

論文の内容の要旨

論文題目 iPS 細胞由来好中球の大量産生法の開発

中村 文美

【序文】

化学療法や造血幹細胞移植の進歩により造血器腫瘍の予後は著しく改善した。一方で、強力な化学療法は長期間にわたる好中球減少を伴うため、重症感染症のリスクが高まると考えられる。抗菌薬や抗真菌薬の予防投与により感染症に対する治療成績は改善したが、好中球減少期の重症感染症は依然として致命的であり、新規の治療選択肢が待たれている。顆粒球輸血は好中球減少期の重症感染症に対する治療選択肢の一つであるが、ドナー確保やドナーの身体的負担のほか、有効性が確定していないために、一般には普及していない。好中球に分化誘導可能な細胞株は存在するが、腫瘍化のリスクや機能の観点で臨床応用はされていない。また、骨髄・臍帯血由来の造血幹細胞を体外増幅する手法も未だ確立されておらず、大量の好中球を確保する手段が現時点ではない。

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は血液細胞を含む多くの組織への分化が報告されている。iPS 細胞は一度樹立すれば無限に増殖することから、iPS 細胞から好中球を大量に産生できれば、ドナーの負担を最小化でき、必要時の大量に好中球を投与することが可能になると考えられる。これまでに iPS 細胞由来の造血前駆細胞に Thrombopoietin (TPO) の存在下で BMI1 と cMyc を過剰発現させることで、4-5 ヶ月増殖する不死化巨核球細胞株が得られ、BMI1 と cMyc の発現を off にすることで、血小板に誘導されることが報告されている。同様の方法で、iPS 細胞由来造血前駆細胞に BMI1 と cMyc を導入し、TPO の代わりに G-CSF の存在下で培養することで骨髄球系の子化細胞株を作製し、BMI1 と cMyc の発現を off にすることで好中球に分化するシステムが可能となれば、顆粒球輸血の普及も可能ではないかと考えられた。iPS 細胞由来顆粒球の大量産生法を開発することを目的として、本研究を行った。

【方法】

iPS 細胞由来好中球の誘導

既報の Sac 法に従い iPS 細胞から誘導した CD34CD43 陽性の造血前駆細胞を、OP9 細胞上で G-CSF 添加培地中に培養した。培養 14 日目の細胞を回収し、サイトスピンでの形態、表面マーカーの発現ならびに DHR assay で活性酸素産生能を評価した。

BMI1、cMyc 導入細胞の作成

iPS 細胞由来 CD34CD43 陽性細胞に G-CSF 存在下でドキシサイクリンによる遺伝子発現調節

が可能なベクターを使用して BMI1 と cMyc を導入し、BMI1 と cMyc の発現 on/off での形態、表面マーカーの発現ならびに DHR assay で活性酸素産生能を評価した。

顆粒球分化段階における単一細胞遺伝子発現解析

既存のマイクロアレイデータを使用して好中球系・単球系で高発現を示す 81 遺伝子について、iPS 細胞由来造血前駆細胞から好中球に分化する過程の 5 時点における単一細胞の遺伝子発現を、ヒートマップおよび主成分分析で分析した。

好中球分化誘導候補遺伝子の導入

iPS 細胞由来好中球分化誘導に関与する候補遺伝子を iPS 細胞由来 CD34CD43 陽性細胞に導入し、14 日後の細胞の形態を評価した。

【結果】

iPS 細胞由来好中球の誘導

iPS 細胞由来造血前駆細胞を G-CSF 存在下で 14 日間培養した結果、形態学的には 70%の細胞が好中球系細胞に分化し、そのうち成熟好中球が 50%を占めた。また、それらの細胞では末梢血好中球と同様に CD11b、13、15、45、64、123 が発現していたが、末梢血好中球で特異的に発現する CD16 や 16b などの発現は低かった。表面マーカーのみでは iPS 細胞由来好中球を同定することはできなかった。iPS 細胞由来好中球は末梢血好中球と同様に好中球刺激物質の添加により強い活性酸素産生能を有することが示された。

BMI1、cMyc 導入細胞の作成

iPS 細胞由来造血前駆細胞に G-CSF 存在下でドキシサイクリンによる遺伝子発現調節が可能なベクターを使用して BMI1 と cMyc を導入し、発現させた結果、約 3 ヶ月間にわたって増殖可能な細胞が作成でき、それらの形態は芽球様で均一であった。また、BMI1 と cMyc 導入細胞で G-CSF 存在下に BMI1 と cMyc の発現を off にしたところ、4 日後には分葉核を持つ好中球様細胞への分化が見られ、CD11b や CD14 などの発現が見られたが、活性酸素産生能は iPS 細胞由来好中球と比較して 1/10 程度に低下していた。また、エステラーゼ染色でも単球系の性質を示していた。

顆粒球分化段階における単一細胞遺伝子発現解析

既存のマイクロアレイデータにおいて好中球系・単球系で高発現を示す遺伝子について、iPS 細胞由来造血前駆細胞から好中球に分化する過程における発現を単一細胞毎に経時的に解析した。その結果、造血前駆細胞からの分化開始時には各細胞の遺伝子発現に差はなかったが、分化 4 日目ではヒートマップ上および主成分分析で二群の細胞集団が存在しており、それらの細胞集団は分化 2 日目及び 7 日目にも存在した。より分化が進んだ 7 日目で主たる集団が好中球系の細

胞と推定された。主成分分析の PCA loading から、好中球系の細胞集団に特徴的な 4 遺伝子を同定した。

好中球分化誘導候補遺伝子の導入

上記で同定した 4 遺伝子を iPS 細胞由来好中球の分化誘導に関与する候補遺伝子とし、これらの遺伝子を iPS 細胞由来造血前駆細胞に導入した結果、1 つの遺伝子を導入した場合に好中球分化誘導効率が 1.25 倍となった。さらに、BMI1 と cMyc 導入細胞に同遺伝子を導入し、BMI1 と cMyc の発現を off にした結果、活性酸素産生能の高い細胞が 14.7% 存在するクローンが得られ、活性酸素産生能を一部改善することができた。

【考察】

本研究では、iPS 細胞由来造血前駆細胞から好中球を誘導し、活性酸素産生能を有する機能的な好中球を作成した。iPS 細胞から分化した造血前駆細胞から成熟好中球に分化する段階での単一細胞遺伝子発現解析を行い、遺伝子発現の経時的な変化を明らかにした。また、iPS 細胞由来造血前駆細胞に BMI1 と cMyc を導入することで、約 3 ヶ月間増殖可能な骨髓球系単球系への分化を示す細胞を作製した。BMI1 と cMyc 導入細胞で BMI1 と cMyc の発現を停止した細胞の活性酸素産生能は iPS 細胞由来好中球と比較して、著しく低下していた。単一細胞遺伝子発現解析の主成分分析の結果から、好中球分化に関与していると考えられた 4 つの候補遺伝子を同定した。候補遺伝子のうちの一つの遺伝子を iPS 細胞由来造血前駆細胞に導入した結果、好中球分化能が 1.25 倍となり、同遺伝子を BMI1 と cMyc 導入細胞に導入することで、一部に活性酸素産生能を持つ細胞が出現することが明らかになった。

今後、今回の遺伝子導入により得られた活性酸素産生能を有する細胞が、in vivo でも機能を有するかどうかについて、放射線照射後のマウスや感染症マウスモデル等を用いて、評価する必要がある。また、食食能や遊走能などその他の好中球機能の検証も必要である。現状では 14% の細胞が活性酸素産生能を有するに過ぎず、また、それらの細胞を選別できないため、更に好中球への分化効率を改善するために、単球系への分化を誘導する遺伝子の CRISPER-Cas9 システムによるノックアウトなども検討の必要がある。現在の遺伝子導入により細胞増殖や好中球への分化誘導を試みる方法では、実用化を検討する場合、iPS 細胞由来細胞の腫瘍化の懸念がある。従って、腫瘍化防止のために細胞死誘導システムの搭載や遺伝子導入と同等の効果を発揮する化合物の検索などが今後の課題であると考えられた。