

201128003A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

難治性疾患由来外来因子フリー人工多能性  
幹細胞の委託作製とバンク化に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 江良 択実

平成24(2012)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

難治性疾患由来外来因子フリー人工多能性  
幹細胞の委託作製とバンク化に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 江良 択実

平成24(2012)年 3月



## 目 次

I. 平成 23 年度研究班名簿	-----3
II. 総括研究報告	
難治性疾患由来外来因子フリー人工多能性幹細胞の委託作製と バンク化に関する研究	-----4
江良 択実	
III. 分担研究報告	
1. 難治性疾患患者皮膚からの皮膚線維芽細胞樹立に関する研究	-----12
尹 浩信	
2. 遺伝子挿入のない iPS 細胞を用いた分化誘導法の 開発に関する研究	-----15
西中村 隆一	
3. センダイウイルスベクターを用いた遺伝子挿入のない疾患由来 iPS細胞株の樹立に関する研究	-----19
房木 ノエミ	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----24
V. 研究成果の刊行物・別刷	-----25

平成 23 年度 厚生労働省難治性疾患克服研究事業  
 難治性疾患由来外来因子フリー人工多能性幹細胞の委託作製とバンク化 研究班

	氏名	所属等	職名
研究代表者	江良 択実	熊本大学 発生医学研究所 幹細胞誘導分野	教授
研究分担者	尹 浩信	熊本大学大学院生命科学研究部 皮膚病態治療再建学	教授
	西中村 隆一	熊本大学 発生医学研究所 腎臓発生分野	教授
	房木 ノエミ	ディナベック株式会社 事業開発本部 技術部 技術開発室	細胞工学グループ リーダー リーダー
研究協力者	小椋 光	熊本大学 発生医学研究所 分子細胞制御分野	教授
	神人 正寿	熊本大学大学院生命科学研究部 皮膚病態治療再建学	講師

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括 研究報告書

## 難治性疾患由来外来因子フリー人工多能性幹細胞の委託作製と バンク化に関する研究

研究代表者 江良 択実 熊本大学発生医学研究所 教授

### 研究要旨

希少性が高く有限である難治性疾患の生体試料を有効利用するために、難治性疾患由来人工多能性幹細胞(iPS 細胞)の医師や研究者からの委託作製と、作製した iPS 細胞のバンク化システムの構築が研究目的である。平成 23 年度は、1) 線維芽細胞を 65 症例（合計 244 症例）、iPS 細胞を 40 症例(合計 70 症例)から樹立し、依頼医師に提供した。2)バンク登録を 29 症例（86 株、合計 32 症例、94 株）について行なった。3) 血液細胞からの iPS 細胞樹立方法を確立し、血液疾患の標的血液細胞から iPS 細胞を作製した。また血液細胞由来 iPS 細胞の起源細胞の解析を行い、T リンパ球由来 iPS 細胞とそうでない iPS 細胞があることが明らかとなった。4) 成果発表を兼ねた市民と研究者への公開シンポジウムを東京にて開催した。5) 共同研究を推進し、新たに 4 つの研究（計 9 件）において共同研究を開始した。以上のように、当初の目標を大きく上回る線維芽細胞の樹立と iPS 細胞樹立を行うことができた。さらに血液細胞からの樹立方法を確立したことは、難治性血液疾患からの作製を可能にしたばかりか、皮膚生検が困難である小児からの樹立をも可能にした進歩と考えている。バンクに登録した iPS 細胞については、体制が整いしだい供給を開始する。その場合、使用機関での倫理審査の承認があることが供給の前提となる。

### 研究分担者

尹 浩信  
熊本大学大学院生命科学研究部  
皮膚病態治療再建学 教授  
西中村 隆一  
熊本大学 発生医学研究所  
腎臓発生分野 教授  
房木 ノエミ  
ディナベック株式会社  
事業開発本部 技術部 技術開発室  
細胞工学グループリーダー

### A. 研究目的

症例数が限られる難治性疾患の生体試料は、希少性が高いために、公平性を確保した提供体制が必要とされる。しかし、仮に公平性を持つ提供システムを構築したとしても、生体試料そのものは有限であり、多くの研究者に対して要求に応じて幅広く供給することは困難な部分が多い。さらに、同一患者から何度もサンプルを採取することは、患者の精神的・肉体的苦痛を招く行為であり避けるべきで

ある。そこで、以上の問題点を克服するために、難治性疾患の生体試料から人工多能性幹細胞(iPS細胞)の委託作製、作製後依頼を受けた研究者に引き渡すとともに、バンク化して研究者からの依頼があれば、どなたにでも提供できるシステム構築を目指す(図1)。このシステム構築に向けて以下の課題を期間内に達成する。

1. iPS細胞樹立に向けての難治性疾患の患者組織提供方法の開発
2. SeVベクターを使った外来因子フリーiPS細胞の確立
3. 作製したiPS細胞をバンク化し提供するシステムの構築

iPS細胞作製には非組込型センダイ・ウイルスベクター(SeV)を用いる。このベクターは染色体に組み込まれることなく、細胞質内で遺伝子を発現することができる。したがって、iPS細胞作製のために必要な初期化因子(Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc)が染色体に組み込まれずにiPS細胞を作製可能で、初期化因子の影響を作製したiPS細胞から排除することができる。

この研究での最も直接的な成果は、多くの研究者へ容易に疾患由来の細胞をiPS細胞の提供という形で行うことが可能となることである。iPS細胞は試験管内で多能性を維持したまま無制限に増幅が可能で長期保存ができる。したがって多くの研究者に提供することができる。また採取することが困難であるような細胞(たとえば神経細胞など)もiPS細胞から誘導後にその細胞を使った研究が可能となる。これらは、まさに患者数が少なく研究が進みにくい状態である疾患の患

者由来の生体細胞の供給力を増やす効果と同じである。疾患特異的iPS細胞の樹立はすでに報告があり、疾患の病因解析に役立つとの知見が得られている(Nature 457:277-281,2009; Cell 136:964-977, 2009等)。以上より、難治性疾患由来のiPS細胞を作製し医師や医学研究者に供給するシステムの構築が、研究の裾野を広げ、病因の解明と治療方法の開発に貢献できると考えられる。

## B. 研究方法

1. iPS細胞樹立のための皮膚線維芽細胞の樹立

健常者のヒトの皮膚生検(直径約5mm片)から、皮膚由来初代線維芽細胞培養方法を確立する。

2. SeVベクターを使ったiPS細胞の確立

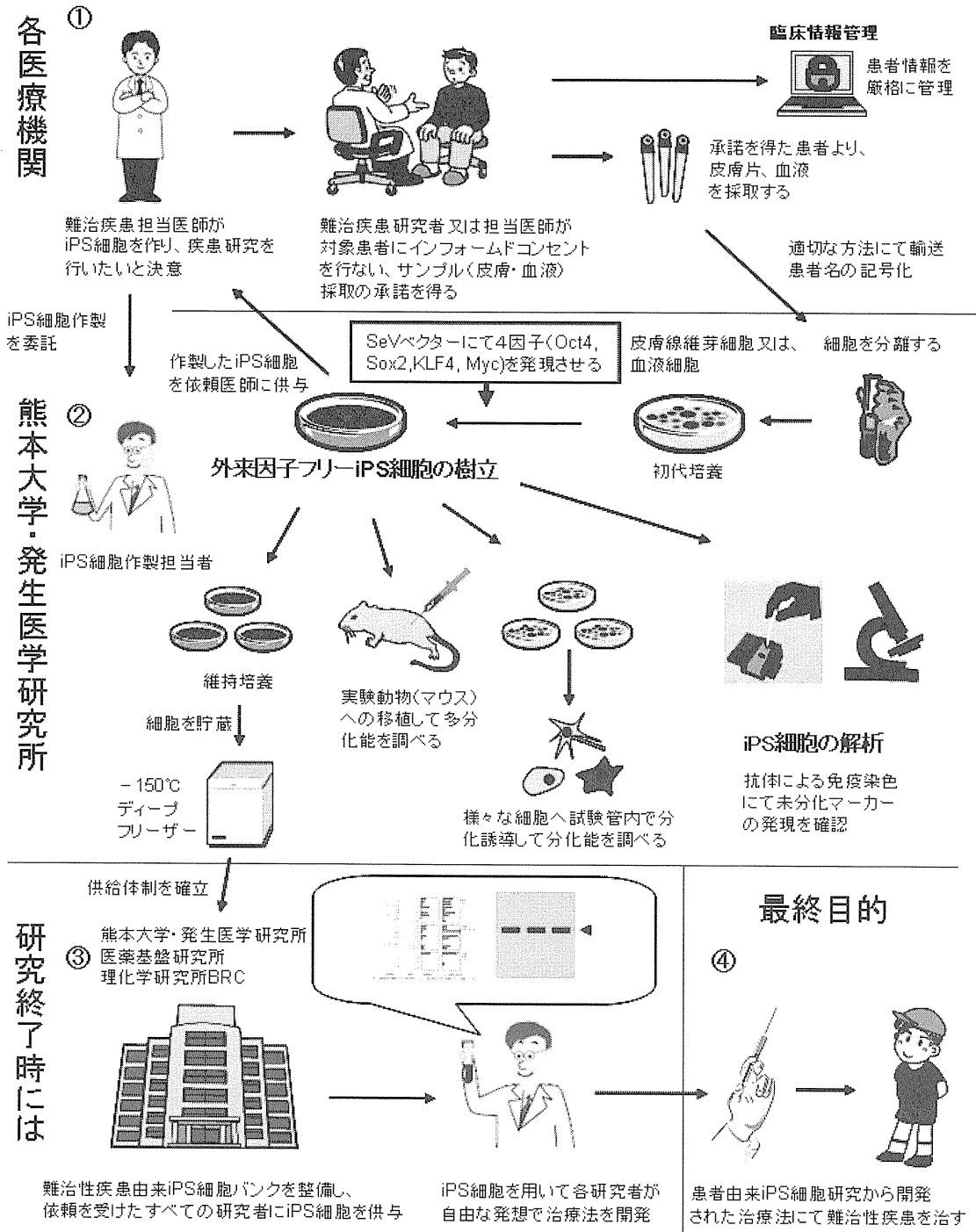
SeVベクターによって患者由来細胞へ初期因子(Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc)を一過性に発現させ、もっとも簡便で、確実なiPS細胞作製方法の確立を行う。また本研究事業関連の研究グループ責任者等と連絡をとり、疾患研究のためのiPS細胞樹立に対しての説明を行い、iPS細胞樹立の要請があれば樹立を行う。

樹立したiPS細胞については、1)アルカリフォスファターゼ染色 2)Nanog, Oct3/4, SSEA-4, TRA-1-60の免疫染色によるiPS細胞の確認を行う。

さらに、三胚葉系細胞への分化を誘導し多能性を確認する。誘導後、神経外胚葉マーカー: Sox1, Neurogenin, Nestin等、中胚葉マーカー: Brachyury, Mesogenin, Mesp2等、内胚葉マーカー: Sox17, CK18, CK19, Foxa2等の発現を定量RT-PCRにて調べる。樹立したiPS細胞は、すみやかに

図1 研究の流れ図

難治性疾患由来外来因子フリー人工多能性幹細胞の委託作製とバンク化



作製依頼者へ供与する。同時に他の研究者への iPS 細胞供与についての同意書の作製を行う。同意後に、1 株について最低 10 本のストックを作製し、-150°C のデープフリーザーへ貯蔵する。

### 3. 血液細胞からの iPS 細胞の樹立

難治性後天性血液疾患あるいは小児難治性疾患の中で皮膚生検が困難な症例については、末梢血液中の血液細胞からの作製の検討も行う。まず患者より同意のもと末梢血液を採取し、単核球を分離する。次に単核球を IL-2 と抗 CD3 抗体にて刺激後、線維芽細胞と同様にセンダイウイルスを感染させ iPS 細胞誘導を行う。感染後、20 日ほどでコロニーが出現する。このコロニーを単離して iPS 細胞を樹立する。樹立した iPS 細胞は、線維芽細胞から作製した iPS 細胞と同様に未分化マーカーの発現や分化能力を検定して iPS 細胞であることを確認する。

#### (倫理面への配慮)

#### 1) 倫理審査

正常と疾患由来の iPS 細胞作製とその解析、細胞のバンク化については研究代表者の所属する機関の倫理委員会で審査を行いすでに承認済みである。患者サンプルの所属機関以外からの提供については、提供機関の倫理審査委員会の承認があることを確認し研究を行う。

#### 2) 人権擁護上の配慮

本研究は、個人ゲノムそのものの情報を得るわけではない。研究の成果を学術雑誌に投稿することや、学会等で発表する場合、個人が特定される個人情報公表されることはない。本研究のために特別に用意した番号によって管理し、人種・性別・年齢・診断名以外の患者情報

はサンプル提供を行う臨床機関にて管理を行う。作製した iPS 細胞は所属機関において施錠できる研究室にて管理し、一般の人々やこの研究に関係ない他の研究者の目に触れることはない。したがって、iPS 細胞から個人の特定の情報につながることはない。また、ヒト iPS 細胞から個体を作製すること、ヒト胚への導入、ヒト胎児への導入、生殖細胞の作製は、行わない。また、バンクからの提供については連結不可能匿名化で行う。

#### 3) 不利益・危険性の排除や説明と同意

サンプル採取には、研究目的・予想される成果、患者情報の保護、予想される不利益等を同意書に記述している内容に準じて、担当医からの十分な説明の後(必要であれば代表申請者も同席して)、同意(インフォームド・コンセント)を得て行う。

皮膚由来線維芽細胞を得るための皮膚生検は通常の医学診療の範囲で行われている方法に準じて行う。生検は、直径 5mm ほどを前腕伸側から局所麻酔を使い行う。痛みは、局所麻酔注射の時のみである。瘢痕は普通のけがの場合と同じである。以上より、危険性はほとんどない。また、末梢血液採取も上腕の静脈より、通常医療で行われている方法に準じて行う。こちらも危険性はない。

本研究による成果が知的財産権の対象になる場合もあるが、提供者に権利が帰属したり、利潤を得ることはない。サンプル提供者にご負担していただく必要経費はなく、また、サンプル提供による謝金・交通費の支給もない。研究にかかる費用については、研究費から支出する。



## C. 研究成果

### 1. バンク事業と iPS 細胞のバンク登録

平成22年度に作成したバンク登録のルールに従って、今年度は医薬基盤研と理化学研究所バイオリソースセンター(理研BRC)に作成した29症例の難病由来iPS細胞の計86株のバンク登録を終了した。昨年度の登録と合わせて32症例、94株がすでに登録が終了しており(表1)、細胞増幅による供給体制が整いし提供を開始する。

### 2. iPS 細胞の作製

#### 2-1. 難治性疾患からの皮膚由来線維芽細胞とiPS細胞の樹立

平成23年度は新たに65症例の皮膚生検サンプルより線維芽細胞を樹立した。これによって、昨年度と合わせて、109疾患、244症例からの線維芽細胞樹立が終了し、いつでもこれらの線維芽細胞よりiPS細胞誘導が可能な状態にある(図2)。新たに40症例からのiPS細胞樹立が終了した。これで、難治性疾患70症例(700株)のiPS細胞作製が終了し、依頼医師・研究者に提供終了または提供可能の状態にある。

図2 樹立した線維芽細胞の疾患別内訳

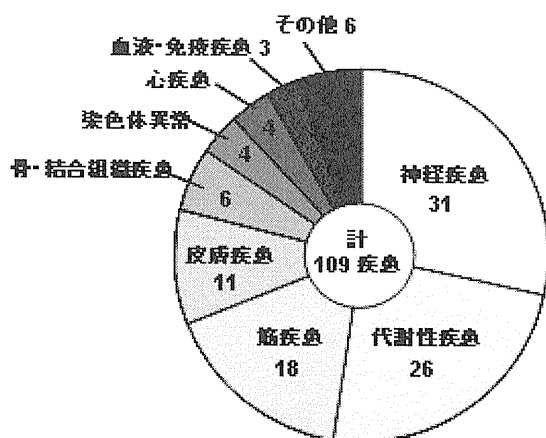


表1 バンク登録したiPS細胞

症例No.	病名	年齢	性別	iPS細胞No.
1	糖尿病type 1b	34歳	男性	SB-2 SS-6 #1
2	Poliozeus-Merzbacher 病	9歳	男性	#2 #3
3	ミトコンドリア病 (MELAS)	34歳	男性	#1 #2 #3
4	Prader-Will Syndrome 症候群	26歳	女性	#1 #2 #5
5	Cockayne 症候群	不明	女性	#2 #3 #8 #10
6	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	11歳	男性	#1 #4 #5
7	孤発性ALS (classical, with UMN)	52歳	男性	#1 #2 #7
8	三鮮型筋ジストロフィー	38歳	女性	#4-7 #4-3 #6-1
9	孤発性ALS (pseudo-polynuritic, w/o UMN)	69歳	女性	#5 #6 #7
10	Variant CMT (Charcot-Marie-tooth, CMT)	44歳	男性	#3-1 #3-2 #5-2
11	Familial ALS	51歳	女性	#1-8 #3-3 #3-4
12	先天性筋線維タイプ不均衡症	49歳	女性	#9 #10 #12
13	孤発性ALS (bulbar, with UMN)	77歳	男性	#7 #10 #11
14	Lay-Sachs病	1歳	女性	#1 #2 #3
15	Allan-Herndon syndrome	13歳	男性	#1 #2 #3
16	Bardet-Biedl syndrome	20歳	男性	#8 #10 #12
17	皮膚筋炎	不明	不明	#2 #6 #7
18	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	18歳	男性	#5 #7 #11
19	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	10歳	男性	#1 #2 #3
20	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	2歳	男性	#3 #10 #11
21	皮膚筋炎	不明	不明	#9 #11 #14
22	ボンベ病	1歳	女性	#32-1 #33-1 #34-2
23	全身性強皮症	71歳	女性	#2 #3 #4
24	肘人体筋炎	40歳	女性	#2 #3 #5
25	強皮症	47歳	女性	#2-3 #2-10 #3-6
26	肢体型筋ジストロフィー	59歳	女性	#3-6 #4-5 #5-4
27	先天性高乳酸血症	2歳	女性	#2 #3 #5
28	ビルビン酸脱水素酵素欠損症	0歳	男性	#3 #4 #5
29	ATR-X症候群	20歳	男性	#1 #2
30	Pulmonary hypertension	54歳	女性	#3-1 #3-2 #3-4
31	新型エーラスタンロス症候群	不明	不明	#2 #5 #6
32	モヤモヤ病	3歳	女性	#3 #5 #9

## 2-2. 新型センダイウイルスベクターによる iPS 細胞誘導

Oct3/4, Klf4, Sox2 の 3 つ遺伝子を 1 つウイルスで発現するセンダイウイルスベクターを新たに開発した (分担者: 房木ノエミ)。このウイルスによる iPS 細胞誘導はこれまでの 4 因子がすべて分離しているタイプに比べて iPS 細胞コロニー誘導効率が 10 倍ほど高い。また従来のタイプでは、誘導開始から作製まで(センダイウイルスが除けるまでの間)、数ヶ月必要であったが、新型では 1.5 ヶ月でウイルスフリーの iPS 細胞を作製することが可能となった。今後、この新型ベクターを用いると短期間での iPS 細胞樹立が可能となり、iPS 細胞樹立のスピードが飛躍的に短縮される。

## 2-3. 血液細胞からの iPS 細胞樹立とそれを用いた血液疾患からの iPS 細胞誘導

昨年度、末梢血液の血液細胞からの iPS 細胞樹立に成功した。血液細胞から作製した iPS 細胞の解析と T 細胞系腫瘍からの iPS 細胞誘導を行った。

### 1) iPS 細胞の起源細胞の解析

樹立した iPS 細胞からゲノム DNA を抽出し、T リンパ球の受容体(TCR)の再構成を調べた。再構成が認められる iPS 細胞と認められない iPS 細胞があった。したがって、一部の iPS 細胞は T リンパ球から誘導されていることが明らかとなった。再構成が認められなかった iPS 細胞が存在することは、T リンパ球以外の細胞が iPS 細胞へと誘導されたことを示唆しており、今後さらにこの点を明らかにすべく研究を進めている。またこの技術を用いて T リンパ性白血病からの iPS 細胞誘導を進めている。

表 2 iPS 細胞を使用する内容で成立した共同研究 (施設名と疾患名) 合計 4 件

臨床側	基礎側	疾患名
1. 佐賀大学附属病院 小児科	熊本大学発生医学研究所 熊本大学薬学部	ライソゾーム病
2. 熊本大学医学部附属病院 小児科	熊本大学発生医学研究所	遺伝性腎疾患
3. 東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 熊本大学生命資源研究・ 支援センター	熊本大学発生医学研究所	プロピオン酸血症
4. 熊本大学医学部附属病院 発達小児科	熊本大学発生医学研究所	筋ジストロフィー

### 3. 市民と患者、研究者への成果の公開

成果発表を兼ねた市民と研究者への公開シンポジウムを東京にて開催した。演者の選定と自ら研究成果を発表した。

### 4. 共同研究の推進

今年度は昨年度に引き続き共同研究を推進し、新たに4つの研究において共同研究を開始した(表2)。前年度と合わせて作製済iPS細胞を用いての共同研究は計9件となった。

## D. 考察

平成23年度は、65症例の皮膚生検サンプルより線維芽細胞を樹立した。iPS細胞の樹立では、本年度40症例、合計70症例から樹立が終了している。これは当初の目的(57症例)を越える数であり、目的は達成された。細胞バンクについては、医薬基盤研と理化学研究所バイオリソースセンター(理研BRC)に作成した29症例の難病由来iPS細胞の計86株のバンク登録を終了した。昨年度の登録と合わせて32症例、94株のバンク登録が終了したことになる。2年6ヶ月という短期間の中でバンクのシステム作りから始めことを考えると、30症例、90株以上バンク登録できたことは想像以上の成果と考えている。作製した疾患由来iPS細胞は、従来のレトロウイルスやレンチウイルスによって作製したiPS細胞と違い、誘導に用いた4因子が染色体内に組み込まれていないiPS細胞である。したがって、疾患由来のiPS細胞としては理想的な細胞であり、こ難治性疾患由来の外來因子フリーのiPS細胞からなる細胞バンクは世界でも初めてのケースである。しかしながら、難治

性疾患が数千種類も存在することや難治性疾患克服研究事業でも300疾患以上もの難治性疾患を対象として研究が行なわれている現実を考えれば、まだまだiPS細胞作製数が不足していると考える。私たちは、線維芽細胞を200株以上すでに樹立した。この細胞をもとに継続的に線維芽細胞からiPS細胞を誘導中であり、患者の同意と依頼者の同意のもと、順次細胞バンク登録を行なっている。今後、バンク登録のiPS細胞については、供給体制(細胞増幅)が整えば供給を開始する。

一方、難治性疾患の中で後天性血液疾患に対応するために、血液細胞、特にTリンパ球からのiPS細胞樹立方法を確立した。本年度はこの技術を用いて実際にTリンパ球の腫瘍疾患よりiPS細胞を樹立している。これらのことから、これまで後天性の難治性血液疾患は、その病気の標的細胞である血液細胞からの作製が必須であり、そのために血液細胞からの作製方法の樹立が求められていたが、この点が克服され、iPS細胞を作製する道が開かれ研究の進展が期待される。血液細胞からのiPS細胞作製の技術は、皮膚生検が困難である小児に対して有効である。難治性疾患の多くを占める遺伝性疾患は圧倒的に小児期に発症する。したがって血液細胞からiPS細胞を作製する技術は今後大きく小児からの作製を進展させると期待される。

作製したiPS細胞を用いての共同研究に向けた話し合いにも積極的に参加し、今年度も4件の共同研究が成立した。疾患由来のiPS細胞に注目が集まっている

とともに、難治性疾患研究において PS 細胞の有用性を多くの研究者が認めていることがあらためて確認された。

本研究を広く一般市民や患者へ知ってもらうために、今年度も成果発表を兼ねた市民公開シンポジウムを東京にて開催した。私たちバンク関連研究者や難治性疾患研究者に加えて厚労省の難治性疾患克服事業の担当者にも来て頂き、多くのご意見を交換できたことは大きな収穫であった。

#### E. 結論

1. 線維芽細胞を 65 症例、iPS 細胞を 40 症例から樹立した。昨年度と合わせて線維芽細胞は合計 244 症例、iPS 細胞 70 症例から樹立したことになる。
2. バンク登録を 29 症例 (86 株) について行なった。これらはすでに理研 BRC と医薬基盤研究所には郵送済である。合計 32 症例 (94 株) の iPS 細胞のバンク登録が終了し、供給体制が整えば配布を開始する。
3. 血液細胞からの iPS 細胞樹立方法を確立し、血液疾患の標的血液細胞から iPS 細胞を作製した。
4. 作製した iPS 細胞は基礎研究と臨床研究に広く活用可能であり、PR を十分に行えば多くの研究者が使うことが予想できる。
5. 市民シンポジウムを開催し、バンク事業を市民や患者に紹介していくことは、この事業を理解してもらう上で重要である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Aoki H, Hara A, Era T, Kunisada T, and Yamada Y. Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis. *Development*. 139(4): 667-677, 2012.

##### 2. 学会発表

国際会議

1. Takumi Era Origin of mesenchymal stem cell. 17th annual meeting of International Society of Cell Therapy (ISCT). Rotterdam, The Netherlands. May 18-21, 2011. (Invited speaker)

国内会議

江良 択実 難病バンクの取り組みについて 公開シンポジウム：難治性疾患の克服に向けて 東京 2011 年

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

##### 1. 特許取得

特許出願番号 2011-197931 発明者：江良 択実 発明の名称：物質のスクリーニング法 出願人：熊本大学 特許出願日：2011 年 9 月 12 日

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

## 難治性疾患患者皮膚からの皮膚線維芽細胞樹立

分担研究者 尹 浩信 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学分野教授

協力者 神人正寿 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学分野講師

### 研究要旨

症例数が限られる難治性疾患の生体試料提供体制を確立する事を目的として難治性疾患の生体試料から人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の作成と作製した iPS 細胞のバンク化に向けて基盤研究を行なっている。そのために我々は、難治性疾患の皮膚から iPS 細胞を樹立する際の皮膚線維芽細胞の樹立について検討を行った。

#### A. 目的

症例数が限られる難治性疾患の生体試料は希少性が高いため、公平性を確保した提供体制が必要とされる。しかしながら、生体試料は有限であり、多くの研究者の要求に応じて幅広く提供する事は困難である。そこでこの問題を解決するために、難治性疾患の生体試料から人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の作成と作製した iPS 細胞のバンク化に向けての基盤研究を行っている。

本研究では iPS 細胞を作製するためにその前段階として難治性疾患の皮膚から生検を行い、皮膚線維芽細胞を樹立する

事を目的として研究を行った。

#### B. 背景

症例数が限られる難治性疾患の生体試料は希少性が高いため、公平性を確保した提供体制が必要とされる。しかしながら、生体試料は有限であり、多くの研究者の要求に応じて幅広く提供する事は困難である。そこでこの問題を解決するために、難治性疾患の生体試料から人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の作成と作製した iPS 細胞のバンク化に向けての基盤研究を行っている。

患者試料から作製された iPS 細胞は、無制限に増幅させ、長期にわたり貯蔵可能



であり、多くの研究者に必要時に容易に提供可能である。従って、さまざまな分野の研究者が難治性疾患を研究する機会が増え、治療法の開発を促進する可能性がある。

iPS 細胞確立に際してはヒト皮膚からヒト皮膚線維芽細胞を培養増殖させ、SeV ベクターによって初期因子 Oct-4、Sox-2、KLF4、c-Myc を一過性に発現させ、iPS 細胞を作製する事が外来因子フリー iPS 細胞を確立する事が最も簡単で、確実であると考えられる。

### C. 方法

本研究は、皮膚試料を手術にて採取する事及び採取した皮膚からヒト皮膚線維芽細胞を培養増殖させその後 iPS 細胞を樹立する事を熊本大学倫理委員会に申請し、承認されている。

まず正常および難治性疾患患者に、研究目的、予想される成果、患者情報の保護、予想される不利益等を同意書に記述している内容に準じて、担当医からの十分な説明の後同意（インフォームド Consent）を得た上で皮膚生検を行なった。

対象は皮膚筋炎 1 例、肢帯型筋ジストロフィー 1 例、Multiple system atrophy 1 例、CADASIL 1 例、家族性アミロイドポリニューロパチー 1 例の合計 5 例であった。

局所麻酔薬を用いて麻酔後 4mm パンチ（直径 4mm）にて皮膚を採取後縫合した。採取した皮膚から皮下脂肪織を剥離後、

培養液（Eagle's MEM）にて数回洗浄後、清潔条件でクリーンベンチに運搬後 0.5mm 角程度に細切除し、再切除した皮膚を間隔をあげながら真皮側をプラスチックシャーレに張り付けていく。Eagle's MEM に 10%FCS および抗生物質、抗真菌剤添加を加えたものを培養液として 37°C にてインキュベーターにて培養を行う。

### D. 結果

顕微鏡にて観察したところ数日にてヒト皮膚線維芽細胞がプラスチックシャーレ上に遊走・増殖し 2-3 週間後にはヒト皮膚線維芽細胞がプラスチックシャーレ上に confluent に増殖した。トリプシン処理にてプラスチックシャーレよりヒト皮膚線維芽細胞を分離し、1:5 の割合でプラスチックシャーレに播種し、ひと皮膚線維芽細胞を増殖する事ができた。また形態学的に 100%ヒト皮膚線維芽細胞である事も確認できた。

### E. 結論

皮膚生検サンプルから作製した線維芽細胞は iPS 細胞作製に使用するにあたり有用である。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Kawashita Y, Jinnin M, Makino T, Kajihara I, Makino K, Honda N, Masuguchi

S, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H.  
Circulating miR-29a levels in patients with  
scleroderma spectrum disorder. *J Dermatol  
Sci*, 61: 67-69, 2011.

2. Asano Y, Ihn H, Jinnin M, Tamaki K.  
Altered dynamics of TGF- $\beta$  receptors in  
scleroderma fibroblasts. *Ann Rheum Dis*,  
70: 384-387, 2011.

3. Moriya C, Jinnin M, Yamane K, Maruo K,  
Muchemwa FC, Igata T, Makino T,  
Fukushima S, Ihn H. Expression of  
matrix metalloproteinase-13 is controlled  
by IL-13 via PI3K/Akt3 and PKC- $\delta$  in  
normal dermal fibroblasts. *J Invest  
Dermatol*, 131: 655-661, 2011.

2. 学会発表

1. Ihn H. “Mechanis of Fibrosis” 2011. 5.  
24-29 22 nd World Congress of Dermatology  
(Seoul, Korea) Invited lecture

2. Fukushima S, Hayano S, Jinnin M, Ihn  
H. “Increased serum levels of SPARC in  
patients with localized scleroderma” 2011.

5. 24-29 22 nd World Congress of  
Dermatology (Seoul, Korea)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

## 遺伝子挿入のない iPS 細胞を用いた分化誘導法の開発に関する研究

分担研究者 西中村 隆一 熊本大学発生医学研究所 教授

### 研究要旨

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の開発によって、難治性疾患の患者から iPS 細胞を樹立し、分化誘導すれば、疾患の発症機構の解明や治療に極めて有益な知見を得ることができる可能性が生まれてきた。そこで、本計画は難治性疾患由来の iPS 細胞の作製とバンク化を目的としている。特にセンダイウイルス（SeV）ベクターを使って、外来因子の遺伝子挿入を持たない iPS 細胞を作成、保存するのが特徴である。本分担研究では、バンク化された iPS 細胞を一般の研究者が利用しやすい様な分化誘導の技術開発を行い、情報を提供することを目指した。

### A. 研究目的

人工多能性幹細胞（iPS細胞）の開発によって、難治性疾患の患者からiPS細胞を樹立し、分化誘導すれば、疾患の発症機構の解明や治療に極めて有益な知見を得ることができる可能性が生まれてきた。そこで、本計画は難治性疾患由来のiPS細胞の作製とバンク化を目的とする。特にセンダイウイルス（SeV）ベクターを使って、外来因子の遺伝子挿入を持たないiPS細胞を作成、保存するのが特徴である。

この分担研究では、バンク化されたiPS細胞を一般の研究者が利用しやすい様な技術開発を行い、情報を提供することを目的とした。難治疾患由来のiPS細胞はバンク化してそれぞれの研究者に役立ててもらおうのが本研究の基本であり、分化誘導もそれぞれで行うことになる。しかし

難治疾患治療に携わる大多数の研究者はiPS細胞の取り扱いには慣れていない。iPS細胞を分化させる際にはフィーダー細胞の混入を除く必要があり、さらに分化誘導法自体がそれぞれの目的細胞によって異なるため試行錯誤が要求される。そこで、正常人由来のiPS細胞をモデルケースとして分化誘導実験を行った。

### B. 研究方法

ゼラチンコートした培養皿にマイトマイシン C 処理したマウス繊維芽細胞をまき( $5 \times 10^5 / 6\text{cm}$  プレート)、その上で iPS 細胞を培養した。共同研究者の房木ノエミ博士がセンダイウイルスベクターによって樹立した外来因子フリー iPS 細胞を使用した。培養液は ReproCell 社の Primate ES cell culture medium に bFGF を添加して

用いた。フィーダーのない条件としては、ReproCell FF(あるいはFF2)培地にbFGFを添加した。

iPS細胞を10 $\mu$ MのRho kinase阻害剤Y27632で1-2時間処理した後、ReproCell社の細胞解離液で処理し、適当な大きさの塊に解離したのち、非接着性の丸底96穴プレート(Lipidure coat)で1週間浮遊培養して胚様体(Embryoid body)を形成させた。あるいは0.25%のトリプシン-EDTA溶液で単一細胞に解離し、10000個/wellで同様に胚様体を形成させた。この間、中胚葉誘導因子であるアクチビンの他、レチノイン酸などを加えて比較した。その後、ゼラチンあるいはファイブロネクチンでコートした培養皿に接着させてさらに1週間培養した。

(倫理面への配慮)

難治性疾患患者由来のiPS細胞ではなく、正常人由来のものを共同研究者の房木ノエミ博士から譲渡された。学内の倫理委員会での承認済みである。

### C. 研究結果

非接着性丸底96穴プレートを使うことによって、胚様体の大きさのコントロールが可能になった。iPS細胞をY27632で前処理した後、細胞塊に解離し、さらにY27632存在下で胚様体を形成させた場合が、最も再現率が高かった。単一細胞への解離や、解離後遠心(1500 rpm, 5分)する方法(spin EB法)も試みたがそれ

を上回る効果はなかった。アクチビンを追加したものは、全く因子を加えない場合に比較して、胚様体の発育がよく、内腔形成も良好であった。さらにアクチビンとWnt3aを追加することによって、PDGFR $\alpha$ 陽性の沿軸中胚葉細胞を誘導することができた。

一方、2次元での平面培養による分化誘導法も試みたが、フィーダーに依存して維持されているiPS細胞を直接細胞外マトリクス上で分化させようとしても、接着性及び生存率が悪い。フィーダー細胞の混入の影響も無視できないため、フィーダーフリーで短期間培養してから分化誘導を試みたが、この間に分化能が障害されていることが示唆された。Thompsonらがわずかに8種類の化合物からなる単純な組成の培地(E8)を発表したので(Chen et al. Nat Methods, 2011)、これとReproCell社のFF及び新世代のFF2培地との比較を進めた。その結果、我々の使用しているセンダイウイルスベクターによって樹立したiPS細胞株は、ラミニンコートプレート上でFF2によって最もよく維持されることが判明した。

現在までのところ、フィーダー上で維持しているiPS細胞を、ラミニンコートプレート上でFF2培地で数日培養することによってフィーダー細胞を除去し、Y37632で前処理したあと、細胞塊にして胚様体を形成させ、アクチビンとWnt3aを作用させることが、中胚葉誘導に最も適していることが明らかになった。

#### D. 考察

山中らが樹立した第一世代の iPS 細胞には外来性因子が残存するのに対し、センダイウイルスベクターによる iPS 細胞は、外来因子フリーのためより高い分化能を期待できる。今後さらに条件を検討したい。難治疾患由来の iPS 細胞は個人情報保全等の法的整備が完了していないため、本分担研究では正常人由来のものを先行させた。もちろん計画全体としては難治疾患由来 iPS 細胞の使用整備を迅速に進めた。

ReproCell 社の培地には Invitrogen 社の Knockout Serum Replacement (KSR) が用いられているが、KSR には血清由来のアルブミン分画が含まれるため、完全な無血清培地ではない。これに対して E8 は iPS/ES 細胞の培養で必須とされる $\beta$ -メルカプトエタノールを敢えて除くことでアルブミンも不要になっており、ロット差に影響されないことが期待されたが、少なくとも我々の使用する iPS 細胞株では良好な結果は得られなかった。

ES細胞やiPS細胞は、株によってばらつきがあることが知られており、分化条件が株によって異なることが予測される。本計画では各疾患から最低3株のiPS細胞を作ることを目標にしているが、これですべての分化誘導のニーズを満たすのは難しい可能性がある。貴重なiPS細胞株がそれぞれ同等に未分化状態を維持し、分化能をもつのが望ましい。マウスのES細胞やiPS細胞では、そのようないわゆる

ground stateの条件が報告されているが、ヒトES/iPS細胞では確立されていない。JaenischらによってマウスES/iPS細胞のような形態とシグナル経路をもつヒトnaïve iPSが報告されている (PNAS, 2010)。外来因子なしでの自己複製維持が10-15世代と一過性である欠点をもつものの、その間は単一細胞から継代でき、分化誘導には有益と考えられる。この方法も試してみたが、一旦確立されたiPS細胞をnativeな状態に持ち込むことはできなかった。ブタのnaïve iPSとされる細胞も学会レベルでは発表されているが、キメラ作成能に劣り、さらなる技術開発が必要である。

#### E. 結論

外来因子フリーiPS細胞の、簡便な中胚葉分化誘導条件を確立した。さらに改善を重ね、早期に科学コミュニティーに還元したいと考えている。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

Nishinakamura R. Nephron progenitors in the embryonic kidney (invited lecture) The11<sup>th</sup> Asian Congress of Pediatric Nephrology. Jun 2, 2011, Fukuoka, Japan.



西中村隆一 発生期におけるネフロン前  
駆細胞維持機構（口演）第54回日本腎臓  
学会 2011年6月15日、横浜

Nishinakamura R. Nephron progenitors in the  
embryonic kidney (シンポジウムオーガナ  
イザー及び口演) 第34回分子生物学会年  
会 2011年12月13日、横浜

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

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

センダイウイルスベクターを用いた遺伝子挿入のない疾患由来  
iPS 細胞株の樹立に関する研究

研究分担者 房木ノエミ ディナベック株式会社  
細胞工学グループ・リーダー

### 研究要旨

本研究は難病疾患患者由来・線維芽細胞初代培養株から、染色体非組込み・細胞質増殖型センダイウイルス(SeV)ベクターを用いて iPS 細胞を作製し、バンク化することが目的である。本年度は熊本大学に新型および血液用も含めた初期化ベクターを 135 セット提供し、熊本大学での iPS 細胞樹立をサポートした。また 3 因子を同時搭載した 2 種類の温度感受性新型ベクターを開発し、ベッカー型筋ジストロフィー患者由来線維芽細胞から iPS 細胞の樹立を行った。その結果、誘導効率は 37°C 誘導ベクターセットでは従来の 10 倍、36°C 誘導ベクターセットでは 2 倍であった。37°C 誘導のベクターセットでは 39°C、1 週間の処理でベクター除去が可能であり、36°C 誘導のベクターセットでは 37°C で培養する事で自然にベクターが除去された。樹立した iPS 細胞は無限増殖し、ヒト ES マーカーを発現していた。本ベクターを用いる事で、誘導効率のアップとベクター除去の時間が短縮され、省力化が可能となった。

#### A. 研究目的

難治性疾患の生体試料は、希少性が高く有限であり、要求に応じて幅広く供給することは困難な部分が多い。そこで、この問題点を克服するために、難治性疾患由来の人工多能性幹細胞(iPS細胞)の委託作製と、作製したiPS細胞のバンク化に向けての基盤研究を遂行中である。特に

本研究では、国内で開発された最新のセンダイウイルス(SeV)ベクターを用いた。この方法では、遺伝的背景が均一で外来因子フリーの細胞が簡便に、かつ、最も効率よく樹立され、従来法のもつ外来因子の遺伝子挿入という欠点を無くした画期的な方法である。本研究分担者は、本年度は難治性疾患細胞由来iPS細胞バン