

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860405

研究課題名(和文) 若年性骨髄単球性白血病患者のiPS細胞を用いた疾患特異的マーカーと治療薬の同定

研究課題名(英文) Establishment of JMML-derived iPS cells for evaluation of the effect for anti-tumor reagents

研究代表者

松田 和之 (MATSUDA, Kazuyuki)

信州大学・医学部附属病院・主任臨床検査技師

研究者番号：00647084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：センダイウィルスベクターを用いて、若年性骨髄単球性白血病(JMML)患者由来のiPS細胞の樹立に成功した。iPS細胞をマウスストローマ細胞(AGM)上でSCF、BMP4、TPO、及びVEGFのサイトカイン下で培養を行うことにより、恒常的にCD34陽性細胞を誘導することが可能となった。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(LBH589)はJMML CD34陽性細胞の増殖を強く抑制したことから、今後、患者由来CD34陽性細胞を用いて、様々な抗腫瘍薬に対する反応性のスクリーニングを行っていきたい。

研究成果の概要(英文)：We established the JMML-derived iPS cells using Sendai virus vector. CD34-positive cells were differentiated from the iPS cells co-cultured with AGM cells in the presence of cytokines (SCF, BMP4, TPO, and VEGF). And we demonstrated that Histone deacetylase inhibitor suppressed the growth of the CD34-positive cells. The patient-derived CD34-positive cells available constantly are useful to evaluate the effect for anti-tumor reagents.

研究分野：血液疾患における遺伝子・染色体解析

キーワード：若年性骨髄単球性白血病 iPS細胞 センダイウィルス 白血病治療薬スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (MDS) / 骨髄増殖性腫瘍 (MPN) は、造血幹細胞の異常に起因する代表的な難治性血液疾患である。小児の MDS/MPN の中で、若年性骨髄単球性白血病 (JMML) は最も多い病型である。白血病細胞の全てが患者の体内で増殖しているわけではなく、ごく少数の白血病性幹細胞 (LSCs) が自己複製と限られた分化を繰り返し、ニッチと呼ばれる骨髄微小環境の中で静止期にとどまっている。MDS や JMML の根治には LSCs の除去を図らねばならない。治療薬のスクリーニングには、患者から樹立した株化細胞が有用であるが、LSCs 自身の分化能のために未だ樹立されていない。腫瘍細胞からの iPS 細胞樹立の報告を踏まえ、JMML 細胞由来の iPS 細胞の樹立を目指す。iPS 細胞を樹立する際、センダイウイルスを用いる方法はホストゲノムへの挿入がなく、付加的な遺伝子異常を引き起こす危険が少ない上に、少量の血液サンプルから iPS 細胞を作製ができるため、小児血液腫瘍患者からの iPS 細胞樹立に応用できる技術であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 因子を搭載したセンダイウイルスベクターを用いて、若年性骨髄単球性白血病 (JMML) 患者から iPS 細胞を樹立し、白血病性幹細胞 (LSCs) 等を含む異なる成熟段階の血液細胞群を分化誘導する。そして、安定して患者由来細胞を供給できる培養系を構築し、抗白血病効果・薬剤応答について、LSCs を効率よく除去できる特異性の高い白血病治療薬のスクリーニングに応用することである。

3. 研究の方法

(1) JMML 患者由来の iPS 細胞の作製

山中 4 因子 (Sox2, Klf4, Oct3/4, Myc) を搭載したセンダイウイルスを用いた。JMML 患者由来の骨髄単核球と T リンパ球に感染させ、遺伝子導入と細胞の初期化を行った。(以下、多能性の確認を行い iPS 細胞の特徴を満たした細胞を PTPN11 変異陽性 (mt) iPS 細胞、PTPN11 変異陰性 (wt) iPS 細胞と呼ぶ。)

(2) iPS 細胞からの血球分化誘導

iPS 細胞は MEF 細胞をフィーダー細胞として、ES 細胞用培養液を用いて、4-5 日間培養した。血球分化誘導のため、フィーダー細胞をマイトマイシン C 処理済みの大動脈-生殖腺-中腎領域由来ストローマ細胞 (AGM 細胞) に、培養液を IMDM に変え、iPS コロニーを 1 ウェルあたり 20~30 個入れて培養した。その際、SCF (50ng/mL)、BMP4 (40ng/mL)、TPO (10ng/mL) および VEGF (10ng/mL) の 4 種類のサイトカインを同時に加え 2 週間培養した。2 週間後、磁気細胞分離により CD34 陽性細胞を分離・回収した。

(3) PTPN11 mt/wt iPS 細胞から誘導した血球細胞の GM-CSF に対する感受性解析および spontaneous コロニー形成の確認

PTPN11 mt と PTPN11 wt iPS 誘導した CD34 陽性細胞を MethoCult® H4230 (ベリタス) に播き、GM-CSF (10ng/mL) を添加し、1 週間培養した後に、生細胞数を Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) によって測定し感受性を解析した。また、MethoCult® H4230 に播き、サイトカインを加えずに 2 週間培養し、コロニー形成の有無を確認した。

(4) 薬剤の JMML 細胞に対する効果の検討

抗腫瘍薬として、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (LBH589) を用いた。PTPN11 mt iPS 細胞、PTPN11 wt iPS 細胞から上記方法で血球誘導した CD34 陽性細胞を、マイトマイシン C 処理済み AGM 細胞上で、SCF (50ng/mL) TPO (10ng/mL) を加えて培養し、LBH589 を 0nM と 20nM の 2 濃度を添加し、1 週間培養後に生細胞数を Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) によって測定した。

4. 研究成果

(1) JMML 患者由来の iPS 細胞の樹立

変異陽性および陰性の 2 種類の細胞から作製した細胞は、未分化マーカー mRNA・蛋白の発現を示した。また、感染に用いたセンダイウイルスの残存はなく、外来性の山中 4 因子の遺伝子発現は認められなかった (表 1)。OCT3/4, NANOG 遺伝子の脱メチル化状態であり (図 1)、テロメラーゼ活性を有した (図 2)。(図表では、PTPN11 変異陽性由来 iPS 細胞を PTPN11 mt iPS, PTPN11 変異陰性由来 iPS 細胞を PTPN11 wt iPS と表記する)

表 1: JMML 患者由来 iPS 細胞の特性

mRNA 発現	PTPN11 mt iPS	PTPN11 wt iPS
OCT3/4	+	+
SOX2	+	+
KLF4	+	+
MYC	+	+
NANOG	+	+
GDF3	-	-
REX1	+	+
DPPA2	-	-
DPPA4	+	+
DNMT3B	+	+
GAPDH	+	+
transgenic OCT3/4	-	-
transgenic SOX2	-	-
transgenic KLF4	-	-
transgenic MYC	-	-
transgenic SeV	-	-

免疫染色	PTPN11 mt iPS	PTPN11 wt iPS
OCT3/4	+	+
SSEA3	+	+
SSEA4	+	+
Tra 1-60	+	+
Tra 1-81	+	+
SOX	-/+	-/+
NANOG	+	+
SeV	-	-

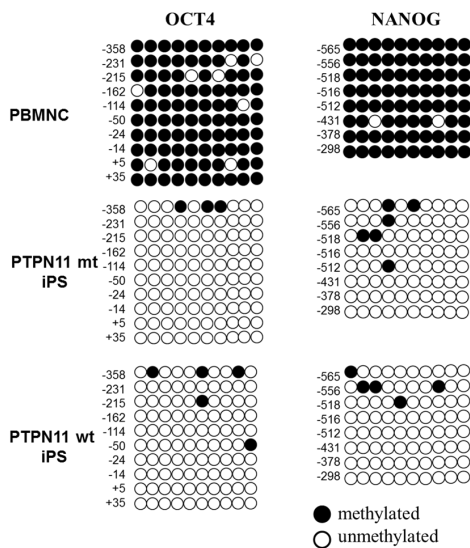


図1 OCT, NANOG 遺伝子メチル化解析

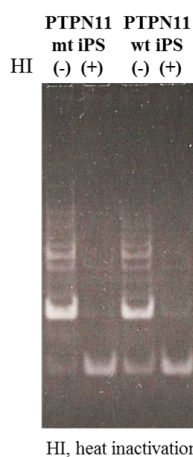


図2 テロメラーゼ活性解析

(2) iPS 細胞からの血球分化誘導

血球分化誘導して得られた細胞をフローサイトメトリー法によって解析した。PTPN11 mt iPS 細胞, wt iPS 細胞から、CD34 陽性 CD45 陽性細胞がそれぞれ 8.96%、8.94% 認められた(図3)。

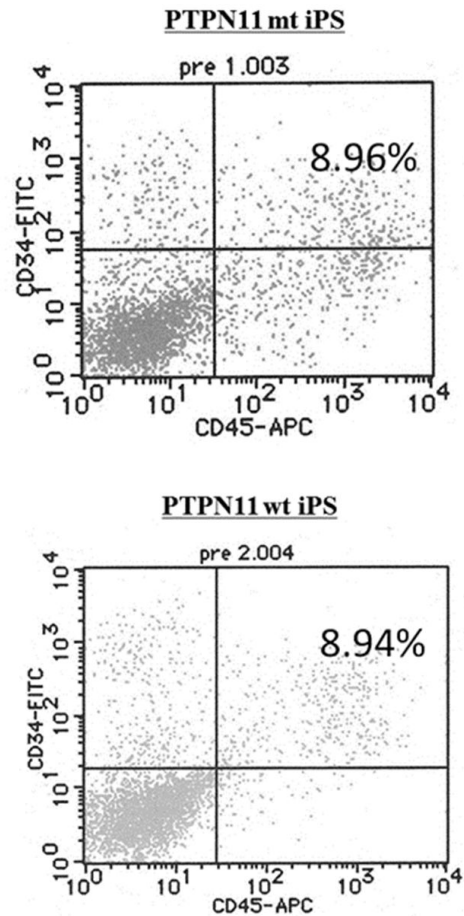


図3 血球分化誘導培養を行い14日目のCD34陽性CD45陽性細胞の割合

(3) PTPN11 mt/wt iPS 細胞から誘導した血球細胞の GM-CSF に対する感受性・spontaneous コロニー形成

PTPN11 mt 由来血球細胞は PTPN11 wt 由来血球細胞よりも有意な増加がみられ、GM-CSF に対する高感受性を示した。また、PTPN11 mt 由来血球細胞は、造血因子非存在下で spontaneous コロニー形成能を示した。

(4) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の CD34 陽性細胞に対する効果の検討

LBH589 は PTPN11 mt 由来 CD34 陽性細胞に対して PTPN11 wt 由来 CD34 陽性細胞よりも有意な増殖抑制効果を示した(図4)。

(5) 今後の展望

本研究により JMML 由来の PTPN11 変異陽性および陰性の iPS 細胞の樹立に成功し、iPS 細胞から CD34 陽性 CD45 陽性細胞の分化誘導を行うことができた。iPS 細胞を経由して腫瘍細胞を再現し、維持・培養する方法を確立することで、恒常的に細胞を供給することが可能となり、今後、JMML の病態解析や新規治療薬の in vitro における反応性解析などの

研究ツールとして利用が期待できる。

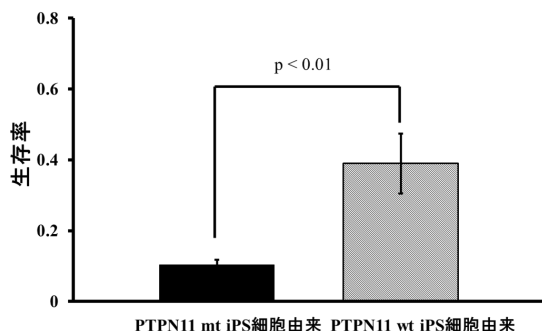


図 4 iPS 細胞から誘導した CD34 陽性細胞に対する抗腫瘍効果

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Sakashita K, Kato I, Daifu T, Saida S, Hiramatsu H, Nishinaka Y, Ebihara Y, Ma F, Matsuda K, Saito S, Hirabayashi K, Kurata T, Uyen LT, Nakazawa Y, Tsuji K, Heike T, Nakahata T, Koike K. In vitro expansion of CD34(+)CD38(-) cells under stimulation with hematopoietic growth factors on AGM-S3 cells in juvenile myelomonocytic leukemia.

Leukemia. 29(3):606-14, 2015.

doi: 10.1038/leu.2014.239. 査読有

Matsuda K, Nakazawa Y, Iwashita C, Kurata T, Hirabayashi K, Saito S, Tanaka M, Yoshikawa K, Yanagisawa R, Sakashita K, Sasaki S, Honda T, Koike K. Myeloid progenitors with PTPN11 and nonRAS pathway gene mutations are refractory to treatment with 6-mercaptopurine in juvenile myelomonocytic leukemia.

Leukemia. 28(7):1545-8, 2014.

doi: 10.1038/leu.2014.58. 査読有

Saito S, Nakazawa Y, Sueki A, Matsuda K, Tanaka M, Yanagisawa R, Maeda Y, Sato Y, Okabe S, Inukai T, Sugita K, Wilson MH, Rooney CM, Koike K. Anti-leukemic potency of piggyBac-mediated CD19-specific T cells against refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia.

Cytotherapy. 16(9):1257-69, 2014.

doi: 10.1016/j.jcyt.2014.05.022. 査読有

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松田 和之 (MATSUDA, Kazuyuki)

信州大学・医学部附属病院・主任臨床検査

技師

研究者番号：00647084