

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である変形性関節症にも認められるケースはしばしば存在する。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。

E. 結論

今後は、軟骨無形成症患者由来の iPS 細胞を作製し、大量に細胞を調製し、上記の遺伝子発現情報やシグナル情報を勘案しつつ、創薬研究を進めてゆく方針である。

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, Ohkubo 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

2. 学会発表

●星 和人, 自己組織化ペプチドを活用した次世代再生軟骨組織の研究開発, 第13回日本再生医療学会総会, 2014年3月4日-3月6日, 国立京都国際会館, 京都

●星 和人, 軟骨の再生・再建-軟骨の生態学的研究-, 第27回日本軟骨代謝学会, 2014年2月28日-3月1日, 京都府医師会館, 京都

●星 和人, 足場素材を導入した3次元再生軟骨の研究開発, 第16回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ, 2013年12月25日-26日, 東京

●星 和人, 生分解性ポリマーを用いた軟骨再生医療の研究開発, 第30回高分子研究会講座, 2013年11月27日, 東京大学生産技術研究所, 東京

● Kazuto H. Clinical Application of Tissue-engineered Cartilage in Craniofacial

Areas. 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. 2013.10.21-24, Barcelona, Spain.

●星 和人, 足場素材を用いた軟骨再生医療の新展開, 第14回再生医療の実用化に関するニーズ発表会, 2013年10月11日, 神戸臨床研究情報センター, 神戸

● Kazuto H. Cartilage Regeneration and Usefulness of Medication. International Cartilage Repair Society 2013 World Congress. 2013.9.15-18, Izmir, Turkey.

●Kazuto H. Optimal Combinations of Scaffolds and Growth Factors for Tissue Engineering of Cartilage. Osteoarthritis Research Society International World Congress on Osteoarthritis, 2013.4.18-21, Philadelphia, USA.

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

心血管細胞への分化誘導と創薬に関する研究

研究分担者：森田啓行

（東京大学大学院医学系研究科健康医科学創造講座・特任准教授）

研究要旨

現時点で特異的治療法が存在しない遺伝性循環器疾患の病態解明および特異的治療法開発を目指し、遺伝性循環器疾患患者末梢血から iPS 細胞を樹立、iPS 細胞由来心血管細胞へと分化誘導し、病態メカニズム解明、治療薬スクリーニングをおこない、さらに、病態メカニズム特異的な治療薬のシーズとなる化合物を同定するのが、本分担研究の目的である。今年度は、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 細胞樹立の対象として適切な症例を選ぶ。iPS 細胞樹立技術、心筋細胞分化誘導技術に関し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。分化誘導に関しては、条件の最適化を続行し、より良質な細胞系を効率よく得ることができるようつとめている。

A. 研究目的

現時点で特異的治療法が存在しない遺伝性循環器疾患の病態解明および特異的治療法開発を目指し、遺伝性循環器疾患患者末梢血から iPS 細胞を樹立、iPS 細胞由来心血管細胞へと分化誘導し、病態メカニズム解明、治療薬スクリーニングをおこない、さらに、病態メカニズム特異的な治療薬のシーズとなる化合物を同定する。

B. 研究方法

遺伝性心筋症患者から末梢血ゲノム DNA を収集、既知原因遺伝子をスクリーニング(HaloPlex 法)、引き続き、全エクソーム解析をおこない、原因遺伝子変異およびその他の遺伝的背景を明らかにし、iPS 細胞樹立の対象として適切な患者を選ぶ。

iPS 細胞樹立、品質検定、iPS 細胞由来心血管細胞への分化誘導のための手技・体制を整備する。

（倫理面への配慮）

東京大学医学部研究倫理委員会において、全ゲノム解析および iPS 細胞関連研究に関して既に承認を取得している。

C. 研究結果

遺伝性心筋症患者 10 名およびその血縁者から末梢血ゲノム DNA を収集、既知原因遺伝子スクリーニング(HaloPlex 法)、引き続き、全エクソーム解析を開始した。原因遺伝子変異およびその他の遺伝的背景を明らかにし、iPS 細胞樹立の対象として適切か精査している。

iPS 細胞樹立に関しては、末梢血にエピソーマルベクターを用いて Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, LIN28, p53-shRNA を導入することによりおこなう。ヒト多能性幹細胞マーカー陽性の iPS 細胞を 5 クローン以上拾い、品質検定をおこなった。多分化能を有する良質な iPS 細胞樹立が確認できた。

さらに、分化用メディアウムで心筋細胞へと分化誘導し、免疫染色(心筋トロポニン T、心房型・心室型心筋ミオシン軽鎖)およびリアルタイム

PCR(上記および SERCA2A)により、iPS 細胞由来心筋細胞の品質検定をおこなった。病態解析に足る品質の細胞系を得ることができているが、分化誘導条件の最適化を続行し、より良質な細胞系を効率よく得ることができるようつとめている。

D. 考察

iPS 細胞樹立対象患者のリクルートをさらに進める必要がある。解析コントロール症例として、変異陰性血縁者が最適であり、その意味でも大きな家系を構成している患者を今後優先的に解析対象にする。

iPS 細胞樹立はスムーズにおこなうことができるが、心筋細胞への分化誘導プロセスは、培養条件を最適化するなど今後の改良が必要である。

E. 結論

病態解明および特異的治療法開発を見据えて、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 細胞樹立の対象として適切な症例を選ぶ。iPS 細胞樹立技術、心筋細胞分化誘導技術に関しても検証済みである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Morita H. Human genomics in cardiovascular medicine; implications and perspectives. *Circ J.* 77: 876-885, 2013.
- 森田啓行. iPS 細胞を用いた心不全の病態解析. *Pharma Medica* 31(5): 45-48, 2013.
- Nakayama A, Morita H., Ando J, Fujita H, Ohtsu H, Nagai R. Adverse cardiovascular outcomes associated with concurrent use of clopidogrel or ticlopidine and proton-pump inhibitors in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Heart Vessels.* 28: 292-300, 2013.
- Nakao T, Morita H., Maemura K, Amiya E,

Inajima T, Saito Y, Watanabe M, Manabe I, Kurabayashi M, Nagai R, Komuro I. Melatonin ameliorates Angiotensin II-induced vascular endothelial damage via its antioxidative properties. *J Pineal Res.* 55: 287-293, 2013.

- Kimura K, Takenaka K, Ebihara A, Uno K, Morita H., Nakajima T, Ozawa T, Aida I, Yonemochi Y, Higuchi S, Motoyoshi Y, Mikata T, Uchida I, Ishihara T, Komori T, Kitao R, Nagata T, Takeda S, Yatomi Y, Nagai R, Komuro I. Prognostic impact of left ventricular noncompaction in patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy-prospective multicenter cohort study. *Int J Cardiol.* 168: 1900-1904, 2013.

- Morita H., Komuro I. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension.

New England Journal of Medicine 369: 2161-2162, 2013.

- Morita H. Genetic variants and dilated cardiomyopathy – To be or not to be causative: Is that the question? – *Circ J.* 77: 2879-2880, 2013.

- Nakayama A, Morita H., Miyata T, Hoshina K, Nagayama M, Takanashi S, Sumiyoshi T, Komuro I, Nagai R. Predictors of mortality after emergency or elective repair of abdominal aortic aneurysm in a Japanese population. *Heart Vessels.* 29: 65-70, 2014.

- 森田啓行. 遺伝子から心筋症をみる. *日本内科学会雑誌* 103 (2): 285-292, 2014.

2. 学会発表

- Morita H. Identification of novel susceptibility loci for myocardial infarction using large-scale genomic analysis. 第 78 回日本循環器学会学術集会, 2014.3.21-23, 東京

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

該当なし

3.その他

該当なし

2. 実用新案登録

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

研究倫理・臨床倫理上の検討

研究分担者：瀧本禎之
(東京大学・医療倫理学・心身医学（同施設）・准教授)

研究要旨

iPS 細胞を利用した研究の遂行に関して一般市民の意識調査を目的とし、加齢黄斑変性の当事者・関係者（家族）・非当事者に対して再生医療研究の必要性についての Web 調査を行った。調査依頼者は 10472 人であり、3311 名の回答を得た。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。

A. 研究目的

再生医療の実現化の為に実施される iPS 細胞を利用した研究の遂行に関しては、患者、患者家族の研究協力は元より、一般市民の研究に対する理解が不可欠であると考えられる。報道などにより、iPS 細胞の臨床への応用に対する市民の期待は概して高いものと推測されるが、当事者／非当事者間の期待の差異や、研究類型間の期待の差異については必ずしも明らかになっているとは言いがたい。そこで、本研究では、加齢黄斑変性に焦点を絞り、加齢黄斑変性の当事者・関係者（家族）・非当事者が再生医療研究の各研究類型に関してどの程度推進する必要性を感じているかを調査することを目的とする。

B. 研究方法

調査会社を介した Web 調査を実施した。調査票は、東京大学大学院医学系研究科医療倫理学分野で作成し、調査票の配布および収集は調査会社 A に委託して行った。患者群（400 名）、患者家族群（200 名）、および一般成人群（全国 20～69 歳男女の調査モニター集団から、日本の人口動態に合わせて無作為に抽出した一般成人 2400 名）を対象とし、

予想回収数を約 3000 名として、WEB 上で調査票を配布した。iPS 細胞を使用する研究の目的を（1）肝臓や腎臓など、臓器の再生（以下、「臓器」）、（2）神経の再生（以下、「神経」）、（3）難病のための治療薬の開発（以下、「創薬」）、（4）生殖補助医療に用いる精子や卵子の作成（以下、「生殖」）、の 4 つに類型化し、それぞれの研究タイプの推進の必要性の度合いを調査した。

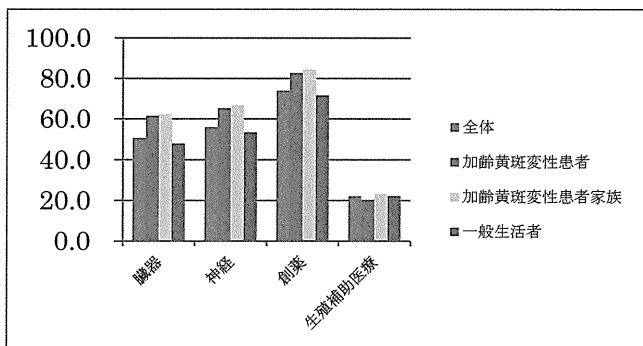
（倫理面への配慮）

本調査は東京大学医学部研究倫理委員会の承認を受けて行った（「iPS 細胞を使用した難病の研究に関する意識調査」 審査番号 10437）。なお、対象患者のリストおよび対象患者家族のリストは、調査会社 A が保有している。また、本研究で用いる調査票で用いる画像及び絵図は、すべて無料で使用できる著作権の発生しないものを、作成者の許可を得た上で使用した。また本調査は、回答者個人の特定を出来ない無記名自記式調査として行った。

C. 研究結果

調査依頼者は 10472 人であり、3311 名の回答を得た（回収率 31.6%）。その結果、「大いに推進す

べき」と回答した者の比率は(3)創薬において最も高い(74.0%)ことが分かった((1)と(2)に関してはマクネマーの検定を実施、共に $p<.0001$ 、ボンフェローニの方法により多重性の調整の後、1%水準で有意差有)。また、(1)臓器、(2)神経、(3)創薬、に関しては患者及び患者家族など当事者の方が非当事者に比べて、「大いに推進すべき」と回答した者の比率が高いことが分かった(χ^2 検定、 $p<.0001$)。



D. 考察

iPS細胞を使用した研究について、報道などで通常光が当てられがちな臓器の再生より、創薬への期待が高いことが示されたことは、当事者／非当事者を問わず、iPS細胞由来の細胞を直接体内へ取り込むことへの忌避の兆候と見なすことができると同時に、創薬を難病治療に限定したとことから、最も社会的不利益を被っている患者への臨床応用を第一に目指すべきという価値観の表出とも考えることができる。また、(1)臓器、(2)神経、

(3)創薬に関して、当事者／非当事者間で研究推進の必要性の認識に差異が生まれていることに関しては、当事者は自身への直接的な利益の可能性も念頭に置き、iPS細胞研究の推進に高い期待を寄せていると考えられる。

E. 結論

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。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。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
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
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：iPS 細胞の樹立と創薬の基盤研究

研究分担者：今井浩三

（東京大学医科学研究所附属病院 病院長 同抗体・ワクチンセンター特任教授）

（研究協力者：海老原康博助教）

研究要旨

（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。我々が経験した（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。この細胞は、理化学研究所へ寄託され、世界の研究者により使用可能となっている。

A. 研究目的

治療方法のない極めて稀な（8；9）転座型白血病患者由来 iPS 細胞を作成し、その白血病細胞の機能。本態を探索し、新たな治療方法を開発しようとした。

B. 研究方法

我々が経験した（8；9）転座型白血病患者白血病細胞から常法により、iPS 細胞の樹立を試み、本細胞を使用して、各種細胞への増殖状態を検索した。

（倫理面への配慮）

研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）に関わる状況について、十分な配慮をして、これを本人並びに家族からいただいており、倫理面の問題がないと判断する。

C. 研究結果

（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。我々が経験した（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。

D. 考察

本研究による血液腫瘍細胞由来の iPS 細胞を用いた研究成果は論文化の予定である。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。なお、この iPS 細胞は、理

化学研究所に寄託し、世界の研究者が利用できるように、道を拓いた。

E. 結論

樹立された iPS 細胞を用いて病態解析を施行した結果を用いて、新たな治療薬の開発に挑戦する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

●Nasuno M, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nakagaki S, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Mesenchymal stem cells cancel azoxymethane-induced tumor initiation. *STEM CELLS* n/a–n/a DOI: 10.1002/stem.1594, 2013.

●Suzuki R, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Niinuma T, Sato A, Noshō K, Yamamoto H, Kai M, Sugai T, Imai K, Suzuki H, Shinomura Y. Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk. *J Gastroenterol* [Epub ahead of print], 2013.

●Shimizu T, Suzuki H, Nojima M, Kitamura H, Yamamoto E, Maruyama R, Ashida M, Hatahira T, Kai M, Masumori N, Tokino T, Imai K, Tsukamoto T, Toyota M. Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer. *Eur Urol* 63:1091-1100, 2013.

●Sawada T, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Shioi Y, Akasaka R, Kamimae S, Harada T, Ashida M, Kai M, Adachi Y,

Yamamoto H, Imai K, Toyota M, Itoh F, Sugai T. Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 52:140-149, 2013.

●Kato N, Yamamoto H, Adachi Y, Ohashi H, Taniguchi H, Suzuki H, Nakazawa M, Kaneto H, Sasaki S, Imai K, Shinomura Y. Cancer detection by ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 methylation in pancreatobiliary fluids. *World J Gastroenterol* 19:1718-1727, 2013.

●Adachi Y, Ohashi H, Imsumran A, Yamamoto H, Matsunaga Y, Taniguchi H, Noshō K, Suzuki H, Sasaki Y, Arimura Y, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y. The effect of IGF-I receptor blockade for human esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Tumor Biol* [Epub ahead of print] 2013.

●Kagami H, Agata H, Inoue M, Asahina I, Tojo A, Yamashita N. Imai K. The use of bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. *Tissue Eng. Part B*. in press.

2. 学会発表

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

該当なし。

2. 実用新案登録
該当なし。

該当なし。

3.その他

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 細胞を用いた難病研究を支える基盤体制の整備

研究分担者：大津 真
(東京大学医科学研究所・准教授)

研究要旨

本研究の遂行において、対象とする難治性疾患から効率的に高品質の iPS 細胞を樹立し、その特性を評価する基盤技術の確立と体制整備は不可欠である。また、創薬研究に適した分化培養系の確立、改良、維持の他、iPS 細胞に関係する種々の技術を拠点内研究者へと提供しうる中心的ラボユニットを拠点内に設置することも重要である。そこで、平成 25 年度には血液細胞等の体細胞から iPS 細胞を樹立する技術、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。さらにヒト検体を扱う研究であることから、東京大学全体の参画研究者を包括しつつ多くの難治性疾患を対象とすることを可能にすべく研究計画書を新規に作成し承認を受け、研究倫理面でも不備なく研究が遂行できるよう体制を整備した。

A. 研究目的

東京大学拠点において iPS 細胞を利用した共同研究を展開し、種々の難病に対する画期的な創薬へと結びつけることを目的とする。

全ての研究は、東京大学医科学研究所ゲノム倫理委員会にて承認された計画書に基づき、対象者からインフォームドコンセントを取得し、個人情報管理における十分な配慮のもと施行した。

B. 研究方法

疾患由来 iPS 細胞樹立法の整備：難病疾患患者からの血液細胞、骨髄細胞、皮膚線維芽細胞を用いて iPS 細胞の樹立を行った。樹立には山中 4 因子を発現するセンダイウイルスベクターおよび京都大学より供与を受けたエピソーマルベクターを用いた。樹立細胞について、種々の評価を行い多能性幹細胞の証明を行った。維持培養系では創薬に適した分化培養系への移行がスムーズに行えるようフィーダーフリー系の試行を行った。血液細胞への分化培養系を基準に分化指向性の評価を行い、異なる維持培養法が未分化性維持等の iPS 細胞特性に及ぼす影響について検討した。

C. 研究結果

平成 25 年 7 月 1 日に東京大学医科学研究所ヒトゲノム倫理審査委員会にて、研究課題「疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬・疾患研究」が承認された。いくつかの血液免疫疾患について、研究計画に基づき同意書を取得の上、採血を行い、造血前駆細胞から iPS 細胞を樹立した。センダイウイルスベクターの使用時にはウイルスゲノムの抜けを RNA レベルで、エピソーマルベクター使用時には、ベクター配列のゲノムへの挿入が無いことを DNA レベルで検証し、いずれもベクター保持の無い iPS 細胞を得ることが可能であった。フィーダーフリー培養系では、コーティングに Matrigel™、または Vitronectin を使用し比較した結果、ライフテクノロジー社製の Essential 8™ メディウム

(倫理面への配慮)

と後者の組合せにより安定してフィーダー培養からの移行、維持、凍結融解後の生細胞の保持が可能であった。特に新規樹立株において、コロニーピックアップ後早期にフィーダーフリー培養にする方法を独自に至適化し完成した。

D. 考察

難病疾患患者では状態の悪化等により、検体採取は可及的に非侵襲的であることが望ましい。平成25年度に整備した少量末梢血からのiPS細胞樹立法はその点で理想的であるが、同時に樹立効率および樹立iPS細胞の品質においても創薬という本研究の目的に十分適しており、標準法としての要件を満たすものであると考えられる。また、樹立後早期にフィーダーフリー培養へと移行できる方法の確立により、より多くのクローンを初期に保存することが可能となった。これにより、無視できないレベルの clonal variation が予想されるiPS細胞研究において、より多様な初期クローンを得て中から目的に合致する最良の株を選別することで、最善の創薬研究へと結びつけることができると考える。また同時にフィーダー培養系に比べて導入が容易であり、拠点横断的に画一した技術共有を可能にするのがフィーダーフリー培養系の強みであり、これを最大限に利用することで東京大学拠点全体の成果への貢献が期待できる。

E. 結論

低浸襲の樹立基本形として最低 5 ml 程度の末梢血から安定してゲノム挿入の無い良質のiPS細胞を樹立する方法を整備した。創薬研究に適した培養系としてフィーダーフリー培養系を確立し、樹立後早期にフィーダー培養から移行する標準的手法も確立した。MEF細胞等のフィーダーに依らない培養系は拠点内の分担研究者への技術供与も容易であり、これを共有することで本研究遂行が促進されることが期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, Okabe M, Masaki H, Takaki S, Otsu M, Nakauchi H. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther.* 21: 1424-31, 2013.
- Saka K, Kawahara M, Teng J, Otsu M, Nakauchi H, Nagamune T. Top-down motif engineering of a cytokine receptor for directing ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J Biotechnol.* 168: 659-65, 2013.
- Saito T, Yano F, Mori D, Ohba S, Hojo H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Tanaka S, Chung UI, Kawaguchi H. Generation of Col2a1-EGFP iPS Cells for Monitoring Chondrogenic Differentiation. *PLoS One.* 8: e74137, 2013.
- Razak SR, Ueno K, Takayama N, Nariai N, Nagasaki M, Saito R, Koso H, Lai CY, Murakami M, Tsuji K, Michiue T, Nakauchi H, Otsu M, Watanabe S. Profiling of MicroRNA in Human and Mouse ES and iPS Cells Reveals Overlapping but Distinct MicroRNA Expression Patterns. *PLoS One.* 8: e73532, 2013.
- Lin HT, Otsu M, Nakauchi H. Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence. *Philos Trans R Soc Lond Series B, Biol Sci.* 368: 20110334, 2013.
- Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet.* 92: 431-8, 2013.

●Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet.* 45: 1232-7, 2013.

●Hirata S, Takayama N, Jono-Ohnishi R, Endo H, Nakamura S, Dohda T, Nishi M, Hamazaki Y, Ishii E, Kaneko S, Otsu M, Nakauchi H, Kunishima S, Eto K. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia iPS cells exhibit defective MPL-mediated signaling. *The J Clin Invest.* 123: 3802-14, 2013.

●Hamanaka S, Ooehara J, Morita Y, Ema H, Takahashi S, Miyawaki A, Otsu M, Yamaguchi T, Onodera M, Nakauchi H. Generation of transgenic mouse line expressing Kusabira Orange throughout body, including erythrocytes, by random segregation of provirus method. *Biochem Biophys Res Commun.* 435: 586-91, 2013.

2. 学会発表

●Translation of stem cell science from bench to bedside.

Makoto Otsu

First International Medi-Bio Symposium of SIMS-IMSUT-WIS. 2013, Asan, Korea.

●Pleiotropic nature of hematopoietic stem cell responses to an inflammatory niche environment.

Makoto Otsu.

The 2nd Joint Global COE Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE,

The Univ of Tokyo and Chiba Univ Global COE. 2013, Tokyo.

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」

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

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」年次報告書

分担研究報告書

分担課題名：「iPS 細胞用臍帯血細胞の提供と保存」

分担研究者：長村登紀子

（東京大学 医科学研究所 附属病院・講師）、

研究要旨

臍帯血は、増殖力の高い造血幹細胞や naïve リンパ球を含み、ドナーへの肉体的負担のない最も未熟な体細胞であり、iPS 細胞のソースとして注目されている。本研究では、適切な動物モデルや細胞株がない難治性疾患の病態解明や新規治療法の開発用として臍帯血を保存し、iPS 細胞ソースとして提供できるシステムを構築することを目的とする。さらに、臍帯血と同時に採取できる臍帯からは、臍帯由来間葉系細胞が豊富に分離培養できることから臍帯の採取も検討した。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た。

A. 研究目的：

本研究では、適切な動物モデルや細胞株がない難治性疾患の病態解明や新規治療法の開発用として疾患を有した患者臍帯血を保存し、iPS 細胞ソースとして提供できるシステムを構築することを目的とする。また同時に採取できる臍帯も間葉系幹細胞または iPS 細胞のソースとして凍結保管する。

臍帯血・臍帯は、胎児由来細胞であり、環境因子の影響が最も少なく、かつ増殖力が良好であるため、iPS 細胞化して疾患の発症段階等を検討するには適すると思われる。さらに、臍帯血と臍帯は元来医療廃棄物として扱われていたものであり、患者への肉体的負担がなく、倫理的にも受け入れやすい。なお、分担者 長村らが参画しているナショナルバイオリソース事業（NBRP）ヒト臍帯血幹細胞バンク事業においても健常者由来の臍帯血の提供が行われており、iPS 細胞化も可能である。

長村らは骨髄に替わる新規細胞ソースとして臍帯血・臍帯由来間葉系幹細胞(MSCs)の国内製剤化とバンキング（厚労科研難治）を進めてお

り、本研究と連携して実施する。（厚労科研難治（H24-難治等(難)一般-016 「希少疾患への治療応用を目指した臍帯および臍帯血由来細胞の

系統的資源化とその応用に関する研究」長村登紀子代表)

B. 方法

臍帯血と臍帯は、協力産婦人科にて帝王切開を予定している妊婦より、紙面にて同意書を取得し、出産時に臍帯血・臍帯の採取を行った。その後、臍帯血と臍帯は、東大医科研細胞リソースセンターに搬送され、図1に従って資源化することとした。臍帯血は、24時間以内に HES 法を用いた有核細胞の凍結を基本とするが、量が少ない場合や疾患ありの場合には、有核細胞とともに、フィコール法を用いて単核球を分離し、凍結保存した。臍帯は 2-3mm に細切し、組織培養ディッシュに並べた後に培養を行う modified Explant 法(特許出願中)を用いて、10%FBS+αMEM にて培養し MSCs を得た。

さらに、臍帯組織には、現在分離できない幹細胞が含まれている可能性や目的とする細胞も将来的に変わる可能性、培養液等の費用が高いことを考慮し、臍帯の一部を臍帯組織ごと凍結保管した(特許出願)。

臍帯血・臍帯由来 MSCs の提供：所内外の研究者が、本研究でバンキングした臍帯血・臍帯由来細胞(MSCs)を基礎的研究のために使用する場合には、当該研究者の所属機関のヒトゲノム倫理審査委員会または倫理審査委員会での承認されたことを確認して提供する体制を整えた。提供に当たって、所定様式を使用し、3rdID を付けて提供する。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京大学医科学研究所（以下、「医科研」）および協力産婦人科所属の病院倫理審査委員会にて承認された「臍帯血と臍帯由来細胞の基礎的研究」およびヒトゲノム倫理審査委員会承認の「臍帯および臍帯血由来細胞の系統的資源化（バンキング）とその応用に関する研究」にもとづいて実施した。医科研内外への試料提供の手続きに準じて、臍帯血・臍帯由来 MSCs の提供体制を整えた。なお、採取時の ID を東大医科研にて 2nd ID と連結置換し、母親を含めて採取者にわからないように匿名化し、さらに外部に提供する場合には 3rdID を付与した。

C. 研究結果

臍帯血・臍帯由来 MSCs の採取と分離培養・凍結方法の検討：

平成 25 年度は、臍帯血・臍帯の採取と臍帯血の調製・凍結保管や臍帯由来 MSCs を調製培養・凍結保管に関する手順（方法に記載）を確立した。また、所内外の研究者への提供手順も構築した。

臍帯血は、疾患を有していることが分かった

時点で、研究用として小分けして分離調製凍結保管した。臍帯血 25 例保管（5 例採取できず）、臍帯由来 MSCs 30 例分保管し、うち 1 例は半陰陽であった。本症例は、染色体検査の結果 21trisomy と判明した。本症例の臍帯血に関しては、血算上、血小板が少ない以外は白血球分画には特に異常は認めていない。また、臍帯由来 MSCs は、健常 MSCs に比し増殖が悪い傾向を認めた。健常児で 1g 当たりの臍帯から MSCs $1.69 \times 10^6/g$ (n=7) が得られるのに比し、 $2.73 \times 10^5/g$ であった（同時期分離比較）。但し、臍帯凍結解凍後も modified explant 法にて MSCs の回収は可能であり、十分提供可能と思われた。なお、本症例においては、出産後転院したため、その後の詳細な臨床データは得られていない。

D. 考察

本研究では、難治性疾患の病態解明や新規治療法の開発用として、疾患を有した患者臍帯血および臍帯を保存し、iPS 細胞ソースとして提供できるシステムを検討した。

今回、細胞調製・凍結保管・提供システムに関して、我々が構築した手順、システムにて運用できると考えられた。

現時点では、特定の 1 産婦人科での採取のため、希少疾患である難治性疾患患者の出生頻度は非常に低いと考えられたが、今回疾患を有する胎児由来細胞を得られたことは、非常に貴重であった。今回経験した 21trisomy (Down syndrome) は Trisomy としては最も頻度が高く、流産・死産率が高い。本症例は半陰陽を伴い、出産後すぐに転院されたためその後の詳細は不明であるが、成長の過程で白血病を発症する場合も多く、一過性異常骨髄症 (Transient abnormal myelopoiesis TAM) や 5 歳までに急性骨髄性白血病(特に M7)を発症するリスクが非ダウン症候群児に比べて 50 倍高いとの報告があ

る。こうした検体の研究は、疾患の段階的発症機序等の解明に有用と思われた。

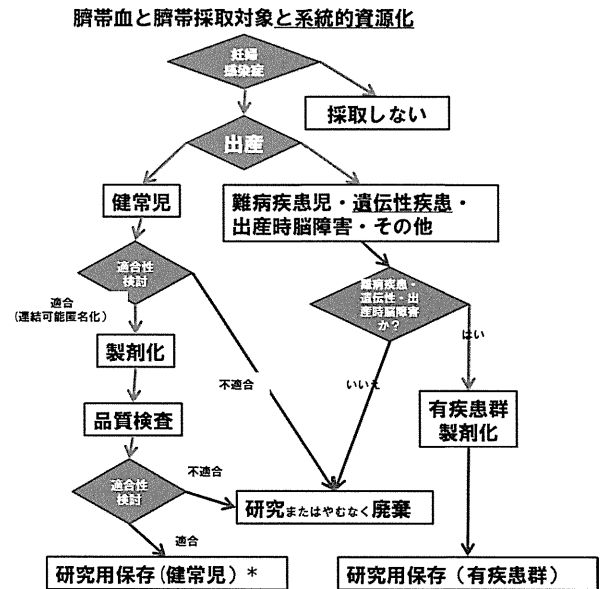
また、これまで東大医科研では、東京臍帯血バンク事業と並行して血縁者間臍帯血採取・保管を行ってきた。これは兄弟に疾患があった場合に次子の臍帯血の調製・凍結・保管を行うものである。そのうち、遺伝性疾患の場合に次子も残念ながら罹患している症例を経験しており、今後も一定の割合で難治性疾患症例が発症する可能性がある。こうした貴重な症例に関して、我々は精神的・肉体的苦痛の少ない方法で、あくまでも治療目的での臍帯血・臍帯採取を行う中で入手していきたいと考えている。しかし、一方で、無作為に収集・保管する中で得られる難治性疾患患者の細胞は、研究者が iPS 細胞化をしたい疾患と必ずしも一致しない可能性は否定できないという問題があり、今後の課題である。

さらに、今回の検討から臍帯血は出産時必ずしも採取できない場合もあるが、臍帯は 100%採取可能であり、組織ごと凍結できることから、臍帯採取も有効な手段と考えられた。

E. 結論

iPS 細胞ソースとして臍帯血・臍帯の収集・調製・凍結保管・提供システムを構築した。

図 1. 臍帯血と臍帯採取と系統的資源化



*現在、健常児に関しては臨床応用のための細胞調製・凍結保管について申請中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Yuzawa M, Yamamoto Y, Yorozu P, Agata H, Tojo A. Stage-Specific Embryonic Antigen 4 in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency. *Tissue Engineering*. 2013 (in press)
- Atsuta Y, Suzuki R, Yamashita T, Fukuda T, Miyamura K, Taniguchi S, Iida H, Uchida T, Ikegame K, Takahashi S, Kato K, Kawa K, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Sakamaki H, Kodera Y; Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Continuing increased risk of oral/esophageal cancer after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in

adults in association with chronic graft-versus-host disease. *Ann Oncol.* 25,435-41. 2014

•Murata M, Nishida T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Fukuda T, Mori T, Kobayashi H, Nakaseko C, Yamagata N, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Atsuta Y, Suzuki R, Naoe T. Allogeneic transplantation for primary myelofibrosis with BM, peripheral blood or umbilical cord blood: an analysis of the JSHCT. *Bone Marrow Transplant.* 49, 355-60, 2014

•Kanda J, Nakasone H, Atsuta Y, Toubai T, Yokoyama H, Fukuda T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Eto T, Miyamura K, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Murata M. Risk factors and organ involvement of chronic GVHD in Japan. *Bone Marrow Transplant.* 49,228-35, 2014

•Kanamori H, Mizuta S, Kako S, Kato H, Nishiwaki S, Imai K, Shigematsu A, Nakamae H, Tanaka M, Ikegame K, Yujiri T, Fukuda T, Minagawa K, Eto T, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Suzuki R, Sakamaki H, Tanaka J. Reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation for patients aged 50 years or older with B-cell ALL in remission: a retrospective study by the Adult ALL Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2013 (in press)

•Murata M, Nakasone H, Kanda J, Nakane T, Furukawa T, Fukuda T, Mori T, Taniguchi S, Eto T, Ohashi K, Hino M, Inoue M, Ogawa H, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Yabe H, Morishima Y, Sakamaki H, Suzuki R. Clinical Factors Predicting the Response of Acute Graft-versus-Host Disease to

Corticosteroid Therapy: An Analysis from the GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 19, 1183-9, 2013

•Kurosawa S, Yakushijin K, Yamaguchi T, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Akiyama H, Taniguchi S, Miyamura K, Takahashi S, Eto T, Ogawa H, Kurokawa M, Tanaka J, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Morishima Y, Sakamaki H, Fukuda T. Recent decrease in non-relapse mortality due to GVHD and infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation in non-remission acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 48, 1198-22, 2013

•Nakasone H, Kanda J, Yano S, Atsuta Y, Ago H, Fukuda T, Kakihana K, Adachi T, Yujiri T, Taniguchi S, Taguchi J, Morishima Y, Nagamura T, Sakamaki H, Mori T, Murata M. A case-control study of bronchiolitis obliterans syndrome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.: GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Transpl Int.* 26, 631-9, 2013

•Nakasone H, Kurosawa S, Yakushijin K, Taniguchi S, Murata M, Ikegame K, Kobayashi T, Eto T, Miyamura K, Sakamaki H, Morishima Y, Nagamura T, Suzuki R, Fukuda T. Impact of hepatitis C virus infection on clinical outcome in recipients after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Am J Hematol.* 88,144-6, 2013

•Atsuta Y, Kanda J, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Onishi Y, Aotsuka N, Nagamura-Inoue T, Kato K, Kanda Y. Different effects of HLA disparity on

transplant outcomes after single-unit cord blood transplantation between pediatric and adult patients with leukemia. *Haematologica*. 98,814-22, 2013.

2. 学会発表

(国内)

1. 何海萍, 長村登紀子, 角田肇, 東條有伸ら. SSEA4 is not a marker for proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived MSCs, 臍帯由来間葉系幹細胞における SSEA4 発現の意義について, 第 75 日本血液学会学術集会総会 (北海道) 2013/10/11
2. 長村登紀子, 内丸薫、高橋聡、大井淳、加藤せい子、河北敏郎、大野伸広、湯地晃一郎、東條有伸, 当院における輸血後鉄過剰症診療の現状 Current Clinical Practice in Post-transfusion Iron Overload in IMSUT Hospital, 第 75 日本血液学会学術集会総会 (北海道) 2013/10/12
3. 長村登紀子、岸野光司、上村知恵, 造血細胞移植に必要な細胞処理・検査に関する技術講習会; こんな時どうする? Q and A テクニカルセミナー第 61 回日本輸血・細胞治療学会 (横浜) 2013/5/16
4. 長村登紀子、何海萍、東條有伸. 臍帯由来間葉系幹細胞の分離とその応用について 第 34 回日本炎症・再生医学会(京都) 2013/7/2

(海外)

●Nagamura-Inoue T, Yamamoto Y, Kobayashi S, Yuzawa M, He H, Tsunoda H, and Tojo A. Impact of mTOR inhibitor, Everolimus on inducible regulatory T cells Derived from Cord Blood, International Society of Cellular

Therapy (ISCT) Annual meeting, New Zealand, 2013

●Tanosaki R, Okuyama Y, Iseki T, Handa M., Kino S., Kumazawa T, Yoshida S, Hara guchi K, Schimizu N, Sakai S, Watanabe N, Uemura T, Ikuta K, Kawahara Y, Muroi K, Nagamura-Inoue T, Takanashi M, for the HPC Study Group, the Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy (JST MCT), ASH meeting, New Orleans 2013/12 /7,

● H. Itonaga, M. Iwanaga, K. Aoki, J. Aoki, K. Ishiyama, T. Kobayashi, T. Sakura, T. Fukuda, T. Yujiri, M. Hirokawa, Y. Morishima, T. Nagamura-Inoue, Y. Atsuta, T. Ishikawa, Y. Miyazaki Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia, New Orleans, 2013/12/7,

●Nagamura-Inoue T, Yamamoto Y, Kobayashi S, Yuzawa M, He H, Tsunoda H, and Tojo A. Impact of mTOR inhibitor, Everolimus on inducible regulatory T cells Derived from Cord Blood, International Society of Cellular Therapy (ISCT) Annual meeting, New Zealand, 2013

●Nagamura-Inoue T, Kodo H, Quality Control for New type of Cord Blood/ Cord Bank for HSCT and others, WS-1, AisaCORD, Kobe, Japan. April 2013

●Nagamura-Inoue T, He H, and Tojo A. Wharton jelly is a rich source of mesenchymal stem cells Symposium 2-2, AisaCORD 2013, Kobe, Japan. April 2013

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

1. 長村 登紀子、森 有加, 大志茂 純、中川栄一、村田 究、小山真太郎 発明の名称：生体組織切断用抑え具 出願人：国立大学法人東京大学 椿本チェーンとの共同出願, 出願日:2013/10/02 特許2013-006923

2. 長村 登紀子、森 有加, 大志茂 純、中川栄一、村田 究、小山真太郎, 出願人：国立大学法人東京大学 椿本チェーンとの共同出願, 発明の名称：培養組織剥離防止プレート 出願日:2013/10/04 特許2013-209095

3. 長村 登紀子、森 有加、島津 貴久、佐瀬孝一 出願人：国立大学法人東京大学 日本全薬工業との共同出願, 発明の名称：臍帯組織の凍結保存方法、特許出願日：2013/12/27, 特願2013-273536

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

免疫・血液系希少疾患由来 iPS 細胞を利用した創薬研究

研究分担者：東條有伸
(医科学研究所 分子療法分野・教授)

研究要旨

本研究では、根治療法あるいは標準治療がない免疫・血液領域の希少疾患を対象として、患者細胞の遺伝子解析情報を利用して分子標的薬または遺伝子医薬を探索し、患者由来 iPS 細胞を用いた病態解析ならびに治療モデルにおいてその検証を行う。今年度は、患者由来 iPS 細胞の樹立を試み、センダイウイルスベクターを用いることによって低悪性度骨髄異形成症候群（MDS）由来の iPS 細胞を樹立した。併せて、当該患者の遺伝子解析用試料を調整し、今後の解析の準備をした。

A. 研究目的

免疫・血液系の希少疾患由来の iPS 細胞を作製する一方で、同一症例の遺伝子解析によって収集される情報をもとに治療標的分子を同定する。iPS 細胞モデルを利用して、候補分子に対する分子標的薬や遺伝子医薬を探索する。

B. 研究方法

本研究は、医科学研究所倫理審査委員会により承認された課題：「難治性造血器疾患由来 iPS 細胞の樹立と iPS 細胞を用いた病態解析」ならびにゲノム倫理審査委員会により承認された課題：「疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬・疾患研究」にもとづき実施した。研究内容を説明のうえ文書による同意を取得した当該疾患患者の骨髄検体より CD34+細胞を分離し、使用するまで凍結保存した。

iPS 細胞の作製には、EF1α プロモーターの下流に豚テショウウイルス由来 2A ペプチド配列で連結した 4 つの初期化因子 cDNA を有するレンチウイルスベクター（3'LTR 内に挿入された loxP 配列により感染細胞を Cre 処理すればウイルス配列の排除可能）または個々の初期化因子をそれぞれ有

するセンダイウイルスベクター（SeV）を用いた。ウイルス感染後の細胞は定法に従い、マウス胎仔線維芽細胞（MEF）をフィーダーとして培養を継続した。

C. 研究結果

レンチウイルスベクター（CS-EF-4F3A-loxP）を感染させた臍帯血 CD34+細胞の場合、MEF 上に播種して 2 週間前後より iPSC 類似の形態を示す細胞塊が出現し、約 0.01%の確立で継代可能な iPSC 様細胞が樹立できた。

いっぽう、2 例の MDS 患者由来 CD34+細胞については、ウイルス感染後 iPSC 類似の形態を示す細胞塊が出現したものの、いずれも継代を重ねると P2~3 で退縮し、iPS 細胞は樹立できなかった。そこで、他の疾患 iPS 細胞作製で用いられているセンダイウイルスベクター（SeV）に変更した。MDS-RCMD 患者 CD34+細胞に初期化因子を発現する SeV を感染させ、生じた細胞塊を継代する過程で siRNA 導入により SeV を排除して iPS 細胞の樹立に成功した。しかしながら、本症例はマーカーとなる染色体異常がないため、樹立され