

201335020A

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)

外来因子フリー難病由来 iPS 細胞の
ライブラリー構築とそれを使った
疾患モデルと薬剤開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 江良 択実

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)

外来因子フリー難病由来 iPS 細胞の
ライブラリー構築とそれを使った
疾患モデルと薬剤開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 江良 択実

平成26(2014)年 3月

目 次

I. 平成 25 年度研究班名簿	3
II. 総括研究報告	
外来因子フリー難病由来 iPS 細胞のライブラリー構築とそれを使った 疾患モデルと薬剤開発 江良 択実	4
III. 分担研究報告	
1. 外来因子フリー難病由来 iPS 細胞のライブラリー構築とそれを使った 疾患モデルと薬剤開発 糸 昭苑	9
2. 難病由来 iPS 細胞からの腎臓細胞分化誘導法の開発 西中村 隆一	12
3. 遺伝子発現とエピゲノム解析、細胞代謝の解析 中尾 光善	14
4. ニーマン・ピック病 C 型治療薬開発を目指した病態モデル細胞・動物 を用いた Non-GLP 非臨床研究 入江 徹美	16
5. 健常人およびニーマンピック C 型患者由来の iPS およびそれらの分化 肝様細胞の総合グライコミクスの比較解析 篠原 康郎	19
6. 外来因子フリー難病由来 iPS 細胞のライブラリー構築とそれを使った 疾患モデルと薬剤開発 房木 ノエミ	22
7. 外来因子フリー難病由来 iPS 細胞のライブラリー構築とそれを使った 疾患モデルと薬剤開発 松本 志郎	25
8. iPS 細胞を使用したライソゾーム病治療薬の開発 有馬 英俊	29
9. 難病患者サンプルの収集と iPS 細胞を使った疾患解析、薬剤開発 杉山 大介	32
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	36
V. 研究成果の刊行物・別刷	38

平成 25 年度 厚生労働省
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)

外来因子フリー難病由来 iPS 細胞のライブラリー構築と
それを使った疾患モデルと薬剤開発

	氏名	所属等	職名
研究代表者	江良 択実	熊本大学 発生医学研究所 幹細胞誘導分野	教授
研究分担者	桑 昭苑	熊本大学 発生医学研究所 多能性幹細胞分野	教授
	西中村 隆一	熊本大学 発生医学研究所 腎臓発生分野	教授
	中尾 光善	熊本大学 発生医学研究所 細胞医学分野	教授
	入江 徹美	熊本大学生命科学研究部 薬剤情報分析学分野	教授
	篠原 康郎	北海道大学大学院先端生命科学研究院	特任教授
	房木 ノエミ	慶応義塾大学 医学部 眼科学	特任准教授
	松本 志郎	熊本大学医学部附属病院 総合周産期母子医療センター	助教
	有馬 英俊	熊本大学生命科学研究部 製剤設計学分野	教授
	杉山 大介	九州大学大学院医学研究院	准教授

外来因子フリー難病由来 iPS 細胞のライブラリー構築と それを使った疾患モデルと薬剤開発

研究代表者 江良 択実 熊本大学発生医学研究所 教授

研究要旨

難治性疾患（難病）では細胞試料が少なく、創薬研究を進める上で障害となっている。一方、iPS 細胞は、多分化能をもつため疾病の標的細胞を誘導することが可能である。増幅し長期に保存できることから、試料が少ないという問題を解決し、創薬研究に効果を発揮すると考えられる。iPS 細胞を使った創薬研究を推進するために、本研究では、

1. 外来因子フリー難病由来 iPS 細胞の作製とそのバンク化
 2. 中・内胚葉系子孫細胞への分化誘導方法の確立とそれを用いた疾患解析と薬剤開発
- を行う。平成 25 年度は、疾患由来 iPS 細胞を作製する線維芽細胞、血液細胞については、平成 25 年度（研究期間 6 か月）の間に、線維芽細胞（15 症例、7 疾患）、血液（5 症例、4 疾患）合計 20 例、11 疾患、樹立・収集した。また iPS 細胞作製については、計 8 症例、5 疾患から 80 株あまりの細胞株を樹立した。さらに、中胚葉系細胞、内胚葉系細胞の誘導について、表面マーカーの開発と誘導方法の確立を行った。さらに iPS 細胞由来の内胚葉系子孫細胞である肝様細胞では疾患での評価系を開発し、それを用いた遺伝性疾患の解析では試験管内での疾患モデルを樹立した。

研究分担者

糸 昭苑
熊本大学発生医学研究所 教授
西中村 隆一
熊本大学発生医学研究所 教授
中尾 光善
熊本大学発生医学研究所 教授
入江 徹美
熊本大学生命科学研究部 教授
篠原 康郎
北海道大学大学院先端生命科学研究院
特任教授
房木 ノエミ
慶應義塾大学医学部 特任准教授
松本 志郎
熊本大学医学部附属病院 助教

有馬 英俊
熊本大学生命科学研究部 教授
杉山 大介
九州大学大学院医学研究院 准教授

A.研究目的

iPS 細胞は、疾病の標的細胞誘導が可能であり、増幅し長期保存にも耐えられる。したがって、生体試料に限られる難治性疾患（難病）の創薬研究に優れた効果を発揮すると考えられる。iPS 細胞を用いて、創薬研究を幅広く展開するためには、多くの疾患由来 iPS 細胞を有するライブラリーと疾患標的細胞への安定した再現性の高い分化誘導方法を備えた基盤構築が求められる。申請者らは、これまでに数百ものヒト疾患由来 iPS 細胞株の作製と保存・バンク化を行ってきた実績を有する。加えて、世界

に先駆けて、分化中間段階細胞を可視化し同定する独自の手法を用いて、中胚葉系（骨、軟骨、血液、血管内皮）と内胚葉系（肝臓、膵臓）細胞のヒト ES/iPS 細胞からの分化誘導方法を確立してきた。これらの成果をもとに難病由来 iPS 細胞を利用した創薬基盤開発研究を遂行する。

本研究の目的は、

- 1) 外来因子フリー難病由来 iPS 細胞の作製とそのバンク化
- 2) 中・内胚葉系子孫細胞への分化誘導方法の確立とそれを用いた疾患解析と薬剤開発

平成 25 年度には、難病由来 iPS 細胞作製を進めると共に、中胚葉・内胚葉系、特に骨・軟骨、血管内皮、肝、膵β、腎細胞の分化誘導法の確立、誘導した細胞の機能評価系の確立、これらの細胞が侵される疾患由来 iPS 細胞を使ったモデル作製と薬剤開発を行う。iPS 細胞を使った難病研究班とも情報を交換し連携する。本研究では、従来の方法と全く異なり外来因子が染色体上に残らず、短期間で作製可能な国内発のセンダイウイルスベクターを用い外来因子フリーの iPS 細胞を作製する特色を有する。この方法は iPS 細胞の作成効率がよく（平均 1%以上）、血液細胞からも容易に作製できる優れた利点を持つ。疾患由来 iPS 細胞の研究は年々増加しているが、作製 iPS 細胞数は未だ不十分であり、未作製な疾患が多く残されている。研究では、細胞表面マーカーを用いて中間段階細胞のモニタリングと分離を行いつつ、疾患異常を解析する特色ある手法を用いる。加えて、化学物質による誘導方法の確立や複合糖質を網羅的に解析し、疾患による異常を明らかにする点は、これまでの研究になかった視点であり独自の点である。

B. 研究方法

1. 難病由来血液細胞、皮膚線維芽細胞の収集と樹立

熊本大学での iPS 細胞作製研究が倫理委員会の承認済である全国 20 以上の大学病院等から、同意済み線維芽細胞、血液細胞の収集を行う。血液細胞はヘパリン加にて採血を行い、単核球

をフィコール遠心法を用いて分離する。線維芽細胞は、ヒトの皮膚生検（直径約 5mm 片）から、皮膚由来初代線維芽細胞を分離培養する。

2. 外来因子フリー難病由来 iPS 細胞の樹立と保存

センダイウイルスベクター (SeV) によって患者由来細胞へ初期因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を一過性に発現させ、iPS 細胞を作製する。血液細胞からの場合は、ConA や抗 CD3 抗体にてリンパ球 (T 細胞) を 5 日間刺激後、iPS 細胞を誘導する。樹立した iPS 細胞については、1) アルカリフォスファターゼ染色 2) Nanog, Oct3/4, SSEA-4, TRA-1-60 の免疫染色による iPS 細胞の確認を行う。さらに、三胚葉系細胞への分化を誘導し多能性を確認する。誘導後、神経外胚葉マーカー: Sox1, Neurogenin, Nestin 等、中胚葉マーカー: Brachyury, Mesogenin, Mesp2 等、内胚葉マーカー: Sox17, CK18, CK19, Foxa2 等の発現を定量 RT-PCR にて調べる。さらに染色体解析、必要に応じて免疫不全マウスに移植して奇形腫を形成させ多分化能を解析する。

樹立した iPS 細胞は、すみやかに貯蔵し、同時に作製依頼者へ供与する。また、バンク登録に向けた患者の同意、研究者の同意を得てバンク化を進める。

3. ヒト iPS 細胞から中胚葉系細胞、内胚葉系細胞への分化

成熟度の高い中・内胚葉由来の細胞誘導方法を確立する。中胚葉誘導では、PDGFR α と KDR を表面マーカーとして、FACS にて分離後、PDGFR α + 分画は、骨・軟骨細胞へ誘導し、KDR+ 分画は血管内皮、血液細胞への分化誘導を行う。また内胚葉表面マーカー CXCR4 を用いて分離後、HGF, OSM 等を用いて肝様細胞の誘導を行う。最終的に、肝臓細胞のマーカー (HNF6, AFP, Albumin 等) にて肝様細胞の誘導ができていることを確認する。

4. 疾患由来 iPS 細胞を用いた疾患モデル開発

疾患 iPS 細胞を用いて、肝細胞に異常をきたし、かつ、治療がないニーマンピック病 C 型 (NPC) の根底にある病態の分子機構を解明す

ると共に、治療薬開発に向けたモデル系を確立する。上述の方法にて肝様細胞へ誘導し、NPCに特徴的な表現型である遊離型コレステロールの蓄積の有無、さらに様々な肝機能（アルブミン産生、アンモニア吸収等）の測定を行い、異常の有無について解析を行う。さらにすでに効果が判明している2-Hydroxypropyl- β -dextrin (HPBCD)の効果についても解析する。

(倫理面への配慮)

1) 倫理審査等

正常と疾患由来のiPS細胞作製とその解析、細胞のバンク化については研究代表者の所属する機関の倫理委員会で審査を行いすでに承認済みである。患者サンプルの所属機関以外からの提供については、提供機関の倫理審査委員会の承認があることを確認し研究を行う。

2) 人権擁護上の配慮

研究の成果を学術雑誌に投稿することや、学会等で発表する場合、個人が特定される個人情報公表されることはない。本研究のために特別に用意した番号によって管理し、人種・性別・年齢・診断名以外の患者情報はサンプル提供を行う臨床機関にて管理を行う。作製したiPS細胞は所属機関において施錠できる研究室にて管理し、一般の人々やこの研究に関係ない他の研究者の目に触れることはない。したがって、iPS細胞から個人の特定の情報につながることはない。また、ヒトiPS細胞から個体を作製すること、ヒト胚への導入、ヒト胎児への導入、生殖細胞の作製は、行わない。また、バンクからの提供については連結不可能匿名化で行う。

3) 不利益・危険性の排除や説明と同意

サンプル採取には、研究目的・予想される成果、患者情報の保護、予想される不利益等を同意書に記述している内容に準じて、担当医からの十分な説明の後(必要であれば代表申請者も同席して)、同意(インフォームド・コンセント)を得て行う。

皮膚由来線維芽細胞を得るための皮膚生検

は通常の医学診療の範囲で行われている方法に準じて行う。生検は、直径5mmほどを前腕伸側から局所麻酔を使い行う。痛みは、局所麻酔注射の時のみである。瘢痕は普通のけがの場合と同じである。以上より、危険性はほとんどない。また、末梢血液採取も上腕の静脈より、通常医療で行われている方法に準じて行う。こちらも危険性はない。

本研究による成果が知的財産権の対象になる場合もあるが、提供者に権利が帰属したり、利潤を得ることはない。サンプル提供者にご負担していただく必要経費はなく、また、サンプル提供による謝金・交通費の支給もない。研究にかかる費用については、研究費から支出する。

C.研究結果

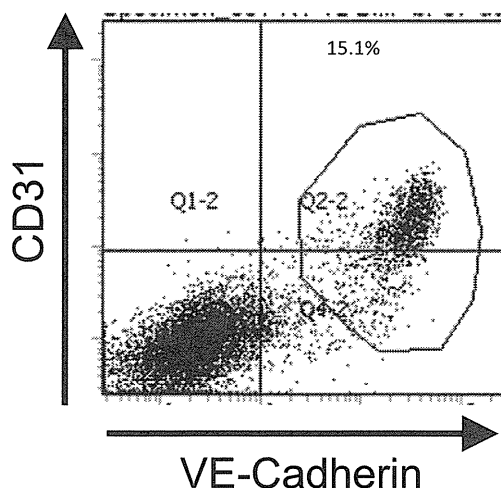
1. 疾患由来血液細胞と線維芽細胞の収集とiPS細胞の樹立

疾患由来iPS細胞を作製する線維芽細胞、血液細胞については、平成25年度(研究期間6か月)の間に、線維芽細胞(15症例、7疾患)、血液(5症例、4疾患)合計20例、11疾患、樹立・収集した。またiPS細胞作製については、計8症例、5疾患から80株あまりの細胞株を樹立した。

2. iPS細胞からの中胚葉系、内胚葉系細胞への誘導方法の確立と肝様細胞の評価系の確立

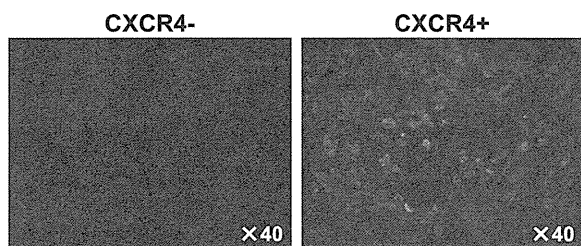
iPS細胞からの分化誘導方法や誘導後の細胞の機能評価系については、1) ヒトiPS細胞からVEGFR2⁺,PDGFR α ⁺の中胚葉様細胞を誘導した。このうちVEGFR2⁺,PDGFR α ⁺から血管内皮細胞の誘導に成功した。またiPS細胞からFGF2, BMP4を用いて直接、CD31⁺, VE-Cadherin⁺の血管内皮細胞の誘導にも成功した(図1)。

図1 血管内皮細胞の誘導



2) ヒト iPS 細胞から CXCR4⁺の内胚葉系細胞を効率よく誘導する条件を確立し、CXCR4 陽性細胞から効率よく肝様細胞（アルブミン産生細胞）を誘導する条件を確立した。（図2）。

図2 内胚葉系マーカーCXCR4の陽性細胞の分離



CXCR4陽性と陰性細胞をFACSIにて分離し、細胞運命を調べるとCXCR4陽性細胞からのみ肝臓マーカーであるアルブミン陽性細胞が出現した。

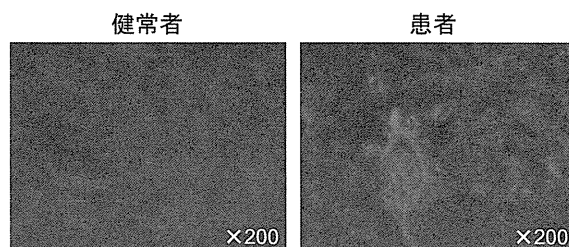
この条件にて誘導するとアルブミン陽性の肝様細胞は約 70-80%誘導される。3)iPS 細胞由来肝様細胞の機能を解析できる評価系（アルブミン分泌能、尿素産生能、アンモニアの処理能力、ATP 産生能力等）を確立した。この系は後に記述する疾患由来 iPS 細胞から肝様細胞を誘導しその細胞の機能解析に使った。

3. 疾患由来 iPS 細胞を使ったニーマンピック病 C 型 (NPC) の疾患モデルの確立

ニーマンピック病 C 型由来 iPS 細胞から肝様細胞を誘導、その細胞でのコレステロールの蓄積、ATP 産生能の低下、オートファジー異常を新たに発見し、この疾患の細胞レベルでのモデルを確立した。まず、NPC の患者 2 名から iPS

細胞を樹立した。その際の誘導効率については、特に差は見られなかった。このことから、NPC の異常は、細胞のリプログラミング効率には影響を与えないことが考えられる。次に、NPC 由来 iPS 細胞を内胚葉系細胞へ誘導した。CXCR4⁺細胞の誘導効率については、健常者由来 iPS 細胞と差は見られなかった。さらにそこからの肝様細胞へ誘導した。誘導中の分化マーカーの発現、アルブミン陽性の肝様細胞誘導効率についても内胚葉系細胞と同様差は見られなかった。以上のことから、NPC 由来 iPS 細胞の内胚葉系細胞、肝様細胞への分化能については健常者と同程度で異常はないと考えられる。次に誘導した肝様細胞での遊離型コレステロールの蓄積を遊離型コレステロールを染色するフィリピン染色を行い解析した（図3）。

図3 患者由来肝様細胞でのコレステロールの蓄積



NPC 由来の肝様細胞では、非常に大量の遊離型コレステロールの蓄積が見られた。さらに誘導した肝様細胞の機能を解析したところ、アルブミン産生能、尿素産生能、アンモニア処理能等にはコントロールとの差を認めなかったものの ATP レベルの有意な低下、オートファジーの亢進と途中での停止を認めた。アポトーシスについては差を認めなかった。以上の結果は、NPC で見られる病態と極めて類似しており、この iPS 細胞を用いたシステムが細胞レベルでの疾患モデルとして樹立できることを示している。さらにこのシステムが薬剤効果を解析する系として使えるかどうかを調べるために、現在欧米で治験が進んでいる 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPBCD) についてその効果について検討した。HPBCD にて 4 日間処理することで、肝様細胞内の遊離型コレステロールの蓄積は劇的に減少した。またこれに伴い、細胞の ATP レベルの低下は回復し、オートファジーの

異常は正常化した。以上の結果は、この細胞レベルでの疾患モデルの系が、薬剤の効果を調べる系として活用できることを示唆している。

D. 考察と結論

1. 線維芽細胞の収集と樹立、血液細胞の収集は計画どおりに進んでおり、今後もこのペースで進める。

2. 中胚葉系細胞、内胚葉系細胞の誘導について、VEGFR2、PDGFR α 、CXCR4 がマウス ES 細胞と全く同様に使用できることが改めて確認された。したがって、これらの表面マーカーを蛍光色素を標識した抗体によって可視化することで FACS を用いて純化・精製することが可能であり、細胞誘導の純度は飛躍的に上昇すると考えられる。

3. 内胚葉系細胞から肝様細胞への分化誘導では、発生分化過程に見られる分化マーカーの発現が見られた。これはこの分化誘導方法が発生分化過程に類似していることを示唆しており、このシステムを用いて疾患の肝細胞分化に与える影響を解析するツールとしても使用できる可能性を示している。

4. ニーマンピック病 C 型 (NPC) から作成した iPS 細胞の誘導効率に正常コントロールとの差はなく、この疾患の異常は、細胞リプログラミングに対して特に影響を与えないと考えられる。

5. NPC 由来 iPS 細胞から誘導した肝様細胞では、著明な遊離型コレステロールの蓄積が見られた。また ATP レベルの低下とオートファジーの異常が見られた。この異常は、コレステロールの蓄積の初期に肝様細胞で見られたことから、NPC で起こるもっとも早期の異常所見であることが示唆される。

6. HPBCD による NPC 由来肝様細胞でのコレステロールの蓄積は劇的に改善した。またこれに伴い ATP レベルとオートファジーの異常も改善した。この結果は、NPC 由来の iPS 細胞を使って確立した細胞レベルでの疾患モデルが薬剤の効果を調べる系として使えることを示唆している。と同時に、HPBCD が将来の NPC の

治療薬候補となり得る可能性を示していると言える。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

1. Tanaka A, Woltjen K, Miyake K, Hotta A, Ikeya M, Yamamoto T, Nishino T, Shoji E, Sehara-Fujisawa A, Manabe Y, Fujii N, Hanaoka K, Era T, Yamashita S, Isobe K, Kimura E, Sakurai H. Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: Prospects for modeling Miyoshi Myopathy in vitro. PLoS One 8(4):e61540, 2013.

2. Yoshimura N, Motohashi T, Aoki H, Tezuka K, Watanabe N, Wakaoka T, Era T, Kunisada T. Dual origin of melanocytes defined by Sox1 expression and their region-specific distribution in mammalian skin. Dev. Growth Differ. 55: 270-281, 2013.

2. 学会発表

江良択実 難治性疾患由来 iPS 細胞の樹立、解析とそのバンク化 第 130 回熊本小児科学会
2013 年 6 月 16 日 熊本

G. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

江良択実、他 1 名 特願 2013-252174 コレステロール蓄積疾患治療薬、およびそのスクリーニング方法 出願日：2013/12/5

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

外来因子フリー難病由来 iPS 細胞のライブラリー構築と それを使った疾患モデルと薬剤開発

研究分担者 桑昭苑 熊本大学・発生医学研究所・多能性幹細胞分野・教授

研究要旨

本研究の目的は、1. 外来因子フリー難病由来 iPS 細胞の作製とそのバンク化、2. 中・内胚葉系子孫細胞への分化誘導方法の確立とそれを用いた疾患解析と薬剤開発である。研究分担者である桑は、平成 25 年度においてはヒト iPS 細胞から機能的な膵臓細胞への分化誘導の構築のための基礎的検討を行った。膵臓分化を促進する低分子化合物を大規模に探索する目的でヒト iPS 細胞から膵臓系譜への分化誘導のハイスループット評価系を構築した。

A.研究目的

本研究の目的は、1. 外来因子フリー難病由来 iPS 細胞の作製とそのバンク化、2. 中・内胚葉系子孫細胞への分化誘導方法の確立とそれを用いた疾患解析と薬剤開発である。

研究分担者である桑は、平成 25 年度においてはヒト iPS 細胞から効率的な膵臓分化誘導方法の構築を目的とした。ヒト iPS 細胞由来の膵臓細胞は再生医療の材料として期待されているが、これまでの研究では *In vitro* での培養では糖依存的なインスリンの分泌が見られない未熟な膵臓β細胞しか作ることができず、成熟化させるためにはマウス腎被膜下への移植という *In vivo* での分化誘導が必要とされてきた。マウス体内での *In vivo* 分化は、将来の再生医療を考える上で質および量ともに問題がある方法であり、*In vitro* での膵臓β細胞の成熟化方法の開発が求められている。

膵臓β細胞は、内胚葉、膵臓前駆細胞を経て分化する。ヒト ES 細胞から内胚葉、内胚葉から膵臓前駆細胞への分化をそれぞれ促進する低分子化合物に関しては、2009 年に相次いで報告されたが、膵臓β細胞の分化促進および成熟化を促す化合物の報告は未だない。

我々の研究室では、マウス ES 細胞から膵臓前駆細胞を誘導した後、1,120 の低分子化合物の中から小胞型モノアミントランスポーターの 1 つ VMAT2 の阻害剤が膵前駆細胞から内分泌前駆細胞への分化を促進する効果があることを見出した（坂野ら、*Nature Chemical biology*, 2013）。

本研究では、ヒト iPS から膵臓細胞への分化誘導系を用いて、これまで全く報告のないヒト膵臓β細胞の分化・成熟化を促進する低分子化合物のスクリーニングを行うことを計画した。

B.研究方法

ヒト iPS 細胞株である Toe を用いて検討を行った。分化状態に関してはインスリン・グルカゴン・ソマトスタチンなどの発現を免疫染色により評価した。培地交換および免疫染色後の解析については、H24 年度の厚生労働省の臨床研究安全基盤整備支援事業で導入したラボラトリーオートメーションシステム Biomek NP (BECKMAN COULTER) およびイメージングサイトメーター IN Cell Analyzer 6000 (GE ヘルスケア・ジャパン) を用いた。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C.研究結果

膵臓細胞を用いたハイスループットなスクリーニング系の構築については具体的には以下のように検討した。1. 384well plate の系で細胞播種・培地交換作業については分注ロボットを用いて行うことによりバラツキの指標である CV 値が約 10%という安定したスクリーニング系を構築することに成功した。2. 分化誘導方法を改良することで、操作の簡便化・培養期間の短縮に成功した。

D.考察

今回の検討により評価系は構築できたと考えられるので、大規模なスクリーニングに向けて準備を整えている。また、構築したハイスループット評価系はモデル細胞を利用した薬剤開発研究にも利用可能である。

E.結論

膵臓分化を促進する低分子化合物を大規模に探索する目的でヒト iPS 細胞から膵臓系譜へ分化誘導のハイスループット評価系を構築した。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

Sakano D, Shiraki N, Kikawa K, Yamazoe T, Kataoka M, Umeda K, Araki K, Mao D, Matsumoto S, Nakagata N, Andersson O, Stainier D, Endo F, Kume K, Uesugi M, **Kume S***. 2014. VMAT2 identified as a regulator of late-stage β -cell differentiation. *Nat Chem Biol*.

10(2):141-8.

Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, **Kume S***. 2013. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci*. 26(Pt 23):5391-9.

Iwashita H, Shiraki N, Sakano D, Ikegami T, Shiga M, Kume K, **Kume S***. 2013. Secreted cerberus1 as a marker for quantification of definitive endoderm differentiation of the pluripotent stem cells. *PLoS One*. 8(5):e64291.

Ogaki S, Shiraki N, Kume K, **Kume S**. 2013. Wnt and Notch signals guide embryonic stem cell differentiation into the intestinal lineages. *Stem Cells*. 31(6):1086-96.

Umeda K, Suzuki K, Yamazoe T, Shiraki N, Higuchi Y, Tokieda K, Kume K, Mitani K, **Kume S***. 2013. Albumin gene targeting in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells with helper-dependent adenoviral vector to monitor hepatic differentiation. *Stem Cell Res.* 10(2):179-94.

坂野大介 **糸 昭苑**、膵 β 細胞・膵島の再生研究 2014 『Recent studies in regeneration of pancreatic β cells』 最新医学 69 巻、36-41.

白木伸明、**糸 昭苑**、2013、第 2 章 iPS 細胞・ES 細胞の開発応用、『再生医療・細胞培養の開発と市場』シーエムシー出版、東京、14-23

白木伸明、**糸 昭苑**、2013. ES/iPS 細胞から内胚葉組織への分化誘導方法の開発、Dojin News、

149 1-6

坂野大介 糸昭苑、2013. 幹細胞からβ細胞を誘導するシグナル、『膝島のバイオロジーの新たな展開』Diabetes Frontier vol 24, 544-549.

山添太士、白木伸明、佐々木裕、糸昭苑、2013. 肝臓の再生医療、日本医師会雑誌 vol 142, no. 4, 791-795.

勝本恵一 糸昭苑、2013. 膝臓の初期発生機構の解明と再生医療への応用, 特集『膝β細胞の発生生物学と再生医療の応用』内分泌・糖尿病・代謝内科 Vol 36 No. 3, 169-175.

大垣総一郎 糸昭苑、2013. 消化器幹細胞：膝上皮『Surgery Frontier』Vol.20, 70-72.

2.学会発表

糸昭苑「多能性幹細胞から膝β細胞への分化誘導」第13回日本再生医療学会総会『iPS細胞、ES細胞の生物学の進歩と再生医療応用』シンポジウム 平成26年3月6日京都（招待講演）

糸昭苑「多能性幹細胞を用いた膝β細胞への分化誘導研究」第3回細胞再生医療研究会」2013年7月27日神戸（特別講演）

糸昭苑「多能性幹細胞を用いた膝β細胞の発生再生研究」内分泌代謝学サマーセミナー、2013年7月12日 由布院（招待講演）

大垣総一郎、白木伸明、糸和彦、糸昭苑「WntシグナルとNotchシグナルがES細胞から腸上皮細胞への分化を促進する」第65回日本細胞生物学会 2013年6月19日、名古屋.

Sakano, D., Shiraki, N., Kataoka, Kikawa K., Endo F.,

M., Kume, K, Uesugi, M. and Kume, S. Screening of small compounds to promote differentiation of mouse ES cells to functional pancreatic β cells. ISSCR Boston, June 12-15, 2-13, 2013. (ポスター)

Kume, S. Screening for low molecular compounds that potentiate beta cell differentiation. Canada- Japan Stem Cell Workshop ISSCR 2013, Boston. June 13, 2013.

Yamazoe T, Shiraki N, Uesugi M, Kume K, Kume, S. Chemical genetic identification of molecules that potentiate hepatic maturation of human iPS-derived hepatocytes, ISSCR Boston, June 12-15, 2-13, 2013 (ポスター)

Kume, S. Signals guiding pluripotent stem cells into pancreatic beta cells. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto April 24, 2013（招待講演）

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- | | |
|----------|------|
| 1.特許取得 | 該当なし |
| 2.実用新案登録 | 該当なし |
| 3.その他 | 該当なし |

難病由来 iPS 細胞からの腎臓細胞分化誘導法の開発

研究分担者 西中村 隆一 熊本大学発生医学研究所 教授

研究要旨

腎臓の起源を同定し、そこからの発生過程を明らかにすることで、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞から糸球体と尿細管という 3次元の腎臓組織を試験管内で誘導することに成功した。これによって、難病患者から iPS 細胞を樹立し、腎臓へと誘導して病態を再現することが現実味を帯びてきた。しかし異なる患者から違う時期に作成される多種類の iPS 細胞から、再現性よく腎臓組織を誘導できるように、誘導法の改善を重ねる必要がある。

A.研究目的

難治性疾患（難病）は患者から入手できる細胞数が少なく、創薬研究を進める上での障害となっている。一方、多分化能をもつ iPS 細胞は、疾病の標的細胞を誘導できるうえ、増幅し長期保存できることから、上記の問題点を解決できる可能性をもっている。そのためには、多くの疾患由来 iPS 細胞（センダイウイルスベクターを用いた外来因子フリーのもの）からなるライブラリーの作成と疾患標的細胞への再現性の高い分化誘導法の開発が必須である。本研究は、創薬基盤の整備を目指して成熟度の高い中・内胚葉由来の細胞誘導方法を確立する計画の中で、腎臓細胞への誘導法開発を担当する。さらに腎疾患患者から iPS 細胞を樹立し、それを腎臓方向へと誘導することによって、病態を再現して創薬の基盤とすることを目指す。

B.研究方法

腎臓は、糸球体や尿細管からなるネフロンという機能単位を 100 万個も有する複雑な臓器である。その複雑な構造と発生機序から、3次元の腎臓組織を試験管内で誘導することは、極めて困難とされていた。西中村は胎齢 10.5 日のマウス腎臓にネフロンの前駆細胞が存在するこ

と、それを Wnt で刺激することによって糸球体や尿細管の細胞が誘導できること、を以前に報告していた。そこで、まずマウスを使って、より早期の胎児細胞からネフロン前駆細胞を誘導できないか試みた。そのためには腎臓がどうやってできていくのかを詳細に解き明かす必要があった。そしてその知見を使って、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞から、ネフロン前駆細胞を経由して腎臓組織の誘導を試みた。

（倫理面への配慮）

DNA 組換え実験、動物実験は、所属機関委員会の許可を得て、機関内の指針を遵守し行った。

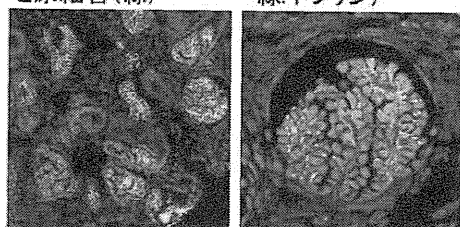
C.研究結果

ネフロン前駆細胞を含めて腎臓はすべて、転写因子 *Osr1* 陽性の中間中胚葉から発生するとされていた。そこで *Osr1* の GFP ノックインマウスと ES 細胞を作成し、解析を進めたが、この過程で、前駆細胞は通説の中間中胚葉由来ではなく、別の細胞群（体軸幹細胞様の細胞）から派生することを見いだした。そしてその細胞群に Wnt, Bmp, アクチビン、レチノイン酸、Fgf9 が働いてネフロン前駆細胞が形成されることを見いだした。この発生過程を忠実に再現する

ことによって、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞から体軸幹細胞様細胞を経由してネフロン前駆細胞を誘導し、それを Wnt で刺激することで糸球体と尿細管の試験管内構築に成功した(下図参照 ; Taguchi et al. *Cell Stem Cell*, 2014)。

ヒトiPS細胞から誘導した腎臓組織

糸球体(桃色, 黄色) と尿細管(緑)
糸球体(桃色:Wt1, 緑:ネフリン)



D. 考察

今回の成果によって、西中村が 1990 年代後半にカエルを用いて行っていた腎臓の試験管内誘導を哺乳類でも実現したことになる。これには腎臓の起源が通説と異なることを見いだしたこと、腎臓の発生過程を詳細に明らかにしたこと、という発生学的知見の積み上げが大きく貢献している。またマウスとヒトでほとんど誘導法が同じであり、種を越えた共通性が示唆された。さらにアクチビンとレチノイン酸の必要性はカエルから保存されており、興味深い。

この成功によって、難病患者から iPS 細胞を樹立し、腎臓へと誘導して病態を再現することが現実味を帯びてきた。とはいえ、今回誘導できたのは糸球体と尿細管であり、集合管や尿管、血管、間質はできていない。よって、現時点で iPS 細胞を樹立する対象になるのは、糸球体や尿細管に症状を呈する疾患のみである。また分化段階も妊娠初期程度に留まるため、それまでに症状を出す疾患に限られる。また今回使用したヒト iPS 細胞は山中伸弥博士が 4 因子を使って最初に樹立した 201B7 株であるが、患者から多数の iPS 株を樹立する場合、その度にまた株間でも性質に差があることが予測される。その

ような状況でも、安定して再現性良く腎臓組織が誘導できなければならない。よって最初の数疾患で iPS 細胞を樹立して誘導を目指す際に、誘導条件を改善していくことが必須である。

E. 結論

ヒト iPS 細胞から、糸球体と尿細管という 3 次元の腎臓構造を試験管内で誘導することに成功した。今後は難病患者由来の iPS 細胞でも安定して腎臓組織を誘導できる再現性の高い方法に向けた改善が必要である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, and Nishinakamura R. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 14(1): 53-67, 2014.

2. 学会発表

西中村隆一、太口敦博 腎臓の起源同定に基づく幹細胞からの腎臓誘導法の開発 第 119 回日本解剖学会総会 2014 年 3 月 29 日、栃木

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

多能性幹細胞からの腎臓誘導法 熊本大学 (西中村隆一、太口敦博) 特願 2013-217029 2013 年 10 月 18 日

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特になし

遺伝子発現とエピゲノム解析、細胞代謝の解析
研究分担者 中尾光善 熊本大学発生医学研究所 教授

研究要旨

iPS 細胞を用いた疾患解析と薬剤開発を行うために、対照および疾患由来の細胞について、遺伝子発現とエピゲノム、細胞形態や細胞代謝等の機能を解析することで、発症や病態の分子機序の理解を目指した研究基盤を確立する。細胞病態を客観的に評価できる解析系を用いて、新たな治療薬剤の探索と開発などに資する。

A.研究目的

iPS 細胞を用いた疾患解析と薬剤開発を行うために、対照および疾患由来の細胞について、遺伝子発現とエピゲノム、細胞形態や細胞代謝等の機能を解析することで、発症や病態の分子機序の理解を目指した研究基盤を確立する。

B.研究方法

対象細胞を用いて、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム、高速シーケンサーを用いたエピゲノム、この両者を組み合わせたパスウェイ解析を準備した。細胞イメージングを用いた細胞形態の計測、細胞外フラックスアナライザーを用いた細胞代謝等の機能解析を用いた。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C.研究結果

本研究課題に貢献するため、本年度は、遺伝子発現とエピゲノム、細胞形態や細胞代謝等の機能を解析する基盤づくりに重点を置いて、これらの点はほぼ準備ができた。

同時に、ヒト iPS 細胞(標準株)について、イメージング計測解析を実施した。形態分類ソフトウェアを用

いて、iPS 細胞が形成するコロニーの分類を行い、完全な iPS 細胞(多能性を有する)、不完全な non-iPS 細胞を検討し、おおむね区別可能であることが分かった。また、核内構造体を認識する特異抗体を用いて、完全および不完全な iPS 細胞の識別法について検討中である。

D.考察

対照および疾患由来の iPS 細胞について、細胞の遺伝子発現とエピゲノム、細胞形態を解析することで、細胞状態の特徴を評価できると考えられた。

E.結論

本研究課題で用いる疾患由来 iPS 細胞について、遺伝子発現とエピゲノム、細胞形態や細胞代謝等の機能を解析することで、発症や病態の分子機序の理解を目指した研究が展開できると考えている。細胞病態を客観的に評価できる解析系を構築することは、新たな治療薬剤の探索と開発などに大いに資すると期待する。

F.健康危険情報

該当なし。

G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

Sasai N, Saitoh N, Saitoh H, and Nakao M. The transcriptional cofactor MCAF1/ATF7IP is involved in histone gene expression and cellular senescence. **Plos One** 87: e68478, 2013.

Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Yoshida N, Oki E, Morita M, Nakao M, and Baba H. IGF2 DMR0 methylation, loss of imprinting, and patient prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. **Ann. Surg. Oncol.** (印刷中)

Baba Y, Watanabe M, Murata A, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Yoshida N, Oki E, Sakamaki K, Nakao M, and Baba H. LINE-1 hypomethylation, DNA copy number alterations, and CDK6 amplification in esophageal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res.** (印刷中)

Kanda S, Ohmori T, Taguchi A, Kudo K, Horiuchi T, Sato Y, Hino S, Suzuki Y, Sander M, Sugano S, Nakao M, and Nishinakamura R. Sall1 co-operates with Six2 to actively maintain nephron progenitors. **J. Am. Soc. Nephrol.** (印刷中)

Hino S, Nagaoka K, and Nakao M. Metabolism-epigenome crosstalk in physiology and diseases. **J. Hum. Genet.** (Reviews, Special Section on Epigenomics: biological understanding and clinical application) 58: 410-415, 2013.

2. 学会発表

中尾光善. エピジェネティクス機構によるエネルギー代謝調節と病態. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 (シンポジウム: 糖尿病とエピジェネティクス) 平成25年5月18日 (熊本市)

斉藤典子、松森はるか、オサマ・アブラダ・モハメド、藤原さおり、中尾光善. 核スペックルと核小体の形成機序と機能. 第86回日本生化学会大会 (シンポジウム: 細胞核内

構造体の構築原理と高次生命機能) 平成25年9月11日 (横浜市)

中尾光善. エピジェネティクス機構によるエネルギー代謝調節と病態. 第21回日本血管生物医学会学術集会 (シンポジウム: 細胞代謝が制御する動的恒常性と破綻~心血管疾患の制圧に向けて~) 平成25年9月27日 (大阪市)

中尾光善. エピジェネティクス機構によるエネルギー代謝調節と病態. 第34回日本肥満学会 (シンポジウム: 白色・褐色脂肪細胞研究の最前線) 平成25年10月11日 (東京)

斉藤典子、松森はるか、坂本智代美、中尾光善. 核スペックルの形成機序と遺伝子発現制御における機能. 第36回日本分子生物学会年会 (ワークショップ: クロマチンと核構造のインタープレーが織りなす生命現象) 平成25年12月5日 (神戸市)

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得 該当なし。
2. 実用新案登録 該当なし。
3. その他 特になし。

ニーマン・ピック病 C 型治療薬開発を目指した 病態モデル細胞・動物を用いた Non-GLP 非臨床研究

研究分担者 入江徹美 熊本大学生命科学研究部薬剤情報分析学分野 教授

研究要旨

ニーマン・ピック病 C 型(NPC)は、細胞内脂質代謝・転送系の破綻を呈する稀少難病であり、有効な治療法が確立していない。現在、人道的使用が認められている 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD) の至適投与条件および安全性に関する情報は極めて少ない。研究分担者らは、cyclodextrin 誘導体 (CDs) を基盤とした各種化合物から NPC 治療薬候補の探索、および臨床における NPC に対する HPBCD 療法の情報不足を補うことを目的とする創薬研究を実施中である。本報告では、NPC 患者由来 iPS 細胞を用いた NPC に対する各種化合物の有効性および安全性に関する評価系の構築に先立ち、既存の NPC 病態モデルに対する検討を行った。その結果、1) HPBCD の有効性には至適投与量が存在すること、2) CDs による細胞内コレステロール改善作用は各誘導体のコレステロール可溶化能と関連すること、3) HPBCD 投与による急性毒性および細胞・臓器傷害性の発現に、*Npc1* genotype が関係することが示唆され、今後の iPS 細胞を用いた評価系構築にあたり、重要な基礎的知見が得られた。

A.研究目的

ライソゾーム病の一種であるニーマン・ピック病 C 型 (NPC) は、細胞内脂質代謝・転送系の破綻を呈する稀少難病であり、未だ有効な治療薬・治療法が確立されておらず、新規治療薬の開発が切望されている。近年、2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD) を NPC 病態モデルマウスに投与すると、病状改善や延命に有効であること、また NPC 病態モデル細胞においては細胞内コレステロールの異常蓄積を改善することが報告された。これら基礎研究の成果をもとに、米国 FDA において HPBCD (静脈内投与及び髄腔内投与) の人道的使用を特認された。本邦においても 2009 年より佐賀大学医学部附属病院で HPBCD 療法が開始され、肝脾腫の縮小や脳波上の改善に一定の効果が得られたが、神経症状の改善には至っておらず、より有効な治療薬が切望されている。また、NPC に対する HPBCD 療法自体もこれまでに HPBCD 大量投与・長期投与がおこなわれた前例がないため、有効性および安全性に関する情報が極めて少ない。そこで研究分担者らは、cyclodextrin 誘導体 (CDs) を基盤とした各種化合物から NPC 治療薬候補の探索、および臨床における NPC に対する HPBCD 療法の情報不足を補うことを目的とした創薬・臨床研究を推進している。本研究では、iPS 細胞を用いた NPC に対する各種薬剤の有効性および安全性の評価系構築を目指し、その前段階として、既存の NPC 病態モデルに対する CDs 間の比較および HPBCD の有効性と安全性についての詳細な検討を行った。

物から NPC 治療薬候補の探索、および臨床における NPC に対する HPBCD 療法の情報不足を補うことを目的とした創薬・臨床研究を推進している。本研究では、iPS 細胞を用いた NPC に対する各種薬剤の有効性および安全性の評価系構築を目指し、その前段階として、既存の NPC 病態モデルに対する CDs 間の比較および HPBCD の有効性と安全性についての詳細な検討を行った。

B.研究方法

NPC 病態モデルである *Npc1* 遺伝子欠損 Chinese hamster ovary cells (*Npc1* KO CHO 細胞)および NPC モデルマウス (*Npc1*^{+/+} マウス) を用い、1) HPBCD の有効濃度および有効投与量の検討、2) 各種 CDs の有効性・安全性の比較検討、3) 高用量 HPBCD 療法の安全性評価を実施した。

C.研究結果

1) HPBCD の有効濃度および有効投与量の検討
Npc1 KO CHO 細胞で見られる NPC 病態に類似した遊離型コレステロールの異常蓄積およびエステ

ル型コレステロールの減少は、0.1mM 以上の HPBCD 添加により改善したが、その一方で HPBCD 添加濃度が 2mM 以上では、遊離型コレステロール・エステル型コレステロールバランスに対する改善効果が消失した。In vivo での検討において、*Npc1*⁺ マウスに HPBCD を 1000-4000 mg/kg、生後 4 週齢から一週間に 1 回皮下投与すると、生存期間が有意に延長し、投与直後の血清中 HPBCD 濃度は、1-2mM を推移した。

2) 各種 CDs の比較検討

HPBCD の置換度の影響を検討するため、細胞内コレステロールの異常蓄積および遊離型/エステル型コレステロールバランスの改善効果を比較したところ、HPBCD の 2-hydroxypropyl 基の平均置換度による効果の違いは見られなかった。次に、置換基の炭素数 (n) を、HPBCD (n=3)、2-hydroxyethyl- β -cyclodextrin (HEBCD) (n=2)、2-hydroxybutyl- β -cyclodextrin (HBBCD) (n=4) と変化させ、疎水性や界面活性を変化させた場合、同濃度条件下における細胞内コレステロール異常蓄積および遊離型/エステル型コレステロールバランスの改善効果は、HEBCD<HPBCD<HBBCD の順で増大した。ここで、今回検討を行った CDs の遊離型コレステロールに対する可溶化能は、HEBCD<HPBCD<HBBCD の順で増大し、NPC 細胞におけるコレステロールバランスの改善効果と対応した。

3) 高用量 HPBCD 療法の安全性評価

野生型 *Npc1*^{+/+} マウスにおいて、20000 mg/kg HPBCD (単回皮下投与) が、sub lethal dose であった。その一方で、意外なことに NPC 病態モデルである *Npc1*⁺ マウスでは、20000 mg/kg の HPBCD 単回皮下投与により生じる臓器傷害や死亡が認められず、HPBCD による毒性に対して抵抗性を示した (図 1)。また、NPC 病態モデル細胞を使用した検討においても同様の現象が確認された。

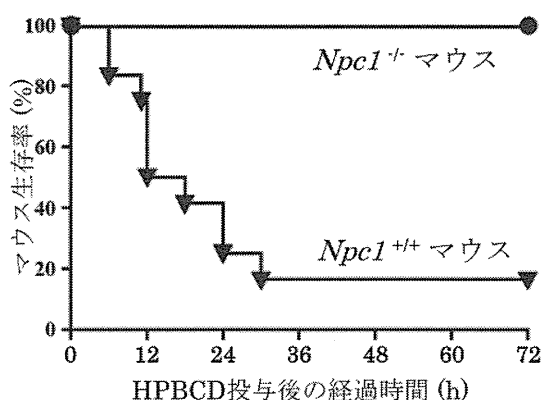


図 1 高用量 HPBCD 投与時の生存率の違い

D. 考察

In vitro 細胞培養系や病態モデル動物における有効性に関する検討より、HPBCD が有効性を発揮するためには、至適投与量が存在することが示唆された。

各種 CDs の NPC に対する効果の比較検討より、CDs による細胞内コレステロールバランス改善作用は、CDs の平均置換度よりも置換基の種類 (疎水性や界面活性など) の影響を受け、その効果は CDs のコレステロール可溶化能と関連した。

安全性に関する検討より、HPBCD 投与による急性毒性および細胞・臓器傷害性の発現に、*Npc1* genotype が影響を与えることが示唆され、今後 HPBCD の安全性評価を行う際に、*Npc1* genotype による違いを十分に考慮する必要性が示された。

E. 結論

本研究により、iPS 細胞を用いた評価系の構築に当たり、重要な基礎的知見が得られた。今後、iPS 細胞による評価系を用いて NPC 患者に対して、より安全かつ有効な治療戦略を確立するため、ヒトにおける最適な血中濃度範囲の検討、未だ解明されていない HPBCD の作用メカニズムの解明、有用な治療薬候補の探索を実施していく予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

Matsuo M, Irie T, Ohno K et al.
Effects of cyclodextrin in two patients with Niemann-Pick Type C disease, *Mol. Genet. Metab.*, 2013, 108(1),76-81.

Tanaka Y and Ishitsuka Y, Irie T et al.
Influence of Npc1 genotype on the toxicity of hydroxypropyl- β -cyclodextrin, a potentially therapeutic agent, in Niemann-Pick Type C disease models, *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 2014, 19-30

2. 学会発表

- 入江徹美:環状オリゴ糖シクロデキストリンによる Niemann-Pick 病 TypeC (NPC) における脂質代謝・転送破綻の修復, 第 27 回熊本県産学官技術交流会(2013 年 1 月 17 日)、熊本、熊本県産業技術センター
- 入江徹美:コレステロールの細胞内輸送機構の破綻とその修復～環状オリゴ糖シクロデキストリンを用いたニーマン・ピック病 C 型の治療戦略～、武庫川女子大学バイオサイエンス研究所公開セミナー(2013 年 1 月 22 日)、大阪、武庫川女子大学浜甲子園キャンパス
- 入江徹美:ニーマン・ピック病 C 型治療の最適化のための rTR、日本学術会議・日本薬学会主催シンポジウム「リバーストランスレーショナルリサーチ (rTR)」(2013 年 5 月 30 日)、東京、慶應義塾大学 芝共立キャンパス
- 入江徹美:シクロデキストリン:医薬品の脇役から主役へのパラダイムシフト～ニーマン・ピック病タイプ C 治療最適化のためのリバーストランスレーショナル・リサーチ～、平成 25 年度大学院生合宿研修(2013 年 7 月 19 日～22 日)、大分、九州地区国立大学九重共同研修所
- 田中雄太、石塚洋一、山田侑世、田口真紀子、白石広葵、武氏志保里、廣瀬優美子、竹尾 透、中瀧直己、東 大志、本山敬一、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、大野耕策、入江徹美:Niemann-Pick 病 C 型治療薬 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin の病態モデルにおける安全性評価、第 30 回シクロデキストリンシンポジウム(2013 年 9 月 13 日)、熊本、熊本パレア (ポスター受賞)
- 岡田安代、谷田部紗矢香、鶴賀千夏、西川淳一、市川 厚、徳丸博子、石塚洋一、東 大志、本山敬一、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、大野耕策、入江徹美:Niemann-Pick 病 Type C の病態モデル、Npc1 欠損細胞に対する 6-O- α -maltosyl- β -cyclodextrin の影響、第 30 回シクロデキストリンシンポジウム(2013 年 9 月 13 日)、熊本、熊本パレア
- 曾我美南、房木ノエミ、濱崎 誠、米田香織、中村公俊、松尾宗明、入江徹美、遠藤文夫、江良拓実:ニーマンピック病 C 型由来 iPSC 細胞を使った疾患モデル作製とシクロデキストリン治療効果解析、第 30 回シクロデキストリンシンポジウム(2013 年 9 月 13 日)、熊本、熊本パレア
- 入江徹美:環状オリゴ糖を用いた細胞内コレステロール転送システム破綻の修復～ニーマン・ピック病 C 型治療への臨床応用～、第 7 回多糖の未来フォーラム(2013 年 11 月 1 日)、大阪、大阪府立大学 I-site なんば
- 田中雄太、山田侑世、徳丸博子、白石広葵、内尾有史朗、近藤悠希、石塚洋一、竹尾 透、中瀧直己、東 大志、本山敬一、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、大野耕策、入江徹美: Niemann-Pick 病 C 型治療薬 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin の安全性、有効性に関する Translational Research、第 66 回日本薬理学会西南部会(2013 年 11 月 16 日)、福岡、福岡大学薬学部 (優秀発表賞)
- 山中悠子、田中雄太、入江徹美 他: Niemann-Pick 病 C 型病態モデルにおける 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin の安全性評価第 30 回日本薬学会九州支部大会(2013 年 12 月 8-9 日)、長崎、長崎大学薬学部
- 入江徹美:脂質認識能を有する環状オリゴ糖シクロデキストリンによるニーマン・ピック病 C 型患児の病状改善、第 2 回日本シャペロン療法研究会 臨床研究に向けて(2013 年 12 月 14 日)、東京、ホテルグランドヒル市ヶ谷

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1.特許取得

コレステロール蓄積疾患治療薬、およびそのスクリーニング方法

「特許発明者」: 江良拓実、入江徹美

「特許出願人」: 国立大学法人熊本大学

「特許出願日」: 平成 25 年 12 月 5 日

「特許出願番号」: 特願 2013-252174

健常人およびニーマンピック C 型患者由来の iPS および それらの分化肝様細胞の総合グライコミクスの比較解析

研究分担者 篠原康郎 北海道大学大学院先端生命 特任教授
古川潤一 北海道大学大学院先端生命 特任助教

研究要旨

健常人およびニーマンピック C 型患者由来の iPS およびそれらの分化肝様細胞にそれぞれ特徴的な分子マーカーを探索するために、細胞に発現する主要な複合糖質糖鎖の網羅的な発現解析（総合グライコミクス）を行った。本解析により、総計 200 種類を超える N-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖、遊離オリゴ糖（FOS）、スフィンゴ糖脂質（GSL）糖鎖、グリコサミノグリカン 2 糖（ヘパラン硫酸、コンドロイチン/デルマトン硫酸、ヒアルロン酸）の定量的解析に成功した。比較解析の結果、疾患の有無に関わらず、iPS 細胞の糖鎖プロファイルは非常によく似ていること、分化肝様細胞では、疾患に依存して、種々の発現動態の変動が認められることを示唆する結果が得られた。

A.研究目的

疾患 iPS および分化した標的細胞の複合糖質を網羅的に解析し、疾患による異常を明らかにする。

B.研究方法

熊本大学江良研究室から供与された健常者（2名）、ニーマンピック病 C 型患者（2名各 2 クローン）由来の iPS 細胞、およびそれぞれから分化させた肝様細胞について、分担者らが確立した方法論（*PNAS*, 110, 2105- 2110, 2013）により、N-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖、スフィンゴ糖脂質（GSL）糖鎖、グリコサミノグリカン（GAG）2 糖、遊離オリゴ糖の網羅的な定量解析を行った。検出された約 200 種類の糖鎖の絶対定量値（タンパク質 100 μ g 当たりの pmol）を用いて細胞間の相関、比較分析を行った

（倫理面への配慮）

該当なし

C.研究結果

本解析により、N-glycan 119 種、FOS 10 種、

O-glycan 17 種、GSL 56 種、GAG2 糖 16 種、総計 218 種類の糖鎖を定量的に解析することに成功した。各クラスの糖鎖ごとに、健常人由来 iPS (N_iPS), NPC 患者由来 iPS (NPC_iPS), 健常人由来 iPS から分化した肝様細胞 (N_HLC), 患者由来 iPS から分化した肝様細胞 (NPC_HLC) の各群間の相関係数を算出した結果を表 1 に示した。この結果から以下のことが示唆された。

- 1) 同種の細胞では、iPS の場合は糖鎖の種類に関わらず相関係数は高く ($r > 0.987$)、ばらつきも小さい ($SD < 0.02$)。すなわち、由来が健常人または NPC 患者に関わらず、iPS の糖鎖プロファイルはよく似ている。しかし、HLC の場合は、相関係数は iPS より低く、特に NPC_HLC で低かった (表 1 の ■ 部分)。すなわち、iPS から分化させた HLC は、iPS よりも糖鎖プロファイリングの観点からはばらつきが大きく、特に患者由来の HLC ではその傾向が顕著である。
- 2) iPS と分化肝様細胞を比較したとき、健常および NPC 患者由来に関わらず、糖鎖プロファ