

201335017A

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
(再生医療関係研究分野)

疾患特異的 iPS 細胞を用いた
創薬スクリーニングシステムの開発

平成 25 年度 研究報告書

研究代表者 澤 芳樹

平成 26 (2014) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

(再生医療関係研究分野)

疾患特異的 iPS 細胞を用いた
創薬スクリーニングシステムの開発

平成 25 年度 研究報告書

研究代表者 澤 芳樹

平成 26 (2014) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

大阪大学医学系研究科 教授 澤 芳樹 1

II. 分担研究報告書

1. 整形疾患における iPS 細胞の分化誘導、新規薬剤の検討

大阪大学医学系研究科 教授 吉川 秀樹 4

2. 小児疾患特異的 iPS 細胞をもちいた創薬スクリーニングシステムの開発

大阪大学医学系研究科 教授 大藪 恵一 6

3. 眼疾患特異 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

大阪大学医学系研究科 教授 西田 幸二 10

4. ライブラリの蓄積、新規化合物の探索に関する研究

大阪大学薬学研究科 教授 堤 康央 12

5. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発に関する研究

大阪大学薬学研究科 教授 土井 健史 16

6. 疾患特異的 iPS 由来肝細胞を用いた薬効評価

大阪大学薬学研究科 教授 水口 裕之 19

7. 組織構築に関する研究

大阪大学工学研究科 教授 明石 満 24

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 28

IV. 研究成果の別刷

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（再生医療関係研究分野）
総括研究報告書

疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

研究代表者 大阪大学医学系研究科心臓血管外科 澤 芳樹

研究要旨

EU では動物を用いる薬剤開発を禁止する途上であり、非臨床試験は *in vitro* 試験にて代用される方向にある。そのなかで我が国の誇る iPS 細胞関連技術は、国際標準に展開させうる基盤技術である。我が国が創薬能力を有する国であり続けるために、iPS 細胞を用いる創薬基盤の構築・運用は喫緊の課題である。健常者由来、疾患特異的 iPS 細胞から作製した標的組織（心臓、血管、運動器、眼、内分泌、肝臓）を用いたスクリーニングにより、創薬開発の効率化、安全性の向上に資する基盤構築を目的とする。また、疾患特異的 iPS 細胞を用い、既承認薬剤が効能を有する適応可能疾患のスクリーニングにより、薬剤に新たな価値を与えるドラッグリポジショニングを行う基盤の構築を行う。

（倫理面への配慮）

iPS 細胞樹立は、臨床研究に関する倫理指針を遵守し、人権擁護に関して配慮を行う。倫理委員会承認の上で、インフォームドコンセントを取得し、体細胞を採取する。遺伝子組換え実験安全委員会、動物実験委員会により承認を受け、法令、施設規則等を遵守し、実験を行う。

A. 研究目的

体細胞から iPS 細胞を樹立し、当該細胞に分化させ、3D組織を作成し、薬効・安全性を判定する評価システムを構築する。本システムによりドラッグリポジショニングや疾患概念変更による薬物適応拡大を行い、創薬候補濃縮化合物ライブラリ作成への展開を行う。

B. 研究方法

平成 25 年度

- 1) 患者の体細胞から iPS 細胞を作成
- 2) iPS 細胞から当該細胞への分化誘導、組織化
- 3) 化合物ライブラリの蓄積

患者由来の iPS 細胞を用い、網羅的プロテオーム解析を行い、バイオリブラリ、低分子化合物ライブラリの充実を目指す。

- 4) ドラッグリポジショニングの対象となりうる薬剤の選別

C. 研究結果

1. iPS 細胞から心筋細胞細胞への分化誘導、心筋組織構築

現在 iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導に成功している。また、iPS 細胞由来心筋細胞の組織化の前に、新生仔心筋細胞を用いた三次組織体を構築しており、組織体に心筋組織収縮刺激剤を投与すると心拍数が向上することを確認した。次に、iPS 細胞由来心筋細胞の組織体の作成に着手し、同組織は、同調した拍動を示す三次元心筋組織であった。またこれまでの三次元構築法を用いて作

成した心筋組織は組織体に空隙があるため、心筋細胞の組織化に関して、新しい方法論の確立が必要である。これまでの積層化法は18回の遠心分離を行うため、細胞のバイアビリティが低下してしまうが、セルカルチャーインサートのポアを利用したフィルター法を使用した場合、細胞のダメージが少なく、組織構築も可能であることが判明した。

最終的には疾患特異的 iPS 細胞を使用する予定であるため、家族歴のある心不全患者（拡張型心筋症）の選定を行い、同患者から同意書を取得し、iPS 細胞の樹立を行っている。他、心筋組織に薬剤を投与した際の反応性を定量化するために、心筋組織の収縮力の定量化、電気伝導性の解析等に着手している。

2. 疾患特異的 iPS 由来肝細胞を用いた薬効評価

本研究において、遺伝子異常を伴う先天性難治疾患の病態解明や疾患モデルの開発、治療薬創出が期待されている遺伝病患者から作製した iPS 細胞疾患（特異的 iPS 細胞）から肝細胞を分化誘導し、有効な疾患モデル細胞を用いた新規薬効評価系の構築を行った。本年度は、これまで有効な治療薬が開発されておらず、救命のために肝移植を要する肝臓疾患である進行性家族性胆汁うっ滞症（progressive familial intrahepatic cholestasis; PFIC）2型患者由来の iPS 細胞の樹立を行い、肝細胞への分化誘導を行った。

健常人および PFIC2 型患者から採取した末梢血から、山中4因子を発現するセンダイウイルスベクターを用いてインテグレーションフリー iPS 細胞を樹立し、末梢血に山中4因子を遺伝子導入することで、典型的な iPS 細胞様コロニーが多数出現した。樹立した iPS 細胞株における未分化関連遺伝子の発現量は当研究室で従来培養しているヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞と同程度であることを確認し、アルブミン産生能をもつ肝細胞に分化できることが確認できた。

3. 整形疾患における iPS 細胞の分化誘導、新規

薬剤の検討

マウス iPS 細胞株(20D17)を用いて、サイトカインと低分子化合物併用による間葉系前駆細胞への誘導効率について基礎検討を行った。

iPS 細胞の有効な分化誘導を行うには、誘導開始時の播種密度が最も重要であることが分かった。他、2%血清含有培地に比べ無血清培地の方が著しく誘導効率が良好であり、サイトカイングラディエントによる培養誘導が適していた。また、間葉系前駆細胞への誘導技術に分化の途中段階で一定期間の低酸素培養が有用であることも分かっている。来期は、上記条件を適正化し、間葉系前駆細胞への分化誘導効率を向上させる予定である。

4. ライブラリの蓄積

低分子化合物ライブラリの蓄積を行うと同時に、大量の化合物ライブラリから特定の機能のある低分子化合物を選定する方法を構築中である。

D. 考察

今回の検討で、iPS 細胞由来心筋細胞特有の組織化の方法を構築することができた。今後、血管新生解析モデル、心毒性解析モデル等の各種心筋組織を作成する予定である。各々の心筋組織モデルにおいて、含有する細胞を変えることが必要であり、十分な検討を要するものと思われる。他疾患に関しても、適切な分化誘導法の検証、薬効を定量化できるような組織構築を行う予定である。

E. 結論

本プロジェクトで作成した各種心筋組織体を用いて新規低分子ライブラリーの心毒性、各種有効性を *ex vivo* で示すことにより、ドラッグリポジショニング、新規薬剤の開発が可能であるものと思われる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawamura M, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Miki K, Ito E, Sougawa N, Kawamura T, Daimon T, Shimizu T, Okano T, Toda K, Sawa Y. : Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart, *Circulation* 128(11 Suppl 1):S87-94, 2013
- 2) Yasuhiro Shudo, Shigeru Miyagawa, Hanayuki Ohkura, Satsuki Fukushima, Atsuhiko Saito, Motoko Shiozaki, Naomasa Kawaguchi, Nariaki Matsuura, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, Akifumi Matsuyama, and Yoshiki Sawa: Addition of Mesenchymal Stem Cells Enhances the Therapeutic Effects of Skeletal Myoblast Cell-Sheet Transplantation in a Rat Ischemic Cardiomyopathy Model, *TISSUE ENGINEERING: Part A*, Vol.20, 2014
- 3) Yu T, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, Kawamura, Kawamura T, Ito E, Kawaguchi N, Sawa Y, Matsuura N.: In vivo differentiation of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *Circ J*. 77(5):1297-306, 2013
- 4) Okada Y, Watanabe M, Nakai T, Kamikawa Y, Shimizu M, Fukuhara Y, Yonekura M, Matsuura E, Hoshika Y, Nagai R, Aird WC, Doi T., RUNX1, but not its familial platelet disorder mutants, synergistically activates PF4 gene expression in combination with ETS family proteins. *J.Thromb. Haemost.* **11**, 1742-1750 (2013)
DOI: 10.1111/jth.12355
- 5) Tachibana K, Takeuchi K, Inada H, Sugimoto K, Ishimoto K, Yamashita M, Maegawa T, Yamasaki D, Osada S, Tanaka T, Rakugi H, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Doi T., Human mannose-binding lectin 2 is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptors via a peroxisome proliferator responsive element. *J. Biochem.*, **154**, 265-273 (2013)
DOI:10.1093/jb/mvt050

2. 学会発表

- 1) Kawamura M et al. Enhanced therapeutic effects of human iPS cell-derived cardiomyocyte transplantation by the combination of cell-sheets with pedicled

omental flap technique in a porcine ischemic cardiomyopathy model (oral) American Heart Association (テキサス州ダラス)

2013. 11. 16-20

- 2) 天野雄斗・西口昭広・松崎典弥・宮川繁・澤芳樹・明石満「細胞集積法を用いた iPS 細胞由来の正常・疾患特異的三次元心筋モデルの構築とその薬剤評価への応用」文部科学省主催 第3回サイエンス・インカレ 2014年3月1日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

出願番号：特願 2013-173745

発明者：明石 満・松崎典弥・澤 芳樹・宮川 繁

発明の名称：薬剤候補化合物のスクリーニングに用いる心筋組織チップの製造方法

出願人：国立大学法人大阪大学

出願日：2013年8月23日

2. 実用新案登録

3. その他

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（再生医療関係研究分野）
分担研究報告書

整形疾患におけるiPS細胞の分化誘導、新規薬剤の検討

研究分担者 大阪大学医学部整形外科学教室 教授 吉川 秀樹

研究要旨

樹立された整形疾患 iPS 細胞による骨系統疾患の病態解明および創薬研究を行うためには iPS 細胞から骨芽細胞系細胞、軟骨細胞への分化誘導技術とそれらを用いた新規薬剤をスクリーニングするための評価系の開発が望まれる。最も重要となる健常 iPS 細胞から間葉系前駆細胞への培養誘導法に焦点を絞り、マウス iPS 細胞株を用いて基礎検討を行ってきた。サイトカイングラディエント法を用いることにより、EB 形成を経ずに平面培養にて中内胚葉から中胚葉系および間葉系前駆細胞への分化誘導法をほぼ確立することが可能となった。

A. 研究目的

整形外科領域における骨系統疾患特異的 iPS 細胞を作製した場合に必要なのが、基盤となる骨系統への分化誘導技術である。iPS 細胞から間葉系前駆細胞や骨芽細胞系細胞を作製する試みは行われているが、多くは従来からの骨誘導液性因子を使用したものであり、EB 形成を経たからの分化誘導法である。

本研究の目的は、新規薬剤を検討するための基礎となる健常 iPS 細胞から高効率に間葉系前駆細胞を作製する培養誘導法を確立することである。

B. 研究方法

京大 iPS 細胞研究所で樹立されたマウス iPS 細胞株(20D17)を用いて、サイトカインと低分子化合物併用による誘導効率について基礎検討を行った。検討項目としては、iPS 細胞の播種密度、有血清あるいは無血清培地の使用、各種サイトカインと数種の低分子化合物併用時の添加時期と濃度、低酸素による培養誘導時期、コーティング処理された培養皿の併用である。これらの諸因子の併用効果について、

FACS および遺伝子発現解析により検討した。

(倫理面への配慮)

研究計画については倫理委員会の承認を得た上で、インフォームドコンセントを取得し、体細胞の採取を行う。得られた細胞は適切な匿名化を行った上で、本研究に供する。遺伝子組換え実験はカルタヘナ法に則り、遺伝子組換え実験安全委員会に申請し、承認を得た後に実験を行っている。遺伝子組み換えベクターはウイルスベクターを使用するが、P2 レベルで実験を行うことができるものであり、研究を遂行するにあたって大きな支障は生じない。動物実験を行う場合はあらかじめ動物実験委員会により承認を受け、動物の愛護及び管理に関する法律や各研究機関が定めた動物実験規則等に従って実施している。

C. 研究結果

iPS 細胞の分化誘導を行う際、誘導開始時の播種密度が最も重要であることが分かった。2%血清含有培地に比べ無血清培地の方が著しく誘導効率が高く

なることが示された。6 種類のサイトカインと 2 種類の低分子化合物併用時の添加時期と濃度の最適化を検討した結果、高効率に間葉系前駆細胞への分化誘導が行うこと可能となるサイトカイングラディエントによる培養誘導が適していることが明らかとなった。また、間葉系前駆細胞への誘導技術に分化の途中段階で一定期間の低酸素培養が有用であることも分かっている。骨芽細胞系細胞へのさらなる効率化を図るためには、誘導細胞の分化過程の各時期に合わせてコーティング処理された培養皿を併用することが望ましいことも明らかにすることができた。

D. 考察

これまでは iPS 細胞を作製する技術に目が向けられ、種々の改良が盛んに行われてきた。しかし、今後は疾患の病因解明と新規薬剤を検討するために特定領域での培養誘導技術が必須となる。iPS 細胞は、多能性を有するがゆえに分化制御が難しく、とくに骨系統への誘導技術は確立されたものは無く検討されている段階にある。

iPS 細胞から確実に効率良く骨芽細胞系細胞を作製するためには、種々の因子を考慮した上で培養条件を併用し、最適化していかなければならないことが分かってきた。細胞の播種密度はその最たるもので、分化開始時の播種密度が適切でないとう目的細胞以外の細胞を作ってしまう恐れがあり、その後の分化状態に大きく影響を及ぼす可能性がある。

無血清培地下で Activin, Wnt, BMP をおもに適用するサイトカイングラディエント法は、iPS 細胞から高効率に間葉系前駆細胞や骨芽細胞系細胞を作製することが可能な培養誘導法である。本法を基礎とし、低酸素培養と各種コーティング処理した培養皿を併用することでさらなる効率化が期待できると考える。

E. 結論

整形領域における iPS 細胞から間葉系前駆細胞への分化誘導法として、サイトカイングラディエント

法による無血清培地下での培養誘導法を確立することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Outani, H., Okada, M., Yamashita, A., Nakagawa, K., Yoshikawa, H., Tsumaki, N.: Direct induction of chondrogenic cells from human dermal fibroblast culture by defined factors. PLoS ONE, 8:e77365, 2013.

Honda, H., Tamai, N., Naka, N., Yoshikawa, H., Myoui, A.: Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in Rattus norvegicus calvaria defect model. Journal of Artificial Organs, 16:305-315, 2013.

2. 学会発表

宮本 諭、吉川秀樹、名井 陽：iPS 細胞から骨芽細胞系細胞への分化誘導システムの確立、第 31 回日本骨代謝学会（2013 年 5 月 30 日、神戸）

H. 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

厚生労働科学研究費補助金

分担研究報告書

小児疾患特異的 iPS 細胞をもちいた創薬スクリーニングシステムの開発

研究分担者 大藪 恵一 大阪大学大学院医学系研究科小児科学教室 教授
研究協力者 北畠 康司 大阪大学大学院医学系研究科小児科学教室 助教

研究要旨

小児難治性疾患の治療法開発においては、その罹患者数が少ないこと、また成長発育過程において病態が形成されるために、細胞の発達・成熟段階を考慮した研究モデルが必要である、という特徴があるため、よい実験系を得ることが困難である。一方、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 技術は、患者からのわずかな細胞・組織をもとに増殖が可能であり、かつ各組織細胞の成熟過程での変化をとらえることができるため、このような小児難病における創薬スクリーニングシステムへの応用が可能であると考えられる。

そこで本研究では、多くの類縁疾患を含みつつも全体の疾患としては非常に高い頻度をもつ骨系統疾患を標的とし、ヒト iPS 細胞から骨細胞への分化誘導系を確立することによって、創薬スクリーニングを可能にする系の確立を目指す。まず小児への侵襲ストレスをおよぼすことおそれのない臍帯血単核球からの iPS 細胞樹立と、その未分化性・多能性の確認、さらに骨細胞系列への分化誘導を目指す。この樹立・分化誘導系を確立することができるならば、今後の骨細胞に起こる変化を捉えることができ、病態の理解だけでなく創薬システムを構築することが可能になると考えられる。

A. 研究目的

ヒト人工多能性幹細胞 (以下、iPS 細胞) 技術の発明により、倫理的問題を克服しかつ免疫学的拒絶反応を回避した再生医療の可能性が開かれた。さらに近年の技術的進歩により iPS 細胞の樹立効率は向上し、癌化などのリスクは大きく低減されてきていることから、臨床応用への期待はいよいよ高くなりつつある。一方でこの iPS 細胞は、難治性疾患の治療に向けた創

薬スクリーニングのリソースとしても大きな期待を集めている。とくに小児科領域の難治性疾患は罹患者数が成人と比較して少なく、またその病態が個体の成長発育過程と密接に関わりながら発症・進展するという特徴があるため、患者からのわずかな細胞・組織をもとに増殖が可能であり、かつ各組織細胞の成熟過程での変化をとらえることのできる iPS 細胞をもちいることで、新たな治療薬の開発に近

づくことができると期待される。

骨系統疾患は、軟骨無形成症 (Achondroplasia)、骨形成不全症 (Osteogenesis imperfect) など、骨格を形成する組織の成長・発達・分化の障害により異常を来す遺伝子疾患を指す。骨系統疾患全体では 1000 人に 1 人と非常に多いにもかかわらず、これまでのところ有効な診断・治療法がない。本研究では、この骨系統疾患における創薬スクリーニングを目標とし、健常者および患者の臍帯血由来ヒト iPS 細胞をもちいたシステムの構築を目指す。これにより、小児の個別疾患に対する治療薬だけでなく、成人を対象としたより広い臨床応用が可能になると期待され、今後の治療薬開発にも大きく寄与するものと考えられる。

B. 研究方法

1. 臍帯血・末梢血・皮膚線維芽細胞の採取ならびにヒト iPS 細胞の樹立

ヒト iPS 細胞の樹立には、一般的に皮膚線維芽細胞が多くもちいられており、小児領域においても重要なリソースである。しかしながら小児患者では痛みを伴う大きな侵襲ストレスであり、また重症患者においては感染のリスクも無視できない。一方、臍帯血中に存在する単核球は、新生児と同じゲノム構造をもちいており、採取に際して痛みを伴わず、かつ分娩後には廃棄される組織であることから、胎内においてあらかじめ診断のついた新生児

については重要な検体となりえる。そこで分娩予定の胎児の保護者に対してあらかじめ説明を行い、同意を得られた場合にのみ分娩時に臍帯血の採取を行った。この臍帯血サンプルより単核球を精製し、山中 4 因子を搭載した持続発現型センダイウイルスベクター SeV-KOSM-302L (産業技術総合研究所 中西真人副研究センター長より供与)をもちいてリプログラミング因子の導入を行った。

2. 樹立されたヒト iPS 細胞の未分化性・多能性の確認と創薬リソースとしての有用性の確認

樹立された iPS 細胞クローンについて、Nanog, Oct3/4, SSEA3 などの未分化マーカーについての免疫染色、およびそれらの QRT-PCR による遺伝子発現の確認を行った。また iPS 細胞を SCID マウスの精巣へ移植し奇形腫 (テラトーマ) 作製実験を行うことで、三胚葉への分化誘導能を確認した。

3. ヒト iPS 細胞からの骨細胞への分化誘導系の確立

ヒト iPS 細胞から骨細胞への分化については、Nasu らによる胚様体形成を介した分化誘導法を試みた (PLoS One, 2013)。iPS 細胞から胚様体を形成させ、7 日目に胚様体を播種した。ここから伸張してきた細胞を分離し、アスコルビン酸・デキサメタゾン・アクチビン A を添加した培地で培養を行った。

C. 研究結果

ヒト iPS 細胞は臍帯血・皮膚線維芽細胞をもとに樹立を行った。まず皮膚線維芽細胞については、大阪大学医学部附属病院・新生児集中治療室に入院中の新生児 3 例、また臍帯血に関しては、同周産期センターにて出生の新生児 5 例について、いずれも保護者から同意を得た上で検体採取を行った。皮膚生検後の組織から接着培養によって皮膚線維芽細胞を得、また分娩時に胎盤中から臍帯血を採取し、単核球分離を行うことで臍帯血細胞を得ることができた。これらに持続発現型センダイウイルス SeV-KOSM-302L を MOI=2 で 2 時間、室温にて感染させた。感染後約 2 週間でコロニーが出現し、さらに 1 週間ほどで十分な大きさとなったためコロニーをピックアップし、クローンの樹立を行った。この樹立時にセンダイウイルスに対する siRNA (L527 siRNA) を添加することにより、SeV ベクターの除去を行った。

各症例につき各 10 クローンについて QRT-PCR を行い、センダイウイルスベクターの除去を確認したうえで保管を行った。

また免疫染色により Nanog, Oct-3/4, SSEA-3, E-cadherin 陽性であること、QRT-PCR により Nanog, Oct-3/4, Klf4, hTERT が十分発現していることを確認した。iPS 細胞を SCID マウスの精巣へ移植し奇形腫形成を行い、三胚葉への分化を調べることで多能性を持っていることを確認

することができた。

骨細胞への分化誘導については、分化誘導開始から 4 週および 6 週間後に骨芽細胞の形成の確認を行った。アルカリホスファターゼ染色により、いずれも陽性細胞を確認することができた。QRT-PCR による遺伝子発現確認では、SOST, DMP-1 などの骨芽細胞マーカーの上昇は認めるものの、初代培養系に比較すると低値であったためさらに培養期間を延長する必要があると思われた。

D. 考察

今回の研究により臍帯血から樹立したヒト iPS 細胞が未分化性・多能性を保持していること、骨細胞系への分化誘導が可能であることを示すことができた。今後さらに骨細胞分化効率が上昇するための工夫を行うとともに、創薬スクリーニングの系の確立を行う予定である。

E. 結論

臍帯血からのヒト iPS 細胞樹立法により、侵襲ストレスを考慮する必要がある小児においても効率よく iPS 細胞作製が可能であり、かつ骨細胞系への分化誘導が可能であることを確認することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（再生医療関係研究分野）

分担研究報告書

眼疾患特異 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

研究分担者 大阪大学医学系研究科 西田幸二

研究要旨

緑内障は後天的失明原因の上位であり、緑内障末期失明患者の減少による社会的意義は大きい。緑内障はメカノストレスにより視神経節細胞が脱落する疾患であるが、神経を包む視神経乳頭グリア細胞が圧ストレスに対して反応することがすでに知られており、その生物学的感受性を解明し生体に近い乳頭モデルを開発することは緑内障に対する創薬スクリーニングシステムの構築に対して有用である。そこで、iPS 細胞誘導グリア細胞を用いて 3 次元視神経乳頭モデルを開発しこれまで開発が困難であった組織保護治療薬創薬に向けて新たな基盤の開発を目指す。

A. 研究目的

緑内障は視神経乳頭篩板におけるメカノストレスにより視神経の力学的損傷と周辺グリア細胞の生物学的反応に伴って視神経節細胞が脱落する疾患である。しかし、篩板グリア細胞がどのようにストレスを感受し生物学的反応を示すのかは不明である。我々は乳頭グリアの高純度単離培養法を開発してきた。今回、iPS 細胞誘導グリア細胞を用い 3 次元視神経乳頭モデルによりグリア細胞のメカノストレス反応を解析する。

B. 研究方法

マウス視神経乳頭グリアを用いた 2 次元および 3 次元培養細胞培養と、伸展装置による培養細胞ストレス刺激システムを構築する。さらに ES/iPS 細胞から視神経乳頭グリアを誘導し、視神経乳頭篩板をモデル化した 2 次元および 3 次元培養細胞伸展装置にて培養しストレス刺激を与える。分子生物学的反応にグリア細胞の接着因子およびメカノストレスチャネルを解析し、

倫理面への配慮として、ヒト iPS の使用に関して倫理委員会の承認を得る。

C. 研究結果

マウス視神経乳頭グリアを用いた 2 次元培養細胞培養と伸展装置によるストレス刺激を施行した。すでに系が確立している ES 細胞の実験系を用いて、まずアストロサイトの誘導を行った。

D. 考察

マウス視神経乳頭グリアを用いた 2 次元培養細胞培養アストロサイトを作成した。培養アストロサイトは 2 次元圧ストレスに反応し形態変化を起こすことが観察された。また、ES 細胞からアストロサイト発現マーカーを確認した。

E. 結論

2 次元のメカノストレス刺激システムを構築し、培養アストロサイトの観察を行うことに成功した。さらに 3 次元モデルを作成することで、よ

り生体に近いモデルに発展する可能性が高い。
ES細胞でのアストロサイト誘導法をiPS細胞にも応用することで、疾患特異性モデルを確立することができる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi T, Kan K, Nishida K, Yamato M, Okano T. Corneal regeneration by transplantation of corneal epithelial cell sheets fabricated with automated cell culture system in rabbit model. *Biomaterials*. 2013;34(36):9010-7.
2. Oie Y, Nishida K. Regenerative medicine for the cornea. *Biomed Res Int*. 2013;2013:428247.
3. Li Y, Inoue T, Takamatsu F, Maeda N, Ohashi Y, Nishida K. Development of genetically modified eliminable human dermal fibroblast feeder cells for ocular surface regeneration medicine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(12):7522-31.
4. Shi D, Takano Y, Nakazawa T, Mengkegale M, Yokokura S, Nishida K, Fuse N. Molecular genetic analysis of primary open-angle glaucoma, normal tension glaucoma, and developmental glaucoma for the VAV2 and VAV3 gene variants in Japanese subjects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;432(3):509-12.
5. Shi D, Funayama T, Mashima Y, Takano Y, Shimizu A, Yamamoto K, Mengkegale M, Miyazawa A, Yasuda N, Fukuchi T, Abe H, Ideta H, Nishida K, Nakazawa T, Richards JE, Fuse N. Association of HK2 and NCK2 with Normal Tension Glaucoma in the

Japanese Population. *PLoS One*. 2013;8(1):e54115.

2. 学会発表

1. 西田幸二、眼とiPS細胞の未来、大阪大学シンポジウム「医の知の未来へ」2013/8/3
2. 西田幸二、眼とiPS細胞の未来、愛媛県眼科学術講演会セッション、2013/11/10
3. Kawashima R, Matsushita K, Usui S, Nishida K: Functional Analysis of Cultured Astrocytes from the Murine Optic Nerve Head, ARVO2013

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（再生医療関係研究分野）

分担研究報告書

ライブラリの蓄積、新規化合物の探索に関する研究

研究分担者 大阪大学薬学研究科毒性学分野 教授 堤 康央

研究要旨

本研究は、iPS 細胞を用いた効率的な医薬品探索システムの構築を最終目標に、バイオ化合物（ペプチド医薬）のライブラリ構築を図るものである。本年度は、骨形成を促進するバイオ化合物（ペプチド）を鋳型として、骨疾患に対する新規医薬品の探索を可能とするライブラリを構築した。具体的には、既存ペプチドを用い、独自のフェージ表面提示法を駆使することで、3~7 アミノ酸が 20 種類のアミノ酸に置換された 10^8 種類（1 億種類）ものペプチド変異体を発現するフェージライブラリを構築した。今後、骨疾患患者由来 iPS 細胞から分化させた骨細胞に対して、本ライブラリを適用することで、効率的な創薬が可能になるものと期待される。

A. 研究目的

本研究は、iPS 細胞を用いた効率的な医薬品探索システムの構築を最終目標に、バイオ化合物（ペプチド）のライブラリ構築を図るものである。本研究により、バイオ医薬（ペプチド医薬）のみならず、ペプチドを模倣した新規低分子化合物（ペプチドミミック）の創製も可能になるものと期待される。

近年、骨粗鬆症などの骨疾患に対する治療薬として、骨吸収を抑える骨吸収抑制剤が脚光を浴びている。一方で骨吸収抑制剤は、歯周病といった、骨自身の喪失を引き起こす疾患に対しては十分な効果が期待できず、新たな骨の形成を可能とする骨再生促進剤の開発が世界的に注目を集めている。事実、骨粗しょう症に対する画期的治療薬として抗 RANKL 抗体デノスマブが上市されているものの、骨吸収抑制作用のみを有しており、「骨再生」は達成できない。

バイオ化合物（ペプチド）は、安価な化学合成で創製できること、また、経口投与が可能な低分

子化合物デザインの鋳型（ペプチドミミック）になり得ることから、次世代型の医薬品フォーマットとして期待されている。しかし、バイオ化合物（ペプチド）は、標的に対する親和性の乏しさや、生体内安定性の乏しさなどの問題点も有しており、実用化に適うバイオ化合物（ペプチド）の創製基盤は確立されていない。

そこで本研究では、独自のフェージ表面提示法と構造生物学的情報を駆使し、バイオ化合物（ペプチド）のライブラリを構築したうえで、iPS 細胞より分化した疾患細胞を用いることで、バイオ化合物（ペプチド）の新規創製システムの構築を図る。

本年度は、既存の骨再生ペプチドを用い、その配列の一部をランダムなアミノ酸に置換したバイオ化合物ライブラリー（ペプチドライブラリ）を構築した（図 1）。

B. 研究方法

ペプチドライブラリの作製；9 アミノ酸、11 アミ

ノ酸からなる 2 種類の骨再生ペプチドを用い、3～7 アミノ酸を 20 種類のアミノ酸に網羅的に置換したペプチド変異体を表面提示したファージライブラリを作製した。まず、PCR によって、ペプチド中のアミノ酸をコードする配列を全てのアミノ酸をコードし得るランダムな配列、NNK 配列 (N; A, T, G, C, K; G, T) に置換した。その後、ファージミドベクターに組み込み、大腸菌 TG1 に形質導入した。

(倫理面への配慮)

本研究計画では組換え DNA 実験を行ったが、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づいて適切に実施すると共に、所属機関の組換え DNA 実験委員会の承認を既に受けている。なお、研究に係る利益相反に関して、所属機関の COI (利益相反) 委員会で審査を受けている。

C. 研究結果および D. 考察

バイオ化合物 (ペプチド) ライブラリの構築

9 アミノ酸、11 アミノ酸からなる 2 種類の骨再生ペプチドを用い、3～7 アミノ酸を 20 種類のアミノ酸に網羅的に置換したペプチド変異体を表面提示したファージライブラリの構築を図った。PCR により、3～7 アミノ酸をコードする遺伝子が NNS 配列に置換された遺伝子ライブラリを構築した後、大腸菌に導入したうえで、ファージライブラリを作製した。その結果、ライブラリサイズは、 10^8 であることが判明した。即ち、3～7 アミノ酸が網羅的に他のアミノ酸に置換された 1 億種類のペプチドがファージ上に提示されたバイオ化合物ライブラリ (ペプチドライブラリ) の創製に成功した。

バイオ化合物 (ペプチド) ライブラリを用いたスクリーニングシステムの構築

本研究で用いたバイオ化合物 (ペプチド) は、腫瘍壊死因子 (TNF) スーパーファミリーサイトカイ

ンの一つである RANKL に結合することが知られている。そこで、構築したバイオ化合物 (ペプチド) ライブラリを用いたスクリーニングシステムの構築を目的に、RANKL への結合力を指標としたバイオ化合物 (ペプチド) 探索システムの構築を図った (図 2)。RANKL に結合する鑄型ペプチドを表面に提示したファージと、何も表面提示していない野生型ファージを 1:15 の比率で混合した後、ビオチン化 RANKL と混合した。その後、ストレプトアビジンを用いて、ビオチン化 RANKL を回収し、RANKL に結合したファージを回収した。その結果、鑄型ペプチドを表面に提示したファージと、何も表面提示していない野生型ファージの比率は、ビオチン化 RANKL との混合前は 1:15 であったにもかかわらず、RANKL に結合したファージの比率は 10:15 に変動していた。即ち、本実験系を用いることで、RANKL に結合し得るバイオ化合物 (ペプチド) を濃縮可能であることが示された。今後、本研究で構築したバイオ化合物ライブラリ (ペプチドライブラリ) を本実験系に適用することで、RANKL への結合性に優れたバイオ化合物 (ペプチド) を同定可能であると考えられる。

E. 結論

既存のバイオ化合物 (ペプチド) を鑄型として、1 億種類の変異ペプチドからなるファージペプチドライブラリの構築に成功した。将来的に、本ライブラリと iPS 細胞を用いたアッセイ系を組み合わせることで、骨の喪失というアンメット・メディカル・ニーズに対応した画期的医薬品の創製に直結するものと期待される。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Intranasal exposure to amorphous nanosilica particles could activate intrinsic

coagulation cascade and platelets in mice.
Yoshida T, Yoshioka Y, Tochigi S, Hirai T,
Uji M, Ichihashi K, Nagano K, Abe Y, Kamada
H, Tsunoda S, Nabeshi H, Higashisaka K,
Yoshikawa T, Tsutsumi Y. Part Fibre Toxicol.
2013 Aug 20;10:41.

2. 学会発表

1. 吉岡靖雄, 小椋健正, 田代克久, 川端健二,
水口裕之, 東阪和馬, 堤 康央: ナノマテ
リアルな催奇形性評価に関する基礎的検討
～in vitro 代替法の構築に向けて～., 日本
動物実験代替法学会第 26 回大会., 京都(京
都), 2013 年 12 月.
2. 堤 康央: ナノ安全科学研究の現状と今後
～トキシコ・バイオマーカー探索から代替
法開発を含めて～., 日本動物実験代替法
学会第 26 回大会., 京都(京都), 2013 年
12 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
該当無し

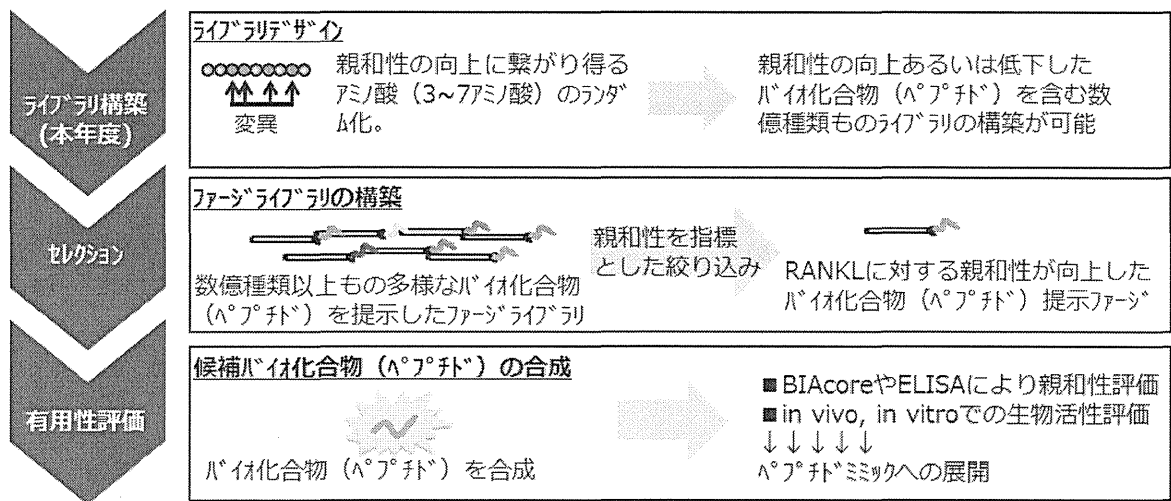


図 1：本研究の概略図。本年度は、1 億種類のバイオ化合物（ペプチド）ライブラリを構築すると共に、図 2 で示すように、効率的に目的活性を有するバイオ化合物（ペプチド）を同定可能なシステムを構築した。

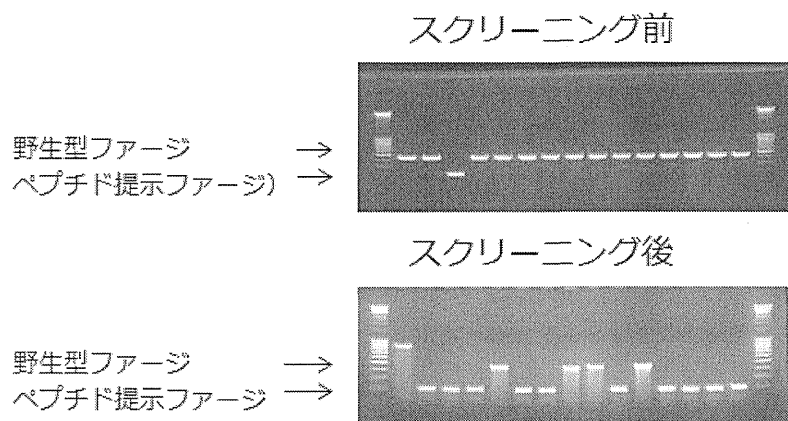


図 2：効率的に目的活性を有するバイオ化合物（ペプチド）を同定システム：1 億種類のバイオ化合物（ペプチド）ライブラリの中から、目的蛋白質への結合力を有するバイオ化合物（ペプチド）をスクリーニング可能であることが明らかとなった。

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（再生医療関係研究分野）

分担研究報告書

疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発に関する研究

研究分担者 大阪大学薬学研究科 土井 健史

研究要旨

疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニング系の開発におけるライブラリ評価の為には、高純度の心筋細胞を安定して供することが必要不可欠である。本年度は分化誘導後の心筋細胞を磁気ビーズで分取精製する方法について検討を行った。心筋型トロポニン T と発現が良く一致する表面抗原について、磁気ビーズを用いて分取したところ、心筋細胞の純度が 9 割程度まで上昇した。本検討により、ヒト iPS 細胞より分化誘導後の心筋細胞を非侵襲的かつ高効率に純化することが可能であり、創薬スクリーニングに用いる供試細胞として有用であることが示唆された。

ヒト iPS 細胞 253G1 をフィーダー細胞 MEF 上で

A. 研究目的

本研究では、循環器疾患に対するドラッグスクリーニング過程において、疾患特異的ヒト iPS 細胞からなる三次元組織体を用いる事で確度の向上および迅速化を目指す。

本年度はスクリーニング系開発におけるライブラリ作製の為の要素技術として、iPS 細胞高純度精製法について検討を行った。通常、iPS 細胞から心筋細胞へ分化誘導を行った場合、その心筋分化効率は 60～80% である。心筋分化効率をロット間で同程度に調整することは困難であるため、分化効率の差が結果の再現性に影響する事が予想される。さらに、心筋細胞における薬剤応答性を鋭敏に検出する為には、心筋細胞以外の細胞によるバックグラウンド強度を最小限にする必要がある。以上の点から、我々は心筋細胞の純化方法の確立が重要であると考え、iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞集団から心筋細胞を精製する事を試みた。

B. 研究方法

培養した後、大量培養装置を用いて心筋に分化誘導を行った。次に、酵素処理にて単一細胞にし、幹細胞から分化させた心筋細胞のマーカーとして報告されている表面抗原を発現している細胞を、磁気ビーズを用いて分取することにより心筋細胞純度の上昇を試みた。処理前後で心筋型トロポニン T の陽性率をフローサイトメトリーを用いて測定し、心筋細胞純度とした。

（倫理面への配慮）

本研究では現在のところは市販の hiPS 細胞を実験に使用している。また本年度は動物実験を施行していない。

C. 研究結果

iPS 由来心筋細胞において、心筋型トロポニン T と、幹細胞から分化させた心筋細胞に特異性の高い 3 種類の表面抗原に対しそれぞれの発現様式を調べたところ、3 種類のうち 2 種類の表面抗原について心筋型トロポニン T との発現が良く一致し

た。次にこの2種類の表面抗原に対する抗体を用いて磁気ビーズで陽性細胞を分取した。分取後の心筋型トロポニンTの陽性率を測定したところ、分取前が67%であったのに対し、それぞれ89.9%、および91.1%へ上昇を認めた。

D. 考察

幹細胞由来心筋細胞の高純度精製は、創薬スクリーニング系の確立において結果の再現性、検出感度に大きく影響するため必要不可欠な技術である。しかしながら、これまでに報告されている精製技術では心筋細胞純度の向上程度は不十分であり、安定した高純度精製法の確立が切望されて来た。今回我々が確立した方法では9割程度まで精製が可能である。更に磁気ビーズを用いた細胞分取法は臨床応用にも使用され安全性が担保されているため、精製後の実験にも細胞傷害性は低いと考えている。

上記のことから表面抗原を用いた心筋細胞精製法は創薬スクリーニングにおいて供試細胞を準備するために有用であると期待される。

E. 結論

細胞表面抗原による細胞分取法は、循環器疾患に対する創薬スクリーニングにおいて、供試細胞の心筋純度を一定かつ高度に精製する為の純化方法として有用である可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okada Y, Watanabe M, Nakai T, Kamikawa Y, Shimizu M, Fukuhara Y, Yonekura M, Matsuura E, Hoshika Y, Nagai R, Aird WC, Doi T., RUNX1, but not its familial platelet disorder mutants, synergistically activates PF4 gene expression in combination with ETS family proteins. *J.Thromb. Haemost.* **11**, 1742-1750 (2013) DOI: 10.1111/jth.12355

Tachibana K, Takeuchi K, Inada H, Sugimoto K, Ishimoto K, Yamashita M, Maegawa T, Yamasaki D, Osada S, Tanaka T, Rakugi H, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Doi T., Human mannose-binding lectin 2 is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptors via a peroxisome proliferator responsive element. *J. Biochem.*, **154**, 265-273 (2013) DOI:10.1093/jb/mvt050

2. 学会発表

第63回日本薬学会近畿支部総会・大会
2013年10月12日(土)同志社女子大学京田辺キャンパス(京都)口頭発表 (E-10-5)
細胞内で生じたダイレクトなタンパク質間相互作用を解析する手法の開発
○藤田泰聖、一瓢奨、喜多絢海、張功幸、樋野展正、土井健史

第63回日本薬学会近畿支部総会・大会
2013年10月12日(土)同志社女子大学京田辺キャンパス(京都)口頭発表 (E-10-4)
血管内皮細胞特異的受容体Robo4のIL-6産生への寄与の解析—敗血症発症メカニズムの解析—
○酒井美貴、真鍋詩織、山本奈那、岡田欣晃、土井健史

第63回日本薬学会近畿支部総会・大会
2013年10月12日(土)同志社女子大学京田辺キャンパス(京都)口頭発表 (E-11-1)
Robo4プロモーターの組織特異的なDNAメチル化パターンが決定されるメカニズムの解析—DNAメチル化による血管内皮細胞特異的な遺伝子発現制御—
○柿内康司、西山侑児、鈴木綾乃、舟橋伸昭、岡田欣晃、土井健史

第63回日本薬学会近畿支部総会・大会
2013年10月12日(土)同志社女子大学京田辺キャンパス(京都)口頭発表 (F-09-5)
ヒストンメチル化酵素SETDB1の酵素活性と翻訳後修飾の解析
○川又那津子、石本憲司、内原佳恵、後藤英子、垣之内啓介、溝端栄一、望月康弘、酒井寿郎、井上豪、児玉龍彦、橘敬祐、土井健史

日本薬学会 第134年会
2014年3月27日(木)–30日(日)熊本市総合体育館(熊本) 28日ポスター発表(28amM-156)
血管内皮細胞特異的受容体Robo4のノックダウンが炎症応答遺伝子発現に与える影響の解析
○真鍋詩織、酒井美貴、山本奈那、Aird WC、岡田欣晃、土井健史