

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
総合研究報告書

先天性異常の疾患群の診療指針と治療法開発をめざした
疾患 iPS 細胞の作製

研究分担者 赤松和土 慶應義塾大学 医学部 講師

研究要旨

先天性異常疾患群領域の難病研究班10班の疾患特異的研究者と、各地の成育医療施設で包括的に先天異常患者の診療に従事しつつ多数班の研究分担者として研究を支えている専門医群の両者を含む重層的・複合的な臨床研究ネットワーク体制を構築し、課題を組織的・体系的に解決する。研究チーム内での分担研究者の役割は疾患特異的iPS細胞の樹立と蓄積である。分担者は末梢血由来のiPS細胞が良好に神経分化して神経疾患の症状を再現可能であることを示し、さらにストックと増殖が可能な不死化リンパ芽球から誘導したiPS細胞も同様であることを示した。すなわち今後のiPS細胞の樹立は末梢血が第一選択となり当研究班内ですでに蓄積されている不死化リンパ芽球ストックがiPS細胞研究リソースとして用いることができると考えられた。ハイスループットなiPS細胞の樹立方法の確立に成功した。

A . 研究目的

本計画では、先天性異常疾患群領域の難病研究班10班の疾患特異的研究者と、各地の成育医療施設で包括的に先天異常患者の診療に従事しつつ多数班の研究分担者として研究を支えている専門医群の両者を含む重層的・複合的な臨床研究ネットワーク体制を構築し、課題を組織的・体系的に解決する。分担者の研究チーム内での分担研究者の役割は疾患特異的iPS細胞の樹立と蓄積である。

B . 研究方法

1. 本年度は研究リソースとしての iPS 細胞の可能性を広げるため、また、協力患者の拡大を図るために、侵襲の少ない末梢血を用いた以下の方法の最適化を行った。

末梢血からの iPS 細胞の樹立と神経分化

健康成人から末梢血を採取し、CD3陽性のT細胞を純化し、センダイウイルスを用いて遺伝子導入を行いiPS細胞を樹立した。樹立したT細胞由来のiPS細胞を神経分化誘導を行い、疾患解析に用いることが可能かを検討した。

不死化リンパ芽球株からの iPS 細胞の樹立と神経分化

健康成人からEBVを用いて作成した**不死化リンパ芽球株**に遺伝子導入を行いiPS細胞を樹立した。樹立したT細胞由来のiPS細胞を神経分化誘導を行い、疾患解析に用いることが可能かを検討した。

2. 文部科学省再生医療実現拠点ネットワークプログラム疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研

究「疾患特異的 iPS 細胞技術を用いた神経難病研究」拠点との連携

H24 年度に採択された上記拠点との連携を促進した。本研究班では下記の 5 課題が共同研究課題として拠点と連携している。

Prader-Willi 症候群患者由来の iPS 細胞を用いた疾患発生機序の解明と創薬

Rubinstein-Taybi 症候群 iPS 細胞を用いた新規治療薬開発

Angelman 症候群 iPS 細胞を用いた疾患発生機序の解明と新規治療薬開発

コステロ症候群の発症機序の解明及び薬物治療法開発

CFC 症候群の発症機序の解明及び薬物治療法開発

3. ハイスループットな iPS 細胞の樹立方法の確立

血液細胞・**不死化リンパ芽球株からの iPS 細胞**の樹立方法をさらに簡便化し、多くの症例（～100 症例）の体細胞を一度に iPS 細胞化する樹立系の確立を目指した。1000 個の細胞をセンダイウイルスを用いてリプログラミングし 96well プレート上で約 20 日間で iPS 細胞の樹立を試みた。

(倫理面への配慮)

動物の飼育・管理は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行われている。また、当研究室におけるヒト ES 細胞の使用については、文部科学省の「ヒト ES 細胞の樹立及び使用

に関する指針」に基づき、平成 19 年 10 月 31 日に「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学の基礎的研究」として承認され、研究計画はそれに準拠したものとなっている。患者からの iPS 細胞の樹立は「神経疾患患者からの iPS 細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究」として慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を受けており（2008 年 6 月）十分な説明の上で患者の同意の下で行われる。他施設との共同研究においては当該施設においても倫理委員会の承認を受けている。

C . 研究結果

1.末梢血・不死化リンパ芽球由来 iPS 細胞の神経分化

T 細胞から誘導した iPS 細胞は良好に神経分化誘導が可能であり、十分な数のニューロンが誘導された。また、この細胞をアストロサイトと 30 日間共培養することにより、誘導されたニューロンから活動電位を検出することに成功した。さらに、遺伝性パーキンソン病患者末梢血から誘導した iPS 細胞を神経細胞へ分化誘導し、線維芽細胞由来の iPS 細胞から誘導したニューロンで確認されていたミトコンドリアの機能異常再現することに成功した。これらの結果から T 細胞由来 iPS 細胞は従来の線維芽細胞由来の細胞と同様に神経疾患の病態解析に使用可能と考えられる。

不死化リンパ芽球から誘導した iPS 細胞も良好に神経分化誘導が可能であり、これまでの解析では EBV による不死化の影響は分化細胞では従来の（不死化していない）血液細胞由来の iPS 細胞と比較して有意な差を認めていない。遺伝性パーキンソン病患者の表現型を同じ患者の**不死化リンパ芽球株から樹立した iPS 細胞でも再現した**。これらの結果から T 細胞由来 iPS 細胞・不死化リンパ芽球は従来の線維芽細胞由来の細胞と同様に神経疾患の病態解析に使用可能と考えられた。

2.共同研究医課題の中で Prader-Willi 症候群に関してはこれまで 3 例の iPS 細胞を樹立し、解析が進行中である。Angelman 症候群に関しては 3 検体から iPS 細胞を樹立し、現在使用する細胞株の選定を行っている。

3.ハイスルーブットな iPS 細胞の樹立方法の確立 1000 個の T 細胞を 96well 上で約 10 日間で iPS 細胞化することに成功した。さらに培地交換のみで約 25 日間で神経細胞への分化誘導を 96well プレート上で行う培養系を開発した。

D . 考察

末梢血から作製した iPS 細胞は、T 細胞由来だけでなく、不死化リンパ芽球由来線維芽細胞由来の iPS 細胞も、従来の線維芽細胞由来 iPS

細胞とほぼ同様の分化誘導能力を示し、十分に疾患解析に用いることが出来るのではないかと考えられる。

今後は、より侵襲の低い採血で iPS 細胞が樹立できるという点を患者に周知し、協力を募っていく。受診のタイミングが合わない場合、樹立施設との連携が困難な受診施設では、不死化リンパ芽球化（SRLに依頼可能）を行い。ストックしておくことを検討すべきであろう。現在当研究班内でも不死化リンパ芽球ストックは数多く保有されており、不死化リンパ芽球からの iPS 細胞の樹立および神経分化誘導に成功したことはそれら全てが iPS 細胞研究リソースとして用いることができる可能性を開く重要な結果である。

さらに、今回開発したハイスルーブットな iPS 細胞の樹立方法の開発により、従来は数症例が限界であった iPS 細胞の樹立を一気に簡略化することができた。この方法を用いて疾患に対する遺伝子異常の寄与が高くない症候群の iPS 細胞を多検体で（>100 症例）樹立し、統計学的処理を行うことにより従来は不可能であった疾患研究を展開することが可能になる。

E . 結論

末梢血由来の細胞からの iPS 細胞は線維芽細胞と似た性質を持つことが確認され、検体採取に末梢血を用いることにより、研究協力を得やすいのではないかと考えられた。また、患者血液の不死化リンパ芽球化を予め行っておくことにより、樹立施設へ即時検体が運搬することが難しい施設でも研究参加が可能であると考えられた。さらに、当研究班内ですでに蓄積されている不死化リンパ芽球ストックが iPS 細胞研究リソースとして用いることができると考えられる。また、今回開発した新しいハイスルーブットな樹立方法を用いることにより、従来不可能であった遺伝子異常の病態への寄与が大きくない疾患に対しても iPS 細胞を用いた疾患研究が可能になると思われる。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsui T, Takano M, Yoshida K, Ono S, Fujisaki C, Matsuzaki Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H, **Akamatsu W**. Neural stem cells directly differentiated from partially reprogrammed fibroblasts rapidly acquire gliogenic competency. **Stem Cells**. 2012 Jun;30(6):1109-19. (W.A. is Corresponding author)
- 2) Yagi T, Kosakai A, Ito D, Okada Y, **Akamatsu W**, Nihei Y, Nabetani A, Ishikawa F, Arai Y, Hirose N, Okano H, Suzuki N. Establishment of induced pluripotent stem cells from centenarians for neurodegenerative disease research. **PLoS One**. 2012;7(7):e41572.

- 3) Imamura M, Okuno H, Tomioka I, Kawamura Y, Lin ZY, Nakajima R, **Akamatsu W**, Okano HJ, Matsuzaki Y, Sasaki E, Okano H. Derivation of induced pluripotent stem cells by retroviral gene transduction in Mammalian species. **Methods Mol Biol.** 2012;925:21-48.
- 4) Matsui T, **Akamatsu W**, Nakamura M, Okano H. Regeneration of the damaged central nervous system through reprogramming technology: Basic concepts and potential application for cell replacement therapy. **Exp Neurol.** 2012 Oct 1. pii: S0014-4886(12)00378-0.
- 5) Imaizumi Y, Okada Y, **Akamatsu W**, Koike M, Kuzumaki N, Hayakawa H, Nihira T, Kobayashi T, Ohyama M, Sato S, Takanashi M, Funayama M, Hirayama A, Soga T, Hishiki T, Suematsu M, Yagi T, Ito D, Kosakai A, Hayashi K, Shouji M, Nakanishi A, Suzuki N, Mizuno Y, Mizushima N, Amagai M, Uchiyama Y, Mochizuki H, Hattori N, Okano H. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. **Mol Brain.** 2012 Oct 6;5(1):35.
- 6) Veraitch O, Kobayashi T, Imaizumi Y, **Akamatsu W**, Sasaki T, Yamanaka S, Amagai M, Okano H, Ohyama M. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Ectodermal Precursor Cells Contribute to Hair Follicle Morphogenesis In Vivo. **J Invest Dermatol.** 2013 Jan 15. doi: 10.1038/jid.2013.7. [Epub ahead of print]
- 7) Nihei Y, Ito D, Okada Y, **Akamatsu W**, Yagi T, Yoshizaki T, Okano H, Suzuki N. Enhanced aggregation of androgen receptor in induced pluripotent stem cell-derived neurons from spinal and bulbar muscular atrophy. **J Biol Chem.** 2013 Jan 30.
- 8) Ohta S, Imaizumi Y, **Akamatsu W**, Okano H, Kawakami Y. Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. **Methods Mol Biol.** 2013;989:193-215. doi: 10.1007/978-1-62703-330-5_16.
- 9) Higurashi N, Uchida T, Christoph L, Misumi Y, Okada Y, **Akamatsu W**, Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K, Mori M, Katsurabayashi S, Shirasaka S, Okano H and Hirose S: A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. **Mol Brain** 6:19. 2013
- 10) Kim C, Kim W, Lee H, Ji E, Choe YJ, Martindale JL, **Akamatsu W**, Okano H, Kim HS, Nam SW, Gorospe M, Lee EK: The RNA binding protein, HuD regulates autophagosome formation in pancreatic β cells by promoting autophagy-related gene 5 expression. **J Biol Chem.** 289: 112-121. 2014
- 11) Bundo M, Toyoshima M, Ueda J, Nemoto-Miyake T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Okada Y, **Akamatsu W**, Kato M, Okano H, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K: Increased L1 Retrotransposition in the neuronal genome in Schizophrenia. **Neuron** 81: 306-313. 2014
- 12) DeBoer E, Azevedo R, Vega T, Brodtkin J, **Akamatsu W**, Okano H, Wagner G, Rasin MR. Prenatal deletion of the RNA binding protein HuD disrupts postnatal cortical circuit maturation and behavior. **J Neurosci.** (in press)
2. 学会発表
 □頭発表
 (招待講演)
- 1) **赤松和土**: 多能性幹細胞由来神経幹細胞を用いた神経系の再生医療の展望 第116回日本眼科学会総会・シンポジウム13 基礎研究セミナー、2012年4月6日(東京・東京国際フォーラム)
- 2) **赤松和土**: 日本分子生物学会第12回春期シンポジウム 多能性幹細胞から神経幹細胞を生み出す分子機構とその応用 2012年4月26日
- 3) **赤松和土**: 幹細胞生物学を応用した神経疾患 病態研究 第53回日本神経学会大会・シンポジウムS(1)_4: ALS に対する再生医療の開発、2012年5月23日(東京・東京国際フォーラム)
- 4) **赤松和土**: 招待講演: 多能性幹細胞・神経幹細胞を用いた再生医療と病態解析: 愛知医科大学 細胞治療研究会 2013年3月5日 愛知
- 5) **赤松和土**: シンポジウム 疾患特異的 iPSC 細胞を用いた病態解明および治療法確立研究: 神経疾患患者由来細胞からの神経系細胞の誘導と病態解析: 日本再生医療学会総会 2013年3月22日 横浜
- 6) **赤松和土**, 岡野 栄之: シンポジウム 45 iPSC 細胞技術を用いた中枢神経系の再生と創薬研究: iPSC technology-based cell therapy for damaged CNS and investigation of neural disorders.: 第90回日本生理学会大会 2013年3

月 29 日東京

- 7) **赤松 和土**：特別講演：iPS細胞技術の神経疾患研究・治療への応用 第116回日本小児科学会学術集会2013年4月19日 広島
- 8) **赤松 和土**：招待講演：題名未定 第11回横浜小児先端医療セミナー 2013年5月24日 横浜
- 9) **赤松 和土**：招待講演：iPS細胞技術を用いた神経系の再生医療と疾患解析 第2回小児泌尿器科研究会 2013年6月1日 東京
- 10) **赤松 和土**：招待講演：iPS細胞を使った神経疾患の治療法の開発：第20回東京血管疾患研究所セミナー 2013年6月8日 東京
- 11) **赤松 和土**：シンポジウム 疾患iPS細胞と創薬：神経疾患患者由来細胞からの神経系細胞の誘導と病態解析：炎症再生学会 2013年7月2日 京都
- 12) **赤松 和土**：シンポジウム：「iPS

technology-based regenerative medicine for damaged central nervous system」第11回遺伝子治療学会シンポジウム **遺伝子治療学会** 2013年7月6日 岡山

- 13) **赤松 和土**：「iPS細胞技術を用いた神経疾患研究と治療」第37回日本血液事業学会総会シンポジウム 2013年10月21日 札幌

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし