

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。また、iPS 細胞作製用細胞として使用可能な、末梢血由来 T 細胞の培養技術を確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Fujihara Y, Takato T, Hoshi K, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Macrophage-inducing fasl on chondrocytes forms immune privilege in cartilage tissue engineering, enhancing in vivo regeneration. *Stem Cells*. in press
- Mori Y, Fujihara Y, Misawa M, Inoue H, Inaki R, Suenaga H, Okubo K, Saijo H, Takato T, Hoshi K. Fabrication of Stereotyped Beta-Tricalcium-Phosphate Blocks into a Conjugated Structure using Mesenchymal Stem Cell Sheets Prepared in Temperature-Responsive Culture Dishes. *J of Hard Tissue Biology*. in press
- Mori Y, Kanazawa S, Asawa Y, Sakamoto T, Inaki R, Okubo K, Nagata S, Komura M, Takato T, Hoshi K. Regenerative Cartilage made by Fusion of Cartilage Elements derived from Chondrocyte Sheets prepared in Temperature-Responsive Culture Dishes. *J of Hard Tissue Biology*. 23(1):101-110, 2014
- Matsuyama M, Fujihara Y, Inaki R, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K. Evaluation of in vivo migration of chondrocytes from tissue-engineered cartilage that was subcutaneously transplanted in mouse model. *OJRM*. 2(4):93-98, 2013
- Mori Y, Hoshi K, Takato T, Takahashi M, Hirano Y, Kanno Y, Okubo K, Saijo H. Submucous cleft palate: variations in bony defects of the hard palate. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 51(8):e220-e223, 2013
- Uto S, Nishizawa S, Takasawa Y, Asawa Y, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Bone and cartilage repair by transplantation of induced pluripotent stem cells in murine joint defect model. *Biomed Res* 34(6):281-288, 2013
- Mori Y, Kanazawa S, Watanabe M, Suenaga H, Okubo K, Nagata S, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Usefulness of Agarose Mold as a Storage Container for Three-Dimensional Tissue-Engineered Cartilage. *Materials and Sci Applications*. 4: 72-78, 2013
- Mori Y, Watanabe M, Nakagawa S, Asawa Y, Nishizawa S, Okubo K, Saijo H, Nagata S, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Hollow Fiber Module Applied for Effective Proliferation and Harvest of Cultured Chondrocytes. *Materials Sci and Applications*. 4:62-67, 2013
- Maeda Y, Suenaga H, Sugiyama M, Saijo H, Hoshi K, Mori Y, Takato T. Clinical presentation of epignathus teratoma with cleft palate; and duplication of cranial base, tongue, mandible, and pituitary gland. *J Craniofac Surg*. 24(4):1486-1491, 2013
- Komura M, Komura H, Otani Y, Kanamori Y, Iwanaka T, Hoshi K, Tsuyoshi T, Tabata Y. The junction between hyaline cartilage and engineered cartilage in rabbits. *Laryngoscope*. 123(6):1547-1551, 2013
- Suenaga H, Hoang Tran H, Liao H, Masamune K, Dohi T, Hoshi K, Mori Y, Takato T. Real-time in situ three-dimensional integral videography and surgical navigation using augmented reality: a pilot study. *Int J Oral Sci*. 5(2): 98-102, 2013
- Ogasawara T, Ohba S, Yano F, Kawaguchi H, Chung UI, Saito T, Yonehara Y, Nakatsuka, T, Mori Y, Takato T, Hoshi K. Nanog promotes osteogenic differentiation of the mouse

mesenchymal cell line C3H10T1/2 by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling. *J Cell Physiol.* 228(1):163-171, 2013

●Maeda Y, Hojo H, Shimohata N, Choi S, Yamamoto K, Takato T, Chung UI, Ohba S. Bone healing by sterilizable calcium phosphate tetrapods eluting osteogenic molecules. *Biomaterials* 34(22):5530-5537, 2013

●Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI. Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *J Biol Chem.* 288:9924-9932, 2013

●Yano F, Hojo H, Ohba S, Fukai A, Hosaka Y, Ikeda T, Saito T, Hirata M, Chikuda H, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1. *Ann Rheum Dis* 72(5):748-753, 2013

●Yano F, Hojo H, Ohba S, Saito T, Honnami M, Mochizuki M, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. Cell-sheet technology combined with a thienopyridone derivative small compound TD-198946 for cartilage regeneration. *Biomaterials* 34:5581-5587, 2013

●Komiyama Y, Ohba S, Shimohata N, Nakajima K, Hojo H, Yano F, Takato T, Docheva D, Shukunami C, Hiraki Y, Chung UI. Tenomodulin expression in the periodontal ligament enhances cellular adhesion. *PLoS ONE* 8(4): e60203, 2013

2. 学会発表

●高戸毅, 粉末積層造形を活用した新規人工骨の取り組みと最新動向及び今後の展開, 「次世代積層造形装置を活用した金属製品・金型/砂型製作」セミナー, 2013年12月12日, メディアボックス会議室, 東京.

●Takato T, Clinical application of regenerative medicine in oral and maxillofacial areas. The Workshop for Medical and Dental Cooperation with Japan and Vietnam, November 23, 2013 Hanoi, Vietnam.

●Takato T, Saijo H, Fujihara Y, Hoshi K, Treatment of Cleft Lip Nasal Deformity-From Birth to Adult-. The Workshop for Medical and Dental Cooperation with Vietnam & Japan, November 23, 2013 Hanoi, Vietnam.

●高戸毅, 口唇口蓋裂の22世紀治療ー出生から成人までの治療・再生軟骨治療などー口友会 秋の例会 医療講演会, 2013年11月2日, 国立オリンピック記念青少年総合センター, 東京.

●Takato T, Clinical application of bone and cartilage regenerative medicine. Seoul Symposium, October 25, 2013, Seoul, Korea.

●Takato T, 2-Stage Surgery combining Maxillary Distraction with Mandibular Setback Osteotomies. Seoul Symposium, October 25, 2013, Seoul, Korea.

●高戸毅, 再生医療の現状と展望, 日本総合医療健康医療学会, 2013年10月14日, 東京大学山上会館, 東京.

●高戸毅, チタンメッシュトレーを用いた顎骨再建. 第58回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 2013年10月11日, 福岡国際会議場, 福岡.

●高戸毅, 学融合が拓く未来の医療. 疾患生命工学センター発足10周年記念シンポジウム, Sep.25, 2013, 東京大学伊藤国際学術研究センター, 東京.

●Takato T, Nanotechnological Approach for Cartilage Regenerative Medicine. Frontiers in Nanomedicine and Imaging Symposium, Jun.

22, 2013, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland.

●高戸毅, あごの骨と軟骨の再生医療 歯科の明るい未来, 第29回医学生物学電子顕微鏡技術学会 学術講演会, 2013年6月9日, 神奈川歯科大学, 神奈川.

●高戸毅, 骨・軟骨再生に関する基礎および臨床研究, 第67回NPO法人日本口腔科学学術集会, 2013年5月24日, 栃木県総合文化センター, 栃木.

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

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

研究分担者：黒川 峰夫
(東京大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科 教授)

研究要旨

血液疾患の中でも悪性リンパ腫・多発性骨髄腫・良性疾患は細胞株やマウスモデルが少なく、大量の細胞を用いるマルチオミクス解析、薬剤スクリーニングが困難であった。我々はこれまで、末梢血や骨髄細胞といった患者検体のリプログラミング方法の最適化を行うことにより、複数の造血器疾患から iPS 細胞を樹立してきた。これらの技術を生かして上記疾患由来 iPS 細胞を樹立し、再分化させた造血幹・前駆細胞を用いて、マルチオミクス解析のみならず、未知の疾患発症機構を同定する。また、ハイスループットの薬剤スクリーニングにより新規治療法を探索する。

A. 研究目的

悪性リンパ腫・多発性骨髄腫・良性疾患患者由来 iPS 細胞を樹立する。作成した複数の患者由来 iPS 細胞を血球に再分化させ、*in vitro* および *in vivo* での細胞表面マーカーやシグナル伝達異常などの病態解析を行う。また、化合物ライブラリーを用いて治療につながる薬剤スクリーニングを実施する。

B. 研究方法

患者検体の末梢血、リンパ球、骨髄細胞から iPS 細胞を樹立し血球に再分化させる。再分化させた血球が疾患の病態を反映するか検討する。その造血幹細胞・前駆細胞分画を用いてコロニー形成能や細胞表面マーカーの解析、メチロームおよびトランスクリプトーム等のマルチオミクス解析を行う。さらに、化合物ライブラリーを用いた大規模薬剤スクリーニングを行う。

(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。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

リプログラミング方法を最適化すること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た。われわれは既に、慢性骨髄性白血病(CML)細胞や JAK2V617F 変異陽性骨髄線維症(MF)をはじめとする骨髄増殖性腫瘍(MPN)細胞、家族性血小板異常症(FPD)患者の皮膚線維芽細胞から、レトロウイルスベクターによる OCT3/4, SOX2, C-MYC, KLF4 の導入によって疾患 iPS 細胞を樹立することに成功している。昨年度から今年度にかけては、新たに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 細胞樹立法を試み、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。一例として、染色体転座(46XY, +1, der(1;7)(q10;p10))を持つ慢性骨髄単球性白血病 (CMMoL)患者より採取した末梢血 CD34 陽性細胞に上記のエピゾーマルベクターを用いて OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、p53-shRNA を導入し、CMMoL 患者由来の iPS 細胞(CMMoL-iPS)を樹立した(下図)。さらに、これらの iPS 細胞において SSEA-4 と TRA-1-60 の免疫染色および内因性の c-MYC、SOX2、OCT3/4、KLF、Nanog、Rex1 のリアルタイム PCR を行い、多能性マーカーが発現していることを確認した。続いて、末梢血細胞からエピゾーマルベクターを

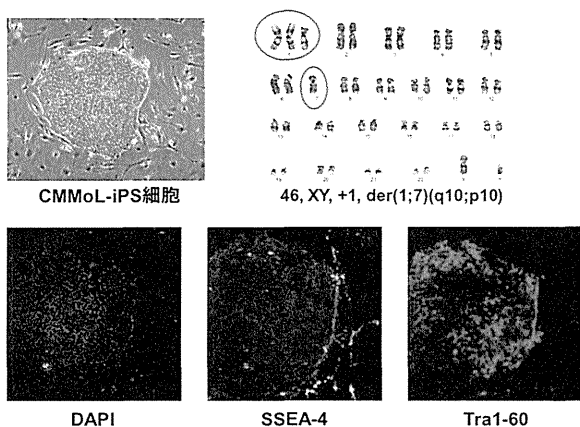
用いて iPS 細胞を樹立する際の最適条件の検討を行ったところ、SCF、IL-3、GM-CSF、TPO を添加して 2 日間前培養を行うこと、5%O₂ 低酸素培養条件でブチル酸、Y27632 などの小分子化合物を付加することで樹立の効率を高めることができた。また、エピゾーマルベクターでは CD34 陽性細胞のみならず、単球、B リンパ球に遺伝子導入することも比較的容易である。末梢血の単球に pCXLE-hOCT3/4-shp53-F 、 pCXLE-hSK 、 pCXLE-hUL を用いて iPS 細胞を樹立させることにも成功している。これらの技術を使って、今まで取り組んでこなかったさまざまな血液疾患、特に悪性リンパ腫・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。

D. 考察

疾患由来 iPS 細胞から再分化させた造血細胞と正常骨髄由来 iPS 細胞から同様に再分化させた造血細胞は、患者検体を表面マーカーで選別して比較するよりも、均一かつ分化段階が揃った細胞が得られる可能性が高い。よって、患者検体同士の比較に比べてサンプル間のばらつきが小さく、疾患に関係する分子生物学的な特徴が表れやすいと考えられる。この点を生かして、これまでに樹立した疾患由来 iPS 細胞を用いて網羅的な遺伝子発現解析やエピゲノム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析といったマルチオミクス解析を行い、疾患に特異的な異常を同定する。また、大量の造血幹・前駆細胞を用いてハイスループットの化合物スクリーニングを行い、新規治療薬を探索する。

E. 結論

血液疾患の患者検体を用いて、疾患由来 iPS 細胞の樹立とその最適化を行ってきた。この系を用いて、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。疾患由来 iPS 細胞か



ら均質な血球を十分な量得られる長所を生かし、分化血球を用いた治療薬候補探索スクリーニングを東大薬学部が所有する創薬ライブラリーや製薬会社との共同研究などを活用して行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Hosoi M, Kumano K, Taoka K, Arai S, Kataoka K, Ueda K, Kamikubo Y, Takayama N, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells derived from primary and secondary myelofibrosis patient samples. *Experimental Hematology*, in press.
- Kumano K, Arai S, Kurokawa M. Generation of iPS cells from normal and malignant hematopoietic cells. *International Journal of Haematology*,98(2):145-52. 2013.
- Nukina A, Kagoya Y, Watanabe-Okochi N, Arai S, Ueda K, Yoshimi A, Nannya Y, Kurokawa M. Single-cell gene expression analysis reveals clonal architecture of blast-phase chronic myeloid leukaemia. *British Journal Haematology*, in press.
- Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, Nakagawa M, Kumano K, Arai S, Kobayashi H, Saito T, Iwakura Y, Kurokawa M. Positive feedback between NF- κ B and TNF- α promotes leukemia-initiating cell capacity. *Journal of Clinical Investigation*, 124(2):528-42, 2014.
- Sato T, Goyama S, Kataoka K, Nasu R, Tsuruta-Kishino T, Kagoya Y, Nukina A, Kumagai K, Kubota N, Nakagawa M, Arai S, Yoshimi A, Honda H, Kadowaki T, Kurokawa M. Evf1 defines leukemia-initiating capacity and tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia. *Oncogene*, in press.
- Ueda K, Yoshimi A, Kagoya Y, Nishikawa S, Marquez VE, Nakagawa M, Kurokawa M. Inhibition of histone methyltransferase EZH2 depletes leukemia stem cell of mixed lineage leukemia fusion leukemia through upregulation of p16. *Cancer Science*, in press.
- Harms MJ, Ishibashi J, Wang W, Lim HW, Goyama S, Sato T, Kurokawa M, Won KJ, Seale P. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metabolism*. 9(4):593-604, 2014
- Riccomagno MM, Sun LO, Brady CM, Alexandropoulos K, Seo S, Kurokawa M, Kolodkin AL. Cas adaptor proteins organize the retinal ganglion cell layer downstream of integrin signaling. *Neuron*. 81(4):779-86, 2014.
- Kobayashi CI, Takubo K, Kobayashi H, Nakamura-Ishizu A, Honda H, Kataoka K, Kumano K, Akiyama H, Sudo T, Kurokawa M, Suda T. The IL-2/CD25 axis maintains distinct subsets of chronic myeloid leukemia-initiating cells. *Blood*. 123(16):2540-9, 2014.
- Kagoya Y, Nannya Y, Nakamura F, Kurokawa M. Gene expression profiles of central nervous system lymphoma predict poor survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*, in press.
- Nannya Y, Shinohara A, Ichikawa M, Kurokawa M. Serial Profile of Vitamins and Trace Elements during the Acute Phase of Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. in press.
- Shinohara A, Imai Y, Nakagawa M, Takahashi T, Ichikawa M, Kurokawa M. Intracellular reactive oxygen species mark and influence the megakaryocyte-erythrocyte progenitor fate of common myeloid progenitors. *Stem Cells*, 32(2):548-57, 2014.

- Goyama S, Schibler J, Cunningham L, Zhang Y, Rao Y, Nishimoto N, Nakagawa M, Olsson A, Wunderlich M, Link KA, Mizukawa B, Grimes HL, Kurokawa M, Liu PP, Huang G, Mulloy JC. Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells. *Journal of Clinical Investigation*, 123(9):3876-88.2013.
- Watanabe-Okochi N, Yoshimi A, Sato T, Ikeda T, Kumano K, Taoka K, Satoh Y, Shinohara A, Tsuruta T, Masuda A, Yokota H, Yatomi Y, Takahashi K, Kitaura J, Kitamura T, Kurokawa M. The shortest isoform of C/EBP β , liver inhibitory protein (LIP), collaborates with Evi1 to induce AML in a mouse BMT model. *Blood*,121(20):4142-55. 2013.
- Hochhaus A, Saglio G, Larson RA, Kim DW, Etienne G, Rosti G, De Souza C, Kurokawa M, Kalaycio ME, Hoenekopp A, Fan X, Shou Y, Kantarjian HM, Hughes TP. Nilotinib is associated with a reduced incidence of BCR-ABL mutations vs imatinib in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood*,121(18):3703-8. 2013.
- Shimizu K, Yamagata K, Kurokawa M, Mizutani S, Tsunematsu Y, Kitabayashi I. Roles of AML1/RUNX1 in T-cell malignancy induced by loss of p53. *Cancer Science*, 104(8):1033-8. 2013.

2. 学会発表

<国際学会>

- Kataoka K, Taoka K, Miyauchi M, Hosoi M, Kumano K, Arai S, Toyama K, Nagae G, Qu W, Morishita S, Aburatani H, and Kurokawa M. Modeling chronic myelomonocytic leukemia through patient-derived induced pluripotent stem cells. (Oral) 55th ASH Annual Meeting and Exposition, December 7-10, 2013, New Orleans, LA, USA.
- Yoshimi A, Toya T, Nakagawa M, Kawazu M, Nannya Y, Ichikawa M, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Mano H, and Kurokawa M. The genetic landscape of FPD/AML revealed CDC25C mutation as a driver that promotes malignant transformation. (Oral) 55th ASH Annual Meeting and Exposition, December 7-10, 2013, New Orleans, LA, USA.
- Kagoya Y, Arai S, Yoshimi A, Tsuruta-Kishino T, Kataoka K, and Kurokawa M. JAK2V617F mutation evokes paracrine DNA damage to adjacent normal cells via secretion of lipocalin-2. (Oral) 55th ASH Annual Meeting and Exposition, December 7-10, 2013, New Orleans, LA, USA.
- Koya J, Kataoka K, Tsuruta-Kishino T, Kobayashi H, Narukawa K, Sato T, and Kurokawa M. Leukemia-associated mutations of DNMT3A inhibit differentiation of hematopoietic stem cells and promote leukemic transformation through aberrant recruitment of Bmi1. (Oral) 55th ASH Annual Meeting and Exposition, December 7-10, 2013, New Orleans, LA, USA.
- Masamoto Y, Arai S, Sato T, Yoshimi A, Takamoto I, Kubota N, Kadowaki T, and Kurokawa M. Anti-obese hormone adiponectin regulates emergency hematopoiesis and antibacterial response through downregulation of Socs3 in hematopoietic progenitor cells. (Oral) 55th ASH Annual Meeting and Exposition, December 7-10, 2013, New Orleans, LA, USA.
- Tsuruta-Kishino T, Kataoka K, Koya J, Kobayashi H, Narukawa K, Sato T, and

Kurokawa M. Loss of p53 leads to leukemic transformation in a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. (Oral) 55th ASH Annual Meeting and Exposition, December 7-10, 2013, New Orleans, LA, USA.

<国内学会>

●飯塚浩光、荒井俊也、片岡圭亮、細井雅孝、熊野恵城、黒川峰夫、家族性血小板異常症患者由来 iPS 細胞の解析 (口演), 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013.10.3-5

●吉見昭秀、遠矢嵩、飯塚浩光、荒井俊也、中川正宏、河津正人、市川幹、桐戸敬太、間野博行、黒川峰夫、エクソームシーケンスおよび単一細胞シーケンスで明らかになった家族性血小板異常症における遺伝学的造血器腫瘍発症メカニズム (口演), 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013.10.3-5

●籠谷勇紀、吉見昭秀、鶴田・木住野貴子、片岡圭亮、荒井俊也、黒川峰夫、JAK2V617F 変異細胞はパラクライン作用で隣接する細胞に DNA 障害を起こし白血病化のリスクを高める (口演), 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013.10.3-5

●古屋淳史、片岡圭亮、佐藤智彦、黒川峰夫、急性骨髄性白血病における DNMT3A 変異の機能的解析 (口演), 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013.10.3-5

●木住野貴子、片岡圭亮、古屋淳史、佐藤智彦、黒川峰夫、JAK2V617F 変異による真性多血症マウスモデルにおいて p53 欠失は白血病化を引

き起こす (口演), 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013.10.3-5

●吉見昭秀、遠矢嵩、飯塚浩光、荒井俊也、中川正宏、河津正人、市川幹、桐戸敬太、間野博行、黒川峰夫、Clonal and mutational evolution reveals genetic mechanisms of leukemia transformation of FPD/AML (口演), 第75回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013.10.12-14

●籠谷勇紀、吉見昭秀、鶴田貴子、片岡圭亮、荒井俊也、黒川峰夫、JAK2V617 mutation evokes paracrine DNA damage to adjacent cells and drives leukemic transformation (口演), 第75回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013.10.12-14

●正本庸介、荒井俊也、佐藤智彦、吉見昭秀、高本偉碩、窪田直人、門脇孝、黒川峰夫、Adiponectin promotes proliferation of hematopoietic cells in vivo (口演), 第75回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013.10.12-14

●古屋淳史、片岡圭亮、鶴田(木住野)貴子、小林央、成川研介、佐藤智彦、黒川峰夫、Functional role of DNMT3A mutation in AML (口演), 第75回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013.10.12-14

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

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

研究分担者：小野 稔
(東京大学大学院医学系研究科心臓外科教授)

研究要旨

細胞シート工学を用いてヒト iPS 細胞より分化誘導させたヒト心筋細胞を細胞シートにし、生体内で積層化することで、機能的で移植可能なヒト心筋組織を作製する。

A. 研究目的

重症心不全治療に対する根治療法は現在、心臓移植のみである。わが国では臓器移植法改正などで社会的環境は整備されてきたが、それでも心臓移植件数は年 30 件ほどに過ぎず、ドナー心臓は圧倒的に不足しているのが現状である。近年、再生医療による細胞を用いた新しい治療法が模索されており、種々の細胞を移植することで低下した心機能を回復させれば、あるいは心筋組織そのものを構築し移植できればこの深刻なドナー不足の問題を解決できるのではないかと考えられている。その方法の一つとして、細胞シート工学を用いるものがある。細胞シートを用いることで scaffold-free な組織を構築することができる利点がある。今回、ヒト iPS 細胞から分化誘導させた心筋細胞を用いて細胞シートを作製し、生体内で積層化し、機能的な厚いヒト心筋組織の作製を目指した。

B. 研究方法

理研より購入した iPS 細胞株を用い、東京女子医科大学の松浦らの報告する方法で培養・分化させたヒト心筋細胞でヒト心筋細胞シートを作製した。
① 作製したヒト iPS 心筋細胞シートが生体内で生着するかを確認するために心筋細胞シートを 3 層に重ねたものをヌードラットの背部皮下に移植

し、2 週間後に観察した。また、長期の生着を確認するため 1 カ月おきに最長 6 か月まで観察した。
② 厚い心筋組織が構築できるかを確認するためにヌードラット皮下にシート 3 層を連続 3 日間積層して計 9 層とし、2 週後に観察した。
③ この方法で構築した心筋組織を、灌流する動脈とともに取り出し、血管吻合することで異所的に移植できるかどうか検証するために、ヌードラットの鼠径部皮下にヒト心筋細胞シート 6 層を移植し、2 週間後に移植部を灌流する大腿動脈を含めて血管付きグラフトとして摘出、別個体の頸部の動脈に吻合し、1 週間後に評価した。
(倫理面への配慮)
動物を手術する際には麻酔深度を十分に保った。犠牲死させる際も苦痛を与えないよう深麻酔下に行った。

C. 研究結果

① 移植 2 週間後に移植部位は全体が同期して肉眼的に拍動しており、電氣的にも一定の周期の電位変化を計測できた。組織学的検査により機能的血管網を伴う心筋様組織となっていることが確認された。移植後 6 カ月でも全体が同期した肉眼的拍動や電氣的活動が観察できた。電子顕微鏡で観察したところ、時間経過とともに心筋組織として成熟していくことが確認できた。

② 3層の細胞シートを連続3日間積層して計9層移植した方が3層移植よりも分厚い心筋組織ができており、機能的血管網を伴っていた。

③ 頸部への移植1週間後も全体が同期した肉眼的拍動・電位変化を認め、組織学的にも機能的な心筋組織であり、生着していることが確認できた。

D. 考察

ヒト iPS 細胞から分化誘導させた心筋細胞を細胞シートにし、積層化するには細胞シート内に効率的に機能的な毛細血管網を導入しなければならない。東京女子医科大学の清水らはラット胎児心筋細胞シートを生体内で積層化してラット心筋組織を再構築することに成功しているが、一度に構築できる心筋組織の厚さの限界は単純拡散で栄養できる80 μ mであると報告している。一方で、移植1日後には、移植した細胞シート内に毛細血管網が構築され、ホストからの血液灌流を受けていることがわかった。その上に細胞シートを重ねて移植すれば、毛細血管網がさらにホスト側から発達し、血液灌流を受けることでさらに分厚い心筋組織として生着させられることが分かっている。

この方法を踏襲することで1日たてばヒト心筋細胞シート内にも毛細血管網が構築されることがわかり、その上に細胞シートを移植すれば厚い組織が構築できることが示された。理論的には1日おきの移植を繰り返せば構築する厚さの限界は問題にならないことになる。

また、最終的な移植場所は心臓表面や心臓周囲がターゲットになるため1日おきの移植を行うには侵襲が大きく非現実的であるため、異所移植は必須となる。移植する際の吻合血管先としては、冠動脈バイパス術で用いられている内胸動脈や大網動脈が吻合動脈、動脈の伴走静脈や右房などが静脈吻合の候補になるだろう。それゆえにグラフトを作製する場所は、吻合血管の太さに見合った動静脈が体表面付近を走る皮下組織が候補になるだろう。さらに細胞シート移植の侵襲を軽減するた

め、血管付きの組織を体外に取り出して灌流培養系で心筋細胞シートを積層化してグラフトを作製する方法や、流路付きのゼラチンゲルの上で心筋細胞シートを積層化する研究も行われている。

また、時間経過でヒト心筋細胞として成熟していることは、臨床に用いる際に重要である。生体内の環境では様々な成長因子がある程度自然に分泌される環境にある。また、自律的に心筋細胞として拍動するストレッチの効果も成熟する要因になっている可能性はある。このメカニズムが詳しく解明できれば効率よく成熟した心筋組織の作製が可能になると考えられる。

E. 結論

ヒト iPS 細胞より分化誘導させた心筋細胞を細胞シートにし、生体内で積層化することで機能的なヒト心筋組織を作製することができた。このヒト心筋組織を血管付きグラフトとして作製して、血管吻合することで目的の場所へ異所性移植できることが示された。

将来的にこの方法をスケールアップできれば分厚い成熟した機能的なヒト心筋組織を構築することができ、新しい治療法の一つとなる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

● Yamauchi H, Motomura N, Chung UI, Sata M, Takai D, Saito A, Ono M, Takamoto S: Growth-associated hyperphosphatemia in young recipients accelerates aortic allograft calcification in a rat model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2013; 145: 522-30

● Umeki A, Nishimura T, Ando M, Takewa Y, Yamazaki K, Kyo S, Ono M, Tsukiya T, Mizuno T, Taenaka Y, Tatsumi E: Change of Coronary Flow by Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device With Cardiac Beat Synchronizing System (Native Heart Load Control System) in

Acute Ischemic Heart Failure Model. *Circ J* 2013; 77: 995-1000

● Umeki A, Nishimura T, Takewa Y, Ando M, Arakawa M, Kishimoto Y, Tsukiya T, Mizuno T, Kyo S, Ono M, Taenaka Y, Tatsumi E: Change in myocardial oxygen consumption employing continuous-flow LVAD with cardiac beat synchronizing system in acute ischemic heart failure models. *J Artif Organs* 2013; 16: 119-128

● Ando T, Kawashima D, Kim H, Joung S, Liao H, Kobayashi E, Gojo S, Kyo S, Ono M, Sakuma I. Direct minimal-invasive intraoperative electrophysiological mapping of the heart. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2013; 22: 372-80

● Ono M, Nishimura T, Kinoshita O, Shiga T, Kinugawa K, Nagai R, Kyo S: Improved survival in patients with continuous-flow ventricular assist device for bridge to heart transplantation. *Transplant Proc* 2013; 45:2017-8

● Kimura M, Kinoshita O, Nishimura T, Imamura T, Shiga T, Kashiwa K, Kinugawa K, Kyo S, Ono M: Successful weaning from the DuraHeart with a low left ventricular ejection fraction. *J Artif Organs* 2013; 16: 504-507

● Inoue T, Kitamura T, Torii S, Hanayama N, Oka N, Itatani K, Tomoyasu T, Irisawa Y, Shibata M, Hayashi H, Ono M, Miyaji K: Five-week use of a monopivot centrifugal blood pump as a right ventricular assist device in severe dilated cardiomyopathy. *J Artif Organs*. 2014; 17: 95-98

● Imamura T, Kinugawa K, Hatano M, Fujino T, Muraoka H, Inaba T, Maki H, Kagami Y, Endo M, Kinoshita O, Nawata K, Kyo S, Ono M: Preoperative beta-blocker treatment is a key for deciding left ventricular assist device

implantation strategy as a bridge to recovery. *J Artif Organs* 2014; 17: 23-32

2. 学会発表

● Komae H, Sekine H, Matsuura K, Dobashi I, Shimizu T, Ono M, Okano T: Three-dimensional beating human myocardial tissues fabricated from induced pluripotent stem cells and cell sheet technology. American Heart Association Scientific Sessions 2013, Nov 2013, Dallas, Texas, USA.

● 小前 兵衛, 関根 秀一, 土橋 泉, 松浦 勝久, 清水 達也, 小野 稔, 岡野 光夫: 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. 第4回 Molecular Cardiovascular Conference II. 2013年9月, Hokkaido

● 小前 兵衛, 関根 秀一, 土橋 泉, 松浦 勝久, 清水 達也, 小野 稔, 岡野 光夫: 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: 第17回循環器再生医療研究会. 2013年11月, 東京

● 小前 兵衛, 関根 秀一, 松浦 勝久, 土橋 泉, 清水 達也, 小野 稔, 岡野 光夫: 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. 第13回日本再生医療学会総会. 2014年3月, 京都

● Komae H, Matsuura K, Shimizu T, Ono M, Okano T: Three-dimensional functional human myocardial tissues fabricated from human induced pluripotent stem cells and foresight for clinical application. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society-2014.3, Tokyo

● 小野 稔, 木下 修, 木村光利, 梅木昭秀, 西村 隆, 許 俊鋭: わが国における植込み型補助人工心臓治療の最適化はいかに達成できるか? 第42回日本心臓血管外科学会学術総会. 2013年2月

東京

● 木村光利、木下 修、西村 隆、内藤敬嗣、安藤政彦、梅木昭秀、山内治雄、竹谷 剛、齋藤 綾、師田哲郎、本村 昇、村上 新、許 俊鋭、小野 稔：当施設における植込み型左室補助人工心臓 25 例の臨床経験. 第 42 回日本心臓血管外科学会学術総会. 2013 年 2 月 東京

● 小野 稔:虚血性僧帽弁逆流の治療戦略. 第 161 回日本胸部外科学会関東甲信越地方会. 2013 年 3 月 高崎

● 小野 稔、佐久間一郎、小林英津子、安藤岳洋、中島 淳、許 俊鋭：低侵襲インテリジェント手術支援用ロボット技術の開発. 日本医工学治療学会第 29 回学術大会. 2013 年 4 月 横浜

● 小野 稔、絹川弘一郎、木下 修、木村光利、札 琢磨、波多野将、今村輝彦、小室一成：心臓移植ブリッジとしての補助人工心臓の現状と課題. 第 49 回日本移植学会. 2013 年 9 月 京都

● 絹川弘一郎、今村輝彦、波多野将、小室一成、許 俊鋭、小野 稔：重症心不全治療の現状と問題 - 薬物治療から補助人工心臓への最善手は？ 第 49 回日本移植学会. 2013 年 9 月 京都

● 小野 稔、木下 修、木村光利、札 琢磨、安藤政彦、梅木昭秀、山内治雄、齋藤 綾、本村 昇、許 俊鋭：重症心不全における左室形成・僧帽弁形成・補助人工心臓の術式選択. 第 66 回 日本胸部外科学会定期学術集会. 2013 年 10 月 仙台

● 小野 稔、絹川弘一郎、木下 修、木村光利、齋藤 綾、安藤政彦、許 俊鋭：当院における心臓移植の遠隔成績. 第 66 回 日本胸部外科学会定期学術集会. 2013 年 10 月 仙台

● 小野 稔:わが国における心臓移植の現状と将来展望. 第 9 回日本移植・再生医療看護学会. 2013 年 10 月 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

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

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

研究分担者：山内 敏正
(東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科・准教授)

研究要旨

疾患患者からの作成した iPS 細胞は、疾患に関連した細胞や臓器へと分化させることにより、疾患の病態を反映した疾患モデルが構築され、より詳細な病態の解明や新たな治療ターゲットの探索や創薬スクリーニングを利用した新規治療法の開発に有用と考えられている。本研究の目的は、遺伝異常を有する糖尿病・代謝疾患患者から疾患特異的 iPS 細胞を作成し、全身の糖脂質代謝の主要臓器である膵島・脂肪細胞・肝細胞へ分化させ疾患モデルを構築し、エピゲノム解析を含むオミクス解析やゲノム編集ツール、化合物スクリーニングなどを駆使した病態解析と新規治療法開発の基盤をつくることである。作成する希少疾患の疾患モデルの確立のみならず、その病態解析からの治験を利用したより幅広い糖尿病などの common disease への還元も図る。

A. 研究目的

iPS 細胞は再生医療への応用のみならず、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を持っている。

ヒト iPS 細胞の作製が報告され、臓器再生・再生医療の実現へ向けた成果が報告されている一方で、近年では iPS 細胞を利用した疾患研究が注目をあつめている。疾患の異常を有する体細胞から疾患特異的 iPS 細胞を作成することにより、対象細胞・臓器への分化過程や分化細胞の機能の異常を見出し、疾患の病態を反映したモデルが構築される。近年進歩しているゲノム編集ツールを用いた精密な病態解析や病態モデル細胞を用いた化合物スクリーニングによる創薬が可能になる。

本研究では主として遺伝異常を有する糖尿病・

代謝疾患患者から疾患特異的 iPS 細胞を作成し、全身の糖脂質代謝の主要臓器である膵島・脂肪細胞・肝細胞へ分化させ、疾患モデルを構築し、エピゲノム解析を含むオミクス解析やゲノム編集ツールを用いた病態解析を行う。本研究成果により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に加えて、それら希少難病疾患の病態形成機構の解明や治療法の開発により、より幅広い糖尿病などの common disease への還元が期待され、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。

B. 研究方法

疾患特異的 iPS 細胞の樹立については、東京大学医科学研究所附属病院のステムセルバンク/CRC(医科研)の大津分担研究者との共同研究によ

り、患者末梢血とエピゾーマルベクターを用いて樹立を行う。対象疾患は糖尿病・代謝内科において遺伝子異常を伴うと想定される家族性脂質異常症、脂肪萎縮性糖尿病、ミトコンドリア糖尿病、MODY（単一遺伝子による糖尿病）と主として収集する。樹立する iPS 細胞は幹細胞の特性を確認し、十分な数の細胞を保存する。創薬研究に適合する細胞への分化系の確立を進める。具体的には取得された疾患特異的 iPS 細胞に合わせて、創薬研究に適合する膵 β 細胞、脂肪細胞、肝細胞への分化系の確立を進める。樹立した疾患 iPS 細胞由来の各組織細胞が患者個体における疾患の性質を有しているかについて、マーカー遺伝子の発現や免疫染色などによる細胞分化能の検討、疾患において鍵となる遺伝子の転写解析、インスリン分泌能など細胞の機能解析により確認する。疾患特異的 iPS が疾患の特性を有しており疾患のモデルとして成立する場合には、その十分な細胞量を活かし、網羅的なエピゲノム解析などのオミクス解析、過剰発現や siRNA によるノックダウン、ゲノム編集ツールなどを駆使して病態解析を行う。更に疾患病態の追究を通して標的のシグナルやタンパク質を同定し、その機序に基づいた創薬スクリーニング施行する。

疾患特異的 iPS 細胞の樹立と創薬・疾患研究における倫理面への配慮としては、東京大学医科学研究所でヒトゲノム・遺伝子解析研究として既に承認済みの「疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬・疾患研究」に共同研究者として加わる。

C. 研究結果

平成 25 年度は、疾患 iPS 細胞由来の各組織細胞を活かし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ターゲット同定のための基盤技術として、ゲノム上のヒストン修飾/転写因子結合領域やオープンクロマチン構造を検出する ChIP-seq および

FAIRE-seq（図 1）の解析の系を確立した。FAIRE-seq は細胞に特異的なエンハンサーなどの転写制御領域に特徴的なオープンクロマチン構造を検出する方法で、である特定の因子に限定しない”unbiased”な手法であり、ヒストン修飾/転写因子結合領域を検出する ChIP-seq や、モチーフ解析などのバイオインフォマティクスと組み合わせることで、既知制御因子の役割および新規制御因子の同定に有用な手法である。

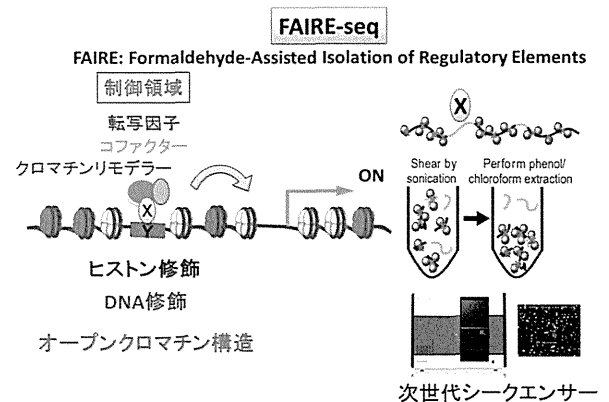


図 1 FAIRE 法と次世代シーケンサーを組み合わせた FAIRE-seq の原理

特に脂肪萎縮性糖尿病からの疾患特異的 iPS 細胞からの脂肪細胞への分化過程や分化した細胞を用いたエピゲノム解析の基盤として、正常分化脂肪細胞（図 1 の例では褐色・白色脂肪細胞・肝細胞）における細胞特異的なオープンクロマチン領域の解析法を最適化し施行した（図 2）。各細胞特異的な転写制御を受ける遺伝子群の近傍には、その細胞特異的なオープンクロマチン領域が存在しており、エンハンサーとして機能していると考えられた（図 2）。

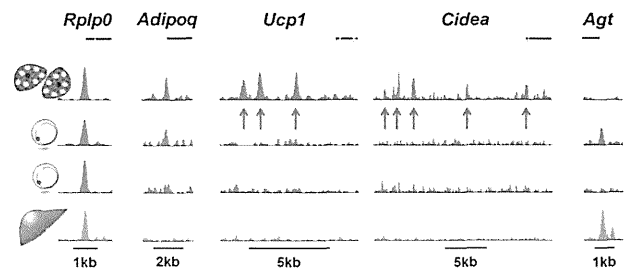


図 2. オミクス解析を駆使した病態研究や創薬

研究のターゲット同定のための基盤技術実験系の確立（褐色・白色脂肪細胞・肝細胞における FAIRE-seq 解析（部分））

疾患特異的 iPS 作成の樹立のための対象としては、東京大学医学部附属病院糖尿病・代謝内科に通院中の、家族性脂質異常症、脂肪萎縮性糖尿病、ミトコンドリア糖尿病、MODY（単一遺伝子による糖尿病）の複数の疾患患者に絞り込んでいる。特に家族性脂質異常症では ApoCII の転写制御異常を末梢血レベルで見出し遺伝的な異常が想定されている ApoCII 欠損症患者(Apolipoprotein C-II deficiency with no rare variant in the APOC2 gene. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 20(5), 481–93 (2013))、後天性の脂肪織炎を伴う脂肪萎縮性糖尿病の患者(未発表)、ミトコンドリア糖尿病、機能異常を伴うアミノ酸置換を同定できている MODY (単一遺伝子による糖尿病) (Maturity-onset diabetes of the young resulting from a novel mutation in the HNF-4alpha gene. *Internal Medicine*, 41(10), 848–52. (2002))の罹患患者を対象に絞り込んだ。

D. 考察

正常脂肪細胞・肝細胞における FAIRE-seq 解析においては、各細胞特異的な転写制御を受ける遺伝子群の近傍に、細胞特異的なオープンクロマチン領域が存在しており（図2）、この解析系の妥当性が示された。対象疾患患者からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立は東京大学医科学研究所の大津真分担研究者がヒトゲノム・遺伝子解析研究として既に承認済みの「疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬・疾患研究」に共同研究者として追加申請手続きを行っている。今後、追加申請の手続きが整い次第、実際の上述の患者からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立を行う。得られた疾患特異的 iPS 細胞を疾患に対応した臓器・細胞へと分化させて、その

細胞が疾患の特性を有しており疾患のモデルとして成立するかどうかについて解析を進める。並行して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、過剰発現や siRNA によるノックダウン、ゲノム編集ツールなどを駆使して病態解析を行う。更に疾患病態の追究を通して標的のシグナルやタンパク質が同定し創薬スクリーニングを施行予定である。

E. 結論

疾患 iPS 細胞由来の各組織細胞を活かし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ターゲット同定のための基盤技術の系を確立した。今後は家族性脂質異常症、脂肪萎縮性糖尿病、ミトコンドリア糖尿病、MODY の患者からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立をすすめる。これら希少疾患の疾患モデルの確立、病態解析、創薬スクリーニングを行い、病態解明や治療法の開発につながる可能性が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

●Kadowaki T, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Iwabu M. Adiponectin and its receptor s: implications for obesity-associated diseases and longevity. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2(1):8-9. 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.

●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 Nov 28

●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.

2. 学会発表

●Toshimasa Yamauchi, Miki O. Iwabu, Masato Iwabu, Takashi Kadowaki: AdipoRs Actions not only in Metabolic Organs but also in Hematopoietic Cells Protect from Nutrient Stress-Induced Insulin Resistanc

e via Reducing Lipotoxicity and Inflammation American Diabetes Association 73rd Scientific Sessions (2013.6.22, Chicago, IL)(poster)

●Jing Yu, Hironori Waki, Toshimasa Yamauchi, Nozomu Kamei, Yusuke Hada, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Kohjiro Ueki, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Takashi Kadowaki: Bivalent Histone Modification at the Promoter and Its Resolution Contribute to the Epigenetic Regulation of PPAR γ Gene Expression and Adipocyte Differentiation American Diabetes Association 73rd Scientific Sessions (2013.06.22 Chicago, IL)(oral)

●Toshimasa Yamauchi, Jing Yu, Hironori Waki, Nozomu Kamei, Yusuke Hada, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Kohjiro Ueki, Shuichi Tsumi, Hiroyuki Aburatani, Takashi Kadowaki. Bivalent histone modification of the promoter and its resolution contribute to the epigenetic regulation of PPAR γ gene 49th EASD Annual Meeting (Barcelona, Spain, 2013.9.24)

●Toshimasa Yamauchi, Jing Yu, Hironori Waki, Nozomu Kamei, Yusuke Hada, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Kohjiro Ueki, Shuichi Tsumi, Hiroyuki Aburatani, Takashi Kadowaki. Bivalent histone modification of the promoter and its resolution contribute to the epigenetic regulation of PPAR γ gene expression and adipocyte differentiation ICDM2013 & 5th AASD (2013年11月7日 ソウル)(poster)

- Yuta Hiraike, Jing Yu, Hironori Waki, Masahiro Nakamura, Wei Sun, Tomohisa Aoyama, Megumi Tomioka, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Kohjiro Ueki, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Toshimasa Yamauchi, Takashi Kadowaki. Genome-wide Profiling of Brown Fat-Specific Open Regulatory Regions Identifies NFIA as a Transcriptional Regulator of Brown Fat-Muscle Cell Lineage Specification. Exploring the Role of Brown Fat in Humans (2014.2.25-26, NIH, Bethesda, MD) (Poster)
- 山内 敏正「肥満におけるアディポネクチン・AdipoRの病態生理的意義」第86回日本内分泌学会学術総会 (2013年4月26日 仙台) (口演発表)
- 于 静、脇 裕典、山内 敏正、羽田 裕亮、岩部 真人、岩部 美紀、堤 修一、油谷 浩幸、門脇 孝「脱メチル化酵素Jmjd3とUtxによるPPAR γ プロモーター領域のヒストンH3リジン27トリメチル化の消失は脂肪細胞分化に寄与する」第56回日本糖尿病学会年次学術集会 (2013年 5月16日 熊本) (口演発表)
- 青山 倫久、脇 裕典、山内 敏正、若林 賢一、井上 剛、中村 正裕、于 静、武 和巳、孫 威、岩部 真人、岩部 美紀、藤田 隆教、植木 浩二郎、和田 洋一郎、堤 修一、児玉 龍彦、酒井 寿郎、油谷 浩幸、門脇 孝「脂肪細胞における遠位エンハンサーを介したPPAR γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析」第56回日本糖尿病学会年次学術集会 (2013年5月17日 熊本) (口演発表)
- 脇 裕典、武 和巳、山内敏正、孫 威、岩部 真人、岩部美紀、植木浩二郎、門脇 孝「allはWnt経路を介して脂肪細胞分化を抑制する」第56回日本糖尿病学会年次学術総会 (2013年5月17日 熊本) (口演発表)
- 山内 敏正、岩部 美紀、岩部 真人、門脇 孝「代謝に重要な各組織におけるアディポネクチン受容体を介した細胞内情報伝達の解析と生活習慣病への応用」第56回日本糖尿病学会年次学術総会 (2013年5月18日 熊本) (口演発表)
- 山内 敏正「インスリン抵抗性改善薬」第56回日本糖尿病学会年次学術総会 (2013年5月18日 熊本) (教育講演)
- 青山 倫久、脇 裕典、山内 敏正、若林 賢一、井上 剛、中村 正裕、于 静、武 和巳、孫 威、岩部 真人、岩部 美紀、藤田 隆教、植木 浩二郎、和田 洋一郎、堤 修一、児玉 龍彦、酒井 寿郎、油谷 浩幸、門脇 孝「Long-Range Transactivation of C/EBP α Gene Expression by PPAR γ through Distal Enhancers during Adipocyte Differentiation」第13回東京大学生命科学シンポジウム (2013年6月8日 東京) (ポスター発表)
- 山内 敏正「代謝機能と食品因子」第13回日本抗加齢医学会総会 (2013年6月28日 横浜)(口演発表)
- 山内 敏正「糖・脂質・エネルギー代謝とmetabolic surgery」第13回日本抗加齢医学会総会 (2013年6月28日 横浜)(口演発表)
- 青山 倫久、脇 裕典、山内 敏正、若林 賢一、井上 剛、中村 正裕、于 静、武 和巳、孫 威、岩部 真人、岩部 美紀、藤田 隆教、植木 浩二郎、和田 洋一郎、堤 修一、児玉

龍彦、酒井 寿郎、油谷 浩幸、門脇 孝「脂肪細胞における遠位エンハンサーを介したPPAR γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析」第18回アディポサイエンス・シンポジウム(2013年8月24日 豊中) (ポスター発表)

●于 静、脇 裕典、山内 敏正、亀井 望、熊谷 勝義、羽田 裕亮、岩部真人、岩部美紀、窪田 直人、植木浩二郎、堤 修一、油谷 浩幸、門脇 孝「PPAR γ プロモーター領域のBivalentヒストン修飾は脂肪細胞分化ポテンシャルを規定する」第18回アディポサイエンス・シンポジウム(2013年8月24日 豊中) (ポスター発表)

●于 静、脇 裕典、山内 敏正、亀井 望、熊谷 勝義、羽田 裕亮、岩部 真人、岩部美紀、窪田 直人、植木浩二郎、堤修一、油谷浩幸、門脇孝：「PPAR γ プロモーター領域のBivalentヒストン修飾は脂肪細胞分化ポテンシャルを規定する」第34回日本肥満学会 (2013年10月 東京) 10/11-12

●平池 勇雄、于 静、脇 裕典、山内 敏正、中村 正裕、青山 倫久、孫 威、富岡 恵、岩部 真人、岩部美紀、植木浩二郎、門脇孝：「骨格筋細胞から褐色脂肪細胞への分化転換におけるNFIAの作用の検討」第34回日本肥満学会 (2013年10月 東京) 10/11-12

●山内 敏正、岩部 美紀、岩部 真人、門脇 孝：「代謝に重要な各組織における AdipoRを介した細胞内情報伝達の解析と肥満症治療への応用」第34回日本肥満学会 (2013年10月 東京) 10/11-12

●脇 裕典、山内 敏正、中村 正裕、于 静、平池 勇雄、孫 威、青山 倫久、富岡 恵、

岩部 真人、岩部 美紀、植木 浩二郎、堤 修一、油谷 浩幸、門脇 孝：「FAIRE-seqを用いた褐色脂肪細胞特異的な転写制御領域のゲノムワイド解析」第34回日本肥満学会 (2013年10月 東京) 10/11-12

●脇 裕典、山内 敏正、平池 勇雄、于 静、青山 倫久、中村 正裕、孫 威、富岡 恵、若林賢一、岩部真人、岡田 美紀、堤 修一、児玉 龍彦、酒井 寿郎、植木 浩二郎、油谷 浩幸、門脇 孝：「白色・褐色脂肪細胞におけるクロマチン構造とエピゲノム制御」第34回日本肥満学会 (2013年10月 東京) 10/11-12

●脇 裕典：「脂肪細胞における転写・エピゲノム制御と肥満症における意義」第34回日本肥満学会 (2013年10月 東京) 10/11-12

●山内 敏正：アディポネクチン受容体を標的にした生活習慣病治療薬の開発第36回日本分子生物学会年会 (2013年12月5日 神戸)

●脇 裕典、平池 勇雄、于 静、山内 敏正、中村 正裕、孫 威、青山 倫久、富岡 恵、岩部 真人、岩部 美紀、植木 浩二郎、堤 修一、油谷 浩幸、門脇孝：褐色脂肪細胞特異的な転写制御領域のFAIRE-seqによる新規制御因子の同定第36回日本分子生物学会年会 (2013年12月5日 神戸)

●山内 敏正：「肥満・糖尿病モデルマウスを用いたアディポネクチンとその受容体の健康長寿における意義の解明と治療法開発への応用」(研究賞受賞講演)第28回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 (2014年2月14日 宮崎)

●山内 敏正、岩部 美紀、岩部 真人、門脇 孝：「アディポネクチン受容体アゴニストの

抗糖尿病作用と寿命延長効果」(シンポジウム)
第28回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
(2014年2月14日 宮崎)

「該当なし」

●山内 敏正: アディポカイン up to date 第48
回糖尿病学の進歩(2014年3月8日 札幌)
(口演発表) シンポジウム

2. 実用新案登録
「該当なし」

3. その他
「該当なし」

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

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：星 和人
(軟骨・骨再生医療寄付講座 特任准教授)

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、ヒト iPS 細胞、間葉系幹細胞、耳介軟骨細胞、関節軟骨細胞について、FGFR3 遺伝子発現量およびその下流シグナルを比較検討した。

A. 研究目的

軟骨無形成症は代表的な骨・軟骨の代謝性疾患である。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

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。

(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 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、他の FGFR と比較検討した。FGFR 発現評価は、逆転写 PCR、Real-time PCR を用いて行ない、そのシグナル解析は Western blotting にて行った。また、iPS 細胞の軟骨細胞への分化誘導は、先行論文 (Oldershaw et al. 2010 nature biotechnology) の方法をアレンジして行った。FGFR1,2 はいずれの細胞でも発現が見られた。FGFR3 は iPS 細胞で強く発現する傾向が見られた。

D. 考察

これらの研究は、軟骨無形成症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