布調節機能が持つ
分化制御プロセスの詳細な解明と、RD の根本的
な病態の解明につながることを期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takada S, Kambe N, Kawasaki Y, Niwa A, Honda-Ozaki F, Kobayashi K, Osawa M, Nagahashi A, Semi K, Hotta A, Asaka I, Yamada Y, Nishikomri R, Heike T, Matsue H, Nakahata T, Saito MK*. Pluripotent stem cell models of Blau syndrome reveal an IFN- γ -dependent inflammatory response in macrophages. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Jun 3. pii: S0091-6749(17)30685-1. doi: 10.1016/j.jaci.2017.04.013.
- 2) Chen B., Teng J., Liu H., Pan X., Zhou Y., Huang S., Lai M., Bian G., Mao B., Sun W., Zhou Q., Yang S., Nakahata T, Ma F.: Inducible overexpression of RUNX1b/c in human embryonic stem cells blocks early hematopoiesis from mesoderm. *J. Mol. Cell Biology*, 2017 Aug 1;9(4):262-273. doi: 10.1093/jmcb/mjx032. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjx032>
- 3) Wang H., Liu C., Liu X., Wang M., Wu D., Gao J., Su P., Nakahata T, Zhou W., Xu Y., Shi L., Ma F.: MEIS1 Regulates Hemogenic Endothelial Generation, Megakaryopoiesis, and Thrombopoiesis in Human Pluripotent Stem Cells by Targeting TAL1 and FLI1. *Stem Cell*

Reports 10(2):447–460, 2018. (13 February 2018)

4) Morita K., Noura M., Tokushige C., Maeda S., Kiyose H., Kashiwazaki G., Taniguchi J., Bano T., Yoshida K., Ozaki T., Matsuo H., Ogawa S., Liu PP., Nakahata T., Sugiyama H., Adachi S., Kamikubo Y.: MEIS1 Regulates Hemogenic Endothelial Generation, Megakaryopoiesis, and Thrombopoiesis in Human Pluripotent Stem Cells by Targeting TAL1 and FLI1. *Sci Transl Med.* 2017 Nov 30;7(1):16604 doi: 10.1038/s41598-017-16799-z.

5) 中畑龍俊: 日常診療と血液・腫瘍性疾患 (特集 日常生活にひそむ小児血液・腫瘍性疾患、I . 総説). *小児科診療* Vol.80 No.10, 1151–1156, 2017年10月

6) 齋藤潤、中畑龍俊 : iPS 細胞を用いた血液・免疫疾患の病態解明 *腎臓内科・泌尿器科*. 5(6):599–604, 2017

2. 学会発表

1) 中畑龍俊: 細胞治療の将来. 第65回日本輸血・細胞治療学会総会 (特別講演) 2017年6月23日 幕張メッセ国際会議

2) Hamabata T., Umeda K., Tanaka T., Daifu T., Nodomi S., Saida S., Kato I., Baba S., Hiramatsu H., Niwa A., Saito MK., Kamikubo Y., Adachi S., Hashii Y. Shimada A., Watanabe H., Osafune K., Nakahata T., Watanabe K., Heike T.: iPSC model of Shwachman syndrome reveals the apoptotic predisposition of hemoangiogenic progenitors. The 79th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2017年10月21日 Plenary Session

3) Kato I., Nishinaka-Arai Y., Nakamura M., Akarca A., Niwa A., Ozawa H., Yoshida K., Mori M., Wang D., Morita M., Ueno H., Shiozawa Y., Shiraishi Y., Miyano S., Gupta R., Umeda K., Watanabe K., Koh K., Adachi S., Heike T., Saito M., Sanada M., Ogawa S., Marafioti T., Watanabe A., Nakahata T., Enver T.: Hypoxic adaptation of leukemic cells in the CNS affords a therapeutic strategy targeting VEGFA. The 79th Annual

Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2017年10月22日 Oral Session

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし