

201024052 A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服 研究事業

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

平成22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中畑龍俊

平成23(2011)年3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服 研究事業

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

平成22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中畑龍俊

京都大学 iPS 細胞研究所
臨床応用研究部門 疾患再現研究分野

はじめに

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。

2007年に研究分担者の高橋和利、山中伸弥によって、ヒト体細胞から多能性幹細胞(iPS細胞)を誘導できることが示され、世界中に大きな衝撃を与えた(Takahashi K. Cell, 2007, 131;861)。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。一方で、今後ヒトES細胞/iPS細胞においてジーンターゲット法を用いて遺伝子改変が行われる時代の到来が予測される。我々は、京都大学iPS細胞研究所において、ヒトiPS細胞の樹立・維持方法の確立、品質改良に取り組んでいる。

本研究班は、平成21年度より新たに結成されたものであるが、その目的は、疾患特異的iPS細胞、遺伝子改変ES/iPS細胞を用いて難治性疾患の病因、病態の解明、新たな治療法の開発を目指すことである。疾患関連iPS細胞研究においては、これらの細胞を作成し解析する技術はもちろん、ES細胞などで培われた各種の細胞への分化系や、作成したiPS細胞の標準化技術の確立なども重要な要素である。これら様々な要素を結集し、できるだけ早く臨床に還元できる成果を得るために、本研究班が組織された。

H22年度は、さらに疾患特異的iPS細胞樹立に必要な患者からの検体採取を進めた。また、前年度の成果をうけて、樹立したiPS細胞を用いた病態解析を進めている。iPS細胞の標準化に向けた戦略も引き続き進捗しており、全体として順調な成果を上げている。

今後は、iPS細胞を用いた、従来になかった新しい観点からの病態解析に踏み込み、診断・治療に向けた研究を進めていきたい。本報告書が関係者の参考になれば幸いである。

平成23年3月 主任研究者 中畑 龍俊

目 次

I. 研究組織	1
II. 平成 22 年度総括研究報告	3
中畑 龍俊	
III. 平成 22 年度分担研究報告	
1. 原発性免疫不全症候群・Fanconi 貧血・骨髄異形成症候群などの iPS 細胞作成及び解析	11
斎藤 潤	
2. 網膜変性疾患 iPS 細胞作成、網膜細胞検証	13
高橋 政代	
3. パーキンソン病疾患 iPS 細胞の解析	15
高橋 淳	
4. 難治性骨軟骨疾患特異的 iPS 細胞作製と病態解明	17
戸口田 淳也	
5. パーキンソン病関連特異的 iPS 細胞作製と解析	19
高橋 良輔	
6. ALS・アリューマン病・脊髄性筋萎縮症関連疾患特異的 iPS 細胞作製と解析	21
井上 治久	
7. 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	25
長船 健二	
8. 原発性免疫不全症候群・拡張型心筋症・疾患特異的 iPS 細胞作成及び解析	27
平家 俊男	
9. 疾患特異的 iPS 細胞の創薬探索系への活用	29
中西 淳	
10. 疾患特異的 iPS 細胞の標準化	31
高橋 和利	
11. 疾患特異的 iPS 細胞のソースとなる患者由来線維芽細胞株の作成・ 収集保管管理に関する研究	33
浅香 勲	
12. 呼吸器疾患特異的 iPS 細胞作製（若年性肺気腫、特発性肺線維症、肺、 リンパ脈管筋腫症、原発性肺高血圧症）	35
三嶋 理晃	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧	37

V. 研究成果の刊行物・印刷物 45

I. 研究組織

平成 22 年度厚生科学研究費補助金
「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」研究班
研 究 組 織

	氏 名	所 属
主任研究者	中畑 龍俊	京都大学 iPS 細胞研究所
分担研究者	斎藤潤	京都大学 iPS 細胞研究所
	高橋政代	理化学研究所 発生再生科学総合研究センター
	高橋淳	京都大学 再生医科学研究所・iPS 細胞研究所
	戸口田淳也	京都大学 再生医科学研究所・iPS 細胞研究所
	高橋良輔	京都大学 医学研究科 神経内科学
	井上治久	京都大学 iPS 細胞研究所
	長船健二	京都大学 iPS 細胞研究所
	平家俊男	京都大学 医学研究科 発達小児科学
	中西淳	武田薬品工業 医薬研究本部 開拓研究所
	高橋和利	京都大学 iPS 細胞研究所
	浅香勲	京都大学 iPS 細胞研究所
	三嶋理晃	京都大学 医学研究科 呼吸器内科学

Ⅱ. 平成 22 年度 総括研究報告書

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

総括研究者：中畑 龍俊

（京都大学 iPS 細胞研究所 特定拠点教授）

研究要旨

難治性疾患克服研究事業対象疾患の新たな画期的な診断、治療法の開発を疾患関連 iPS 細胞を用いて行うことを目的として、以下の研究を行った。

<疾患 iPS 細胞作成> 原発性免疫不全症候群、網膜変性疾患、脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、難治性骨軟骨疾患、多発性嚢胞腎などの疾患患者 80 例以上から皮膚線維芽細胞を樹立し、iPS 細胞のソースとした。

<分化系の構築> 網膜色素上皮細胞、ドパミン神経細胞、運動ニューロン、骨格筋細胞、好中球、気道上皮細胞などの分化系・培養系の構築や最適化を行った。

<疾患解析> CINCA 症候群、網膜色素変性症、ALS、多発性嚢胞腎などの患者由来の iPS 細胞を用いて、分化した細胞の機能解析を行い、新たな生物学的・病理学的特徴を明らかにした。

<iPS 細胞の標準化> 自己の線維芽細胞をフィーダー細胞として利用する技術を確立した。

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。

2007年に研究分担者の高橋和利、山中伸弥によって、ヒト体細胞から多能性幹細胞(iPS細胞)を誘導できることが示され、世界中に大きな衝撃を与えた(Takahashi K. Cell, 2007, 131:861)。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。一方で、今後ヒトES細胞/iPS細胞においてジーンターゲット法を用いて遺伝子改変が行われる時代の到来が予測される。

本研究の目的は、疾患特異的iPS細胞を用いて難治性疾患の病因、病態の解明、新たな治療法の開発を目指すと共にiPS細胞から各疾患で傷害されている各臓器の細胞に分化させる方法を共有化して班員以外の研究者や企業に提供し、我が国における研究基盤を確立することである。

文部科学省の事業などで樹立された疾患特異的iPS細胞を有効に活用するため、各疾患で傷害されている各臓器の細胞に分化させる方法を研究分担者間で共有し、共同研究の依頼に応じて標準化されたiPS細胞とそれに適合した分化系を速やかに供与し、班員以外の研究者、製薬企業と連携して創薬への応用を進める。

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(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、発症年齢の異なる複数の神経変性疾患の疾患関連iPS細胞を用いたaging subtractionにより、各々の病態の関連を解明することをめざす。また、我々が開発したNOGマウスにiPS細胞から分化させた種々の細胞を移植することにより、in vivoでの病態を明らかにする。

本研究を遂行するためには幹細胞樹立の標準化、適切な分化系の構築が必要であるため、平行してこれらの事業を行う。さらに企業との共同研究で、毒性試験系への応用、創薬活用を進める。

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、疾患特異的iPS細胞のソースとなる皮膚などの組織を採取する。対象疾患は、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、神経線維腫症I・II型、結節性硬化症、シャイ・ドレーガー症候群、多発性硬化症、パーキンソン病、ペルオキシソーム病、ライソゾーム病、ミトコンドリア病、副腎酵素欠損症、後縦靭帯骨化症、黄色靭帯骨化症、前縦靭帯骨化症、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、再生不良性貧血、不応性貧血、多発性嚢胞腎、肥大型心筋症、拡張型心筋症、原発性免疫不全、自己炎症性疾患、サルコイドーシスなどとする。樹立手法はレトロウイルスベクター法を用いるが、適時樹立方法を改善する。樹立のソースとなる線維芽細胞などは、京都大学iPS細胞研究所共通基盤施設で保存する。iPS細胞は標準化を行い、適切なクローンを選別する。iPS細胞の樹立は文部科学省の再生医療の実現化プロジェクトでも行うので、この事業で樹立されたiPS細胞も本研究に用いる。

ヒトES/iPS細胞のジーンターゲット法を行う。具体的には、疾患特異的iPS細胞の持つ遺伝子変異やその関連遺伝子の改変や、変異を導入したES細胞を作成し、シグナル解析や発現解析に用いる。

体細胞モザイクの患者から正常と変異クローンの疾患特異的iPS細胞を作成する。これにより遺伝的背景の多様性を最小限に抑え、今後の疾患特異的iPS細胞研究をデザインする上での指標となりうる解析手法を開発する。

発症年齢が異なるが表現型が近似する複数の神経変性疾患の患者由来の疾患関連iPS細胞を神経細胞に分化させ、発症に関与する分子機構の差異を解析し、年齢依存性の発症機構を解明する。疾患の発症時期を老年期以降にずらし、発症を未然に防ぐ治療を開発する。

分担研究者らにより、種々の細胞への分化系は確立されているが、さらに効率及び安全性を向上させる。

疾患特異的iPS細胞の供与や薬剤ライブラリの共用などについて、製薬会社と連携して創薬へのiPS細胞の応用を進める。

本研究は、疾患を有する患者さんから検体を頂きiPS細胞を作成して行う研究であるため、患者さんの同意・協力を必要とする研究である。また、作成するiPS細胞を用いた疾患解析においては、遺伝子解析が必須であり、

個人情報取り扱いの配慮を必要とする研究である。この2点に対して、我々は、疾患特異的 iPS 細胞研究を行うにあたり、京都大学医学部医の倫理委員会に、ヒトを対象とした医学の研究および臨床応用実施申請書として「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」およびヒト遺伝子解析申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」の2申請を行った。その後、京都大学医学部医の倫理委員会での審査を頂き、平成20年6月4日付けで、実施に関して承認を頂いた。今後の研究においては、その内容を忠実に順守して行う。

C：結果

【原発性免疫不全症候群・Fanconi 貧血・骨髄異形成症候群などの iPS 細胞作成及び解析】

原発性免疫不全症候群のうち、2例のCINCA症候群体細胞モザイク患者由来の iPS 細胞を用いて研究を行った変異型と正常型の2種類のクローンを複数得た。また、確立した単球マクロファージの分化系で解析したところ、疾患特異的な表現型が確認された。現在薬剤スクリーニングの系の確立を進めている。FANCONI 貧血についても樹立を進めている。

【網膜変性疾患 iPS 細胞作成、網膜細胞検証】

原因遺伝子の判明している網膜色素変性症の患者4例由来の疾患特異的 iPS 細胞を用いて細胞を分化誘導した。遺伝子変異のタイプによって、視細胞への分化効率が異なり、また遺伝子変異のある視細胞のみ分化誘導後にアポトーシスを呈し細胞数の減少を認めた。また、ビタミンEを添加した場合にRP9の遺伝子変異の視細胞のみ細胞死の抑制効果を認めた。この結果は iPS 細胞の個別化医療への応用の可能性を示唆するものである。

【パーキンソン病疾患 iPS 細胞の解析】

iPS 細胞の利点のひとつは自家移植が可能であることであり、免疫反応や未知の病原体の感染は回避できる。しかし、患者由来 iPS 細胞から誘導した分化細胞が正常に機能するかどうかの検討が必要である。そこで本研究では、孤発例パーキンソン病患者から iPS 細胞の樹立を試み、2名の患者から iPS 細胞を樹立した。うち1名2株からドーパミン神経細胞が誘導されることを確認した。今後詳細な検討を進めるとともに、より多くの患者からの iPS 細胞株を用いた検討を行う予定で

ある。

【ALS・アルツハイマー病・脊髄性筋萎縮症関連疾患特異的 iPS 細胞作製と解析】

成人期および小児期発症脊髄性筋萎縮症患者・徐進行型と通常の急速進行型の SOD1 変異 ALS 患者由来皮膚線維芽細胞を樹立した。先行実験として、変異 SOD1 関連 ALS iPS 細胞由来アストロサイトとコントロールヒト iPS 細胞由来アストロサイトのマイクロアレイ解析を行った。さらに ALS モデルマウス由来初代培養アストロサイトとコントロールマウス由来初代培養アストロサイトマイクロアレイ解析を行った。ヒト、マウス両者の解析において共通に変動する遺伝子を同定した。その遺伝子産物であるタンパク質は孤発性 ALS 患者髄液で上昇することがすでに報告されており、疾患マーカーとなりうる可能性がある。

【パーキンソン病関連特異的 iPS 細胞作製と解析】

遺伝性パーキンソン病患者2例由来の iPS 細胞について、TH 陽性のドーパミン神経への分化を検討した。孤発性パーキンソン病2例について iPS 細胞の候補クローンを樹立した。

【難治性骨軟骨疾患特異的 iPS 細胞作製と病態解明】

異所性骨化を呈する難治性疾患罹患者より樹立された 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。

【原発性免疫不全症候群・拡張型心筋症・疾患特異的 iPS 細胞作成及び解析】

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つに、研究対象となる組織を得ることの倫理的・物理的困難さがある。疾患特異的 iPS 細胞は、これらの困難さを解決出来る大きな手段となる。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と、in vitro での解析手法の評価が必要である。今回我々は、ヒト iPS 細胞より、造血細胞、骨格筋細胞を作成し、その特性の評価を行った。

【疾患特異的 iPS 細胞作成 (多発性嚢胞腎など)】

7名の常染色体優性多発性嚢胞腎患者から樹立された iPS 細胞株を用いて、iPS 細胞から同疾患の罹患臓器の一種である血管内皮細胞、周皮細胞への試験管内での分化誘導を行い、健常日本人 iPS 細胞由来のそれらの血管細胞とマイクロアレイによる遺伝子発現の比較解析を行い、内皮細胞、周皮細胞それぞれに数個の患者 iPS 細胞由来の罹患臓器細胞種で発現が異常となる遺伝子を同定した。

血管炎症候群に関しては、顕微鏡的多発性血管炎3例から皮膚生検、皮膚培養により線維芽細胞のストックを完了した。また、罹患臓器である血管細胞へ分化誘導可能であることを確認した。

【患者線維芽細胞の保存・疾患 iPS 細胞作成】

本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14疾患を対象に、新たな患者80例以上から、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。うち約15例分については、他の分担研究者と共同で、レトロウィルスベクター法により Oct3/4、SoxII、Klf4、cMyc の4遺伝子、または Oct3/4、SoxII、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〜十数クローンずつ樹立した。

【ヒト iPS 細胞の標準化】

本研究では疾患特異的 iPS 細胞の標準化を目的として、10株のヒト ES 細胞株と50株のヒト iPS 細胞を神経細胞へと分化誘導させ、分化能の評価を行った。また、種々の網羅的解析を行った。ES 細胞および正常な iPS 細胞からなるグループと分化抵抗性クローンをマイクロアレイで解析した結果、分化抵抗性クローンで優位に高発現する遺伝子を複数同定することができた。

【創薬探索系への活用】

難治性疾患の疾患特異的 iPS 細胞として、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者由来 iPS 細胞を導入し、運動神経への分化誘導を開始した。疾患特異的 iPS 細胞およびその分化細胞のタンパク質発現プロファイルを解析するための条件検討を実施し、ALS 患者由来 iPS 細胞のタンパク質発現プロファイルを正常 iPS 細胞と比較した。その結果、ALS 患者由来 iPS 細胞のミトコンドリア画分において、複数の変動タンパク質を同定した。

D：考察

本年度は、分担研究者がそれぞれ課題に取り組み、皮膚線維芽細胞のストック作成と iPS 細胞クローンの作成が順調に進行した。iPS 細胞の評価も進められており、未分化マーカーの出現、形態、導入遺伝子のサイレンシング、分化能など様々な検討が各分担研究者によって行われている。

本年度は、いくつかの疾患で、患者 iPS 細胞を用いた病態解析が開始された。従来の手法では解明しえなかった、様々な解析結果が明らかになってきており、病態の理解・治療薬開発に向けて、研究を進めてゆきたい。

樹立に適した状態で線維芽細胞を維持すること、性質のよい iPS 細胞を維持する方法、解析に適した再現性のよい分化系の構築などは、疾患 iPS 細胞株を得ることと同様に極めて重要である。これらについても分担研究者によって、改良がなされるとともに、品質管理も適切に行われている。

E：結論

本年度は疾患の幅を広げるとともに、いくつかの疾患については本格的な病態解析が始まっている。関連 iPS 細胞を用いた病態解析・病因究明という大きな目標に向けて、順調に研究が進行している。引き続き来年度も研究に邁進し、病気に苦しむ患者さんの診断・治療に貢献できる成果を求めてゆきたい。

F：健康危険情報

なし

G：研究発表

1. Sakai H, Ito S, Nishikomori R, Takaoka Y, Kawai T, Saito M, Okafuji I, Yasumi T, Heike T, Nakahata T. : A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gene. *Rheumatology (Oxford)*. 49: 194-196, 2010 (Letter to the Editor(Case Report))
2. Kato I, Umeda K, Awaya T, Yui Y, Niwa A, Fujino H, Matsubara H, Watanabe KI, Heike T, Adachi N, Endo F, Mizukami T, Nunoi H, Nakahata T., Adachi S.: Successful treatment of refractory donor lymphocyte infusion-induced immune-mediated pancytopenia with rituximab. *Pediatr Blood Cancer*. 54: 329-331, 2010
3. Mizuno Y., Chang H., Umeda K., Niwa A.,

- Iwasa T., Awaya T., Fukada S., Hiroshi Yamamoto H., Yamanaka S., Nakahata T., Heike T.: Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J.* 24: 2245-2253, 2010
4. Takeuchi M., Kimura S., Kuroda J., Ashihara E., Kawatani M., Osada H., Umezawa K., Yasui E., Imoto M., Tsuruo T., Yokota A., Tanaka R., Nagao R., Nakahata T., Fujiyama Y., Maekawa T.: Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl⁺ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in a hypoxic environment. *Cell Death and Differentiation* 17:1211-1220, 2010
 5. Kubota M, Adachi S, Usami I, Okada M, Kitoh T, Shiota M, Taniguchi Y, Tanizawa A, Nanbu M, Hamahata K, Fujino H, Matsubara K, Wakazono Y, Nakahata T.: Characterization of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in Japanese children: a retrospective multi-center study. *Int J Hematol.* 91(2):252-257, 2010
 6. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Nishikawa K, Tanimura Y, Makinoshima H, Goda M, Akashi H, Inutsuka A, Niwa A, Shigemoto T, Nabeshima Y, Nakahata T., Nabeshima Y, Fujiyoshi Y, Dezawa M.: Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(19):8639-43, 2010
 7. Kaichi S, Hasegawa K, Takaya T, Yokoo N, Mima T, Kawamura T, Morimoto T, Ono K, Baba S, Doi H, Yamanaka S, Nakahata T., Heike T.: Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice. *Cardiovasc Res.* 88: 314-323, 2010
 8. Iwasa T, Baba S, Doi H, Kaichi S, Yokoo N, Mima T, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T, Nakahata T., Heike T.: Neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells improve the cardiac function of acute ischemic heart mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 400(1):27-33, 2010
 9. Matsuda K, Taira C, Sakashita K, Saito S, Tanaka-Yanagisawa M, Yanagisawa R, Nakazawa Y, Shiohara M, Fukushima K, Oda M, Honda T, Nakahata T., Koike K. : Long-term survival after nonintensive chemotherapy in some juvenile myelomonocytic leukemia patients with CBL mutations, and the possible presence of healthy persons with the mutations. *Blood* ;115(26):5429-31, 2010
 10. Kumada T, Yamanaka Y, Kitano A, Shibata M, Awaya T, Kato T, Okawa K, Abe T, Oshima N, Nakahata T., Heike T.: Ttyh1, a Ca(2+)-binding protein localized to the endoplasmic reticulum, is required for early embryonic development. *Dev Dyn.:* 239(8):2233-45. 2010
 11. Matsuse D, Kitada M, Kohama M, Nishikawa K, Makinoshima H, Wakao S, Fujiyoshi Y, Heike T, Nakahata T., Akutsu H, Umezawa A, Harigae H, Kira J, Dezawa M.: Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.:* 69(9):973-85. 2010
 12. Yamanaka Y, Kitano A, Takao K, Prasansuklab A, Mushiroda T, Yamazaki K, Kumada T, Shibata M, Takaoka Y, Awaya T, Kato T, Abe T, Iwata N, Miyakawa T, Nakamura Y, Nakahata T., Heike T.: Inactivation of fibroblast growth factor binding protein 3 causes anxiety-related behaviors. *Mol Cell Neurosci.* 46(1): 200-12. 2011
 13. 中畑龍俊：増血因子と臨床応用。臨床検査（第54巻第6号）623-629, 2010
 14. 中畑龍俊：iPS細胞と遺伝性疾患（特集臨床遺伝学の進歩と日常診療。遺伝性疾患の新しい治療と今後期待される治療研究）日本医師会雑誌（第139巻第3号）632-634, 2010
 15. 浅井康一、井澤和司、納富誠司郎、大野光洋、北村律子、矢野潤、加藤文英、菊池清、足立壮一、中畑龍俊：骨髄移植後、RSウイルス感染を契機に特発性器質化肺炎と考えられる肺合併症を呈したDown症候群の1例。小児科臨床 Vol.63 No.8

学会発表

1. 中畑龍俊：iPS細胞を用いた今後の医療。第47回日本小児神経学会近畿地方会 2010年2月13日 ピアザ淡海
2. 中畑龍俊：疾患特異的iPS細胞を用いた今後の医療。第12回外科分子細胞治療研究会 2010年4月8日 名古屋国際会議場
3. 中畑龍俊：小児における再生医療の展望。第113回日本小児科学会学術集会 2010年4月23-25日（23日）盛岡市民文化ホール
4. 中畑龍俊：Various clinical applications of human induced pluripotent stem cells(iPS cells). 第16回日本遺伝子治療学会学術集会 2010年7月1-3日（3日）栃木

5. 中畑龍俊：再生医療とレチノイド（1. iPS 細胞）. 第 21 回日本レチノイド研究会学術集会 2010 年 11 月 13-14 日（14 日） 大阪医科大学
6. 中畑龍俊：iPS 細胞の臨床展開. 第 31 回日本臨床薬理学会年会 2010 年 12 月 1-3 日（1 日） 国立京都国際会館
7. 中畑龍俊、伊藤守：再生医療の基礎研究に有用なヒト化動物. 第 57 回日本実験動物学会総会 シンポジウム 3（テーマ：再生医療の幕を開く動物実験） 5 月 12-14 日（14 日） 京都テルサ
8. 中畑龍俊：CAPS に対する細胞分子生物的手法を用いた診療基盤技術の開発. 難治性疾患克服研究推進事業研究成果発表会「難治性疾患克服研究の成果と今後」 5 月 23 日 星陵会館ホール（東京）
9. 中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 47 回日本臨床分子医学会学術集会 2010 年 4 月 10-11 日（11 日） 東京国際フォーラム
10. 中畑龍俊：Derivation of Engraftable Myogenic Precursors from Murine ES/iPS cells and Generation of Disease-specific iPS cells from Patients with Duchenne Muscular dystrophy(DMD) and Other Diseases. 51st Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology(第 51 回日本神経学会総会) Symposium 7(The Forefront of Regenerative Medicine Research) 5 月 20-22 日(22 日) 東京国際フォーラム
11. 中畑龍俊：iPS 細胞と疾患モデル細胞. (ミニシンポジウム 1：血液免疫関連疾患と iPS 細胞) 第 31 回日本炎症・再生医学会 2010 年 8 月 5-6 日（5 日） 京王プラザホテル（東京）
12. 西小森隆太、田中尚子、井澤和司、酒井秀政、村田祐樹、横山宏司、阿部純也、田中孝之、斎藤潤、河合朋樹、八角高裕、中畑龍俊、平家俊男：抗 IL-1 療法（ワークショップ 2：サイトカインを標的とした病態制御の可能性） 第 31 回日本炎症・再生医学会 2010 年 8 月 5-6 日（5 日） 京王プラザホテル（東京）
13. 栗屋智就、張璽、水野雄太、丹羽明、加藤竹雄、深田宗一郎、山元弘、山中伸弥、中畑龍俊、平家俊男：マウス胚性幹細胞および誘導多能性幹細胞からの骨格筋幹／前駆細胞の誘導と移植効果（ワークショップ 7：組織幹細胞による臓器再生） 第 31 回日本炎症・再生医学会 2010 年 8 月 5-6 日（5 日） 京王プラザホテル（東京）
14. 丹羽明、斎藤潤、加藤格、大嶋宏一、末盛博文、平家俊男、中畑龍俊：ヒト ES/iPS 細胞からの in vitro 二次元無血清造血誘導における、分化過程の経時的解析（ポスター） 第 31 回日本炎症・再生医学会 2010 年 8 月 5-6 日 京王プラザホテル（東京）
15. Itaru Kato, Akira Niwa, Toshio Heike, Megumu Saito, Satoshi Saida, Hisanori Fujino, Katsutsugu Umeda, Souichi Adachi, Mamoru Ito, Fumihiko Ishikawa, Tatsutoshi Nakahata: A novel therapy for ALL by targeting the extramedullary sites. 第 72 回日本血液学会学術集会 2010 年 9 月 24-26 日 パシフィコ横浜
16. Tatsuya Morishima, Ken-Ichiro Watanabe, Akira Niwa, Hisanori Fujino, Souichi Adachi, Tatsutoshi Nakahata: Neutrophil differentiation from human induced pluripotent stem(iPS) cells for disease investigation. 第 72 回日本血液学会学術集会 2010 年 9 月 24-26 日 パシフィコ横浜
17. Akira Niwa, Toshio Heike, Katsutsugu Umeda, Koichi Ohima, Itaru Kato, Hirofumi Suemori, Megumu Saito, Tatsutoshi Nakahata: Tracing the developmental route from human ESC/iPSCs to blood cell mesoderm in Serum-free 2D culture. 第 72 回日本血液学会学術集会 2010 年 9 月 24-26 日 パシフィコ横浜
18. Kodera Y, Yamamoto K, Kato S, Harada M, Kanda Y, Hamajima N, Asano S, Ikeda Y, Imamura M, Kawa K, Morishima Y, Nakahata T, Tanimoto M, Dohy H, Tanosaki R, Shiobara S, Sung-Won Kim, Nagafuji K, Hino M, Miyamura K, Suzuki R; Safety and Risk of Allogenic Peripheral Blood Stem Cell Donation: The Comprehensive Report of Nation-Wide Consecutively Pre-Registered 3, 264 Family Donor Survey In 10 years Project by Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. 52nd Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December4-7, 2010, Orland, Florida

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 発明の名称：インフラマソームの活性を抑える薬剤をスクリーニングする方法
発明者：Tatsutoshi Nakahata
Megumu Saito
Takayuki Tanaka
特許出願人：京都大学
米国仮出願日：2010年11月18日
米国仮出願番号：61/415,102
2. 発明の名称：多能性幹細胞からの好酸球の製造方法
発明者：Tatsutoshi Nakahata
Kohichiro Tsuji
Feng Ma
Hirohisa Saito
Kenji Matsumoto
特許出願人：京都大学
米国仮出願日：2010年12月3日
米国仮出願番号：61/419,496
3. 発明の名称：多能性幹細胞からの樹状細胞への分化誘導法
発明者：Tatsutoshi Nakahata
Megumu Saito
Akira Niwa
Masakatsu Yanagimachi
特許出願人：京都大学
米国仮出願日：2011年2月23日
米国仮出願番号：61/445,856

Ⅲ. 平成 22 年度 分担研究報告書

原発性免疫不全症候群・Fanconi 貧血・骨髄異形成症候群などの iPS 細胞作成及び解析

研究分担者 齋藤 潤 （京都大学 iPS 細胞研究所 特定拠点助教）

研究要旨

本年度は、原発性免疫不全症候群のうち、中条西村症候群の iPS 細胞を作成した。前年度作成した iPS 細胞のうち、CINCA 症候群については患者由来変異クローンで IL-1 β の過剰産生を認めるなど、病態の再現が確認された。Fanconi 貧血については、遺伝子修復を含む、疾患解析のために必要な ES/iPS 細胞の遺伝子改変による iPS 細胞の作製を進めている。

A. 研究目的

血液・免疫系の細胞は非常に複雑なネットワークを生体内で構築しており、患者検体では治療の影響などのばらつきを廃して解析を行うことが通常困難である。また、分化異常症などの場合、マウスモデルとヒトで同じ遺伝子変異でも表現型が異なることがあるので、患者 iPS 細胞を血球系へ分化させて解析することは有用であると考えられる。

そこで、本研究では血球・免疫系の疾患の患者から iPS 細胞を樹立し、それを血球系へ分化させて表現型を再現し、解析を行って、疾患の本態に迫ることを目的とした。

B. 研究方法

京都大学医の倫理委員会に承認された研究計画書に従って、患者の同意を得、皮膚から繊維芽細胞株を樹立した。疾患関連 iPS 細胞の樹立は、通常のレトロウイルスベクター法を用いて 4 因子(cMyc, Klf4, Cxt3/4, Sox2)を導入し、SNL フィーダー細胞上でクローニング・維持・ストックを行った。解析のためには ES/iPS 細胞の特定の遺伝子をノックアウト・ノックインすることが望ましいため、遺伝子改

変のためのベクターもデザインした。

本研究を含む疾患特異的 iPS 細胞研究を行うにあたり、京都大学医学部医の倫理委員会に、ヒトを対象とした医学の研究および臨床応用実施申請書として「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」およびヒト遺伝子解析申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」の 2 申請を行い、承認を頂いている。その内容を忠実に順守して研究を行っている。

C. 研究結果

免疫不全症のうち、自己炎症性症候群である CINCA 症候群 2 例、好中球減少症である HAX1 遺伝子異常症 1 例、中条西村症候群 1 例から疾患関連 iPS 細胞を樹立した。

また、重症複合型免疫不全症である細網異形成症 (AK2 遺伝子異常症) 2 例及び Fanconi 貧血 3 例についても疾患関連 iPS 細胞を樹立中であり、現在進行中である。樹立した iPS 細胞株については、奇形種形成、トランスジーンサイレンシング、未分化マーカーの発現などを確認している。

CINCA 症候群患者由来 iPS 細胞を OP9 フィーダー上で血球細胞へと分化させたところ、サイトカイン

産生能、貪食能などを持つ、機能的マクロファージに分化した。

NLRP3 変異を持つクローンでは、すべて IL-1 β の過剰産生が認められた一方で、変異なしクローンでは IL-1 β 産生は正常であった。マイクロアレイによる発現解析では、両者は極めて類似した発現プロファイルを示していた。

また、Fanconi 貧血については、従来の方法では iPS 細胞の作製が困難であることが判明したため、遺伝子修復・遺伝子改変を BAC を用いたターゲティングベクターで行う予定であり、現在研究を進めている。

以上のように H22 年度の研究は順調に目標を達成している。一部の疾患では病態再現が達成されたので、来年度は病態解析と創薬スクリーニングを行っていく予定である。

D. 考察と今後の展望

疾患 iPS 細胞を用いた病態解析は、まだ始まったばかりの分野であり、その成果の解釈には慎重な評価が必要である。従来の解析では得られなかった様々な利点があると考えられるが、信頼できる結果を得るためには、適切な対照疾患の設定、分化させた細胞の評価系の確立が必須であると考えている。本年度は作成した iPS 細胞の病態再現を行うことができた。この成果を来年度に生かすために、引き続き精力的に研究を行いたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

1: Kambe N, Nakamura Y, Saito M, Nishikomori R. The Inflammasome, an Innate Immunity Guardian, Participates in Skin Urticarial Reactions and Contact Hypersensitivity. *Allergol Int.* 2010 Feb 25;59(2). [Epub ahead of print]

2: Sakai H, Ito S, Nishikomori R, Takaoka Y, Kawai T, Saito M, Okafuji I, Yasumi T, Heike T, Nakahata T. A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gene. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Jan;49(1):194-6.

2. 学会発表

● なし

F. 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

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
網膜再生医療研究チーム 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。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、視細胞を分化誘導した。遺伝子変異のタイプによって、視細胞への分化効率が異なり、また遺伝子変異のある視細胞のみ分化誘導後にアポトーシスを呈し細胞数の減少を認めた。また、過去のアメリカの大規模調査で試みられた各種ビタミンを培地中に投与したところ、ビタミン E を添加した場合に RP9 の遺伝子変異の視細胞のみ細胞死の抑制効果を認めた。この結果は iPS 細胞の個別化医療への応用の可能性を示唆するものである。

A. 研究目的

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 細胞を作製し、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についてインフォームドコンセントを得た上で作製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

の分化効率と経時変化を抗ロドプシン抗体を用いた染色にて確認を行った。分化誘導した視細胞については、培養中にアポトーシスに陥る割合や、各種ストレスマーカーの染色によってアポトーシスの機序を検討した。

さらに患者 iPS 細胞由来の視細胞について、各種因子（ビタミン A, C, E）を培地中に添加し、変性を抑制するか、原因遺伝子変異によって異なるかを検討した。

C. 研究結果

RP1、RP9、PRPH2 あるいは RHO 遺伝子のいずれかに変異をもつ網膜色素変性患者由来の iPS 細胞を各患者 30 ライン作製し、その中から外来遺伝子のコピー数が最も少ない 3 ラインずつを選択し検討した。

それぞれの iPS 細胞から約 4 ヶ月間かけて視細胞を誘導した。これらの視細胞は、ロドプシン遺伝子の発現や電気生理学的解析から、桿体細胞であることが確認された。原因遺伝子によって分化誘導 120 日目のロドプシン陽性細胞率が異なり、正常 iPS 細胞では 150 日目のロドプシン陽性細胞率は 120 日目と比べて変化しなかったものの、患者 iPS 細胞由来視細胞は 150 日目に大幅に減少した (図 1)。また、桿体細胞の変性機序は原因遺伝子によって異なっており、RP9 遺伝子に変異がある場合は DNA の酸化が、RHO 遺伝子に変異がある場合は小胞体へのストレスが、それぞれ変性の原因になっていることを示唆していた。

また、培地中に α トコフェロールを添加した場合、RP9 の遺伝子変異のみ細胞生存率が向上することが明らかになった。 α トコフェロールは他の変異をもつ細胞には効果がなく、また、アスコルビン酸、 β カロテンは、いずれの細胞にも効果を示さなかった。

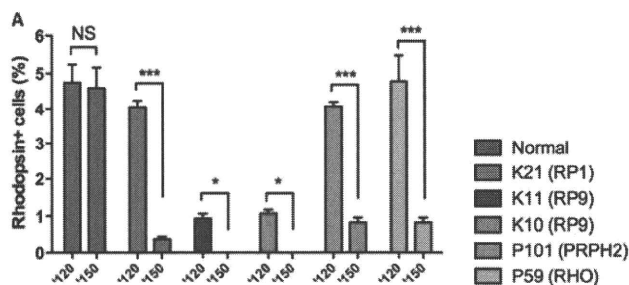


図 1 患者 iPS 細胞由来視細胞の割合と経時変化

D. 考察

患者由来 iPS 細胞から誘導した桿体細胞は培養過程で変性する傾向が見られ、同じ患者由来の iPS 細胞から誘導した錐体細胞や双極細胞ではそのような変性は見られなかった。また、各種ビタミンの視細胞抑制効果は、変異遺伝子によって異なった。この効果は過去に行われたアメリカの大規模スタディでは明らかになっていない効果であった。

E. 結論

今回の結果より、変異をもつ患者由来 iPS 細胞から誘導した桿体細胞だけが変性を起こすこと、また、それを抑制する薬剤の効果が原因遺伝子によって異なることを明らかになった。患者由来の iPS 細胞が個別化医療に有用である可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Jin ZB, Okamoto S, Osakada F, Homma K, Assawachananont J, Hiram Y, Iwata T, Takahashi M. Modeling Pathogenesis of Retinal Degeneration Using Patient-derived Induced Pluripotent Stem Cells. Plos One.2011;6(2):e17084

2. 学会発表

- ZB.Jin, S.Okamoto, M.Takahashi :Invitro Induction of Retinitis Pigmentosa-Specific Photoreceptor Cells From patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells ARVO Annual meeting,May 2-6 ,2010.Florida,USA

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