

201335019A

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)

難治性疾患創薬シーズの探索と薬剤安全性評価法開発

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 井上 治久

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)

難治性疾患創薬シーズの探索と薬剤安全性評価法開発

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 井上 治久

平成 26(2014)年 3 月

はじめに

本研究班は、平成 25 年度より、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）において、新たに結成されたものである。その目的は、難治性疾患創薬シーズの探索と薬剤安全性評価法開発を行なうことである。

本研究は、厚生労働行政の課題の一つである難治性疾患の治療法の確立に関し、臨床研究へとつなげる画期的な診断・治療法の開発及び確立に直接貢献することを目指すものであり、研究費補助金の目的である「厚生労働科学研究の振興を促し、もって、国民の保険医療に関し、行政施策の科学的な推進を確保し、技術水準の向上を図ること」に合致する。

ヒト iPS 細胞の誕生から 6 年が経過し、これまで、iPS 細胞の作製方法、疾患解析用 iPS 細胞の品質管理方法、各系譜への分化誘導方法、疾患解析技術の蓄積等が行なわれてきた (Inoue & Yamanaka et al. iPS cells: a game changer for future medicine. The EMBO Journal, 2014)。今後、この技術を応用して、新たな医療の実用化を目指した研究を行なうために、本研究班が組織された。

平成 25 年度は、研究者がそれぞれ課題に取り組み、各分野の疾患からの iPS 細胞を用いた疾患表現型の同定とそれ指標としたスクリーニング系の構築に取り組んだ。特に、分化誘導が既存の方法からでは難しい細胞では、分化誘導方法の改変・構築からはじめることを行なった。

今後、iPS 細胞を核とした従来にない独創的な創薬開発・薬剤毒性評価系へむけた研究を進めていく。本報告書が関係者の皆様方のお役に立つ事ができれば幸甚である。

平成 26 年 3 月 主任研究者 井上 治久

目 次

I. 研究組織	1
II. 平成 25 年度総括研究報告 井上 治久	3
III. 平成 25 年度分担研究報告	
(1) iPS 細胞技術を用いた難治性肝疾患治療薬シーズの探索と 臨床試験ドロップアウト予測用幹細胞パネルの作製 長船 健二	13
(2) 遺伝性疾患における創薬シーズ探索と薬剤安全性評価法の開発 吉田 善紀	17
(3) 血液・免疫疾患由来 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニング系構築 斎藤 潤	21
(4) 難治性疾患創薬シーズの探索と薬剤安全性評価法の開発 太田 章	25
IV. 班会議記録	27
V. 研究成果の刊行に関する一覧	39
VI. 研究成果の刊行物・印刷物	43

I. 研究組織

平成 25 年度厚生労働科学研究
「難治性疾患創薬シーズの探索と薬剤安全性評価法開発」研究班
研 究 組 織

	氏 名	所 属
研究代表者	井上 治久	京都大学 iPS 細胞研究所
分担研究者	長船 健二	京都大学 iPS 細胞研究所
	吉田 善紀	京都大学 iPS 細胞研究所
	斎藤 潤	京都大学 iPS 細胞研究所
	太田 章	京都大学 iPS 細胞研究所

Ⅱ. 平成 25 年度 総括研究報告書

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

難治性疾患創薬シーズの探索と薬剤安全性評価法開発

研究代表者：井上 治久
(京都大学 iPS 細胞研究所 准教授)

－研究要旨－

難治性疾患では、診断は臨床症状・各種検査などを併せても難渋する場合も多い。また、治療法が確立しておらず、病態解明に基づく新規治療法の開発が必要である。iPS 細胞の作製技術が確立され、入手が困難であった患者由来サンプルが、生存患者からも取得可能になった。ここで患者由来iPS細胞から作製された目的細胞は、患者が生来有している遺伝学的要因の影響をすべて反映する細胞となりうる。これを用いれば、患者由来iPS 細胞を用いて病因解明とともに未開発かつ有効な治療標的や診断マーカーの同定を患者ごとで行うことも可能となる。

これまで、研究代表者らは、神経変性疾患患者由来のiPS細胞から疾患に罹患する神経細胞を分化誘導、既知の疾患表現型を再現に加え、新たな病態を明らかにし、それらの疾患表現型を改善する化合物を同定した。また、患者iPS細胞解析技術のかかえるクローン間評価などの課題を克服する手法を蓄積し、治療薬シーズとなる化合物同定まで至った(Egawaら, 2012)。研究分担者らは、自己炎症性疾患患者由来iPS細胞を用いた創薬スクリーニング系の構築(Tanakaら, 2012)や、ヒトiPS細胞から心細胞、更には肝・腎細胞の分化誘導の成功(Maeら, 2013)を報告している。本研究課題では、他事業で得た知見も使い、疾患モデリングに基づく治療薬スクリーニング、薬剤安全性・毒性評価用細胞の作製等に取り組む。

A. 研究目的

本研究では、治療方法が確立されていない難病克服の為、iPS 細胞技術を用いた治療薬シーズの探索と心・肝・神経細胞を用いた薬剤安全性・毒性評価技術の開発を行う。

多くの孤発性の難治性疾患の疾患モデルの確立は既存の方法では困難を極め、神経変性疾患などで患者由来 iPS 細胞によりはじめて可能になる事例が多数知られている。2008年の家族性 ALS の iPS 細胞の報告を皮切りに、多くの難病で疾病態再現が報告されてきた。しかし、iPS 細胞を用いた難治性疾患薬剤スクリーニングプラットフォームに関する報告はほとんどなく、山中伸弥博士による総説でも、薬剤スクリーニングモデル構築が次のステージの患者 iPS 細胞を用いた研究として期待されている

(Yamanaka, Cell Stem Cell, 2012)。

一方で、iPS 細胞由来の分化細胞を用いた薬剤毒性評価に関しては、分化心筋細胞を用いた致死性不整脈である QT 延長症候群の危険性の評価など心筋でその研究が進んでいるが、その他の細胞種では未開発である。研究代表者らは、日本製薬工業協会の協力を得つつ、心筋・肝細胞・神経細胞に対して毒性を呈した化合物を用いて、その毒性を検出する細胞とアッセイ系を iPS 細胞から作製することを目指す。そこでは、iPS 細胞を用いた疾患解析で確立してきたアッセイ系基盤を用いることによって、創薬と毒性評価の双方向性の研究開発をすすめる。この開発が、医学のみならず、創薬産業にもたらす効果は極めて大きいと期待される。

本研究を通じ、iPS 細胞を核とした従来にない独創的な創薬開発と臨床試験プロセス

に組み込まれる可能性を有する薬物安全性・毒性評価系の確立を行う。

B. 研究方法

代表者らはこれまで、ヒト・アストロサイト細胞株を用いた ALS 治療薬剤スクリーニング (Murakamiら、2011)、ヒト iPS 細胞を用いたアルツハイマー病薬剤スクリーニング系構築 (Yahataら、2011)、ALS・アルツハイマー病患者 iPS 細胞を用いた薬剤スクリーニング系 (Egawaら、2012; Kondoら、2013) を構築してきた。本研究では、同定した疾患表現型を用いた大規模スクリーニング系を構築する。加えて、日本製薬工業協会からの情報をもとに、これまで種々の毒性を呈した薬剤をモデルとして、その毒性を検出可能な細胞の開発とアッセイ系の構築を行う。これらの研究に関しては、次の5名の研究者を中心とした実施体制を組み推進する。研究代表者としては井上治久が、研究総括・難治性神経疾患創薬開発・神経毒性評価を担当する。分担研究者としては、長船健二が、難治性肝疾患創薬開発・肝毒性評価を、吉田善紀が、難治性心疾患創薬開発・心毒性評価を、斎藤潤が、難治性血液疾患創薬開発を担当する。また、太田章が、創薬スクリーニングを行う。

本研究は倫理委員会により、課題名『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』(承認番号第824番) および『ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究』(承認番号第G259番) として承認されており、動物の取り扱いについては、医学部動物実験ガイドラインを遵守し、動物委員会の承認を得て行うものである。これらの内容を忠実に順守して

研究を進める。

C. 研究結果 (総括+分担分)

【神経疾患の新規治療薬シーズの探索、神経細胞の毒性試験用細胞の作製】

ALS 患者 iPS 細胞を用いて、運動神経細胞細胞死を指標に、化合物大規模スクリーニング系を構築した (Z' factor > 0.6)。アルツハイマー病患者 iPS 細胞由来大脳神経細胞を用いた amyloid β に関する大規模スクリーニング系を構築した (Z' factor > 0.97)。神経毒性評価のアッセイ系として、多電極アレイ (MEA) 解析を開始した。はじめに、ヒト神経細胞に比較し、短時間で成熟化するマウス iPS 細胞由来の神経細胞を用いた。

【iPS 細胞技術を用いた難治性肝疾患治療薬シーズの探索と臨床試験ドロップアウト予測用肝細胞パネルの作製】 (長船)

本年度末までに新生児型シトルリン血症 1 例と成人型シトルリン血症 3 例から iPS 細胞株の樹立を完了した。次に、NANOG, OCT3/4, TRA1-60, TRA1-81 などの未分化マーカーの発現、胚様体、奇形腫形成による三胚葉成分への多分化能を確認した。また、既報のヒト iPS 細胞から肝臓系譜への分化誘導法 (Kajiwara M, 2012) を改良し、新生児型および成人型シトルリン血症特異的 iPS 細胞から罹患細胞種である肝細胞への試験管内での分化誘導を行った。そして、RT-PCR 法と免疫染色法にて、ALBUMIN, AAT, CYP3A4, CYP3A5 などの肝細胞マーカーに加え、ASS や Citrin などの本疾患に関連した尿素サイクル関連遺伝子の発現を確認した。

薬剤毒性評価系開発に関しては、化合物

を用いた新規分化誘導法で得られる肝細胞の ALBUMIN 蛋白の分泌、PAS 染色によるグリコーゲン貯蔵、ICG と LDL 取り込みなどの機能と CYP1A1, CYP2A6, CYP2A7 などの酵素の発現確認、さらに rifampicin 投与による CYP3A4 の酵素誘導などの機能を確認した。

また、マイクロアレイ解析にてマウス初代培養肝細胞に特異的に発現する約 110 種の転写因子を同定した。そして、iPS 干渉法にてそれらの因子の評価を行い、成熟肝細胞を誘導する遺伝子の候補を探索した。

【遺伝性心疾患における創薬シーズ探索と薬剤安全性評価法の開発】 (吉田)

心筋細胞分化誘導効率を改善するために、分化誘導系の開発を行った。新しく開発した分化誘導法を用いることにより複数のヒト ES/iPS 細胞株において 80-90% の高効率でトロポニン T 陽性心筋細胞が得られる分化誘導系を開発した。分化誘導した心筋細胞をマイクロアレイ解析により遺伝子発現を解析したところ、成人および胎児の心臓組織の遺伝子発現に近い遺伝子発現プロファイルであることが認められた。またこの分化誘導系をもちいて作製した心筋細胞を用いて多電極アレイ解析をおこない、選択的 IKr 阻害薬 (E 4031) および IKs 阻害薬 (chromanol 293B) によりフィールド電位間隔 (Field Potential Duration) が用量依存的に延長することを確認した。今後は、他の薬剤での反応を確認し、ハイスループット薬剤探索系に対応できる系の構築を目指すとともに、QT 延長症候群などの疾患 iPS 細胞由来心筋細胞における薬剤反応性を調べていく予定である。

【血液・免疫疾患由来 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニング系構築】(斎藤)

本年度は、血液・免疫疾患を対象とした、iPS 細胞由来血球を用いたスクリーニング系を確立することを主眼とした。CINCA 症候群患者由来 iPS 細胞を単球系細胞へ分させ、京都大学 iPS 細胞研究所で所有する活性既知の化合物に対して、化合物スクリーニングを行った。LPS 非添加の well を阻害率 100%、LPS 添加かつ化合物非添加の well を阻害率 0%とし、化合物添加による阻害率を、IL-1b と IL-6 に対して検討した。基準 well を設定して、系の安定性を評価したところ、Z'-factor 0.8 程度、S/B ratio 6-8 程度で安定していた。実際に 4000 の活性既知化合物をスクリーニングしたところ、3 つの化合物が IL-1b 特異的な阻害剤としてヒットした。これらの化合物は、既報のあるものであったため、スクリーニング系の有用性が証明された。また、以上より、iPS 細胞からの単球分化系によって得た単球細胞を刺激した際のサイトカインをリードアウトとしたスクリーニング系を確立した。

【骨疾患・免疫疾患の新規治療薬シーズの探索】

1. 1次スクリーニングとして、変異型 ACVR1/ALK2 を強制発現した前軟骨細胞の軟骨分化誘導系を用い、当研究所で構築した化合物ライブラリーのうち、既存薬、活性既知化合物(計 4881)化合物について評価を行った。Z'-factor は 0.631 となり良好なアッセイであった。4881 化合物の中から、1 μ M の濃度で軟骨化を示す指標を 40%以上阻害するもの 160 を選抜した。

2. 160 化合物を 3, 1, 0.3, 0.1 μ M の濃度で評価した。指標としてアルカリフォスファターゼ活性と細胞生存率を N=2 で評価し、アルカリフォスファターゼ活性を下げた細胞生存率に影響しない化合物を 68 選抜した。

3. 68 化合物を物性等により 16 化合物まで選抜し、FOP 由来 iPS 細胞の軟骨化能亢進を抑制する活性を指標に 3 化合物まで絞り込んだ。化合物の中には BMP 受容体阻害剤が含まれていた。

D. 考察

本年度は、分担研究者がそれぞれ課題に取り組み、各分野の疾患からの iPS 細胞を用いた疾患表現型の同定とそれ指標としたスクリーニング系の構築に取り組んだ。特に、分化誘導が既存の方法からでは難しい細胞では、分化誘導方法の構築からはじめることを行なった。今後、疾患表現型の同定で用いたアッセイ系を毒性評価系への応用が期待できる。

E. 結論

本年度は初年度であったが、iPS 細胞を用いた治療薬スクリーニングと治療薬シーズの同定、薬剤毒性評価という大きな目標に向けて、順調に研究を開始することができた。引き続き、来年度も研究を推進する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Kondo, T., Asai, M., Tsukita, K., Kutoku, Y., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Imamura, K., Egawa, N., Yahata, N., Okita, K., Takahashi,

- K., Asaka, I., Aoi, T., Watanabe, A., Watanabe, K., Kadoya, C., Nakano, R., Watanabe, D., Maruyama, K., Hori, O., Hibino, S., Choshi, T., Nakahata, T., Hioki, H., Kaneko, T., Naitoh, M., Yoshikawa, K., Yamawaki, S., Suzuki, S., Hata, R., Ueno, S., Seki, T., Kobayashi, K., Toda, T., Murakami, K., Irie, K., Klein, WL., Mori, H., Asada, T., Takahashi, R., Iwata, N., Yamanaka, S., Inoue, H. (2013) Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular A β and Differential Drug Responsiveness. *Cell Stem Cell*, 12(4): 487-496.
2. Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., Aoi, T., Watanabe, A., Yamada, Y., Morizane, A., Takahashi, J., Ayaki, T., Ito, H., Yoshikawa, K., Yamawaki, S., Suzuki, S., Watanabe, D., Hioki, H., Kaneko, T., Makioka, K., Okamoto, K., Takuma, H., Tamaoka, A., Hasegawa, K., Nonaka, T., Hasegawa, M., Kawata, A., Yoshida, M., Nakahata, T., Takahashi, R., Marchetto, MC., Gage, FH., Yamanaka, S., Inoue, H. (2013) Response to Comment on "Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells". *Science Translational Medicine*, 5(188): 188r2.
 3. Hirata, N., Nakagawa, M., Fujibayashi, Y., Yamauchi, K., Murata, A., Minami, I., Tomioka, M., Kondo, T., Kuo, T-F., Endo, H., Inoue, H., Sato, Ando, S., Kawazoe, Y., Aiba, K., Nagata, K., Kawase, E., Chang, Y-T., Suemori, H., Eto, K., Nakauchi, H., Yamanaka, S., Nakatsuji, N., Ueda, K., Uesugi, M. (2014) A Chemical Probe that Labels Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Reports* 6(6):1165-1174.
 4. 近藤孝之、井上治久、「iPS 細胞を用いた神経疾患病態研究」, Medical Science Digest, 2013, 39(5), 25-28.
 5. 今村恵子、井上治久、「iPS 細胞を用いた神経・精神疾患治療薬の開発」 医学の歩み 近視研究の新展開, 2013, 245(10), 885-886.
 6. 近藤孝之、井上治久、「iPS 細胞による神経疾患研究」, Clinical Neuroscience, 2013, 31(7), 855-857.
 7. 今村恵子、井上治久、「ALS 病態解明に寄与する iPS 細胞の樹立」, 感染・炎症・免疫, 2013, 43(2), 64-65.
 8. 近藤孝之、井上治久、「iPS 細胞技術を用いたアルツハイマー病の新たな医療開発」, 認知症の最新医療, 2013, 3(3)139-146.
 9. 近藤孝之、井上治久、高橋良輔、「iPS 細胞の治療応用」, 日本内科学会雑誌, 2013, 102(8), 2015-2022.
 10. 近藤孝之、井上治久、「アルツハイマー病患者由来 iPS 細胞を用いた細胞内 A β 関連ストレスと薬剤応答性の解明」, 細胞工学, 2013, 32(9), 988-989.
 11. 井上治久、「人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell:iPS 細胞)と神経変性疾患」, 日本内科学会雑誌, 2013, 102(9), 2267-2272.
 12. 今村恵子、井上治久、「iPS 細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究」, 日本生物学的精神医学会誌, 2013, 24(3),

131-133.

13. 近藤孝之、井上治久、「神経再生医療の現状」, 神経・精神疾患診療マニュアル, 2013, 142(2), S356-S357.
14. 江川斉宏、井上治久、「神経変性疾患特異的 iPS 細胞の樹立と病態解析, 創薬への応用」, Medical Science Digest, 2013, 39(11), 10-13.

著書・総説

1. Inoue, H., Nagata, N., Kurokawa, H., Yanamaka, S. iPS cells: A game changer for future medicine. *The EMBO Journal* 33(5):409-417, 2014.
2. 近藤孝之、井上治久、高橋良輔、「大脳皮質神経細胞への分化誘導」, ES・iPS 細胞実験スタンダード 再生・創薬・疾患研究のプロトコールと臨床応用の必須知識, 2014, III 217-225.
3. 近藤孝之、井上治久、「ヒト多能性幹細胞を用いた疾患研究と創薬開発の展開」 ES・iPS 細胞実験スタンダード 再生・創薬・疾患研究のプロトコールと臨床応用の必須知識, 2014, V 338-344.

国際学会

1. Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Okita, K., Inoue, H., Takahashi, J.: Induced Pluripotent Stem Cells Derived From Idiopathic Parkinson's Disease Patients Differentiate into Midbrain Dopaminergic Neurons. ISSCR 11th Annual Meeting Boston, MA, USA 2013.6.13.
2. Yoshida, M., Kitaoka, S., Yamane, M., Tsukita, K., Inoue, H., Saito, M., Nakahata, T.: Spinal Motor Neurons Generated from

Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Spinal Muscular Atrophy Patients Failed to Cluster Acetylcholine Receptors at The Neuromuscular Junctions. ISSCR 11th Annual Meeting Boston, MA, USA 2013.6.13.

3. Koshihara, Y., Morizane, A., Yamakado, H., Kikuchi, T., Doi, D., Nishimura, K., Minakawa, E., Egawa, N., Kondo, T., Inoue, H., Takahashi, J., Takahashi, R.: iPS Cell Modeling of Genetic Parkinson's Disease. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kyoto, Japan 2013.6.20.
4. Kondo, T., Takahashi, R., Inoue, H.: Efficient derivation of functional astrocytes from human induced pluripotent stem cells. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kyoto, Japan 2013.6.20.
5. Egawa, N., Takahashi, R., Inoue, H.: Generation of motor neurons through patient-specific iPSCs with mutant TDP-43. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kyoto, Japan 2013.6.21.

国内学会

1. 近藤孝之、八幡直樹、舟山美里、月田香代子、浅井 将、岩田修永、川勝 忍、和泉唯信、梶 龍兒、朝田 隆、高橋良輔、井上治久、「家族性アルツハイマー病患者由来 iPS 細胞の樹立と解析」 第 54 回日本神経学会学術大会 東京 2013.5.30
2. 小松研一、井上治久、山下博史、近藤孝

- 之、植村健吾、高橋良輔 「筋萎縮性側索硬化症モデルマウス由来 iPS 細胞は、運動ニューロン死を再現する」 第 54 回日本神経学会学術大会 東京 2013.6.1
3. 小芝 泰、森實飛鳥、山門穂高、菊地哲宏、皆川栄子、土井大輔、西村周泰、江川齊宏、井上治久、高橋 淳、高橋良輔 「疾患特異的 iPS 細胞モデルによる遺伝性パーキンソン病の研究」 第 54 回日本神経学会学術大会 東京 2013.6.1
 4. 今村恵子、月田香代子、江川齊宏、近藤孝之、井上治久 「上位運動ニューロン解析に向けたヒト iPS 細胞由来投射ニューロンの作製」 第 54 回日本神経学会学術大会 東京 2013.6.1.
 5. 今村恵子、井上治久 「iPS 細胞作成法とトピックス」 第 35 回神経組織培養研究会 大阪 2013.6.29.
 6. 江川齊宏、井上治久 「患者由来 iPS 細胞を用いた筋萎縮性側索硬化症の病態再現」 第 86 回日本生化学会大会 シンポジウム「iPS 細胞技術を用いた神経疾患研究の進歩と今後の展望」 横浜 2013.9.13.
 7. 近藤孝之、井上治久 「アルツハイマー病患者由来 iPS 細胞を用いた細胞内 A β 関連ストレスと薬剤応答性の解明」 第 86 回日本生化学会大会 シンポジウム「iPS 細胞技術を用いた神経疾患研究の進歩と今後の展望」 横浜 2013.9.13.
 8. 井上治久 「第 1 回 Novartis PD Symposium: Meet the Expert Meeting, PD 領域における Disease Modifying Therapy の実現を目指して」セッション 1 (基礎) DMT その実現に向けた基礎研究 パネ
ルディスカッション: - Is the DMT an Achievable Dream? 大阪 2013.9.14.
 9. 井上治久 「iPS細胞を用いた神経変性疾患の研究. 神戸バイオメディカル学術交流会」 第14回定期交流会 神戸 2013.12.11.
- 招待講演・セミナー
1. Inoue, H. Modeling Alzheimer's disease using patient-specific iPSCs reveals stress phenotypes. Stem Cells & Cell Signaling - 2013 Meeting on 'Assays to Regenerative Medicine, Tissue Engineering & Therapeutics' Waltham, USA, 2013.5.1.
 2. Inoue, H. Unraveling neurodegenerative-disease mechanisms using patient-specific iPSCs. ISSCR 11th Annual Meeting, Session Plenary III: Disease Modeling, Boston, MA, USA, 2013.6.13.
 3. Inoue, H. Neurodegenerative disease-specific iPS cell research. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Human Induced Neuronal Cells and Neurodegenerative Diseases -The Next Stage of iPS and iN Cells in Neuroscience Field- Kyoto, Japan, 2013.6.22.
 4. Inoue, H. Stem cells: from research to medical application. BioUANL 2013 From biotechnology to bioeconomy in Mexico, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico, 2013.10.14.
 5. Inoue, H. Unraveling neurodegenerative diseases using patient-specific iPSCs. MRC-CRM, The University of Edinburgh, Edinburgh, U.K., 2013.10.22.

6. Inoue, H. Unraveling neurodegenerative diseases using patient-specific iPSCs. CAMBRIDGE STEM CELL CLUB, Cambridge Stem Cell Institute, London, U.K., 2013.10.24.
7. Inoue, H. The use of iPSC cells toward drug development for neurodegenerative diseases. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences iPSC Cells in Drug Discovery & Development, Session 1: Neurological disease (1) , Osaka, Japan, 2014.1.16.
8. Inoue, H. Unraveling neurodegenerative diseases by somatic cell reprogramming International symposium“New Frontier of Molecular Neuropathology 2014” Tokyo, Japan, 2014.3.6.
9. 井上治久、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPSC 細胞) と神経変性疾患 第 110 回 日本内科学会総会 東京 2013.4.13.
10. 井上治久 iPSC 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究. 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 所内セミナー 東京 2013.4.19.
11. 井上治久 iPSC 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究 第 11 回 左京区医師会学術講演会 京都 2013.4.20.
12. 井上治久 iPSC 創薬研究—中枢神経系 バイオフィナンスギルド第 11 期第 10 回セミナー「iPSC 細胞創薬の急進展と落とし穴」 東京 2013.5.17.
13. 井上治久 iPSC 細胞由来神経細胞を用いた薬効評価 日本製薬工業協会 ヒト iPSC 細胞安全性応用タスクフォース (TF-5) コンソーシアム説明会 東京 2013.5.28.
14. 江川齊宏、井上治久 iPSC 細胞を用いた ALS の病態解析 第 54 回日本神経学会 学術大会 シンポジウム 「iPSC 細胞研究の現状と展望」 東京 2013.5.29.
15. 井上治久 iPSC 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究 岐阜薬大・岐阜大連携第 5 回 岐阜脳神経研究会 岐阜 2013.6.24.
16. 井上治久 iPSC 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究 名古屋大学博士課程教育リーディングプログラム IGER Seminar 名古屋 2013.6.26.
17. 井上治久 iPSC 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究 第 202 回日本神経学会九州地方会 ランチョンセミナー 佐賀 2013.6.29.
18. 井上治久 iPSC 細胞技術を用いた神経変性疾患のモデルデザイン 第 34 回 日本炎症・再生医学会 京都 2013.7.2.
19. 井上治久 iPSC 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究 第 48 回天然物化学談話会 大津 2013.7.4.
20. 井上治久 iPSC 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究 第 5 回日本創傷外科学会総会・学術集会 京都 2013.7.12.
21. 井上治久 iPSC 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究 第 22 回 日本 Cell Death 学会学術集会 京都 2013.7.19.
22. 井上治久 iPSC 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究 第 8 回京大病院 iPSC 細胞・再生医学研究会 京都 2013.7.25.
23. 井上治久 iPSC 細胞を用いた神経変性疾患の研究 第 56 回 神経内科懇話会「iPSC 細胞を利用した神経治療への展開」 東京 2013.8.3.

24. 井上治久 「iPS 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究」 第 4 回 ALS フォーラム 東京 2013.8.31.
25. 井上治久 「iPS 細胞作製技術を用いた神経変性疾患の研究」 第 4 回 Molecular Cardiovascular Conference II 北海道 2013.9.6
26. 井上治久 「iPS 細胞を用いた神経疾患研究」 第 21 回つくば Dementia セミナー つくば 2013.9.13.
27. 井上治久 「iPS 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究」 第 1 回最先端創薬科学シンポジウム～蛍光と創薬～ 長崎 2013.9.28.
28. 井上治久 「iPS 細胞技術を用いた神経疾患研究」 Parkinson Disease & Alzheimer Disease Conference – Disease Modifying Therapy をめざす Drug Design – 静岡 2013.10.11.
29. 井上治久 「神経疾患 iPS 細胞の現状と展望」 第 7 回 パーキンソン病・運動障害疾患コンgres 静岡 2013.10.12.
30. 井上治久 「iPS 細胞を用いた神経変性疾患の研究」 第 46 回山口県 Neuroscience 研究会, 山口 2013.10.17.
31. 井上治久 「iPS 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究」 第 129 回 日本薬理学会関東部会 東京 2013.10.19.
32. 井上治久 「iPS 細胞を用いた神経変性疾患に対する新たな医療開発をめざして」 中京東部西部医師会合同学術講演会 京都 2013.11.2.
33. 井上治久 「iPS 細胞技術を用いた新たな医療の可能性」 第 3 回医工薬産学公連携支援シンポジウム 京都 2013.11.7.
34. 井上治久 「iPS 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究」 ヒト iPS 細胞: 臨床・産業応用最前線 2013 疾患特異的 iPS 細胞を利用した病態解明・創薬開発 品川 2013.11.25.
35. 井上治久 「iPS 細胞を用いた神経疾患の研究」 Parkinson Disease & Alzheimer Disease Conference – Disease Modifying Therapy をめざす Drug Design – 三重 2013.11.29.
36. 井上治久 「iPS 細胞を用いた神経疾患の研究について」 第 10 回リハビリテーション運営委員会講演会 京都 2014.1.25.
37. 井上治久 「iPS 細胞技術を用いた神経変性疾患への挑戦」 第 10 回宮崎サイエンスキャンプ 宮崎 2014.2.15.
38. 井上治久 「iPS 細胞を用いた神経変性疾患の研究」 第 4 回鹿児島神経内科先端セミナー 鹿児島 2014.2.28.
39. 井上治久 「iPS 細胞を用いた神経難病の研究」 公開シンポジウム『倫理が育む健康・福祉に貢献する研究』 沖縄 2014.3.8.
40. 井上治久 「iPS 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究」 シンポジウム SY-20 疾患特異的 iPS 細胞 第 13 回日本再生医療学会総会 京都 2014.3.5.
- 学会主催・座長等
1. 第 54 回日本神経学会学術大会 シンポジウム: 「iPS 細胞研究の現状と展望」 (オーガナイザー・座長) (2013.5.29)
 2. 第 36 回日本神経科学学会 Neuro2013 シンポジウム (オーガナイザー・座長): ヒト神経細胞と神経変性疾患 —iPS、iN

- 細胞の未来— (2013.6.22)
3. 第 86 回日本生化学会大会シンポジウム (CREST 共催・オーガナイザー・座長) : iPS 細胞技術を用いた神経疾患研究の進歩と今後の展望, 横浜 (2013.9.13)
 4. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences Organizing Committee (オーガナイザー), 大阪 (2014.1.16-18)
 5. 第 13 回日本再生医療学会総会シンポジウム SY-20 疾患特異的 iPS 細胞 (オーガナイザー・座長), 京都(2014.3.5)
 6. International symposium “New Frontier of Molecular Neuropathology 2014” (座長), 東京(2014.3.16)
- アウトリーチ活動
1. 井上治久 iPS 細胞作製技術を用いた神経疾患の研究 第 33 回近畿 SCD・MSA 友の会総会 大阪 2013.5.18.
 2. 井上治久 iPS 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究 灘中学校・高等学校 2013 (平成 25) 年度・前期 土曜講座 神戸 2013.6.1.
 3. 井上治久 iPS 細胞技術を用いた神経変性疾患の研究 日本神経学会市民公開講座 徳島 2014.1.26.
- Alzheimer's In Vitro. Forbes Tech 2013.5.14
4. Press Briefing (Panelist, Moderator). Press Session 2 The Evolution of Pluripotent Stem Cell Research. ISSCR 11th Annual Meeting, MA, USA 2013.6.14.
 5. iPS 細胞作製技術を用いた神経疾患の研究 近畿 SCD・MSA 友の会ニュース Page 17-24 7630 号 2013.7.11.
 6. i P S細胞使い 難病治療研究...病気再現 新薬開発促す YOMIURI ONLINE Yomi Dr.(net) 2013.7.11.
 7. 迫真 号砲 iPS 医療 3 時計とタイマー 日経新聞 朝刊 page 2 2013.7.18.
 8. iPS 細胞でアルツハイマーに挑む 井上治久. 文藝春秋 10 月号 310-314 (2013.9.10)
 9. iPS 細胞・再生医学研究会 取り組みを報告. 芝蘭会報 179 号 page 4 2013.10.1.
 10. 症状再現 難病根治へ 新薬の候補物質 試す 井上治久・京大准教授. 読売新聞 朝刊 page13 2013.10.21.
 11. 研究発展へ「サイラ賞」貢献の 8 人表彰 京都大 iPS 細胞研究所(CiRA) 京都新聞 朝刊 page24 2014.1.9.
- H. 知的財産の出願・登録状況
なし

報道等

1. iPS 細胞を使った認知症の治療. 「ぼ〜れば〜れ」 393 号 2013.4.25.
2. New iPSC Alzheimer's model offers clue to why patients respond differently to drug treatment. (net) STEM CELLS PORTAL 2013.
3. Scientists Test A Potential Treatment Of

Ⅲ. 平成 25 年度 分担研究報告書

iPS 細胞技術を用いた難治性肝疾患治療薬シーズの探索と臨床試験ドロップアウト予測用肝細胞パネルの作製

研究分担者 長船 健二 (京都大学 iPS 細胞研究所 准教授)

研究要旨

新生児型および成人型シトルリン血症は、未だ有効な治療法の確立されていない致死性代謝性脳症を引き起こす難治性疾患である。本研究では、両シトルリン血症の患者体細胞より疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、同疾患の罹患細胞種である肝細胞に試験管内で分化誘導可能であることを確認した。また、それらの疾患特異的 iPS 細胞由来の肝細胞は、同疾患の原因遺伝子である ASS および Citrin や尿素サイクル関連遺伝子を発現していることを確認した。また、新規の低分子化合物を用いたヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法を確立し、その方法で作製される肝細胞がいくつかの代謝機能において従来の増殖因子を主に用いた分化誘導法で作製される肝細胞とほぼ同等であることが判明した。

A. 研究目的

尿素サイクル構成酵素であるアルギニノコハク酸合成酵素(argininosuccinate synthetase; ASS)や尿素サイクル関連分子である Citrin の欠損で発症する常染色体劣性疾患である新生児型および成人型シトルリン血症は、肝移植以外に根治的治療のない致死性代謝性脳症を引き起こす難治性疾患である。また、成人型シトルリン血症は、肝細胞内の脂肪変性と肝線維症から肝硬変に至る非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis; NASH)の病態を呈する。シトルリン血症と NASH の病態解明や新規治療法の開発研究に遺伝子改変マウスなどが使用されてきたが、ヒトの病態に完全には合致していないため、病態を正確に模倣した新規疾患モデルの開発が望まれてきた。

そこで、本研究では、新生児型および成人型シトルリン血症の患者由来 iPS 細胞(人工多能性幹細胞)の肝細胞への分化系を用いることで同疾患と NASH に対する創薬系開発を目指した新規疾患

モデルの開発を目的とした。

一方、無限の増殖能を有するヒト iPS 細胞から分化誘導される細胞種を薬剤の安全性・毒性評価に使用する研究が様々な細胞種で行われている。肝細胞は薬剤毒性の標的となる主要な細胞種であるが、ヒト iPS 細胞から毒性評価に使用可能な代謝活性を有する肝細胞は未だ作製可能となっていない。

本研究のもう一つの目的は、低分子化合物や遺伝子導入を用いて、ヒト iPS 細胞から薬剤毒性評価に使用可能な成熟肝細胞への分化誘導法の開発とそれを用いた臨床試験でドロップアウトする薬剤を予測できる肝細胞パネルを開発することである。

B. 研究方法

新生児型および成人型シトルリン血症の患者から同意取得後に皮膚生検または採血を行う。そして、皮膚塊を培養し増殖させた線維芽細胞にレト

ロウイルスベクターによる初期化誘導 4 因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) または 3 因子 (c-MYC を除く) の遺伝子導入にて疾患特異的 iPS 細胞を樹立する。または、抹消血から T 細胞を分離しエピゾーマルベクターを用いた 6 因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, shP53) の導入にて iPS 細胞を樹立する。

次に、樹立された iPS 細胞を罹患細胞種である肝細胞に試験管内で分化誘導することにより、病態を模倣する試験管内疾患モデルの作製を目指す。

薬剤毒性評価系開発に関しては、既報の HGF などの増殖因子を用いた分化誘導法を低分子化合物に置き換えた新規のヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法を既に開発している (Kotaka M et al., 投稿準備中)。新規分化誘導法で得られる肝細胞の CYP 活性をはじめとする代謝機能などの評価および肝障害マウスへの移植による肝細胞の機能評価を行う。また、マウス初代培養肝細胞に対して iPS 干渉法 (Hikichi T et al., 2013) を行い、成熟肝細胞を誘導する遺伝子の候補の探索を行う。

(倫理面への配慮)

患者由来 iPS 細胞を用いた研究は、京都大学大学院医学研究科・医学部「医の倫理委員会」にて承認された研究計画に基づき、匿名化の実施および遺伝情報を厳密に管理することによって、患者個人情報の漏洩によるプライバシー侵害の防止を徹底して行う。

C. 研究結果

本年度末までに新生児型シトルリン血症 1 例と成人型シトルリン血症 3 例から iPS 細胞株の樹立を完了した。次に、NANOG, OCT3/4, TRA1-60, TRA1-81 などの未分化マーカーの発現、胚様体、奇形腫形成による三胚葉成分への多分化能を確認した。また、既報のヒト iPS 細胞から肝臓系譜へ

の分化誘導法 (Kajiwara M, 2012) を改良し、新生児型および成人型シトルリン血症特異的 iPS 細胞から罹患細胞種である肝細胞への試験管内での分化誘導を行った。そして、RT-PCR 法と免疫染色法にて、ALBUMIN, AAT, CYP3A4, CYP3A5 などの肝細胞マーカーに加え、ASS や Citrin などの本疾患に関連した尿素サイクル関連遺伝子の発現を確認した。

薬剤毒性評価系開発に関しては、化合物を用いた新規分化誘導法で得られる肝細胞の ALBUMIN 蛋白の分泌、PAS 染色によるグリコーゲン貯蔵、ICG と LDL 取り込みなどの機能と CYP1A1, CYP2A6, CYP2A7 などの酵素の発現確認、さらに rifampicin 投与による CYP3A4 の酵素誘導などの機能を確認した。

また、マイクロアレイ解析にてマウス初代培養肝細胞に特異的に発現する約 110 種の転写因子を同定した。そして、iPS 干渉法にてそれらの因子の評価を行い、成熟肝細胞を誘導する遺伝子の候補を探索した。

D. 考察

新生児型および成人型シトルリン血症両者の患者体細胞から疾患特異的 iPS 細胞樹立が可能であることが判明した。そして、両シトルリン血症特異的 iPS 細胞は、試験管内で肝細胞へ分化誘導可能であり、尿素サイクル関連遺伝子を発現することも確認した。本疾患 iPS 細胞由来の肝細胞を用いて治療標的分子を含む疾患関連分子の探索が可能であることが示唆された。

新規化合物を用いた分化誘導法は、既報の肝細胞作製で用いられている HGF, OsM などの増殖因子、サイトカインを代替可能であり、それらの因子で作製された肝細胞といくつかの代謝機能において同等の性質を有していることが判明した。