

201128005A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 畑 龍 俊

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

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 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ティング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、平成21年度より平成23年度までの3年間を研究期間として研究班が組織された。

本年度は3年計画の最終年度に当たり、前年度までの成果を生かして、さらに多くの疾患で皮膚線維芽細胞を樹立し、iPS細胞のソースとした。収集した皮膚線維芽細胞の数は総数で180例に達した。また、分化系もさらに洗練され、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が行われた。疾患解析も順調に進行しており、進行性骨化性線維異形成症、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、病態の理解・創薬につながる成果が上がっている。

今後も、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24年3月 主任研究者 中畑 龍俊

## 目 次

I. 研究組織	1
II. 総括研究報告	3
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 中畑 龍俊	
III. 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	15
高橋 政代	
3. パーキンソン病疾患 iPS 細胞の解析	19
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	21
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	23
高橋 良輔	
6. 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	27
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	31
長船 健二	
8. ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成、疾患研究に関する研究	35
平家 俊男	
9. 疾患特異的 iPS 細胞の創薬探索系への活用	39
中西 淳	
10. iPS 細胞の標準化	41
高橋 和利	
11. 難治性疾患患者由来線維芽細胞株の作成・収集・保管管理および疾患特異的 iPS 細胞の品質に関する研究	43
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）	47
三嶋 理晃	

IV. 研究成果の刊行に関する一覧 ..... 49

V. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 61

# I. 研究組織

平成 23 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
研究代表者	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
	高橋 良輔	京都大学 医学研究科 臨床神経学
	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 生物研究所
	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 23 年度 総括研究報告書



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>前年度から収集を続けている脊髄性進行性筋萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、多発性硬化症、パーキンソン病、後縦靭帯骨化症、多発性嚢胞腎、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、突発性難聴に加えて、モヤモヤ病、脊髄小脳変性症、再生不良性貧血等の新規 6 疾患を対象に、新たな患者 20 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>進行性骨化性線維異形成症、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>ヒト ES 細胞株と 5 ヒト iPS 細胞の遺伝子発現、メチル化 DNA、神経細胞への分化能を調べた。

## 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

本年度は、個々の疾患解析、創薬への応用へより一層注力した。

難治性疾患克服研究事業の対象疾患患者から書面で同意を得た後皮膚などの組織を採取し、疾患特異的iPS細胞を樹立する。樹立に関しては、文科省の研究費と連携させ、重複を避けて国費の有効利用を図る。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、難治性呼吸器疾患などとする。iPS細胞のソースとなる線維芽細胞などは、当センター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ほか、凍結保存法の改善、安全性評価などを行う。

家族性および孤発性パーキンソン病のiPS細胞から分化させたドパミン神経を用いたミトコンドリアの解析、網羅的解析、細胞生物学的な解析、多発性嚢胞腎患者の病態関連候補遺伝子・診断マーカーの開発、腎、肝嚢胞モデル作製、肺リンパ脈管筋腫症の病態解析、網膜色素変性症患者のiPS細胞由来視細胞の形態・細胞死の評価と有効薬剤の探索、疾患由来iPS細胞から分化させた骨・軟骨細胞の表現型・トランスクリプトームあるいはプロテオーム解析、ヒト好中球減少症の病態再現、ALSの神経細胞を用いた網羅的タンパク質発現解析と創薬評価系の構築などを行う。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細胞を作成し、遺伝的背景の多様性を最小限に抑えた解析を行う。

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(aging subtraction)。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、遺伝子改変iPS細胞は、専任の管理者が維持・管理し、個々の解析に用いると同時に、共同研究の申し込みがあった場合、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、日本全体での共同研究を促進する。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。

### (倫理面での配慮)

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：研究結果

【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】

従来の方法のように血清やフィーダーを使用しない、新しい血球分化系を開発した。

また、免疫不全症・造血不全症・小児神経疾患例などから、患者家族を含めて 20 例以上の対象者から iPS 細胞を樹立した。

このうち、自己炎症性症候群であるモザイク型 CINCA 症候群 2 例においては、体細胞モザイクの患者から正常型と遺伝子変異型のクローンを樹立し、その性質を詳細に比較した。骨髄不全症である細網異形成症においては、iPS 細胞の樹立は非常に困難であったが、一時的に遺伝子を補充することによって、iPS 細胞の樹立に成功した。現在これらの iPS 細胞の血球分化能を解析中である。

【網膜変性疾患 iPS 細胞作成、網膜細胞検証】

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 細胞を作製した。

RP1、PRPH2 あるいは RHO 遺伝子の変異を持つ iPS 細胞から誘導した網膜色素上皮 (RPE) 細胞は、RPE 特有の遺伝子である BEST1、RPE65、および RPE とミュラー細胞に発現する CRALBP を発現していた。RPE に特徴的な RPE signature gene 154 個の発現プロファイルをマイクロアレイを用いて検討したところ、市販の胎児 RPE 初代培養細胞よりも高く発現を認めた。

一方、スプライシングファクター遺伝子である RP9 の変異を持つ患者 iPS 細胞由来 RPE は、成長因子の分泌量も低く、RPE signature gene 154 個の発現パターンも他の RPE とは異なっていた。

【パーキンソン病疾患 iPS 細胞の解析】

4 名から iPS 細胞を樹立した。うち 2 名からドパミン神経細胞誘導が可能であった。現在、iPS 細胞としての性質やドパミン神経細胞誘導効率について解析を行っている。

【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】

複数の変異 SOD1 関連 ALS 患者皮膚線維芽細胞より iPS 細胞を樹立した。ALS iPS 細胞より分化誘導した運動ニューロンの一部は、ミスフォールド SOD1 に対する抗体によって染色され、ALS の病理表現型を再現した。アストロサイトマイクロアレイ解析にて、ALS 新規分子パスウェイ・発現

上昇遺伝子を同定した。ALS 両者の解析において共通に変動する遺伝子を同定した。

【パーキンソン病関連特異的 iPS 細胞作製と解析】

健常ヒト由来 iPS 細胞を分化誘導し、ドパミン神経マーカー陽性細胞を得た。これらのドパミン神経細胞の一部に  $\alpha$  シヌクレインおよび LRRK2 が発現していることを確認した。I2020T 変異型 LRRK2 を有する遺伝性 PD 患者由来 iPS 細胞を用いて、1) と同様の方法でドパミン神経への分化誘導を開始した。

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 細胞候補クローンを樹立し、外因性初期化誘導因子のサイレンシングを確認した。LRRK2 変異を有する遺伝性 PD 患者や孤発性 PD 患者からも樹立を開始した。

【難治性骨軟骨疾患特異的 iPS 細胞作製と病態解明】

現在まで後縦靭帯骨化症 2 例、進行性骨化性線維異形成症 (FOP) 4 例、骨形成不全症 1 例の iPS 細胞を作製した。FOP 由来細胞に関しては、明らかに細胞自立的骨分化能が亢進していることが判明した。骨及び軟骨分化への拘束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。

【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】

HAX1 遺伝子異常症の患者細胞由来 iPS 細胞から好中球を分化させ、正常 iPS 細胞から分化した好中球と比較し表現型を確認した。

iPS 細胞からの骨格筋分化法を用い、免疫不全マウスへの細胞移植実験を行い、長期にわたる骨格筋再生能を確認した。また、昨年度樹立した DMD 患者由来 iPS 細胞の骨格筋や心筋細胞への分化誘導を行った。

【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 (ADPKD) 患者から樹立した iPS 細胞株 7 株のうち、脳動脈瘤合併 ADPKD 特異的 iPS 細胞株 4 株と非合併 iPS 細胞株 3 株由来の血管細胞間の遺伝子発現の比較を行ったところ、脳動脈瘤合併例の内皮細胞で 18 種、血管平滑筋細胞で 7 種の発現上昇を認める遺伝子が同定された。現在、それらの同定された分子を用いた新規診断法開発や治療標的分子としての活用を検討している。

顕微鏡的多発血管炎に関しては、3 例から iPS 細胞を樹立し、病態関連細胞種である血管内皮細胞および好中球への分化誘導が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】

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、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、高安静脈炎、突発性難聴に加えて、モヤモヤ病、脊髄小脳変性症、再生不良性貧血等の新規6疾患を対象に、新たな患者20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およびEpisomal vector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。

#### 【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、上記株における遺伝子発現、メチル化DNAを調べた。

#### 【創薬探索系への活用】

ヒトiPS細胞から運動神経前駆細胞を効率よく誘導する化合物、さらに運動神経の成熟化を促す化合物の探索を開始した。

ALS患者由来iPS細胞の総タンパク質およびミトコンドリア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、正常iPS細胞と比較してALS患者由来iPS細胞において発現が変動するタンパク質を同定した。

#### 【呼吸器疾患特異的iPS細胞作製】

びまん性肺疾患26症例（うちLAM1例、BHD1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、計10検体）した。マウス及びヒトiPS細胞より、SP-C（サーファクタント）産生性の肺胞上皮細胞の誘導を確認した。

#### D：考察

本年度も、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前年度以上に順調に進行した。iPS細胞の標準化についても、遺伝子発現、エピゲノム解析などで新しい知見を得ることができた。

患者iPS細胞を用いた病態解析も本格化しており、創薬につながる成果や、疾患の本態を理解する上で重要な成果が報告されている。従来の手法では解明しえなかった、様々な結果を生かし、さらに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。分担研究者間における分化系や細胞の共有化も積極的に進められており、班全体として成果が上がっている。

#### E：結論

本年度は前年度の成果を生かし、さらに疾患の幅を広げるとともに、本格的な病態解析が進んでいる。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. 論文発表

1. Morishima T., Watanabe K., 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.* 226(5):1283-1291, 2011.
2. Heike T., Saito M., Nishikomori R., Yasumi T., Nakahata T.: Autoinflammatory diseases—a new entity of inflammation. *Inflammation and Regeneration* 31:125-136, 2011.
3. Yamanaka Y., Kitano A., Takao K., Prasansuklab A., Mushiroda T., Yamazaki K., Kumada T., Shibata M., Takaoka Y., Awaya T., Kato T., Nakahata T., Heike T.: Inactivation of fibroblast growth factor binding protein 3 causes anxiety-related behaviors. *Mol. Cell. Neurosci.* 46:200-212, 2011.
4. Kamio T., Ito E., Ohara A., Kosaka Y., Tsuchida M., Yagasaki H., Mugishima H., Yabe H., Morimoto A., Ohga S., Muramatsu H., Hama A., Kaneko T., Nagasawa M., Kikuta A., Osugi Y., Bessho F., Nakahata T., Tsukimoto I., Kojima S.: Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica* 96: 814-819, 2011.
5. Wakao S., Kitada M., Kuroda Y., Shigemoto T., Matsuse D., Akashi H., Tanimura Y., Tsuchiyama K., Kikuchi T., Goda M., Nakahata T., Fujiyoshi Y., Dezawa M.: Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse) cells are a primary source of iPS cells in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:9875-9880, 2011.
6. Yoshida N., Yagasaki H., Hama A., Takahashi Y., Kosaka Y., Kobayashi R., Yabe H., Kaneko T., Tsuchida M., Ohara A., Nakahata T., Kojima S.: Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica* 96: 771-774, 2011.
7. Kawagoe S., Higuchi T., Xing-Li M., Shimada Y., Dhimizu H., Fukuda T., Chang H., Nakahata T., Fukuda S., Ida H., Ohashi T., Eto Y.: Generation

- of induced pluripotent stem (iPS) cells derived from a murine model of Pompe disease and differentiation of Pompe-iPS cells into skeletal muscle cells. *Mol. Genet. Metab.* 104: 123-128, 2011.
8. Niwa A., Heike T., Umeda K., Oshima K., Kato I., Sakai H., Suemori H., Nakahata T., Saito M.: A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS ONE* 6(7):e22261, 2011.
  9. Murata Y., Yasumi T., Shirakawa R., Izawa K., Sakai H., Abe J., Tanaka N., Kawai T., Oshima K., Saito M., Nishikomori R., Ohara O., Ishii E., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.: Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc 13-4 protein. *Blood* 118: 1225-1230, 2011.
  10. Yahata N., Asai M., Kitaoka S., Takahashi K., Asaka I., Hioki H., Kaneko T., Maruyama K., Saido T.C., Nakahata T., Asada T., Yamanaka S., Iwata N., Inoue H.: Anti-A $\beta$  Drug Screening Platform Using Human iPS Cell-Derived Neurons for the Treatment of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 6(9):e25788, 2011.
  11. Kato I, Niwa A, Heike T, Fujino H, Saito MK, Umeda K., Hiramatsu H., Ito M., Morita M., Nishinaka Y., Adachi S., Ishikawa F., Tatsutoshi Nakahata T.: Identification of Hepatic Niche Harboring Human Acute Lymphoblastic Leukemic Cells via the SDF-1/CXCR4 Axis. *PLoS ONE* 6(11): e27042, 2011.
  12. Tanaka N., Nishikomori R., Saito M., Izawa K., Sakuma M., Morimoto T., Kambe N., Watanabe S., Oshima K., Ohara O., Goldbach-Mansky R., Aksentijevich I., Arostegui J.I., Yague Jm Joost F., van Gijn M.E., SaintBasile G., Pontillo A., Kawai T., Yasumi T., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.: High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome patients; the results of an international multicenter collaborative study. *Arthritis Rheum.* 63:3625-3632,2011.
  13. Hiejima E., Komatsu H., Takeda Y., Sogo T., Inui A., Okafuji I., Nishikomori R., Nakahata T., Fujisawa T.: Acute liver failure in young children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis without macrophage activation syndrome: Report of two cases. *J. Pediatr. Child Health in press.*
  14. Sakai H., Okafuji I., Nishikomori R., Abe J., Izawa K., Kambe N., Yasumi T., Nakahata T., Heike T.: The CD40-CD40L axis and INF-g play critical roles in Langerhans giant cell formation. *Int. Immunol. In press.*
  15. 中畑龍俊: 対談「血液および血液疾患を語る(22) 造血幹細胞の体外増幅—iPS細胞の応用も含めて—」。最新医学 66(1):123-132, 2011.
  16. 大封智雄, 渡邊健一郎, 加藤格, 瓜生久美子, 徳舛麻友, 梅田雄嗣, 松原央, 足立壮一, 岡本晋弥, 上本伸二, 中畑龍俊: 治療前に胸水を伴った Wilms 腫瘍の一女児例. *小児がん* 48(1): 28-31, 2011.
  17. 中畑龍俊: iPS 細胞は長寿へ導く夢のタイムマシンである(特集 02 カラダを再生する画期的な細胞の誕生). *Back Up* 30:8-12, 2011.
  18. 中畑龍俊: 小児医療をめぐる最先端医学 iPS 細胞を用いた今後の医療。(特集 小児医療の最先端—これからの新たな展望—) *東京小児科医学会報* 29 (3): 26-33, 2011.
  19. 中畑龍俊: 幹細胞に魅せられて。(リレー随想) *小児科臨床* 64(7): 1638-1645, 2011.
  20. 加藤元博, 真田昌, 加藤格, 佐藤康晴, 滝田順子, 竹内賢吾, 丹羽明, 陳玉彦, 中崎久美, 野本順子, 朝倉義崇, 赤塚美紀, 林泰秀, 森啓, 五十嵐隆, 黒川峰夫, 千葉滋, 森茂郎, 石川雄一, 岡本康司, 飛内賢正, 中釜斉, 中畑龍俊, 吉野正, 小林幸夫, 小川誠司: B 細胞性悪性リンパ腫における A20 の遺伝子変異による不活性化. *臨床血液* 52 (6):313-319, 2011.
  21. 中畑龍俊: iPS 細胞の臨床応用の展望. *BIO Clinica* 26 (9):16-17 2011.
  22. 中畑龍俊: 疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子治療・個別化医療. *小児科* 52 (12):1743-1749, 2011.
  23. 中畑龍俊: 再生医療の進歩(II 再生医療の進歩). *小児科診療* 75(1):57-63, 2012.
2. 学会発表
    1. Morishima T., Watanabe K., 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.* 226(5):1283-1291, 2011.
    2. Heike T., Saito M., Nishikomori R., Yasumi T., Nakahata T.: Autoinflammatory diseases—a new entity of inflammation. *Inflammation and Regeneration* 31:125-136, 2011.
    3. Yamanaka Y., Kitano A., Takao K., Prasansuklab A., Mushiroda T., Yamazaki K., Kumada T., Shibata M., Takaoka Y., Awaya T., Kato T., Nakahata T., Heike T.: Inactivation of fibroblast growth factor binding protein 3 causes anxiety-related behaviors. *Mol. Cell. Neurosci.* 46:200-212,2011.
    4. Kamio T., Ito E., Ohara A., Kosaka Y., Tsuchida M., Yagasaki H., Mugishima H., Yabe H., Morimoto A., Ohga S., Muramatsu H., Hama A., Kaneko T., Nagasawa M., Kikuta A., Osugi Y., Bessho F., Nakahata T., Tsukimoto I., Kojima S.: Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica* 96: 814-819, 2011.
    5. Wakao S., Kitada M., Kuroda Y., Shigemoto T., Matsuse D., Akashi H., Tanimura Y., Tsuchiyama K., Kikuchi T., Goda M., Nakahata T., Fujiyoshi Y., Dezawa M.: Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse) cells are a primary source of iPS cells in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:9875-9880, 2011.
    6. Yoshida N., Yagasaki H., Hama A., Takahashi Y., Kosaka Y., Kobayashi R., Yabe H., Kaneko T.,

- Tsuchida M., Ohara A., Nakahata T., Kojima S.: Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica* 96: 771-774, 2011.
7. Kawagoe S., Higuchi T., Xing-Li M., Shimada Y., Dhimizu H., Fukuda T., Chang H., Nakahata T., Fukada S., Ida H., Ohashi T., Eto Y.: Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells derived from a murine model of Pompe disease and differentiation of Pompe-iPS cells into skeletal muscle cells. *Mol. Genet. Metab.* 104: 123-128, 2011.
  8. Niwa A., Heike T., Umeda K., Oshima K., Kato I., Sakai H., Suemori H., Nakahata T., Saito M.: A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS ONE* 6(7):e22261, 2011.
  9. Murata Y., Yasumi T., Shirakawa R., Izawa K., Sakai H., Abe J., Tanaka N., Kawai T., Oshima K., Saito M., Nishikomori R., Ohara O., Ishii E., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.: Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc 13-4 protein. *Blood* 118: 1225-1230, 2011.
  10. Yahata N., Asai M., Kitaoka S., Takahashi K., Asaka I., Hioki H., Kaneko T., Maruyama K., Saido T.C., Nakahata T., Asada T., Yamanaka S., Iwata N., Inoue H.: Anti-A $\beta$  Drug Screening Platform Using Human iPS Cell-Derived Neurons for the Treatment of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 6(9):e25788, 2011.
  11. Kato I, Niwa A, Heike T, Fujino H, Saito MK, Umeda K., Hiramatsu H., Ito M., Morita M., Nishinaka Y., Adachi S., Ishikawa F., Tatsutoshi Nakahata T.: Identification of Hepatic Niche Harboring Human Acute Lymphoblastic Leukemic Cells via the SDF-1/CXCR4 Axis. *PLoS ONE* 6(11): e27042, 2011.
  12. Tanaka N., Nishikomori R., Saito M., Izawa K., Sakuma M., Morimoto T., Kambe N., Watanabe S., Oshima K., Ohara O., Goldbach-Mansky R., Aksentjevich I., Arostegui J.I., Yague Jm Joost F., van Gijn M.E., SaintBasile G., Pontillo A., Kawai T., Yasumi T., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.: High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome patients; the results of an international multicenter collaborative study. *Arthritis Rheum.* 63:3625-3632,2011.
  13. Hiejima E., Komatsu H., Takeda Y., Sogo T., Inui A., Okafuji I., Nishikomori R., Nakahata T., Fujisawa T.: Acute liver failure in young children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis without macrophage activation syndrome: Report of two cases. *J. Pediatr. Child Health* in press.
  14. Sakai H., Okafuji I., Nishikomori R., Abe J., Izawa K., Kambe N., Yasumi T., Nakahata T., Heike T.: The CD40-CD40L axis and INF-g play critical roles in Langerhans giant cell formation. *Int. Immunol.* In press.
  15. 中畑龍俊: 対談「血液および血液疾患を語る(22) 造血幹細胞の体外増幅—iPS 細胞の応用も含めて—」. *最新医学* 66(1):123-132, 2011.
  16. 大封智雄、渡邊健一郎、加藤格、瓜生久美子、徳舛麻友、梅田雄嗣、松原央、足立壮一、岡本晋弥、上本伸二、中畑龍俊: 治療前に胸水を伴った Wilms 腫瘍の一女兒例. *小児がん* 48(1): 28-31, 2011.
  17. 中畑龍俊: iPS 細胞は長寿へ導く夢のタイムマシンである(特集 02 カラダを再生する画期的な細胞の誕生). *Back Up* 30:8-12, 2011.
  18. 中畑龍俊: 小児医療をめぐる最先端医学 iPS 細胞を用いた今後の医療.(特集 小児医療の最先端—これからの新たな展望—) *東京小児科医会報* 29(3): 26-33, 2011.
  19. 中畑龍俊: 幹細胞に魅せられて.(リレー随想) *小児科臨床* 64(7): 1638-1645, 2011.
  20. 加藤元博、真田昌、加藤格、佐藤康晴、滝田順子、竹内賢吾、丹羽明、陳玉彦、中崎久美、野本順子、朝倉義崇、赤塚美紀、林泰秀、森啓、五十嵐隆、黒川峰夫、千葉滋、森茂郎、石川雄一、岡本康司、飛内賢正、中釜斉、中畑龍俊、吉野正、小林幸夫、小川誠司: B 細胞性悪性リンパ腫における A20 の遺伝子変異による不活性化. *臨床血液* 52(6):313-319, 2011.
  21. 中畑龍俊: iPS 細胞の臨床応用の展望. *BIO Clinica* 26(9):16-17 2011.
  22. 中畑龍俊: 疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子治療・個別化医療. *小児科* 52(12):1743-1749, 2011.
  23. 中畑龍俊: 再生医療の進歩(Ⅱ再生医療の進歩). *小児科診療* 75(1):57-63, 2012.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 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
- 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

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

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

### Ⅲ. 平成 23 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 特定拠点講師）

## 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-1b 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、レトロウイルスベクター・エピソーマルベクター法を用いてトランスジーンを導入し、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。

また、血球分化の正確な評価を行うため、フィーダー・血清を用いない血球分化系の開発も行った。

さらに、疾患を横断的に理解するため、神経系や脂肪細胞への分化系を導入し、血球とこれらの細胞種との相互作用を検討する。

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

我々は、従来の方法のように血清やフィーダーを使用しない、新しい血球分化系を開発した。この系は簡便であり、かつ再現性が高く、骨髄球・赤芽球・巨核球への分化を行うことができた。

また、免疫不全症・造血不全症・小児神経疾患例などから、患者家族を含めて 29 例の対象者から iPS 細胞を樹立した。

このうち、自己炎症性症候群であるモザイク型 CINCA 症候群 2 例においては、体細胞モザイクの患

者から正常型と遺伝子変異型のクローンを樹立し、その性質を詳細に比較した。変異型クローンでは、炎症性サイトカインである IL-1b が高値であり、様々な既知の阻害剤によって阻害可能であったことから、創薬スクリーニングに有用な系が確立されたと考えている。

骨髄不全症である細網異形成症においては、iPS 細胞の樹立は非常に困難であったが、一時的に遺伝子を補充することによって、iPS 細胞の樹立に成功した。現在これらの iPS 細胞の血球分化能を解析中である。

以上のように平成23年度までの研究は順調に目標を達成している。いくつかの疾患では病態再現が達成されたので、さらに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られる。複数の疾患で iPS 細胞の病態再現を行うことができたが、この成果を次年度以降に生かすために、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

Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T, Saito MK\*. A Novel Serum-Free Monolayer Culture for Orderly Hematopoietic Differentiation of Human Pluripotent Cells via Mesodermal Progenitors. PLoS One. 2011;6(7):e22261. Epub 2011 Jul 27.

齋藤潤、平家俊男. iPS 細胞を用いた再生医療 小児科診療 75 巻 1 号 pp102-106,2011

齋藤潤 【iPS 細胞の臨床応用の展望】 疾患特異的 iPS 細胞の臨床応用 BIO Clinica 26 巻 9 号 pp796-800, 2011

齋藤潤 CAPS：クライオパイリン関連周期熱症候群 日本臨床免疫学会会誌 34 巻 5 号 pp.369-377,2011

##### 2. 学会発表

Takayuki Tanaka, et al. DISEASE MODELING WITH INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS REVEALS THE PATHOGENESIS OF SOMATIC MOSAICISM IN AN NLRP3-DRIVEN AUTOINFLAMMATORY SYNDROME. ISSCR, Toronto, Canada (June,2011)

Megumu Saito, et al. DISEASE MODELING OF A NLRP3-DRIVED AUTOINFLAMMATORY DISEASE WITH INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS. IAIS, Paris, France (June,2011)

#### F. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

##### 1. 特許取得

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

出願日：2010/11/18

出願番号：61/415,102

出願国：米国

発明者：中畑龍俊/齋藤潤/田中孝之/山中伸弥

備考：CINCA 症候群の疾患 iPS 細胞に関連する特許出願

発明の名称：多能性幹細胞から樹状細胞への分化誘導法

出願日：2011/2/23

出願番号：61/445,856

出願国：米国

発明者：中畑龍俊/斎藤潤/丹羽明/柳町昌克

備考：樹状細胞の分化誘導方法

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 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。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。

我々は、過去に原因遺伝子の判明している網膜色素変性の患者から疾患特異的 iPS 細胞を作製し、網膜細胞を分化誘導し、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ること、また遺伝子変異のある視細胞のみが分化誘導後にアポトーシスを呈し細胞数の減少することを認めた。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、原因遺伝子によってビタミンの効果が異なることを報告した。

本年度は上記と同じ各患者 iPS 細胞から網膜色素上皮細胞（RPE）を分化誘導し、それぞれの成長因子分泌能や貪食能、RPE に特徴的な 154 個の遺伝子セットについてマイクロアレイを用いて発現プロファイルを比較した。その結果、RP9 遺伝子の変異による網膜色素変性患者 iPS 細胞から分化した RPE のみが発現プロファイルが異なり、そのほかロドプシンや RP1, PRPH2 の遺伝子変異の患者 iPS 細胞由来 RPE では iPS 細胞の作成法に関わらずほぼ同様の発現プロファイルが認められた。

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網膜色素変性は遺伝性疾患であり、多数の原因遺伝子が報告されているものの、視細胞の変性機序に関してはほとんど解明されていない。

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している。

昨年までの視細胞分化誘導に加え、本年度は患者 iPS 細胞から RPE を分化誘導し、その性質を比較した。

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 細胞から RPE を分化誘導し、色調でピックアップして純化した。それぞれの成長因子分泌能を ELISA 法で、貪食能は蛍光マイクロビーズを貪食させる方法で、さらにマイクロアレイを用いて RPE に特徴的な 154 個の遺伝子セットの発現プロファイルなどを比較検討した。

（倫理面への配慮）

倫理面では患者の遺伝子診断及び iPS 細胞作製の