

201335021A

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)

精神・神経疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡野 栄之

平成 26 (2014) 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告書	
精神・神経疾患特異的iPS細胞を用いた創薬研究-----	1
岡野 栄之	
II. 分担研究報告書	
1. 汎用性ヒト型双腕ロボットと既存薬ライブラリーを用いたiPS創薬研究 -----	7
佐谷 秀行	
2. 腎・泌尿器系の稀少遺伝性疾患の原因遺伝子群の網羅的解析系の開発 -----	11
小崎 健次郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 15
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 19

# I. 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

精神・神経疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬研究

研究代表者	岡野 栄之	慶應義塾大学医学部	生理学教室	教授
研究分担者	佐谷 秀行	慶應義塾大学医学部	先端医科学研究所	教授
	小崎 健次郎	慶應義塾大学医学部	臨床遺伝学センター	教授

研究要旨

本研究は、精神・神経疾患特異的iPS細胞を用いた効率的な創薬システムの基盤構築を通じて、創薬シーズを探索し、実際に効果のある薬剤を臨床現場へ送り出すことを目標としている。これまでの疾患特異的iPS細胞を用いた創薬研究は、検討症例数が少ないため再現性の検討が不十分、シーズの選択が非系統的という2つの大きな問題を有している。そのため、細胞表現型を高速かつ高効率に解析できる薬剤評価システムを構築すること、短期間に臨床応用を目指すために、スクリーニング対象薬剤の選択を戦略的に行うことが求められている。本研究は、細胞表現型の評価として神経分化異常、ニューロンの機能異常、ミトコンドリア機能、代謝異常の検出系を自動化すること、自施設に構築済みの既存薬ライブラリーを用いることを特徴としている。

平成25年度は、統合失調症患者（22q11.2）の欠失）のiPS細胞から分化誘導した神経細胞において、LINE-1配列が増加していることを見出した。さらに、別のゲノム構造異常を有する統合失調症患者からのiPS細胞樹立も進めており、2症例のiPS細胞の樹立が完了した。

創薬スクリーニングを目指した分化誘導システムと表現型の定量的アッセイシステムの開発は、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、多系統萎縮症、脊髄小脳変性症、牟婁病に関してそれぞれ適切な種類の神経系細胞に誘導し、酸化ストレス、細胞内代謝、異常物質の蓄積を中心に表現型解析を進めている。

また、ヒトiPS細胞を96ウェルプレートで神経系細胞へ分化誘導できる実験系や蛍光標識抗体などを用いて細胞性状をハイスループットで検出する実験系も確立した。

さらに、分担者の佐谷らによって、神経線維腫症を標的とした上皮間葉転換を評価するシステムをヒト型双腕ロボット「まほろ」を用いて実施するための実験プロトコルの作成、動作確認を行い、概ね問題なく稼働することを確認した。

上記に加えて、iPS細胞の樹立時、継代や分化誘導過程で起きると考えられる遺伝子変異を把握し、性質の明確化されたiPS細胞や分化細胞を用いることは、創薬研究にとって重要である。分担者の小崎らは、iPS細胞の品質管理に適合した点突然変異の検出システムを構築した。

以上のように、疾患特異的iPS細胞の樹立・品質管理、神経系細胞への分化誘導と病態解析、多検体を処理できる実験系などが整いつつあり、これらが有機的に結びつくことで創薬シーズの同定や新しい治療法の確立につながるものと期待される。

A. 研究目的

本研究の目的は、慢性的・持続的で、生活面の長期の支障を来す中枢神経疾患について発症機序を解明し、効果的な治療法を確立することである。

具体的には、神経疾患特異的iPS細胞を用いた効率的な創薬システムの構築を通じて、創薬シーズを同定する。その後、臨床試験を通じて、当該薬の中枢神経疾患に対する薬事承認を目指す。

比較的稀少だが、均質性の高い疾患に対する創薬開発法が確立できれば、1)厚生労働省の難

治性疾患克服研究事業で未だ取り扱われていない、稀少難病の治療法の開発、2)比較的患者数は多いが、均質性の低いと思われる中枢神経疾患（統合失調症・双極性障害・発達障害等）の効率的な治療薬の開発に応用が可能である。

これまでiPS細胞の表現型の解析は、研究者の主観的な判断に負うところが大きく、製薬企業の参入の障壁となっていたが、解析の定量化とそのハイスループット化は、iPS細胞研究の産業化を促進するとともにiPS細胞研究分野における国際的な技術水準の向上に資すると期待される。また、既存薬の中に新たな活性をもつ薬剤

を見出すことで、迅速な臨床応用に持ち込むことが可能であり、一日も早く安全な薬剤を求める社会の要求にこたえるものである。本研究の成果は他の臓器系の難治性疾患の創薬シーズの探索や、他臓器に対する薬剤シーズの中枢神経系への副作用の評価にも利用可能であり、安全で効果的な新規薬剤の開発を目指すという、厚生労働行政の基本方針に合致する。特に中枢神経系に対する作用の多くは動物の検討では困難で、ヒト細胞の評価系を自動化することの臨床的な意義は大きい。

## B. 研究方法

### (1) 疾患特異的iPS細胞の樹立

患者末梢血や皮膚から体細胞を分離し、エピソードベクター等を用いて初期化因子の遺伝子を導入することでiPS細胞を樹立する。複数コロニー（平均60コロニー程度）をピックアップし、樹立に用いたベクターの残存、神経系細胞への分化能や必要に応じて点突然変異などを確認等を確認し、創薬スクリーニングに使用できるiPS細胞株を選定する。

### (2) 分化誘導システムと表現型の定量的アッセイシステムの開発

#### 1. 分化誘導

胚様体を介した神経幹細胞への分化誘導法、あるいは、低分子化合物を組み合わせた神経幹細胞への分化誘導法を行う。神経幹細胞からニューロンへの分化誘導の過程で、増殖因子や低分子化合物を適切な時期に添加することで、迅速、高効率に目的とするニューロンに分化誘導する。また、必要に応じて、目的とするニューロンに特異的な遺伝子の発現制御領域下で蛍光タンパク遺伝子等を発現させることで、目的とするニューロンを可視化する。

#### 2. 表現型の定量的アッセイ

iPS細胞から分化誘導した神経細胞などを、フラックスアナライザー、in cell analyzer、CE-MSなどを用いて表現型解析を行う。

### (3) 薬剤スクリーニング

予備的な実験として、ヒトiPS細胞を96ウェルプレートに播種し、すでに確立している分化誘導を行う。さらに、蛍光レポーターなどを用いて細胞内の状態変化をハイスループットで検出する実験系をIn cell Analyzerを用いて検出する。

神経線維腫症を標的として、上皮間葉転換を指標にした薬剤評価プロトコルを、ヒト型双

腕ロボット「まほろ」に導入し、薬剤評価プロトコルを実施させる。

### (倫理面への配慮)

本研究は、慶應義塾大学の倫理委員会で人権擁護、不利益・危険性の排除、説明と同意に関して十分な審査を経た承認のもとに行われる。ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守し、下記の各種指針にもとづいて研究計画を立案・遂行している。

- ① ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針
- ② 臨床研究に関する倫理指針
- ③ その他（文部科学省研究振興局長通知19文科振第852号）

ヒト検体を採取する際には、試料等提供者の個人情報保護、検体提供の任意性、提供を受けた検体の取り扱い、得られる研究成果の医学的貢献度等について、試料等提供者ないしはその保護者に十分に説明したうえで、文書により同意を得ている。試料等の匿名化など個人情報の保護に努め、個人情報保護に関する法律、行政機関の保有する個人情報の保護に関する法律（平成15年法律第58号）、独立行政法人等の保有する個人情報の保護に関する法律（平成15年法律第59号）及び地方公共団体等において個人情報の保護に関する法律第11条の趣旨を踏まえて制定される条例等を遵守している。

iPS細胞株の樹立と解析に関しては、慶應義塾大学医学部倫理委員会により、課題名「神経疾患患者からのiPS細胞株の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究」が既に承認（平成20年6月18日）されている。

## C. 研究結果

### (1) 疾患特異的iPS細胞の樹立

22番染色体(22q11.2)の欠失を持つ統合失調症患者から作製したiPS細胞を用いた解析から、患者由来のiPS細胞から誘導した神経細胞において、LINE-1配列が増加していることを見出した。

さらに、別のゲノム構造異常を有する統合失調症患者からiPS細胞の樹立を進めており、2症例のiPS細胞の樹立が完了した（図1）。現在、解析に用いるクローンの選択を行っている。

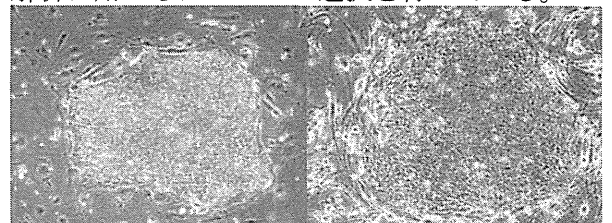


図1. 患者由来iPS細胞 患者の母由来iPS細胞

双極性障害に関しては、CNV解析・全ゲノム解

析を行い、病態との関連が強く疑われるゲノム構造異常を持つ患者の選定を開始した。

さらに、神経線維腫症患者由来の細胞株（親株）とその親株由来で増殖能を獲得した細胞株（亜株）のゲノムDNAにおける点突然変異を異なるプログラムで検出し、得られた結果の比較検討を行うことで、iPS細胞の品質管理に適した解析システムを構築した。

（2）創薬スクリーニングを目指した分化誘導システムと表現型の定量的アッセイシステムの開発

### 1. 筋萎縮性側索硬化症 (FUS 変異)

患者2名から樹立した iPS 細胞と健常者由来 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞を用いて、ストレスに対する細胞死や遺伝子発現解析などを行った。

樹立した iPS 細胞を浮遊培養によって神経幹細胞へと誘導後、接着培養することで運動ニューロンへの分化誘導を行い、運動ニューロンマーカーである Islet-1、HB9 の発現を確認したところ、非常に高効率に運動ニューロンに分化していることが明らかとなった。高効率な運動ニューロンへの分化誘導システムが完成した。

さらに、HB9 プロモーター制御下にレポーター遺伝子を発現させることで、運動ニューロンの可視化も可能となった（図2）。

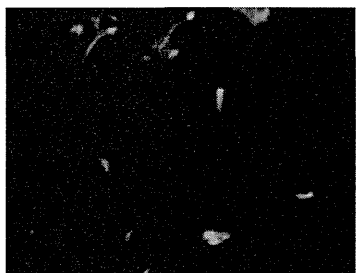


図2. 運動ニューロンの可視化

次に、iPS 細胞から分化誘導した運動ニューロンを用いて、グルタミン酸等による細胞死を切断型 Caspase-3 染色によって検討した。その結果、健常者 iPS 細胞由来神経細胞と比較して患者由来 iPS 細胞由来神経細胞において、細胞死が2倍程度増加することを見出した。

また、同様の刺激により、健常者由来神経細胞と比較して患者由来神経細胞において神経突起長の有意な萎縮を認めた。

一方で、FUS 変異筋萎縮性側索硬化症において一般的に検出される FUS タンパク質の局在変化等は認めなかった。

### 2. パーキンソン病

すでに樹立済みの PARK2 患者由来 iPS 細胞から栄養因子と低分子化合物との組み合わせでドーパミンニューロンを誘導し、メタボローム解析を行った。

その結果、PARK2 患者 iPS 細胞由来神経細胞において、解糖系とペントースリン酸経路が亢進していることを見出した。

現在、筋萎縮性側索硬化症やパーキンソン病以外にも、アルツハイマー病、多系統萎縮症、脊髄小脳変性症、牟婁病に関してそれぞれ適切な種類の神経系細胞に誘導し、酸化ストレス、細胞内代謝、異常物質の蓄積を中心に定量的な表現型解析を進めているところである。

### （3）創薬スクリーニング

多検体での薬剤スクリーニングを可能とするために、ヒト iPS 細胞を96ウェルプレートで神経系細胞へ分化誘導できる実験系を確立した。

また、蛍光標識抗体などを用いて細胞性状をハイスループットで検出する実験系を In cell Analyzer を用いて確立した。

神経線維腫症を標的とした上皮間葉転換を評価するシステムをヒト型双腕ロボット「まほろ」を用いて実施するための実験プロトコルの作成、動作確認を行い、概ね問題なく稼働することを確認した。

## D. 考察

統合失調症患者 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞の解析結果から、LINE-1 と呼ばれる転移因子が神経細胞において増えることが、統合失調症の病態に関わることが明らかとなり、今後、統合失調症の治療法、診断法や発症予防法の開発に寄与するものと期待できる。

筋萎縮性側索硬化症患者由来 iPS 細胞から誘導した運動ニューロンを用いることによって、ストレスに対する細胞死亢進などの表現型を再現できたので、我々の非常に高効率な運動ニューロンへの分化誘導システムは、筋萎縮性側索硬化症を含む運動ニューロン病の解析に役立つものと考えられる。

しかしながら、変異 FUS の細胞質蓄積などの表現型の再現は、今後の検討課題である。

パーキンソン病患者由来神経細胞の解析から新たに見出した代謝経路の亢進といった事実が、創薬研究の対象になりうるか否かを検討する必要がある。

## E. 結論

疾患特異的iPS細胞の樹立、神経系細胞への分化誘導と病態解析、多検体を処理できる実験系などが整いつつあり、これらが有機的に結びつくことで新しい治療法の確立や創薬シーズの同定につながるものと期待される。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1 : 論文発表

【代表研究者：岡野栄之】

1. Okano H, Nakamura M, Yoshida K, Okada Y, Tsuji O, Nori S, Ikeda E, Yamanaka S, Miura K.: Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. **Circulation Research** 112(3):523-533, 2013.

2. Nishimoto Y, Nakagawa S, Hirose T, Okano HJ, Takao M, Shibata S, Suyama S, Kuwako K, Imai T, Murayama S, Suzuki N, Okano H: The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1\_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis. **Mol. Brain**, 6(31), 2013.

3. Iwanami A, Gini B, Zanca C, Assuncao A, Nael A, Dang J, Yang H, Zhu S, Kohyama J, Kitabayashi I, Cavenee WK, Cloughesy TF, Furnari TF, Nakamura M, Toyama Y, Okano H, Mischel P.: PML mediates Glioblastoma resistance to mTOR-targeted therapies. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, 110(11):4339-4344, 2013.

4. Fukuda T, Takeda S, Xu R, Sato T, Bando W, Ochi H, Sunamura S, Fujita K, Shinomiya K, Okano H, Kimura A, Enomoto M, Okawa A, Itoh H.: *Sema3A* regulates bone mass accrual through sensory innervations. **Nature** 497(7450):490-493, 2013.

5. Takeuchi K, Yoshioka N, Higa Onaga S, Watanabe Y, Miyata S, Wada Y, Kudo C, Okada M, Ohko K, Oda K, Sato T, Yokoyama M, Matsushita N, Nakamura M, Okano H, Sakimura K, Kawano H, Kitagawa H, Igarashi M. Chondroitin sulphateN-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. **Nat Commun.**4 (2740), 2013..

6. Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K,

Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, and Iwamoto K: Increased L1 Retrotransposition in the neuronal genome in Schizophrenia. **Neuron** 81(2):306-13. 2014.

7. Imaizumi Y, Okano H.: Modeling human neurological disorders with induced pluripotent stem cells. **J Neurochem.** 2013 Nov 29. doi: 10.1111/jnc.12625.

8. Naka-Kaneda H, Nakamura S, Igarashi M, Aoi H, Kanki H, Tsutsumi S, Aburatani H, Shimazaki T and Okano H: The miR-17/106-p38 axis is a key regulator of the neurogenic-to-gliogenic competence transition in developing neural stem/progenitor cells. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** 111(4):1604-1609,2014

【研究分担者：佐谷秀行】

9. Takenouchi T, Shimizu A, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Saya H and Kosaki K: Multiple cafe' au lait spots in familial patients with MAP2K2 mutation. **Am J Med Genet** 164: 392-396, 2014

【研究分担者：小崎健次郎】

10. Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Kosaki K.: Somatic CTNNB1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation. *Am J Med Genet*, in press

### 2 : 学会発表

【代表研究者：岡野栄之】

【国外】

1. Hideyuki Okano: Brain Science Using iPScell Technology and Transgenic Non-human Primates : 2013 Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry and American Society for Neurochemistry (ISN/ASN)./ Plenary Lecture, 2013.4.20 \*2013.4.20-2013.4.24 (Cancun Convention Centre, Cancun, Mexico)

2. Hideyuki Okano: Brain Science using iPScell technology and Transgenic Non-Human Primates : Seminner at The University of Edinburgh, 2013.5.8 \*2013.5.8 (The University of Edinburgh , Edinburgh, UK)

3. Hideyuki Okano: iPScell technologies for CNS-regeneration & disorders : IID 2013 (International Investigative Dermatology 2013)/ Guest Lecture, 2013.5.9 \*2013.5.8-5.13 (Queen Anne & Jacobite Rooms, Edinburgh Castle, Edinburgh, UK)

4. Hideyuki Okano: The iPScell-based CNS regeneration and investigation of neurological disorders : Tissue Repair & Regeneration, Gordon



Research Seminar –Keynote Lecture, 2013.6.15  
\*2013.6.15-16 (Colby-Sawyer College New  
London, NH, USA)

5. Hideyuki Okano: iPS cell Technology and  
Transgenic non-human Primates to study Brain  
Science : The 61st NIBB Conference, Cellular  
Community in Mammalian Embryogenesis,  
2013.7.11 \*2013.7.10-12 (Okazaki Conference  
Center, Okazaki, Japan)

6. Hideyuki Okano: Modelling pediatric and  
late-onset neurological disorders using  
reprogramming technologies : COLD SPRING  
HARBOR ASIA CONFERENCES, CSHA/ISSCR  
Joint Meeting on Stem Cells in Science and  
Medicine , 2013.10.17\*2013.10.14-17 (Suzhou  
Dushu Lake Conference Center, Shuzhou, People's  
Republic of China)

7. Hideyuki Okano: Neuroscience using iPS cell  
technologies and Transgenic Non-human  
Primates : Pathology Research Lecture Series,  
Health Science, UC San Diego, 2013.11.13\*  
2013.11.13 (University of California San Diego,  
San Diego, CA, USA)

8. Hideyuki Okano: Regeneration and Modeling of  
Central Nervous System Disorders using iPS cell  
Technologies : 2013 World Alliance Forum in San  
Francisco, 2013.11.15\*2013.11.15 (Golden Gate  
Club at the Presidio, San Francisco, CA, USA)

【研究分担者：佐谷秀行】

【国内】

1. 佐谷秀行:がん幹細胞を標的とした治療薬開  
発の現状と課題。第3回がん新薬開発合同シン  
ポジウム。11/29/2013、ステーションコンファレンス  
東京、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含  
む。）

1. 特許取得

【平成 25 年度】国内 1 件 国外 3 件

【国内】

1.発明の名称：霊長類動物の初期胚への外来遺  
伝子導入法及び該導入法を含むト  
ランスジェニック霊長類動物を作  
出する方法

出願番号：特願 2009-551406

特許番号：日本 第 5374389

出願日：2008 年 12 月 9 日

権利者：学校法人慶應義塾

発明者：岡野 栄之、佐々木 えりか

【国外】

1.発明の名称：霊長類動物の初期胚への外来遺  
伝子導入法及び該導入法を含むト  
ランスジェニック霊長類動物を作  
出する方法

出願番号：201005522-6

特許番号：163739 (W02009/096101)

出願日：2008 年 12 月 9 日

権利者：学校法人慶應義塾

発明者：岡野 栄之、佐々木 えりか

2.発明の名称：霊長類動物の初期胚への外来遺  
伝子導入法及び該導入法を含むト  
ランスジェニック霊長類動物を作  
出する方法

出願番号：12/865,304

特許番号：8592643

出願日：2008 年 12 月 9 日

権利者：学校法人慶應義塾

発明者：岡野 栄之、佐々木 えりか

3.発明の名称：神経分化に適した iPS 細胞の増  
幅方法、及び神経幹細胞の誘導方法

出願番号：PCT/JP2013/066102

出願日：2013 年 6 月 11 日

権利者：学校法人慶應義塾

武田薬品工業(株)

発明者：岡野 栄之、赤松 和土、松本 拓也、  
庄司 昌伸、中村 恒史

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。



## II. 分担研究報告書

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）  
分担研究報告書

汎用性ヒト型双腕ロボットと既存薬ライブラリーを用いた iPS 創薬研究

研究分担者 佐谷 秀行 慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 教授

研究要旨

iPS 細胞 (iPSC) は、in vitro で様々な系譜の細胞に分化させることによって、その細胞特有の病態を解析することができる極めて優れたツールである。私たちは遺伝性疾患由来の iPSC から病的形質を発現する細胞を誘導し、それを用いて薬剤スクリーニングを行うことを目的として研究を行う。具体的には、高いスループットと再現性を持つ汎用性ヒト型双腕ロボットを用いた細胞アッセイ系を構築し、病的形質を有する iPSC 由来細胞を用いて既存薬ライブラリーをスクリーニングすることにより、早期に臨床に応用できる薬剤の同定を行う。

A. 研究目的

遺伝性疾患、とくに神経系に症状をきたす疾患では、患者の神経系細胞を用いてその形質の問題点を解析することは不可能である。しかし、iPSC の登場により、in vitro で神経系の細胞を誘導できるようになり、その細胞を用いた創薬研究が理論上可能となりつつある。

細胞を用いた薬剤スクリーニング (Cell-based drug screening) は、スループットが低いことと、再現性の低さに問題がある。今後様々な疾患の iPSC を用いて薬剤スクリーニングを行うためには、ハイスループットで再現性の高いシステムを構築する必要がある。

我が国はロボット開発では世界をリードし、近年開発されたヒト型双腕ロボットは、その作業の再現性の高さから、医学生物学実験にも使用されつつある。しかし、まだ単純なタンパク質調整や核酸抽出などの作業に用いられるだけで、薬剤スクリーニングのような複雑な作業に用いられた例はない。本研究は、ヒト型双腕ロボットを用いることにより、再現性もスループットも高い薬剤スクリーニング技術を確認し、次年度から iPSC を用いた薬剤探索を行うことを目的として実施した。

B. 研究方法

ヒト正常 iPSC、疾患 iPSC から誘導した各種細胞の特性をリードアウトとしたアッセイ系を構築した後、汎用性ヒト型双腕ロボットを用いて、早期に臨床応

用が可能な化合物を見出すことが、本プロジェクトのミッションである。本年度は、我が国で開発された汎用性ヒト型双腕ロボット(呼称「まほろ」)を用いて、ハイスループット薬剤スクリーニングを行うためのシステム作りを行った。

スループットと再現性が高い Cell-based drug screening を実現するためには、①無菌条件下で長期間細胞が培養可能であること、②細胞を扱う適切なヒトの操作手順をロボット動作に置き換えること(プログラミング、ティーチング)が重要である。そこで本年度は、作業工程が基本的、かつ汎用性が高く、薬剤スクリーニングにすぐに移行可能である 96 穴プレートを用いた細胞増殖能評価系を以下の過程を踏んで構築し、そのアルゴリズムを用いて既存の薬剤による細胞増殖能評価を実施した。

評価系構築手順

- A) 細胞増殖能定量化のための実験プロトコールの確立
- B) ロボットの作業プロトコールの確立、シミュレーション、プログラミング
- C) 必要設備の設置、器具等の配置、必要器具の作製およびロボットへの作業プロトコールのティーチング
- D) 試運転、必要器具の改良、ロボット動作のチューニング
- E) ハイスループットアッセイの施行

具体的には、未分化な細胞が非接着培養条件下

において球体を形成して増殖する能力(スフィア形成能)を評価するアッセイ系をモデルとしてシステムの構築を行った。実験の概略を図 1 に示す。細胞は骨肉腫癌幹細胞 (*Oncogene* 29:5687-5699, 2010) を使用し、化合物存在下で非接着丸底 96 穴細胞培養 dish と接着平底細胞培養 dish における細胞増殖の差異を見ることによりヒット化合物の抽出を行う。目的の化合物は、接着した条件では細胞増殖を阻害しないが、スフィア形成条件において増殖阻害を示す(図 1)。

以下に具体的に確立し施行したロボット作業手順を記載する。

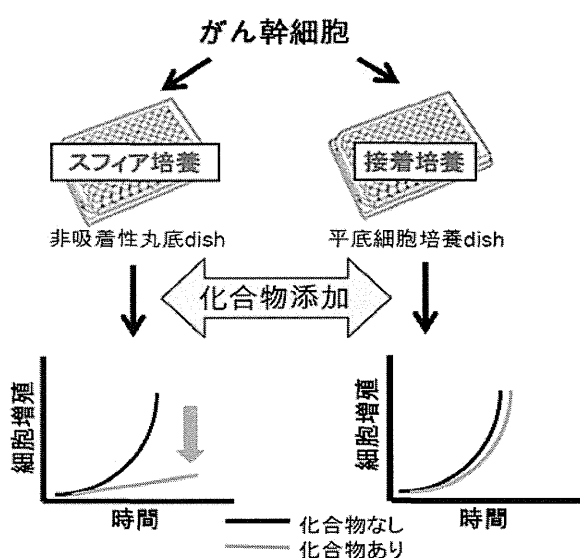


図 1 スフィア形成能抑制剤のスクリーニング  
がん幹細胞を非接着性丸底皿、接着性平底皿に散布し、化合物ライブラリーを添加する。接着条件では増殖阻害を示さないが、スフィア形成培養のみで阻害効果を示す化合物の取得を目指す。

### 1) 細胞の調整、器具の設置

細胞培養期間に応じた細胞数を調整する。例えば、2 日間の培養期間であれば 50 $\mu$ l 中に細胞が 1000 個入るように調整する。準備した細胞、化合物溶解用ジメチルスルフォキシド (DMSO) 液はロボット前面のチューブ (50ml のコニカルチューブ) 立てへ、スクリーニングに用いる化合物、希釈用細胞培養液 (96 穴に細胞培養液を 200 $\mu$ l ずつ分注する) は据え置き冷蔵庫へ、細胞播種用 96 穴培養皿 (丸底、平底) は据え置き CO<sub>2</sub> インキュベーターへ設置する。ここまでの、施行する実験規模に

応じた細胞数の準備、器具の設置はヒトの手で行うが、これ以降のスクリーニングの手順はロボットへティーチングを行い、自動運転を可能とした。

### 2) 汎用性ヒト型双腕ロボットによる作業工程仕様

ロボットはフィルターを通った空気で満たされたクリーンルームに配置され、CO<sub>2</sub> インキュベーター、冷蔵庫、プレートミキサー、ピペットマン用チップ (充填器に内蔵)、廃液用吸引器が併設されている。96 穴プレート、50 ml コニカルチューブ、細胞散布用リザーバー等はティーチングによりロボットが正確に扱えるように位置を定めた。コニカルチューブの開栓、冷蔵庫、CO<sub>2</sub> インキュベーターの開閉・収納、8 連ピペットを用いた作業を始め、細胞培養に使用する器具に合わせてロボットが支持できるようにハンド部分、固定器具を新たに開発、新製した。特に、スクリーニング工程において鍵となる 8 連ピペットを用いたピペッティング作業に工夫を要した。チップラックを新たに新製し、チップが 8 連すべてに装着するため角度や押し込む力を調整し、最終的に安定して全ての先端に装着することが可能となった。さらに、粘性の違いによる気泡の混入に対しては、ピペッティング操作の改良 (速度、角度等) を行い克服した(図 2)。

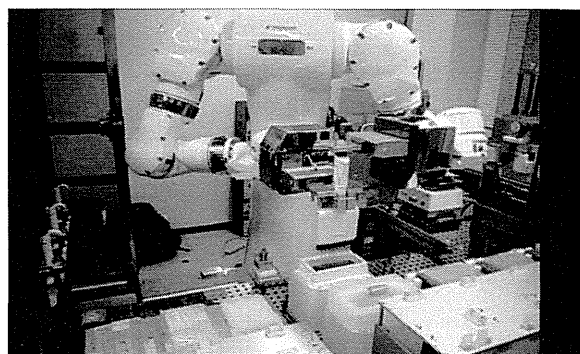


図 2 汎用性ヒト型双腕ロボット(まほろ)による細胞調整作業

### 細胞散布

コニカルチューブから細胞を滅菌リザーバーに移し、丸底、平底のプレートに 50 $\mu$ l ずつ 8 連ピペットを用いて散布を行う。この際、検証過程において、時間の経過とともに細胞が沈殿し、先に散布したウェルと後のウェルとの間に有意な細胞数の差が生

じた。このため、細胞浮遊液を6列散布するごとに攪拌操作を追加したところ、全てのウェルで均等に、再現性良く細胞を散布することが可能となった。実験に必要となる全ての細胞を散布しCO<sub>2</sub>インキュベーターへ収納し、以下の化合物の調整を行う。細胞96穴プレートは最大で丸底、平底4枚ずつに散布することが可能である。また、1ラン当たり最大で384種の化合物を検証することが可能であった。

### 化合物調整

96穴丸底プレートにあらかじめ準備された化合物ライブラリーを冷蔵庫から取り出し、DMSOを8連ピペットマンにて追添加することにより目的の濃度に希釈する。プレートミキサーにて振動数を調整しながら攪拌し、均一な溶解液を作る。溶解液より適量を8連ピペットマンにて採取し、化合物と共に冷蔵庫に収納していた200μlの細胞培養液(96穴プレートに用意)へ添加する。8連ピペットマンを用いてピペッティング操作により溶液を均一に混合する。添加後、DMSOに溶解した化合物のプレートは冷蔵庫へ保管する。次に、上述の通り散布した細胞(96穴丸底、平底)をCO<sub>2</sub>インキュベーターから取り出し、調整した化合物含有の細胞培養液50μlを各ウェルに添加する。添加後、細胞培養96穴プレートはCO<sub>2</sub>インキュベーターへ収納し培養を行う。最大で4バッチの施行が可能であり、2バッチ目以降は、化合物を取り出し希釈するところから繰り返して施行する。

### 3) 細胞増殖の定量化

目的の期間、細胞をインキュベートした後、Cell Titer Glo 細胞増殖アッセイキット(Promega社)を使用し、発光強度により細胞増殖を定量化する。

### 4) 倫理面の配慮

現時点ではヒト臨床検体の使用はないが、ヒト正常iPSC、疾患iPSCに対して化合物ライブラリーを用いたハイスループットの分化、増殖アッセイについては大学倫理委員会の承認を得た上で実施する。使用するiPSCは、インフォームドコンセントを十分に行った上で供与された細胞を用いて誘導する。

## C. 研究結果

上記、研究方法の記載通り、プロトコール構築、

ロボットへのティーチング及びチューニングを通して、細胞を用いたハイスループットスクリーニング系を確立した。実際に抗癌剤(アドリアマイシン)を用いたアッセイ結果を示す(図3)。4バッチ(丸底、平底各4枚ずつ)施行したが、バッチ内、バッチ間の両者において細胞は均一に散布できており(アドリアマイシン未添加群では有意差なし)、アドリアマイシンの抗腫瘍活性も観察された(未添加群との比較: Student's t-test で  $p < 0.005$ )。さらに、重要な点はこれまで各ウェルの観察において細菌、カビなどの感染事故は起こっておらず、清潔操作に関

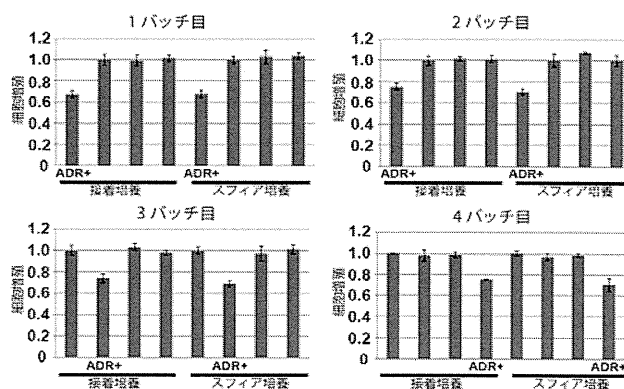


図3 4バッチを施行した際の骨肉腫幹細胞増殖の比較。ロボットにより細胞を散布、アドリアマイシン(ADR) 240 ng/mlを添加(1列8ウェル)後、2日間培養した。12列のうち添加列より3または4ウェル、非添加列より4ウェルを抽出し細胞増殖の定量化を行い平均を取った。

して問題なく行ける状況である。

## D. 考察

汎用性ヒト型双腕ロボットは、ヒトの動きを精緻に模倣してあらゆる動きが可能である。プログラミングとティーチングにより比較的容易に用途変更ができる可塑性の高さから、自動車産業を始め様々な用途に活用されている。これまで、細胞を散布するハイスループットの機器は既に存在するが、汎用性ヒト型双腕ロボットによる細胞を用いたハイスループットアッセイ系の構築は世界発である。

本研究では実際のがん幹細胞を用いてスフィア形成能を阻害する化合物を抽出するアッセイ系を確立した。スフィア形成能はがん幹細胞のみならず一部の正常幹細胞において自己複製能を測る重要な指標となり(*Int. J. Cancer* 132: 1249-1259, 2013)、幹細胞の評価系で汎用されている。即ち、本研究から今後抽出されるヒット化合物からスフィア形成能に関する詳細な分子機構を解明してゆく

研究の流れは、再生医療において幹細胞の効率的な増殖の点において貢献するものと考えられる。図 3 に結果を示したスフィア形成条件、細胞接着条件においてアドリアマイシンは増殖抑制効果に差を示さなかった。このことは、アドリアマイシンがスフィア培養下での特異的阻害作用を示す化合物ではないことを意味する。

本研究を通じて、このロボットが清潔操作、正確性、再現性が高度に求められる細胞培養アッセイに大変適していることが証明された。現在準備中のヒト正常 iPSC、疾患 iPSC を用いた分化、増殖アッセイへの移行も微調整によって容易に行えるものとする。本プロジェクトの遂行により、創薬分野のみならず工学の発展にも寄与できると考える。

## E. 結論

汎用性ヒト型双腕ロボットを用いてハイスループットの細胞スクリーニング系を開発した。細胞操作を正確、再現性良くかつ清潔に施行することができ、今後、既存薬を用いたスクリーニングに対応することが可能となった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takenouchi T, Shimizu A, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Saya H and Kosaki K: Multiple cafe' au lait spots in familial patients with MAP2K2 mutation. *Am J Med Genet* 164: 392-396, 2014

### 2. 学会発表

- 1) 佐谷秀行: がん幹細胞を標的とした治療薬開発の現状と課題。第3回がん新薬開発合同シンポジウム。11/29/2013、ステーションコンファレンス東京、東京

## G. 知的財産権の出願・登録状況(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。

腎・泌尿器系の稀少遺伝性疾患の原因遺伝子群の網羅的解析系の開発

研究分担者 小崎 健次郎 慶應義塾大学医学部 臨床遺伝学センター 教授

研究要旨

本研究全体の目標は、神経疾患特異的iPS細胞を用いた効率的な創薬システムの構築と高スループット化を行うことである。iPS細胞については継代に応じて細胞に徐々に変異が蓄積することが知られており、創薬研究対象とする患者細胞の性質の明確化・均質化はプロジェクトの成功のために必須のプロセスといえる。遺伝子変異部位の確認を行うために、次世代シーケンサー等による網羅的なスクリーニングのあと、異常の疑われる部位についてサンガー法で確認を行う。今年度は網羅的なスクリーニングのための方法として、体細胞変異を検出するための手法を確立した。

A. 研究目的

本研究全体の目標は、神経疾患特異的iPS細胞を用いた効率的な創薬システムの構築と高スループット化を行うことである。iPS細胞の作成時・継代時・分化誘導時に細胞に徐々に遺伝子変異が蓄積することが知られている。創薬研究を行う場合、患者細胞への遺伝子変異の蓄積の有無および程度を明確化することは、臨床応用を前提として均質な細胞を得るためには必須のプロセスといえる。特にiPS細胞はがん化により大きく性質を変えると懸念されるため、ガン関連遺伝子の蓄積についてプロファイリングが必要と考えられる。

本年は次世代シーケンサーを用いて、培養時の遺伝子変異の蓄積を網羅的に把握するための手法を開発した。

B. 研究方法

一般に入手可能な神経線維腫症患者由来の細胞株XとX由来にて著明な増殖能を獲得した細胞株Yをヌードマウスに移植し、増殖した細胞のゲノムDNAを抽出し、4800の既知ヒト疾患関連遺伝子の変異を網羅的に同定した。Yに存在し、Xに存在しない遺伝子変異を抽出することのためのプログラム群の導入と比較をおこなった。

ゲノムDNAを断片化したのち、TruSightOneキット（イルミナ社）を用いてヒト疾患との関連が報告されている全4800遺伝子の翻訳領域のゲノムDNAを回収した。次世代シーケンサーMiSEQ（イルミナ社）を用いて得られた粗配列を、プログラムBWAを用いて、ヒト参照配

列hg19に整列させた。Picardを用いて重複配列を除去し、GATKで再配列してbam形式・vcf形式の出力ファイルを得た。vcf形式のファイルに対してSnPEffおよびannovarでアノテーションを行った。

体細胞変異の有無を検出するため、bam形式の出力ファイルを2種のプログラム（MuTect, Strelka）により比較検討した。MuTectはBroad Institute, StrelkaはStrelka Instituteが開発したプログラムである。

MuTect

Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, Gabriel S, Meyerson M, Lander ES, Getz G. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. Nat Biotechnol. 31:213-9, 2013. <http://www.broadinstitute.org/cancer/cga/mutect>

Strelka

Saunders CT, Wong WS, Swamy S, Becq J, Murray LJ, Cheetham RK. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. Bioinformatics. 28:1811-7, 2012. <ftp://strelka@ftp.illumina.com>

Linuxオペレーティングシステムの環境下で32コアCPU・メインメモリー200GB超を有するサーバーを用いてパフォーマンスを検討した。得られた変異について、variant toolsを用いてアノテーションを行い、包括的に比較した。San Lucas FA1, Wang G, Scheet P, Peng B.



Integrated annotation and analysis of genetic variants from next-generation sequencing studies with variant tools. San Lucas FA1, Wang G, Scheet P, Peng B. *Bioinformatics*. 28:421-2, 2012.  
<http://varianttools.sourceforge.net>

得られた遺伝子変異のリストのうち、タンパク翻訳領域内の遺伝子変異のみについて体細胞遺伝子変異の有無と質を評価した。アノテーションにあたっては、COSMICデータベース Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer <http://cancer.sanger.ac.uk/> を用いた。

#### (倫理面への配慮)

入手可能なヒト細胞株を用いた検討のため、ゲノム指針の適応とならない。患者検体を用いた解析はヒトゲノム指針に従い、慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得て解析を行った

### C. 研究結果

1検体あたりの計算時間はMuTectで、約8時間で終了した。Strelkaの計算速度は、使用するCPUコア数に完全に依存した。28コア使用時には5分程度で計算を終了することができた。

一塩基置換について検討したところ、MuTectとStrelkaの両方で検出しえた変異が15個認められた。そのうちの1個は、NF1原因遺伝子と同一のパスウェイに属する遺伝子で、細胞の形質の変化との関連が強く示唆された。MuTectのみで検出し得た変異が1個、Strelkaのみで検出し得た変異が5個であった。Strelkaのみで検出された5個の変異のうち2個について次世代シーケンサーのリードを目視で確認したところ擬陽性と考えられた。

Strelkaの使用により、4800遺伝子中、1遺伝子について欠失を同定することができた。われわれは昨年、MuTectを用いて、Simpson-Golabi症候群患者の末梢血ゲノムDNAと当該患者に発症した肝芽腫のゲノムDNAを比較し、肝細胞ガンの発症に関与するβカテニン体細胞変異を同定・報告している。今回、Strelkaで再解析し、βカテニンの変異を再確認し得た。Strelkaによって欠失の有無をスクリーニングしたが、欠失を認めなかった。

### D. 考察

前述のごとく、MuTectは一塩基置換の検出に特化したプログラムであり、欠失・重複(indel)の検出は不能である。iPS細胞に発生する体細胞変異にはindelも含まれている。この

ためMuTect単体による検討では不十分なスクリーニングとなる。

一塩基置換については、MuTectよりもStrelkaの方が多くの変異が同定された。すなわち、今回使用したパラメータでは、MuTectの特異度が高く、Strelkaの感度が高いともいえる。Strelkaのみで検出された2個の変異部位については、Xにもごく少数、変異アレルと同じアレルが存在していた。MuTectはデフォルトで「正常対照」に設定したサンプルに変異アレルが認められた場合は、少量(‘alternate allele in normal’)であっても、その変異を無視する仕様になっている。Strelkaのみで検出された2個の変異についても、alternate allele in normalが認められた。

文献上、iPS細胞を作成するオリジナルの細胞のゲノムDNAに変異がわずかに(数パーセント)存在し、同じ変異が作成後のiPS細胞にヘテロ接合体(50%)として検出される場合が報告されている。オリジナルの細胞群に既に体細胞変異を有する細胞がモザイクの状態が存在し、正の淘汰を受けた可能性が推測される。このような状況を検出するためには、MuTectのデフォルトの‘alternate allele in normal’オプションを外すがまたはStrelkaを用いた解析が必要と考えられる。

本研究の目的は、前述のごとくiPS細胞のハイスループットスクリーニングである。Strelkaは、マルチコア環境下での並列処理を可能としたプログラム構成となっており、32コアCPU下では、30ジョブ(15細胞の解析に相当)を同時に分析可能であり、3プログラムでは1細胞あたりの計算時間は最短となる。スループットを重視するスクリーニング環境下では、Strelkaの単体使用を、さらに精度を重視する場合は、StrelkaとMuTectの併用が進められると考えられた。

一般にMuTectは体細胞変異を有する細胞の割合が低い場合にも、感度・特異度が維持されるとの利点の報告がある。iPS細胞の細胞塊についても変異を有する細胞と変異を有しない細胞がモザイクとして混在する状況は十分想定される。したがって、変異を有する細胞の割合が低い場合にはMuTectの仕様が望まれる。今回の研究では、変異を有する細胞の割合が低い場合のMuTectとStrelkaのパフォーマンスの比較を行っておらず、今後の検討課題と考えられた。

### E. 結論

iPS化時に発生する点突然変異の検出には、計算時間と感度の両方からは計算プログラム



Strelkaの使用が最も適していると考えられた。計算資源や時間に余裕があれば、MuTectを併用すべきと考えられた。本研究の実施を通じて、ハイスループットスクリーニングのためのパイプラインを構築することができた。スループットに応じて、使用するプログラムを適宜組み合わせ使用する計画である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Kosaki K. Somatic CTNNB1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation. Am J Med Genet, in press

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

【代表研究者：岡野栄之】

発表者名	論文タイトル名	発表誌	巻・号	ページ	出版年
Okano H, Nakamura M, Yoshida K, Okada Y, Tsuji O, Nori S, Ikeda E, Yamanaka S, Miura K.	Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells.	Circulation Research	112・3	523-533	2013
Nishimoto Y, Nakagawa S, Hirose T, Okano HJ, Takao M, Shibata S, Suyama S, Kuwako K, Imai T, Murayama S, Suzuki N, Okano H	The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis.	Mol. Brain	6・31	1-18	2013
Iwanami A, Gini B, Zanca C, Assuncao A, Nael A, Dang J, Yang H, Zhu S, Kohyama J, Kitabayashi I, Cavenee WK, Cloughesy TF, Furnari TF, Nakamura M, Toyama Y, Okano H, Mischel P.	PML mediates Glioblastoma resistance to mTOR-targeted therapies.	Proc.Natl.Acad.Sci.US A	110・11	4339-4344	2013

発表者名	論文タイトル名	発表誌	巻・号	ページ	出版年
Fukuda T, Takeda S, Xu R, Sato T, Bando W, Ochi H, Sunamura S, Fujita K, Shinomiya K, Okano H, Kimura A, Enomoto M, Okawa A, Itoh H.	Sema3A regulates bone mass accrual through sensory innervations.	Nature	497・ 7450	490-493	2013
Takeuchi K, Yoshioka N, Higa Onaga S, Watanabe Y, Miyata S, Wada Y, Kudo C, Okada M, Ohko K, Oda K, Sato T, Yokoyama M, Matsushita N, Nakamura M, Okano H, Sakimura K, Kawano H, Kitagawa H, Igarashi M.	Chondroitin sulphateN-acetylgalactosa minyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury.	Nat Commun.	4・2740	1-11	2013

発表者名	論文タイトル名	発表誌	巻・号	ページ	出版年
Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K	Increased L1 Retrotransposition in the neuronal genome in Schizophrenia.	Neuron	81・2	306-313	2014
Imizumi Y, Okano H.	Modeling human neurological disorders with induced pluripotent stem cells.	J Neurochem.	epub ahead of print	epub ahead of print	2013
Naka-Kaneda H, Nakamura S, Igarashi M, Aoi H, Kanki H, Tsutsumi S, Aburatani H, Shimazaki T and Okano H	The miR-17/106-p38 axis is a key regulator of the neurogenic-to-gliogenic transition in developing neural stem/progenitor cells.	Proc.Natl.A cad.Sci.US A	111・4	1604-1609	2014