

パーキンソン病疾患 iPS 細胞の解析

研究分担者 高橋 淳（再生医科学研究所/iPS 細胞研究所 准教授）

研究要旨

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 iPS 細胞株を樹立する。

A. 研究目的

パーキンソン病は主に中脳黒質のドーパミン神経が減少する神経変性疾患であり、iPS 細胞は細胞移植治療の細胞源として注目されている。パーキンソン病患者本人由来の iPS 細胞を移植治療に用いることにより拒絶反応を回避できる可能性がある一方で、パーキンソン病患者由来 iPS から正常に機能するドーパミン神経が誘導できるかどうかは未知数である。本研究では、パーキンソン病患者由来 iPS 細胞を用いて、ドーパミン神経細胞を誘導し、*in vitro* 及び *in vivo* でその機能を検討することを目的とする。

B. 研究方法

孤発例パーキンソン病患者 15 名より皮膚線維芽細胞を採取、episomal vector を用いて 2 名より iPS 細胞株を樹立した。その 2 名からは末梢血も採取、血球細胞からも iPS 細胞を作製予定である。残りの 13 名からも順次 iPS 細胞を作製する。得られた iPS 細胞より、浮遊培養法によりドーパミン神経を誘導した。コントロールとして罹病歴のないヒト線維芽細胞由来 iPS 細胞を用い、ドーパミン神経誘導効率及び誘導さ

れた神経細胞の薬剤耐性を検討中である。また、誘導されたドーパミン神経をマウス・ラットの線条体に移植し、その生着と機能を解析する。

C. 研究結果

上記方法にもとづいて得られた一人のパーキンソン病患者由来 iPS 細胞 2 株について、*in vitro* で TH 陽性のドーパミン神経細胞が誘導できることを確認した。他の孤発例パーキンソン病患者由来 iPS 細胞や、遺伝性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞についても検討中である。

D. 考察

パーキンソン病患者由来 iPS 細胞から誘導したドーパミン神経細胞をラットに移植した報告はあるが、患者数は 5 名と少なく、長期間の評価はなされていない。また過去の報告は全て孤発例パーキンソン病患者のものである。細胞移植治療の実現に向けてさらに多くの患者由来 iPS 細胞の検討及び移植後の長期間の観察が必要である。

## E. 結論

弧発例パーキンソン病患者由来 iPS 細胞を樹立し、ドーパミン神経細胞を誘導した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 該当なし

### 2. 学会発表

- 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及び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, 2010. 3. 18-19, 広島.
- 菊地哲広、森実飛鳥、土井大輔、尾上浩隆、林 拓也、川崎俊之、高橋 淳:パーキンソン病モデルサルに対するヒト iPS 細胞由来ドーパミン神経移植;第25回神経組織の成長・再生・移植研究会, 2010. 5. 22, 大阪.
- 菊地哲広、森実飛鳥、土井大輔、尾上浩隆、林 拓也、川崎俊之、高橋 淳:パーキンソン病モデルサルに対するヒト iPS 細胞由来ドーパミン神経移植, 第4回パーキンソン病・運動障害疾患コングレス, 2010. 10. 7-9, 京都.
- 菊地哲広、森実飛鳥、土井大輔、尾上浩隆、林 拓也、川崎俊之、宮本 享、高橋 淳:パーキンソン病モデルサルに対するヒト iPS 細胞由来ドーパミン神経移植;社団法人日本脳神経外科学会第69回学術総会, 2010. 10. 27-29, 福岡.
- Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Saiki H, Takahashi J.: Transplantation of human iPS derived dopaminergic neurons to a primate model for Parkinson disease; Neuroscience 2010 (Society for Neuroscience) ,2010.11.15, San Diego.

## 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、FOP3 例、骨形成不全症 1 例の iPS 細胞を作製した。in vitro の骨分化誘導に関しては、胚様体を經由する方法と經由しない方法で比較検討した。骨分化及び靭帯・腱分化細胞を早期に検出するために、それぞれの系統特異的なマーカー遺伝子を導入した iPS 細胞を作成した。FOP 由来 iPS 細胞に関しては、相同組換えによる変異修正細胞の樹立を試みた。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

いくつかの分化誘導法を検討した結果、疾患由来 iPS 細胞と健常者由来 iPS 細胞の分化能の比較のため

に、それぞれの病態に適した方法を用いることが重要であることが判明した。そのため各分化段階を示すマーカー遺伝子を導入した複数の細胞株を樹立することが必要であると考えられ、計画を進めている。また FOP の場合、極めて稀な疾患であるため、海外から細胞を入手し、匿名性が維持できるよう配慮した。

## 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、病態に適した分化誘導法を確立した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Jin Y, Kato T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H, Ueda M, Aoyama T, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J.: Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 15; 391(3): 1471-6.
- Aoyama T, Okamoto T, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Ito K, Jin Y, Ueda M, Nagayama S, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J. Histone modifiers, YY1 and p300, regulate the expression of cartilage-specific gene, chondromodulin-I, in mesenchymal stem cells. *J Biol Chem.* 2010 Sep 24; 285(39): 29842-50.
- Nishigaki T, Teramura Y, Nasu A, Takada K, Toguchida J, Iwata H. Highly efficient cryopreservation of human induced pluripotent stem cells using a dimethyl sulfoxide-free solution. *Int J Dev Biol.* in press.

### 2. 学会発表

- Nasu, A., Kato, T., Tamaki, S., Hayakawa, K., Mitsui,

H., Sato, S., Kobayashi, K., Aoyama, T., Takahashi, K., Yamanaka, S., Toguchida, J.: Comparison of human iPSCs generated with cells derived from a single donor but from different tissue origins. 8th ISSCR, June 17, 2010. San Francisco, CA, USA.

- 三井裕人、青山朋樹、布留守敏、伊藤錦哉、笠原崇、早川和男、小林恭介、丸山隆幸、金治敏也、藤村心成、杉原光、大塚隆信、中村孝志、戸口田淳也：ウサギ変形性膝関節症モデルを用いたプロスタグランジン E2 受容体特異的作動薬の検証；第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、2010 年 10 月 14 日、京都。
- 青山朋樹、中村孝志、前川平、戸口田淳也：間葉系幹細胞を用いた骨壊死治療；第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、2010 年 10 月 14 日、京都。
- 青山朋樹、中村孝志、前川平、戸口田淳也：間葉系幹細胞を用いた骨壊死治療；第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、2010 年 10 月 14 日、京都。
- Nasu, A., Kato, T., Yamamoto, T., Nakamura, T., Toguchida, J.: Comparison of human iPSCs generated from different tissues of identical donors. 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 10 日、神戸。

## 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

パーキンソン病関連特異的 iPS 細胞作製と解析

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

遺伝性パーキンソン病患者由来の iPS 細胞よりドーパミン神経マーカー陽性細胞を得た。

孤発性パーキンソン病患者由来の iPS 細胞を樹立した。

A. 研究目的

本研究の目的は、パーキンソン病（PD）患者由来の iPS 細胞およびそれを分化誘導した細胞を疾患モデルとして樹立し、PD の病態解明と新規創薬に役立てることである。PD は黒質線条体のドーパミン神経細胞死により進行性の運動機能障害を来す神経変性疾患で、65 歳以上の有病率は約 1%にのぼる。診断は臨床症状・画像検査・ドーパミン補充療法への反応を複合的に考慮して行われるが、非典型例での診断には苦慮することも多い。運動症状発症に先立って既にドーパミン神経細胞死が起きていることが知られているが、現状では早期診断は困難である。また疾患の進行を抑制する治療薬がなく、徐々にドーパミン補充療法の効果が不安定になる患者が多い。病態解明のためには疾患モデルが有用であるが、これまで作成された種々の PD モデルは疾患を再現できていない。これらの課題をふまえて、PD の早期診断および進行抑制のための新規創薬に寄与する PD 特異的 iPS 細胞および iPS 細胞由来神経細胞を樹立することが本年の目的である。

B. 研究方法

外因性初期化誘導遺伝子のサイレンシングは RT-PCR 法により確認した。ドーパミン神経への分化誘導には Serum- free floating culture of embryoid body-

like aggregates (SFEBq) 法を用いた。未分化マーカーである Oct4、Nanog、SSEA-3、SSEA-4、TRA1-60、TRA1-81、TRA2-49 およびドーパミン神経マーカーである TH の発現は免疫蛍光染色を用いて確認した。（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

1) 我々が既に樹立した I2020T 変異型 LRRK2 を有する遺伝性 PD 患者由来 iPS 細胞候補クローンのうち 2 クローンにおいて、外因性初期化誘導遺伝子がサイレンシングされていることを確認した。これらのクローンは各種未分化マーカーを発現し、また三胚葉への分化能を持ち、iPS 細胞であることを確認した。この iPS 細胞は患者由来の I2020T 変異を持ち、かつ、正常核型が維持されていた。さらにこの iPS 細胞をドーパミン神経へ分化誘導し、一部の細胞が TH 陽

性となったことを確認した。

2) 2名の孤発性PD患者皮膚線維芽細胞よりiPS細胞の候補クローンを樹立した。

3) 1名のPINK1変異を有する遺伝性PD患者皮膚線維芽細胞よりiPS細胞樹立を開始した。

4) 1名の孤発性PD患者より皮膚線維芽細胞を樹立した。

#### D. 考察

SFEBq法によりTH陽性細胞を得たが、ドーパミン神経として典型的な染色パターンではなかった。また継代が最終分化段階まで継続できなかった。従って次年度は分化誘導方法の改善が必要である。また他の遺伝性PD患者皮膚線維芽細胞よりiPS細胞を樹立し、表現型解析を進める予定である。

#### E. 結論

遺伝性PD患者由来のiPS細胞よりドーパミン神経マーカー陽性細胞を得た。また孤発性PD患者由来のiPS細胞を樹立した。今後、分化誘導の方法を改良し、その表現型を解析することにより、PDの病態解明や新規創薬への応用が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

● Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, Takahashi R, Misawa H, Kwak S. (2010) Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci*, 30:11917-25.

● Murakami G, Inoue H, Tsukita K, Asai Y, Amagai Y, Aiba K, Shimogawa H, Uesugi M, Nakatsuji N, Takahashi R (2011) Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates SOD1 transcription for drugs to treat ALS, *J Biomol Screen* in press

● Egawa N, Yamamoto K, Inoue H, Hikawa R, Nishi K, Mori K, Takahashi R. (2010) The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6{alpha}, protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death.

*J Biol Chem*, in press

##### 2. 学会発表

● Komatsu K, Inoue H, Kondo T, Kitaoka S, Ichisaka T, Takahashi K, Yamanaka S, Takahashi R: Establishment of iPS cells from amyotrophic lateral sclerosis model mice. The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan (2010.9.2)

● Kondo T, Inoue H, Egawa N, Yoshikawa K, Yamawaki S, Naitoh M, Suzuki S, Takahashi K, Hasegawa K, Nakahata T, Yamanaka S, Takahashi R: Generation of disease-specific induced pluripotent stem cells from hereditary Parkinson's disease. The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan (2010.9.3)

● Yahata N, Inoue H, Kitaoka S, Tsukita K, Kondo T, Egawa N, Asaka I, Takahashi K, Nakahata T, Kawakatsu S, Takahashi R, Asada T, Yamanaka S: Generation of disease-specific induced pluripotent stem cells from Alzheimer's disease patients. The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA(2010.11.14)

● Kitaoka S, Inoue H, Tsukita K, Kawada M, Naitoh M, Takahashi K, Yoshikawa K, Kondo T, Yamawaki S, Watanabe D, Suzuki S, Takahashi R, Yamanaka S: Analysis of motor neurons derived from induced pluripotent stem cells from ALS patients. The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA(2010.11.17)

#### 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

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

研究分担者 井上治久

（京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 准教授）

研究要旨

成人期および小児期発症脊髄性筋萎縮症患者皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞を樹立した。

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由来 iPS 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。

A. 研究目的

iPS 細胞を用いた疾患の病態解析については、従来では *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き (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。また、NOG マウスを応用して *in vivo* 解析を行い、病態を明らかにする。

B. 研究方法

成人期および小児期発症脊髄性筋萎縮症患者皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞から、脊髄運動ニューロンを分化誘導し、マイクロアレイ等により、遺伝子発現の比較等を行い、脊髄性筋萎縮症の発症時期に対する modifier 分子の同定を試みる (*aging subtraction*)。

緩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入手できた場合は、それぞれ脊髄運動ニューロンを分化誘導し、同様に *aging subtraction* を行う。

（倫理面への配慮）

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。また、組み換え DNA 実験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い、ヒト ES 細胞の取扱いは、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

成人期および小児期発症脊髄性筋萎縮症患者皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞を樹立した。

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由来 iPS 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。

#### D. 考察

ヒト、マウスアストロサイト両者の解析において共通に変動する遺伝子を同定した遺伝子は孤発性 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。

#### E. 結論

今後、成人期および小児期発症脊髄性筋萎縮症、徐進行型と通常の急速進行型の SOD1 変異 ALS において、aging subtraction による解析をすすめる予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Inoue H.: Neurodegenerative disease-specific induced pluripotent stem cell research. *Experimental Cell Research*. 2010 Oct; 316(16): 2560-2564.
- 井上治久: iPS 細胞作製技術を用いた ALS 治療法開発; 日本 ALS 協会会報, 2011 年 1 月; 82 : 7-9.
- 八幡直樹、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; 日本生物学的精神医学会誌, [In press].

##### 2. 学会発表

- Kitaka, S., Inoue, H., Tsukita, K., Kawada, M., Naith, M., Takahashi, K., Yoshikawa, K., Kondo, T., Yamawaki, S., Watanabe, D., Suzuki, S., Nakahata, T., Takahashi, R., Yamanaka, S.: Differentiation of induced pluripotent stem cells from ALS patients generates motor neurons: The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, September 2, 2010. Kobe, Japan
- Komatsu, K., Inoue, H., Kondo, T., Kitaoka, S., Ichisaka, T., Takahashi, K., Yamanaka, S., Takahashi, R.: Establishment of iPS cells from amyotrophic lateral sclerosis model mice: The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, September 2, 2010. Kobe, Japan
- Inoue, H.: Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research: Kick off symposium Science Research on Innovative Area "Foundation of Synapse and Neurocircuit Pathology.", October 27, 2010. Tokyo, Japan.
- Kitaoka, S., Inoue, H., Tsukita, K., Kawada, M., Naitoh, M., Takahashi, K., Yoshikawa, K., Kondo, T., Yamawaki, S., Watanabe, D., Suzuki, S., Takahashi, R., Yamanaka, S.: Analysis of motor neurons derived from induced pluripotent stem cells from ALS patients: The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November 17, 2010. San Diego, USA.
- Inoue, H.: iPSC Cell Banking facilitating Disease-specific iPSC research: CIRM iPSC Cell Banking Workshop, November 17, 2010. San Francisco, USA.
- Inoue, H.: iPSC Cell Technology and Motor Neuron Disease: International Symposium on Motor Neuron Disease and Perry Syndrome in Tokyo, February 22, 2011. Tokyo, Japan.
- 井上治久: iPS 細胞作製技術を用いた神経変性疾



患の研究；第3回 iPS 細胞産学合同研究会，2010年4月12日，京都。

- 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；梅田神経懇話会，2010年10月4月28日，大阪。
- 北岡志保、井上治久、月田香代子、川田三代、高橋和利、近藤孝之、吉川勝宇、山脇聖子、内藤素子、鈴木茂彦、伊藤秀文、和泉唯信、森田光哉、中野今治、川田明広、中畑龍俊、高橋良輔、山中伸弥：変異 SOD1 を有する ALS 患者由来 iPS 細胞の樹立と脊髄運動ニューロンへの分化；第51回日本神経学会総会，2010年5月21日，東京。
- 井上治久：iPS 細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究；第1回 ALS フォーラム，2010年8月28日，東京。
- 成田年、永井拓、橋本恵理、今井哲司、井上治久、岡野ジェイムス洋尚、池田和隆：次世代の精神薬理の研究手法 Research approaches for the new strategy of psychopharmacology；第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会合同年会，スタディグループ6，2010年9月16日，仙台。
- 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；第32回日本生物学的精神医学会，2010年10月8日，福岡。
- 井上治久：変性疾患モデルとしての iPS 細胞；第29回日本認知症学会学術集会，シンポジウム3「神経変性症としての前頭側頭葉変性症：症候から分子病態解明の新展開まで」，2010年11月5日，愛知。
- 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，第26回 Wako ワークショップ，2010年11月26日，東京。
- 井上治久：iPS 細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究，鳥取医療センター，2010年12月8日，鳥取。
- 井上治久：iPS 細胞作製技術を用いた神経変性疾

患の研究；第2回関西北陸神経免疫研究会，2011年1月22日，京都。

- 井上治久：iPS 細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究；札幌神経再生医療研究会，2011年2月8日，札幌。

#### 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 iPS 細胞研究所 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。本研究では、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、患者個人情報の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

7名の常染色体優性多発性嚢胞腎患者から iPS 細胞株を樹立した。そして、樹立された 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、1 例から iPS 細胞を樹立した。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。

#### D. 考察

「多発性嚢胞腎」特異的 iPS 細胞の血管分化系で同定された遺伝子は、同疾患のモデルマウス (Pkd1+/-マウス) の血管細胞においても同様の発現パターンを示すことを確認した。よって、この疾患特異的 iPS 細胞の分化系は、同疾患の血管合併症を模倣するモデルとして使用することが可能であると考えられる。また、同定された遺伝子は、バイオマーカーや治療標的分子として今後使用できる可能性が考えられる。

顕微鏡的多発血管炎の患者体細胞から、レトロウイルスベクターを用いた初期化因子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、試験管内で同疾患の罹患臓器である血管細胞へ分化可能であり、疾患モデル作製に使用可能であると考えられる。

#### E. 結論

「多発性嚢胞腎」特異的 iPS 細胞の血管細胞への分化系を用いて病態関連分子、バイオマーカーの探索が可能である。「顕微鏡的多発血管炎」特異的 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

- Osafune, K.: *In vitro* regeneration of kidney from pluripotent stem cells. *Exp.Cell Res.*, 2010, Oct 1; 316(16): 2571-7.

- Osafune, K. and Yamanaka, S. Stem cells in regenerative processes; Induced pluripotent stem cells. *Regenerative Nephrology* (Elsevier), 2010, pp203-15.

- 長船 健二: iPS細胞技術を用いた腎臓再生医療の開発;腎と透析 (東京医学社) 69 (3): 368-73, 2010.

- 長船 健二: 幹細胞から腎臓への分化誘導; *Annual Review 腎臓*2011 (中外医学社) 67-73, 2011.

#### 2. 学会発表

- 長船 健二、塩田 文彦、近藤 尚哉、新井 沙弥香、高橋 和利、浅香 勲、山田泰広、中畑 龍俊、武曾 恵理、深津 敦司、山中 伸弥: 「多発性嚢胞腎」特異的 iPS 細胞の樹立と病態解析研究; 第53回日本腎臓学会学術総会, 2010年6月17日, 神戸.

- 長船 健二: 幹細胞から腎臓への分化の戦略; 第53回日本腎臓学会学術総会, 2010年6月16日, 神戸.

- 長船 健二: iPS細胞技術を用いた腎臓再生医療の開発; 第40回日本心臓血管作動物質学会, 2011年2月5日, 高松.

- 曾根 正勝、田浦 大輔、長船 健二、小嶋 勝利、山中 伸弥、中尾 一和: ヒトiPS/ESからの血管構成細胞分化誘導・単離技術の確立と疾患iPS研究への応用; 第10回日本再生医療学会総会, 2011年3月2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

- 多発性嚢胞腎の検査方法および治療剤のスクリーニング方法、米国仮出願日2010年11月5日、米国仮出願番号61/410,757

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

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

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。

A. 研究目的

疾患研究において患者由来検体には、大きな制限がある。神経系組織は採取自体が困難であり、筋・骨等は物理的には採取可能であるものの、患者の負担が大きい。また血液等採取が比較的容易な組織でも、頻回の採血は許容できる範囲を超える。一方、患者は何らかの治療を受けている場合が多く、患者検体においては治療の影響も排除できない。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、上記の問題が解決でき、真に有効な疾患研究の遂行が可能となる。本研究では、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た。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を新たに樹立した (Morishima et al J Cell Physiol.

2011)。しかし共培養系であること、血清を使用すること、分化効率が悪い等の問題があり、Feeder 細胞や血清を使用しない新たな好中球分化系を開発した。本法では未分化ヒト iPS 細胞を、マトリゲル®上で BMP4、VEGF、SCF、TPO、IL-3、G-CSF などと共に培養することで、好中球へと分化させた。さらに、先天性好中球不全症である HAX1 遺伝子異常症の患者より iPS 細胞を樹立を試みた。

また、我々の研究室では過去にマウス ES および iPS 細胞から胚様体法によって効率的な骨格筋細胞誘導法を確立したが、今回それらの方法を応用し、ヒト ES および iPS 細胞から *in vitro* で骨格筋細胞を誘導する系を確立した。本法では未分化ヒト ES および iPS 細胞を細胞塊として浮遊培養して胚様体を形成した後、無血清培地と血清含有培地での培養を組み合わせることで、骨格筋細胞を誘導する。また遺伝性筋疾患として最も患者数の多いデュシャン型筋ジストロフィー (DMD) の患者より iPS 細胞を樹立した。

C. 研究結果

新たな好中球分化系では、培養開始約 25 日目には、従来の OP9 細胞を用いた方法と比較し 10 倍以上の数の好中球を得ることができた。さらに、HAX1 遺伝子異常症の患者細胞由来の iPS 細胞を樹立し、現在この疾患特異的 iPS 細胞を好中球に分化させる実験が進行中である。

また、ヒト ES 細胞や iPS 細胞から *in vitro* で骨格筋細胞を誘導に成功した。国際的にもヒト iPS 細胞からの骨格筋分化の報告は未だなされておらず、iPS 細胞を用いた骨格筋研究における大きな一歩である。これらの細胞は *in vitro* で段階的に骨格筋マーカーを発現するのみならず、現在進行中の実験では *in vivo* での骨格筋再生能を有することが観察されており、今後の骨格筋再生医療に大きな期待が持てる結果である。さらに、DMD 患者由来 iPS 細胞を樹立し、現在その万能性や複製能について検証を行っている。

#### D. 考察

今回、好中球分化誘導系として確立した方法は、簡便で短時間に効率よく成熟好中球を得ることができ、複数クローンを扱う必要がある疾患特異的 iPS 細胞を用いた疾患解析には非常に有用である。

骨格筋分化誘導においては新たにヒト ES および iPS 細胞の *in vitro* での分化誘導法を確立し、疾患研究および再生医療への基盤研究を進める上で重要な進捗となった。今後はそれらの方法を用いて DMD 患者由来 iPS 細胞との比較検討や、移植可能な骨格筋幹/前駆細胞の単離などの研究を進めてゆく必要がある。

#### E. 結論

今回我々はより簡便で効率的なヒト iPS 細胞からの好中球分化系を確立した。先天性好中球減少症患者由来 iPS 細胞を樹立し、病態解明のための材料が揃ったと考えられる。骨格筋研究においてはヒト iPS 細胞からはじめて骨格筋分化誘導に成功した。これらの技術の応用により、今後の筋疾患研究及び再生

医療に向けて大きな進歩が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

● Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Fujino H, Matsubara H, Adachi S, Suemori H, Nakahata T, Heike T.; Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *J Cell Physiol.* 2011 May;226(5):1283-1291.

##### 2. 学会発表

● Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Fujino H, Adachi S, Nakahata T, Heike T.: Neutrophil differentiation from human induced pluripotent stem (iPS) cells for disease investigation: Poster Session, WED/THU #V 15: International Society for Stem Cell Research 8th Annual Meeting, June 16-19, 2010. San Francisco, California, USA

● 栗屋智就、加藤竹雄、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 22 年度精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(武田班) 班会議，2010 年 12 月 13～14 日，東京

● 平家俊男：筋ジストロフィーに対する治療研究の進歩「iPS 細胞を用いた筋ジストロフィーの再生移植治療」；平成 22 年度精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー研究」合同班会議

#### 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㈱医薬研究本部開拓研究所 主席研究員）

研究要旨

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 細胞を京都大学 iPS 細胞研究所より導入し、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。

A. 研究目的

難治性疾患の疾患特異的 iPS 細胞およびその分化細胞を用いて、タンパク質の発現プロファイルを解析する。変動タンパク質の中から疾患の病態に関連するタンパク質を同定し、創薬ターゲットとしての可能性を検証するとともに、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

ALS 患者由来の iPS 細胞（A20415 株）および健康人由来の iPS 細胞（253G1 株）を用い、それぞれから総タンパク質、ミトコンドリアタンパク質を調製し、発現タンパク質の差異を 2D-DIGE システムにより解析した。ミトコンドリア画分の精製は Mitochondria Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec 社製)を使用した。

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

総タンパク質の発現を 2D-DIGE システムにより網羅的に解析した結果、正常 iPS 細胞に比較して ALS 患者由来 iPS 細胞において発現が上昇するタンパク質は 4 種、発現が減少するタンパク質は 6 種であった。また、ミトコンドリア画分のタンパク質の発現を同様に解析した結果、正常 iPS 細胞に比較して ALS 患者由来 iPS 細胞において発現が上昇するタンパク質は 26 種、発現が減少するタンパク質は 19 種であった。これら変動タンパク質について MAS による同定を行なった。確認された発現変動タンパク質について、病態とのかかわりを検討中。

D. 考察

ALS 患者由来 iPS 細胞における発現変動タンパク質について検証実験を進めるとともに、疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した運動神経について同様の解析を実施する必要がある。

E. 結論

ALS 患者由来 iPS 細胞についてタンパク質発現プロファイル解析を実施し、発現が変動するタンパク質を確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- 安達啓子、中村恒史、浅見麻乃、岡田洋平、岡野栄之、中西 淳：iPS 細胞由来ヒト神経細胞を用いた創薬評価系の構築；第 33 回日本神経科学会、第 53 回日本神経化学会、第 20 回日本神経回路学会 の合同大会, 2010 年 9 月 2 日～4 日, 神戸.

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 (iPS 細胞研究所 講師)

研究要旨

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。

A. 研究目的

これまでに多くの健常人由来または疾患特異的 iPS 細胞が樹立され解析に用いられている。しかし、いったいどのような株を用いればよいのかを判定する明確な基準は存在しない。そこで、本研究では疾患特異的 iPS 細胞の標準化を目的としている。

B. 研究方法

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、それらの株について、マイクロアレイによる遺伝子、マイクロ RNA の発現解析、さらに Infinium を用いた DNA メチル化解析を行った。

C. 研究結果

神経細胞への分化誘導実験の結果から 50 クローン中 4 クローンの iPS 細胞が分化抵抗性を示すことがわかった。実際これらの細胞を免疫不全マウスに移植することで腫瘍が形成されることも確認された。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。

D. 考察

過去のマウス iPS 細胞の結果と比較して、ヒト iPS 細胞中に含まれる分化抵抗性クローンの頻度は低いことがわかった。しかし、ES 細胞で見られない現象が iPS 細胞において観察されたのも事実である。また本研究では、正常細胞と分化抵抗性細胞の間で異なった発現を示す遺伝子を同定した。今後これらの遺伝子が細胞分化に与える影響と、マーカーとしての有用性を確認する予定である。

E. 結論

これまでに報告の無い規模で、ヒト ES 細胞と iPS 細胞の分化能及び遺伝子発現を詳細に直接比較した。ES 細胞と iPS 細胞を明確に区別する違いは見出されなかった。一方で、分化誘導に対して抵抗性を示す細胞と正常に分化する細胞群の間では異なった遺伝子発現が見出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

● Fujiwara, M., Yan, P., Otsuji, T.G., Narazaki, G.,



- Uosaki, H., Fukushima, H., Kuwahara, K., Harada, M., Matsuda, H., Matsuoka, S., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., Ikeda, T., Sakata, R., Mummery, C.L., Nakatsuji, N., Yamanaka, S., Nakao, K., and Yamashita, J.K. Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-a. *PLoS ONE* **6(2)**: e16734, 2011.
- Takayama, N., Nishimura, S., Nakamura, S., Shimizu, T., Ohnishi, R., Endo, H., Yamaguchi, T., Otsu, M., Nishimura, K., Nakanishi, M., Sawaguchi, A., Nagai, R., Takahashi, K., Yamanaka, S., Nakauchi, H., and Eto, K. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med* **20(207)**:2817-2830, 2010.
  - Homma, K., Sone, M., Taura, D., Yamahara, K., Suzuki, Y., Takahashi, K., Sonoyama, T., Inuzuka, M., Fukunaga, Y., Tamura, N., Itoh, H., Yamanaka, S., and Nakao, K. Sirt1 plays an important role in mediating greater functionality of human ES/iPS-derived vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* **212(1)**: 42-47, 2010.
  - Tamaoki, N., Takahashi, K., Tanaka, T., Ichisaka, T., Aoki, H., Takeda-Kawaguchi, T., Iida, K., Kunisada, T., Shibata, T., Yamanaka, S., and Tezuka, K. Dental Pulp Cells for Induced Pluripotent Stem Cell Banking. *J Dent Res* **89(8)**:773-778, 2010.
  - Takahashi, K.: Evaluation of human induced pluripotent stem cells. Royal Society Discussion Meeting (2010.10.18 ロンドン)
  - 高橋和利:iPS細胞の安全性に対する取り組み 第7回自治医科大学国際シンポジウム (2010.10.8 栃木)
  - 高橋和利:iPS細胞の安全性に対する取り組み 第40回(社)日本口腔インプラント学会・学術大会 (2010.9.18 北海道)
  - 高橋和利: Simple test for evaluation the safeness of human induced Pluripotent Stem cells. GSC セタミーティング (2010.7.15 横浜)
  - 高橋和利: ヒト iPS 細胞のこれまでとこれから 金沢大学十全医学会学術総会・学術集会 (2010.7.9 石川)
  - 高橋和利: Nuclear reprogramming: From germline to cloned animals. 第43回日本発生生物学学会年会 (2010.6.22 京都)
  - 高橋和利:iPS細胞の安全性に対する取り組み 日本エピジェネティクス研究会第4回大会 (2010.5.29 鳥取)
  - 高橋和利: Simple test for evaluation the safeness of human induced Pluripotent Stem cells. 第51回日本神経学会総会 (2010.5.22 東京)
  - Takahashi, K., Yokura, M., Okada, A., Ichisaka, T., Yamanaka, S. : SIMPLE TEST FOR EVALUATION THE SAFENESS OF HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS. ISSCR 8<sup>th</sup> Annual Meeting (2010.6.17 アメリカ)

## 2. 学会発表

- Takahashi, K.: Evaluating the safety of human induced pluripotent stem cells. AACR Special Conference on Stem Cells, Development, and Cancer (2011.3.4-6 カナダ)
- 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

研究分担者 浅香 勲（京都大学 iPS 細胞研究所 特定准教授）

研究要旨

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、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～十数クローンずつ樹立した。

A. 研究目的

本研究は、難治性疾患の病因、病態の解明、新たな治療法の開発に供する疾患特異的 iPS 細胞を作成するため、難治性疾患患者の組織より線維芽細胞を樹立して感染試験等の品質確認を行った後凍結保存し、難治性疾患の線維芽細胞株を収集するとともに、当該疾患特異的 iPS 細胞が樹立された後、長期間比較解析を可能とするための保管管理システムを確立することを目的としており、これ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

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、10%の FBS を添加した DMEM 培地を用いたアウトグロース法により線維芽細胞を作成し、難治性疾患患者の線維芽細胞株を収集した。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、生存率を安定に維持するため、完全気相型液体窒素タンクに保管した。

他の分担研究者と共同して、樹立された一部の難治性疾患患者由来の線維芽細胞材料として、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、iPS 細胞株の樹立を実施した。

（倫理面への配慮）

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、個人情報の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、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。本研究においては、その内容を忠実に順守して行う。

## C. 研究結果

前年度から収集を続けている脊髄性進行性筋委縮症、筋委縮性側索硬化症、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、多発性嚢胞腎等に加えて、遺伝性 QT 延長症候群、ミトコンドリア病、進行性骨化性線維異形成症、中条—西村症候群、高安動脈炎、突発性難聴等の 9 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。

## D. 考察

本年度樹立した患者由来の線維芽細胞株においてはいずれもマイコプラズマ感染は確認されず、他の微生物の発生も見られなかった。また、一部の線維芽細胞株から iPS 細胞も樹立できていることから、皮膚の採取方法および線維芽細胞株の樹立方法は、アウトグロース法で問題ないと考えられる。

## E. 結論

難治性疾患克服研究事業の対象となる疾患のうち、新たな患者 80 例以上から線維芽細胞株を樹立した。疾患特異的 iPS 細胞のソースとして確保した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

- 八幡直樹、井上治久、北岡志保、月田香代子、近藤孝之、江川斉宏、浅香勲、高橋和利、中畑龍俊、

川勝忍、高橋良輔、朝田隆、山中伸弥：若年性アルツハイマー病患者由来 iPS 細胞の樹立・解析；第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月 22 日、東京

- 長船健二、塩田 文彦、近藤 尚哉、新井 沙弥香、高橋 和利、浅香 勲、山田泰広、中畑 龍俊、武曾 恵理、深津 敦司、山中 伸弥：「多発性嚢胞腎」特異的 iPS 細胞の樹立と病態解析研究；第 53 回日本腎臓学会学術総会、2010 年 6 月 17 日、神戸

- Yahata, N., Inoue, H., Kitaoka, S., Tsukita, K., Kondo, T., Naohiro, E., Asaka, I., Takahashi, K., Nakahata, T., Kawakatsu, S., Takahashi, R., Asada, T., Yamanaka, S. : Generation of disease-specific induced pluripotent stem cells from Alzheimer's disease patients. The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, September 3, 2010. Kobe, Japan

- 浅香 勲：再生医療への応用が期待されているヒト iPS 細胞の樹立と維持・管理の実際；ワークショップ「眼科感覚器領域の再生医療研究における基礎と臨床の最先端」第 42 回日本臨床分子形態学会、2010 年 9 月 25 日、三島

- Yahata, N., Inoue, H., Kitaoka, S., Tsukita, K., Kondo, T., Egawa, N., Asaka, I., Takahashi, K., Nakahata, T., Kawakatsu, S., Takahashi, R., Asada, T., Yamanaka, S. : Generation of disease-specific induced pluripotent stem cells from Alzheimer's disease patients. The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November 14, 2010. San Diego, 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

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）

研究分担者 三嶋理晃（医学研究科呼吸器内科学 教授）

## 研究要旨

若年性肺気腫、特発性肺線維症、肺リンパ脈管筋腫症、原発性肺高血圧症など難治性呼吸器疾患の病態解明と新規治療法の開発を目的とし、呼吸器疾患 iPS をバンク化し、疾患 iPS 由来の肺細胞が、疾患特有のフェノタイプを呈しうるかを検討する。

これまでに 35 症例より検体を採取し、うち 5 例の疾患 iPS 細胞を樹立した。またマウス及びヒト iPS 細胞から気道及び肺胞上皮細胞への分化法を検討した。

### A. 研究目的

疾患 iPS 細胞を用い、若年性肺気腫、特発性肺線維症、肺リンパ脈管筋腫症、原発性肺高血圧症など難治性呼吸器疾患の病態解明と新規治療法の開発を行う。その実現のために、

- (1) 難治性呼吸器疾患症例由来の iPS 細胞をバンク化し、
- (2) 疾患由来 iPS 細胞から分化した肺細胞が、疾患としてのフェノタイプを呈しうるかを検討する。

### B. 研究方法

(1) 京大病院受診中の特発性肺線維症等の症例において、同意取得の上、外科的肺生検若しくは肺切除の際に、皮膚及び肺組織の検体を採取し、線維芽細胞を培養～保存、iPS 化を行った。リンパ脈管筋腫症(LAM)、Birt-Hogg-Dube 症候群など、当院での患者集積が少ない疾患に関しては、適宜他院との連携の上検体採取の準備を行う。

(2) 非疾患の iPS 細胞を用い、肺細胞、特に肺胞上皮細胞への分化誘導法を検討する。分化誘導法が

確立した時点で、疾患 iPS 細胞から肺細胞を分化誘導し、非疾患群との細胞フェノタイプの比較検討を行う。

（倫理面への配慮）

本検討は、京都大学医学部医の倫理委員会で承認された「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」および「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」の一環として、その内容を忠実に遵守して行う。またヒト ES 細胞で規定された使用に関する規則を遵守して行う。

### C. 研究結果

(1) 本年度までに、間質性肺疾患 25 症例（うち LAM 1 例）、肺癌 10 症例（うち COPD 合併 2 例、気管支喘息合併 2 例）より同意を得て、肺及び皮膚検体を採取、線維芽細胞株を樹立～凍結保存した。そのうち間質性肺炎 3 例、肺癌 2 例において iPS 細胞株を樹立（いずれも肺及び皮膚の 2 検体より）した。