

博士論文

iPS 細胞由来顆粒球の産生を促進する化合物の探索

日野 俊哉

iPS 細胞由来顆粒球の産生を促進する化合物の探索

東京大学大学院 医学系研究科 内科学専攻 博士課程

血液・腫瘍病態学

指導教員 黒川 峰夫 教授

日野 俊哉

目次

要旨.....	2
序文.....	3
実験方法.....	8
結果.....	18
考察.....	38
謝辞.....	45
参考文献.....	46

要旨

顆粒球輸注療法は顆粒球減少時の感染症に対する治療手段であるが、ドナーから連日顆粒球採取が必要となり、広く臨床応用されるに至っていない。当研究室は過去にヒト iPS 細胞から *in vitro* で大量培養可能な顆粒球前駆細胞を作成したが、好中球への分化に 4 日間を要するため、分化誘導時の添加により分化期間を短縮する化合物を好中球表面抗原である CD16b の早期発現を指標とし、フローサイトメトリー法により 1885 種類の化合物でスクリーニングを行った。AKT 阻害剤の一つである MK-2206 dihydrochloride が候補として抽出され、さらに機能の評価を行ったところ、MK-2206 dihydrochloride を添加培養した iPS 細胞由来顆粒球で貪食能が早期に出現した。しかし、走化性や Oxidative burst、殺菌能の早期獲得は認めなかった。

序文

担がん患者は健常者と比較し易感染状態のため感染症の発症リスクが高く、また、がんに対する化学療法後は血球減少状態となるため、敗血症や肺炎等の重症感染症を発症する危険性が非常に高いことが知られている。特に急性白血病などの血液疾患に対する全身化学療法では、その他の固形がんに対する治療と比較して発熱性好中球減少症の発生率が高く、その管理は生命予後に密接に関わる¹⁻³。血球の中で好中球は細菌や真菌感染に対する初期免疫において重要な役割を果たしており⁴、組織内に細菌などの病原体が侵入すると炎症性変化を起こした組織内の細胞より炎症性サイトカインが放出され、血液中に循環している好中球はそれらの走化性因子を感知すると炎症部位に遊走する。そこで病原体に接触すると、受容体を介して病原体を貪食して細胞内に取り込み、形成した食胞の中に顆粒を放出することで殺菌を行ったり、貪食を行わずに細菌に直接顆粒を放出することで殺菌を行う⁵。そのため、高度好中球減少時にはこれらの初期免疫能が低下し、大量の抗生剤投与を行ったとしてもしばしば重篤な経過を辿る。

顆粒球輸注療法 (granulocyte transfusion therapy ; GTX)は顆粒球が減少する病態での重症感染症に対する治療手段であるが⁶、顆粒球の寿命が短いために、輸注に必要な顆粒球を得るには健常ドナーから連日体外循環による採取が必要とな

り、採取のために顆粒球コロニー形成刺激因子 (Granulocyte Colony Stimulating Factor : G-CSF)や副腎ステロイドの投与を行うため、ドナーに対する負担や有害事象を考慮する必要がある^{7,8}。ドナーの選定には HLA 型の一致は必須ではないが、顆粒球採取の際に赤血球成分を完全には除去することが困難なため、赤血球の血液型の適合が必要である。また、顆粒球輸注療法による合併症として急性の肺障害が 5%程度で認められるとする報告もあり⁹、他の治療に優先される治療法ではないのが現状である。そのため、小規模な臨床試験や症例報告では有効性が報告されてはいるが¹⁰⁻¹²、十分な症例数での検討は困難であり、ランダム化比較試験では有効性を示した報告はなく^{13,14}、エビデンスが十分ではないため広く臨床応用されるに至っていない。しかし、抗菌剤治療に難治性の感染症患者に対して、十分な顆粒球数を輸注することは予後の改善につながる可能性も示唆されている¹⁴。

当研究室では、輸注に必要な好中球を早期に大量に得るために、ヒト iPS 細胞から *in vitro* で大量培養可能な顆粒球前駆細胞を開発し、その細胞が 4 日間で好中球へと分化することを明らかにした¹⁵。この結果は、健常者から iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞を大量に作成しストックすることで、顆粒球輸注が必要な患者へ大量の好中球投与が可能になることが期待される。しかし、臨床応用につなげるには、十分な数の顆粒球を迅速に準備するために顆粒球の分化に要する期間

を短縮することが重要である。実際、過去の顆粒球輸注のランダム化比較試験である RING study では、顆粒球輸注療法に適格と判断されてから初回輸注が行われるまでの日数は中央値 2.3 日であったと報告されており¹⁴、分化期間の短縮は臨床応用に近づける上で必要であると考えられた。

好中球は分化をするのに伴い表面抗原の発現の変化^{16,17}、遊走能や接着能¹⁸、貪食能¹⁹、殺菌能²⁰などの特徴的な機能を獲得することが報告されており、種々の方法で評価される。その中でも表面抗原の評価は抗体染色を用いたフローサイトメトリー法により比較的簡便に行うことができると考えられた。そこで本研究では好中球に発現する表面抗原のうち、成熟好中球に発現が高いと知られている CD16b の発現に着目した。CD16b はグルコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型の Fcγ 受容体であり²¹、好中球と好塩基球の一部のサブセットで発現している^{16,22}。以前はシグナル伝達に関わらないと考えられていたが、近年、他の Fc 受容体と協調して好中球の機能に関与することが示唆されてきており、オプソニン化した細菌の貪食に関与とする報告もある^{23,24}。また、過去の論文では細胞株 HL-60 を用いた *in vitro* の実験で CD16b を分化の指標として用いており²⁵、CD16b を指標として用いることは妥当と考えられた。当研究室で作成した iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞についても分化誘導後 4 日目まで CD16b の発現が増加し続けることが抗体染色を用いたフローサイトメトリー法で確認

でき、さらに成熟好中球である分葉好中球へと分化するのに伴い CD16b の発現量も同様に上昇していくことが確認された (Figure 1)。

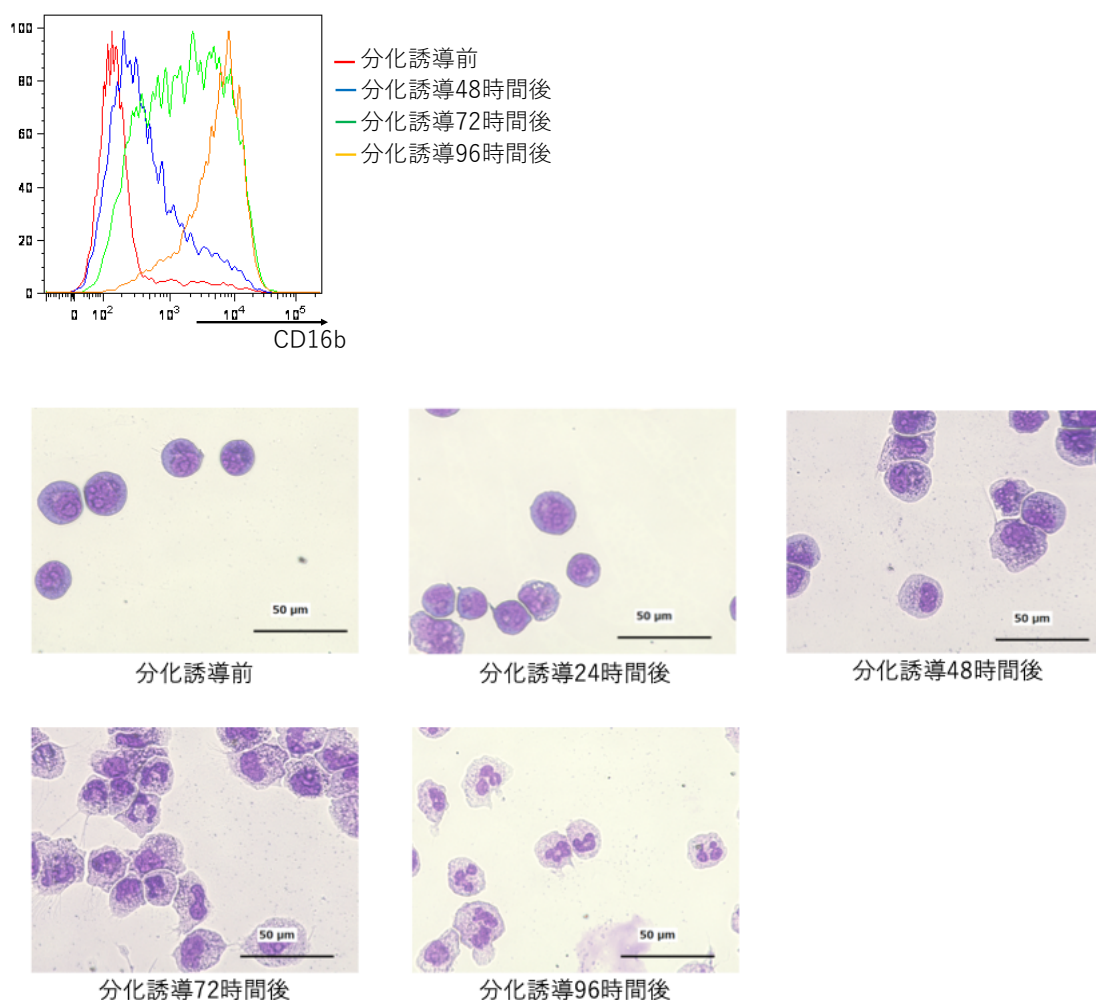


Figure 1. iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の分化誘導

iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の分化誘導前から分化誘導 96 時間後までの抗体染色を用いたフローサイトメトリー法による CD16b 陽性細胞のヒストグラムおよび光学顕微鏡での細胞形態を示す。

上記の結果より、iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞において CD16b を分化の代替マーカーとして用いることができると考えられたため、本研究では化合物ライブ

ラリーを用いて、分化誘導時に添加することで早期に CD16b の発現上昇が得られる化合物の探索を計画した。化合物による分化誘導は、遺伝子編集と比較して操作が簡便であることや好中球自身に新たな修飾を加えないことで安全性が確保され、臨床への応用が容易になると考えられた。また、表面抗原を利用した化合物によるスクリーニングは過去にも報告があり²⁶、実験系としても妥当であると考えられた。

本研究で用いた iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞は、Figure 1 に示す様に CD16b の発現が分化誘導 48 時間後から 96 時間後にかけて大きく変化するため、72 時間後の CD16b の発現を指標として早期に誘導させる化合物をスクリーニングで抽出し、それらの化合物添加時における好中球の機能についてさらに評価を行っている。

方法

1. 細胞株と培養

当研究室では過去に正常 CD34 骨髄細胞から iPS 細胞を樹立し²⁷、さらにその細胞を分化させ前駆細胞の状態を増殖する iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞を樹立しており¹⁵、実験には同細胞を使用した。浮遊細胞株である iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の培養は、20%ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco)及び 100 unit/mL ペニシリン (Sigma-Aldrich Japan)と 100 µg/mL ストレプトマイシン (Penicillin-Streptomycin: PS) (Sigma-Aldrich Japan)を添加調整したイスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium: IMDM) (Sigma-Aldrich Japan)を用いて行った。なお、iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞は分化を抑制するために、Doxycycline 依存性に c-MYC、BMI1 および BCL-XL を強制発現するように作成されており、また増殖を G-CSF に依存するため、1 µg/mL Doxycycline Hyclate (TCI)および 0.1 µg/mL G-CSF (Proteintech)を IMDM 中に加えて培養した¹⁵。培養は、37°C、5% CO₂ インキュベータ内で行った。

2. 分化誘導

iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞は Doxycycline 誘導性に c-MYC、BMI1 および BCL-XL を強制発現しており、顆粒球前駆細胞の状態より分化せずに増殖しているが、

G-CSF 投与下で Doxycycline を除いた培養液で培養を行うことで、これらの遺伝子の発現が低下し、好中球への分化が誘導されることを先行研究で確認している¹⁵。本研究でも同様の操作により分化誘導を行なった。具体的には、iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞を Doxycycline を除いた 20% FBS・1% PS・0.1 μ g/mL G-CSF 添加 IMDM に 5.0×10^5 cell/mL となるように調整し (化合物スクリーニング時は 1.0×10^6 cell / mL に調整)、化合物の添加を行い 37°C、5%CO₂ 条件下のインキュベーターで培養し分化誘導を行なっている (Figure 2)。

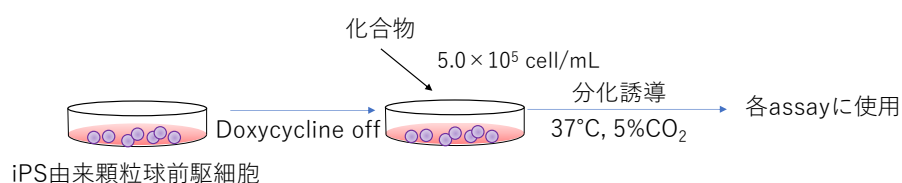


Figure 2. 分化誘導のシェーマ

iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞を、Doxycycline を除いた化合物添加培養液に 37°C、5%CO₂ 条件下で培養し分化誘導し、各 assay に用いて評価を行なった。

3. 化合物スクリーニング

東京大学 創薬機構より validated compound library に含まれる既知薬理活性試薬 1885 種類を提供いただき、化合物を加えることによる iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の CD16b の発現の変化について抗体染色を用いたフローサイトメトリー法により解析を行った。創薬機構より各 well に 2mM の化合物 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Waco) 溶液が 100nL ずつ分注された 96-well プレートを提供していただ

き、iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞が 1.0×10^6 cell / mL になるように調整した 20% FBS・1% PS・ $0.1 \mu\text{g/mL}$ G-CSF 添加 IMDM を各 well に $100 \mu\text{L}$ ずつ加えて (化合物の最終濃度は $2 \mu\text{M}$ 、DMSO は 0.1% となるように調整した)、 37°C 、 CO_2 5% の条件下のインキュベータで 72 時間培養し分化誘導を行った。その後 $600 \times g$ で遠心操作を行い、上清を除いて anti-human CD16b-APC 抗体 (Miltenyi Biotec) をリン酸緩衝食塩水 (Phosphate Buffered Saline: PBS) 溶液に 1:100 で希釈し $50 \mu\text{L}$ ずつ各 well に加えて 30 分間 4°C 遮光にて染色を行った。再度 $600 \times g$ で遠心操作を行い、上清を除き PBS にて wash を行った後、CD16b の発現を BD FACSCelesta™ Flow Cytometer (BD Biosciences) を用いて評価した。

4. 食食能評価

各化合物を加えて 24-96 時間分化誘導を行った iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の食食能について、*E.coli* Phagocytosis Assay kit (Cayman Chemical) を用いて評価した。iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞を 20% ヒト血清 (Merck) 添加 IMDM に 2.5×10^6 cell / mL になるように調整し、*E. coli* (FITC/inactivated) Suspension を 1:10 となるように加えて 96well プレートに $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で 30 分培養した。その後 $400 \times g$ で遠心し、上清を捨てたのちに $50 \mu\text{L}$ の trypan blue quenching solution を加え 1 分ほど室温で培養し、細胞の表面に付着している FITC の蛍光を消光させ

た。再度 400×g で遠心し、上清を捨てたのち 400μL の Assay Buffer を加え、BD FACS Aria™ III Cell Sorter (BD Biosciences)にて解析を行った。

5. Oxidative burst 機能評価

各化合物を加えて 24-96 時間分化誘導を行った iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の Oxidative Burst 機能についてフローサイトメトリー法にて評価を行った。0.5% ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin: BSA)(ナカライテスク) 、1000 U/mL ウシ肝臓由来カタラーゼ (Wako)添加 HBSS 溶液 (Wako)に iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞を 3.0×10^5 cell /1.2mL となるように加えて懸濁し、それぞれの細胞に対して 400μL ずつ分注したサンプル (A, B, C)を作成した。次に 100mM Dihydrorhodamine 123 Hydrochloride (Wako)となるように DMSO 溶液に調整し、B, C に 0.5 μl ずつ添加した。その後 3.2uM Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) (Santa Cruz)、0.5% BSA 添加 HBSS 溶液を A、C に 100 μl ずつ加え、B には PMA を含まない 0.5% BSA 添加 HBSS 溶液を 100 μl 加えた。37℃の恒温槽で 15 分間遮光条件下で反応させた後、600×g で遠心操作を行い、上清を捨て 0.5% BSA 添加 HBSS 溶液で wash を行い BD FACS Aria™ III Cell Sorter で解析を行った。

6. 細胞走化性の評価

各化合物を加えて 48-96 時間分化誘導を行った iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の走化性について 3 μ m Chemotaxis Assays, 96-Well Format (CELL BIOLABS, INC.)を用いて評価を行った。Feeder Tray に 10% FBS 添加 IMDM を 150 μ L 加え、その上に Membrane Chamber を挟んで、細胞が 1.0×10^6 cell/mL になるように調整した IMDM を各 well に 100 μ L ずつ分注し、37°C、5%CO₂ の条件下で 2 時間培養した。その後 Membrane Chamber を取り、上の溶液を除いたのちに Cell Detachment Solution を 150 μ L ずつ分注した Cell Harvesting Tray に 37°C で 30 分間浸し、Membrane Chamber の下に付着した細胞を回収した。Feeder Tray の溶液および Cell Detachment Solution より 75 μ L ずつ回収し、CyQuant® GR dye を 4X Lysis Buffer に 1:75 で混ぜた溶液を 50 μ L 加え、室温遮光下で 20 分間染色を行った。150 μ L を OptiPlate-96 F (Perkin Elmer) に分注し、ARVO MX (Perkin Elmer) で解析を行った。

7. 表面抗原発現解析

各化合物を加えて 12-96 時間分化誘導を行った iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の表面抗原の発現解析を BD FACS Aria™ III Cell Sorter を用いて行った。FACS 抗体は PBS に Table 1 に示す濃度で希釈して使用し、4°C で 30 分間遮光条件下で染

色を行った。CD35、FPR1、CXCR1 の解析では、それらの抗体染色を行う前に Human TruStrain FcX™ (BioLegend)を PBS で 20:1 に希釈した溶液を加え、室温で 5 分間 Fc レセプターの blocking を行った。

Table 1. 使用した FACS 抗体

エピトープ	抱合色素	クローン	使用濃度	供給元
CD16b	APC	REA589	1:100	Miltenyi Biotec
CD32a	APC	02	1:40	Sino Biological
CD11b	APC	ICRF44	1:100	BioLegend
CD35	APC	E11	1:40	Miltenyi Biotec
FPR1	APC	W15086B	1:40	BioLegend
CXCR1	FITC	BF1	1:40	BioLegend

8. 顆粒球分化誘導化合物

創薬機構より提供いただいた化合物ライブラリーを用いたスクリーニング後に、当研究室で購入し使用した化合物および供給元を下記リストに示す (Table 2.)。化合物は全て DMSO に溶解して各種実験に使用した。

Table 2. 購入した化合物

化合物	供給元
MK-2206 dihydrochloride	AdipoGen Life Sciences
AP26113	Cayman Chemical Company
Scriptaid	Cayman Chemical Company
GSK690693	Selleck

Rapamycin	AdipoGen Life Sciences
LY2584702	Selleck
PF-4708671	Selleck

9. リアルタイム定量 PCR (Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction :

RT-qPCR:)

iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の分化誘導後の *FCGR3B* の mRNA 発現の確認のため RT-qPCR による解析を行った。1.0×10⁶ 個の細胞から NucleoSpin RNA (タカラバイオ)を用いて total RNA を抽出後、これを鋳型として ReverTra Ace (東洋紡)により逆転写反応を行い、complementary DNA (cDNA)を合成した。

THUNDERBIRD SYBR qPCR MIX (東洋紡)と QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、製造者推奨のプロトコールに従い SYBR green 法で RT-qPCR を行った。得られた Cp 値から検量線法を用いて計算された発現量を、内部標準遺伝子である *18S rRNA* の発現量で標準化を行い解析した。

全ての解析は triplicate で行った。なお全てのウェルについて、融解曲線解析により PCR 合成産物の特異性を確認した。RT-qPCR に使用したプライマーを以下に示す。

Table 3. RT-qPCR に用いたプライマー

遺伝子名	Forward primer	Reverse primer
<i>18S rRNA</i>	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
<i>FCGR3B</i>	GAGCCTCAATGGTACAGCGT	GCCTGGCTTGAGATGAGGTT

10. サイトスピンとライト・ギムザ染色

検体のサイトスピンは Thermo Shandon Cytospin 3 (Marshall Scientific)を用いて行った。5×10⁴ 個の細胞を 3%FBS 添加 PBS 50 μL に溶解し、検体を専用のサンプルチャンバーにアプライし、穴あき濾紙を挟んでスライドガラスに接続した。800×g で 10 分間遠心しスライドガラスに細胞を貼り付けた。スライドガラスを回収し、ライト・ギムザ染色を行った。

ライト・ギムザ染色は以下の通り行った。ライト染色液 (WS16; Sigma-Aldrich Japan)を張り付いている細胞が染色されるように 10-15 滴スライドガラスに滴下し、2-3 分間静置した。その後リン酸緩衝液を上から加え、再度 2-3 分間静置した後、スライドガラスの裏側を流水で水洗した。次にギムザ染色液 (GS500; Sigma-Aldrich Japan)をリン酸緩衝液(1/15mol/L, pH6.4-6.8)で 1/20 に希釈し、希釈ギムザ染色液をスライドガラスに十分量になるように滴下し、7 分静置した。その後、スライドガラスの裏側を流水で水洗し、乾燥させた。乾燥したスライドガラスを顕微鏡で観察した。

11. 殺菌能評価

分化誘導 48-96 時間後の iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞における大腸菌 (*Escherichia coli* ; *E. coli*)に対する殺菌能について *in vitro* での評価を行った。*E. coli* は DH5 α コンピテント細胞(タカラバイオ)を用いたが、アンピシリン耐性を獲得させるために、アンピシリン耐性遺伝子配列を持つ pMX Retrovirus vector を 42 °C 45 秒のヒートショックにより形質転換を行い使用した。プロトコルについては過去の文献を参考とした²⁸。具体的には、前日より LB 液体培地に細菌を加え 37°C で 16 時間程震盪培養を行い増殖させた後、iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞と共培養する 3 時間前に再度 LB 液体培地に 10 倍希釈して 37°C で震盪培養を行い対数増殖期に入るように調整した。分化誘導した iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞を 1.0×10^6 cell /mL、*E. coli* については 1.0×10^7 colony forming unit (CFU) /mL となるように、12-well プレートに 20% FBS /IMDM 1mL に調整し 37°C で 2 時間震盪共培養を行った。CFU は Eppendorf BioPhotometer Basic (eppendorf)を用いて OD600 より算出した。その後 MQ で段階希釈を行い、100 μ g/mL の ampicillin (フジタ製薬)を含有する LB 寒天培地にそれぞれ 25 μ L 播種した。37°C で 16~24 時間培養した後にコロニー数をカウントした。

12. 細胞増殖アッセイ

iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の分化誘導後の細胞数の推移を、血球計算版を用いて計測した。Doxycycline を除いた 20% FBS・1% PS・0.1 μ g/mL G-CSF 添加 IMDM に 5.0×10^5 cell/mL となるように調整し、化合物を加えて 24 ウェルプレートに 1mL ずつ分注した。Doxycycline を除いた日を day 0 として、day 1~day 4 での細胞数を測定した。

13. 統計解析

実験では、独立した実験を 3 回以上行い、同様の傾向が得られることを確認し、平均値 \pm 標準偏差の形式で記載した。統計学的有意差は Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA)および GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)のソフトウェアを用いて unpaired t-test により評価した。またフローサイトメトリーのデータは、FlowJoTM 解析用ソフトウェア (TreeStar, Ashland, OR, USA) を用いて解析を行った。

結果

1. 化合物スクリーニング

1885 種類の各化合物添加条件下で分化誘導 72 時間後の iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の CD16b の発現量を FACSCelesta にて評価した。実験のシェーマを Figure 3 に示す。各プレート間での差を補正するために、DMSO のみを加えたときの CD16b の発現量をコントロールとした。具体的には DMSO を加えたときの CD16b の発現を平均蛍光強度 (Mean Fluorescence Intensity; MFI) で計算し、その値に対する比を各化合物でそれぞれ算出した。1885 種類のうち MFI 比が高かった 60 種類について再度同一プレート内で評価を行った。96 時間分化誘導を行ったコントロールサンプルに匹敵する MFI 比を示す化合物は認められなかったが、コントロールと比較して MFI 比が高い化合物を候補として 11 種類抽出し、さらに解析を進めた (Figure 4, Table 4)。各化合物についてのフローサイトメトリーの結果を Figure 5 に示す。

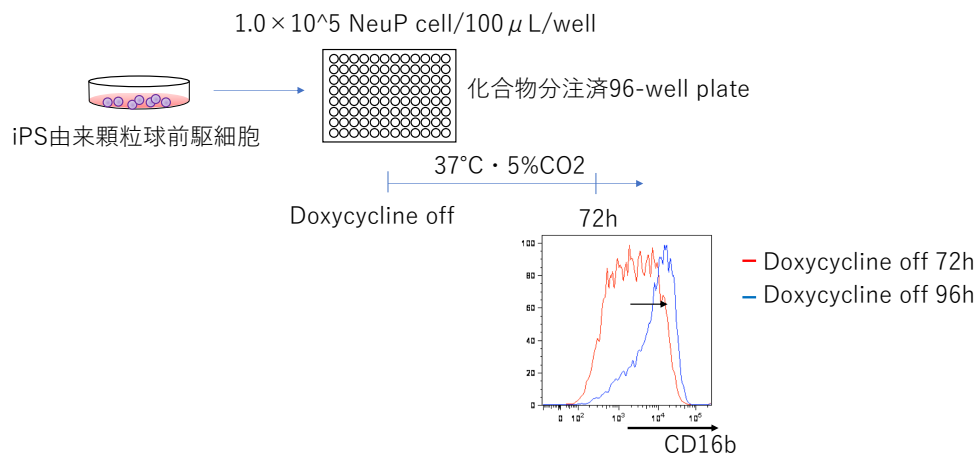


Figure 3. 化合物スクリーニングのシェーマ

各化合物投与下での 72 時間分化誘導後の iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の CD16b の発現を、FACSCelesta を用いてフローサイトメトリー法にて解析した。Figure 内のヒストグラムはコントロールである DMSO を加えたときの分化誘導 72 および 96 時間後の細胞における CD16b の発現の推移を示す。

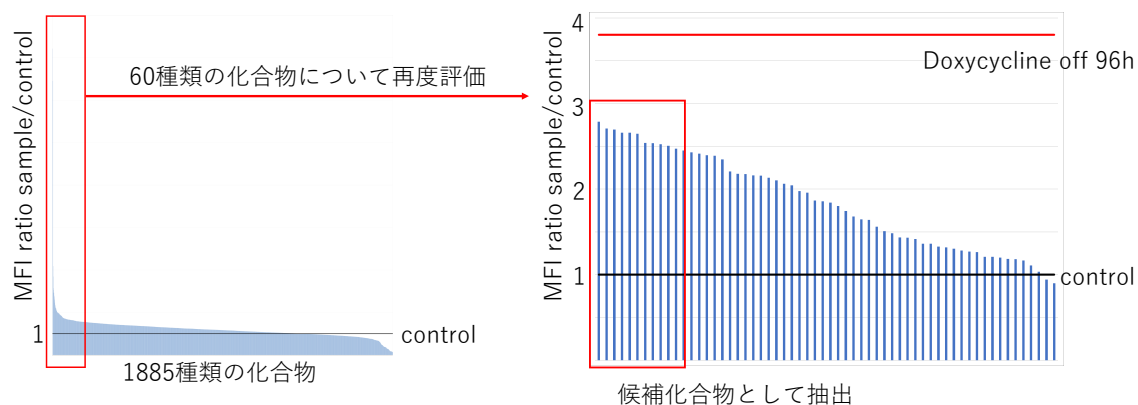
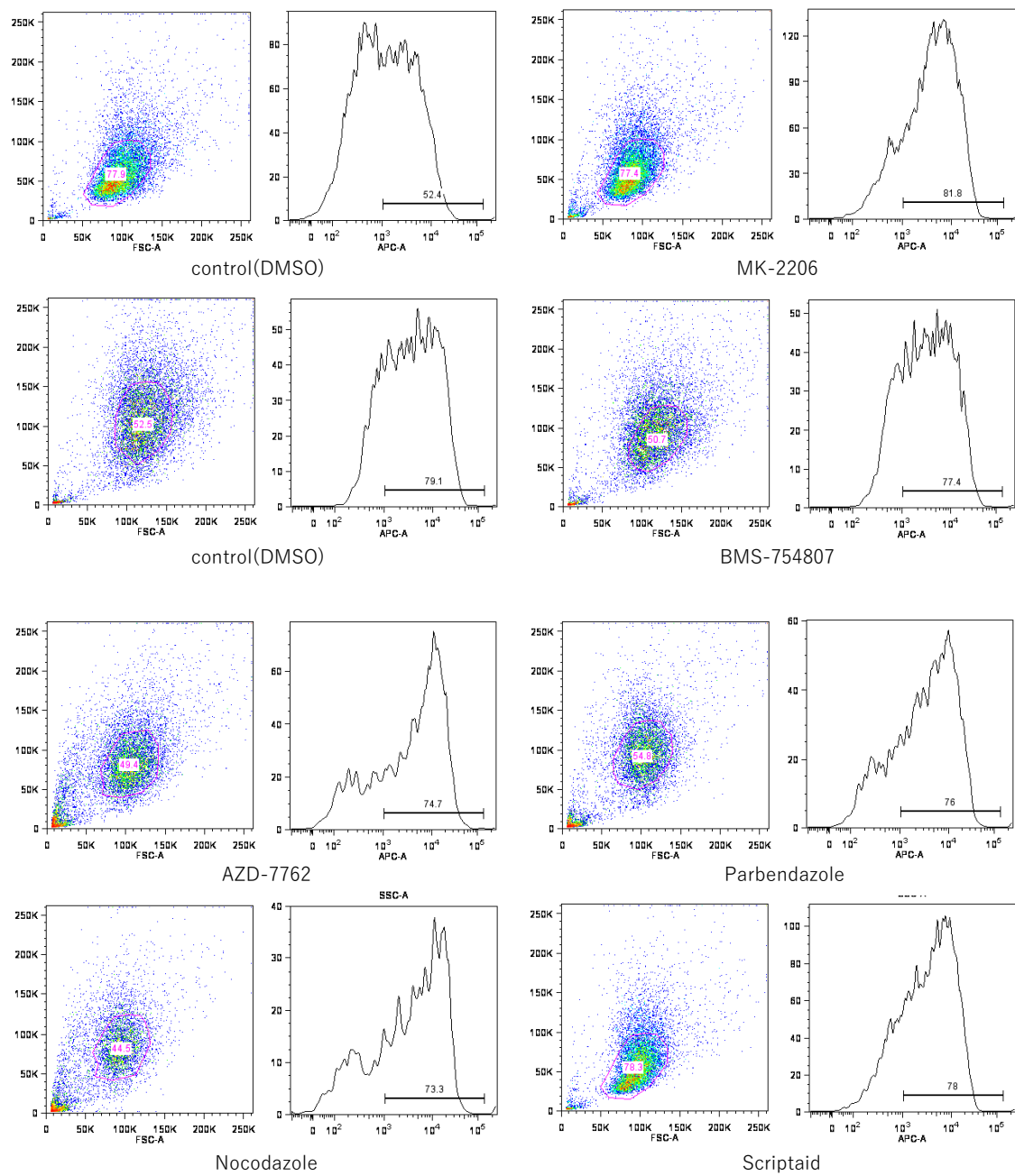


Figure 4. 化合物添加による CD16b の発現解析

1885 種類の化合物により、分化誘導 72 時間後の CD16b の発現が control と比較して高いものを MFI 比として棒グラフに示す (左図)。1 回目のスクリーニングで 60 種類の候補を抽出し、再度同様の実験を行った (右図)。その中でも MFI が高い 11 種類の化合物を候補として抽出した。赤線は DMSO 投与時の分化誘導 96 時間後の MFI 比を示す。1 回目のスクリーニングは 1 回、60 種類抽出後のスクリーニングは 2 回施行し、平均を棒グラフに示している。



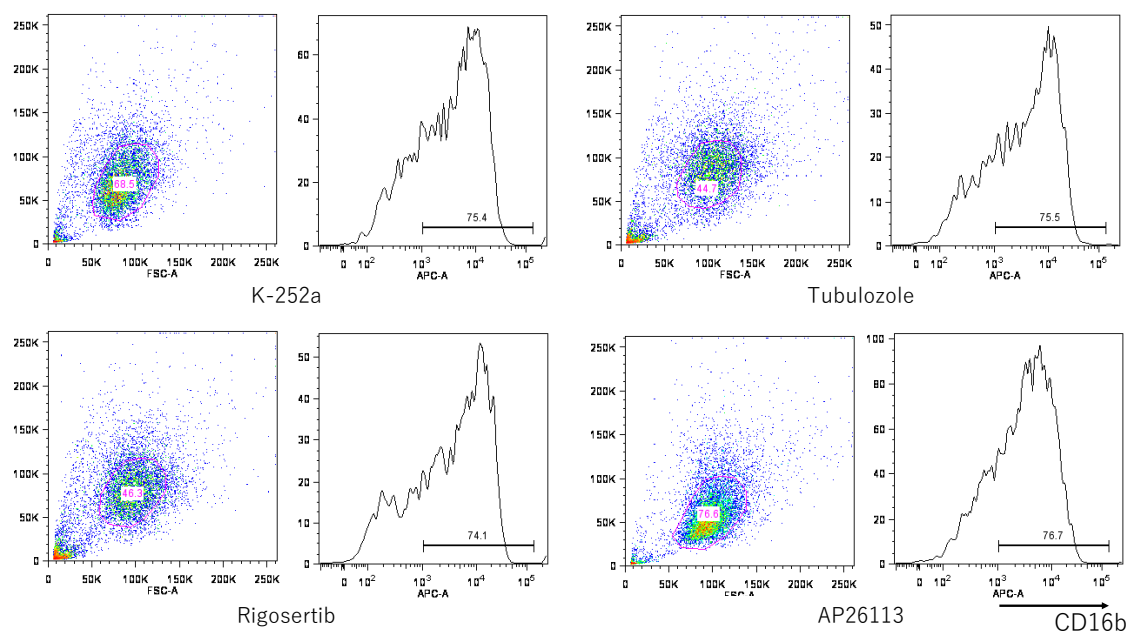


Figure 5. 候補とした化合物のフローサイトメトリー

各化合物添加による分化誘導 72 時間後の細胞のフローサイトメトリー法による解析。各化合物について左図が前方散乱光 (forward scatter: FSC) (X 軸) に対する側方散乱光 (side scatter: SSC) (Y 軸) のドットプロット、右図が細胞の CD16b の発現 (APC 陽性) のヒストグラムの代表例を示す。

Table 4. スクリーニングで抽出した化合物と既知作用

化合物	既知作用
MK-2206 dihydrochloride	inhibitor of Akt1/2/3
Scriptaid	Inhibitor of histone deacetylase
AP26113	selective ALK inhibitor
Tozasertib	inhibitor of Aurora A/B/C kinases
BMS-754807	inhibitor of IGF-1R/InsR
AZD-7762	checkpoint kinase (Chk) inhibitor
Parbendazole	Anthelmintic
Nocodazole	Antineoplastic, Microtubule poison
Tubulozole, HCl	Stereospecific microtubule inhibitor

K-252a	Potent inhibitor of Ca ²⁺ /calmodulin kinase II
Rigosertib (sodium)	a selective and non-ATP-competitive inhibitor of PLK1

2. 細胞形態の評価

上記にて抽出された化合物を添加し、分化誘導 72 時間後の細胞についてサイトスピンを行い、ライト・ギムザ染色法にて染色し細胞形態を顕微鏡で確認した。コントロールである DMSO を加えた場合は分化誘導 72 時間後で桿状核球と一部分葉核球を認めており、96 時間後では半分以上が分葉核球を認めていた。上記を基準として比較したところ、Microtubule 阻害剤 (Parbendazole、Nocodazole、Tubulazole)、K-252a、Rigosertib、AZD-7762 は 72 時間後時点で核の分葉を認めない細胞が多くを占めており、Tozasertib、BMS-754807 はやや大型の過分葉の好中球を認めていた。MK-2206、Scriptaid、AP26113 では桿状核球と分葉核球が認められていたが、コントロールと比較して分葉核球が多いという傾向は認められなかった。フローサイトメトリー法での解析で、FSC および SSC の分画がコントロールと比較して類似する MK-2206、Scriptaid、AP26113 についてさらに解析を行った (Figure 6)。

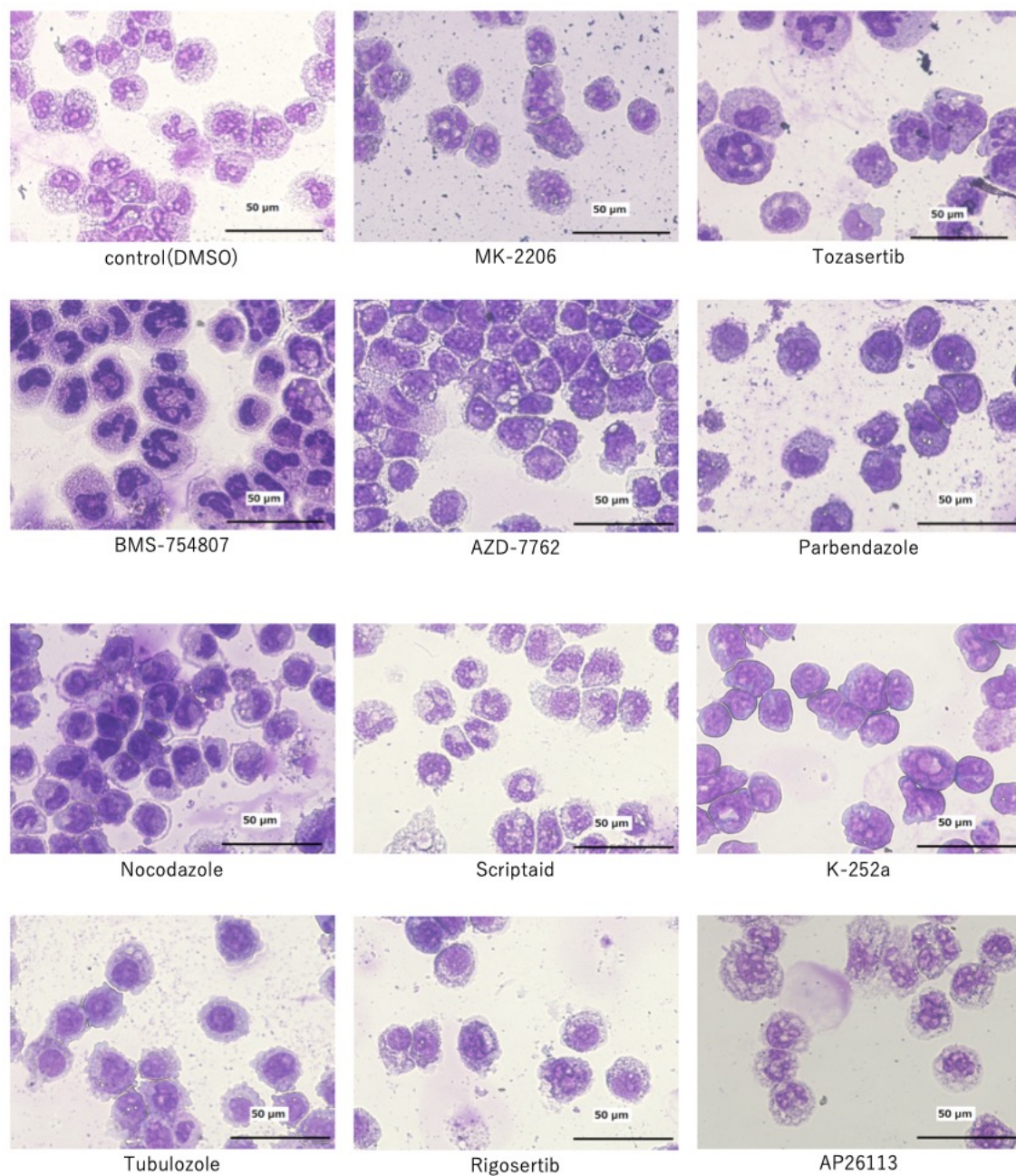


Figure 6. 分化誘導 72 時間後の細胞形態

各化合物添加による分化誘導 72 時間後の細胞形態の代表例を示す。

3. CD16b の発現確認

上記 3 種類の化合物 (MK-2206、Scriptaid、AP26113) を改めて購入し、分化誘導 72 時間後の CD16b の早期発現が再現されるかフローサイトメトリー法にて解析を行った。それぞれの化合物について $1\mu\text{M}$ および 100nM の濃度で評価を行ったところ、 100nM では $1\mu\text{M}$ と比較し CD16b の早期発現効果は弱まった。 $1\mu\text{M}$ では Figure 7 に示すように、コントロールと比較して有意に CD16b の早期発現が起こることを確認できたため、化合物濃度を $1\mu\text{M}$ として以後の解析を行った。

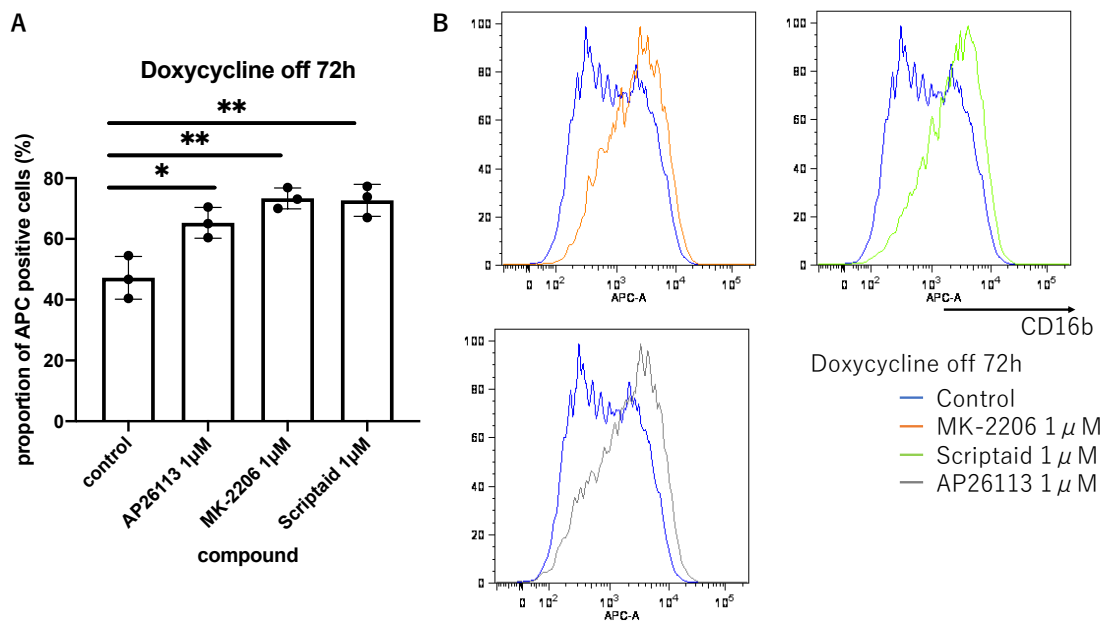
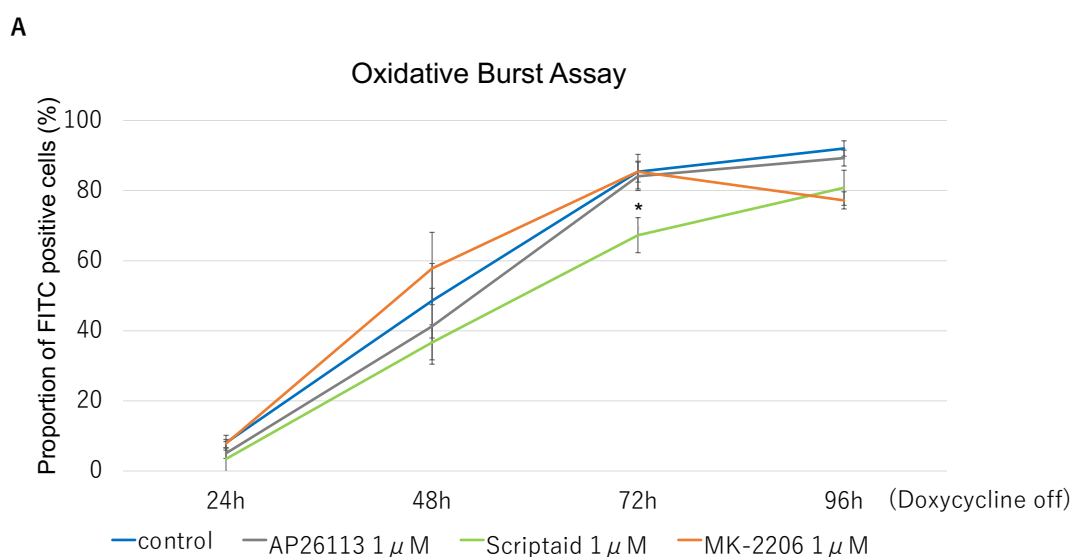


Figure 7. 化合物添加による CD16b の早期発現の確認

control、AP26113、MK-2206、Scriptaid 添加による分化誘導 72 時間後の CD16b 表面抗原の発現陽性細胞の割合を棒グラフで示す ($n=3$)。AP26113、MK-2206、Scriptaid 添加により CD16b 陽性細胞は早期に増加する (A)。ヒストグラムは分化誘導 72 時間後の細胞の CD16 発現の代表例を示す (B)。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

4. Oxidative Burst 機能評価

好中球は生体内に侵入した微生物などの刺激により、ニコチンアミドアデニンジヌクレチドリン酸オキシダーゼが活性化することで、酸素分子よりスーパーオキサイドアニオンが生成され、さらに過酸化水素やヒドロキシラジカル、次亜塩素酸などの活性酸素種が生成される²⁹。この一連のプロセスは **Oxidative Burst** と呼ばれ、これらの活性酸素種は微生物の殺菌に関わっており自然免疫に重要である。上記3種類の化合物について、**Oxidative Burst**の機能を比較したところ、**MK-2206** および **AP26113** については分化誘導 24-72 時間後において、コントロールと比較して機能の低下は認められなかったが、**Scriptaid** については 72 時間後の状態ではコントロールと比較して有意に低下を認めた。**MK-2206** については 96 時間後時点で低下傾向を認めた (Figure 8)。



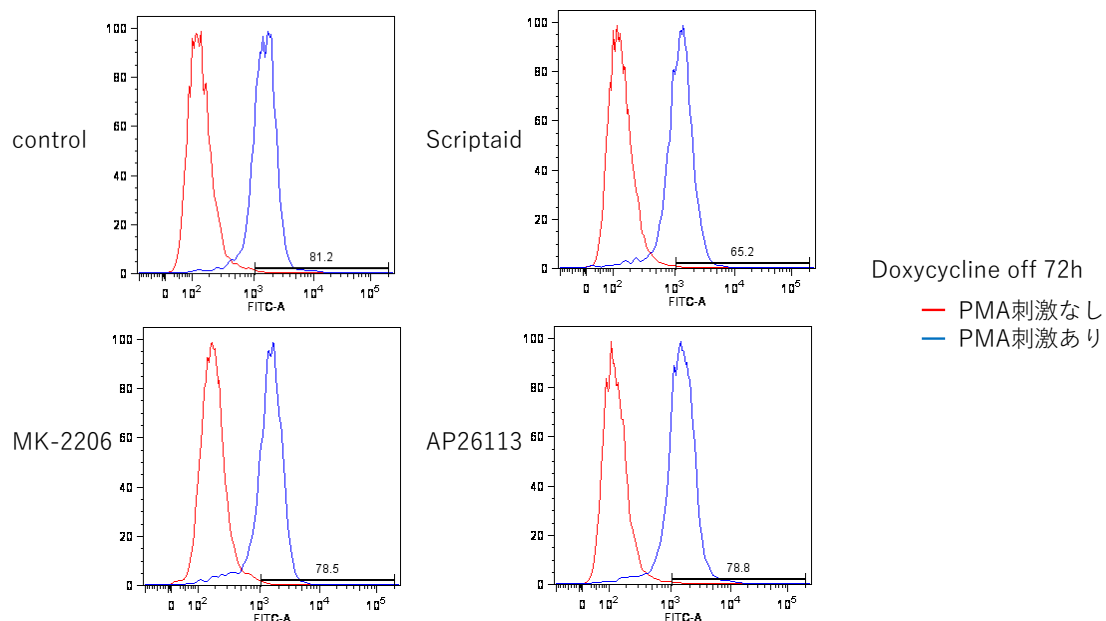
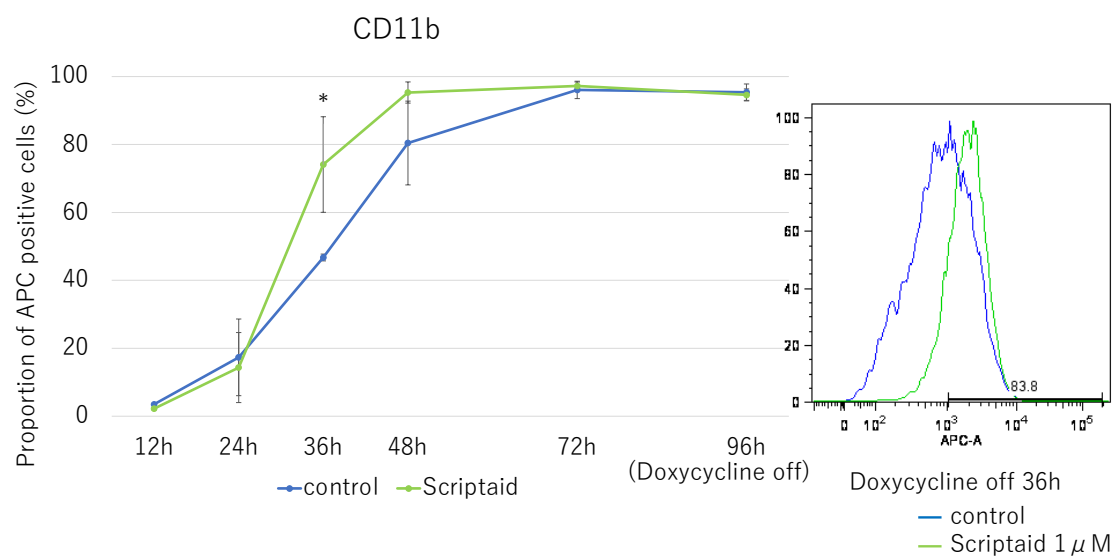
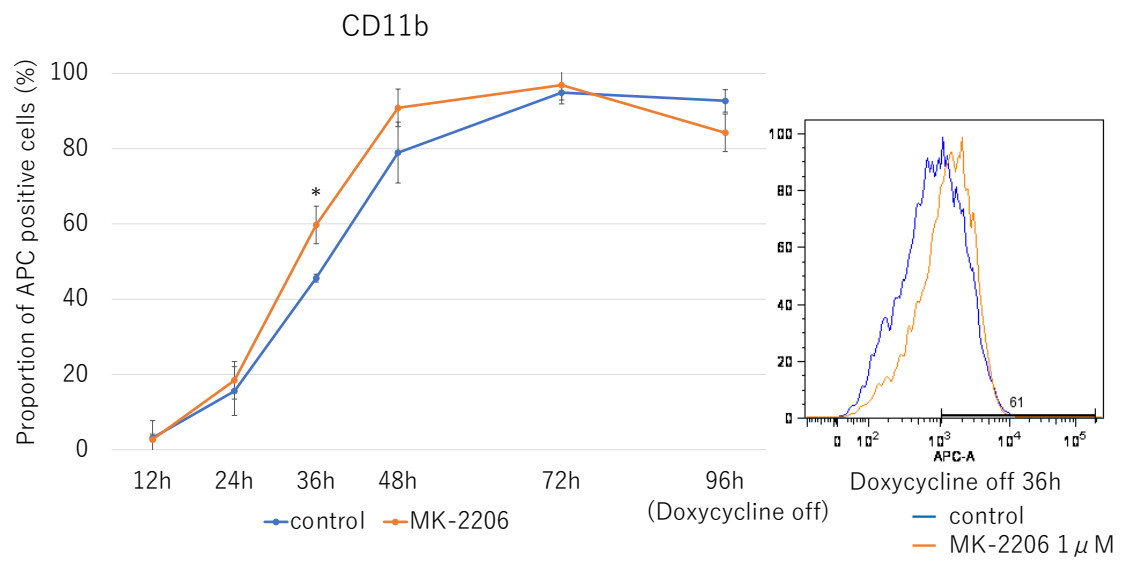


Figure 8. 化合物添加による Oxidative Burst 機能の変化

control、AP26113、Scriptaid、MK-2206 添加により、Oxidative Burst を起こす細胞 (FITC 陽性細胞) の割合を折れ線グラフで示す (n=3)。Scriptaid を添加することで Oxidative Burst を起こす細胞が減少することが示された (A)。ヒストグラムは分化誘導 72 時間後の細胞に対する PMA 刺激の有無での FITC 陽性細胞率の代表例を示す (B)。* $p < 0.05$

5. CD11b 表面抗原発現解析

CD11b は骨髓球以降に発現が上昇することが知られているため¹⁶、CD16b とは異なる分化の指標として抗体染色によるフローサイトメトリー法にて解析を行った。MK-2206 および Scriptaid ではコントロールと比較して早期に表面抗原 CD11b の発現を認めたが、AP26113 では早期発現が認められなかった (Figure 9)。Oxidative Burst 機能が Scriptaid 添加時に機能低下を示した結果と合わせて、MK-2206 を候補としてさらに追加の解析を行った。



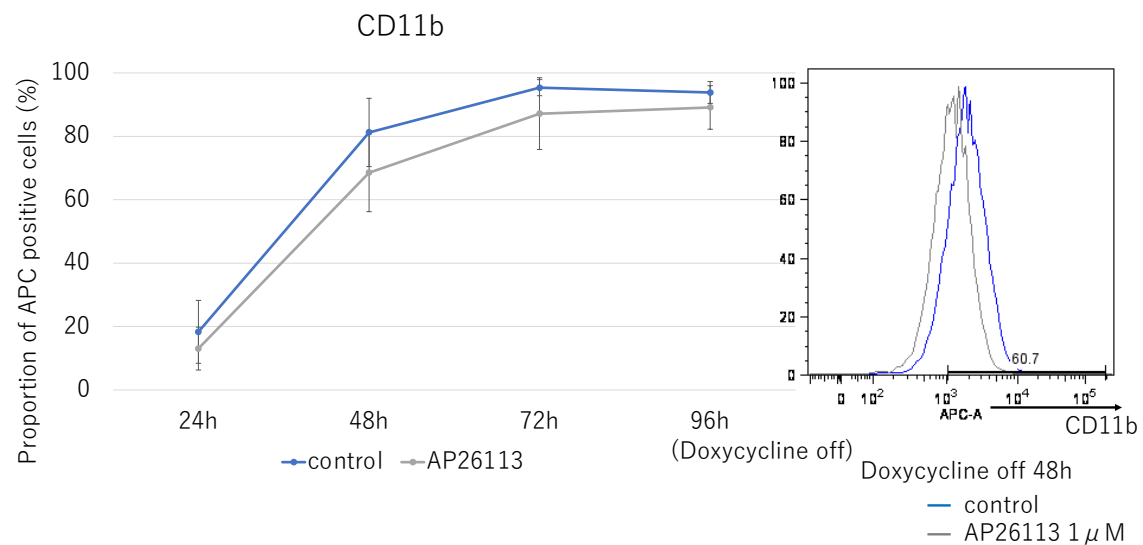


Figure 9. 化合物添加による CD11b 表面抗原の発現解析

control と比較し AP26113、Scriptaid、MK-2206 添加時の分化誘導 12-96 時間後の CD11b 表面抗原の発現細胞の割合を折れ線グラフで示す(n=3)。MK-2206、Scriptaid を添加することで CD11b の発現が早期に誘導されることが示された。ヒストグラムは MK-2206 および Scriptaid は分化誘導 36 時間後、AP26113 は分化誘導 48 時間後の細胞の CD11b の発現の代表例を示す。* $p < .05$

6. 分化誘導後の細胞数の評価

分化誘導後の細胞数の変化について MK-2206 添加による細胞数の変化について評価を行った。両者とも徐々に細胞数の増加を認めており、分化誘導 48 時間後より MK-2206 添加群で低下傾向であったが、有意な差は認められなかった (Figure 10)。

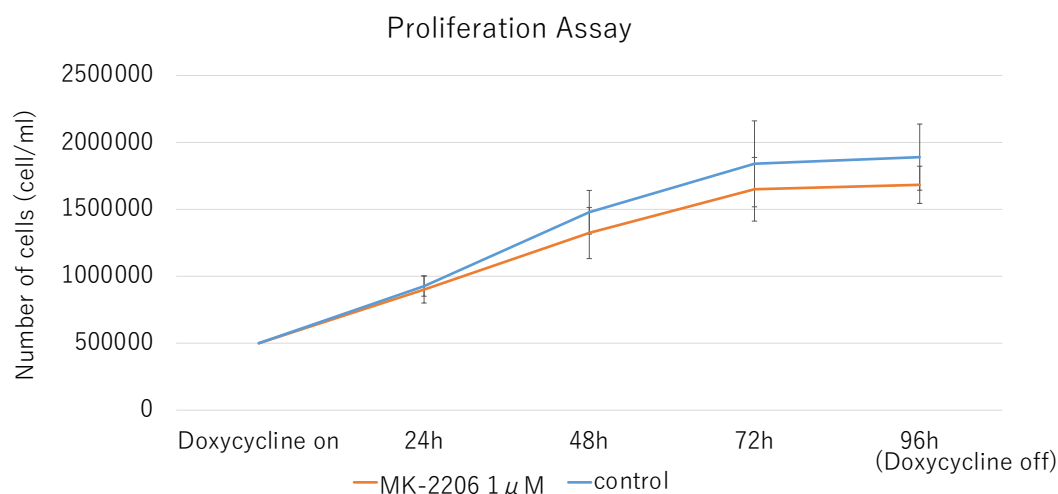


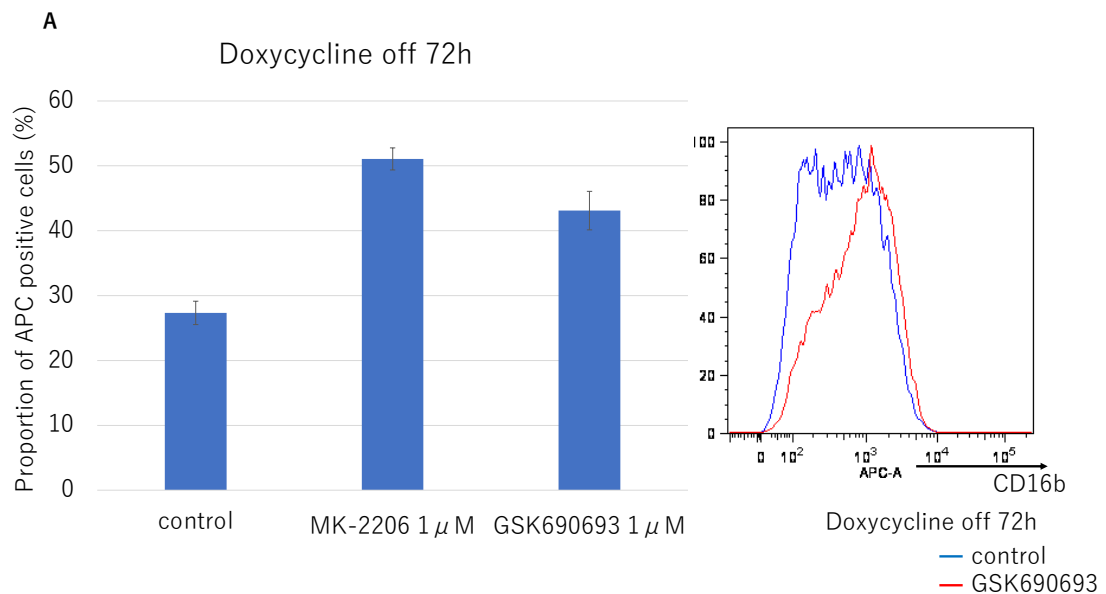
Figure 10. MK-2206 添加による生存能の評価

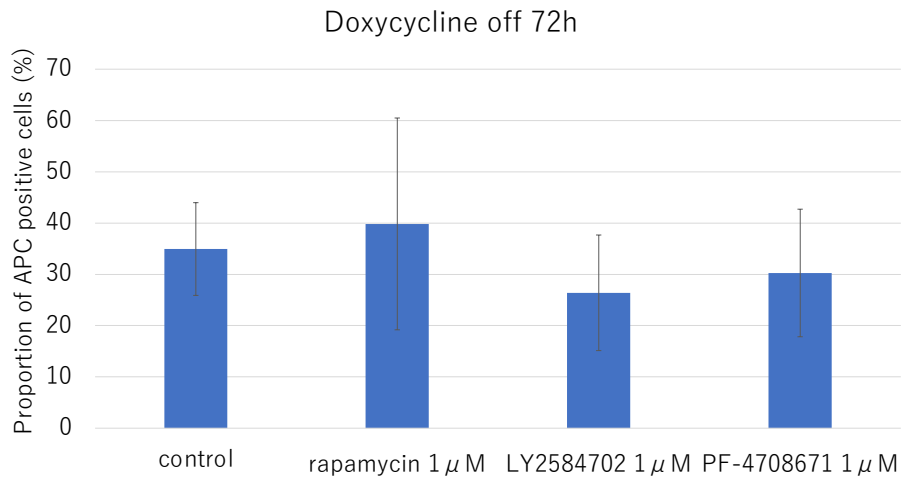
control と MK-2206 添加時の分化誘導 24-96 時間後の細胞数を折れ線グラフで示す (n=3)。

7. PI3K/AKT/mTOR pathway に関わる阻害剤添加時の CD16b の発現解析

MK-2206 は pan AKT inhibitor として知られている。AKT が関わるシグナル経路として phosphatidylinositol 3-phosphate kinase/Akt/ mammalian target of Rapamycin (PI3K/AKT/mTOR) pathway が知られているが³⁰⁻³²、化合物ライブラリーでのスクリーニングで抽出した分化誘導 72 時間後の CD16b の発現が高値であった 60 種類の中に PI3K/AKT/mTOR pathway に関わる阻害剤が MK-2206 の他に 7 種類含まれていた。また MK-2206 とは異なる AKT inhibitor である GSK690693 を用いて CD16b 表面抗原の発現解析をフローサイトメトリー法にて評価を行ったところ、分化誘導 72 時間後にコントロールと比較して早期に発現を認めた。AKT の下流のシグナル経路として知られている AKT/mTOR/S6K pathway について^{33,34}、

mTOR inhibitor である rapamycin、S6K inhibitor である LY2584702、PF-4708671 を用いて同様の評価を行ったが、有意な CD16b の早期発現は認められなかった (Figure 11A)。また、MK-2206 について分化誘導 72 時間後の FCGR3B の mRNA の発現量解析を RT-qPCR 法により行ったところ、コントロールと比較して発現量増加を認めた (Figure 11B)。以上の結果より MK-2206 を用いてさらに追加の解析を行うこととした。





B

FCGR3B/18s control vs MK-2206

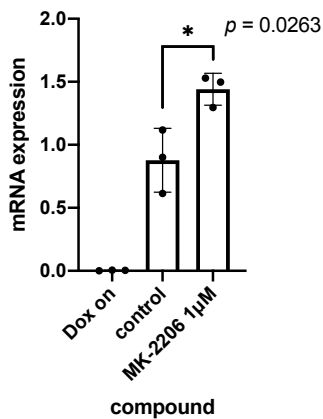


Figure 11. Akt/mTOR/S6K pathway の阻害剤による CD16b の発現の比較

Akt/mTOR/S6K pathway に関わる阻害剤の添加により、control と比較して分化誘導 72 時間後の CD11b 表面抗原の発現量が上昇している細胞 (APC 陽性細胞) の割合をフローサイトメトリー法で評価し棒グラフで示す(n=3)。MK-2206 と同様に Akt 阻害剤である GSK690693 の添加により CD16b の発現が早期に誘導されることが示された (n=3)。ヒストグラムは分化誘導 72 時間後の細胞の CD16b 発現の代表例を示す (A)。Doxycycline on、control、MK-2206 添加時の分化誘導 72 時間後の FCGR3B の mRNA の発現量を棒グラフで示す (n=3) (B)。* $p < 0.05$

8. *E. coli* Phagocytosis Assay Kit による貪食能の評価

MK-2206 を加えることによる貪食能の評価を行った。Figure 12 に示すように、MK-2206 を加えた iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞では分化誘導 48 時間後時点で 70%程度の細胞で *E.coli* を取り込みが認められ、コントロールと比較して早期に貪食能の獲得が示された。96 時間後時点では control、MK-2206 群両方で貪食能は低下傾向となっていた。

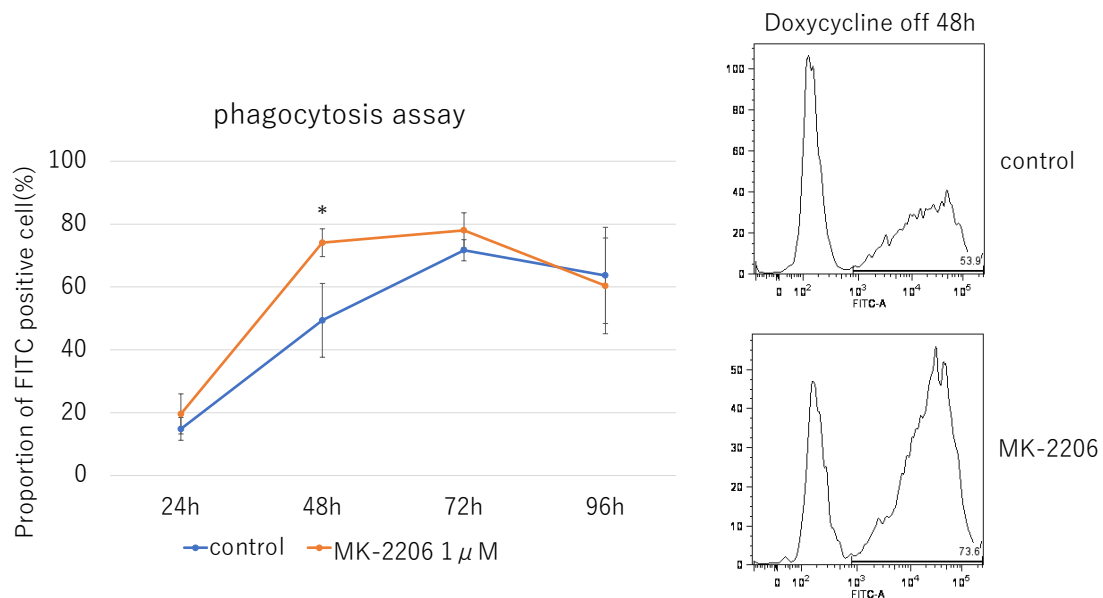
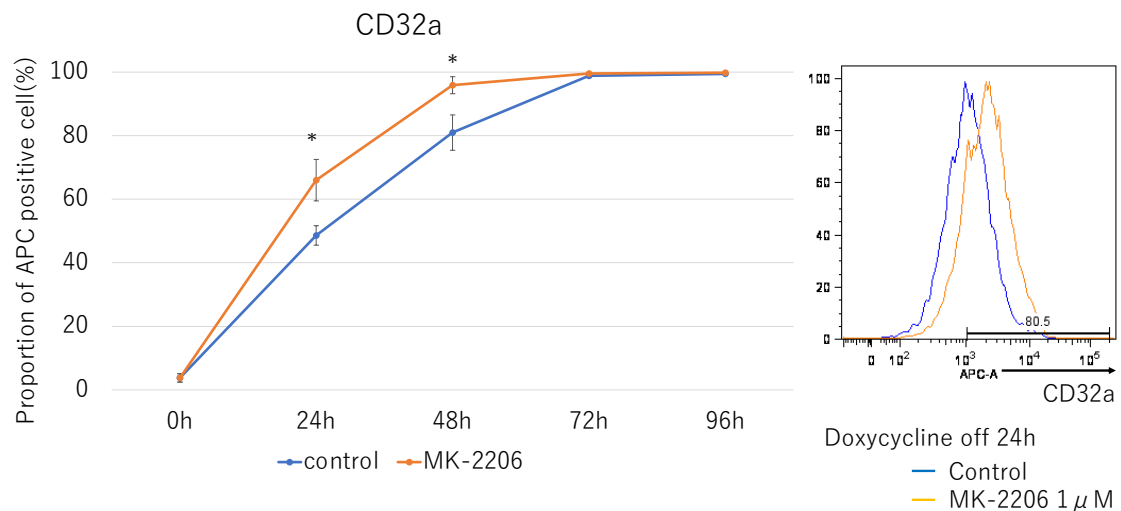


Figure 12. MK-2206 添加による貪食能の評価

MK-2206 添加により、control と比較して分化誘導 24-96 時間後の貪食能をフローサイトメトリー法による FITC 陽性細胞の割合として折れ線グラフに示す (n=3)。MK-2206 を添加することで、分化誘導 48 時間後の貪食を起こす細胞の割合が早期に増加していることを示している。ヒストグラムは分化誘導 48 時間後の細胞の FITC 陽性率の代表例を示す。* $p < 0.05$

9. 貪食や oxidative burst に関わる表面抗原について評価

上記の機能評価の結果を踏まえて、好中球で発現が上昇する表面抗原である CD32a および CD35 の MK-2206 添加による変化についてフローサイトメトリー法にて評価を行った。CD32a は Fc レセプターの一つであり、抗体によりオプソニン化された病原菌の貪食や免疫複合体を介して好中球の活性酸素の産生に関わるとされており^{35,36}、CD35 はヒト補体成分 C3b に対するレセプターであり、オプソニン化された病原菌の貪食に関わるとされている^{37,38}。MK-2206 を添加することで、早期にこれらの表面抗原の発現が認められた (Figure 13)。



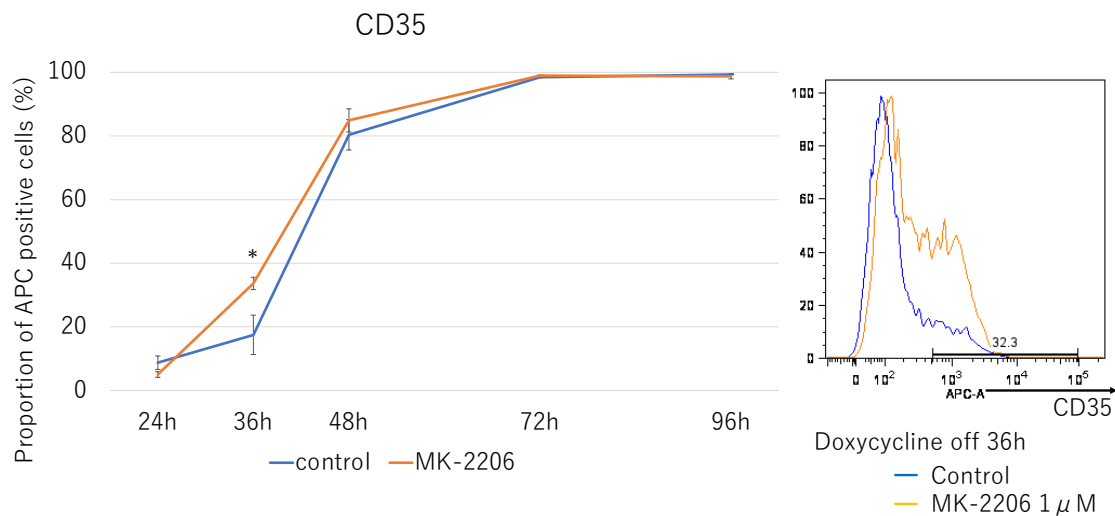


Figure 13. MK-2206 添加による CD32a、CD35 の発現の変化

MK-2206 添加により、control と比較して分化誘導 24-96 時間後の CD32a および CD35 表面抗原の発現をフローサイトメトリー法による APC 陽性細胞の割合として折れ線グラフで示す (n=3)。CD32a、CD35 の表面抗原の発現が MK-2206 添加により早期に誘導されることを示している。ヒストグラムはそれぞれの表面抗原の発現が大きく変化する分化誘導 24 時間後の CD32a および 36 時間後の CD35 の発現の代表例を示す。* $p < 0.05$

10. 走化性因子受容体の発現比較

MK-2206 投与での走化性に関与する受容体の発現についてもフローサイトメトリー法にて評価を行った。細菌性ホルミルペプチドの受容体である FPR1^{39,40} および炎症性サイトカイン Interleukin-8 (IL-8) に対する受容体である CXCR1^{41,42} の発現について control と比較を行ったところ、MK-2206 を添加することで早期にこれらの表面抗原の発現が認められた (Figure 14)。

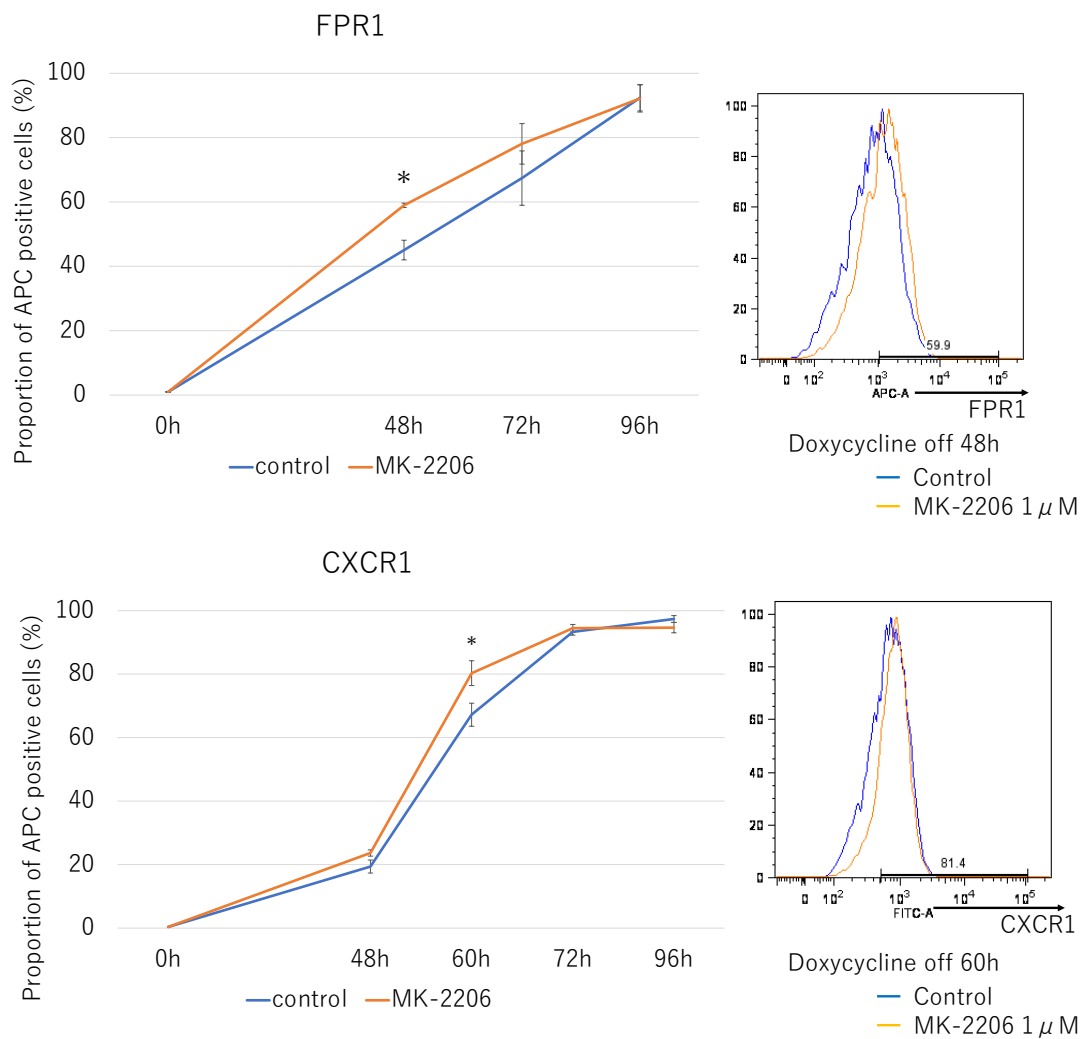


Figure 14. MK-2206 添加による走化性因子受容体の発現の変化

MK-2206 添加により分化誘導 48-96 時間後の FPR1 および CXCR1 表面抗原の発現をフローサイトメトリー法による APC 陽性細胞の割合として折れ線グラフで示す (n=3)。FPR1、CXCR1 の表面抗原の発現が MK-2206 添加により早期に誘導されることを示している。ヒストグラムはそれぞれの表面抗原の発現が大きく変化する分化誘導 48 時間後の FPR1 および 60 時間後の CXCR1 の発現の代表例を示す。* $p < 0.05$

11. 細胞走化性の評価

MK-2206 の添加による細胞走化性への影響について比較した。分化誘導 48-72 時間後の走化性を持つ細胞の割合は両者で明らかな差は認められなかった。しかし分化誘導 96 時間後の走化性を持つ細胞の割合は、MK-2206 添加群で control と比較して有意ではないが低下傾向が認められた (Figure 15)。

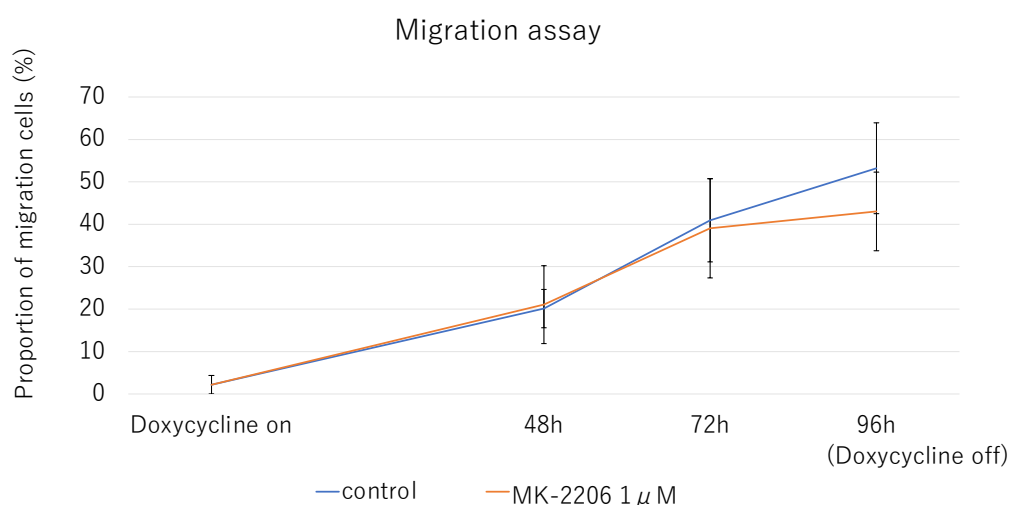


Figure 15. 細胞走化性の比較

MK-2206 添加により、control と比較して分化誘導 48-96 時間後の細胞走化性の変化を折れ線グラフで示す (n=3)。MK-2206 を添加することにより遊走する細胞の割合の増加は認められなかった。

12. *In vitro* での殺菌能の評価

MK-2206 を加えて分化誘導を行った iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の殺菌能について、*E. coli* を用いて *in vitro* での評価を行った。iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞を加えない時、あるいは未分化な状態の iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞と共培養さ

せた時と比較して、分化誘導 72-96 時間経過した細胞と共培養させた場合の細菌量は低下を認めたが、**control** と比較して殺菌能が上昇する結果は得られなかった (Figure 16)。

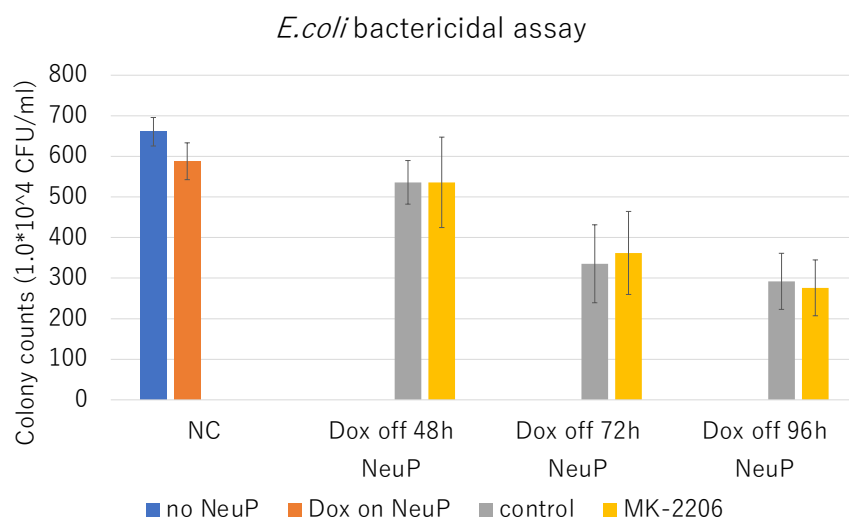


Figure 16. *in vitro* での殺菌能評価

MK-2206 添加により、**control** と比較して分化誘導 48-96 時間後の *E.coli* に対する殺菌能について CFU として棒グラフに示す(n=3)。MK-2206 を添加することにより殺菌能の早期出現は認められなかった。*NC* : **negative control**、*Dox* : Doxycycline、*NeuP* : Neutrophil Progenitor

考察

本研究で私は顆粒球分化を促進する化合物の探索を目的として、iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞を用いて終末分化の表面抗原である CD16b を標的とした化合物スクリーニングを行い、pan-AKT 阻害剤である MK-2206 dihydrochloride が iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞に対して Fc γ レセプターやケモカインレセプターなどの表面抗原の早期発現および貪食能の早期獲得に有用である可能性を示した。

しかし、その他の顆粒球の機能である oxidative burst や走化性、および細菌に対する殺菌能については、早期の機能獲得を示すことはできなかった。

CD16b は他の Fc レセプターと協調してオプソニン化された細菌の貪食能に関与することが報告されている^{23,24,43} が、oxidative burst とは関与しないとの報告があり³⁵、本研究でも CD16 の発現変化は得られたものの oxidative burst 機能の上昇は得ることができなかった。また、細菌に対する殺菌能についても oxidative burst の関与するところが大きいと考えられ⁴⁴⁻⁴⁶、早期の機能獲得を示すことができなかったと考えられた。しかし、今回の実験では好中球で発現が上昇するもう一つの Fc γ レセプターである CD32a についても早期に上昇を認めており、CD32a は脱顆粒や炎症性メディエーターや活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) の産生、Neutrophil extracellular traps (NETs) の形成に関わると報告されてお

り^{35,47-49}、今回の結果とは解離するものと考えられた。その理由として以下に記載する様に、AKT の阻害による効果が関わっている可能性を考えた。

今回候補化合物として抽出した MK-2206 は allosteric pan AKT 阻害剤としての既知の作用が知られている⁵⁰。AKT は細胞の生存や代謝などの恒常性に関わる遺伝子を制御していることが知られているが、一部の腫瘍細胞においては恒常的に活性化することで、異常な増殖や不死化、浸潤や転移に関わることが知られている^{32,51-53}。そのため、AKT 阻害剤である MK-2206 は AKT pathway が異常に活性化しているいくつかの難治性の癌に対する治療効果が期待されており、臨床試験で検証が行われている^{54,55}。また、AKT が関わるシグナル経路である PI3K/AKT pathway は、好中球の機能に関連することがいくつか報告されている。例えば、PI3K γ をノックアウトしたマウスの好中球は呼吸バーストや遊走能の低下が認められている⁵⁶。ヒト iPS 細胞より作成した好中球ではミリス Toil 化 AKT を強制発現させることで *E. coli* に対する貪食能と NETs の形成が増加したという報告されている⁵⁷。走化性因子受容体については、ヒト好中球において CXCR2 を介した IL-8 が誘導する走化性や FPR1 を介する走化性は AKT により制御されることが知られる^{58,59}。さらに、AKT はアイソフォームにより好中球に対して異なる効果を持つとも報告されており、AKT2 ノックアウトマウスの好中球は遊走能や脱顆粒酵素の低下、活性酸素の産生が低下することや⁶⁰、 α M β 2

integrin の細胞表面の発現が低下し、接着能や crawling が低下することが報告されているが⁶¹、反対に AKT1 ノックアウトマウスの好中球では ROS 産生の増加や MMP9 や MPO などの顆粒タンパクの産生が増加し、*in vitro* の実験で貪食能や *S. aureus* に対する殺菌能が上昇したとの報告されている⁶²。上記のように AKT は好中球の種々の機能に関わっているため、今回の実験では CD16b などの表面抗原の早期発現およびそれに付随した貪食能の早期発現には効果が得られたが、MK-2206 の pan AKT 阻害効果により、いくつかの機能については機能低下に作用した可能性は否定できないと考えられた。また、今回の実験は阻害剤を用いた実験であり、化合物スクリーニングのその他の PI3K/AKT に関わる阻害剤でも同様の傾向が認められていたが、今回の CD16b の早期発現が off-target 効果によるものである可能性も否定できないと考えられた。それらを明らかにするためには AKT のアイソフォームごとに分けた AKT 発現量あるいはリン酸化を低下させる実験が必要と考えられる。

本研究の目的であった「顆粒球分化の分化期間の短縮」について、過去に報告されたヒト前骨髄性白血病細胞の細胞株である HL-60 を用いた実験では、DMSO で分化誘導を行った時に mTOR に対する small interfering RNA や阻害剤である rapamycin を用いることで PLD2 の発現が早期に上昇し、分化期間が短縮に繋がる可能性があることが報告されている²⁵。mTOR は AKT pathway に関わっているこ

とが知られており、今回の結果を補助する可能性があるが、本研究では rapamycin を用いた CD16b の発現についての実験では、早期発現を示唆する結果を得ることはできなかった。その理由として、培養時に加えている G-CSF により PI3K/AKT pathway が活性化されることで、阻害剤の効果が幾らか打ち消された可能性が考えられた⁶³。また、本実験では AKT/mTOR/S6K pathway に関わる阻害剤での評価を行ったが、AKT は他にも FOXO1 や GSK3B、NFκB などに関わる経路の活性化を制御することが知られている³⁰。好中球についても PI3K/AKT シグナルは GSK3B を制御し、走化性に関わることが報告されており⁶⁴、AKT が制御すると知られる他の蛋白についても好中球における作用を明らかにすることで、より分化期間短縮につながる化合物を同定できる可能性があり、今後評価することが望まれる。

G-CSF は G-CSF 受容体に結合することで、Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT)、mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase (MAPK/ERK)、PI3K/AKT の経路を活性化し、増殖および分化を調節することが知られている^{63,65}。その中で PI3K/AKT pathway は抗アポトーシスに関わり、骨髄系前駆細胞の増殖を促すことで、より多くの成熟好中球が得られる様になると考えられている。好中球はプログラムされた細胞死を引き起こすことで組織への不必要な傷害を防いでいるが、その過程で AKT

のリン酸化が低下していくことが知られており、阻害剤で AKT のリン酸化阻害を行うことで、細胞死も促進されることが報告されている⁶⁶。しかし、他の報告では AKT 阻害剤および mTOR 阻害剤は好中球の生存率を低下させないと述べられており意見が分かれる⁶⁷。同報告では AKT/mTOR pathway の活性化は骨髓芽球、前骨髓球、骨髓球などの顆粒球前駆細胞の生存に重要であると述べており、今回 pan-AKT 阻害剤である MK-2206 は G-CSF の効果に相反し、これらの分画の生存期間の短縮、すなわち好中球分化までの期間の短縮に働き、分化誘導 48 時間以降の増殖がコントロールに比較し低下傾向であったことも矛盾しないと考えられた。また、好中球の寿命は 19 時間程と予想されており⁶⁸、分化誘導 96 時間後の oxidative burst、走化性がコントロールと比較した時に低下傾向であったが、早期に機能を獲得することで、早期に機能を喪失したとも考えられた。

顆粒球/単球系前駆細胞から成熟好中球までの各段階でのトランスクリプトームを解析した論文では、細胞周期に関わる遺伝子の発現は顆粒球前駆細胞から未熟好中球にかけて急激に低下し、一方で微生物に対する応答に関わる遺伝子の発現は未熟好中球から成熟好中球に分化するにつれて増加していくことが示されており⁶⁹、AKT は成熟好中球の機能においても重要であるため、増殖能を持つ前駆細胞の期間に限定して AKT 阻害剤を作用させることで、分化後の好中球に

おける阻害剤による機能低下を克服できる可能性があると考えられ、今後の課題である。

本研究では iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞より分化させた好中球を生体内に投与することを最終的な目的とするため、作成した細胞の生体内投与の安全性および分化誘導時に用いる MK-2206 の生体内へのリスクが問題となる。MK-2206 は現在臨床試験の段階で用いられている薬剤であり、臨床試験では湿疹や粘膜炎、倦怠感、消化器症状、高血糖などが主な副作用として報告されているが^{54,55}、生体への影響については今後のデータの蓄積が待たれる。本研究では MK-2206 は分化誘導時にのみ投与し、生体に投与するときには MK-2206 は洗浄するため生体内にはほぼ投与されず、生体への影響は少ないものと考えられるが、作成した細胞の生体内投与の安全性も含め in vivo での評価は必要であり、今後の課題である。また、本研究は iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の分化促進化合物の探索を目的とし、機能についても iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞での化合物投与の有無で比較を行ったが、正常ヒト好中球との比較も必要であり、今後の課題である。

結論として、今回のスクリーニングは好中球分化のマーカーとして CD16b の発現を指標に化合物の絞り込みを行い、MK-2206 添加により貪食や走化性に関わる表面抗原の早期発現および貪食能の早期獲得を達成できたが、その他の機能においては早期獲得が認められなかった。しかし、AKT の阻害により機能が

低下している可能性があるため、AKT に制御される因子の中で分化促進と機能低下に関わる因子を明らかにすることで、その点を克服できる可能性があり、今後の課題として研究を進めていく予定である。

謝辞

本研究を進めるにあたり、丁寧なご指導を頂きました東京大学大学院医学系研究科 血液腫瘍病態学講座 黒川峰夫教授に深く感謝致します。また、実験全般に関してご指導・ご協力を頂きました、東京大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科講師 中原史雄先生、正本庸介先生、籠谷勇紀先生、特任助教の宮内将先生に感謝致します。また、実験のサポートや機器のメンテナンスをして頂きました、東京大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科実験助手 田中啓子様、佐藤さおり様に感謝致します。また、化合物を提供いただきました創薬機構の小島宏建先生、今村理世先生および AMED 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (課題番号 1996)に感謝申し上げます。

参考文献

- 1 Biswal, S. & Godnaik, C. Incidence and management of infections in patients with acute leukemia following chemotherapy in general wards. *Ecancermedicalscience* **7**, 310, doi:10.3332/ecancer.2013.310 (2013).
- 2 Gardner, A. *et al.* Randomized comparison of cooked and noncooked diets in patients undergoing remission induction therapy for acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* **26**, 5684-5688, doi:10.1200/jco.2008.16.4681 (2008).
- 3 Culakova, E. *et al.* Patterns of chemotherapy-associated toxicity and supportive care in US oncology practice: a nationwide prospective cohort study. *Cancer Med* **3**, 434-444, doi:10.1002/cam4.200 (2014).
- 4 Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**, 657-670, doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011 (2010).
- 5 Kobayashi, S. D., Malachowa, N. & DeLeo, F. R. Neutrophils and Bacterial Immune Evasion. *J Innate Immun* **10**, 432-441, doi:10.1159/000487756 (2018).
- 6 Gea-Banacloche, J. Granulocyte transfusions: A concise review for practitioners. *Cytotherapy* **19**, 1256-1269, doi:10.1016/j.jcyt.2017.08.012 (2017).
- 7 Liles, W. C. *et al.* A comparative trial of granulocyte-colony-stimulating factor and dexamethasone, separately and in combination, for the mobilization of

- neutrophils in the peripheral blood of normal volunteers. *Transfusion* **37**, 182-187, doi:10.1046/j.1537-2995.1997.37297203521.x (1997).
- 8 Stroncek, D. F., Yau, Y. Y., Oblitas, J. & Leitman, S. F. Administration of G--CSF plus dexamethasone produces greater granulocyte concentrate yields while causing no more donor toxicity than G--CSF alone. *Transfusion* **41**, 1037-1044, doi:10.1046/j.1537-2995.2001.41081037.x (2001).
 - 9 Kim, K. H. *et al.* Therapeutic granulocyte transfusions for the treatment of febrile neutropenia in patients with hematologic diseases: a 10-year experience at a single institute. *Cytotherapy* **13**, 490-498, doi:10.3109/14653249.2010.529889 (2011).
 - 10 Lee, J. J. *et al.* Clinical efficacy of granulocyte transfusion therapy in patients with neutropenia-related infections. *Leukemia* **15**, 203-207, doi:10.1038/sj.leu.2402007 (2001).
 - 11 Peters, C. *et al.* Leucocyte transfusions from rhG-CSF or prednisolone stimulated donors for treatment of severe infections in immunocompromised neutropenic patients. *Br J Haematol* **106**, 689-696, doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01619.x (1999).
 - 12 Price, T. H. *et al.* Phase I/II trial of neutrophil transfusions from donors stimulated with G-CSF and dexamethasone for treatment of patients with infections in

- hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **95**, 3302-3309 (2000).
- 13 Seidel, M. G. *et al.* Randomized phase III study of granulocyte transfusions in neutropenic patients. *Bone Marrow Transplant* **42**, 679-684, doi:10.1038/bmt.2008.237 (2008).
 - 14 Price, T. H. *et al.* Efficacy of transfusion with granulocytes from G-CSF/dexamethasone-treated donors in neutropenic patients with infection. *Blood* **126**, 2153-2161, doi:10.1182/blood-2015-05-645986 (2015).
 - 15 Miyauchi, M. *et al.* Genetically Engineered Hematopoietic Progenitors Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells Achieve the Feeder-Free and Robust Production of Neutrophils with the Functional Capacity In Vivo. *Blood* **134**, 720 (2019).
 - 16 Elghetany, M. T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol Dis* **28**, 260-274, doi:10.1006/bcmd.2002.0513 (2002).
 - 17 Futosi, K., Fodor, S. & Mócsai, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol* **17**, 638-650, doi:10.1016/j.intimp.2013.06.034 (2013).
 - 18 Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and

- inflammation. *Nat Rev Immunol* **13**, 159-175, doi:10.1038/nri3399 (2013).
- 19 Hampton, M. B. & Winterbourn, C. C. Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils. *J Immunol Methods* **232**, 15-22, doi:10.1016/s0022-1759(99)00147-7 (1999).
 - 20 Winterbourn, C. C. & Kettle, A. J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal* **18**, 642-660, doi:10.1089/ars.2012.4827 (2013).
 - 21 Vidarsson, G. & van de Winkel, J. G. Fc receptor and complement receptor-mediated phagocytosis in host defence. *Curr Opin Infect Dis* **11**, 271-278, doi:10.1097/00001432-199806000-00002 (1998).
 - 22 Meknache, N., Jönsson, F., Laurent, J., Guinépain, M. T. & Daëron, M. Human basophils express the glycosylphosphatidylinositol-anchored low-affinity IgG receptor FcγRIIIB (CD16B). *J Immunol* **182**, 2542-2550, doi:10.4049/jimmunol.0801665 (2009).
 - 23 Fossati, G., Moots, R. J., Bucknall, R. C. & Edwards, S. W. Differential role of neutrophil Fcγ receptor IIIB (CD16) in phagocytosis, bacterial killing, and responses to immune complexes. *Arthritis Rheum* **46**, 1351-1361, doi:10.1002/art.10230 (2002).

- 24 Treffers, L. W. *et al.* FcγRIIIb Restricts Antibody-Dependent Destruction of Cancer Cells by Human Neutrophils. *Front Immunol* **9**, 3124, doi:10.3389/fimmu.2018.03124 (2018).
- 25 Di Fulvio, M. *et al.* Phospholipase D2 (PLD2) shortens the time required for myeloid leukemic cell differentiation: mechanism of action. *J Biol Chem* **287**, 393-407, doi:10.1074/jbc.M111.259465 (2012).
- 26 Sykes, D. B. *et al.* Inhibition of Dihydroorotate Dehydrogenase Overcomes Differentiation Blockade in Acute Myeloid Leukemia. *Cell* **167**, 171-186.e115, doi:10.1016/j.cell.2016.08.057 (2016).
- 27 Miyauchi, M. *et al.* ADAM8 Is an Antigen of Tyrosine Kinase Inhibitor-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Cells Identified by Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* **10**, 1115-1130, doi:10.1016/j.stemcr.2018.01.015 (2018).
- 28 Takeda, K. Phagocytosis and bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes for oral bacteria. *J. Jpn. Stomatol. Soc.* **38**, 991-1006 (1989).
- 29 Bokoch, G. M. & Zhao, T. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase. *Antioxid Redox Signal* **8**, 1533-1548, doi:10.1089/ars.2006.8.1533 (2006).

- 30 Manning, B. D. & Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **169**, 381-405, doi:10.1016/j.cell.2017.04.001 (2017).
- 31 Bhaskar, P. T. & Hay, N. The two TORCs and Akt. *Dev Cell* **12**, 487-502, doi:10.1016/j.devcel.2007.03.020 (2007).
- 32 Hers, I., Vincent, E. E. & Tavaré, J. M. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* **23**, 1515-1527, doi:10.1016/j.cellsig.2011.05.004 (2011).
- 33 Magnuson, B., Ekim, B. & Fingar, D. C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J* **441**, 1-21, doi:10.1042/bj20110892 (2012).
- 34 Tavares, M. R. *et al.* The S6K protein family in health and disease. *Life Sci* **131**, 1-10, doi:10.1016/j.lfs.2015.03.001 (2015).
- 35 Huizinga, T. W. *et al.* Phosphatidylinositol-linked FcRIII mediates exocytosis of neutrophil granule proteins, but does not mediate initiation of the respiratory burst. *J Immunol* **144**, 1432-1437 (1990).
- 36 Sanders, L. A. *et al.* Human immunoglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. *Infect Immun* **63**, 73-81, doi:10.1128/iai.63.1.73-81.1995 (1995).
- 37 Fällman, M., Andersson, R. & Andersson, T. Signaling properties of CR3

- (CD11b/CD18) and CR1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement-opsonized particles. *J Immunol* **151**, 330-338 (1993).
- 38 van Kessel, K. P., Bestebroer, J. & van Strijp, J. A. Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Front Immunol* **5**, 467, doi:10.3389/fimmu.2014.00467 (2014).
- 39 Prossnitz, E. R. & Ye, R. D. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacol Ther* **74**, 73-102, doi:10.1016/s0163-7258(96)00203-3 (1997).
- 40 Wen, X. *et al.* G-protein-coupled formyl peptide receptors play a dual role in neutrophil chemotaxis and bacterial phagocytosis. *Mol Biol Cell* **30**, 346-356, doi:10.1091/mbc.E18-06-0358 (2019).
- 41 Godaly, G., Hang, L., Frendéus, B. & Svanborg, C. Transepithelial neutrophil migration is CXCR1 dependent in vitro and is defective in IL-8 receptor knockout mice. *J Immunol* **165**, 5287-5294, doi:10.4049/jimmunol.165.9.5287 (2000).
- 42 Murphy, P. M. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. *Semin Hematol* **34**, 311-318 (1997).
- 43 Bredius, R. G. *et al.* Role of neutrophil Fc gamma RIIa (CD32) and Fc gamma RIIIb (CD16) polymorphic forms in phagocytosis of human IgG1- and IgG3-

- opsonized bacteria and erythrocytes. *Immunology* **83**, 624-630 (1994).
- 44 Nathan, C. & Cunningham-Bussel, A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* **13**, 349-361, doi:10.1038/nri3423 (2013).
- 45 Hurst, J. K. What really happens in the neutrophil phagosome? *Free Radic Biol Med* **53**, 508-520, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.008 (2012).
- 46 Kuhns, D. B. *et al.* Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* **363**, 2600-2610, doi:10.1056/NEJMoa1007097 (2010).
- 47 Unkeless, J. C., Shen, Z., Lin, C. W. & DeBeus, E. Function of human Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIIB. *Semin Immunol* **7**, 37-44, doi:10.1016/1044-5323(95)90006-3 (1995).
- 48 Tsuboi, N., Asano, K., Lauterbach, M. & Mayadas, T. N. Human neutrophil Fcgamma receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity* **28**, 833-846, doi:10.1016/j.immuni.2008.04.013 (2008).
- 49 Chen, K. *et al.* Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood*

- 120**, 4421-4431, doi:10.1182/blood-2011-12-401133 (2012).
- 50 Hirai, H. *et al.* MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **9**, 1956-1967, doi:10.1158/1535-7163.Mct-09-1012 (2010).
- 51 Revathidevi, S. & Munirajan, A. K. Akt in cancer: Mediator and more. *Semin Cancer Biol* **59**, 80-91, doi:10.1016/j.semcancer.2019.06.002 (2019).
- 52 Li, B. *et al.* Significance of PI3K/AKT signaling pathway in metastasis of esophageal squamous cell carcinoma and its potential as a target for anti-metastasis therapy. *Oncotarget* **8**, 38755-38766, doi:10.18632/oncotarget.16333 (2017).
- 53 Brognard, J., Clark, A. S., Ni, Y. & Dennis, P. A. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* **61**, 3986-3997 (2001).
- 54 Xing, Y. *et al.* Phase II trial of AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced breast cancer who have tumors with PIK3CA or AKT mutations, and/or PTEN loss/PTEN mutation. *Breast Cancer Res* **21**, 78, doi:10.1186/s13058-019-1154-8

- (2019).
- 55 Jonasch, E. *et al.* A randomized phase 2 study of MK-2206 versus everolimus in refractory renal cell carcinoma. *Ann Oncol* **28**, 804-808, doi:10.1093/annonc/mdw676 (2017).
 - 56 Hirsch, E. *et al.* Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* **287**, 1049-1053, doi:10.1126/science.287.5455.1049 (2000).
 - 57 Trump, L. R. *et al.* Neutrophils Derived from Genetically Modified Human Induced Pluripotent Stem Cells Circulate and Phagocytose Bacteria In Vivo. *Stem Cells Transl Med* **8**, 557-567, doi:10.1002/setm.18-0255 (2019).
 - 58 Lane, H. C., Anand, A. R. & Ganju, R. K. Cbl and Akt regulate CXCL8-induced and CXCR1- and CXCR2-mediated chemotaxis. *Int Immunol* **18**, 1315-1325, doi:10.1093/intimm/dxl064 (2006).
 - 59 Yang, S. C. *et al.* Propofol inhibits superoxide production, elastase release, and chemotaxis in formyl peptide-activated human neutrophils by blocking formyl peptide receptor 1. *J Immunol* **190**, 6511-6519, doi:10.4049/jimmunol.1202215 (2013).
 - 60 Chen, J., Tang, H., Hay, N., Xu, J. & Ye, R. D. Akt isoforms differentially regulate

- neutrophil functions. *Blood* **115**, 4237-4246, doi:10.1182/blood-2009-11-255323 (2010).
- 61 Li, J. *et al.* Neutrophil AKT2 regulates heterotypic cell-cell interactions during vascular inflammation. *J Clin Invest* **124**, 1483-1496, doi:10.1172/JCI72305 (2014).
- 62 Liu, G. *et al.* Kinase AKT1 negatively controls neutrophil recruitment and function in mice. *J Immunol* **191**, 2680-2690, doi:10.4049/jimmunol.1300736 (2013).
- 63 Dwivedi, P. & Greis, K. D. Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling in severe congenital neutropenia, chronic neutrophilic leukemia, and related malignancies. *Exp Hematol* **46**, 9-20, doi:10.1016/j.exphem.2016.10.008 (2017).
- 64 Tang, W. *et al.* A PLCbeta/PI3Kgamma-GSK3 signaling pathway regulates cofilin phosphatase slingshot2 and neutrophil polarization and chemotaxis. *Dev Cell* **21**, 1038-1050, doi:10.1016/j.devcel.2011.10.023 (2011).
- 65 Touw, I. P. & van de Geijn, G. J. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal myeloid cell development, leukemia and related blood cell disorders. *Front Biosci* **12**, 800-815, doi:10.2741/2103 (2007).

- 66 Zhu, D. *et al.* Deactivation of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate/Akt signaling mediates neutrophil spontaneous death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14836-14841, doi:10.1073/pnas.0605722103 (2006).
- 67 Souza, L. R., Silva, E., Calloway, E., Cabrera, C. & McLemore, M. L. G-CSF activation of AKT is not sufficient to prolong neutrophil survival. *J Leukoc Biol* **93**, 883-893, doi:10.1189/jlb.1211591 (2013).
- 68 Lahoz-Beneytez, J. *et al.* Human neutrophil kinetics: modeling of stable isotope labeling data supports short blood neutrophil half-lives. *Blood* **127**, 3431-3438, doi:10.1182/blood-2016-03-700336 (2016).
- 69 Evrard, M. *et al.* Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity* **48**, 364-379 e368, doi:10.1016/j.immuni.2018.02.002 (2018).