

## 論文の内容の要旨

論文題目 iPS 細胞を用いた慢性骨髄単球性白血病の原因遺伝子の探索

氏名 山崎 翔

### 【序文】

慢性骨髄単球性白血病(chronic myelomonocytic leukemia: CMMoL)はクローン性の造血幹細胞腫瘍であり、骨髄異形成(myelodysplastic: MDS)／骨髄増殖性腫瘍(myeloproliferative neoplasm: MPN)に分類される。CMMoL でよくみられる染色体異常や遺伝子変異は明らかになってきたが、病態は未だ解明されておらず、同種造血幹細胞移植以外に効果的な治療法が存在しない。

造血器腫瘍の病態解明と治療法探索にはこれまで主に細胞株・マウスモデル・患者検体が使われてきたが、それぞれに問題点がある。リプログラミング技術の発展に伴い人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS 細胞)の樹立が報告されてから、様々な疾患より iPS 細胞が樹立され、再分化することにより病態の再現が可能となっている。iPS 細胞はこれまでの研究のアプローチにおける様々な問題点を解決できる可能性があり、疾患の病態解析や治療法探索に非常に有用であると考えられる。

以上を踏まえて、私は当研究室において世界で初めて樹立された CMMoL 腫瘍細胞由来 iPS 細胞(CMMoL-iPS 細胞)の性質を解析し、さらに網羅的遺伝子解析を利用して CMMoL の病態を明らかにすることを目指した。

### 【主な研究方法】

#### CMMoL-iPS 細胞の血球分化

100 細胞程度の iPS 細胞塊をマイトマイシン C で処理した C3H10T1/2 細胞と共培養した。リコンビナントヒト vascular endothelial growth factor を含む培養液を用い、15 日目に形成された sac 様構造物を物理的に剥離し、内部に含まれる造血幹・前駆細胞(CMMoL-HPC)を解析に用いた。

#### フローサイトメトリー解析

FACSAria を用いて解析とソーティングを行った。抗体はいずれも 20 倍希釈して染色し、7-アミノ-アクチノマイシン D を加えて死細胞を除去してから解析した。

#### 血球コロニー形成能評価、replating assay

コロニー形成能の評価にはサイトカインを含む半固形培地(Methocult H4434 classic)を用いた。造血幹・前駆細胞 3000 個を 1 ml の半固形培地に混ぜ 37°C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で培養し、7 日後にコロニー数と形態を観察した。replating assay では PBS で半固形培地ごと細胞を回収し、洗浄後に生細胞 3000 個を撒きかえた。

## 網羅的遺伝子発現解析

CMMoL 患者とコントロールの健常者の骨髓それぞれの CD34 陽性細胞、iPS 細胞、iPS 細胞由来造血幹・前駆細胞について遺伝子発現プロファイルとメチル化プロファイル調べた。遺伝子発現は SurePrint G3 Human GE Microarray 8x60K Ver.2.0、メチル化は Infinium Human Methylation 450 BeadChip を用いて解析した。

## CRISPR/Cas9 システムを用いた CMMoL-iPS 細胞における遺伝子 Y のノックアウト

ガイド RNA を発現するベクターと、PAM 配列を認識する Cas9 タンパク質を発現するベクターを NEPA21 による electroporation により CMMoL-iPS 細胞へトランスフェクションした。コロニーが確認できるまで ROCK inhibitor を加えた iPS 細胞培養液で培養し、単一細胞由来のクローンを得た後にシーケンシングでノックアウトできていることを確認した。

## 【結果】

### CMMoL-iPS 細胞の血球分化誘導

C3H10T1/2 細胞と共培養してできた sac 様構造物の中に分化した CD34 陽性 CD43 陽性造血幹・前駆細胞の存在を確認した。なお、CMMoL-HPC は健常ヒト骨髓から樹立した iPS 細胞 (Normal-iPS 細胞) 由来造血幹・前駆細胞 (Normal-HPC) と比較して得られた細胞数が有意に多かった。

### CMMoL-HPC 由来分化血球の表面マーカー解析

CMMoL-HPC から半固形培地での分化を通して得られた血球は、Normal-HPC 由来分化血球と比較して CD34 陽性造血前駆細胞や CD14 陽性単球系細胞の割合が増えていた。また、CMMoL-HPC 由来分化血球のみで、元の検体において見られた異常抗原である CD56 陽性細胞の存在が確認できた。

### CMMoL-HPC は不死化し、コロニー形成能を維持する

半固形培地での replating assay では、Normal-HPC が 2 継代でコロニーが形成できなくなるのに対して、CMMoL-HPC は 4 継代以上持続し不死化することが確認された。さらに、CMMoL-HPC はサイトカインなしの環境下でもやや大きめのコロニーを形成できた。

## 網羅的遺伝子解析による CMMoL の病態に関わる遺伝子の絞り込み

CMMoL 患者と健常者の元の検体と iPS 細胞由来造血幹・前駆細胞に関して、遺伝子発現とメチル化プロファイルのそれぞれの相関解析を行ったところ、元の検体のプロファイルの差が iPS 細胞の樹立というリプログラミングと造血幹・前駆細胞への再分化の過程を経ることによって縮まっていた。そして、CMMoL-HPC において Normal-HPC よりも 2 倍以上発現が高く、プロモーター領域が低メチル化状態と

なっている遺伝子 *X*、*Y*、*Z* を抽出した。

### **CMMoL において遺伝子 *X*、*Y* の発現量が上昇している**

他の CMMoL の患者検体の CD34 陽性細胞について発現量を調べたところ、*X*、*Y* の 2 遺伝子が健康ヒト骨髓検体と比べて上昇していた。

### **遺伝子 *Y* のノックダウンにより細胞株 OCI-AML3 の細胞増殖が低下する**

白血病細胞株である OCI-AML3 について候補となった 3 つの遺伝子をノックダウンし細胞増殖を比較したところ、遺伝子 *Y* のノックダウンにおいてのみ細胞増殖が有意に低下した。

### **CMMoL-iPS 細胞は遺伝子 *Y* のノックアウトにより血球分化が阻害される**

CMMoL-iPS 細胞において CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子 *Y* をノックアウトした。ホモで 1 塩基が欠失したクローン、ホモで 3 塩基が欠失したクローン（ただし、フレームシフトが起こらなかったため 1 アミノ酸欠失）、ヘテロで 14 塩基が欠失したクローンを得ることができ、それぞれに関して血球へ分化させたところ、1 アミノ酸欠失のクローンでは得られた造血幹・前駆細胞の数に変化がなかったが、ヘテロ欠失ではやや減少し、ホモ欠失ではほぼ消失していた。

### **【考察】**

本研究では、当研究室において世界で初めて樹立された CMMoL-iPS 細胞を解析し、血球分化によって得られる CMMoL-HPC がサイトカインを含む半固形培地で不死化する点や、表面マーカーが元の検体の白血病細胞と一致する点で疾患の性質を再現できていることを示した。その上で iPS 細胞の自己複製能を活かして網羅的遺伝子解析を行った。CMMoL 患者と健常者の遺伝子発現とメチル化プロファイルの差は、iPS 細胞由来造血幹・前駆細胞において元の検体よりも差が小さくなっており、リプログラミングと再分化という同じ過程を経ることによって、元の検体よりも均質な細胞を得ることができたからだと考えられる。全く他人の検体の差を比較する際に、iPS 細胞を用いることで背景を揃えることができ、候補遺伝子の絞り込みに大変有用であった。今後、他の疾患において iPS 細胞を用いた網羅的遺伝子解析を行う際に参考となる貴重な知見である。今回、CMMoL の病態に関わる候補遺伝子として抽出された遺伝子 *Y* は他の複数の患者の CMMoL 腫瘍細胞においても正常造血幹・前駆細胞より発現が高いことを示すことができた。様々な遺伝子背景を持つ CMMoL 患者において共通の特徴と考えられ、今後、抗体医薬品の開発など治療標的になりうると考えている。iPS 細胞を用いた病態解析や治療法探索においても、in vivo モデルが存在しないこと、ウイルス感染時に細胞毒性があること、単一細胞からのクローン化に時間がかかることなどまだまだ問題があり、これらを解決するためにも多角的な視点から検証実験が必要である。