

イルは大きく変化した。特に変化したのは、N-glycan ($r=0.497\sim0.546$), GSL ($r=0.679\sim0.697$) および O-glycan ($r=0.668\sim0.739$)であった (表1の 部分)。これらの糖鎖では、肝様細胞への分化に伴い、糖鎖プロファイルは劇的に変化することが示された。

3) 健常人と NPC 患者を比較した場合、iPS は由来に関わらずどの糖鎖も相互によく似ていた ($r>0.964$, $SD<0.02$)。しかし、HLC では、両者間の差が大きくなる傾向があり、特に N, GSL で顕著であった (0.806 ± 0.12 , 0.771 ± 0.10) (表1の 部分)。このことは分化肝様細胞において疾患特異的な糖鎖を見いださせる可能性が高いことを示唆している。

N-glycan	N_iPS	NPC_iPS	N_HLC	NPC_HLC
N_iPS	0.999 ± 0.00	0.979 ± 0.02	0.497 ± 0.17	0.511 ± 0.17
NPC_iPS		0.987 ± 0.02	0.538 ± 0.16	0.546 ± 0.16
N_HLC			0.918 ± 0.14	0.806 ± 0.12
NPC_HLC				0.861 ± 0.17

FOS	N_iPS	NPC_iPS	N_HLC	NPC_HLC
N_iPS	1.000 ± 0.00	0.998 ± 0.00	0.922 ± 0.09	0.925 ± 0.07
NPC_iPS		0.999 ± 0.00	0.882 ± 0.10	0.919 ± 0.05
N_HLC			0.979 ± 0.04	0.966 ± 0.03
NPC_HLC				0.995 ± 0.01

O-glycan	N_iPS	NPC_iPS	N_HLC	NPC_HLC
N_iPS	0.994 ± 0.01	0.964 ± 0.02	0.668 ± 0.17	0.736 ± 0.19
NPC_iPS		0.987 ± 0.01	0.646 ± 0.07	0.739 ± 0.08
N_HLC			0.983 ± 0.03	0.897 ± 0.04
NPC_HLC				0.962 ± 0.05

GSL	N_iPS	NPC_iPS	N_HLC	NPC_HLC
N_iPS	0.988 ± 0.02	0.960 ± 0.02	0.679 ± 0.02	0.698 ± 0.18
NPC_iPS		0.984 ± 0.02	0.722 ± 0.15	0.697 ± 0.15
N_HLC			0.942 ± 0.10	0.771 ± 0.10
NPC_HLC				0.822 ± 0.22

GAG	N_iPS	NPC_iPS	N_HLC	NPC_HLC
N_iPS	0.993 ± 0.01	0.983 ± 0.01	0.908 ± 0.03	0.902 ± 0.03
NPC_iPS		0.991 ± 0.01	0.938 ± 0.03	0.931 ± 0.02
N_HLC			0.996 ± 0.01	0.979 ± 0.01
NPC_HLC				0.991 ± 0.01

凡例	N_iPS	NPC_iPS	N_HLC	NPC_HLC
N_iPS	同種の細胞	NとNPCの比較	iPSとHLCの比較	
NPC_iPS		同種の細胞		iPSとHLCの比較
N_HLC			同種の細胞	NとNPCの比較
NPC_HLC				同種の細胞

表 1 各種細胞間の糖鎖発現プロファイルに基づく類似度の比較。数値は相関係数(r) \pm SD。健常人(N)は各2例(2個体、各1クローン)、NPCは各4例(2個体、各2クローン)。

また、各クラスの糖鎖の総量を各種細胞間で比較した結果を図1に示した。この実験結果から以下のことが示唆された。

- 1) 健常人(N), NPC患者由来のiPS細胞の各クラスの糖鎖の総量は、GAGではなぜか細胞間で大きくばらついたので除き、他のクラスの糖鎖では細胞間で比較的一定であった (図1A)。
- 2) 健常人(N), NPC患者由来のiPSから分化させた肝様細胞の各クラスの糖鎖の総量は、GSLおよびFOSについて、患者由来の方が健常人由来のものよりも増大する傾向を認めた (図1B)。

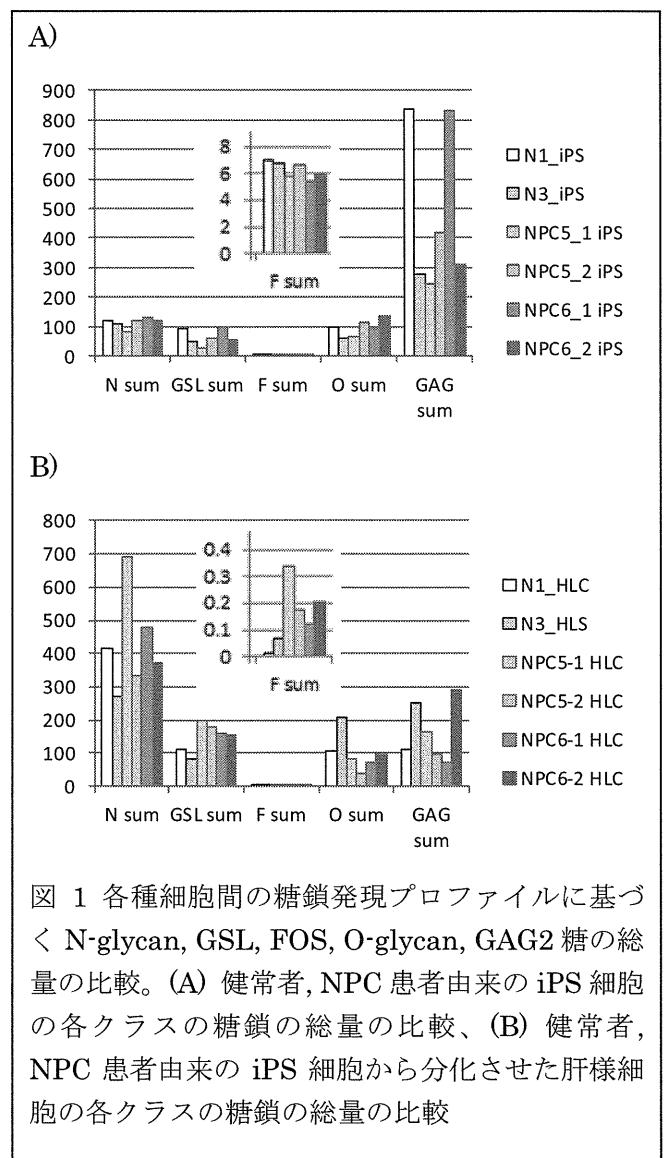


図 1 各種細胞間の糖鎖発現プロファイルに基づく N-glycan, GSL, FOS, O-glycan, GAG2 糖の総量の比較。(A) 健常人, NPC 患者由来の iPS 細胞の各クラスの糖鎖の総量の比較、(B) 健常人, NPC 患者由来の iPS 細胞から分化させた肝様細胞の各クラスの糖鎖の総量の比較

表1および図1に示した実験結果は、疾患(NPC)の有無にかかわらず、作製したiPSの糖鎖プロファイルはよく類似していたのに対し、両

者から分化させた肝様細胞では健常者由来か患者由来化に依存して糖鎖発現プロファイルに差が認められた。これは、NPC 患者由来の iPS が病態を反映する表現型を示していないこと、肝様細胞に分化したときには、患者由来のものにコレステロール蓄積などの NPC に特徴的な表現型を示したことを考えれば妥当な結果と考えられる。

GSL の発現量の増大の詳細なメカニズムは現時点では不明だが、細胞表面のラフトはスフィンゴミエリン、GSL、コレステロールの 3 者で巧妙にバランスをとって構成されていることから、NPC におけるコレステロールの蓄積が GSL の発現に影響を与えたものと考えられる。グルコシルセラミド合成酵素阻害薬であるミグルスタットは、もともとゴーシェ病などのスフィンゴ脂質蓄積症の治療薬として開発されたが、最近になって NPC による進行性神経症状の治療薬としても承認されている。

NPC 患者由来の iPS から分化させた肝様細胞で FOS が増大傾向を示した分子メカニズムは現段階で不明であるが、哺乳類細胞の FOS の解析例自体が過去にほとんど例がないため、NPC と正常細胞を区別する指標として今後の研究展開に興味を持たれる。

本結果は、疾患 iPS を用いた初めての総合的なグライコムイクスの研究成果であり、本アプローチがマーカー探索の有用なアプローチとなることを示唆している。今後、個々のクラスの個々の糖鎖の発現動態の変動を詳細に解析することによって、疾患特異的なマーカーの探索を進めていく予定である。

G.研究発表

2.論文発表

特記なし

2.学会発表

特記なし

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得

特記なし

2.実用新案登録

特記なし

3.その他

特記なし

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 房木ノエミ 慶應義塾大学 医学部 眼科学教室 特任准教授

研究要旨

研究分担者は、非組込型 RNA ウイルスベクターであるセンダイウイルスベクターに初期化 4 因子 KLF4, OCT4, SOX2 および c-MYC を搭載し、これらを用いて、ヒト線維芽細胞や血球細胞から効率よく外来遺伝子フリー iPS 細胞を樹立する方法を開発してきた。また温度感受性新型ベクターにより、より高効率にウイルス由来遺伝子が除去出来るように誘導系の改善を行ってきた。本ベクターは、疾患 iPS 細胞樹立にもよりよいツールとして貢献している。今回、本ベクターを用いて今まで報告の少ない難治性眼科領域疾患 iPS 細胞樹立を試みた。また国内共同研究では、以前の厚生労働科学研究費補助金を用いて樹立した家族性アミロイドーポリニューロパチー(FAP)患者由来 iPS 細胞を用い、疾患の再現に関する論文を発表した。海外との共同研究では、頭蓋骨幹端異形成症疾患 iPS 細胞を樹立し、疾患の再現と解析を行い、また後期発症疾患の再現を目的として、早老症の原因遺伝子(progerin)を細胞に導入することにより、樹立した iPS 細胞から早期にパーキンソン病モデルを構築することが可能になった。これらの研究技術は国内疾患研究を加速するものである。

A.研究目的

難治性疾患の生体試料は、希少性が高く有限であり、要求に応じて幅広く供給することは困難な部分が多い。そこで、この問題点を克服するために、難治性疾患由来の人工多能性幹細胞(iPS 細胞)の委託作製と作製した iPS 細胞のバンク化と薬剤開発に向けての基盤研究を行っている。本研究の特徴は、国内で開発された最新のセンダイウイルス(SeV)ベクターを用いることで、遺伝的背景が均一で外来因子フリーの iPS 細胞が簡便に、かつ、最も効率よく樹立され、従来法のもつ外来因子の遺伝子挿入という欠点を無くした画期的な方法であるという点である。本研究の公共性を鑑み、各方面からの要請により昨年、SeV ベクターの特許権を所有するディナベック社は樹立 iPS 細胞に対する権利を放棄している。本研究分担者は、本年度は各種難治性疾患の情報収集および、難治性眼科疾患細胞由来 iPS 細胞作製の準備を行った。また国内外との共同研究を行い、各種疾患 iPS 細

胞の樹立と疾患の再現、Late onset の疾患を、早老症遺伝子を導入することで早期に再現することに成功した。これらの技術はこれからの疾患 iPS 細胞研究を加速化に役立つものである。

B.研究方法

血液、皮膚組織、あるいは頬粘膜組織から、4 因子(OCT4, KLF4, SOX2, c-MYC) 搭載 SeV ベクターを用いて iPS 細胞を樹立する。ベクターは MBL より購入し、P2 にて樹立を行う。樹立方法は房木らによる既報の通り(PNAS, 2011)。樹立された疾患特異的 iPS 細胞については、iPS 細胞としての品質管理、発症機構解析の見地より、以下の解析を行う。

- ① 外来遺伝子フリーの確認:iPS 細胞樹立に用いた、染色体非組込型 SeV ベクターの残存の有無を、RT-PCR もしくは抗 SeV 抗体による免疫染色にて確認を行う。
- ② 発現プロファイル解析: 樹立した iPS 細胞株

の万能性、分可能の検討のため、PCR、マイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを解析する。

③ メチル化プロファイル解析：樹立した iPS 細胞株のエピジェネティックな状態の検討のため、Bisulfate PCR 等を用いてメチル化プロファイルを解析する。

④ 疾患関連遺伝子の解析：原因遺伝子の変異が同定されている患者に対して、樹立された iPS 細胞が同じ変異を有していることを確認する。

⑤ iPS 細胞の分化誘導と解析：樹立した iPS 細胞株を試験管内で分化誘導や免疫不全マウスへの移植実験を行い、生理学的、病理学的、細胞生物学的特性を解析する。

(倫理面への配慮)

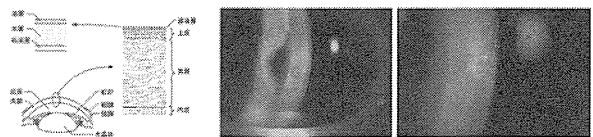
慶應義塾大学にて行われる疾患 iPS 細胞作製に関しては、慶應義塾大学医学部の倫理委員会を通し、倫理的に問題のないことを確認した。患者から採取された体組織試料と患者の家族歴・臨床所見・検査所見に関する情報は連結可能匿名化し管理する。個人情報管理者は各患者に対して連結可能な匿名コードを当て、患者名と匿名コードの対照表を施錠可能な保管場所に保管する。実施責任者および分担研究者は、患者より採取した組織・iPS 細胞株・患者の臨床所見・検査所見を上記の匿名コードを用いて使用・保存する。

C. 研究結果

Fuchs 角膜内皮変性症 (FCD: Fuchs corneal dystrophy) は常染色体優性遺伝形式をもち、滴状角膜 (guttata cornea) という特徴的所見を伴い、原発性に角膜内皮が障害され、進行性に内皮細胞数の減少をきたす角膜内皮ジストロフィの一つである。多くの FCD は成人後 (多くは 50 代~70 代) で発症する late-onset FCD だが、10 歳未満からすでに滴状角膜が発症する early-onset FCD の家系もあり、early-onset FCD に関しては 8 型コラーゲン遺伝子異常が原因であることがわかっている。また、一部の late-onset FCD では、SLC4A11 遺伝子異常等が指摘されている。他の多くの late-onset FCD の原因遺伝子として最も有力なのは TCF4 である。TCF4 の SNPs

(single-nucleotide polymorphism) が FCD と関連している。角膜内皮のストレスや障害が加わった時に、TCF4 の異常のため創傷治癒機転がきちんと機能しないと考えられている。きっかけとなる角膜内皮のストレスや障害に関しては、活性酸素説や異常タンパク蓄積による小胞体ストレス説が有力であるが、いまだに病態の詳細な解明はなされていない。進行した FCD は水疱性角膜症を生じ視力が著しく低下する (図 1)。

眼科疾患 フックス角膜内皮変性症



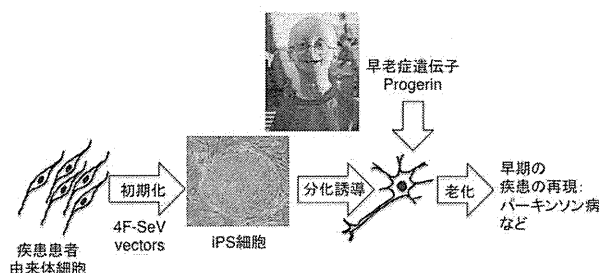
水疱性角膜症：角膜内皮細胞が減少しポンプ機能が低下することから、実質に水が溜まり角膜がむくむ。

現在のところ視力の回復のためには角膜移植以外に方法がなく、薬物療法等の保存的治療は開発されていない。従って FCD の病因解明、治療法開発のためには、患者自身の病的角膜内皮組織を用いた研究が最も望ましい。本年度は、患者血液から iPS 細胞を作るため、患者血液から遺伝子変異を解析し、同時に iPS 細胞を作製する準備を整えている。本学倫理委員会は、すでに通過し、DNA 解析を進めている。

また、以前の厚労科研費にて作製した、FAP 患者由来 iPS 細胞株を熊本大学と共同で解析を行い、疾患の再現に成功している (文献 1)。主な海外との共同研究では、SeV ベクターを提供し、頭蓋骨幹端異形成症疾患 iPS 細胞を樹立し、疾患の再現と解析を行った (文献 3)。また、Late onset の疾患を再現するため、iPS 細胞を誘導後、早老症：Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) の原因遺伝子 (Progerin) を導入し、早期にパーキンソン病モデルを構築することに成功している

(文献 2)。早老症では、核膜タンパク lamin A 遺伝子 LMNA の変異により、short form の Progerin が核膜に蓄積し、lamin A の scaffolding 機能が損なわれ、結果的に核の機能を阻害し細胞分裂や telomere の維持を阻害し、老化が促進される。同論文では、Progerin の他、細胞の老化 (加齢) マーカーを計測し、加齢マーカーが初期化により消失すること、それを分化させても加齢マーカー

が現れないこと（初期化による細胞の若返り）、しかし Progerin を過剰発現することで、老化を再現できるとしている（図2）。



D. 考察

このように、非組込型 RNA ベクターを用いて iPS 細胞を作製すると、高効率に疾患 iPS 細胞を樹立することが可能になり、疾患の再現と今後のスクリーニングに極めて有用なツールとなりうる。また早老症原因遺伝子 Progerin を導入すれば Late-onset の疾患再現を早期に実現することが可能であり、疾患研究を加速する。

E. 結論

非組込型 RNA ベクターである SeV ベクターを用いて、高効率に各種疾患 iPS 細胞を樹立し、疾患の再現に成功した。また Late onset の病態再現に早老症原因遺伝子 Progerin が有用であることを示した。今後はこれら細胞を用いて治療用薬剤スクリーニングを行いたいと考えている。

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

1. Generation of familial amyloidotic polyneuropathy-specific induced pluripotent stem cells. Isono K., et al. Stem Cell Research, 12(2), 574-583, 2014.
2. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. Miller JD., et al. Cell Stem Cell, 13(6), 691-705, 2013
3. Induced pluripotent stem cell reprogramming by integration-free Sendai

virus vectors from peripheral blood of patients with craniometaphyseal dysplasia. Chen IP., et al. Cell Reprogram., 15(6), 503-513, 2013.

4. Effect of in vivo administration of reprogramming factors in the mouse liver. Tomokuni A., et al. Oncol. Lett., 6(2) 323-328, 2013.

5. Blood cell-derived induced pluripotent stem cells free of reprogramming factors generated by Sendai viral vectors. Ye, L., et al. Stem Cells Transl Med. 2(8), 558-566, 2013.

2. 学会発表

・ Reprogramming exhausted tumor-infiltrating lymphocytes by Sendai viral vectors. H. Saito, K. Okita, N. Fusaki, A. Cheng and F. Ito. 2013 NYSCF Conference, NY, USA.

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 無

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 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

研究要旨

先天代謝異常症は希少難病に分類される。希少難病においては、その発症頻度、母集団が極めて少なく、同時に希少難病を専門とする医師、研究者が少ないことから十分な基礎研究、病態研究が遅延してきた。このような状況は、治療方法の開発が行われにくいという状況を長く続ける要因となってきた。このような状況を鑑み、本研究では希少難病患者から採取した生体サンプルを用いて疾患特異的 iPS 細胞を作成し、ライブラリー化することで、希少難病研究の研究材料の供給源となるとともに、それを用いて疾患病態を解明し、薬剤のスクリーニングシステムの基盤を作成することを目的として実施した。分担研究者である熊本大学小児科では、特に小児の先天代謝異常症の専門であり、外来患者から説明と同意の上、定期的に生体サンプルを採取・提供をおこなった。本年度は、メチルマロン酸血症2例(Mut0, Mut-)、メープルシロップ尿症1例、軟骨異常栄養症2例(重症型、軽症型)、シトリン欠損症1例がライブラリーに追加された。さらに、当研究室では先天代謝異常症の中でも比較的頻度が高く、致死性で治療薬が全く開発されていないメチルマロン酸血症患者から得られた iPS 細胞を用いて疾患の病態解明および治療薬の開発を試みた。

A.研究目的

希少難病のなかでも特に小児の希少難病に関する病態研究および治療薬開発は長い間、進んでこなかった。その大きな要因の一つが、患者数が少ないことに起因する生体サンプルの不足である。本研究室は、先天異常・先天性代謝異常症の国内の中心的役割を担ってきた施設であり、国内有数の患者数を誇っている（先天代謝異常学会調査：非公開情報）。そのため、本分担研究者らは当院の外来患者を対象に、希少難病の生体サンプル（皮膚繊維芽細胞および末梢血単核球）を採取し、研究代表者（江良教授）と共同して iPS 細胞のライブラリー作成を行う。また、この疾患特異的 iPS 細胞を用いて、病態の解明と薬剤のスクリーニングシステムの基盤の構築を目指す。

B.研究方法

1. 生体サンプルの収集

場所は熊本大学医学部附属病院の外来もしくは病棟とした。主治医および分担研究者である松本が同席の上説明を行った。患者は、小児であるため同意書

は両親からえた。採取は、末梢血単核球の場合は、日常診療に用いられる採血機材および手技を用いた。採取されたサンプルは単核球分離ののちに研究代表者である江良教室へ搬送した。皮膚生検は、まず皮膚採取予定部位に局所麻酔を行い、十分麻酔が効いたことを確認して、5mmx5mm の皮膚を剥離し、採取した。採取されたサンプルは小児科培養室にて培養を行い、研究代表者である江良教室へ搬送した。

2. メチルマロン酸血症の病態解明

①ラット神経細胞を用いた毒性試験

セボフルレン麻酔下で胎仔を取り出し大脳を取り出した。大脳半球を間脳から分離し、髄膜も丁寧に除去し、0.5%トリプシンHBS Sにて37度30分攪拌分離した。フィルターをかけて、96well dish (poly L リジンコート)へ1x10⁴cell/wellの割合で播種した。神経培地に懸濁して、5%CO₂ 37度で2日間培養した。初回培地交換時に5-FU 5 μg/ml添加した。10日目に毒性試験を実施

MMAを添加し、24時間後に目視(トリパンプル)およびWST-8により吸光度測定した。

②患者皮膚を用いたアミノ酸毒性試験

繊維芽細胞を前培養した。80%コンフルエントの状態では1x10³cell/wellの割合で、96well collagen coated dishへ播種した。ブランクには培地のみを加えた。5%CO₂インキュベータにて24時間前培養した。20倍濃度のMMA前駆アミノ酸物質を加えた。24時間、48時間後、72時間後の吸光度を測定した。

③患者皮膚を用いたメチルマロン酸毒性試験

患者由来繊維芽細胞を前培養した。80%コンフルエントの状態では5x10³cell/wellの割合で、96well collagen coated dishへ播種した。ブランクには培地のみを加えた。5%CO₂インキュベータにて24時間前培養した。種々の濃度(0.1mM, 1mM, 2.5mM, 5mM, 10mM, 20mM)のMMAを培地に加えた。24時間後の吸光度を測定する。

④患者皮膚繊維芽細胞を用いた薬剤スクリーニングのための評価系の確立

患者由来繊維芽細胞を前培養した。80%コンフルエントの状態では5x10³cell/wellの割合で、96well collagen coated dishへ播種した。ブランクには培地のみを加えた。5%CO₂インキュベータにて24時間前培養した。前培養開始24時間後に候補薬剤を種々の濃度で添加した。

(倫理面への配慮)

本研究は、熊本大学倫理委員会の承認を得ている。また、各患者家族もしくは本人より倫理委員会の許可を得た同意書を用いて同意を得たうえで情報の収集と生体サンプルの採取を行った。

本研究のために特別に用意した番号を用いた。具体的には、採取された生体サンプルおよび疾患特異的iPS細胞はデジタルIDとパスワードを必要とするオートロック式の研究室内部に保管・管理した。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と申請者らで管理し、連結可能な暗号化処理を行った。一般の立ち入りは禁止されており、iPS細胞から個人の特定の情報につながることはない。本研究では、iPS細胞の解析中に必要に応じて患者のゲノム情報を取り扱っている。ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守して研究を行なっている。得られた情報は、インターネットに接続しないコンピューターにて管理を行い、ID登録した個人しかコンピューターを起動できない処置を行なっている。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は公表されない。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。細胞バンクからの提供についてはゲノム指針に準じて行っている。

C.研究結果

1. 生体サンプル採取結果

H25年度は、

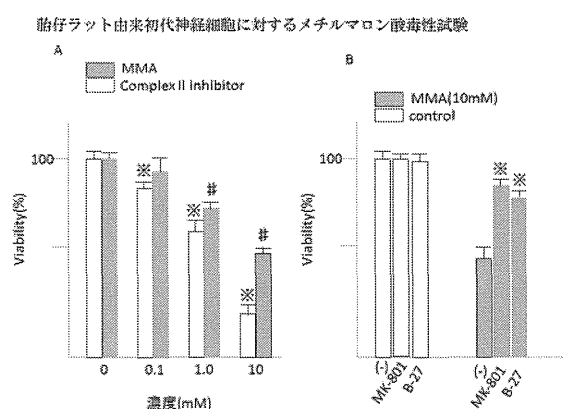
- ・メチルマロン酸血症2例(Mut0, Mut-)
- ・メープルシロップ尿症1例
- ・軟骨異栄養症2例(重症型、軽症型)、
- ・シトリン欠損症1例

を採取した。

2. 病態解明研究結果

①ラット神経細胞を用いた毒性試験

神経細胞は、添加されたメチルマロン酸の濃度に比例して細胞数が減少した(次ページ図1A;生存率:メチルマロン酸濃度0mM 100%, 0.1mM 82%, 1.0mM 67%, 10mM 27%)。次ページ図B;引き続き、メチルマロン酸を10mM濃度で添加した培養液中にMK-801およびB27添加溶液を添加し、生存率を比較した。その結果、MK-801で83%, B27添加により76%の生存率が得られ、非添加群27%と比較して、有意に改善した(p<0.01)。



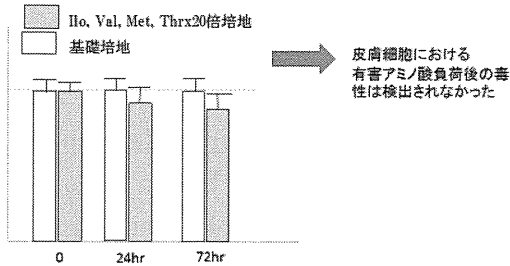
②患者皮膚を用いたアミノ酸毒性試験

患者皮膚繊維芽細胞にメチルマロニル CoA mutaseの基質アミノ酸であるイソロイシン、バリン、メチオニン、スレオニンを20倍濃度となるように添加し、72時間後まで細胞数を測定した。その結果、皮膚繊維芽細胞に対するアミノ酸毒性は認めなかった。

2. MMA 患者皮膚を用いた毒性試験

A 方法：薬物スクリーニングに適した条件の検証

- ・ 繊維芽細胞を前培養する。
- ・ 80%コンフルエントの状態での10⁶cells/wellの割合で、80well collagen coated dishへ移植する。
- ・ プラシコには培地のみ加える。
- ・ 5%CO₂インキュベーターにて24時間前培養する。
- ・ 種々の濃度のMMA初期アミノ酸物質を加える。
- ・ 24時間、48時間後、72時間後の吸光度を測定する。

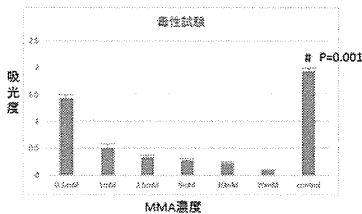


③患者皮膚を用いたメチルマロン酸毒性試験

メチルマロン酸は培養液に添加した濃度に比例して細胞障害を示した。

B 方法：薬物スクリーニングに適した条件の検証

- ・ 患者由来繊維芽細胞を前培養する。
- ・ 80%コンフルエントの状態での10⁶cells/wellの割合で、80well collagen coated dishへ移植する。
- ・ プラシコには培地のみ加える。
- ・ 5%CO₂インキュベーターにて24時間前培養する。
- ・ 種々の濃度のMMAを添加する。
- ・ 24時間後の吸光度を測定する。



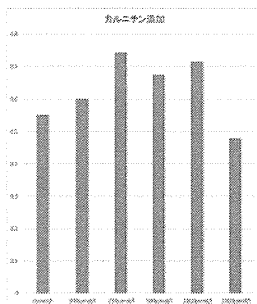
スクリーニングでは分散が小さい10mMの濃度を採用した。

④患者皮膚繊維芽細胞を用いた薬剤スクリーニングのための評価系の確立

培養液には 10mM の濃度のメチルマロン酸を添加し、その障害性が抑制される系の確立を目指した。候補薬剤の一つであるカルニチンを用いた。その結果、カルニチン濃度 250-1000 μmol/l 濃度で、毒性軽減効果が認められたが、正常コントロールと比較して、完全には毒性を排除できてはいなかった。2000 μmol/l 濃度では細胞毒性が認められた。

C

- ・ 患者由来繊維芽細胞を前培養する。
- ・ 80%コンフルエントの状態での10⁶cells/wellの割合で、80well collagen coated dishへ移植する。
- ・ プラシコには培地のみ加える。
- ・ 5%CO₂インキュベーターにて24時間前培養する。
- ・ 全培養液に24時間後に候補薬剤を種々の濃度で添加する。
- ・ 24時間後の吸光度を測定する。



1. 2000μmol/l濃度カルニチンは細胞毒性を示した。
2. 250-1000μmol/l濃度では、MMAの細胞毒性抑制効果が傾向として認められた。
3. 正常コントロール 吸光度平均2.102と比較すると完全に毒性を排除はできなかった。

D. 考察

メチルマロン酸血症は、イソロイシン、バリン、メチオニン、スレオニンの代謝経路にあるメチルマロニル CoA mutase の機能異常により、主に肝臓と筋肉でメチルマロン酸が産生され、これにより全身の臓器に障害をきたす疾患である。細胞内で産生されたメチルマロン酸が細胞機能障害（主にミトコンドリア内の酵素障害）を引き起こすため、多臓器に障害を与えると考えられているが明確に証明したものは無い。メチルマロン酸血症の結血中濃度を下げる試みがされており、肝臓移植、腎臓移植、透析などの治療が試みられているが、血中濃度が正確に組織障害を反映しているかどうかも定かではない。まず、重要臓器である神経細胞であるが、結果2-①ではメチルマロン酸がラットの神経細胞に濃度依存性に障害を及ぼし、さらに神経保護作用のある薬剤により毒性が軽減された。メチルマロン酸血症の患者では、上記の治療により血中濃度が下がった場合でも、髄液中メチルマロン酸が高い値を示し、神経障害が増悪する例が報告されており、神経細胞を用いたメチルマロン酸毒性を軽減する作用を有する薬物のスクリーニング系として有効である可能性が示唆された。現在、患者由来 iPS 細胞から神経細胞を誘導し、毒性試験を試みている。

また、一般的には基質アミノ酸負荷が増悪因子として考えられており、基質アミノ酸を20倍濃度とした場合の毒性を調べた。その結果、皮膚繊維芽細胞に対しては、基質アミノ酸の負荷による毒性は認めなかった。患者にとって、どの程度のアミノ酸負荷が必要であるのかは定まっておらず、アミノ酸毒性試験は重要であり、現在、iPS 細胞を用いて肝臓、神経に誘導し、重要標的臓器における基質アミノ酸毒性試験を行っている。

また、薬剤スクリーニング系の確立については、皮膚繊維芽細胞を用いて、10mM のメチルマロン酸を添加した培地を用いた系が発作期の患者血中濃度に相当するため、これを用いることとした。現在、評価系として用いるための精度・感度評価を実施している。

E. 結論

メチルマロン酸血症患者における病態解析を行った。皮膚繊維芽細胞に対する基質アミノ酸毒性

の有無を調べたが、皮膚繊維芽細胞に対して基質アミノ酸は毒性を示さなかった。次に、メチルマロン酸自体が細胞毒性を示すか否かを調べた。その結果、皮膚繊維芽細胞およびラット由来神経細胞に対して、濃度依存性に細胞障害を示した。本研究結果は、メチルマロン酸の毒性を減弱する薬剤のスクリーニングに有効である可能性を示唆した。

また、新たにメチルマロン酸血症2例(Mut0, Mut-)、メープルシロップ尿症1例、軟骨異栄養症2例(重症型、軽症型)、シトリン欠損症1例の生体サンプルがライブラリーに追加された。

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

1. Akiko Yamamoto, Kimitoshi Nakamura, Shirou Matsumoto, Masanori Iwai, Yosuke Shigematsu, Go Tajima, Miyuki Tsumura, Satoshi Okada, Hiroshi Mitsubuchi¹ and Fumio Endo. VLCAD deficiency in a patient who recovered from ventricular fibrillation, but died suddenly of a respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics International* 2013 Dec; 55(6):775-8.

2. Kido J, Nakamura K, Matsumoto S, Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R, Endo F. Current status of hepatic glycogen storage disease in Japan: clinical manifestations, treatments and long-term outcomes. *J Hum Genet.* 2013 May;58(5):285-92.

2. 学会発表

1) Shirou Matsumoto, Takumi Era, Kimitoshi Nakamura, Hiroshi Mitsubuchi, Fumio Endo. In vitro modeling of methylmalonic acidemia (MMA) using patient specific induced pluripotent stem cells. The 3rd ACIMD and the 55th Annual Meeting of

JSIMD, Nov. 29. 2013.

2) Ken Momosaki, Shirou Matsumoto, Kimitoshi Nakamura, Hiroshi Mitsubuchi, Toshika Okumiya, Fumio Endo. Newborn screening for Pompe disease in a Japanese region. The 3rd ACIMD and the 55th Annual Meeting of JSIMD, Nov. 28. 2013.

3) Rieko Sakamoto, Shirou Matsumoto, Hiroshi Mitsubuchi, Fumio Endo. Improvement of development, growth and QOL of the patients of methylmalonic acidemia after liver transplantation. The 3rd ACIMD and the 55th Annual Meeting of JSIMD, Nov. 28. 2013.

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

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

iPS 細胞を使用したライソゾーム病治療薬の開発

研究分担者 有馬英俊 熊本大学大学院生命科学研究部 製剤設計学分野 教授

研究要旨

GM1-ガングリオシドーシスは、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子の変異に基づく神経遺伝病であり、代表的なライソゾーム病の一つである。本症は致死的で、難病に指定されており、有効な治療法はない。本研究では、新規 GM1-ガングリオシドーシス治療薬として、シクロデキストリン (CyD) 誘導体の可能性を検討した。その結果、GM1-ガングリオシドーシス患者由来 iPS 細胞から繊維芽細胞へ分化させた A138 細胞に対して、CyDs 誘導体は、エンドライソゾームに蓄積した GM1-ガングリオシド量を低下させることが示唆された。これらの結果より、CyDs が GM1-ガングリオシドーシスの新規治療薬として有用である可能性が示された。

A. 研究目的

ガングリオシドは、疎水性のセラミド、親水性のオリゴ糖鎖にシアル酸残基が結合した糖脂質で、神経系の修復、細胞の分化増殖、レセプター機能、リン酸化酵素活性化などの生理活性を有する。GM1-ガングリオシドーシスの原因は、ライソゾーム酵素の一つである、 β -ガラクトシダーゼが欠損することにより、その基質である GM1-ガングリオシドやアシアロ GM1-ガングリオシドなどの糖脂質が脳や内臓（肝臓、脾臓）などに蓄積し、ケラタン硫酸などのムコ多糖が骨に蓄積する疾患である（図 1）。 β -ガラクトシダーゼはスフィンゴ脂質活性化タンパク質の一つであるサポシン A の存在下、GM1 糖鎖の β -ガラクトースを切断したり、ガラクトースを含むオリゴ糖やケラタン硫酸を分解したりする。遺伝形式は常染色体劣性遺伝であり、分類としては、乳児期早期から発症し痙攣性対麻痺をはじめとする広汎な中枢神経障害、眼底のチェリーレッドスポット、肝脾腫、骨異常を伴う乳児型（1 型）、幼児期から発症し、中枢神経障害は進行する若年型（2 型）、さらに学童期から構音障害などの症状が現れ、錐体外路症状が中心となる成人型（3 型）の 3 病型がある。対症療法として、ジストニアに対してトリヘキシフェニジル塩酸塩が有効とされる。骨髄移植も試みられているが著名な効果はこれまで確認されていない。現在、ケミカルシャペロン療法の開発

が進められており、N-オクチル-4-エピ-バリエナミン (NOEV) は GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスの中枢神経系を含む全ての臓器で β -ガラクトシダーゼ活性の回復が認められ、GM1-ガングリオシドの蓄積の減少が確認されている。しかしながら、まだ実用段階ではなく、依然として安全性が高く、効果に優れた新規治療薬の開発が期待されている。

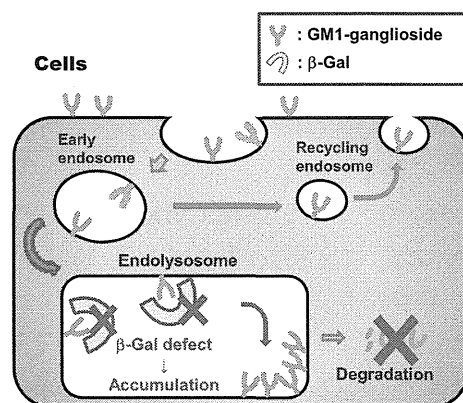


図 1. GM1-ガングリオシドーシスの発症機序

環状マルトオリゴ糖であるシクロデキストリン (CyDs) はその空洞径に応じて、生体膜からリン脂質やコレステロールなどの脂質類を熱力学的平衡に基づいて可溶化し、生体膜の構造や機能に影響を与えることが知られている。また、生体膜にはリピッドラフトと呼ばれるコレステロー

ルやガングリオシドなどのスフィンゴ脂質が豊富な領域が存在し、メチル- β -CyD (M- β -CyD) やヒドロキシプロピル- β -CyD (HP- β -CyD) は細胞形質膜上のリピッドラフトからコレステロールを漏出させ、その構造を破壊することが報告されている。近年、コレステロールが脳や内臓に蓄積するニーマンピック症候群タイプ C 病に対して、医師主導の人的臨床応用として、HP- β -CyD が投与され、肝脾腫を改善することが報告された。しかしながら、他のライソゾーム病に対する CyD の有用性評価はほとんど行われていない。そこで本申請課題では、新規 GM1-ガングリオシドシス治療薬としての CyD 誘導体の可能性を検討するために、GM1-ガングリオシドシス患者から樹立した iPS 細胞から分化させた繊維芽細胞 (A138 細胞) を用いて、細胞内 GM1-ガングリオシド量に及ぼす各種 CyD 誘導体の影響を検討した。さらに、GM1-ガングリオシドモデルマウスを作成し、各種 CyD 誘導体の影響を検討した。

B. 研究方法

1. 細胞

GM1-ガングリオシドシス患者由来 iPS 細胞から繊維芽細胞へ分化させた A138 細胞 (研究代表者 江良氏より提供) を使用した。

2. 細胞障害性

A138 細胞 (1×10^6 cells/well) を 10 mM、1 時間もしくは 1 mM、24 時間で処理した後、WST-8 試薬を用いて細胞生存率を測定した。

3. リピッドラフトと各種 CyDs との相互作用

A138 細胞 (1×10^6 cells/well) を 10 mM、1 時間もしくは 1 mM、24 時間で処理した後、培養上清中のコレステロールおよびリン脂質をそれぞれコレステロール E テストワコーおよびリン脂質 C テストワコーを用いて定量した。

4. GM1-ガングリオシド量に及ぼす CyDs の影響

A138 細胞 (1×10^6 cells/well) を 10 mM、1 時間もしくは 1 mM、24 時間で処理した後、FITC ラベル化コレラトキシン B および Alexa-ラベル化コレラトキシン B を添加し、それぞれフローサイトメーターおよび共焦点レーザー顕微鏡にて細胞内 GM1 ガングリオシド量を測定した。

5. GM1-ガングリオシドシスモデルマウス

松田ら (医薬基盤研究所) によって樹立された β -ガラクトシダーゼノックアウトマウスを使用した。

(倫理面への配慮)

GM1-ガングリオシドシスモデルマウスの使用に際し、熊本大学遺伝子組み換え生物等第二種使用等安全管理規則に則り、承認を得ている (承認番号 25-016)。

C. 研究結果および考察

本研究では、GM1-ガングリオシドシス治療薬としての各種 CyDs 誘導体の可能性を検討した。A138 細胞に対して、6 種の CyDs は高濃度短時間処理 (10 mM, 1 時間) あるいは低濃度長時間処理 (1 mM, 24 時間) 後も、ほとんど細胞障害性を示さなかった。共焦点レーザー顕微鏡による検討から、各種 CyDs (1 mM) で 24 時間処理後、A138 細胞内の GM1-ガングリオシド量は有意に低下することが明らかとなった。また、その効果は、ジメチル- α -CyD (DM- α -CyD) や M- β -CyD 添加系において高い傾向が示された。また、フローサイトメリーによる検討からも、同様に GM1-ガングリオシド量の低下が認められたことから、CyDs が細胞内エンドライソゾームの過剰な GM1-ガングリオシドの蓄積を減少させる可能性が示唆された。さらに、各種 CyDs の高濃度短時間処理 (10 mM, 1 時間) ではコレステロールやリン脂質が培地中に漏出したが、低濃度長時間処理 (1 mM, 24 時間) では、漏出作用は認められなかった。これらの結果より、CyDs の低濃度長時間処理 (1 mM, 24 時間) により惹起された細胞内 GM1-ガングリオシド量の低下に、リピッドラフトからの脂質成分の漏出効果の影響は少ないものと推察される。今後、CyDs が細胞内 GM1-ガングリオシド量を低下させる詳細な機構を明らかにするとともに、GM1-ガングリオシドシスモデルマウスを用いた治療効果に関する検討を行う必要がある。

D. 結論

本研究では、新規 GM1-ガングリオシドシス治療薬として、CyD 誘導体の可能性を検討した。

その結果、GM1-ガングリオシドーシス患者由来 iPS 細胞から繊維芽細胞へ分化させた A138 細胞に対して、CyDs 誘導体は、エンドライソゾームに蓄積した GM1-ガングリオシド量を低下させることが示唆された。これらの結果より、CyDs が GM1-ガングリオシドーシスの新規治療薬として有用である可能性が示された。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし。

2. 学会発表

①前田有紀、本山敬一、東 大志、竹尾 透、中瀧直己、倉内祐樹、香月博志、石塚洋一、入江徹美、有馬英俊、「GM1 ガングリオシドーシス治療薬としての親水性シクロデキストリン類の基礎的検討」第 30 回シクロデキストリンシンポジウム (熊本, 9/12-13, 2013)

②Yuki Maeda, Keiichi Motoyama, Taishi Higashi, Yuka Horikoshi, Toru Takeo, Naomi Nakagata, Yuki Kurauchi, Hiroshi Katsuki, Yoichi Ishitsuka, Tetsumi Irie, Takumi Era, Hidetoshi Arima, Feasibility Study of Hydrophilic Cyclodextrin Derivatives as Drugs for GM1- Gangliosidosis, 7th Asian Cyclodextrin Conference, (Bangkok, 27-29 November, 2013)

G. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

該当なし

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

研究分担者 杉山大介 九州大学大学院医学研究院 准教授

研究要旨

インドネシア・アイックマン研究所を訪問し、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た。また、質量分析装置を応用して、グロビントタンパク質を解析する技術の開発を試みた。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た。

A.研究目的

- ①難病の遺伝性血液疾患（サラセミア）の皮膚繊維芽細胞の情報収集を行う。
- ②作製したヒト iPS 細胞から赤血球系細胞を効率よく分化誘導法を確立し、作製した細胞の品質を解析するための基盤技術を開発する。

B.研究方法

- ①に関しては、インドネシア・アイックマン研究所の研究者よりメール・面談を通じて情報収集を行う。
- ②に関しては、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トタンパク質を解析する技術を開発する。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トアイピングの技術を開発する。

(倫理面への配慮)

インドネシア・アイックマン研究所よりサラセミア患者サンプルの提供を受けるにあたり、倫理委員会に提出する書類の打合せが終了した。

C.研究結果

- ①インドネシア・アイックマン研究所はサラセミア

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。アイックマン研究所の Ita N Margaretha 博士は、分担研究者研究室を訪問したことがあり、サラセミアの皮膚繊維芽細胞に関する情報を提供して頂いた。また、平成 26 年 1 月 21 日～1 月 24 日、代表研究者・江良博士とともに、アイックマン研究所を訪問し、Iswari Setianingsih 博士、Ita N Margaretha 博士ら面談し、サラセミア患者サンプルの提供に関して口頭で同意を得た。

②以下の表のように、alpha-, beta-, delta-, epsilon-, gamma-, mu-, theta-, zeta-globin を認識するペプチドをデザインした。

Symbol	Description	PID	Pep seq
HBA1;HB A2	hemoglobin, alpha 1;hemoglobin, alpha 2	TB4976 37	[MT3]-LRVDPVNFK[MT3]
HBA1;HB A2	hemoglobin, alpha 1;hemoglobin, alpha 2	TB2392 62	[MT3]-FLASVSTVLTSK[M T3]
HBB	hemoglobin, beta	TB4625 45	[MT3]-EFTPPVQAAYQK[M T3]
HBB	hemoglobin, beta	TB4624 44	[MT3]-VNVDEVGGEALGR
HBB	hemoglobin, beta	TB2525 50	[MT3]-LLGNVLC[CAM]V LAHHFGK[MT3]

HBB	hemoglobin, beta	TB2524 12	[MT3]-GTFATLSELHC[CA M]DK[MT3]
HBB	hemoglobin, beta	TB4623 30	[MT3]-SAVTALW GK[MT3]
HBB	hemoglobin, beta	TB2526 24	[MT3]-FFESFGDLSTPDAV MGNPK[MT3]
HBB	hemoglobin, beta	TB2525 49	[MT3]-LLGNVLC[CAM]V LAHHFGK[MT3]
HBD	hemoglobin, delta	TB5330 68	[MT3]-EFTPQMQAAY[MT3]QK[MT3]
HBD	hemoglobin, delta	TB5328 30	[MT3]-EFTPQMQAAYQK[M T3]
HBD	hemoglobin, delta	TB5330 19	[MT3]-EFTPQMQAAYQK[M T3]
HBD	hemoglobin, delta	TB5327 63	[MT3]-LLGNVLC[CAM]V LAR
HBD	hemoglobin, delta	TB5331 33	[MT3]-GTFSQLSELHC[CA M]DK[MT3]
HBD	hemoglobin, delta	TB5329 69	[MT3]-GTFSQLSELHC[CA M]DK[MT3]
HBE1	hemoglobin, epsilon 1	TB4507 98	[MT3]-LSELHC[CAM]DK[MT3]
HBE1	hemoglobin, epsilon 1	TB4273 46	[MT3]-EFTPEVQAAWQK[M T3]
HBE1	hemoglobin, epsilon 1	TB4509 39	[MT3]-FFDSFGNLS SPSAI LG NPK[MT3]
HBE1	hemoglobin, epsilon 1	TB4270 35	[MT3]-AAVSLW SK[MT3]
HBE1	hemoglobin, epsilon 1	TB4129 07	[MT3]-MNV EAGG EALGR
HBE1	hemoglobin, epsilon 1	TB4271 02	[MT3]-VLTSFGDAIK[MT3]
HBE1	hemoglobin, epsilon 1	TB4127 08	[MT3]-AAVSLW SK[MT3]
HBE1	hemoglobin, epsilon 1	TB4130 55	[MT3]-NMDNLK[MT3]PAF AK[MT3]
HBE1	hemoglobin, epsilon 1	TB4273 23	[MT3]-NMDNLK[MT3]PAF AK[MT3]

HBG1	hemoglobin, gamma A	TB1103 44	[MT3]-VLTS LGDATK[MT3]
HBG1;HB G2	hemoglobin, gamma A;hemoglobin, gamma G	TB4752 92	[MT3]-VNVEDAGGETLGR
HBG1;HB G2	hemoglobin, gamma A;hemoglobin, gamma G	TB1105 50	[MT3]-EFTPEVQASWQK[M T3]
HBG1;HB G2	hemoglobin, gamma A;hemoglobin, gamma G	TB4754 02	[MT3]-GTFAQLSELHC[CA M]DK[MT3]
HBG1;HB G2	hemoglobin, gamma A;hemoglobin, gamma G	TB4754 78	[MT3]-FFDSFGNLS SAI MGNPK[MT3]
HBG1;HB G2	hemoglobin, gamma A;hemoglobin, gamma G	TB4752 12	[MT3]-ATITSLW GK[MT3]
HBG1;HB G2	hemoglobin, gamma A;hemoglobin, gamma G	TB3126 27	[MT3]-EFTPEVQASWQK[M T3]
HBM	hemoglobin, mu	TB5331 18	[MT3]-MLAAVGA AVQHVDN LR
HBM	hemoglobin, mu	TB5331 03	[MT3]-MLAAVGA AVQHVDN LR
HBM	hemoglobin, mu	TB5328 20	[MT3]-AALSPLADLHALVL R
HBM	hemoglobin, mu	TB5328 08	[MT3]-AALSPLADLHALVL R
HBM	hemoglobin, mu	TB5329 70	[MT3]-AALSPLADLHALVL R
HBM	hemoglobin, mu	TB5327 57	[MT3]-LFTVVPSTK[MT3]

HBM	hemoglobin, mu	TB5327	
		41	[MT3]-LFTVYPSTK[MT3]
HBQ1	hemoglobin, theta 1	TB4929	
		20	[MT3]-TFLAFPATK[MT3]
HBQ1	hemoglobin, theta 1	TB4929	
		23	[MT3]-VADALSLAVER
HBQ1	hemoglobin, theta 1	TB1255	
		59	[MT3]-TYFSHLDLSPGSSQ VR
HBQ1	hemoglobin, theta 1	TB1255	
		88	[MT3]-K[MT3]LGSNVGVY TTEALER
HBZ	hemoglobin, zeta	TB4670	
		98	[MT3]-FLSVVSSVLTEK[M T3]
HBZ	hemoglobin, zeta	TB4671	
		69	[MT3]-TYFPFDLHPGSAQ LR
HBZ	hemoglobin, zeta		
			[MT3]-TYFPFDLHPGSAQ LR
HBZ	hemoglobin, zeta		
			[MT3]-SIDDIGGALSK[MT 3]
HBZ	hemoglobin, zeta		
			[MT3]-ISTQADTIGTETLE R
HBZ	hemoglobin, zeta		
			[MT3]-ISTQADTIGTETLE R
HBZ	hemoglobin, zeta		
			[MT3]-VVAAVGDAVK[MT3]
HBZ	hemoglobin, zeta		
			[MT3]-LFLSHPQTK[MT3]
HBZ	hemoglobin, zeta		
			[MT3]-LSELHAYILR
Symbol	Description		Pep seq

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。

D. 考察

①平成 25 年度は、インドネシア・アイックマン研究所を訪問し、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た。次年度に向けたサ

ラセミアサンプル入手に関する基盤を整備した。
②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。

E. 結論

①平成 25 年度は、インドネシア・アイックマン研究所を訪問し、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た。
②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試みた。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

- 1) 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
- 2) Inoue T, Tani K and Sugiyama D. “Mesodermal and hematopoietic differentiation from ES and iPS cells.” *Stem Cell Rev.* 9(4), 422-34, 2013
- 3) 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.*, In press, 2013
- 4) 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

2.学会発表

1) 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

2) 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

3) 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

4) 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

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得

2.実用新案登録

3.その他

特になし

IV 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌 (主なものを6つ選んで掲載)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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	VMAT2 identified as a regulator of late-stage β -cell differentiation.	Nature Chemical Biology	10(2)	141-148	2014
Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, 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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tanaka Y, Ishitsuka Y, Irie T	Influence of Npc1 genotype on the toxicity of hydroxypropyl- β -cycl odextrin, a potentially therapeutic agent, in Niemann-Pick Type C disease models	Molecular Genetics and Metabolism Reports		19-30	2014
Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S, Bowman RL, Liu B, Tu EY, Mandal PK, Vera E, Shim J, Kriks S, Taldone T, Fusaki N, Tomishima MJ, Krainc D, Milner TA, Rossi DJ, Studer L	Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging.	Cell Stem Cell	13(6)	691-705	2013
Inoue T, Tani K, Sugiyama	Mesodermal and hematopoietic differentiation from ES and iPS cells.	Stem Cell Rev.	9(4)	422-434	2013

V 研究成果の刊行物・別刷

Efficient and Reproducible Myogenic Differentiation from Human iPSC Cells: Prospects for Modeling Miyoshi Myopathy *In Vitro*

Akihito Tanaka^{1,2}, Knut Woltjen¹, Katsuya Miyake³, Akitsu Hotta¹, Makoto Ikeya¹, Takuya Yamamoto¹, Tokiko Nishino¹, Emi Shoji^{1,4}, Atsuko Sehara-Fujisawa⁴, Yasuko Manabe⁵, Nobuharu Fujii⁵, Kazunori Hanaoka⁶, Takumi Era⁷, Satoshi Yamashita⁸, Ken-ichi Isobe², En Kimura⁸, Hidetoshi Sakurai^{1*}

1 Center for iPSC Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, Japan, **2** Department of Immunology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Showa-ku, Nagoya, Japan, **3** Department of Histology and Cell Biology, School of Medicine, Kagawa University, Miki-cho, Kida-gun, Kagawa, Japan, **4** Department of Growth Regulation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, Japan, **5** Department of Health Promotion Sciences, Graduate School of Human Health Sciences, Tokyo Metropolitan University, Hachioji City, Tokyo, Japan, **6** Molecular Embryology, Department of Bioscience, School of Science, Kitasato University, Minami-ku, Sagami-hara City, Kanagawa, Japan, **7** Department of Cell Modulation, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, Chuo-ku, Kumamoto, Japan, **8** Department of Neurology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Chuo-ku, Kumamoto, Japan

Abstract

The establishment of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) has enabled the production of *in vitro*, patient-specific cell models of human disease. *In vitro* recreation of disease pathology from patient-derived hiPSCs depends on efficient differentiation protocols producing relevant adult cell types. However, myogenic differentiation of hiPSCs has faced obstacles, namely, low efficiency and/or poor reproducibility. Here, we report the rapid, efficient, and reproducible differentiation of hiPSCs into mature myocytes. We demonstrated that inducible expression of *myogenic differentiation 1* (*MYOD1*) in immature hiPSCs for at least 5 days drives cells along the myogenic lineage, with efficiencies reaching 70–90%. Myogenic differentiation driven by *MYOD1* occurred even in immature, almost completely undifferentiated hiPSCs, without mesodermal transition. Myocytes induced in this manner reach maturity within 2 weeks of differentiation as assessed by marker gene expression and functional properties, including *in vitro* and *in vivo* cell fusion and twitching in response to electrical stimulation. Miyoshi Myopathy (MM) is a congenital distal myopathy caused by defective muscle membrane repair due to mutations in *DYSFERLIN*. Using our induced differentiation technique, we successfully recreated the pathological condition of MM *in vitro*, demonstrating defective membrane repair in hiPSC-derived myotubes from an MM patient and phenotypic rescue by expression of full-length *DYSFERLIN* (*DYSF*). These findings not only facilitate the pathological investigation of MM, but could potentially be applied in modeling of other human muscular diseases by using patient-derived hiPSCs.

Citation: Tanaka A, Woltjen K, Miyake K, Hotta A, Ikeya M, et al. (2013) Efficient and Reproducible Myogenic Differentiation from Human iPSC Cells: Prospects for Modeling Miyoshi Myopathy *In Vitro*. PLoS ONE 8(4): e61540. doi:10.1371/journal.pone.0061540

Editor: Atsushi Asakura, University of Minnesota Medical School, United States of America

Received: November 14, 2012; **Accepted:** March 11, 2013; **Published:** April 23, 2013

Copyright: © 2013 Tanaka et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported in part by the FIRST Program, Scientific Research Grant No.22790284 (to HS) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), and a grant from the Leading Project of MEXT (to HS and AS). This research was also supported in part by grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan (to TE) and Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency (to TE). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: hsakurai@cira.kyoto-u.ac.jp

Introduction

The establishment of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) [1,2] has paved the way for the generation of patient-specific stem cell resources. Directed differentiation of pluripotent stem cells into a variety of cell types provides a powerful tool for *in vitro* disease modeling [3]. Although the number and genetic diversity of patient-derived hiPSC lines continues to increase, the difficulty of differentiating hiPSC into mature cell types remains a major obstacle in understanding disease.

Effective differentiation into affected cell types is a critical step in the production of *in vitro* disease models from hiPSCs. In the case of myopathies, significant efforts have been made to generate skeletal muscle cells from human pluripotent stem cells [4,5,6]. However, previously reported differentiation protocols suffer from

complex time-consuming procedures, low differentiation efficiencies, and/or low reproducibility. Reproducibility is perhaps the greatest hurdle facing robust differentiation protocols from human pluripotent stem cells, especially considering the high levels of clonal variation previously reported [7].

Directed myogenic differentiation of adult somatic cells mediated by the master transcriptional factor, MYOD1 [8,9], was initially established in 1987 [8]. Following this first demonstration, various types of cells have been shown to give rise to myocytes in response to forced expression of *MYOD1* [9,10,11], including hiPSC-derived fibroblasts treated with *MYOD1* mRNA [12]. Considering the inherent potential of hiPSCs, differentiation into fibroblasts prior to myogenic induction is a redundant step. Recently, Tedesco et al. showed that hiPSC-derived mesoangio-