

## 論文の内容の要旨

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

### 【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。CML の原因遺伝子として知られる *BCR-ABL* 融合遺伝子を標的とした分子標的治療の発展により CML の長期予後は劇的な改善を認めた。しかし一方で、TKI の投与を中断すると一般的には再発を認めることから、*BCR-ABL* 融合遺伝子を標的としたチロシンキナーゼ阻害剤(tyrosine kinase inhibitor : TKI)に耐性を有する CML 幹細胞の存在が示唆されている。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。しかしながら現在まで、マウスモデル、ヒト細胞株、患者検体の既存の疾患モデルを用いた病態研究からは、造血幹細胞移植以外の根治治療法の確立に至っていない。

近年のリプログラミング技術の発展に伴い、induced pluripotent stem cells(iPSCs)が遺伝性疾患細胞のみならず悪性腫瘍細胞からも樹立することが可能となった。実際、血液疾患領域においても、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、疾患モデルとしての検討が進められてきた。そこで今回私は外来遺伝子の挿入がない CML-iPSCs を樹立した。この CML-iPSCs を CML 幹細胞における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行った。

### 【主な材料と方法】

#### 疾患由来 iPSCs の樹立

Okita らによって報告された導入細胞のゲノムに外来遺伝子の挿入が起こらない pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL、pCXWB-EBNA1、episomal vector を用いて遺伝子導入を行った。

#### CML-iPSCs の確認

患者検体より樹立した iPSCs を用いて、*BCR-ABL* に対する半定量 Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)および染色体解析を行い CML-iPSCs であることを確認した。

## **iPSCs の血液分化誘導**

iPSCs の血液分化誘導は、VEGF を添加した血液分化用培地を用いて C3H10T1/2 と iPSCs の共培養にて行った。C3H10T1/2 と iPSCs とを共培養することで sac 様の構造物が得られ(iPS-sac 法)、sac 内で分化誘導された血液細胞を回収することで解析に用いた。

## **CML-iPSCs 由来 pre-hematopoietic progenitor cells(pre-HPCs)のイマチニブ感受性評価**

CML-iPSCs から血液分化誘導した細胞のうち、未分化な CD34 陽性・CD43 陽性・CD45 陰性 pre-hematopoietic progenitor cells(pre-HPCs)のイマチニブ感受性評価を細胞増殖能評価、および apoptosis 解析を用いて行った。

## **CML-iPSC 由来 pre-HPCs の網羅的遺伝子発現解析**

CML-iPSCs 由来 pre-HPCs に 6 時間イマチニブ 2.5 $\mu$ M を曝露したサンプルから RNA を抽出し、クラスター解析および gene sets enrichment analysis(GSEA)解析を含めた網羅的遺伝子発現解析を行った。

### **【結果】**

#### **慢性骨髄性白血病患者検体由来 iPSCs の樹立**

複数の慢性骨髄性白血病慢性期患者の骨髄液から CD34 陽性細胞を濃縮し、*OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2*, *L-MYC*, *EBNA1*, *LIN28*, の導入と p53 の knock down を併用することで iPSCs 様コロニーを得た。iPSCs 様コロニーは幹細胞遺伝子の発現を認め、奇形種形成能を持つことが示された。また外来遺伝子の挿入が無いことも確認され、CML 患者検体から iPSCs を樹立することに成功した。

#### **疾患由来 CML-iPSCs の確認**

CML 患者検体由来の iPSCs において、*BCR-ABL* 融合遺伝子の遺伝子発現および染色体解析を行った。CML 患者検体由来 iPSCs には *BCR-ABL* を発現し、また患者検体と同様に t(9;22)(q34;q11.2) の染色体異常のみを有するクローンが存在することが示された。この結果 CML 疾患細胞から樹立した CML-iPSCs が得られたことが示され、以後の解析に利用した。

#### **CML-iPSCs からの血液分化誘導**

CML-iPSCs を iPS-sac 法を用いて血液分化誘導したところ、CD34 陽性・CD43 陽性の血液細胞を分化誘導できることが示された。

#### **CML-iPSCs 由来 pre-HPCs はイマチニブ耐性の細胞を含む**

CML-iPSCs から分化誘導した血液細胞のうち未分化な CD34 陽性・CD43 陽性・CD45 陰性 pre-hematopoietic progenitor cells(pre-HPCs)の未分化性、イマチニブ感受性を評価した。Pre-HPCs は血球コロニー形成能評価にて多系統への分化能を有する未分化な細胞であることが示された。また、細胞増殖能評価および apoptosis 解析の結果イマチニブに対して耐性示し、CML-iPSCs 由来 pre-HPCs はイマチニブ耐性の細胞を含むことが示された。

### **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 は CML 幹細胞と共通のイマチニブ耐性機構を有することが示唆された。CML 幹細胞においてイマチニブ耐性に寄与する原因遺伝子を同定するため、CML-iPSCs 由来 pre-HPCs にイマチニブを曝露したサンプルを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。GSEA 解析の結果、CML-iPSCs 由来 pre-HPCs においてイマチニブ曝露においてのみ enrich される 9 遺伝子群を抽出した。

### **【考察】**

本研究では CML 幹細胞の解析を行うプラットフォームとして、CML-iPSCs を利用することに着目した。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を行った。その結果、HPCs の前段階と考えられる CD34 陽性・CD43 陽性・CD45 陰性 pre-HPC 分画には、イマチニブ耐性を示すこと細胞が含まれることを示した。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群を抽出した。

CML-iPSCs 由来 pre-HPCs と CML 幹細胞は共通のイマチニブ耐性機構を有している可能性が考えられるため、抽出した 9 遺伝子群に CML 幹細胞のイマチニブ耐性に寄与する遺伝子が含まれることが示唆される。しかしながら、CML-iPSCs は一つの疾患モデルであり、他のモデルでの検証が必要不可欠である。複数のモデルを用いて慎重に検討を行うことで、CML 幹細胞のイマチニブ耐性に寄与する候補遺伝子が同定できる可能性が広がると考えられる。