

論文の内容の要旨

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

RUNX1 は造血を制御する転写因子で、急性骨髄性白血病(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、*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-EVI1* ($t(3;21)(q26; q22)$)、*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(MDS)といった造血器腫瘍が多数報告されている。*RUNX1* は正常造血に必須であることから、その機能異常が造血器腫瘍発症に深く関わっていると考えられている。*RUNX1* 遺伝子のヘテロ変異で発症する稀な遺伝性疾患として、家族性血小板異常症(FPD/AML)がある。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、AML や MDS などの造血器腫瘍を高率に発症する。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。*RUNX1* は巨核球の分化でも重要であり、*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(iPSC)は再生医療の細胞源として、また疾患の病態解明のための研究や、創薬研究においても魅力的なプラットフォームとして期待されている。患者検体から疾患に特異的な遺伝子異常を有する iPSC が樹立できれば、ほぼ無限に細胞を増殖させることができ、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、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。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、病態の解明、さらには新たな細胞治療につながる可能性がある。FPD/AML で *RUNX1* 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。

本研究では、FPD/AML 患者の皮膚線維芽細胞から iPSC を作製し(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の有無について解析を行い、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かどうか評価した。さらに FPD-iPSC の *RUNX1* 変異の遺伝子修復を行い、FPD-iPSC でみられた特徴が消失するかどうか評価し、遺伝子修復した FPD-iPSC が FPD/AML の新たな細胞治療につながる可能性があるかどうか検討することを目的とした。

まず *RUNX1* の R174X の変異を有する FPD/AML 患者から皮膚生検を行い、線維芽細胞を増殖させた。*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* の 4 因子をレトロウイルスで導入してリブ

ログラミングし、FPD-iPSC を作成した。FPD-iPSC は、形態的には胚性幹細胞に類似し、幹細胞遺伝子を発現していた。免疫蛍光染色で SSEA-4 と TRA-1-60 の発現も確認できた。NOD/scid マウスでの奇形腫形成についても確認した。さらに、*RUNX1* 遺伝子に患者検体と同一の R174X の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、真に FPD/AML 患者由来で、未分化性と多分化能を有する iPSC であることを確認した。

FPD-iPSC をまず造血前駆細胞(HPC)へ分化誘導を行った。VEGF 存在下でマウス間質細胞の C3H10T1/2 細胞と共培養し、CD34 陽性 CD43 陽性の HPC をセルソーターで分離した。FPD-iPSC 由来の HPC では、正常 iPSC 由来の HPC と比較して、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が、巨核球系のコロニーについては、CD41 陽性の巨核球コロニー(CFU-Mk)数は FPD-iPSC 由来の HPC で有意に少なく、巨核球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 MGDF, SCF およびへパリン添加の分化培地で C3H10T1/2 細胞と共培養し巨核球に分化させた。細胞表面マーカーの解析にて、FPD-iPSC で CD41a 陽性率の有意な減少を認めた。また FPD-iPSC では CD41a 陽性の巨核球において、成熟巨核球のマーカーである CD42b の発現の低下を認め、FPD/AML における血小板機能異常を反映しているものと考えられた。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、FPD/AML における血小板減少、血小板機能異常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。

次に *RUNX1* の変異を特異的に修復するために、*RUNX1* の変異部位を標的にする人工ヌクレアーゼ TALEN (transcription activator-like effector nuclease)と、正常 *RUNX1* 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作製した。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 *RUNX1* の変異部位がドナー配列由来の正常 *RUNX1* のコーディング配列に置き換えられ、さらに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作製した。作製した TALEN の DNA 切断活性を確認した後、TALEN による遺伝子修復を確認するために、HEK293T 細胞に TALEN とドナーのプラスミドを導入し、ピューロマイシン耐性を獲得した細胞の 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。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。この方法を用いて FPD-iPSC で *RUNX1* の遺伝子修復を試みた。単細胞に解離させた FPD-iPSC に 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、ピューロマイシン耐性のコロニーを単離し、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、さらに正常 *RUNX1* のみが発現していることを cDNA のシーケンシングで確認した。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。巨核球系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。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 陽性の巨核球の有意な増加が認められ、CD41a 陽性の巨核球における CD42b の発現にも回復が認められた。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、巨核球分化の異常を改善することができ、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。さらには FPD/AML に対する新しい根本的な治療法につながる可能性が考えられた。また 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りうると考えられた。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 は有用である可能性がある。

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。巨核球分化におけるその特徴を解析したところ、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 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、*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。