

## 論文の内容の要旨

論文題目 iPS 細胞由来顆粒球の産生を促進する化合物の探索

氏名 日野 俊哉

### 【序文】

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。血球の中で顆粒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いるため、高度顆粒球減少時には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、輸注に必要な顆粒球を得るに健常ドナーから連日体外循環による顆粒球採取が必要となる。これらの制約もあり、広く臨床応用されるに至っていないのが現状である。

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、ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; 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過去に報告している。しかし、臨床応用につなげるには、十分な数の好中球を迅速に準備するための分化に要する期間を短縮することが重要である。本研究では好中球に発現する表面抗原である CD16b の発現に着目し、当研究室で作成した iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞が分化誘導後4日目まで CD16b の発現が増加し続けること、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。そこで、CD16b を好中球分化の代替マーカーとして用い、1885 種類からなる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を抽出し、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なった。

### 【主な材料と方法】

#### iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の分化誘導

当研究室では正常 CD34 骨髄細胞から iPS 細胞を樹立し、さらに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、本研究は同細胞を用いて研究を行った。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、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分化が誘導されることが示されている。本研究では化合物を分化誘導開始時に投与し、同方法を用いた分化誘導後にフローサイトメトリー法による表面抗原発現の評価および機能評価を行った。

## 化合物ライブラリーを用いたスクリーニング

東京大学 創薬機構より validated library に含まれる既知薬理活性試薬 1885 種類を提供いただき、化合物の最終濃度が 2 $\mu$ M となるように調整し、iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞の分化誘導時に添加を行い、72 時間後の CD16b の発現を解析した。CD16b の発現は細胞の抗体染色を行い、フローサイトメトリー法にて平均蛍光強度 (Mean Fluorescence Intensity; MFI) を計算し定量化を行った。

### 【結果】

#### 化合物スクリーニングによる候補化合物の抽出

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、Dimethyl sulfoxide を加えたときをコントロールとし、その値に対する比を各化合物でそれぞれ算出した。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、これらの化合物添加時の分化誘導 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、形態学的にコントロールと同様の分化した好中球が認められた MK-2206 dihydrochloride (MK-2206)、Scriptaid、AP26113 を候補として抽出した。

#### Scriptaid 添加により Oxidative Burst 機能は低下する

上記 3 種類の化合物を加えて分化誘導を行った iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞について、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 あるいは Scriptaid 添加により表面抗原 CD11b が早期に発現する

CD16b とは異なる分化の指標として CD11b が骨髓球以降に発現が上昇することが知られているため、上記 3 種類の化合物を加えて分化誘導を行った iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞について、CD11b の発現を評価したところ、MK-2206 および Scriptaid ではコントロールと比較して早期に CD11b の発現が上昇した。Oxidative Burst 機能の結果と合わせ、MK-2206 についてさらに解析を行なった。

#### MK-2206 添加により貪食能の早期獲得が誘導される

*E. coli* Phagocytosis Assay Kit による貪食能の評価では、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では、分化誘導 48 時間後時点でコントロールと比較して早期に貪食能の獲得が認められた。

### **MK-2206 添加により貪食能や走化性に関わる表面抗原の早期発現が認められた**

MK-2206 を加えて分化誘導を行なった iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞では、好中球で発現が上昇する表面抗原のうち、貪食に関わる表面抗原である CD32a や CD35、および走化性に関わる表面抗原である FPR1 や CXCR1 の発現がコントロールと比較して早期に発現が認められた。

### **MK-2206 添加による走化性の早期獲得は認めない**

分化誘導 48-72 時間後の iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞において、走化性を持つ細胞の割合は、MK-2206 添加時とコントロールで明らかな差は認められなかった。

### **MK-2206 添加による *E.coli* に対する *In vitro* での殺菌能の早期獲得は認めない**

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における殺菌能について *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 48-96 時間経過した細胞と共培養させた場合細菌量は低下を認めたが、コントロールと比較して殺菌能が上昇する結果は得られなかった。

### **【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、MK-2206 投与により iPS 細胞由来顆粒球前駆細胞に対して Fc $\gamma$  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が得られることを示した。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。

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が、AKT が関わるシグナル経路である phosphatidylinositol 3-phosphate kinase/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。AKT はアイソフォームにより好中球機能に対して作用が異なることも報告されており、そのため、CD16b 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、その他の機能については機能低下に作用した可能性が考えられた。AKT のアイソフォームの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検証が必要である。