



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士(薬学)
報告番号	甲第1440号
学位記番号	第301号
氏名	佐藤 大介
授与年月日	平成26年3月25日
学位論文の題名	疾患 iPS 細胞を用いた糖原病 Ib 型における好中球減少症の機序の解明
論文審査担当者	主査： 条 和彦 副査： 松永 民秀, 服部 光治, 林 秀敏

名古屋市立大学学位論文

疾患 iPS 細胞を用いた糖原病 Ib 型における  
好中球減少症の機序の解明

2014 年

名古屋市立大学大学院薬学研究科 臨床薬学分野

佐藤 大介

一. 本論文は2014年3月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 糸 和彦 教授

副査 服部 光治 教授

林 秀敏 教授

松永 民秀 教授

二. 本論文は、学術情報誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

【基礎となる報文】

1. **Daisuke Satoh**, Tohru Maeda, Tetsuya Ito, Yoko Nakajima, Mariko Ohte, Akane Ukai, Katsunori Nakamura, Shin Enosawa, Masashi Toyota, Yoshitaka Miyagawa, Hajime Okita, Nobutaka Kiyokawa, Hidenori Akutsu, Akihiro Umezawa and Tamihide Matsunaga.  
Establishment and directed differentiation of induced pluripotent stem cells from glycogen storage disease type Ib patient.  
Genes to Cells 2013; **18**: 1053–1069.
2. **Daisuke Satoh**, Mariko Ohte, Tohru Maeda, Katsunori Nakamura and Tamihide Matsunaga.  
G6PT inhibition model using HL-60 cells and induction of ROS production through PKC/NOX2 activation: Clinical condition for elucidation of Glycogen storage disease type Ib.  
Biological and Pharmaceutical Bulletin 2014; **37**: 534-540.

三. 本論文の基礎となる研究は、松永 民秀 教授の指導のもとに名古屋市立大学大学院 薬学研究科において行われた。

## 略語一覧

AA	activin A
AFP	$\alpha$ -fetoprotein
ALB	albumin
AP	alkaline phosphatase
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumin
c-MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
CYP	cytochrome P450
DAG	diacylglycerol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEX	dexamethasone
DHAP	dihydroxyacetone phosph- ate
DHE	dihydroethidium
DIDS	4,4-diisothiocyanostilbene-2,2-disulfonic acid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMEM/F12	DMEM and Ham's nutrient mixture F-12
DMSO	dimethyl sulfoxide
DPI	diphenyliodonium chloride
EB	embryoid body
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ES 細胞	胚性幹細胞 (embryonic stem cells)
F6P	fructose 6-phosphate
FBS	fetal bovine serum
FDP	fructose 1,6-bisphosphate
FLK1	vascular endothelial growth factor receptor 1
G3P	glycerol 3-phosphate
G6P	glucose 6-phosphate
G6Pase	glucose-6-phosphatase
G6PT	glucose-6-phosphate transporter
<i>g6pt</i> <sup>(-/-)</sup> マウス	<i>g6pt</i> ノックアウトマウス
<i>g6pt</i> <sup>(+/+)</sup> マウス	野生型マウス
GAP	glyceraldehyde 3-phosphate
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor

GSC	goosecoid
GSDIb	glycogen storage disease type Ib
HGF	hepatocyte growth factor
HNF	hepatocyte nuclear factor
ICG	indocyanine green
IL-3	interleukin-3
iPS 細胞	人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells)
IYIAP	3-(1-(3-imidazol-1-ylpropyl)-1H-indol-3-yl)-4-anilino-1H-pyrrole-2,5-dione
KLF4	kruppel-like factor 4
KO-DMEM	Knockout DMEM
KSR	Knockout Serum Replacement
L-012	8-amino-5-chloro-7-phenylpyridol 3,4-d]pyridazine-1,4-(2H,3H)dione sodium
LB 培地	Lysogeny Broth medium
L-glu	L-glutamine
LTF	lactoferrin
MEF	mouse embryonic fibroblast
MMC	mitomycin C
MMP9	gelatinase
MPO	myeloperoxidase
Mn-SOD	manganese superoxide dismutase
NEAA	non essential amino acid
Nox	NADPH oxidase
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OCT3/4	octamer transcription factor-3/4
PAS	periodic acid-schiff
PBS(-)	Dulbecco's phosphate buffered saline without calcium, magnesium
PEI	polyethylenimine
PFK1	phosphofructokinase-1
PKC	protein kinase C
PGMase	phosphoglucomutase
RFP	fluorescent protein
ROS	活性酸素種 (reactive oxygen species)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

SCF	stem cell factor
S.E.	標準誤差 (standard error)
SOD	superoxide dismutase
SOX	sex determining region Y-box
TAT	tyrosine aminotransferase
Trolox C	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
TPO	thrombopoietin
TUJ1	neuron-specific class III beta-tubulin
VE	vitamin E
VEGF	vascular endothelial growth factor
$\beta$ -MeE	$\beta$ -mercaptoethanol
<i>p</i> NA	<i>p</i> -nitroanilide
$\alpha$ -GP	$\alpha$ -glycerophosphate

疾患 iPS 細胞を用いた糖原病 Ib 型における好中球減少症の機序の解明

佐藤 大介

【背景】糖原病 Ib 型 (glycogen storage disease type Ib, GSDIb; MIM232220) は、glucose 6-phosphate (G6P) 輸送に関与する *glucose-6-phosphate transporter (G6PT)* 遺伝子 (NM\_001467、11q23) の変異が原因で発症する先天性代謝異常症である (Fig. 1)。GSDIb の病態は、glucose 6-phosphatase (G6Pase) 系機能低下により G6P から glucose に変換することができず、肝臓や腎臓に多量の glycogen が蓄積することによる肝腫大・腎腫大、周辺組織を圧迫することによる肝機能異常・腎機能異常を呈する。また、生体内での glucose の大部分は、glycogen 分解や糖新生で産生された G6P の加水分解により生じるため、G6Pase 系機能低下は低血糖を起こす。また、慢性的な低血糖により、血中 insulin/glucagon 比が低下するため、脂肪組織から脂肪酸が遊離して高脂血症となり、肝臓で脂肪酸が triglyceride として蓄積し脂肪肝となる。加えて、GSDIb 患者では上記症状以外にも、特異的な症状として好中球減少症を伴うことが知られているが、その原因は未だ解明されていない。そこで本研究ではこの原因を解明するために、GSDIb 患者から induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) を樹立し、その病態機序の解明を行った。

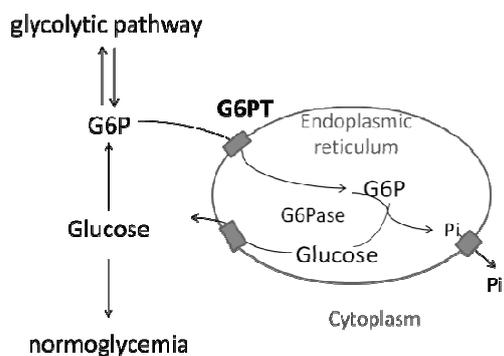


Fig. 1 G6Pase system. The primary *in vivo* function of G6PT is to translocate G6P from the cytoplasm into the lumen of the endoplasmic reticulum. As blood glucose levels fall between meals, G6P produced in the terminal step of gluconeogenesis and glycogenolysis in the liver, kidney, and intestine is transported by G6PT into the endoplasmic reticulum where G6P is hydrolyzed by G6Pase to glucose for release back into the blood

【結果及び考察】

1. GSDIb 患者由来 iPS 細胞の樹立と病態モデルの作出

本研究は、名古屋市立大学 大学病院及び国立成育医療研究センター病院における倫理委員会承認後、承認内容に基づき患者家族からインフォームドコンセントを得て行った。細胞は、生体肝移植時に摘出された肝臓及び皮膚より採取した。本研究ではレトロウイルスによりリプログラミングファクターである *SOX2*、*KLF4*、*I-MYC*、*OCT3/4*、*GLIS1*、*NANOG* を導入することで iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞は未分化な iPS 細胞の特性である

核/細胞質比の大きな細胞から成るコロニーを形成し (Fig. 2)、アルカリフォスファターゼ陽性であった。また、多能性マーカーである内因性 *SOX2*、*KLF4*、*MYC*、*OCT3/4*、*GLIS1*、*NANOG*、*REX*、*GDF3* 遺伝子を発現し、表面マーカーTra-1-60、SSEA3 陽性であった。さらに、*in vitro* において *activin A* 濃度依存的な分化応答性を示し、低用量では外胚葉マーカーTUJ1、中用量では中胚葉マーカーFLK1、高用量では内胚葉マーカーである *SOX17* を発現したことから分化多能性を有する細胞であることが認められた。これらの結果から、樹立した胚性幹細胞様細胞が iPS 細胞であることを確認した。

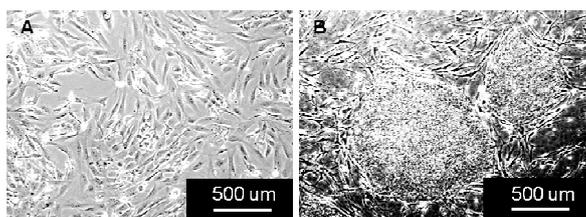


Fig. 2 Morphologic change.  
 (A) Hepatic non-parenchymal cells  
 (B) GSDIb-derived iPS cells

## 2. 肝細胞への分化誘導

樹立した iPS 細胞が GSDIb の病態を反映するモデルとして妥当であることを確認するために、その病態の主症状を示す肝細胞の分化誘導を行った。iPS 細胞から肝細胞への分化誘導は、*activin A* を添加することで内胚葉へと誘導した後に DMSO 処理にて肝芽細胞、*hepatocyte growth factor*、*dexamethasone*、*oncostatin M* にて肝細胞へと誘導した。分化ステージの経過に伴い形態学的変化 (Fig. 3)、及びマーカー遺伝子の発現上昇が認められた。肝細胞まで分化誘導することで多核敷石状の形態を持つ肝細胞上皮様細胞が出現し、肝細胞マーカーである *albumin* の発現のみならず、薬物代謝酵素である *CYP3A4*、*CYP1A2* 等や糖代謝遺伝子 *G6Pase* 等の遺伝子発現が認められた。また *albumin* 分泌についても認められ、肝細胞機能評価法のひとつである *indocyanine green* の取り込み能・排泄能も認められた。

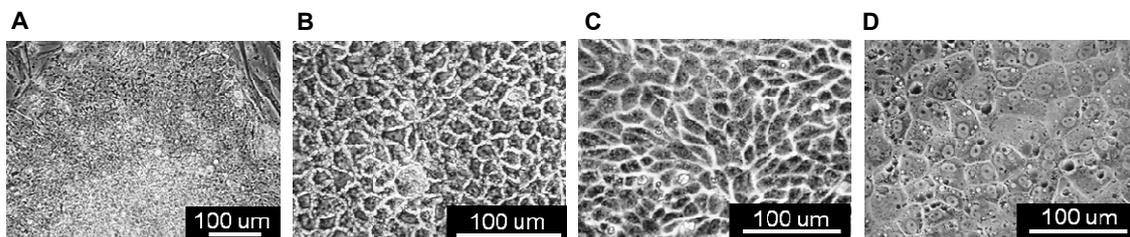


Fig. 3 Differentiation of GSDIb-iPS cells into hepatocytes.

- (A) Undifferentiated iPS cells (day 0).
- (B) Endodermal cells (day 5).
- (C) Hepatic progenitor cells (day 12).
- (D) iPS cell-derived hepatocytes (day 25).

GSDIb 患者では G6Pase 系機能低下により、細胞内糖代謝系が異常亢進することが知られているが、本研究にて樹立された iPS 細胞についても同様に glycogen、G6P、pyruvate、lactate、lipid、urate の蓄積を認めた。さらに誘導した肝細胞は glucagon 負荷による G6P 代謝遅延及び G6Pase の持続的発現上昇 (Fig. 4)、galactose 負荷により lactate 蓄積上昇といった GSDIb における肝細胞の典型的な糖代謝応答を示した。これらの結果から樹立した GSDIb 患者由来 iPS 細胞が患者自身の表現型を示しうるモデルとして妥当であることが示された。

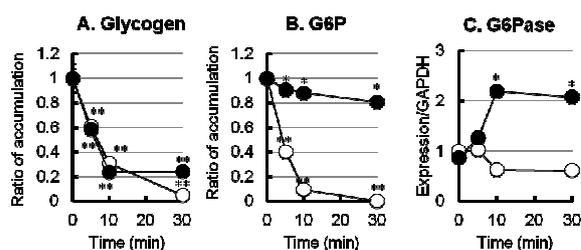


Fig. 4 Glucagon administration assay.  
 ○: Ct-iPSH, control-iPS cell-derived hepatocytes.  
 ●: Pt-iPSH, GSDIb-iPS cell-derived hepatocytes.  
 \*, \*\* $P < 0.05, 0.01$  versus each cells at 0 min (=1).  
 Mean  $\pm$  S.E.,  $n = 3-4$ .

## 2. 好中球への分化誘導

血液細胞への分化誘導方法は vascular endothelial growth factor にて中胚葉へと誘導し、thrombopoietin、interleukin-3、stem cell factor にて血管芽細胞を形成し、granulocyte colony stimulating factor 存在下にて好中球へと誘導した。分化ステージの経過に伴い形態学的変化 (Fig. 5)、及びマーカーの発現が認められた。Day 23 までの分化誘導において特徴的構造物 (iPS-sac) の出現を確認した。これは FLK1 を高発現した血管芽細胞由来嚢状構造をとり、その内部に CD34<sup>+</sup>血管幹細胞が存在した。この内部細胞を Day 32 まで分化誘導した細胞は造血系細胞遺伝子マーカーである *PU.1*、*MMP9*、*MPO*、*C/EBP $\epsilon$*  発現に加え、CD13、CD16、CD45 といった典型的な表面マーカーを発現した。また、zymosan A の取り込み能を有することから、好中球機能のひとつである貪食能を持つことが明らかとなった。

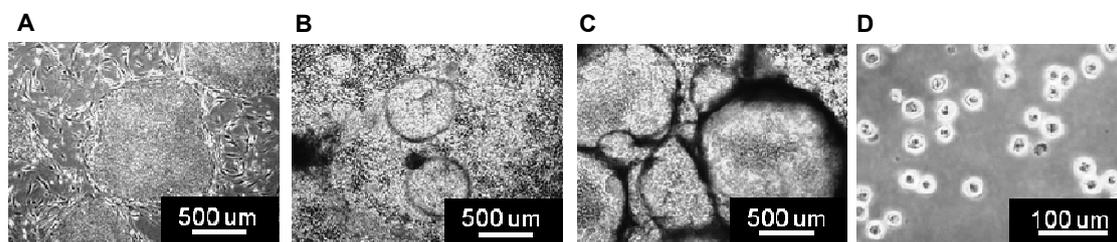


Fig. 5 Differentiation of GSDIb-iPS cells into neutrophils.

- (A) Undifferentiated iPS cells (day 0).
- (B) Mesodermal cells (day 15).
- (C) iPS-sacs (day 23).
- (D) iPS cell-derived neutrophils (day 32).



### 3-3. G6PT 機能低下に伴う PKC 活性化機構の検討

GSDIb における G6PT 機能低下によって惹起される現象を、好中球発生段階における G6P 代謝変動の観点から検討を行った。その結果、Pt-iPSNs では Ct-iPSNs と比較し glycogen、G6P 値は骨髓球において非常に高値を示した。また ATP 値も同様に高かった。一方で分化日数の経過に伴い、これらの糖代謝産物は減少した。これらの現象から GSDIb 患者の骨髓球では、他の臓器と同様に G6P が過剰に蓄積されていることが考えられる。また分化の段階が進行するにつれて好中球機能の中心的な Nox2 構成遺伝子の発現が上昇する。本研究における PKC/Nox2 系に影響を及ぼす経路としては、解糖系に由来する  $\alpha$ -glycerophosphate から生合成される diacylglycerol 量増加を介した PKC 活性化が考えられる。G6P から diacylglycerol の合成経路としては、G6P は解糖系酵素により glycerol 3-phosphate を経て、diacylglycerol が生合成される。また蓄積した G6P の代謝には解糖系のみならず、pentose phosphate 経路も働く。pentose phosphate 経路からは ATP、NAD、FAD の前駆物質となる ribose 5-phosphate を glucose から作り出し、同時に NADPH を産生する。この NADPH は最終的に Nox2 活性化の為に補酵素として働くことが知られており、Nox2 の活性化には複合体形成のみならず、こうした反応基質の存在の増加も酸化ストレス増加を誘発する原因の一つであることを示唆した。一方で酸化ストレス及びアポトーシスが著しく上昇するにつれ、細胞内糖代謝産物が減少する結果は、G6Pase 系の機能ではなく、細胞がアポトーシスを起こした結果引き起こされる現象である可能性を示唆した。

## 4. HL-60 細胞由来 GSDIb モデルを用いた糖代謝に惹起される ROS 産生機序の検討

### 4-1. HL-60 細胞由来 GSDIb モデルの作成

ヒト骨髓性白血病細胞 HL-60 細胞を DMSO 処理により好中球へ分化後、G6PT 阻害薬処理を行い、GSDIb 好中球モデル細胞を得た。この作成したモデルは骨髓から好中球へと分化するのに伴い経時的に ROS 産生が上昇、G6PT 未処置群と比較して有意に上昇した。また前述した Nox2 及び PKC 阻害剤の存在下、その ROS 産生は有意に減少した。これらの結果は前述の仮説を支持する。

### 4-2. 糖代謝が及ぼす ROS 産生への影響

培地中 glucose 濃度の条件を変えて細胞を培養した結果、low-glucose 培地では、HL-60 細胞自身からの ROS 産生量が減少したことから、glucose を反応開始の為に基質とする diacylglycerol/PKC 経路を介することを示唆した。また、細胞膜画分を NADPH と反応させることで glucose 濃度依存的に ROS 産生が上昇したことから、この glucose 濃度依存的な ROS 産生は好中球細胞膜上の Nox2 が関与することを示唆した。また、このときアポトーシスマーカーである caspase-3 及び-9 活性が有意に減少した。

## 【総括】

本研究では患者 iPS 細胞を用いて骨髄球から好中球への分化ステージにおける細胞を解析した。その結果、骨髄球からの分化の初期において G6P、glycogen、ATP の蓄積が認められ、好中球へと分化誘導されるに従い Nox2 複合体の遺伝子発現が上昇し、ROS 産生量が飛躍的に上昇した。最終的に末梢好中球においてはアポトーシスが誘導され、このとき細胞内糖代謝は著しく低下した。従って GSD1b における好中球減少症の機序としては、細胞内 G6P 蓄積からの解糖系亢進に伴う PKC 活性化、Nox2 複合体形成を介する酸化ストレス上昇やアポトーシス活性化が要因であることが示唆された。

また HL-60 細胞を使用した実験系においても iPS 細胞を使用した系と同様の結果が得られた。この系において、その酸化ストレスの産生機序が glucose をその反応基質とする glucose 代謝産物の増加に由来することを示した。

## 【基礎となる報文】

1. **Daisuke Satoh**, Tohru Maeda, Tetsuya Ito, Yoko Nakajima, Mariko Ohte, Akane Ukai, Katsunori Nakamura, Shin Enosawa, Masashi Toyota, Yoshitaka Miyagawa, Hajime Okita, Nobutaka Kiyokawa, Hidenori Akutsu, Akihiro Umezawa and Tamihide Matsunaga.  
Establishment and directed differentiation of induced pluripotent stem cells from glycogen storage disease type Ib patient.  
*Genes to Cells* 2013; **18**: 1053–1069.
2. **Daisuke Satoh**, Tohru Maeda, Katsunori Nakamura and Tamihide Matsunaga.  
G6PT inhibition model using HL-60 cells and induction of ROS production through PKC/NOX2 activation: Clinical condition for elucidation of Glycogen storage disease type Ib.  
*Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2014; **37**: 534–540.
3. **Daisuke Satoh**, Mariko Ohte, Katsunori Nakamura, and Tamihide Matsunaga.  
Mechanism elucidation of neutropenia in Glycogen storage disease type Ib using the patient derived-induced pluripotent stem cell model.  
(in preparation)

## 目次

第一章 序論	1
第二章 糖原病 Ib 型患者由来 iPS 細胞の作出	4
2.1 緒言	4
2.2 実験材料及び実験方法	5
2.2.1 被験者	5
2.2.2 実験材料及び試薬	5
2.2.3 患者組織からの細胞単離及び初代培養	13
2.2.4 PlatGP 細胞の培養	16
2.2.5 MEF の培養	17
2.2.6 OP9 細胞の培養	19
2.2.7 HL-60 細胞の培養	21
2.2.8 糖原病 Ib 型患者 G6PT 遺伝子変異部位の同定	22
2.2.9 ベクタープラスミドの調製	23
2.2.10 ヒト iPS 細胞の樹立及び培養	23
2.2.11 EB 形成法を用いたヒト iPS 細胞の分化多能性の確認	24
2.2.12 分化誘導因子を用いた <i>in vitro</i> における iPS 細胞の分化多能性の確認	27
2.2.13 肝細胞への分化誘導	28
2.2.14 好中球への分化誘導	29
2.2.15 RNA 抽出と PCR	30
2.2.16 染色による評価	32
2.2.17 ICG 取り込み・放出試験	33
2.2.18 糖代謝試験	34
2.2.19 貪食能試験	35
2.2.20 DHE 染色	35
2.2.21 L-012 による ROS 産生量の測定	35
2.2.22 細胞膜フリップフロップの検出	36
2.2.23 Caspase 活性測定	36
2.2.24 タンパク質定量	36
2.2.25 統計処理	36

2.3	実験結果	37
2.3.1	iPS 細胞の樹立	37
2.3.2	iPS 細胞の多能性の確認	40
2.3.3	肝細胞への分化誘導	43
2.3.4	糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞の病態評価	47
2.3.5	好中球への分化誘導	52
2.3.6	糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球の病態評価	56
2.4	考察	60
第三章 糖原病 Ib 型患者由来 iPS 細胞を用いた好中球減少症の機序の検討		65
3.1	緒言	65
3.2	実験材料および実験方法	66
3.2.1	実験材料及び試薬	66
3.2.2	MEF の培養	67
3.2.3	OP9 細胞の培養	68
3.2.4	ヒト iPS 細胞の培養	68
3.2.5	好中球への分化誘導	69
3.2.6	RNA 抽出と PCR	70
3.2.7	染色による評価	71
3.2.8	貪食能試験	72
3.2.9	糖代謝産物の定量	72
3.2.10	ATP の定量	72
3.2.11	L-012 による ROS 産生量の測定	72
3.2.12	細胞膜 Nox2 活性測定	72
3.2.13	Caspase 活性測定	73
3.2.14	統計処理	73
3.3	実験結果	74

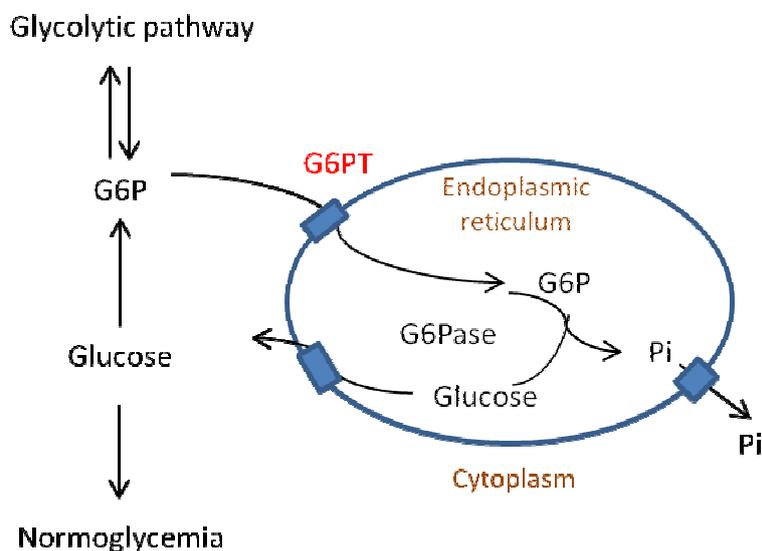
3.3.1	好中球への分化誘導	74
3.3.2	糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞の病態評価	77
3.3.3	ROS 産生機序の解明	80
3.4	考察	84
第四章	HL-60 細胞を用いた好中球減少症の機序の検討	85
4.1	緒言	85
4.2	実験材料及び実験方法	86
4.2.1	実験材料及び試薬	86
4.2.2	HL-60 細胞及びラット肝ミクロソームにおける G6PT 輸送活性測定	87
4.2.3	糖原病 Ib 型好中球モデルの作成と実験目的別の細胞培養方法	88
4.2.4	L-012 による ROS 産生量の測定	88
4.2.5	細胞膜 Nox2 活性測定	89
4.2.6	Caspase 活性測定	89
4.2.7	染色による評価	89
4.2.8	統計処理	90
4.3	実験結果	91
4.3.1	HL-60 細胞を用いた糖原病 Ib 型モデル細胞の評価	91
4.3.2	糖原病 Ib 型モデル細胞における ROS 産生経路の検討	94
4.3.3	糖原代謝異常に惹起される ROS 産生経路の検討	97
4.4	考察	99
4.4.1	HL-60 細胞を用いた糖原病 Ib 型好中球モデル作成	99
4.4.2	Nox2 活性化を介した ROS 産生及びアポトーシス誘導機構の検討	100
4.4.3	PKC を介した Nox2 活性化による ROS 産生経路の検討	101
4.4.4	糖原代謝異常に惹起される ROS 産生経路の検討	102
4.4.5	好中球成熟化に伴う酸化ストレス産生経路の活性化	105
4.4.6	糖原病 Ib 型臨床報告からみた好中球減少症	106
4.4.7	糖原病 Ib 型患者好中球における ROS 産生経路仮説	107

第五章 総括	109
謝辞	110
引用文献	112

## 第一章 序論

糖原病 I 型の歴史的背景として, 1952 年 Cori 夫妻が本症の肝 glucose-6-phosphatase (G6Pase) 活性が著明に低下していることを明らかにした.<sup>1)</sup> しかし, 一部の症例において臨床的には I 型を示すが, 凍結肝で測定した G6Pase 活性は正常な症例が認められ, Ib 型という名称が付けられた. なお Ib 型に対し, 凍結肝でも酵素活性が低いままのものを Ia 型と名付けられた. その後, 1978 年 Naisawa らは, ミクロソーム膜を破壊した状態では, 患者肝 G6Pase 活性は正常を示すが, ミクロソーム膜を破壊しない条件で生検後直ちに測定すると, その活性が著しく低下していることを見出した.<sup>2)</sup> 現在, 糖原病 Ib 型の病因は, ミクロソーム膜における G6Pase の基質 glucose 6-phosphate (G6P) 輸送障害であることが知られている.<sup>3)</sup>

糖原病 I 型の病因は G6Pase 系の異常に起因する. G6Pase 系とは, 小胞体に存在する酵素系であり, G6P を細胞質から小胞体内に輸送する glucose-6-phosphate transporter (G6PT), G6P の脱リン酸化を行う G6Pase 及び phosphoric/pyrophosphoric acid 輸送タンパク質からなる (Fig. 1).<sup>4)</sup> 現在までに, 糖原病 I 型の原因は G6Pase, G6PT, phosphoric/pyrophosphoric acid 輸送タンパク質の遺伝子異常が報告されており, それぞれ Ia 型, Ib 型, Ic 型と付けられている.<sup>5-8)</sup>



**Figure 1. G6Pase system.**

The primary *in vivo* function of G6PT is to translocate G6P from the cytoplasm into the lumen of the endoplasmic reticulum. As blood glucose levels fall between meals, G6P produced in the terminal step of gluconeogenesis and glycogenolysis in the liver, kidney, and intestine is transported by G6PT into the endoplasmic reticulum where G6P is hydrolyzed by G6Pase to glucose for release back into the blood

糖原病 I 型の病態は、前述のように G6Pase 系機能低下により G6P から glucose に変換することができず、肝臓や腎臓に多量の glycogen が蓄積することで肝腫大・腎腫大を引き起こし、それによって周辺組織を圧迫することで肝機能異常・腎機能異常を呈する (Fig. 2)。また、生体内での glucose の大部分は、glycogen 分解や糖新生で産生された G6P の加水分解により生じるため、G6Pase 系機能低下は低血糖を起こし、糖原病 I 型患者は、血糖維持のため glucose やそのポリマーを絶えず摂取しなければならない。また、慢性的な低血糖により、血中 insulin/glucagon 比が低下するため、脂肪組織から脂肪酸が遊離して高脂血症となり、肝臓で脂肪酸が triglyceride として蓄積し脂肪肝となる。本症における高乳酸血症の成因は、glucose に変換されない G6P が解糖系を介して pyruvate と nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) に代謝され、その結果、lactate 産生が亢進することによる。また、高尿酸血症の成因の一つは、腎尿細管における urate と lactate の排泄とが競合するためであり、もう一つにはペントースリン酸回路が活性化されリボースを生じ、その結果、プリン の生合成が高まるためと説明されている。<sup>9-14)</sup>

糖原病 Ib 型 (glycogen storage disease type Ib (GSDIb), MIM232220) は、G6PT 遺伝子 (NM\_001467, 11q23) の変異が原因で発症する先天性代謝異常症であり、10 万人に 1 人の割合で発症する。<sup>9-15)</sup> 現在までにその遺伝子変異は 80 種類以上が報告されており、日本人患者では第二エクソンにおけるミスセンス変異 (W118R) が 40%以上を占めることが報告されている。<sup>16)</sup>

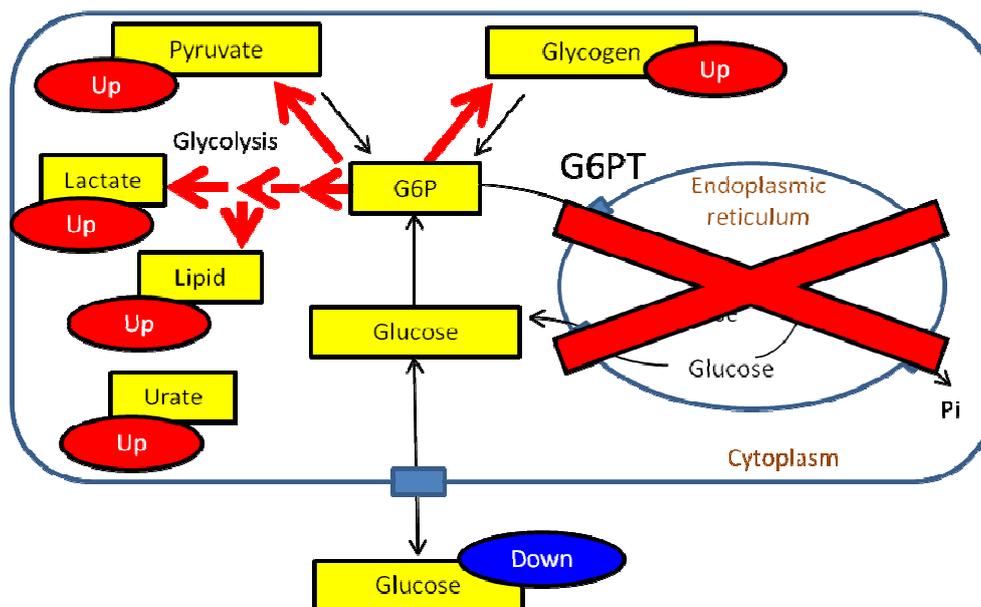


Figure 2. Glycogen storage disease type I.

糖原病 Ib 型患者では Ia 型で認められる症状に加え、特異的な症状として、好中球減少を伴うことが知られているが<sup>17,18)</sup>、その原因は未だ解明されていない。糖原病 Ia 型において好中球減少症が見られないのは、全身に発現する G6PT とは異なり<sup>19)</sup>、G6Pase は発現部位に特異性があるからと考えられている。すなわち、糖原病 I 型の主症状 (glycogen 蓄積, 肝・腎機能異常, 糖放出障害による低血糖等) を呈する肝臓及び腎臓では G6Pase- $\alpha$ <sup>20)</sup> が、好中球では G6Pase- $\beta$ <sup>21)</sup> がそれぞれ発現している。一般に糖原病 Ia 型とされるのは、糖原病の主症状を呈する G6Pase- $\alpha$  遺伝子疾患である。しかし、低血糖などの主症状がみられない G6Pase- $\beta$  遺伝子異常でも、好中球減少症がみられること<sup>22)</sup> を鑑みると、糖原病 Ib 型における好中球減少症は、糖原病 I 型における諸症状と同様、G6Pase 系の機能低下が原因と考えられる。

これまでの糖原病 Ib 型に関する知見として、Kuijpers ら<sup>23)</sup> 及び Kim ら<sup>24)</sup> の報告がある。彼らは糖原病 Ib 型患者及び *g6pt* ノックアウトマウス (*g6pt*<sup>(-/-)</sup>マウス) の好中球では、健康人及び野生型マウス (*g6pt*<sup>(+/+)</sup>マウス) と比較し、酸化ストレス及びアポトーシスの発現が有意に上昇することを報告した。さらに、彼らはそのアポトーシス発現の上昇は酸化ストレスに起因すると考察している。また、この結果を支持する報告として、Melis らの研究がある。<sup>25)</sup> 彼らは糖原病 Ib 型患者における好中球減少症への治療目的として抗酸化作用を有する vitamin E の投薬効果を検討し、糖原病 Ib 型患者の好中球減少症を有意に改善することを報告した。<sup>25)</sup> このように糖原病 Ib 型における好中球減少症の原因として酸化ストレスが関与するという報告は幾つか存在する。しかし、これらの報告は、酸化ストレスを現象として捉えているのみであり、実際問題として糖原病 Ib 型における G6PT 機能低下に起因する活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) 産生経路のメカニズムについては説明していない。

そこで本研究は、糖原病 Ib 型に特徴的な症状である好中球減少症の原因について、糖原病 Ib 型患者から induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) を樹立し、G6PT 機能低下時における糖原代謝の破綻に惹起される ROS 産生のメカニズムの解明を行った。

## 第二章 糖原病 Ib 型患者由来 iPS 細胞の作出

### 2.1 緒言

糖原病 Ib 型を含む先天性代謝異常症はこれまでに 1,000 種類以上の報告があり、疾患の種類によって障害臓器も異なる。その病態は多彩な症状を呈し複雑である。iPS 細胞を用いた研究手法は、標的となる細胞あるいは組織・臓器に分化させることで患者由来の試料として解析することが可能な技術であり、先天性代謝異常症の研究に有効であると考えられる。iPS 細胞は、胚性幹細胞 (embryonic stem cells, ES 細胞) と同様に、自己複製能及び分化多能性を持つ細胞であり、いくつかの転写因子を終末分化したヒト体細胞に導入することによって樹立可能である。<sup>26, 27)</sup> iPS 細胞は生物医学的研究のための強力な手法として期待され、疾患特有の病態モデル作成を容易にした。<sup>28)</sup> 特に症例数の少ない先天性代謝異常症は、病態サンプルやモデルが容易に得られないことで未だ研究が十分に行われていない分野も多く、iPS 細胞の誕生はこのような分野において実験的なプラットフォームを提供した。<sup>29-31)</sup> 疾患特異的 iPS 細胞は、患者の遺伝情報を保持したあらゆる細胞を作製可能であることから、その疾患発症機序の解明の画期的な手法として研究を加速させ、また新たな治療薬の創出に大きく役立つと考えられる。<sup>32, 33)</sup> そこで、未だ解明されていない糖原病 Ib 型患者における好中球減少症の機序を解明すべく、本章では糖原病 Ib 型患者から採取された組織細胞から患者由来 iPS 細胞を樹立し、その iPS 細胞を用いて患者の病態部位である肝細胞及び好中球へと分化誘導し、iPS 細胞を用いた糖原病 Ib 型モデル作成を目的に研究を行った。

## 2.2 実験材料及び実験方法

### 2.2.1 被験者

糖原病 Ib 型患者 (2 歳) は、遺伝学的検査に基づき糖原病 Ib 型と診断された。患者組織検体は生体肝移植の際、切除された組織を実験に使用した。なお本研究は名古屋市立大学大学院医学研究科 (Nagoya, Japan), 国立成育医療研究センター病院 (Tokyo, Japan) の倫理委員会の承認を得た後、そのプロトコールに準拠し行った。また患者は生体肝移植が行われた際、未成年であったため、書面でのインフォームド・コンセントは患者家族から得た。

### 2.2.2 実験材料及び試薬

#### 1) 試薬

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), DMEM and Ham's nutrient mixture F-12 (DMEM/F12), MEM $\alpha$ , L-glutamine (L-glu), non essential amino acid (NEAA), oncostatin M (OSM), dexamethasone (DEX), 8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazine-1,4(2H,3H)dione (L-012), trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Y-27632, CaCl<sub>2</sub>, D(+)-galactose, 45 w/v% D(+)-glucose solution, glycerol, paraformaldehyde, ethanol (99.5%), methanol は Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan) より入手した。Bovine serum albumin (BSA) は Nacalai tesque (Kyoto, Japan) より入手した。Fetal bovine serum (FBS), polyethylenimine (PEI), indocyanine green (ICG),  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -MeE), dimethylsulfoxide (DMSO), gelatin (porcine skin, Type A), leukocyte alkaline phosphatase (AP) kit, periodic acid-schiff (PAS) kit は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より入手した。Dulbecco's phosphate buffered saline without calcium, magnesium (PBS) 用錠剤は DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan) より入手した。SYBR Premix ExTaqII は Takara Bio (Osaka, Japan) より入手した。Platinum ES/EC Retrovirus Expression System (Pantropic) は Cell Biolabs, Inc. (San Diego, CA, USA) より入手した。Knockout Serum Replacement (KSR), Knockout DMEM (KO-DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (GlutaMax 含有), GlutaMax, collagenase IV, Superscript II Reverse Transcriptase, Alexa Fluor 488 (goat-anti mouse IgM 及び rabbit IgG), Alexa Fluor 568 (goat-anti mouse IgG 及び rabbit IgG), Alexa Fluor 488-conjugated zymosan A, borondipyrromethene は Invitrogen Life Science (Carlsbad, CA, USA) より入手した。Basic fibroblast growth factor (bFGF), activin A, hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin-3 (IL-3), stem cell factor (SCF), thrombopoietin (TPO), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) は Pepro Tech (Rocky Hill,

NJ, USA) より入手した. Mitomycin C (MMC) は Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. (Tokyo, Japan) より入手した. セルバンカーは Juji Field Inc. (Tokyo, Japan) より入手した. Accutase は MS Technosystems (Osaka, Japan) より入手した. 霊長類 ES/iPS 細胞用凍結保存液は ReProCELL (Kanagawa, Japan) より入手した. Cosmedium 004 は Cosmo Bio (Tokyo, Japan) より入手した. Polybrene は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より入手した. RNeasy Mini Kit は Qiagen (Valencia, CA, USA) より入手した. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) は Dojindo Molecular Technologies, Inc. (Kumamoto, Japan) より入手した. Glycogen assay kit, lactate assay kit, pyruvate assay kit, adipogenesis assay kit, urate assay kit, ES/iPS cell characterization kit, anti-human sex determining region Y-box (SOX)17 antibody, anti-human neuron-specific class III beta-tubulin (TUJ1) antibody は Funakoshi (Tokyo, Japan) より入手した. Anti-human albumin (ALB) antibody, anti-human vascular endothelial growth factor receptor 1 (FLK1) antibody は Abcam (Cambridge, United Kingdom) より入手した. Anti-human CD13 antibody, Anti-human CD16 antibody, Anti-human CD45 antibody, BD Matrigel Matrix, Growth Factor Reduced は BD Biosciences (Bedford, MA, USA) より入手した. Dihydroethidium (DHE) は Molecular Probes (City of Eugene, OR, USA) より入手した. Annexin V-FITC は Medical Biological Laboratories (Nagoya, Japan) より入手した. Bio-Rad Protein Assay kit は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) より入手した. その他, 実験に使用した試薬類は市販品の特級または生化学用のものを使用した.

## 2) 細胞

ヒト iPS 細胞 (Tic, Dotcom, Windy) は, ヒト胎児 (male, E14 weeks) 肺線維芽細胞 MRC-5 に octamer transcription factor-3/4 (OCT3/4), SOX2, kruppel-like factor 4 (KLF4), v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (c-MYC) を, パントロピックレトロウイルスベクターを用いて導入後, クローン化したものであり, 国立成育医療研究センター梅澤明弘博士よりご供与頂いた. ヒト iPS 細胞株 (iPS201B7) は, caucasian (female, 36 years old) 皮膚線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を導入後, クローン化したものであり, 理化学研究所バイオリソースセンター Cell Bank (Tokyo, Japan) より入手した. フィーダー細胞は mouse embryonic fibroblast (MEF) (Oriental Yeast Co., LTD., Nagano, Japan) を使用した. 本研究で用いたヒト健常人肝細胞は DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan) より入手した. OP9 細胞及び HL-60 細胞は, 理化学研究所バイオリソースセンター Cell Bank (Tokyo, Japan) より入手した.

### 3) 試薬の調製

#### 50 mg/mL Ampicillin 溶液

秤量した 500 mg の ampicillin を 10 mL の滅菌水にて溶解し, 0.22  $\mu$ m フィルターを通して滅菌した. 溶液は -20 °C で保存した.

#### PBS 溶液

PBS 錠を 1 錠/100 mL で溶解し, オートクレーブで滅菌した. PBS 溶液は室温で保存した.

#### 0.05% Trypsin/EDTA 溶液

1 mL の 0.5% trypsin/ EDTA 溶液を 9 mL の PBS で希釈し, 使用まで 4 °C で保存した.

#### 0.25% Trypsin/EDTA 溶液

5 mL の 0.5% trypsin/ EDTA 溶液を 5 mL の PBS で希釈し, 使用まで 4 °C で保存した.

#### iPS 細胞用剥離液

秤量した 100 mg の collagenase, Type IV, powder を 30 mL の PBS にて溶解し, collagenase 溶液とした. collagenase 溶液 30 mL, KSR 20 mL, 2.5% trypsin 10 mL, 1000 mM CaCl<sub>2</sub>/PBS 100  $\mu$ L 及び PBS 40 mL を混合した. その後, 0.22  $\mu$ m フィルターを通して滅菌した. 溶液は -20 °C で保存した.

#### 0.1% Gelatin ストック溶液

0.5 g の gelatin を 500 mL の超純水で溶解し, オートクレーブで滅菌した. 溶液は室温で保存した.

#### 0.1% Collagen type IV 溶液

10 mg の collagen type IV を 10 mL の超純水で溶解し, 0.22  $\mu$ m フィルターを通して滅菌した. 溶液は使用まで 4 °C で保存した.

#### 8 mg/mL Polybrene 溶液

80 mg の polybrene を 10 mL の滅菌済超純水に溶解し, 0.22  $\mu$ m フィルターを通して滅菌した. 溶液は -20 °C で保存した.

### **1 mg/mL PEI 溶液**

10 mg の PEI を 10 mL の滅菌済超純水に溶解し、0.22  $\mu\text{m}$  フィルターを通して滅菌した。溶液は  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### **1 mg/mL MMC 溶液**

2 mg の MMC 注を 2 mL の PBS に溶解した。溶液は  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### **5 mg/mL ICG 溶液**

25 mg の ICG 注を 5 mL の PBS に溶解した。溶液は  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### **10 mM Y-27632 溶液**

5 mg の Y-27632 を 1478  $\mu\text{L}$  の DMSO に溶解した。溶液は  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### **5 $\mu\text{g/mL}$ bFGF 溶液**

bFGF 粉末を 30 秒程度小型遠心機で遠心した。100  $\mu\text{g}$  の bFGF を 100  $\mu\text{L}$  の滅菌済超純水を加えて再構成した (1000  $\mu\text{g/mL}$ )。その後、上記原液を 20 mL の iPS 細胞用基礎培地にて懸濁した (5  $\mu\text{g/mL}$ )。bFGF 溶液はクライオバイアルに分注し、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ディープフリーザーにて保存した。

### **10 $\mu\text{g/mL}$ Activin A 溶液**

Activin A 粉末を 30 秒程度小型遠心機で遠心した。100  $\mu\text{g}$  の activin A は 200  $\mu\text{L}$  の滅菌済超純水を加えて再構成した (500  $\mu\text{g/mL}$ )。上記原液を 10 mL の iPS 細胞用基礎培地にて懸濁した (10  $\mu\text{g/mL}$ )。bFGF 溶液はクライオバイアルに分注し、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ディープフリーザーにて保存した。

### **10 $\mu\text{g/mL}$ HGF 溶液**

HGF 粉末を 30 秒程度小型遠心機で遠心した。10  $\mu\text{g}$  の HGF は 20  $\mu\text{L}$  の滅菌済超純水を加えて再構成した (0.5 mg/mL)。上記原液を 1000  $\mu\text{L}$  の EB 形成用培地に懸濁した (10  $\mu\text{g/mL}$ )。HGF 溶液はクライオバイアルに分注し、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ディープフリーザーにて保存した。

### **10<sup>-1</sup>M DEX 溶液**

19.6 mg の DEX は DMSO を 500  $\mu$ L 加え、完全に溶解した。OSM 溶液はクライオバイアルに分注し、-80 $^{\circ}$ C ディープフリーザーにて保存した。

### **20 $\mu$ g/mL OSM 溶液**

OSM 粉末を 30 秒程度小型遠心機で遠心した。10  $\mu$ g の OSM は 100  $\mu$ L の滅菌済超純水を加えて再構成した (100  $\mu$ g/mL)。上記原液を 400  $\mu$ L の EB 形成用培地に懸濁した (10  $\mu$ g/mL)。OSM 溶液はクライオバイアルに分注し、-80 $^{\circ}$ C ディープフリーザーにて保存した。

### **20 $\mu$ g/mL VEGF 溶液**

VEGF 粉末を 30 秒程度小型遠心機で遠心した。10  $\mu$ g の VEGF は 50  $\mu$ L の 0.1% BSA 含有 PBS を加えて再構成した (200  $\mu$ g/mL)。上記原液を 450  $\mu$ L の滅菌済超純水に懸濁した (20  $\mu$ g/mL)。VEGF 溶液はクライオバイアルに分注し、-80 $^{\circ}$ C ディープフリーザーにて保存した。

### **50 $\mu$ g/mL SCF 溶液**

SCF 粉末を 30 秒程度小型遠心機で遠心した。10  $\mu$ g の SCF は 50  $\mu$ L の 0.1% BSA 含有 PBS を加えて再構成した (200  $\mu$ g/mL)。上記原液を 150  $\mu$ L の滅菌済超純水に懸濁した (50  $\mu$ g/mL)。SCF 溶液はクライオバイアルに分注し、-80 $^{\circ}$ C ディープフリーザーにて保存した。

### **20 $\mu$ g/mL IL-3 溶液**

IL-3 粉末を 30 秒程度小型遠心機で遠心した。10  $\mu$ g の IL-3 は 50  $\mu$ L の 0.1% BSA 含有 PBS を加えて再構成した (200  $\mu$ g/mL)。上記原液を 450  $\mu$ L の滅菌済超純水に懸濁した (20  $\mu$ g/mL)。IL-3 溶液はクライオバイアルに分注し、-80 $^{\circ}$ C ディープフリーザーにて保存した。

### **10 $\mu$ g/mL TPO 溶液**

TPO 粉末を 30 秒程度小型遠心機で遠心した。10  $\mu$ g の TPO は 100  $\mu$ L の 0.1% BSA 含有 PBS を加えて再構成した (100  $\mu$ g/mL)。上記原液を 900  $\mu$ L の滅菌済超純水に懸濁した (10  $\mu$ g/mL)。TPO 溶液はクライオバイアルに分注し、-80 $^{\circ}$ C ディープフリーザーにて保存した。

#### **G-CSF (10 µg/mL)**

G-CSF 粉末を 30 秒程度小型遠心機で遠心した。10 µg の G-CSF は 100 µL の 0.1% BSA 含有 PBS を加えて再構成した (100 µg/mL)。上記原液を 900 µL の滅菌済超純水に懸濁した (10 µg/mL)。G-CSF 溶液はクライオバイアルに分注し、-80°C ディープフリーザーにて保存した。

#### **4) 培地の調製**

##### **Lysogeny Broth (LB) 培地 (50 µg/mL ampicillin)**

培地組成は NaCl 5g, Trypton 5 g, 乾燥酵母 2.5 g を滅菌水 500 mL に溶解し、オートクレーブ滅菌し調製した。培地温度が 50°C 以下になったことを確認後、50 mg/mL ampicillin 溶液を 500 µL 添加した。

##### **細胞培養用基礎培地**

培地組成は 10% FBS, 2 mM L-glu, 0.1 mM NEAA, 100 units/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin を含む DMEM (High Glucose) 培地とした。

##### **PlatGP 細胞用基礎培地**

培地組成は 10% FBS, 2 mM L-glu, 0.1 mM NEAA を含む DMEM (High Glucose) 培地とした。

##### **OP9 細胞用基礎培地**

培地組成は 20% FBS, 2 mM L-glu, 0.1 mM NEAA, 100 units/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin を含む MEM $\alpha$  培地とした。

##### **HL-60 細胞用基礎培地**

培地組成は 10% FBS, 2 mM L-glu, 0.1 mM NEAA, 100 units/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin を含む RPMI1640 培地とした。

##### **iPS 細胞用基礎培地**

培地組成は 20% KSR, 0.08 mM NEAA, 2 mM L-glu, 100 units/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin, 0.1 mM  $\beta$ -MeE を含む DMEM Ham's F-12 培地とした。

### **Embryoid body (EB) 形成用培地**

培地組成は 20% KSR, 0.08 mM NEAA, 2 mM L-glu, 100 units/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin, 0.1 mM β-MeE を含む KO-DMEM 培地とした.

### **肝細胞分化基礎培地 I**

培地組成は 0.5% KSR, Glutamax, 100 units/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin を含む RPMI1640 培地とした.

### **肝細胞分化基礎培地 II**

培地組成は 2% KSR, Glutamax, 100 units/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin を含む RPMI1640 培地とした.

### **肝細胞分化基礎培地 III**

培地組成は 20% KSR, 0.1mM NEAA, 2 mM L-glu, 1% DMSO, 100 units/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin, 0.1 mM β-MeE を含む KO-DMEM 培地とした.

### **血液細胞分化基礎培地**

培地組成は 10% FBS, 2 mM L-glu, 0.1 mM NEAA, 100 units/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin を含む MEMα 培地とした.

### **Glucagon 負荷試験培地**

培地組成は 100 nM glucagon, 2mM L-glu, 0.5% BSA を含む DMEM (glucose (-)) 培地とした.

### **Glucose/galactose 負荷試験前培地**

培地組成は 2 mM L-glu, 0.5% BSA を含む DMEM (glucose (-)) 培地とした.

### **Glucose 負荷試験培地**

培地組成は 2 mM L-glu, 0.5% BSA を含む DMEM (10 mM glucose) 培地とした.

### **Galactose 負荷試験培地**

培地組成は 2 mM L-glu, 0.5% BSA を含む DMEM (0 mM glucose, 10 mM galactose) 培地とした。

### **5) 培養プレートの準備**

#### **LB 寒天培地 (50 µg/mL ampicillin)**

培地組成は NaCl 1.0 g, trypton 1.0 g, 乾燥酵母 0.5 g を滅菌水 100 mL に溶解し、オートクレーブ滅菌し調製した。培地温度が 50 °C 以下になったことを確認後, 50 mg/mL ampicillin 溶液を 100 µL 添加した。その後培地はデカントにて 10 mL/100 mm dish ずつ添加し, 寒天が固まるまで静置した。寒天が固まったことを確認後, プレートは使用まで 4 °C にて保存した。

#### **Gelatin コーティングディッシュの作製**

細胞培養用ディッシュの底面を覆うように 0.1% gelatin 溶液を添加し, 4 °C にて一晩静置した。

#### **Collagen type IV コーティングプレートの作製**

細胞培養用ディッシュの底面を覆うように collagen type IV 溶液を添加し, 4 °C にて一晩静置した。

#### **マトリゲルプレートの作製**

細胞培養用ディッシュの底面を覆うようヒト iPS 細胞用培地にて 30 倍に希釈した GFR Matrigel を添加し, 使用する直前まで 4 °C にて保存した。マトリゲルプレートは使用する 1 時間前に 37 °C インキュベーターに静置後、使用した。

## 2.2.3 患者組織からの細胞単離及び初代培養

### 1) 患者肝臓から細胞単離及び初代培養

#### 1-1) 肝臓から細胞の調製

肝細胞分離に用いる肝組織は、組織切断面より小葉肝動脈もしくは中心静脈を確保し、血管腔へカニューレを挿入後血管周囲とともにカニューレを結索することにより固定し、灌流路を確保した。前灌流液 (NaHCO<sub>3</sub>, HEPES, ethylenediaminetetraacetic acid を含む Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 不含 Hanks 平衡塩溶液) をシリンジにより肝組織内へ灌流し、組織内の残留血液を除去した。次いでカニューレをペリスタポンプに接続し、37 °C 保温条件下で collagenase 液 (CaCl<sub>2</sub> および collagenase 含有前還流液) にて 20 分間灌流し、組織構造を消化した。Collagenase 液での灌流処置後、駒込ピペットにより組織を分散し、ガーゼとナイロンメッシュにて濾過することにより大型の細胞塊を除去し、肝臓細胞の懸濁液を得た。得られた肝臓細胞懸濁液を遠心により、肝実質細胞と非実質細胞へ分画した。得られた肝実質細胞分画はさらに二回遠心分離することにより肝実質細胞純度を確保した。また非実質細胞分画は密度勾配遠心法によりさらに分画し、肝星細胞等の肝非実質細胞を単離した。単離した細胞は市販の細胞凍結保存液 (セルバンカー) を用いて凍結処理を行い、液体窒素中において保管した。

#### 1-2) 肝実質細胞の培養

37°C の水浴で温めた Cosmedium 004 を 15 mL 遠沈管に 10 mL 採取した。凍結した肝実質細胞を取り出し、37°C の水浴で半融解させた。15 mL 遠沈管から培地を 1 mL 程度とり、凍結チューブに添加し細胞を融解した後、15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、Cosmedium 004 培地 4 mL で懸濁した。Collagen IV コーティングディッシュから collagen type IV 溶液を吸引除去し、肝実質細胞を播種し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて培養した。なお本研究に用いた肝実質細胞はいずれも培養 48 時間以内のものである。

### 1-3) 肝非実質細胞の培養

#### 1-3-1) 肝非実質細胞の解凍

37°C の水浴で温めた細胞培養用基礎培地を 15 mL 遠沈管に 10 mL 採取した。凍結した肝非実質細胞を取り出し、37°C の水浴で半融解させた。15 mL 遠沈管から培地を 1 mL 程度とり、チューブに添加し細胞を融解した後、15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、細胞培養用基礎培地 4 mL で懸濁した。Gelatin コーティングディッシュ 4 枚から溶液を吸引除去し、細胞密度が  $7 \times 10^5$  cells/100 mm dish になるように播種した。5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて培養した。

#### 1-3-2) 肝非実質細胞の継代

肝非実質細胞は、培養約 2~3 日でコンフルエントになるため、継代を行った。細胞培養用基礎培地、0.05% trypsin-EDTA、PBS を 37°C の水浴で温めた。コンフルエントになった肝非実質細胞の培養液を吸引除去し、PBS 10 mL/100 mm dish で洗浄した。0.05% Trypsin-EDTA を 1 mL/100 mm dish で添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 5 分間処理した。細胞培養用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収した。さらに細胞培養用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、残りの細胞も 15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、細胞培養用基礎培地 5 mL で懸濁した。Gelatin コーティングディッシュ 5 枚から gelatin 溶液を吸引除去し、細胞培養用基礎培地を 9 mL/100 mm dish で添加し、肝非実質細胞懸濁液を 1 mL/100 mm dish で播種した。5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて培養した。

#### 1-3-3) 肝非実質細胞の保存

PBS、0.05% trypsin-EDTA、細胞培養用基礎培地を 37°C の水浴で温めた。肝非実質細胞の培養ディッシュから培養液を吸引除去し、PBS 10 mL/100 mm dish で洗浄した。0.05% Trypsin-EDTA を 1 mL/100 mm dish で添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 2 分間処理した。細胞培養用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収した。さらに細胞培養用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、残りの細胞も 15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去した。セルバンカー 500  $\mu$ L で懸濁し、細胞保存用チューブに回収し、-80°C にて使用するまで保存した。

## 2) 皮膚組織からの細胞単離及び初代培養

### 2-1) 皮膚検体からの細胞調製

培養開始まで皮膚組織は細胞培養用基礎培地に浸漬させた。採取した組織を 70% エタノールに軽く浸漬させ、その後 100 units/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin を含む PBS に浸漬させた。組織を 5~10 mm<sup>2</sup> に切断し、組織片を 60 mm ディッシュに軽く押し当てるように接着させた。ディッシュのフタを開けた状態で 30 分間風乾させた後、細胞培養用培地 5 mL/60 mm dish を加え、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて培養した。その後、培地はケラチノサイトの遊走したことを確認後に交換した。以降培地交換は 2~3 日毎に行った。1~2 週間の培養によりディッシュの約 50% 程度まで皮膚線維芽細胞が増殖した。

### 2-2) 皮膚線維芽細胞の継代

皮膚線維芽細胞は、培養約 3 日でコンフルエントになるため、継代を行った。細胞培養用基礎培地, 0.05% trypsin-EDTA, PBS を 37°C の水浴で温めた。コンフルエントになった皮膚線維芽細胞の培養液を吸引除去し、PBS 10 mL/100 mm dish で洗浄した。0.05% Trypsin-EDTA を 1 mL/100 mm dish で添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 5 分間処理した。細胞培養用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収した。さらに細胞培養用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、残りの細胞も 15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、細胞培養用基礎培地 5 mL で懸濁した。Gelatin コーティングディッシュ 5 枚から gelatin 溶液を吸引除去し、細胞培養用基礎培地を 9 mL/100 mm dish で添加し、皮膚線維芽細胞懸濁液を 1 mL/100 mm dish で播種した。5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて培養した。

### 2-3) 皮膚線維芽細胞培養の凍結保存

PBS, 0.05% trypsin-EDTA, 細胞培養用基礎培地を 37°C の水浴で温めた。皮膚線維芽細胞の培養ディッシュから培養液を吸引除去し、PBS 10 mL/100 mm dish で洗浄した。0.05% Trypsin-EDTA を 1 mL/100 mm dish で添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 5 分間処理した。細胞培養用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収した。さらに細胞培養用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、残りの細胞も 15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去した。セルバカンカー 500 µL で懸濁し、細胞保存用チューブに回収し、-80°C にて使用するまで保存した。

## 2-4) 皮膚線維芽細胞培養の解凍

37°Cの水浴で温めた細胞培養用基礎培地を15 mL遠沈管に10 mL採取した。凍結した皮膚線維芽細胞を取り出し、37°Cの水浴で半融解させた。15 mL遠沈管から培地を1 mL程度とり、MEFのチューブに添加し細胞を融解した後、15 mL遠沈管に回収した。1,000 rpmで5分間遠心後、上清を吸引除去し、細胞培養用基礎培地4 mLで懸濁した。Gelatinコーティングディッシュからgelatin溶液を吸引除去し、細胞培養用基礎培地を9 mL/100 mm dishで添加し、皮膚線維芽細胞懸濁液を1 mL/100 mm dishで播種した。5% CO<sub>2</sub>/95% air条件下CO<sub>2</sub>インキュベーター中37°Cにて培養開始した。

## 2.2.4 PlatGP 細胞の培養

### 1) PlatGP 細胞の解凍

37°Cの水浴で温めたPlatGP細胞用基礎培地を15 mL遠沈管に10 mL採取した。凍結したPlatGP細胞を取り出し、37°Cの水浴で半融解させた。15 mL遠沈管から培地を1 mL程度とり、PlatGP細胞のチューブに添加し細胞を融解した後、15 mL遠沈管に回収した。1,000 rpmで5分間遠心後、上清を吸引除去し、PlatGP細胞用基礎培地5 mLで懸濁した。Gelatinコーティングディッシュ5枚からgelatin溶液を吸引除去し、PlatGP細胞用基礎培地を2 mL/100 mm dishで添加し、PlatGP細胞懸濁液を1 mL/100 mm dishで播種した。5% CO<sub>2</sub>/95% air条件下CO<sub>2</sub>インキュベーター中37°Cにて培養した。

### 2) PlatGP 細胞の継代

PlatGP細胞は、培養約3日でコンフルエントになるため、継代を行った。PlatGP細胞用基礎培地、0.05% trypsin-EDTA、PBSを37°Cの水浴で温めた。コンフルエントになったPlatGP細胞の培養液を吸引除去し、PBS 10 mL/100 mm dishで洗浄した。0.05% Trypsin-EDTAを1 mL/100 mm dishで添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air条件下CO<sub>2</sub>インキュベーター中37°Cにて2分間処理した。PlatGP細胞用基礎培地を5 mL/100 mm dishで添加し、細胞懸濁液を15 mL遠沈管に回収した。さらにPlatGP細胞用基礎培地5 mL/100 mm dishで添加し、残りの細胞も15 mL遠沈管に回収した。1,000 rpmで5分間遠心後、上清を吸引除去し、PlatGP細胞用基礎培地5 mLで懸濁した。Gelatinコーティングディッシュ5枚からgelatin溶液を吸引除去し、PlatGP細胞用基礎培地を2 mL/100 mm dishで添加し、PlatGP細胞懸濁液を1 mL/100 mm dishで播種した。5% CO<sub>2</sub>/95% air条件下CO<sub>2</sub>インキュベーター中37°Cにて培養した。

### 3) PlatGP 細胞の凍結保存

PBS, 0.05% trypsin-EDTA, PlatGP 細胞用基礎培地を 37 °C の水浴で温めた. PlatGP 細胞の培養ディッシュから培養液を吸引除去し, PBS 10 mL/100 mm dish で洗浄した. 0.05% Trypsin-EDTA を 1 mL/100 mm dish で添加し, 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37 °C にて 2 分間処理した. PlatGP 細胞用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し, 細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収した. さらに PlatGP 細胞用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し, 残りの細胞も 15 mL 遠沈管に回収した. 1,000 rpm で 5 分間遠心後, 上清を吸引除去した. セルバンカー 500  $\mu$ L で懸濁し, 細胞保存用チューブに回収し, -80 °C にて使用するまで保存した.

## 2.2.5 MEF の培養

### 1) MEF の解凍

37 °C の水浴で温めた細胞培養用基礎培地を 15 mL 遠沈管に 10 mL 採取した. 凍結した MEF を取り出し, 37 °C の水浴で半融解させた. 15 mL 遠沈管から培地を 1 mL 程度とり, MEF のチューブに添加し細胞を融解した後, 15 mL 遠沈管に回収した. 1,000 rpm で 5 分間遠心後, 上清を吸引除去し, 細胞培養用基礎培地 4 mL で懸濁した. Gelatin コーティングディッシュ 4 枚から gelatin 溶液を吸引除去し, 細胞培養用基礎培地を 9 mL/100 mm dish で添加し, MEF 懸濁液を 1 mL/100 mm dish で播種した. 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37 °C にて培養した.

### 2) MEF の継代

MEF は, 培養約 3 日でコンフルエントになるため, 継代を行った. 細胞培養用基礎培地, 0.05% trypsin-EDTA, PBS を 37 °C の水浴で温めた. コンフルエントになった MEF の培養液を吸引除去し, PBS 10 mL/100 mm dish で洗浄した. 0.05% Trypsin-EDTA を 1 mL/100 mm dish で添加し, 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37 °C にて 5 分間処理した. 細胞培養用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し, 細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収した. さらに細胞培養用基礎培地 5 mL/100 mm dish で添加し, 残りの細胞も 15 mL 遠沈管に回収した. 1,000 rpm で 5 分間遠心後, 上清を吸引除去し, 細胞培養用基礎培地 5 mL で懸濁した. Gelatin コーティングディッシュ 5 枚から gelatin 溶液を吸引除去し, 細胞培養用基礎培地を 9 mL/100 mm dish で添加し, MEF 懸濁液を 1 mL/100 mm dish で播種した. 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件

下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて培養した. MEF 培養ディッシュ 1 枚当り gelatin コーティングディッシュ 5 枚に継代した.

継代後, 約 3 日でコンフルエントになるので, 再度上記の方法で継代を行った. その際は, MEF 培養ディッシュ 1 枚当り gelatin コーティングディッシュ 5 枚に継代した.

### 3) MEF の MMC 処理

MEF は, iPS 細胞培養時にフィーダー細胞として用いることから, 細胞増殖を抑制するため MMC 処理を行った. PBS, 10 µg/mL MMC を含む細胞培養用基礎培地を 37°C の水浴で温めた. コンフルエントの培養ディッシュから培養液を吸引除去し, MMC 含有細胞培養用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し, 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 90 分間処理した. その後 MMC 含有細胞培養用基礎培地を吸引除去し, PBS 10 mL/100 mm dish で 2 回洗浄し, 細胞培養用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し, 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 3 時間〜一晩静置した.

### 4) MMC 処理 MEF の凍結保存

PBS, 0.05% trypsin-EDTA, 細胞培養用基礎培地を 37°C の水浴で温めた. MMC 処理を行った MEF の培養ディッシュから培養液を吸引除去し, PBS 10 mL/100 mm dish で洗浄した. 0.05% Trypsin-EDTA を 1 mL/100 mm dish で添加し, 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 5 分間処理した. 細胞培養用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し, 細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収した. さらに細胞培養用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し, 残りの細胞も 15 mL 遠沈管に回収した. 1,000 rpm で 5 分間遠心後, 上清を吸引除去した. セルバンカー 500 µL で懸濁し, 細胞保存用チューブに回収し, -80°C にて使用するまで保存した.

### 5) フィーダー細胞としての MMC 処理 MEF の解凍

37°C の水浴で温めた細胞培養用基礎培地を 15 mL 遠沈管に 10 mL 採取した. 凍結した MMC 処理した MEF を, 37°C の水浴で半融解させた. 15mL 遠沈管から培地を 1 mL 程度とり, MMC 処理した MEF のチューブに添加し細胞を融解した後, 15mL 遠沈管に回収した. 1,000 rpm で 5 分間遠心後, 上清を吸引除去し, 細胞培養用基礎培地 1 mL で懸濁した. Gelatin コーティングディッシュから gelatin 溶液を吸引除去し, 細胞培養用基礎培地を約 10 mL 添加し, MEF 懸濁液を細胞数が  $5\sim 7\times 10^5$  cells/100 mm dish になるように播種した. 播種後, 3 時

間以上 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37 °C にて培養したものをフィーダー細胞として用いた。

## 2.2.6 OP9 細胞の培養

### 1) OP9 細胞の解凍

37 °C の水浴で温めた OP9 細胞用基礎培地を 15 mL 遠沈管に 10 mL 採取した。凍結した OP9 細胞を取り出し、37 °C の水浴で半融解させた。15 mL 遠沈管から培地を 1 mL 程度とり、OP9 細胞のチューブに添加し細胞を融解した後、15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、OP9 細胞用基礎培地 4 mL で懸濁した。Gelatin コーティングディッシュから gelatin 溶液を吸引除去し、OP9 細胞用基礎培地を 9 mL/100 mm dish で添加し、OP9 細胞懸濁液を 1 mL/100 mm dish で播種した。5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37 °C にて培養した。

### 2) OP9 細胞の継代

OP9 細胞は、培養約 3 日でコンフルエントになるため、継代を行った。OP9 細胞用基礎培地、0.25% trypsin-EDTA、PBS を 37 °C の水浴で温めた。コンフルエントになった OP9 細胞の培養液を吸引除去し、PBS 10 mL/100 mm dish で洗浄した。0.25% Trypsin-EDTA を 1 mL/100 mm dish で添加し、5 % CO<sub>2</sub>/95 % air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37 °C にて 5 分間処理した。OP9 細胞用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収した。さらに OP9 細胞用基礎培地 5 mL/100 mm dish で添加し、残りの細胞も 15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、OP9 細胞用基礎培地 5 mL で懸濁した。Gelatin コーティングディッシュから gelatin 溶液を吸引除去し、OP9 細胞用基礎培地を 9 mL/100 mm dish で添加し、OP9 細胞懸濁液を 1 mL/100 mm dish で播種した。5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37 °C にて培養した。OP9 細胞培養ディッシュ 1 枚当り gelatin コーティングディッシュ 5 枚に継代した。

### 3) OP9 細胞の MMC 処理

OP9 細胞は、iPS 細胞分化時にフィーダー細胞として用いることから、細胞増殖を抑制するため MMC 処理を行った。PBS, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MMC を含む OP9 細胞用基礎培地を 37 $^{\circ}\text{C}$  の水浴で温めた。コンフルエントの培養ディッシュから培養液を吸引除去し、MMC 含有 OP9 細胞用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、5%  $\text{CO}_2$ /95% air 条件下  $\text{CO}_2$  インキュベーター中 37 $^{\circ}\text{C}$  にて 90 分間処理した。その後 MMC 含有 OP9 細胞用基礎培地を吸引除去し、PBS 10 mL/100 mm dish で 2 回洗浄し、OP9 細胞用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、5%  $\text{CO}_2$ /95% air 条件下  $\text{CO}_2$  インキュベーター中 37 $^{\circ}\text{C}$  にて 3 時間～一晩静置した。

### 4) MMC 処理 OP9 細胞の凍結保存

PBS, 0.25% trypsin-EDTA, OP9 細胞用基礎培地を 37 $^{\circ}\text{C}$  の水浴で温めた。MMC 処理を行った OP9 細胞の培養ディッシュから培養液を吸引除去し、PBS 10 mL/100 mm dish で洗浄した。0.25% Trypsin-EDTA を 1 mL/100 mm dish で添加し、5%  $\text{CO}_2$ /95% air 条件下  $\text{CO}_2$  インキュベーター中 37 $^{\circ}\text{C}$  にて 5 分間処理した。OP9 細胞用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収した。さらに OP9 細胞用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、残りの細胞も 15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去した。セルバンカー 500  $\mu\text{L}$  で懸濁し、細胞保存用チューブに回収し、-80 $^{\circ}\text{C}$  にて使用するまで保存した。

### 5) フィーダー細胞としての MMC 処理 OP9 細胞の解凍

37 $^{\circ}\text{C}$  の水浴で温めた細胞培養用基礎培地を 15 mL 遠沈管に 10 mL 採取した。凍結した MMC 処理した OP9 細胞を、37 $^{\circ}\text{C}$  の水浴で半融解させた。15 mL 遠沈管から培地を 1 mL 程度とり、MMC 処理した OP9 細胞のチューブに添加し細胞を融解した後、15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、細胞培養用基礎培地 1 mL で懸濁した。Gelatin コーティングディッシュから gelatin 溶液を吸引除去し、細胞培養用基礎培地を約 10 mL 添加し、OP9 細胞懸濁液を細胞数が  $5\sim 7\times 10^5$  cells/100 mm dish になるように播種した。播種後、3 時間以上 5%  $\text{CO}_2$ /95% air 条件下  $\text{CO}_2$  インキュベーター中 37 $^{\circ}\text{C}$  にて培養したものをフィーダー細胞として用いた。

## 2.2.7 HL-60 細胞の培養

### 1) HL-60 細胞の解凍

37°C の水浴で温めた HL-60 細胞用基礎培地を 15 mL 遠沈管に 10 mL 採取した。凍結した HL-60 細胞を取り出し、37°C の水浴で半融解させた。15 mL 遠沈管から培地を 1 mL 程度とり、HL-60 細胞のチューブに添加し細胞を融解した後、15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、HL-60 細胞用基礎培地 4 mL で懸濁した。HL-60 細胞用基礎培地を 9 mL/100 mm dish で添加し、HL-60 細胞懸濁液を 1 mL/100 mm dish で播種した。5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて培養した。

### 2) HL-60 細胞の継代

HL-60 細胞は、培養約 3 日でコンフルエントになるため、継代を行った。HL-60 細胞用基礎培地を 37°C の水浴で温めた。コンフルエントになった HL-60 細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、HL-60 細胞用基礎培地 5 mL で懸濁した。HL-60 細胞用基礎培地を 9 mL/100 mm dish で添加し、HL-60 細胞懸濁液を 1 mL/100 mm dish で播種した。5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて培養した。HL-60 細胞培養ディッシュ 1 枚当りディッシュ 5 枚に継代した。

### 3) MMC 処理 HL-60 細胞の凍結保存

HL-60 細胞は、培養約 3 日でコンフルエントになるため、継代を行った。HL-60 細胞用基礎培地を 37°C の水浴で温めた。コンフルエントになった HL-60 細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去した。セルバンカー 500  $\mu$ L で懸濁し、細胞保存用チューブに回収し、-80°C にて使用するまで保存した。

### 4) HL-60 細胞の好中球への分化誘導

HL-60 細胞用基礎培地を 37°C の水浴で温めた。HL-60 細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収し、1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、HL-60 細胞用基礎培地 5 mL で懸濁した。HL-60 細胞懸濁液を細胞数が  $5 \times 10^5$  cells/100 mm dish になるように播種した。播種後、培地に最終濃度が 1.25% となるように DMSO を添加した。DMSO 添加から 4 日後、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37 °C にて培養したものをコントロール好中球として用いた。

## 2.2.8 糖原病 Ib 型患者 *G6PT* 遺伝子変異部位の同定

### 1) PCR

PCR 反応液組成は, PCR Master Mix 25  $\mu$ L, 50 pmol/ $\mu$ L primer (forward) 1 $\mu$ L, 50 pmol/ $\mu$ L primer (reverse) 1  $\mu$ L, genomic DNA 0.5  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 22.5  $\mu$ L を混合し, 全量を 50  $\mu$ L とした. 反応条件は, 熱変性 95 °C, 10 分→熱変性 95 °C, 30 秒→アニーリング 55 °C, 1 分→伸長反応 72 °C, 1 分→伸長反応 72 °C, 5 分→4 °C ( $\infty$ ) の工程で行った. PCR サイクル数は 35 サイクルとした. PCR の条件を Table 1 に示す.

### 2) 電気泳動

PCR 反応終了後, 得られた PCR product を 2% agarose gel で約 20 分間電気泳動を行い, 泳動後の agarose gel は ethidium bromide 液で 20 分間染色した. FAS II (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて agarose gel に紫外線を照射し, バンドを 10×2 mm 四方切り取り取った.

### 3) PCR product DNA 抽出

PCR product からの DNA の抽出は, 上記の 10×2 mm 四方 agarose gel より QIA quick Gel Extraction Kit のプロトールに従い行った.

### 4) ダイレクトシーケンス

反応組成は, Premix 4  $\mu$ L, Big Dye Sequencing Buffer 2  $\mu$ L, 0.5 pmol/ $\mu$ L Primer 6  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 4  $\mu$ L, PCR product DNA 4  $\mu$ L を混合し全量を 20  $\mu$ L とした. 反応条件は, 熱変性 96 °C, 1 分→熱変性 96 °C, 10 秒→アニーリング 55 °C, 5 秒→伸長反応 60 °C, 4 分→4 °C ( $\infty$ ) の工程で行った. Primer は PCR の項と同一である.

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, CA, USA)を用いて, Run time は全て 120 分, Injection time は 30 秒の設定で行った.

**Table 1 Primer sequence for *G6PT* genomic analysis.**

G6PT exon No.	Forward primer sequence (5'to 3')	Reverse primer sequence (5'to 3')
1	AGGCTGTGCGTCTTGGCTGGTAGGG	TTCTGTGTCCCAGGTCCACCA
2	CCTTCTTTCATTGCTCCTGTGTTT	CTCTATGACAATCCAACAGGCTC
3	CTGCCCATCTGACCCACCCCTCA	AGTGGTCGGTCTGGGTGGGGGCTC
4	GGGGAGAGCAGTCAGGCAGAGCCT	CTGCTCCTTATGCCACCCCTTGTC
5	TCCCTCTTCCCACCACAACCTCCCT	CCCTTCTCCTTCTGTCCCTTCTG
6	TGTTCTGAGGACGTGACATTGCCG	CCTTGTGCCCTGCCGTGAGCC
7	TCTGGCCTGGTTTTCTTTTCTTC	GTGAGACAGACCAGGAGAAAAACC
8	CTCTGAATGCCACTCCACTCTCCC	ACAGGTGGGGGTGAGGGAGAGACT
9	GCTTAGGTTCTTCCCTTTCCCTG	GAGCGTGCAGGGGAAGGCCACCG

## 2.2.9 ベクタープラスミドの調製

### 1) 形質転換

本研究に用いた iPS 細胞樹立用プラスミドは Addgene を介して京都大学 山中伸弥教授らの研究室にて構築されたものを入手した。0.1  $\mu\text{L}$  のプラスミド原液を 10  $\mu\text{L}$  のコンピテントセル JM109 に添加し、氷上に 15~30 分間静置した。その後、サーマルサイクラーにて 42°C, 1 分間ヒートショックの操作を行った。形質転換後のコンピテントセルに 90  $\mu\text{L}$  の SOC 培地を添加し、37°C の条件下 1 時間インキュベートした。インキュベート後、LB 寒天プレート (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicillin) に適量播種し、37°C の条件下一晩静置した。

### 2) 大腸菌の培養

LB 寒天プレートに出現した大腸菌コロニーは、無菌条件下オートクレーブ滅菌済楊枝にてピックアップし、15 mL 遠心管にあらかじめ入れておいた 2 mL の LB 培地 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicillin) にて濯いだ。その後、15 mL 遠心管は水浴恒温槽にて 37°C の条件下で 8 時間〜一晩振とう培養した。その後、LB 培養液は 500 mL 集気ビンにあらかじめ入れておいた 100 mL の LB 培地 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicillin) に添加した。その後、500 mL 集気ビンは水浴恒温槽にて 37°C の条件下で 8 時間〜一晩振とう培養した。

### 3) 大腸菌からの DNA 抽出

培養した大腸菌からの DNA 抽出は QIAGEN Midi prep kit を用いて行い、そのプロトコールに準拠し行った。

### 4) DNA の定量

DNA 量は、核酸蛋白質分光光度計 BioSpec-nano (島津製作所社製) の RNA 簡易定量モードを用いて 260 nm における吸光度を測定することにより求めた。また、DNA の純度は 260 nm と 280 nm における吸光度比より求めた。得られた DNA は滅菌水により、1 mg/mL になるように希釈した。

## 2.2.10 ヒト iPS 細胞の樹立及び培養

### 1) PlatGP 細胞への遺伝子導入及びレトロウイルスの作製

100  $\mu\text{L}$  の OPTI-MEMI 培地で 5  $\mu\text{g}$  のレトロウイルスベクタープラスミド pMXs-hOCT4,

pMXs-hSOX2, pMXs-hKLF4, pMXs-hlMYC, pMXs-hNANOG, pMXs-hGLIS または pMXs-red fluorescent protein (RFP) と 2.5  $\mu\text{g}$  のヘルパープラスミド pCMV/VSV-G を穏やかに混合した。また、別のチューブで、100  $\mu\text{L}$  の OPTI-MEMI 培地で 11.5  $\mu\text{g}$  の PEI を穏やかに混合した。希釈した DNA 溶液と PEI 溶液を穏やかに混合し、室温で 20 分間静置した。前日に  $1 \times 10^6$  cells/60 mm dish になるように継代した PlatGP 細胞の培地を吸引除去し、OPTI-MEM 2 mL を加えた。20 分後 DNA-PEI 複合体溶液をディッシュに加えた。ディッシュを前後にゆすって穏やかに混合し、37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  で一晚培養した。遺伝子導入の 24 時間後に培地を除去し、新鮮な PlatGP 培養用培地と交換した。その後細胞は 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  で 3~5 日間培養した。遺伝子導入効率は RFP にて確認した。

## 2) レトロウイルスの感染

遺伝子導入による RFP 陽性細胞が 80%以上であることを確認後、hOCT4, hSOX2, hKLF4, IMYC, hNANOG 及び hGLIS 遺伝子をコードしたレトロウイルスを含む PlatGP 培地上清を 50 mL 遠心管に等量ずつ混合した。その後、0.45  $\mu\text{m}$  セルロースアセテートフィルターで濾過し、上清中の細胞を除去した。得られたウイルス液は直ちに使用するか、分注して -80 $^{\circ}\text{C}$  で保存した。前日に  $2 \times 10^5$  cells/60 mm dish になるように継代した皮膚線維芽細胞または肝非実質細胞の培地を吸引除去し、polybrene (最終濃度; 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加したウイルス含有培地と交換した。その後細胞は 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  で 3~5 日間培養した。

遺伝子導入効率は RFP にて評価した。遺伝子導入効率が 50%であることを確認後、ウイルス液の培養上清を除去し、細胞培養用基礎培地と交換した。以降、培地は 2~3 日毎に交換した。

## 3) 細胞の再播種

遺伝子導入から 7~10 日後、細胞は MEF 上に再播種された。線維芽細胞の培地を吸引除去し、PBS で洗浄した。0.05% Trypsin-EDTA を 1 mL/100 mm dish で添加し、5%  $\text{CO}_2$ /95% air 条件下  $\text{CO}_2$  インキュベーター中 37  $^{\circ}\text{C}$  にて 5 分間処理した。細胞培養用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収した。さらに細胞培養用基礎培地 5 mL/100 mm dish で添加し、残りの細胞も 15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、細胞培養用基礎培地 5 mL で懸濁し、細胞を計数した。その後細胞は前日  $5\sim 7 \times 10^5$  cells/100 mm dish に播種した MMC 処理 MEF 上に、 $5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$  cells/100 mm dish になるように播種した。5%  $\text{CO}_2$ /95% air 条件下  $\text{CO}_2$  インキュベーター中 37  $^{\circ}\text{C}$  にて培養

した。再播種の 24 時間後に培地を除去し、iPS 細胞培養用培地+5 ng/mL bFGF と交換した。以降、培地は 5 ng/mL bFGF 含有 iPS 細胞培養用培地とし、2~3 日毎に交換した。

#### 4) iPS 細胞コロニーの単離

iPS 細胞様コロニーの出現は目視にて確認した。P1000 のピペットの先端に iPS 細胞剥離液を満たし、培地を吸引除去されたディッシュに軽く押し当てるように接着させた。ディッシュのフタを開けた状態で 1 分間処理した後、ゆっくりと吸引した。吸引剥離したコロニーは 1.5 mL チューブに移され、コロニーの沈殿を確認後、その上清を吸引除去した。沈殿した細胞は、前日  $2 \times 10^5$  cells/60 mm dish に播種した MMC 処理 MEF 上に、1 colony/60 mm dish になるように播種した。その後、培地は毎日交換し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて培養した。

#### 5) ヒト iPS 細胞の継代

ヒト iPS 細胞は、培養後 3~5 日で継代を行った。ヒト iPS 細胞用培地、PBS、ヒト iPS 細胞用剥離液を 37°C の水浴で温めた。ヒト iPS 細胞の培養液を吸引除去し、PBS 10 mL/100 mm dish で 2 回洗浄した。ヒト iPS 細胞用剥離液を 1 mL/100 mm dish で添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 5 分間処理し、ヒト iPS 細胞用剥離液を吸引除去した。ヒト iPS 細胞用培地 5 mL/100 mm dish を添加し、細胞懸濁液を 50 mL 遠沈管に回収した。さらにヒト iPS 細胞用培地 5 mL/100 mm dish で添加し、残りの細胞も先の 50 mL 遠沈管に回収した。回収後、50 mL 遠沈管を軽く攪拌し、静置して大きなサイズのヒト iPS 細胞コロニーを自然沈降させた。自然沈降させたコロニーを 1 mL のピペットで吸い、細胞培養用 100 mm ディッシュの底面の縁で 3 回程度ピペッティングすることで、コロニーサイズをある程度均一となるようにし、再び 50 mL 遠沈管に戻した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、ヒト iPS 細胞用培地 15 mL で懸濁した。遠心中、フィーダー細胞ディッシュから細胞培養用基礎培地を吸引除去し、ヒト iPS 細胞用培地を 5 mL/100 mm dish 程度添加した。静置後、フィーダー細胞ディッシュからヒト iPS 細胞用培地を吸引除去し、新たなヒト iPS 細胞用培地を 5 mL/100 mm dish 入れた。ヒト iPS 細胞懸濁液を 5 mL/100 mm dish で播種し、さらに、最終濃度 5 ng/mL となるように bFGF を添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて培養した。培地は 1 日毎に交換した。

## 6) ヒト iPS 細胞の凍結保存

ヒト iPS 細胞の培養液を吸引除去し、PBS 10 mL/100 mm dish で 2 回洗浄した。ヒト iPS 細胞用剥離液を 1 mL/100 mm dish で添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37 °C にて 5 分間処理した。ヒト iPS 細胞用剥離液を吸引除去し、ヒト iPS 細胞用培地 5 mL/100 mm dish を添加し、細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収した。さらにヒト iPS 細胞用培地 5 mL/100 mm dish で添加し、残りの細胞も先の 15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去した。細胞をヒト iPS 細胞用凍結保存液 200 μL で懸濁後、1 分以内に液体窒素にて急速凍結した。ヒト iPS 細胞は実験開始まで液体窒素中に保管した。

## 7) ヒト iPS 細胞の解凍

37 °C の水浴で温めたヒト iPS 細胞用培地を 15 mL 遠沈管に 10 mL 採取した。液体窒素中からヒト iPS 細胞を取り出し、15 mL 遠沈管から培地を 1 mL 程度とり、ヒト iPS 細胞のチューブに添加して軽くピペッティングすることにより細胞を融解し、15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、ヒト iPS 細胞用培地 5 mL で懸濁した。遠心中、フィーダー細胞ディッシュから細胞培養用基礎培地を吸引除去し、ヒト iPS 細胞用培地を 5 mL 程度添加した。静置後、フィーダー細胞ディッシュからヒト iPS 細胞用培地を吸引除去し、新たなヒト iPS 細胞用培地を 5 mL 添加した。ヒト iPS 細胞懸濁液を 5 mL 播種し、5 ng/mL となるように bFGF を添加し、さらに 10 μM となるように Y-27632 を添加した。5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37 °C にて培養開始した。細胞播種 48 時間後に 5 ng/mL bFGF を含むヒト iPS 用培地に交換し、それ以降は 1 日毎に交換した。

### 2.2.11 EB 形成法を用いたヒト iPS 細胞の分化多能性の確認

ヒト iPS 細胞の培養液を吸引除去し、PBS 10 mL/100 mm dish で 2 回洗浄した。ヒト iPS 細胞用剥離液を 1 mL/100 mm dish で添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37 °C にて 5 分間処理し、ヒト iPS 細胞用剥離液を吸引除去した。EB 形成用培地 5 mL/100 mm dish を添加し、コロニーを破壊しないようにセルスクレーパーにて慎重に剥離した。剥離した細胞は 15 mL 遠沈管に回収した。さらに EB 形成用培地 5 mL/100 mm dish で添加し、残りの細胞も先の 15 mL 遠沈管に回収した。回収後、15 mL 遠沈管を軽く攪拌し、静置して大きなサイズのヒト iPS 細胞コロニーを自然沈降させた。上清を吸引除去後、沈殿した細胞懸濁液を 10 mL にメスアップし、浮遊細胞培養用 10 cm ディッシュに播種した。5% CO<sub>2</sub>/95% air

条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて培養した。

EB の継代は 3~4 日毎に行った。コロニーを破壊しないようにピペットにて吸引し、15 mL 遠心管に回収した。遠沈管を軽く攪拌し、静置して大きなサイズのヒト iPS 細胞コロニーを自然沈降させた。上清を吸引除去後、沈殿した細胞懸濁液を 10 mL にメスアップし、浮遊細胞培養用 10 cm ディッシュに播種した。その後、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて静置した。

#### 2.2.12 分化誘導因子を用いた iPS 細胞の分化多能性の確認

iPS 細胞の分化は分化を activin A にて制御されることに基づき、Okabayashi らの方法<sup>34)</sup>を参考にし、*in vitro* における iPS 細胞の分化多能性を評価した。24-well plate に播種された iPS 細胞を、0.5, 10 または 100 ng/mL activin A を含む肝細胞分化培地 I にて 3 日間培養後、同様に 0.5, 10 または 100 ng/mL activin A を含む肝細胞分化用培地 II にて 2 日間培養することで三胚葉に分化させた。

### 2.2.13 肝細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化は、ヒト iPS 細胞が培養ディッシュに対し、未分化コロニーの占める割合が約 70%になった状態で開始した。100 ng/mL Activin A を含む肝細胞分化用培地 I にて 3 日間培養後、100 ng/mL activin A を含む肝細胞分化用培地 II にて 2 日間培養することで内胚葉に分化させた。

分化誘導 5 日目に細胞は継代された。方法は、まず activin A を 5 日間処理したヒト iPS 細胞培養ディッシュに、Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho 結合キナーゼ阻害剤である Y-27632 を 10  $\mu$ M となるように添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 60 分間処理した。Y-27632 処理後の培養ディッシュから培養液を吸引除去し、PBS 10 mL/100 mm dish で 2 回洗浄した。Accutase を 2 mL/100 mm dish で添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 5 分間処理した。10  $\mu$ M Y-27632 含有肝細胞分化用培地 III を 5 mL/100 mm dish にて細胞を剥離し、細胞懸濁液を 50 mL 遠沈管に回収した。さらに 10  $\mu$ M Y-27632 含有肝細胞分化用培地 III を 5 mL/100 mm dish で添加し、残った細胞も先の 50 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、10  $\mu$ M Y-27632 含有肝細胞分化用培地 III で懸濁し、あらかじめ肝細胞分化用培地 III にて 30 倍に希釈した GFR Matrigel コートした細胞培養用 24 well-plate に播種した。継代後 24 時間で Y-27632 を含まない肝細胞分化用培地 III に交換した。継代後はこの肝細胞分化用培地 III で 7 日間培養することで肝芽細胞に分化させた。

最後に、10 ng/mL HGF, 20 ng/mL OSM, 10<sup>-7</sup> M DEX を含む Cosmedium 004 培地で 10 日間、プライマリーセル無血清培地で 3 日間培養することにより肝細胞への分化を行った。

#### 2.2.14 好中球への分化誘導

ヒト iPS 細胞の好中球への分化は、ヒト iPS 細胞が培養ディッシュに対し、未分化コロニーの占める割合が約 70%になった状態で開始した。まずヒト iPS 細胞培養ディッシュに、Y-27632 を 10  $\mu$ M となるように添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 60 分間処理した。Y-27632 処理後の培養ディッシュから培養液を吸引除去し、PBS 10 mL/100 mm dish で 2 回洗浄した。ヒト iPS 細胞用剥離液を 1 mL/100 mm dish で添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 5 分間処理した。ヒト iPS 細胞用剥離液を吸引除去し、10  $\mu$ M Y-27632 含有血液分化用基礎培地 5 mL/100 mm dish を添加し、細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収した。さらに 10  $\mu$ M Y-27632 含有血液分化用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、残った細胞も先の 15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、10 mL の 20 ng/mL VEGF, 10  $\mu$ M Y-27632 含有血液分化用基礎培地にて懸濁し、前日に  $5-7 \times 10^5$  cells/100 mm dish になるように播種した OP9 細胞へ播種した。継代後 24 時間で Y-27632 を含まない血液分化用基礎培地に交換した。播種後は 20 ng/mL VEGF 含有血液分化用基礎培地で 14 日間培養することで中胚葉に誘導した。

14 日後、Y-27632 を 10  $\mu$ M となるように添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 60 分間処理した。Y-27632 処理後の培養ディッシュから培養液を吸引除去し、PBS 10 mL/100 mm dish で 2 回洗浄した。0.25% Trypsin/EDTA 溶液を 3 mL/100 mm dish で添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 5 分間処理した。10  $\mu$ M Y-27632 含有血液分化用基礎培地 5 mL/100 mm dish を添加し、細胞懸濁液を 50 mL 遠沈管に回収した。さらに 10  $\mu$ M Y-27632 含有血液分化用基礎培地を 5 mL/100 mm dish で添加し、残った細胞も先の 50 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、20 ng/mL IL-3, 50 ng/mL SCF, 10 ng/mL TPO を含有した 10 mL の血液分化用基礎培地にて懸濁し、前日に  $5-7 \times 10^5$  cells/100 mm dish になるように播種した OP9 細胞へ播種した。その後、細胞は 20 ng/mL IL-3, 50 ng/mL SCF, 10 ng/mL TPO を含む血液分化用基礎培地で 9 日間培養することにより血管芽細胞への分化を行った。

23 日後、細胞は 10 ng/mL G-CSF, 20 ng/mL TPO 含有血液分化用基礎培地で 9 日間培養することで好中球に誘導した。

## 2.2.15 RNA 抽出と PCR

### 1) RNA 抽出

Total RNA は, RNeasy Mini Kit の添付マニュアルに従い抽出した.

### 2) RNA の定量

RNA 量は, 核酸蛋白質分光光度計 BioSpec-nano (島津製作所社製) の RNA 簡易定量モードを用いて 260 nm における吸光度を測定することにより求めた. また, RNA の純度は 260 nm と 280 nm における吸光度比より求めた.

### 3) 逆転写反応

cDNA の合成は, PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) を使用し, 添付マニュアルに従い行った.

### 4) Real-Time RT-PCR

PCR プライマーは, Table 2 に示したものをを用いた. Real-Time RT-PCR の反応混合液は SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time) を用い, 最終容量 12.0  $\mu$ L で行った. 反応は, 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) を用い, 初期変性を 95 °C で 30 秒間行った後, 変性を 95 °C で 5 秒, アニーリング及び伸長反応を 60 °C で 31 秒間, サイクル数 40 で行った. 結果は内在性コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いて補正した.

**Table 2 Primer sequence for PCR.**

Primer name	Forward primer sequence (5'to 3')	Reverse primer sequence (5'to 3')
ALB	GAGCTTTTTGAGCAGCTTGG	GGTTCAGGACCACGGATAGA
AFP	AGCTTGGTGGTGGATGAAAC	TCTGCAATGACAGCCTCAAG
BRACHYURY	ACCCAGTTCATAGCGGTGAC	CAATTGTCATGGGATTGCAG
C/EBP $\epsilon$	CCCTTACACAAGGGCAAGAA	CTCTGCCATGTACTCCAGCA
CYP1A2	CCTCTTTGGAGCTGGGTTTG	GCTGTGGGGGATGGTGAA
CYP2D6	CCTACGCTTCCAAAAGGCTTTT	AGAGAACAGGTCAGCCACCACT
CYP3A4	CTGTGTGTTTCCAAGAGAAGTTAC	TGCATCAATTTCTCCTGCAG
CYP3A5	CTCTCTGTTTCCAAAAGATACC	TGAAGATTATTGACTGGGCTG
CYP3A7	AGATTTAATCCATTAGATCCATTCG	AGGCGACCTTCTTTTATCTG
CYP7A1	TAGGAACCCAGAAGCAATGA	GGATGTTGAGGGAGGCACTGG
FLK1	CTGCAAATTTGGAAACCTGTC	GAGCTCTGGCTACTGGTGATG
G6Pase	TTTGGGATCCAGTCAACACA	CAGATGGGGAAGAGGACGTA
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
GATA2	ACCGGAAGATGTCCAACAAG	TCTCCTGCATGCACTTTGAC
GDF3	AAATGTTTGTGTTGCGGTCA	TCTGGCACAGGTGTCTTCAG
GSC	CACCTCCGCGAGGAGAAAGT	GACGACGACGTCTTGTTCCAC
HNF4 $\alpha$	GAGCTGCAGATCGATGACAA	TACTGGCGGTGTTGATGTA
KLF4	TCTCAAGGCACACCTGCGAA	TAGTGCCGTGGTCAGTTCATC
LTF	GCATGGGCTAAGGATTTGAA	TCCCAAATTTAGCCTGTTGG
MMP9	TTGACAGCGACAAGAAGTGG	GCCATTCACGTCGTCCTTAT
MPO	TGTTTGAGCAGGTCATGAGG	CCAGATGTCGATGTTGTTGG
MYC	ACTCTGAGGAGGAACAAGAA	TGGAGACGTGGCACCTCTT
NANOG	CTGTGATTTGTGGGCCTGAA	TGTTTGCCTTTGGGACTGGT
OCT3	AGCGAACCAGTATCGAGAAC	TTACAGAACCACACTCGGAC
PFK1	ATGTGGGTGCCAAAGTCTTC	CAGCTGGATGATGTTGGAGA
PGMase	GTTAAGACCCAGGCGTACCA	GAAGTTCTCCGCGTAGTTGG
PU.1	CCAGCTCAGATGAGGAGGAG	CAGGTCCAACAGGAACTGGT
REX1	TCGCTGAGCTGAAACAAATG	CCCTTCTTGAAGGTTTACAC
RUNKS	CCCTAGGGGATGTTCCAGAT	TGAAGCTTTTCCCTCTTCCA
SOX2	ACACCAATCCCATCCACACT	GCAAACCTTCTGCAAAGCTC
SOX17	TGCAGGCCAGAAGCAGTGTTAC	CCCAAACCTGTTCAAGTGGCAGA
TAT	ATCTCTGTTATGGGGCGTTG	TGATGACCACTCGGATGAAA
TERT	TGTGCACCAACATCTACAAG	GCGTTCTTGGCTTTCAGGAT

## 2.2.16 染色による評価

### 1) AP 染色

AP 染色は, leukocyte AP kit のプロトコールに準拠し行った. 細胞を PBS で 3 回洗浄し, 室温にて 4 °C に冷却した 30% acetone-citrate solution に 30 秒間浸漬することにより固定した. PBS で 3 回洗浄後, 固定した細胞は, AP 染色液浸漬させ, 常温にて 60 分間反応させた. 反応後, PBS で 3 回洗浄し観察した.

### 2) 非標識抗体を用いた免疫蛍光染色

接着細胞を, PBS で 3 回洗浄し, 室温にて 4 °C に冷却した 4% paraformaldehyde に一晩浸漬することにより固定した. PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄後, 固定した細胞は, 冷 methanol に浸漬させ, 5 分間膜透過処理を行った. PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄後, 2% スキムミルクに浸し室温にて 20 分間反応させ, ブロッキング処理を行った. また, 浮遊細胞 ( $1 \times 10^4$  cells) を, 96-well plate またはスライドガラス上へサイトスピンを行い, 細胞を接着した. 固定した細胞は, PBS で 3 回洗浄し, 室温にて 4 °C に冷却した 100% methanol に 5 分間浸漬することにより固定した. その後一次抗体として anti-human OCT3/4 antibody rabbit IgG polyclonal (1:100), anti-human NANOG antibody rabbit IgG polyclonal (1:100), anti-human TRA-1-60 antibody mouse IgM monoclonal (1:100), anti-human SSEA3 antibody mouse IgM monoclonal (1:100), anti-human TUJ1 antibody mouse IgG monoclonal (1:200), anti-human SOX17 antibody mouse IgG monoclonal (1:200), anti-human FLK1 antibody rabbit IgG polyclonal (1:200), anti-human albumin antibody mouse IgG monoclonal (1:200) を用いて, 4 °C にて一晩反応させた. PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄後, 二次抗体として, Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (1:200), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgM (1:200), Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (1:200), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:200) を用いて, 室温遮光下にて 60 分間反応させた. PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄後, 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI を室温遮光下で 5 分間反応させ核染色を行った. PBS で 3 回洗浄後, 蛍光顕微鏡にて観察した.

### 3) 標識抗体を用いた免疫蛍光染色

細胞を, PBS で 3 回洗浄し, 冷 methanol に浸漬させ, 5 分間固定及び膜透過処理を行った. PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄後, 抗体として anti-human CD13 antibody conjugated PE (1:100), anti-human CD16 antibody conjugated PE (1:100), anti-human CD45 antibody conjugated PE

(1:100) を用いて、室温にて一時間反応させた。PBS で5分間ずつ3回洗浄後、0.2 µg/mL DAPI を室温遮光下で5分間反応させ核染色を行った。PBS で3回洗浄後、蛍光顕微鏡にて観察した。

#### 4) PAS 染色

培養後の細胞を、PBS で3回洗浄後、室温にて4°C の4% paraformaldehyde に30分間浸漬することにより固定した。PBS で3回洗浄後、0.5% 過ヨウ素酸溶液で5分間反応させた。PBS で3分間洗浄後、コールドシッフ試薬で6分間反応させた。その後亜硫酸水で3分間ずつ3回洗浄した。PBS で5分間洗浄し、顕微鏡にて観察した。

#### 5) Borondipyrromethene 染色

培養後の細胞を、PBS で3回洗浄後、室温にて4°C の4% paraformaldehyde に30分間浸漬することにより固定した。PBS で3回洗浄後、borondipyrromethene 溶液で5分間反応させた。PBS で3分間洗浄後、0.2 µg/mL DAPI を室温遮光下で5分間反応させ核染色を行った。PBS で3回洗浄後、蛍光顕微鏡にて観察した。

#### 2.2.17 ICG 取り込み・放出試験

5mg/mL ICG を培養用培地にて1 mg/mL に希釈した。希釈 ICG 含有培地、PBS を37°C の水浴で温めた。細胞の培養液を吸引除去し、PBS で洗浄した。希釈 ICG 含有培地を500 µL/1 well/24 well plate 添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下CO<sub>2</sub>インキュベーター中にて60分間処理し、顕微鏡下にて観察した。

顕微鏡観察後、希釈 ICG 含有培地を吸引除去し、PBS で洗浄した。培養用培地を500 µL/1 well/24 well plate 添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下CO<sub>2</sub>インキュベーター中にて6時間処理し、顕微鏡下にて観察した。

## 2.2.18 糖代謝試験

### 1) Glycogen 及び解糖系代謝物の蓄積

培養液を吸引除去し, PBS 500  $\mu\text{L}/\text{well}/24\text{-well plate}$  で洗浄した. Cosmedium 004 を 500  $\mu\text{L}/\text{well}/24\text{-well plate}$  で添加し, 5%  $\text{CO}_2/95\% \text{ air}$  条件下  $\text{CO}_2$  インキュベーター中  $37^\circ\text{C}$  にて, 3, 6, 12 時間処理した. 一定時間培養後, 培養液を吸引除去し, PBS 500  $\mu\text{L}/\text{well}/24\text{-well plate}$  で洗浄した. 細胞を 100  $\mu\text{L}$  の細胞溶解液にて溶解し, 実験開始まで  $-20^\circ\text{C}$  にて保存した.

Glycogen, lactate, pyruvate, lipid, urate の測定は, それぞれ glycogen, lactate, pyruvate, adipogenesis, urate assay kits のプロトコールに従って行った.

### 2) Glucagon 負荷試験

培養液を吸引除去し, PBS 500  $\mu\text{L}/\text{well}/24\text{-well plate}$  で洗浄した. Cosmedium 004 を 500  $\mu\text{L}/\text{well}/24\text{-well plate}$  で添加し, 5%  $\text{CO}_2/95\% \text{ air}$  条件下  $\text{CO}_2$  インキュベーター中  $37^\circ\text{C}$  にて, 12 時間処理した. 一定時間培養後, 培養液を吸引除去し, PBS 500  $\mu\text{L}/\text{well}/24\text{-well plate}$  で洗浄した. glucagon 負荷試験培地を添加し, 5%  $\text{CO}_2/95\% \text{ air}$  条件下  $\text{CO}_2$  インキュベーター中  $37^\circ\text{C}$  にて, 5, 10, 30 分間処理した. 一定時間培養後, 培養液を吸引除去し, PBS 500  $\mu\text{L}/\text{well}/24\text{-well plate}$  で洗浄した. 細胞を 700  $\mu\text{L}$  の細胞溶解液にて溶解し, 実験開始まで  $-20^\circ\text{C}$  にて保存した.

100  $\mu\text{L}$  の細胞溶解液は glycogen, G6P の定量に用いられた. Glycogen, G6P の測定は, それぞれ glycogen, G6P のプロトコールに従って行った.

600 $\mu\text{L}$  の細胞溶解液は糖代謝由来産物の定量に用いられた. RNA 抽出後, 逆転写を行い, real-time PCR に用いられた. 方法は前項に従って行った.

### 3) Glucose 負荷試験

培養液を吸引除去し, PBS 500  $\mu\text{L}/\text{well}/24\text{-well plate}$  で洗浄した. Glucose/galactose 負荷試験前培地を 500  $\mu\text{L}/\text{well}/24\text{-well plate}$  で添加し, 5%  $\text{CO}_2/95\% \text{ air}$  条件下  $\text{CO}_2$  インキュベーター中  $37^\circ\text{C}$  にて, 30 分間処理した. 30 分後, 培養液を吸引除去し, PBS 500  $\mu\text{L}/\text{well}/24\text{-well plate}$  で洗浄した. glucose 負荷試験培地を添加し, 5%  $\text{CO}_2/95\% \text{ air}$  条件下  $\text{CO}_2$  インキュベーター中  $37^\circ\text{C}$  にて, 5, 10, 30 分間処理した. 一定時間培養後, 培養液を吸引除去し, PBS 500  $\mu\text{L}/\text{well}/24\text{-well plate}$  で洗浄した. 細胞を 100  $\mu\text{L}$  の細胞溶解液にて溶解し, 実験開始まで  $-20^\circ\text{C}$  にて保存した. 100  $\mu\text{L}$  の細胞溶解液は lactate の定量に用いられた. Lactate の測定は, lactate assay kits のプロトコールに従って行った.

#### 4) Galactose 負荷試験

培養液を吸引除去し, PBS 500  $\mu$ L/well/24-well plate で洗浄した. Glucose/galactose 負荷試験前培地を 500  $\mu$ L/well/24-well plate で添加し, 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて, 30 分間処理した. 30 分後, 培養液を吸引除去し, PBS 500  $\mu$ L/well/24-well plate で洗浄した. galactose 負荷試験培地を添加し, 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて, 5, 10, 30 分間処理した. 一定時間培養後, 培養液を吸引除去し, PBS 500  $\mu$ L/well/24-well plate で洗浄した. 細胞を 100  $\mu$ L の細胞溶解液にて溶解し, 実験開始まで -20°C にて保存した. 100  $\mu$ L の細胞溶解液は lactate の定量に用いられた. Lactate の測定は, lactate assay kit のプロトコールに従って行った.

#### 2.2.19 食食能試験

細胞を培養用培地に溶解した zymosan A conjugated Alexa Fluoro 488 溶液に浸漬させ, 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 30 分間静置した. その後, 標本を PBS で 3 回洗浄し, 蛍光顕微鏡にて観察した.

#### 2.2.20 DHE 染色

細胞を PBS に溶解した 2  $\mu$ M DHE 溶液に浸漬させ, 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 30 分間静置した. その後, 標本を PBS で 3 回洗浄した. 細胞は蛍光顕微鏡にて観察した. また, 蛍光プレートリーダーにて  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 544 \text{ nm}/612 \text{ nm}$  における蛍光発光量を定量した.

#### 2.2.21 L-012 による ROS 産生量の測定

細胞は PBS で洗浄後, 血液分化基礎培地 600  $\mu$ L あたり  $1 \times 10^5$  cells に懸濁した. 反応組成は, 細胞懸濁液 600  $\mu$ L, 20 mM L-012 溶液 2  $\mu$ L とした. L-012 によるルミノール反応はルミノメーター (Lumat Lb 9507, Berthold Technologies 製, Bad Wildbad, Germany) にて測定した. 測定条件は測定 10 秒, 測定休止間隔 20 秒, 全測定 610 秒で行った.

### 2.2.22 細胞膜フリップフロップの検出

細胞を PBS に溶解した Annexin V-FITC 溶液に浸漬させ、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37 °C にて 30 分間静置した。その後、PBS で 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡にて観察した。また、蛍光プレートリーダーにて  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 483 \text{ nm}/538 \text{ nm}$  における蛍光発光量を定量した。

### 2.2.23 Caspase 活性測定

細胞を細胞破碎用緩衝液 50  $\mu\text{L}$  にて懸濁し、凍結・融解を 3 回繰り返した。その後、氷上にて 20 分間インキュベート後、4 °C、10,000 $\times$ g で 1 分間遠心し得た上清を細胞質画分とした。Caspase 活性測定は caspase-3 及び caspase-9 assay kit のプロトールに従って行い、caspase-3 及び caspase-9 の基質である DEVD-*p*NA または LEHD-*p*NA の切断反応に基づいた。生成した発色性物質 *p*-nitroanilide (*p*NA) をマイクロプレートリーダーにて波長 405 nm における吸光度を測定した。また、測定結果はタンパク質量で補正した。

### 2.2.24 タンパク質量

プロテインアッセイ染色液を用い Bradford 法にて行った。反応溶液組成は 5 倍希釈した染色液 200  $\mu\text{L}$ 、サンプル 10  $\mu\text{L}$  とした。反応液は 5 分間室温で放置後、マイクロプレートリーダー (Thermo scientific 製, MA, USA) にて 595 nm の吸光度を測定した。濃度測定は BSA を標準品とした。

### 2.2.25 統計処理

測定値は、全て平均値 $\pm$ 標準誤差 (S.E.) で表記した。

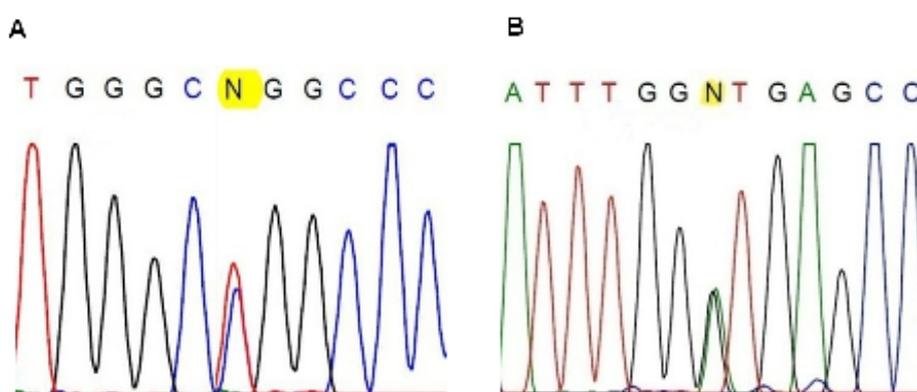
独立二群間の検定には、Welch's *t*-test を用いた。多群の比較には分散分析で有意であることを確認後、Scheffe's F test を用いた。危険率 5 %未満を有意とした。

## 2.3 実験結果

### 2.3.1 iPS 細胞の樹立

#### 1) 患者遺伝子変異

本研究のために検体を提供して頂いた患者は、exon 2 に T から C のミスセンス変異 (W118R) 及び exon 1 に G から A のミスセンス変異 (IVS1+1G>A) を有しており、本研究においても事前にそれらは確認された (Fig. 3).



**Figure 3. Patients of glycogen storage disease type Ib in Nagoya City University hospital.**

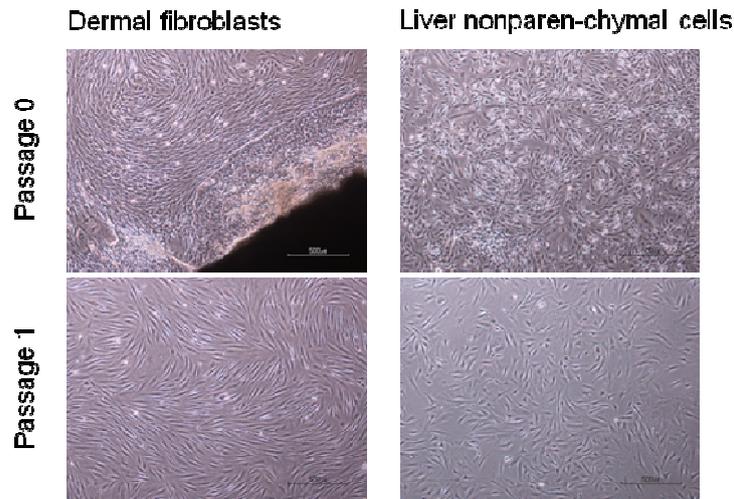
(A) Direct sequencing analysis demonstrated a heterozygous T to C transition resulting in a W118R missense mutation was observed in exon 2. (B) G to A transition splicing error in intron 1 (IVS1+1G>A).

#### 2) 皮膚線維芽細胞の初代培養

皮膚を細胞培養用基礎培地中にて接着培養した。培養後 3~5 日にケラチノサイトの遊走が認められ、7~10 日に線維芽細胞が、ケラチノサイトを越えて遊走した (Fig. 4)。継代は、細胞が 50%コンフルエントになったときに行った。iPS 細胞の樹立には継代数が 5 回以内の細胞を実験に使用した。

#### 3) 肝非実質細胞の初代培養

肝非実質細胞は細胞培養用基礎培地中にて培養した。播種 24 時間以内に細胞の接着が認められた。培養 2 日時点においては実質細胞用の肝細胞に特徴である多核細胞構造を持つ細胞の存在が確認されたが、7~10 日まで培養すると、ほぼ全ての細胞が線維芽細胞様細胞であることが確認された。継代は、細胞が 50%コンフルエントになったときに行った (Fig. 4)。iPS 細胞の樹立には継代数が 5 回以内のものを実験に使用した。



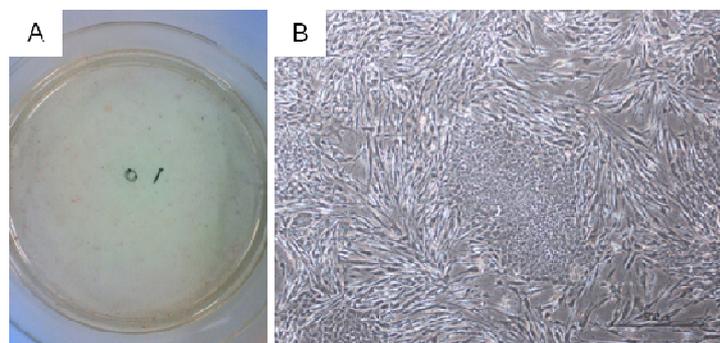
**Figure 4. Dermal fibroblasts and liver nonparen-chymal cells derived from GSDIb patient.**

#### 4) レトロウイルスの感染

iPS 細胞の樹立のための肝非実質細胞及び皮膚線維芽細胞は、継代数 5 回以内の細胞を使用した。細胞に OCT3/4, SOX2, KLF4, I-MYC, NANOG, GLIS1 遺伝子を、パントロピックレトロウイルスベクターを用いて導入し、遺伝子導入 48 時間後において全体の 50%以上の細胞において RFP<sup>+</sup>細胞が確認された。

#### 5) 遺伝子導入後の細胞の変化

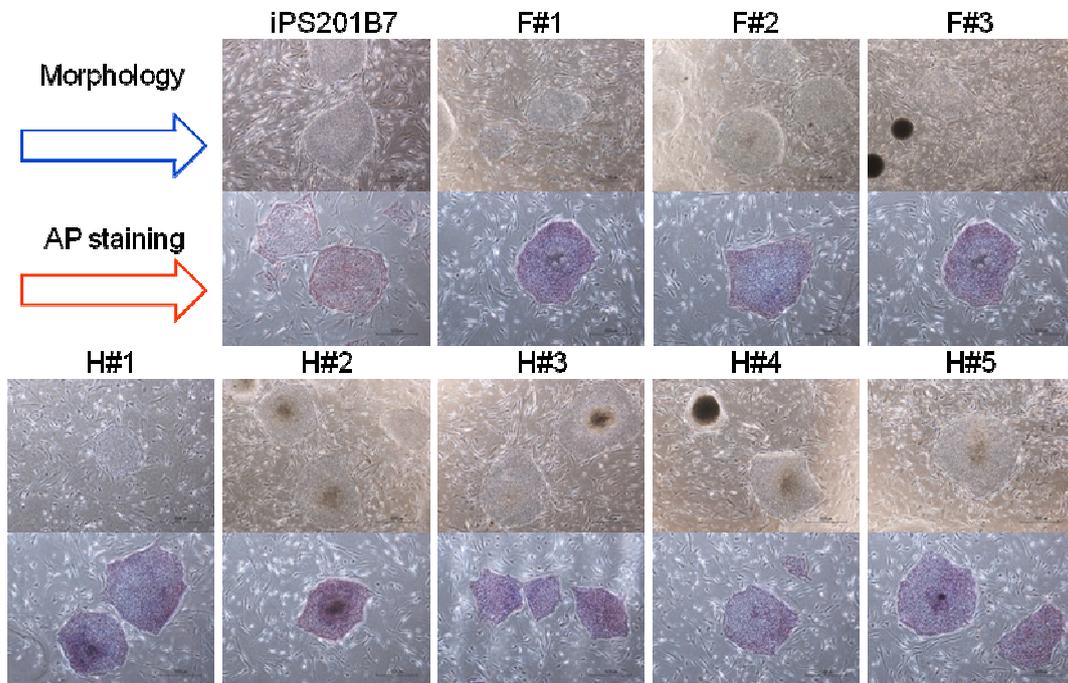
本研究では、リプログラミング因子OCT3/4, SOX2, KLF4, I-MYC, NANOG, GLIS1 を加えることでiPS 細胞を樹立した。遺伝子導入後 20 日目において AP 染色行ったところ数百個の AP<sup>+</sup>細胞 (コロニー) の存在が確認された (Fig. 5A)。また、出現したコロニーは全て扁平の構造のコロニーを形成した (Fig. 5B)。



**Figure 5. Morphologic and characteristic changes after induction.**

## 6) iPS 細胞のクローニング

本研究における iPS 細胞は OCT3/4, SOX2, KLF4, I-MYC, NANOG, GLIS1 を導入した細胞からクローニングした. 遺伝子導入後 30 日目では ES 細胞様の形態 (核/細胞質比が大きな細胞からなる辺縁がシャープな形状をした細胞コロニー) をした細胞の存在を確認した. このコロニーを単離後 MEF 上へ再播種し, この操作を繰り返すことで iPS 細胞をクローニングした.最終的に, 皮膚繊維芽細胞から 3 株, 及び肝非実質細胞から 5 株の iPS 細胞を樹立した. これらの細胞は全て AP 陽性であった (Fig. 6). Fig. 6 の iPS201B7 は健常人由来 iPS 細胞であり, ポジティブコントロールとして用いた.



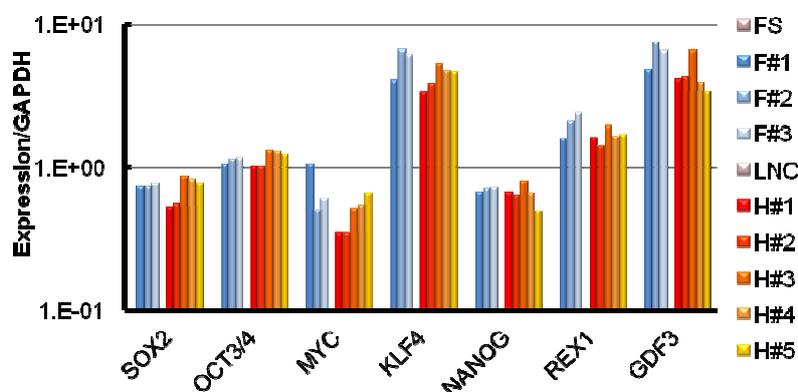
**Figure 6. GSDIb patient-derived iPS cell lines.**  
iPS201B7, control iPS cells.  
F#1-3, dermal fibroblast-derived iPS cells.  
H#1-5, liver nonparen-chymal cell-derived iPS cells.

## 2.3.2 iPS 細胞の多能性の確認

### 1) 未分化 iPS 細胞の遺伝子及びタンパク質発現

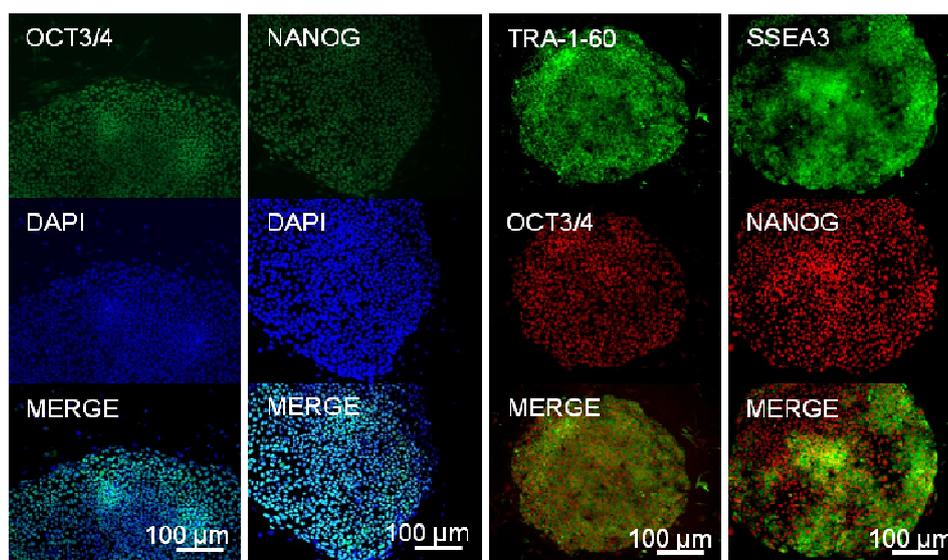
樹立した iPS 細胞の遺伝子発現パターンを qPCR 解析によって確認した (Fig. 7). 未分化マーカー-SOX2, OCT3/4, MYC, KLF4, NANOG, REX1, GDF3 mRNA 発現は, 皮膚線維芽細胞及び肝臓非実質性細胞で検出されなかったが, 樹立した iPS 細胞では発現が認められた.

さらに, 樹立した iPS 細胞では多能性マーカー-OCT3/4, NANOG に加えて, ES 細胞の細胞膜表面に発現する TRA-1-60, SSEA3 の高発現が認められた (Fig. 8).



**Figure 7. Real-time PCR analysis for pluripotent stem cell markers.**

Each marker was calculated as the ratio to the value for the control-iPS cells (iPS201B7) expression level. FS, dermal fibroblasts; LNC, liver hepatic nonparenchymal cells; F#1-3, dermal fibroblast-derived iPS cells; H#1-5, liver nonparenchymal cell-derived iPS cells.



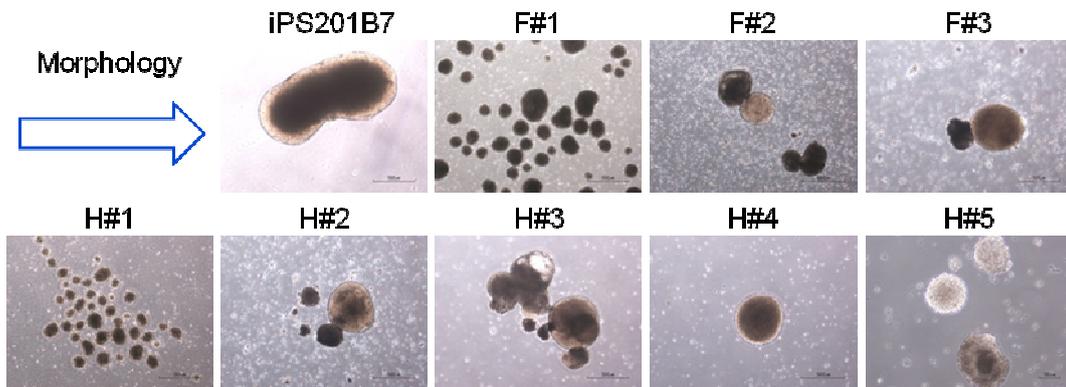
**Figure 8. Immunostaining analysis for pluripotent stem cell markers.**

iPS cell clone in panels was GSDIb-patient-derived iPS cell line H#1.

## 2) 浮遊培養法による分化多能性の確認

浮遊培養によって培養後 24 時間以内に iPS 細胞は EB を形成した (Fig. 9). EB を 7 日間培養し, その遺伝子発現, 及びタンパク質発現を評価した.

遺伝子発現の解析の結果, 未分化マーカーである OCT3/4, NANOG の発現の減少が認められた. 一方で三胚葉マーカー; 外胚葉 (SOX1, ZIC1), 中胚葉 (FLK1, RUNX1), 内胚様 (SOX17, GSC) の mRNA 発現の上昇が認められた (Fig. 10).

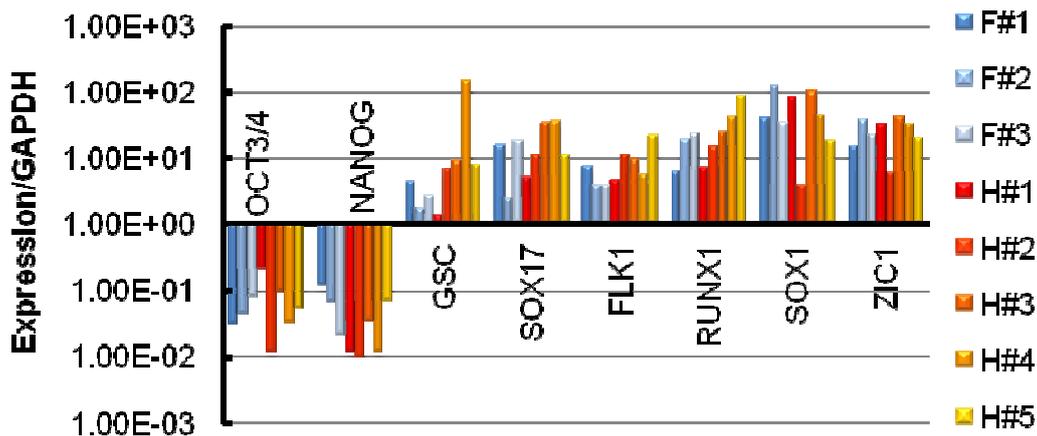


**Figure 9. Morphologies of EBs in iPS cell lines derived from GSDIb patient.**

iPS201B7, control iPS cells.

F#1-3, dermal fibroblast-derived iPS cells.

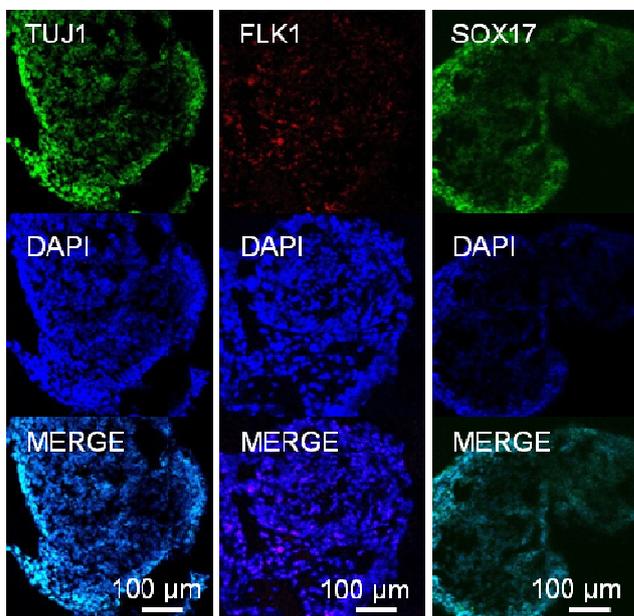
H#1-5, liver nonparen-chymal cell-derived iPS cells.



**Figure 10. Real-time PCR analysis in EBs derived from GSDIb patient-iPS cell lines.**

SOX1 and ZIC1, ectoderm, endoderm; FLK1 and RUNX1, mesoderm; GSC and SOX17. Expression levels were calculated as the ratio of marker expression to the value for each undifferentiated-iPS cells. F#1-3, dermal fibroblast-derived iPS cells; H#1-5, liver nonparen-chymal cell-derived iPS cells.

免疫染色法にてタンパク質発現を検討したところ、三胚様マーカー；外胚葉 TUJ1, 中胚葉 FLK1, 内胚葉 SOX17 の発現が認められた (Fig. 11).

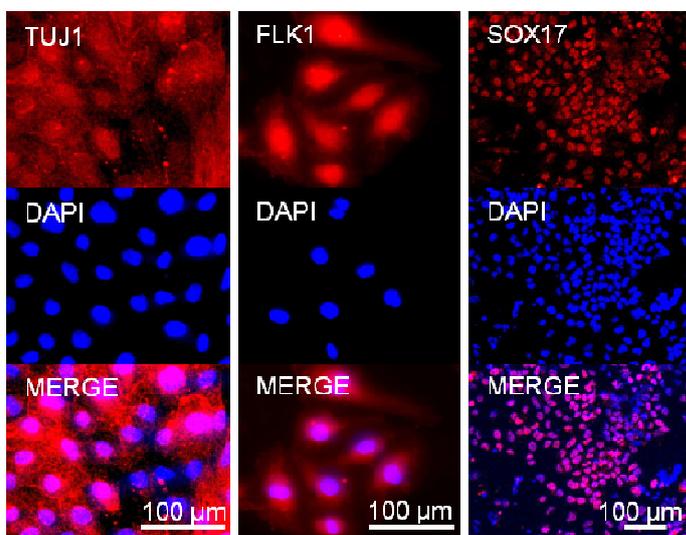


**Figure 11. Immunostaining analysis in EBs.**

Panel's clone was GSDIb H#1.  
TUJ1, ectodermal marker.  
FLK1, mesodermal marker.  
SOX17, endodermal marker.

### 3) 分化誘導因子を用いた iPS 細胞の分化多能性の確認

iPS 細胞の分化多能性の確認は Okabayashi らの方法<sup>34)</sup>を用いて行った。その結果, activin A 添加 5 日後に, 濃度依存的に三胚葉マーカー；外胚葉 TUJ1, 中胚葉 FLK1, 内胚葉 SOX17 の発現が認められた (Fig. 12).



**Figure 12. *in vitro* differentiation.**

Panel's clone was GSDIb H#1.  
TUJ1, ectodermal marker.  
FLK1, mesodermal marker.  
SOX17, endodermal marker.

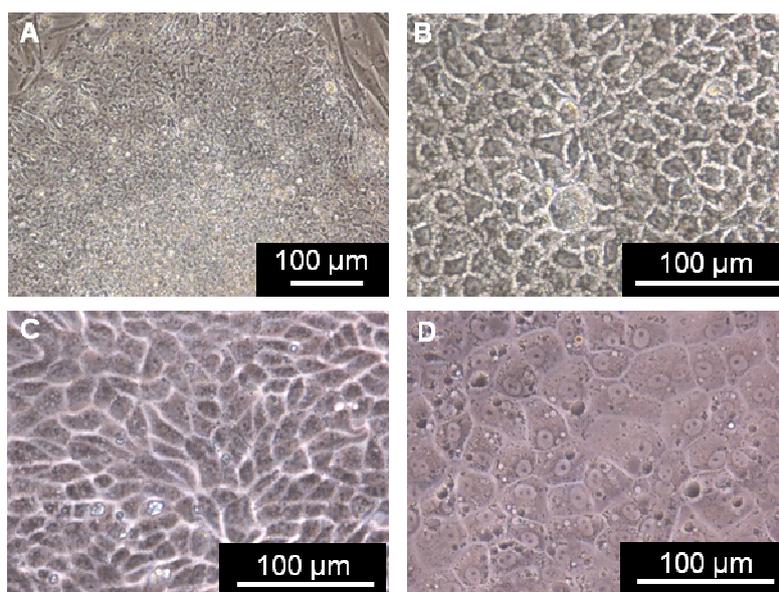
### 2.3.3 肝細胞への分化誘導

#### 1) 形態学的観察

以下説明なく使用した iPS 細胞クローンは、全て肝非実質細胞由来 iPS 細胞株 H#1 である。

Activin A 処置によって分化誘導直後 24 時間においては劇的な細胞死を観察した。一方で生細胞の増殖能は著しく高く、分化 5 日目までに約 70% コンフルエントまで細胞が増殖した (Fig. 13B)。

その後、これらの細胞はマトリゲルコートした 24-well plate 上で、DMSO を含む培地にて 7 日間培養された (Fig. 13C)。分化期間の経過とともに、細胞は、段階的に多角構造へと形態学的な変化を伴った。最後に、培地を HGF, OSM, DEX を含む培地にて 10 日間培養することで、肝細胞に特徴的な多核の構造を形成した (Fig. 13D)。



**Figure 13. Morphologic changes in hepatocytes differentiation stages.**

(A) iPS cells (day 0).

(B) Endodermal cells (day 5).

(C) Hepatic progenitors (day 12).

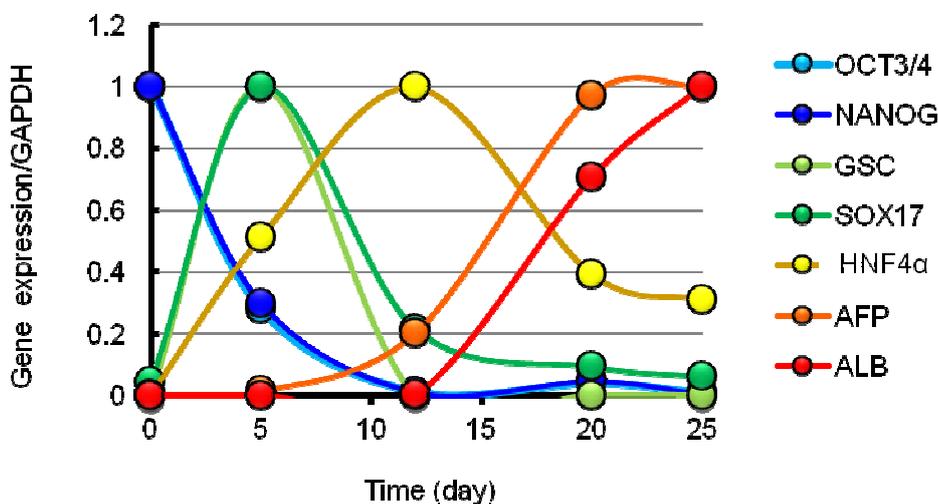
(D) Hepatocyte-like cells (day 25)

Panel's clone was GSDIb H#1.

## 2) 遺伝子発現変化

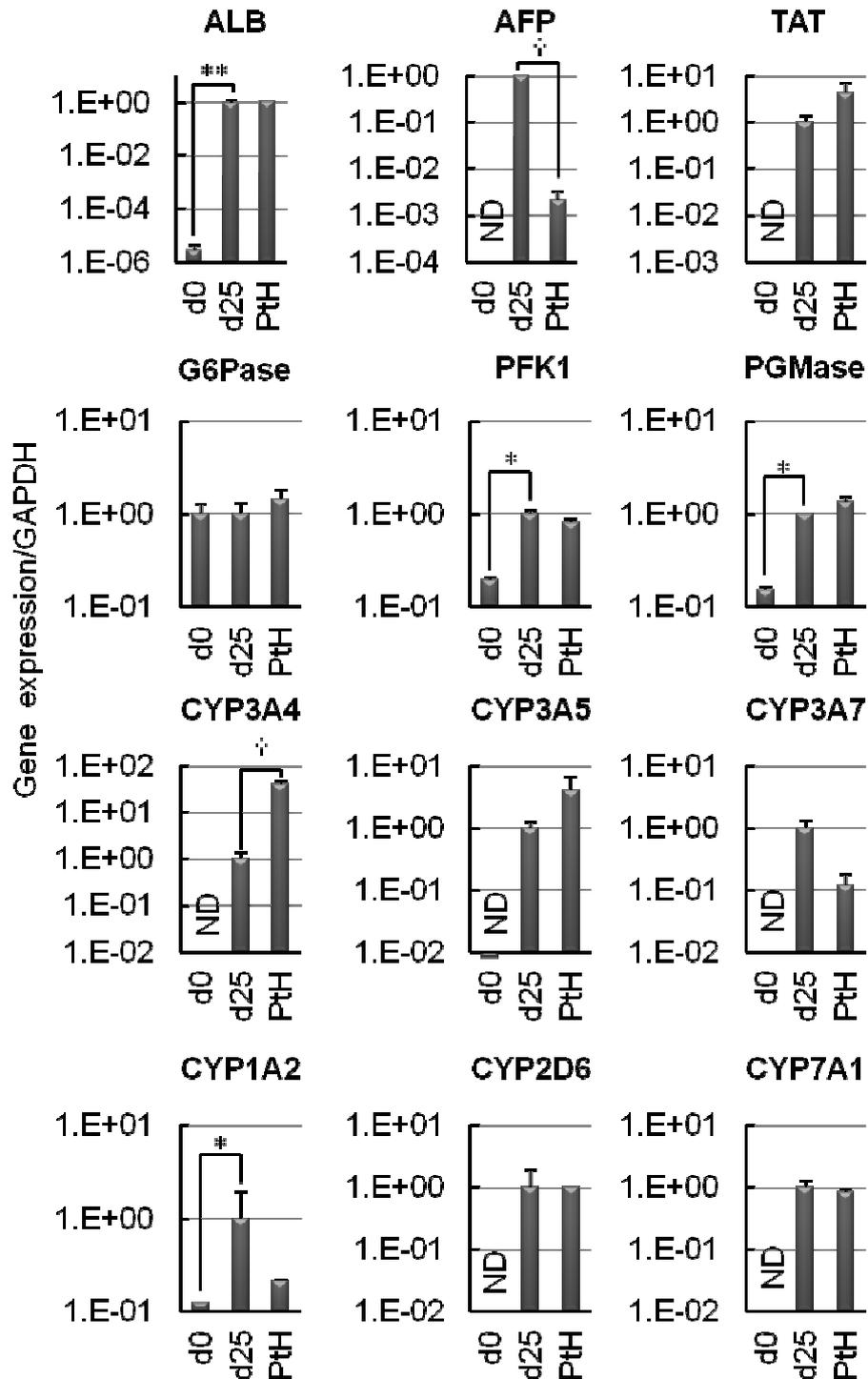
肝細胞分化に伴う遺伝子発現変化をプロファイルした (Fig. 14). その結果, 未分化マーカーOCT3/4, NANOG の発現が分化誘導 5 日において 40%以下に減少し, 分化 12 日では完全に消失した. それに伴い, 内胚様マーカーである gooseoid (GSC), SOX17 は分化 5 日目をピークに発現が上昇した. また分化誘導 12 日では hepatocyte nuclear factor (HNF) 4 $\alpha$ , 20 日では  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), 25 日では ALB の発現が上昇した.

分化誘導 25 日目における遺伝子発現 (d25) を評価した (Fig. 15). 本研究では糖原病 Ib 型患者肝細胞をポジティブコントロール (PtH) として使用した. また未分化 iPS 細胞をネガティブコントロール (d0) とした. 遺伝子発現は, 各 d25 発現レベルを 1 とした. その結果, 未分化 iPS 細胞と比較し, 分化誘導した肝細胞では成熟肝細胞マーカー tyrosine aminotransferase (TAT), 糖代謝酵素 phosphofructokinase-1 (PFK1), phosphoglucomutase (PGMase), 薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP7A1 の高い発現が認められた.



**Figure 14. Expression of genes marking the key stages of iPS cell differentiation.**

Maximum expression level = 1. Panel's clone was GSDIb H#1.  $n = 3$ .

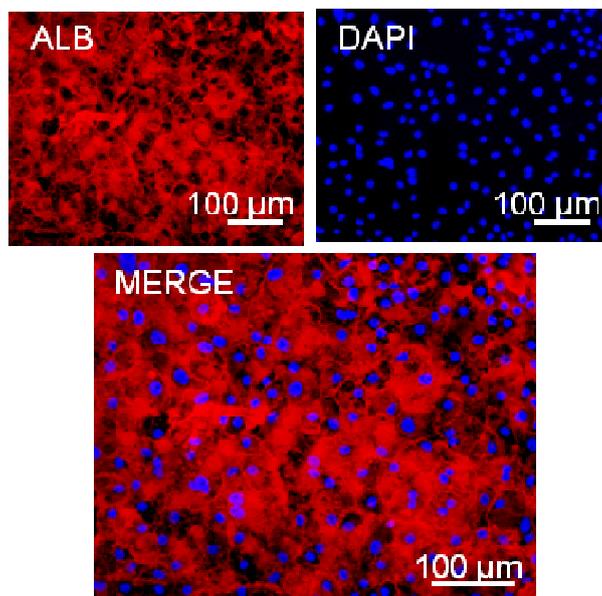


**Figure 15. Expression of hepatocyte markers on day 25 (d25).**

Hepatocytes from a patient with glycogen storage disease type Ib were used as positive controls (PtH), and undifferentiated GSDIb-iPSCs H#1 were used as a negative control (d0). The expression level was calculated as the ratio to the value for each d25 expression level. \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. d0, † $P < 0.05$  vs. PtH. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of 3 independent experiments.

### 3) 肝細胞免疫染色

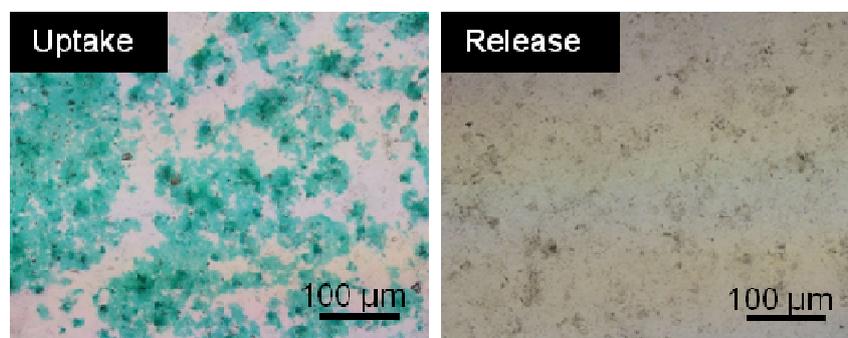
25 日間分化誘導した肝細胞は遺伝子発現と同様に、肝細胞マーカーである ALB の発現も認められた (Fig. 16).



**Figure 16.** ALB protein expression on day 25.  
Panel's clone was GSDIb H#1.

### 4) 肝細胞機能評価

肝細胞機能評価のために ICG の取り込み試験を行った (Fig. 17). 分化誘導して得られた肝細胞は、ICG 共存下における 1 時間のインキュベーションによって ICG の取り込み能が認められた (左). また、培地交換後 6 時間のインキュベーションにより ICG の放出が認められた (右).

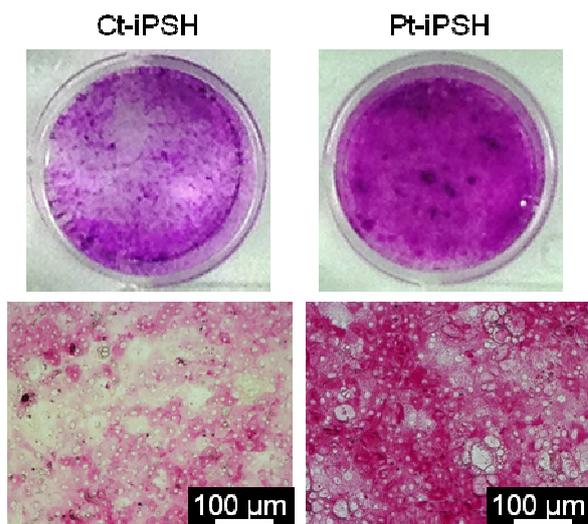


**Figure 17.** Cellular uptake (left) and release (right) of ICG.  
Panel's clone was GSDIb H#1.

### 2.3.4 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞の病態評価

#### 1) PAS 染色

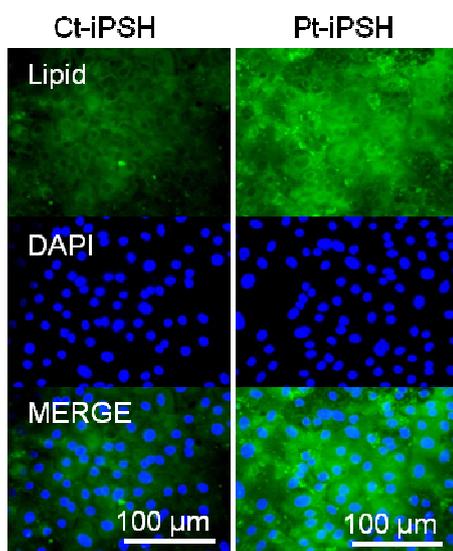
分化誘導した細胞の glycogen 蓄積量を調べるために PAS 染色を行った。PAS 染色の結果、糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞では、健常人 iPS 細胞由来肝細胞と比較して、PAS 陽性像が強く観察された (Fig. 18).



**Figure 18. Periodic acid-Schiff staining.**  
Ct-iPSH, control-iPSC-derived hepatocytes.  
Pt-iPSH, GSDIb-iPSC-derived hepatocytes.

#### 2) Borondipyrromethene 染色

分化誘導した細胞の lipid 蓄積量を調べるために borondipyrromethene 染色を行った。Borondipyrromethene 染色の結果、糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞では、健常人 iPS 細胞由来肝細胞と比較して、borondipyrromethene 陽性像が強く観察された (Fig. 19).



**Figure 19. Borondipyrromethene staining.**  
Ct-iPSH, control-iPSC-derived hepatocytes.  
Pt-iPSH, GSDIb-iPSC-derived hepatocytes.

### 3) Glycogen 及び解糖系代謝物の蓄積

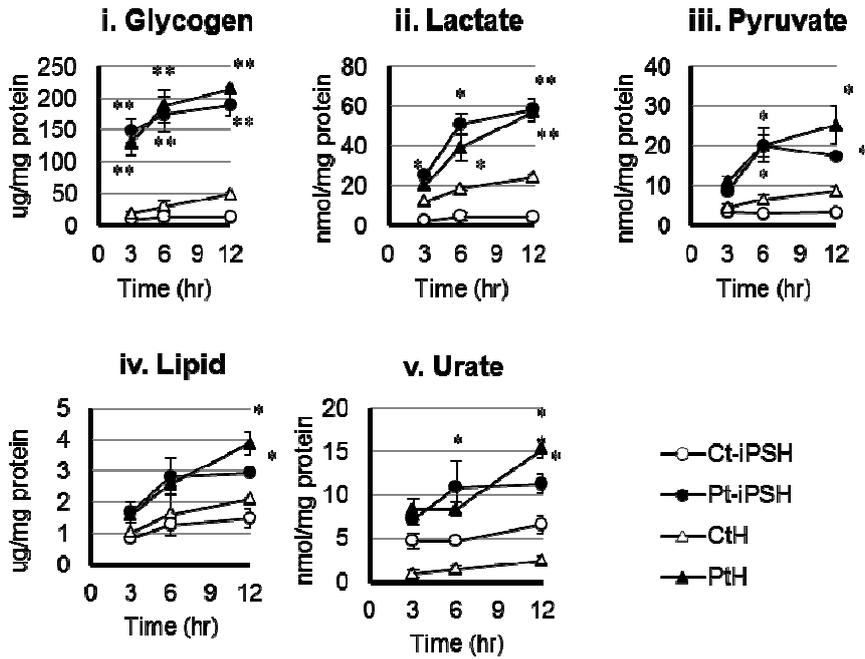
分化誘導 25 日目に培地交換を行い, 3, 6, 12 時間後に細胞を回収した. Glycogen 蓄積は培地交換後, 時間とともに増加した. 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞の細胞内 glycogen 蓄積は, それぞれの時間毎の健常人 iPS 細胞由来肝細胞の蓄積より高かった (Fig. 20). 3, 6, 12 時間における細胞内 glycogen 蓄積量は, 健常人 iPS 細胞由来肝細胞では 9.6, 13, 14  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein, 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞では 129, 188, 214  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein, 健常人由来肝細胞では 18, 30, 49  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein, 糖原病 Ib 型患者由来肝細胞では 148, 175, 189  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein であった.

他のエネルギー代謝解析においても, 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞ではそれぞれの時間毎の健常人 iPS 細胞由来肝細胞と比較して lactate, pyruvate, lipid, urate 蓄積の上昇が認められた(Fig. 20). 3, 6, 12 時間における細胞内 lactate 蓄積量は, 健常人 iPS 細胞由来肝細胞では 2.4, 4.6, 4.3  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein, 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞では 25, 51, 58  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein と 6, 及び 12 時間において有意に高かった. また, 健常人由来肝細胞では 12, 19, 24  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein, 糖原病 Ib 型患者由来肝細胞では 20, 39, 57  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein であった.

3, 6, 12 時間における細胞内 pyruvate 蓄積量は, 健常人 iPS 細胞由来肝細胞では 3.4, 2.9, 3.3  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein, 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞では 8.6, 20, 17  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein と 6 及び 12 時間において有意に高かった. また, 健常人由来肝細胞では 4.4, 6.5, 8.7  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein, 糖原病 Ib 型患者由来肝細胞では 11, 20, 25  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein であった.

3, 6, 12 時間における細胞内 lipid 蓄積量は, 健常人 iPS 細胞由来肝細胞では 0.84, 1.3, 1.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein, 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞では 1.6, 2.8, 2.9  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein と 12 時間において有意に高かった. また, 健常人由来肝細胞では 1.0, 1.6, 2.1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein, 糖原病 Ib 型患者由来肝細胞では 1.6, 2.6, 3.9  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein であった.

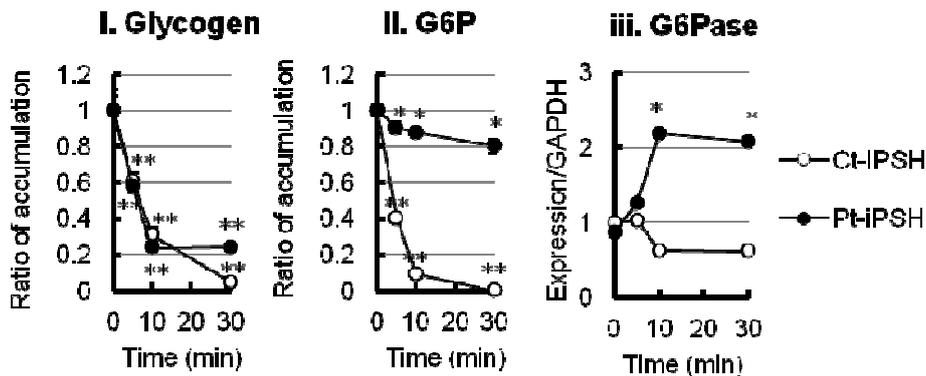
3, 6, 12 時間における細胞内 urate 蓄積量は, 健常人 iPS 細胞由来肝細胞では 4.7, 4.7, 6.6  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein, 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞では 7.2, 11, 11  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein と 6 及び 12 時間において有意に高かった. また, 健常人由来肝細胞では 0.94, 1.5, 2.5  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein, 糖原病 Ib 型患者由来肝細胞では 8.3, 8.4, 15  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein であった.



**Figure 20. Analyses of metabolic functions of GSDIb-iPS cell-derived hepatocytes.** GSDIb-iPS cell-derived hepatocytes secreted more glycogen (i), lactate (ii), pyruvate (iii), lipid (iv), and urate (v) than those of the control subjects as assessed by quantitative determinations at 3, 6, and 12 h. \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Ct-iPSH. Ct-iPSH, control-iPSC-derived hepatocytes; Pt-iPSH, GSDIb-iPSC-derived hepatocytes; PtH, GSDIb patient hepatocytes

#### 4) Glucagon 負荷試験

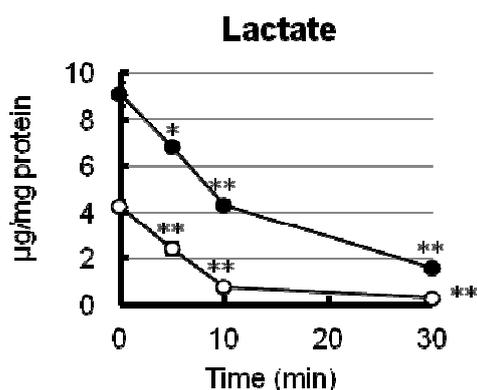
Glucagon 負荷試験の結果, 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞では G6P 代謝遅延, 及び G6Pase の遺伝子発現の持続的上昇が認められた (Fig. 21).



**Figure 21. Glucagon administration assay.** Glycogen accumulation (i), G6P accumulation (ii), and G6Pase gene expression levels (iii) were calculated as the ratio to the value for each iPS-derived hepatocyte level at 0 min. \*, \*\* $P < 0.05$ , 0.01 vs. each-iPSH at 0 min. Ct-iPSH, control-iPSC-derived hepatocytes; Pt-iPSH, GSDIb-iPSC-derived hepatocytes.

## 5) Glucose 負荷試験

Glucose 負荷試験は, glucose 含有培地にて細胞を一定時間のインキュベート後, glucose 不含培地に交換した. その後, 細胞は0, 5, 10, 30分後に回収された. 0, 5, 10, 30分後における細胞内 lactate 蓄積量は, 健常人 iPS 細胞由来肝細胞では 4.3, 2.4, 0.75, 0.30 nmol/mg protein, 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞では 7.2, 11, 11 nmol/mg protein であった (Fig. 22).

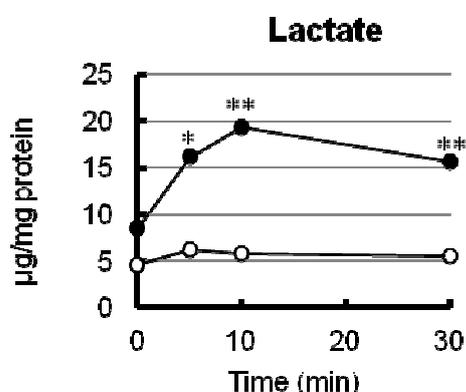


**Figure 22. Glucose administration assay.**  
\*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. each-iPSH at 0 min.  
Ct-iPSH, Ct-iPSH, control-iPS cell-derived hepatocytes; Pt-iPSH, GSDIb-iPS cell-derived hepatocytes.

○; Ct-iPSH  
●; Pt-iPSH

## 6) Galactose 負荷試験

Galactose 負荷試験は, glucose 含有培地にて細胞を一定時間のインキュベート後, galactose 含有 glucose 不含培地に交換した. その後, 細胞は0, 5, 10, 30分後に回収された. 0, 5, 10, 30分後における細胞内 lactate 蓄積量は, 健常人 iPS 細胞由来肝細胞では 4.5, 6.2, 5.8, 5.5 nmol/mg protein, 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞では 8.4, 16.1, 19, 17 nmol/mg protein と 5, 10 及び 30 分後において有意に上昇した (Fig. 23).

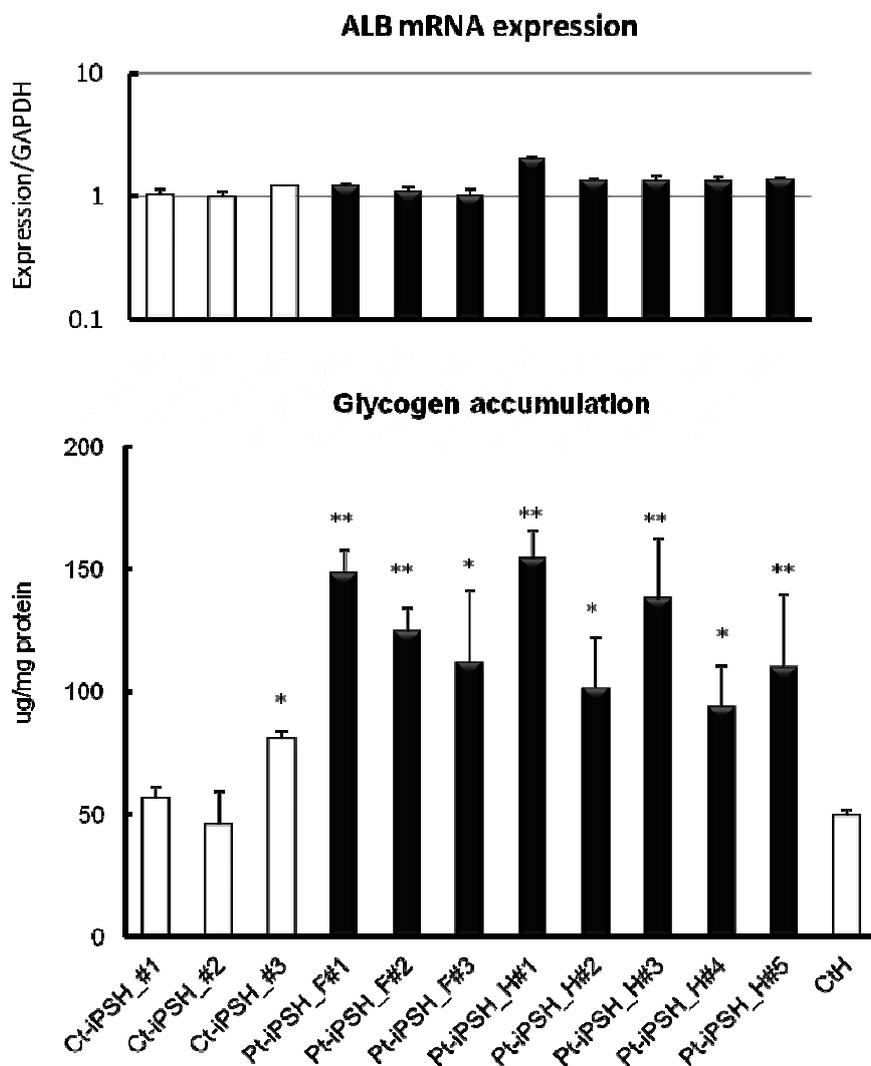


**Figure 23. Galactose administration assay.**  
\*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. each-iPSH at 0 min.  
Ct-iPSH, Ct-iPSH, control-iPS cell-derived hepatocytes; Pt-iPSH, GSDIb-iPS cell-derived hepatocytes.

○; Ct-iPSH  
●; Pt-iPSH

## 7) Glycogen 蓄積の iPS 細胞株間の比較

iPS 細胞の株間の違いによる表現型の差を検討した。実験に用いた株は、健康人由来 iPS 細胞 3 株、糖原病 Ib 型患者皮膚由来 iPS 細胞 3 株、糖原病 Ib 型患者肝非実質細胞由来 iPS 細胞 5 株を用いた。その結果、ALB 遺伝子発現量が認められたことから、いずれの株も肝細胞へと誘導したことを示唆した。一方で患者由来 iPS 細胞から分化誘導した肝細胞では、由来する組織及び iPS 細胞の株の種類を問わず、glycogen が蓄積することが認められた。また、患者 iPS 細胞由来肝細胞は健康人肝細胞と比較しても glycogen 蓄積値は高値であった (Fig. 24).



**Figure 24. Analyses of glycogen accumulation in iPSC-derived hepatocytes.**

Ct-iPSH, control-iPS cell-derived hepatocytes; Pt-iPSH, GSDIb-iPSC-derived hepatocytes; CtH, normal hepatocytes. \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. CtH. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments.

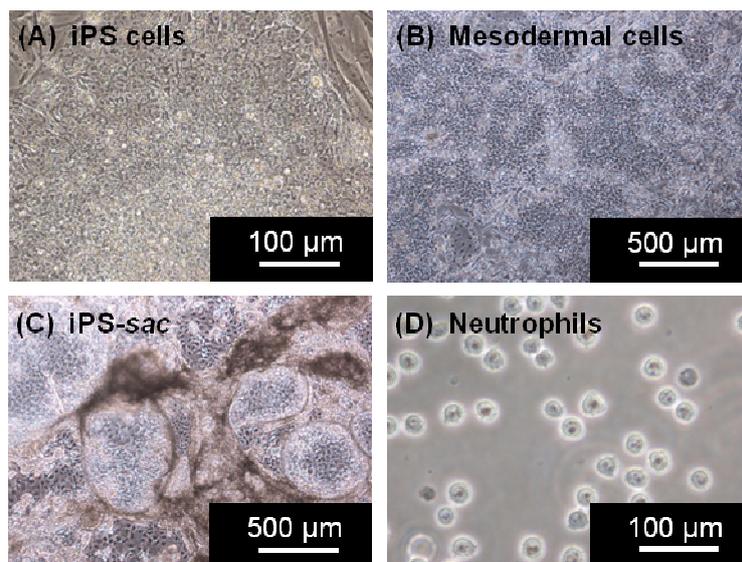
### 2.3.5 好中球への分化誘導

#### 1) 形態学的観察

以下説明なく使用した iPS 細胞クローンは、全て肝非実質細胞由来 iPS 細胞株 H#1 である。

OP9 細胞上にて VEGF 共存下で培養することで iPS 細胞は、avtivin A 共存下の結果と同様に敷石状の細胞へと形態を変化させた。一方で分化日数の経過と共にその細胞集塊の一部に環状の構造物を形成した (Fig. 25B)。その後、SCF, IL-3, TPO 刺激によってその構造を劇的に変化させた。環状構造物は立体に盛り上がり、半透明の袋状の構造物を形成した (iPS-sac)。この iPS-sac は分化誘導 23 日目までに 5~10 mm の大きさとなった。またその sac 内部は空洞であることが顕微鏡下においても観察することが可能であり、sac 内部に多数の球状の浮遊細胞が存在した (Fig. 25C)。

分化誘導 23 日目に iPS-sac 内部の浮遊細胞を取り出し、G-CSF, TPO 存在下にて OP9 細胞上へ再播種した。その後播種した細胞は OP9 細胞上にて維持された (Fig. 25D)。

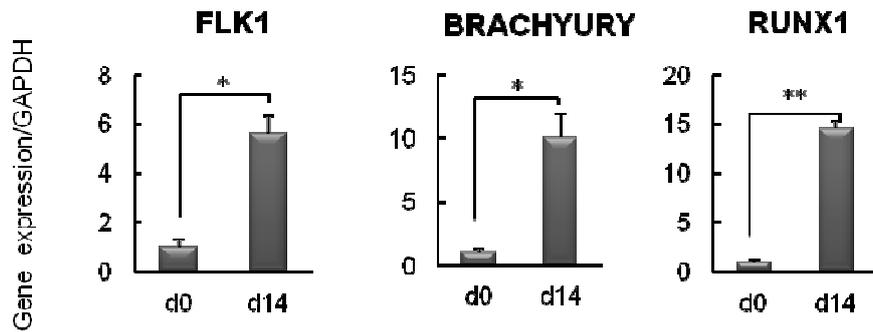


**Figure 25. Morphologic changes in neutrophils differentiation stages.**

- (A) iPS cells.
- (B) Mesodermal cells.
- (C) iPS-sac(s).
- (D) Neutrophil-like cells

#### 2) 遺伝子発現変化

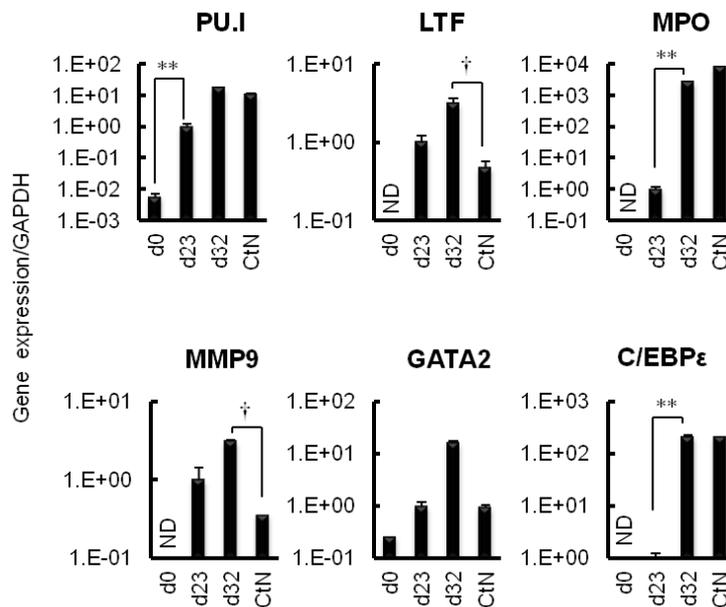
分化誘導 14 日時点における遺伝子発現を解析した (Fig. 26)。その結果、分化誘導前の iPS 細胞と比較し、中胚葉マーカー FLK1, BRACHYURY, RUNX1 の高発現が認められた。



**Figure 26. Real-time PCR analysis for mesodermal cell markers.**

Expression of mesodermal markers for day-14 differentiated cells (d14) and undifferentiated iPSCs (d0). Expression levels were calculated as the ratio of d14 expression to the value for d0. \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ : vs. d0. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments.

分化誘導 23 日及び 32 日時点における遺伝子発現を解析した (Fig. 27). その結果, 分化誘導前の iPS 細胞と比較し, 分化誘導 23 日 (d23) において骨髄球及び好中球マーカー PU.1, lactoferrin (LTF), myeloperoxidase (MPO), gelatinase (MMP9), GATA binding protein 2 (GATA2) が高発現した. またこれらのマーカーは分化 32 日 (d32) まで上昇した.



**Figure 27. Real-time PCR analysis for hematopoietic (myelocyte) markers.**

Expression of hematopoietic (myelocyte) markers by differentiated cells on days 23 (d23) and (d32). Neutrophils derived from normal myeloid cells and undifferentiated iPSCs (CtN) were used as positive and negative (iPSCs, d0) controls, respectively. Expression levels were calculated as the ratio to the value for the d23 expression level. \*\* $P < 0.01$ : vs. d23, † $P < 0.05$ : vs. CtN. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments.

## 2) 免疫染色

分化誘導 23 日目における iPS-sac の免疫染色を行った。その結果, iPS-sac 表面は血管内皮マーカーでもある FLK1 が高発現していた (Fig. 28).

また, 分化誘導 32 日目における浮遊細胞の免疫染色を行った。その結果, 好中球細胞膜表面に高発現が認められる CD13, CD16, CD45 の発現が認められた (Fig. 29).

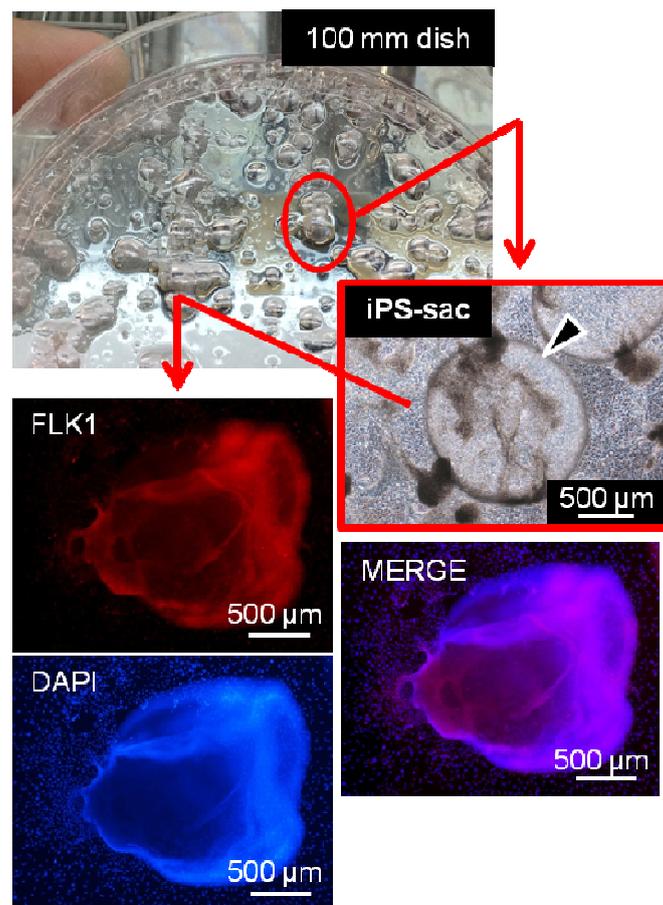


Figure 28. Morphology and character of iPS-sac.

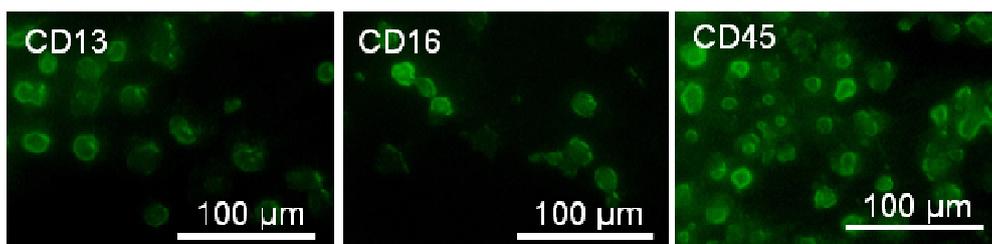
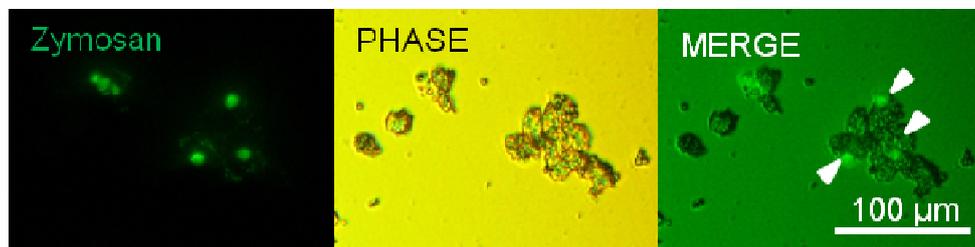


Figure 29. Immunofluorescent staining of CD13, CD16, and CD45.

### 3) 食食能試験

Zymosan は酵母の細胞壁に存在する  $\beta$ -glucan である。好中球を含む食食細胞では zymosan を認識し、それを食食することで免疫機能を果たす。本研究に用いた zymosan A は Alexa Fluoro 488 標識されており、zymosan A の食食が行われると Alexa Fluoro 488 の緑色蛍光を発する。本研究で分化誘導した 32 日時点における細胞を蛍光標識オプソニン化 zymosan A を含む培地にて 30 分間インキュベートしたところ、zymosan A による食食がその内部に観察された (Fig. 30)。

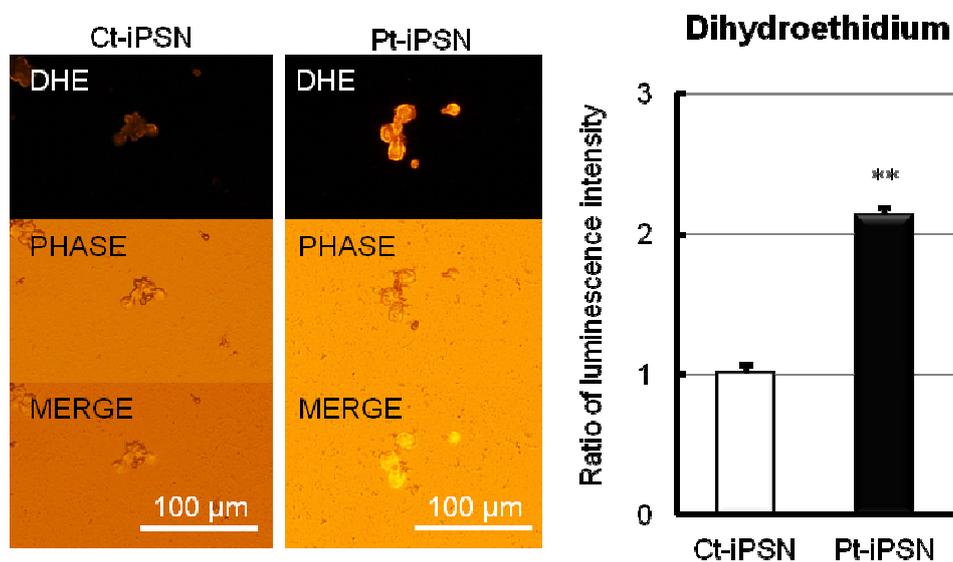


**Figure 30.** Zymosan uptake assay of phagocytic capacity.

### 2.3.6 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球の病態評価

#### 1) DHE 染色

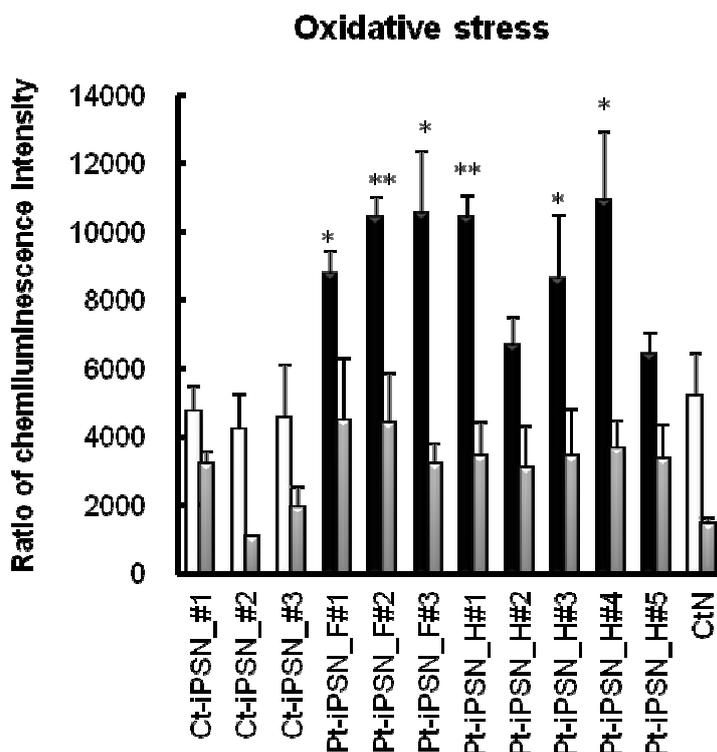
蛍光プローブである DHE は、エチジウムの還元型で ROS と反応すると酸化型エチジウムとなり DNA インターカレーションされ赤色蛍光を発するようになる。本研究ではその性質を利用し、細胞内における ROS 産生の検討を行った。その結果、健常人 iPS 細胞由来好中球と比較し、糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球では DHE による強い橙色蛍光発光が認められた (Fig. 31).



**Figure 31. Dihydroethidium staining in Neutrophils differentiated from iPS cells.** Fluorescence intensities were calculated as the ratio to the value of the Ct-iPSN. **\*\*** $P < 0.01$  vs. Ct-iPSNs.

## 2) L-012 による ROS 産生検出

L-012 は新規なピリドピリダジン構造を有する合成発光基質である。中性域で ROS と反応し高感度に発光するため、生理条件下における細胞中の ROS 産生の検出に有効である。実験に用いた株は、健常人由来 iPS 細胞 3 株、糖原病 Ib 型患者皮膚由来 iPS 細胞 3 株、糖原病 Ib 型患者肝非実質細胞由来 iPS 細胞 5 株を用いた。その結果、患者由来 iPS 細胞から分化誘導した好中球では、由来する組織及び iPS 細胞の株の種類を問わず、ROS 産生が上昇することが認められた。またこれらの ROS 産生上昇は vitamin E 誘導体 Trolox C 共存下では低下した (Fig. 32)。この結果は、ROS 緩和のための抗酸化剤として vitamin E が有効であることを示唆した。

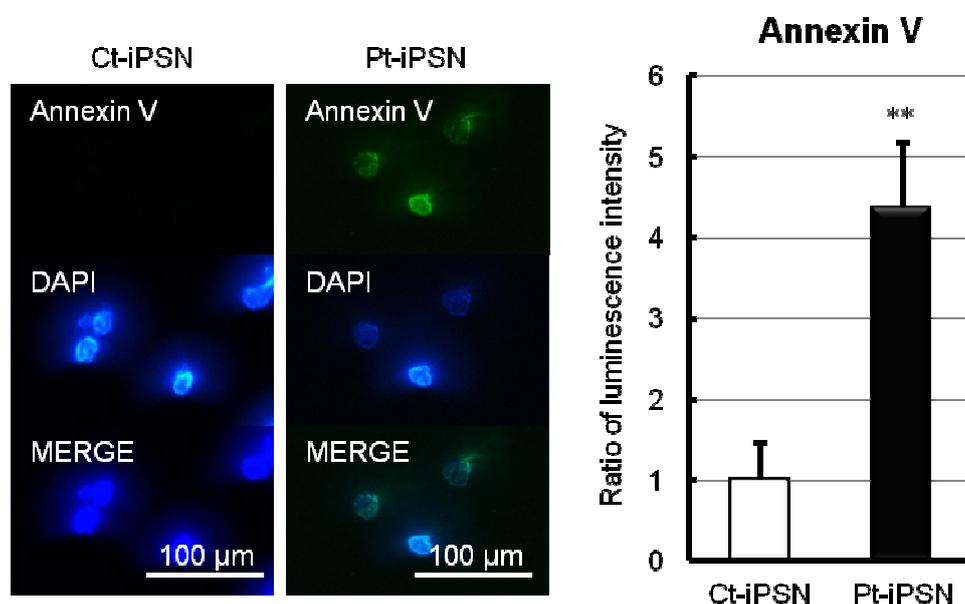


**Figure 32. Analysis of oxidative stress among all iPS cell lines.**

Each gray column represents the results of cells treated with vitamin E. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of four independent experiments.  $P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  vs. CtN. Ct-iPSN, control-iPSC-derived neutrophil-like cells; Pt-iPSN, GSDIb-iPSC-derived neutrophil-like cells; CtN, normal neutrophils.

### 3) Annexin V によるアポトーシスの検出

アポトーシスの初期では細胞膜構造が変化し、正常細胞では脂質二重膜の内側に局在する phosphatidylserine が細胞膜の外側に露出する。その陰性荷電したリン脂質に  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に Annexin V が結合することを利用してアポトーシス細胞を検出することが可能である。本研究ではその性質を利用し、病態モデルにおけるアポトーシス発現の検討を行った。その結果、健常人 iPS 細胞由来好中球と比較し、糖原病 1b 型患者 iPS 細胞由来好中球では Annexin V に標識された PE による強い緑色蛍光発光が認められた (Fig. 33)。

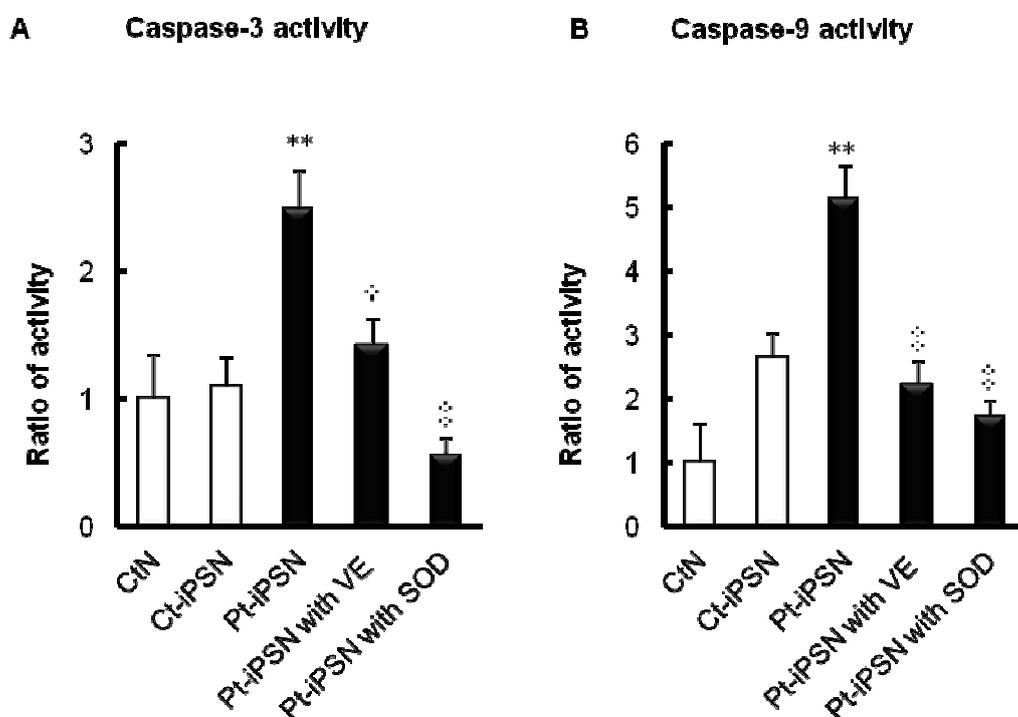


**Figure 33. Exposure of phosphatidylserine on the surface of cell membranes.**

Annexin V-positive neutrophils, as determined by fluorescence staining (green; FITC). Expression levels were calculated as the ratio to that of the respective Ct-iPSN.  $**P < 0.01$  vs. Ct-iPSN. Pt-iPSN, control-iPSC-derived neutrophil-like cells; Pt-iPSN, GSD1b-iPSC-derived neutrophil-like cells.

#### 4) Caspase 活性試験

Caspase は、細胞にアポトーシスを起こさせるシグナル伝達経路を構成する、一群の cysteine protease である。cysteine protease は活性部位にシステイン残基をもつタンパク質分解酵素であり、caspase は基質となるタンパク質の aspartic acid 残基の後部を切断する。本研究の結果、糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球では健常人 iPS 細胞由来好中球と比較し caspase-3 では 2.2 倍、caspase-9 では 2.7 倍有意に高かった (Fig.34)。また vitamin E 及び superoxide dismutase (SOD) 共存下で、その活性は減少した。



**Figure 34. Analysis of caspase activity.**

The DEVD-cleaving activity of caspase-3 (B) and the LEHD-cleaving activity of active caspase-9 (C) in protein extracts of differentiated cells. Expression levels were calculated as the ratio to that of the value of the respective CtN. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \*\* $P < 0.05, 0.01$  vs. CtN; †, ‡ $P < 0.05, 0.01$  vs. Pt-iPSN. Ct-iPSN, control-iPSC-derived neutrophil-like cells; Pt-iPSN, GSDIb-iPSC-derived neutrophil-like cells; CtN, control neutrophils; VE, vitamin E; SOD, superoxide dismutase.

## 2.4 考察

iPS 細胞の利用は再生医療のみならず, iPS 細胞を患者自身の細胞から樹立して, 特定の臓器系譜の細胞に分化誘導することによって, 今まで解析が困難であった疾患の原因究明や未だ治療法の確立されていない病気への応用にも期待されている.<sup>32, 33)</sup> 本研究においても糖原病 Ib 型患者の病態を解明するにあたり, まず患者から iPS 細胞を樹立し, その臓器特異的な表現型を確認した.

樹立した糖原病 Ib 型患者由来 iPS 細胞が患者モデルとして成立するか検討するために, まずは患者表現型が最も顕著に現れる肝細胞へと誘導した. iPS 細胞は分化日数の経過とともに形態学的な変化が認められた (Fig. 13). 分化誘導 25 日目時点において肝細胞に特徴的な細胞構造である多核細胞が出現した. 遺伝子発現解析によって, 分化誘導に伴う変化をプロファイリングした結果, その遺伝子発現推移が生体における肝臓組織発生<sup>35)</sup> を模することを示した (Fig. 14). Activin A 刺激に伴う iPS 細胞の分化誘導によって内胚葉マーカーである SOX17 及び GSC の発現が上昇した. 反対に未分化マーカーある OCT4 及び NANOG の発現量は減少した. その後, 分化誘導 12 日では肝芽細胞にて発現が認められる HNF4 $\alpha$  の上昇, 20 日では未熟肝細胞にて発現が認められる AFP の上昇, 25 日では成熟肝細胞にて発現が認められる ALB の上昇を確認した. また, 分化誘導 25 日目の細胞は TAT, CYP7A1, G6Pase, PFK1, PGMase, CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 mRNA の発現も認められた (Fig. 15). またこれらのマーカーは未分化な iPS 細胞では著しく低いか, あるいは検出不可能であった. また, ALB や TAT の発現は患者肝細胞と同レベルの発現であった. また ALB 免疫染色の結果, ほぼすべての細胞で陽性であった (Fig. 16).

肝管腔からの化合物の取り込み及び放出は, 重要な肝細胞機能のひとつである.<sup>36)</sup> 例えば, 有機アニオン ICG が成熟した肝細胞のみに取り込まれ, 放出される性質を利用し, ICG は肝機能試験に用いられる.<sup>37)</sup> これまでに ES 細胞由来肝細胞においても ICG 処置下におけるその ICG 取り込み能, 放出能によってその機能を評価した報告がある.<sup>38)</sup> 本研究において, iPS 細胞から分化誘導した肝細胞がその機能を有することを確認するために ICG 試験を行った (Fig. 17). その結果, 分化誘導して得られた細胞は, ICG を共存させることで取り込み, ICG を含まない培地にて 6 時間培養することで放出する能力を有することを示した. これらの結果は, iPS 細胞から誘導した肝細胞様細胞が機能的で, 肝細胞の特徴を有することを示した.

糖原病 Ib 型は, 小胞体膜上に存在する *G6PT* 遺伝子変異に起因する.<sup>2)</sup> この糖原病 Ib 型患

者では肝臓における G6P からの glucose 生合成が低下し, glucose の血中への放出が妨げられることで低血糖となる. 一方で細胞内では, glucose への変換を受けない G6P が過剰に蓄積することで glycogen 貯蔵を上昇させ, 細胞を圧迫することで細胞障害を生じる. また, 解糖系を異常亢進させることで, 高乳酸血症, 高脂血症等の諸症状を呈する. これらの症状は, G6Pase- $\alpha$  遺伝子変異に起因する糖原病 Ia 型の症状と同様である.<sup>39)</sup> 本研究において糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞は糖原病 I 型の典型的な表現型を表した. PAS 染色の結果, 健常人 iPS 細胞由来肝細胞と比較して糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞では細胞内 glycogen の過剰な蓄積を示した (Fig. 18). さらに, 脂質特異的に結合する borondipyrromethene 染色の結果から, 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞では細胞内に脂質を過剰に蓄積することが認められた (Fig. 19). これらの結果は, 糖原病 Ia 型患者 iPS 細胞由来肝細胞を用いた Rashid らの報告と一致する.<sup>40)</sup> さらに, 糖代謝分析の結果, 健常人 iPS 細胞由来肝細胞と比較して糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞では glycogen 蓄積, lactate 蓄積, pyruvate 蓄積, lipid 蓄積, urate 蓄積が上昇した. この結果は患者肝細胞の結果と同レベルの蓄積であった (Fig. 20).

Glucagon は, 肝臓において adenylate cyclase を活性化し cyclic AMP を生じさせる. 産生された cyclic AMP は, phosphorylase system を活性化して glycogen 分解を促進させることで, 血糖値を上昇させる. 糖原病 Ib 型では phosphorylase system には異常は無く, glycogen からの glucose 1-phosphate の遊離, G6P への変換は正常に進行すると考えられる. しかしながら産生された G6P は, 血糖維持に働く G6Pase system, 及びエネルギー利用に働く解糖系の 2 つの経路に流入していくが, 糖原病 Ib 型患者は G6Pase system の異常のために, glucagon 刺激によって産生された G6P は解糖系によって消費される. 本研究においても分化誘導した糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞は, 健常人 iPS 細胞由来肝細胞と比較し glucagon 刺激に伴い, glycogen 分解の促進が認められたが, G6P 代謝は遅延しており, それに伴う解糖系酵素 G6Pase の持続的上昇を認めた (Fig. 21). Fernandes らが報告した糖原病の臨床分類スクリーニング法を用いて<sup>41)</sup>, glucose 負荷試験および galactose 負荷試験を行った. その結果, 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞では健常人 iPS 細胞由来肝細胞と比較して glucose 負荷による短期間における現象として一過性に lactate 値が減少し (Fig. 22), また galactose 負荷によって lactate 値が著しく上昇し (Fig. 23), 糖原病 I 型の特徴を示した. さらに今回樹立した他のすべての iPS 細胞株についても検討した (Fig. 24). その結果肝細胞マーカーである ALB 遺伝子発現はいずれの iPS 細胞株についても大きな変化は無く, 肝臓への分化は同程度であった. 対照的に糖原病 Ib 型患者由来 iPS 細胞では, 他の健常人由来 iPS 細胞と比較し glycogen の蓄積が上昇したことから, 患者肝臓病態を反映したモデルの作出に成功した.

iPS細胞の好中球への分化誘導方法は、まずiPS細胞をOP9細胞上へ継代し、VEGFを添加することで中胚葉へと分化させた。尚、iPS細胞をOP9細胞上へ継代した日をday 0とした。OP9細胞上でVEGFと共存させたiPS細胞は密なコロニー構造 (Fig. 25A)から、敷石上のコロニー構造へと変化した (Fig. 25B)。Day 14時点において遺伝子発現の変化についてみたところ、day 0と比較し中胚葉マーカーFLK1, BRACHYURY, RUNX1 mRNA 発現が数十倍から数百倍に上昇した (Fig. 26)。その後iPS細胞は14日目に0.05% トリプシンで剥離し、再度OP9細胞上へ播種した。Day 14からday18までの培地は血液細胞分化基礎培地にIL-3, SCF, TPOを加えたものである。培養後しばらくすると Fig. 25C に示すようなドーム上の構造物 (sac) が観察された。この sac 外壁は血管内皮細胞マーカー陽性であり、内部に血球細胞マーカー陽性の球状細胞が多数存在すると報告されている。本研究においても Fig. 28 に示すような sac をしばらく培養したところ、sac が壊れて中から球状の細胞が多数観察された (Fig. 25D)。ここから (day23) の培地の組成は分化終了 (day 32) まで同一であり、血液細胞分化基礎培地に G-CSF, TPO を加えたものである。骨髓球及び好中球マーカー<sup>42-44)</sup> である PU.1, myeloperoxidase (MPO), lactoferrin (LTF), gelatinase (MMP9), GATA binding protein 2 (GATA2)と CCAAT/enhancer-binding protein epsilon  $\epsilon$  (C/EBP $\epsilon$ )は分化誘導前と比較し、分化誘導 23 日目において高発現することが認められた (Fig. 27)。また、これらの発現は 32 日目まで上昇した。

分化 day 32 時点で培地中の浮遊細胞を回収し免疫染色を行った。回収した細胞は Fig.29 に示す通り、CD13, CD16, CD45 陽性であった。CD13 抗原<sup>45)</sup> は、正常末梢血の好中球、好酸球、好塩基球及び単球などほとんどの骨髓系細胞にみられ、骨髓系分化の方向付けがされた前駆細胞の表面にこの抗原がみられる。CD16 (glycosylphosphatidylinositol 結合型)<sup>46)</sup> は好中球に発現する。CD45<sup>47)</sup> は、すべてのヒト白血球表面に発現し、赤血球及び血小板には存在しない。分化誘導し得られた細胞はいずれのマーカーにも陽性であることから、iPS 細胞から好中球へ分化したことが確認された。

また、白血球は貪食作用を持ち、侵入微生物の排除、損傷細胞や異物の除去に働き、感染防御機構の中で重要な働きを持つ。Zymosan<sup>48)</sup> は酵母の細胞壁であり、オプソニン化に拘らず白血球に貪食される。分化誘導した細胞を zymosan A と共存させて 37°C, 30 分間インキュベートすると、蛍光標識した zymosan の貪食が観察された (Fig. 30)。この結果から分化誘導した iPS 細胞が機能的な好中球であることを示唆した (Fig. 30)。

Fig. 31 は ROS 産生を DHE 染色にて評価した結果である。膜透過性を持つ還元型エチジウムは細胞膜を容易に透過し、細胞内で酸化されると橙色の蛍光を発する。糖原病 Ib 型患者

iPS 細胞由来好中球では健常人 iPS 細胞由来好中球と比較し、エチジウムの発色が強くなった。また、今回樹立した糖原病 Ib 型患者由来 iPS 細胞 8 株全てにおいても同様に検討した (Fig. 32)。その結果、細胞中の ROS と反応する L-012 による化学発光強度も糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球では健常人 iPS 細胞由来好中球と比較し高くなることが認められた。また糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球における ROS 産生の上昇は抗酸化剤 vitamin E の添加によって抑制された。

Fig. 33 は phosphatidylserine の細胞膜表面への露出を、蛍光標識した Annexin V を用いて検出した結果である。早期アポトーシスは、細胞の内部から外部への phosphatidylserine の移動による細胞膜の形態学的な変化が特徴であり、DNA 分解より先に生じる。Annexin V は  $Ca^{2+}$  存在下で phosphatidylserine に特異的で高い親和性を有する。Fig. 33 に示したように糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球では、健常人 iPS 細胞由来好中球と比較して FITC の蛍光発色が強くなった。また caspase は、細胞にアポトーシスを起こさせるシグナル伝達経路を構成する、一群の cysteine protease である。この活性についても Annexin V の結果と同様、糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球では caspase-3 では 2.2 倍、caspase-9 では 2.7 倍有意に高くなった (Fig. 34)。また vitamin E 及び SOD 共存下で、その活性は減少した。

糖原病 Ib 型は小胞体膜上に存在する G6P 輸送体である G6PT 遺伝子の欠損で発症する。従って、G6PT 遺伝子異常は G6Pase 機能不全を起こし、肝臓では glucose を体外へ放出できないことで低血糖を起こす。また、細胞内では解糖系が過剰亢進し、glycogen 蓄積や高乳酸血症、高脂血症などの症状をきたす。これらの症状は G6Pase 遺伝子異常である糖原病 Ia 型の症状と同じである。本研究で分化誘導することで得られた肝細胞においても glycogen の蓄積などの糖原病 I 型の典型症状が認められ、この結果は Hossein らが報告した糖原病 Ia 型の iPS 細胞モデルの結果と一致する。一方で、糖原病 Ib 型が糖原病 Ia 型と異なることを特徴付ける症状があり、糖原病 Ib 型では好中球機能不全・好中球減少症をきたし、頻回な感染症の危険性にさらされている。<sup>23)</sup> 糖原病 Ia 型の原因遺伝子 G6Pase- $\alpha$  は好中球では発現していない。<sup>21)</sup> 今回樹立した iPS 細胞の元となった糖原病 Ib 型患者も好中球数が 1000 / $\mu$ L 未満であり、常に G-CSF 製剤にて好中球数を維持しつつ、抗生剤にて感染症予防を行っている。<sup>49,50)</sup> 好中球に存在する G6PT が好中球減少症及び機能異常に関わるかは解明されていないが、見解として酸化ストレスの増加によるアポトーシスが原因であるとされている。<sup>25)</sup> 糖原病 Ib 型モデルマウスを用いた Kim ら報告では、マウス好中球では持続的に酸化ストレスが上昇し、それに起因して caspase-3, 9 の活性が上昇することを報告した。<sup>24)</sup> また、糖原病 Ib 型における好中球減少症が好中球 G6Pase 系の破綻によるものであることを、Jun らは好中球

に特異的に存在する *g6pase-β* ノックアウトマウスを用いて証明した.<sup>22)</sup> ヒトでも同様な報告がなされており, Melis らはさらに抗酸化剤である vitamin E の投薬によって酸化ストレスを減少させることで, 好中球減少が緩和されることを報告した.<sup>25)</sup> 本研究にて樹立した患者由来 iPS 細胞を用いた病態モデルにおいても酸化ストレスの上昇及びアポトーシス発現が認められた. これらの結果は, 本研究で樹立した iPS 細胞が好中球における患者表現型を有するモデルとして有効であることを示した. さらに抗酸化剤共存下において酸化ストレスのみならず, アポトーシスも抑制した結果は今後の糖原病 Ib 型の治療に対して有効な知見であると考えられた.

### 第三章 糖原病 Ib 型患者由来 iPS 細胞を用いた好中球減少症の機序の検討

#### 3.1 緒言

糖原病 Ib 型患者の病態は, *G6PT* 遺伝子変異により G6P から glucose に変換することができず, 肝臓や腎臓に多量の glycogen が蓄積することによる肝腫大・腎腫大, 周辺組織を圧迫し, 肝機能異常・腎機能異常を呈する. また, 生体内での glucose の大部分は, glycogen 分解や糖新生で産生された G6P の加水分解により生じるため, G6PT 系機能低下は低血糖を起こす.

加えて, 糖原病 Ib 型患者では上記症状以外にも, 特異的な症状として, 好中球減少を伴うことが知られているが<sup>17, 18)</sup>, その原因は未だ解明されていない. この現象は, 好中球 *G6Pase-β*<sup>21)</sup> の欠損でも認められることから, G6Pase 系の機能低下が原因と考えられている.<sup>22)</sup> これまでの糖原病 Ib 型に関する知見として, Kuijpers ら<sup>23)</sup> 及び Kim ら<sup>24)</sup> の報告がある. 彼らは糖原病 Ib 型患者及び *g6pt*<sup>(-/-)</sup>マウスの好中球では, 健常人及び *g6pt*<sup>(+/+)</sup>マウスと比較し, 酸化ストレス及びアポトーシスの発現が有意に上昇することを報告した. さらに, 彼らはそのアポトーシス発現の上昇は酸化ストレスに起因すると考察している. また, この結果を支持する報告として, Melis ら<sup>25)</sup> の研究がある. 彼らは糖原病 Ib 型患者における好中球減少症への治療目的として抗酸化作用を有する vitamin E の効果を検討し, 糖原病 Ib 型患者の好中球減少症を有意に改善することを報告した.<sup>25)</sup> このように糖原病 Ib 型における好中球減少症の原因として酸化ストレスが関与するという報告は幾つか存在する. しかし, これらの報告は, 酸化ストレスを現象として捉えているのみであり, 実際問題として ROS 産生経路のメカニズムについては説明していない. 一方, 糖原病 Ib 型における好中球 ROS の産生経路について述べた研究として, Leuzzi らの報告がある. 彼らは好中球における主要な ROS 産生タンパク質である nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (Nox)2 に着目し, G6PT 阻害により Nox2 が活性化されること, 及び Nox2 阻害薬によりアポトーシスが抑制されることを明らかにした.<sup>51)</sup> しかし, この報告においても ROS 産生の場としての Nox2 の役割について述べているのみであり, 糖原病 Ib 型における G6PT 機能低下に起因する ROS 産生の機序は明らかにしていない.

そこで本研究は, 前章の糖原病 Ib 型患者由来 iPS 細胞を用い, 好中球細胞膜に存在する Nox2 の活性化機序の観点, 及び好中球への分化誘導に伴う Nox2 複合体形成の観点から病態解明を試みた.

## 3.2 実験材料および実験方法

### 3.2.1 実験材料及び試薬

#### 1) 試薬

DMEM/F12, MEM $\alpha$ , L-glu, NEAA, L-012, staurosporine, chelerythrine, apocynin, NADPH は Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan)より入手した. FBS, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox C), diphenyliodonium chloride (DPI),  $\beta$ -MeE, gelatin は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より入手した. SYBR Premix ExTaqII は Takara Bio (Osaka, Japan) より入手した. 3-(1-(3-imidazol-1-ylpropyl)-1H-indol-3-yl)-4-anilino-1H-pyrrole-2,5-dione (IYIAP) は Merck-Calbiochem (Darmstadt, Germany) より入手した. PBS 用錠剤は DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan) より入手した. SYBR Premix ExTaqII は Takara Bio (Osaka, Japan) より入手した. KSR, Superscript II Reverse Transcriptase, Alexa Fluor 488 (goat-anti rabbit IgG), Alexa Fluor 568 (goat-anti mouse IgG, rabbit IgG), Alexa Fluor 488-conjugated zymosan A は Invitrogen Life Science (Carlsbad, CA, USA) より入手した. bFGF, VEGF, IL-3, SCF, TPO, G-CSF は Pepro Tech (Rocky Hill, NJ, USA) より入手した. RNeasy Mini Kit は Qiagen (Valencia, CA, USA) より入手した. Glycogen, G6P, lactate, pyruvate, caspase-3/7 及び -9 assay kit は Funakoshi (Tokyo, Japan) より入手した. Anti-human FLK1, anti-human Bax, anti-human Smac/Diablo, anti-human Omi/HtrA2, anti-human GRP78/Bip, anti-human manganese superoxide dismutase (Mn-SOD), anti-gp91<sup>phox</sup> は Abcam (Cambridge, United Kingdom) より入手した. Anti-human CD13, anti-human CD16, anti-human CD34, anti-human CD45 は BD Biosciences (Bedford, MA, USA) より入手した. DHE は Molecular Probes (City of Eugene, OR, USA) より入手した. DAPI は Dojindo Molecular Technologies, Inc. (Kumamoto, Japan) より入手した. その他, 実験に使用した試薬類は市販品の特級または生化学用のものを使用した.

#### 2) 細胞

糖原病 Ib 型患者由来 iPS 細胞株は第二章で樹立したものを使用した.

健常人由来 iPS 細胞株 (Tic) は第二章と同様に, 国立成育医療研究センター 梅澤明弘 博士よりご供与頂いたものを使用した. フィーダー細胞は MEF (Oriental Yeast Co., LTD., Nagano, Japan) を使用した. OP9 細胞及び HL-60 細胞は, 理化学研究所バイオリソースセンターCell Bank (Tokyo, Japan) より入手した.

### 3) 試薬の調製

#### 細胞破碎用緩衝液

0.25 M Sucrose および 1 mM EDTA 含有 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) とした.

#### 細胞膜分画用緩衝液

1.2 M Sucrose および 1 mM EDTA 含有 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) とした.

その他の試薬の調製は第二章で述べた方法と同様に行った.

### 4) 培地の調製

培地の調製は第二章で述べた方法と同様に行った.

### 5) 培養プレートの準備

培養プレートの準備は第二章で述べた方法と同様に行った.

## 3.2.2 MEF の培養, MMC 処理

### 1) MEF の解凍

MEF の解凍は第二章で述べた方法と同様に行った.

### 2) MEF の継代

MEF の継代は第二章で述べた方法と同様に行った.

### 3) MEF の MMC 処理

MEF の MMC 処理は第二章で述べた方法と同様に行った.

### 4) MMC 処理 MEF の凍結保存

MMC 処理 MEF の凍結保存は第二章で述べた方法と同様に行った.

### 5) フィーダー細胞としての MMC 処理 MEF の解凍

フィーダー細胞としての MMC 処理 MEF の解凍は第二章で述べた方法と同様に行った.

### **3.2.3 OP9 細胞の培養, MMC 処理**

#### **1) OP9 細胞の解凍**

OP9 細胞の解凍は第二章で述べた方法と同様に行った。

#### **2) OP9 細胞の継代**

OP9 細胞の継代は第二章で述べた方法と同様に行った。

#### **3) OP9 細胞の MMC 処理**

OP9 細胞の MMC 処理は第二章で述べた方法と同様に行った。

#### **4) MMC 処理 OP9 細胞の凍結保存**

MMC 処理 OP9 細胞の凍結保存は第二章で述べた方法と同様に行った。

#### **5) フィーダー細胞としての MMC 処理 OP9 細胞の解凍**

フィーダー細胞としての MMC 処理 OP9 細胞の解凍は第二章で述べた方法と同様に行った。

### **3.2.4 ヒト iPS 細胞の培養**

#### **1) ヒト iPS 細胞の解凍**

ヒト iPS 細胞の解凍は第二章で述べた方法と同様に行った。

#### **2) ヒト iPS 細胞の継代**

ヒト iPS 細胞の継代は第二章で述べた方法と同様に行った。

#### **3) ヒト iPS 細胞の凍結保存**

ヒト iPS 細胞の凍結保存は第二章で述べた方法と同様に行った。

### 3.2.5 好中球への分化誘導

ヒト iPS 細胞から好中球への分化誘導は、ヒト iPS 細胞が培養ディッシュに対し、未分化コロニーの占める割合が約 70%になった状態で開始した。まずヒト iPS 細胞培養ディッシュに、Y-27632 を 10  $\mu$ M となるように添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 60 分間処理した。Y-27632 処理後の培養ディッシュから培養液を吸引除去し、PBS 10 mL/dish で 2 回洗浄した。ヒト iPS 細胞用剥離液を 1 mL/dish で添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 5 分間処理した。ヒト iPS 細胞用剥離液を吸引除去し、10  $\mu$ M Y-27632 含有血液分化用基礎培地 5 mL/dish を添加し、細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に回収した。さらに 10  $\mu$ M Y-27632 含有血液分化用基礎培地を 5 mL/dish で添加し、残った細胞も先の 15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、10 mL の 20 ng/mL VEGF, 10  $\mu$ M Y-27632 含有血液分化用基礎培地にて懸濁し、前日に  $5\sim 7 \times 10^5$  cells/100 mm dish になるように播種した OP9 細胞へ播種した。継代後 24 時間で Y-27632 を含まない血液分化用基礎培地に交換した。播種後は 20 ng/mL VEGF 含有血液分化用基礎培地で 15 日間培養することで中胚葉に誘導した。

15 日後、20 ng/mL IL-3, 50 ng/mL SCF, 10 ng/mL TPO を含む血液分化用基礎培地で 9 日間培養することにより血管芽細胞への分化を行った。

24 日後、Y-27632 を 10  $\mu$ M となるように添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 60 分間処理した。Y-27632 処理後の培養ディッシュから培養液を吸引除去し、PBS 10 mL/dish で 2 回洗浄した。0.25% Trypsin/EDTA 溶液を 3 mL/100 mm dish で添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37°C にて 5 分間処理した。10  $\mu$ M Y-27632 含有血液分化用基礎培地 5 mL/dish を添加し、細胞懸濁液を 50 mL 遠沈管に回収した。さらに 10  $\mu$ M Y-27632 含有血液分化用基礎培地を 5 mL/dish で添加し、残った細胞も先の 50 mL 遠沈管に回収した。回収した細胞は 45  $\mu$ m セルロースアセテートフィルターで濾過し、細胞を完全にバラバラにした。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、10 ng/mL G-CSF, 20 ng/mL IL-3 含有した 10 mL の血液分化用基礎培地にて懸濁し、前日に  $5\sim 7 \times 10^5$  cells/100 mm dish になるように播種した OP9 細胞へ播種した。継代 24 時間後、浮遊細胞を含む培地上清を 15 mL 遠沈管に回収した。1,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を吸引除去し、10 ng/mL G-CSF, 20 ng/mL IL-3 含有した 10 mL の血液分化用基礎培地にて懸濁し、前日に  $5\sim 7 \times 10^5$  cells/100 mm dish になるように播種した OP9 細胞へ播種した。播種後は 10 ng/mL G-CSF, 20 ng/mL IL-3 含有血液分化用基礎培地で培養することで好中球に誘導した。

### 3.2.6 RNA 抽出と PCR

#### 1) RNA 抽出

Total RNA は第二章で述べた方法と同様に RNeasy Mini Kit の添付マニュアルに従い抽出した。

#### 2) RNA の定量

RNA 量は第二章で述べた方法と同様に核酸蛋白質分光光度計 BioSpec-nano (島津製作所社製) の RNA 簡易定量モードを用いて 260 nm における吸光度を測定することにより求めた。また, RNA の純度は 260 nm と 280 nm における吸光度比より求めた。

#### 3) 逆転写反応

cDNA の合成は第二章で述べた方法と同様に PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) を使用し, 添付マニュアルに従い行った。

#### 4) Real-Time RT-PCR

PCR プライマーは, Table 3 に示したものをを用いた。Real-Time RT-PCR は第二章で述べた方法と同様に行った。

**Table 3 Primer sequence for PCR**

Primer name	Forward primer sequence (5'to 3')	Reverse primer sequence (5'to 3')
BRACHYURY	ACCCAGTTCATAGCGGTGAC	CAATTGTCATGGGATTGCAG
CEBP $\epsilon$	CCCTTACACAAGGGCAAGAA	CTCTGCCATGTACTCCAGCA
FLK1	CTGCAAATTTGGAAACCTGTC	GAGCTCTGGCTACTGGTGATG
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
GATA2	ACCGGAAGATGTCCAACAAG	TCTCCTGCATGCACTTTGAC
gp91 <sup>phox</sup>	GTACCTGGCTGTGACCCTGT	GGTTTTGGTGGAGGAAGTGA
LTF	GCATGGGCTAAGGATTTGAA	TCCCAAATTTAGCCTGTTGG
MMP9	TTGACAGCGACAAGAAGTGG	GCCATTCACGTCGTCCTTAT
MPO	TGTTTGAGCAGGTCATGAGG	CCAGATGTTCGATGTTGTTGG
p47 <sup>phox</sup>	ACGTGGTGGAGGTCGTAGAG	TCTTCCGTCTCGTCAGGACT
PU.1	CCAGCTCAGATGAGGAGGAG	CAGGTCCAACAGGAACTGGT
Rac2	GCAAGACCTGCCTTCTCATC	TTGCTGTCCACCATCACATT
RUNX1	CCCTAGGGGATGTTCCAGAT	TGAAGCTTTTCCCTCTTCCA

### 3.2.7 染色による評価

#### 1) 非標識抗体を用いた免疫蛍光染色

接着細胞を, PBS で3回洗浄し, 室温にて4°Cに冷却した4% paraformaldehyde に一晩浸漬することにより固定した. PBS で5分間ずつ3回洗浄後, 固定した細胞は, 冷 methanol に浸漬させ, 4°Cにて5分間膜透過処理を行った. PBS で5分間ずつ3回洗浄後, 2%スキムミルクに浸し室温にて20分間反応させ, ブロッキング処理を行った. また, 浮遊細胞 ( $1 \times 10^4$  cells) を, 96-well plate またはスライドガラス上へサイトスピンを行い, 細胞を接着した. 固定した細胞は, PBS で3回洗浄し, 室温にて4°Cに冷却した100% methanol に5分間浸漬することにより固定した. その後, 一次抗体として anti-human FLK1 antibody rabbit IgG polyclonal (1:200), anti-human Bax antibody mouse IgG monoclonal (1:200), anti-human Smac/Diablo antibody rabbit IgG polyclonal (1:200), anti-human Omi/HtrA2 antibody rabbit IgG polyclonal (1:200), anti-human GRP78/Bip antibody rabbit IgG polyclonal (1:200), anti-human manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) antibody rabbit IgG polyclonal (1:200), anti-gp91<sup>phox</sup> antibody rabbit IgG polyclonal (1:200) を用いて, 室温にて60分間, または4°Cにて一晩反応させた. PBS で5分間ずつ3回洗浄後, 二次抗体として, Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (1:200), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgM (1:200), Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (1:200), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:200) を用いて, 室温遮光下にて60分間反応させた. PBS で5分間ずつ3回洗浄後, 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI を室温遮光下で5分間反応させ核染色を行った. PBS で3回洗浄後, 蛍光顕微鏡にて観察した. また細胞は蛍光プレートリーダーにて  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  (Alexa Fluor 568 = 544 nm/612 nm, Alexa Fluor 488 = 483nm/538 nm) における蛍光発光量を定量した.

#### 2) 標識抗体を用いた免疫蛍光染色

浮遊細胞 ( $1 \times 10^4$  cells) を, 96-well plate またはスライドガラス上へサイトスピンを行い, 細胞を接着した. その後 PBS で3回洗浄し, 室温にて4°Cに冷却した100% methanol に5分間浸漬することにより固定した. PBS で5分間ずつ3回洗浄後, 抗体として anti-human CD13 antibody conjugated PE (1:100), anti-human CD16 antibody conjugated PE (1:100), anti-human CD34 antibody conjugated PE (1:100), anti-human CD45 antibody conjugated PE (1:100)を用いて, 室温にて一時間反応させた. PBS で5分間ずつ3回洗浄後, 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI を室温遮光下で5分間反応させ核染色を行った. PBS で3回洗浄後, 蛍光顕微鏡にて観察した.

### 3) DHE 染色

DHE 染色は第二章で述べた方法と同様に行った。

#### 3.2.8 食食能試験

食食能試験は第二章で述べた方法と同様に行った。

#### 3.2.9 糖代謝産物の定量

Glycogen, G6P, lactate 及び pyruvate の定量は、それぞれ Glycogen, G6P, lactate 及び pyruvate 測定キットを使用し、プロトコールに従って行った。細胞 ( $1 \times 10^5$  cells) は 50  $\mu$ L の細胞溶解液で懸濁し、反応液を添加後 30 分間インキュベートした。その後マイクロプレートリーダーを使用して、その蛍光発光を検出した。

#### 3.2.10 ATP の定量

ATP はキットのプロトコールに従って行った。細胞  $1 \times 10^4$  を 96 well plate 内に 23°C の条件下で 30 分間インキュベートした。続いて専用の試薬を加え、30 秒間混合した。最後にプレートをルミノメーターにセットし、25°C の条件にてその蛍光を検出した。

#### 3.2.11 L-012 による ROS 産生量の測定

細胞は 96-well プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well にて播種し 37°C の条件下で 30 分間インキュベートした。反応組成は、細胞懸濁液に L-012 (最終濃度; 80  $\mu$ M) を含む 50  $\mu$ L の系とした。L-012 による化学発光は 37°C の条件にてルミノメーターを用いて検出した。

#### 3.2.12 細胞膜 Nox2 活性測定

##### 1) 細胞膜画分の調製

細胞を細胞破碎用緩衝液 1 mL 中にてホモジナイザーで 1 分間ホモジナイズした。ホモジネートは 9,000 $\times$ g で 20 分間遠心分離し、その上清を細胞膜分画用緩衝液 2 mL 上に重層、

100,000×gにて60分間遠心し、得られた細胞膜分画用緩衝液界面を細胞膜画分として回収した。操作は全て氷上で行った。タンパク質定量はプロテインアッセイ染色液付属のプロトコールに従って行い、最終濃度 1.0 mg protein/mL に調整した。

## 2) Nox2 活性測定

Nox2 が NADPH を補酵素として ROS を産生することを利用し、生じた ROS が L-012 と反応し生じる蛍光をルミノメーターにて測定した。

反応組成は、0.1 mg protein/mL の細胞膜懸濁液に L-012 (最終濃度; 80 μM) を含む 50 μL の系とした。また、実験の目的に合わせ NADPH を最終濃度が 200 μM となるように加えた。L-012 による化学発光は 37°C の条件にてルミノメーターを用いて検出した。

### 3.2.13 Caspase 活性測定

Caspase 活性は kit を使って、それぞれのプロトコールに従った。細胞  $1 \times 10^4$  を 96 well plate 内が 23°C の条件下で 30 分間インキュベートした。続いて専用の試薬を加え、30 秒間混合した。最後にプレートをルミノメーターにセットし、25°C の条件にてその蛍光を検出した。

### 3.2.14 統計解析

測定値は、全て平均値 ± S.E. で表記した。

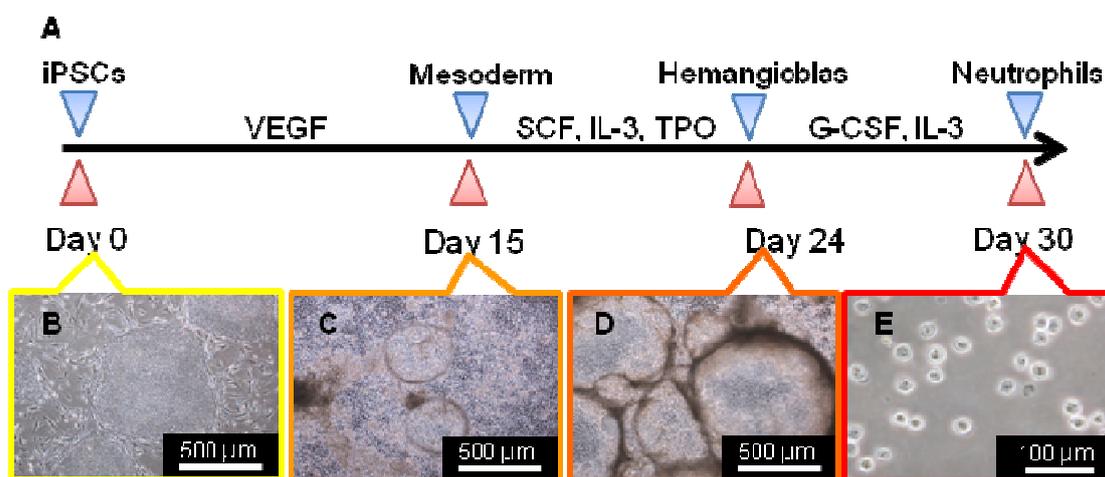
独立二群間の検定には、Welch's *t*-test を用いた。多群の比較には分散分析で有意であることを確認後、Scheffé's *F* test を用いた。危険率 5%未満を有意とした。

### 3.3 実験結果

#### 3.3.1 好中球への分化誘導

以下説明なく使用した iPS 細胞クローンは、全て肝非実質細胞由来 iPS 細胞株 H#1 である。

好中球への分化誘導法は第二章の方法を一部修正して行った。まず iPS 細胞を中胚葉へと誘導するために OP9 細胞の上へ播種し、VEGF 共存下にて 15 日間培養した。OP9 細胞に播種された iPS 細胞は、細胞間隙が狭い tight なコロニー構造から敷石状コロニーへと形態が変化した (Fig. 35)。このとき細胞を回収し、その遺伝子発現を解析すると、誘導前の未分化な iPS 細胞では観察されなかった中胚葉マーカー FLK1, BRACHYURY, RUNX1 の発現が認められた (Fig. 36)。



**Figure 35. Differentiation of iPS cells into neutrophils.**

(A) Flow chart showing the differentiation protocol into neutrophils. VEGF, vascular endothelial growth factor; SCF, stem cell factor; IL-3, interleukin-3; TPO, thrombopoietin; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor. (B) Undifferentiated iPS cells. (C) Mesodermal cells. (D) iPS-sacs. (E) iPS-derived neutrophils.

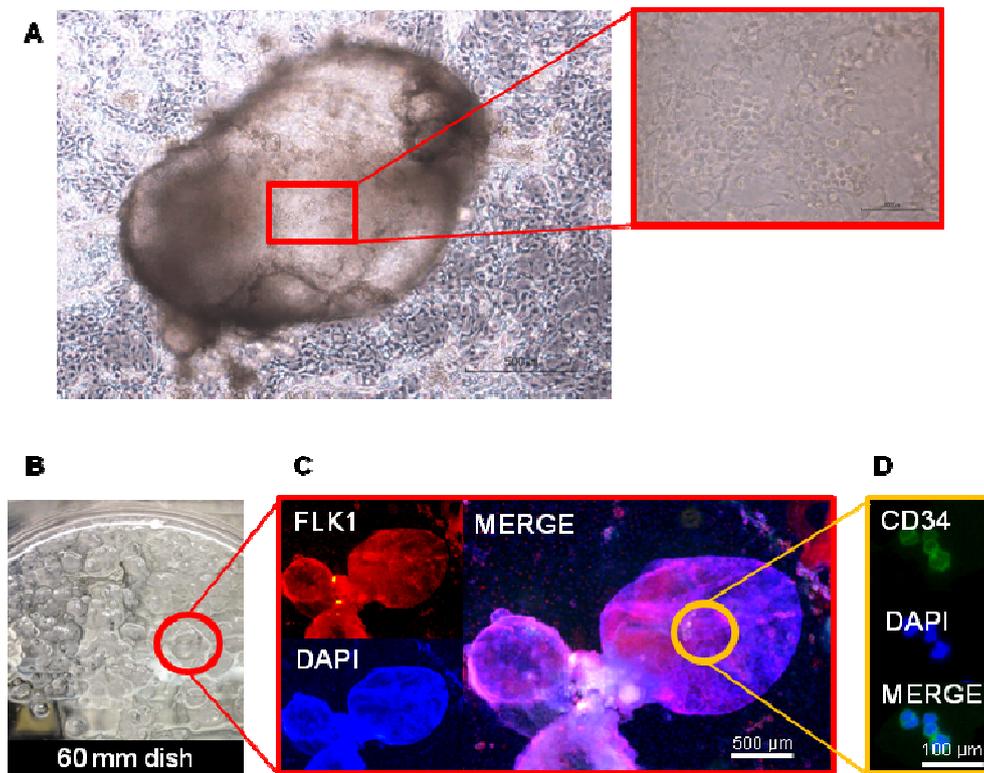


**Figure 36. PCR analysis for mesodermal cell markers.**

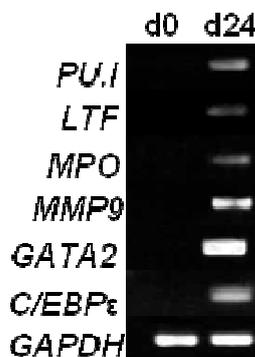
Expression of mesodermal markers for day 14 differentiated cells (d14) and undifferentiated iPS cells (d0).

その後 15 日から 24 日にかけて、細胞は IL-3, SCF, TPO 含有培地にて培養された。培養直後から細胞コロニーは、徐々に半球形の立体構造を形成した (iPS-sac) (Fig. 37)。これらの iPS-sac は血管内皮細胞マーカー-FLK1 を高発現しており (Fig. 37C), 内部に多数の CD34<sup>+</sup>球状浮遊細胞が多数観察された (Fig. 37D)。

この iPS-sac 内部の浮遊細胞を回収し、その遺伝子発現を解析すると骨髓球マーカー-PU.1, LTF, MPO, MMP9, GATA2, C/EBP $\epsilon$  の発現が認められた (Fig. 38)。



**Figure 37. Morphology and character of iPS-sac.**

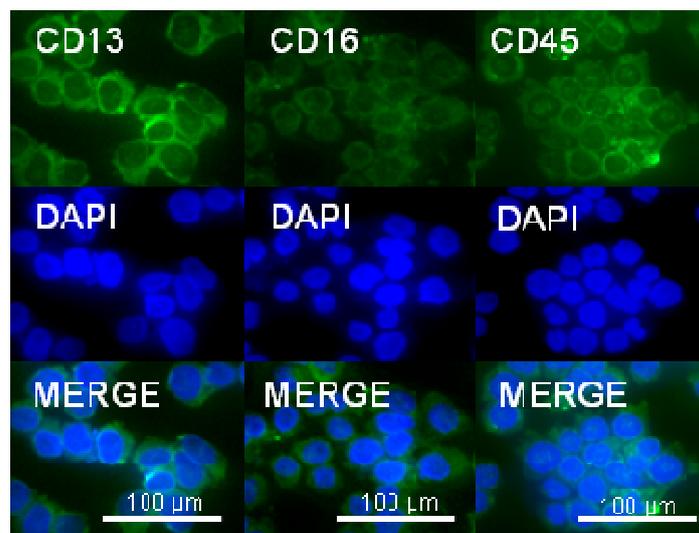


**Figure 38. PCR analysis for myeloblast markers.**

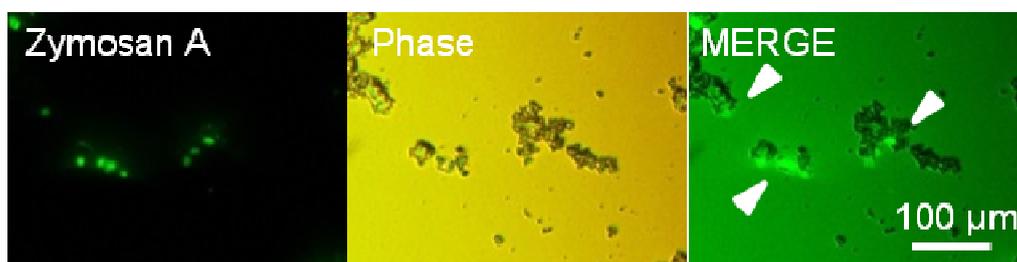
Expression of hematopoietic (myelocyte) markers by undifferentiated iPS cells (d0) and differentiated cells on day 24 (d24).

分化 24 日目に, それらの浮遊細胞を OP9 細胞上へ再播種し, G-CSF, IL-3 共存下にて 7 日間培養した. 分化誘導 30 日目に細胞を回収し, その表面マーカーを調べてみたところ, CD13, CD16 及び CD45 に陽性であった (Fig. 39).

さらに, zymosan A の細胞内への取り込みが認められたことから, 分化誘導した細胞は食胞形成能力を有した (Fig. 40).



**Figure 39.** Immunofluorescent staining of CD13, CD16, and CD45.

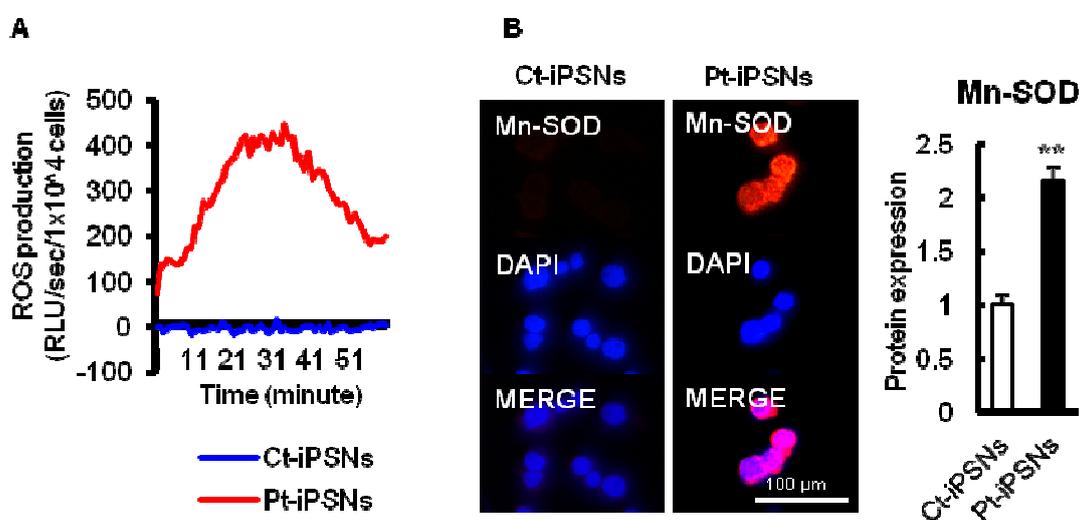


**Figure 40.** Zymosan uptake assay of phagocytic capacity.

### 3.3.2 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来肝細胞の病態評価

#### 1) 酸化ストレス

誘導 30 日目における細胞の酸化ストレスについて評価したところ、糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球では健常人 iPS 細胞由来好中球と比較し、ROS 反応性化合物 L-012 による蛍光発光が高く検出された (Fig. 41A). また酸化ストレス時、ミトコンドリアから産生される ROS 消去タンパク質 Mn-SOD の発現量が糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球では健常人 iPS 細胞由来好中球と比較し約 2 倍に上昇することが認められた (Fig. 41B).



**Figure 41. Oxidative stress.**

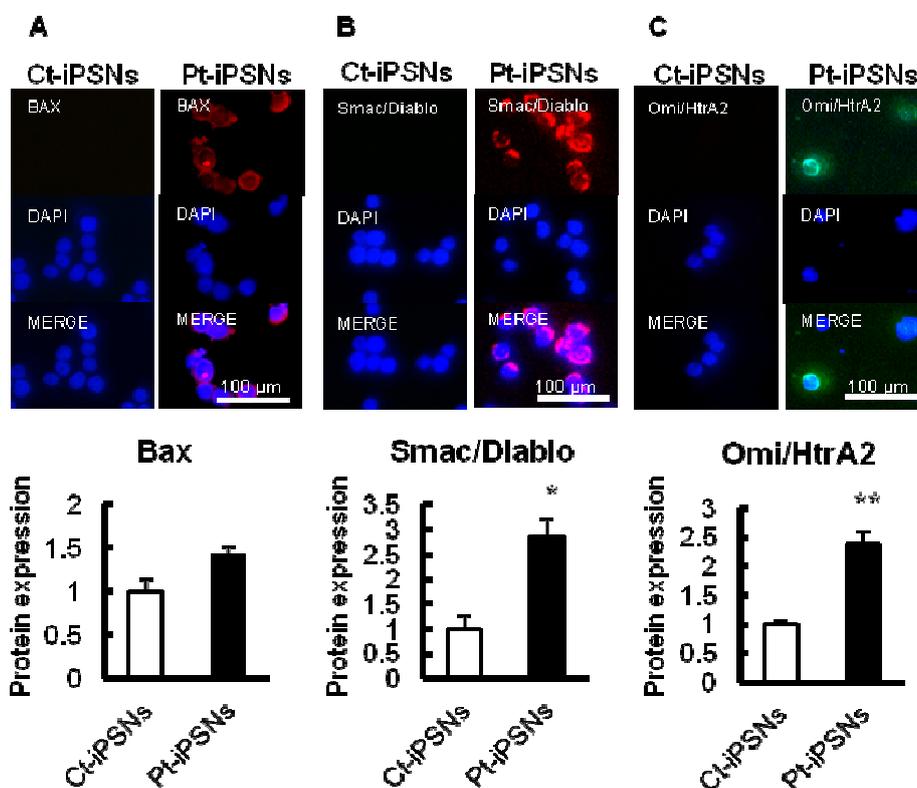
(A) ROS production assay using superoxide-sensitive chemiluminescent dye. (B) Immunostaining of an oxidative stress marker; manganese superoxide dismutase (Mn-SOD). Mean ± S.E.,  $n = 4-6$ . \*\*  $P < 0.01$  vs. Ct-iPSNs (=1). Ct-iPSNs, control-iPS cell-derived neutrophils; Pt-iPSNs, patient-iPS cell-derived neutrophils.

#### 2) アポトーシス

アポトーシスマーカータンパク質 Bax, Smac/Diablo, Omi/HtrA2 の免疫染色を行った (Fig. 42). Bax はアポトーシスを促進する Bcl-2 ファミリーとしてミトコンドリア cytochrome *c* の放出等に関与する. Smac/Diablo, Omi/HtrA2 は caspase 阻害因子である XIAP などの機能を抑制し, caspase の活性化を促進する. Fig. 42A-C に示すように、糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球では健常人 iPS 細胞由来好中球と比較し、それぞれ 1.4, 2.9, 2.4 倍の発現上昇が認められた.

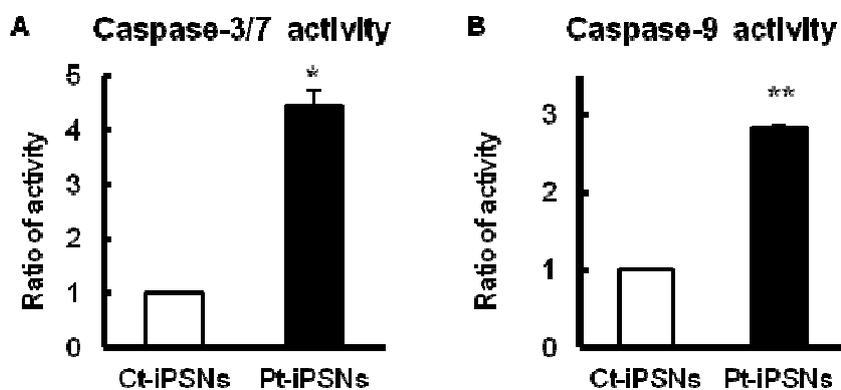
Caspase は、アポトーシスを誘発するシグナル伝達経路に関する cysteine protease ファミ

リーである。<sup>52, 53)</sup> 免疫染色の結果と同様に、糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球の caspase-3/7 及び-9 は健常人 iPS 細胞由来好中球と比較し 3-4 倍上昇した (Fig. 43).



**Figure 42. Analysis of apoptosis markers.**

(A) Bax, (B) Smac/Diablo, and (C) Omi/HtrA2. Mean  $\pm$  S.E.,  $n = 4$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. Ct-iPSNs (=1). Ct-iPSNs, control-iPSC-derived neutrophils; Pt-iPSNs, patient-iPSC-derived neutrophils.

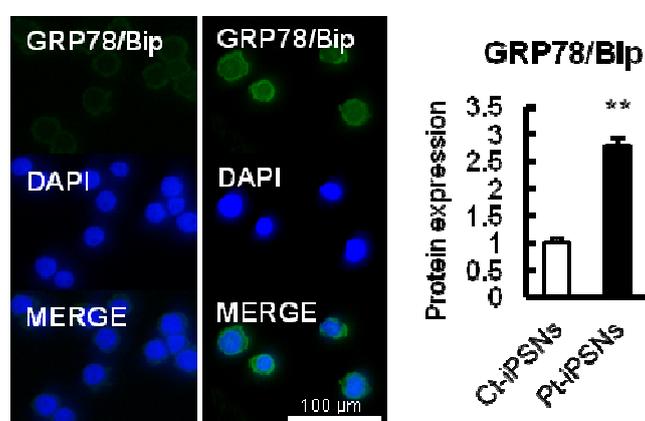


**Figure 43. Analysis of caspase activities.**

Mean  $\pm$  S.E.,  $n = 4$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. Ct-iPSNs (=1). Ct-iPSNs, control-iPS cell-derived neutrophils; Pt-iPSNs, patient-iPS cell-derived neutrophils.

### 3) 小胞体ストレス

細胞は小胞体ストレスによる unfolded protein の小胞体内での蓄積を察知し、小胞体から核へ細胞内シグナル伝達を活性化させ、シャペロン蛋白 BIP などの発現を誘導する.<sup>54-56)</sup> 糖原病 Ib 型好中球モデルでは小胞体ストレスが上昇することが知られており、本研究においても小胞体ストレスマーカーも同様に糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球で高値を示した (Fig. 44).



**Figure 44. Analysis of a marker of endoplasmic reticulum stress.**

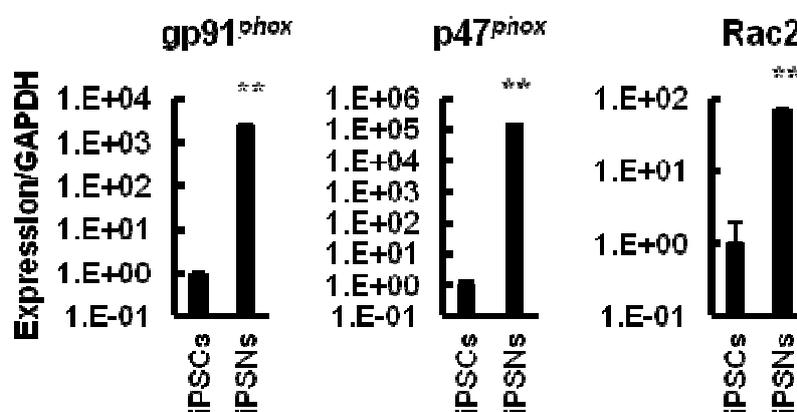
Expression levels were calculated as the ratio to that of the respective Ct-iPSNs. Mean  $\pm$  S.E.,  $n = 4$ . \*\* $P < 0.01$  vs. Ct-iPSNs. Ct-iPSNs, control-iPSC-derived neutrophils; Pt-iPSNs, patient-iPSC-derived neutrophils.

### 3.3.3 ROS 産生機序の解明

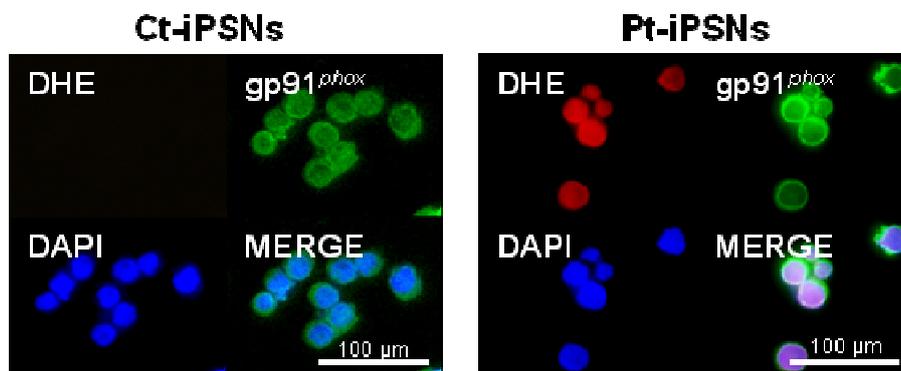
#### 1) Nox2 遺伝子及びタンパク質発現

Nox2 は NAD(P)H を補酵素として ROS 産生に関与する細胞膜上に存在するタンパク質である。一般に Nox2 の活性化には Rac, p47<sup>phox</sup> 等の Nox2 コンポーネントが gp91<sup>phox</sup> に結合することで, ROS を産生することが可能となる.<sup>57-61)</sup> 本研究の結果, 未分化な iPS 細胞と比較し, 分化誘導した細胞では, それらのマーカーが高発現していることが確認された (Fig. 45).

さらに糖尿病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球の gp91<sup>phox</sup> 陽性細胞では DHE 陽性であることから, 酸化ストレスが顕著に上昇していることが明らかとなった (Fig. 46).



**Figure 45. Real-time PCR analysis.** Expression of Nox2 components, gp91<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, and Rac2, for day 30 differentiated cells (iPSNs) and undifferentiated iPS cells (iPS cells). Mean  $\pm$  S.E.,  $n = 3$ . \*\*  $P < 0.01$ : vs. iPS cells (=1).



**Figure 46. Immunostaining for Nox2.** Red, dihydroethidium (DHE); green, gp91<sup>phox</sup>; blue, DAPI. Ct-iPSNs, control-iPS cell-derived neutrophils; Pt-iPSNs, patient-iPS cell-derived neutrophils.

## 2) Nox2 を介した ROS 産生の検討

Nox2 の酸化ストレスへの影響を明らかにするために Nox2 阻害剤添加時における ROS 産生について検討した. その結果 Nox2 阻害剤(+) では Nox2 阻害剤(-) と比較し, ROS 産生を有意に抑制した (Fig. 47).

また Nox2 が細胞膜上に存在するタンパク質であることから, その細胞膜を抽出し, 補酵素 NADPH 共存下にてその Nox2 活性について検討した. その結果, 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球では健常人 iPS 細胞由来好中球と比較し ROS 産生は 3.3 倍の活性を持つことを確認した (Fig. 48). これらの結果は, 糖原病 Ib 型における ROS 産生の起点の一つに Nox2 が関与することを示唆した.

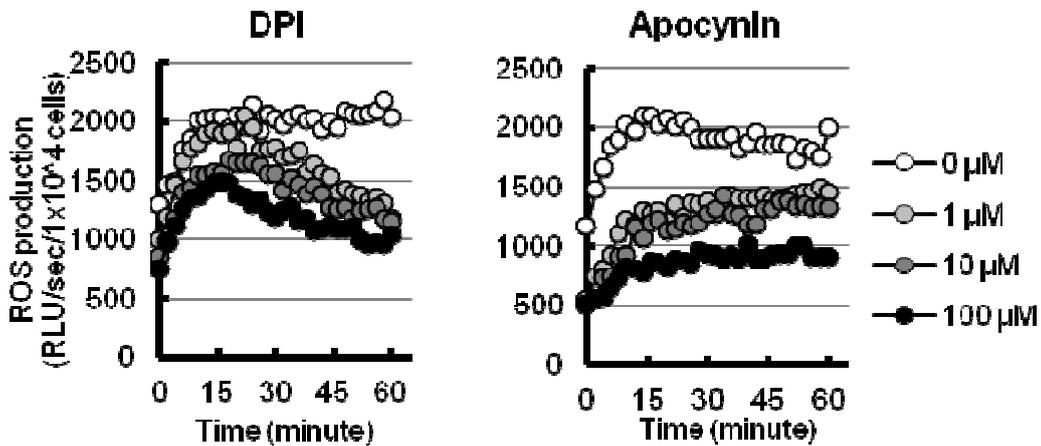


Figure 47. ROS production of Pt-iPSNs treated with 0, 1, 10, or 100  $\mu\text{M}$  Nox2 inhibitors, DPI and apocynin.  $n = 4$ .

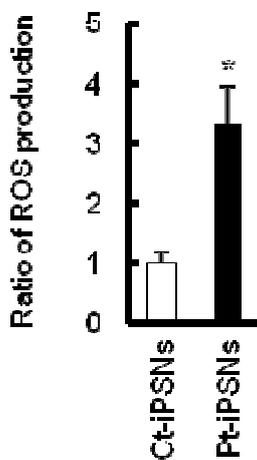
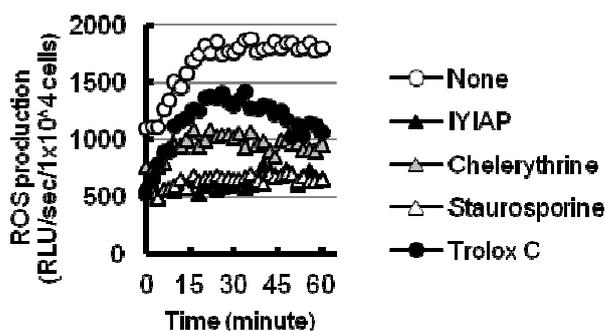


Figure 48. Nox2 activity in the cell membrane in the presence of NADPH. Mean  $\pm$  S.E.,  $n = 4$ . \*  $P < 0.05$ : vs. Ct-iPSNs (=1). Ct-iPSNs, control-iPSC-derived neutrophils; Pt-iPSNs, patient-iPSC-derived neutrophils.

### 3) PKC を介した ROS 産生及びアポトーシス発現の検討

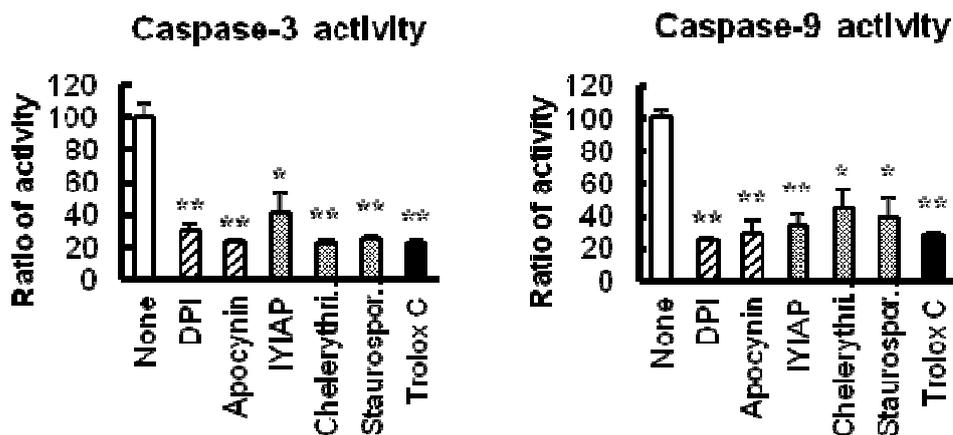
分化誘導して得られた糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球へ protein kinase C (PKC) 阻害剤 IYIAP, chelerythrine, staurosporine を添加した時の ROS 産生量を検討した. その結果, 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球で上昇した ROS 産生の上昇は, 抗酸化剤である Trolox C と同様に, いずれの PKC 阻害剤においても ROS 産生を著しく減少させた (Fig. 49).

Nox2 阻害剤 (DPI, apocynin), PKC 阻害剤 (IYIAP, chelerythrine, staurosporine), 抗酸化剤 (Trolox C) 共存下における caspase 活性について検討した. その結果, DPI, apocynin, IYIAP, chelerythrine, staurosporine, Trolox C を添加することで caspase-3 活性は各々30.0%, 24.0%, 41.7%, 23.0%, 25.9%, caspase-9 活性は各々25.1%, 29.2%, 35.3%, 44.9%, 39.3%, 27.8%に減少した (Fig. 50).



**Figure 49. ROS production of Pt-iPSNs treated with 10 μM PKC inhibitors.**

IYIAP (▲), chelerythrine (△), staurosporine (▽), antioxidant, Trolox C (●) or none (○).  $n = 4$ .

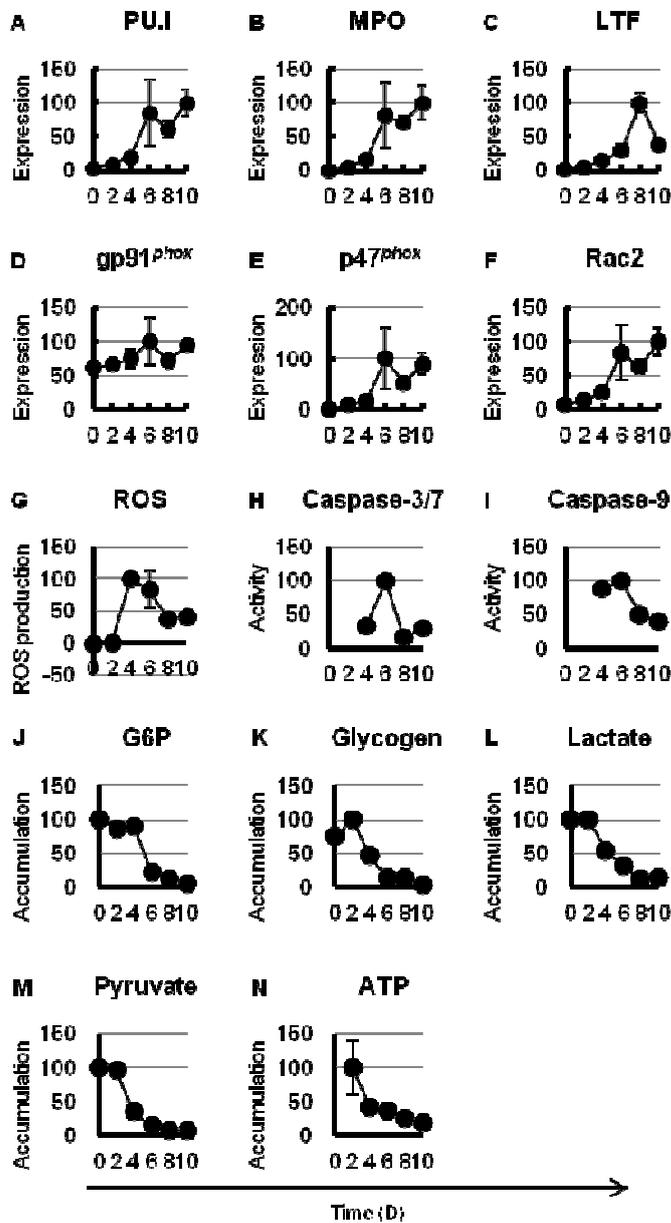


**Figure 50. Effects of Nox2 and PKC inhibitors on apoptosis induction in GSDIb patient-iPSC-derived neutrophils.**

Differentiated Pt-iPS cells were incubated with 10 μM Nox2 inhibitor (DPI and apocynin), 10 μM PKC inhibitor (IYIAP, chelerythrine, and staurosporine), 10 μM vitamin E analog (Trolox C) or none, and then caspase-3, and -9 activities were measured. Mean ± S.E.,  $n = 4$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ : vs. None (=100).

#### 4) 骨髄分化に伴う経時的变化

骨髄球 (D0) から好中球 (D2~D10) への分化誘導段階における ROS 産生量, アポトーシス, Nox2 発現, 解糖由来産物量の経時的な変化について検討した (Fig. 51). その結果, 好中球分化マーカーである PU.I, MPO, LTF 遺伝子の経時的上昇が認められた. この変化に伴い Nox2 活性本体 gp91<sup>phox</sup> は変化が認められなかったが, そのコンポーネント p47<sup>phox</sup>, Rac2 の発現が著しく上昇した. また, ROS は4日目以降急激に上昇し, それに伴いアポトーシスマーカーである caspase-3 及び-9 活性の発現が認められた. 一方, 解糖由来産物 (G6P, glycogen, lactate, pyruvate, ATP) は分化初期において高値を示し, その後 ROS 産生, caspase 活性の上昇に伴い急激に減少した.



**Figure 51.** Time course studies by sampling cells at several points during the differentiation process of myelocytes (day 24=D0) into neutrophils (day 34=D10).

(A-C) Differentiation markers into neutrophils; (A) PU.I, (B) MPO, (C) LTF. (D-F) Nox2 components; (D) gp91<sup>phox</sup>, (E) p47<sup>phox</sup>, (F) Rac2. (G) ROS production. (H) Caspase-3/7 activity. (I) Caspase-9 activity. (J-N) Accumulation of glycolytic products; (J) G6P, (K) glyocogen, (L) lactate, (M) pyruvate, and (N) ATP. Mean  $\pm$  S.E.,  $n = 3-6$ . Maximum levels=100.

### 3.4 考察

iPS 細胞を, OP9 細胞との共培養にて, VEGF 存在下で中胚葉へと分化誘導した. その後 SCF, TPO, IL-3 存在下で血管芽細胞, G-CSF, TPO 存在下で好中球へと分化誘導した (Fig. 35). 誘導した iPS 細胞由来細胞は day 24 において特徴的な袋状構造物である iPS-sac を形成, 非常に高い血管内皮細胞マーカー FLK1 を発現し, その内部に CD34<sup>+</sup>浮遊細胞を内包していた (Fig. 37). またその浮遊細胞について検討したところ, 骨髓球マーカーである好中球マーカーである PU.1, LTF, MPO, MMP9, GATA2, C/EBP $\epsilon$  を発現し (Fig. 38), さらに G-CSF 存在下で培養した day 30 以降では好中球表面マーカー CD13, 16, 45 の発現 (Fig. 39) 及び貪食能 (Zymosan A 取り込み, Fig. 40) を有していた. この分化誘導の結果は, 血管芽細胞を幹細胞とする骨髓発生を *in vitro* にて再現できたことを示唆した.

分化誘導して得られた患者好中球モデルは, *g6pt*<sup>(-/-)</sup>マウスと同様に ROS 産生の上昇 (Fig. 41A), 酸化ストレスマーカー Mn-SOD 発現の上昇 (Fig. 41B) が認められた. また, アポトーシスマーカー Bax 発現 (Fig. 42A), Smac/Diablo 発現 (Fig. 42B), Omi/HtrA2 発現 (Fig. 42C), caspase-3/7 活性 (Fig. 43A), caspase-9 活性 (Fig. 43B) も有意に上昇していた. 加えて小胞体ストレスマーカー GRP78/Bip の発現上昇も認められた (Fig. 44). これらの結果は作成した iPS 細胞由来好中球モデルが患者病態を反映することを示した. 本章で誘導した iPS 細胞由来患者モデルを用いた病態解明に関する考察は第四章の結果と共に行う.

## 第四章 HL-60 細胞を用いた好中球減少症の機序の検討

### 4.1 緒言

HL-60 細胞 (human promyelocytic leukemia cells) は、顆粒球 (好中球), 単球/マクロファージ, 好酸球や好塩基球に分化する.<sup>62)</sup> HL-60 細胞には分化時期の異なる複数の細胞が混在しているが, 主な細胞は前骨髄球である. 細胞の形態学的特長は, 細胞質に多数のアズール顆粒があること, 大きな1つの核があること, 核に 2~3 個の核小体があることである. 骨髄球の分化における分子イベントならびに分化プロセスにおける生理学的, 薬理的, ウイルス学的要素に関する研究のためのヒト細胞の継続した供給源として利用されている.

糖原病 Ib 型における HL-60 細胞を用いた報告にはこれまでに Leuzzi らの報告がある.<sup>51)</sup> 彼らは好中球における主要な ROS 産生タンパク質である Nox2 に注目し, G6PT 阻害により Nox2 が活性化されること, 及び Nox2 阻害薬 DPI 添加によりアポトーシスが抑制されることを明らかにした. そこで, 本章では第二章の結果から明らかとなった Nox2 活性化のための PKC の関与, 及び G6PT 機能低下に伴う糖代謝異常に惹起される ROS 産生のメカニズムを, Leuzzi らの糖原病 Ib 型モデルを用いて検討することを目的とした.

## 4.2 実験材料及び実験方法

### 4.2.1 実験材料及び試薬

#### 1) 試薬

G6P, ethidium bromide, ethanol, chloroform, ascorbic acid, molybdic acid, sodium chloride, potassium chloride, glycerin, paraformaldehyde, staurosporine, chelerythrine, apocynin, L-012, sucrose, NADPH, NADH, cacodylic acid は Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan) より, DMSO, DPI, Trolox C, FBS 4,4-diisothiocyanostilbene-2,2-disulfonic acid (DIDS), paramethoxyamphetamine (PMA), RPMI1640 は Sigma (St. Louis, MO, USA) より, RPMI1640 (glucose 不含) は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) より, IYIAP は Merck-Calbiochem (Darmstadt, Germany) より, Bio-Rad Protein Assay kit は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) より, BSA は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より, Caspase-3 assay kit 及び caspase-9 assay kit は Funakoshi (Tokyo, Japan) より, PBS 用錠剤は DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan) より, acetonitrile は Kanto Chemical co. inc. (Tokyo, Japan) より購入した. その他, 実験に使用した試薬類は市販品の特級または生化学用のものを使用した. 細胞破碎用緩衝液には, 0.25 M sucrose および 1 mM EDTA 含有 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を, ミクロソーム懸濁用緩衝液には 20% glycerol 含有細胞破碎用緩衝液 (pH 7.4) を, 酵素反応用溶液には, 0.2 M cacodylic acid-HCl 緩衝液 (pH 6.0) を, 細胞膜分画用緩衝液には 1.2 M sucrose および 1 mM EDTA 含有 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を用いた.

#### 2) 細胞

本研究で用いた HL-60 細胞は, 理化学研究所バイオリソースセンターCell Bank (Tokyo, Japan) より入手した. HL-60 細胞は  $1\sim 5\times 10^5$  cells/mL になるよう HL-60 細胞用基礎培地で播種した. 細胞は 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> インキュベーター (MCO-18AC, 三洋電機バイオメディカ社, Osaka, Japan) 中 37°C にて培養した. 細胞は 2~3 日毎に継代した. 細胞は, セルバンカーで懸濁し, 液体窒素内で保管した.

#### 3) 動物

動物は 11 週齢の Wistar 系雄性ラット (SLC, Shizuoka, japan) を用い, 自由に餌と水を摂取することが可能な条件下で 12 時間ごとの明暗サイクルで温度・湿度をコントロールし飼育した. なお, 本研究は名古屋市立大学動物実験ガイドラインにしたがって実施した.

## 4.2.2 ラット肝ミクロソームにおける G6PT 輸送活性測定

### 1) ミクロソーム画分の調製

肝臓 1.5 g を細胞破碎用緩衝液 4.5 mL 中にて細切した後、ガラス-テフロンホモジナイザーで 15 分間ホモジナイズした。ホモジネートは 9,000×g で 20 分間遠心分離 (日立工機製, ヒタチ PR-52D, Osaka, Japan) し, その上清を 105,000×g にて 90 分間遠心分離 (日立工機製, ヒタチ P55AT アングルロータ, Osaka, Japan) し, 得られた沈渣をミクロソーム画分として回収した。沈渣は, ガラス-テフロンホモジナイザーを用いてミクロソーム懸濁用緩衝液組成で懸濁し実験に使用した。操作は, 全て氷上あるいは 4°C にて行った。

### 2) タンパク質定量

プロテインアッセイ染色液を用い Bradford 法にて行った。反応液組成は 5 倍希釈した染色液 200  $\mu$ L, ミクロソーム画分 10  $\mu$ L とした。反応液は 5 分間室温で放置後, マイクロプレートリーダー (Thermo scientific 製, MA, USA) にて 595 nm の吸光度を測定した。濃度測定は BSA を標準品とした。

### 3) G6Pase 反応

反応液組成は, 100  $\mu$ M G6P buffer 20  $\mu$ L, 0.1 mg protein/mL ミクロソーム画分 20  $\mu$ L, 酵素反応用溶液 160  $\mu$ L を混合し, 全量を 200  $\mu$ L とした。反応液は 37°C で振とうし, 反応終了後, 速やかに同量の acetonitrile を加え 30 秒間激しく攪拌することで, 除タンパク操作とした。その後, 4°C, 10,000×g で遠心し, 上清を代謝物の定量に用いた。

### 4) $\text{H}_2\text{PO}_3^-$ の定量

反応液組成は, 代謝物溶液 100  $\mu$ L, 0.1 M ascorbic acid 溶液 2.5  $\mu$ L, 4 % molybdic acid 溶液 2.5  $\mu$ L を混合し, 全量を 105  $\mu$ L とした。反応液は 10 分間, 37°C でインキュベート後, マイクロプレートリーダーにて 710 nm の吸光度を測定した。

#### 4.2.3 糖原病 Ib 型好中球モデルの作成と実験目的別の細胞培養方法

本研究において、各種実験に用いた糖原病 Ib 型モデル細胞の培養条件は、以下のとおりである。

##### 1) 糖原病 Ib 型モデル細胞の作成及び検討

Leuzzi らの方法<sup>51)</sup>に従い、HL-60 細胞を HL-60 細胞用基礎培地に 1.25% DMSO 処理することで好中球へ分化させた。HL-60 細胞は、分化 2 日目に G6PT 阻害薬 DIDS (最終濃度 1, 10, 100, 500  $\mu\text{M}$ ) を添加し、分化 4 日目に細胞を回収し、各実験に使用した。また、1.25% DMSO 処理のみで 4 日間分化誘導した HL-60 細胞をコントロールとした。

##### 2) 糖原病 Ib 型モデル細胞における ROS 産生経路の検討

HL-60 細胞は、HL-60 細胞用基礎培地に 1.25% DMSO 処理することで好中球へ分化させた。HL-60 細胞は、分化 2 日目に G6PT 阻害薬 DIDS (最終濃度 100  $\mu\text{M}$ ) を添加し、分化 4 日目に細胞を回収し、各実験に用いた。なお、細胞回収 1 時間前に Trolox C, Nox2 阻害剤(DPI, apocynin), PKC 阻害剤 (IYIAP, staurosporine, chelerythrine) を実験の目的に合わせ添加した。また、1.25% DMSO 処理のみで 4 日間分化誘導した HL-60 細胞をコントロールとした。

##### 3) 糖原代謝異常に惹起される ROS 産生経路の検討

HL-60 細胞は、10% FBS 含有 RPMI1640 (glucose 濃度 1, 2, 3.3, 5, 10 mM) 培地に 1.25% DMSO 処理することで好中球へ分化させた。HL-60 細胞は、分化 2 日目に G6PT 阻害薬 DIDS (最終濃度 100  $\mu\text{M}$ ) を添加し、分化 4 日目に細胞を回収し、各実験に用いた。また、1.25% DMSO 処理のみで 4 日間分化誘導した HL-60 細胞をコントロールとした。

#### 4.2.4 L-012 による ROS 産生量の測定

細胞は PBS で洗浄後、RPMI1640 600  $\mu\text{L}$  あたり  $1 \times 10^5$  cells に懸濁した。反応組成は、細胞懸濁液 600  $\mu\text{L}$ , 20 mM L-012 溶液 2  $\mu\text{L}$  とした。また、実験の目的に合わせ PMA, Trolox C, DPI, apocynin, IYIAP, staurosporine, chelerythrine を加えた。L-012 によるルミノール反応はルミノメーター (Lumat Lb 9507, Berthold Technologies 製, Bad Wildbad, Germany) にて測定した。測定条件は測定時間 10 秒, 測定休止間隔 20 秒, 全測定時間 610 秒で行った。

#### 4.2.5 細胞膜 Nox2 活性測定

##### 1) 細胞膜画分の調製

細胞を細胞破碎用緩衝液 1 mL 中にてホモジナイザーで 1 分間ホモジナイズした。ホモジネートは 9,000×g で 20 分間遠心分離し、その上清を細胞膜分画用緩衝液 2 mL 上に重層、100,000×g にて 60 分間遠心し、得られた細胞膜分画用緩衝液界面を細胞膜画分として回収した。操作は全て氷上で行った。タンパク質定量はプロテインアッセイ染色液付属のプロトコールに従って行い、最終濃度 0.2 mg protein/mL に調整した。

##### 2) Nox2 活性測定

本実験では、Nox2 が NAD(P)H を補酵素として ROS を産生することを利用し、生じた ROS が L-012 と反応し生じる蛍光をルミノメーターにて測定した。反応組成は、RPMI1640 550  $\mu$ L, 0.2 mg protein/mL 細胞膜画分 50  $\mu$ L, 20 mM L-012 溶液 2  $\mu$ L とした。また、実験の目的に合わせ NAD(P)H 溶液を 5  $\mu$ L 加えた。L-012 によるルミノール反応はルミノメーターにて測定した。測定条件は測定時間 10 秒、測定休止間隔 20 秒、全測定時間 610 秒で行った。

#### 4.2.6 Caspase 活性測定

細胞を細胞破碎用緩衝液 50  $\mu$ L にて懸濁し、凍結・融解を 3 回繰り返した。その後、氷上にて 20 分間インキュベート後、4°C, 10,000×g で 1 分間遠心し得た上清を細胞質画分とした。Caspase 活性測定は caspase-3 及び caspase-9 assay kit のプロトコールに従って行い、caspase-3 及び caspase-9 の基質であるラベルされた DEVD-*p*NA または LEHD-*p*NA の切断反応に基づいた。生成した発色性物質 *p*-nitroanilide (*p*NA) をマイクロプレートリーダーにて波長 405 nm における吸光度を測定した。また、測定結果はタンパク質量で補正した。

#### 4.2.7 染色による評価

浮遊細胞 ( $1 \times 10^4$  cells) を、96-well plate またはスライドガラス上へサイトスピンを行い、細胞を接着させた。その後 PBS で 3 回洗浄し、室温にて 4°C に冷却した 100% methanol に 5 分間浸漬することにより固定した。その後、一次抗体として anti-human Bax antibody mouse IgG monoclonal (1:200), anti-human Smac/Diablo antibody rabbit IgG polyclonal (1:200), anti-human Omi/HtrA2 antibody rabbit IgG polyclonal (1:200) を用いて、室温にて 60 分間反応

させた. PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄後, 二次抗体として, Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (1:200), Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (1:200) を用いて, 室温遮光下にて 60 分間反応させた. PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄後, 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI を室温遮光下で 5 分間反応させ核染色を行った. PBS で 3 回洗浄後, 蛍光顕微鏡にて観察した.

#### 4.2.8 統計処理

測定値は, 全て平均値  $\pm$  S.E. で表記した.

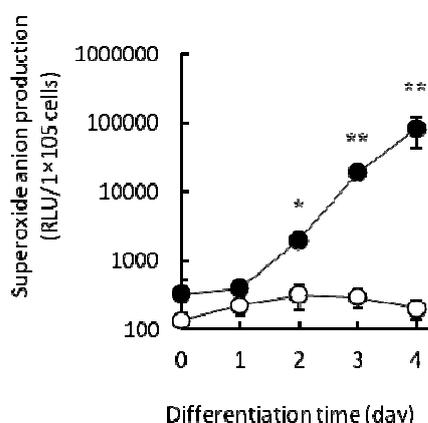
独立二群間の検定には, Welch's *t*-test を用いた. 多群の比較には分散分析で有意であることを確認後, Sheffe's F test を用いた. 危険率 5%未満を有意とした.

### 4.3 実験結果

#### 4.3.1 HL-60 細胞を用いた糖原病 Ib 型モデル細胞の評価

##### 1) HL-60 細胞の好中球への分化評価

HL-60 細胞は好中球への分化に伴い、ROS を産生することが可能となる。本実験では、その性質を利用し、ROS 誘発性物質 PMA 刺激による ROS 産生量を測定することで、好中球への分化を評価した。HL-60 細胞は、DMSO 添加後から PMA 刺激による ROS 産生が認められ、その産生量は経時的に上昇することが確認された (Fig. 52).

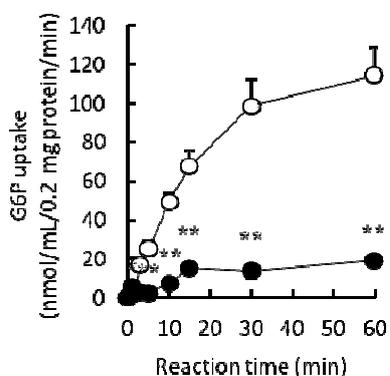


**Figure 52. Effects of PMA on ROS production in DMSO-treated HL-60 cells.**

Cells were reacted with L-012 and 100 nM PMA or with L-012 alone and chemiluminescence of the ROS-sensitive dye L-012 was then measured ( $\circ$ , PMA-untreated cells;  $\bullet$ , PMA-treated cells). Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. DMSO treated cells.  $n = 6$ .

##### 2) G6PT 阻害剤の評価

DIDS 共存下におけるラット肝ミクロソーム G6PT による G6P uptake を評価した。本原理は、G6P が G6Pase にて glucose 及び  $\text{H}_2\text{PO}_3^-$  に変換されることを利用し、 $\text{H}_2\text{PO}_3^-$  を測定することで間接的に G6P uptake を評価した。その結果、コントロール群では G6P 添加後から経時的に、G6P uptake が増加するのに対し、DIDS 群では、G6PT uptake が抑制された (Fig. 53).

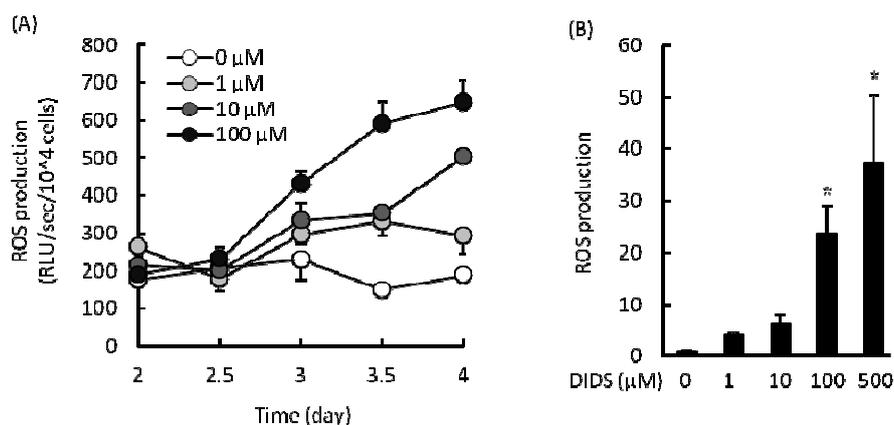


**Figure 53. G6P uptake in microsomes treated with DIDS.**

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of six independent experiments;  $\circ$ , 10 mM G6P;  $\bullet$ , 10 mM G6P + 100  $\mu\text{M}$  DIDS; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. 10 mM G6P.  $n = 6$

### 3) G6PT 阻害剤添加による ROS 産生への影響

HL-60 細胞は分化期間を 4 日とし、分化 2 日目に DIDS を添加した。その結果、分化日数及び DIDS 濃度依存的に ROS 産生が上昇した (Fig. 54A)。分化 4 日目における DIDS 群 (1, 10, 100, 500  $\mu\text{M}$ ) の ROS 産生量は、コントロール群と比較し 4.0, 6.3, 23.7, 37.4 倍と DIDS 濃度依存的な上昇が確認された (Fig. 54B)。



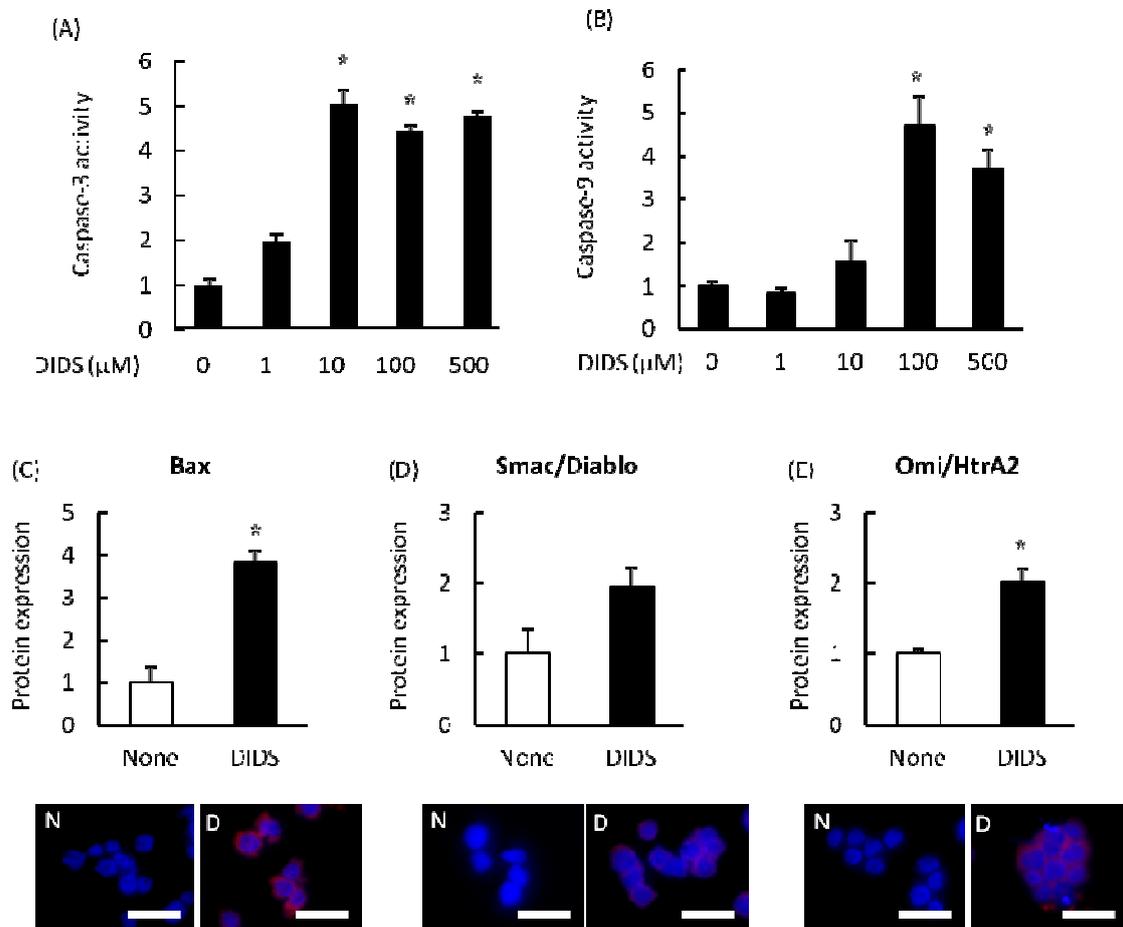
**Figure 54. Effects of DIDS on ROS production in neutrophils.**

Neutrophils were incubated with 1, 10, 100, or 500  $\mu\text{M}$  DIDS on day 2 of differentiation and were cultured until day 4. (A) Time-dependent ROS production; (B) ROS production on day 4 of differentiation; Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of 4–6 independent experiments. \*  $P < 0.05$  vs. untreated neutrophils.

### 4) G6PT 阻害剤添加によるアポトーシスへの影響

細胞は第三項と同じ条件で培養し、4 日目に細胞を回収し、caspase-3 及び-9 活性を測定した。その結果、caspase-3 及び-9 活性は DIDS 群ではコントロール群と比較し高く、DIDS 濃度依存的な上昇がみられた (Fig. 55A, B)。

また、アポトーシスマーカータンパク質である Bax, Smac/Diablo 及び Omi/HtrA2 は、100  $\mu\text{M}$  DIDS 処置群ではコントロール群と比較して各々 4, 2 及び 2 倍高かった (Fig. 55C-E)。



**Figure 55. Effects of DIDS on apoptosis in neutrophils.**

Neutrophils were incubated with 1, 10, 100, or 500  $\mu\text{M}$  DIDS on day 2 of differentiation and were cultured until day 4. (A, B) Caspase-3 and -9 activities on day 4; Apoptosis marker proteins (C) Bax, (D) Smac/Diablo, and (E) Omi/HtrA2. Cells in C–E were treated with 100  $\mu\text{M}$  DIDS; N, DIDS-untreated cells; D, DIDS-treated cells; red, apoptosis marker proteins; blue, DAPI. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of 4–6 independent experiments. Untreated neutrophils (None) were given a value of 1; C–E; \*  $P < 0.05$  vs. untreated neutrophils; scale bar 50  $\mu\text{m}$

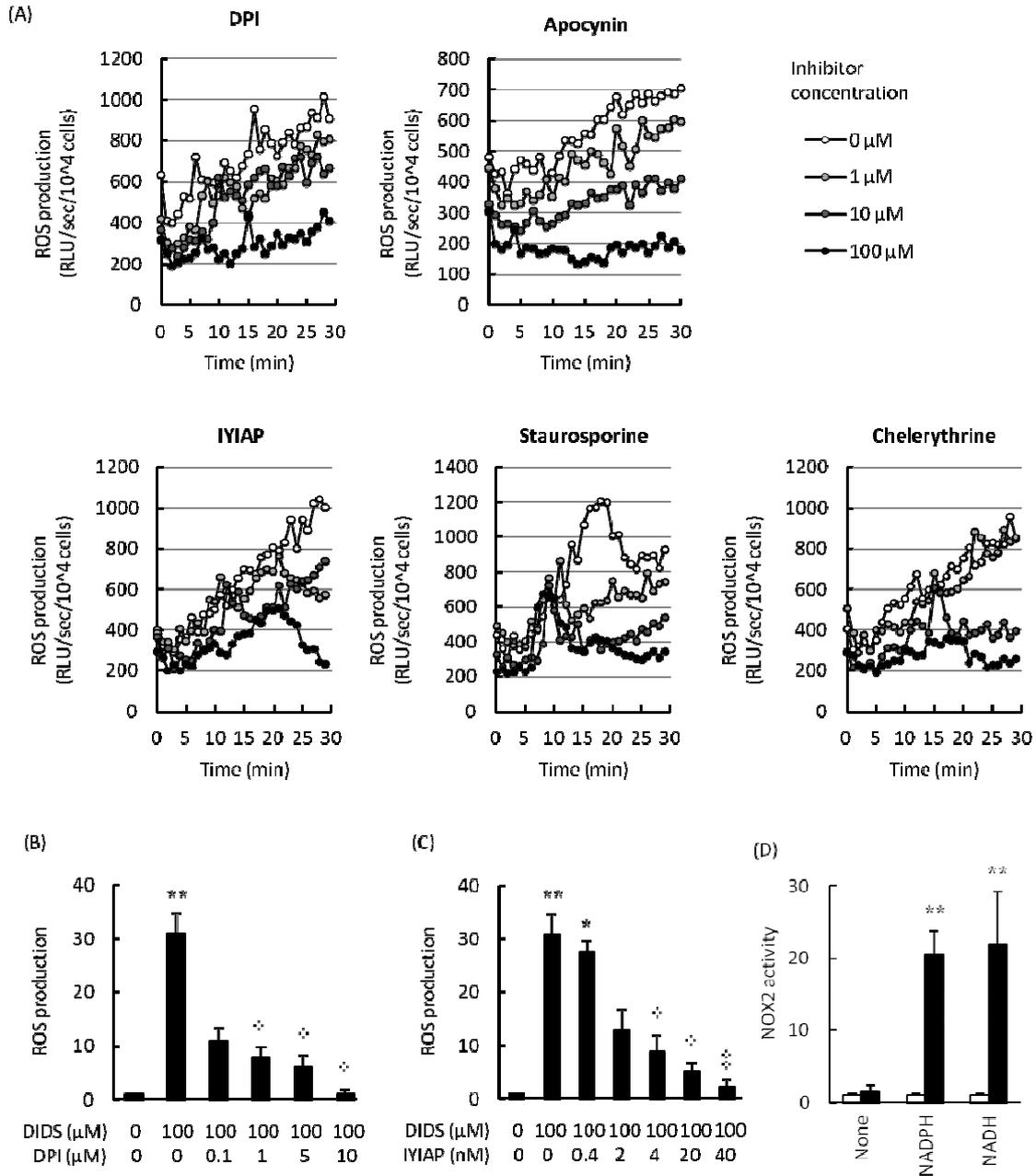
### 4.3.2 糖原病 Ib 型モデル細胞における ROS 産生経路の検討

#### 1) ROS 産生経路阻害薬添加による ROS 産生経路の検討

ROS 産生量は Nox2 阻害剤 (DPI, apocynin) 及び PKC 阻害剤 (IYIAP, staurosporine, chelerythrine) 濃度依存的に減少した (Fig. 56A). 加えて 0.1, 1, 5 及び 10  $\mu$ M DPI を処置することで ROS 産生量は各々 35.1%, 25.4%, 20.2%, 及び 3.5% に低下した (Fig. 56B). また 0.2, 0.4, 2, 4, 20 及び 40 nM IYIAP を処置することで ROS 産生量は各々 89.3%, 41.3%, 28.8%, 16.5% 及び 7.6% に低下した (Fig. 56C).

#### 2) 細胞膜 Nox2 活性化による ROS 産生の検討

細胞膜画分に NAD(P)H 添加条件下で生成される ROS 産生量をルミノメーターにて測定した. その結果, コントロール群では 200  $\mu$ M NADH 及び 200  $\mu$ M NADPH 添加による変動は認められなかった. 一方, DIDS 群では無添加群 (None) と比較し, NADH 及び NADPH 添加による ROS 産生量が有意に上昇し, NADH 添加では 14 倍, NADPH 添加では 13 倍となった (Fig. 56D).

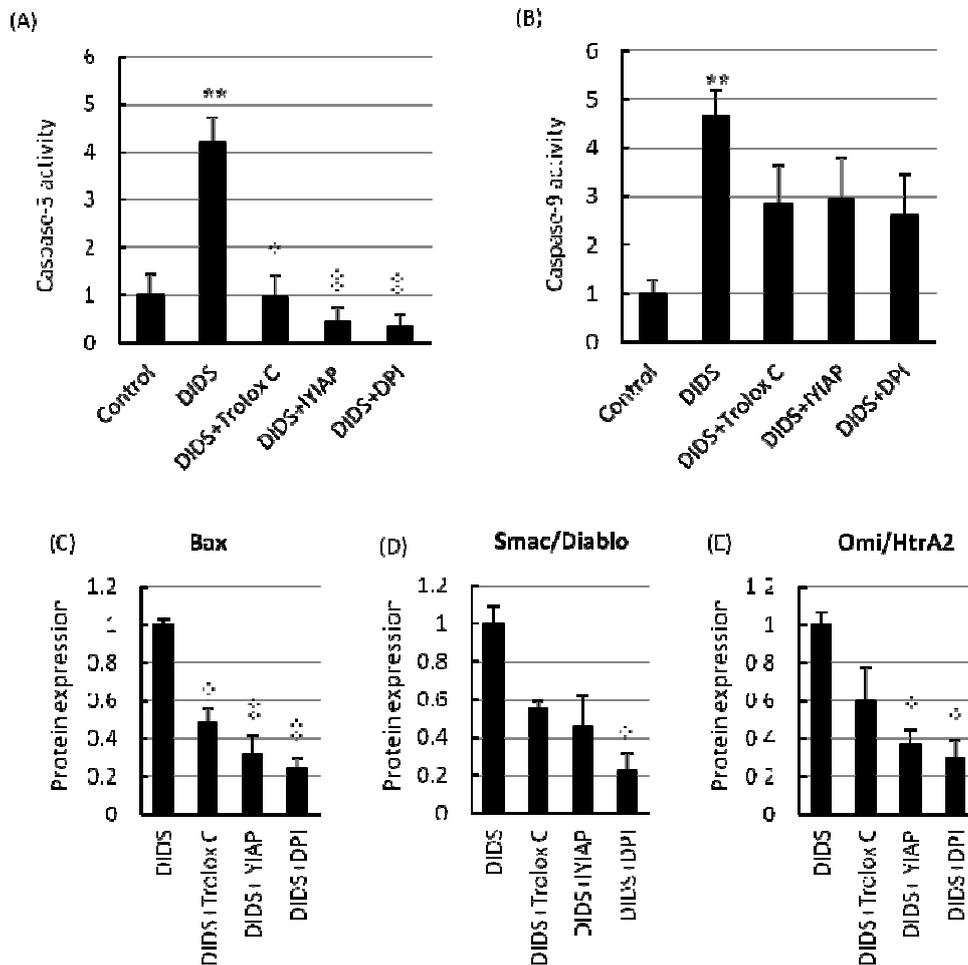


**Figure 56. Examination of ROS production in DIDS-treated neutrophils.**

(A) DIDS-treated neutrophils were incubated with the Nox2 inhibitors DPI or apocynin, or with the PKC inhibitors IYIAP, staurosporine, or chelerythrine. ROS production after treatment with DPI (B), or IYIAP (C); Nox2 activity in cell membranes (D) was determined in the presence of 200  $\mu\text{M}$  NADPH or NADH in ( $\square$ ) untreated neutrophils or ( $\blacksquare$ ) DIDS-treated neutrophils. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of 4–6 independent experiments. Untreated neutrophils (control) were given a value of 1; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated neutrophils; †  $P < 0.05$ , ‡  $P < 0.01$  vs. 100  $\mu\text{M}$  DIDS-treated neutrophils.

### 3) ROS 産生経路阻害薬添加によるアポトーシスへの影響

DIDS 群は、コントロール群と比較し caspase-3 及び-9 活性が各々4 倍及び5 倍に上昇した。また, Trolox C, IYIAP, DPI を共存させることでDIDS 処理による caspase-3 及び-9 活性は各々23.0%, 1.0%, 6.9% (Fig. 57A) 及び60.7%, 63.5%, 55.8%に抑制された (Fig. 57B)。またアポトーシスマーカーBax, Smac/Diablo, Omi/HtrA2 タンパク質発現量について検討した。その結果, Trolox C, IYIAP, DPI を共存させることで Bax 発現量は各々48.4%, 31.2%, 23.9%に抑制 (Fig. 57C), Smac/Diablo 発現量は各々55.3%, 46.3%, 22.6%に抑制 (Fig. 57D), Omi/HtrA2 発現量は各々59.6%, 36.8%, 29.7%に抑制された (Fig. 57E)。



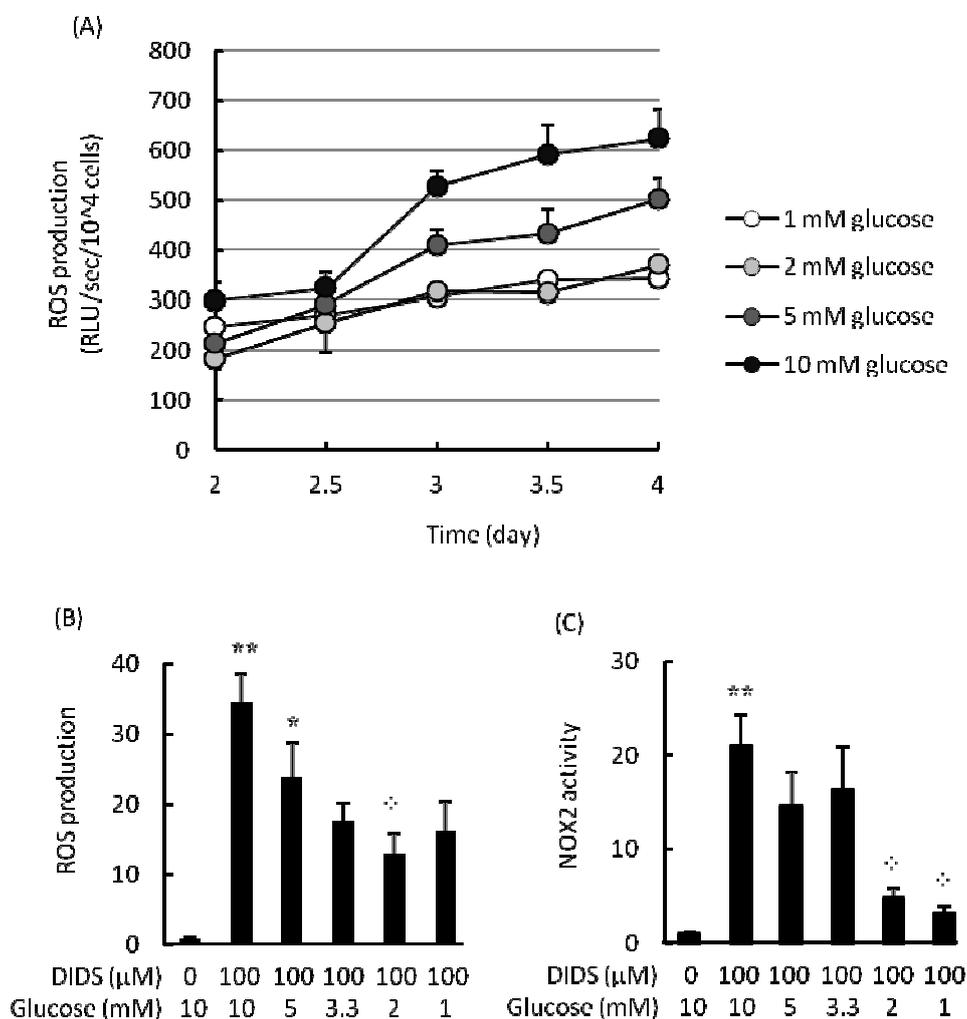
**Figure 57. Effects of ROS inhibitors on induction of apoptosis in DIDS-treated neutrophils.**

DIDS-treated neutrophils were incubated for 60 min in RPMI1640 medium containing 10  $\mu$ M Trolox C, 40 nM IYIAP, or 10  $\mu$ M DPI. (A, B) Caspase-3 and -9 activities; Apoptosis marker proteins (C) Bax, (D) Smac/Diablo, and (E) Omi/HtrA2. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of 4 independent experiments. Untreated neutrophils (A–B; control) and DIDS-treated neutrophils (C–E; DIDS) were given a value of 1; \*\*  $P < 0.01$ : vs. control, †  $P < 0.05$ , ‡  $P < 0.01$  vs. 100  $\mu$ M DIDS-treated neutrophils

### 4.3.3 糖原代謝異常に惹起される ROS 産生経路の検討

#### 1) 培地 glucose 濃度の違いが及ぼす ROS 産生量への影響

HL-60 細胞を 100  $\mu$ M DIDS を含む glucose 濃度 1, 2, 3.3, 5 及び 10 mM 培地にて培養し、ルミノメーターにてその ROS 産生量を測定した。なお、100  $\mu$ M DIDS を含まない glucose 濃度 10 mM 培地にて培養したものをコントロール群とした。その結果、RPMI1640 (glucose 10 mM)+DIDS 群は、コントロール群と比較し ROS 産生が有意に上昇した。また、この ROS 産生の上昇は glucose 濃度を低下させることで時間依存的、及び濃度依存的に抑制された (Fig. 58A, B)。また、4 日目に回収した細胞の細胞膜を分画し、補酵素 NADPH 共存下で生じる ROS 産生量を測定したところ、培地 glucose 濃度依存的に ROS 産生が減少した (Fig. 58C)。

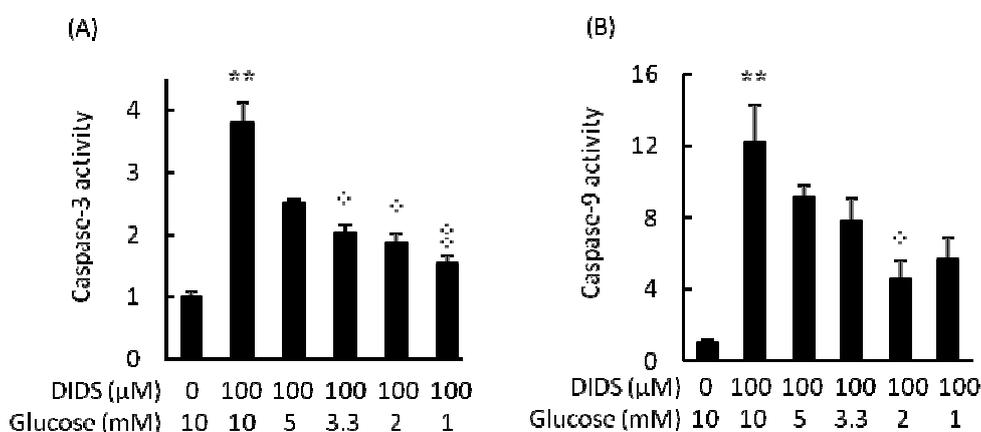


**Figure 58. Effects of glucose concentrations on ROS production in DIDS-treated neutrophils.**

(A, B) DIDS-treated cells were cultured in RPMI1640 medium containing 1, 2, 3.3, 5, or 10 mM glucose until day 4, and ROS production were determined. (C) Nox2 activity in the cell membrane; Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of 4–6 independent experiments.

## 2) 培地 glucose 濃度の違いが及ぼすアポトーシスへの影響

前項と同じ条件で培養した細胞を4日目に細胞を回収し、その caspase-3 及び-9 活性を測定した。その結果、DIDS 群はコントロール群と比較し caspase-3 及び-9 活性が有意に上昇したが、低 glucose 濃度培地で培養することでその活性は濃度依存的に抑制された (Fig. 59)。このときの caspase-3 活性の減少は5, 3.3, 2 及び 1 mM glucose 群では各々66.3%, 53.9%, 49.2% 及び 40.5%であった。また caspase-9 活性の減少は5, 3.3, 2 及び 1 mM glucose 群では各々75.2%, 63.9%, 37.3%及び46.3%であった。



**Figure 59. Effects of glucose concentrations apoptosis in DIDS-treated neutrophils.**

(A, B) DIDS-treated cells were cultured in RPMI1640 medium containing 1, 2, 3.3, 5, or 10 mM glucose until day 4, and caspase-3 and -9 activities were determined. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of 4–6 independent experiments. Untreated neutrophils were given a value of 1; \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated neutrophils; †  $P < 0.05$ , ‡  $P < 0.01$ : vs. 100  $\mu$ M DIDS-treated

## 4.4 考察

### 4.4.1 HL-60 細胞を用いた糖原病 Ib 型好中球モデル作成

HL-60 細胞は、DMSO や retinoic acid 等で好中球に分化することが報告されている。<sup>63)</sup> HL-60 細胞が分化すると、細胞質の顆粒は減少し、核は分葉する。また、核/細胞質比は小さくなる。加えて、分化に伴い貪食作用や殺菌作用、それらの刺激に応答して ROS を産生する能力が出現する。本研究では、この性質を利用し、HL-60 細胞が産生する ROS を測定することで、HL-60 細胞の好中球への分化を確認した。HL-60 細胞は、DMSO 添加後から ROS 産生能を持ち、日数が経つにつれ PMA 刺激による ROS 産生量が増大することが確認されたことから、好中球へ分化したと評価した (Fig. 52)。なお、PMA は細胞表面レセプターを介して PKC を活性化し、活性型 PKC による Nox2 の活性化を介し ROS を産生する化学物質である。

DIDS は、小胞体膜上に存在する G6PT を阻害することが報告されている。<sup>64,65)</sup> 本研究における G6PT による G6P uptake 測定には、小胞体内に取り込まれた G6P が、同じく小胞体内膜上に存在する G6Pase によって glucose と  $\text{H}_2\text{PO}_3^-$  に加水分解されることを利用し、生成した  $\text{H}_2\text{PO}_3^-$  を定量し、G6PT の G6P uptake 能とした。実験の結果、DIDS を共存させることでミクロソーム画分における G6P uptake が減少したことから、既存の報告と同様に、DIDS が G6PT を阻害することが確認できた (Fig. 53)。

糖原病 Ib 型患者及び *g6pt*<sup>(-/-)</sup> マウスの好中球は、外部刺激なしに ROS を産生することが知られている。<sup>23,24)</sup> 糖原病 Ib 型モデルの作成のために、上記培養条件で HL-60 細胞を好中球へ分化誘導し、分化 2 日目に G6PT 阻害薬 DIDS を加えた。その結果、コントロール群に比べ、DIDS 群では ROS 産生量が有意に高くなり、その ROS 産生量は DIDS 濃度依存的に上昇した (Fig. 54)。この結果は、既存の報告に一致する。<sup>51)</sup>

Caspase-3 はアポトーシスシグナル伝達において中心的な役割を果たす cysteine protease である。通常 caspase-3 及び-9 は活性の低い前駆体として細胞内に存在し、細胞死刺激を受けるとプロセッシングされて活性型となる。アポトーシス誘導時に caspase ファミリーにより形成されるカスケードが活性化され、caspase-9 から caspase-3 を介し細胞質または核内の基質を切断し、細胞の形態的、生化学的変化を引き起こす。<sup>52,53)</sup> 分化型 HL-60 細胞を DIDS 処理した本研究において、ROS 産生同様、caspase-3 および-9 活性も DIDS 濃度上昇とともに増加したことから (Fig. 55)、ここまでの結果をふまえて、糖原病 Ib 型モデル細胞を得たと評価した。

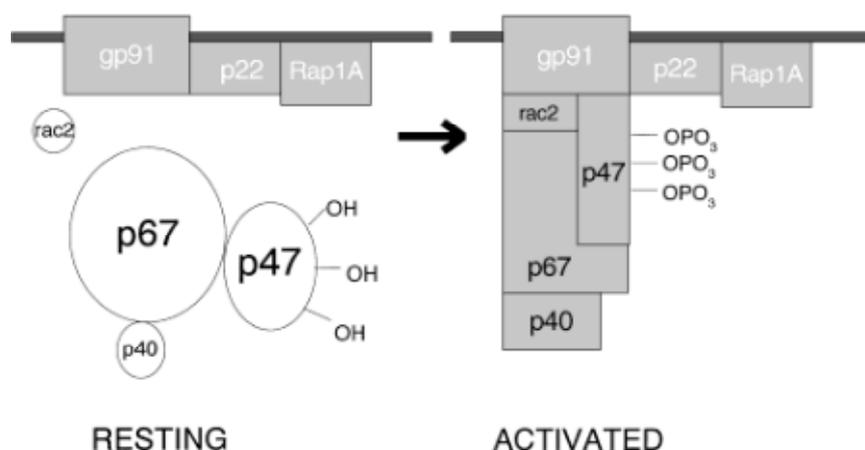
#### 4.4.2 Nox2 活性化を介した ROS 産生及びアポトーシス誘導機構の検討

ここからは、第三章及び第四章の結果に基づき考察を行う。好中球からの ROS の発生源の 1 つとして、食細胞が微生物などを貪食するときに活性化される Nox2 がある。<sup>57-61)</sup> 一般に Nox2 は単独では不活性であり、活性化には幾つかの可溶性タンパク質や低分子量タンパク質 Rac が必要であることが知られている (Fig. 60)。好中球において貪食機構や殺菌機構の中心的役割を果たす Nox2 は、細胞の刺激で応答し、Rac に加えて p67<sup>phox</sup> と p47<sup>phox</sup> が Nox2 に結合することで、細胞質の NADPH から細胞外の酸素分子へ電子を伝達することにより ROS を産生し、好中球におけるシグナル伝達に働く。<sup>57-61)</sup> 本研究においても終末分化した細胞は未分化な iPS 細胞と比較し、Nox2 遺伝子発現が有意に上昇し (Fig. 45)、患者群においては Nox2<sup>+</sup>細胞にて ROS 産生上昇を確認した (Fig. 46)。一方で、生体内で発生する ROS は、その産生量と消去とのバランスにより、厳密に制御されており、酸化ストレスによる過剰な細胞死の誘導機構は、好中球のみならず、他の組織においても、組織の機能を維持する上で危機的である。<sup>66)</sup> 一般に ROS 産生の起点は幾つか報告されているが、糖原病 Ib 型を扱った本研究では Leuzzi らの報告<sup>51)</sup> 同様、好中球細胞膜上に存在する Nox2 に着目した。その結果、iPS 細胞及び HL-60 細胞を用いた糖原病 Ib 型モデル細胞への Nox2 阻害薬の添加による ROS 産生量の減少 (Fig. 47 及び Fig. 56A,B)、及びアポトーシスの抑制 (Fig. 50 及び Fig. 56)、また、細胞膜における Nox2 補酵素 NAD(P)H 共存下における ROS 産生量の増加 (Fig. 48 及び Fig. 56D) が認められたことから、糖原病 Ib 型における ROS 産生には、細胞膜存在する Nox2 を介することが示唆された。

糖原病 Ib 型における酸化ストレスに惹起されるアポトーシスの経路としては、Kim らが報告したミトコンドリアを介する経路がある。<sup>24)</sup> ミトコンドリアはアポトーシスの刺激を受けると、その外膜透過性が亢進し、ミトコンドリア内膜と外膜に区切られた膜間に存在する cytochrome *c* や Smac/Diablo, Omi/HtrA2 などのタンパク質が細胞質へと漏出する。<sup>67)</sup> 漏出した cytochrome *c* は Apaf-1 及び ATP と共同で caspase-9 を活性化し、最終的に caspase-3/7 が活性化され、アポトーシスが実行される。<sup>53,68)</sup> さらに、ROS はアポトーシスシグナルの起点となることも知られており<sup>66)</sup>、糖原病 Ib 型患者及び *g6pt*<sup>(-/-)</sup> マウスにおいて抗酸化薬の投与で、アポトーシスが抑制されることも報告されている。<sup>25,51)</sup> 本研究においても抗酸化物質 Trolox C 及び Nox2 阻害薬の共存下で酸化ストレスの抑制のみならず、アポトーシスも抑制されたという結果は、糖原病 Ib 型における好中球減少症は、酸化ストレスに惹起されたアポトーシスが原因であることが示唆された (Fig. 50 及び Fig. 57)。

#### 4.4.3 PKC を介した Nox2 活性化による ROS 産生経路の検討

本研究では, PKC 阻害薬共存下において ROS 産生量の低下 (Fig. 49 及び Fig. 56C) 及びアポトーシスの抑制が確認された (Fig. 50 及び Fig. 57). PKC は, serin/threonine 残基の側鎖 OH 基をリン酸化するプロテインキナーゼであり, 様々なタンパク質を標的として細胞内シグナル伝達にかかわる. PKC のアイソザイムは幾つか報告されているが, ヒト好中球では  $\text{Ca}^{2+}$  を必要とする  $\alpha$ ,  $\beta$  と  $\text{Ca}^{2+}$  を必要としない  $\delta$  が報告されており,<sup>69)</sup> いずれも diacylglycerol (DAG) を基質としている. 糖原病 Ib 型における PKC 活性化機構の詳細は後述するが, 好中球において PKC の標的タンパク質の 1 つに Nox2 のアイソフォームの 1 つである  $\text{p47}^{\text{phox}}$  があり, 活性化型 PKC は  $\text{p47}^{\text{phox}}$  をリン酸化することが報告されている (Fig. 60).<sup>70,71)</sup> リン酸化された  $\text{p47}^{\text{phox}}$  は  $\text{p67}^{\text{phox}}$  及び Rac と共に細胞膜へ移行し, Nox2 複合体を形成し, Nox2 における ROS の産生が可能となる.<sup>72)</sup> これらの報告をふまえ, 本研究における PKC 阻害薬共存下での ROS 産生量の低下及びアポトーシス抑制は, PKC による Nox2 活性化が抑制された結果ではないかということが示唆された.



**Figure 60. Activation of the leukocyte NADPH oxidase.**

In the resting cell, the subunits of the Nox2 are distributed between the cytosol ( $\text{p40}^{\text{phox}}$ ,  $\text{p47}^{\text{phox}}$ ,  $\text{p67}^{\text{phox}}$  and Rac) and the membranes ( $\text{p22}^{\text{phox}}$  gp91<sup>phox</sup> complex). When the cell is activated,  $\text{p47}^{\text{phox}}$  becomes phosphorylated by PKC. Bernard M, et al., Blood 93:1464-1476, 1999

#### 4.4.4 糖原代謝異常に惹起される ROS 産生経路の検討

糖原病 Ib 型では G6P の代謝障害により、解糖系が異常亢進することが知られている。通常、glucose は細胞内に取り込まれると細胞質に存在する解糖系の第一段階酵素 hexokinase により G6P に代謝され、ATP 産生の為に pyruvate に代謝される。また、過剰量の G6P は、glycogen として細胞内に蓄積され、血糖低下時には glycogen は G6P へ分解・代謝され、glucose に変換されて放出される。この G6P から glucose への変換は、hexokinase とは異なる経路であり、小胞体内で行われる。糖新生あるいは glycogen 分解により生成された G6P は、一旦 G6PT にて小胞体内に輸送され、小胞体内側膜上に局在する G6Pase により、glucose に変換された後に、小胞体から細胞質へ輸送され、細胞外へ放出される。<sup>73,74)</sup> 糖原病 Ib 型は、この glucose 放出障害により、細胞内に取り込まれた glucose は G6P への変換を受け、解糖系や glycogen 合成等に過剰利用される。本症における肝 glycogen 量は、湿組織 100 g あたり 4 g 以上を占めるとされ、解糖系由来代謝物である lactate 値の血中濃度は 50 mg/dL 以上を示すことも珍しくない。また、ペントースリン酸経路活性化による血清 urate 値は 10 mg/dL 以上を示す。その他にも解糖系に由来する  $\alpha$ -glycerophosphate ( $\alpha$ -GP) と fatty acyl-CoA から中性脂肪が産生され、高中性脂肪血症を呈する。このように、糖原病 Ib 型では、血中への glucose 放出障害による低血糖を呈するとともに、細胞内高 glucose となることにより、糖利用が異常に亢進することが知られている。<sup>9-14)</sup>

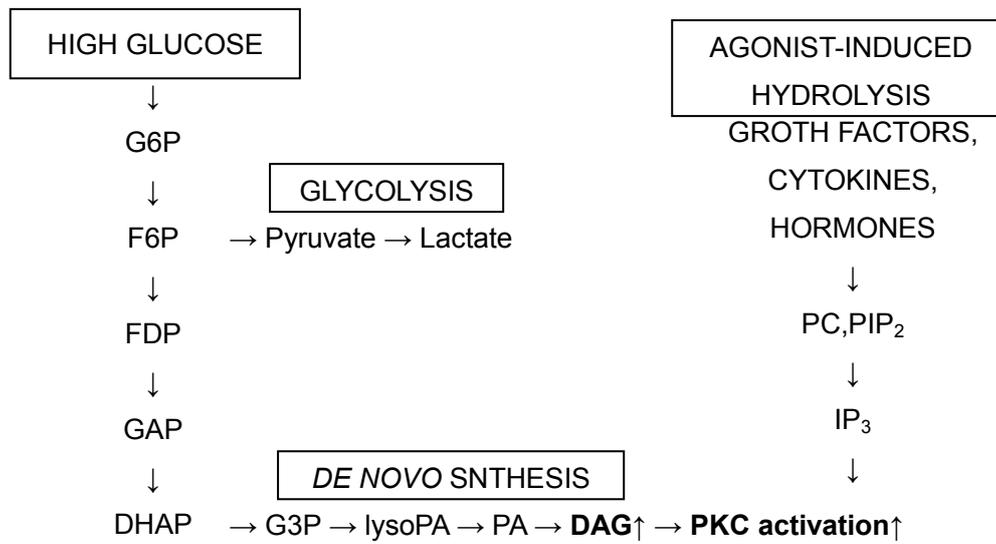
解糖系亢進時における細胞内高 glucose による ROS 産生機序は幾つか報告されているが<sup>75-78)</sup>、本研究における PKC/Nox2 系に影響を及ぼす経路としては、解糖系に由来する  $\alpha$ -GP から生合成される DAG 量増加を介した PKC 活性化が考えられる。<sup>79-82)</sup> G6P から DAG の合成経路としては、G6P は解糖系酵素により fructose 6-phosphate (F6P), fructose 1,6-bisphosphate (FDP), glyceraldehyde 3-phosphate (GAP), dihydroxyacetone phosphate (DHAP) を経て glycerol 3-phosphate (G3P) が生合成される。<sup>83)</sup> 生成された G3P は glycerol 3-phosphate acyltransferase と monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase により、acyl-CoA から acyl 基の転移を受け、lysoPA (phosphatidic acid), PA を経て、DAG が生合成される (Fig. 61)。<sup>84-86)</sup> DAG は、1,2 位に結合する acyl 基の違いにより、さまざまな構造の組み合わせが可能であるが、PKC の活性化能が高い DAG としては 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol や 1-stearoyl-2-arachidonyl-*sn*-glycerol が報告されている。<sup>87,88)</sup>

本研究では、糖原病 Ib 型モデル細胞における DAG 量の測定は行っていないが、培地中の glucose 濃度の条件を変えて細胞を培養した結果、低 glucose 濃度の培地では、HL-60 細胞自

身からの ROS 産生量が減少 (Fig. 58A,B) するとともにアポトーシスの発現が抑制されたこと (Fig. 59) は, glucose を反応開始の為の基質とする前述の経路を支持するものとなる. また, 前述した培養条件で培養した細胞の細胞膜画分を NADPH と反応させることで, glucose 濃度依存的に ROS 産生が上昇した結果は (Fig. 59C), この glucose 濃度依存的な ROS 産生には, DAG/PKC 経路を介した好中球細胞膜における Nox2 が関与することが示唆された.

また, 血管内皮細胞や平滑筋等において抗酸化物質 vitamin E は DAG/PKC レベルを低下させることが報告されている. Vitamin E は, 直接 PKC の活性を抑制するのではなく, DAG 量を減少させて間接的に PKC 活性調節に働く.<sup>89-91)</sup> 好中球においても DAG/PKC 経路は存在し, 抗酸化物質 vitamin E アナログである Trolox C 共存下で糖原病 Ib 型モデル細胞からの ROS 産生量が減少したこと (Fig. 49), 及びアポトーシスが抑制したこと (Fig. 50 及び Fig. 57) は, 糖原病 Ib 型における ROS 産生機序は DAG/PKC を介するという仮説を支持すると考えられる.

また蓄積した G6P の代謝には解糖系のみならず, ペントースリン酸経路も働く. ペントースリン酸経路の最初の反応を触媒するサイトゾル中に存在する酵素 glucose-6-phosphate dehydrogenase は ATP, NAD, FAD の前駆物質となる ribose 5-phosphate を glucose から作り出し, 同時に NADPH を産生する.<sup>92)</sup> この NADPH は最終的に Nox2 活性化の為の補酵素として働くことが知られており, Nox2 の活性化には複合体形成のみならず, こうした反応基質の存在の増加も酸化ストレス増加を誘発する原因の一つであることが示唆された. これらの結果は HL-60 細胞と G6PT 阻害剤を用いた Leuzzi らの報告<sup>51)</sup> を支持する結果となる. また一方で細胞内高 G6P の影響は Nox2 活性促進のみならず, ミトコンドリア呼吸活性も上昇させて, 酸化ストレスを亢進させることが知られている. このことは Kim ら<sup>24)</sup> や Cheung ら<sup>22)</sup> のミトコンドリア活性化からアポトーシスを誘発させるという報告を支持するものとなる. 一方, 酸化ストレス及びアポトーシスが著しく上昇するにつれ, 細胞内解糖系由来代謝産物が減少する結果は, G6Pase 系の機能低下ではなく, 細胞がアポトーシスを起こした結果引き起こされる現象である可能性を示唆した. しかしながらこれらの仮説は本研究では未解決の問題であり, 今後の課題となる.



**Figure 61. Mechanism of DAG/PKC activation.**

Hyperglycemia induces mainly *de novo* pathway. *Net Das Evcimen, et al., Pharmacological Research 55:498-510,2007*

#### 4.4.5 好中球成熟化に伴う酸化ストレス産生経路の活性化

患者由来 iPS 細胞を用いる利点として、細胞の分化の発生段階を *in vitro* の実験系で詳細に観察することができる点が挙げられる。このことは常に多種多様に分化誘導を受ける血球系細胞について病態の解明を行う場合には非常に有用であり、*in vivo* では解析が難しい均一な細胞群を用いた評価系の構築に有効である。そこで糖原病 Ib 型における G6PT 機能低下によって惹起される現象を、好中球成熟化に伴う G6P 代謝変動の観点から考察を試みた。好中球 G6Pase 系の機能低下時における細胞内の糖代謝変動は複数報告されておりヒト及び動物においても細胞内の G6P 値は減少し、それを基質として産生する ATP, lactate 等の産生は低下するとの報告がある。<sup>93,94)</sup> しかし、これらの事象は、好中球 G6Pase 系機能低下によって誘発される好中球酸化ストレスの上昇を直接説明することが難しい。一方でアポトーシスの誘発には細胞内 ATP レベルの上昇が必要であり<sup>95)</sup>、この高いレベルの細胞質 ATP がアポトーシス実行に不可欠である。また、このピーク値は数時間にわたって持続し、その後次第に減少していくことから、これまでの報告にある好中球細胞内の G6P 低下は G6Pase 系によって惹起されるのではなく、アポトーシスが誘発された終末期の細胞である可能性が考えられる。そこで、骨髓細胞から好中球への分化過程におけるいくつかのポイントで細胞をサンプリングし、G6Pase 系機能低下時におけるその遺伝子発現、糖代謝、酸化ストレス及びアポトーシスへの影響について検討を行った。その結果、骨髓球からの分化の初期において G6P, ATP 等の蓄積が認められた (Fig. 51J-H)。また、好中球へと分化誘導されるに従い Nox2 複合体の遺伝子発現が上昇し (Fig. 51A-F)、ROS 産生量が飛躍的に上昇した (Fig. 51G)。最終的に末梢好中球においてはアポトーシスが誘導され (Fig. 51H,I)、このとき細胞内糖代謝は著しく低下した (Fig. 51J-H)。従って糖原病 Ib 型における好中球減少症の機序としては、細胞内 G6P 蓄積に伴う解糖系亢進に伴う PKC 活性化による Nox2 複合体形成、及び解糖系由来代謝物の産生増加によって酸化ストレスやアポトーシスが活性化することが要因であることが示唆された。本研究における成果は未だ解明されていない糖原病 Ib 型における好中球減少症の機序の解明に留まらず、今後の糖原病 Ib 型治療法の開発に繋がる重要な治療標的の絞込みに繋がる知見となることを示唆した。

#### 4.4.6 糖原病 Ib 型臨床報告からみた好中球減少症

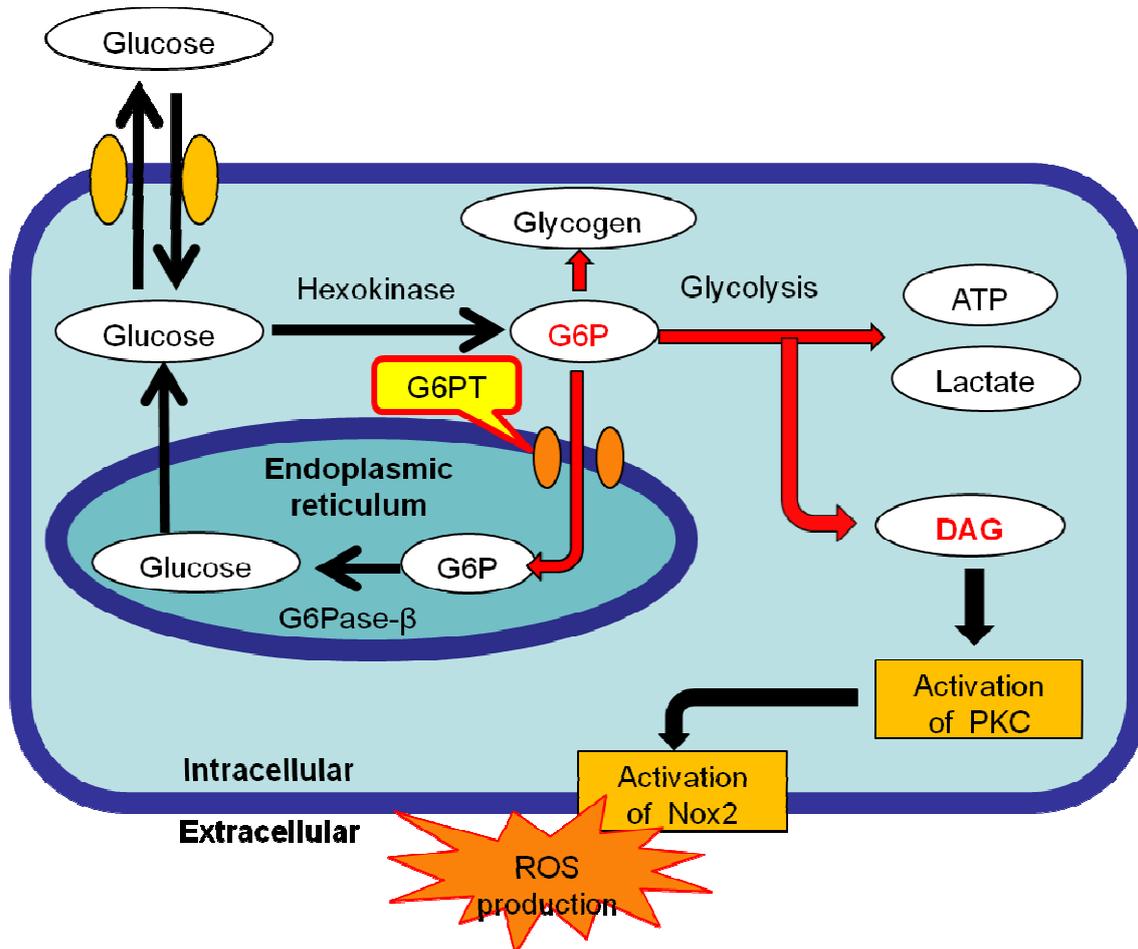
糖原病 Ib 型における好中球減少症の原因は、好中球における G6PT 異常に伴う G6Pase 系機能低下による症状であることが既に知られている。全身に発現する G6PT とは異なり<sup>19)</sup>、G6Pase の遺伝子発現は部位によって特異性が認められる。糖原病 I 型の主症状 (glycogen 蓄積、肝・腎機能異常、糖放出障害による低血糖等) を呈する肝臓及び腎臓では *G6Pase-α*<sup>20)</sup> が、好中球では *G6Pase-β*<sup>21)</sup> がそれぞれ発現している。*G6Pase-α* 欠損では好中球減少症は認められず、*G6Pase-β* 欠損特異的にその症状が現れる。<sup>22)</sup> 従って糖原病 Ib 型における好中球減少症の原因は、好中球の G6PT 異常に伴う現象であることが考えられる。それにもかかわらず、糖原病 Ib 型患者における好中球減少症に関して興味深い報告がある。それは生体肝移植により好中球減少症を改善したという報告<sup>96-98)</sup>がある一方で、改善しなかったという正反対の報告<sup>99-101)</sup>が複数あることである。本研究における仮説に従って上記報告を説明するなら、肝移植前と肝移植後では外因性 glucose 摂取量に大きな違いがあるためと考えられる。すなわち、糖原病 Ib 型患者では G6PT 機能低下によって低血糖を生じ、常に生命の危機に瀕している。そのため患者は低血糖回避のために頻回な glucose 接種を強いられる。一方で、生体肝移植を行った患者は低血糖を完全に防ぐことが可能であり、移植以降の glucose 接種は必要なくなる。<sup>102,103)</sup> 従って肝移植前は絶えず外因性の glucose 摂取を必要とすることで、血糖値は正常に保たれるものの、肝細胞や骨髄を含む多くの組織に余剰の glucose 産物が蓄積することとなる。そのため、肝臓では glucose 由来産物である glycogen が蓄積し、lactate, urate, lipid 合成を亢進させ、様々な症状を呈する。また、骨髄由来細胞においても同様な変化をきたすことが考えられ、頻回な glucose 摂取により前述した解糖系由来産物を介した DAG/PKC 経路が活性化する。しかしながら、生体肝移植された患者では、肝臓に蓄積された内因性 glucose のみで血糖値を維持することが可能となり、体内に取り込まれる総 glucose 量は低下する。従って、肝移植された患者において好中球減少症が改善するのは骨髄で利用される総 glucose 量が低下し、それを基質とする PKC/Nox2 を介した ROS 産生が肝移植前より緩和した結果と考えられる。

#### 4.4.7 糖原病 Ib 型患者における好中球減少症に関する仮説

本研究は、糖原病 Ib 型での G6PT 機能低下に伴う glucose 放出障害、及び好中球における ROS 産生経路の活性化に着目し、糖原病 Ib 型における好中球減少症の機序の検討を行った。本研究の仮説を Fig. 62 に示す。

通常、glucose は細胞膜上の glucose transporter を介して取り込まれ、hexokinase によって G6P に変換を受け、解糖系を進むことで ATP 合成に利用される。また、過剰量の G6P は glycogen として蓄積され、血糖低下時に放出される。一方、hexokinase による glucose から G6P への変換は不可逆的であり、G6P から glucose に変換するためには、G6P は一旦小胞体内に取り込まなければならない。小胞体内に取り込まれた G6P は同じく小胞体内膜上に存在する G6Pase によって glucose に変換される。糖原病 I 型は、この G6Pase 系の機能低下により、G6P から glucose への変換ができないことにより、血糖値の低下及び細胞内糖濃度の上昇による glycogen 蓄積、lactate 合成亢進、fatty acid 合成亢進がみられる。<sup>9-14)</sup>

本研究は、このような糖原病 I 型の症状に着目して検討を行った結果、細胞内高 glucose に惹起される DAG 合成量の増加、PKC の活性化及び Nox2 の活性化を介して ROS 産生量を上昇させることが示唆された。糖尿病では、高 glucose 濃度条件における DAG/PKC 経路の活性化は、糖尿病合併症の発症に深く関与することが知られており、症状発現組織である血管内皮細胞、平滑筋細胞、腎臓等で証明されている。<sup>79-82)</sup> 好中球においても DAG/PKC 経路は存在し、その役割は好中球において最も重要となる殺菌作用、貪食作用に必要不可欠であり、その発現量は他の組織と比較して多いことが知られている。<sup>64)</sup> そこで、糖原病 Ib 型を扱った本論においても、細胞内 glucose 利用増加による DAG/PKC 経路が活性化すると考えた。糖原病 Ib 型における細胞内高 glucose の影響によるさまざまな臨床症状は、糖尿病におけるそれよりも遥かに深刻である<sup>104)</sup> ことを考えると、糖原病 Ib 型における好中球減少症の原因として、細胞内高 glucose による DAG/PKC 経路の活性化に着目することは妥当である。本研究は、ROS 産生の場合として Nox2 の活性化について述べたが、細胞内高 glucose に起因する ROS 産生の機序は他にも報告されている。<sup>75-78)</sup> しかし、糖原病 Ib 型での G6PT 機能低下による ROS 産生の機序が未だ解明されていない現状を考えると、本研究の成果は糖原病 Ib 型の病態解明に新たな知見を与えるものとなると考えられる。



**Figure 62. Pathway of ROS production in glycogen storage disease type Ib patient's neutrophils.**

G6P, glucose 6-phosphate; G6Pase-β, glucose-6-phosphatase-β; G6PT, glucose-6-phosphate transporter; DAG, diacylglycerol; PKC, protein kinase C; Nox2, NADPH oxidase 2; ROS, reactive oxygen species.

## 第五章 総括

### 患者 iPS 細胞の樹立

- 糖原病 Ib 型患者の肝非実質細胞から 5 株, 及び皮膚線維芽細胞から 3 株の iPS 細胞を樹立した.
- 樹立した iPS 細胞は未分化マーカー遺伝子を発現しており, ES 細胞で特異的に認められる細胞表面マーカーを高発現した.
- 浮遊培養及びサイトカイン刺激によって分化多能性を評価したところ, 三胚葉への分化誘導を確認した.

### 肝細胞への分化誘導

- 肝細胞へ分化誘導したところ, 各分化ステージに伴い特徴的な形態変化を示した.
- 分化誘導した肝細胞は肝特異的な性質, 及び機能を有していた.
- 糖原病 Ib 型患者から樹立した iPS 細胞由来肝細胞は患者表現型である glycogen 蓄積や lipid 蓄積が認められ, 患者モデルとして妥当であることを示した.

### 好中球への分化誘導

- 好中球へ分化誘導したところ, 分化誘導過程において生体内における二次造血を模し, 血管芽細胞を介した CD34<sup>+</sup>造血産生細胞を得た.
- 分化誘導した CD34<sup>+</sup>細胞は G-CSF 刺激によって好中球表面マーカーである CD13, CD16, CD45 を発現し, 好中球機能である貪食能を有した.
- 患者 iPS 細胞由来好中球では正常 iPS 細胞由来好中球と比較し, 酸化ストレス, アポトーシス, 小胞体ストレスが上昇した.
- アポトーシスは酸化ストレスに惹起され, 抗酸化剤の存在下で有意にアポトーシスを抑制した.

### 糖原病 Ib 型患者における病態の解析

- iPS 細胞は好中球への分化誘導に伴い Nox2 コンポーネント遺伝子を高発現した.
- 患者 iPS 細胞由来好中球では Nox2<sup>+</sup>細胞において ROS 産生が上昇した.
- 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞由来好中球は Nox2 阻害剤の存在下で抑制され, Nox2 補酵素である NADPH 存在下にて上昇したことから, 糖原病 Ib 型における ROS 産生には Nox2 が関与することが示唆された.
- PKC 阻害剤存在下で ROS 産生が抑制された結果は糖原病 Ib 型における ROS 産生には PKC が関与することが示唆された.
- PKC 活性化による ROS 産生には糖原病 Ib 型における糖放出障害が原因として考えられ, 細胞内に蓄積した G6P を介して解糖系が亢進し, PKC を活性化することが示唆された.

## 謝辞

本研究に際し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲を戴きました名古屋市立大学大学院 薬学研究科 臨床薬学 松永 民秀 教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲を戴きました名古屋市立大学大学院 薬学研究科 臨床薬学 鈴木 匡 教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

本論文作成にあたり、種々の有益な御助言と御校閲を賜りました、名古屋市立大学大学院 薬学研究科神経薬理学分野 条 和彦 教授、名古屋市立大学大学院 薬学研究科 病態生化学分野 服部 光治 教授、名古屋市立大学大学院 薬学研究科 医薬品代謝解析学分野 林 秀敏 教授に深謝します。

本研究に際し、終始丁寧な御指導、御助言を賜りました名古屋市立大学大学院 薬学研究科 臨床薬学 中村 克徳 准教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、終始丁寧な御指導、御助言を賜りました金城大学 薬学部 前田 徹 准教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、本症例に対する丁寧な御助言を賜りました名古屋市立大学大学院 医学研究科小児科学 伊藤 哲哉 准教授、中島 葉子 博士、一木 沙耶香 博士ならびに教室員の皆様に心より御礼申し上げます。

本研究に際し、iPS 細胞樹立に関しまして御指導・御鞭撻を賜りました福島県立医科大学 生体情報伝達研究所 和田 郁夫 教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、煩雑な倫理委員会の書類作製への御助言および患者組織サンプル調製を賜りました国立成育医療研究センター臨床研究センター 先端医療開発室 絵野沢 伸 室長に心より御礼申し上げます。

本研究に際し、健常人由来 iPS 細胞を賜りました国立成育医療研究センター研究所 梅澤 明弘 博士, 豊田 雅士 博士, 阿久津 英憲 博士, 清河 信敬 博士, 大喜多 肇 博士, 宮川 世志幸 博士に心より御礼申し上げます.

本研究の遂行に際し、多大なるご協力を頂きました名古屋市立大学薬学部臨床薬学教育研究センターの皆様へ深く感謝致します.

## 引用文献

1. Cori GT, Cori CF. Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *J. Biol. Chem.*, **199**, 661–667 (1952).
2. Narisawa K, Igarashi Y, Otomo H, Tada K. A new variant of glycogen storage disease type I probably due to a defect in the glucose-6-phosphate transport system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 1360–1364 (1978).
3. Igarashi Y, Otomo H, Narisawa K, Tada K. A new variant of glycogen storage disease type 1: probably due to a defect in the glucose-6-phosphate transport system. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **2**, 45–49 (1980).
4. Veiga-da-Cunha M, Gerin I, Van Schaftingen E. How many forms of glycogen storage disease type I? *Eur. J. Pediatr.*, **159**, 314–318 (2000).
5. Veiga-da-Cunha M, Gerin I, Chen YT, de Barys T, de Lonlay P, Dionisi-Vici C, Fenske CD, Lee PJ, Leonard JV, Maire I, McConkie-Rosell A, Schweitzer S, Vikkula M, Van Schaftingen E. A gene on chromosome 11q23 coding for a putative glucose-6-phosphate translocase is mutated in glycogen-storage disease types Ib and Ic. *Am. J. Hum. Genet.*, **63**, 976–983 (1998).
6. Veiga-da-Cunha M, Gerin I, Chen YT, Lee PJ, Leonard JV, Maire I, Wendel U, Vikkula M, Van Schaftingen E. The putative glucose 6-phosphate translocase gene is mutated in essentially all cases of glycogen storage disease type I non-a. *Eur. J. Hum. Genet.*, **7**, 717–723 (1999).
7. Galli L, Orrico A, Marcolongo P, Fulceri R, Burchell A, Melis D, Parini R, Gatti R, Lam C, Benedetti A, Sorrentino V. Mutations in the glucose-6-phosphate transporter (G6PT) gene in patients with glycogen storage diseases type 1b and 1c. *FEBS Lett.*, **459**, 255–258 (1999).
8. Janecke AR, Lindner M, Erdel M, Mayatepek E, Möslinger D, Podskarbi T, Fresser F, Stöckler-Ipsiroglu S, Hoffmann GF, Utermann G. Mutation analysis in glycogen storage disease type 1 non-a. *Hum. Genet.*, **107**, 285–289 (2000).
9. Chou JY, Matern D, Mansfield BC, Chen YT. Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase complex. *Curr. Mol. Med.*, **2**, 121–143 (2002).
10. Marcolongo P, Barone V, Priori G, Pirola B, Giglio S, Biasucci G, Zammarchi E, Parenti G, Burchell A, Benedetti A, Sorrentino V. Structure and mutation analysis of the glycogen storage disease type 1b gene. *FEBS Lett.*, **436**, 247–250 (1998).
11. Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, Moses SW, Chou JY. Inactivation of the glucose 6-phosphate transporter causes glycogen storage disease type 1b. *J. Biol. Chem.*, **274**, 5532–5536 (1999).
12. Gerin I, Veiga-da-Cunha M, Achouri Y, Collet JF, Van Schaftingen E. Sequence of a putative glucose 6-phosphate translocase, mutated in glycogen storage disease type Ib. *FEBS Lett.*, **419**, 235–238 (1997).
13. Annabi B, Hiraiwa H, Mansfield BC, Lei KJ, Ubagai T, Polymeropoulos MH, Moses SW, Parvari R, Herschkovitz E, Mandel H, Fryman M, Chou JY. The gene for glycogen-storage disease type 1b maps to chromosome 11q23. *Am. J. Hum. Genet.*, **62**, 400–405 (1998).
14. Gerin I, Veiga-da-Cunha M, Noël G, Van Schaftingen E. Structure of the gene mutated in glycogen storage disease type Ib. *Gene*, **227**, 189–195 (1999).

15. Chou JY, Jun HS, Mansfield BC. Neutropenia in type Ib glycogen storage disease. *Curr. Opin. Hematol.*, **17**, 36–42 (2010).
16. Kure S, Suzuki Y, Matsubara Y, Sakamoto O, Shintaku H, Isshiki G, Hoshida C, Izumi I, Sakura N, Narisawa K. Molecular analysis of glycogen storage disease type Ib: identification of a prevalent mutation among Japanese patients and assignment of a putative glucose-6-phosphate translocase gene to chromosome 11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248**, 426–431 (1998).
17. Gitzelmann R, Bosshard NU. Defective neutrophil and monocyte functions in glycogen storage disease type Ib: a literature review. *Eur. J. Pediatr.*, **152**, Suppl 1, S33–38 (1993).
18. Schaub J, Heyne K. Glycogen storage disease type Ib. *Eur. J. Pediatr.*, **140**, 283–288 (1983).
19. Lin B, Annabi B, Hiraiwa H, Pan CJ, Chou JY. Cloning and characterization of cDNAs encoding a candidate glycogen storage disease type Ib protein in rodents. *J. Biol. Chem.*, **273**, 31656–31660 (1998).
20. Pan CJ, Lei KJ, Chen H, Ward JM, Chou JY. Ontogeny of the murine glucose-6-phosphatase system. *Arch. Biochem. Biophys.*, **358**, 17–24 (1998).
21. Guionie O, Clottes E, Stafford K, Burchell A. Identification and characterisation of a new human glucose-6-phosphatase isoform. *FEBS Lett.*, **551**, 159–164 (2003).
22. Cheung YY, Kim SY, Yiu WH, Pan CJ, Jun HS, Ruef RA, Lee EJ, Westphal H, Mansfield BC, Chou JY. Impaired neutrophil activity and increased susceptibility to bacterial infection in mice lacking glucose-6-phosphatase-beta. *J. Clin. Invest.*, **117**, 784–793 (2007).
23. Kuijpers TW, Maianski NA, Tool AT, Smit GP, Rake JP, Roos D, Visser G. Apoptotic neutrophils in the circulation of patients with glycogen storage disease type Ib (GSD1b). *Blood*, **101**, 5021–5024 (2003).
24. Kim SY, Jun HS, Mead PA, Mansfield BC, Chou JY. Neutrophil stress and apoptosis underlie myeloid dysfunction in glycogen storage disease type Ib. *Blood*, **111**, 5704–5711 (2008).
25. Melis D, Della Casa R, Parini R, Rigoldi M, Cacciapuoti C, Marcolongo P, Benedetti A, Gaudieri V, Andria G, Parenti G. Vitamin E supplementation improves neutropenia and reduces the frequency of infections in patients with glycogen storage disease type Ib. *Eur. J. Pediatr.*, **168**, 1069–1074 (2009).
26. 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).
27. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, **318**, 1917–1920 (2007).
28. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, **136**, 964–977 (2009).
29. Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castellà M, Ríó P, Sleep E, González F, Tiscornia G, Garreta E, Aasen T, Veiga A, Verma IM,

- Surrallés J, Bueren J, Izpisúa Belmonte JC. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*, **460**, 53–59 (2009).
30. Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, Leibel RL, Melton DA. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 15768–15773 (2009).
  31. Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, Ang YS, Schaniel C, Lee DF, Yang L, Kaplan AD, Adler ED, Rozov R, Ge Y, Cohen N, Edelmann LJ, Chang B, Waghray A, Su J, Pardo S, Lichtenbelt KD, Tartaglia M, Gelb BD, Lemischka IR. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature*, **465**, 808–812 (2010).
  32. Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, Ganat YM, Menon J, Shimizu F, Viale A, Tabar V, Sadelain M, Studer L. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*, **461**, 402–406 (2009).
  33. 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. U.S.A.*, **106**, 9826–9830 (2009).
  34. Okabayashi K, Asashima M. Tissue generation from amphibian animal caps. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **13**, 502–507 (2003).
  35. Chou JY. Regulators of fetal liver differentiation in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.*, **263**, 378–386 (1988).
  36. Müller M, Jansen PL. The secretory function of the liver: new aspects of hepatobiliary transport. *J. Hepatol.*, **28**, 344–354 (1998).
  37. Berk PD, Stremmel W. Hepatocellular uptake of organic anions. *Prog. Liver Dis.*, **8**, 125–144 (1986).
  38. Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, Tsunoda Y. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells*, **20**, 146–154 (2002).
  39. Melis D, Pivonello R, Parenti G, Della Casa R, Salerno M, Lombardi G, Sebastio G, Colao A, Andria G. Increased prevalence of thyroid autoimmunity and hypothyroidism in patients with glycogen storage disease type I. *J. Pediatr.*, **150**, 300–305 (2007).
  40. Rashid ST, Corbineau S, Hannan N, Marciniak SJ, Miranda E, Alexander G, Huang-Doran I, Griffin J, Ahrlund-Richter L, Skepper J, Semple R, Weber A, Lomas DA, Vallier L. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.*, **120**, 3127–3136 (2010).
  41. Fernandes J, Koster JF, Grose WF, Sorgedragger N. Hepatic phosphorylase deficiency. Its differentiation from other hepatic glycogenoses. *Arch. Dis. Child*, **49**, 186–191 (1974).
  42. Borregaard N, Theilgaard-Mönch K, Sørensen OE, Cowland JB. Regulation of human neutrophil granule protein expression. *Curr. Opin. Hematol.*, **8**, 23–27 (2001).
  43. Friedman AD. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene*, **26**, 6816–6828 (2007).

44. Cowland JB, Borregaard N. The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J. Leukoc. Biol.*, **66**, 989–995 (1999).
45. Sakai K, Hattori T, Sagawa K, Yokoyama M, Takatsuki K. Biochemical and functional characterization of MCS-2 antigen (CD13) on myeloid leukemic cells and polymorphonuclear leukocytes. *Cancer. Res.*, **47**, 5572–5576 (1987).
46. Lanier LL, Phillips JH, Testi R. Membrane anchoring and spontaneous release of CD16 (FcR III) by natural killer cells and granulocytes. *Eur. J. Immunol.*, **19**, 775–778 (1989).
47. Pulido R, Lacal P, Mollinedo F, Sánchez-Madrid F. Biochemical and antigenic characterization of CD45 polypeptides expressed on plasma membrane and internal granules of human neutrophils. *FEBS Lett.*, **249**, 337–342 (1989).
48. Czap JK. The role of beta-glucan receptors on blood and tissue leukocytes in phagocytosis and metabolic activation. *Pathol. Immunopathol. Res.*, **5**, 286–296 (1986).
49. Visser G, de Jager W, Verhagen LP, Smit GP, Wijburg FA, Prakken BJ, Coffier PJ, Buitenhuis M. Survival, but not maturation, is affected in neutrophil progenitors from GSD-1b patients. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **35**, 287–300 (2012).
50. Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Mahlaoui N, Chantelot CB. Congenital neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management. *Orphanet. J. Rare. Dis.*, **6**, 26 (2011).
51. Leuzzi R, Bánhegyi G, Kardon T, et al. Inhibition of microsomal glucose-6-phosphate transport in human neutrophils results in apoptosis: a potential explanation for neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type 1b. *Blood*, **101**, 2381–2387 (2003).
52. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I et al: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479–489 (1997).
53. Scott FL, Denault JB, Riedl SJ, Shin H, Renatus M, Salvesen GS. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J.*, **24**, 645–655 (2005).
54. Shiu RP, Pouyssegur J, Pastan I. Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 3840–3844 (1977).
55. Haas IG, Wabl M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*, **306**, 387–389 (1983).
56. Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*, **332**, 462–464 (1988).
57. Volpp BD, Nauseef WM, Donelson JE, Moser DR, Clark RA. Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 7195–7199 (1989).
58. Lomax KJ, Leto TL, Nunoi H, Gallin JI, Malech HL. Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science*, **245**, 409–412
59. Leto TL, Lomax KJ, Volpp BD, Nunoi H, Sechler JM, Nauseef WM, Clark RA, Gallin JI,

- Malech HL. Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-src. *Science*, **248**, 727–730 (1990).
60. Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem. J.*, **296**, 557–561 (1993).
  61. Park JW, Ma M, Ruedi JM, Smith RM, Babior BM. The cytosolic components of the respiratory burst oxidase exist as a M(r) approximately 240,000 complex that acquires a membrane-binding site during activation of the oxidase in a cell-free system. *J. Biol. Chem.*, **267**, 17327–17332 (1992).
  62. Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J. Exp. Med.*, **149**, 969–974 (1979).
  63. Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood*, **70**, 1233–1244 (1987).
  64. van de Werve G, Lange A, Newgard C, Méchin MC, Li Y, Berteloot A. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1533–1549 (2000).
  65. Fulceri R, Bellomo G, Gamberucci A, Scott HM, Burchell A, Benedetti A. Permeability of rat liver microsomal membrane to glucose 6-phosphate. *Biochem. J.*, **286**, 813–817 (1992).
  66. Fruehauf JP, Meyskens FL Jr. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin. Cancer Res.*, **13**, 789–794 (2007).
  67. Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*, **121**, 671–674 (2005).
  68. Gao Z, Tian Y, Wang J, Yin Q, Wu H, Li YM, Jiang X. A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. *J. Biol. Chem.*, **282**, 30718–30727 (2007).
  69. Kent JD, Sergeant S, Burns DJ, McPhail LC. Identification and regulation of protein kinase C-delta in human neutrophils. *J. Immunol.*, **157**, 4641–4647 (1996).
  70. Heyworth PG, Badwey JA. Protein phosphorylation associated with the stimulation of neutrophils. Modulation of superoxide production by protein kinase C and calcium. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22**, 1–26 (1990).
  71. El Benna J, Faust RP, Johnson JL, Babior BM. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 6374–6378 (1996).
  72. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*, **93**, 1464–1476 (1999).
  73. Arion WJ, Wallin BK, Lange AJ, Ballas LM. On the involvement of a glucose 6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose 6-phosphatase. *Mol. Cell Biochem.*, **6**, 75–83 (1975).

74. Arion WJ, Ballas LM, Lange AJ, Wallin BK. Microsomal membrane permeability and the hepatic glucose-6-phosphatase system. Interactions of the system with D-mannose 6-phosphate and D-mannose. *J. Biol. Chem.*, **251**, 4891–4897 (1976).
75. Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, van den Enden M, Kilo C, Tilton RG. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*, **42**, 801–813 (1993).
76. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, **49**, 1939–1945 (2000).
77. Ookawara T, Kawamura N, Kitagawa Y, Taniguchi N. Site-specific and random fragmentation of Cu,Zn-superoxide dismutase by glycation reaction. Implication of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.*, **267**, 18505–18510 (1992).
78. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, **404**, 787–790 (2000).
79. Erickson RW, Langel-Peveri P, Traynor-Kaplan AE, Heyworth PG, Curnutte JT. Activation of human neutrophil NADPH oxidase by phosphatidic acid or diacylglycerol in a cell-free system. Activity of diacylglycerol is dependent on its conversion to phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, **274**, 22243–22250 (1999).
80. Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 11059–11063 (1992).
81. Craven PA, Davidson CM, DeRubertis FR. Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids. *Diabetes*, **39**, 667–674 (1990).
82. Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*, **43**, 1122–1129 (1994).
83. Romano AH, Conway T. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. *Res. Microbiol.*, **147**, 448–455 (1996).
84. Berne C. The metabolism of lipids in mouse pancreatic islets. The biosynthesis of triacylglycerols and phospholipids. *Biochem. J.*, **152**, 667–673 (1975).
85. Dunlop ME, Larkins RG. Pancreatic islets synthesize phospholipids de novo from glucose via acyl-dihydroxyacetone phosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **132**, 467–473 (1985).
86. Kambayashi Y, Takekoshi S, Tanino Y, Watanabe K, Nakano M, Hitomi Y, Takigawa T, Ogino K, Yamamoto Y. Various Molecular Species of Diacylglycerol Hydroperoxide Activate Human Neutrophils via PKC Activation. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **41**, 68–75 (2007).
87. Go M, Sekiguchi K, Nomura H, Kikkawa U, Nishizuka Y. Further studies on the specificity of diacylglycerol for protein kinase C activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**, 598–605 (1987).

88. Nishizuka Y. The Albert Lasker Medical Awards. The family of protein kinase C for signal transduction. *JAMA*, **262**, 1826–1833 (1989).
89. Bursell SE, King GL. Can protein kinase C inhibition and vitamin E prevent the development of diabetic vascular complications? *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **45**, 169–182 (1999).
90. Kunisaki M, Bursell SE, Clermont AC, Ishii H, Ballas LM, Jirousek MR, Umeda F, Nawata H, King GL. Vitamin E prevents diabetes-induced abnormal retinal blood flow via the diacylglycerol-protein kinase C pathway. *Am. J. Physiol.*, **269**, E239–46 (1995).
91. Kunisaki M, Bursell SE, Umeda F, Nawata H, King GL. Normalization of diacylglycerol-protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and cultured rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels. *Diabetes*, **43**, 1372–1377 (1994).
92. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.*, **87**, 245–313 (2007).
93. Verhoeven AJ, Visser G, van Zwieten R, Gruszczynska B, Tien Poll-The DW, Smit GP. A Convenient Diagnostic Function Test of Peripheral Blood Neutrophils in Glycogen Storage Disease Type Ib. *Pediatr. Res.*, **45**, 881–885 (1999).
94. Jun HS, Lee YM, Cheung YY, McDermott DH, Murphy PM, De Ravin SS, Mansfield BC, Chou JY. Lack of glucose recycling between endoplasmic reticulum and cytoplasm underlies cellular dysfunction in glucose-6-phosphatase-beta-deficient neutrophils in a congenital neutropenia syndrome. *Blood*, **116**, 2783–2792 (2010).
95. Zamaraeva MV, Sabirov RZ, Maeno E, Ando-Akatsuka Y, Bessonova SV, Okada Y. Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death Differ.*, **12**, 1390–1397 (2005).
96. Adachi M, Shinkai M, Ohhama Y, Tachibana K, Kuratsuji T, Saji H, Maruya E. Improved neutrophil function in a glycogen storage disease type 1b patient after liver transplantation. *Eur. J. Pediatr.*, **163**, 202–206 (2004).
97. Martinez-Olmos MA, López-Sanromán A, Martín-Vaquero P, Molina-Pérez E, Bárcena R, Vicente E, Candela A, Pallardo-Sánchez LF. Liver transplantation for type 1b glycogenosis with reversal of cyclic neutropenia. *Clin. Nutr.*, **20**, 375–357 (2001).
98. Kasahara M, Horikawa R, Sakamoto S, Shigeta T, Tanaka H, Fukuda A, Abe K, Yoshii K, Naiki Y, Kosaki R, Nakagawa A. Living donor liver transplantation for glycogen storage disease type 1b. *Liver Transpl.*, **15**, 1867–1871 (2009).
99. Karaki C, Kasahara M, Sakamoto S, Shigeta T, Uchida H, Kanazawa H, Kakiuchi T, Fukuda A, Nakazawa A, Horikawa R, Suzuki Y. Glycemic management in living donor liver transplantation for patients with glycogen storage disease type 1b. *Pediatr. Transplant.*, **16**, 465–470 (2012).
100. Lachaux A, Boillot O, Stamm D, Canterino I, Dumontet C, Regnier F, Floret D, Hermier M. Treatment with lenograstim (glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor) and orthotopic liver transplantation for glycogen storage disease type 1b. *J. Pediatr.*, **123**, 1005–1008 (1993).
101. Matern D, Starzl TE, Arnaout W, Barnard J, Bynon JS, Dhawan A, Emond J, Haagsma EB, Hug G, Lachaux A, Smit GP, Chen YT. Liver transplantation for glycogen storage disease types I, III, and IV. *Eur. J. Pediatr.*, **158**, Suppl 2, S43–48 (1999).

102. Greene HL, Slonim AE, O'Neill JA Jr, Burr IM. Continuous nocturnal intragastric feeding for management of type 1 glycogen-storage disease. *N. Engl. J. Med.*, **294**, 423–425 (1976).
103. Chen YT, Comblath M, Sidbury JB. Cornstarch therapy in type I glycogen-storage disease. *N. Engl. J. Med.*, **310**, 171–175 (1984).
104. Wittenstein B, Klein M, Finckh B, Ullrich K, Kohlschütter A. Plasma antioxidants in pediatric patients with glycogen storage disease, diabetes mellitus, and hypercholesterolemia. *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 103–110 (2002).