

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
（再生医療関係研究分野））

「iPS細胞等の安定供給と臨床利用のための基盤整備」

分担研究報告書

「小児科領域におけるヒト iPS 細胞をもちいた再生医療を実現化するための技術基盤の確立」

研究分担者 **大園 恵一** **大阪大学 小児科学教室** **教授**
研究協力者 **北畠 康司** **大阪大学 小児科学教室** **助教**

【研究要旨】

ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）技術の発明により、ヒト難病の病態解析と再生医療への期待はますます高くなりつつある。しかしながらそのリソースとして多くもちいられる皮膚線維芽細胞では皮膚生検が必須であり、その侵襲ストレスは小児では大きな問題となる。また血液の採取については、とくに新生児の場合は容易に貧血を来すため、その適応について慎重な検討が必要となる。したがって新生児・小児において「安全かつ非侵襲的な採取」を可能にする組織・細胞をリソースとした iPS 細胞の樹立法を確立することは、今後 iPS 細胞の安定供給と臨床利用の基盤整備に大きく資するものと思われる。

一方、臍帯血や臍帯・胎盤などは、胎児とおなじゲノム構造を持つ一方で、分娩後は廃棄される組織である。羊膜組織は眼科領域に於ける再生医療で活用され、また臍帯血幹細胞による移植療法も広く行われており、その有用性および安全性が確立している。これら胎児組織をもちいたヒト iPS 細胞の樹立・保管・分化技術を確立することができれば、児へ侵襲を加えることなくリソースを得ることができ、また疾患患者・健常児の検体を豊富に集めることができるであろう。そこで本研究では、これらの胎児組織のうち臍帯血に注目し、胎児組織由来ヒト iPS 細胞を安全に樹立・保管・分化させることのできる系の構築を目指す。これにより iPS 細胞を安定的に供給することが可能となり、小児のみならず成人を対象としたより広い臨床応用が可能になると期待され、今後の再生医療の発展に大きく寄与するものと考えられる。

A. 研究目的

ヒト人工多能性幹細胞（以下、iPS 細胞）技術の発明は、本格的な再生医療の発達への期待を飛躍的に大きくした。ゲノムを傷つけることなく初期化を引き起こすエピソードベクターならびにセンダイウイルスベクターの開発、血液細胞や神経細胞、心筋細胞などの各細胞系列への分化誘導方法

の確立などによってさらに臨床応用への道が開かれ、昨年はいよいよ加齢黄斑変性症患者に対する自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮シートの移植が世界ではじめて行われた。これからますます臨床応用症例が増えていくと考えられるとともに、そのリソースとしてもちいられる生体の組織・細胞の安定かつ安全な採取が大きな問題となってくる。

とくに小児科領域においては、採血手技や皮膚生検などの処置は大きな侵襲とストレスを加えるため無視できない問題となる。

臍帯血や臍帯・胎盤などは、胎児とおなじゲノム構造を持つ一方で、分娩後は廃棄される組織であり、児に侵襲を加えることなく採取が可能である。そこで我々はこれら胎児組織をもちいたヒト iPS 細胞の樹立・保管・分化技術の確立を目指している。すでに昨年度の研究において、臍帯血検体から効率よくヒト iPS 細胞を作製することができ、分化能・増殖能を保持したまま安定的に保存可能であることを確認した。今年度はさらにこれら臍帯血由来 iPS 細胞が分化誘導能をもっているかどうかについて確認するため、まず造血細胞系列への分化誘導を行い、その確認を行った。

B. 研究方法

樹立されたヒト iPS 細胞は 7 日ごとに継代を行った。低吸着ディッシュをもちいて作製した胚様体 (Embryoid Body; EB) を血清不含培地 (BPEL) (Ng et al., 2008) ならびにサイトカインをもちいて分化誘導をおこなった (Grigoriadis et al., 2010)。サイトカインとしては BMP4、IL6、VEGF、IL11、SCF、IL3、TPO、EPO をもちいた。分化誘導した細胞については、フローサイトメトリーならびにメチルセルロースアッセイによって評価をおこなった。

(倫理面への配慮)

本研究においては関連指針等を遵守し、大阪大学倫理委員会の承認を経て慎重に研究を進める。常に人権を尊重した研究を実行し、患者の不利益とならないよう最大限の配慮を行うこととする。

C. 研究結果

大阪大学医学部附属病院・総合周産期母子医療センターにて採取された 5 名からの臍帯血をもとに持続発現型センダイウイルズベクター SeV-KOSM-302L をもちいてヒト iPS 細胞を樹立した。これらの未分化性および多分化能を確認した後、血液分化誘導を行った。

分化誘導開始から 12 日目の胚様体 (EB) についてグロビン発現を見たところ、明らかに γ -type のグロビンが他の ϵ 、 β に比較して有意に発現しており、この血球分化誘導が胎児型 2 次造血を再現していることを確認できた。またフローサイトメトリーにより、KDR 陽性・CD31 陽性の造血前駆細胞ならびに CD235 陽性赤芽球系細胞、CD33 陽性骨髓球系細胞の出現が見られ、さらにメチルセルロースアッセイにより CFU-G/GM/M、E、GEMM の各コロニーの形成も確認することができた。

D. 考按

臍帯・臍帯血・胎盤・羊膜などの胎盤組織は、分娩後は廃棄される組織である。これらを利用することで痛みによる侵襲ストレスを回避することが可能となる。今回の研究により臍帯血から樹立されたヒト iPS 細胞が正常な血球系への分化誘導能を保持していることを確認することができた。今後さらにゲノム編集を行いその特性を詳細に解析することにより、再生医療・病態解析のリソースとしての可能性を調べる予定である。

E. 結論

我々が構築した臍帯血からのヒト iPS 細

胞樹立法により、侵襲ストレスを考慮する必要があり、かつ造血分化誘導が可能であることを確認することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeyari S, Yamamoto T, Kinoshita Y, Fukumoto S, Glorieux FH, Michigami T, Hasegawa K, Kitaoka T, Kubota T, Imanishi Y, Shimotsuji T, Ozono K.

Hypophosphatemic osteomalacia and bone sclerosis caused by a novel homozygous mutation of the FAM20C gene in an elderly man with a mild variant of Raine syndrome. Bone, 67C:56-62, 2014 Jun 27
2. Kubota T, Kitaoka T, Miura K, Fujiwara M, Ohata Y, Miyoshi Y, Yamamoto K, Takeyari S, Yamamoto T, Namba N, Ozono K. Serum fibroblast growth factor 23 is a useful marker to distinguish vitamin D-deficient rickets from hypophosphatemic rickets. Horm Res Paediatr, 81(4):251-7, 2014

3. Kitaoka T, Miyoshi Y, Namba N, Miura K, Kubota T, Ohata Y, Fujiwara M, Takagi M, Hasegawa T, Jüppner H, Ozono K. Two Japanese familial cases of Caffey disease with and without the common COL1A1 mutation and normal bone density, and review of the literature. Eur J Pediatr, 173(6):799-804, 2014 Jun

4. 大園 恵一 軟骨無形成症 小児科診療, 77 増刊号: 613-615, 2014.

2. 学会発表

1. 北畠 康司、坂野 公彦、平田 克弥、大森 早也佳、荒堀 仁美、松浪 桂、谷口 英俊、和田 和子、大園 恵一：ダウン症候群における病態発症メカニズムの解明、第 117 回日本小児科学会学術集会（2014 年 4 月 11 日、名古屋）

2. 北畠 康司、坂野 公彦、大森 早也佳、平田 克弥、那波 伸敏、和田 和子、荒堀 仁美、谷口 英俊、大園 恵一：疾患特異的ヒト iPS 細胞をもちいたダウン症候群の病態解析、第 37 回日本小児遺伝学会学術集会（2014 年 4 月 10 日、名古屋）

3. 北畠 康司、坂野 公彦、大森 早也佳、平田 克弥、荒堀 仁美、松浪 桂、谷口 英俊、和田 和子、橋井 佳子、大高 真奈美、中西 真人、佐久間 哲史、山本 卓、大園 恵一：Analysis of transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome using gene editing technologies、第 76 回日本血液学会学術集会（2014 年 10 月 31 日、大阪）

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし