

201335024A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究(再生医療関係研究分野)

疾患由来 iPS 細胞を利用した
難治性疾患の創薬研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 門脇 孝

平成26(2014)年5月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

疾患由来 iPS 細胞を利用した
難治性疾患の創薬研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 門脇 孝

平成26（2014）年 5月

目 次

I. 総括研究報告書		
研究総括	門脇 孝	5
II. 分担研究報告書		
1. 悪性神経膠腫手術検体よりの脳腫瘍幹細胞 primary culture の樹立	齊藤 延人	17
2. 疾患由来 iPS 細胞を利用した難治性疾患の創薬研究	高戸 毅	22
3. 悪性リンパ腫・多発性骨髄腫・良性疾患由来 iPS 細胞を用いた新規治療薬の開発	黒川 峰夫	26
4. iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いたヒト三次元心筋組織の再生と移植の可能性	小野 稔	31
5. 疾患由来 iPS 細胞からの脂肪細胞・膵β細胞分化と創薬研究	山内 敏正	35
6. 疾患由来 iPS 細胞を利用した難治性疾患の創薬研究	星 和人	42
7. 心血管細胞への分化誘導と創薬に関する研究	森田 啓行	45
8. 研究倫理・臨床倫理上の検討	瀧本 禎之	48
9. iPS 細胞の樹立と創薬の基盤研究	今井 浩三	50
10. 疾患由来 iPS 細胞を用いた難病研究を支える基盤体制の整備	大津 真	53
11. iPS 細胞用臍帯血細胞の提供と保存	長村 登紀子	56
12. 免疫・血液系希少疾患由来 iPS 細胞を利用した創薬研究	東條 有伸	62
13. 樹立 iPS 細胞の遺伝子、miRNA、エピジェネティクスなどの分子基盤の解析	渡邊 すみ子	66
14. iPS 細胞から機能的な肝臓・膵臓細胞への分化誘導系の開発	宮島 篤	68
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		71
IV. 研究成果の刊行物・別刷		93

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
「疾患由来 iPS 細胞を利用した難治性疾患の創薬研究」総括研究報告書

研究総括

研究代表者：門脇 孝

（東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科教授）

研究要旨

iPS 細胞はさまざまな疾患の原因解明、特に、適切な動物モデルがなく患者数が非常に少ないために臨床研究を進めにくい希少難病疾患の病態解明や新規治療法の開発に役立つ可能性がある。そこで本研究では患者から非侵襲的に大量の罹患組織を採取することが困難な難病疾患等について、iPS 細胞を経て分化細胞やがん幹細胞を大量に得られるメリットを活かして病態研究や治療開発を行うことを目的とする。そのため iPS 細胞化技術の最適化によって効率的に疾患由来 iPS 細胞を樹立する取り組みを進め、ゲノムへの外来遺伝子の組み込みがなく形質転換などのリスクが最小限に抑えられた疾患由来 iPS 細胞の樹立技術を確立した。さらに、多能性幹細胞としての品質評価法、創薬研究に向けたフィーダーフリー培養系の整備を行った。また、ゲノム倫理審査の承認を受け、拠点全体で倫理面等の不備なく共同研究が推進できるよう基盤整備を行った。臍帯血と臍帯の採取・調製・凍結保管・提供システムを構築し、1 例 21trisomy 児の検体を得た。また本研究の枠組みにおける一つの研究拠点として、東京大学医学部附属病院内に幹細胞創薬研究室を創設し、その運営を開始した。また、ヒト、マウス iPS 細胞に特異的な miRNA 発現パターンを把握し、あるキナーゼがマウス iPS 細胞の樹立効率を著しく上げることを明らかにした。平成 25 年度には上記のような基盤整備が完了し、血液、脳神経、心臓、代謝、骨・軟骨の各領域で疾患検体を用いた iPS 細胞樹立の試みを開始し、すでに t(8;9)転座型白血病および低リスク骨髄異形成症候群、脳腫瘍患者の腫瘍細胞から iPS 細胞を樹立することに成功した。また、t(8;9)転座型白血病および脳腫瘍由来 iPS 細胞から血液細胞に分化誘導した際には疾患や腫瘍幹細胞の特性を示すこと、腫瘍原性を保持することが培養系やマウスモデルの系で示された。さらに、白血病由来 iPS 細胞から分化させた血球細胞はチロシンキナーゼ阻害薬により増殖が抑制されることを示し、この結果から iPS 細胞は疾患の病態解析と創薬開発に有効であることが示唆された。また、循環器領域、代謝領域では iPS 細胞樹立の対象として適切な症例を選ぶため、遺伝性疾患患者の遺伝子変異スクリーニング等を行い、対象疾患に絞り込んだ。肝臓と膵臓の細胞をヒト iPS 細胞から分化誘導し創薬研究に利用可能な系を開発することを試みた。またオミクス解析を駆使した病態研究や創薬研究の標的同定のための基盤技術として ChIP-seq および FAIRE-seq の解析の系を確立した。骨・軟骨領域では、軟骨無形成症に焦点を当てて研究を進めた。軟骨無形成症の原因は FGFR3 の恒常的発現であることから、FGFR3 の恒常的発現変異を有するヒト iPS 細胞を gene editing 技術で作製し、FGFR3 の遺伝子発現量の比較や下流シグナルの評価を行った。研究倫理・臨床倫理上の検討において、市民は iPS 細胞を利用した医学研究、とりわけ難病のための治療薬の開発に期待を寄せていることが明らかとなった。本研究によって様々な難治性疾患の病態解明や治療法の開発が期待され、さらに難治性疾患をモデルとした一般的な慢性疾患の治療法開発にもつながる可能性がある。高品質な疾患特異的 iPS 細胞をバンク化し配布可能とすることで、今後は民間企業をも巻き込んだ創薬研究の発展が期待される。

分担研究者

斉藤 延人	東京大学・脳神経外科 教授
高戸 毅	東京大学・口腔外科・再生医療 教授
黒川 峰夫	東京大学・血液・腫瘍内科 教授
小野 稔	東京大学・心臓外科 教授
山内 敏正	東京大学・糖尿病・代謝内科 講師
星 和人	東京大学・軟骨再生医療 特任准教授
森田 啓行	東京大学・循環器内科 特任准教授
瀧本 禎之	東京大学・医療倫理学・心身医学 准教授
今井 浩三	東京大学・抗体・ワクチン治療 特任教授
大津 真	東京大学・幹細胞治療 准教授
長村 登紀子	東京大学・血液免疫学・細胞プロセスとバンキング 講師
東條 有伸	東京大学・幹細胞治療 教授
渡辺 すみ子	東京大学・再生基礎医科学・幹細胞学 特任教授
宮島 篤	東京大学・発生再生研究 教授

A. 研究目的

iPS 細胞はさまざまな疾患の原因解明、特に、適切な動物モデルがなく患者数が非常に少ないために臨床研究も進めにくい希少難病疾患の病態解明や新規治療法の開発に役立つ可能性がある。東京大学では疾患特異的 iPS 細胞を用いた造血器腫瘍分子病態の解明を行っているほか、疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究(JST)の枠組みの中で造血障害班などの難病研究班が拠点や製薬企業と共同研究グループを形成し、効率的に創薬研究を推進する体制を構築しつつある。東京大学は 21 万を超える化合物を有する公的化合物ライブラリー(創薬オープンイノベーションセンター)を有しているほか、これまでの COE プログラムで医学・薬学融合型の研究拠点が形成されている。さらに、東京大学は橋渡し研究加速ネットワークプログラム(文科省)実施機関の一つで、基礎研究の成果を臨床に展開するさまざまな取り組みが支援されてい

る。このような豊富な iPS 細胞取り扱い経験と支援環境を生かして創薬研究を更に推進するため、厚生労働「iPS 細胞を利用した創薬研究支援事業」にて「幹細胞創薬研究室」「医科学研究所ステムセルバンク」を中心とする拠点を整備した。この拠点で、患者から非侵襲的に大量の罹患組織を採取することが困難な骨・軟骨系難病疾患、代謝系難病疾患などについて、iPS 細胞を経て分化細胞を大量に得られるメリットを活かして病態研究や治療開発を行うことを本研究の目的とする。腫瘍性疾患についても、がん幹細胞に相当する細胞を大量に入手できるメリットを活かすことができる。

B. 研究方法

平成 25 年度前半には、東大病院では斉藤、星各分担研究者、医科研では大津、東條、長村各分担研究者が、①保存用液体窒素タンクと 2 次元コードシステム等の施設整備、②細胞保存に適した容器と条件の確認、③連携機関との検体受領体制整備、データベース構築、④標準業務手順書の整備とスタッフ教育、⑤関連部門との業務分担体制構築、⑥検体受け入れに関する広報活動、を行う。データベース構築にあたっては、瀧本分担研究者らの検討に基づき、倫理的な配慮のもとでドナー情報や細胞プロセッシング履歴などのデータを記録する。同 25 年度後半には他機関からの検体の受付を開始し、東大病院、医科研病院の連携医療機関や、橋渡し研究加速ネットワークプログラムの拠点機能等を通じて学外からの検体を収集する。

検体の受け入れが始まり次第、疾患由来 iPS 細胞の樹立を行う。東大病院では黒川分担研究者、医科研では大津分担研究者を中心に、エピゾーマルベクター等を用いて行う。iPS 細胞特性を確認し、十分なロットの細胞を保存する。次に、iPS 細胞から各系統への分化誘導系を確立する。心筋細胞へは小野・森田分担研究者、骨芽細胞・破骨細胞・軟骨細胞へは高戸分担研究者、星分担研究者、造血細胞へは黒川、大津各分担研究者、隣β

細胞・脂肪細胞・肝細胞へは山内、宮島各分担研究者を中心に行う。同一患者由来の iPS 細胞でもクローン間で分化能に差が認められるので、分化能の高いクローンを以後の研究に用いる。平成 26 年度末までに造血、代謝、骨・軟骨、心臓の各領域について、1 つ以上の疾患について複数の患者由来 iPS 細胞を樹立し、そこから目的組織への分化誘導の系を確立することを目標とする。分化誘導に伴って、疾患の分子生物学的特性が細胞に現れることが多い。疾患 iPS 細胞由来の各組織細胞を用いてその十分な細胞量を活かしたトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどのオミクス解析を行って疾患病態を多角的に追究し、創薬ターゲットを同定する。

将来的には基盤が整った領域から創薬オープンイノベーションセンターを利用した創薬研究を開始する。標的のシグナルやタンパク質が同定されていれば蛍光タンパク質やレポーター遺伝子の安定発現株が有用である場合が多いので、それらを作製し、発光や蛍光、蛍光偏光(FP)、蛍光タンパク質の局在、蛍光エネルギー転移反応(FRET)などを指標にスクリーニングを行う。また、細胞膜タンパク質が標的として同定されれば抗体の効果を検証するほか、膜輸送体やシグナル伝達タンパク質が標的として同定されれば構造解析による阻害剤の *in silico* 設計の可能性を追究する。標的が同定されない場合は、ランダムスクリーニングとして 9,600 種の代表的化合物から成る Core Library を活用し、細胞生存・増殖、遊走、サイトカイン分泌、イオン濃度、ATP 活性などをエンドポイントとしてスクリーニングを行う。具体的には、代謝領域ではミトコンドリア病の疾患特異的 iPS 細胞を作製し、その ATP 産生障害を介した病態形成機構の解明やその知見の糖尿病など common disease への還元を図るほか、家族性高コレステロール血症や、膵機能低下における非アルコール性脂肪肝/脂肪肝炎などを対象とする。血液領域では、骨髄増殖性腫瘍、および難治性疾患克服研究事業

「特発性造血障害に関する調査研究班」と一部連携して、関連の疾患細胞を用いる。血液腫瘍の研究では、特に未分化ながん幹細胞分画の細胞を特異的に抑制する化合物を探索する。また、心・血管領域では心筋症などを対象とする。

(倫理面への配慮)

幹細胞医療研究の倫理支援は赤林朗教授を委員長とする「医学系研究科倫理委員会」、武藤教授を室長とする「研究倫理支援室」が対応し、研究計画と説明同意文書のチェックや実地調査等を行っている。臨床試験は山崎力教授をセンター長とする「臨床研究支援センター」、長村文孝教授を室長とする「臨床試験管理推進室」が対応し、プロトコルと説明同意文書のチェックや体制整備及び規制対応を行っている。これらは連携して基礎から臨床までの一貫した支援体制を構築しており、ヒト幹細胞臨床研究審査委員会、倫理審査委員会、ゲノム審査委員会等の委員会の運営支援を行っている他、再生医療ハイウェイにおける再生医療倫理相談窓口の運営にも参画している。各委員会は外部機関からの倫理申請も受け付けており、個人情報保護に関しても所内で規定を設けている。医科研病院では臨床試験実施時には、被験者への説明と理解状況の確認に重点をおいたコーディネーターを配置し、心理状況を適切に把握するために外部から先端医療に通じた臨床心理士(大木桃代文教大学教授)にも適宜患者面接を行っている。以上のような対応により、研究対象者の人権に配慮し、同意撤回の自由を保護し、それによる不利を受けないことを保証する。

動物実験は各組織の動物実験委員会が研究の審査を行い、動物実験施設と共に動物愛護を含めた実験講習を実施し、研究内容の確認も行った。また動物実験の自己点検・評価を行い、東京大学本部ライフサイエンス研究倫理支援室と内容の確認を行った。

C. 研究結果

iPS 細胞は、様々な疾患、特に適切な動物モデルがなく臨床研究も進めにくい希少難病疾患の病態解明や新規治療法の開発に役立つ可能性を持つ。本研究事業では血液、脳神経、心臓、代謝、骨・軟骨などの難治性疾患について、iPS 細胞から得た十分量の分化細胞を用いて創薬研究を行うことを目標とする。平成 25 年度は主に検体収集の基盤整備および各領域において疾患由来 iPS 細胞の樹立技術、分化誘導技術の確立に取り組んだ。

血液領域では、iPS 細胞化技術の最適化によって効率的に造血器疾患由来 iPS 細胞を樹立する取り組みを進め、センダイウイルスベクター (CytoTune™-iPS) やエピゾーマルベクター (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL) を用いた iPS 細胞樹立法を導入し、ゲノムへの外来遺伝子の組み込みがなく (Science. 324:797-801, 2009)、形質転換などのリスクが最小限に抑えられた疾患由来 iPS 細胞を樹立することに成功した。また、末梢血細胞からエピゾーマルベクターを用いた樹立の最適条件の検討を行ったところ、前培養は 2 日間 SCF、IL3、GM-CSF、TPO 添加して行い、5%O₂ 低酸素培養条件でブチル酸、ロックインヒビターなどの小分子化合物を付加することにより樹立の効率が上昇することを確認した。また、エピゾーマルベクターでは CD34 陽性細胞のみならず、単球、B リンパ球に遺伝子導入することが可能である、末梢血の単球にエピゾーマルベクターを (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL) を用いて iPS 細胞を樹立させる系を確立した。さらに、多能性幹細胞としての品質評価法、創薬研究に向けたフィーダーフリー培養系の整備を行った。また、ゲノム倫理研究計画書を新規に作成し承認を受け、拠点全体で倫理面等の不備なく共同研究が推進できるよう基盤整備を行った。t(8;9)転座型白血病は極めて稀な白血病であり、その希少さゆえに、造血細胞移植以外有効な治療法は分かっていない。t(8;9)転座

型白血病患者 (Yamamoto, Ebihara et al: Leuk & Lymph, 2013) の血液腫瘍細胞から iPS 細胞を樹立した。この iPS 細胞から血液細胞を分化誘導すると、マクロファージの異常増殖が認められ、これがこの疾患の本体であると考えられた。また、imatinib はマクロファージ増殖を抑制できなかったが、ponatinib などの tyrosine kinase inhibitor は有意にマクロファージ増殖を抑制できた。これらの結果から、この iPS 細胞は疾患の病態解析と創薬開発に有効であると考えられた。また、医科学研究所ステムセルバンクと共同研究を行い、センダイウイルスベクターを用いて低リスク骨髄異形成症候群 (MDS-RCMD) 患者骨髄 CD34 陽性細胞由来の iPS 細胞株の樹立に成功した。

脳神経領域では平成 25 年度は、4 人の患者検体より脳腫瘍幹細胞株の樹立に成功した。続いて、樹立された細胞株が、脳腫瘍幹細胞の特性を持っているかを確認した。幹細胞培地にて sphere を形成し、継代を重ねても sphere 形成を常に維持し続けることを確認した。継代が 20 回以上安定して可能であることを確認して、無限増殖能も確認した。さらにこれらの細胞株をヌードマウスの脳に移植し、脳内に腫瘍を形成して腫瘍死させることで、腫瘍原性を確認した。さらに、脳腫瘍間細胞株を血清入り培地にて分化させ、GFAP、NeuN、O4 抗体による免疫染色にて、多分化能を有していることを確認した。腫瘍幹細胞より mRNA を抽出し、real time PCR にて幹細胞マーカーである CD133、nestin、sox2 等の発現が上昇していることを確認した。

心臓領域ではヒト皮膚線維芽細胞由来の iPS 細胞を心筋に分化誘導させた。この iPS 細胞由来心筋細胞を温度応答性培養皿で細胞シートを作製した。この細胞シートをヌードラット皮下で積層化して 3 次元構造を有するヒト心筋組織の再構築を試みた。移植ヒト iPS 心筋細胞シートは全体が同期した拍動を認め組織学的にも機能的血管網を伴う心筋組織であり、段階的に積層化することで組

織を厚くできた。また時間経過で心筋組織が成熟していくことを確認した。さらにこの組織を吻合可能な栄養動静脈とともに摘出し、血管吻合による別個体への移植にも成功した。また、iPS 細胞樹立の対象として適切な症例を選ぶため、遺伝性循環器疾患患者の遺伝子変異スクリーニングをおこなった。iPS 細胞樹立技術、心筋細胞分化誘導技術についても検証をおこなった。多分化能を有する良質な iPS 細胞を樹立することができた

代謝領域における疾患特異的 iPS 細胞作製に関して、遺伝的な異常が想定される ApoCII 欠損症患者、後天性の脂肪織炎を伴う脂肪萎縮性糖尿病、MODY の罹患患者を対象疾患に絞り込んだ。また疾患特異的 iPS 細胞由来の各組織細胞の網羅的な転写解析やエピゲノム解析などのオミクス解析を駆使した病態研究や創薬研究の標的特定のための基盤技術として ChIP-seq および FAIRE-seq の解析の系を確立した。また、代謝の中心である肝臓と膵臓の細胞をヒト iPS 細胞から分化誘導し創薬研究に利用可能な系を開発することを試みた。肝細胞は単独での肝機能の発現・維持が難しいことから、肝非実質細胞との共培養系の樹立に向けて肝中皮細胞の肝機能発現に対する効果を検討し、有効性が示された。また、膵臓分化誘導系においては、ヒト iPS 細胞から膵臓系にコミットした細胞を PDX1 の発現を指標として分離することができ、分化誘導系の高効率化が期待された。

骨・軟骨領域では、代表的な骨・軟骨疾患である、軟骨無形成症に焦点を当て、研究を進めた。軟骨無形成症の原因は FGFR3 の恒常的発現であることが判明しているため、FGFR3 の恒常的発現変異を有するヒト iPS 細胞を、gene editing 技術で作製した。また、軟骨無形成症患者細胞由来の iPS 細胞を作製する目的で、末梢血由来 T 細胞の培養技術を確立した。さらに、軟骨無形成症発症の機序を解析するため、FGFR3 について遺伝子発現量をヒトの iPS 細胞、間葉系幹細胞、耳介軟骨細胞、関節軟骨細胞に関して比較した。次に、FGFR3

の下流シグナルである、p38、ERK、STAT 及び、それぞれのリン酸化タンパクの発現量を同様に比較検討した。

臍帯血は、増殖力の高い造血幹細胞や naive リンパ球を含み、最も未熟な体細胞であり、ドナーへの肉体的負担のないため iPS 細胞のソースとして注目されている。また同時に採取できる臍帯からは間葉系幹細胞および iPS 細胞ソースとして有用と思われた。今年度は、臍帯血と臍帯の採取・調製・凍結保管・提供システムを構築し、1例 21trisomy 児の検体を得た。ヒト、マウス iPS に共通、特異的な miRNA 発現パターンを把握した。現在注目しているキナーゼがマウス iPS の樹立効率を著しくあげることが明らかになった。技術基盤として、RNA sequene, ChiP sequence, DNA methylation などが再現よく、解析が可能になった。眼科領域の遺伝性疾患について、iPS 樹立をおこなう前段階として、マウス網膜を用いた基礎研究をおこない、遺伝子の役割について検討した。本研究の枠組みにおける一つの研究拠点として、東京大学医学部附属病院内に幹細胞創薬研究室を創設し、その運営を始めた。

研究倫理・臨床倫理上の検討において、iPS 細胞を利用した医学研究に対する市民の意識を調査した。その結果、iPS 細胞を利用した医学研究に関して、市民はとりわけ難病のための治療薬の開発に期待を寄せていることが明らかとなった。また、当事者は特に、iPS 細胞を利用した医学研究への期待が高いことが明らかとなった。

D. 考察

本研究事業の成果としては、下記の 3 点が期待される。

① 希少疾患や腫瘍などの疾患特異的 iPS 細胞は創薬研究上極めて貴重である。高品質な疾患特異的 iPS 細胞を配布可能とすることで、通常それらを用いることが難しい企業とも連携した創薬研究の発展が期待できる。再生医療以外にも iPS 細胞

の有用な臨床利用法を示すことで、企業による iPS 細胞の利用全体が促進され、産業化の可能性が高まることが期待される。

② 厚労省難治性疾患克服研究事業の対象疾患の病態解明や治療法の開発につながる可能性がある。これらの疾患の治療法開発は、患者の QOL 向上や生命維持に貢献するほか、遺伝性で罹患期間の長い疾患が多いため医療経済的にも効果がある。また、程度の差はあっても、希少疾患に認められる分子病態が一般的な慢性疾患にも認められるケースはしばしば存在すると考えられる。従って、希少難病疾患をモデルとして開発された治療法が幅広い患者に有効である可能性があり、その点で潜在的に多大な経済効果や医療への貢献をもたらす可能性がある。

③ ヒト iPS 細胞の安全で効率的な保存方法や分析・評価方法、ベクター発現細胞株作製方法、分化誘導法などの技術が整備され、品質の安定化が進むことが期待される。iPS 細胞由来の分化細胞は現在セルベースアッセイに頻用されている細胞株よりも生理的な状態に近く、真のヒット化合物を効率的に発見できることが期待される。

今後さらに疾患由来 iPS 細胞を用いた研究の可能性を追究していくためには、相互の情報交換を通じて限られた時間の中で効率よく各領域の研究を推進する必要があると考えられる。また、疾患由来 iPS 細胞が疾患の病態をどれほど反映するのか、各領域でより詳細に検討し、今後の病態解明に基づいた創薬研究の基盤とする必要があると考えられた。

血液領域では血液領域では、iPS 細胞化技術の最適化がほぼ完了したため、この手法を用いてさまざまな血液疾患、特に疾患由来 iPS 細胞を用いた病態解明の意義が高いと考えられる悪性リンパ腫・多発性骨髄腫・良性疾患を中心に疾患由来 iPS 細胞の樹立を進める。平成 25 年度に確立した iPS 細胞関連技術、特にフィーダーフリー培養系は未経験者にも導入しやすく、今後積極的に拠点内共

同研究者への技術提供を行う。また、共同研究者からの依頼に応じ当該研究対象疾患に由来する iPS 細胞樹立を行う。また、さらなる病態生理を明らかにし、それとともに新しい治療法の開発に努める。低悪性度骨髄異形成症候群 (MDS) 由来の iPS 細胞の報告はほとんどなく、樹立した株は MDS における造血異常の解析ツールとして貴重である。血球への分化誘導時に認められる事象を正常 iPS 細胞と比較解析することにより、樹立した iPS 細胞由来の血球細胞における疾患特異性を確認することができると考えられ、また、その上での病態解析に基づく創薬研究を推進するに当たり、大変有用なツールとなることが期待される。

脳神経領域では近年、悪性神経膠腫の治療抵抗性の原因として脳腫瘍幹細胞が注目されているが、そのメカニズムはいまだ十分に解明されておらず、その機序同定が治療成績向上のため必須と考えられている。今後、我々が樹立した脳腫瘍幹細胞株を用いて、幹細胞性維持、増殖を制御する因子に関して解析を行い、将来の新規治療法に繋げることを目標とする。また、今回樹立したこれら脳腫瘍幹細胞は、今後の iPS 様脳腫瘍細胞作成に活用できると考える。

心臓領域ではヒト iPS 細胞由来心筋細胞シート積層による分厚い成熟する移植可能なヒト心筋組織構築の成功は将来的な臨床応用の可能性を示唆する。患者 iPS 細胞由来心筋細胞の品質検定をおこない、患者特異的な病態メカニズムの解明へと進む。

代謝領域では対象疾患に絞り込んだ患者由来の疾患特異的 iPS 細胞を作成し、確立した網羅的な転写解析やエピゲノム解析などのオミクス解析などの基盤技術を用いることにより、希少疾患のモデルや病態研究、創薬研究の標的同定が期待される。

平成 25 年度に今年度確立した臍帯血と臍帯の採取・調製・凍結保管・提供システムを、今後も一定の比率で発生する難治性疾患の保管に生かす

とともに、得られた疾患の提供を積極的に行う。iPS 細胞に共通、特異的な miRNA 発現パターンを今後指標として、研究班で作成される疾患由来 iPS の miRNA 発現パターンの相違の検討が可能になると期待される。RNA sequence, ChiP sequence, DNA methylation についても同様の解析をスタートすることが期待される。

研究倫理・臨床倫理上の検討において市民の iPS 細胞研究全般に対する期待の高さ、難病のための創薬全般への期待の高さが平成 25 年度の研究により明らかになった。今後、個別の研究に対する市民の期待と倫理的懸念についての調査に役立てると共に、iPS 細胞を利用した難治性疾患の創薬研究に関する市民との対話促進に役立てたい。

E. 結論

本研究によって様々な難治性疾患の病態解明や治療法の開発が期待され、さらに難治性疾患をモデルとした一般的な慢性疾患の治療法開発にもつながる可能性がある。高品質な疾患特異的 iPS 細胞をバンク化し配布可能とすることで、民間企業をも巻き込んだ創薬研究の発展が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kadowaki T, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Iwabu M. Adiponectin and its receptors: implications for obesity-associated diseases and longevity. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2(1). 8-9. 2014
- Toda G, Fujishiro M, Yamada T, Shojima N, Sakoda H, Suzuki R, Yamauchi T, Ueki K, Kadowaki T. Lung abscess without sepsis in a patient with diabetes with refractory episodes of spontaneous hypoglycemia: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep.* 8(1). 51. 2014
- DIAbetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium. Genome-wide

trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat Genet.* 46(3). 234-44. 2014

- Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kadowaki T. Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 28(1). 15-23. 2014
- Takamoto I, Kubota N, Nakaya K, Kumagai K, Hashimoto S, Kubota T, Inoue M, Kajiwara E, Katsuyama H, Obata A, Sakurai Y, Iwamoto M, Kitamura T, Ueki K, Kadowaki T. TCF7L2 in mouse pancreatic beta cells plays a crucial role in glucose homeostasis by regulating beta cell mass. *Diabetologia.* 57(3). 542-53. 2014
- Kadowaki T, Kondo K. Efficacy and safety of teneligliptin added to glimepiride in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with an open-label, long-term extension. *Diabetes Obes Metab.* 16(5). 418-25. 2014
- Moller JB, Pedersen M, Tanaka H, Ohsugi M, Overgaard RV, Lyng J, Almind K, Vasconcelos NM, Poulsen P, Keller C, Ueki K, Ingwersen SH, Pedersen BK, Kadowaki T. Body composition is the main determinant for the difference in type 2 diabetes pathophysiology between Japanese and Caucasians. *Diabetes Care.* 37(3). 796-804. 2014
- Hara K, Fujita H, Johnson TA, Yamauchi T, Yasuda K, Horikoshi M, Peng C, Hu C, Ma RC, Imamura M, Iwata M, Tsunoda T, Morizono T, Shojima N, So WY, Leung TF, Kwan P, Zhang R, Wang J, Yu W, Maegawa H, Hirose H; DIAGRAM consortium, Kaku K, Ito C, Watada H, Tanaka Y, Tobe K, Kashiwagi A, Kawamori R, Jia W, Chan JC, Teo YY, Shyong TE, Kamatani N, Kubo M, Maeda S, Kadowaki T. Genome-wide association study identifies three novel loci for type 2 diabetes. *Hum Mol Genet.* 23(1). 239-46. 2014
- Takase S, Osuga J, Fujita H, Hara K, Sekiya M,

- Igarashi M, Takanashi M, Takeuchi Y, Izumida Y, Ohta K, Kumagai M, Nishi M, Kubota M, Masuda Y, Taira Y, Okazaki S, Iizuka Y, Yahagi N, Ohashi K, Yoshida H, Yanai H, Tada N, Gotoda T, Ishibashi S, Kadowaki T, Okazaki H. Apolipoprotein C-II deficiency with no rare variant in the APOC2 gene. *J Atheroscler Thromb.* 20(5). 481-93. 2013
- Kadowaki T. Ensuring success for J-NIH. *Science.* 342(6159). 670. 2013
 - Goda M, Kadowaki T. Tenelegliptin for the treatment of type 2 diabetes. *Drugs Today (Barc).* 49(10). 615-29. 2013
 - Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, Ueki K, Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S, Kadowaki T. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature.* 503(7477). 493-9. 2013
 - Yamada T, Hara K, Kadowaki T. Chewing betel quid and the risk of metabolic disease, cardiovascular disease, and all-cause mortality: a meta-analysis. *PLoSOne.* 8(8). e70679. 2013
 - Nakaya K, Kubota N, Takamoto I, Kubota T, Katsuyama H, Sato H, Tokuyama K, Hashimoto S, Goto M, Jomori T, Ueki K, Kadowaki T. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor anagliptin ameliorates diabetes in mice with haploinsufficiency of glucokinase on a high-fat diet. *Metabolism.* 62(7). 939-51. 2013
 - Kubota T, Kubota N, Kadowaki T. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of glucose metabolism. *Rev Endocr Metab Disord.* 14(2). 207-16. 2013
 - Yamada T, Hara K, Umematsu H, Kadowaki T. Male pattern baldness and its association with coronary heart disease: a meta-analysis. *BMJ Open.* 3(4). e002537. 2013
 - Nabeno M, Akahoshi F, Kishida H, Miyaguchi I, Tanaka Y, Ishii S, Kadowaki T. A comparative study of the binding modes of recently launched dipeptidylpeptidase IV inhibitors in the active site. *Biochem Biophys Res Commun.* 434(2). 191-6. 2013
 - Kadowaki T, Kondo K. Efficacy, safety and dose-response relationship of tenelegliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab.* 15(9). 810-8. 2013
 - Awazawa M, Futami T, Sakada M, Kaneko K, Ohsugi M, Nakaya K, Terai A, Suzuki R, Koike M, Uchiyama Y, Kadowaki T, Ueki K. Deregulation of pancreas-specific oxidoreductin ERO1 β in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Mol Cell Biol.* 34(7). 1290-9. 2014
 - Sacks FM, Hermans MP, Fioretto P, Valensi P, Davis T, Horton E, Wanner C, Al-Rubeaan K, Aronson R, Barzon I, Bishop L, Bonora E, Bunnag P, Chuang LM, Deerochanawong C, Goldenberg R, Harshfield B, Hernandez C, Herzlinger-Botein S, Itoh H, Jia W, Jiang YD, Kadowaki T, Laranjo N, Leiter L, Miwa T, Odawara M, Ohashi K, Ohno A, Pan C, Pan J, Pedro-Botet J, Reiner Z, Rotella CM, Simo R, Tanaka M, Tedeschi-Reiner E, Twum-Barima D, Zoppini G, Carey VJ. Association between plasma triglycerides and high-density lipoprotein cholesterol and microvascular kidney disease and retinopathy in type 2 diabetes mellitus: a global case-control study in 13 countries. *Circulation.* 129(9). 999-1008. 2014
 - Nishimura S, Manabe I, Takaki S, Nagasaki M, Otsu M, Yamashita H, Sugita J, Yoshimura K, Eto K, Komuro I, Kadowaki T, Nagai R. Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation. *Cell Metab.* 18(5). 759-766. 2013
 - Ma RC, Hu C, Tam CH, Zhang R, Kwan P, Leung TF, Thomas GN, Go MJ, Hara K, Sim X, Ho JS, Wang C, Li H, Lu L, Wang Y, Li JW, Wang Y, Lam VK, Wang J, Yu W, Kim YJ, Ng DP, Fujita H, Panoutsopoulou K,

Day-Williams AG, Lee HM, Ng AC, Fang YJ, Kong AP, Jiang F, Ma X, Hou X, Tang S, Lu J, Yamauchi T, Tsui SK, Woo J, Leung PC, Zhang X, Tang NL, Sy HY, Liu J, Wong TY, Lee JY, Maeda S, Xu G, Cherny SS, Chan TF, Ng MC, Xiang K, Morris AP; DIAGRAM Consortium, Keildson S; MuTHER Consortium, Hu R, Ji L, Lin X, Cho YS, Kadowaki T, Tai ES, Zeggini E, McCarthy MI, Hon KL, Baum L, Tomlinson B, So WY, Bao Y, Chan JC, Jia W. Genome-wide association study in a Chinese population identifies a susceptibility locus for type 2 diabetes at 7q32 near PAX4. *Diabetologia*. 56(6). 1291-305. 2013

●Saxena R, Saleheen D, Been LF, Garavito ML, Braun T, Bjorntorp A, Young R, Ho WK, Rasheed A, Frossard P, Sim X, Hassanali N, Radha V, Chidambaram M, Liju S, Rees SD, Ng DP, Wong TY, Yamauchi T, Hara K, Tanaka Y, Hirose H, McCarthy MI, Morris AP; DIAGRAM; MuTHER; AGEN, Basit A, Barnett AH, Katulanda P, Matthews D, Mohan V, Wander GS, Singh JR, Mehra NK, Ralhan S, Kamboh MI, Mulvihill JJ, Maegawa H, Tobe K, Maeda S, Cho YS, Tai ES, Kelly MA, Chambers JC, Kooner JS, Kadowaki T, Deloukas P, Rader DJ, Danesh J, Sanghera DK. Genome-wide association study identifies a novel locus contributing to type 2 diabetes susceptibility in Sikhs of Punjabi origin from India. *Diabetes*. 62(5). 1746-55. 2013

2. 学会発表

●Takashi Kadowaki. The role of adiponectin and adiponectin receptor in obesity-associated diseases. *CSH (Cold Spring Harbor) Asia Meeting*. 2013.5. Suzhou, China.

●Takashi Kadowaki. Role of adiponectin receptors in type 2 diabetes and metabolic syndrome. *40th IMSUT Founding Commemorative Symposium - Dysregulation of signal transduction systems*

underlying intractable disorders. 2013.5. Tokyo, Japan.

●Takashi Kadowaki. Diet Therapy in Diabetes. *8th Asia Pacific conference on Clinical Nutrition*. 2013.6. Chiba, Japan.

●Takashi Kadowaki. Roles of adiponectin receptors in regulation of nutrient disposal and promising drug target for obesity-linked disease. *1st Annual Helmholtz-Nature Medicine Diabetes Conference*. 2013.9. Munich, Germany.

●Takashi Kadowaki. The role of adiponectin receptor in insulin resistance and type 2 diabetes. *Boston Joslin International Symposium on Diabetes* 2013. 2013.1. Boston, USA.

●Takashi Kadowaki. Impaired adiponectin receptor signaling in obesity-linked insulin resistance and shortened lifespan". *IR 2013 XII. International Symposium on Insulin Receptors and Insulin Action*. 2013.11. Barcelona, Spain.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(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

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
「疾患由来 iPS 細胞を利用した難治性疾患の創薬研究」 分担研究報告書

悪性神経膠腫手術検体よりの脳腫瘍幹細胞 primary culture の樹立

研究分担者：斉藤 延人

（東京大学大学院医学系研究科脳神経外科・教授）

研究要旨

我々は、神経膠芽腫の患者検体より脳腫瘍幹細胞株を樹立した。また、これらの細胞が自己複製能、無限増殖能、多分化能を有し、ヌードマウスの脳内で腫瘍原性を有することを確認することで、脳腫瘍幹細胞の特性を有していることを確認した。

A. 研究目的

悪性神経膠腫手術検体よりの脳腫瘍幹細胞 primary culture の樹立を行い、iPS 細胞樹立や悪性神経膠腫創薬研究に資するモデル細胞として確立する。

B. 研究方法

患者の脳腫瘍検体を、手術室にて摘出後すぐに 4℃の培養液へ無菌的に移し、研究室へと運ぶ。シャーレ内で、メスにて検体を機械的に破碎し、可及的に single cell とした。フィルターに通して破碎しきれなかった腫瘍塊を取り除き、B27 と N2 を含む幹細胞用培地へと移して、37℃エアークューバー内で培養を開始した。培養中は、EGF と FGF を定期的に培地内へ添加した。検体内に腫瘍幹細胞が含まれている場合は、浮遊培養中で sphere を形成するので、十分に増殖した所でプロテアーゼ処理にて sphere を single cell へと分散し、継代を行った。十分な細胞数が安定して得られたら、継代数が早い段階で細胞の一部を凍結し、必要な時に培養を再開できるよう保存しておいた。残りの細胞は培養を継続し、安定して継代継続が可能なことを確認した。

（倫理面への配慮）

患者の臨床検体・材料を使用する実験は、東京大学の倫理委員会の承諾のもと、患者もしくは家族よりのインフォームドコンセントを所定の用紙を用いて取得した後に行った。また、実験およびデータ解析の際、患者の個人情報が出漏れしないよう匿名化して施行した。

マウスは S P F (Specific Pathogen Free) 規格の施設で飼育され、自然界の環境に影響を与えないよう十分な配慮がなされている。また、実験は東京大学動物実験マニュアルを遵守し、必要最小限の数の動物を使用し、十分に苦痛を取り除いた状態で行った。

C. 研究結果

平成 25 年度は、4 人の患者検体より脳腫瘍幹細胞株を樹立した。樹立された細胞株が、脳腫瘍幹細胞の特性を持っているかを確認した。

幹細胞培地にて sphere を形成し、継代を重ねても sphere 形成を常に維持し続けることを確認して、自己複製能を確認。継代が 20 回以上安定して可能であることを確認して、無限増殖能を確認。これらの細胞株をヌードマウスの脳に移植し、脳内に腫瘍を形成して腫瘍死させることを確認することで、腫瘍原性を確認した。さらに、脳腫瘍間細胞株を血清入り培地にて分化させ、GFAP、

NeuN、O4 抗体による免疫染色にて、多分化能を有していることを確認した。

腫瘍幹細胞より mRNA を抽出し、real time PCR にて幹細胞マーカーである CD133、nestin、sox2 等の発現が上昇していることを確認した。

D. 考察

患者検体より脳腫瘍幹細胞株を樹立し、これらの細胞が脳腫瘍幹細胞の特性を有していることを確認した。実際には脳腫瘍幹細胞の定義は確立しておらず、コンセンサスが得られた特異的な脳腫瘍幹細胞マーカーも存在しない。しかし、幹細胞の特性である自己複製能、無限増殖能、多分化能を確認し、in vivo にて腫瘍原性を確認することが、多くの論文で腫瘍幹細胞の確認として行われており、我々もこれらを確認した。さらに特異的なマーカーはないものの、幾つかのマーカーを組み合わせることで脳腫瘍幹細胞株の検出率が上がるという報告があり、我々も複数のマーカーを確認した。

近年、悪性神経膠腫の治療抵抗性の原因として脳腫瘍幹細胞が注目されているが、そのメカニズムはいまだ十分に解明されておらず、その機序同定が治療成績向上のため必須と考えられている。今後、我々が樹立した脳腫瘍幹細胞株を用いて、幹細胞性維持、増殖を制御する因子に関して解析を行い、将来の新規治療法に繋げることが目標である。

E. 結論

我々は、患者検体より脳腫瘍幹細胞株を樹立し、これらの細胞が脳腫瘍幹細胞の特性を有していることを in vitro, in vivo にて確認した。これら脳腫瘍幹細胞は、今後の iPS 様脳腫瘍細胞作成に活用できると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

● Miyawaki S, Imai H, Shimizu M, Yagi S, Ono H, Mukasa A, Nakatomi H, Shimizu T, and Saito N. Genetic variant RNF213 c.14576G>A in various phenotypes of intracranial major artery stenosis/occlusion. *Stroke* 44: 2894-2947, 2013.

● Aihara K, Mukasa A, Gotoh K, Saito K, Nagae G, Tsuji S, Tatsuno K, Yamamoto S, Takayanagi S, Narita Y, Shibui S, Aburatani H, Saito N. H3F3A K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients. *Neuro Oncol.* 16:140-146, 2014.

● Johnson BE, Mazor T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY, Fouse SD, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Asthana S, Jalbert LE, Nelson SJ, Bollen AW, Gustafson WC, Charron E, Weiss WA, Smirnov IV, Song JS, Olshen AB, Cha S, Zhao Y, Moore RA, Mungall AJ, Jones SJ, Hirst M, Marra MA, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger MS, Chang SM, Taylor BS, Costello JF. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science.* 343:189-193, 2014.

● Fukushima S, Otsuka A, Suzuki T, Yanagisawa T, Mishima K, Mukasa A, Saito N, Kumabe T, Kanamori M, Tominaga T, Narita Y, Shibui S, Kato M, Shibata T, Matsutani M, Nishikawa R, Ichimura K; On behalf of the Intracranial Germ Cell Tumor Genome Analysis Consortium (iGCT Consortium). Mutually exclusive mutations of KIT and RAS are associated with KIT mRNA expression and chromosomal instability in primary intracranial pure germinomas. *Acta Neuropathol.* 2014 Jan

23. [Epub ahead of print].

● Echizen K, Nakada M, Hayashi T, Sabit H, Furuta T, Nakai M, Koyama-Nasu R, Nishimura Y, Taniue K, Morishita Y, Hirano S, Terai K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Takayanagi S, Ohtani R, Saito N, Akiyama T. PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 444:13-18, 2014

● Shinozaki M, Nakamura M, Konomi T, Kobayashi Y, Takano M, Saito N, Toyama Y, Okano H. Distinct roles of endogenous vascular endothelial factor receptor 1 and 2 in neural protection after spinal cord injury. *Neurosci Res.* 78:55-64, 2014.

● Shinozaki M, Yasuda A, Nori S, Saito N, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Novel method for analyzing locomotor ability after spinal cord injury in rats: technical note. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 53:907-913.

● Koyama-Nasu R, Haruta R, Nasu-Nishimura Y, Taniue K, Katou Y, Shirahige K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Matsui M, Takahashi R, Hoshino-Okubo A, Sugano H, Manabe E, Funato K, Akiyama T: The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 24:33(17):2236-44

2. 学会発表

● Satoru Miyawaki, Hideaki Imai, Shunsaku Takayanagi, Hideaki Ono, Hiroshi Horikawa, Takashi Ochi, Akihiro Ito, Akitake Mukasa, Hirofumi Nakatomi, Nobuhito Saito. Classifying intracranial major artery stenosis/occlusion based on the

genotype of RNF213, the susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain* 2013, 2013.5.21, Shanghai

● Satoru Miyawaki, Takahiro Hayasaka, Hideaki Imai, Hiroshi Horikawa, Takashi Ono, Akihiro Ito, Hirofumi Nakatomi, Mitsutoshi Seto, Nobuhito Saito. Visualization and analysis of spatio-temporal molecular changes in hippocampus after transient global ischemia using imaging mass spectrometry. *Brain* 2013, 2013.5.22, Shanghai

● Hideaki Ono, Hideaki Imai, Satoru Miyawaki, Shigeru Miyata, Hirotaka Yamagata, Yasuki Ishizaki, Hirofumi Nakatomi, Masahiko Mikuni, Nobuhito Saito. A new rat model of stress-induced depression associated with age-related, selective white matter injury. *Brain* 2013, 2013.05.23, Shanghai

● Hideaki Ono, Hideaki Imai, Takahiro Hayasaka, Satoru Miyawaki, Hiroshi Horikawa, Takashi Ochi, Akihiro Ito, Hirofumi Nakatomi, Mitsutoshi Seto, Nobuhito Saito. Comprehensive analysis of selective white matter injury of the rat model by using imaging mass spectrometry and conventional histopathology. *Brain* 2013, 2013.05.23, Shanghai

● 高柳俊作, 武笠晃丈, 相原功輝, 柴原純二, 油谷浩幸, 市村幸一, 斉藤延人. HemangioblastomaにおけるVHL遺伝子異常と発現の関連. 第31回日本脳腫瘍病理学会, 2013.05.25, 横浜

● Hideaki Ono, Hideaki Imai, Satoru Miyawaki, Shigeo Miyata, Masashi Kurachi, Yasuki Ishizaki, Hirofumi Nakatomi, Masahiko Mikuni, Nobuhito Saito. Analysis

of stress vulnerability related to selective white matter injury using rat model. Neuro 2013, 2013.06.22, Kyoto

● Akitake Mukasa. The Identification of Therapeutic Targets for Glioma through Genetic and Epigenetic Profiling (招待講演). the 23rd Annual Meeting of the Korean Brain Tumor Society, 2013.6.29, Daegu/Korea

● Satoru Miyawaki, Hideaki Imai, Shunsaku Takayanagi, Hideaki Ono, Yasuaki Karasawa, Takashi Ochi, Akihiro Ito, Akitake Mukasa, Hirofumi Nakatomi, Nobuhito Saito. The susceptibility genetic variant for moyamoya disease, RNF213 c.14576G>A, is associated with various phenotypes of intracranial major artery stenosis/occlusion. 3rd International Moyamoya Meeting, 2013.7.13, Sapporo

● Akitake Mukasa. The Epigenetic Profiling of Malignant Gliomas (招待講演). the XV WFNS World Congress of Neurosurgery, 2013.9.13, Seoul/Korea

● Shunsaku Takayanagi, Akitake Mukasa, Koki Aihara, Kuniaki Saito Ryohei Otani, Shota Tanaka, Hirofumi Nakatomi, Hiroyuki Aburatani, Koichi Ichimura, Keisuke Ueki, Nobuhito Saito. Alterations of the von Hippel-Lindau Gene and Copy Number Abnormalities in Hemangioblastomas of Central Nervous System. WFNS2013, 2013.09.13, Seoul, Korea

● Koki Aihara, Akitake Mukasa, Syunsaku Takayanagi, Kuniaki Saito, Kengo Gotoh, Hitoki Ueda, Shogo Yamamoto, Kenji Tatsuno, Yoshitaka Narita, Souichiro Shibui, Nobuhito Saito, Hiroyuki Aburatani.

Searching the new mechanism of gliomagenesis by analyzing low grade gliomas lacking common genetic alteration (English oral). 第72回日本癌学会学術総会, 2013.10.4, Yokohama

● 武笠晃丈, 齊藤邦昭, 相原功輝, 高柳俊作, 大谷亮平, 田中将太, 上田 宏生, 山本 尚吾, 辰野 健二, 永江玄太, 島村徹平 Teppei Shimamura, 成田善孝, 永根基雄, 西川亮, 植木敬介, 宮野悟, 油谷浩幸, 齊藤延人. 神経膠腫の悪性化に伴うジェネティック・エピジェネティックな変化 (口演) (シンポジウム). 第71回日本脳神経外科学会総会, 2013.10.17 (16-18), 横浜

● 高柳俊作, 武笠晃丈, 相原功輝, 齊藤邦昭, 中富浩文, 柴原純二, 油谷浩幸, 市村幸一, 植木敬介, 齊藤延人. 統合的ゲノム解析による中枢神経系血管芽腫への VHL遺伝子異常の寄与度評価. 日本脳神経外科学会第72回学術総会, 2013.10.18, 東京

● 大谷亮平, 武笠晃丈, 高柳俊作, 齊藤邦昭, 田中将太, 辛正廣, 齊藤延人. Chordomaの悪性度とBrachyury遺伝子発現との関連. 第72回日本脳神経外科学会総会, 2013.10.18, 横浜

● Akitake Mukasa, Akira Watanabe, Hideki Ogiwara, Nobuhito Saito, Hiroyuki Aburatani. Tumor suppressive role of DACH1 in glioblastoma stem-like cell. (Poster) the 4th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology (WFNO)/ the 18th Annual Society for Neuro-Oncology (SNO) Meeting 2013.11.23 (22-25)

● Shunsaku Takayanagi, Akitake Mukasa, Koki Aihara, Kuniaki Saito, Ryohei Otani, Shota Tanaka, Hirofumi Nakatomi, Hiroyuki Aburatani, Koichi Ichimura,

Keisuke Ueki, Nobuhito Saito. Integrated genomic analysis of Hemangioblastomas in Central Nervous System. 4th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology/18th Annual Meeting of the Society of Neuro-Oncology, 2013.11.23, San Francisco, USA.

● 高柳俊作, 武笠晃丈, 相原功輝, 齊藤邦昭, 田中将太, 中富浩文, 油谷浩幸, 市村幸一, 植木敬介, 齊藤延人. Hemangioblastomaの統合的ゲノム・エピゲノム解析. 第31回日本脳腫瘍学会学術集会, 2013.12.08, 宮崎

● 武笠晃丈, 齊藤邦昭, 相原光輝, Brett E. Johnson, 高柳俊作, 大谷亮平, 田中將太, 上田 宏生, 山本 尚吾, 辰野 健二, 永江玄太, 島村徹平, 成田善孝, 永根基雄, 西川亮, 植木

敬介, 宮野悟, Joseph F. Costello, 油谷浩幸, 齊藤延人. 神経膠腫の悪性化に伴うジェネティック・エピジェネティックな進化 (口演). 第31回日本脳腫瘍学会, 2013.12.10 (8-10), 宮崎

G. 知的財産権の出願・登録状況 (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

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
「疾患由来 iPS 細胞を利用した難治性疾患の創薬研究」 分担研究報告書

課題名 疾患由来 iPS 細胞を利用した難治性疾患の創薬研究

研究分担者：高戸 毅

（東京大学大学院医学系研究科顎口腔外科・歯科矯正歯科 教授）

研究要旨

軟骨無形成症は代表的な骨・軟骨の代謝性疾患である。患者から非侵襲的に大量の罹患組織を採取することが困難な軟骨無形成症について、疾患特異的 iPS 細胞を作製し、病態研究や治療開発を行うことを目的とする。本年度は、FGFR3 の恒常的発現変異を有するヒト iPS 細胞、gene editing 技術で作製した。また、軟骨無形成症患者細胞由来の iPS 細胞を作製する目的で、末梢血由来 T 細胞の培養技術を確立した。

A. 研究目的

iPS 細胞はさまざまな疾患の原因解明、特に、適切な動物モデルがなく患者数が非常に少ないために臨床研究も進めにくい希少難病疾患である軟骨無形成症の病態解明や新規治療法の開発に役立つ可能性がある。患者から非侵襲的に大量の罹患組織を採取することが困難な軟骨無形成症について、iPS 細胞を経て分化細胞を大量に得られるメリットを活かして病態研究や治療開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

FGFR3 の恒常的発現変異を有するヒト iPS 細胞、gene editing 技術で作製した。また、軟骨無形成症患者細胞由来の iPS 細胞を作製する目的で、末梢血由来 T 細胞の培養技術を確立した。

（倫理面への配慮）

幹細胞医療研究の倫理支援は「医学系研究科倫理委員会」、「研究倫理支援室」が対応する。動物実験は動物実験委員会が研究の審査を行い、動物実験施設と共に動物愛護を含めた実験講習を実施し、研究内容の確認も行っている。また動物実験の自

己点検・評価を行い、東京大学本部ライフサイエンス研究倫理支援室と内容の確認を行っている。

C. 研究結果

FGFR3 の恒常的発現変異を有するヒト iPS 細胞、gene editing 技術で作製し、培養細胞株を得た。現在、培養細胞株を安定化している。また、骨無形成症患者細胞由来の iPS 細胞を作製する目的で、末梢血由来 T 細胞の培養技術を確立し、大量のヒト T 細胞を得た。

D. 考察

代表的な希少疾患である軟骨無形成症の疾患特異的 iPS 細胞は創薬研究上極めて貴重である。高品質な疾患特異的 iPS 細胞を配布可能とすることで、通常それらを用いることが難しい企業とも連携した創薬研究の発展が期待できる。再生医療以外にも、創薬などといった、iPS 細胞の有用な臨床利用法を示すことで、企業による iPS 細胞の利用全体が促進され、産業化の可能性が高まることが期待される。

E. 結論