

博士論文

論文題目 **iPS** 細胞化技術を用いた慢性骨髄性白血病幹
細胞分画におけるイマチニブ耐性機構の解明

氏名 宮内 将

iPS 細胞化技術を用いた慢性骨髄性白血病幹細胞分画に おけるイマチニブ耐性機構の解明

所属 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 血液・腫瘍病態学

指導教官 黒川峰夫教授

申請者 宮内 将

目次

【目次】	1
【要旨】	2
【序文】	3
【研究方法】	8
【結果】	23
【考察】	54
【結論】	59
【謝辞】	60
【参考文献】	61

【要旨】

腫瘍細胞由来の induced pluripotent stem cells (iPSCs)は新規の疾患モデルとしての活用が期待されている。本研究では、2 例の慢性骨髄性白血病(chronic myelogenous leukemia: CML)の患者検体より iPSCs を樹立し、血液細胞に分化誘導して解析を行った。CD34 陽性、CD43 陽性、CD45 陰性の未分化分画では、イマチニブに対して抵抗性を示すことを見出した。また、網羅的遺伝子発現解析により、この未分化な分画がイマチニブに曝露された際に複数の遺伝子群の発現が変化することを見出した。この遺伝子群にイマチニブ抵抗性の原因となる遺伝子が含まれる可能性がある。

【序文】

慢性骨髄性白血病(chronic myelogenous leukemia: CML)は、*BCR-ABL* 融合遺伝子が形成されることで造血幹細胞が癌化し引き起こされる骨髄増殖性腫瘍である[1-3]。CML は初期状態である数年間の慢性期[4-8]を経過した後に移行期[9, 10]へと移り、癌化した細胞の増殖が極めて活発な急性転化期[11-16]に至る[17-23]。CML の原因遺伝子として知られる *BCR-ABL* 融合遺伝子は、9 番染色体と 22 番染色体の転座によって形成されたフィラデルフィア染色体の転座部位に存在する。造血幹細胞に由来する未分化で幼若な細胞から終末分化し成熟した血液細胞まで、*BCR-ABL* 融合遺伝子の影響により異常な増殖を認める。その結果各分化段階の血液細胞が異常に増殖した CML の病態が形成されることとなる。

CML の治療は分子標的治療の発展により劇的に変化し、大幅な予後の改善を認めた[24][25]。*BCR-ABL* 融合蛋白質を標的としたチロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase inhibitor : TKI)が開発され、約 90%の患者において長期予後の改善を認めている。しかし一方で、TKI の投与を中断すると分子生物学的手法を用いても存在を検出することができない状態まで腫瘍細胞が減少した分子生物学的寛解を達成している患者においても一般的には再発を認める。このことから、

TKI に耐性を有する CML 幹細胞の存在が示唆されている[26]。CML 幹細胞を根絶することが CML の根治につながると考えられ、CML 幹細胞の病態解析が盛んに行われてきた。

これまで CML の病態研究において、マウスモデル、ヒト細胞株、患者検体等がプラットフォームとして使用され、様々な知見が積み重ねられてきた。CML マウスモデルの白血病幹細胞と、そのカウンターパートである正常マウスの造血幹細胞の遺伝子発現プロファイルを比較して解析することで、CML 幹細胞の生存・維持に寄与する分子が同定されている。胎性造血幹細胞の発達に寄与する β -catenin[27][28][29]、apoptosis に関連する *BCL6* 遺伝子[30]、脂質代謝酵素である *Alox5*[31]、*BLK* がん抑制遺伝子[32]等が例に挙げられる。これらの知見をもとに新規治療戦略が考案されているが、臨床応用に結び付いてはいない。現在の CML 慢性期の標準治療である TKI の治療は、寛解状態の維持と長期予後に大きく寄与するものの、上述の通り再発を認めることから根治治療として確立はしていない。現在、造血幹細胞移植を除いて、CML の根治治療は確立されていない。

病態解析のプラットフォームとして用いられる各モデルにはそれぞれに特徴がある。既存の疾患モデルを用いた得られた知見が未だ臨床応用に到達してい

ない理由として、1: マウスモデルはヒト CML を十分に再現できていない可能性がある、2: ヒト細胞株は一般的に付加的な遺伝子異常の蓄積が起こっており、また急性転化期に至った CML 患者の細胞から樹立されている、3: 患者検体は解析の為に十分な検体量を確保することが困難であり、大量の検体を必要とする薬剤スクリーニングや網羅的解析などの研究が困難な場合がある、などが考えられる。

近年のリプログラミング技術の確立と発展に伴い、induced pluripotent stem cells(iPSCs)は、様々な種類の細胞から樹立可能となった[33–37]。iPSCs は再生医療の実現において重要なソースと考えられている一方、新規疾患モデルとして神経疾患領域、循環器疾患領域、血液疾患領域等を含めた様々な領域で応用されている[38–42]。稀少な先天性疾患由来の iPSCs は疾患モデルとして利用され、新しい知見を明らかにしている。また、悪性腫瘍細胞由来の iPSCs は、細胞株やマウスモデルといった既存のプラットフォームと異なる、新規疾患モデルとなりうる可能性を秘めている。

実際、CML を含む様々な造血器腫瘍から腫瘍細胞由来の iPSCs が樹立されている[43–46]。CML 腫瘍細胞由来 iPSCs(CML-iPSCs)は TKI に対する感受性が消失しているが、CML-iPSCs を再度血液に分化誘導することで TKI の感受性が回

復し原疾患の病態を再現すること、CML-iPSCs から分化誘導した血液細胞には TKI 耐性を示す未分化な分画が存在すること、CML-iPSCs のクローン毎に TKI に対する感受性は異なること等が報告されている[47,48]。 これまでに CML-iPSCs の樹立と CML-iPSCs を用いた解析は複数報告されている。これらの報告における、CML-iPSCs および CML-iPSCs 由来血液細胞の形質を表 1 にまとめる[45-48]。

著者	Jan E. Carette et al. Blood 2010	Kejin Hu et al. Blood 2011	Keiki Kumano et al. Blood 2012	Aur�lie Bedel et al. PLoS One 2013
由来細胞	KBM7 CML由来細胞株	CML患者検体 (1患者由来)	CML患者検体 (1患者由来)	CML患者検体 (2患者由来)
CML-iPSCs	イマチニブ 感受性消失		イマチニブ 感受性消失	イマチニブ 感受性消失
CML-iPSCs由来 血液細胞		骨髓系3系統 のコロニー形 成が可能	イマチニブ 感受性回復 イマチニブ耐性 分画あり	イマチニブ 感受性回復 感受性回復は部 分的

表 1. CML-iPSCs の樹立および解析の報告

これまでに報告された、CML-iPSCs の樹立、CML-iPSCs および CML-iPSCs 由来血液細胞の解析結果を簡略して示す。CML-iPSCs 由来血液細胞に分化誘導することで原疾患の病態が再現されることが報告されている。

また、これまでに報告された CML-iPSCs の多くは iPSCs に外来遺伝子の挿入が起きる retrovirus vector を用いて樹立されている。CML-iPSCs の解析においては、外来遺伝子挿入のバイアスが生じない方法を用いて樹立した CML-iPSCs の

方がより原疾患を反映した解析が行える可能性がある。

ヒト由来であり、解析に必要な検体を理論的には十分量得ることがことできる CML-iPSCs は CML 幹細胞の病態を解析するプラットフォームとして極めて有効であると考えられた。そこで今回私は CML-iPSCs を CML 幹細胞の病態解析のプラットフォームとして利用し、CML 患者の標準的な治療に用いられる TKI であるイマチニブに対する CML 幹細胞の耐性機構を明らかにすることを目的とし本研究を開始した。

【研究方法】

細胞

ヒト細胞を用いたすべての研究は東京大学大学院医学系研究科・医学部の倫理委員会（承認番号 2771）および、ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会（承認番号 2314）の審査と承認を得た上で行った。対象となる慢性骨髄性白血病患者より書面にてインフォームドコンセントを得た上で、対象患者の骨髄液を採取した。

マウス C3H10T1/2 細胞株は独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター(茨城)より購入した。

マウス胎児線維芽細胞(mouse embryonic fibroblast: MEF)は、妊娠 12 日目の ICR マウスを日本クレア株式会社(東京)より購入し、マウスを安楽死処理した後胎仔より作製した。取り出した胎仔の頭部を除去し、体部を剪断した後、トリプシン(Trypsin-EDTA solution 1x; SIGMA life science, 米国)を加え 30 分室温でインキュベートする。70 μ m セルストレーナーを用いて濾過した後、回収した MEF を MEF 用培地: 20%ウシ胎仔血清(HyClone FETAL BOVINE SERUM; Thermo SCIENTIFIC, 神奈川)、100 unit/ml ペニシリン(Penicillin; Sigma-Aldrich)、100 ng/ml ストレプトマイシン(Streptomycin; Sigma-Aldrich)を加えた DMEM low

glucose(ナカライテスク, 京都)にて 37°C、5 % CO₂ 環境下で 48 時間培養し(以下特に記載の無い限り培養条件は 37°C、5 % CO₂ 環境下とする)、細胞凍結保存液(セルバンカー; 和光純薬, 大阪)を用いて凍結保存した試料を用いた。

骨髄単核球の分離、濃縮、培養

患者骨髄液から Lymphoprep(Axix-Shield PoC AS)を用いた比重遠心法にて骨髄単核球を分離した。分離した患者骨髄単核球は AUTO MACS(Miltenyi Biotec, ドイツ)、または FACS Aria II (Becton, Dickinson, 東京)を使用して CD34 陽性分画を濃縮した。AUTO MACS を使用する際、製造者推奨のプロトコールに従い phycoerythrin(PE)結合抗ヒト CD34 抗体(BECKMAN COULTER, 東京)と Anti-PE micro beads(Miltenyi Biotec)を用いて磁気細胞分離法にて細胞を濃縮した。FACS Aria II を使用する際、PE 結合抗ヒト CD34 抗体、及び fluorescein isothiocyanate(FITC)結合抗ヒト CD38 抗体(Beckman Coulter)を使用して CD34 陽性細胞分画を濃縮した。

得られた CD34 陽性細胞は 48 時間、37°C、低酸素環境下(5% O₂)で血球刺激用培地: 20% ウシ胎仔血清(FCS; 和光純薬)、100 unit/ml ペニシリン(Penicillin; Sigma-Aldrich)、100 µg/ml ストレプトマイシン(Streptomycin; Sigma-Aldrich)、100

ng/ml リコンビナントヒト stem cell factor(rhSCF; 和光純薬)、10 ng/ml リコンビナントヒト megakaryocyte growth and development factor(rhMGDF; 協和発酵キリン, 東京)、100 ng/ml リコンビナントヒト Flt3-ligand(rhFlt3L; 和光純薬)、100 ng/ml リコンビナントヒト IL-6(rhIL-6; 和光純薬)、10 ng/ml リコンビナントヒト IL-3(rhIL-3; 和光純薬)を添加した MEM α (和光純薬)を用いて前培養を行った。

Episomal vector を用いた遺伝子導入

遺伝子導入については導入細胞のゲノムに外来遺伝子の挿入が起こらない既報の pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL、pCXWB-EBNA1、episomal vector を用いた[49,50]。各プラスミドを 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で準備し各々0.83 μl , 0.83 μl , 0.83 μl , 0.5 μl と electroporation 用の細胞懸濁液 100 μl (Nucleofector Kits for Human CD34+ Cells; Lonza, スイス)を混合し、前培養した CD34 陽性 1.0×10^5 細胞を懸濁する。Amaxa Nucleofector II (Lonza)のプログラム U-008 を用いて、製造者推奨のプロトコールに従い electroporation にて遺伝子を導入した。

疾患由来 iPSCs の樹立

前述の通り遺伝子導入をした CD34 陽性細胞を、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のマイトマイシン

C(Mitomycin C; 和光純薬)を添加した前述の MEF 用培地で 3 時間培養した MEF と、上記のサイトカイン含有の血球刺激用培地を用いて 37°C、低酸素環境下(5% O₂)で共培養した。2 日後、10 µM の ROCK 阻害剤 Y27632(和光純薬)を添加したヒト iPSCs 用培地: 5 ng/ml リコンビナントヒト線維芽細胞増殖因子(rhbFGF; 和光純薬)、20% Knockout Serum Replacement(KSR; Invitrogen, 米国)、0.1mM 非必須アミノ酸(MEM; ナカライテスク)、0.11mM 2-メルカプトエタノール、2 mM L-グルタミン、100 unit/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン(PSG; ナカライテスク)を添加した DMEM/F12 Ham(ナカライテスク)に培養液を置換し、以後 2 日毎に培養液を交換した。遺伝子導入から 20-30 日後に複数の iPSCs 様コロニーを観察し、他のコロニーと接触の認められない単一コロニーを複数個別々の 60 mm dish に取り上げ、前述の通りマイトマイシン C で処理した MEF と共培養し複数のクローンを得た。

iPSCs の培養・継代

iPSCs の正常コントロールとして、当研究室で上述と同様の方法で健常ヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞(Normal Human Cells Bone Marrow CD34+; Lonza, スイス Lot#: 080152A)から樹立した iPSCs を用いた。

iPSCs は前述のヒト iPSCs 用培地を用いて、前述の通りマイトマイシン C 処理を行った MEF と 60 mm dish 上で共培養した。未分化性を維持するため、24 時間ごとに培養液を交換し、3~4 日に 1 回の頻度で継代を行った。

継代の際には、iPSCs 用乖離液: 0.25%トリプシン(Invitrogen)、1 mM 塩化カルシウム(和光純薬), 20% KSR を添加した phosphate buffered saline(PBS)を加えて MEF を剥離した。PBS で wash した後、ピペットマンで物理的に iPSCs を剥離し、ピペッティングで細胞塊を数十細胞程度に砕いた後に 1/3 量を新しいマイトマイシン C 処理後の MEF 上に播種した。

iPSCs からの RNA 抽出、cDNA 作製

iPSCs からの RNA 抽出は NucleoSpin RNA(タカラバイオ, 滋賀)を用いて行った。前述の iPSCs 用乖離液を用いて iPSCs と共培養している MEF を剥離した。PBS で wash した後、ピペットマンで iPSCs を物理的に剥離し、ピペッティングにて iPSCs を単細胞にまで砕いた後、製造者推奨のプロトコールに従って iPSCs より RNA を抽出した。

cDNA 作製は、上記の方法で抽出した RNA を使用し PrimeScript RT Master Mix(タカラバイオ)を用いて製造者推奨のプロトコールに従って行った。

半定量的 RT-PCR

半定量 Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)は前述の方法にて作製した cDNA を用いて行った。PCR 反応条件は、変性 94℃ 30 秒、会合 57℃ 30 秒とした。

反応に使用したプライマーは既報のものを用いた[49]。以下にプライマーの配列を示す。プライマーのうち、(pla)の表記のあるものは pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL の vector 由来に発現する外来遺伝子に対して PCR 反応が起きるよう設計されている。これらを用いて外来遺伝子の挿入が起きてないことを確認した。また外来遺伝子の挿入の有無を確認する際には、コロニーを単離してから 10 継代以上培養を行った iPSCs を用いた。

プライマー名	方向	配列
OCT3/4 (CDS)	FW	CCC CAG GGC CCC ATT TTG GTA CC
	RV	ACC TCA GTT TGA ATG CAT GGG AGA GC
OCT3/4 (pla)	FW	CAT TCA AAC TGA GGT AAG GG
	RV	TAG CGT AAA AGG AGC AAC ATA G
KLF4 (CDS)	FW	ACC CAT CCT TCC TGC CCG ATC AGA
	RV	TTG GTA ATG GAG CGG CGG GAC TTG
KLF4 (pla)	FW	CCA CCT CGC CTT ACA CAT GAA GA
	RV	TAG CGT AAA AGG AGC AAC ATA G
SOX2 (CDS)	FW	TTC ACA TGT CCC AGC ACT ACC AGA
	RV	TCA CAT GTG TGA GAG GGG CAG TGT GC
SOX2 (pla)	FW	TTC ACA TGT CCC AGC ACT ACC AGA
	RV	TTT GTT TGA CAG GAG CGA CAA T

L-MYC (CDS)	FW	GCG AAC CCA AGA CCC AGG CCT GCT CC
	RV	CAG GGG GTC TGC TCG CAC CGT GAT G
L-MYC (pla)	FW	GGC TGA GAA GAG GAT GGC TAC
	RV	TTT GTT TGA CAG GAG CGA CAA T
LIN28(CDS)	FW	AGC CAT ATG GTA GCC TCA TGT CCG C
	RV	TCA ATT CTG TGC CTC CGG GAG CAG GGT AGG
LIN28 (pla)	FW	AGC CAT ATG GTA GCC TCA TGT CCG C
	RV	TAG CGT AAA AGG AGC AAC ATA G
EBNA-1	FW	ATC AGG GCC AAG ACA TAG AGA TG
	RV	GCC AAT GCA ACT TGG ACG TT
BCR_ABL	FW	AAC TCC AGA CTG TCC ACA GCA
	RV	AAC GAG CGG CTT CAC TCA
18S	FW	CAG CCA CCC GAG ATT GAG CA
	RV	TAG TAG CGA CGG GCG GTG TG
GAPDH	FW	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
	RV	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

Real time PCR

Real time PCR は前述の通り作製した cDNA を用いて行った。反応に用いたプライマーの配列を下記に示す。PCR 反応条件は変性 95°C 10 秒、会合 10 秒、伸長 72°C 20 秒、50 サイクルとした。THUNDERBIRD qPCR MIX (TOYOBO, 大阪) を使用し、LightCycler480 (Roche, スイス)を用いて製造者推奨のプロトコールに従って行った。

プライマー名	方向	配列
BCR_ABL	FW	AAC TCC AGA CTG TCC ACA GCA

	RV	AAC GAG CGG CTT CAC TCA
18S	FW	CAG CCA CCC GAG ATT GAG CA
	RV	TAG TAG CGA CGG GCG GTG TG

免疫蛍光染色

免疫染色は Alexa Flour 555 結合抗ヒト TRA-1-60 抗体(BD Bioscience, 東京)、および Alexa Flour 488 結合抗ヒト Stage specific embryonic antigen-4(SSEA-4)抗体 (BioLegend, 東京)を用いて行った。また、蛍光顕微鏡での観察は FLUOVIEW FV10i(OLYMPUS, 東京)を用いて行った。

3.7% ホルムアルデヒド(和光純薬)を用いて 20 分間室温で fixation を行った。PBS で wash した後に 0.2% Triton を添加した PBS を加えて 10 分間室温で Permeabilization を行った。再度 PBS で wash した後、2% Bovine serum albumin(BSA; 和光純薬)を添加した PBS を加えて 40 分室温で Blocking を行った。1% BSA 添加 PBS を用いて 1:100 に希釈した抗ヒト TRA-1-60 抗体、抗ヒト SSEA-4 抗体を Blocking 後の iPSCs に加え、遮光し 4℃の条件で 16 時間抗体反応を行った。抗体反応終了後、1% BSA 添加 PBS で wash した後、0.4 µg/ml の核染色剤 DAPI(コスモ・バイオ, 東京) を加えた 1% BSA 添加 PBS を用いて 1 時間室温で核染色を行った後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

奇形種作製

奇形腫作製に用いた NOD.Cg-Prkdc^{scid} >Il2rg^{tm1Wjl} >/SzJ (NSG)免疫不全マウスは日本チャールス・リバー株式会社(神奈川)より購入した。6～8 週齢雄マウスを使用し、すべての動物実験は東京大学大学院医学系研究科・医学部 部局動物実験委員会の審査と承認を得て、施設ガイドラインを遵守して行った。

作製した奇形腫の観察には BZ-X710 蛍光顕微鏡(KEYENCE, 大阪)を用いた。

奇形腫作製には継代 3～4 日後の iPSCs を用いた。iPSCs の継代の際と同様の方法で MEF 剥離後に、ピペットマンを用いて iPSCs を物理的に剥離して PBS で洗浄をした。洗浄後 10 μ M の ROCK 阻害剤 Y2763 を添加したヒト iPSCs 用培地 100 μ l に 1～2 x 10⁶ iPSCs を懸濁し、麻酔下にて開腹した NSG マウスの精巣被膜下に片側 30 μ l の細胞懸濁液を注入した。iPSCs の注入は、細胞懸濁液を作製後 1 時間以内に行った。12 週後、iPSCs を移植した NSG マウスを安楽死処理し、精巣被膜下に形成された腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍を 4 %ホルムアルデヒドを用いて固定し、パラフィン包埋、薄切りの後にヘマトキシリン・エオジン染色を行い、顕微鏡下に観察を行った。

染色体解析

iPSCs の染色体解析は日本遺伝子研究所(宮城)、および株式会社ビー・エム・エル(東京)に委託した。

日本遺伝子研究所への提出は以下の手順で行った。50 ml 張り付き細胞培養用ボトル内で前述の iPSCs 用培地を用いて MEF と共同培養した。継代 3-4 日後にボトル中に iPSCs 用培地を充満させ、空気の入らないようボトルを密閉した後、常温で検体を提出した。

株式会社ビー・エム・エル(東京)への提出は後述の iPSCs の血液分化誘導の方法に従って分化誘導した後、CD34 陽性 CD43 陽性細胞をソーティングによって濃縮し 200,000 cell を前述の血球刺激用培地 2 ml に懸濁した。細胞懸濁液を空気の入らないようチューブに充填して密閉した後、常温で検体を提出した。

iPSCs の血液分化誘導

iPSCs の血液分化誘導は、C3H10T1/2 と iPSCs の共培養にて行った[51]。

C3H10T1/2 細胞の培養は 10T1/2 用培地: 10% FCS(Biological industries, イスラエル)、2 mM L-グルタミン、100 unit/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン(PSG; ナカライテスク)を添加した BME(Invitrogen)を用い、3-4 日毎に 1/8～

1/10 量を継代した。

MEF と同様の方法で、マイトマイシン C 処理を行い増殖が停止した C3H10T1/2 細胞と iPSCs を 100 mm dish 上で共培養し、血液分化用培地: 15% FBS(Invitrogen)、20 ng/ml リコンビナントヒト vascular endothelial growth factor (rhVEGF; R&D systems, 米国)、10 µg/ml ヒトインスリン、5.5 µg/ml ヒトトランスフェリン、5 ng/ml 亜セレン酸ナトリウム(ITS-X; Sigma-Aldrich)、2 mM L-グルタミン、100 unit/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン(PSG; ナカライテスク)、0.45mM モノチオグリセロール(Monothioglycerol; Sigma-Aldrich)、50 µg/ml アスコルビン酸(Ascorbic acid; Sigma-Aldrich)を添加した Iscove's modified Dulbecco medium(IMDM; Sigma Aldrich)を用いて培養した。培地は培養開始 4, 7, 10, 12, 14, 16 日目に 10 ml 全量を交換した。培養 17 日目、形成された sac 様構造物(iPS-sac)をピペットマンで物理的に破壊し、40 µm のセルストレーナーを通過させた後に血液細胞を回収し解析を行った。

フローサイトメトリー(FACS)解析

解析および細胞のソーティングは、FACSAria II、または FACSAriaIII(BD)を用いて行った。FACS データの解析は FlowJo(Star Tree, Ashland, OR, 米国)を使

用した。

半定量 RT-PCR に使用した Lymphocyte は急性骨髄性白血病患者寛解期の骨髄液より CD3 陽性細胞をソーティングによって濃縮し使用した。

ソーティングによって iPSCs から分化誘導した血液細胞を分化した CD34 陰性・CD43 陽性・CD45 陽性 Differentiated cells(DCs)、と未分化な CD34 陽性・CD43 陽性・CD45 陰性 pre-hematopoietic progenitor cells (pre-HPCs)に分けて濃縮し解析を行った。

染色に使用した抗ヒト抗体をリストとして下記に示す。

エピトープ	抱合色素	使用濃度	供給元
CD3	PE	1:20	BECKMAN COULTER
CD34	PE-Cy7	1:20	BioLegend
	PE	1:20	BECKMAN COULTER
CD43	PE	1:20	BECKMAN COULTER
CD45	FITC	1:20	BD PharMingen

血球コロニー形成能評価

コロニー形成能評価はサイトカイン含有メチルセルロース半固形培地である MethoCult H4434 classic(Stemcell Technologies; カナダ)を用いて行った。1.0 x 10⁴ の前造血前駆細胞を 2 ml の半固形培地に懸濁し 14 日間培養した。14 日後、形

成されたコロニーを製造者推奨のプロトコールに従い計測した。各実験はそれぞれ duplicate して行い、計測した値の平均値を結果として採用した。

細胞増殖能、イマチニブ感受性評価

イマチニブ感受性評価し使用したイマチニブは LC laboratory より購入した。

イマチニブの溶媒として Dimethyl sulfoxide(DMSO; Sigma-Aldrich)を用いた。

iPSCs より分化誘導した血液細胞をソーティングによって分画ごとに濃縮した後、前述の血球刺激用培地に懸濁し 5×10^3 細胞ごとに 96 well マルチプレートに播種し培養した。96 時間後、細胞数を計測し細胞増殖能、およびイマチニブ感受性を評価した。

annexinV apoptosis 解析

annexinV apoptosis 解析には Allophycocyanin(APC)抱合抗 annexin V 抗体を使用した。核染色には 10 μ g/ml の DAPI を用いた。

Apoptosis 解析に使用した mitogen-activated protein kinase (ERK5) inhibitor、XMD8-92 は R&D systems より購入した。溶媒として DMSO を用いた。

Apoptosis 解析には、血液分化誘導開始後 17 日目の iPS-sac をピペットマンで

物理的に破壊し、40 μm のセルストレーナーを通したのち、5 μM のイマチニブおよび XMD8-92 を加えた血球分化用培地を用いて 24 時間 C3H10T1/2 細胞と共に培養した血液細胞を用いた。

化合物に曝露後に iPSCs 由来血液細胞を Annexin V binding buffer(Annexin V kit; BECKMAN COULTER)を用いて、製造者推奨のプロトコールに従い抗体反応および核染色を施した後、FACS 解析を行った。

網羅的遺伝子発現解析

網羅的遺伝子発現解析のサンプルは、iPSCs 由来血液細胞をソーティングによって分化した CD34 陰性・CD43 陽性・CD45 陽性 DCs と未分化な CD34 陽性・CD43 陽性・CD45 陰性 pre-HPCs に分けて濃縮し、DMSO のみもしくは 2.5 μM イマチニブを添加した血球刺激用培地に懸濁した後、6 時間培養して回収した。

RNAからのcDNA作製およびプローブを用いてのシグナル値検出、クラスター解析はタカラバイオ株式会社に委託した。網羅的遺伝子発現解析は、約15,000のnon-coding RNAを含む50,599の遺伝子およびnon-coding RNAをtargetとした SurePrint G3 Human GE 8x60K v2 Microarray(Agilent, 英国)を用いてマイクロアレイを行った。RNAからcDNAの作製に関しては、微量RNA増幅試薬OVATION

SYSTEM(NuGEN, 米国)を用いて行った。ターゲットの増幅にはOvation Pico WTA System V2(NuGEN)、ラベリングにはSureTag Complete DNA Labeling Kit(Agilent)、ハイブリダイゼーションおよび洗浄にはGene Expression Hybridization Kit(Agilent)、Gene Expression Wash Buffers Pack(Agilent)をそれぞれ用いた。またシグナル値の算出には専用解析ソフト Agilent Feature Extraction(Agilent)を用いた。クラスター解析は、サンプル間で変動の大きい上位1,000遺伝子を抽出して行った。

検出されたシグナル値の生データの標準化にはCLC Genomics Workbench(フイルジュン, 愛知)を用いた。Gene Sets Enrichment Analysis(GSEA)にはjavaGSEA Desktop Application 64bitを用いた。

【結果】

慢性骨髄性白血病患者検体由来 iPSCs の樹立

はじめに、CML-CP 期の患者検体から iPSCs の樹立を試みた。慢性骨髄性白血病患者慢性期患者の骨髄液から単核球を分離し CD34 陽性細胞の濃縮を行った。複数のサイトカイン含有の培養液中で前培養を行った後、electroporation にて OCT3/4, KLF4, SOX2, L-MYC, EBNA1, LIN28, を導入および p53 を knock down することで CML-iPSCs の樹立を試みた(図 1)。iPSCs 樹立を試みた患者検体の情報および、検体採取後の治療経過を表 1 に示す。2 患者とも検体採取後に TKI を用いて治療が行われ、治療 3 ヶ月後の染色体検査の結果フィラデルフィア染色体を認める細胞が検出されない細胞遺伝学的寛解を達成しており、治療に良好な反応を得ている。

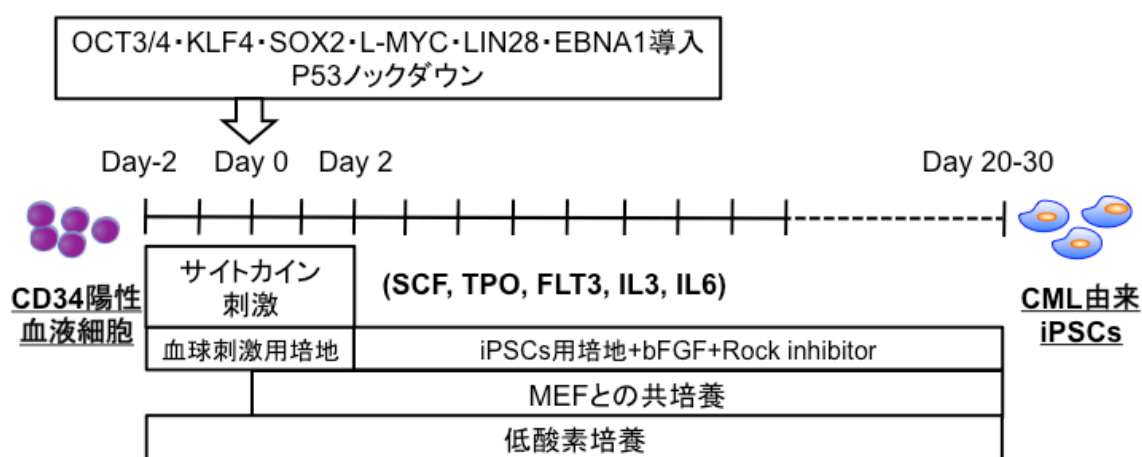


図 1.CML 患者検体からの iPSCs 樹立シエーマ

検体採取時情報

	性別	年齢	病期	染色体異常
患者1	男性	44歳	CML慢性期 未治療	46XY, t(9;22)(q34;q11.2)
患者2	男性	22歳	CML慢性期 未治療	46XY, t(9;22)(q34;q11.2)

検体採取後治療経過

	治療経過
患者1	Dasatinib 600mg/day 内服 3ヶ月後細胞遺伝学的寛解.
患者2	Nilotinib 100mg/day 内服 3ヶ月後細胞遺伝学的寛解.

表 1. iPSCs 樹立を試みた患者情報

iPSCs 樹立を試みた患者情報の一覧を示す。CML 慢性期末治療であり t(9;22)(q34;q11.2)以外の染色体異常を認めていない患者を選び iPSCs の樹立を行った。

遺伝子導入を行い低酸素環境下で MEF との培養を行ったところ、遺伝子導入 20-30 日後に複数の iPSCs 様コロニーを得たため、それぞれのコロニーを単離してクローン化を行った(図 2)。

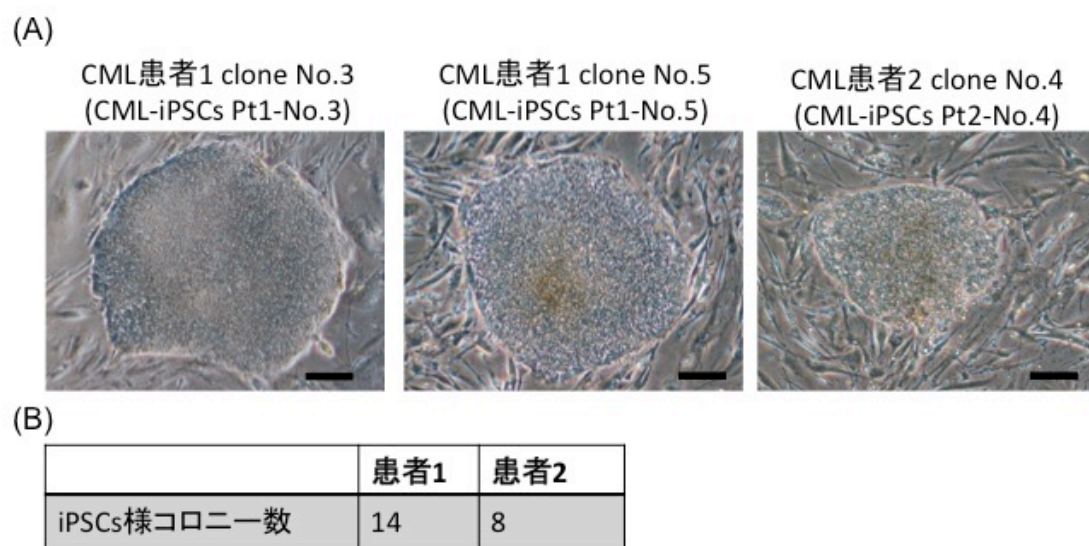


図 2.CML 患者検体由来 iPSCs 様コロニー

A) 遺伝子導入 20～30 日後に得られた iPSCs 様コロニーの形態像を示す。スケールバー: 100 μ m。B) 各患者から単離した iPSCs 様コロニーの数を示す。

次に、CML 患者検体から得られた iPSCs 細胞様コロニーが iPSCs の形質を有しているか検討を行った。免疫染色を用いて幹細胞マーカーとして知られている SSEA-4、及び TRA-1-60 の発現を確認した。その結果、得られた iPSCs 細胞様コロニーに SSEA-4 及び TRA-1-60 の発現していることが確認された(図 3)。

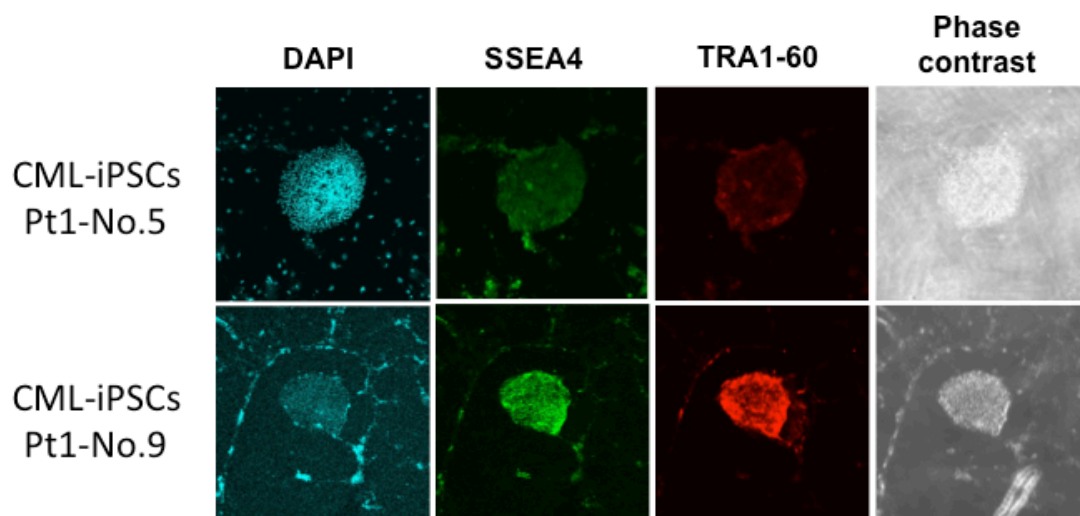


図 3. CML 患者検体由来 iPSCs 様コロニーの免疫染色

核染色剤 DAPI、SSEA-4、TRA-1-60 の蛍光顕微鏡像、および位相差像を示す。元倍率 40 倍。iPSCs 様コロニーが SSEA-4、及び TRA-1-60 を発現していることが確認された。

同時に、半定量 RT-PCR を用いて ESCs および iPSCs で発現することが知られている幹細胞遺伝子 OCT3/4、KLF4、SOX2、LIN28 の発現を確認した。患者 1 について 14 コロニー中凍結保存せず培養を維持していた No.1-8 のクローンのうち、維持培養が困難であった No.2 を除くクローンの遺伝子発現を確認したところ、CML 患者由来 iPSCs 様コロニーはそれぞれの幹細胞遺伝子を発現していた。特に CML 患者検体では OCT3/4、および SOX2 は発現が認められない一方で、iPSCs 様コロニーからは発現が確認された(図 4)。

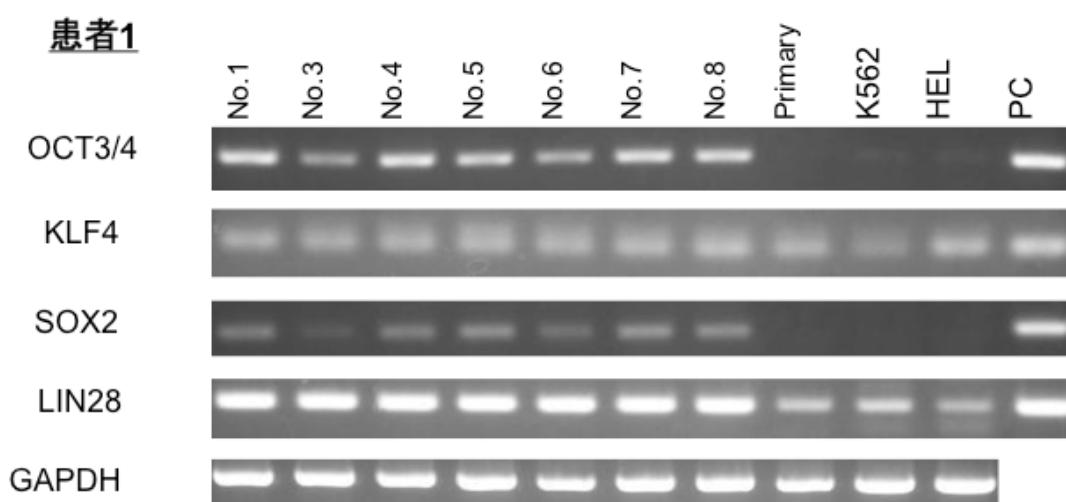


図 4.CML 患者検体由来 iPSCs 様コロニーの幹細胞遺伝子発現

幹細胞遺伝子として知られる OCT3/4、KLF4、SOX2、LIN28 の発現を確認した。患者検体および他のヒト白血病細胞株では OCT3/4、SOX2 の発現は認められないが、iPSCs 様コロニーからは他の幹細胞と同時に OCT3/4、SOX2 の発現が認められた。positive control として遺伝子導入を行う際に用いた episomal vector を用いた。Primary: CML 患者検体、K562: ヒト白血病細胞株-1、HEL: ヒト白血病細胞株-2、PC: positive control (vector)

これらの幹細胞遺伝子は、遺伝子導入を行った vector からの発現によって維持されている可能性があるため、vector による外来遺伝子の発現消失が起きているかを検討した。遺伝子導入を行った vector から外来遺伝子発現に特異的に PCR 反応が起きるよう設計されたプライマーを用いて RT-PCR を行った。患者 1 について、後述の染色体解析の結果 46 XY, t(9; 22)(q34;q11.2)の染色体異常を有する No.3, 5, 8 の iPSCs コロニーを選び、コロニーを単離してから 10 継代以上培養を行った RNA を抽出し cDNA 作成を行った。これらの iPSCs からは L-MYC、

SOX2、KLF4、LIN28、EBNA-1 の外来遺伝子の発現が消失していることが確認された(図 5)。

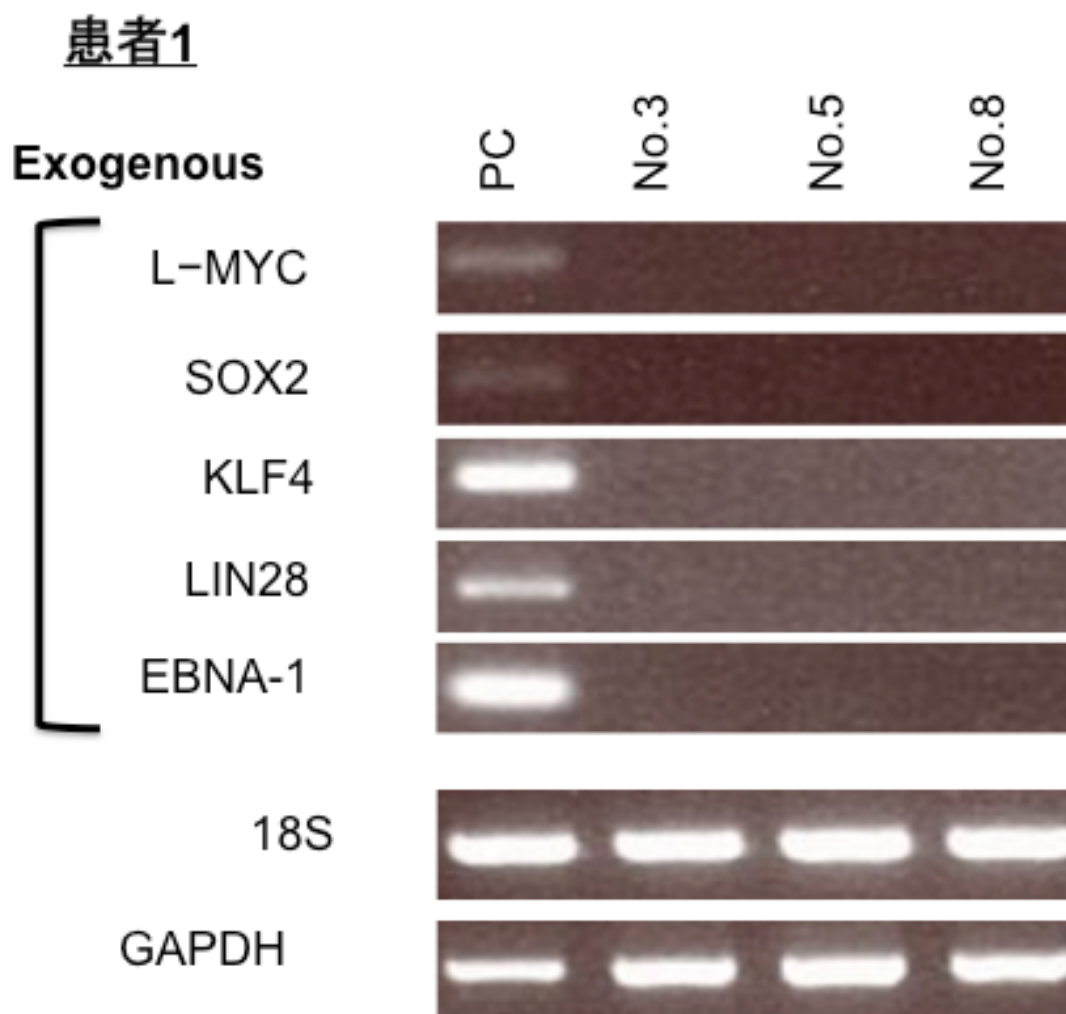


図 5.外来遺伝子発現の確認

Episomal vector 由来の外来遺伝子特異的に PCR 反応を起こすプライマーを用いて RT-PCR を行った。導入した L-MYC、SOX2、KLF4、LIN28、EBNA-1 の発現が消失していることを確認した。Positive control として、同様の方法で pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL、pCXWB-EBNA1 を遺伝子導入した CD34 陽性細胞を血球刺激用培地で 96 時間培養したのち回収した細胞を用いた。PC: positive control

さらに、iPSCs 様コロニーの多分化能を検討するため、NSG 免疫不全マウスの精巣被膜下に iPSCs 様コロニーを移植した。iPSCs は NOD/SCID 免疫不全マウスの精巣被膜下に移植することで、生体内に奇形腫を形成することが知られている。今回得られた CML 患者検体由来 iPSCs 様コロニーを週齢 8 週の NSG マウス精巣被膜下に移植した。移植 12 週間後、NSG マウスの精巣被膜下に形成された腫瘍を摘出し組織を観察した。腫瘍内には三胚葉系に分化した組織が観察され奇形腫の形成を確認するとともに、iPSCs 様コロニーが多分化能を有することが示された(図 6)。

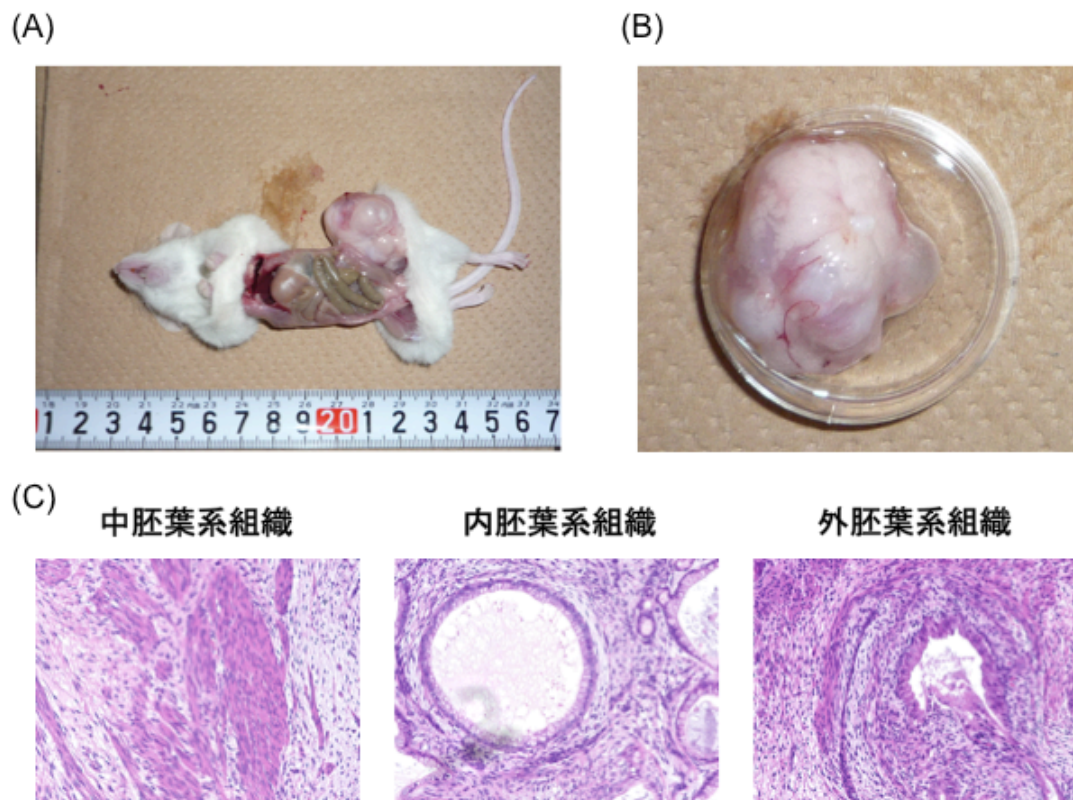


図 6. CML 患者検体由来 iPSCs 様コロニーから形成された奇形腫

A, B) CML-iPSCs Pt1-No.3 由来奇形腫マクロ像。左精巣被膜下に腫瘍の形成を認める。C) 奇形腫ミクロ像。筋組織(中胚葉系組織)、腺組織(内胚葉系組織)、神経組織(外胚葉)が同一腫瘍組織内に認められる。HE 染色。元倍率 100 倍。

以上の結果より、CML 患者検体より外来遺伝子の発現が消失した iPSCs が樹立されたことが示された。

疾患由来 CML-iPSCs の確認

CML 患者検体から iPSCs を樹立することに成功したが、CML 患者骨髄液に含まれる正常組織から iPSCs が樹立される可能性も考えられる。このため、CML 患者検体から樹立した iPSCs が、疾患細胞由来であるかを検討した。

CML 疾患細胞由来 iPSCs は、iPSCs の段階でも病的遺伝子 *BCR-ABL* を発現していることが知られている。患者検体から樹立した iPSCs を用いて、維持培養が 3 継代以上可能であったクローンを選び、*BCR-ABL* の発現を RT-PCR にて確認した。RT-PCR の結果、*BCR-ABL* の発現が確認できるクローンが患者 1,2 ともに存在することが示された。(図 7)。

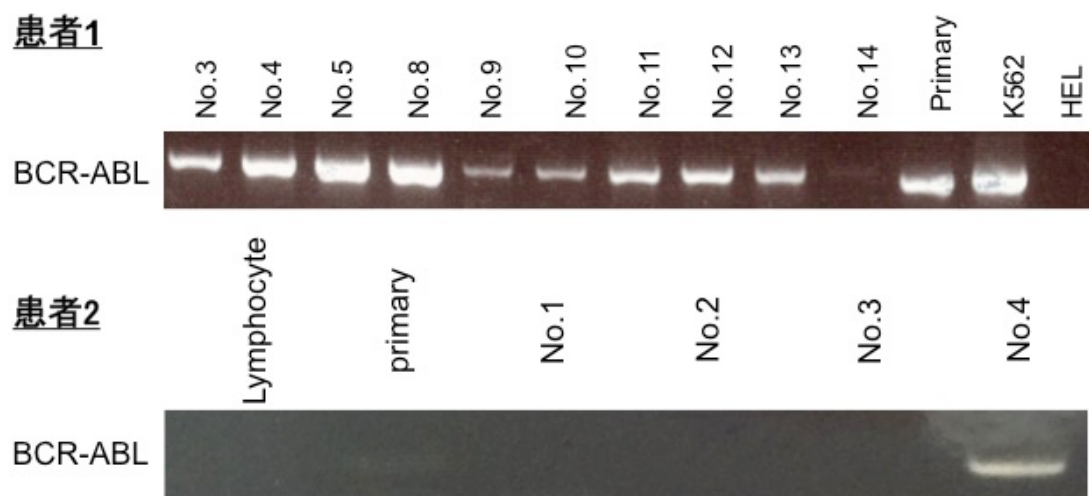


図 7. *BCR-ABL* 遺伝子発現確認 RT-PCR

CML 患者検体から樹立した iPSCs の各クローンを用いて *BCR-ABL* 遺伝子発現 RT-PCR を行った。CML 患者検体と同様に各クローンに *BCR-ABL* の遺伝子発現が確認される。Primary: CML 患者検体、K562: *BCR-ABL* 陽性ヒト白血病細胞株、HEL: *BCR-ABL* 陰性ヒト白血病細胞株、Lymphocyte: 急性骨髄性白血病寛解期患者 CD3 陽性リンパ球。

CML 疾患細胞から iPSCs が樹立されたことを、別の方法で確認するために CML 患者検体から樹立された iPSCs の染色体解析を行った。染色体解析の結果、*BCR-ABL* 遺伝子発現陽性の細胞は CML 患者検体と同様に t(9;22)(q34;q11.2)を有していることが確認された。一方で、*BCR-ABL* 遺伝子発現陰性の iPSCs の中には CML 患者検体由来でありながら、46XY 正常核型を有している iPSCs が含まれることが明らかとなった。今回行った染色体解析の結果を表 2 に示す。この結果から、患者検体から樹立した iPSCs には疾患細胞由来 iPSCs のみならず、正

常組織由来 iPSCs が含まれることが示唆された(図 8)。

患者	clone No.	染色体解析結果
患者 1	3	46, XY, t(9;22)(q34;q11.2)
	5	46, XY, t(9;22)(q34;q11.2)
	8	46, XY, t(9;22)(q34;q11.2)
	10	46, XY, t(9;22)(q34;q11.2) 47, XY, t(9;22)(q34;q11.2), +15 45, XY, t(9;22)(q34;q11.2), -18 45, XY, der(9)t(9;22)(q34;q11.2), -22 44, X, -Y, -4, t(9;22)(q34;q11.2) 44, XY, -3, t(9;22)(q34;q11.2), -18 44, XY, t(9;22)(q34;q11.2), -19, -22 44, XY, t(9;22)(q34;q11.2), -21, -22 43, XY, -1, t(9;22)(q34;q11.2), -10, -11 42, XY, -3, t(9;22)(q34;q11.2), -10, -11, -19 42, XY, -1, -7, -9, t(9;22)(q34;q11.2), -12, -16
	11	46, XY, t(9;22)(q34;q11.2)
患者 2	1	46, XY
	3	46, XY
	4	46, XY, t(9;22)(q34;q11.2)
	8	46, XY, t(9;22)(q34;q11.2)

表 2. 染色体解析を行った iPSCs

染色体解析を行った iPSCs クローンと解析結果を示す。CML-iPSCs 患者 1 のクローン No.10 に関しては複数の染色体異常が確認された。

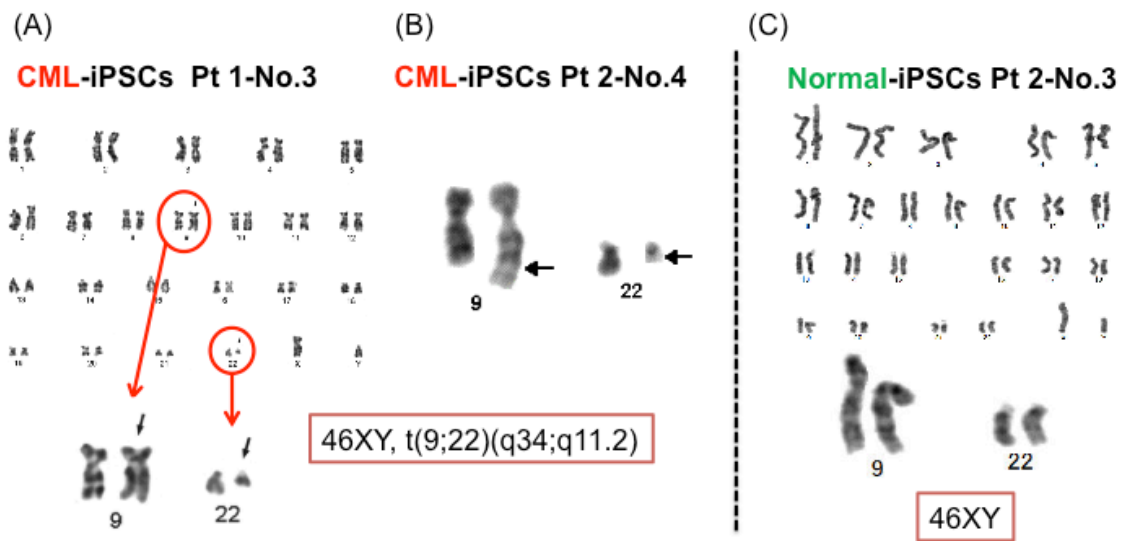


図 8. CML 患者検体由来 iPSCs の染色体解析

A) *BCR-ABL* 発現陽性 CML-iPSCs Pt1-No.3 の染色体解析結果。B) *BCR-ABL* 発現陽性 CML-iPSCs Pt2-No.4 の染色体解析結果。A)、B)ともに CML 患者検体と同様に 46 XY, t(9; 22)(q34;q11.2)で、他の付加的染色体異常を認めなかった。C) CML 患者 2、クローン No.3 の iPSCs の染色体解析結果。CML 患者由来の iPSCs であるが、46XY 正常核型である。患者検体に混在した正常組織から iPSCs が樹立されていることが示唆される。

これらの結果から、CML 患者検体からは疾患細胞由来 CML-iPSCs と *BCR-ABL* 融合遺伝子陰性で正常核型の iPSCs が樹立されたことが示された。今回樹立、および以後の実験に使用した iPSCs の幹細胞遺伝子発現確認、外来遺伝子発現消失確認、奇形腫作成、染色体解析、*BCR-ABL* 遺伝子発現確認の結果を以下表 2 に示す。CML 患者由来クローンのうち、疾患由来 CML-iPSCs と確認のできたクローンは患者 1,2 においてそれぞれ、14 クローン中 2 クローン、8 クローン中 1 クローンであった。上記の全ての確認を行うことができた iPSCs に関して、

Healthy donor から樹立した iPSCs 2 クローンおよび CML 患者 2 から樹立した正常核型の iPSCs をそれぞれ Normal-iPSCs H_1, H_2, Pt,2 とした。また CML 患者 1 および 2 から樹立したクローンのうち、染色体解析結果 46 XY, t(9;22)(q34;q11.2)で、他の付加的染色体異常を認めず、*BCR-ABL* 遺伝子発現が確認できたクローンを CML-iPSCs Pt1_1, Pt1_2, Pt_2 とした。これら Normal-iPSCs および CML-iPSCs それぞれ 3 クローンずつを以後の解析に用いることとした。

	clone No.	stem cell gene expression	integration check	teratoma formation	karyotype analysis G-banding	<i>BCR-ABL</i> gene expression	
Healthy donor	12	○	○	○	46 XY		Normal-iPSCs H_1
	14	○	○	○	46 XY		
	17	○	○	○	46 XY		
CML patient 1	1	○					Normal-iPSCs H_2
	2						
	3	○	○	○	46 XY t(9;22)	○	
	4	○				○	CML-iPSCs Pt1_1
	5	○	○	○	46 XY t(9;22)	○	
	6	○					
	7	○					CML-iPSCs Pt1_2
	8	○	○		46 XY t(9;22)	○	
	9	○	○				
	10 to 14	○			表2参照	○(14×)	
CML patient 2	1	○	○		46 XY	×	Normal-iPSCs Pt2
	2	○	○			×	
	3	○	○	○	46 XY	×	
	4	○	○	○	46 XY t(9;22)	○	CML-iPSCs Pt2
	5					×	
	6	○				×	
	7					×	
	8	○	×		46 XY t(9;22)	○	

表 3 樹立および実験に以後の実験に利用した iPSCs 一覧

今回の実験に利用した iPSCs および樹立を試みた iPSCs 各解析結果を表に示す。空欄部分は当該の解析を行っていないことを示す。また×は解析の結果陰性の結果であったことを示す。以後の解析で Normal-iPSCs として用いたクローンを赤で CML-iPSCs として用いたクローンを青でそれぞれ示す。

CML-iPSCs からの血液分化誘導

樹立した CML-iPSCs からイマチニブ耐性を示す未分化な血液細胞を解析するために、最初に CML-iPSCs から血液細胞の分化誘導を行った。

C3H10T1/2 と iPSCs を VEGF 添加の血球分化用培地を用いて 17 日間培養することで、sac 様構造物(iPS-sac)が形成される。この iPS-sac 内に分化誘導された血液細胞が含まれることが知られている。CML-iPSCs から、この iPS-sac が形成されることを確認した(図 9)。

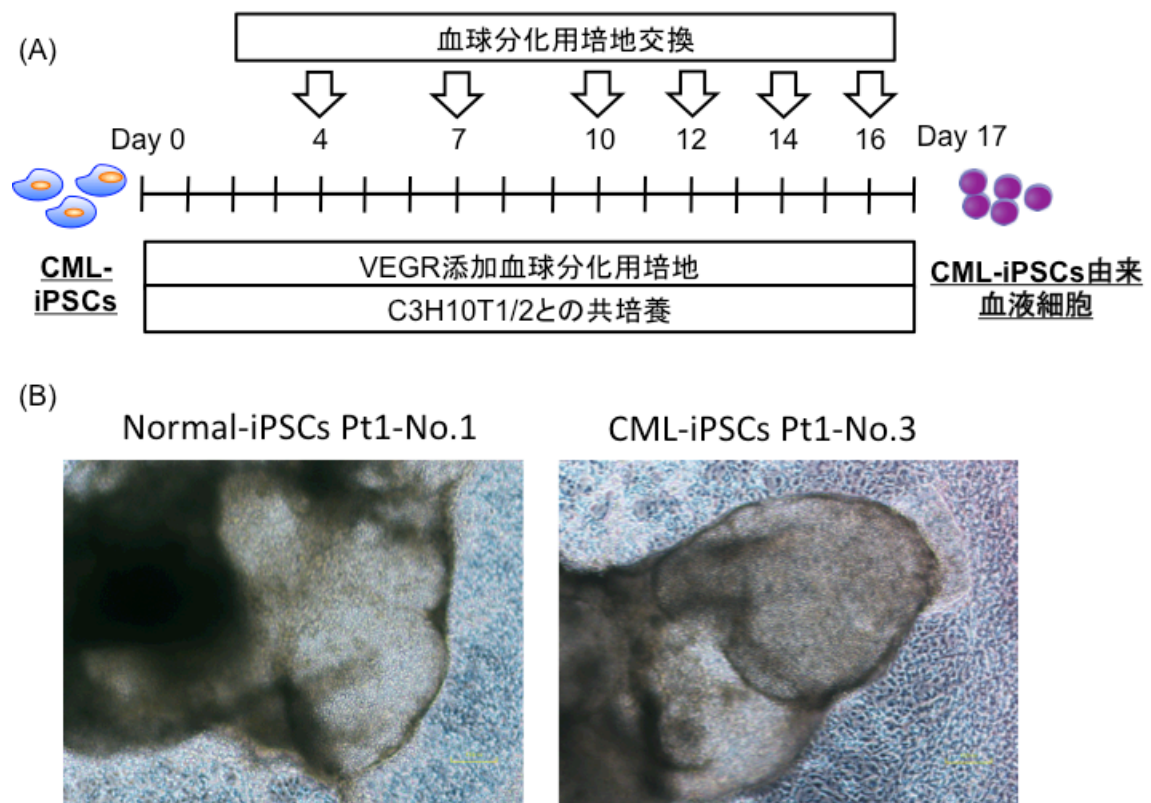


図 9. iPS-sac 法を用いた CML-iPSCs からの血液分化誘導

A) CML-iPSCs からの血液分化誘導シエーマ。B) Normal-iPSCs、および CML-iPSCs から血液分化誘導し形成された iPS-sac 形態像。CML-iPSCs から形成された sac 内にも血液様細胞が充満しているのが観察される。元倍率 40 倍。

CML-iPSCs 由来 pre-HPCs はイマチニブ耐性の細胞を含む

次に、CML-iPSCs から分化誘導した血液細胞からイマチニブ耐性を示す未分化な細胞と、イマチニブ感受性を示す分化した分画の検討を行った。未分化な細胞分画としては、正常 iPSCs の血液分化誘導において造血前駆細胞の前段階の細胞として既に報告のある、CD34 陽性・CD43 陽性・CD45 陰性 pre-hematopoietic progenitor cells (pre-HPCs)に着目した[52]。また、イマチニブ感受性を示す分化した分画として、CD34 陰性・CD43 陽性・CD45 陽性 Differentiated cells (DCs)に着目し解析を行った(図 10)。

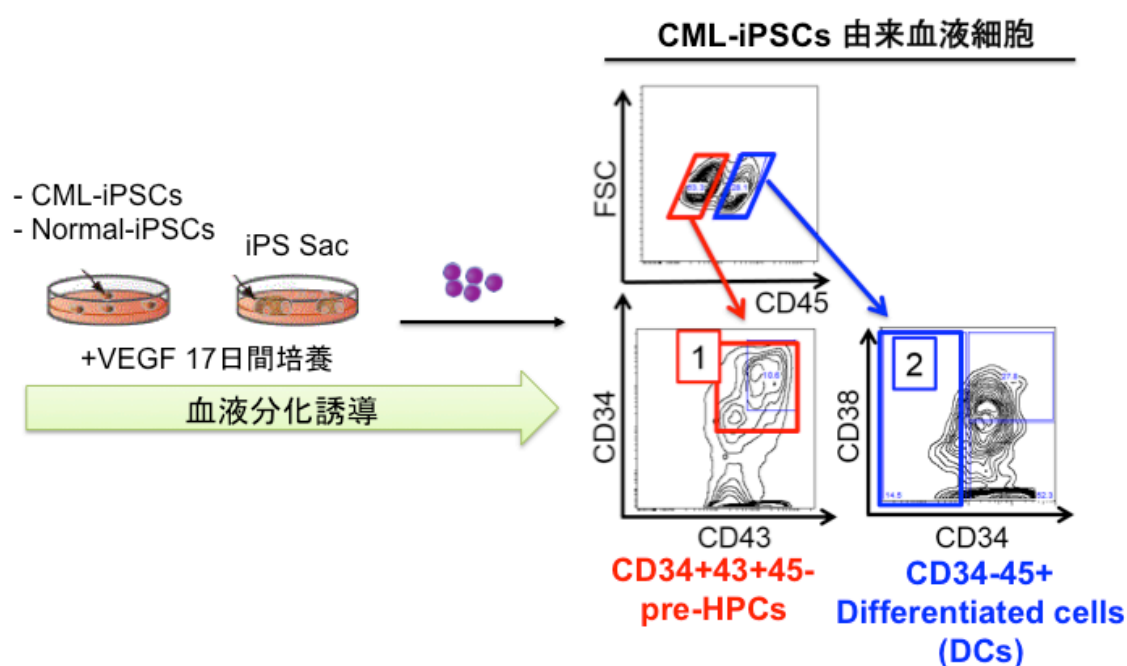


図 10. iPSCs 血液分化誘導後、未分化血液細胞分画及び分化血液細胞分画

未分化な血液細胞分画として CD34 陽性・CD43 陽性・CD45 陰性 pre-hematopoietic progenitor cells (pre-HPCs)、CD34 陰性・CD43 陽性・CD45 陽性 Differentiated cells (DCs)の解析を行った。FSC: forward scatter。

CML-iPSCs から分化誘導した pre-HPCs の多分化能、および血球産生能を検討した。サイトカイン含有半固形培地 MethoCult 4434 classic を用いて、血球コロニー形成能評価を行ったところ、CML-iPSCs 由来の pre-HPC は Normal-iPSCs 同様、多系統の血球コロニー産生能を示した。一方で Normal-iPSCs 由来 HPCs と CML-iPSCs 由来 HPCs のコロニー形成能に明らかな違いは認められなかった(図 11)。

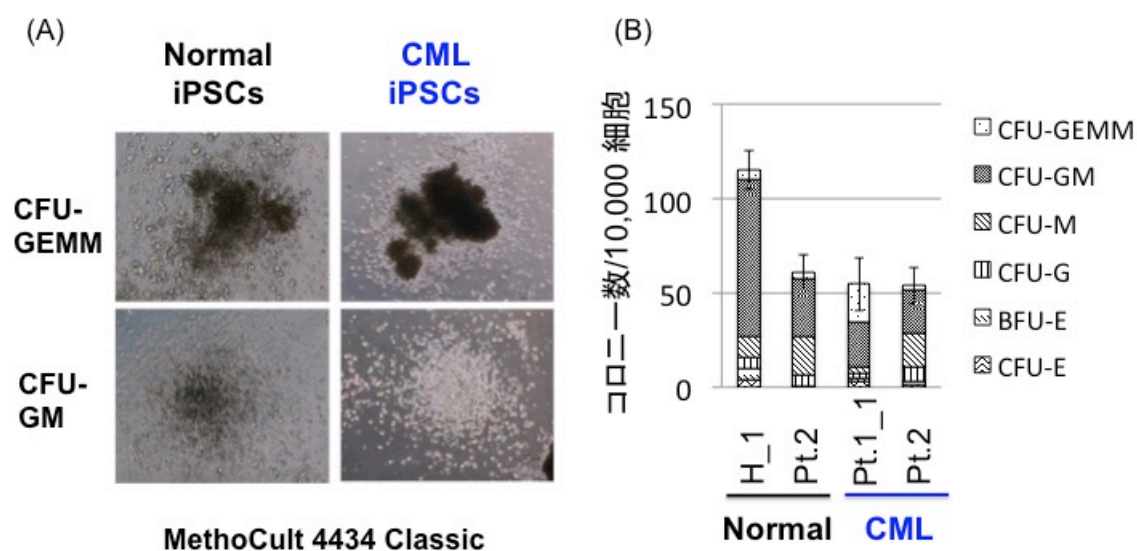


図 11. CML-iPSCs 由来 pre-HPCs の血球コロニー形成能評価

A) CML-iPSCs 由来 pre-HPCs の CFU-GEMM、および CFU-GM の顕微鏡像。CML-iPSCs 由来 pre-HPCs、Normal-iPSCs 同様多系統の血球コロニーを産生することが示されている。各群 3 回の実験の平均値±標準偏差を表す。

さらに、CML-iPSCs 由来 pre-HPCs の増殖能およびイマチニブ感受性を検討した。SCF、MGDF、FLT-3 ligand、IL-3、IL-6 を添加した血球刺激用培地に DMSO のみ、もしくはイマチニブを加えて増殖能を評価した。DMSO のみの環境下では、CML-iPSCs 由来の pre-HPCs は Normal-iPSCs 由来に比べて有意に増殖能が高いことが示された。また DCs においても、増殖能は pre-HPCs に劣るものの、同様の結果が示された(図 12)。イマチニブを加えた条件下で CML-iPSCs 由来の pre-HPCs と DCs を比較したところ、pre-HPCs はイマチニブ曝露下でも緩徐に増殖することが明らかとなった。(図 13)

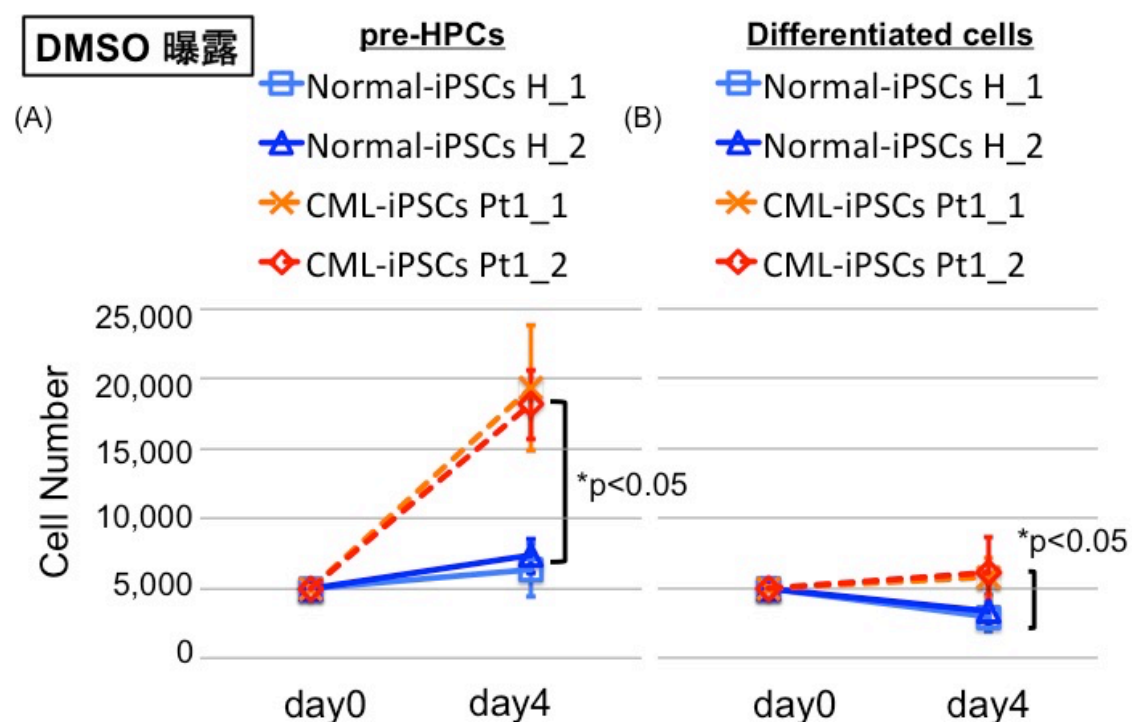


図 12. DMSO 曝露条件下における pre-HPCs の増殖能評価

A) Normal および CML-iPSCs 由来 pre-HPCs 由来の細胞増殖能を示す。B) Normal および CML-iPSCs 由来 DCs 由来の細胞増殖能を示す。A),B)いずれにおいても CML-iPSCs 由来細胞は有意に増殖能が高いことが示されている。SCF 100 ng/ml, MGDF 10 ng/ml, FLT-3 ligand 100 ng/ml, IL-3 10 ng/ml, IL-6 100 ng/ml, 20% FCS を添加した α MEM で培養。各群 3 回の実験の平均値 \pm 標準偏差を表す。

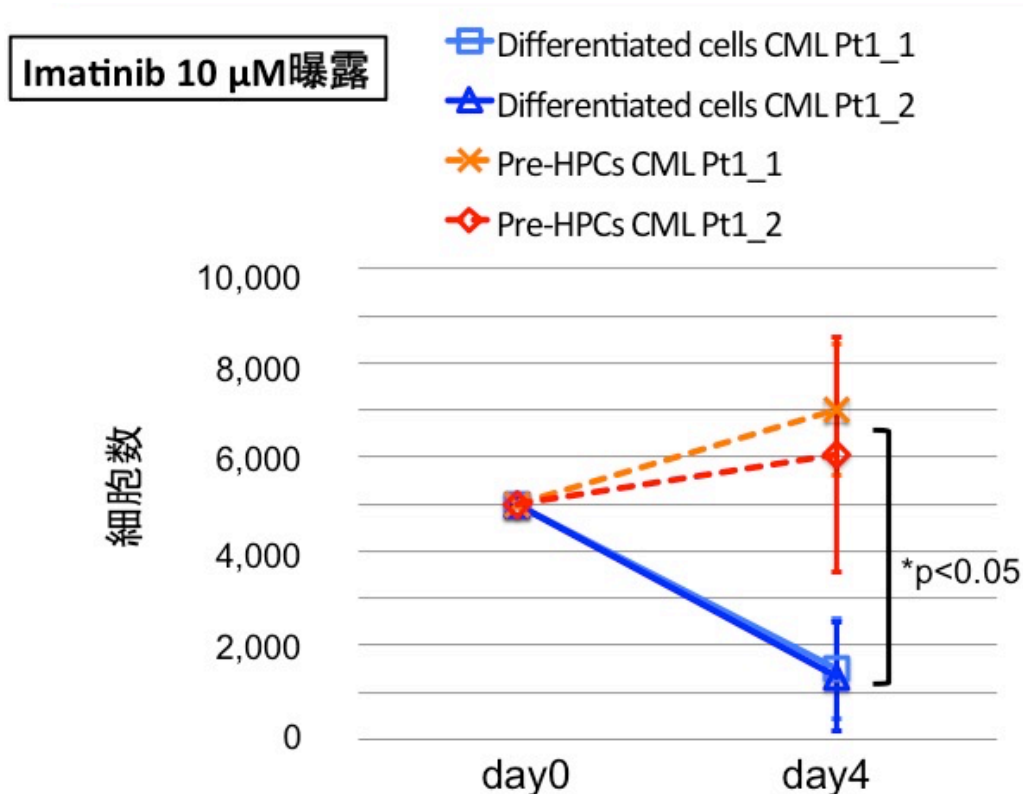


図 13. CML-iPSCs 由来 pre-HPCs と DCs のイマチニブ感受性評価

イマチニブ 10 μ M 下での CML-iPSCs 由来 pre-HPCs と DCs の細胞増殖能を示す。pre-HPCs はイマチニブ曝露下でも緩徐に増殖しており、pre-HPCs の中にイマチニブ耐性を示す細胞が含まれることが示唆される。SCF 100 ng/ml, MGDF 10 ng/ml, FLT-3 ligand 100 ng/ml, IL-3 10 ng/ml, IL-6 100 ng/ml, 20% FCS を添加した α MEM で培養。各群 3 回の実験の平均値 \pm 標準偏差を表す。

次に、CML-iPSCs 由来 pre-HPCs のイマチニブ曝露に対する apoptosis 解析を、APC 抱合抗 annexinV 抗体及び核染色材 DAPI を用いて行った。CML-iPSCs 由来 DCs はイマチニブ曝露下では、annexin V 陰性・DAPI 陰性の生細胞以外の on-viable cell の割合が有意に増加しイマチニブ感受性を示した。その一方で、pre-HPCs はイマチニブ曝露下でも non-viable cell の割合に有意な差は認められな

かった(図 14)。これらの結果から、CML-iPSCs 由来 pre-HPCs にはイマチニブ耐性を示す細胞が含まれることが示唆された。

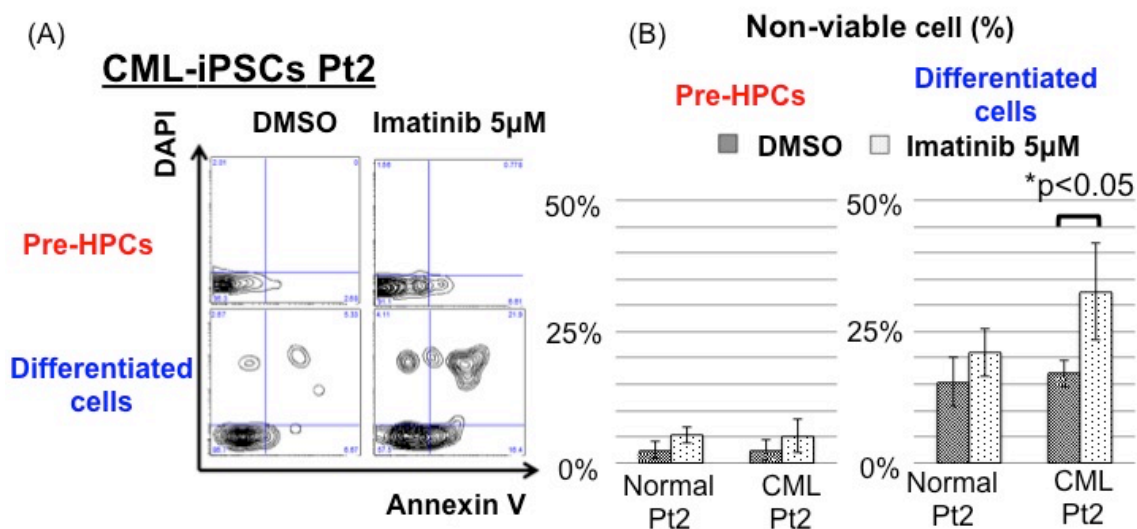


図 14. CML-iPSCs 由来 pre-HPCs のイマチニブ曝露下 apoptosis 解析

A) CML-iPSCs 由来 pre-HPCs の apoptosis 解析結果の典型的な例を示す。B) CML-iPSCs 由来 pre-HPCs、および DCs における non-viable cell の割合を示す。DCs においてはイマチニブ 5 μM 曝露下で non-viable cell の割合が有意差をもって上昇しているのに対して、pre-HPCs においては有意な差は認められない。各群 3 回の実験の平均値±標準偏差を表す。

CML-iPSCs 由来 pre-HPCs を用いたイマチニブ耐性遺伝子の検索

CML-iPSCs 由来 pre-HPCs を用いて、CML 細胞がイマチニブ耐性を示す原因となる遺伝子の検索を行った。イマチニブ耐性の細胞が含まれることが強く示唆される pre-HPCs 及びイマチニブ感受性を示す DCs を用いて、DMSO のみ曝露する群及びイマチニブ 2.5 μ M を曝露する群に分けて網羅的遺伝子発現解析を行った。また、正常のコントロールとして Normal-iPSCs 由来の pre-HPCs も同時に解析を行った(図 15)。

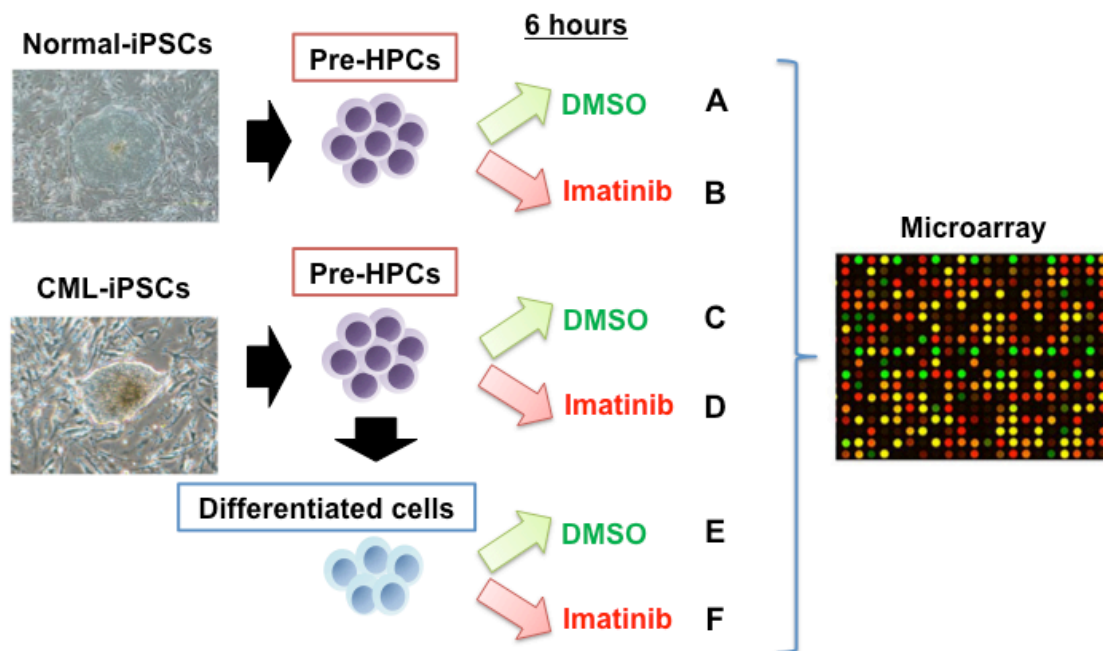


図 15. CML-iPSCs 由来 pre-HPCs を用いた網羅的遺伝子発現解析シエーマ

CML-iPSCs 由来 pre-HPCs および DCs、Normal-iPSCs 由来 pre-HPCs を、イマチニブ 2.5 μM を添加した血球刺激用培地を用いて 6 時間培養した後サンプルを回収し網羅的遺伝子発現解析を行った。

網羅的遺伝子発現解析によって得られた結果を用いて、変動の大きかった上位 1,000 遺伝子を抽出しクラスター解析を行ったところ、pre-HPCs と DCs はイマチニブ曝露の有無に関わらず、大きく 2 つのクラスターに分けられた(図 16)、(表 4)。この結果から、今回の網羅的遺伝子発現解析結果は一定の程度信頼に足る結果であることが示唆された。

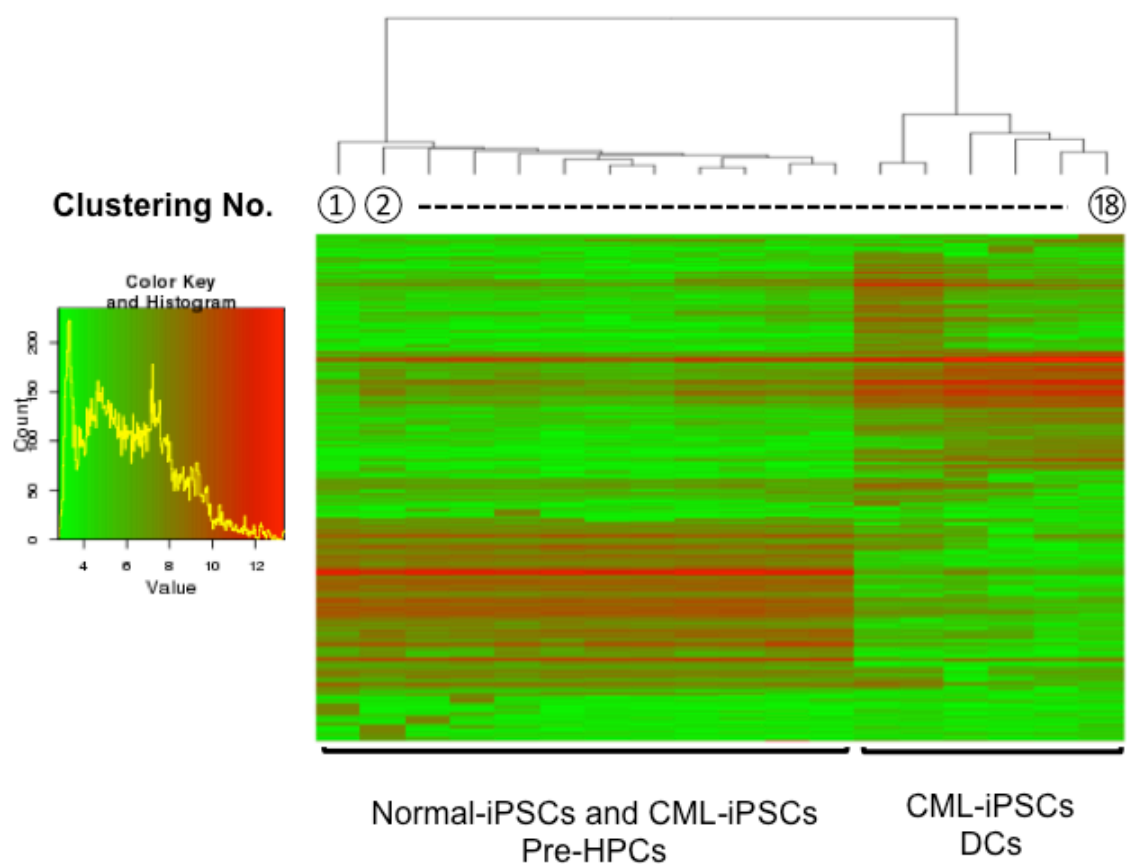


図 16. 網羅的遺伝子発現解析:クラスター解析結果

網羅的遺伝子発現解析によって変動差の大きかった上位 1,000 遺伝子を抽出しクラスター解析を行った結果を示す。Pre-HPCs と DCs は大きく 2 つのクラスターに分類された。

clustering

No.	sample	subpopulation	imatinib exposure
1	Normal-iPSCs H_1	pre-HPCs	imatinib 5 μ M
2	CML-iPSCs Pt1_2	pre-HPCs	imatinib 5 μ M
3	Normal-iPSCs H_2	pre-HPCs	imatinib 5 μ M
4	Normal-iPSCs H_2	pre-HPCs	DMSO
5	CML-iPSCs Pt1_2	pre-HPCs	DMSO
6	Normal-iPSCs H_1	pre-HPCs	DMSO
7	CML-iPSCs Pt2	pre-HPCs	DMSO
8	CML-iPSCs Pt2	pre-HPCs	imatinib 5 μ M
9	Normal-iPSCs Pt2	pre-HPCs	DMSO
10	Normal-iPSCs Pt2	pre-HPCs	imatinib 5 μ M
11	CML-iPSCs Pt1_1	pre-HPCs	DMSO
12	CML-iPSCs Pt1_1	pre-HPCs	imatinib 5 μ M
13	CML-iPSCs Pt1_1	DCs	DMSO
14	CML-iPSCs Pt1_1	DCs	imatinib 5 μ M
15	CML-iPSCs Pt1_2	DCs	DMSO
16	CML-iPSCs Pt1_2	DCs	imatinib 5 μ M
17	CML-iPSCs Pt2	DCs	DMSO
18	CML-iPSCs Pt2	DCs	imatinib 5 μ M

表 4. クラスター解析結果およびサンプル名一覧

クラスター解析の結果、図 16 のように clustering No.が割り当てられた。各 clustering No.に対応するサンプルの一覧を示す。

また、得られた結果を用いて GSEA 解析を行った。イマチニブ曝露を行った

CML-iPSCs 由来 pre-HPCs と DCs を比較したところ、false discovery rate(FDR) <

0.25 の割合で enrichment された gene sets には造血幹細胞の維持において重要な

役割を果たすことが報告されている homeobox A9(HOXA9)、CML 幹細胞のイマ

チニブ耐性に関わることが報告されている transforming growth factor, beta(TGF- β)、イマチニブのターゲット遺伝子など関連した遺伝子群が含まれ、網羅的遺伝子解析の妥当性を示すものと考えられた (図 17)。

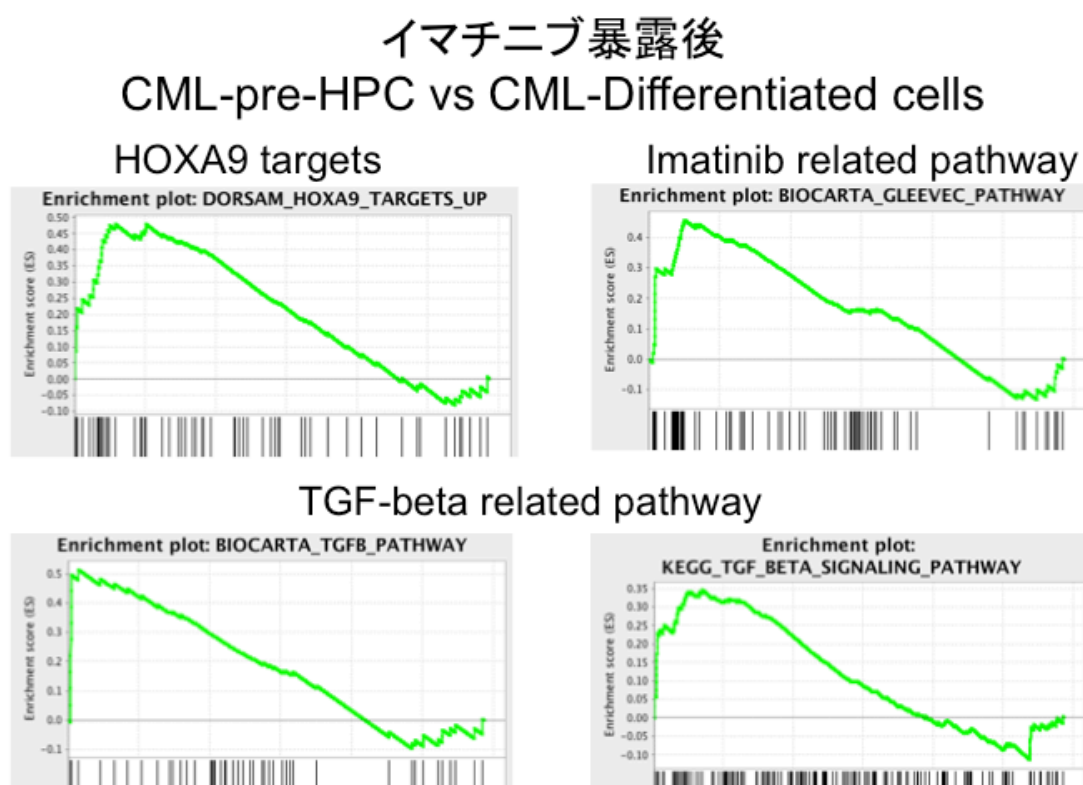


図 17. イマチニブ暴露後 CML-iPSCs 由来 pre-HPCs vs DCs の GSEA 解析

CML-iPSCs 由来 pre-HPCs vs DCs の GSEA 解析の結果の一部を示す。HOXA9 や TGF- β 等の造血幹細胞の維持や、CML 幹細胞のイマチニブ耐性に関わる遺伝子群が enrichment されている。

次に、GSEA 解析の結果 enrichment された遺伝子群の中からイマチニブ耐性に寄与する遺伝子群の候補について検討した。DMSO のみを暴露した群とイマチ

ニブ 2.5 μ M を曝露した群それぞれで CML-iPSCs 由来 pre-HPCs と DCs を GSEA 解析したところ、pre-HPCs についてそれぞれ 1,000 個および 902 個の遺伝子群が $FDR < 0.25$ の割合で enrichment されていた。これらのうち 789 個の遺伝子群については DMSO 曝露群、イマチニブ曝露群で共通であったが、113 個の遺伝子群はイマチニブ曝露群のみで enrichment されていた。この 113 個の遺伝子群のうち、DMSO 曝露群の CMLiPSCs 由来 DCs と pre-HPCs の比較では DCs で enrichment されているがイマチニブ曝露群の CMLiPSCs 由来 DCs と pre-HPCs の比較では pre-HPCs で enrichment されている 9 個の遺伝子群に候補を絞り込んで、追加の解析を行うこととした(図 18)。候補として絞り込んだ遺伝子群を表 3 に示す。

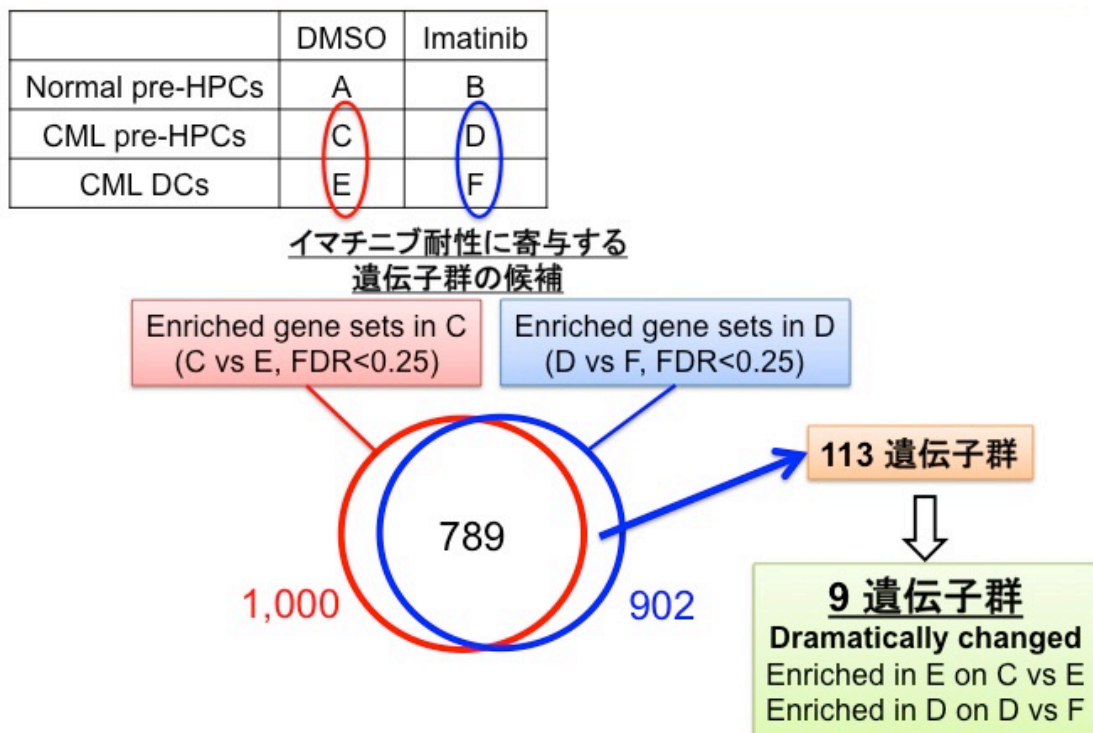


図 18. GSEA 解析によって得られたイマチニブ耐性に寄与する遺伝子群の候補絞り込みシェーマ

CML-iPSCs 由来 pre-HPCs と DCs の GSEA 解析の結果、pre-HPCs において enrichment される遺伝子群は DMSO 曝露群とイマチニブ 2.5 μ M 曝露群で大部分共通であった。イマチニブ曝露群の pre-HPCs においてのみ enrichment されイマチニブ曝露によって劇的に変化の認められる 9 遺伝子群を候補遺伝子群として絞り込んだ。

NAME	FDR value
GRANDVAUX_IRF3_TARGETS_DN	0.121693365
REACTOME_AQUAPORIN_MEDIATED_TRANSPORT	0.19126707
KIM_WT1_TARGETS_UP	0.19375119
PID_CMYB_PATHWAY	0.19655316
KANNAN_TP53_TARGETS_DN	0.2031906
TURASHVILI_BREAST_	
LOBULAR_CARCINOMA_VS_LOBULAR_NORMAL_UP	0.20319283
HUTTMANN_B_CLL_POOR_SURVIVAL_DN	0.20353681
KEGG_GLYCOSAMINOGLYCAN_	
BIOSYNTHESIS_KERATAN_SULFATE	0.20587851
SHI_SPARC_TARGETS_DN	0.21015383

表 3. GSEA 解析で CML-iPSCs 由来 pre-HPCs においてイマチニブ曝露後に大きく変化の認められた 9 遺伝子群

絞り込んだ 9 遺伝子群から、CML 幹細胞のイマチニブ耐性に寄与する遺伝子を探し出すために、候補遺伝子の評価を行うこととした。前述の様に絞り込んだ 9 候補遺伝子群のうちの一つにおいて、CML-iPSCs 由来 pre-HPCs においてはイマチニブ曝露後のシグナル値の平均が上昇し、DCs においてイマチニブ曝露後のシグナル値の平均が低下した遺伝子を検索したところ、mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MEK5)がイマチニブ耐性の候補遺伝子として抽出された(図 19)。また、MEK5 に依存したシグナル伝達経路の下流に位置する mitogen-activated protein kinase (ERK5)の knock down によって *BCR-ABL* 陽性 K562

細胞株のイマチニブによる apoptosis 誘導能を上昇させることが報告されているが[53][54]、CML 幹細胞において ERK5 の役割は明らかではない。このため、MEK5-ERK5 シグナル伝達経路を CML 幹細胞のイマチニブ耐性に寄与する経路の候補と考え評価を行うこととした。

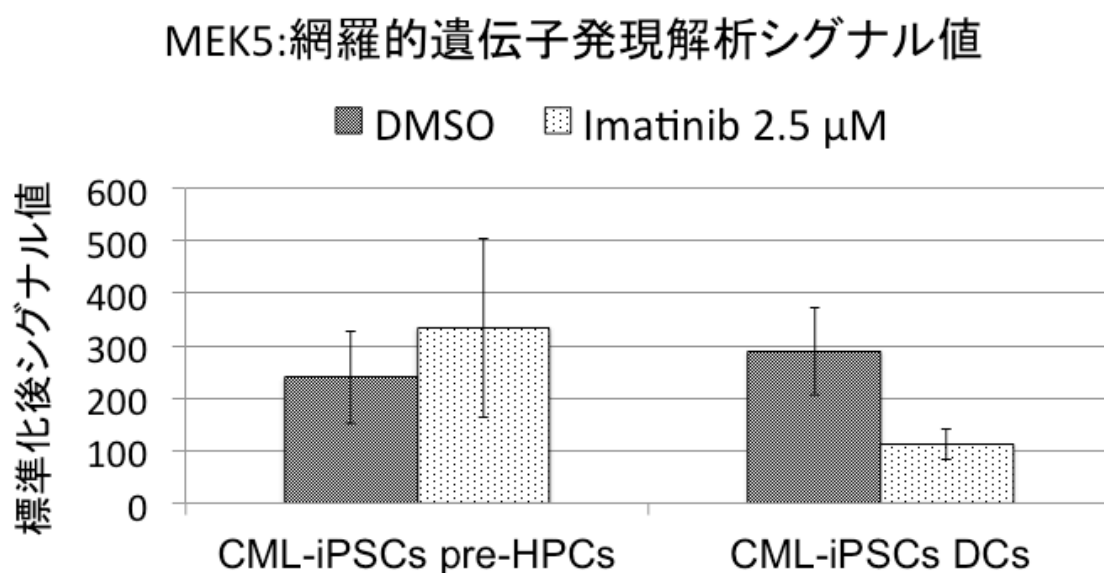


図 19. MEK5 の網羅的遺伝子発現解析シグナル値

MEK5 の標準化処理を行った網羅的遺伝子発現解析シグナル値を示す。イマチニブ曝露群において、Pre-HPCs においてはシグナル値が上昇している一方で、DCs においてはシグナル値が減少している。各群 3 サンプルの平均値±標準偏差を表す。

MEK5-ERK5 シグナル伝達経路の pre-HPCs のイマチニブ耐性に対する寄与を ERK5 inhibitor XMD8-92 を用いて評価することとした[55]。CML-iPSCs の

pre-HPCs に対してイマチニブ 5 μ M に加えて XMD8-92 を加え、apoptosis 解析を行ったところ apoptosis 誘導能に有意な差は認められなかった(図 20)。このことから MEK5-ERK5 シグナル伝達経路は CML-iPSCs 由来 pre-HPCs のイマチニブ耐性に大きく寄与しないことが示唆された。

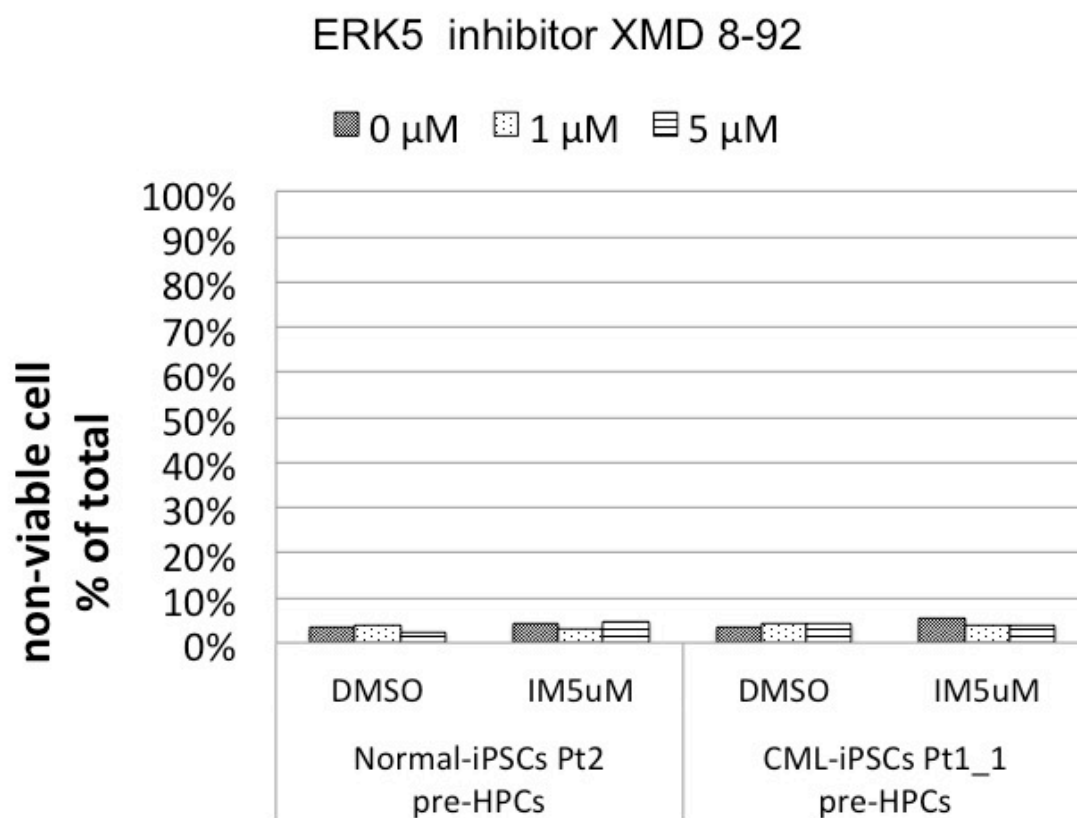


図 20. CMLiPSCs 由来 pre-HPCs の ERK5 inhibitor XMD 8-92 曝露下 apoptosis 解析

CML-iPSCs 由来 pre-HPCs における non-viable cell の割合の代表的な 1 例を示す。XMD8-92 をイマチニブ 5 μ M に加えても、non-viable cell の割合に差がつく傾向は認められなかった。

【考察】

本研究では CML 幹細胞の解析を行うにあたり、CML-iPSCs を CML の病態モデルとして利用することに着目した。今回の外来遺伝子の挿入が無い CML-iPSCs を樹立し、CML-iPSCs から分化誘導した血液細胞の解析により、HPCs の前段階であると報告されている CD34 陽性・CD43 陽性・CD45 陰性 pre-HPC 分画において CML-iPSCs 由来血液細胞がイマチニブ耐性を示すことを明らかにした。さらに、pre-HPCs の網羅的遺伝子発現解析により CML-iPSCs 由来 pre-HPCs においてイマチニブ耐性に寄与する候補遺伝子を抽出した。これまでの CML-iPSCs を用いた報告においては、CML-iPSCs の段階ではイマチニブ感受性は消失しているが CML-iPSCs 由来血液細胞はイマチニブ感受性を回復し、原疾患の病態を反映していることが示されている。さらに、CML-iPSCs から分化誘導した血液細胞はイマチニブ感受性が回復するが、その回復の程度は部分的であること、またイマチニブ耐性を示す分画が存在することが示されている。これらの CML-iPSCs 由来血液細胞の形質は CML 幹細胞と似通った部分もあり、そのメカニズムについても CML 幹細胞と共通している可能性が考えられる。本研究で抽出した CML-iPSCs 由来 pre-HPCs においてイマチニブ耐性に寄与する候補遺伝子を評価することにより、CML 幹細胞においてイマチニブ耐性に寄与す

る遺伝子を同定できる可能性が示唆される。

本研究では pre-HPCs が、多系統の血球コロニーを形成することで多分化能を有した未分化な血球であることを示した。また血球刺激用培地を用いた細胞増殖能評価、および apoptosis 解析によって CML-iPSCs 由来 pre-HPCs がイマチニブ耐性であることを示した。また予備検討で細胞周期解析を行ったところ、CML-iPSCs 由来 pre-HPCs はイマチニブ曝露下においても cell cycle arrest が起きていないことを示唆する結果を得た。このことは、CML-iPSCs がイマチニブ耐性機構を有することをあらためて支持する結果と考えられる。この細胞周期解析も含め、他の解析を用いてイマチニブ耐性であることを複数の角度から検討する必要があると考えられる。

今回解析の対象とした pre-HPCs は in vitro のある一定の条件下で分化誘導することによってイマチニブ耐性を示した。しかしながら、特定の条件下のみの検討であり、分化誘導条件の違いや hematopoiesis の違いについては検討されていない。そのため、CML-iPSCs 由来血液細胞が生体内においてイマチニブ耐性を示すかどうかの十分な検討が必要と考えられる。

iPSCs 由来血液細胞を生体内で解析するにあたっては、有効な in vivo モデルが限られている。In vitro で iPSCs から遺伝子導入を用いずに分化誘導した血液

細胞を用いて造血組織の再構築に成功した報告は見られない。実際、本研究の予備検討において、*in vitro* で誘導した Normal-iPSCs 由来 CD34 陽性、CD43 陽性細胞を NSG 免疫不全マウス移植したところ、生着は認められなかった。

iPSCs を用いて免疫不全マウスに移植可能な血液細胞を得る方法として、フィーダー細胞と iPSCs を混合して NSG マウスの皮下に移植して形成された奇形種内で産生された血液細胞を用いる方法[56]、もしくは複数の遺伝子導入を行い分化誘導した血液細胞を用いる方法が報告されている[57]。しかしながら、奇形種形成モデルにおいては解析に必要な十分量の血液細胞を回収することが困難であり、遺伝子導入モデルでは原疾患の病態を修飾してしまう可能性が考えられる。このように iPSCs 由来血液細胞を生体内で解析する方法には制約があり、*in vivo* モデルの作製は重要な課題であると考えられる。

本研究において、イマチニブ耐性に寄与する候補遺伝子として抽出され評価が行われた MEK5-ERK5 シグナル伝達経路は CML-iPSCs 由来 pre-HPCs においても apoptosis 誘導能には寄与しないことが示された。MEK5-ERK5 シグナル伝達経路は乳癌の化学療法耐性に寄与していることが報告されており、CML-iPSCs 由来血液細胞、さらに CML 幹細胞のイマチニブ耐性に寄与している可能性が考えられた[58]。一方で、MEK5-ERK5 シグナル伝達経路は epithelial

mesenchymal transition のような細胞の形質変化、もしくは神経発生の過程で重要な役割を果たしていることが知られている[59][60]。CML-iPSCs 由来血液細胞の網羅的遺伝子発現解析のみでは、血液分化誘導の過程で発現が変化する遺伝子とイマチニブ耐性に寄与する候補遺伝子とより分けることは極めて困難であると考えられる。このため CML-iPSCs 由来血液細胞で抽出されたイマチニブ耐性候補遺伝子や耐性機構については、他の疾患モデル、また理想的には他の患者検体でも十分に評価、検討されなければならない。

今回の CML-iPSCs 由来 HPCs の解析から抽出されたイマチニブ耐性に寄与すると考えられる候補遺伝子は、複数の疾患モデルを用いて評価を進めている。第一に、CML-iPSCs を用いた評価を進めている。CML-iPSCs にテトラサイクリン誘導遺伝子 knock down システムを搭載し、血液分化誘導したあとに inducible knock down を行い pre-HPCs の apoptosis 解析を行う。同時にヒト白血病細胞株を用いた評価を進めている。イマチニブ耐性 *BCR-ABL* 陽性白血病細胞株を作製し候補遺伝子を knock down した後に細胞増殖能を解析する方法や、マウスモデルを用いた評価方法も準備中である。マウス骨髄細胞にレトロウイルスベクターを用いて *BCR-ABL* を過剰発現し骨髄移植を行うことで CML 様疾患を発症する CML マウス骨髄移植モデルを用いて産生したマウス CML 細胞で候補遺伝子を

knock down することで起きる半固形培地血球コロニー形成能を解析する。実際、CML 幹細胞において protein kinase C (PKC) family である PKC η を介した MEK/ERK シグナル伝達経路の活性化がイマチニブ耐性に寄与していることを報告した Leyan らも細胞株、マウスモデル、ヒト検体と複数の疾患モデルを用いて解析を行っている[61]。

iPSCs からの血液分化誘導において、本研究では VEGF 添加血球分化用培地を使用した。分化誘導に 17 日間を要し、iPS-sac 法を用いて CML-iPSCs からの血液分化誘導に成功した。しかしながら昨今、血液分化誘導法が改良され複数のサイトカインおよび化合物を添加することでより約 1 週間で血液細胞に分化誘導することに成功している[62]。短期間で効率よく精度の高い解析を行うためには、血液分化誘導法の最適化について検討を要すると考えられる。

CML-iPSCs を用いた解析は CML のプラットフォームの一つであり、それぞれの疾患モデルの限界を考慮して補完しながら病態の十分な検討を行う必要があると考えられる。

【結論】

本研究ではCML患者より外来遺伝子の挿入の無いCML-iPSCsを樹立し、CML幹細胞のイマチニブ耐性に寄与する原因遺伝子の抽出に利用した。CML-iPSCs由来 pre-HPCs はイマチニブ耐性であることが示された。この CML-iPSCs 由来 pre-HPCs の網羅的遺伝子発現解析を行うことで、pre-HPCs においてイマチニブ耐性に寄与する遺伝子の候補を抽出した。これらの遺伝子は CML 幹細胞のイマチニブ耐性に寄与する遺伝子と共通である可能性が示唆され、今後複数のモデルを使用して評価を行う必要があると考えられる。

【謝辞】

本研究全般ならびに論文作成を進めるにあたり丁寧なご指導頂きました、東京大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍病態学講座 黒川峰夫教授に深く感謝申し上げます。

また実験全般に関してご指導・ご協力頂きました、関西医科大学医学部 病理学第一講座准教授 熊野恵城先生、東京大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科講師 荒井俊也先生、同科助教 田岡和城先生、同科特任助教 吉見昭秀先生に感謝申し上げます。

Episomal vector: pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL、pCXWB-EBNA1 を供与していただいた京都大学 iPS 細胞研究所講師 沖田圭介先生に感謝申し上げます。

ヒト rMGDF を供与していただいた、協和発酵キリン株式会社に感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1 *Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven T, Geurts van Kessel A, Bootsma D, Grosveld G, Ferguson-Smith MA, Davies T, Stone M.* Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306, 277–280 (1983)
- 2 *Melo J V, Barnes DJ.* Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 441–453 (2007)
- 3 *Rowley JD.* Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290–293 (1973)
- 4 *Cotta C V, Bueso-Ramos CE.* New insights into the pathobiology and treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann Diagn Pathol* 11, 68–78 (2007)
- 5 *Garcia-Manero G, Faderl S, O'Brien S, Cortes J, Talpaz M, Kantarjian HM.* Chronic myelogenous leukemia: a review and update of therapeutic strategies. *Cancer* 98, 437–457 (2003)
- 6 *Kluin-Nelemans HC, Buck G, le Cessie S, Richards S, Beverloo HB, Falkenburg JHF, Littlewood T, Muus P, Bareford D, van der Lelie H, Green AR, Roozendaal KJ, Milne AE, Chapman CS, Shepherd P.* Randomized comparison of low-dose versus high-dose interferon-alfa in chronic myeloid leukemia: prospective collaboration of 3 joint trials by the MRC and HOVON groups. *Blood* 103, 4408–4415 (2004)
- 7 *Savage DG, Szydlo RM, Goldman JM.* Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol* 96, 111–116 (1997)
- 8 *Spiers AS, Bain BJ, Turner JE.* The peripheral blood in chronic granulocytic leukaemia. Study of 50 untreated Philadelphia-positive cases. *Scand J Haematol* 18, 25–38 (1977)

- 9 *Muehleck SD, McKenna RW, Arthur DC, Parkin JL, Brunning RD.* Transformation of chronic myelogenous leukemia: clinical, morphologic, and cytogenetic features. *Am J Clin Pathol* 82, 1–14 (1984)
- 10 *Xu Y, Dolan MM, Nguyen PL.* Diagnostic significance of detecting dysgranulopoiesis in chronic myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 120, 778–784 (2003)
- 11 *Derderian PM, Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Cork A, Estey E, Pierce S, Keating M.* Chronic myelogenous leukemia in the lymphoid blastic phase: characteristics, treatment response, and prognosis. *Am J Med* 94, 69–74 (1993)
- 12 *Khalidi HS, Brynes RK, Medeiros LJ, Chang KL, Slovak ML, Snyder DS, Arber DA.* The immunophenotype of blast transformation of chronic myelogenous leukemia: a high frequency of mixed lineage phenotype in “lymphoid” blasts and A comparison of morphologic, immunophenotypic, and molecular findings. *Mod Pathol* 11, 1211–1221 (1998)
- 13 *Nair C, Chopra H, Shinde S, Barbhaya S, Kumar A, Dhond S, Yejamanam B, Sapre R, Chougule A, Advani S.* Immunophenotype and ultrastructural studies in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 19, 309–313 (1995)
- 14 *Patel BB, Mohamed AN, Schiffer CA.* “Acute myelogenous leukemia like” translocations in CML blast crisis: two new cases of inv(16)/t(16;16) and a review of the literature. *Leuk Res* 30, 225–232 (2006)
- 15 *Saikia T, Advani S, Dasgupta A, Ramakrishnan G, Nair C, Gladstone B, Kumar MS, Badrinath Y, Dhond S.* Characterisation of blast cells during blastic phase of chronic myeloid leukaemia by immunophenotyping--experience in 60 patients. *Leuk Res* 12, 499–506 (1988)
- 16 *Wu Y, Slovak ML, Snyder DS, Arber DA.* Coexistence of inversion 16 and the Philadelphia chromosome in acute and chronic myeloid leukemias : report of six cases and review of literature. *Am J Clin Pathol* 125, 260–266 (2006)

- 17 *Bacher U, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Schoch C, Haferlach T.* Blast count and cytogenetics correlate and are useful parameters for the evaluation of different phases in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 46, 357–366 (2005)
- 18 *Buesche G, Hehlmann R, Hecker H, Heimpel H, Heinze B, Schmeil A, Pfirrmann M, Gomez G, Tobler A, Herrmann H, Kappler M, Hasford J, Buhr T, Kreipe H-H, Georgii A.* Marrow fibrosis, indicator of therapy failure in chronic myeloid leukemia - prospective long-term results from a randomized-controlled trial. *Leukemia* 17, 2444–2453 (2003)
- 19 *Cortes JE, Talpaz M, O'Brien S, Faderl S, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Verstovsek S, Rios MB, Shan J, Kantarjian HM.* Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal. *Cancer* 106, 1306–1315 (2006)
- 20 *Cortes JE, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Rios MB, Shan J, Garcia-Manero G, Faderl S, Thomas DA, Wierda W, Ferrajoli A, Jeha S, Kantarjian HM.* Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood* 101, 3794–3800 (2003)
- 21 *Gratwohl A, Hermans J, Goldman JM, Arcese W, Carreras E, Devergie A, Frasson F, Gahrton G, Kolb HJ, Niederwieser D, Ruutu T, Vernant JP, de Witte T, Apperley J.* Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet* 352, 1087–1092 (1998)
- 22 *Kari L, Loboda A, Nebozhyn M, Rook AH, Vonderheid EC, Nichols C, Virok D, Chang C, Horng W-H, Johnston J, Wysocka M, Showe MK, Showe LC.* Classification and prediction of survival in patients with the leukemic phase of cutaneous T cell lymphoma. *J Exp Med* 197, 1477–1488 (2003)

- 23 *Savage DG, Szydlo RM, Chase A, Apperley JF, Goldman JM.* Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia: the effects of differing criteria for defining chronic phase on probabilities of survival and relapse. *Br J Haematol* 99, 30–35 (1997)
- 24 *Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, Apperley J, Cervantes F, Cortes J, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Niederwieser D, Silver R, Hehlmann R.* Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 108, 1809–1820 (2006)
- 25 *Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MWN, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA.* Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 355, 2408–2417 (2006)
- 26 *Jørgensen HG, Allan EK, Jordanides NE, Mountford JC, Holyoake TL.* Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells. *Blood* 109, 4016–4019 (2007)
- 27 *Heidel FH, Bullinger L, Feng Z, Wang Z, Neff T a, Stein L, Kalaitzidis D, Lane SW, Armstrong S a.* Genetic and pharmacologic inhibition of β -catenin targets imatinib-resistant leukemia stem cells in CML. *Cell Stem Cell* 10, 412–424 (2012)
- 28 *Scheller M, Schönheit J, Zimmermann K, Leser U, Rosenbauer F, Leutz A.* Cross talk between Wnt/ β -catenin and Irf8 in leukemia progression and drug resistance. *J Exp Med* 210, 2239–2256 (2013) talk between Wnt/ β -catenin and Irf8 in leukemia progressio. *J Exp Med* 210, 2239–2256 (2013)

- 29 *Zhang B, Li M, McDonald T, Holyoake TL, Moon RT, Campana D, Shultz L, Bhatia R.* Microenvironmental protection of CML stem and progenitor cells from tyrosine kinase inhibitors through N-cadherin and Wnt- β -catenin signaling. *Blood* 121, 1824–1838 (2013)
- 30 *Hurtz C, Hatzi K, Cerchietti L, Braig M, Park E, Kim Y, Herzog S, Ramezani-Rad P, Jumaa H, Müller MC, Hofmann W-K, Hochhaus A, Ye BH, Agarwal A, Druker BJ, Shah NP, Melnick AM, Müschen M.* BCL6-mediated repression of p53 is critical for leukemia stem cell survival in chronic myeloid leukemia. *J Exp Med* 208, 2163–2174 (2011)
- 31 *Chen Y, Hu Y, Zhang H, Peng C, Li S.* Loss of the Alox5 gene impairs leukemia stem cells and prevents chronic myeloid leukemia. *Nat Genet* 41, 783–792 (2009)
- 32 *Zhang H, Peng C, Hu Y, Li H, Sheng Z, Chen Y, Sullivan C, Cerny J, Hutchinson L, Higgins A, Miron P, Zhang X, Brehm M a, Li D, Green MR, Li S.* The Blk pathway functions as a tumor suppressor in chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat Genet*, 1–13 (2012)
- 33 *Takahashi K, Yamanaka S.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676 (2006)
- 34 *Martin GR.* Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634–7638 (1981)
- 35 *Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147 (1998)
- 36 *Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813 (1997)

- 37 *Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872 (2007)
- 38 *Yamanaka S.* Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 1, 39–49 (2007)
- 39 *Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Golland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218–1221 (2008)
- 40 *Park I-H, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877–886 (2008)
- 41 *Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Zwi-Dantsis L, Caspi O, Winterstern A, Feldman O, Gepstein A, Arbel G, Hammerman H, Boulos M, Gepstein L.* Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 225–229 (2011)
- 42 *Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castellà M, Río P, Sleep E, González F, Tiscornia G, Garreta E, Aasen T, Veiga A, Verma IM, Surrallés J, Bueren J, Izpisua Belmonte JC.* Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460, 53–59 (2009)
- 43 *Loh Y-H, Agarwal S, Park I-H, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K, Daley GQ.* Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113, 5476–5479 (2009)
- 44 *Ye Z, Zhan H, Mali P, Dowey S, Williams DM, Jang Y-Y, Dang C V, Spivak JL, Moliterno AR, Cheng L.* Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood* 114, 5473–5480 (2009)

- 45 *Carette JE, Pruszk J, Varadarajan M, Blomen V a, Gokhale S, Camargo FD, Wernig M, Jaenisch R, Brummelkamp TR.* Generation of iPSCs from cultured human malignant cells. *Blood* 115, 4039–4042 (2010)
- 46 *Hu K, Yu J, Suknuntha K, Tian S, Montgomery K, Choi K-D, Stewart R, Thomson J a, Slukvin II.* Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. *Blood* 117, e109–19 (2011)
- 47 *Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N, Otsu M, Nagae G, Ueda K, Nakazaki K, Kamikubo Y, Eto K, Aburatani H, Nakauchi H, Kurokawa M.* Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood* 119, 6234–6242 (2012)
- 48 *Bedel A, Pasquet J-M, Lippert E, Taillepierre M, Lagarde V, Dabernat S, Dubus P, Charaf L, Beliveau F, de Verneuil H, Richard E, Mahon F-X, Moreau-Gaudry F.* Variable behavior of iPSCs derived from CML patients for response to TKI and hematopoietic differentiation. *PLoS One* 8, e71596 (2013)
- 49 *Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S.* A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8, 409–412 (2011)
- 50 *Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, Sato Y, Amano N, Watanabe A, Goshima N, Yamanaka S.* An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells* 31, 458–466 (2013)
- 51 *Takayama N, Nishikii H, Usui J, Tsukui H, Sawaguchi A, Hiroyama T, Eto K, Nakauchi H.* Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood* 111, 5298–5306 (2008)

- 52 *Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Miyagi S, Endoh M, Endo T a, Takayama N, Eto K, Toyoda T, Koseki H, Nakauchi H, Iwama A.* Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* 121, 447–458 (2013)
- 53 *Diaz-Meco MT, Moscat J.* MEK5, a new target of the atypical protein kinase C isoforms in mitogenic signaling. *Mol Cell Biol* 21, 1218–1227 (2001)
- 54 *Buschbeck M, Hofbauer S, Di Croce L, Keri G, Ullrich A.* Abl-kinase-sensitive levels of ERK5 and its intrinsic basal activity contribute to leukaemia cell survival. *EMBO Rep* 6, 63–69 (2005)
- 55 *Yang Q, Deng X, Lu B, Cameron M, Fearn C, Patricelli MP, Yates JR, Gray NS, Lee J.* Pharmacological inhibition of BMK1 suppresses tumor growth through promyelocytic leukemia protein. *Cancer Cell* 18, 258–267 (2010)
- 56 *Amabile G, Welner RS, Nombela-Arrieta C, D’Alise AM, Di Ruscio A, Ebraliidze AK, Kraytsberg Y, Ye M, Kocher O, Neuberg DS, Khrapko K, Silberstein LE, Tenen DG.* In vivo generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells. *Blood* (2012)
- 57 *Doulatov S, Vo LT, Chou SS, Kim PG, Arora N, Li H, Hadland BK, Bernstein ID, Collins JJ, Zon LI, Daley GQ.* Induction of Multipotential Hematopoietic Progenitors from Human Pluripotent Stem Cells via Respecification of Lineage-Restricted Precursors. *Cell Stem Cell* 13, 459–470 (2013)
- 58 *Yang Q, Lee J-D.* Targeting the BMK1 MAP kinase pathway in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 17, 3527–3532 (2011)
- 59 *Finegan KG, Wang X, Lee E, Robinson AC, Tournier C.* Europe PMC Funders Group Regulation of neuronal survival by the extracellular signal- regulated protein kinase 5. 16, 674–683 (2009)
- 60 *Drew B a, Burow ME, Beckman BS.* MEK5/ERK5 pathway: the first fifteen years. *Biochim Biophys Acta* 1825, 37–48 (2012)

- 61 *Ma L, Shan Y, Bai R, Xue L, Eide CA, Ou J, Zhu LJ, Hutchinson L, Cerny J, Khoury HJ, Sheng Z, Druker BJ, Li S, Green MR.* A therapeutically targetable mechanism of BCR-ABL-independent imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Sci Transl Med* 6, 252ra121 (2014)
- 62 *Sturgeon CM, Ditadi A, Awong G, Kennedy M, Keller G.* Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 32, 554–561 (2014)