

201128003B

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21年度～23年度 総合研究報告書

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21年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 江良 択実

平成24(2012)年 3月

目 次

I. 総合研究報告	
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	-----3
江良 択実	
資料1 研究の概略図	
資料2 倫理委員会承認書類	
資料3 iPS細胞作製・解析とバンク化の説明書・同意書	
資料4 バンク登録が終了した疾患由来iPS細胞	
資料5 事業説明用パンフレット、資源分配同意書	
資料6 市民公開シンポジウムのポスター	
資料7 共同研究の内容	
資料8 iPS細胞を使った新規薬剤開発	
II. 分担総合研究報告	
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	-----41
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	-----44
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	-----48
房木 ノエミ	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----57
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----59

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合研究報告書

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、疾患由来人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の委託作製とバンク化システムの構築が研究目的である。研究を開始した平成 21 年度 10 月からの 2 年 6 ヶ月間に、1) 109 疾患、244 症例の難治性疾患から線維芽細胞を樹立。このうち 70 症例（47 疾患、700 株）から外来因子フリーの iPS 細胞を樹立し依頼医師へ提供した。また、32 症例（94 株）の iPS 細胞のバンク登録が終了した。2) 線維芽細胞と末梢血液から温度感受性センダイウイルスベクター (SeV) を使った iPS 細胞樹立技術を確立した。樹立した iPS 細胞の未分化マーカーや分化マーカーの免疫染色と RT-PCR 法での発現確認方法を確立した。以上の結果を通して iPS 細胞樹立技術を標準化した。3) バンク化について連携機関である医薬基盤研、理研 BRC との共通同意書、説明用パンフレットや分配の規則を記した書類の作製等を行い iPS 細胞バンク体制を確立した。4) 合計 5 回の市民公開シンポジウムの開催を行い市民や患者にこの事業を理解してもらう活動を行なった。5) 作製した iPS 細胞を使っただけの計 9 件の基礎と臨床の共同研究の成立に寄与した。以上の成果から当初の目的をすべて達成できた。しかし、1) 未作製の疾患がまだ多くあり、これらからすでに線維芽細胞は樹立したこと、2) 新型ベクターの開発等の iPS 細胞量産化の基盤が整ったこと 3) バンクを軌道に乗せるには短期間に細胞登録を増やすことが必要であること 4) iPS 細胞が難治性疾患研究において有用なツールであること 5) 市民・患者の関心が高いことから総合的に判断して、この研究を何らかの形で継続する必要があると考察する。

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

難治性疾患の生体試料は希少性が高いために、研究を発展させるためには公平性を確保した提供体制が必要とされる。

しかし、数が少なく限りがあるために、試料を研究者の要求に応じて幅広く供給することは困難であり、このことが研究上の問題点である。そこで、この問題を克服するために、難治性疾患由来人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の委託作製と依頼者への提供、さらに患者と依頼者の同意があればバンク化して多くの研究者に提供できるシステム構築を目指す(資料 1)。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. センダイウイルスベクター (SeV) を使った外来因子フリー iPS 細胞樹立技術の確立と iPS 細胞の委託作製
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 細胞作製には従来のレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターと違って染色体に組み込まれずに細胞質内にて発現できる SeV を用いる。したがって、発現させる初期化因子(Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) が染色体上に残らない外来因子フリーの iPS 細胞を作ることができる。これは、病因が不明な疾患研究において、iPS 細胞作製による遺伝子自身の変化を無視できる理想的方法である。研究を遂行することで外来因子フリーの iPS 細胞のバンクが世界初で日本国内に立ち上がることになる。

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 細胞は試験管内にて増幅が可能で長期保存ができる。また採取困難である細胞 (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、まさに難治性疾患患者由来細胞の供給力を増やす効果と同じである。疾患由来 iPS 細胞の樹立はすでに報告があり、疾患の病因解析と治療法開発に役立つとの知見が多く得られている (Nature 457:277-281,2009 等)。しかし、作製未経験者である医師が自ら iPS 細胞を作製するには時間と労力を費やす。本研究には、このような医師に代わって作製を行うことで、彼らの負担を軽減し、疾患研究に集中できる環境を作るねらいがある。さらに、難治性疾患由来 iPS 細胞をバンク化して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. 皮膚線維芽細胞の樹立

患者の皮膚生検(直径約 5mm 片)から、皮膚由来線維芽細胞を樹立する。

2. SeV を使った iPS 細胞の樹立

初期化因子を発現する SeV を患者由来線維芽細胞へ導入する。感染後 20 日以降に出現してくる細胞塊コロニーをピックアップ後、増幅し iPS 細胞樹立する。38 度にてウイルス増殖が抑制される温度感受性株を用いるため、培養温度を変えることで容易にウイルスを除去できる。温度変化を与える時期 (継代数) を検討する。ウイルス除去を確定するために、ウイルス遺伝子を nested RT-PCR (一度目の PCR 産物をもう 1 度内側のプライマーにて PCR すること) にて検出する。

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。検査後問題なければ、iPS 細胞は作製依頼者へ提供する。バンク化の同意が得られたものについては、バンク登録を行なう。

3. 血液細胞からの iPS 細胞の樹立

後天性血液疾患からの樹立に用いるために、血液細胞からの作製の検討も行う。末梢単核球を IL-2 と抗 CD3 抗体にて 5 日間刺激後、iPS 細胞誘導を行う。樹立後、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

本研究は所属機関の倫理委員会で承認済みである (資料 2)。所属機関以外からのサンプル提供は、提供機関の倫理審査委員会の承認があることが必須である。

2) 人権擁護上の配慮

本研究は、個人ゲノム情報を得るわけではない。成果を学術雑誌、学会等で発表する場合、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・診断名以外の情報はサンプル提供を行う臨床機関にて管理する。作製した iPS 細胞は施錠できる研究室で管理し、この研究に関係ない人の目に触れることはない。

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、同意を得て行う (資料 3)。

線維芽細胞を得るための皮膚生検や末梢血液採取は通常診療にて行なう方法に準じるため危険性はない。

成果が知的財産権の対象になる場合、提供者に権利が帰属することはない。サンプル提供者にご負担していただく必要経費はなく、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難治性疾患由来 iPS 細胞の樹立とバンク登録

研究開始 (平成 21 年度 10 月) からの 2 年 6 ヶ月間に、計 109 疾患、244 症例の難治性疾患から線維芽細胞を樹立した (図 1)。このうち 70 症例 (1 症例から 10 株、合計 700 株) から外来因子フリーの iPS 細胞を樹立し依頼医師へ提供した。また、32 症例 (94 株) については iPS 細胞のバンク登録が終了した (図 2、資料 4)。

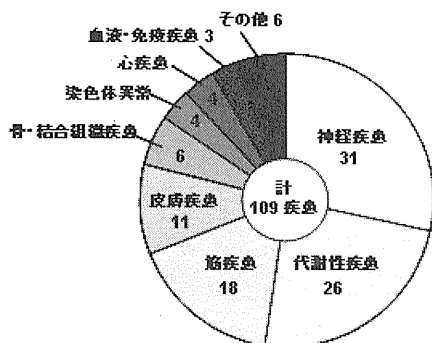
②iPS 細胞樹立技術の確立と標準化

皮膚由来線維芽細胞からの iPS 細胞誘導方法を確立した (図 2, 3)。温度感受性センダイウイルスベクター (SeV) を使った樹立時の最適な温度シフト時期の決定と Nested RT-PCR 法でのウイルスフリー iPS 細胞の判定を行なった (図 3)。こ

の手技にて 10^{10} 個に 1 個の感染細胞まで検出可能となった。作成した iPS 細胞検

図1 iPS細胞誘導を行っている疾患の内訳

A. 樹立した線維芽細胞の疾患別内訳



B. 樹立したiPS細胞の疾患別内訳

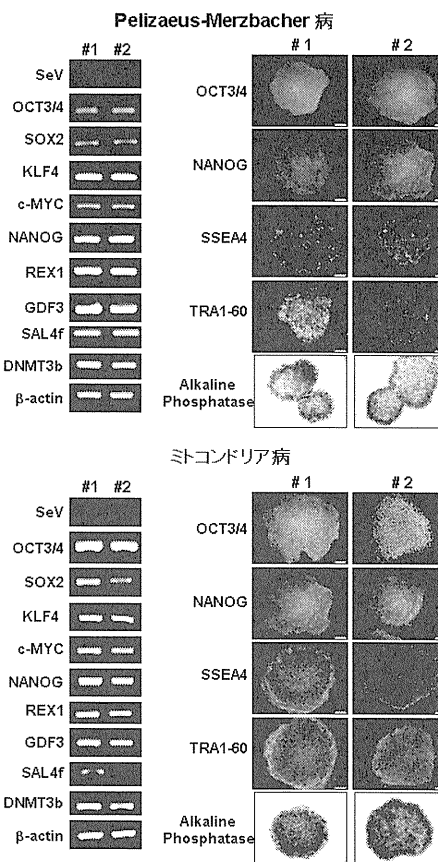
合計 47疾患、70症例

疾患名	症例数
神経疾患	
筋萎縮性側索硬化症	5
家族性アミロイドポリニューロパチー	3
シャルコー・マリー・トゥース病	1
Pelizaeus Merzbacher病	1
Kii-ALS	1
那須ハコラ病	1
ALLAN-HERNDON症候群	1
ハンチントン舞蹈病	1
球脊髄性筋萎縮症	1
Bardet-Biedl症候群	1
ATR-X症候群	1
もやもや病	1
Parkinson病	1
代謝性疾患	
Krabbe病	4
糖原病Ib	2
糖原病II	1
副腎過形成症	1
オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	1
Fabry病	1
Tay-Sachs病	1
高乳酸血症	1
ビリルビン酸脱水素酵素欠損症	1
プロピオン酸血症	1
中性脂肪蓄積心筋症	1
異染性白質ジストロフィー	1
筋疾患	
三好型筋ジストロフィー	1
ミトコンドリア病	4
肢帯型筋ジストロフィー	1
Duclenne型筋ジストロフィー	3
Becker型筋ジストロフィー	1
先天性筋繊維タイプ不均衡症	1
封入体筋炎	1
筋強直性ジストロフィー	1
Central core病	1
皮膚疾患	
強皮症	2
皮膚筋炎	2
遺伝性全身性色素異常症	1
骨・結合組織疾患	
進行性骨化繊維異形成症	4
Winchester症候群	1
Marfan症候群	1
Loeys-Dietz症候群	3
新型エーラスタンロス症候群	1
その他	
肺高血圧症	1
Galloway-Mowat症候群	1
Prader-Willi症候群	1
コケイン症候群	1
X連鎖無ガンバグロブリン血症	2
健常者コントロール	3

定では、安定した未分化マーカーや分化マーカーの免疫染色方法と RT-PCR 法での発現確認方法を確立した (図 2, 3)。以上の結果から外来因子フリーの iPS 細胞樹立技術を標準化した。

図2 バンクへ登録したiPS細胞

3疾患のうち2疾患のiPS細胞の性状を示す。未分化マーカーを発現している。



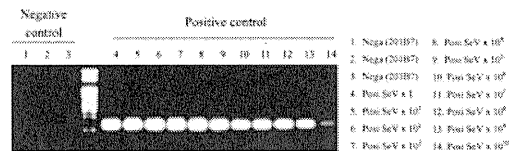
末梢血液を利用した iPS 細胞誘導方法を確立した。末梢血液から単核球を分離する。その細胞を IL-2 と抗 CD3 抗体にて刺激を行い、Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc を発現するセンダイ・ウイルスを感染させ iPS 細胞を樹立する。また全血を用いても樹立に成功した (図 4)。

③新型ベクター開発による樹立方法の効率化と加速化

ウイルスベクターの改良を行い、従来型では樹立に 4 ヶ月以上かかっていたところを 1 ヶ月半で作製できる新型センダ

図3 外来因子フリーiPS細胞の樹立と標準化

A. Nested RT-PCR: 10¹⁰に1個でも検出可能



B. ウイルス除去の温度シフト適性継代数の検討

継代数7-8で温度シフトを行なうとウイルスフリーにする効率が高い

疾患No	38度処理(継代数)	RNA回収(継代数)	除去効率
A24	8	10	73.33%
A35	7,9	10	58.33%
A66	7	9	64.29%
A72	7	9	57.14%
A71	7	9	75.00%
A92	7	9	58.33%
A96	7	9	91.67%

ウイルスベクターを開発した。このベクターでは iPS 細胞樹立に必要な 3 因子 (Oct3/4, Klf4, Sox2) を 1 つのベクターにて発現させ、温度感受性とする。このことによって、iPS 細胞樹立の効率を上昇させるばかりか、樹立後半に温度をシフトさせることによって、より早くウイルスを細胞から除くことができる。したがって従来のベクターより短期間にてウイルスフリーの iPS 細胞の樹立が可能となる。この新ベクターの開発のおかげで加速化された作製体制が構築された。

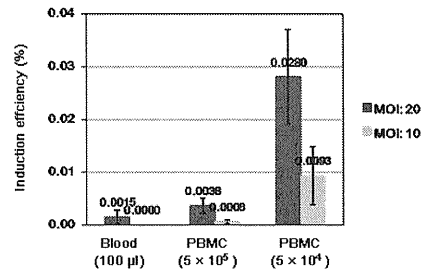
④バンクシステムの構築

依頼者（医師・研究者）はまず作製の窓口である研究代表者（江良択実）へ連絡する（資料 1）。収集班からの対応窓口には医薬基盤研も加わる。依頼者の所属機関の倫理委員会承認並びに患者の同意があることが作製の必須条件である。作製した iPS 細胞のバンク化については、理研バイオリソースセンター（理研 BRC）、医薬基盤研究所と連携し、管理・配布の体制を構築した。共通の同意書や説明用

図4 血液細胞から樹立したiPS細胞

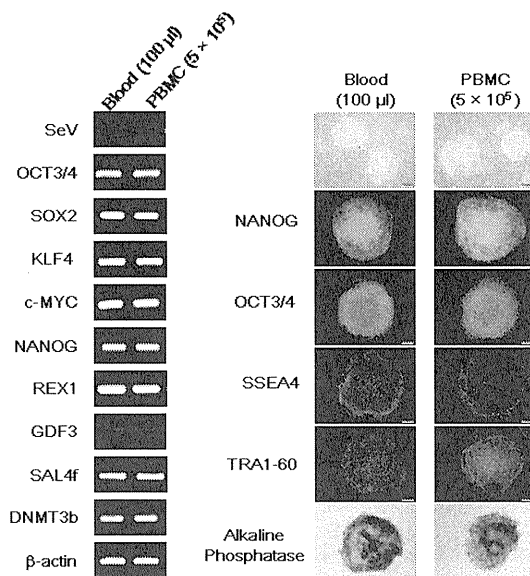
A. iPS細胞樹立の頻度

線維芽細胞からの樹立に比べて効率が低い



B. 作製したiPS細胞樹立の性状

線維芽細胞からの樹立と同様に未分化マーカーを発現している。



パンフレットの作製、分配規則を作成し整備した（資料 3, 5）。登録した細胞については、十分な増幅後、供給を開始する。

⑤患者や市民の理解を深めるための活動 合計 5 回の市民公開シンポジウム全国にて開催し（熊本、大阪、東京等、資料 6）、研究者、市民、患者にこの事業を理解してもらおう活動を行なった。

⑥iPS 細胞を使っての共同研究の促進 作製した iPS 細胞を使っての計 9 件の基礎と臨床の共同研究の成立に協力し研究の発展に寄与した。（資料 7）

⑥さらに一部の疾患由来 iPS 細胞を使って、疾患モデルを作製し、新規治療薬の

候補化学物質を同定した（資料 8）。

D. 考察

これまでに、合計 109 疾患、244 症例の皮膚生検サンプルより線維芽細胞を樹立した。iPS細胞も 70 症例から樹立し、依頼医師へ提供した。バンク体制と配布に関わる書類整備も終了した。同時に 32 症例から作製したiPS細胞、合計 94 株のバンク登録も完了した（資料 4）。以上より、当初の目標である難治性疾患 56 症例からの樹立は達成できた。今後、増幅の作業が済み次第、バンクからの配布が始まる。

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。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が進展する。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発展させると期待される。

当初の研究計画にはないが、iPS 細胞を使った薬剤開発研究を行っている。いくつかの治療候補物質も見つけてきており、疾患由来 iPS 細胞が疾患研究において有用なツールであることを支持する知見である。

短期間に新たな共同研究が 9 件成立した背景には、疾患由来 iPS 細胞研究の有用性を多くの研究者が認めていることによると考えられる。

市民公開シンポジウムには多くの人々の参加があった。特に熊本市では、地方都市開催にもかかわらず、参加者が 100 名以上にのぼったことは、市民や患者の iPS 細胞への関心の高さをうかがわせる。樹立した線維芽細胞が 109 疾患、244 症例とひじょうに多く集めることができ、当初の予想を大幅に超える成果が上げられた。線維芽細胞からはすぐにでも iPS 細胞を作製できる。また採取が容易な血液からの樹立法も確立した。加えて、新型ウイルスベクター開発による iPS 作製の加速化が達成できた。以上より、iPS 細胞量産化の基盤が整ったと言える。バンクが始動したばかりであること、研究者の関心の高さ、市民・患者の iPS 細胞にかかる期待が高いこと、基盤整備が完了したことを合わせて考えるに、何らの形でこのプロジェクトを進めることが、難治性疾患の研究を大幅に推進し、かつ、厚生労働行政上も役立つと考察する。

E. 結論

1. 合計 109 疾患、244 症例の皮膚生検サンプルより線維芽細胞を樹立、70 症例からの iPS 細胞の樹立（1 症例から 10 株、合計 700 株）、これと同時に 32 症例から作製した iPS 細胞、合計 94 株のバンク登録も完了した。当初の目的は達成した。
2. iPS 細胞樹立の標準化、新型ベクターの開発等の量産化の基盤・体制が整った
3. 医薬基盤研、理研 BRC と連携し難治性

疾患由来 iPS 細胞バンク体制を確立した。
4.iPS 細胞は疾患研究に威力を発揮できる
有用なツールであり、研究者、市民、患
者の関心が高い。

F. 研究発表

1. 論文発表

江良 択実 (研究代表者)

* corresponding author

1. 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. Era T*. Mesoderm cell development from ES cells. *Methods Mol Biol*. 636: 87-103, 2010.

3. Kitagawa M and Era T*. Differentiation of mesodermal cells from pluripotent stem cells. *Int J Hematol*. 91: 373-383, 2010.

4. Kinoshita M*.. Era T., Jakt LM. and Nishikawa S-I. A novel protein kinase, Vlk, is essential for stromal function of mesenchymal cells. *Development*, 136: 2069-2079, 2009.

5. Shimizu, N., Watanabe, H., Kubota, J., Wu, J., Saito, R., Yokoi, T., Era T., Iwatsubo, T., Watanabe, T., Nishina, S., Azuma, N., Katada, T. and Nishina, H*. Pax6-5a promotes neuronal differentiation of murine embryonic stem cells. *Biol Pharm Bull*. 32: 999-1003, 2009.

6. Era T*, Izumi N., Hayashi M., Tada S., Nishikawa S. and Nishikawa S-I. Multiple mesoderm subsets give rise to endothelial cells whereas hematopoietic cells are

differentiated only from a restricted subset in ES cell differentiation culture. *Stem Cells*. 26: 401-411, 2008.

7. Satoh Y., Matsumura I., Tanaka H., Ezoe S., Fukushima K., Tokunaga M., Yasumi M., Shibayama H., Mizuki M., Era T., Okuda T. and Kanakura Y*. AML1/runx1 works as a negative regulator of C-MPL in hematopoietic stem cells. *J Biol Chem*. 283, 30045-30056, 2008.

8. Arnold SJ., Huang GJ., Cheung AF., Era T., Nishikawa S., Bikoff EK., Molnár Z., Robertson EJ. and Groszer M.* The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. *Genes Dev*. 22:2479-84, 2008.

9. ES細胞からの分化 江良択実 再生医療業書 朝倉書店 in press.

10. 多能性幹細胞と中胚葉細胞 江良択実 医学のあゆみ in press.

房木 ノエミ (研究分担者)

1. K. Yusa, S. T. Rashid, H. S-Marchand, I. Varela, P-Q. Liu, D. E. Paschon, E. Miranda, A. Ordóñez, N. Hannan, F. Rouhani, S. Darche, G. Alexander, S. J. Marciniak, N. Fusaki, M. Hasegawa, M. C. Holmes, J. P. Di Santo, D. A. Lomas, A. Bradley and L. Vallier, Targeted gene correction of $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011 Oct 12;478(7369):391-4.

2. Takahashi S, Fusaki N, Ohta S, Iwahori Y, Iizuka Y, Inagawa K, Kawakami Y, Yoshida K, Toda M. Downregulation of KIF23 suppresses glioma proliferation. *J*

- Neurooncol.* 2011 Sep 9.
3. H. Ban, N. Nishishita, N. Fusaki*, T. Tabata, K. Saeki, M. Shikamura, N. Takada, M. Inoue, M. Hasegawa, S. Kawamata, and S. Nishikawa Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc. Natl. Sci. Acad. U.S.A.*, 2011 Aug 23;108(34):14234-9. Epub 2011 Aug 5.*corresponding author
 4. N. Nishishita, N. Fusaki, S. Kawamata: Generation of ICM-type human iPS cell from CD34+ cord blood cells. Book Title: Embryonic Stem cells / Book1, 2011 ISBN: 978-953-307-412-2.
 5. N. Nishishita, C. Takenaka, N. Fusaki, S. Kawamata. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Cord Blood Cells. Book Title: Pluripotent Stem Cells, Nova Science Publishers, Inc. 2011 ISBN: 978-1-60876-738-0
 6. N. Fusaki. Nonintegrating RNA viruses Wiley Publishers, 2011, p103-119
Book Title: "Primary and Stem Cells: Gene Transfer Technologies and Applications"
 7. T Seki, S Yuasa, M Oda, T Egashira, K Yae, D Kusumoto, H Nakata, S Tohyama, H Hashimoto, M Kodaira, Y Okada, H Seimiya, N. Fusaki, M Hasegawa, K Fukuda. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 2010 Jul 2;7(1):11-14
 8. Ueda R, Ohkusu-Tsukada K, N. Fusaki, Soeda A, Kawase T, Kawakami Y, Toda M. Identification of HLA-A2- and A24-restricted T-cell epitopes derived from SOX6 expressed in glioma stem cells for immunotherapy. *Int J Cancer.* 2010 Feb 15;126(4):919-29.
 9. N. Fusaki*, H Ban, A Nishiyama, K Saeki, M Hasegawa Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 2009;85(8):348-62. *corresponding author
 10. 房木ノエミ : 「センダイウイルスベクターによるiPS細胞の樹立法」
Medical Science Digest (ニューサイエンス社) vol.37, No.11, 2011, p28-31.
 11. 房木ノエミ : 「センダイウイルスベクターによる血液からのiPS細胞の誘導」
BIO Clinica (北隆館) Vol.26, No.9, 2011, p48-50.
 12. 房木ノエミ : 「センダイウイルスベクターによるiPS細胞作製法」
Medical Science Digest (ニューサイエンス社) vol.37, No.1, 2011, p7-9.
 13. 房木ノエミ : 「センダイウイルスベクターによるiPS細胞作製法」
Medical Science Digest (ニューサイエンス社) vol.37, No.1, 2011, p7-9.
- 西中村 隆一 (分担研究者)
1. Fujimura S, Jiang Q, Kobayashi C, and Nishinakamura R. Notch2 activation in the embryonic kidney depletes nephron progenitors. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21(5):803-810, 2010.
 2. Uchiyama Y, Sakaguchi M, Terabayashi T, Inenaga T, Inoue S, Kobayashi C, Oshima N, Kiyonari H, Nakagata N, Sato Y, Sekiguchi K,

Miki H, Araki E, Fujimura S, Tanaka SS, and Nishinakamura R. Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney mesenchyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(20): 9240-9245, 2010.

尹 浩信 (分担研究者)

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- β 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- δ in normal dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 131: 655-661, 2011.

4. Kanemura H, Fukushima S, Yamashita J, Honda N, Oyama R, Kakimoto A, Masuguchi S, Ishihara T, Inoue Y, Jinnin M, Ihn H. Circulating microRNA-221 level in patients with malignant melanoma as a new tumor marker. *J Dermatol Sci*, 61: 187-193, 2011.

5. Oyama R, Jinnin M, Kakimoto A, Kanemura H, Ichihara A, Fujisawa A, Honda N, Masuguchi S, Fukushima S, Maruo K, Ihn H. Circulating microRNA associated with TNF signaling pathway in patients with plaque psoriasis. *J Dermatol Sci*, 61:

209-211, 2011.

6. Yamada M, Sakai K, Hayashi M, Hozumi Y, Abe Y, Kawaguchi M, Ihn H, Suzuki T. Oculocutaneous Albinism Type 3: A Japanese girl with novel mutations in TYRP1 gene. *J Dermatol Sci*, 64: 217-222, 2011.

7. Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Nakano M, Horiguchi H, Ogata A, Odagiri H, Yano M, Araki K, Jinnin M, Ito T, Hirakawa S, Ihn H, Oike Y. The chronic inflammatory mediator angiopoietin-like protein 2 contributes to carcinogenesis and cancer cell metastasis. *Cancer Res*, 71 : 7502-7512, 2011.

8. Namikawa K, Yamazaki N, Nakai Y, Ihn H, Tomita Y, Uhara H, Takenouchi T, Kiyohara Y, Moroi Y, Yamamoto Y, Otsuka F, Kamiya H, Iizuka H, Hatta N, Kadono T. Prediction of additional lymph node positivity and clinical outcome of micrometastases in sentinel lymph nodes in cutaneous melanoma: A multi-institutional study of 450 patients in Japan. *J Dermatol*, in press.

9. Kajihara I, Jinnin M, Makino T, Honda N, Igata T, Masuguchi S, Fukushima S, Okamoto Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Ihn H. Increased accumulation of thrombospondin-2 due to low degradation activity stimulates type I collagen expression in scleroderma fibroblasts. *Am J Pathol*, in press.

2. 学会発表

江良 択実 (研究代表者)

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)
2. 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
 3. 江良 択実、房木ノエミ 難治性疾患からのiPS細胞の樹立 第10回 日本再生医療学会総会 シンポジウム iPS 細胞・ES 細胞研究の最前線～夢の治療を目指して～東京、2011年 招待講演
 4. 江良 択実 難病研究資源バンクについて 市民・研究者シンポジウム 難病研究と創薬 大阪 2011年
 5. Takumi Era Origin of mesenchymal stem cell. First European Conference on Mesenchymal Stem Cells. Toulouse, France. Nov. 18-20, 2010. (Invited speaker)
 6. Takumi Era Origin of Mesenchymal stem cell. Personalized Stem Cell Medicine- A Canada-California-Japan discussion workshop. San Francisco, USA, 2010. (Invited speaker)
 7. 江良 択実 iPS細胞バンク化事業 内分泌難病対策の今後と難病研究資源バンクの活用 第14回日本内分泌病理学会学術集会 公開サテライトシンポジウム 京都 2010年 招待講演
 8. 江良 択実 iPS細胞の委託作製とバンク化 市民・研究者公開シンポジウム バンク化が拓く、難治性疾患対策の未来 熊本市 2010年
 9. 江良 択実 人工多能性幹細胞(iPS細胞)の委託作製とバンク化 今後の難病対策のあり方に関するシンポジウム 東京 2010年
 10. 江良 択実 人工多能性幹細胞 (iPS細胞)の委託作製とバンク化 シンポジウム難治性疾患の克服に向けて 第28回日本ヒト細胞学会学術集会 つくば市 2010年 招待講演
 11. 江良 択実 多能性幹細胞から間葉系幹細胞への分化 第9回日本再生医療学会総会 シンポジウム 広島 2010年 招待講演
 12. Takumi Era Guided differentiation from ES/iPS cell to mesenchymal stem cell. CIRM(California Institute for Regenerative Medicine)/JST(Japan Science and Technology Agency) Workshop in San Francisco, USA, 2009. (Invited speaker)
 13. 江良 択実 多能性幹細胞を規定する因子群 -臨床応用を見据えて- 多能性幹細胞から組織幹細胞への分化 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 シンポジウム. 神戸 2008年 シンポジウムオルガナイザー、招待講演
 14. 江良 択実 A new aspect of mesenchymal stem cell development 第67回日本癌学会学術総会 招待講演 名古屋 2008年 招待講演
 15. Takumi Era Guided differentiation of ES cell into mesenchymal stem cell 2nd Tecan Symposium in Zurich, Switzerland. 2008. (Invited speaker)
 16. 江良 択実 多能性幹細胞研究における細胞純化 第18回日本サイトメトリー学会学術集会、シンポジウム、東京 2008年 招待講演

房木 ノエミ (研究分担者)

1. N. Fusaki, H. Ban, N. Nishishita, T. Tabata, M. Shikamura, N. Takada, M. Hasegawa, S. Kawamata and S.-I. Nishikawa: "Temperature-sensitive Sendai virus vectors to generate 'immaculate' induced pluripotent stem cells (iPSCs)." Cell Symposia (Lisbon, Portugal), 2011/12.10
2. A. Sugasaki, K. Isono, Y. Oya, H. Jono, N. Shiraki, T. Era, N. Fusaki, M. Tasaki, M. Ueda, S. Shinriki, M. Shono, K. Obayashi, Y. Inomata, S. Kume and Y. Ando. "Generation of familial amyloidotic polyneuropathy-specific induced pluripotent stem cells." VIII International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy. (Kumamoto, Japan), 2011/11.21
3. H. Ban, N. Fusaki, Y. Ueda, A. Iida, M. Inoue and M. Hasegawa. "Development of an artificial controllable Sendai virus-based gene expression system and its application to the field of regenerative medicine." IUMS2011, XV International Congress of Virology, (Sapporo, Hokkaido, Japan), 2011/9.13
4. N. Fusaki, H. Ban, T. Tabata, A. Iida, M. Hasegawa, H. Ihn and T. Era: "Efficient generation of patient-specific iPSCs using temperature-sensitive Sendai virus vectors." International Society of Stem Cell Research Annual Meeting (ISSCR) (Toronto, Canada), 2011/6.16
5. Nishishita, N., Takenaka, C., Shikamura, M., Matsushima, K., Fusaki, N., Kawamata, S. "GENERATION OF ICM-TYPE HUMAN IPS CELL FROM CD34+ CORD BLOOD

- CELLS." ISSCR (Toronto, Canada), 2011/6.17
6. N. Fusaki, H. Ban, T. Tabata, A. Iida, M. Hasegawa, H. Ihn and T. Era: "Efficient generation of vector/transgene free human induced pluripotent stem cells from intractable disease patients using non-integrating Sendai virus vectors." ASGCT (アメリカ遺伝子・細胞治療学会:Seattle, WA, USA), 2011/5.18
 7. Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Koichi Saeki, Toshiaki Tabata, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa.: Simple and Efficient Preparation of Immaculate Human iPS Cells with Transgene-Free and No Chromosomal Damages Using an Extracellular Manipulation System of Genetic Information, PlasmExTM. 13th ASGCT annual meeting, Washington DC, USA 2010/5/22
 8. Hiroshi Ban, Noemi Fusaki, Toshiaki Tabata, Koichi Saeki, Akihiro Iida, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa.: Erasable Non-Integrating RNA Replicon Vectors for Generation of Immaculate iPS Cells Free from Transgenes and Sequence-Interference. 13th ASGCT annual meeting, Washington DC, USA 2010/5/21
 9. Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Toshiaki Tabata, Koichi Saeki and Mamoru Hasegawa: TEMPERATURE SENSITIVE SENDAI VIRUS VECTORS ENABLE TO GENERATE COMPLETELY TRANSGENE-FREE HUMAN IPS CELLS EFFICIENTLY. ISSCR 8th Annual Meeting, San Francisco, USA 2010/6/18
 10. Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Toshiaki

Tabata, Mamoru Hasegawa, Hironobu Ihn and Takumi Era : Comprehensive generation of intractable disease patient-specific induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors for cell banking using non-integrating Sendai virus vectors. Keystone symposium 2011/1.31-2.4

11. 房木ノエミ、長谷川護: Highly efficient generation of transgene-free iPS cells using temperature sensitive Sendai virus RNA vectors. 発生生物学会 (京都) 2010/6/21 (招待講演)

12. Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Koichi Saeki, Toshiaki Tabata and Mamoru Hasegawa: SIMPLE AND EFFICIENT GENERATION OF FOREIGN-GENE-FREE HUMAN iPS CELLS WITHOUT CHROMOSOMAL DAMAGE USING SENDAI VIRUS RNA VECTORS. 日本遺伝子治療学会(宇都宮) 2010/7/1, Plenary

13. Hiroshi Ban, Noemi Fusaki, Akihiro Iida, Yasuji Ueda, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa: AN ERASABLE (HIT-AND-RUN) VECTOR BASED ON RNA REPLICON VIRUSES MAY BE USEFUL IN CELL-PROGRAMING/REPROGRAMING WITHOUT CHROMOSOMAL DAMAGES. 日本遺伝子治療学会(宇都宮)2010/7/1

14. 江良沢実、房木ノエミ : 「難治性疾患由来からのiPS細胞の樹立」日本再生医療学会 2011/3/1 (招待講演)

15. 房木ノエミ、伴 浩志、佐伯 晃一、田畑 寿晃、長谷川 護 細胞質型Sendaiウイルスベクターによる染色体を傷つけない外来因子フリーヒトiPS細胞の

作製 (日本分子生物学会、横浜、2009.12.10)

16. Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Koichi Saeki, Toshiaki Tabata and Mamoru Hasegawa Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using Sendai virus vectors, the RNA virus vectors that do not integrate into the host genome. (Keystone Symposium, 2010.2.16)

17. 房木ノエミ、伴浩志、長谷川護 ゲノムを傷つけないiPS細胞の高効率作製法: センダイウイルスベクターの利用 (日本再生医療学会、広島、招待講演、2010.3.18)

18. 伴浩志、房木ノエミ、佐伯晃一、長谷川護 安全で効率的なiPS細胞誘導: センダイウイルスベクター(SeV)の優位性 (日本再生医療学会、広島、2010.3.18)

西中村 隆一 (研究分担者)

1. Nishinakamura R. Nephron progenitors in the embryonic kidney (invited lecture) The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology. Jun 2, 2011, Fukuoka, Japan.

2. 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

3. 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

尹 浩信 (分担研究者)

1. Ihn H. "Mechanism of Fibrosis" 2011. 5. 24-29 22nd 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)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

江良 択実 (研究代表者)

1. 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. 江良 択実、西川伸一 特許番号 4368572 号
表面細胞マーカーを指標に精製した中胚葉系幹細胞
3. 江良 択実、西川伸一 特許番号 116909 号
内胚葉系幹細胞の調製

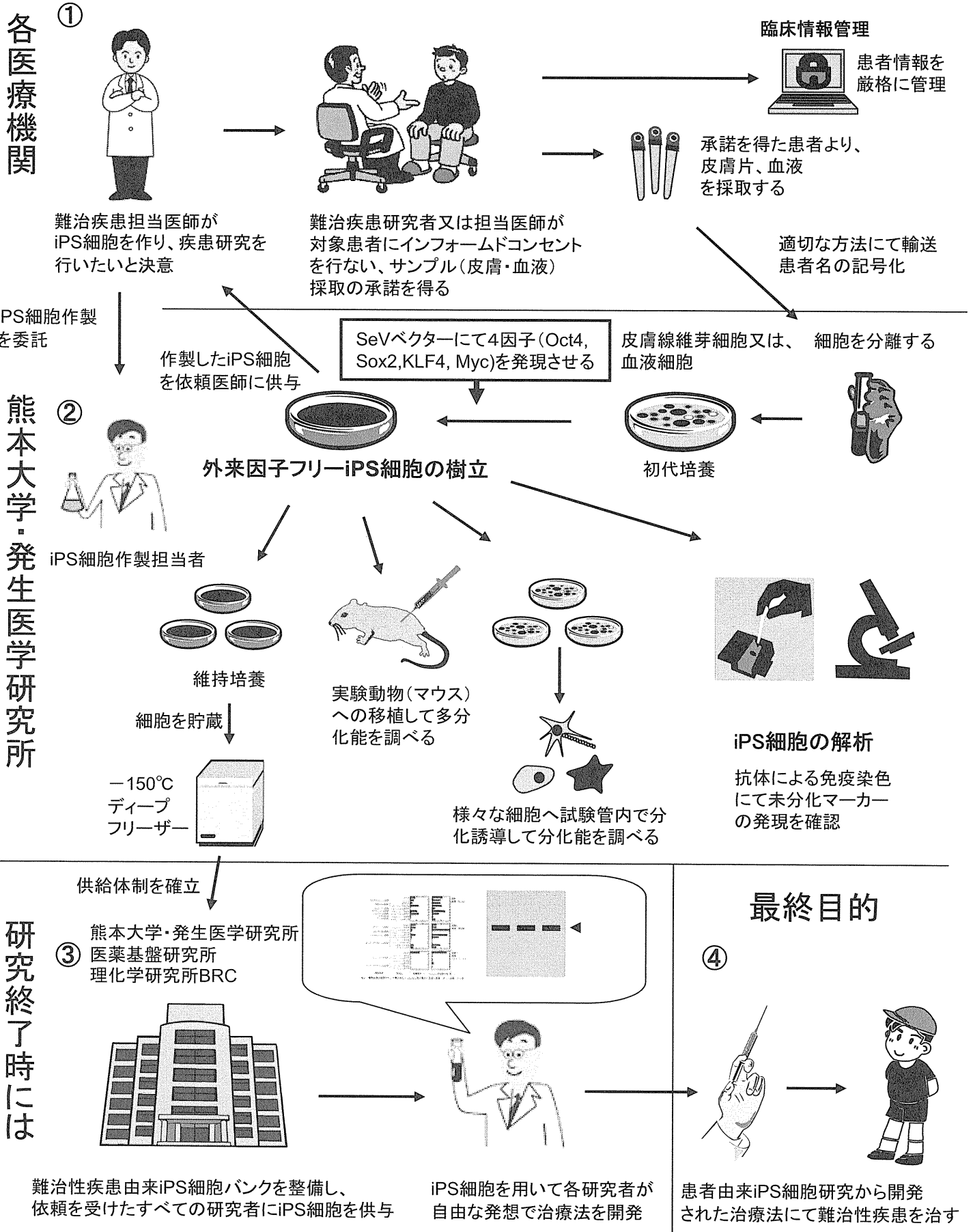
2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

資料1 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



資料2 倫理委員会承認書類

別記様式第6（第10条関係）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査結果通知書

平成23年 9月12日

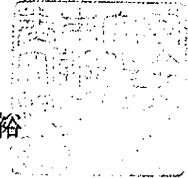
発生医学研究所

幹細胞誘導分野

江良 択実 殿

大学院生命科学研究部長

竹屋 元裕



受付番号 ゲノム第153号〈変更〉（※平成23年8月12日付け変更申請）

課題名 「ヒト疾患由来iPS細胞の樹立とそれを用いた病態解析および治療法の研究」

実施責任者名 発生医学研究所 幹細胞誘導分野 江良 択実 教授

期間 平成21年11月27日から平成24年3月31日まで
（うち試料採取期間は平成24年3月14日まで）

※ゲノム第153号は、一般研究倫理委員会で倫理第335号として審査された研究の遺伝子解析にかかる申請書。

上記研究計画書について、平成23年8月29日の熊本大学大学院生命科学研究部等ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会（迅速審査）の判定に基づき、下記のとおり決定したので通知します。

記

決定内容	許 可	不 許 可	審査対象外	その他
不許可等の理由				

※許可された研究計画を変更しようとする場合はヒトゲノム・遺伝子解析研究計画変更申請書（別記様式第2）を、研究が中止又は終了した場合はヒトゲノム・遺伝子解析研究（中止・終了）報告書（別記様式第3）を提出ください。

疫学・一般研究審査結果通知書

平成23年 9月12日

発生医学研究所

幹細胞誘導分野

江良 択実 殿

大学院生命科学研究部長
竹屋 元裕

受付番号 倫理第335号（変更）（※平成23年8月12日付け変更申請）

課題名 「ヒト疾患由来iPS細胞の樹立とそれを用いた病態解析および治療法の研究」

実施責任者名 発生医学研究所 幹細胞誘導分野 江良 択実 教授

期 間 平成21年11月27日から平成24年3月31日まで

※倫理第335号の

・遺伝子解析については、ゲノム第153号として、ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会で審査。

・皮膚生検については、先進第1018号として、臨床研究・医療技術倫理委員会で審査。

上記研究計画書について、平成23年8月26日の熊本大学大学院生命科学研究部等疫学・一般研究倫理委員会（迅速審査）の判定に基づき、下記のとおり決定したので通知します。

記

決 定 内 容	<input checked="" type="radio"/> 許 可 <input type="radio"/> 不 許 可 <input type="radio"/> 審 査 対 象 外 <input type="radio"/> そ の 他
不 許 可 等 の 理 由	

※研究計画を変更又は中止しようとする場合は疫学・一般研究計画（変更・中止）申請書（別記様式第2）を、研究等を中止又は終了した場合は疫学・一般研究（中止・終了）報告書（別記様式第3）を提出ください。

臨床研究・医療技術審査結果通知書

平成23年 9月12日

発生医学研究所
幹細胞誘導分野
江良 択実 殿

大学院生命科学研究部長
竹屋 元裕

受付番号 先進第1018号〈変更〉（※平成23年8月12日付け変更申請）
課題名 「ヒト疾患由来iPS細胞の樹立とそれを用いた病態解析および
治療法の研究」
実施責任者名 発生医学研究所 幹細胞誘導分野 江良 択実 教授
期 間 平成21年11月27日から平成24年3月31日まで
※先進第1018号は、一般研究倫理委員会で倫理第335号として
審査された研究の皮膚生検にかかる申請書。

上記実施計画書について、平成23年8月26日の熊本大学大学院生命科学研究部等臨床研究・医療技術倫理委員会（迅速審査）の判定に基づき、下記のとおり決定したので通知します。

記

決定内容	許 可 不 許 可 審 査 対 象 外 そ の 他
不許可等の理由	

※実施計画を変更又は中止しようとする場合は臨床研究・医療技術実施計画（変更・中止）申請書（別記様式第2）を、研究等が中止又は終了した場合は臨床研究・医療技術（中止・終了）報告書（別記様式第3）を提出ください。