

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 難治性疾患実用化研究事業

(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases

研究開発課題名：(日本語) 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

(英語) Analysis on pathophysiology and a novel therapy development for
idiopathic bone marrow failures by using iPS cell technology

研究開発担当者 (日本語) 京都大学医学研究科 教授 高折 晃史

所属 役職 氏名：(英語) Graduate School of Medicine, Kyoto University, Professor,
Akifumi Takaori Kondo

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 骨髄異形成症候群に関わる研究開発

開発課題名：(英語) Research on Myelodysplastic syndrome

研究開発分担者 (日本語) 京都大学 iPS 細胞研究所 准教授 吉田 善紀

所属 役職 氏名：(英語) Center for iPS cell Research and Application, Kyoto University, Associate
Professor, Yoshinori Yoshida

研究開発分担者 (日本語) 京都大学 iPS 細胞研究所 研究員 蝶名林 和久

所属 役職 氏名：(英語) Center for iPS cell Research and Application, Kyoto University,
Researcher, Kazuhisa Chonabayashi

研究開発分担者 (日本語) 東京大学医学部附属病院 講師 荒井 俊也

所属 役職 氏名：(英語) University of Tokyo, Lecturer, Toshiya Arai

分担研究 (日本語) 自己免疫性造血不全に関わる研究開発
開発課題名: (英語) Research on autoimmune bone marrow failure

研究開発分担者 (日本語) 金沢大学 教授 中尾 眞二
所属 役職 氏名: (英語) Kanazawa University, Professor, Shinji Nakao

分担研究 (日本語) 先天性造血不全に関わる研究開発
開発課題名: (英語) Research on congenital bone marrow failure

研究開発分担者 (日本語) 京都大学 iPS 細胞研究所 教授 中畑 龍俊
所属 役職 氏名: (英語) Center for iPS cell Research and Application, Kyoto University,
Professor, Tatsutoshi Nakahata

II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究は、下記の 3 項目に関する研究開発計画を進めた。

1. 骨髄異形成症候群に関わる研究開発: (高折、吉田、蝶名林、荒井)
2. 自己免疫性造血不全に関わる研究開発: (中尾)
3. 先天性造血不全に関わる研究開発: (中畑)

1. 骨髄異形成症候群に関わる研究開発: (高折、吉田、蝶名林、荒井)

骨髄異形成症候群 (MDS) は、予後不良のクローン性造血障害である。MDS には病態を再現し解析する疾患モデルがなく、新規治療法を開発するためのツールが殆どないのが現状である。我々は複数の MDS 及び MDS から移行した二次性急性骨髄性白血病症例の異常クローンから疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、樹立した疾患特異的 iPS 細胞からの造血細胞分化系を確立し、分化成熟障害などの病態再現が可能な疾患モデルを構築した。疾患特異的 iPS 細胞と元の患者の MDS 細胞の全エクソシーケンスを行い、MDS の発症・進展に重要と思われる遺伝子変異を同定した。また、疾患特異的 iPS 細胞と同一患者由来の正常 iPS 細胞を再誘導して得られた造血前駆細胞分画の網羅的な遺伝子発現解析を行い、疾患特異的 iPS 細胞に特異的な遺伝子発現異常が認められた。さらに疾患特異的 iPS 細胞由来造血前駆細胞を用いてハイスループット薬剤スクリーニング系を確立して、薬剤スクリーニングを開始した。

また、荒井は、骨髄異形成症候群(MDS)の一病型である慢性骨髄単球性白血病(CMML)の疾患細胞から疾患特異的 iPS 細胞(CMML-iPSC)を樹立した。VEGF 添加下における C3H10T1/2 間質細胞との共培養によって、CMML-iPSC から CD34,CD43 陽性の造血前駆細胞が分化誘導された。この細胞は元の CMML 細胞の遺伝子異常や増殖能亢進、表面抗原発現などの特性を再現していた。この細胞を用いた網羅的な遺伝子発現とエピゲノム解析によって、CMML の病態に関与している候補遺伝子をいくつか抽出した。そのなかで、*SLITRK4* の発現は他の CMML 臨床検体でも亢進していることを確認した。興味深いことに、CRISPR/Cas9 システムで CMML-iPSC において *SLITRK4* をノックアウトすると、造血前駆細胞への分化が著明に抑制されることがわかり、この遺伝子を標的とする分子治療によって CMML を根絶できる可能性が示唆された。

2. 自己免疫性造血不全に関わる研究開発：(中尾)

特発性再生不良性貧血 (aplastic anemia: AA) は、細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocytes: CTLs) によって自己の造血幹・前駆細胞 (hematopoietic stem/progenitor cells: HSPCs) が攻撃される結果発症する典型的な自己免疫疾患である。これは、第 6 染色体短腕の片親性ダイソミーによる loss of heterozygosity (6pLOH) の結果、特定の HLA クラス I アレルの欠失した血球 (HLA allele-lacking leukocytes: HLA-LLs) が患者全体の約 25% に検出されることから強く推測されているが、CTL の標的抗原が不明である。これを明らかにするためには、①HLA-LLs を持つ患者から、野生型 HSPCs と、HLA を欠失した HSPCs の両者を準備する、②同じ患者から樹立した野生型 HSPC 特異的 CTL の中から、HLA 欠失 HSPCs を傷害しない CTL クローンを樹立する、③この CTL クローンを用いて野生型 HSPCs cDNA ライブラリーをスクリーニングする、というプロセスが必要である。

そこで、我々は 6pLOH と HLA-B*40:02 の変異により B4002 を欠失した顆粒球を持つ症例 1 と、同じく 6pLOH と HLA-B*54:01 変異により B5401 を欠失した症例 2 の 2 例の AA 患者単球から iPSC 細胞 (iPSC) を樹立した。その結果、それぞれから野生型、6pLOH(+), B4002 または B5402 の単独欠失の 3 種類 2 組の iPSC 細胞の樹立に成功した。それぞれの iPSC 細胞から、効率よく CD34 陽性細胞を誘導する *in vitro* の培養方法を検討したところ、既存のサイトカインカクテル (StemPro) 培地での培養と同様に、OP9 細胞の培養上清と WEHI3B 細胞の培養上清を加えた培地での培養でも、3 週間目には CD34⁺ 細胞が、培養細胞全体の約 70% 程度に達することが明らかになった。この培養細胞から純化した CD34⁺ 細胞 (iPSC-HSPC) を、Sirpa をノックインした C57BL/6.Rag2 マウス (BRGS マウス) の骨髄内に移植したところ、移植後 9 週目には顆粒球、赤血球、B 細胞、T 細胞に分化し、3.5-8.9% 前後のキメリズムが得られることが示された。

症例 1 の iPSC-HSPCs で患者の CD8⁺T 細胞を 2 回刺激したところ、6pLOH(+) 細胞や B4002 欠失細胞は傷害しないが、野生型細胞のみを傷害する CTL 株が樹立されたが、CTL クローンの長期維持が困難であった。このため、CTL 株と症例 1 の治療前の骨髄 T 細胞から、PD-1⁺CD8⁺T 細胞を単一細胞ソーティングし、T 細胞レセプター (TCR) の β 鎖を解析したところ、骨髄で最も頻度が高い CDR3 モチーフを持つ T 細胞の β 鎖、α 鎖の塩基配列は、CTL 株で 3 番目に繰り返しの頻度が高い β 鎖、α 鎖の配列と完全に一致していた。症例 1 の CTL で頻度の高かった上位 4 種類と、症例 2 の初診時の骨髄 CD137⁺PD-1⁺CD8⁺T 細胞および CD137⁺PD-1⁺CD8⁺T 細胞から単離した単一 T 細胞のうち、TCRVβ の繰り返し頻度の高い 4 種類の TCRα 鎖・β 鎖 cDNA を、レトロウイルスベクターを用いて Jurkat 細胞にトランスフェクトした。症例 2 の TCR トランスフェクタント 4 種類を、自身の CD34⁺細胞と培養したところ、野生型 iPSC-HSPCs に対する特異的なインターフェロン γ 産生がみられた。現在、症例 2 の野生型 iPSC-HSPCs から cDNA ライブラリーを作製し、HLA-B*54:01 導入 COS 細胞トランスフェクタントを用いたスクリーニングを準備中である。

3. 先天性造血不全に関わる研究開発：(中畑)

先天性造血不全は先天的に血液を正常に産生できない疾患であるが、侵されている血球系統も 3 系統から 1 系統まで多くの病型が存在する。先天性造血不全の多くは遺伝子異常に起因すると考えられているが、その病態を再現し解析する疾患モデルがなかったことから、新規治療法の開発は大きく遅れてきた。我々は先天性造血不全のうちファンconi貧血、細網異形成症、ダイヤモンドブラックファン貧血、先天性好中球減少症の患者から、iPSC 細胞の樹立(疾患特異的 iPSC 細胞)に成功した。また、我々は iPSC 細胞から中胚葉を経て①血管内皮/血球共通前駆細胞、②各種血液前駆細胞、③成熟細胞ができる過程につ

いて時間を追って観察できる系を確立してきた。それを用いて、ファンconi貧血においては、血球・内皮系共通前駆細胞から造血前駆細胞への分化障害が病態であること、細網異形成症に関しても、同疾患の好中球減少およびTリンパ球減少は成熟障害に起因することを明らかにした。

We have worked on the following 3 projects.

- 1. Research on Myelodysplastic syndrome (Takaori-Kondo, Yoshida, Chonabayashi, Arai)**
- 2. Research on autoimmune bone marrow failure (Nakao)**
- 3. Research on congenital bone marrow failure (Nakahata)**

1. Research on Myelodysplastic syndrome (Takaori-Kondo, Yoshida, Chonabayashi, Arai)

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of clonal stem cell diseases characterized by inefficient hematopoiesis with poor prognosis. There are currently no useful tools for identifying new therapeutic targets of MDS mainly because of a lack of good disease models. Here we generated multiple iPS cell lines from several patients with either MDS or secondary acute myeloid leukemia that progressed from MDS. We successfully developed hematopoietic differentiation systems from the disease specific iPS cells and constructed the disease model recapitulating the MDS disease phenotypes such as maturation defect. We performed whole-exome analysis of disease-specific iPS cells and MDS cells derived from the original patients to find somatic mutations which are crucial for the pathogenesis and progression of MDS. Next, we performed microarray analysis in hematopoietic progenitor cells induced from the disease-specific iPS cells and isogenic normal iPS cells, identifying MDS-specific expression changes. Furthermore, we had established a high-throughput screening system utilizing hematopoietic progenitor cells derived from disease-specific iPS cells and started drug screening.

Arai has also established induced pluripotent stem cells (iPSC) from CMML CD34 positive leukemic cells (CMML-iPSC) as a new disease model. Co-cultured with C3H10T1/2 stromal cells in the presence of vascular endothelial growth factor, CMML-iPSC generated CD34 CD43 double-positive hematopoietic progenitor cells (CMML-HPC). CMML-HPC have recapitulated important disease features of parental CMML cells in terms of genetic abnormalities, acceleration of cell proliferation, and aberrant surface markers expression. With comprehensive gene expression and DNA methylation profiling analyses using CMML-HPC, we identified several candidate genes related to the pathogenesis of CMML. Among them, the expression of *SLITRK4* was up-regulated in other CMML patients' CD34+ leukemic cells compared to normal CD34+ bone marrow cells. Interestingly, disruption of this gene via CRISPR/Cas9 system dramatically attenuated generation of CMML HPC from CMML iPSC, which suggested an intriguing possibility that targeted molecular therapy of this gene would eradicate CMML leukemic cells.

2. Research on autoimmune bone marrow failure (Nakao)

Acquired aplastic anemia (AA) is considered to be a typical auto-immune disease that targets hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) by cytotoxic T lymphocytes (CTLs). This hypothesis is

mainly based on current findings that HLA class I allele-lacking leukocytes (HLA-LLs) due to loss of heterozygosity of the 6p chromosome are detected in approximately 25% of patients with AA. However, this theory has not been proven due to lack of knowledge with regard to the autoantigens presented by particular HLA alleles. To identify autoantigens on HSPCs that are involved in the development of AA, the following three processes are required; 1. Preparation of both wild-type and HLA class I allele-lacking HSPCs from AA patients possessing HLA-LLs; 2. Isolation of CTL clones capable of killing only wild-type HSPCs; 3. Screening of cDNA library transfectants derived from the wild-type HSPCs using the CTL clones. First, we generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from peripheral blood (PB) monocytes of two patients (Case 1 and Case 2) who possessed HLA-LLs as a result of 6pLOH and HLA-B allele mutations. Two sets of three different iPSC clones were established which included wild-type, 6pLOH(+), and HLA-B(-) (B4002[-] or B5401[-]) clones. Three-week cultures of the iPSCs in the medium containing various growth factors (StemPro) or in the OP9 or WEHI3B cell-conditioning medium produced hematopoietic cells comprising 70% CD34⁺ cells. 10⁶ CD34⁺ cells were injected into the femoral bone of C57BL/6.Rag2 mice harboring NOD-Sirpa (BRGS) and the mice were sacrificed at 9-12 weeks after the injection. 3.5 to 8.9 % human CD45⁺ cells were detected in the BM, spleen, and PB, and all retained original phenotypes. Stimulation of Case 1's CD8⁺ T cells with autologous iPSC-HSPCs gave rise to CTL lines that killed WT-HSPCs but spared HLA-lacking HSPCs. However, stable CTL clones with the same specificity could not be established from the CTL lines. We then analyzed T cell receptor (TCR) V α repertoire using a single PD1⁺ T-cell sorting followed by sequencing of the following three cell population; 1) a CTL line from Case 1; 2) bone marrow (BM) T cells from Case 1 seven years ago when the patient relapsed with pancytopenia; 3) BM T cells from Case 2 before any treatment. Several TCR V α motifs were recurrently detected, and one of recurrent TCRV α motifs that was the third most frequent was identical to a TCRV α motif detected most frequently in the BM of the patient. cDNA of four different TCR α chains that were more frequent than the others in Case 1' CTL line and Case 2's BM T cells were transduced into Jurkat cells and their reactivity to autologous iPSC-HSPCs were assessed using IFN- γ secretion as a marker. Case 2's TCR transfectants secreted IFN- γ in response to wild-type iPSC-HSPCs but not to B5401-lacking HSPCs. We are currently preparing cDNA library from Case 2's wild-type CD34⁺ cells for its transfection into *B*5401*-COS cells and screening by the TCR transfectants.

3. Research on congenital bone marrow failure (Nakahata)

We generated multiple iPS cell lines from patients with congenital bone marrow failure including Fanconi anemia, reticular dysgenesis, Diamond-Blackfan syndrome, and congenital neutropenia. We also successfully developed hematopoietic differentiation systems from the disease specific iPS cells and constructed the disease model recapitulating the disease phenotypes. Using this system, we found that Fanconi anemia-specific iPS cells show the differentiation defect from HAPCs to HPCs.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 5件）

1. Nishizawa M, Chonabayashi K, Nomura M, Tanaka A, Nakamura M, Inagaki A, Nishikawa M, Takei I, Oishi A, Tanabe K, Ohnuki M, Yokota H, Koyanagi-Aoi M, Okita K, Watanabe A, Takaori-Kondo A, Yamanaka S, Yoshida Y. Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity. *Cell Stem Cell*. 2016, 19, 341-54.
2. Iizuka H, Kagoya Y, Kataoka K, Yoshimi A, Miyauchi M, Taoka K, Kumano K, Yamamoto T, Hotta A, Arai S, Kurokawa M. Targeted gene correction of RUNX1 in induced pluripotent stem cells derived from familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy restores normal megakaryopoiesis. *Exp Hematol*. 2015, 43:849-57.
3. Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, Ozawa T, Nakagawa N, Imi T, Maruyama H, Katagiri T, Kishi H, Tajima A, Muraguchi A, Kashiwase K, Nakao S. Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2017, 129:2908-2916.
4. Maruyama H, Katagiri T, Kashiwase K, Shiina T, Sato-Otsubo A, Zaimoku Y, Maruyama K, Hosokawa K, Ishiyama K, Yamazaki H, Inoko H, Ogawa S, Nakao S. Clinical significance and origin of leukocytes that lack HLA-A allele expression in patients with acquired aplastic anemia. *Exp Hematol*. 2016, 44:931-9. e3.
5. Ohta R, Niwa A, Taniguchi Y, Suzuki NM, Toga J, Yagi E, Saiki N, Nishinaka-Arai Y, Okada C, Watanabe A, Nakahata T, Sekiguchi K, Saito MK. Laminin-guided highly efficient endothelial commitment from human pluripotent stem cells. *Scientific Reports* 2016, 6:35680.
6. 蝶名林 和久、吉田 善紀、高折 晃史. リプログラミング技術を用いた骨髄異形成症候群の病態解明と新規治療の可能性. iPS 細胞を用いた難病研究-臨床病態解明と創薬に向けた研究の最新知見. 遺伝子医学 MOOK27 号. メディカルドゥ社. 2015, 27, 147-51.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. iPS Technology Revealed the Genetic and Functional Diversity Present in a Secondary AML Patient, ポスター, Chonabayashi K, Kawahara M, Watanabe A, Nakamura M, Nishizawa M, Takaori-Kondo A, Yamanaka S, Yoshida Y, The 58th Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2014/12/5, 海外.
2. Generation of engraftable leukemic stem cells from iPS cells derived from a secondary AML patient, 口演, Chonabayashi K, Kawahara M, Watanabe A, Nakamura M, Nishizawa M, Takaori-Kondo A, Yamanaka S, Yoshida Y, 第 77 回日本血液学会学術集会, 2015/10/16, 国内.
3. Patient-specific induced pluripotent stem cells recapitulate the maturation defect of myelodysplastic syndromes, ポスター, Chonabayashi K, Kawahara M, Okita K, Nishizawa M, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Yamanaka S, Yoshida Y, The 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2014/12/4, 海外.

4. iPS technology revealed the genetic and functional diversity present in a single MDS patient, 口演, Chonabayashi K, Kawahara M, Watanabe A, Amano N, Okita K, Nishizawa M, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Yamanaka S, Yoshida Y. 第 76 回日本血液学会学術集会, 2014/10/31, 国内.
5. Investigation of causative genes in CMML through patient-derived induced pluripotent stem cells, 口頭, 山崎翔, 田岡和城, 荒井俊也, 宮内将, 片岡圭亮, 吉見昭秀, 黒川峰夫, 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016/10/15, 国内.
6. Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Identified SLITRK4 As a Causative Gene of Chronic Myelomonocytic Leukemia, 口頭, 山崎翔, 田岡和城, 荒井俊也, 宮内将, 片岡圭亮, 吉見昭秀, 黒川峰夫, 第 58 回米国血液学会年会, 2016/12/5, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特になし。

(4) 特許出願
特になし。