

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、エピゾーマル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。

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針

臨床研究に関する倫理指針

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、個人情報の保護に関する法律、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。

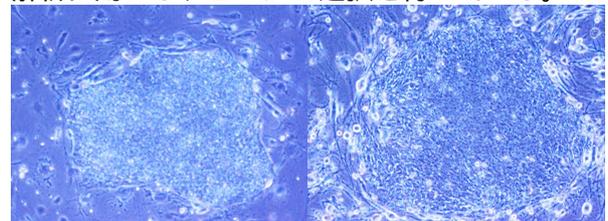


図1. 患者由来iPS細胞 患者の母由来iPS細胞

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）。

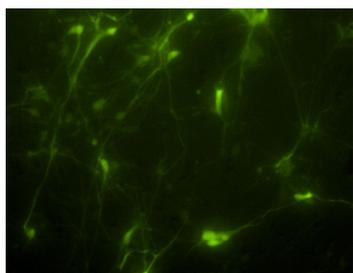


図2. 運動ニューロンの可視化

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口ポット「まほろ」を用いて実施するための実験プロトコールの作成、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 café 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 iPS cell 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: iPS 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 iPS cells-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。