

201335018A

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)

iPS細胞を活用した血液・免疫系難病に対する革新的治療薬の開発

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 九州大学・生体防御医学研究所
ゲノム病態学分野
教授 谷 憲三朗

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
iPS 細胞を活用した血液・免疫系難病に対する革新的治療薬の開発 谷 憲三郎	1
II. 分担研究報告	
1. 血液・免疫系難病由来人工多能性幹細胞（iPS）細胞の樹立と新規薬剤探索研究 谷 憲三郎	13
2. 原発性免疫不全症候群の疾患特異的 iPS 細胞を用いた原因・病態解析 原 寿郎	22
3. iPS 細胞を活用した血液・免疫系難病に対する革新的治療薬の開発 杉山 大介	24
4. iPS 細胞を活用した血液・免疫系難病に対する革新的治療薬の開発 菅野 仁	27
5. 発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）造血障害における免疫分子病態の解明 花岡 伸佳	30
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	37

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）
総括研究報告書

iPS細胞を活用した血液・免疫系難病に対する革新的治療薬の開発

研究代表者 谷 憲三郎 九州大学生体防御医学研究所 教授

研究要旨

「難病」克服に向けた革新的医療技術として、難病患者の疾患特異的iPS細胞を用いることで、アンメット・メディカル・ニーズである稀少疾患並びに難病病態の細胞レベルでの再現が可能となり、疾患動物モデル無くしても、細胞レベルでの発症機構の解明が期待でき、候補薬剤を効率良く選定できる可能性が高いものと期待できる。本研究は血液および免疫系難病を対象とし、疾患特異的iPS細胞を分化した造血・免疫細胞を対象に、薬剤候補物質を大規模スクリーニングし、候補物質を厳選し、それらの薬剤についての臨床研究を計画・実施するものである。

谷らは主に疾患特異的iPS細胞の本格的樹立に向けて、健常人および患者由来iPS細胞の樹立諸条件を検討した。臍帯血、または健常人由来末梢血および繊維芽細胞を用いて2種類のセンダイウイルスベクター、あるいは当研究室が開発したウイルスベクターを用いてiPS細胞を樹立し、比較検討を行った後、iPS細胞樹立に関する手順書を作成した。本手順書に従い、実際にX連鎖性無ガンマグロブリン症候群患者よりiPS細胞を樹立し、未分化性を確認した。また、iPS細胞から造血前駆細胞への分化誘導法の検討を行うことにより、平成26年度以降の疾患iPS細胞の病態解析、および創薬スクリーニング実施に向けての検討を行った。

原らは既にセンダイウイルスベクターを用いて樹立したXLA患者、およびWiskott-Aldrich症候群（WAS）患者由来のiPS細胞を長期培養し、X染色体不活化の解除の有無を検討した結果、患者由来のiPS細胞では健常者とは異なり、X染色体不活化の解除が認められなかった。この2名の患者のX染色体不活化異常の原因を同定するために、現在患者末梢血を用いたエキソーム解析、RNA Seq法による解析を継続中である。

菅野らは赤血球ピルビン酸キナーゼ（PK）活性低下により、PK異常症が疑われるもののヒトPKLR遺伝子に変異を同定出来なかった重症先天性溶血性貧血8症例についてその病因を検討した結果、赤血球特異的な転写因子であるKLF1遺伝子の変異を同定した。全例とも変異KLF1の複合ヘテロ接合体であったが、臨床像は新生児期重症早発黄疸および赤血球輸血を必要とする新生児溶血性疾患であり、半数以上がその後赤血球輸血依存性の重症慢性溶血性貧血を呈した。KLF異常症も今後のiPS細胞を用いた新規治療法開発候補として重要と考えられた。

杉山らはマヒドン大学サラセミアリサーチセンター・Saovaros Svasti博士との共同研究としてサラセミア患者サンプルの提供が可能となるシステム構築を進めた。また、質量分析装置を応用して、グロビンタンパク質を解析する技術の開発を進め、ヒト細胞を用いて解析に有効なペプチドをスクリーニングし、ペプチドの最終候補を11個選出した。

花岡らはNKG2D免疫が造血障害を誘導する有力な分子病態と捉えており、これまでにPNH（発作性夜間血色素尿症）や特発性造血障害を有する再生不良性貧血患者血球膜上のNKG2Dリガンド（ULBPs, MICs）発現およびこのリガンドを標的とする自己リンパ球傷害を明らかにしてきた。25年度は病態解明を促進する解析試料の量的確保を目指したPNH患者由来のiPS細胞樹立に必要な対象患者の選定や環境整備を進めた。

以上の様に、25年度は血液・免疫系難病疾患に対する新規薬剤開発に向けた、難病疾患患者由来iPS細胞の樹立システムを順調に構築でき、一部疾患においては化合物ライブラリースクリーニングに着手した。

分担研究者

分担研究者

谷 憲三郎 九州大学生体防御医学研究所・教授
原 寿郎 九州大学大学院・教授
杉山 大介 九州大学病院・准教授
菅野 仁 東京女子医科大学・教授
花岡 伸佳 和歌山県立医科大学・准教授

A. 研究目的

「難病」の克服に向けてiPS細胞を用いた革新的創薬研究が可能となった。我々はこれまで九州大学病院分子・細胞調整センター（KU-MCPC）において、再生医療・免疫療法に用いる細胞製剤を製造し、施設内にGMP（Good manufacturing practice）準拠検査室を設置、薬事法準拠の品質検査体制を構築した。さらに霊長類・マウスiPS/ES細胞からの血球分化系の確立（Kurita, R., Tani, K. Stem Cells, 2006）、安全性に優れる自己開発・遺伝子非挿入型麻疹ウイルスベクターを用いたiPS細胞樹立法の開発を行っている。また、厚生労働省「iPS細胞を利用した創薬研究支援事業」にて整備した大型液体窒素保存タンクと供給設備、異

常時対応システム及びゲノミクス・エピゲノミクス・プロテオミクス解析関連機器等の導入を行うことにより、基盤整備を行ってきた。研究期間内（平成26年度から平成29年度）に、倫理委員会承認取得後各種難病患者iPS細胞樹立を開始し、それらを対象に、文部科学省・最先端研究基盤事業「化合物ライブラリーを活用した創薬等最先端研究・教育基盤の整備」等を活用し、各疾患治療薬候補物質を選定する。① 細胞分化障害又は細胞死が誘導されやすいことが病態である遺伝性および後天性血液・免疫疾患を対象とした創薬研究を実施する。② X染色体不活化解除はiPS細胞の特徴であり、これを用いた治療は、X連鎖劣性遺伝性疾患の女性患者へ応用可能と考えられる。具体的にはX染色体不活化異常によるX連鎖性無ガンマグロブリン血症、Wiskott-Aldrich症候群女性患者を同定し、iPS細胞を用いてX染色体不活化を定量し、不活化を解除されたiPS細胞の治療への応用、X染色体不活化異常のメカニズムの解明に向け網羅的解析を行い、X染色体不活化解除薬剤を選定する。平成26年度は平成25年度に作成した手順書に基づき各種難病患者由来iPS細胞を樹立、特性解析、iPS細胞由来分化細胞の機能解析と並行してトランスオミクス解析による網羅的解析を行う。さらに順次化合物ライブラリーを用いた創薬スクリーニングを行い、候補薬剤の選定に着手する。また平成26年度に、患者末梢血単核球、口腔内細胞等からDNAを抽出し、ヒトアンドロゲンレセプター遺伝子繰り返し配列を利用して、X染色体不活化の程度を定量する。平成28年度から得られた候補化合物について順次GLPレベルでの前臨床試験の準備を行い開始する。また、平成27年度から保存検体（疾患特異的iPS細胞、患者由来生体材料）の品質評価項目の策定、評価を行う。以上は現在の最先端医学を駆使した研究内容であり、極めて独創性と社会への貢献度の高い研究である。

B. 研究方法

5ヶ年研究計画概要

平成25年度は血液・免疫系難病疾患患者検体の取り扱い、及びiPS細胞の樹立、保存等に関連する各施設での倫理委員会の承認を得る。また、文書による同意を得た健常人検体（骨髄、末梢血など）を用いて、様々な方法でiPS細胞を樹立する。各組織および異なる樹立法により樹立されたiPS細胞の性質の違いを検討するとともに、樹立に向けての手順書の作成を行う。またGMPレベルでのiPS細胞樹立をめざし、種々の検討（基質、培養液など）を行う。

平成26年度より25年度に作成した手順書をもとに血液・免疫系難病疾患患者よりiPS細胞の樹立を行う。樹立したiPS細胞は未分化性、多能性についてin vitro / in vivoによる機能解析を行うとともに、疾患の責任遺伝子変異を確認する。以上の検討によって、樹立が確認できた疾患特異的iPS細胞は、各施設へ送付するとともに、疾患責任遺伝子による遺伝的影響、蛋白質構造異常による表現型への影響等を、トランスオミクス解析（ゲノミクス、エピジェネティクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクス）技術を用いて網羅的に解析しデータベース化する。

る。トランスオミクス解析は、厚生労働省「iPS細胞を利用した創薬研究支援事業」にて整備した解析関連機器を使用する。同時に平成27年度より疾患特異的iPS細胞の長期保存法を検討し、細胞の品質評価項目を策定し評価を行う。

また平成25年度より各血液系（好中球系、B細胞、T細胞、血小板など）への分化誘導法を確立するとともに、細胞バンクなどより手に入る疾患特異的iPS細胞を用いて化合物ライブラリースクリーニングにて新規薬剤の探索を先行する。

平成25年度 研究方法

谷らは以下の(1)～(4)について研究を進めた。

(1) 健常人由来検体を用いた iPS 細胞樹立検討

本研究について、倫理審査申請書類を作成し、九州大学医系地区部局ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理委員会にて申請を行い、承認を得た（許可番号:568-00）。

その後、健常人由来繊維芽細胞（BJ 細胞）、臍帯血由来骨髄細胞、及び IL-2、CD3/CD28 ビーズで刺激した健常人由来末梢T細胞より iPS 細胞の樹立を行った。樹立に用いるベクターとして、当初はレトロウイルスベクターを用いた iPS 細胞樹立も計画していたが、樹立効率が低く、ゲノムに挿入された外来遺伝子の樹立後の影響を憂慮し、使用を中止した。従って実際には、①産業技術総合研究所で開発されたセンダイウイルス（SeVdp(KOSM302L)）（中西真人教授より供与）、および DNAVEC 社より購入したセンダイウイルス（Dnavec-SeV）、②当研究室にて開発した新規ウイルスベクター(XV)を用いて iPS 細胞の樹立を行った（なお②XVの詳細については現在特許申請計画中であり、本報告書が公開予定であるため、ここでの詳細な記載は控えさせていただきます）。

① SeV による iPS 細胞の樹立

臍帯血由来単核球に SeVdp(KOSM302L)、および Dnavec-SeV をそれぞれ感染させ、iPS 細胞の樹立を行った。樹立した iPS 細胞の未分化性等の特性解析、樹立までに要した日数、および SeV の残存を解析し、両者間の比較を行った。

② XV による iPS 細胞の樹立

本ベクターは、ヒト疾患に関与する一本鎖 RNA ウィルスをもとに、遺伝子改変を行ったウィルスベクターである。本ウィルスベクターの特徴は、a) 本ウィルスについては既に多くの知見が存在し、ウィルスが引き起こす疾患は治療法が確立されているため安全性が高い、b) RNA ウィルスのためゲノム DNA への挿入により引き起こされるゲノム毒性がなく、複数の遺伝子(6種類以上の外来遺伝子を搭載可能)を一過性に導入することが可能、c) 赤血球を除くほぼすべての細胞に対して高い効率で遺伝子導入することが可能、といった特徴がある。本ウィルスベクターに 5 種類（GFP、OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC）搭載し、ヒト胎児繊維芽細胞である BJ 細胞より iPS 細胞の樹立を行った。

また樹立した iPS 細胞の未分化性、多能性について解析を行い他の方法で樹立した iPS 細胞と同様の性質を保持していることを確認した。

(2) 疾患患者由来 iPS 細胞の樹立

九州大学小児科にて採血した X 連鎖性無ガンマグロブリン症候群 (XLA) 患者末梢血単核球より Dnavec-SeV および XV を用いて iPS 細胞の樹立を行った。単核球を IL-2、CD3/CD28 ビーズで刺激を加え 7 日間培養した T 細胞に Dnavec-SeV、XV を感染させ、MEF 上で iPS 細胞を樹立した。

(3) iPS 細胞由来血液細胞分化誘導法の開発

京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) より提供を受けたヒト iPS 細胞 (409B2 細胞) 及び当研究室で樹立した iPS 細胞を用いて血液細胞への分化誘導について検討した。

血液細胞への分化誘導法に関しては、AGMS-3 細胞 (京都大学、中畑龍俊教授より供与) との共培養法、および胚様体 (EB) 形成法の二つで検討を行った。

誘導して得られた細胞はフローサイトメトリー法にて CD34 および CD45 抗体染色を行い、細胞系統を確認した。

(4) GMP 規格 iPS 細胞樹立に向けた検討

409B2 細胞を用いて、異種成分不含培養液・基質を用いた iPS 細胞の培養法を検討した。使用した培養液として、S-Medium (DS ファーマ社)、ReproFF2 (リプロセル社)、Essential8 (Life Technologies 社)、mTeSR1 (VERITAS 社)、CELRENA (細胞科学研究所) の 5 つの培養液を用いて検討した。また基質として、Matrigel (Corning 社)、VTN-N、Geltrex (Life Technologies 社)、iMatrix511 (nippi 社) の 4 種類について検討を行った。

それぞれの基質をコートしたディッシュに 409B2 細胞を 2×10^4 cells/cm² にて播種し、4 日間培養した。培養後細胞を回収し、未分化マーカー (NANOG 等) の発現を確認した。

(5) XLA 患者および WAS 患者由来 iPS 細胞の樹立と X 染色体不活化の評価

原らは X 染色体不活化異常によって発症した、XLA 患者および WAS 患者、および健康女性から、上記 (2) とは別の手順書に従い iPS 細胞を樹立した。樹立の方法は、センダイウイルスを用いて Oct3/4、c-Myc、Klf4、Sox2 の 4 遺伝子を末梢血由来の T リンパ球に遺伝子導入し、iPS 細胞へと再プログラムした。X 染色体不活化の評価は、X 染色多条の HUMARA 遺伝子の繰り返し多型を含む領域を、メチル化感受性制限酵素を用いて切断し、PCR 法を用いて増幅する方法を用いた。

(6) 免疫学的機序による先天性溶血性貧血が否定された症例解析

菅野らは、免疫学的機序による先天性溶血性貧血が否定されたタイ人 8 症例について、以下の検査方法を用いて赤血球寿命短縮の原因を解析した。

- 1) Eosin 5'-maleimide (EMA) 結合能、2) 赤血球酵素活性測定、3) Hb 分画および等電点電気泳動、4) サラセミア遺伝子検査 (Gap PCR)、5) KLF1 遺伝子解析

(7) 質量分析装置を用いたグロビンタイピング法の開発

杉山らは質量分析装置を応用して、赤血球系細胞の酸素運搬を司るグロビンタンパク質の解析方法を開発している。具体的には、alpha-, beta-, delta-, epsilon-, gamma-, mu-, theta-, zeta-globin を認識するペプチドをデザインし、ヒト細胞において質量分析装置を用いてグロビンタイピングが簡便に可能な方法の開発を進めた。

(8) PNH 患者情報の収集とその解析

花岡らは和歌山県立医科大学附属病院に定期通院している 5 名の PNH 患者を対象とし、患者カルテやアンケート調査より情報を収集した。また、PNH クローン量を DAF (decay accelerating factor, CD55) と CD59、顆粒球 (CD15 陽性細胞) 膜上の NKG2D リガンド発現を NKG2D リガンド (ULBP1, ULBP2, ULBP3, MICA/B) と CD15 の単クローン抗体を用いた 2 カラーフローサイトメトリー法で評価した。

(9) 倫理面への配慮

本研究においては試料としてヒト細胞、ヒト幹細胞を用い、ヒトゲノム解析を行う計画のため「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し、人権の保護に十分配慮し適正に研究を行う。KU-MCPC で加工、保存する検体に関しては「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、受入れ前に実施計画書に記載される倫理面への配慮に関する項目につき、研究対象者に対する利益、不利益の説明、ならびにリスクファクターとその排除、波及する影響等の記述内容、および説明・同意文書の内容について、九州大学病院および関連機関内に設置されている臨床研究倫理審査委員会、ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査専門委員会、研究内容によってはヒト ES 細胞の使用に関する倫理審査専門委員会による承認を得るものとする。さらに有害事象発生時の対応マニュアルを完備し、病院長並びに総長を最高責任者とする体制のもと、厚生労働省への連絡手順を明らかにさせる。実験動物を用いる研究に関しては、文部科学省及び九州大学の定める『動物の愛護及び管理に関する法律』を遵守して動物愛護、生命倫理の観点に十分配慮しながら動物に苦痛を与えることなく実験を行う。全ての遺伝子組み換え実験は文部科学省の定める『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』及び九州大学の定める『九州大学遺伝子組換え実験指針』に従って実施し、安全性の確保に最大の注意を払う。そのため、実験室内の P2 レベルの培養室、SPF 実験動物管理部屋において厳重な管理のもと実験を行い、ウイルス汚染や人畜共通感染症の発生伝播を防止する。なお、本研究で得られた新規候補薬剤を用いた臨床試験実施が可能となった際には、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守した医師主導治験を、九州大学病院 ARO 次世代医療センターの支援のもと薬事法、ICH-GCP に準拠して実施する。

C. 研究結果

(1) 健康人由来検体を用いた iPS 細胞樹立検討

① SeV による iPS 細胞の樹立

臍帯血より単核球を分離し SeVdp (KOSM302L)、および Dnavec-SeV をそれぞれ感染させ、iPS 細胞の樹立を行った。遺伝子導入後、RPMI1640+10%FBS で 3 日間培養後、MEF 細胞上に播種しヒト ES 細胞維持用培養液にて培養を行った。

Dnavec-SeV は遺伝子導入後 16 日目より ES 細胞様のコロニーが出現し、SeVdp (KOSM302L) は遺伝子導入後 18 日目より ES 細胞様のコロニーが出現した。

出現した ES 細胞様コロニーは未分化マーカーである NANOG、OCT3/4 を免疫抗体染色法で確認することができ、10 代以上の継代をすることができた。

なお、Dnavec-SeV で樹立した iPS 細胞はガラス法により凍結保存・解凍後の培養が可能であったが、SeVdp (KOSM302L) で樹立した iPS 細胞は同法により凍結保存・解凍後に細胞形態が著しく崩れやすいことが明らかになった。

② XV による iPS 細胞の樹立

当研究室で開発したウイルスベクターを用いて胎児繊維芽細胞である BJ 細胞に遺伝子導入したところ、導入効率が MOI=3 で 8 割程導入することができ、4 遺伝子の発現が確認できた。本ベクターを BJ 細胞に遺伝子導入後 7 日目に MEF 細胞上に播種し、ヒト ES 細胞維持用培養液にて培養を行ったところ 21 日目より偽コロニーが出現し、27 日目に ES 細胞様コロニーの出現が確認できた (樹立効率約 0.01%程度)。

ES 細胞様コロニーは未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼを発現し、NANOG、OCT4、SSEA4、Tra-1-60 の各分子も免疫抗体染色法で発現が確認できた (図 1)、15 代以上の継代ができた。また、網羅的遺伝子解析法による遺伝子発現パターンが ES 細胞 (khES-3 細胞) に近似しており、正常のヒト細胞核型を保持していた。また胚様体を形成することができ、三胚葉系の細胞の出現が確認できた。

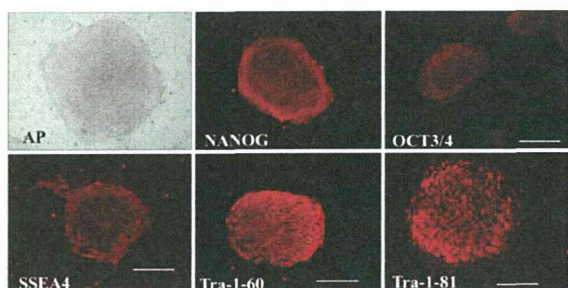


図 1. XV にて樹立した iPS 細胞の未分化マーカーの発現解析

線維芽細胞より XV を用いて樹立した iPS 細胞の未分化マーカーの発現を、アルカリフォスファターゼ (AP) に対する化学染色、および各蛋白質特異的抗体を用いた免疫抗体染色法にて解析を行った。スケールバーは 500 μ m を表す。

同様に健康人末梢血由来単核球を IL-2、CD3/CD28 ビーズで刺激して得られた T 細胞に対して、ほぼ 100% の効率で遺伝子導入が可能であり、遺伝子導入後 22 日目に ES 細胞様コロニーが出現し、各コロニーにおいて未分化マーカーの発現が確認できた (図 2)。

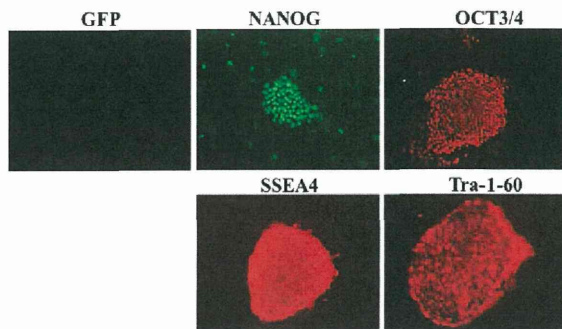


図 2. 末梢血 T 細胞由来 iPS 細胞の未分化性解析

IL-2、CD3/CD28 にて 7 日間刺激した健康人末梢血由来 T 細胞に XV を感染させ樹立した iPS 細胞の GFP 発現及び未分化マーカーを免疫抗体染色法にて解析した。

(2) 難病患者由来 iPS 細胞の樹立

九州大学小児科にて採取した X 連鎖性無ガンマグロブリン症候群 (XLA) 女性患者由来末梢血より単核球を分離し、IL-2、CD3/CD28 ビーズで刺激して得られた T 細胞に対して、Dnavec-SeV および XV によって iPS 細胞の樹立を行った。

SeV (導入効率 39.0%) および XV (導入効率 100%) にて遺伝子導入した T 細胞を 3 日目に MEF 上に播種し、ES 細胞維持用培養液にて培養を行うと、SeV では遺伝子導入後 14 日目に、XV では遺伝子導入後 24 日目に ES 細胞様コロニーの出現が確認できた (図 3)。

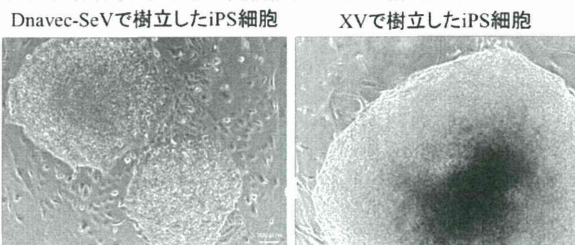


図 3. XLA 患者より樹立した iPS 細胞の形態

左図が Dnavec-SeV、右図は XV を用いて X 連鎖性無ガンマグロブリン症候群 (XLA) 患者由来末梢血 T 細胞より樹立した iPS 細胞の形態。それぞれ ES 細胞様形態を示す。

特に Dnavec-SeV で樹立したものは未分化マーカーである NANOG の発現が確認できた (図 4)。

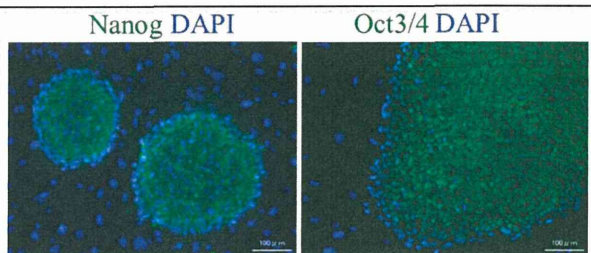


図 4. Dnavec-SeV で樹立した XLA 患者由来 iPS 細胞の未分化性解析

Dnavec-SeV で樹立した XLA 患者由来 iPS 細胞を未分化マーカーである OCT3/4 および NANOG 特異的抗体で染色した (緑: 各蛋白質発現; 青: 核染色)。

(3) iPS 細胞由来血液細胞分化誘導法の開発

上記 XV にて樹立した iPS 細胞を AGMS-3 細胞上に播種した後、ES 細胞維持用培養液で 2 日間培養し、その後分化誘導用培養液に交換し 12 日間培養を行った。その結果、CD34、CD45 両陽性細胞の出現を確認できた(図 5)。

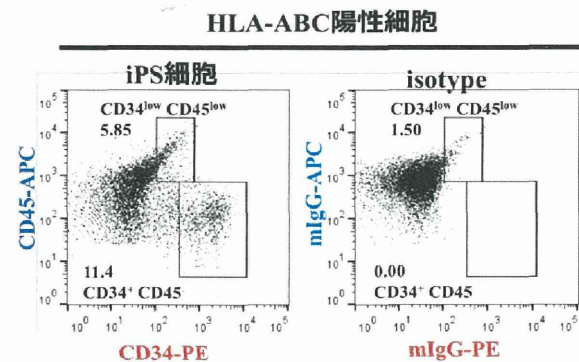


図 5. iPS 細胞由来血液細胞の解析

XV を用いて樹立した iPS 細胞を AGMS-3 細胞との共培養法にて血液系細胞へ分化誘導を行った (CD34⁺CD45⁺: 血管内皮様細胞、CD34^{low}CD45^{low}: 造血幹・前駆様細胞)。

(4) GMP 規格 iPS 細胞樹立に向けた検討

まず 409B2 細胞を用いて、フィーダーフリー、異種成分不含の条件での培養法について検討を行ったところ、表 1 のような結果が得られた。

	mTeSR1	ReproFF2	S-Medium	Essential8	CELRENA
Matrigel	◎	○	×	○	◎
VTN-N	◎	—	—	○	×
Geltrex	◎	×	—	○	◎
i-Matrix511	◎	—	—	○	◎

表 1. 異種成分不含培養条件による iPS 細胞培養結果
◎: NANOG 発現を確認、○: コロニー形態の維持が可能
×: コロニー形態維持が不可能、—: 未検討

(5) XLA 患者および WAS 患者由来 iPS 細胞の樹立と X 染色体不活化の評価

患者 iPS 細胞が Nanog, Oct3/4 などのマーカー上の特徴を有していることを確認後、長期間培養し、X 染色体不活化の状態を継続的に調べた。樹立した早期の XLA 患者由来 iPS 細胞では、X 染色体不活化は、non-random な不活化であり、患者母由来の X 染色体が不活化していた。この iPS 細胞を長期に培養した結果 (Passage 19)、X 染色体不活化の解除は認められなかった。他方、X 染色体不活化異常を起こしたメカニズムを解析するために、女性 XLA 患者および女性 WAS 患者末梢血のエキソーム解析、および RNA Seq 解析を行った。これまで原因となる遺伝子変異は同定できていないが、解析を継続中である。

(6) 免疫学的機序による先天性溶血性貧血が否定された症例解析

原因不明の先天性溶血性貧血症例についてその病因

を検討した結果、8 例に赤血球特異的な転写因子である、KLF1 遺伝子の変異を同定した。全例、変異 KLF1 の複合ヘテロ接合体であった。新生児期重症黄疸にて光線療法既往があり、1 歳時までに赤血球輸血が必要であり、8 例のうち 5 例はその後赤血球輸血依存性の重症慢性溶血を認めた。赤血球形態はサラセミア様の小球性低色素性貧血であった。赤血球像は多彩であり、著しい hypochromasia、大小不同を伴う poikilocytosis、標的赤血球、破碎赤血球などが観察された。赤血球酵素活性のスクリーニングではピルビン酸キナーゼ (PK) 活性の低下を全例で認めたが、翻訳領域およびエクソン-イントロン接合部分の遺伝子変異は同定し得なかった。等電点電気泳動および異常バンドから抽出したヘモグロビンの質量分析では、Hb Bart's (γ4) および Hb Portland I (ζ2γ2) を認めた。グロビン遺伝子解析では HbF の増加を説明する β サラセミア遺伝子型を保有する個体は一例も無く、また γ グロビン発現異常を説明出来るシス制御領域の変異も同定し得なかった。

β グロビンおよび赤血球型 PK に同時に発現異常が存在する事実より、両遺伝子に共通のトランス活性化因子である転写因子 KLF1 の発現低下を疑い、その構造遺伝子である KLF1 の変異解析を実施したところ、表 2 に示すような結果を得た。

表 2. 同定した KLF1 遺伝子変異、アミノ酸置換

Pt#	Allele 1	Allele 2
1	R331W	G335R
2	G176RfsX179	R301H
3	-154C/T	A298P
4	Q58X	A298P
5	G176RfsX179	A298P
6	G176RfsX179	A298P
7	G176RfsX179	A298P
8	G176RfsX179	A298P

(7) 質量分析装置を用いたグロブintaiピングの技術開発

マヒドン大学サラセミアリサーチセンターはサラセミア研究が盛んであり、膨大なサラセミア患者サンプルを保有する。マヒドン大学サラセミアリサーチセンターの Saovaros Svasti 博士との共同研究として、サラセミアの皮膚繊維芽細胞に関する情報を提供頂くと共に、今後のサラセミア患者サンプルの提供に関して協議中である。本疾患の高感度かつ簡便な解析に必要な、alpha-, beta-, delta-, epsilon-, gamma-, mu-, theta-, zeta-globin を認識するペプチドをデザインすると共に、ヒト臍帯血、ヒト成体末梢血、K562 赤白血病細胞を用いて、質量分析装置で解析し、有望なペプチドのスクリーニングを行った。さらにクロマトグラフィーの形状精査を行い、ペプチドの最終候補を 11 個選出した。

(8) PNH 患者情報の収集とその解析

PNH 5 名 (男 2 名/女 3 名、平均年齢 48.4 歳、平均罹病期間 14.8 年) の病型は、古典的 PNH 2 名、再生不良性貧

血-PNH症候群 (AA-PNH) 3名であった。AA-PNH3以外は血管内容血が顕著であった。血栓症の既往は認められなかった。造血障害を併発し、さらに、顆粒球膜上の NKG2D リガンドを検出できたのは、AA-PNH1とAA-PNH2の2名であった (表3)。造血障害の程度はいずれも軽症 (grade 1) であった。

表3. 顆粒球膜上の NKG2D リガンド発現

	ULBP1	ULBP2	ULBP3	MICA/B
PNH1	-	-	-	-
PNH2	-	-	-	+
AA-PNH1	+	+	+	±
AA-PNH2	+	-	+	-
AA-PNH3	-	-	-	-

D. 考察

平成 25 年度の研究は、疾患特異的 iPS 細胞樹立に向けての iPS 細胞樹立法の検討を主に行った。現在、iPS 細胞樹立法に関してはレトロウイルスベクター (ガンマレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター)、エピソードベクター、センダイウイルスベクターが主に用いられてきているが、レトロウイルスベクターおよびエピソードベクターによる樹立法はその樹立効率の低さとゲノム毒性発生の可能性より、当研究室ではセンダイウイルスベクター (SeV) による樹立法を中心に実施してきた。また当研究室で開発したウイルスベクターに関しても、ほぼセンダイウイルスベクターと同様の性質を保持しているものと考え今回の樹立法の検討に加えた。

iPS 細胞を樹立することが可能な SeV は 2 種類存在しそれぞれ長所、短所が存在する。Dnavec-SeV は樹立までの期間の短縮化が可能である一方、3 種のベクターを同時に感染できた細胞でのみ iPS 細胞が樹立可能であるため操作が煩雑であった。SeVdp (KOSM302L) は 1 種のベクターで 4 個の遺伝子をすべて発現させることが可能であったが、樹立までに長期間必要であり、細胞種によっては iPS 細胞化できない細胞があることがわかった。これは、SeVdp (KOSM302L) は Dnavec-SeV と比較し、細胞へのダメージが大きく、幼弱な細胞は SeVdp (KOSM302L) による遺伝子導入に耐えることができないことによるものと考えられた。よって疾患 iPS 細胞樹立に用いる SeV は Dnavec-SeV を用いることにした。

当研究室で開発したウイルスベクター (XV) は、1 種のベクターで 5 個の遺伝子を発現することが可能であり、繊維芽細胞、末梢血由来 T 細胞の両者に対して高い遺伝子導入効率を示した。本ベクターを用いて樹立した ES 細胞様コロニーは未分化マーカーの発現等、ES 細胞と近似した性質を示すことより iPS 細胞樹立が可能ベクターであると考えている。SeV と比較して iPS 細胞の樹立効率はやや低いものの、樹立した iPS 細胞においては本ベクターの残存は検出されおらず、上記 Dnavec-SeV と同様に疾患 iPS 細胞を樹立する手段として有効であると考えられた。本 XV は、腫瘍溶解性ウイルスとして臨床研究において既に

使用されているウイルスをベクター化したものであり、将来的には GMP 規格製品の作製も可能となり、研究室レベルでの比較的容易な使用が可能化するものと期待され、本研究目的にも合致していると考えられる。

これら Dnavec-SeV および XV を用いての iPS 細胞樹立の標準手順書を作成し、XLA 女性患者より iPS 細胞の樹立が可能であった。現在両方法にて樹立した XLA 由来 iPS 細胞について、未分化性、多能性の解析を進めるとともに、X 染色体の不活性化、血液細胞への分化能についても検討を行い、両者間の相違点を明らかにするとともに、今後の解析に使用する iPS 細胞株の選定を行っている。

また、フィーダーフリー、異種成分不含条件下での既樹立 iPS 細胞の培養に成功し、現在同条件にて iPS 細胞を樹立する方法を SeV および XV の両方法を用いて検討を行っている。今後、現行の MEF 細胞との共培養法による iPS 細胞の樹立、維持法より、異種成分不含の条件下での iPS 細胞の樹立、維持法へと移行していく予定である。

樹立した iPS 細胞は病態の再現を行うために、血液細胞への分化誘導が必要であるが、当研究室では AGMS-3 細胞との共培養法にて高効率に安定的に造血前駆細胞への分化を誘導することができた。今後、好中球系細胞、巨核球系細胞、赤血球系細胞、T 細胞系細胞、B 細胞系細胞への分化誘導法について検討を行っていく予定である。

本研究で中心的に研究を進めていく予定の難病疾患については、先ず X 染色体不活化異常によって発症した XLA 患者 iPS 細胞では、予想通り X 染色体不活化異常が確認され、長期的な培養でも不活化の解除は起こらなかった。このことは、X 染色体不活化の偏りが、確率論的な機序で起こったとする考えを否定するものである。これを基盤として、X 染色体不活化を解除・制御する創薬研究を行う。同時に、さらなる X 染色体不活化機構明研究も実施していく必要があるものと考えられた。

先天性溶血性貧血の病因の 1 つとして、KLF1 遺伝子多型が赤血球内 HbF 量を増加させる HPPH (hereditary persistence of fetal hemoglobin) と関連していることは既に報告されていた。一方 KLF1 の 2 個目の zinc finger におけるミスセンス変異 (E325K) はヘテロ接合体マウスが CDA (congenital dyserythropoietic anemia) 様の表現型を示すことも最近明らかになった。今回の検討結果から、KLF1 遺伝子変異は胎芽～胎児型グロビンの出現および β グロビン発現低下、赤血球型 PK 活性の低下という二つの遺伝子異常による赤血球寿命の短縮を来し、重症先天性溶血性貧血を惹起することが明らかになった。KLF1 異常症の臨床像は新生児期重症早発黄疸および赤血球輸血を必要とする新生児溶血性疾患であり、半数以上がその後赤血球輸血依存性の重症慢性溶血性貧血を呈した。重症 PK 異常症に加えて、KLF1 異常症も iPS 細胞を用いた新規治療法開発の対象とすべきと考えられ、現在患者 iPS 細胞の樹立を準備中である。

先天性溶血性貧血の中でも患者数の多いサラセミアは特に東南アジア各国の大きな医療問題となっており、薬剤による治療法の開発が可能化すれば人類へ

の貢献は極めて大きい。平成 25 年度は、マヒドン大学サラセミアリサーチセンターよりサラセミアの皮膚繊維芽細胞に関する情報を効率よく収集し、26 年度に向けサラセミア患者サンプル入手に関する基盤の整備中である。これまでグロビンタンパク質の定性・定量は困難であり、遺伝子発現解析が主として行われた。グロビンタンパク質を解析するため、様々なグロビンを認識するペプチドをデザインし、有望なペプチドのスクリーニングを行った。今後本法を応用し、ヒト iPS 細胞から分化誘導した赤血球系細胞の品質を解析する基盤技術の開発が見込める。

後天性の造血不全症の代表的存在である PNH 患者において、NKG2D リガンド膜発現細胞は自己リンパ球により速やかに傷害された。そのため、リガンド発現を血球膜上に検出した 2 名は、現在も血球傷害免疫機序が発動していることが示唆された。今後さらに年齢、性別、免疫抑制療剤使用の有無など iPS 細胞作成に最適な条件を探る必要がある。

E. 結論

疾患 iPS 細胞の樹立は、Dnavec 社のセンダイウイルスベクター及び当研究室で開発したウイルスベクターを用いて樹立を行うことに決定した。平成 25 年度の研究結果を基にして作成したヒト iPS 細胞樹立手順書に従って、今後新たな患者由来 iPS 細胞の樹立を進めていく予定である。iPS 細胞の樹立後、AGMS-3 細胞との共培養法を用いて造血前駆細胞を誘導し、血液細胞への分化誘導を行い、薬剤スクリーニングを行っていく計画である。

X 染色体不活化異常によって発症した、XLA 患者および WAS 患者、および健康女性から、iPS 細胞を樹立した。X 染色体不活化異常によって発症した XLA 患者 iPS 細胞では、X 染色体不活化異常が確認され、長期的な培養でも不活化の解除は起こらなかった。女性 XLA 患者および女性 WAS 患者末梢血のエキソーム解析、および RNA Seq 解析を行った。これまで原因となる遺伝子変異は同定できていないが、今後とも解析を進める。これを基盤として、X 染色体不活化を解除・制御する創薬研究を行う。同時に、X 染色体不活化機構の解明研究を継続する計画である。

摘脾術により QOL の改善が期待できない先天性溶血性貧血の一病型として、新たに KLF1 異常症を同定することができ、今後 iPS 細胞を用いた病態解明および創薬の対象疾患として重要と考えられた。

サラセミア研究においては、マヒドン大学サラセミアリサーチセンターとの共同研究の一環として、先ず患者サンプルの円滑な輸送体制の確立を行い、iPS 細胞を樹立し、質量分析装置を応用することで、創薬開発研究の加速化を図る予定である。

iPS 細胞樹立による PNH 造血障害モデル作成には、造血障害を有し免疫機序の関与が支持される AA-PNH1 または AA-PNH2 が良い候補患者であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Inoue-Yokoo T, Tani K, Sugiyama D. Mesodermal and hematopoietic differentiation from ES and iPS cells. Stem Cell Rev. 9:422-434, 2013

2) Liao J, Marumoto T, Yamaguchi S, Okano S, Takeda N, Sakamoto C, Kawano H, Nii T, Miyamoto S, Nagai Y, Okada M, Inoue H, Kawahara K, Suzuki A, Miura Y, Tani K. Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. Mol Ther. 21:1242-12450, 2013

3) Kurita R, Suda N, Sudo K, Miharada K, Hiroshima T, Miyoshi H, Tani K, Nakamura Y. Establishment of immortalized human erythroid progenitor cell lines able to produce enucleated red blood cells. PLoS ONE. 8:e59890, 2013

4) Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamauchi K, Ueno K, Nariai N, Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K, Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 110:3023-3028, 2013

5) Inoue H., Tani K., Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. Cell Death and Differentiation. 2013 Jul 5, Epub ahead of print

6) Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T. B cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. Int J Hematol. 98: 355-60, 2013

7) Ishimura M, Yamamoto H, Mizuno Y, Takada H, Goto M, Doi T, Hoshina T, Ohga S, Ohshima K, Hara T. A non-invasive diagnosis of histiocytic necrotizing lymphadenitis by means of gene expression profile analysis of peripheral blood mononuclear cells. J Clin Immunol. 33(5): 1018-26, 2013

8) Imagawa T, Nishikomori R, Takada H, Takeshita S, Patel N, Kim D, Lheritier K, Heike T, Hara T, Yokota S. Safety and efficacy of canakinumab in Japanese patients with phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndrome as established in the first open-label, phase-3 pivotal study (24-week results). Clin Exp Rheumatol. 31: 302-9, 2013

9) Higuchi Y, Shimizu J, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Takada H, Ishimura M, Hara T, Ohara O, Asagoe K, Kubo T. The identification of a novel

splicing mutation in ClqB in a Japanese family with Clq deficiency: a case report. *Pediatr Rheumatol Online J.* 11(1): 41, 2013

10) Tsuzuki S, Akahira-Azuma M, Kaneshige M, Shoya K, Hosokawa S, Kanno H, Matsushita T. A Japanese neonatal case of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency presenting as severe jaundice and hemolytic anemia without apparent trigger. *Springerplus.* 2013;2:434.

11) Akizawa Y, Kanno H, Kawamichi Y, Matsuda Y, Ohta H, Fujii H, Matsui H, Saito K. Enhanced expression of myogenic differentiation factors and skeletal muscle proteins in human amnion-derived cells via the forced expression of MYOD1. *Brain Dev.* 2013 Apr;35(4):349-55.

12) Shimanuki M, Sonoki T, Hosoi H, Watanuki J, Murata S, Mushino T, Kuriyama K, Tamura S, Hatanaka K, Hanaoka N, Nakakuma H: Acute Leukemia Showing t(8;22)(p11;q11), Myelodysplasia, CD13/CD33/CD19 Expression and Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangement. *Acute Haematologica* 129:238-242, 2013

13) Shimanuki M, Sonoki T, Hosoi H, Watanuki J, Murata S, Kawakami K, Matsuoka H, Hanaoka N, Nakakuma H: Molecular Cloning of IG λ Rearrangements using Long Distance Inverse-PCR (LDI-PCR). *Eur J Haematol* 90:59-67, 2013

14) Hanaoka N, Murakami Y, Nagata M, Horikawa K, Nagakura S, Yonemura Y, Murata S, Sonoki T, Nakakuma H: Occupancy of whole blood cells by a single PIGA-mutant clone with HMGA2 amplification in a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria patient having blood cells with NKG2D ligands. *Br J Haematol* 160:114-6, 2013

15) Kurimoto M, Matsuoka H, Hanaoka N, Uneda S, Murayama T, Sonoki T, Nakakuma H: Pretreatment of leukemic cells with low-dose decitabine markedly enhances the cytotoxicity of gemtuzumab ozogamicin. *Leukemia* 27:233-258, 2013

16) Sugiyama D, Kulkeaw K and Mizuochi C. "TGF-beta-1 up-regulates extra-cellular matrix production in mouse hepatoblasts." *Mech Dev.* 130(2-3), 195-206, 2013

17) Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, Lai MI, and Sugiyama D. "Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells." *Stem Cell Res Ther.*, 4(3):71, 2013

18) Hikosaka K, Ikutani M, Shito M, Kazuma K, Gulshan M, Nagai Y, Takatsu K, Konno K, Tobe K, Kanno H,

Nakagawa T. Deficiency of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 3 (Nmnat3) causes hemolytic anemia by altering the glycolytic flow in mature erythrocytes. *J Biol Chem.* 2014 Apr 16.

19) Kobayashi Y, Hatta Y, Ishiwatari Y, Kanno H, Takei M. Human parvovirus B19-induced aplastic crisis in an adult patient with hereditary spherocytosis: a case report and review of the literature. *BMC Res Notes.* 2014;7:137.

20) Viprakasit V, Ekwattanakit S, Riolueang S, Chalaow N, Fisher C, Lower K, Kanno H, Tachavanich K, Bejrachandra S, Saipin J, Juntharanyom M, Sanpakit K, Tanphaichitr VS, Songdej D, Babbs C, Gibbons RJ, Philipsen S, Higgs DR. Mutations in Kruppel-like factor 1 cause transfusion-dependent hemolytic anemia and persistence of embryonic globin gene expression. *Blood.* 2014;123:1586-1595. doi: 10.1182/blood-2013-09-526087. Epub 2014 Jan 17.

21) Swain A, Inoue T, Tan KS, Nakanishi Y, and Sugiyama D. "Intrinsic and Extrinsic Regulation of Mammalian Hematopoiesis in the Fetal Liver." *HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY*, In press, 2014

22) Inoue T, Kulkeaw K, Muennu K, Tanaka Y, Nakanishi Y, and Sugiyama D. The herbal drug ninjin'yoeito accelerates myelopoiesis but not erythropoiesis in vitro. *Genes to Cells.* 2014. (in press)

23) Yamaguchi S, Marumoto T, Nii T, Kawano H, Liao J, Nagai Y, Okada M, Takahashi A, Inoue H, Sasaki E, Fujii H, Okano S, Ebise H, Sato T, Suyama M, Okano H, Miura Y, Tani K. Characterization of common marmoset dysgerminoma like tumor induced by lentiviral expression of reprogramming factors. *Cancer Science* 2014 (in press)

24) Nii T, Marumoto T, Kawano H, Yamaguchi S, Liao J, Okada M, Sasaki E, Miura Y, Tani K, Analysis of essential pathways for self-renewal in common marmoset embryonic stem cells. *FEBS Open Bio* 2014 (in press)

25) Narusawa M, Inoue H, Sakamoto C, Matsumura Y, Takahashi A, Inoue T, Watanabe, Miyamoto S, Miura M, Hijikata Y, Tanaka Y, Inoue M, Takayama K, Okazaki T, Hasegawa M, Nakanishi Y, and Tani K. TLR7 ligand augments GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Immunology Research* 2014(in press)

2. 学会発表

1) Murahashi M, Hijikata Y, Tanaka Y, Inoue H, Marumoto T, Nakanishi Y, Yoshida K, Tsunoda Nakamura,

Y, Tani K. Phase I clinical trial of cancer vaccine combined with chemotherapy targeting both tumor antigen and immune tolerance against advanced solid tumors. 37th ESMO Congress, September 2012, Vienna, Austria

2) Yosuke Yokota, Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Takehiko Yokomizo and Kenzaburo Tani. Absence of LTB4/BLT1 axis promotes generation of long-lasting antitumor memory responses induced by administration of GM-CSF gene-transduced tumor cells, in a CD4+ T cell-dependent manner. American Society of Hematology, 53th Annual Meeting, San Diego, 2011.

3) Jiyuan Liao, Tomotoshi Marumoto, Shinji Okano, Saori Yamaguchi, Takenobu Nii, Hirotaka Kawano, Yoko Nagai, Chika Sakamoto, Michiyo Okada, Yoshie Miura, Hiroyuki Inoue, Masato Tanaka, Kaori Nagatoshi, Kohichi Kawahara, Akira Suzuki and Kenzaburo Tani. Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. American Society of Hematology, 53th Annual Meeting, San Diego, 2011.

4) Hiroyuki Inoue, Yasuki Hijikata, Keisuke Yasunari, Akira Sakamoto, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Yumiko Matsumura, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic Edmonston strain of measles virus harboring the wild-type N, P, L Genes (MV-NPL) effectively target lung cancer stem cells. American Association of Cancer Research, 103th Annual Meeting, Chicago, 2012

5) Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Beibei Wang, Keisuke Yasunari, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Tomotoshi Marumoto, Atsushi Takahashi, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Cocksackievirus B3 is an immunostimulatory oncolytic virus active against lung adenocarcinoma. American Association of Cancer Research, 103th Annual Meeting, Chicago, 2012

6) Keisuke Yasunari, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Beibei Wang, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Oncolytic Echovirus 4 as a potent virotherapy agent against human esophageal cancer

7) Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Akira Sakamoto, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Yumiko Matsumura, Takafumi Nakamura, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered Measles virus Edmonston strain expressing the wild-type N, P, L Genes (MV-NPL) is a promising oncolytic virotherapy agent against lung cancer stem cells. American Society of Gene and Cell Therapy, 15th

Annual Meeting, Philadelphia, 2012.

8) Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Akira Sakamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic measles virus lyses non-small cell lung cancer stem cells in vitro and in vivo. Asian Pacific Lung Cancer Conference, 5th Annual Meeting, Fukuoka, 2012.

9) Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Akira Sakamoto, Kaname Nosaki, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic measles virus effectively targets and kills non-small cell lung cancer stem cells. Asian Pacific Society of Respirology, 17th Annual Meeting, Hong Kong, 2012.

10) Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Cocksackievirus B3 (CVB3) as a Novel Oncolytic Virotherapy Agent against Non Small Cell Lung Cancer. 第 52 回日本肺癌学会 総会, 大阪, 2011

11) Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Meiko Yamada, Takafumi Nakamura, Nosaki Kaname, Urata Yasuo, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Cocksackievirus B3 is an Oncolytic Virus Active Against Non-Small Cell Lung Cancer, 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸, 2012

12) Hiroyuki Inoue, Akira Sakamoto, Keisuke Yasunari, Shohei Miyamoto, Yumiko Matsumura, Kaname Nosaki, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Novel engineered oncolytic Edmonston strain of measles virus elicits remarkable oncolytic activity against non-small cell lung cancer stem cells. 第 18 回日本遺伝子治療学会, 熊本, 2012

13) Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Beibei Wang, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Cocksackievirus B3 is an immunostimulatory oncolytic virus active against lung adenocarcinoma. 第 18 回日本遺伝子治療学会, 熊本, 2012

14) Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Beibei Wang, Keisuke Yasunari, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. 非小細胞肺癌に対するコクサッキーウイルス B3 を用いた新規腫瘍溶解性ウイルス療法, 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌, 2012

15) Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Yosuke Yokota, Ayumi Watanabe, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa,

Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. TLR7 ligand Imiquimod enhances GM-CSF-induced immunological antitumor effect. 第4回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会, 金沢, 2012

16) Ayumi Wanatabe, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Keisuke Okita, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Shinya Yamanaka and Kenzaburo Tani. Novel cancer immunotherapy using induced pluripotent stem cells genetically engineered to produce GM-CSF. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012

17) Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Ayumi Watanabe, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Plasmacytoid DCs are involved in an antitumor immunity induced by GM-CSF gene-transduced tumor cells. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012

18) Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Shohei Miyamoto, Yumiko Matsumura, Kaname Nosaki, Akira Sakamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Novel engineered oncolytic measles virus shows oncolytic activity against non-small cell lung cancer stem cells. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012

19) Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Beibei Wang, Keisuke Yasunari, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Immunostimulatory coxsackievirus B3 as a potent oncolytic agent against non-small cell lung carcinoma. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012

20) Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Kaname Nosaki, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. 肺癌幹細胞を標的とした新規遺伝子改変麻疹腫瘍溶解性ウイルス療法. 第53回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2013

21) Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. A novel cancer cell vaccine using induced pluripotent stem cells genetically engineered to produce GM-CSF elicits substantial antitumor immunity in a syngeneic mouse model. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013

22) Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu,

Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Dual microRNA-regulated oncolytic coxsackievirus B3 infection displays antitumor activity with attenuated pathogenicity in mice. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013

23) Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Combination use of TLR7 ligand with GM-CSF gene-transduced tumor vaccines provides substantial antitumor immunity against poorly immunogenic mouse lung cancer cells. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013

24) Miyako Sagara, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Chika Sakamoto, Yuki Nakano, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. CVB3 infection elicits potent oncolytic activity against lung cancer stem cells. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013

25) Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. Gene expression profiling identifies plasmacytoid dendritic cells as positive regulators in GM-CSF-induced antitumor immunity. The 4th Japanese Society of Hematology International Symposium 2013, Matsuyama, Japan, May 24-25, 2013

26) Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Vaccination with irradiated induced pluripotent stem cells genetically engineered to secrete GM-CSF provides substantial antitumor immunity in immunocompetent syngeneic mouse models. 第19回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013

27) Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. Plasmacytoid dendritic cells play an essential role in GM-CSF-induced antitumor immunity. 第19回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013

28) Miyako Sagara, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Chika Sakamoto, Yuki Nakano, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Differential susceptibility of cancer stem cells and cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition to oncolysis by CVB3 infection. 第19回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013

29) Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Infection with dual microRNA-targeted coxsackievirus B3 abrogates its pathogenicity retaining oncolytic activity. 第 19 回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013

30) Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Beibei Wang, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani.

Infection with Echovirus 4 elicits potent oncolytic activity against cisplatin-resistant esophageal carcinoma. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013

31) Miyako Sagara, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Chika Sakamoto, Yuki Nakano, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. CVB3 infection displays different oncolytic activities against cancer stem cells and cancer cells undergoing EMT. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013

32) Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Therapeutic vaccine with GM-CSF gene-transduced cancer stem cells inhibits tumor growth and metastasis of breast cancer. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013

33) Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. MicroRNA-targeted coxsackievirus B3 infection markedly reduces its pathogenicity retaining oncolytic activity. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013

34) Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Vaccination with irradiated induced pluripotent stem cells elicits substantial antitumor immunity. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013

35) Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. TLR7 ligand overcomes therapeutic resistance to GM-CSF-gene transduced tumor vaccination. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013

36) Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, and Kenzaburo Tani. Therapeutic vaccine with GM-CSF gene-transduced cancer stem cells inhibits tumor growth and metastasis of breast

cancer. The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium, Recent Advances in Stem Cell Biology 2013. Fukuoka, Japan, November 4-6, 2013

37) Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. MicroRNA-regulated coxsackievirus B3 abrogates its pathogenicity retaining oncolytic activity. The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium, Recent Advances in Stem Cell Biology 2013. Fukuoka, Japan, November 4-6, 2013

38) Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. MicroRNA-targeted coxsackievirus B3 infection markedly reduces its toxicity without losing its original oncolytic activity. Therapeutics Discovery Symposium Asia Small RNAs to Stem Cells & Epigenetic Reprogramming Asia-2013 Meeting On 'RNA Regulation to Delivery, Programming to Pluripotency & Therapeutics'. Tokyo, Japan, November 25-26, 2013

39) Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Takafumi Hiramoto, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Vaccination with irradiated induced pluripotent stem cells genetically engineered to produce GM-CSF confers potent T cells-mediated antitumor immunity. The 53th ASH Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA, December 10-13, 2013

40) Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Yumiko Matsumura, Atsushi Takahashi, Ayumi Watanabe, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. TLR7 ligand potentiates GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells. The 53th ASH Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA, December 10-13, 2013

41) Hara T, Ishimura M, Tahada H: Autoimmune diseases in patients with primary immunodeficiency diseases. The 2nd International Congress on Controversies in Rheumatology and Autoimmunity, Apr 4-6, 2013, Budapest, Hungary

42) Hara T: Innate immunity and infection in the newborn. The 9th Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 9-12, 2013, Kuching, Sarawak, Malaysia

43) Hara T, Ishimura M, Yamamoto H, Mizuno Y, Takada H, Ohshima K: A Non-invasive Diagnosis of Histiocytic Necrotizing Lymphadenitis. Frontiers in Immunology Research 2013 International Conference, Jul 1-4,

2013, Monte Carlo, Monaco

44) Takimoto T, Ishimura M, Takada H, Morio T, Ohga S, Hara T: A Japanese female case of Wiskott-Aldrich syndrome with skewed X-chromosome inactivation. The 4th JSH International Symposium, May 24-25, 2013, Ehime, Japan

45) 古賀 木綿子, 野口 磨依子, 大園 秀一, 中川 慎一郎, 上田 耕一郎, 稲田 浩子, 松石 豊次郎, 財津 亜友子, 横地 一興, 大賀 正一, 菅野 仁, 伊藤 悦郎. 心不全を伴う危急的貧血で発症した Diamond-Blackfan 貧血の乳児例. 第 116 回日本小児科学会学術集会 (平成 25 年 4 月 19-21 日) 日本小児科学会雑誌 117:1346, 2013

46) 羽賀洋一, 三井一賢, 小嶋靖子, 佐藤真理, 松裏裕行, 関根孝司, 館野昭彦, 菅野 仁, 小原 明, 佐地 勉. アスコルビン酸とリボフラビンとの併用療法が有効であった遺伝性メトヘモグロビン血症. 第 116 回日本小児科学会学術集会 (平成 25 年 4 月 19-21 日) 日本小児科学会雑誌 117:431, 2013

47) 菅野 仁. 先天性溶血性貧血およびダイヤモンド・ブラックファン貧血の診断法の進歩. 第 55 回 日本小児血液・がん学会 学術集会. 教育セッション 3 赤血球系疾患 (平成 25 年 11 月 29 日)

48) Inoue T and Sugiyama D. "Identification of ACVR2B as a novel erythrocyte marker and analysis of its function" 第 1 回赤血球研究会、札幌、2013 年 10 月、口頭発表

49) Tan KS, Inoue T, Lim WF, Mizuochi C, Kulkeaw K, Preedagasamzin S, Tanaka Y, Lai MI and Sugiyama D. "Spleen Niche Cells Accelerate Erythropoiesis through SCF and IGF-1 Secretion in Mouse Embryo." 第 75 回日本血液学会、札幌、2013 年 10 月、口頭発表

50) Kulkeaw K, Pongpair O, Inoue T, Srinoun K, Yanagi C, Horio Y, Yenchitsomanus P, and Sugiyama D. "Dppa3 accelerates erythroid differentiation accompanied with globin synthesis in the mouse fetal liver." 第 7 回武田科学振興財団薬科学シンポジウム、大阪 2014 年 1 月

51) Inoue T, Kulkeaw K, Kanitta S, Tan KS, Tanaka Y, Kojima N, Nakanishi Y and Sugiyama D. "Clarification of molecular mechanisms on erythropoiesis and its clinical application." JSPS 日本ベトナム二国間交流プログラム、ハノイ、2014 年 2 月、口頭発表

52) 杉山大介、創造的次世代医療実現化を担う ARO の構築、第 2 回トランスレーショナルリサーチシンポジウム、福岡、2014 年 3 月 8 日、口頭発表 (特別講演)

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

- ① New U.S. provisional patent application.
Title: Common marmoset embryonic stem cell lines
Filed: September 11, 2004.
Our Reference No.: 39888-0003PR

② 発明名称 : 新規腫瘍溶解性ウイルス

- ・ 整理番号 QP120013
- ・ 国際特許分類 A61K 35/76
- ・ 代表発明者 井上博之
- ・ 発明者 谷憲三朗、宮本将平、王 倍倍
- ・ 出願日: 2013-04-19
- ・ 出願番号: PCT/JP2013/061686

③ 発明名称: 遺伝子組換えコクサッキーウイルス

- ・ 整理番号 QP130008-US
- ・ 代表発明者 谷憲三朗
- ・ 発明者: 谷憲三朗、井上博之、宮本 将平
- ・ 出願日: 2013/4/17
- ・ 出願番号: 61/812943

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特になし

血液・免疫系難病由来人工多能性幹細胞（iPS）細胞の樹立と新規薬剤探索研究

分担研究者 谷 憲三郎 九州大学生体防御医学研究所 教授

研究要旨

「難病」克服に向けた革新的医療技術として、難病患者の疾患特異的iPS細胞を用いることで、アンメット・メディカル・ニーズである稀少疾患並びに難病病態の細胞レベルでの再現が可能となり、疾患動物モデル無くしても、細胞レベルでの発症機構の解明が期待でき、候補薬剤を効率良く選定できる可能性が高いものと期待できる。本研究は血液および免疫系難病を対象とし、疾患特異的iPS細胞を分化した造血・免疫細胞を対象に、薬剤候補物質を大規模スクリーニングし、候補物質を厳選し、それらの薬剤についての臨床研究を計画・実施するものである。

平成25年度は主に疾患特異的iPS細胞の本格的樹立に向けて、健常人および患者由来iPS細胞の樹立諸条件を検討した。臍帯血、または健常人由来末梢血および繊維芽細胞を用いて2種類のセンダイウイルスベクター、あるいは当研究室が開発したウイルスベクターを用いてiPS細胞を樹立し、比較検討を行った後、iPS細胞樹立に関する手順書を作成した。本手順書に従い、実際にX連鎖性無ガンマグロブリン症候群患者よりiPS細胞を樹立し、未分化性を確認した。また、iPS細胞から造血前駆細胞への分化誘導法の検討を行うことにより、平成26年度以降の疾患iPS細胞の病態解析、および創薬スクリーニング実施に向けての検討を行った。

分担研究者

谷憲三郎 九州大学生体防御医学研究所・教授

A. 研究目的

「難病」の克服に向けてiPS細胞を用いた革新的創薬研究が可能となった。我々はこれまで九州大学病院分子・細胞調整センター（KU-MCPC）において、再生医療・免疫療法に用いる細胞製剤を製造し、施設内にGMP（Good manufacturing practice）準拠検査室を設置、薬事法準拠の品質検査体制を構築した。さらに霊長類・マウスiPS/ES細胞からの血球分化系の確立（Kurita, R., Tani, K. Stem Cells, 2006）、安全性に優れる自己開発・遺伝子非挿入型麻疹ウイルスベクターを用いたiPS細胞樹立法の開発を行っている。また、厚生労働省「iPS細胞を利用した創薬研究支援事業」にて整備した大型液体窒素保存タンクと供給設備、異常時対応システム及びゲノミクス・エピゲノミクス・プロテオミクス解析関連機器等の導入を行うことにより、基盤整備を行ってきた。研究期間内（平成26年度から平成29年度）に、倫理委員会承認取得後各種難病患者iPS細胞樹立を開始し、それらを対象に、文部科学省・最先端研究基盤事業「化合物ライブラリーを活用した創薬等最先端研究・教育基盤の整備」等を活用し、各疾患治療薬候補物質を選定する。① 細胞分化障害又は細胞死が誘導されやすいことが病態である遺伝性および後天性血液・免疫疾患を対象とした創薬研究を実施する。② X染色体不活化解除はiPS細胞の特徴であり、これを用いた治療は、X連鎖劣性遺伝性疾患の女性患者へ応用可能と考えられる。具体的にはX染色体不活化異常によるX連鎖性無ガンマグロブリン血症、iskott-Aldrich症候群女性患者を同定し、iPS細胞を用いてX染色体

不活化を定量し、不活化を解除されたiPS細胞の治療への応用、X染色体不活化異常のメカニズムの解明に（文章が欠失しています！）

向け網羅的解析を行い、X染色体不活化解除薬剤を選定する。平成26年度は平成25年度に作成した手順書に基づき各種難病患者由来iPS細胞を樹立、特性解析、iPS細胞由来分化細胞の機能解析と並行してトランスオミクス解析による網羅的解析を行う。さらに順次化合物ライブラリーを用いた創薬スクリーニングを行い、候補薬剤の選定に着手する。また平成26年度に、患者末梢血単核球、口腔内細胞等からDNAを抽出し、ヒトアンドロゲンレセプター遺伝子繰り返し配列を利用して、X染色体不活化の程度を定量する。平成28年度から得られた候補化合物について順次GLPレベルでの前臨床試験の準備を行い開始する。また、平成27年度から保存検体（疾患特異的iPS細胞、患者由来生体材料）の品質評価項目の策定、評価を行う。以上は現在の最先端医学を駆使した研究内容であり、極めて独創性と社会への貢献度の高い研究である。

B. 研究方法

5ヶ年研究計画概要

平成25年度は血液・免疫系難病疾患患者検体の取り扱い、及びiPS細胞の樹立、保存等に関連する各施設での倫理委員会の承認を得る。また、文書による同意を得た健常人検体（骨髄、末梢血など）を用いて、様々な方法でiPS細胞を樹立する。各組織および異なる樹立法により樹立されたiPS細胞の性質の違いを検討するとともに、樹立に向けての手順書の作成を行う。またGMPレベルでのiPS細胞樹立をめざし、種々の検討（基質、培養液など）を行う。

平成26年度より25年度に作成した手順書をもとに血液・免疫系難病疾患患者よりiPS細胞の樹立を行う。樹立したiPS細胞は未分化性、多能性についてin vitro / in vivoによる機能解析を行うとともに、疾患の責任遺伝子変異を確認する。以上の検討によって、樹立が確認できた疾患特異的iPS細胞は、各施設へ送付するとともに、疾患責任遺伝子による遺伝的影響、蛋白質構造異常による表現型への影響等を、トランスオミクス解析（ゲノミクス、エピジェネティクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクス）技術を用いて網羅的に解析しデータベース化する。トランスオミクス解析は、厚生労働省「iPS細胞を利用した創薬研究支援事業」にて整備した解析関連機器を使用する。同時に平成27年度より疾患特異的iPS細胞の長期保存法を検討し、細胞の品質評価項目を策定し評価を行う。

また平成25年度より各血液系（好中球系、B細胞、T細胞、血小板など）への分化誘導法を確立するとともに、細胞バンクなどより手に入る疾患特異的iPS細胞を用いて化合物ライブラリースクリーニングにて新規薬剤の探索を先行する。

平成 25 年度 研究方法

（1）健常人由来検体を用いた iPS 細胞樹立検討

本研究について、倫理審査申請書類を作成し、九州大学医学部地区部局ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理委員会にて申請を行い、承認を得た（許可番号：568-00）。

その後、健常人由来繊維芽細胞（BJ 細胞）、臍帯血由来骨髄細胞、及び IL-2、CD3/CD28 ビーズで刺激した健常人由来末梢 T 細胞より iPS 細胞の樹立を行った。樹立に用いるベクターとして、当初はレトロウイルスベクターを用いた iPS 細胞樹立も計画していたが、樹立効率が低く、ゲノムに挿入された外来遺伝子の樹立後の影響を憂慮し、使用を中止した。従って実際には、①産業技術総合研究所で開発されたセンダイウイルス（SeVdp (KOSM302L)）（中西真人教授より供与）、および DNAMEC 社より購入したセンダイウイルス（Dnamec-SeV）、②当研究室にて開発した新規ウイルスベクター（XV）を用いて iPS 細胞の樹立を行った（なお②XV の詳細については現在特許申請計画中であり、本報告書が公開予定であるため、ここでの詳細な記載は控えさせていただきます）。

① SeV による iPS 細胞の樹立

臍帯血由来単核球に SeVdp (KOSM302L)、および Dnamec-SeV をそれぞれ感染させ、iPS 細胞の樹立を行った。樹立した iPS 細胞の未分化性等の特性解析、樹立までに要した日数、および SeV の残存を解析し、両者間の比較を行った。

② XV による iPS 細胞の樹立

本ベクターは、ヒト疾患に関与する一本鎖 RNA ウィルスをもとに、遺伝子改変を行ったウイルスベクターである。本ウイルスベクターの特徴は、a)本ウイルスについては既に多くの知見が存在し、ウィルスが引き起こす疾患は治療法が確立されているため安全性が高い、b)RNA ウィルスのためゲノム DNA への挿入により引き起

こされるゲノム毒性がなく、複数の遺伝子（6種類以上の外来遺伝子を搭載可能）を一過性に導入することが可能、c)赤血球を除くほぼすべての細胞に対して高い効率で遺伝子導入することが可能、といった特徴がある。本ウイルスベクターに5種類（GFP、OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC）搭載し、ヒト胎児繊維芽細胞である BJ 細胞より iPS 細胞の樹立を行った。

また樹立した iPS 細胞の未分化性、多能性について解析を行い他の方法で樹立した iPS 細胞と同様の性質を保持していることを確認した。

（2）難病患者由来 iPS 細胞の樹立

九州大学小児科にて採血した X 連鎖性無ガンマグロブリン症候群（XLA）患者末梢血単核球より Dnamec-SeV および XV を用いて iPS 細胞の樹立を行った。単核球を IL-2、CD3/CD28 ビーズで刺激を加え 7 日間培養した T 細胞に Dnamec-SeV、XV を感染させ、MEF 上で iPS 細胞を樹立した。

（3）iPS 細胞由来血液細胞分化誘導法の開発

京都大学 iPS 細胞研究所（CiRA）より提供を受けたヒト iPS 細胞（409B2 細胞）及び当研究室で樹立した iPS 細胞を用いて血液細胞への分化誘導について検討した。

血液細胞への分化誘導法に関しては、AGMS-3 細胞（京都大学、中畑龍俊教授より供与）との共培養法、および胚様体（EB）形成法の二つで検討を行った。

誘導して得られた細胞はフローサイトメトリー法にて CD34 および CD45 抗体染色を行い、細胞系統を確認した。

（4）GMP 規格 iPS 細胞樹立に向けた検討

409B2 細胞を用いて、異種成分不含培養液・基質を用いた iPS 細胞の培養法を検討した。使用した培養液として、S-Medium（DS ファーマ社）、ReproFF2（リプロセル社）、Essential8（Life Technologies 社）、mTeSR1（VERITAS 社）、CELRENA（細胞科学研究所）の5つの培養液を用いて検討した。また基質として、Matrigel（Corning 社）、VTN-N、Geltrex（Life Technologies 社）、iMatrix511（nippi 社）の4種類について検討を行った。それぞれの基質をコートしたディッシュに409B2 細胞を 2×10^4 cells/cm² にて播種し、4 日間培養した。培養後細胞を回収し、未分化マーカー（NANOG 等）の発現を確認した。

（5）倫理面への配慮

本研究においては試料としてヒト細胞、ヒト幹細胞を用い、ヒトゲノム解析を行う計画のため「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し、人権の保護に十分配慮し適正に研究を行う。KU-MCPC で加工、保存する検体に関しては「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、受入れ前に実施計画書に記載される倫理面への配慮に関する項目につき、研究対象者に対する利益、不利益の説明、ならびにリスクファクターとその排除、波及する影響等の記述内容、および説明・同意文書の内容について、九州大学病院および関連機関内に設置されている臨床研究倫理審査委員会、ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査専門委員会、研究内容によってはヒト ES 細胞の使用に関する倫理審査専門委員会による承認を得る

ものとする。さらに有害事象発生時の対応マニュアルを完備し、病院長並びに総長を最高責任者とする体制のもと、厚生労働省への連絡手順を明らかにさせる。実験動物を用いる研究に関しては、文部科学省及び九州大学の定める『動物の愛護及び管理に関する法律』を遵守して動物愛護、生命倫理の観点に十分配慮しながら動物に苦痛を与えることなく実験を行う。全ての遺伝子組み換え実験は文部科学省の定める『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』及び九州大学の定める『九州大学遺伝子組換え実験指針』に従って実施し、安全性の確保に最大の注意を払う。そのため、実験室内の P2 レベルの培養室、SPF 実験動物管理部屋において厳重な管理のもと実験を行い、ウイルス汚染や人畜共通感染症の発生伝播を防止する。なお、本研究で得られた新規候補薬剤を用いた臨床試験実施が可能となった際には、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守した医師主導治験を、九州大学病院 ARO 次世代医療センターの支援のもと薬事法、ICH-GCP に準拠して実施する。

C. 研究結果

(1) 健康人由来検体を用いた iPS 細胞樹立検討

① SeV による iPS 細胞の樹立

臍帯血より単核球を分離し SeVdp (KOSM302L)、および Dnavec-SeV をそれぞれ感染させ、iPS 細胞の樹立を行った。遺伝子導入後、RPMI1640+10%FBS で 3 日間培養後、MEF 細胞上に播種しヒト ES 細胞維持用培養液にて培養を行った。

Dnavec-SeV は遺伝子導入後 16 日目より ES 細胞様のコロニーが出現し、SeVdp (KOSM302L) は遺伝子導入後 18 日目より ES 細胞様のコロニーが出現した (図 1)。

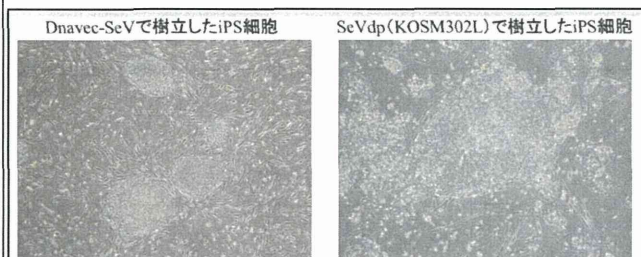


図 1. SeV を用いて樹立した健康人由来 iPS 細胞の形態
左図が Dnavec 社、右図が産業技術総合研究所由来センダイウイルスベクターを用いたもの。コロニー形態的には両者とも胚性幹細胞様形態を示している。

出現した ES 細胞様コロニーは未分化マーカーである NANOG、OCT3/4 を免疫抗体染色法で確認することができ (図 2)、10 代以上の継代をすることができた。なお、Dnavec-SeV で樹立した iPS 細胞はガラス化法により凍結保存・解凍後の培養が可能であったが、SeVdp (KOSM302L) で樹立した iPS 細胞は同法により凍結保存・解凍後に細胞形態が著しく崩れやすいことが明らかになった。

② XV による iPS 細胞の樹立

当研究室で開発したウイルスベクターを用いて胎児

繊維芽細胞である BJ 細胞に遺伝子導入したところ、導

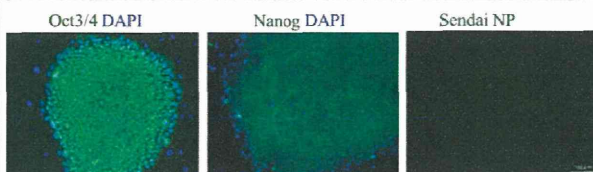


図 2. Dnavec-SeV で樹立した iPS 細胞の未分化マーカーおよび SeV の発現

Dnavec-SeV で樹立した iPS 細胞を未分化マーカーである OCT3/4、NANOG、およびセンダイウイルス特異的抗体で染色した (緑：各蛋白質発現；青：核染色)。

入効率が MOI=3 で 8 割程度導入することができ、4 遺伝子の発現も確認できた (図 3)。

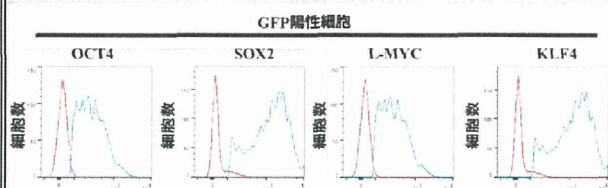


図 3. XV におけるリプログラミング因子の発現

正常繊維芽細胞 (BJ 細胞) に当研究室で開発したウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行い、導入後 3 日目における各リプログラミング因子の発現を FACS 法にて解析を行った。全ての GFP 陽性細胞において 4 因子の発現が認められた (赤：コントロール IgG；青：各蛋白質特異的抗体)

本ベクターを BJ 細胞に遺伝子導入後 7 日目に MEF 細胞上に播種し、ヒト ES 細胞維持用培養液にて培養を行ったところ 21 日目より偽コロニーが出現し、27 日目に ES 細胞様コロニーの出現が確認できた (樹立効率約 0.01%程度) (図 4)。

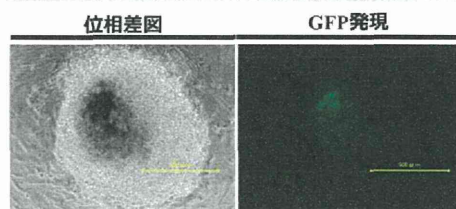


図 4. XV によって樹立した iPS 細胞の形態

XV を用いて BJ 細胞に遺伝子導入後、27 日目に出現したコロニーの形態。左図は位相差図、右図は蛍光図。本 XV は導入遺伝子が発現すると GFP も発現する構造であるため、本 iPS 細胞では XV の発現が認められないと考えられる。

ES 細胞様コロニーは未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼを発現し、NANOG、OCT4、SSEA4、Tra-1-60 の各分子も免疫抗体染色法で発現が確認でき (図 5)、15 代以上の継代ができた。また、網羅的遺伝子解析法による遺伝子発現パターンが ES 細胞 (khES-3 細胞) に近似しており、正常のヒト細胞核型を保持していた。また胚様体を形成することができ、三胚葉系細胞の出現が

確認できた。

同様に健康人末梢血由来単核球を IL-2、CD3/CD28 ビーズで刺激して得られた T 細胞に対して、ほぼ 100% の

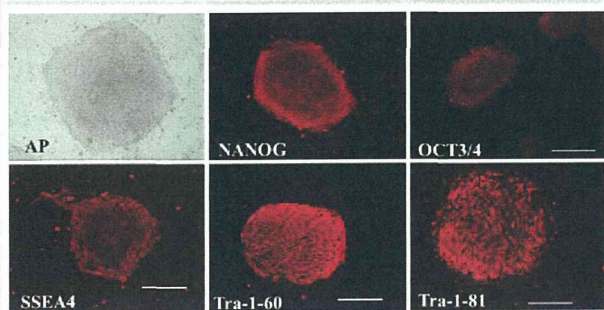


図 5. XV にて樹立した iPS 細胞の未分化マーカーの発現解析

線維芽細胞より XV を用いて樹立した iPS 細胞の未分化マーカーの発現を、アルカリフォスファターゼ (AP) に対する化学染色、および各蛋白質特異的抗体を用いた免疫抗体染色法にて解析を行った。スケールバーは 500 μm を表す。

効率で遺伝子導入が可能であり、遺伝子導入後 22 日目に ES 細胞様コロニーが出現し、各コロニーにおいて未分化マーカーの発現が確認できた (図 6)。

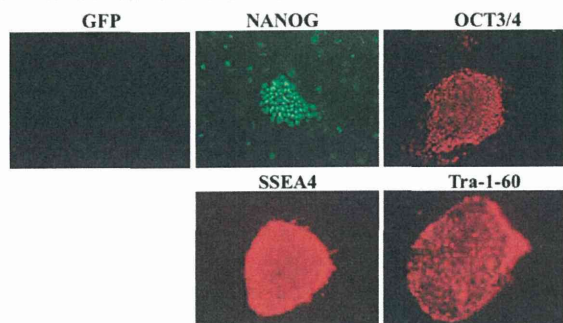


図 6. 末梢血 T 細胞由来 iPS 細胞の未分化性解析

IL-2、CD3/CD28 にて 7 日間刺激した健康人末梢血由来 T 細胞に XV を感染させ樹立した iPS 細胞の GFP 発現及び未分化マーカーを免疫抗体染色法にて解析した。

(2) 難病患者由来 iPS 細胞の樹立

九州大学小児科にて採取した X 連鎖性無ガンマグロブリン症候群 (XLA) 女性患者由来末梢血より単核球を分離し、IL-2、CD3/CD28 ビーズで刺激して得られた T 細胞に対して、Dnavec-SeV および XV によって iPS 細胞の樹立を行った。

SeV (導入効率 39.0%) および XV (導入効率 100%) にて遺伝子導入した T 細胞を 3 日目に MEF 上に播種し、ES 細胞維持用培養液にて培養を行うと、SeV では遺伝子導入後 14 日目に、XV では遺伝子導入後 24 日目に ES 細胞様コロニーの出現が確認できた (図 7)。特に Dnavec-SeV で樹立したものは未分化マーカーである NANOG の発現が確認できた (図 8)。XV で樹立した iPS 細胞に関しては現在検討中である。

(3) iPS 細胞由来血液細胞分化誘導法の開発

上記 XV にて樹立した iPS 細胞を AGMS-3 細胞上に播種した後、ES 細胞維持用培養液で 2 日間培養し、その後分化誘導用培養液に交換し 12 日間培養を行った。その

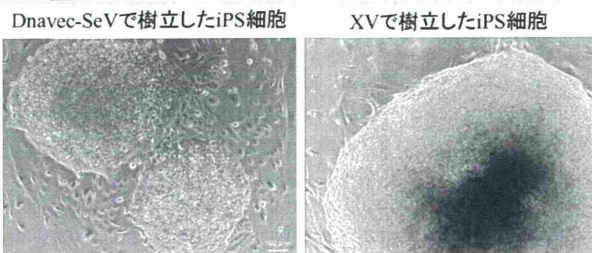


図 7. XLA 患者より樹立した iPS 細胞の形態

左図が Dnavec-SeV、右図は XV を用いて X 連鎖性無ガンマグロブリン症候群 (XLA) 患者由来末梢血 T 細胞より樹立した iPS 細胞の形態。それぞれ ES 細胞様形態を示している。

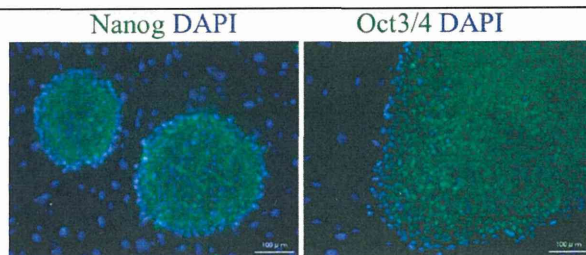


図 8. Dnavec-SeV で樹立した XLA 患者由来 iPS 細胞の未分化性解析

Dnavec-SeV で樹立した XLA 患者由来 iPS 細胞を未分化マーカーである OCT3/4 および NANOG 特異的抗体で染色した (緑: 各蛋白質発現; 青: 核染色)。

結果、CD34、CD45 両陽性細胞の出現を確認できた (図 9)。

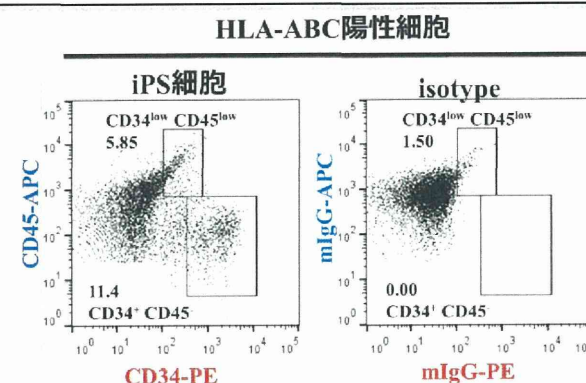


図 9. iPS 細胞由来血液細胞の解析

XV を用いて樹立した iPS 細胞を AGMS-3 細胞との共培養法にて血液系細胞へ分化誘導を行った (CD34⁺CD45⁺: 血管内皮様細胞、CD34^{low}CD45^{low}: 造血幹・前駆様細胞)。

(4) GMP 規格 iPS 細胞樹立に向けた検討

まず 409B2 細胞を用いて、フィーダーフリー、異種成分不含の条件での培養法について検討を行ったところ、表 1 のような結果が得られた。

表 1. 異種成分不含条件での iPS 細胞培養結果

	mTeSR1	ReproFF2	S-Medium	Essential8	CELRENA
Matrigel	◎	○	×	○	◎
VTN-N	◎	—	—	○	×
Geltrex	◎	×	—	○	◎
i-Matrix511	◎	—	—	○	◎

◎ : NANOG 発現を確認、○ : コロニー形態の維持が可能
× : コロニー形態維持が不可能、— : 未検討

D. 考察

平成 25 年度の研究は、疾患特異的 iPS 細胞樹立に向けての iPS 細胞樹立法の検討を主に行った。現在、iPS 細胞樹立法に関してはレトロウイルスベクター(ガンマレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター)、エピソードベクター、センダイウイルスベクターが主に用いられてきているが、レトロウイルスベクターおよびエピソードベクターによる樹立法はその樹立効率の低さとゲノム毒性発生の可能性より、当研究室ではセンダイウイルスベクター (SeV) による樹立法を中心に実施してきた。また当研究室で開発したウイルスベクターに関しても、ほぼセンダイウイルスベクターと同様の性質を保持しているものと考え今回の樹立法の検討に加えた。

iPS 細胞を樹立することが可能な SeV は現在 2 種類使用可能であり、それぞれ長所、短所が存在する。Dnavec-SeV は樹立までの期間の短縮化が可能である一方、3 種のベクターを同時に感染できた細胞でのみ iPS 細胞が樹立可能であるため操作が煩雑であった。SeVdp (KOSM302L) は 1 種のベクターで 4 個の遺伝子をすべて発現させることが可能であったが、樹立までに長期間必要であり、細胞種によっては iPS 細胞化できない細胞があることがわかった。これは、SeVdp (KOSM302L) は Dnavec-SeV と比較し、細胞へのダメージが大きく、脆弱な細胞は SeVdp (KOSM302L) による遺伝子導入に耐えることができないことによるものと考えられた。よって疾患 iPS 細胞樹立に用いる SeV は Dnavec-SeV を用いることにした。

当研究室で開発したウイルスベクター (XV) は、1 種のベクターで 5 個の遺伝子を発現することが可能であり、繊維芽細胞、末梢血由来 T 細胞の両者に対して高い遺伝子導入効率を示した。本ベクターを用いて樹立した ES 細胞様コロニーは未分化マーカーの発現等、ES 細胞と近似した性質を示すことより iPS 細胞樹立が可能なベクターであると考えている。SeV と比較して iPS 細胞の樹立効率はやや低いものの、樹立した iPS 細胞においては本ベクターの残存は検出されておらず、上記 Dnavec-SeV と同様に疾患 iPS 細胞を樹立する手段として有効であると考えられた。本 XV は、腫瘍溶解性ウイルスとして臨床研究において既に使用されているウイルスをベクター化したものであり、将来的には GMP 規格製品の作製も可能となり、研究室レベルでの比較的容易な使用が可能化するものと期待され、本研究目的にも合致していると考えられる。

これら Dnavec-SeV および XV を用いての iPS 細胞樹立の標準手順書を作成し、XLA 女性患者より iPS 細胞の樹立が可能であった。現在両方法にて樹立した XLA 由来 iPS 細胞について、未分化性、多能性の解析を進めるとともに、X 染色体の不活性化、血液細胞への分化能についても検討を行い、両者間の相違点を明らかにするとともに、今後の解析に使用する iPS 細胞株の選定を行っている。

また、フィーダーフリー、異種成分不含条件下での既樹立 iPS 細胞の培養に成功し、現在同条件にて iPS 細胞を樹立する方法を SeV および XV の両方法を用いて検討を行っている。今後、現行の MEF 細胞との共培養法による iPS 細胞の樹立、維持法より、異種成分不含の条件下での iPS 細胞の樹立、維持法へと移行していく予定である。

樹立した iPS 細胞は病態の再現を行うために、血液細胞への分化誘導が必要であるが、当研究室では AGMS-3 細胞との共培養法にて高効率に安定的に造血前駆細胞への分化を誘導することができた。今後、好中球系細胞、巨核球系細胞、赤血球系細胞、T 細胞系細胞、B 細胞系細胞への分化誘導法について検討を行っていく予定である。

E. 結論

疾患 iPS 細胞の樹立は、Dnavec 社のセンダイウイルスベクター及び当研究室で開発したウイルスベクターを用いて樹立を行うことに決定した。平成 25 年度の研究結果を基にして作成したヒト iPS 細胞樹立手順書に従って、今後新たな患者由来 iPS 細胞の樹立を進めていく予定である。iPS 細胞の樹立後、AGMS-3 細胞との共培養法を用いて造血前駆細胞を誘導し、血液細胞への分化誘導を行い、薬剤スクリーニングを行っていく計画である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Inoue-Yokoo T., Tani K., Sugiyama D. Mesodermal and hematopoietic differentiation from ES and iPS cells. Stem Cell Rev. 9:422-434, 2013

2) Liao J., Marumoto T., Yamaguchi S., Okano S., Takeda N., Sakamoto C., Kawano H., Nii T., Miyamoto S., Nagai Y., Okada M., Inoue H., Kawahara K., Suzuki A., Miura Y., Tani K. Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. Mol Ther. 21:1242-12450, 2013

3) Kurita R., Suda N., Sudo K., Miharada K., Hiroshima T., Miyoshi H., Tani K., Nakamura Y. Establishment of immortalized human erythroid progenitor cell lines able to produce enucleated red blood cells. PLoS ONE. 8:e59890, 2013

4) Hiramoto T., Ebihara Y., Mizoguchi Y., Nakamura

K., Yamauchi K., Ueno K., Nariai N., Mochizuki S., Yamamoto S., Nagasaki M., Furukawa Y., Tani K., Nakauchi H., Kobayashi M., Tsuji K, Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 110:3023-3028, 2013

5) Inoue H., Tani K., Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. Cell Death and Differentiation. 2013 Jul 5, Epub ahead of print

6) Yamaguchi S., Marumoto T., Nii T., Kawano H., Liao J., Nagai Y., Okada M., Takahashi A., Inoue H., Sasaki E., Fujii H., Okano S., Ebise H., Sato T., Suyama M., Okano H., Miura Y., Tani K. Characterization of common marmoset dysgerminoma like tumor induced by lentiviral expression of reprogramming factors. Cancer Science 2014 (in press)

7) Nii T., Marumoto T., Kawano H., Yamaguchi S., Liao J., Okada M., Sasaki E., Miura Y., Tani K., Analysis of essential pathways for self-renewal in common marmoset embryonic stem cells. FEBS Open Bio 2014 (in press)

8) Narusawa M., Inoue H., Sakamoto C., Matsumura Y., Takahashi A., Inoue T., Watanabe, Miyamoto S., Miura M., Hijikata Y., Tanaka Y., Inoue M., Takayama K., Okazaki T., Hasegawa M., Nakanishi Y., and Tani K. TLR7 ligand augments GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells. Cancer Immunology Research 2014 (in press)

2. 学会発表

1. Murahashi M, Hijikata Y, Tanaka Y, Inoue H, Marumoto T, Nakanishi Y, Yoshida K, Tsunoda Nakamura, Y, Tani K. Phase I clinical trial of cancer vaccine combined with chemotherapy targeting both tumor antigen and immune tolerance against advanced solid tumors. 37th ESMO Congress, September 2012, Vienna, Austria

2. Yosuke Yokota, Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Takehiko Yokomizo and Kenzaburo Tani. Absence of LTB4/BLT1 axis promotes generation of long-lasting antitumor memory responses induced by administration of GM-CSF gene-transduced tumor cells, in a CD4+ T cell-dependent manner. American Society of Hematology, 53th Annual Meeting, San Diego, 2011.

3. Jiyuan Liao, Tomotoshi Marumoto, Shinji Okano, Saori Yamaguchi, Takenobu Nii, Hirotaka Kawano, Yoko

Nagai, Chika Sakamoto, Michiyo Okada, Yoshie Miura, Hiroyuki Inoue, Masato Tanaka, Kaori Nagatoshi, Kohichi Kawahara, Akira Suzuki and Kenzaburo Tani. Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. American Society of Hematology, 53th Annual Meeting, San Diego, 2011.

4. Hiroyuki Inoue, Yasuki Hijikata, Keisuke Yasunari, Akira Sakamoto, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Yumiko Matsumura, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic Edmonston strain of measles virus harboring the wild-type N, P, L Genes (MV-NPL) effectively target lung cancer stem cells. American Association of Cancer Research, 103th Annual Meeting, Chicago, 2012

5. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Beibei Wang, Keisuke Yasunari, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Tomotoshi Marumoto, Atsushi Takahashi, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus B3 is an immunostimulatory oncolytic virus active against lung adenocarcinoma. American Association of Cancer Research, 103th Annual Meeting, Chicago, 2012

6. Keisuke Yasunari, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Beibei Wang, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Oncolytic Echovirus 4 as a potent virotherapy agent against human esophageal cancer

7. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Akira Sakamoto, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Yumiko Matsumura, Takafumi Nakamura, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered Measles virus Edmonston strain expressing the wild-type N, P, L Genes (MV-NPL) is a promising oncolytic virotherapy agent against lung cancer stemcells. American Society of Gene and Cell Therapy, 15th Annual Meeting, Philadelphia, 2012.

8. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Akira Sakamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic measles virus lyses non-small cell lung cancer stem cells in vitro and in vivo. Asian Pacific Lung Cancer Conference, 5th Annual Meeting, Fukuoka, 2012.

9. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Akira Sakamoto, Kaname Nosaki, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic measles virus effectively targets and kills non-small cell lung cancer stem cells. Asian Pacific Society of Respiriology, 17th Annual Meeting, Hong