

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業 事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 疾患 iPS 細胞を活用した難治性血液・免疫疾患の病態解明と治療法開発
(英語) Elucidation of the pathogenesis of intractable hematological and immunological diseases and development of therapeutic methods using diseased iPS cells

研究開発実施期間: 平成 29 年 8 月 31 日～令和 5 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 齋藤潤
(英語) Megumu K. Saito

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 京都大学・iPS 細胞研究所・教授
(英語) Professor, Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University

II 研究開発の概要

本研究計画においては、難治性血液・免疫疾患を対象として、疾患 iPS 細胞を用いた解析、スクリーニング系の構築を行い、これらの疾患の診断治療法の革新を目指した。研究終了時の対象疾患は、原発性免疫不全症候群、中條西村症候群 (Nakajo-Nishimura syndrome: NNS)、Blau 症候群、白血病と類縁疾患、骨髄異形成症候群、全身性エリテマトーデス (SLE)、RAS 関連自己免疫性リンパ増殖症様疾患 (RAS-associated ALPS-like disease, RALD) 及びシェーグレン症候群 (SjS) である。

血球系・免疫系は全身に分布しており、その異常は全身の様々な症状を惹起し、患者さんの苦痛や消耗が強い疾患も多い。また造血器腫瘍を含む難治性血液疾患の多くが根治的治療を造血幹細胞移植に頼っていることから、より低侵襲の特異的治療が強く望まれている。血液疾患の解析に必要な造血幹前駆細胞を患者さんから十分得ることは難しい。また免疫疾患は動物とヒトで免疫システムが異なることが多く、動物モデルの構築が難しいことも多い。一方、多能性幹細胞からの血球分化では、分化誘導法の確立が進んでおり、分化前駆段階の細胞を得、その評価を行うことも可能である。そこで本研究計画では、疾患 iPS 細胞を用いた難治性血液・免疫疾患の病態解析と診断治療法の開発を行った。以下に各疾患ごとの成果の概略を示す。

原発性免疫不全症について、Chédiak-Higashi 症候群 (CHS)、DNM1L 異常症および MIRAGE 症候群患者から樹立した iPS 細胞を *in vitro* で分化させ、ミトコンドリア、ライソゾーム、オートファゴソーム、エンドソームなどの細胞内小器官異常について検討し、その機能改善を指標とするスクリーニング系の開発を行った。CHS は、LYST 遺伝子変異により起きる原発性免疫不全症候群である。LYST 変異により細胞内輸送の障害が起

きることが想定されているが、免疫不全の病態は明らかでない。これを明らかにするために、CHS6 症例から iPS 細胞を樹立した。患者由来 iPS 細胞から分化誘導した細胞を用いた解析で、ライソゾームの Exocytosis 機能低下、オートファゴソーム増加、ミトコンドリア形態異常が起きていることを見出した。この結果から、CHS では LYST 変異によりライソゾーム異常が起こり、オートファゴソーム、ミトコンドリアを適切に処理出来ず細胞内小器官の機能が低下していると考えられた。また、巨大リソソームの出現およびオートファゴソームの増加を、特定の蛍光プローブを用いる事で、簡便かつ迅速に大量検体を解析するスクリーニング系の構築を行った。DNM1L 異常症 2 例についても iPS 細胞を樹立し、分化した細胞で、ミトコンドリア膜電位、ミトファジー、酸素消費速度(Oxygen Consumption Rate:OCR)を解析し、ミトコンドリア機能低下が起きていることを見出した。さらに、ミトコンドリア形態異常と ATP 産生能などの機能低下を、特定の蛍光プローブを用いる事で、簡便かつ迅速に大量検体を解析するスクリーニング系の構築を行った。MIRAGE 症候群は、造血異常 (Myelodysplasia)、易感染性 (Infection)、成長障害 (Restriction of growth)、先天性副腎低形成症 (Adrenal hypoplasia)、性腺症状 (Genital phenotypes)、消化器症状 (Enteropathy) を中心とした多彩な症状を示す先天性疾患である。SAMD9 遺伝子の異常が原因であることは明らかにされているが、免疫不全の発症メカニズムやその詳細な病態は明らかにされていない。我々はまず、MIRAGE 症候群 10 例の臨床像を解析し、免疫担当細胞の特定の分画の異常と生命予後が相関していること、周期性発熱が起きており自己炎症疾患様の病態が併存している事を見出した (Mitsui-Sekinaka, J Clin Immunol 2021)。次に、患者由来 iPS 細胞を樹立し、遺伝子修復技術を用いて疾患由来 iPS 細胞の変異修復株および正常 iPS 細胞の変異導入株を作成した。これらと正常 iPS 細胞を免疫担当細胞へ分化させ、FACS、電子顕微鏡、共焦点顕微鏡による解析を行った。また、エンドソーム形態の異常とエンドサイトーシス機能の障害を、特定の蛍光プローブを用いる事で、簡便かつ迅速に大量検体を解析するスクリーニング系の構築を行った。

NNS は、免疫プロテアソーム遺伝子 PSMB8 の変異で起こる慢性炎症と脂肪・筋萎縮を特徴とする疾患で、そのメカニズムは詳しく知られておらず、未だ有効な治療法がない。PSMB8 変異有無以外は遺伝背景をそろえた iPS/ES 細胞を CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて作製し、NNS 患者さん由来 iPS/ES 細胞から作製した単球系細胞を用いた解析により NNS の病態再現に成功した (Honda-Ozaki, Stem Cell Rep 2018)。NNS 患者さん由来 iPS/ES 細胞から作製した単球系細胞は、刺激前から過剰な活性酸素の産生を認め、IFN- γ + TNF- α 刺激により、異常な JAK/STAT 経路、p38MAPK 経路の活性化や様々な生体応答反応経路が亢進した。また、この疾患モデルを用い、ハイスループットスクリーニングによる網羅的な治療薬候補の探索を試みた。その結果見出されたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 CUDC-907 は、NNS の患者さんで過剰に産生されるケモカインの MCP-1 及び IP-10 を効果的に抑制した (Kase, Stem Cells Transl Med 2020)。

Blau 症候群は NOD2 遺伝子変異によって発症する自己炎症疾患であり、その炎症機序は不明であり、特異的治療は存在しない。Blau 症候群の患者さん由来 iPS 細胞とゲノム編集技術を用いて、炎症反応の異常を示すモデルを構築した (Takada, J Allergy Clin Immunol 2017)。Blau 症候群の患者さん由来 iPS 細胞から作製したマクロファージと、患者さんと同じ遺伝子異常を挿入した健常者由来 iPS 細胞から作製したマクロファージは、IFN- γ 添加により、NF κ B が過剰に活性化し、その結果炎症性サイトカインの産生が誘導された。また、網羅的遺伝子解析により、Blau 症候群患者さんのマクロファージでは、IFN- γ 依存的な自己炎症反応が起きること、抗 TNF 抗体治療によりこの異常が改善されることを明らかにした (Kitagawa, J Allergy Clin Immunol 2021)。

白血病については、2 例の FLT3 変異陽性急性骨髄性白血病 (AML) 患者から疾患特異的 AML-iPS 細胞を樹立し、血球分化誘導を行い、白血病の *in vitro*, *in vivo* での病態再現を行った (Chonabayashi, Ann Hematol. 2019)。AML-iPS 細胞から分化した造血前駆細胞は正常 iPS 細胞由来の造血前駆細胞と比較して、*in vitro* での骨髄球系への分化の偏り及び自己複製能の亢進が認められた。同一症例から樹立した多数の AML-iPS 株を用いることで遺伝的に多様な単クローン由来白血病マウスの作製及び造腫瘍能の解析が可能となり、また AML 発症後の移植マウスから腫瘍細胞を回収して遺伝子発現プロファイル等の比較を行いサブクローン間の *in vivo* で

の振る舞いの差を規定するゲノム異常の一部を明らかにすることができた。さらに AML-iPS 由来白血病細胞株を用いて腫瘍内多様性に対応可能な薬剤スクリーニング系を構築した。

白血病の類縁疾患であるダウン症に合併する一過性骨髄異常増殖症 (Transient abnormal myelopoiesis: TAM) について、TAM 発症における造血前駆細胞のどの段階のどの分画の細胞が GATA1 変異の影響を最も受けるのか、に着目し、疾患 iPS 細胞を用いて解析を行った。TAM は近年増加しているダウン症児の生下時に合併する前白血病疾患で、胎生肝造血期の trisomy21 造血前駆細胞が GATA1 変異を獲得することによって発生するため、その時期の造血を再現する iPS 細胞由来造血分化系は、TAM の病態解析へ応用するのに適した培養系であると言える。まず、ダウン症児から作製した iPS 細胞とゲノム編集により GATA1 変異を修復したアイソジェニックな iPS 細胞ペアを用いて血球分化を行った。その結果、GATA1 変異クローンでは、赤芽球系への分化阻害、巨核芽球系での成熟阻害、骨髄球系への分化傾倒が認められ、疾患 iPS 細胞を用いた TAM モデルの構築に成功した。さらにプロジェクターアッセイにより、これらの異常増殖の表現型は、P-erymk41(+)と定義した血球前駆細胞分画に起因していることが見出され、TAM 発症の責任細胞分画の同定に成功した。(Nishinaka-Arai, Haematologica. 2021)。これにより、TAM 発症時に GATA1 変異を獲得する血液前駆細胞分画は、同定した分画よりもより未分化な分画に絞られたと言える。次に、早期造血系譜における完全長 GATA1 タンパク (GATA1fl) のアイソフォームである、N 末端転写活性化ドメインを欠いた短型の GATA1 タンパク (GATA1s) の量的増加が血球分化へ与える影響を解析することで、GATA1s の発現レベルが TAM の表現型にどのような影響を与えるかを解析した。疾患 iPS 細胞にドキシサイクリン誘導性の GATA1s を導入した細胞を用いて GATA1s の発現量を変化させ、解析を行った。その結果、GATA1s の発現レベルは TAM の表現型において未分化な血液前駆細胞の産生量を増加させ、また DS-AMKL のリスクとなり得る巨核芽球形前駆細胞の産生量の差と前駆細胞の長期残存に影響を与えることが示唆された (Matsuo S. PLoS One. 2021)。これらの結果から、GATA1s タンパクには、GATA1fl タンパクとは異なる独自の働きがあることが示唆された。

骨髄異形成症候群については、予後が極めて不良な非定型 EVI1 転座を持つ MDS-iPS 細胞から分化させた造血前駆細胞を用いて、コロニー形成不全や赤血球系分化障害など樹立元の MDS 症例に特徴的な病態を in vitro で再現することが可能であった。MDS-iPS 細胞及び分化させた造血前駆細胞の網羅的なゲノム・エピゲノム解析を行い、転座相手の染色体長腕上に EVI1 高発現に関与しているエンハンサーの候補を同定した。さらに MDS-iPS 由来の造血前駆細胞では、BET 阻害剤投与により EVI1 の発現が抑制され、アポトーシスが誘導されることを確認した。

RALD は造血幹・前駆細胞における RAS 遺伝子 (KRAS/NRAS) の活性型変異に起因して発症すると考えられているが、希少疾患のため遺伝子変異による造血幹・前駆細胞の特性変化の知見は乏しく、有効な薬剤が開発されていない。RALD を対象とする薬剤評価に向け、有益な細胞パネルを構築するとともに、造血前駆細胞の分化誘導法の確立を進めた。KRAS 変異を有する RALD 患者より RALD 疾患ヒト iPS 細胞を樹立し、この細胞から分化誘導した造血前駆細胞において RAS 経路の活性化および骨髄球系細胞の分化異常・アポトーシス促進等を確認した (Stem cell reports, 2018; Stem Cell Research & Therapy, 2019)。この知見を元に RALD に対して治療効果を有する薬剤の選定を進め、KRAS 変異を有する造血前駆細胞の選択的抑制に有効な分子標的薬剤を抽出した (論文投稿中)。更に、治療効果の高い薬剤を選定するため、薬剤評価のスループット性向上のための検討を行い、フィーダー細胞に依存しない高効率な造血前駆細胞の分化誘導系を新たに確立した。また、RALD 患者において変異報告がある NRAS について、ゲノム編集法により疾患モデルヒト iPS 細胞を樹立し、ゲノム編集 NRAS 変異株が造血前駆細胞への分化能を有することを確認し、KRAS および NRAS 変異を有する RALD 疾患ヒト iPS 細胞パネルを構築した。以上より、RALD 疾患 hiPS 細胞パネルを対象とするスループット性の高い造血前駆細胞の薬剤アッセイ系を確立し、創薬スクリーニングのための基盤を構築した。

SLE は遺伝的要因と環境的要因が寄与する自己免疫疾患であるが、既存治療法による寛解達成率は 2 割程度と十分でなく、長期予後改善が可能で副作用の少ない新規治療薬開発が強く求められている。本研究では、SLE

の薬剤スクリーニングに向け、家族歴のある SLE 患者の遺伝子解析より SLE の遺伝的リスクと考えられるレアバリエントを同定し、SLE 患者由来 iPS 細胞およびゲノム編集による遺伝子変異修正株を用いて、レアバリエントの影響を実験的に解明することを目指した。姉妹例 SLE 患者の全エクソン情報、東京大学が独自に構築した免疫疾患患者のゲノムデータベース (ImmuNexUT) を用いた解析より、SLE 病態に中核的な役割を果たす I 型インターフェロン (IFN) 関連遺伝子のレアバリエントを複数同定した。以上より、疾患ヒト iPS 細胞と遺伝子研究を組み合わせた SLE 関連遺伝子の創薬スクリーニング戦略について PoC を確認した。現在、in silico 解析による化合物候補のリストアップが完了し、疾患ヒト iPS 細胞による抑制能スクリーニングを計画中である。

SS についての成果は以下のとおりである。1) SS 患者(HLA-A24, A31, DRB1 14:54, DRB1 15:02)末梢血から M3R 反応性 Th1 細胞(IFN- γ 産生)をフローサイトメトリー法を用いて分離し、35 個のクローンを樹立した。2) 1)で樹立した 5 個の Th1 細胞クローンに山中 4 因子をセンダイウイルスを用いて遺伝子導入し、7 個の T-iPS 細胞株を樹立した。3) 樹立した T-iPS 細胞が有する TCR 遺伝子が、iPS 細胞化する前の Th1 細胞クローンと同一の再構成した TCRV β 遺伝子、TCRV α 遺伝子であることを sequence 法で確認した。4) T-iPS 細胞から CD34+ 細胞を経て樹状細胞への分化誘導することに成功した(Iizuka-Koga, Stem Cell Reports 2017)。5) T-iPS 細胞を in vitro で CD34+CD43+細胞に分化誘導し、NSG マウスに細胞移入することにより 60 日目のマウス末梢血においてヒト由来 CD4+T 細胞への分化を確認することができた。ヒト臍帯血からの foxp3+Treg 細胞への誘導に成功した(Takahashi, Clin Exp Immunol 2021)。6) In vitro において、ヒト memory CD8+T 細胞から CD8+Treg 細胞を誘導することに成功した。7) 50%の SS 患者末梢血に M3R 反応性 Th17 細胞が存在することを ELI-SPOT 法で明らかにした(Abe, J Clin Invest Insight 2020)。

In this research plan, we targeted intractable hematological and immunological diseases, analyzed them using disease iPS cells, and constructed a screening system, aiming to innovate diagnostic and therapeutic methods for these diseases. The target diseases at the end of the study were primary immunodeficiency syndrome, Nakajo-Nishimura syndrome (NNS), Blau syndrome, leukemia and related diseases, myelodysplastic syndrome, systemic lupus erythematosus (SLE), RAS-associated autoimmune lymphoproliferative syndrome (RALD) and Sjögren's syndrome (SjS).

The hematopoietic and immune systems are distributed throughout the body, and abnormalities in these systems cause a variety of systemic symptoms, and many of these diseases are very painful and exhausting for patients. In addition, many intractable hematologic diseases, including hematopoietic tumors, rely on hematopoietic stem cell transplantation for curative treatment, and more minimally invasive and specific therapies are highly desirable. It is difficult to obtain enough hematopoietic stem progenitor cells from patients for analysis of blood diseases. In addition, it is often difficult to construct animal models for immunological diseases because the immune systems of animals and humans are often different. On the other hand, in the differentiation of blood cells from pluripotent stem cells, differentiation induction methods have been established, and it is possible to obtain and evaluate cells in the progenitor stage of differentiation. Therefore, in this research project, we analyzed the pathogenesis of intractable hematological and immunological diseases using diseased iPS cells and developed diagnostic and therapeutic methods. The following is a summary of the results for each disease.

For primary immunodeficiency diseases, iPS cells established from patients with Chédiak-Higashi syndrome (CHS), DNMI1L deficiency, and MIRAGE syndrome were differentiated *in vitro*, and intracellular organelles such as mitochondria, lysosomes, autophagosomes, and endosomes were examined for abnormalities.

NNS is a disease characterized by chronic inflammation and fat and muscle atrophy caused by mutations in the immunoproteasome gene PSMB8, the mechanism of which is not well understood and for which no effective treatment is available. The monocyte lineage cells generated from NNS patient-derived iPS/ES cells showed excessive ROS production even before stimulation, and IFN- γ + TNF- α stimulation enhanced activation of inflammatory pathways (Honda-Ozaki, Stem Cell Rep 2018). Using this disease model, we attempted to comprehensively search for potential therapeutic agents by high-throughput screening and identified a histone deacetylase inhibitor CUDC-907, as a candidate (Kase, Stem Cells Transl Med 2020).

Blau syndrome is an autoinflammatory disease caused by mutations in the NOD2 gene, the inflammatory mechanism of which is unknown and no specific treatment exists. iPS cells derived from patients with Blau syndrome and genome editing technology were used to construct a model showing an abnormal inflammatory response (Takada, J Allergy Clin Immunol 2017). Comprehensive genetic analysis also revealed that IFN- γ -dependent autoinflammatory responses occur in macrophages from patients with Blau syndrome and that this abnormality is ameliorated by anti-TNF antibody treatment (Kitagawa, J Allergy Clin Immunol 2021).

For leukemia, disease-specific AML-iPS cells were established from two FLT3 mutation-positive acute myeloid leukemia (AML) patients, and hematopoietic differentiation was induced to recapitulate the pathogenesis of leukemia *in vitro* and *in vivo* (Chonabayashi, Ann Hematol. 2019)

We also focused on which fractions of hematopoietic progenitor cells are most affected by GATA1 mutations in the development of transient abnormal myelopoiesis of Down syndrome (TAM) and found a responsible progenitor fraction named P-erymk41(+) (Nishinaka-Arai, Haematologica. 2021).

In myelodysplastic syndromes, hematopoietic progenitor cells differentiated from MDS-iPS cells with

atypical EVI1 translocation, which have a very poor prognosis, could be used to reproduce in vitro pathological conditions characteristic of MDS cases from which they were established, such as colony formation defects and impaired erythroid lineage differentiation. We performed comprehensive genomic and epigenomic analyses of MDS-iPS cells and differentiated hematopoietic progenitor cells, and identified candidate enhancers involved in EVI1 upregulation on the long arm of the translocation partner chromosome.

In order to evaluate drugs for RALD, we established a useful cellular panel and develop a new drug for the treatment of RALD. We established a panel of human iPS cells from RALD patients with KRAS mutations and differentiated them into hematopoietic progenitor cells, which showed activation of the RAS pathway, abnormal differentiation of myelomonocytic cells, and accelerated apoptosis.

For SLE, we identified rare variants that are considered to be a genetic risk for SLE based on genetic analysis of SLE patients with family history of SLE, and experimentally elucidated the effects of rare variants using iPS cells derived from SLE patients and genome-edited strains with corrected genetic mutations for drug screening for SLE. We aimed to experimentally elucidate the effects of rare variants using SLE patient-derived iPS cells and genome-edited gene mutation-corrected lines. Based on the analysis of all exon information of sister case SLE patients and the genome database of immune disease patients (ImmuNexUT) originally constructed by the University of Tokyo, we identified several rare variants of type I interferon (IFN)-related genes that play a central role in SLE pathogenesis and enhance type I IFN production in response to dsRNA stimulation.

Results for SS are as follows: 1) M3R-reactive Th1 cells (IFN- γ producing) were isolated from peripheral blood of SS patients (HLA-A24, A31, DRB1 14:54, DRB1 15:02) using flow cytometry, and 35 clones were established. 2) Five Th1 cell clones established in 1) were transfected with Yamanaka 4 factors using Sendai virus, and seven T-iPS cell lines were established. 3) We successfully induced differentiation of T-iPS cells into dendritic cells via CD34⁺ cells (Iizuka-Koga, Stem Cell Reports 2017).4) T-iPS cells were differentiated into CD34⁺CD43⁺ cells in vitro and transferred into mice, and differentiation into human-derived CD4⁺ T cells was confirmed in peripheral blood of mice on day 60.6) In vitro, we successfully induced CD8⁺ Treg cells from human memory CD8⁺ T cells. 7) In the peripheral blood of 50% of SS patients, we found M3 R-reactive Th17 cells in the peripheral blood of 50% of SS patients by ELI-SPOT method (Abe, J Clin Invest Insight 2020).