

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。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、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、細胞保存に適した容器と条件の確認、連携機関との検体受領体制整備、データベース構築、標準業務手順書の整備とスタッフ教育、関連部門との業務分担体制構築、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、エピソードマーカー等を用いて行う。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、膵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 naïve 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。

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。

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。

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, Lynge 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-4inhibitor 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 type2 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. Dereglulation 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, SimX, Ho JS, Wang C, Li H, Lu L, Wang Y, Li JW, Wang Y, Lam VK, Wang J, Yu W, KimYJ, 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, Kambh M, 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：齊藤 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 エアークュベータ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、患者の個人情報が漏れ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, 田中將太, 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

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 thienoindazole 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 - 出生から成人までの治療・再生軟骨治療など - 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

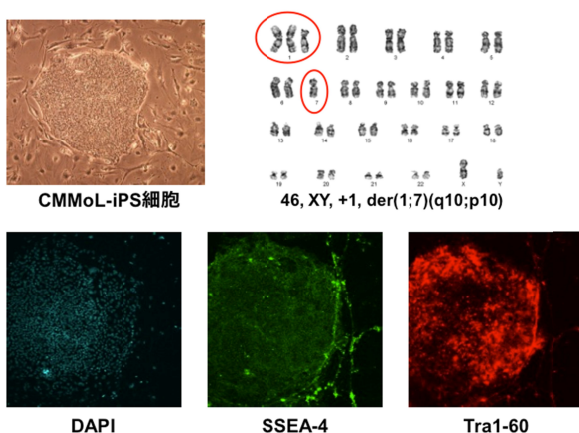
用いて iPS 細胞を樹立する際の最適条件の検討を行ったところ、SCF、IL-3、GM-CSF、TPO を添加して 2 日間前培養を行うこと、5%O₂ 低酸素培養条件でプチル酸、Y27632 などの小分子化合物を付加することで樹立の効率を高めることができた。また、エピゾーマルベクターでは CD34 陽性細胞のみならず、単球、B リンパ球に遺伝子導入することも比較的容易である。末梢血の単球に pCXLE-hOCT3/4-shp53-F 、 pCXLE-hSK 、 pCXLE-hUL を用いて iPS 細胞を樹立させることにも成功している。これらの技術を使って、今まで取り組んでこなかったさまざまな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



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. Evi1 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。

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。

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。

この方法で構築した心筋組織を、灌流する動静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静脈を含めて血管付きグラフトとして摘出、別個体の頸部の動静脈に吻合し、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

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、電気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気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。

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。

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脈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ング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 . 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 B 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)の天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。

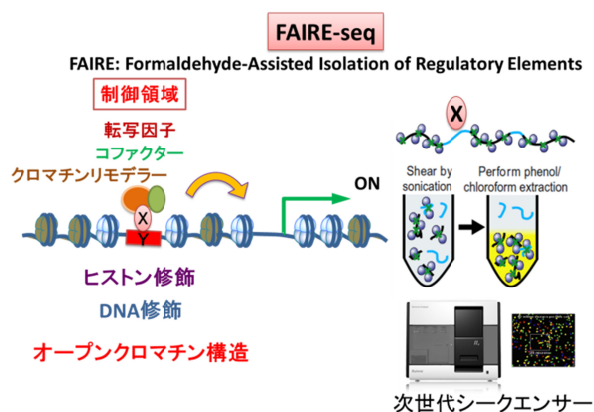


図 1 FAIRE 法と次世代シーケンサーを組み合わせた FAIRE-seq の原理

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）。

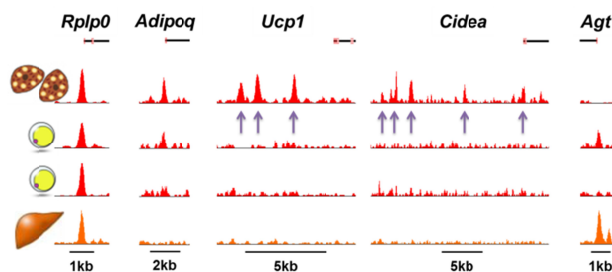


図 2 . オミクス解析を駆使した病態研究や創薬

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 Resistance

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「Cdk

al1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

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。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EDIUM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	3.その他
該当なし	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、それぞれの研究類型の推進の必要性の度合いを調査した。

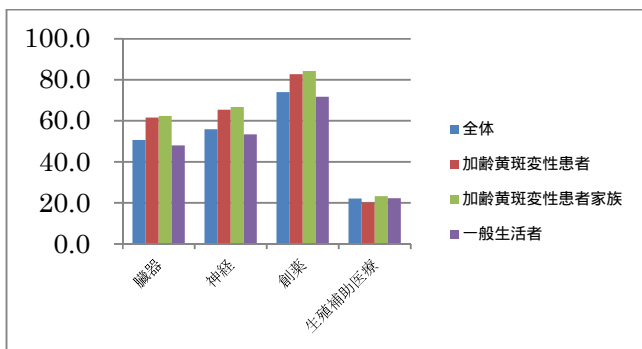
（倫理面への配慮）

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)と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5ml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, Koefler 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（NBRS）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 banking 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(banking)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。

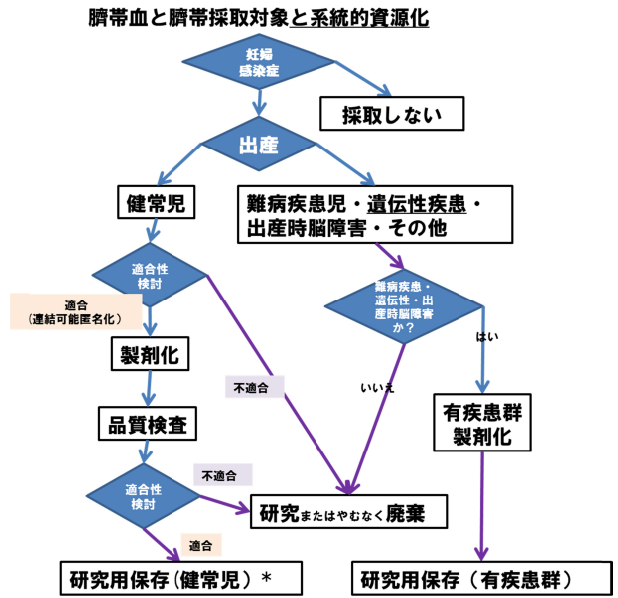
また、これまで東大医科研では、東京臍帯血バンク事業と並行して血縁者間臍帯血採取・保管を行ってきた。これは兄弟に疾患があった場合に次子の臍帯血の調製・凍結・保管を行うものである。そのうち、遺伝性疾患の場合に次子も残念ながら罹患している症例を経験しており、今後も一定の割合で難治性疾患症例が発症する可能性がある。こうした貴重な症例に関して、我々は精神的・肉体的苦痛の少ない方法で、あくまでも治療目的での臍帯血・臍帯採取を行う中で入手していきたいと考えている。しかし、一方で、無作為に収集・保管する中で得られる難治性疾患患者の細胞は、研究者が iPS 細胞化をしたい疾患と必ずしも一致しない可能性は否定でき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., Uzawa 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. Kobayashi1, T. Sakura1, T. Fukuda, T. Yujiri1, 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、EF1 α プロモーターの下流に豚テシヨウウイルス由来 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

た iPSC が MDS クローン由来か、残存する正常細胞由来かの判別は遺伝子解析を要する。現在、RCMD で比較的高頻度に検出されるスプライシング関連遺伝子等の変異の有無を患者 DNA 検体についてスクリーニングしている。

D . 考察

EF1 α プロモーターは ES 細胞や iPSC で働くことから、内在性の発現と併せて初期化因子の発現レベルが高いことが MDS 由来 iPSC 細胞樹立を阻害する可能性を考え、SeV に変更した。しかしながら、臍帯血 CD34⁺細胞の場合はレンチウイルスでも樹立できたことから、エピゲノムの変化を含む細胞特性の差異が原因と考えられた。今後他の疾患特異的 iPSC 細胞の作製には SeV を使用する予定である。

E . 結論

SeV ベクターを用いて、MDS-RCMD 患者由来 iPSC 細胞株の樹立に成功した。

F . 研究発表

1. 論文発表

●Sato A, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ishihara M, Tashiro Y, Gritli I, Shimazu H, Munakata S, Yagita H, Okumura K, Tsuda Y, Okada Y, Tojo A, Nakauchi H, Takahashi S, Heissig B, Hattori K. Inhibition of plasmin attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality by suppressing the matrix metalloproteinase-9-dependent inflammatory cytokine storm and effector cell trafficking. *Leukemia*. 2014 *in press*

●Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Oyaizu N, Asanuma S, Yamagishi M, Yamochi T, Watanabe N, Tojo A, Watanabe T, Uchamaru K. CADM1 expression and stepwise down-regulation of

CD7 is closely associated with clonal selection of HTLV-1-infected T cells potentially evolving into adult T cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res. Published OnlineFirst April 11, 2014; doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3169*

●He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Yuzawa M, Yamamoto Y, Yorozu P, Tojo A. Stage-Specific Embryonic Antigen 4 is not a marker for proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 20(7-8): 1314-24, 2014

●Yokoyama K, Yokoyama N, Izawa K, Kotani A, Harashima A, Hozumi K, *Tojo A. *In vivo* leukemogenic potential of an interleukin-7 receptor- α mutant in hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*. 22(26):4259-63, 2013

●Tomokuni A, Eguchi H, Hoshino H, Dewi DL, Nishikawa S, Kano Y, Miyoshi N, Tojo A, Kobayashi S, Gotoh N, Hinohara K, Fusaki N, Saito T, Suemizu H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Doki Y, Mori M, Ishii H, Nagano H. Effect of *in vivo* administration of reprogramming factors in the mouse liver. *Oncol Lett*. 6(2):323-8, 2013

●Ohno N, Kobayashi S, Ishigaki T, Yuji K, Kobayashi M, Sato K, Watanabe N, Tojo A, Uchamaru K. Loss of CCR4 antigen expression after mogamulizumab therapy in a case of adult T cell leukaemia-lymphoma. *Br J Haematol*. 163(5):683-5, 2013

●Okuyama K, Ikawa T, Harnprasopwat R, Lu J, Yamashita R, Ha D, Toyoshima T, Chanda B, Kawamata T, Yokoyama K, Gertner B, Wang S, Ando K, Lodish HF, Tojo A, Kawamoto H, Kotani A. miR-126-mediated control of cell fate in B cell-myeloid progenitors as a potential alternative to transcriptional factors. *Proc Natl*

Acad Sci USA. 110(33):13410-5, 2013

●Chen MH, Soda Y, Izawa K, Kobayashi S, Tani K, Maruyama K, Tojo A, Asano S. A versatile drug delivery system using streptavidin-tagged pegylated liposomes and biotinylated biomaterials. *Int J Pharm.* 454(1):478-85, 2013

●Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimaru K. The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I. *PLoS One.* 8(1):e53728, 2013

●Morimoto A, Shimazaki C, Takahashi S, Yoshikawa K, Nishimura R, Wakita H, Kobayashi Y, Kanegane H, Tojo A, Imamura T, Imashuku S; Japan LCH Study Group. Therapeutic outcome of multifocal Langerhans cell histiocytosis in adults treated with the Special C regimen formulated by the Japan LCH Study Group. *Int J Hematol.* 97(1):103-8, 2013

●Ebihara Y, Takedani H, Ishige I, Nagamura-Inoue T, Wakitani S, Tojo A, Tsuji K. Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of hemophilic arthropathy. *Hemophilia.* 19:e87-9, 2013

2. 学会発表

●Kato S, Yamaguchi T, Ooi J, Tsukada M, Kawakita T, Takahashi S. The impact of severe chronic GVHD on survival after cord blood transplantation. 39th Annual Meeting of the European Group of Blood and Marrow Transplantation. 2013.4.7-10, London, GB

●He H, Nagamura-Inoue T, Yamamoto Y, Mori Y, Tsunoda H, Tojo A. The immunosuppressive effect of Wharton Jelly-derived mesenchymal stem cells in vitro. The 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2013.12.7-10, New Orleans, USA

●Izawa K, Yamamoto M, Tojo A. Long-term ex vivo maintenance of murine iPSC-derived hematopoietic stem/progenitor cells by conditional HoxB4. The 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2013.12.7-10, New Orleans, USA

●大野伸広、田野崎隆二、福田隆浩、井上明威、藤重夫、伊藤 歩、小林真之、佐藤広太、城 憲秀、川俣豊隆、湯地晃一郎、石垣智寛、小林誠一郎、渡辺信和、内丸 薫、東條有伸. Significance of the allogeneic HSCT in the treatment of the aggressive ATL patients. 第 75 回日本血液学会学術集会、2013.10.11-13、札幌

●湯地晃一郎、佐藤広太、城 憲秀、小林真之、磯部優理、島田直樹、石橋通宏、小沼貴晶、大野伸広、小林誠一郎、小柳津直樹、内丸 薫、東條有伸. Mantle cell lymphoma with hypersensitivity to mosquito bites in the elderly: a distinct entity. Mantle cell lymphoma with hypersensitivity to mosquito bites in the elderly: a distinct entity. 第 75 回日本血液学会学術集会、2013.10.11-13、札幌

●城 憲秀、大野伸広、小林真之、佐藤広太、川俣豊隆、石垣智寛、小林誠一郎、湯地晃一郎、内丸 薫、東條有伸. Mogamulizumab treatment for ATL patients in IMSUT hospital. 第 75 回日本血液学会学術集会、2013.10.11-13、札幌

●佐藤広太、湯地晃一郎、津田真由子、大野伸広、内丸 薫、東條有伸. Marked Eosinophilia Caused by Interleukin-5-producing Cardiac Myxoma. 第 75 回日本血液学会学術集会、2013.10.11-13、札幌

- 小林真之、佐藤広太、川俣豊隆、湯地晃一郎、大野伸広、高橋 聡、内丸 薫、東條有伸. Clinical profile of adult Langerhans cell histiocytosis: A single-institute experience in Japan 第75回日本血液学会学術集会、2013.10.11-13、札幌
- Haiping He、長村登紀子、角田 肇、湯沢美紀、山本由紀、東條有伸. SSEA4 is not a marker for proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived MSCs. 第75回日本血液学会学術集会、2013.10.11-13、札幌

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

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

研究分担者：渡邊 すみ子
（東京大学医科学研究所・特任教授）

研究要旨

樹立された疾患由来 iPS 細胞について遺伝子、miRNA などの分子基盤の解析をおこなうため、miRNA array を用いて既存の iPS, ES について解析した miRNA 発現データベースについて特徴抽出を行った。マウス、ヒト iPS の樹立効率を改善するキナーゼを見いだした。ヒストンメチル化解析の技術確立を行った。

A．研究目的

本研究班で樹立される疾患由来 iPS 細胞について、東大医科研ステムセルバンクと協力し、遺伝子、miRNA、エピジェネティクスなどの分子基盤の解析を行う。また、眼科領域の難治性遺伝性疾患について、iPS 細胞の樹立をめざし、創薬研究を行う。

B．研究方法

ステムセルバンクより提供された多数のヒト、マウス iPS, ES について miRNA array を用いて検討を終えていた miRNA 発現パターンのデータベースについてバイオインフォマティクスの手法により解析を行い、特徴抽出を行った。また遺伝子発現パターンの解析から、マウス、ヒト iPS の樹立効率を改善するシグナル分子としてあるキナーゼに注目し、この発現による iPS 樹立効率の改善を検討した。エピジェネティクスを検討するため、DNA メチル化, Histone メチル化について技術確立を行った。

(倫理面への配慮) 研究対象者に対する人権擁護上の配慮：東京大学の指針にもとづき、研究計画について倫理、ゲノム審査をへて承認ののち、研究

を開始する。研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意は、東大医科研コアラボで確立された方法を統一して利用する。動物実験は指針にもとづき、東大医科研動物実験委員会により承認を得て行っている。

C．研究結果

1. 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。今後これを指標として、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。
2. 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。
3. RNA sequene, ChiP sequene, DNA methylation などが再現よく、解析が可能になった。
4. 眼科領域のある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。

D．考察

miRNA は、正常細胞の様々な組織から作成した iPS において、極めて類似した発現パターンを示し、新たに樹立された iPS の品質管理、および、

疾患特異性を検討する上でよい指標になる。今後 Histone メチル化、DNA メチル化をどのような範囲・手法で検討するか、今後検討が必要となる。

E . 結論

miRNA は、正常細胞の様々な組織から作成した iPS において、極めて類似した発現パターンを示し、新たに樹立された iPS の品質管理、および、疾患特異性を検討する上でよい指標になる。

F . 研究発表

1. 論文発表

- Iida, A., Iwagawa, T., Kuribayashi, H., Satoh, S., Mochizuki, Y., Baba, Y., Nakauchi, H., Furukawa, T, Koseki, H, Murakami, A., and Watanabe, S. Jmjd3 is required for the development of subsets of retinal bipolar cells, **Proc.Natl. Acad. Sci., USA**, 2014: 111,3751-3756
- Koso, H., Tsuhako, A., Lyons, E., Ward, J. M., Rust, A. G., Adams, D. J., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., and Watanabe, S. Transposon mutagenesis identifies Foxr2 as a putative oncogene in medulloblastoma, **Can Res**, 2014: 74, 2351-2361
- Mochizuki, Y., Iida, A., Lyons, E., Kageyama, R., Nakauchi, H., Murakami, A., Watanabe, S. Use of cell type-specific transcriptome to identify genes specifically involved in Müller glia differentiation during retinal development, **Dev Neurobiol**,2013: Nov 4, in press
- Usui, A., Mochizuki, Y., Iida, A., Miyauchi, E., Satoh, S., Sock, E., Nakauchi, H., Aburatani, H., Murakami, A., Wegner, M., Watanabe, S. The early retinal progenitor-expressed gene Sox11 regulates the timing of the differentiation of retinal cells. **Development**, 2013: 140, 740-750
- Iwagawa, T, Tanaka, Y, Iida, A., Itoh, T., Watanabe, S. (2013) Enhancer/promoter

activities of the long/middle wavelength-sensitive opsins of vertebrates mediated by thyroid hormone receptor $\alpha 2$ and COUP-TFII, **Plos One**, 2013: 8, e72065

- Siti Razila Abdul Razak, Ueno, K., Takayama, T, Nariai, N, Nagasaki, M, Saito, R., Koso, H., Lai, C.-Y., 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**, 2013: 8(9), e73532

2. 学会発表

- Rika Saito, Makoto Otsu, Hiromitsu Nakauchi, Sumiko Watanabe, Roles of maternal embryonic leucine zipper kinase, Melk, in stem cells, 第8回研究所ネットワーク国際会議、2013年6月、Kyoto
- 渡辺すみ子、ヒストン H3K27 メチル化による網膜分化制御の機構、第17回視覚科学フォーラム、2013年8月、滋賀県草津市

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

課題名：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

研究分担者：宮島篤

（東京大学分子細胞生物学研究所・教授）

研究要旨

疾患由来 iPS 細胞を利用した難治性疾患の創薬研究を進めるためには、iPS 細胞から機能的な細胞を分化誘導し、それを創薬研究に適したシステムへと応用するための技術開発が必須である。本分担研究では、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。

A．研究目的

肝臓は薬物代謝の中心臓器でもあり、その機能を担う肝細胞は創薬研究においては極めて重要である。しかし、現在利用可能な肝細胞は、初代培養肝細胞や株化した肝細胞で、いずれも生体肝臓中の肝細胞の機能に比べて格段に低い機能しかなく、創薬研究に利用可能な高い機能をもつ肝細胞が求められている。また、インスリンを産生する膵

細胞は糖尿病治療薬の開発にとって鍵となる細胞である。本研究課題の「疾患由来 iPS 細胞を利用した難治性疾患の創薬研究」には、まず、通常の iPS 細胞からの分化誘導系の確立が必須であり、本研究では iPS 細胞から肝臓・膵臓の細胞を分化誘導するとともに、それを創薬研究に適したシステムへと進化させることを目的とする。

B．研究方法

iPS 細胞からの肝細胞分化培養系の報告はすでに多数あるが、問題として、様々なサイトカインによる多段階かつ長期間の分化誘導を必要とすること、また、全ての iPS 細胞を均一に肝細胞に分化させることは困難であり、さらに成熟した高機能肝細胞が得られないといった問題がある。そこで我々は、ヒト iPS 細胞をまず未分化な肝芽細胞へと分化誘導し、純化・増幅した後に、それを機能的肝細胞へと分化成熟させる 2 段階の分化誘導法を検討している。また、肝非実質細胞が肝細胞の機能の発現と維持に重要である可能性も考慮した培養系の開発を行う。

一方、膵細胞への分化誘導系も様々なサイトカインによる多段階かつ長期間の分化誘導を必要とするが、インスリン産生細胞の出現頻度は極めて低い。膵内分泌細胞への分化誘導は多段階分化誘

導系を用いて行うが、すべての細胞が均一、かつ同時に分化するわけではなく、また各ステップの分化効率に差があることが最終的な効率の低下を招いているものと考えられる。そこで、各誘導ステップにおいて分化した細胞のみを分取してその性状を解析し、 β 細胞への再現性のよい分化培養系の樹立を目指す。本研究では、細胞分離法として特異的な RNA 配列を検出可能な Smartflare 法を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はすでに樹立されたヒト iPS 細胞を入手して培養を行う研究であり、倫理問題は発生しない。一部の実験においてマウスを使う場合もあるが、所定の学内諸手続きを経て行っている。

C . 研究結果

肝細胞の *in vitro* での機能発現・維持に肝非実質細胞を加えるとよいとの結果を得ており、肝非実質細胞の一つである肝中皮細胞の役割について解析した。トランスパレント社の Cell-able プレート上にフィーダー細胞としてマウス胎児肝臓由来の肝中皮細胞を播種し、接着後、CD13,CD133 の発現を指標に分離したヒト iPS 細胞由来の肝前駆細胞を播種することで三次元共培養系を樹立した。共培養後に、肝前駆細胞は中皮細胞上に均一なスフェロイドを形成した。さらに、肝細胞の成熟マーカーのひとつである CYP3A4 の発現を解析したところ、平面培養系に比較し、この三次元共培養系において高い発現量が認められた。

膵臓系細胞への多段階分化誘導系において、分化した細胞を転写因子の発現を指標にして、分取し培養する系が構築可能かを検討した。膵臓系の

前駆細胞である PDX1 陽性細胞を、smartflare を用いて染色、セルソーターで分取し、維持培養系の樹立を試みた。その結果、この方法による細胞分取は可能であるという結果を得た。また、この細胞集団には増殖能があった、しかし、継代培養した後に、従来の分化誘導培地を用いた分化誘導を試みたところ、 β 細胞に分化させることは出来なかった。

D . 考察

マウス肝中皮細胞とヒト iPS 細胞由来の肝前駆細胞を使用した三次元共培養系にて、中皮細胞が肝細胞分化にも作用しうることが示された。今後は、ヒト中皮細胞の効果を検討する。市販の細胞に加えてヒト iPS 細胞からの分化誘導系の開発も視野に入れる必要がある。さらに、その他の肝非実質細胞の肝細胞分化に対する作用の検討も行う。

膵臓系前駆細胞マーカー PDX 1 を発現する細胞を分取し培養することが可能であることを確認したが、継代後の分化能が不十分であることが分かった。したがって、現在の培養系では膵前駆細胞としての分化能を維持することができない可能性があり、前駆細胞として安定的に維持培養する系の確立が必要となる。

E . 結論

マウス肝臓由来の肝中皮細胞とヒト iPS 細胞由来の肝前駆細胞の三次元共培養系の樹立に成功した。肝細胞の成熟マーカーの発現が誘導されたことから、肝中皮細胞が肝前駆細胞の成熟を促進する可能性が示唆された。

細胞の分離には通常細胞膜タンパク質に対する

抗体を使ったセルソータが使われるが、本研究では転写因子の発現を Smartflare にて検出し、細胞を分離することが可能であることが示された。したがって、今後はさらに分化が進んだ段階で発現する因子を指標に細胞を分離することで分化段階の異なる細胞の解析が可能となることが期待される。

F . 研究発表

1. 論文発表

- Komori T., Tanaka M., Senba E., Miyajima A. and Morikawa Y. Lack of Oncostatin M receptor □ leads to adipose tissue inflammation and insulin resistance by switching macrophage phenotype. *J. Biol. Chem.* 288, 21861-21875, 2013.
- Miyaoaka Y. and Miyajima A. To divide or not to divide: revisiting liver regeneration. *Cell Division* 8, 8, 2013.
- Taguchi K, Hirano I, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Suzuki A, Motohashi H, and Yamamoto M. Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers. *Mol. Cell Biol.* 34:900-913, 2014.
- Itoh T. and Miyajima A. Cellular Basis of Liver Regeneration. *Hepatology* 59, 1617-1626, 2014.
- 渡邊亜美、宮島篤.糖尿病治療を目指したiPS細胞からの膵島形成.再生医療の最新の進歩、最新医学 69巻、630-638、2014。

2. 学会発表

- 宮島篤、渡邊亜美. iPS細胞から機能的膵島への

分化誘導系の開発. 第56回日本糖尿病学会シンポジウム「糖尿病領域における再生医療の進化」2013年5月17日 熊本市。

- 渡邊亜美、小高晃弘、宮島篤

ヒト iPS 細胞からの機能的膵島分化誘導系の確立と分化誘導メカニズム解析. 第13回日本再生医療学会総会 2014年3月4日. 京都

- 木戸 丈友、伊藤 利将、厚井 悠太、宮島 篤.

ヒト iPS 細胞から肝類洞内皮細胞の分化誘導. 第13回日本再生医療学会総会. 2014年3月6日. 京都

- Miyajima A. 23rd Asia Pacific Association of Study of Liver Disease. “Liver stem cells in development and regeneration”. June 8, 2013. Singapore.

- Kido T, Tanaka T, Sakai Y and Miyajima A. Enrichment of liver progenitors derived from human iPS cells. 20th Annual Meeting of Japanese Society of Hepatic Cell Research. 2013.9.26. Osaka.

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」