

## 博士論文

論文題目 家族性血小板異常症患者由来の人工多能性幹細胞  
におけるRUNX1の遺伝子修復

氏 名 飯塚 浩光

家族性血小板異常症患者由来の人工多能性幹細胞における

RUNX1 の遺伝子修復

所属： 東京大学大学院 医学系研究科 内科学専攻

血液・腫瘍内科学

指導教員： 黒川 峰夫 教授

氏名： 飯塚 浩光

## 目次

要旨	5
序文	6
方法	10
FPD/AML 患者検体から iPSC の樹立	10
iPSC の血球分化	10
コロニー形成能	11
HPC の巨核球分化	12
In vivo での血小板産生	12
<i>RUNXI</i> TALEN およびドナー配列の作製	12
TALEN による遺伝子修復	13
結果	15
FPD/AML 患者から iPSC の樹立	15
FPD-iPS の血球分化能の解析	24
In vivo での血小板産生能	36
<i>RUNXI</i> の変異部位を切断する TALEN の設計	38
FPD-iPSC での <i>RUNXI</i> 変異の遺伝子修復	43
考察	50

引用文献	57
謝辞	66
利益相反(COI)開示	68

## 要旨

血小板減少と高率な白血病化などを特徴とする常染色体優性遺伝性疾患である家族性血小板異常症(FPD/AML)患者の皮膚線維芽細胞から、人工多能性幹細胞を作製した(FPD-iPSC)。巨核球分化におけるその特徴を解析したところ、巨核球コロニー産生能の低下、巨核球の成熟障害を認めた。TALEN を用いて FPD-iPSC の *RUNX1* の遺伝子修復を行ったところ、FPD-iPSC が示した巨核球への分化異常の回復が認められた。遺伝子修復した FPD-iPSC は、FPD/AML に対する新たな治療法につながる可能性が考えられた。

## 序文

*RUNX1* (*AML1*, *CBFA2*, *PEBP2aB* と呼ばれる)は、造血を制御する転写因子で、急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia; AML)で多くみられる染色体転座  $t(8;21)(q22; q22)$ に関わる遺伝子として発見された。*RUNX1* は 21 番染色体長腕上の 21q22.12 に存在し、*RUNX1* タンパク質は Runt ホモロジドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインと、トランス活性化ドメインから成る。*RUNX1* は、*CBFβ* とヘテロ二量体を形成し、DNA と結合し転写を調節することで、造血系の分化において重要な役割を担っている。これまでに、*RUNX1-ETO* ( $t(8;21)(q22;q22)$ )、*RUNX1-EVII* ( $t(3;21)(q26;q22)$ )、*ETV6-RUNX1* ( $t(12; 21)(p13;q22)$ )などの *RUNX1* を含む染色体転座や、*RUNX1* の遺伝子変異を有する、AML や骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome; MDS)といった造血器腫瘍が多数報告されている[1-4]。*RUNX1* は正常造血に必須であることから、その機能異常が白血病発症に深く関わっていると考えられているが、詳細なメカニズムは明らかになっていない。

*RUNX1* 遺伝子のヘテロ変異で発症する遺伝性疾患として、家族性血小板異常症(Familial platelet disorder with predisposition to myeloid malignancy; FPD/AML)がある[5]。FPD/AML は血小板減少と血小板機能異常を呈する常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性疾患で、軽度から中等度の出血傾向を示し、AML や MDS などの造血器腫瘍を高率に発症する[6-8]。FPD/AML はこれまでの約 30 家系程度の

報告にとどまり、頻度は非常に低いと考えられている[9-14]。FPD/AML の疾患モデルはこれまでに確立されておらず、血小板減少や血小板機能異常の発症機序や、造血器腫瘍への進展の機序については、明らかになっていない。すなわち、*Runx1* のヘテロノックアウトマウスでは血小板数の減少を示すが、白血病は発症せず、また T 細胞の異常も示した[15]。また *Runx1* のコンベンショナルノックアウトマウスは胎生致死であり、*Runx1* のコンディショナルノックアウトマウスは巨核球系の異常は呈するが、T リンパ球の異常も示し、ヒトにおける FPD/AML の病態と一致しない[16]。*RUNX1* は巨核球の分化でも重要であり、*RUNX1* の変異は FPD/AML の病態に深く関与していると考えられ[17]、*RUNX1* 遺伝子の変異を修復する遺伝子治療の開発が、この疾患の根本的な治療につながる可能性がある。

人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPSC) は再生医療の細胞源として期待されているが、それだけでなく疾患の病態解明のための研究や、創薬のための研究においても魅力的なプラットフォームとなりうる[18]。ある疾患に特異的な遺伝子異常を有する iPSC が樹立できれば、理論上、無限に細胞を増殖させることができ、さらに目的の細胞種に分化させることができる。特に FPD/AML のような希少疾患では、研究に使用できる患者検体を十分に得られないことから、患者由来の iPSC は疾患モデルとして大きな将来性を有している。

さらに患者由来の iPSC への遺伝子導入や遺伝子修復などの操作により、新たな細胞治療につながる可能性がある。これまでに、鎌状赤血球症や $\beta$ サラセミア、Fanconi 貧血の患者由来 iPSC において、遺伝子修復により正常造血を回復させることに成功したとする報告がある[19-25]。FPD/AML でも *RUNXI* の遺伝子修復をした iPSC から、量的にも質的にも正常な血小板を産生することができる血球が得られれば、自家造血細胞移植の新たな移植ソースとなる可能性がある。

遺伝子修復などのゲノム編集のための新たな技術として、TALEN (transcription activator-like effector nuclease)が近年注目されている。TALEN は、Zinc finger nuclease (ZFN)と同様に、配列特異的に DNA を切断するように合成することができる人工ヌクレアーゼである[26]。ZFN と比較して作製が比較的容易であること、標的配列の任意性が高いことが長所として知られている。TALEN あるいは ZFN の DNA 二本鎖切断酵素と、相同組み換えの鋳型となるドナーを同時に導入することで、相同組み換えによる遺伝子改変が可能となる[27]。

本研究では、FPD/AML 患者の皮膚線維芽細胞から iPSC を樹立し(FPD-iPSC)、FPD/AML の臨床的特徴と合致するような巨核球系の分化異常が再現されることを確認し、FPD-iPSC が FPD/AML の疾患モデルとして病態解析に利用可能であることを示した。さらに TALEN を用いて FPD-iPSC の *RUNXI* の変異の修復を行い、巨核球分化の異常が回復されることを確認し、FPD/AML における血小



板の異常が *RUNX1* の変異によるものであることを示した。遺伝子修復した FPD-iPSC がこの疾患の新たな治療につながる可能性が示された。

## 方法

### FPD/AML 患者検体から iPSC の樹立

書面でインフォームドコンセントを得たうえで、FPD/AML 患者から皮膚生検を行った。本研究は東京大学大学院医学系研究科・医学部 倫理委員会により承認されている。皮膚片を培養し、線維芽細胞を増殖させた後、既報の通り、*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* の4因子をレトロウイルスで導入することでリプログラミングし、FPD-iPSC を作製した[18]。同様に、コントロールとして健康な提供者から正常 iPSC を作製した。iPSC は、プロトコールに従って、フィーダー細胞としてマウス胎児線維芽細胞(mouse embryonic fibroblast; MEF)と共培養し、4~7 日毎に継代し、維持した[28]。

### iPSC の血球分化

iPSC の血球への分化誘導は、マウス間質細胞である C3H10T1/2 細胞との共培養を用いる既報の iPS-sac 法で行った[29]。iPSC の細胞小塊を、マイトマイシン C 処理した C3H10T1/2 上に播種し、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF) 20 ng/mL 存在下で培養した。培地は day3 ,6, 9, 11, 13 に交換し、day14 または day15 にセルソーターFACS AriaII または FACS AriaIII を使用して、CD34 陽性 CD43 陽性の造血前駆細胞(hematopoietic progenitor cell; HPC)を回収した。

## コロニー形成能

コロニー形成能の評価には、赤芽球系、顆粒球単球系コロニーには MethoCult H4034 の半固形培地を用いた。MethoCult H4034 では、サイトカインとして stem cell factor (SCF/ c-Kit リガンド)、顆粒球単球コロニー刺激因子 (granulocyte macrophage- colony stimulating factor; GM-CSF)、インターロイキン-3 (IL-3)、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte- colony stimulating factor; G-CSF)、エリスロポエチン (EPO)が添加されている。iPS-sac から回収した HPC を 14 日間培養し、形成されたコロニーを形態で分類し、計測した。一方、巨核球系のコロニー形成能の評価については、MegaCult-C の半固形培地で行った。MegaCult-C は、IL-3、インターロイキン-6 (IL-6)、トロンボポエチン (TPO)が添加されたコラーゲン培地で、HPC をダブルチャンバースライドで 10~12 日間培養した。その後、プロトコールに従って、吸水し、アセトンとメタノールの 3:1 混合液で固定し、マウス抗ヒト CD41 抗体、ビオチン結合ヤギ抗マウス IgG 抗体、アビジン結合アルカリフォスファターゼを順に反応させ、アルカリフォスファターゼ基質で発色させた。バックグラウンドはエバンスブルーで染色した。CD41 陽性細胞は赤紫色に発色し、CD41 陰性細胞は青色に染色されるので、コロニーを CD41 陽性細胞のみの巨核球コロニー(CFU-Mk)、CD41 陽性細胞と陰性細胞が混ざった mixed-Mk コロニー、CD41 陰性細胞のみの non-Mk コロニーに分類して、それぞれ

れ計数した。

### HPC の巨核球分化

iPSC 由来の HPC を巨核球に分化させるために、マイトマイシン C 処理した C3H10T1/2 上で、Megakaryocyte growth and development factor (MGDF) 25 ng/ml、SCF 50 ng/ml およびヘパリンを添加した分化用培地で培養した。培地は day3 に同量追加し、day6 に半量交換した。培養 9 日目に浮遊細胞を回収し、CD41a と CD42b の発現をフローサイトメーターで解析した[30]。

### In vivo での血小板産生

実験動物中央研究所から購入した NOD/Shi-scid IL2Rg<sup>null</sup> (NOG)マウスに 2.0 Gy の X 線を照射し、その 24 時間後以降に iPSC から分化させた巨核球を静注した。静注 3 時間後に末梢血を採取し、ヒト CD41a およびヒト CD42b 陽性の血小板をフローサイトメーターで解析した[31]。

### RUNXI TALEN およびドナー配列の作製

Addgene より Joung Lab REAL Assembly TALEN Kit を取り寄せ、REAL 法で合成するため、ZiFiT (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>)のウェブサイトで TALEN の設計を行った。DNA 二本鎖切断の標的部位は *RUNXI* の変異部位の周辺またはそれより 5'側の任意の部位でよいのだが、*RUNXI* の変異部位を切断する TALEN のペアを設計した。REAL Assemble TALEN Kit には、DNA 1 塩基を認識する

repeat-variable di-residue (RVD)モジュールを載せたプラスミドが含まれており、それらに対して、設計上で5'側になる RVD モジュールに対しては BsaI と BamHI で切り出し、3'側になる RVD モジュールに対しては BbsI と BamHI で切断し、それらをライゲーションした。このように反応させることで、RVD が設計通りの順序に並ぶので、段階的に同様の反応を繰り返し、DNA 認識部位を作製した [32]。その後、DNA 切断酵素である FokI の配列を含む発現プラスミドに挿入した。プロモーターは、iPSC でも発現しやすいよう、CMV プロモーターから CAG プロモーターに入れ替えた。

相同組み換えのドナー配列は、OCT4-2A-eGFP-PGK-Puro ベクターを基に、*RUNXI* の変異部位の 5'側、3'側それぞれ約 700 塩基の 5' homology arm, 3' homology arm の相同配列をとり、その内側に *RUNXI* の変異部位以後の *RUNXI* cDNA、ポリアデニル化信号、PGK-Puromycin 耐性の順に並んだ配列となるように作製した。

### TALEN による遺伝子修復

iPSC 培養ディッシュから、解離液を用いて MEF を除去し、Accutase で iPSC を単細胞に解離させた。遠心後、opti-MEM に再懸濁し、TALEN 発現プラスミドとドナー配列プラスミドを添加し、エレクトロポレーター NEPA21 を使用してトランスフェクションした。NEPA21 の設定は、Poring pulse: 電圧 125 V, パルス

幅 5 ms, パルス間隔 50 ms, 回数 2, 減衰率 10 %, 極性+とし、Transfer pulse: 電圧 20 V, パルス幅 50 ms, パルス間隔 50 ms, 回数 5, 減衰率 40 %, 極性+/-とする導入条件を主に用いた。エレクトロポレーション後 3 日目よりピューロマイシン添加の培地で培養し、ピューロマイシン耐性クローンを選択した。その後はピューロマイシン非添加の培地で増殖させ、エレクトロポレーション後 2 週間頃に単一コロニーを採取し、増殖させた。各クローンについて、相同組み換えにより目的の配列の挿入に成功したかどうか、ゲノム DNA の以下の PCR で判定した。プライマー1; GAGTCATCAATTTTATTCTGACTGATCC, プライマー2; TAAAGGCAGTGGAGTGGTTCA, プライマー3; CCACCAACCTCATTCTGTTT, プライマー4; GAGGCGCCGTAGTACAGGT, プライマー5; TTTCCAGAACCACACCCTTC, プライマー6; TCCCTCACTCCAAGAAGAGAGTAT. その後、シーケンシングで *RUNX1* の変異が消失していることを確認した。

## 結果

### FPD/AML 患者から iPSC の樹立

本研究は、図 1 の FPD/AML 家系の患者 II-2 より皮膚組織の提供を受けた。既報の通り、II-2 は血小板減少から AML を発症し、非血縁者間骨髄移植を受け、寛解を維持している[33]。また本家系内では、患者 I-1 は血小板減少を認め、MDS から AML に移行し、死亡した。II-1, II-2, II-3 および III-1, III-2 はいずれも血小板減少を認め、III-1 は急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia; ALL)を発症し、非血縁者間骨髄移植を受けて寛解となっている。当研究室での先行研究では、患者 II-2, II-3 および III-1 については、*RUNX1* のシーケンシング解析にて、3 人とも *RUNX1* のエクソン 5 に C > T の変異を片アレルに認めた(図 2a)。この変異は、*RUNX1* の 174 番目アミノ酸のアルギニンのコドン(CGA)が終止コドン(TGA)となる p.R174X のナンセンス変異であり、この変異体は Runt ホモロジードメインの C 末端付近までのポリペプチド鎖となり(図 2b)、ドミナントネガティブに正常 *RUNX1* のトランスアクチベーションを阻害することが報告されている[14]。

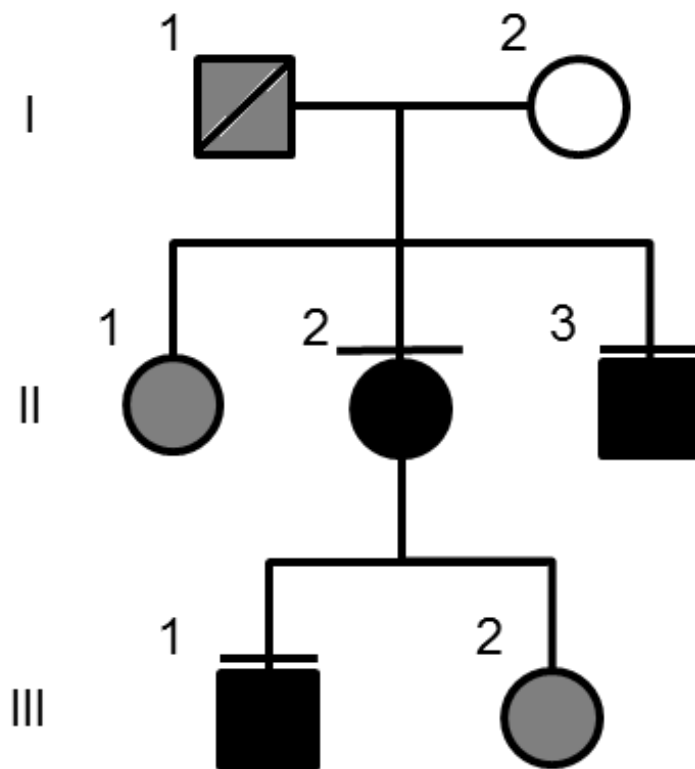


図 1. FPD/AML 家系図

●女性患者、■は男性患者を表す。黒色は FPD/AML 患者、灰色は血小板減少を認めたが、*RUNX1* の変異解析による FPD/AML の診断が確定されていない者を意味する。■あるいは●の上部の線は *RUNX1* の変異の有無についてシーケンシングを行ったことを意味する。文献 33 より修正転載。



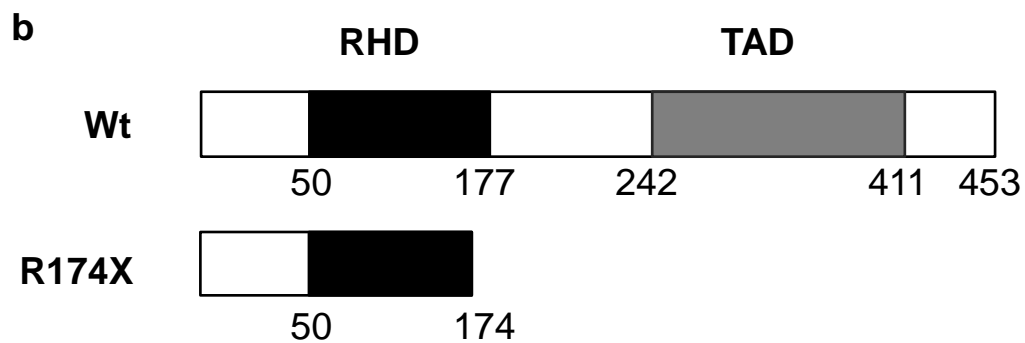
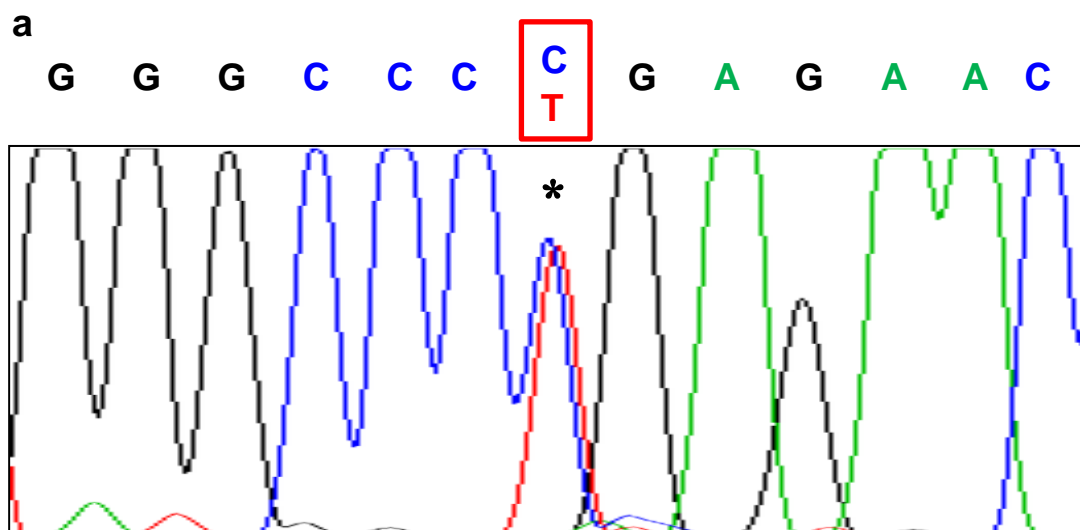


図2. FPD/AML 患者検体での *RUNX1* のシーケンス解析(a)および *RUNX1* の変異体の構造のシェーマ(b)  
 (a) C > T のヘテロ変異を認める。(b) RHD, runt homology domain; TAD, transactivation domain; Wt, wildtype.  
 (文献 33 より修正転載。)

FPD/AML 患者 II-2 の皮膚線維芽細胞を、レトロウイルスで *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* および *c-MYC* の 4 因子を導入し、リプログラミングすることで、iPSC を樹立した(FPD-iPSC)。FPD-iPSC は、胚性幹細胞(embryonic stem cell; ESC)様の形態を呈しており(図 3)、*NANOG*, *OCT4*, *REX1*, *SOX2*, *LIN28* といった幹細胞遺伝子を発現していた(図 4)。また、多能性マーカーである SSEA-4 と TRA-1-60 の発現についても免疫蛍光染色で確認できた(図 5)。さらに、*RUNX1* 遺伝子に患者検体と同一の R174X ヘテロ変異を有していることをシーケンシングで確認し(図 6)、真に FPD/AML 患者由来の iPSC であることを確認した。免疫不全の NOD/scid マウスでの奇形腫形成についても確認した(図 7)。以上のことから、樹立した FPD-iPSC が未分化性と多分化能を有する iPSC であることが確認できた。

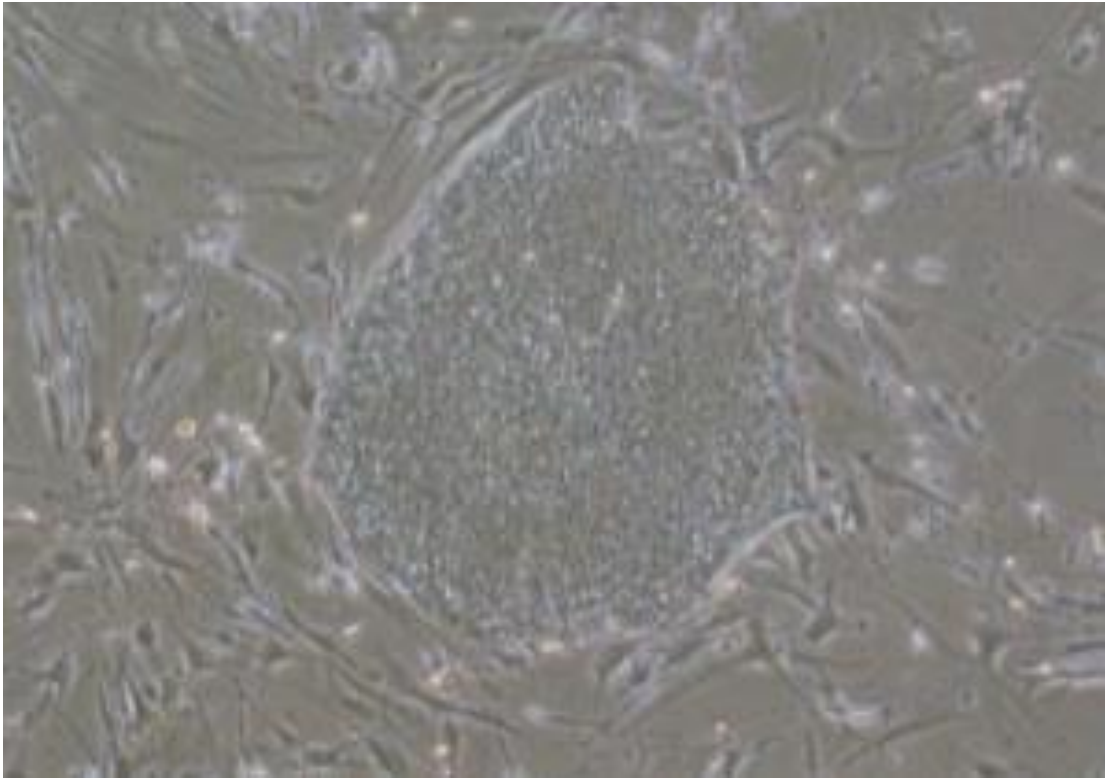


図 3. FPD-iPSC の形態像  
ESC 様の細胞コロニーの形成を認めた。(位相差顕微鏡像)

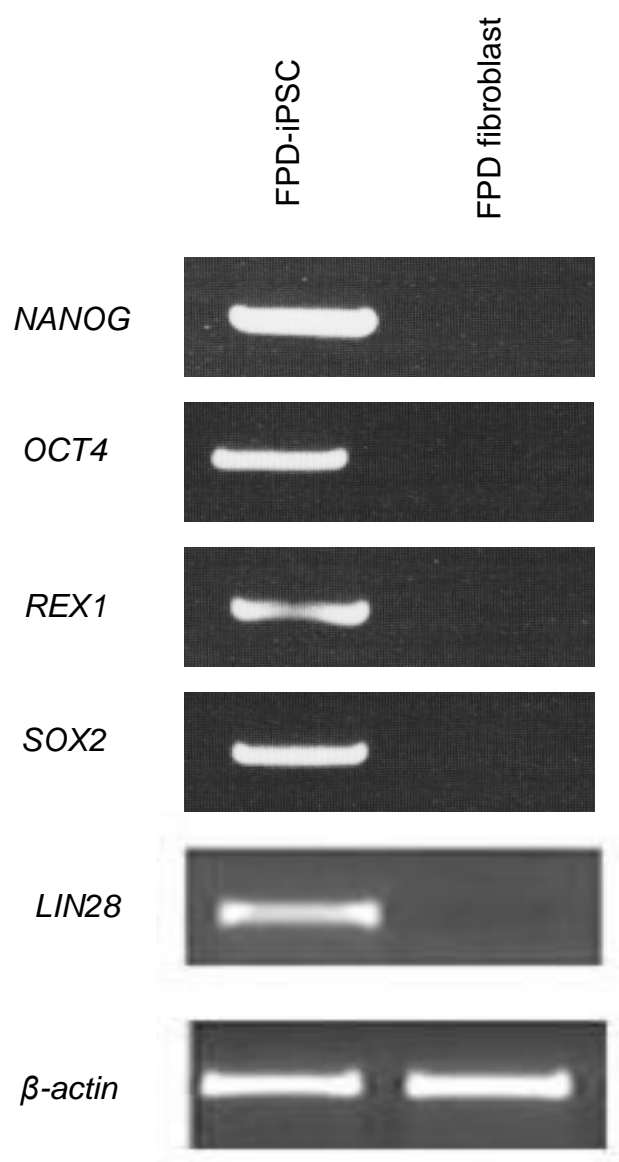
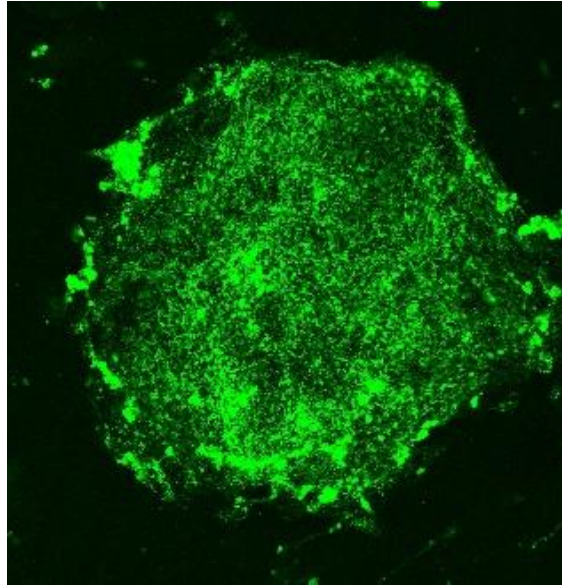


図 4. FPD-iPSC の幹細胞遺伝子の発現

SSEA4



TRA1-60

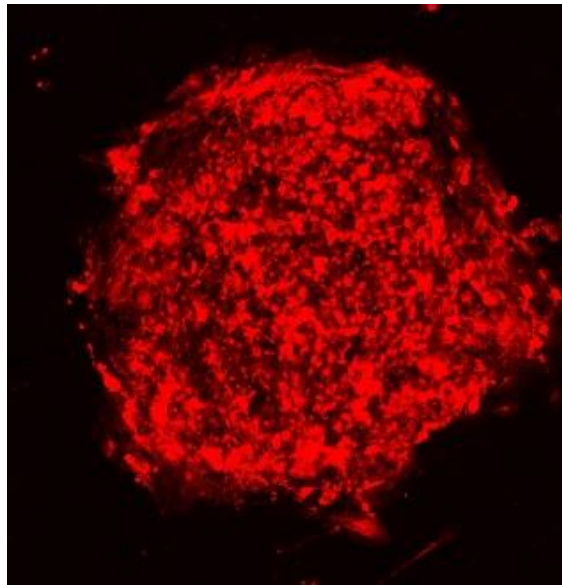


図 5. FPD-iPSC の幹細胞遺伝子の発現

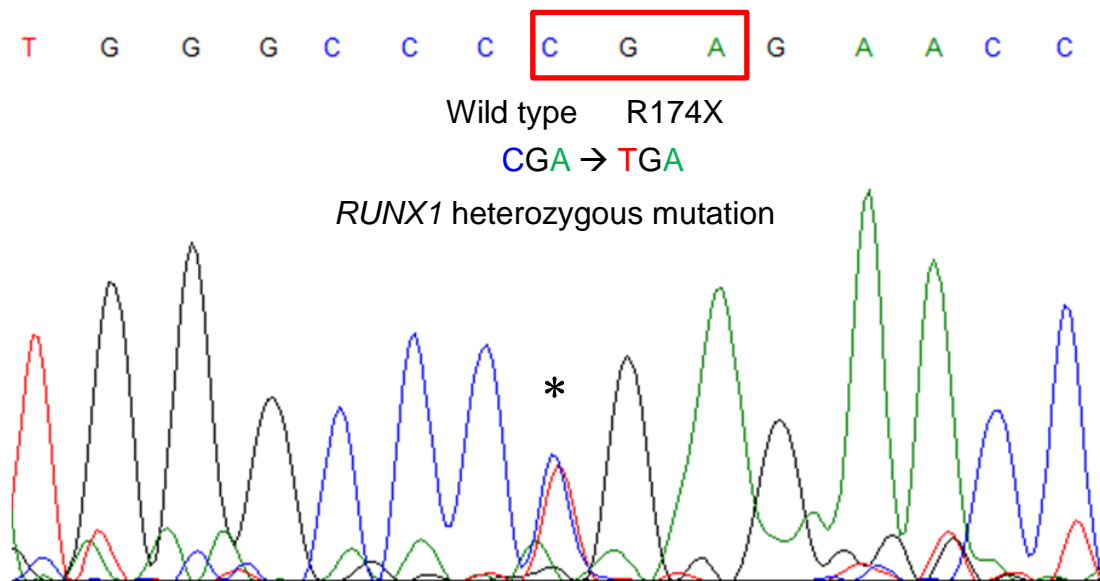
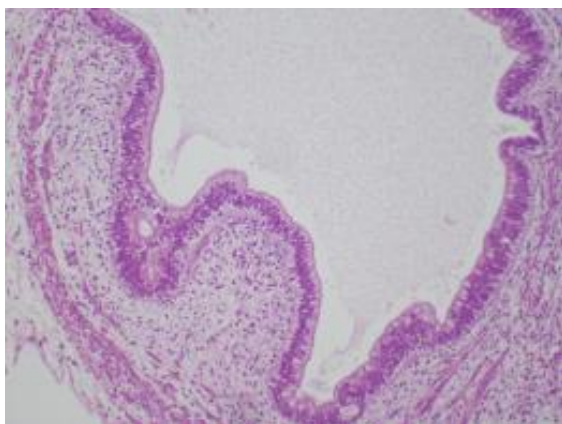
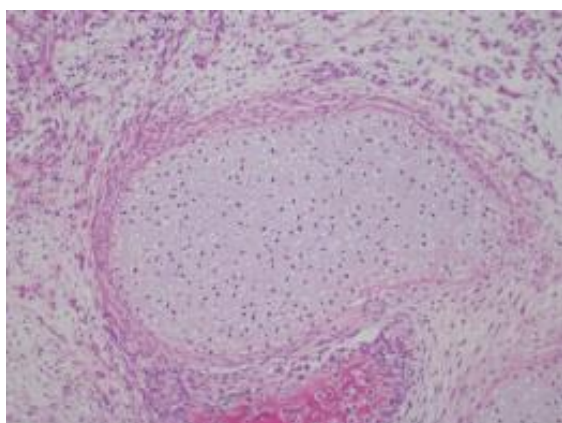


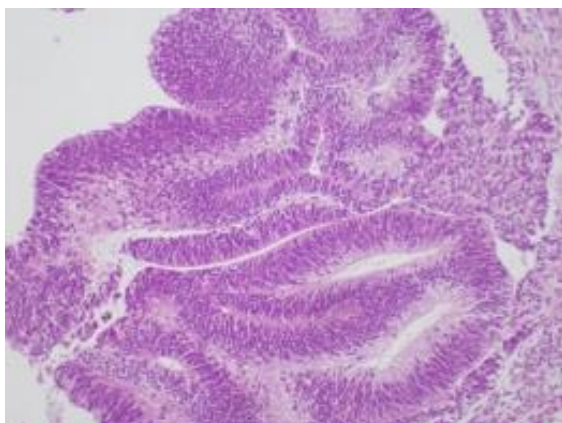
図 6. FPD-iPSC の *RUNX1* のシーケンシング



Endoderm



Mesoderm



Ectoderm

図 7. FPD-iPSC の奇形腫形成

上から順に内胚葉、中胚葉、外胚葉の三胚葉が認められた。(HE 染色)

## FPD-iPS の血球分化能の解析

FPD-iPSC の分化能を調べるために、まず HPC に分化誘導を行った(図 8)。iPSC を VEGF 存在下で C3H10T1/2 細胞と共培養していったところ、sac 様構造 (iPS-sac)の形成が認められ、iPS-sac 内に球状の血球様細胞の出現を認めた(図 9)。培養開始 14 日後あるいは 15 日後に iPS-sac から CD34 陽性 CD43 陽性の HPC をセルソーターで分離した。FPD-iPSC からは、正常コントロール iPSC とほぼ同等に HPC を分化させることができた(図 10, 図 11)。次に、コロニー形成能の評価のために CD34 陽性 CD43 陽性の HPC を半固形培地で培養し、形成されたコロニー数を計測した。正常コントロール iPSC 由来の HPC と比較して、FPD-iPSC 由来の HPC では、赤芽球系および顆粒球単球系のコロニー数には有意差を認めなかった(図 12)。



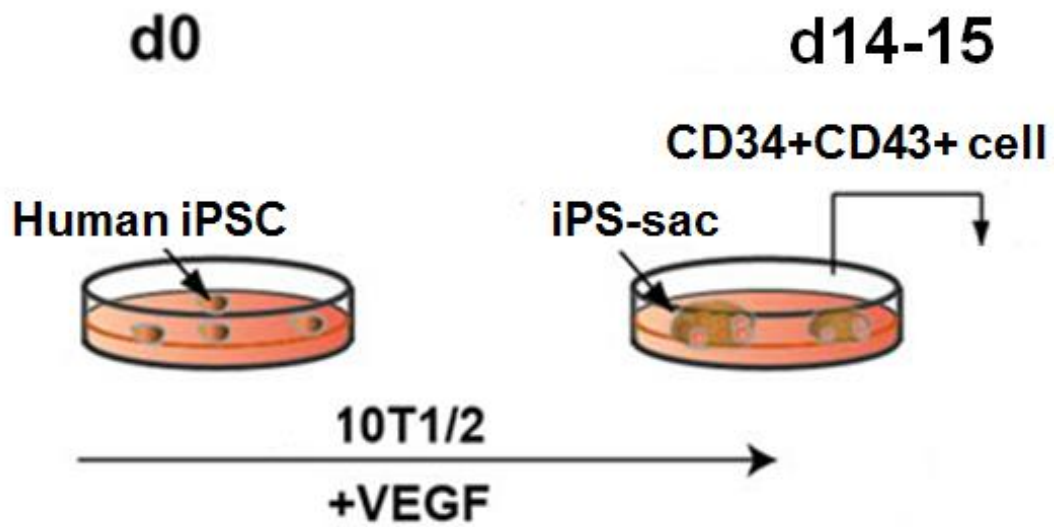


図 8. iPSC から HPC 分化誘導実験の模式図  
 iPSC を VEGF 存在下で C3H10T1/2 と共培養し、CD34 陽性 CD43 陽性の HPC を回収した。(文献 29 より修正転載)

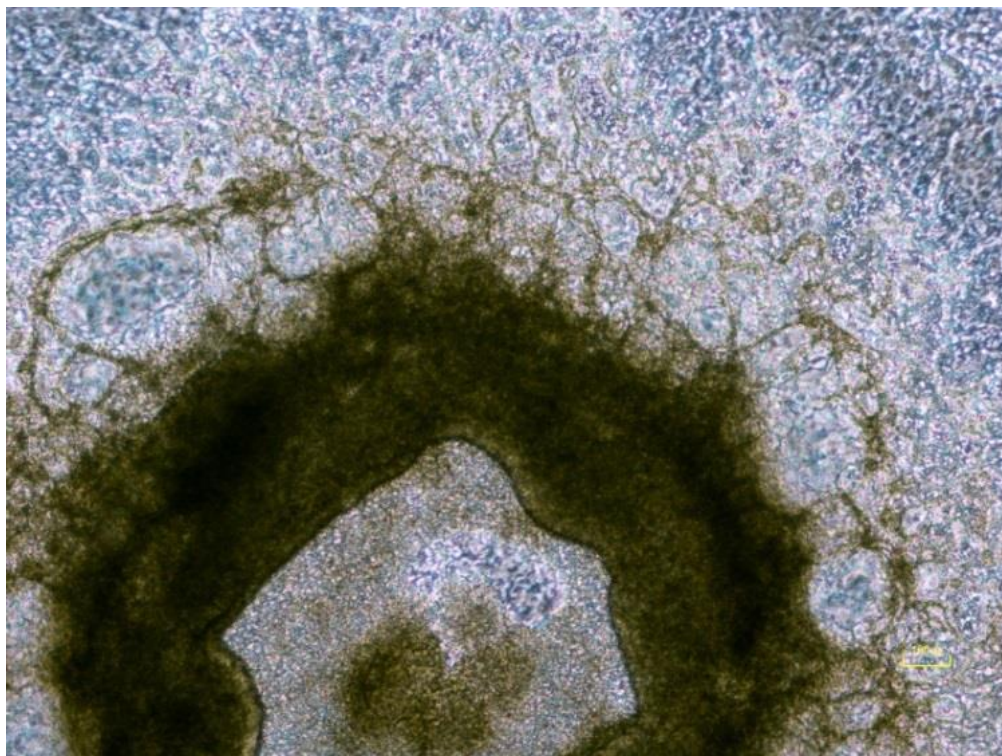


図 9. iPS-sac の形態像  
 分化誘導中に iPS-sac が形成され、iPS-sac 内に球状の血球様細胞が出現した。

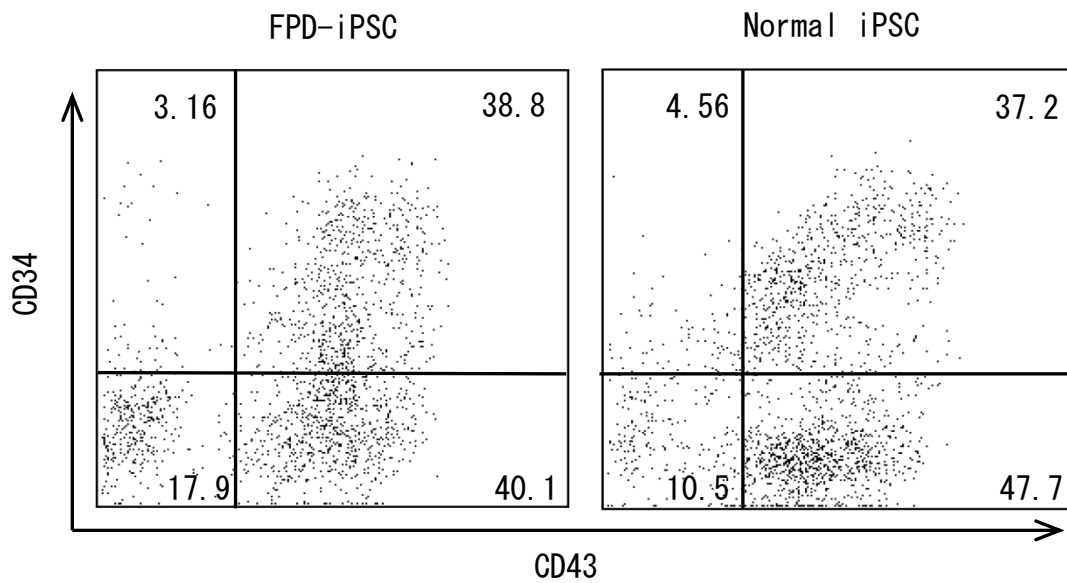


図 10. iPSC からの血球分化誘導  
代表的なフローサイトメトリーのプロット図

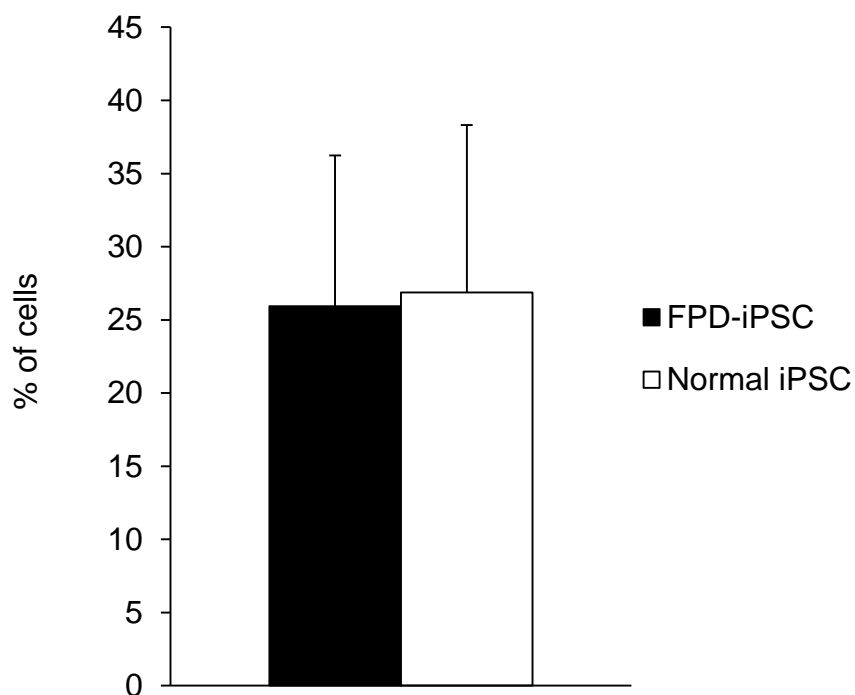


図 11. iPSC の血球分化効率  
CD34 陽性 CD43 陽性の HPC の比率。FPD-iPSC と正常 iPSC で有意差を認めなかった。グラフは独立した 20 回の実験の平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

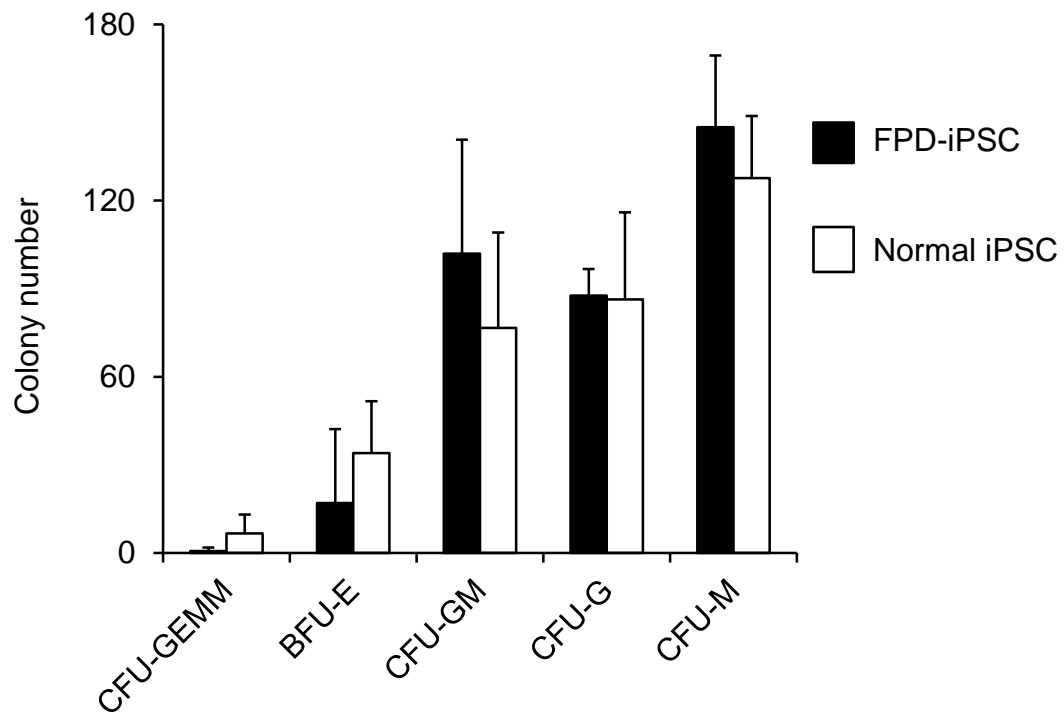


図 12. MethoCult H4034 での FPD-iPSC 由来 HPC と正常コントロール iPSC 由来 HPC のコロニー形成能の比較

いずれも有意差を認めなかった。グラフは独立した 3 回の実験の平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

一方、巨核球系のコロニー形成能については、MegaCult-C で評価した。HPC をコラーゲン培地で培養し、固定、染色したところ、CD41 陽性の CFU-Mk 数は FPD-iPSC 由来の HPC で正常コントロールより有意に少なく(図 13)、巨核球系のコロニー形成能の低下が認められた。

さらに、iPSC 由来の HPC を巨核球に分化させるために、MGDF, SCF およびヘパリン添加の分化培地で C3H10T1/2 細胞と 9 日間共培養し、セルソーターで CD41a 陽性 CD42b 陽性細胞を回収した。得られた CD41a 陽性 CD42b 陽性細胞のサイトスピン像では、FPD-iPSC 由来と正常コントロール由来ともに、核の多倍体化を伴う巨核球が見られた(図 14)。細胞表面マーカーの発現を解析したところ、FPD-iPSC 由来では、CD41a 陽性率の有意な減少を認めた(図 15, 16)。また巨核球はその成熟過程で CD41a 陽性 CD42b 陰性から CD41a 陽性 CD42b 陽性の成熟巨核球へと、CD42b が陽性化するのだが、FPD-iPSC 由来の巨核球では CD42b の陽性率の有意な減少を認めた。また、CD41a 陽性分画での CD42b の平均蛍光強度(MFI)は、正常 iPSC と比較して FPD-iPSC において有意な低下を認め、巨核球の成熟が障害されていると考えられた(図 17)。CD42b は血小板の粘着において重要な役割を担っている GPIb を構成する分子であるため、この結果は FPD/AML における血小板機能の異常を反映しているものと考えられた。

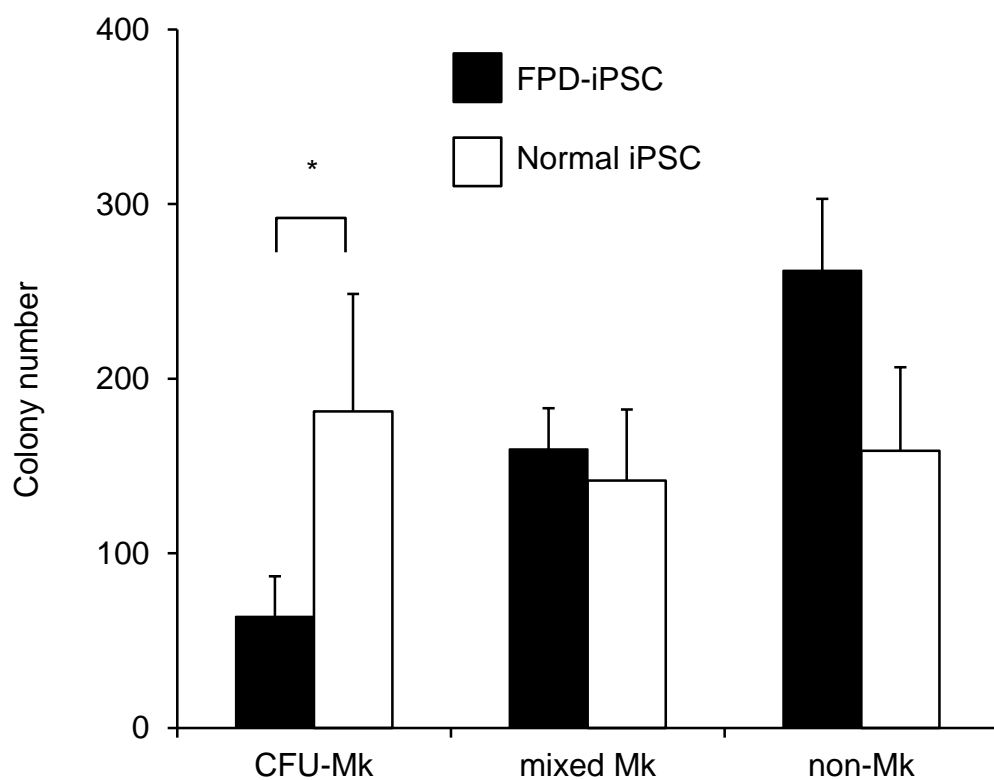


図 13. MegaCult-C での巨核球コロニー形成能の評価

FPD-iPSC 由来の HPC で、正常 iPSC 由来 HPC に比較し、巨核球系コロニー (CFU-Mk) の有意な減少を認めた。グラフは独立した 3 回の実験の平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。\*  $P < 0.05$

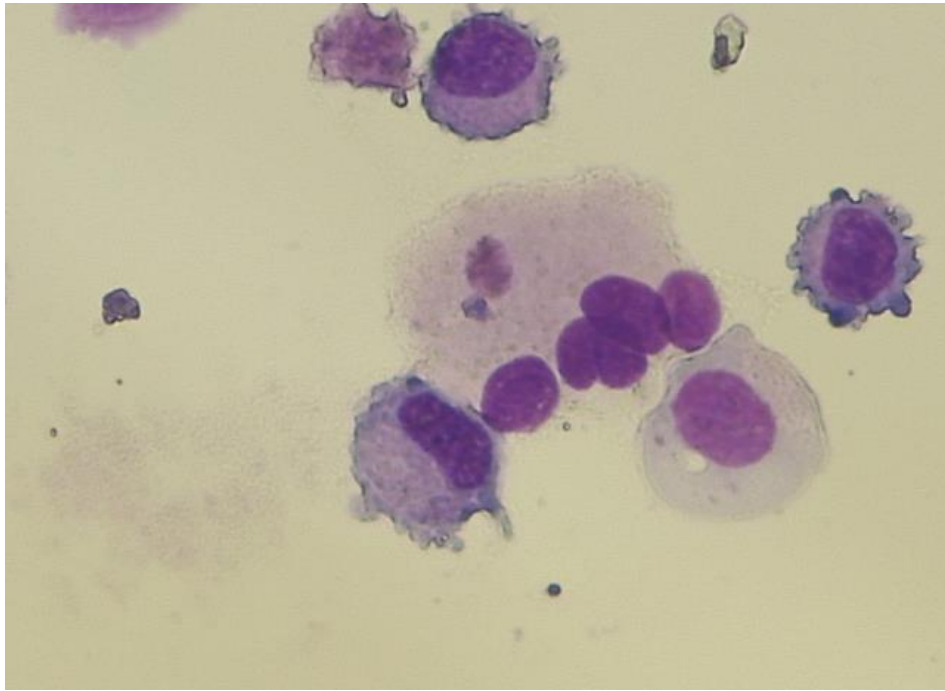


図 14. CD41a 陽性 CD42b 陽性の巨核球のサイトスピン像  
ライト・ギムザ染色。上：FPD-iPSC 由来の CD41a 陽性 CD42b 陽性巨核球。  
下：正常 iPSC 由来の CD41a 陽性 CD42b 陽性巨核球。

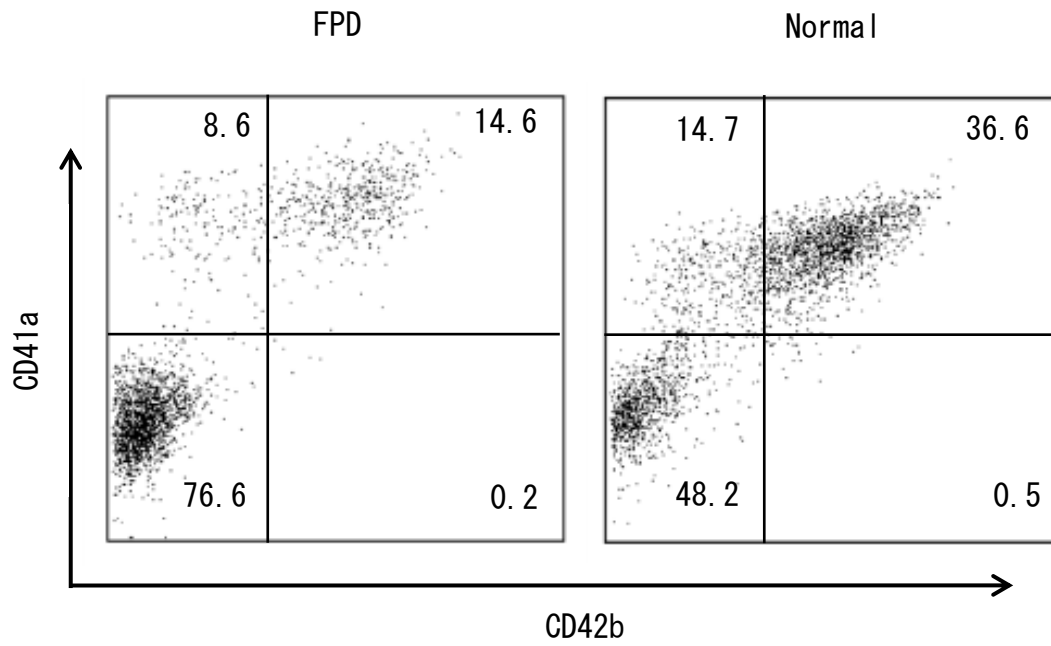


図 15. 巨核球分化のフローサイトメトリー解析の代表的なプロット図  
 FPD-iPSC 由来の細胞で、CD41a 陽性細胞の減少を認めた。

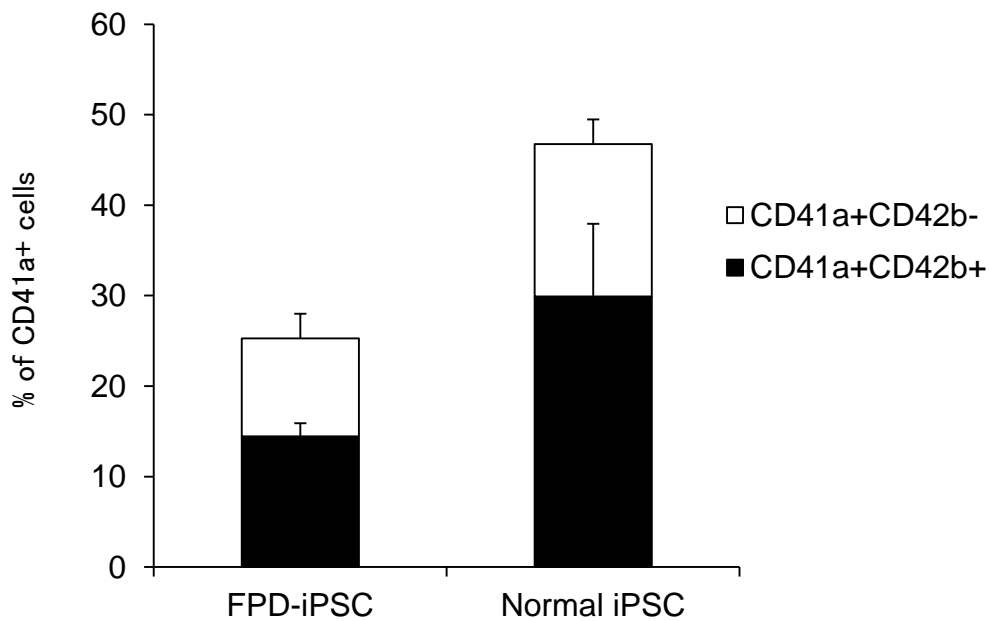


図 16. 巨核球分化の解析

FPD-iPSC 由来 HPC では、CD41a 陽性率の減少を認めた。また、CD41a,CD42b 共陽性の細胞比率の減少を認めた。グラフは独立した 3 回の実験の平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

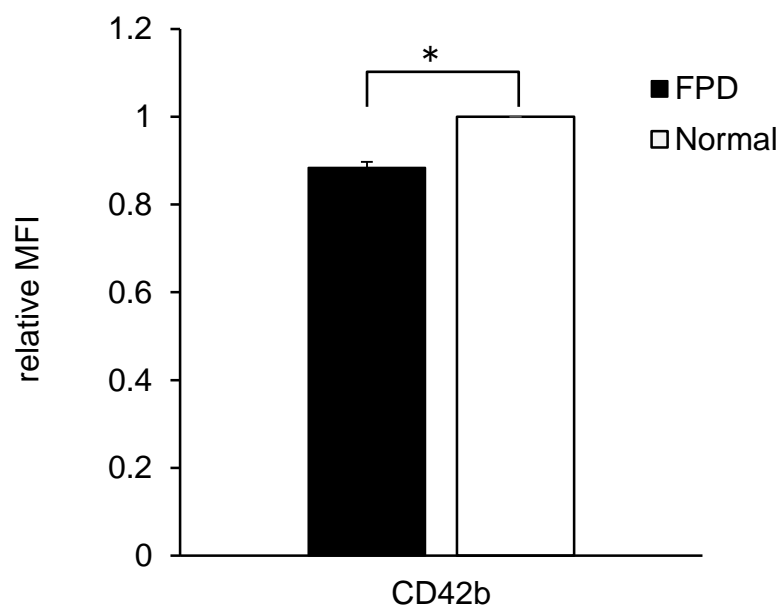


図 17. 巨核球の成熟の解析

FPD-iPSC 由来 HPC では、CD41a 陽性分画での CD42b の平均蛍光強度(MFI, mean fluorescence intensity)の減少を認めた。グラフは独立した 3 回の実験の平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。\*P < 0.05



核の多倍体化について解析したところ(図 18)、FPD-iPSC 由来の巨核球と正常 iPSC 由来の巨核球で、全体の加重平均では有意な差はみられなかったが(図 19)、FPD-iPSC 由来では 2 倍体(2N)の割合の増加と、4 倍体(4N)の割合の減少を認め、2N から 4N への移行が障害されている可能性が考えられた(図 20)。8N, 16N では有意な差が認められなかった原因は不明だが、8N 以降の多倍体化については RUNX1 の関与度が低い可能性が考えられる。

以上のことから、FPD-iPSC では HPC から巨核球への分化の障害、および巨核球の成熟の障害があると考えられた。

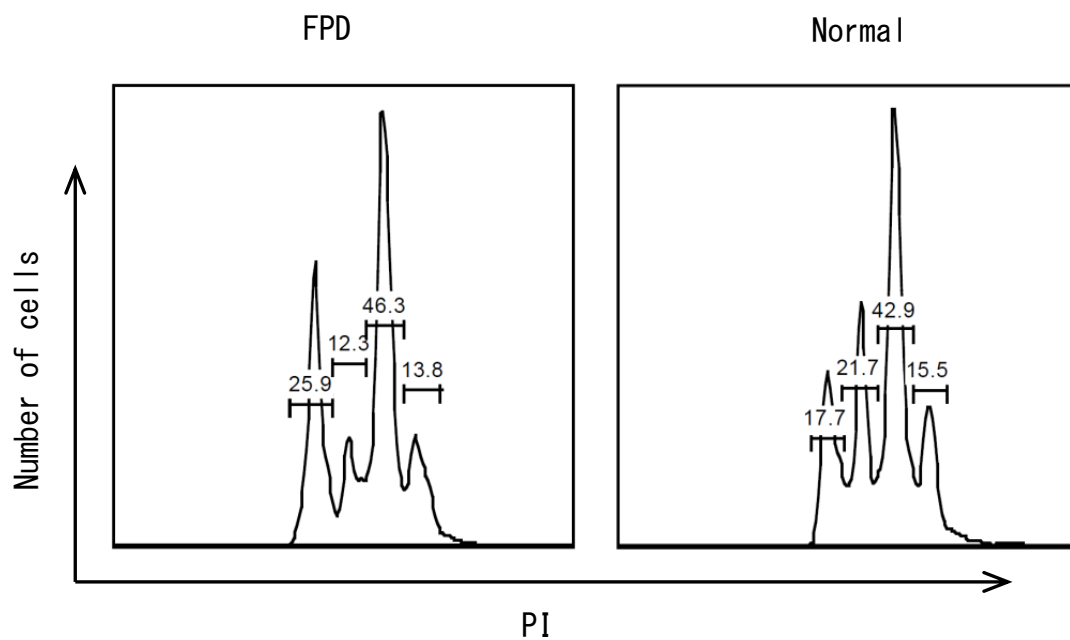


図 18. CD41a 陽性 CD42b 陽性の巨核球の多倍体化の解析  
 図は代表的なヒストグラム。

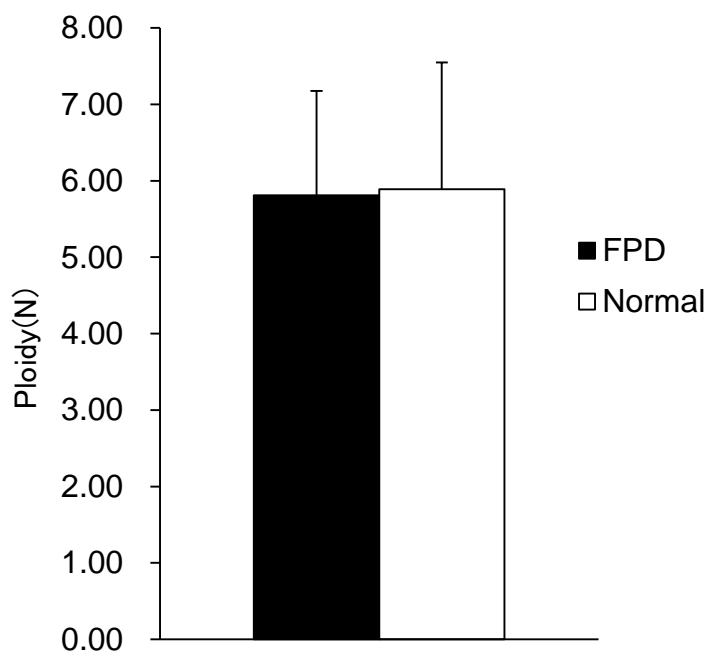


図 19. 巨核球の核の多倍体化の解析  
 全体の加重平均には有意な差は認めなかった。グラフは独立した 4 回の実験の平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

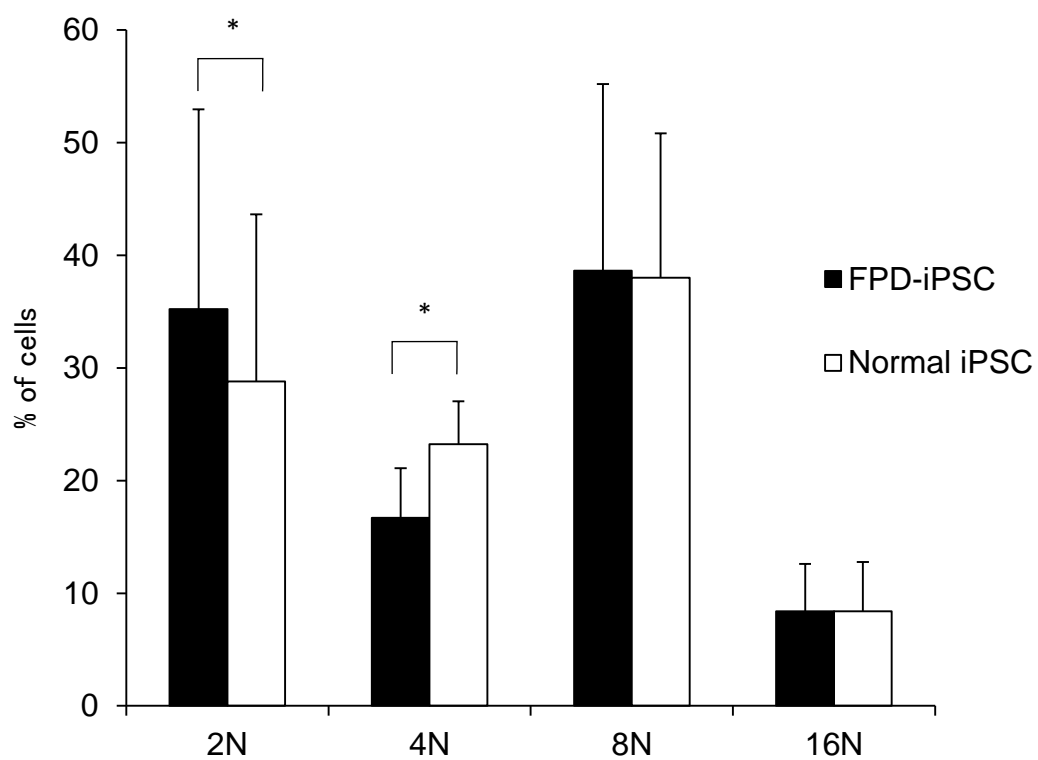


図 20. 巨核球の核の多倍体化の解析

FPD-iPSC 由来で 2N の割合の増加、4N の割合の低下を認めた。グラフは独立した 4 回の実験の平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

\* P < 0.05

## In vivo での血小板産生能

FPD/AML 患者由来の巨核球の *in vivo* での血小板産生能について調べるため、*in vitro* で分化させた FPD-iPSC 由来および正常 iPSC 由来の同数の巨核球を、免疫不全マウス(NOG マウス)に静注し、注射 3 時間後の末梢血中の血小板サイズのヒト CD41a 陽性ヒト CD42b 陽性細胞数を評価した。正常 iPSC 由来の巨核球と比較して、FPD-iPSC 由来の巨核球では CD41a 陽性 CD42b 陽性の血小板の割合が少ない傾向がみられたが、有意差は認めなかった(図 21)。

以上のことから、FPD-iPSC 由来の血球では、巨核球の成熟障害に加え、血小板産生能の低下傾向も示しており、FPD/AML の疾患の特徴をよく反映しているものと考えられ、FPD-iPSC は FPD/AML の疾患モデルとして有用であると考えられた。

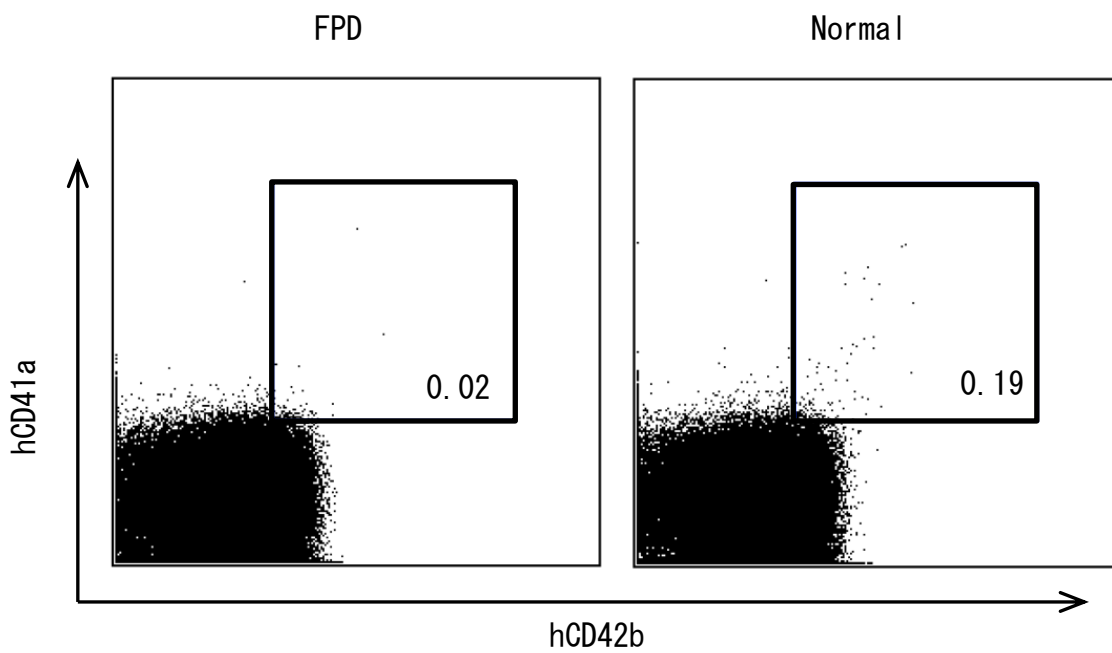


図 21. In vivo での血小板産生の解析  
 血小板のサイズのゲートで、ヒト CD41a, ヒト CD42b について解析した。  
 図は代表的なプロット図。

## RUNXI の変異部位を切断する TALEN の設計

次に、*RUNXI* の変異の修復により FPD-iPSC で見られた巨核球系の分化・成熟障害の改善が見られるかどうかという点に関心をもった。*RUNXI* の変異を特異的に修復するために、*RUNXI* の変異部位を標的にする TALEN と、正常 *RUNXI* のエクソン 5 以降のコーディング配列を含むドナー配列を設計した(図 22- 24)。TALEN のヌクレアーゼが標的部位に二本鎖切断を起こした後に、ドナー配列との相同組み換えによって、ゲノム DNA の *RUNXI* の変異部位がドナー配列由来の正常 *RUNXI* のコーディング配列に置き換えられる。相同組み換えを起こした細胞を選択するために、相同組み換えを起こした細胞にはピューロマイシン耐性遺伝子が挿入されるようにドナー配列を設計した。

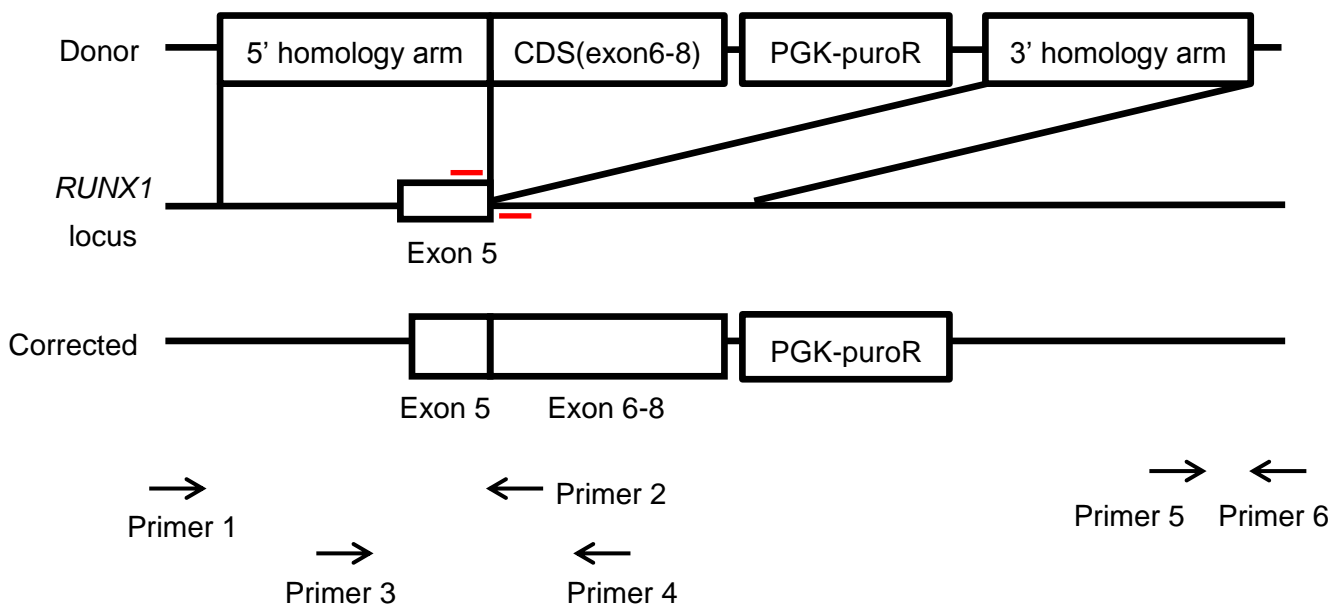


図 22. TALEN による遺伝子修復の模式図

赤線は TALEN 結合配列の部位。二本鎖切断され、相同組み換えによって切断部位に exon6-8 のコーディング配列とピューロマイシン耐性が挿入される。Primer1-6 は相同組み換えの確認のための PCR で使用したプライマーである。

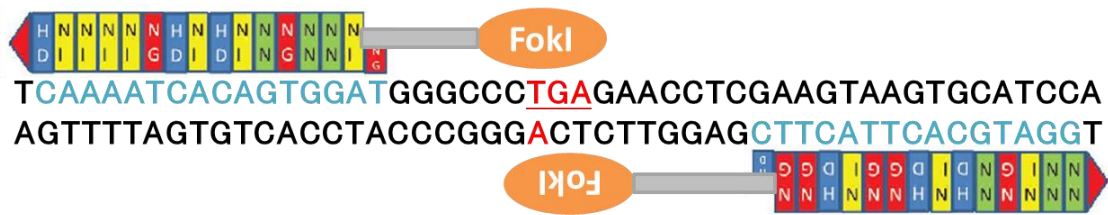


図 23. TALEN のシェーマ

赤字は *RUNXI* の変異部位。青字は TALEN の認識部位が結合する配列。TALEN の認識配列に挟まれた部位で FokI により DNA の二本鎖切断が起こる。

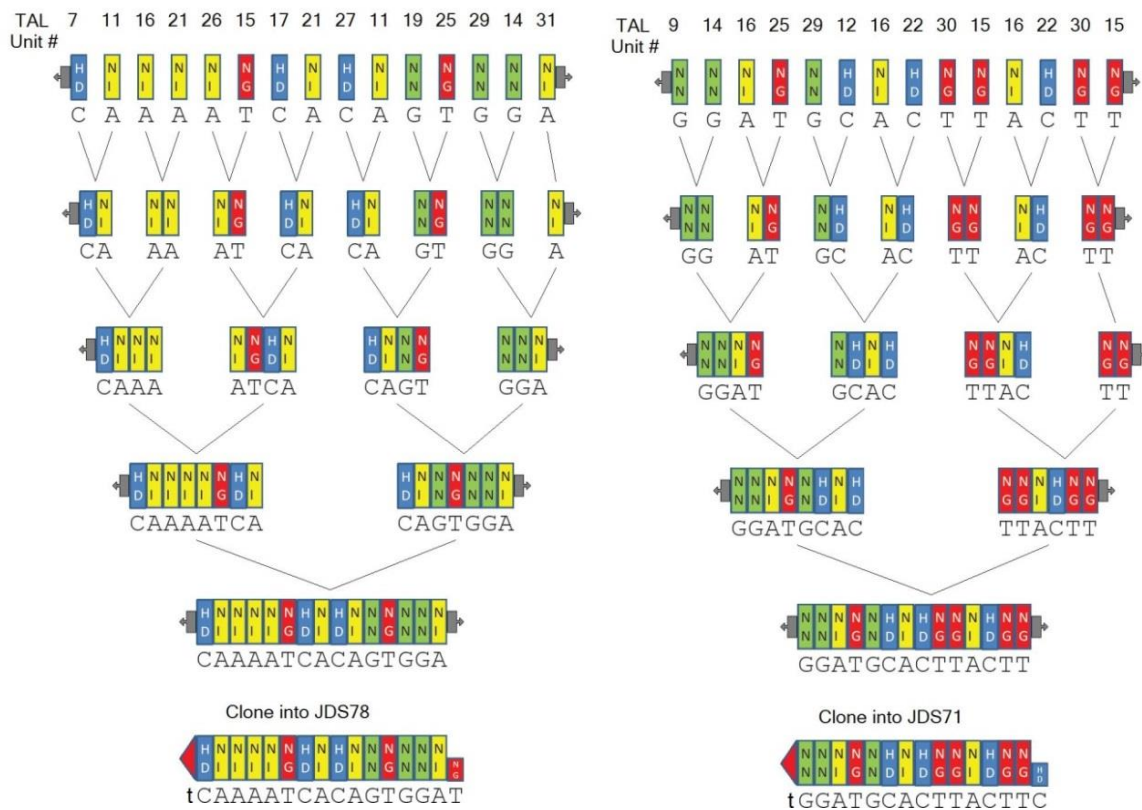


図 24. TALEN の DNA 認識配列の合成の模式図

REAL 合成法で各 RVD が設計通りに並ぶよう段階的に合成した。



作製した TALEN の DNA 切断活性を確認するために、ヒト細胞株 HeLa に TALEN のみを導入したところ、*RUNX1* の変異部位に新たに数塩基の挿入・欠失 (indel) が出現することを確認した (data not shown)。次に、TALEN による遺伝子修復の効率を確認するために、HEK293T 細胞に TALEN とドナーのプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。その後、ピューロマイシン添加培地で培養し、生存している細胞の DNA を抽出した。相同組み換えに特異的なプライマーでの PCR によって、ドナー配列が正しく標的部位に組み込まれたことを確認した (図 25)。さらに、ピューロマイシン耐性細胞での *RUNX1* タンパク質の発現量が、コントロールの細胞とほぼ同等であることが確認できたことから、挿入された *RUNX1* のコーディング配列は正しく転写、翻訳されていることが示された (図 26)。

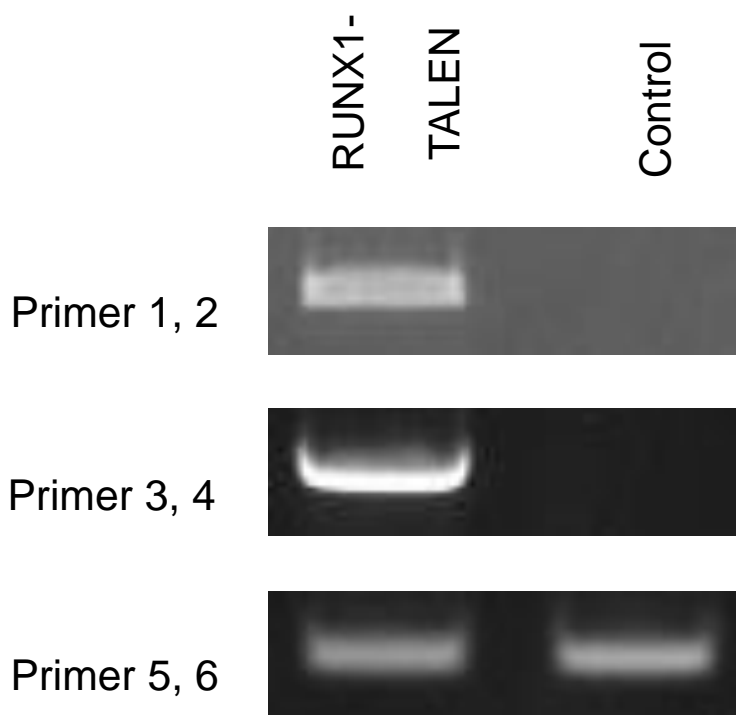


図 25. TALEN による遺伝子編集の確認の PCR  
各プライマーの位置関係は図 21 に示した通り。

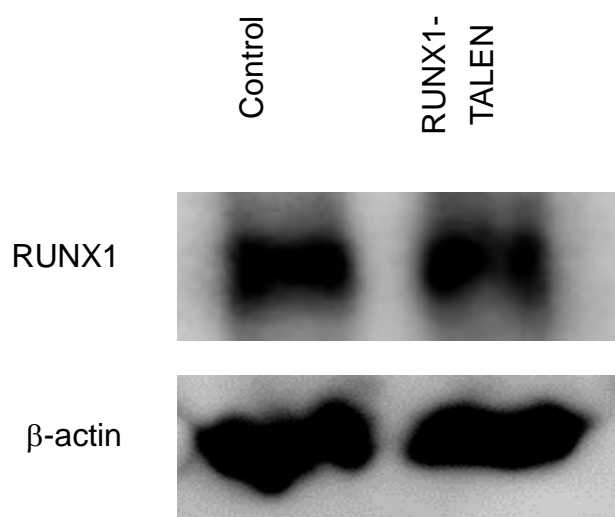


図 26. TALEN により遺伝子編集された細胞の RUNX1 タンパク質の発現  
RUNX1 発現量はコントロールとほぼ同等であった。

## FPD-iPSC での *RUNX1* 変異の遺伝子修復

次に、この方法を用いて FPD-iPSC で *RUNX1* の遺伝子修復を試みた(図 27)。

FPD-iPSC を単細胞に解離し、TALEN とドナー配列のプラスミドをトランスフェクションして、MEF 上で培養した。ピューロマイシン存在下でも生存可能であったコロニーをそれぞれ単離し、増殖させた。前述と同様の PCR で、期待した組み換えが起こっていることを確認し(data not shown)、さらに正常 *RUNX1* のみが発現していることを cDNA のシーケンシング解析で確認した(data not shown)。

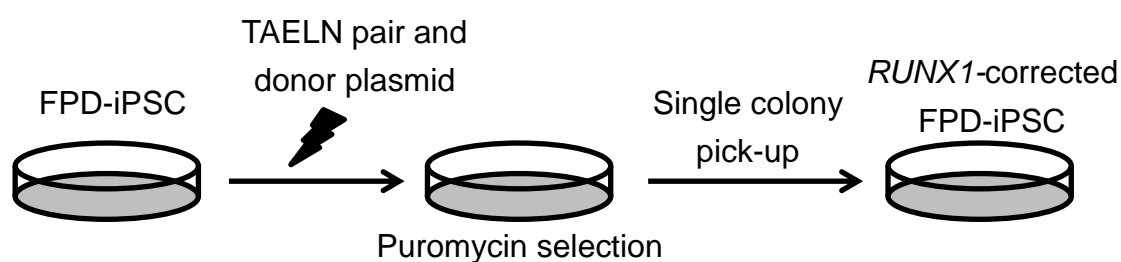


図 27. TALEN による *RUNX1* 遺伝子修復の模式図

次に、遺伝子修復された FPD-iPSC を血球へ分化誘導し、巨核球への分化能について解析した。コラーゲン培地での巨核球系のコロニー形成能の評価では、遺伝子修復された iPSC 由来の HPC では、FPD-iPSC 由来の HPC と比較して CFU-Mk コロニー数の有意な増加を認めた(図 28)。さらに、C3H10T1/2 細胞との共培養での巨核球への分化誘導においても、FPD-iPSC 由来と比較して CD41a 陽性の巨核球の分化効率の有意な増加が認められ、CD41a 陽性 CD42b 陽性の成熟巨核球の比率にも回復が認められた(図 29, 30)。また CD41a 陽性細胞での CD42b の MFI についても、遺伝子修復による回復が認められ、FPD-iPSC における巨核球の分化および成熟の障害が改善されたものと考えられた(図 31)。遺伝子修復された FPD-iPSC を正常 iPSC と比較すると、有意な差ではないものの、いずれの実験でも低下傾向を認めており、iPSC のクローン間の差、およびドナーの違いによる影響を受けているものと考えられた。

*RUNX1* の遺伝子修復された FPD-iPSC 由来の細胞での *RUNX1* の発現量については、HPC の段階でも巨核球の段階でも、もとの FPD-iPSC 由来の細胞での発現量と有意な差は認められず(図 32, 33)、*RUNX1* の遺伝子修復によりこれらの変化がもたらされたものと考えられた。

以上のことから、TALEN を用いた *RUNX1* の遺伝子修復による生理的なレベルの正常 *RUNX1* の発現の回復によって、FPD/AML 患者由来の血球の巨核球分

化の異常を改善することができ、この疾患に対する新たな治療法につながる可能性が考えられた。

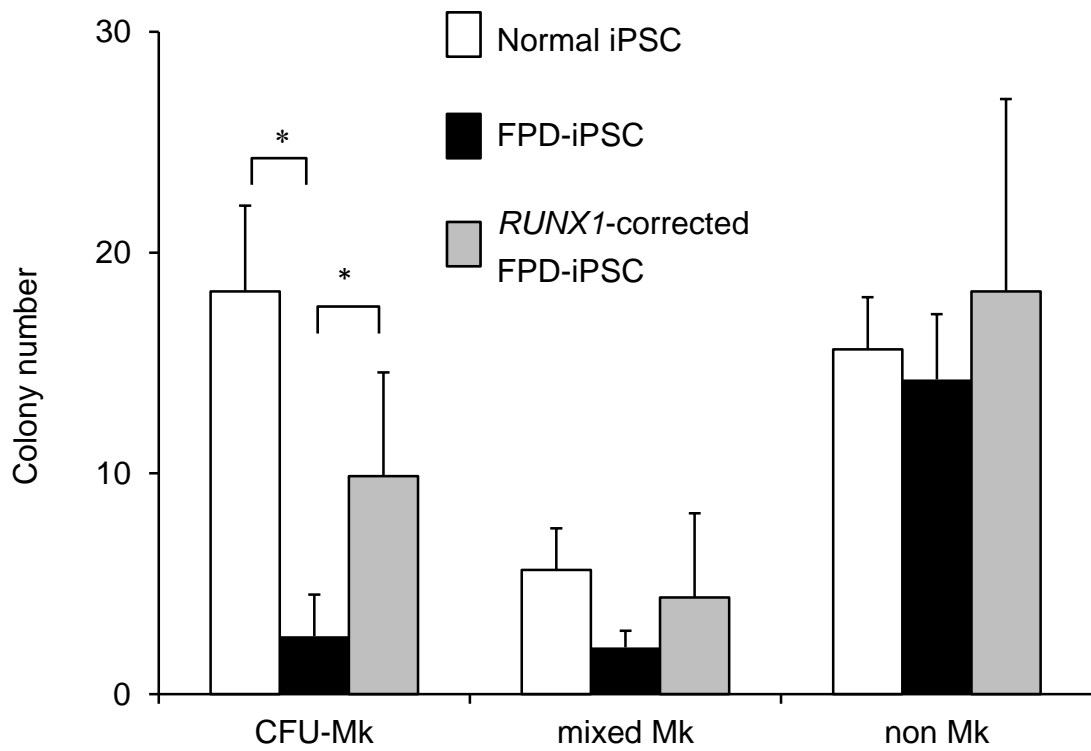


図 28. *RUNX1* 遺伝子修復による巨核球系コロニー形成能の変化  
 グラフは独立した 4 回の実験の平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。  
 \*P<0.05

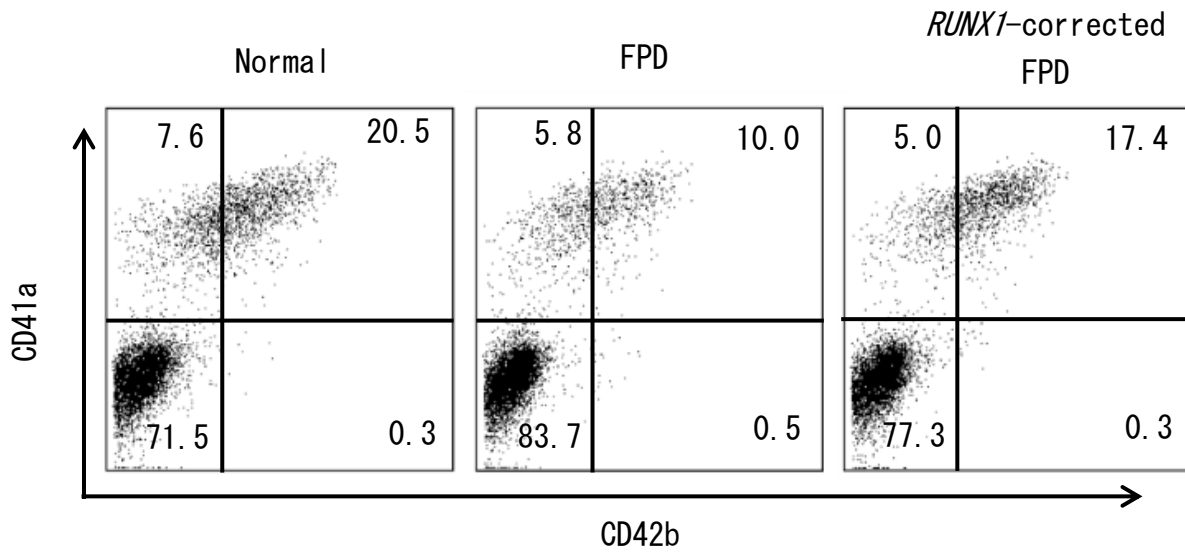


図 29. *RUNX1* 遺伝子修復による巨核球分化効率の変化  
代表的なプロット図。

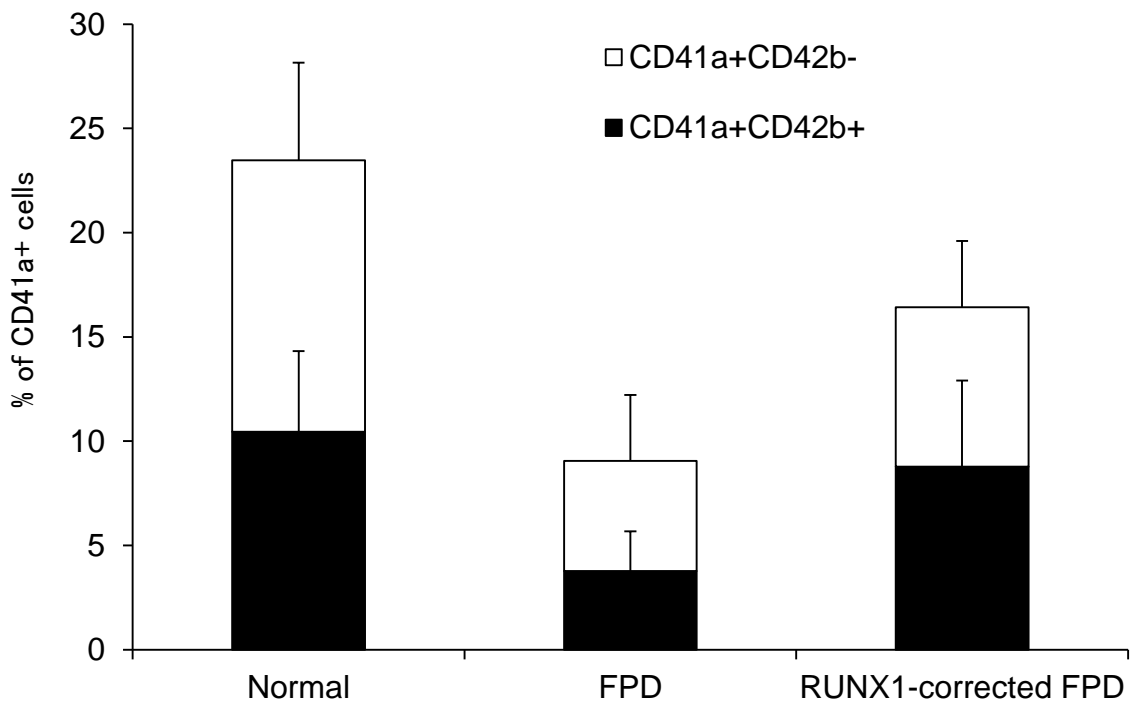


図 30. *RUNX1* 遺伝子修復による巨核球の分化の変化  
グラフは独立した 4 回の実験の平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

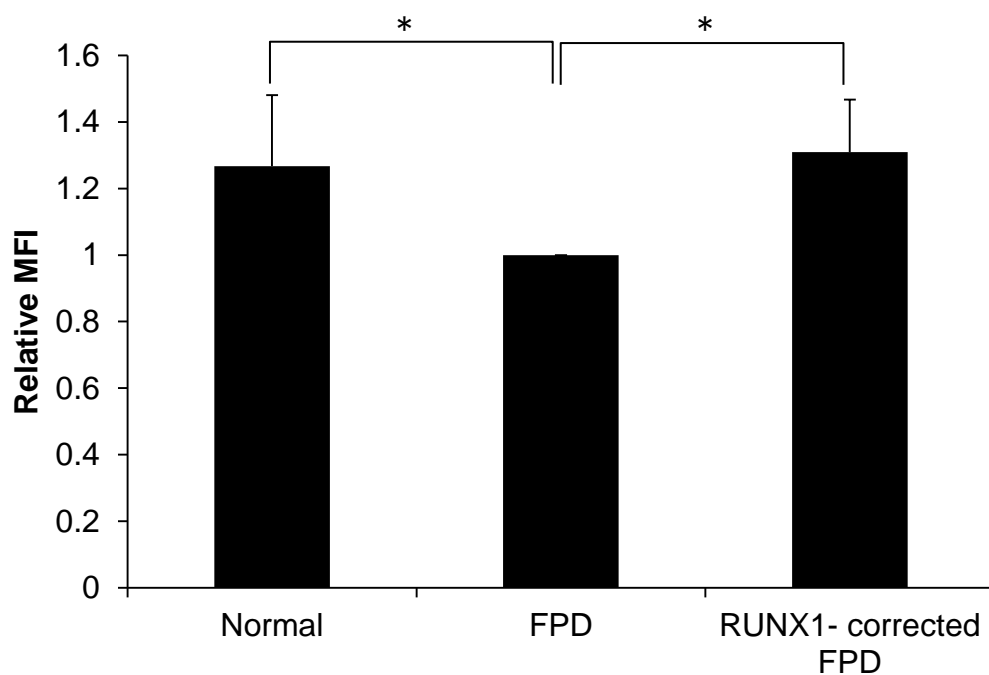


図 31. *RUNX1* 遺伝子修復による CD41a 陽性分画での CD42b の平均蛍光強度(MFI)の変化

グラフは独立した 4 回の実験の平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

\* P < 0.05



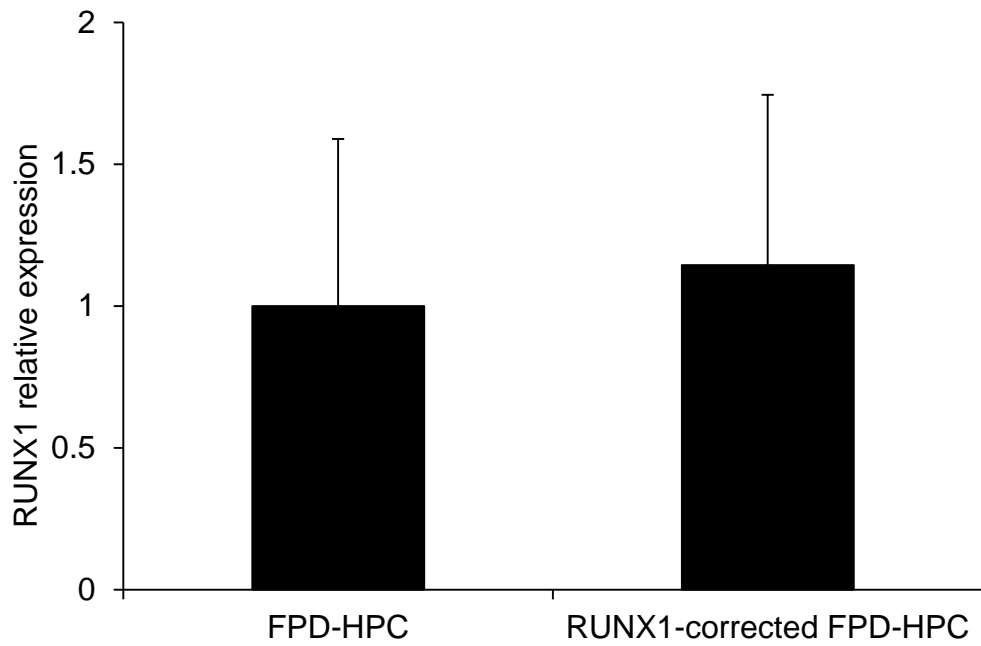


図 32. iPSC から分化させた HPC の *RUNX1* の発現  
*RUNX1* の遺伝子修復操作による *RUNX1* の発現量に有意な変化は認めなかった。グラフは独立した 3 回の実験の平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

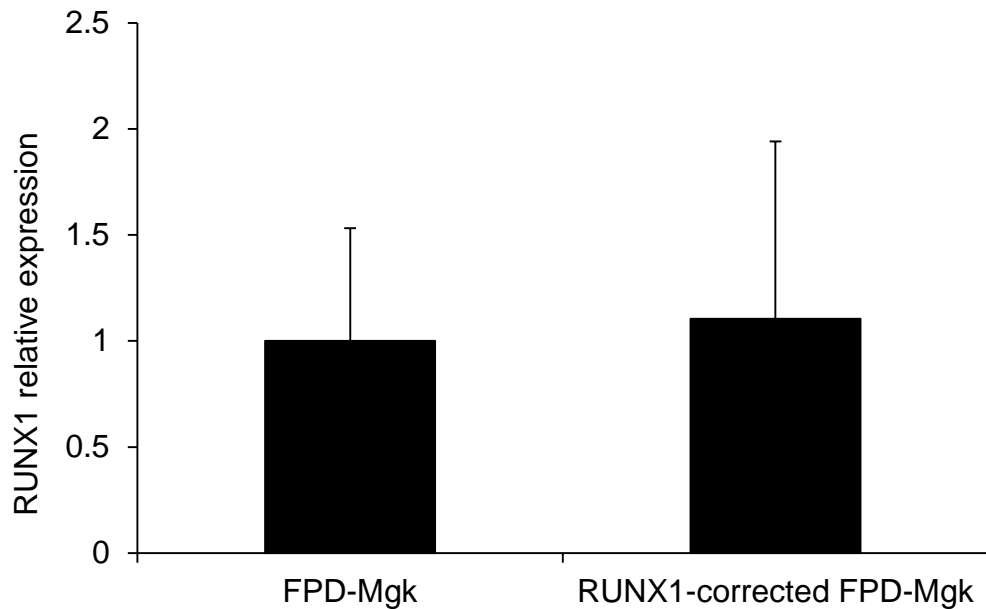


図 33. iPSC から分化させた巨核球(Mgk)の *RUNX1* の発現  
*RUNX1* の遺伝子修復操作による *RUNX1* の発現量に有意な変化は認めなかった。グラフは独立した 3 回の実験の平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

## 考察

本研究では、FPD/AML 患者の皮膚線維芽細胞をリプログラミングし、FPD-iPSC を作製した。FPD-iPSC は、通常の iPSC と形態的にも未分化性および多分化能の点においても同様の結果を示し、未分化性および多分化能を有する iPSC であることが確認できた。FPD-iPSC を血球に分化させたところ、HPC の分化効率においては有意差を認めず、また赤芽球系、顆粒球単球系への分化についても有意差を認めなかったものの、巨核球への分化の障害、および巨核球の成熟の障害を認め、FPD/AML でみられる血小板減少、血小板機能異常の病態を反映しているものと考えられた。FPD/AML では、リストセチン凝集を除く血小板凝集能の異常(コラーゲン、エピネフリン、アラキドン酸、ADP 凝集異常)を認めることが多く、濃染顆粒異常症( $\delta$  storage pool disease)様の血小板機能異常と考えられるが[6, 7, 9]、GPIIb/IIIa の活性化の障害との報告もあり[11]、FPD/AML で血小板機能異常が生じる詳細なメカニズムは分かっていない。FPD-iPSC を用いて血小板への分化を詳細に解析することで、FPD/AML において血小板機能異常が生じるメカニズムが明らかになるかもしれない。また、FPD-iPSC の巨核球の分化・成熟の障害は、TALEN を用いた *RUNX1* の遺伝子修復で改善させることができ、HPC から巨核球への分化、およびその後の巨核球の成熟に *RUNX1* が深く関与していることが確認された。遺伝子修復された iPSC

は、今後、新たな細胞療法として FPD/AML の治療につながる可能性がある。さらに、FPD-iPSC は、FPD/AML が AML や MDS に移行する機序など、FPD/AML の病態を解明するための新たなプラットフォームになる可能性があると考えられる。さらには、*RUNX1* の体細胞変異を有する AML および MDS の発症機序に関する研究においても FPD-iPSC は有用であるかもしれない。

疾患の原因となっている遺伝子異常を操作するために、患者の細胞に遺伝子導入を行う、といった遺伝子治療は、遺伝性疾患では有効な治療法のひとつになりうると期待される。これまで、導入効率の高さからウイルスベクターが最もよく使用されてきた。原発性免疫不全症候群など単一の遺伝子の異常で発症するような血液疾患では、遺伝子修復された造血幹細胞の自家移植は、根治的治療法となる可能性があり、多くの臨床試験でも研究されている[34-39]。ただ最大の懸念は、挿入変異のリスクであり、レトロウイルスベクターの **long terminal repeat (LTR)** 領域内のエンハンサーによってベクター挿入部位の近傍のがん原遺伝子の発現の亢進による癌化の可能性が考えられる[40-44]。レンチウイルスベクターは、レトロウイルスベクターよりも安全とされ、近年では Wiskott-Aldrich 症候群患者の CD34 陽性の血球にレンチウイルスで遺伝子導入し、その細胞を自家移植することで治療に成功したとの報告もあるが[45]、それでも導入遺伝子のインテグレーションに伴うリスクがある。今回の TALEN を用いた

手法には、ウイルスベクターによる遺伝子導入に比べいくつか利点があると考ええる。まず、両側の相同配列があることで、相同組み換えによって挿入したい配列が特定の部位に組み込まれるという点である。次に、導入された遺伝子は、生理的なプロモーターによって発現されるので、ウイルスベクターによる遺伝子の過剰発現に比べ、より正常に近い機能を再現できるものと考えられる。特に、今回のように原因となる変異がドミナントネガティブ効果をもつ場合には、正常な cDNA 配列のランダムインテグレーションでは、変異体が残存するため正常な機能の回復が期待できないこともあるかもしれない。

今回のように遺伝子治療に iPSC を使用した利点は、患者由来の細胞、特に血球を、ほぼ無限に増やすことができるという点であり、in vitro での遺伝子修復の後に自家移植に使用できるかもしれないということである。しかし一方で iPSC から自己複製能をもつ長期造血幹細胞 (long term hematopoietic stem cell; LT-HSC) を産生させることは依然困難であり、既報では ESC や iPSC 由来の CD34 陽性造血細胞の移植では有効に生着していない[46-48]。今回、NOG マウスに注射した巨核球は血小板を産生できることを示したが、移植後の長期的な造血の再構築には、iPSC 由来の HSC を効率的に回収することが求められる。HSC の維持には in vivo では骨髄ニッチによる制御が必要であり、in vitro では微小環境を人工的に再現することは困難である。近年の研究で、in vivo での奇形腫形成

を通じて iPSC から生着可能な HSC を得ることができたとの報告もあるが[49]、将来に臨床的に使用するために HSC を安全かつ効率的に得る技術を確立するためにはさらなる研究が必要である。また本研究を通じて、iPSC を用いた造血器疾患の研究を効率的に推進するためには、効率の良い血球への分化誘導法や、iPSC への効率的な遺伝子導入法の開発、改良が必要と思われた。

今回の研究では、iPSC 樹立のためのリプログラミングにレトロウイルスベクターで 4 因子を導入しており、iPSC で外来遺伝子が発現していないことは確認しているものの、外来遺伝子がゲノムに組み込まれてしまっている。特にがん遺伝子でもある *c-MYC* を導入しており、リプログラミングによるサイレンシングが不完全な場合や再活性化を起こした場合などに、導入した遺伝子が問題となる懸念がある。センダイウイルスあるいはエピゾーマルベクターなどを用いてリプログラミングを行っていれば、外来遺伝子が残存しないので、遺伝子修復した iPSC 等を臨床応用する際にはより安全性を高くすることができると思われる。

FPD/AML には、血小板減少の他に白血病への移行という重大な合併症がある[50]。本研究では白血病への移行に関しての解析は行っていないが、*RUNX1* の変異のみでは白血病は発症しないことを考慮すると、FPD/AML で白血病移行のリスクが大きい原因としては、*RUNX1* の変異の他になんらかの付加的遺伝子異

常が蓄積することで白血病を発症するという発症機序が推測される。つまり、FPD/AML では *RUNXI* の変異により遺伝子異常が蓄積しやすい可能性がある [51]。この観点からもやはり *RUNXI* の遺伝子変異を修復することは、血小板数の正常化と同様に、白血病化するクローンの出現を防ぐという点でも重要であると考えられる。DNA 不安定性の増大により DNA 損傷が経時的に蓄積されることを考慮すると、FPD/AML ではなるべく早期に *RUNXI* の変異を修復することが望ましいかもしれない。FPD/AML からの AML あるいは MDS の発症機序の解明、さらには *RUNXI* の体細胞変異を有する AML あるいは MDS の発症機序の解明には、さらなる研究が必要と考えられるが、FPD-iPSC はそういった研究において大きな役割を果たことができると考える。

本研究と同様に、FPD/AML 患者から iPSC を作製したという報告が最近、相次いでなされた。Sakurai らは、*RUNXI* の異なる変異(G172E, G143W, N233fsX283)を有する FPA/AML の 3 家系の患者の末梢血 T 細胞をセンダイウイルスによる遺伝子導入でリプログラミングし、FPD-iPSC を作製した[52]。FPD-iPSC は HPC の分化効率の低下、巨核球の分化異常を示し、そのうち 2 家系からの iPSC について正常 *RUNXI* の過剰発現でそれらの異常は回復することを示した。一方で正常 iPSC に *RUNXI* 変異体を導入してもそれらの異常が再現されないことを示し、*RUNXI* のハプロ不全によって FPD/AML が発症すると主張した。Connelly らは、

*RUNXI* の Y260X 変異を有する 1 家系の FPD/AML 患者の皮膚線維芽細胞からプラスミドベクターでリプログラミングを行い、iPSC を作製した[53]。ZFN を用いた *RUNXI* 変異の遺伝子修復によって、巨核球の分化効率が增加することを示した。前者の報告と本研究とを比較すると、相違点として HPC の分化効率が低下するか否かという点などが挙げられる。この相違が生じた原因としては、*in vitro* の血球分化誘導の実験系の相違や、*RUNXI* の変異の違いによる機能の違いが関係していると考えられる。また正常 *RUNXI* の過剰発現を行っているが、本研究でも当初、正常 *RUNXI* の過剰発現を試みたが、FPD-iPSC への導入に成功しなかったこともあり、TALEN での遺伝子修復を行った。本手法のほうが *RUNXI* の発現が生理的に制御されるという点で理想に近いものとする。後者の報告では、Zinc finger nuclease を用いて、本研究と同様に FPD-iPSC の *RUNXI* の遺伝子修復を行っており、*RUNXI* の遺伝子修復の前後で CD41 陽性 CD42 陽性の巨核球の分化が増加することを示しているが、正常と比較して FPD-iPSC において巨核球の分化障害が認められるかという点については検証していない。

以上、本研究を要約すると、FPD/AML 患者の皮膚線維芽細胞から FPD-iPSC を作製した。FPD-iPSC では巨核球コロニー産生能の低下、巨核球の成熟異常を認め、FPD/AML の臨床的特徴を反映しているものと考えられた。TALEN を用いて *RUNXI* の遺伝子修復を行ったところ、FPD-iPSC が示した巨核球への分化

異常の回復を示し、*RUNX1* の変異が巨核球の異常の原因であることが示された。

遺伝子修復した iPSC は、FPD/AML に対する新たな治療法につながる可能性が  
考えられた。



## 引用文献

1. Gowney JD, Shigematsu H, Li Z, et al. Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood*.106:494–504. (2005)
2. Harada H, Harada Y, Niimi H, Kyo T, Kimura A, Inaba T. High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood*. 103:2316–2324. (2004)
3. Kohlmann A, Grossmann V, Klein HU, et al. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *J Clin Oncol*. 28:3858–3865. (2010)
4. Tang JL, Hou HA, Chen CY, et al. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood* 114:5352–5361. (2009)
5. Song W, Sullivan MG, Legare RD, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukemia. *Nat Genet*. 23:166-175. (1999)

6. Downton SB, Beardsley D, Jamison D, Blattner S, Li FP. Studies of a familial platelet disorder. *Blood*. 65:557-563. (1985)
7. Gerrard JM, Israels ED, Bishop AJ, et al. Inherited platelet-storage pool deficiency associated with a high incidence of acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 79:246-255. (1991)
8. Arepally G, Rebbeck TR, Song W, Gilliland G, Maris JM, Poncz M. Evidence for genetic homogeneity in a familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia (FPD/AML). *Blood*. 92:2600-2602. (1998)
9. Buijs A, Poddighe P, van Wijk R, et al. A novel CBFA2 single-nucleotide mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. *Blood*. 98:2856-2858. (2001)
10. Heller PG, Glembotsky AC, Gandhi MJ, et al. Low Mpl receptor expression in a pedigree with familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia and a novel AML1 mutation. *Blood*. 105:4664-4670. (2005)
11. Sun L, Mao G, Rao AK. Association of CBFA2 mutation with decreased platelet PKC-theta and impaired receptor-mediated activation of GPIIb-IIIa and pleckstrin phosphorylation: proteins regulated by CBFA2 play a role in GPIIb-IIIa activation. *Blood*. 103:948-954. (2004)

12. Owen CJ, Toze CL, Koochin A, et al. Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. *Blood*. 112:4639-4645. (2008)
13. Kirito K, Sakoe K, Shinoda D, Takiyama Y, Kaushansky K, Komatsu N. A novel RUNX1 mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. *Haematologica*. 93:155-156. (2008)
14. Michaud J, Wu F, Osato M, et al. In vitro analysis of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood*. 99:1364-1372. (2002)
15. Sun W, Downing JR. Haploinsufficiency of AML1 results in a decrease in the number of LTR-HSCs while simultaneously inducing an increase in more mature progenitors. *Blood*. 104:3565-72. (2004)
16. Ichikawa M, Asai T, Saito T, et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med*. 10:299-304. (2004)
17. Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic

- differentiation. *Blood*. 101:4333-4341. (2003)
18. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131:861-872. (2007)
  19. Ye L, Chang JC, Lin C, Sun X, Yu J, Kan YW. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106:9826–9830. (2009)
  20. Wang Y, Jiang Y, Liu S, Sun X, Gao S. Generation of induced pluripotent stem cells from human beta-thalassemia fibroblast cells. *Cell Res*. 19:1120–1123. (2009)
  21. Wang Y, Zheng CG, Jiang Y, et al. Genetic correction of beta-thalassemia patient-specific iPS cells and its use in improving hemoglobin production in irradiated SCID mice. *Cell Res*. 22:637–648. (2012)
  22. Sebastiano V, Maeder ML, Angstman JF, et al. In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells*. 29:1717–1726. (2011)
  23. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 318:1920-1923.

(2007)

24. Ma N, Liao B, Zhang H, et al. Transcription Activator-like Effector Nuclease (TALEN)-mediated Gene Correction in Integration-free  $\beta$ -Thalassemia Induced Pluripotent Stem Cells. *J Biol Chem.* 288:34671-34679. (2013)
25. Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature.* 460:53–59. (2009)
26. Miller JC1, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol.* 29:143-8. (2011)
27. Hockemeyer D1, Wang H, Kiani S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol.* 29(8):731-4. (2011)
28. Kumano K, Arai S, Hosoi M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood.* 119:6234-6242. (2012)
29. Takayama N, Nishikii H, Usui J, et al. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood.* 111:5298-306. (2008)

30. Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, et al. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med.* 207:2817-2830. (2010)
31. Ono Y, Wang Y, Suzuki H, et al. Induction of functional platelets from mouse and human fibroblasts by p45NF-E2/Maf. *Blood.* 120:3812-3821. (2012)
32. Sander JD, Cade L, Khayter C, et al. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol.* 29:697-698. (2011)
33. Nishimoto N, Imai Y, Ueda K, et al. T cell acute lymphoblastic leukemia arising from familial platelet disorder. *Int J Hematol.* 92:194-197. (2010)
34. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med.* 360:447-458. (2009)
35. Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 363:355-364. (2010)
36. Boztug K, Schmidt M, Schwarzler A, et al. Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med.* 363:1918-1927. (2010)
37. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med.* 12:401-409. (2006)

38. Candotti F, Shaw KL, Muul L, et al. Gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency: clinical comparison of retroviral vectors and treatment plans. *Blood*. 120:3635-3646. (2012)
39. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med*. 365: 2357-2365. (2011)
40. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 302:415-419. (2003)
41. McCormack MP, Rabbitts TH. Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 350:913-922. (2004)
42. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 118:3132-3142. (2008)
43. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest*. 118:3143-3150. (2008)

44. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med.* 16:198–204. (2010)
45. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science.* 341:1233-1235. (2013)
46. Narayan AD, Chase JL, Lewis RL, et al. Human embryonic stem cell-derived hematopoietic cells are capable of engrafting primary as well as secondary fetal sheep recipients. *Blood.* 107:2180-2183. (2006)
47. Lu M, Kardel MD, O'Connor MD, Eaves CJ. Enhanced generation of hematopoietic cells from human hepatocarcinoma cell-stimulated human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Exp Hematol.* 37:924-936. (2009)
48. Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, et al. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell.* 3:85-98. (2008)
49. Amabile G, Welner RS, Nombela-Arrieta C, et al. In vivo generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells. *Blood.* 121:1255-1264. (2013)
50. Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V et al. High frequency of RUNX1



biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood*. 113:5583–5587. (2009)

51. Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H et al. C-terminal mutation of RUNX1 attenuates the DNA-damage repair response in hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 26:303-311. (2012)
52. Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, et al. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. *Leukemia*. (epub ahead of print; doi:10.1038/leu.2014.136). (2014)
53. Connelly JP, Kwon EM, Gao Y, et al. Targeted correction of RUNX1 mutation in FPD patient-specific induced pluripotent stem cells rescues megakaryopoietic defects. *Blood*. 124:1926-1930. (2014)

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導賜りました東京大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科 教授 黒川峰夫先生に謹んで感謝の意を表します。また実験計画から実験手法に至るまで、ご指導、ご助言を下さった同講師 荒井俊也先生に心から感謝申し上げます。本研究を行うにあたってご協力いただきました、同講師(現 関西医科大学病理学第一講座准教授) 熊野恵城先生、同助教(現 Ontario Cancer Institute, Princess Margaret Cancer Centre) 籠谷勇紀先生、同助教 田岡和城先生、同助教(現 さいたま市立病院内科) 細井雅孝先生、同助教(現 京都大学大学院医学系研究科腫瘍生物学) 片岡圭亮先生に感謝いたします。

検体を提供してくださった FPD/AML 患者さんに感謝いたします。

TALEN の設計に関してご指導、ご協力いただいた広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学 教授 山本卓先生、同特任助教 佐久間哲史先生に感謝いたします。iPSC への TALEN の導入に関して貴重なご助言、ご指導をいただいた京都大学 iPS 細胞研究所初期化機構研究部門 助教 堀田秋津先生に感謝いたします。

実験の補佐をしてくださいました東京大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科 技術補佐員の鳴村与志さま、外間洋子さま、井澤友華里さま、山本真理子さまに感謝いたします。

MGDF を提供して下さった協和発酵キリン株式会社に感謝いたします。

本研究をまとめるに当たり、貴重なご助言をいただきました、東京大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科 講師(現 湘南東部総合病院血液・腫瘍内科) 市川幹先生、同特任助教 吉見昭秀先生、同助教 遠矢嵩先生をはじめとする皆様に感謝いたします。

## 利益相反(COI)開示

本研究に関連して、開示すべき利益相反(COI)関係にある企業などはありません。