

網膜変性疾患iPS細胞作成、網膜細胞検証

研究分担者 高橋 政代（独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター チームリーダー）

研究要旨

網膜色素変性は本邦での視力障害を引き起こす原因疾患のうち第3位を占める重要な疾患であり、未だ確立された治療法がない。ビタミン A 投与の効果を検討する研究がアメリカで大規模に行われたが、多岐にわたる原因遺伝子の区別なしに行われた研究であり、その効果はわずかでまだ議論の残るところである。また、2008年に RPE65 遺伝子変異による先天性網膜色素変性患者への遺伝子治療が開発され、その効果が報告されるなど遺伝子治療が実現している。このことから、個々の症例における原因遺伝子変異の検出は将来の遺伝子治療に役立つだけでなく、それを元にした各種治療薬の効果判定や治療法の開発、光障害の影響を考えるためにも非常に重要であることが理解できる。

我々は、原因遺伝子の判明している網膜色素変性症の患者から疾患特異的 iPS 細胞を作製し、疾患の病態を解明すると共に個々の症例に効果のあるビタミンや薬剤の検討を目指すものであり、本研究によりヒト iPS 細胞を用いた病態解析・創薬の分野での研究開発が期待される。

A. 研究目的

難治性疾患克服研究事業の対象となっている網膜変性疾患は遺伝性疾患であり、その原因遺伝子が多岐にわたることから新たな診断法と画期的な治療法の開発が求められている。

本研究では、遺伝子診断にて原因遺伝子の判明している網膜色素変性患者の体細胞から iPS 細胞を作成し、それから分化誘導した網膜細胞を用いて病態の解明及び治療法の開発を目指す。特に個々の症例によるビタミンやその他の薬剤の視細胞変性に及ぼす影響が異なるかどうかを検討し、個々の症例に適した治療法を検討する方法を確立する。

B. 研究方法

過去の遺伝子診断にて原因遺伝子変異の判明している網膜色素変性患者7名についてインフォームド

コンセントを得た上で、皮膚組織を採取し線維芽細胞を培養増殖させた。

（倫理面への配慮）

倫理面では患者の遺伝子診断及び iPS 細胞作製のための皮膚組織の提供について、また、ヒト細胞の取り扱いについて、理化学研究所及び先端医療センター病院における倫理委員会の審査・承認を受けており、人権及び利益の保護について十分な配慮がなされている。

動物実験においても理化学研究所の規程に則り、実験時における動物の苦痛及び使用数を最小限に抑えるなど、十分な配慮を行った。

C. 研究結果

患者はそれぞれの原因遺伝子の機能が異なるように選択した（ロドプシン、RDS、RP1、RP9、RP11）。

親子、兄弟の組み合わせがそれぞれ一組ずつ含まれており計7名の上腕皮膚から線維芽細胞を培養した。レトロウイルスを用いて線維芽細胞に4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を導入し、iPS細胞をそれぞれ複数細胞株樹立した。

できた iPS 細胞の中から導入遺伝子コピー数が低い細胞株を選び、SCID マウス精巣でテラトーマを複製、3胚葉に分化し多分化能を有することを確認した。これらの iPS 細胞株を維持増殖し、冷凍保存した。上記のようにそれぞれの患者から3株の iPS 細胞を選び、網膜細胞へと分化誘導したところ、すべての患者の iPS 細胞から色素を持った網膜色素上皮細胞が出現した。

#### D. 考察

網膜色素変性の患者7名全例からテラトーマ産生能を持つ iPS 細胞を作成することができた。また導入遺伝子コピー数の少ない株を選ぶことで、網膜色素上皮細胞に分化することのできる iPS 細胞を得ることができた。今後は作成した網膜色素変性患者の iPS 細胞を網膜への分化誘導法 (SFEB 変法) を用いて視細胞に分化させ、各患者 iPS 細胞について視細胞への分化効率や分化後の視細胞の形態に異常がないかを抗ロドプシン抗体を用いた染色や RT-PCR にて確認する。また、分化誘導した視細胞について、培養中にアポトーシスに陥る割合や、各種ストレス負荷によるアポトーシスの割合の検討を行う。

#### E. 結論

網膜色素変性モデルマウスの過去の研究から、同じ原因遺伝子でも変異によって光障害に対する脆弱性が異なったり、ビタミン A の投与による視細胞変性の抑制度が異なることが知られているが、患者 iPS 細胞から網膜細胞の分化に成功したことは、患者 iPS 細胞を用いてこれらの因子の影響が原因遺伝子変異によって異なるかを検討することが可能となり、真

臨床的に個々の症例の治療に有用な情報が得られる。患者 iPS 細胞によって現在は科学的根拠のない保存療法のみが施行されている網膜変性疾患に科学的根拠のある治療をもたらすことが可能となる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

● Hirami Y, Osakada F, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, Ikeda H, Yoshimura N, Takahashi M; Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett.* 2009 458:126-131

● Osakada F, Ikeda H, Sasai Y, Takahashi M; Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells. *Nature Protocols.* 2009 4(6):811-824

##### 2. 学会発表

● 平見恭彦、小坂田文隆、高橋和利、山中伸弥、栗本康夫、高橋政代：ヒト人工多能性幹細胞由来網膜色素上皮細胞および視細胞の分化誘導；第113回日本眼科学会総会，2009年4月16日～19日，東京

● Takahashi, M.; The Retina: Neural Stem Cells and Photoreceptor Degeneration: Okinawa Insutitute of Science and Techinology International Workshop, November 9-12, 2009. Okinawa, Japan

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

##### 1. 特許取得

○ 該当なし

##### 2. 実用新案登録

○ 該当なし

##### 3. その他

○ 該当なし

疾患特異的iPS細胞を用いた難治性疾患の画期的診断・治療法の開発に関する研究

研究分担者 高橋 淳（再生医科学研究所/iPS細胞研究センター 准教授）

研究要旨

パーキンソン病に対する iPS 細胞移植治療の実現化を将来の目的としてヒト iPS 細胞からのドーパミン神経細胞誘導条件を最適化に取り組み、無血清培地を用いた浮遊細胞系で BMP および TGF $\beta$ , Activin 阻害剤を加えることによって分化誘導効率が有意に上昇することを明らかにした。

A. 研究目的

パーキンソン病に対する iPS 細胞移植治療の実現化を目的とし、平成21年度はその基礎となるヒト iPS 細胞からのドーパミン神経細胞誘導条件を最適化に取り組んだ。

B. 研究方法

すでに樹立されているヒト iPS 細胞（253G4, Takahashi et al. Cell 2007）を用いて、フィーダー細胞を用いない浮遊培養系によるドーパミン神経細胞分化誘導を試みた。さらに多能性維持や中内胚葉誘導活性をもつ TGF $\beta$ , Activin を阻害するために低分子化合物 SB431542 を加え、さらに神経分化を抑制する BMP シグナルの阻害低分子化合物 Dorsomorphin を加えた。

C. 研究結果

無血清培地を用いた浮遊細胞系で BMP および TGF $\beta$ , Activin 阻害剤を加えたところ、神経誘導効率と神経前駆細胞の生存が有意に向上することを明らかにした。浮遊培養系でこれらに作用させると神経系細胞マーカーである PSA-NCAM の陽性細胞が 2 週間で 99.8%になった。さらにこの細胞をラミニン/

ポリオルニチン上で接着培養するとドーパミン神経細胞のマーカー (TH)陽性細胞が多数出現し、HPLC でドーパミンの産生も確認することができた。

D. 考察

培地内の KSR および B27 supplement に BSA が含まれているので動物由来因子が完全に除かれているわけではないが、フィーダー細胞やマトリクスも用いずかなり臨床応用に近いプロトコールでヒト iPS 細胞からドーパミン神経細胞が誘導できたことは意義深い。

E. 結論

無血清培地を用いた浮遊細胞系に BMP および TGF $\beta$ , Activin 阻害剤を加えることで、ヒト iPS 細胞から効率良くドーパミン神経細胞を誘導することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

● 該当なし

2. 学会発表

- Morizane, A., Doi, D., Kikuchi, T., Takahashi, J.:  
Small molecules promote neural differentiation from human pluripotent stem cells in the stromal (PA6) cell co-culture condition: nanosymposium 113.5: Society for Neuroscience 39th Annual Meeting, October 17-21, 2009. Chicago, IL, USA.
- Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Takahashi, J.:  
Feeder-free and chemically-defined culture method to induce neural cells from human ES and iPScells: Poster session 808.10: Society for Neuroscience 39th Annual Meeting, October 17-21, 2009. Chicago, IL, USA.
- 森実飛鳥、土井大輔、菊地哲広、高橋淳：低分子化合物を用いたヒト多能性幹細胞からの神経誘導：第9回日本再生医療学会総会、2009年18日～19日、広島。
- 菊地哲広、森実飛鳥、土井大輔、高橋淳：浮遊培養法によるヒトESおよびiPS細胞からの神経分化誘導：第9回日本再生医療学会総会、2009年18日～19日、広島。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

難治性骨軟骨疾患特異的 iPS 細胞作製と病態解明

研究分担者 戸口田淳也（京都大学再生医科学研究所 教授）

研究要旨

異所性骨化を呈する難治性疾患罹患者より iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞から間葉系幹細胞、更に靭帯・腱細胞を誘導し、in vitro 及び in vivo において骨化誘導実験を行い、正常個体から誘導した細胞と比較検討することで異所性骨化の分化機構を解明することを目指し、その基盤となる実験系を構築した。

A. 研究目的

現在難治性疾患の指定を受けている骨・関節系疾患には軟部組織（靭帯・腱など）の骨化を主体とするものが多い。これらの組織は本来骨化しないものであり、分化段階における異常、あるいは分化後の分化転換により異所性骨化が開始されると想定されるが、分子レベルでのメカニズムは明らかにされていない。本研究ではこれらの疾患罹患者より iPS 細胞を樹立し、中胚葉細胞、間葉系幹細胞、そして靭帯・腱細胞へと誘導し、骨化誘導実験に対する反応を正常個体由来の iPS 細胞と比較検討することで、病態を分子レベルで解明し、創薬に結びつく知見を得ることを目的とする。

B. 研究方法

下記の難治性疾患に指定されている疾患罹患者を対象として iPS 細胞の作成を目指した。

- 1) 後縦靭帯骨化症
- 2) 黄色靭帯骨化症
- 3) 進行性骨化性線維異形成症(FOP)

更に指定されていないが、骨化と関連した病態として骨形成不全症罹患者からも iPS 細胞を作製した。作製した iPS 細胞を中胚葉細胞、そして間葉系幹細胞へと誘導し、その後 in vitro 及び in vivo で骨化を誘

導する実験の構築に取り組んだ。

（倫理面への配慮）

iPS 細胞の作製にあたっては、京都大学医学部・医学研究科医の倫理委員会において承認された「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究」計画の記載事項を遵守して遂行した。

C. 研究結果

現在まで後縦靭帯骨化症 2 例、骨形成不全症 1 例の iPS 細胞を作製した。さらに FOP 罹患者の iPS 細胞を作製である。in vitro の誘導は胚様体を經由した方法を用いて間葉系幹細胞を誘導した。in vivo の実験は、人工骨材料を併用し、ヌードラットへの移植実験で評価する実験を遂行中である。

D. 考察

靭帯・腱細胞を効率よく誘導する方法の確立が骨化の相違を解析するためには重要となると考えられ、次年度の課題として取り組みたい。また FOP の場合、極めて稀な疾患であるため、匿名性の保護に特別の配慮が必要であると考えられた。

E. 結論

骨化異常の分子機構を解明するために、異所性骨化を呈する難治性疾患から iPS 細胞を作製した。

F. 研究発表

## 1. 論文発表

- Otsuka S, Aoyama T, Furu M, Ito K, Jin Y, A, Fukiage K, Kohno Y, Maruyama T, Kanaji T, Nishiura A, Sugihara H, Fujimura S, Otsuka T, Nakamura T, Toguchida J.: PGE2 signal via EP2 receptors evoked by a selective agonist enhances regeneration of injured articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Apr 17(4): 529-38.
- Ito K, Aoyama T, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Jin Y, Nasu A, Ueda M, Kasai Y, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T, Kobayashi A, Yoshida S, Niwa H, Otsuka T, Nakamura T, Toguchida J.: A novel method to isolate mesenchymal stem cells from bone marrow in a closed system using a device made by non-woven fabric. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010 Feb 16(1): 81-91.

## 2. 学会発表

- Nasu A, Kato T, Tamaki S, Hayakawa K, Mitsui H, Aoyama T, Takahashi K, Yamanaka S, Toguchida J. Revere differentiation and re-differentiation of bone marrow stromal cells containing mesenchymal stem cells: 7th ISSCR. July 10, 2009 Barcelona
- Jin Y, Kato T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H, Ueda M, Aoyama T, Toguchida J. The effect of hypoxia on proliferation and differentiation properties of human bone marrow stromal cells.: 7th ISSCR. July 10, 2009 Barcelona
- 金永輝、加藤友久、布留守敏、伊藤錦哉、那須輝、上田路子、青山朋樹、中村孝志、戸口田淳也。骨髄間質細胞の増殖、分化に対する低酸素培養の効果。第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会、2009 年 11 月 5 日、横浜
- 那須輝、加藤友久、玉置さくら、早川和男、青山朋樹、大塚隆信、中村孝志、戸口田淳也。間葉系幹細胞と人工多能性幹細胞由来間葉細胞の比較検討による間

葉系分化機構の解析。第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会、2009 年 11 月 5 日、横浜

- 伊藤錦哉、青山朋樹、加藤友久、布留守敏、三井裕人、早川和男、酒井芳紀、大塚隆信、中村孝志、戸口田淳也。OVX ラットモデルにおいて、プロスタサイクリン受容体作動薬は骨芽細胞に直接作用し骨形成を促す。第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会、2009 年 11 月 5 日、横浜

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

疾患特異的 iPS 細胞を用いた難治性疾患の画期的診断・治療法の開発に関する研究

研究分担者 高橋 良輔（京都大学医学研究科・臨床神経学 教授）

研究要旨

パーキンソン病（遺伝性2例、孤発性11例）の皮膚線維芽細胞を樹立した。

1名の遺伝性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞候補クローンを樹立した。

A. 研究目的

パーキンソン病（PD）の臨床診断は、臨床症状と画像診断などを含む多角的状況証拠を積み上げることによりなされているが、非典型的な場合も多く、正確な診断はレビー小体と呼ばれる細胞質内凝集体の出現を伴う黒質ドーパミン神経細胞変性を中心的特徴とする死後脳の病理組織学的所見に基づく。本研究は、パーキンソン病特異的 iPS 細胞由来神経細胞を用いた創薬開発を目的としている。

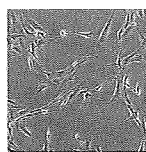
B. 研究方法

申請者は、これまでの研究から、構造異常を起こしたミスフォールドタンパク質の蓄積により神経変性が生じると考えている。パーキンソン病死後病理組織においては、 $\alpha$ -synucleinが中脳ドーパミン作動性ニューロンにおいて封入体として蓄積しており、パーキンソン病患者iPS細胞由来ドーパミン作動性ニューロンにおいて、 $\alpha$ -synucleinが生化学的に不溶化しやすいという仮説を有している。本申請研究では、難病であるパーキンソン病およびその類縁疾患について、患者さんへの適切な説明及びそれに基づく同意取得の下、皮膚細胞を収集し、患者皮膚細胞バンクを構築する。さらに皮膚細胞よりiPS細胞を作成し、分化誘導によるモデル細胞構築を行う。

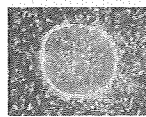
（倫理面への配慮）

京都大学医学部附属病院では、本研究は京都大学医学部倫理委員会により、課題名『ヒト疾患特異的iPS細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究』（承認番号第824番）および『ヒト疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝子解析研究』（承認番号第G259）として承認されている。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を損集するものである。

C. 研究結果



17名のパーキンソン病患者より皮膚線維芽細胞を樹立した（左図はその1例）。内訳は、遺伝性6名、孤発性11名である。



1名のI2020T 変異型 LRRK2を有する遺伝性パーキンソン病患者皮膚線維芽細胞よりiPS細胞を樹立した（左図）。

D. 考察

目標としていた数のパーキンソン病の皮膚皮膚線維芽細胞を樹立した。ただし、iPS細胞樹立とその解析は、今後の課題である。

本申請研究は、原因が不明で、根本的な治療法が確

立していない難治性疾患であるパーキンソン病を重点的・効率的に研究を行うことにより、進行の阻止を目指した創薬開発を行う。

今後、樹立した皮膚線維芽細胞より、iPS細胞を複製、さらにドーパミン作動性神経に分化誘導し、表現型を解析する必要がある。

## E. 結論

遺伝性パーキンソン病患者より疾患特異的なiPSを樹立した。今後、それらを分化させた細胞を解析することにより、その疾患の病態解明や、再生医療への応用が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Inoue H, Kondo T, Lin L, Mi S, Isacson O, Takahashi R(2009) Protein Misfolding and Axonal Protection in Neurodegenerative Diseases, In **Protein folding and misfolding: neurodegenerative diseases**, ed. Ovadi, J.

高橋良輔 (2009) : パーキンソン病の神経細胞移植治療、日本医事新報、4445、79-80

Takahashi R. (2009)Edaravone in ALS. (commentary) *Exp Neurol*. 217:235-6

Takeuchi H, Yanagida T, Inden M, Takata K, Kitamura Y, Yamakawa K, Sawada H, Izumi Y, Yamamoto N, Kihara T, Uemura K, Inoue H, Taniguchi T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S.(2009) Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models. *J Neurosci Res*. 87:576-85.

Sawada H, Oeda T, Yamamoto K, Kitagawa N, Mizuta E, Hosokawa R, Ohba M, Nishio R, Yamakawa K, Takeuchi H, Shimohama S, Takahashi R, Kawamura T.(2009) Diagnostic accuracy of cardiac metaiodobenzylguanidine scintigraphy in Parkinson disease. *Eur J Neurol*. 16, 174-82.

Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, Takahashi R, Chiba T.(2009)Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers. *Int J Cancer*. 125, 2029-35.

Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Uemura K, Takeda S, Takahashi R.(2009) A chemical neurotoxin, MPTP induces Parkinson's disease like phenotype, movement disorders and persistent loss of dopamine neurons in medaka fish. *Neurosci Res*. 65, 263-71.

Uyama N, Uchihara T, Mochizuki Y, Nakamura A, Takahashi R, Mizutani T. (2009) Selective nuclear shrinkage of oligodendrocytes lacking glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy: a 3-dimensional volumetric study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 68: 1084-91.

Yamakawa K, Izumi Y, Takeuchi H, Yamamoto N, Kume T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S, Sawada H.(2009)Dopamine facilitates alpha-synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Nov 11. [Epub ahead of print]

Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Kobayashi Y, Sakaki Y, Toyoda A, Uemura K, Kobayashi D, Takeda S, Takahashi R. (2010) Loss of PINK1 in medaka fish (*Oryzias latipes*) causes late-onset decrease in spontaneous movement. *Neurosci Res*. 66;151-61.

Kawamoto Y, Ito H, Kobayashi Y, Suzuki Y, Ihara M, Kawamata, J, Akiguchi I, Fujimura H, Sakoda S, Kusaka H, Hirano A, Takahashi R. (2010) HtrA2/Omi-immunoreactive intraneuronal inclusions in the anterior horn from patients with sporadic and SOD1 mutant amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropath Appl Neurobiol*. in press.

### 2. 学会発表

高橋良輔：家族性パーキンソン病の分子メカニズムー神経保護治療に向けてーシンポジウム「神経変性疾患の分子標的治療への新たな展開」、第32回日本神経科学学会、名古屋（2009.9.18）

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし



疾患特異的 iPS 細胞を用いた難治性疾患の画期的診断・治療法の開発に関する研究

研究分担者 井上 治久

（京都大学 物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞センター 特定拠点准教授）

研究要旨

脊髄性筋萎縮症2例、脊髄小脳変性症3例より皮膚線維芽細胞を樹立した。

ヒト iPS 細胞より、脊髄性筋萎縮症で変性する脊髄運動ニューロンへの分化誘導方法を確立した。

A. 研究目的

iPS 細胞を用いた疾患の病態解析については、従来は *in vitro* で単一の疾患の表現型を再現することにとどまっております (Raya A. Nature. 2009:460:53, Ebert AD. Nature. 2009:457:277)、コントロールの設定、複数の疾患を組み合わせた横断的な解析、*in vivo* 解析などは行われていない。そこで、発症年齢の異なる神経変性疾患の疾患関連 iPS 細胞を用いた aging subtraction 等により、各々の病態の関連を解明する。

B. 研究方法

難治性疾患克服研究事業の対象疾患患者から書面で同意を得た後皮膚などの組織を採取し、疾患特異的 iPS 細胞を樹立する。対象疾患は、脊髄性進行性筋萎縮症(井上)、脊髄小脳変性症(井上)、神経線維腫症 I・II 型(井上・斎藤)、結節性硬化症(井上)、シャイ・ドレーガー症候群(井上)、多発性硬化症(井上)、などとした。疾患特異的 iPS 細胞を神経変性を生じる特定の神経へ分化誘導を行った。また倫理面では、患者の遺伝子情報の取り扱いに際しては、京都大学倫理審査委員会の承認を受けており、人権及

び利益の保護について、十分配慮した。組み換え DNA 実験については、京都大学の承認を受けた後、規定されている封じ込め手段を行った。ヒト ES 細胞の取り扱いについては、認可施設で実験を行った。疾患関連 iPS 細胞作製については、京都大学医学部倫理委員会の承認を受けており、患者の同意・協力を得て行った。動物実験については、苦痛を最小限とするよう十分配慮して行い、遺伝子組み換え動物はカルタヘナ法を順守して扱った。

C. 研究結果

(a) 成人期発症脊髄性筋萎縮症 2 例、脊髄小脳変性症 3 例より皮膚線維芽細胞を樹立した。

(b) ヒト iPS 細胞より、脊髄性筋萎縮症で変性する脊髄運動ニューロンへの分化誘導方法を確立した。

D. 考察

脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy: SMA)とは、脊髄運動神経細胞(脊髄前角細胞)の変性・細胞死によって起こる神経原性の筋萎縮症を生じる運動ニューロン疾患である。体幹や四肢の筋力低下、筋萎縮を進行性に示す。小児期に発症する I 型: 重症型(別

名: ウェルドニッヒ・ホフマン(Werdnig-Hoffmann病)、  
II型: 中間型 (別名: デュボビッツ(Dubowitz病)、III  
型: 軽症型 (別名: クーゲルベルグ・ウェランダー  
Kugelberg-Welander病) と、成人期に発症するIV型に  
分類される。SMAの原因遺伝子は運動神経細胞生存遺  
伝子(survival motor neuron1:SMN1)である。第5染色  
体(5q13)に存在している。I、II型は95%にSMN1遺  
伝子欠失が認められる劣性遺伝性疾患、III型の約半数、  
IV型の1-2割においてSMN1遺伝子変異が認められる。  
本研究で皮膚線維芽細胞を樹立した2例は、III型もし  
くはIV型であると考えられる。

SMN1 遺伝子の近傍、テロメア側には、SMN1 遺  
伝子とは5塩基対のみが異なっている遺伝子SMN2が  
存在している。SMN2のコピー数が多い場合に、SMN1  
遺伝子欠失が存在しても、発症時期が遅れ、SMN2は  
病態の修飾遺伝子であると考えられている。最近の  
研究より、SMN2以外にも、神経細胞アポトーシス抑  
制蛋白(neuronal apoptosis inhibitory protein:略  
してNAIP)遺伝子もSMAの修飾遺伝子であることが  
判明しており、他にもいくつかの修飾遺伝子が存在  
する可能性が考えられている。同一の遺伝子変異を  
有していても、発症時期が異なる患者iPS細胞由来  
運動ニューロンを比較解析する(aging subtraction)  
ことにより修飾遺伝子を同定できる可能性がある。

## E. 結論

最終目的のために、本研究で樹立した成人発症  
SMAの皮膚線維芽細胞からのiPS細胞樹立に加えて、  
IもしくはII型SMAの皮膚線維芽細胞樹立およびそ  
れらからのiPS細胞を樹立する必要がある

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 井上治久: iPS細胞を用いた神経難病の研究. 東  
海高校・中学サタデープログラム 16th, 名古屋  
(2010. 2. 20)
- 井上治久: iPS細胞作製技術を用いた神経変性疾  
患の研究. 鳥取大学医学部附属病院 神経科学講演  
会, 米子 (2010. 2. 24) .
- 井上治久: 疾患特異的 iPS細胞を用いた神経変性  
疾患の研究. 日本薬理学会年会 シンポジウム「幹  
細胞分化の制御機構と再生医療におけるこれから  
の薬理学研究の方向性」, 大阪 (2010. 3. 17)
- Inoue, H. : Neurodegenerative disease-specific  
induced Pluripotent Stem cells research. Personalized  
Stem Cell Medicine- A Canada-California-Japan  
discussion workshop. San Francisco, USA(2010.3.25)

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

難治性腎疾患特異的iPS細胞を用いた新規試験管内疾患モデルの作製

研究分担者 長船 健二（京都大学物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター 特定拠点准教授）

研究要旨

多発性嚢胞腎および血管炎症候群（顕微鏡的多発血管炎（急速進行性糸球体腎炎）、ウェゲナー肉芽腫症、アレルギー性肉芽腫性血管炎）は、有効な治療法の未だに確立されていない末期慢性腎不全に進行しうる難治性疾患である。本研究においては、4疾患の患者皮膚細胞より疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、それらの iPS 細胞を多発性嚢胞腎の罹患臓器である胆管上皮細胞や血管細胞、血管炎症候群の罹患臓器である血管細胞や血球細胞に試験管内で分化誘導することにより、病態形成を模倣する新規の疾患モデルを作製し、病態解明や治療法開発研究に繋げる。

A. 研究目的

多発性嚢胞腎は、腎臓のみならず肝臓、膵臓、生殖腺などの嚢胞形成や脳動脈瘤合併など全身の多数の臓器に病態を形成する未だ有効な治療法の確立されていない難治性疾患である。また、血管炎症候群は、肺や腎臓などの臓器を栄養する血管に炎症を生じ、それらの重要臓器が機能不全に陥る難治性疾患である。白血球を攻撃する自己抗体（抗好中球細胞質抗体：ANCA）が患者血液中から検出されることより、免疫異常の関与が考えられているが、傷害される血管自体にも異常があるのか否かなど、その病態はほぼ不明のままである。副腎皮質ホルモン（ステロイド）製剤や免疫抑制剤が治療薬として使用されているが、完全ではなく副作用も多いため、安全で有効な治療法の開発が望まれている。

本研究の目的は、iPS 細胞技術を用いて多発性嚢胞腎および血管炎症候群に対する新規の試験管内疾患モデルを作製し、病態解明や治療法開発に繋げることである。

B. 研究方法

京都大学医学部附属病院および田附興風会医学研究所北野病院にて診療を受けている前述4疾患の患者の皮膚細胞を同意取得の後に皮膚生検によって採取し、初期化因子導入にて疾患特異的 iPS 細胞を樹立する。さらに、樹立された iPS 細胞を、多発性嚢胞腎の罹患臓器である胆管上皮細胞や血管細胞、血管炎症候群の罹患臓器である血管細胞や血球細胞に試験管内で分化誘導することにより、病態を模倣する試験管内疾患モデルの作製を行う。

本研究は、京都大学大学院医学研究科・医学部「医の倫理委員会」かつ田附興風会医学研究所北野病院「医の倫理委員会」にて承認された研究計画に基づき、匿名化の実施および遺伝情報を厳密に管理することによって、患者個人情報漏洩によるプライバシー侵害の防止を徹底して行う。

C. 研究結果

5名の多発性嚢胞腎患者（3名は脳動脈瘤合併か

つ腎障害重症、2名は軽症) から iPS 細胞株を樹立した。そして、未分化マーカーおよびトランスジーン の発現評価、胚様体、奇形腫形成による多分化能 の評価をほぼ完了した。また、多発性嚢胞腎特異的 iPS 細胞から罹患臓器である血管内皮細胞、周皮細胞、胆管上皮細胞への試験管内での分化誘導を行い、フローサイトメトリーにて単離したそれらの細胞の遺伝子発現解析を開始した。

血管炎症候群に関しては、顕微鏡的多発血管炎(急速進行性糸球体腎炎)は3例、ウェゲナー肉芽腫症およびアレルギー性肉芽腫性血管炎に関しては各1例の候補症例を選択し、顕微鏡的多発血管炎の2例については、皮膚生検および iPS 細胞研究実施の同意を得た。

#### D. 考察

多発性嚢胞腎の患者体細胞から、レトロウイルスベクターを用いた山中 4 因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)および3因子(c-Mycを除く)の遺伝子導入による疾患特異的 iPS 細胞樹立が可能であることが判明した。さらに、樹立された iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様の未分化状態特異的マーカー遺伝子を発現し、胚様体、奇形腫形成にてヒト ES 細胞と同様の三胚葉成分への多分化能を示した。また、多発性嚢胞腎特異的 iPS 細胞は、試験管内で胆管や血管細胞へ分化可能であった。

#### E. 結論

多発性嚢胞腎に対する疾患特異的 iPS 細胞は樹立可能であり、樹立された iPS 細胞は試験管内疾患モデル作製に使用可能である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Lau F, Ahfeldt T, Osafune K, Akutsu H, Cowan CA.;

Induced pluripotent stem (iPS) cells: an up-to-the-minute review. F1000 Biology Reports 2009; 1: 84.

- 長船健二: iPS 細胞作製の最先端と作製された iPS 細胞株間の特性差異についての最新の知見、実験医学 28(2): 55-61, 2010.

##### 2. 学会発表

該当なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成、疾患研究に関する研究

研究分担者 平家 俊男（京都大学大学院医学研究科発達小児科学 教授）

研究要旨

マウス ES/iPS 細胞、ヒト ES/iPS 細胞を用いて、造血細胞、骨格筋細胞を作成する基盤技術を開発した。ヒト疾患研究において横たわる大きな障壁の 1 つとして、患者さんより病態の原因となる組織を頂くことの倫理的、物理的困難さにある。疾患特異的 iPS 細胞は、これらの困難さを解決してくれる大きな手段となる。しかし、効率的な疾患研究を遂行するには、ES 細胞、iPS 細胞から、目的とする組織を選択的に作成する基盤技術の開発が必須である。今回我々は、ヒト iPS 細胞より、造血細胞、骨格筋細胞を作成する基盤技術を開発した。

A. 研究目的

疾患研究において患者さんから頂ける検体には、大きな制限がある。中枢神経系など、倫理的に採取が不可能である。筋肉、骨等採取が物理的な可能な組織においても、患者さんに大きな負担をお願いしなければならない。また、血液等採取が比較的容易な組織においても、頻回の採血は、許容できる範囲を超える。一方、患者さんは、何らかの治療を受けておられる場合が多い。その場合、患者さんから直接検体を頂いて疾患研究を行っても、治療の影響を排除できない。疾患特異的 iPS 細胞を作成して疾患研究を行うシステムが確立されると、上記の危惧が解決でき、真に有効な疾患研究の遂行が可能となる。本研究においては、小児の様々な疾患特異的 iPS 細胞を作成し、疾患責任組織を分化誘導して、疾患解析研究、治療基盤開発研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

我々の研究室では過去にサル ES 細胞、マウス iPS 細胞を OP9 細胞との共培養系において赤血

球に分化させることに成功している。今回我々はこの分化システムを応用し、ヒト iPS 細胞からの好中球分化系の樹立を試みた。

未分化ヒト iPS 細胞を回収し、OP9 上で VEGF を加えて 10 日間培養すると、中胚葉マーカーである VEGFR2 と CD34 の共陽性細胞が出現する。10 日目にこの分画を sorting して新しい OP9 上に播きなおし、SCF, IL-3, TPO, G-CSF などの造血サイトカインの存在下に約 30 日間培養した。この時点で浮遊細胞として得られた細胞を用いて形態・機能評価を行った。

また、我々の研究室では過去にマウス ES 細胞から胚様体法によって効率的に骨格筋細胞を誘導し、移植可能な骨格筋幹/前駆細胞をフローサイトメトリーにより単離することに成功した。今回、iPS 細胞が ES 細胞と同様に骨格筋細胞への分化能を有し、今後の疾患解析・細胞移植治療への応用が可能であることを検証するため、マウス iPS 細胞を用いた骨格筋分化誘導と、筋ジストロフィーモデルマウス（mdx マウス）への移植実験を行った。

未分化マウス iPS 細胞を単一細胞に解離し、

hanging-drop 法により 6 日間かけて胚様体を形成し、マトリゲル®上に付着培養させ 2~3 週間程度培養すると、形態学的に判別可能な自発収縮活動をみせる骨格筋細胞と考えられる細胞集団が出現する。これらの細胞を RT-PCR および免疫染色で解析した。

また、骨格筋分化の過程で出現する筋サテライト細胞マーカー SM/C-2.6 陽性の細胞を単離し、筋傷害を与えた mdx マウスの前脛骨筋に移植し、移植細胞の生着とジストロフィン蛋白の発現について解析した。また、これらの方法を応用し、ヒト ES 細胞および iPS 細胞からの骨格筋分化誘導について検討を行った。

### C. 研究結果

好中球分化に関して、回収した細胞は形態学的に約 40%が成熟好中球の形態をとっており、表面抗原の解析でも成熟好中球に発現する抗原が陽性であった。これらの細胞は電子顕微鏡、免疫染色にて好中球特殊顆粒を備えていることが確認され、貪食能、遊走能、活性酸素産生能等の機能も備えていることも確認された。また、分化の過程における表面抗原、転写因子の発現を経時的に解析した結果、骨髄における正常造血と類似した経過をとることが確認された。これらのことより、我々の OP9 との共培養系は未分化ヒト iPS 細胞から機能的成熟好中球を分化させることができ、その分化過程は正常造血を模倣していると考えられた。

骨格筋分化に関して、我々の考案した方法によって、マウス iPS 細胞においても ES 細胞と同等に、効率的に骨格筋細胞を誘導することが可能であった。経時的な骨格筋転写因子、サテライト細胞マーカーの発現解析においてもほぼ同様の結果が得られ、iPS 細胞からも ES 細胞と同様に、骨格筋細胞を産生可能であることを証明した。また、iPS 細胞由来の骨格筋前駆細胞も mdx マウスに生

着し、欠損しているジストロフィン蛋白を長期にわたって回復することを示し、移植細胞中に再生可能な幹/前駆細胞が含まれていることが示された。また、ヒト ES 細胞および iPS 細胞からの骨格筋分化誘導に関しては、成熟骨格筋マーカーであるミオシン重鎖およびミオゲニン陽性細胞を誘導する系を確立し、解析を行っているところである。

### D. 考察

今回我々は、未分化ヒト iPS 細胞から成熟好中球を分化させ、その機能と分化過程を詳細に解析した。過去にヒト ES 細胞から好中球分化を行った報告はあるが、ヒト iPS 細胞から成熟好中球を分化させ、その機能を詳細に解析した報告はない。また、未分化細胞から成熟好中球へと分化する過程の転写因子などの解析を行った報告はヒト ES 細胞を用いたものを含めてもなかった。先天性骨髄不全症候群などの好中球に異常を来す疾患は原因遺伝子が同定されつつあるが、その病態生理に関しては不明な点が多い。これらの患者さんより疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、今回我々が樹立した好中球分化系を用いて好中球に分化させ、その分化過程を正常 iPS 細胞と比較しながら詳細に検討することで、これらの疾患の病態解明につながる知見が得られることが期待される。

また、骨格筋分化においては、iPS 細胞が ES 細胞と同等に骨格筋細胞へと分化することをはじめて報告した。このことは iPS 細胞が ES 細胞と同等に疾患解析、細胞移植治療に有用であることを示しており、今後の病態解析、細胞移植治療において大きな一歩であると考えられる。現在我々はヒト ES 細胞および iPS 細胞を用いた骨格筋分化系の開発を行っており、in vitro での骨格筋細胞誘導に成功している。既にデュシャン型筋ジストロフィー患者から iPS 細胞を誘

導することに成功しているが、これらの技術を用いることによって、筋ジストロフィーの病態解析や細胞治療の開発に新たな展開が期待される。

#### E. 結論

我々は、正常ヒト iPS 細胞から成熟好中球を分化させ、その機能と分化過程を詳細に解析する実験系を確立した。この系を用いて疾患特異的 iPS 細胞を好中球に分化させ解析することで、好中球に異常を来す疾患の病態解析につながると考えられる。

また、骨格筋分化においては、マウス iPS 細胞が ES 細胞と同等に骨格筋細胞へと分化し、移植可能な骨格筋前駆細胞を単離することが可能であることを証明した。本研究をヒト ES 細胞および iPS 細胞、疾患特異的 iPS 細胞へと発展させることによって、筋疾患の病態解析や細胞移植治療において新たな展開が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Mizuno Y, Chang H, Umeda K, Niwa A, Iwasa T, Awaya T, Fukada SI, Yamamoto H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T.; Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent cells. *FASEB J.* 2010 (in press)

##### 2. 学会発表

- Awaya T, Chang H, Mizuno Y, Niwa A, Iwasa T, Umeda K, Fukada SI, Yamamoto H, Motohashi N, Suzuki Y, Takeda S, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T.; Derivation of engraftable muscle precursors from murine ES/iPS cells. The 8<sup>th</sup> French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophy. “New developments of therapeutic strategy for muscular dystrophies”, 3<sup>rd</sup> ~ 4<sup>th</sup> July 2009, Paris

- 栗屋智就、水野雄太、張璽、加藤竹雄、丹羽明、中畑龍俊、平家俊男：多能性幹細胞（ES 細胞、iPS 細胞）を用いた骨格筋幹／前駆細胞の同定およびその臨床応用に関する研究；平成 21 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に応用するための統括的研究」（武田班）班会議，2009 年 12 月 3～4 日，東京

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

疾患特異的 iPS 細胞の創薬探索系への活用

研究分担者 中西 淳（武田薬品工業(株)医薬研究本部開拓研究所 主席研究員）

研究要旨

ヒト iPS 細胞株を京都大学から導入し、維持培養、凍結保存などの基盤技術を確立した後、ヒト iPS 細胞から神経分化誘導を検討した。化合物評価に適した条件を設定するために、神経分化誘導方法と分化マーカーの測定法を最適化してスループットを改善した。創薬探索系のモデルとして、ドーパミン神経マーカー（TH）の発現を促進する物質の評価系を構築して検討を開始した。また、ヒト iPS 細胞からの運動神経の分化誘導法についても検討を開始した。

A. 研究目的

難治性疾患の疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した細胞を用いて、病態フェノタイプを再現した細胞モデルを構築する。この細胞モデルを用いて疾患メカニズム研究を実施して創薬ターゲットを同定するとともに、候補化合物探索のための創薬評価系を構築する。

B. 研究方法

京都大学等で作製された疾患特異的 iPS 細胞を導入し、神経細胞への効率的な分化誘導法を化合物等を用いて検討する。また、分化させた神経細胞に化合物処理によるストレス、刺激を加えて病態フェノタイプの誘導を試みる。さらに、化合物評価に適したアッセイ系を構築するために、簡便な検出法、培養法について検討する。倫理面への配慮のため、患者の個人情報入手しない。

C. 研究結果

京都大学から導入したヒト iPS 細胞株を用いて、

維持培養、凍結保存などの基盤技術を確立し、ヒト iPS 細胞からの神経分化誘導法を検討した。iPS 細胞からニューロスフェアを形成させる方法に関して、化合物評価に適した条件を設定するために、培養条件と分化マーカーの測定法を最適化してスループットを改善した。創薬探索系のモデルとして、ドーパミン神経マーカー（TH）の発現を促進する物質の評価系を構築し、既知化合物について活性の測定を開始した。また、ヒト iPS 細胞からの運動神経の分化誘導法についても検討を開始した。

D. 考察

ヒト iPS 細胞から誘導したニューロスフェアは長期の維持培養が可能で凍結保存も可能なことから、実用的な創薬評価に適していると考えられた。

E. 結論

iPS 細胞から誘導したヒト神経細胞は、創薬評価に使用可能であることが確認された。



F. 研究発表

1. 論文発表

- 中西 淳 「iPS 細胞を用いた創薬研究—薬効・副作用評価系への活用」 Medical Science Digest 35(12):13-16 2009

2. 学会発表

- 該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

疾患特異的iPS細胞の標準化

研究分担者 高橋 和利 (京都大学 物質・細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター 特定拠点助教)

研究要旨

本年度はヒト iPS 細胞の標準化を目的として、ヒト iPS 細胞の樹立および維持において自己の細胞をフィーダー細胞として用いることができるか否かを検討した。結果、14 例中 11 例において自己の線維芽細胞をフィーダー細胞として利用することが可能であった。この結果は他人由来の成分を含まない培養系の確立に寄与すると考えられる。

A. 研究目的

iPS 細胞は、ES細胞に似た形態、遺伝子発現様式をもち、また、高い増殖能性と様々な組織の細胞に分化できる多能性を併せ持つ。採取に差し支えない組織細胞から樹立できるiPS 細胞は、ES 細胞が直面する倫理的問題や移植後免疫拒絶を回避し、細胞移植治療への応用が期待されている。しかし、細胞移植治療に応用可能なiPS 細胞を作製するには安全性などの様々な課題を解決する必要があり、iPS 細胞の樹立、培養に不可欠なフィーダー細胞の改善もその一つである。

従来、ヒトiPS 細胞は、マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) をフィーダー細胞にして樹立、培養されてきた。しかし、マウス由来フィーダー細胞を使用することで、外来性抗原、未知のウイルス、人畜共通病原体でヒトiPS 細胞が汚染する可能性がある。フィーダー細胞を用いず、特殊な培地のみでヒトES 細胞を培養した例も報告されているが、染色体の不安定化につながる可能性が指摘されている。

これらの問題を回避するために、新生児皮膚線維芽細胞やヒトES 細胞由来線維芽細胞をフィーダー

細胞としてヒトES 細胞の増殖に用いた研究も報告されているが、他人由来の細胞をフィーダー細胞として用いることは、未知のウイルスやプリオンなど病原体による感染を起こす可能性がある。

本研究では、臨床応用のための技術開発において iPS 細胞作製の資源であるヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) を、同時にフィーダー細胞としても用いることが理想的であると考え、その可能性を調べた。

B. 研究方法

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4 種類のHDF株 (成人から採取された1388 株、1392 株、1503 株、および新生児から採取されたNHDF 株の合計4 種類) に導入した。導入後6日目に、4 種類と同系のHDF フィーダー細胞 (自己フィーダー細胞) をそれぞれ準備した培養皿に遺伝子導入されたHDF を播種した。遺伝子導入から約3 週間後、形成された4 種類のヒトiPS 細胞を単離し、それぞれの自己フィーダー上に移した。その後、自己フィーダー上で維持したiPS細胞株の性質を詳細に解析した。

### C. 研究結果

自己フィーダー上で、iPS 細胞は未分化状態を維持したまま正常に増殖し、少なくとも18 継代が可能であった。

自己フィーダー細胞上で培養されたiPS 細胞における遺伝子発現を解析したところ、未分化細胞マーカーの発現レベルは、既存のマウスフィーダー細胞で樹立されたヒトiPS 細胞や ES 細胞と同等であった。また、自己フィーダー細胞で培養されたiPS 細胞は26 継代後でも正常な核型を示していた。

次に、自己フィーダー細胞上で樹立・培養されたヒト iPS 細胞の分化多能性解析を行った。ES 細胞の分化誘導研究で一般的な方法である胚様体注1 1 形成による試験管内分化誘導を行ったところ、内胚葉、中胚葉、外胚葉への分化を示すマーカー遺伝子の発現を確認できた。また、樹立されたヒト iPS 細胞を免疫不全マウスに注入し、奇形腫の形成を観察したところ、すべての細胞株で上皮細胞（内胚葉）、軟骨（中胚葉）、神経冠様構造（外胚葉）など様々な組織を含むテラトーマの形成を確認した。これらの結果は、自己フィーダー細胞で樹立・培養されたヒト iPS 細胞に分化多能性があることを示している。

### D. 考察

本研究成果によって、皮膚由来の線維芽細胞を用いれば、自己細胞をフィーダーとして利用できることが明らかになった。一方で、上記の4 株に加えて14 株の細胞を試したところ、そのうち3 株はフィーダー細胞としての支持能力が乏しいことが分かった。今後はフィーダーとしての適性がどのような機構で規定されているのかを明らかにする必要がある。

### E. 結論

最近の研究報告で、ヒト胎児線維芽細胞を自己フィーダー細胞として用いてiPS 細胞を樹立、培養し

たという報告がある。本研究では新生児および成人の皮膚線維芽細胞から自己フィーダー細胞を用いてiPS 細胞を樹立、培養が可能であることを見出した。つまり、ヒト皮膚線維芽細胞は、iPS 細胞の資源はもちろんのこと、フィーダー細胞として機能することを示している。さらに、皮膚線維芽細胞がフィーダー細胞として機能するので、患者に由来しない、従来のフィーダー細胞を用いずに、ヒトiPS 細胞の樹立可能であることも確認した。異種成分を含まない樹立・培養方法の確立が医療応用可能なiPS 細胞の作製で重要とされている現状において、この研究結果は、その目的に近づく大きな一歩だと考えられる。また、iPS 細胞を作製する手順の効率化につながり、GMP 準拠の細胞調製に寄与すると期待される。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Takahashi K, Narita M, Yokura M, Ichisaka T, Yamanaka S.; Human induced pluripotent stem cells on autologous feeders. PLoS ONE. 2009 Dec; 4:e8067.

#### 2. 学会発表

- 高橋和利：iPS 細胞の安全性向上を目指して 第5 回臨床分子医学研究会, 2009 年 12 月 19 日, 京都.
- 高橋和利：ヒト iPS 細胞の安全性向上に対する取り組み 第2回 Kyoto Neuroscience Conference, 2009 年 11 月 19 日, 京都.

### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

#### 1. 特許取得

該当なし

#### 2. 実用新案登録

該当なし

#### 3. その他

該当なし

疾患特異的 iPS 細胞を用いた難治性疾患の画期的診断・治療法の開発に関する研究

研究分担者 浅香 勲（京都大学 物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター 特定拠点講師）

研究要旨

今年度は、難治性疾患克服研究事業の対象となる疾患のうち脊髄性進行性筋萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、多発性硬化症、パーキンソン病、後縦靭帯骨化症、多発性嚢胞腎等の患者数例から十数例について、書面で同意を得た後皮膚を採取し、アウトグロース法により線維芽細胞を作成し、各検体十数本以上の凍結細胞ストックを作成した。さらに、筋萎縮性側索硬化症、後縦靭帯骨化症、CINCA 症候群、多発性嚢胞腎等の線維芽細胞について、レトロウィルスベクター法により Oct3/4、Sox II、Klf4、cMyc の 4 遺伝子、または Oct3/4、Sox II、Klf4 の 3 遺伝子を導入して疾患特異的 iPS 細胞をそれぞれ数クローンずつ樹立した。

A. 研究目的

「研究目的」を御記載下さい。

難治性疾患克服研究事業の対象となっている疾患はいずれも患者数が少なく研究が進みにくいことから、新たな画期的な診断、治療法の開発が求められている。

iPS 細胞は患者を含む特定の個人由来の多能性幹細胞として樹立できる点で画期的であり、患者から樹立された iPS 細胞（疾患特異的 iPS 細胞）を用いた難治性疾患の病態解析、創薬、治療法開発が期待される。

本研究目的は、難治性疾患患者の組織より疾患特異的 iPS 細胞を作成して、難治性疾患の病因、病態の解明、新たな治療法の開発研究に供することと、樹立された疾患線維芽細胞株ならびに疾患特異的 iPS 細胞株を、長期間定常的に各種研究に供するための保管管理条件を確立することである。これらによって、我が国における難治性疾患研究基盤の確立を図るものである。

B. 研究方法

「研究方法」を御記載下さい。

難治性疾患克服研究事業の対象疾患患者から書面で同意を得た後皮膚を採取し、患者由来の線維芽細胞株をアウトグロース法により樹立収集した。得られた線維芽細胞株は、マイコプラズマ等の感染試験を実施し、陰性を確認した株のみを疾患特異的 iPS 細胞の材料として登録し、液体窒素保存タンクに保管した。樹立された患者由来の線維芽細胞材料として、順次レトロウィルスベクター法により Oct3/4、Sox II、Klf4、cMyc の 4 遺伝子、または Oct3/4、Sox II、Klf4 の 3 遺伝子を導入し、iPS 細胞株の樹立を実施した。樹立された疾患特異的 iPS 細胞株は線維芽細胞と同様、登録後液体窒素保存タンクに保管した。

また、今後増加する貴重な細胞材料の生存率を安定に維持すると同時に、紛失や取り違えを防止するため完全気相型液体窒素タンクと凍結バイアルの二次元バーコードによる入出庫管理システムを整備した。

（倫理面への配慮）