

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：疾患特異的 iPS 細胞を活用した特発性造血障害の病態解析と新規治療法開発
2. 研究開発代表者：高折 晃史（国立大学法人京都大学）
3. 研究開発の成果

本研究課題では、希少難治性疾患である特発性造血障害を対象に、患者造血細胞由来の疾患特異的 iPS 細胞を用いて、病態の解明、新たな治療法の開発を目指している。課題は、1)骨髄異形成症候群、2)自己免疫性造血不全、3)先天性造血不全の3つの柱で進めており、それぞれの成果を下記に詳述する。

1) 骨髄異形成症候群(MDS)に関わる研究開発

(ア) 疾患特異的 iPS 細胞の機能・病態解析

① MDS-iPS 細胞の病態解析及びゲノム解析：iPS 細胞より造血幹細胞、さらに各種血球への分化実験により、MDS の病態の一部を再現できた。また、これら iPS 細胞の網羅的ゲノム解析を終了した。

(イ) 薬剤スクリーニング系の確立とスクリーニングの開始：胚様体形成法を用いた大量培養・分化誘導法を確立し、血球分化マーカーをフローサイトにより検出する系でのスクリーニングを開始した。さらに分化誘導マーカーCD235a(赤血球系)や CD66b(好中球系)などのレポーター遺伝子発現細胞株を作製中である。

(ウ) 環状鉄芽球を伴う不応性貧血の疾患 iPS 細胞から誘導した造血細胞の解析：疾患 iPS 細胞を *in vitro* で赤芽球系造血細胞に分化させ、RARS の形態学的特徴である環状鉄芽球の出現を再現できた。

2) 自己免疫性造血不全に関わる研究開発

第6染色体短腕の loss of heterozygosity (6pLOH)により HLA クラス I 抗原の欠失を起こした血球を持つ再生不良性貧血（再不貧）患者7症例の単球（5例）またはBリンパ芽球細胞株（2例）から iPS 細胞樹立を試みた結果、計6例から2-9個の iPS 細胞クローンが樹立された。このうちの1例(KANA1)では、6pLOH(+)と6pLOH(-)の両者のクローンが樹立された。両者の細胞を培養することにより、約50%の CD34 陽性細胞を含む HLA-A24(+)および HLA-A24(-)の造血前駆細胞集団が誘導された。この患者から同意を得て CD8+T 細胞を単離し、X線照射した HLA-A24(+)細胞と共に2週間培養したところ、HLA-A24(+)CD34 陽性細胞のみを傷害し、HLA-A24(-)CD34 陽性細胞を傷害しない CTL が得られた。この CTL 株から7個の T 細胞クローンを単離したところ、そのうち2個は親細胞株と同様に、HLA-A24(+)CD34 陽性細胞のみを傷害した。

3) 先天性造血不全に関わる研究開発

Fanconi 貧血、Kostmann 症候群、細網異形成症、Diamond-Blackfan 症候群の患者より iPS 細胞を樹立した。Fanconi 貧血(FANCA)、細網異形成症(RD)では従来の方法では樹立が困難であったが、6因子 (Oct3/4, Klf4, L-Myc, Sox2, LIN28, shp53) をエピソーマルベクターで導入する方法を用いて樹立することができた。Fanconi 貧血に関しては疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析が進んだ。Fanconi 貧血患者 iPS 細胞株から産生される血球数は、コントロール細胞株（正常 iPS 細胞、患者 iPS 細胞に FANCA 遺伝子を導入した細胞株）と比較して、劇的に低下しており、また、発生初期の細胞である Hemato-angiogenic progenitor cells で造血必須転写因子群が発現低下していた。これらの所見は、Fanconi 貧血患者における造血不全が、発生より初期で起こっていることを示している。他の3疾患については、それぞれの疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析が始まっている。

4. その他