

iPS細胞を活用した血液・免疫系難病に対する革新的治療薬の開発

研究代表者 谷 憲三郎 九州大学生体防御医学研究所 教授

研究要旨

「難病」克服に向けた革新的医療技術として、難病患者の疾患特異的人工多能性幹（iPS）細胞を用いることで、アンメット・メディカル・ニーズである希少疾患並びに難病病態の細胞レベルでの再現が可能となり、疾患動物モデル無くしても、細胞レベルでの発症機構の解明が期待でき、候補薬剤を効率良く選定できる可能性が高いものと期待できる。本研究は血液および免疫系難病を対象とし、疾患特異的 iPS 細胞を分化した造血・免疫細胞を対象に、薬剤候補物質を大規模スクリーニングし、候補物質を厳選し、それらの薬剤についての臨床研究を計画・実施するものである。26 年度は以下の研究を実施した。

谷らは、平成 25 年度に作成した手順書に従い、研究分担者と連携して種々の血液・免疫系疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。得られた iPS 細胞は形態、未分化マーカーの発現、3 胚葉分化能の点でその特性を維持しており、各血球系列への安定した分化が可能であった。さらに、正常対照 iPS 細胞を用いて各血球系列への分化誘導系を確立した。この分化誘導系は、血液・免疫系疾患特異的 iPS 細胞を活用した新規創薬スクリーニング法として期待が持てる。**原ら**は、iPS 細胞樹立のために Wiskott-Aldrich 症候群（WAS）、CINCA 症候群、家族性地中海熱、化膿性関節炎・壊疽性膿皮症・座瘡症候群患者検体を採取し、iPS 細胞樹立に供した。また、樹立した iPS 細胞の X 染色体活性化状態を評価する新規手法の開発に着手した。さらに、自己炎症性疾患特異的 iPS 細胞が血管内皮細胞に分化誘導可能であることを確認し、本疾患の病態解明および新規治療薬開発に有用である可能性を示した。**杉山ら**は、サラセミア患者検体使用に向けて検体受け入れ体制を整備した。また、質量分析装置を応用してグロブタンパク質を解析する技術の開発を試みた。さらに、ヒト細胞を用いてグロブタンパク質の解析に有効なペプチドをスクリーニングした。今後本法の応用により、iPS 細胞から分化誘導した赤血球系細胞の品質解析技術開発への寄与が見込まれる。**菅野ら**は、iPS 細胞樹立のためにピルビン酸キナーゼ異常症（PKD）、先天性赤血球異形成貧血（CDA）患者検体を採取するとともに遺伝性有口赤血球症（Dehydrated Stomatocytosis）の一例について、PIEZO1 遺伝子変異を同定した。また CDA の一例に KLF1 遺伝子変異を同定した。これらの先天性貧血症に関しては現在赤血球輸血以外安全な治療法は無いため、今後樹立される iPS 細胞を用いた病態解明および新規治療薬の開発が期待される。**花岡ら**は、iPS 細胞樹立のために発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）患者検体を採取し、iPS 細胞樹立に供した。また、PNH 患者血漿中の遊離型 UL16-binding proteins（ULBPs）を高率に検出することができた。この結果は NKG2D 免疫による PNH 造血障害の発生を示唆する所見であり、NKG2D 免疫が治療標的の候補として有力と考えられた。

以上のように、平成 26 年度は種々の血液・免疫系疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、その品質を評価した。さらに、iPS 細胞を利用した in vitro 病態モデルの確立、病態の解明および創薬スクリーニングに活用しうる多くの成果を得た。

谷 憲三郎 九州大学生体防御医学研究所・教授
 原 寿郎 九州大学大学院医学研究院・教授
 杉山 大介 九州大学先端医療イノベーションセンター・特任教授
 菅野 仁 東京女子医科大学医学部・教授
 花岡 伸佳 和歌山県立医科大学医学部・准教授

A . 研究目的

「難病」の克服に向けて人工多能性幹（iPS）細胞を用いた革新的創薬研究が可能となった。我々はこれまで九州大学病院分子・細胞調整センター（KU-MCPC）において、再生医療・免疫療法に用いる細胞製剤を製造し、施設内に Good Manufacturing Practice（GMP）準拠検査室を設置、

薬事法準拠の品質検査体制を構築した。さらに霊長類・マウス胚性幹(ES)/iPS細胞からの血球分化系の確立(Kurita, R., Tani, K., Stem Cells, 2006)、安全性に優れる自己開発・遺伝子非挿入型麻疹ウイルスベクターを用いたiPS細胞樹立法の開発(論文投稿準備中)を行ってきた。また、厚生労働省「iPS細胞を利用した創薬研究支援事業」にて大型液体窒素保存タンクと供給設備、異常時対応システム及びゲノミクス・エピゲノミクス・プロテオミクス解析関連機器等の導入を行うことにより、基盤整備を行ってきた。

研究期間内(平成26年度から平成29年度)に、学内倫理委員会の承認を取得し血液・免疫系難病特異的iPS細胞を樹立し、それらを対象に文部科学省・最先端研究基盤事業「化合物ライブラリーを活用した創薬等最先端研究・教育基盤の整備」等を活用し、各疾患治療薬候補物質を選定する計画である。

細胞分化障害又は細胞死が誘導されやすいこと等が病態である遺伝性および後天性血液・免疫系疾患を対象とした創薬研究を実施する。X染色体不活性化解除はiPS細胞の特徴であり、これを用いた治療は、X連鎖劣性遺伝性疾患の女性患者へ応用可能と考えられる。具体的にはX染色体活性化異常によるX連鎖性無ガンマグロブリン血症(XLA)、Wiskott-Aldrich症候群(WAS)女性患者を同定し、iPS細胞を用いてX染色体活性化状態を定量し、不活性化を解除したiPS細胞の治療への応用、X染色体活性化異常のメカニズム解明に向け網羅的解析を行い、X染色体不活性化解除薬剤を選定する。

平成26年度には、分担研究者の協力のもと、谷からは前年度に作成した手順書をもとに患者及び健常人由来iPS細胞を樹立する。また、化合物スクリーニング系の確立に向けて、iPS細胞より分化誘導した血液細胞による病態モデル作製に取り組む。

B. 研究方法

5 力年研究計画概要

平成25年度は血液・免疫系難病疾患患者検体の取り扱い、及びiPS細胞の樹立、保存等に関連する各施設での倫理委員会の承認を得る。また、文書による同意を得た健常人検体(骨髄、末梢血など)を用いて、様々な方法でiPS細胞を樹立する。様々な細胞種から異なる方法により樹立されたiPS細胞の性質の違いを検討するとともに、樹立に向けての手順書を作成する。また、GMPレベルでのiPS細胞樹立をめざし、種々の培養条件(基質・培養液等)

を検討する。

平成26年度は、平成25年度に作成した手順書をもとに血液・免疫系難病疾患患者よりiPS細胞を樹立する。樹立したiPS細胞はその未分化性・多能性についてin vitro/in vivoで機能解析を行うとともに、疾患の責任遺伝子変異を確認する。以上の検討によって、品質が確認できた疾患特異的iPS細胞は各分担研究者へ送付するとともに、疾患責任遺伝子による遺伝的影響、タンパク質構造異常による表現型への影響等をトランスオミクス解析(ゲノミクス、エピジェネティクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクス)技術を用いて網羅的に解析しデータベース化する。トランスオミクス解析は、厚生労働省「iPS細胞を利用した創薬研究支援事業」にて整備した解析関連機器を使用する。同時に平成27年度より疾患特異的iPS細胞の長期保存法を検討し、細胞の品質評価項目を策定する。また、骨髄球、赤血球、リンパ球等の各血球系列への分化誘導法を確立する。

平成27年度以降は、検体保存の品質評価項目を策定する。さらに、病態モデルが確立された疾患より、順次ハイスループットスクリーニング系を構築し、創薬スクリーニングに着手する。併せて、樹立したiPS細胞を用いて原因遺伝子変異の機能的影響について評価する。

平成26年度

谷からは分担研究者の協力のもと(1)~(6)の研究を行った。

(1) 患者由来組織の採取

重症先天性好中球減少症(SCN)、発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)、ピルビン酸キナーゼ異常症(PKD)、不安定ヘモグロビン症(UHD)、家族性地中海熱(FMF)、化膿性関節炎・壊疽性膿皮症・座瘡症候群(PAPA症候群) CINCA症候群、アクネ症候群、先天性赤血球異形性貧血(CDA)、若年性サルコイドーシス、X連鎖無ガンマグロブリン血症-急性リンパ性白血病(XLA-ALL)、Wiskott-Aldrich症候群(WAS)患者及び健常人の同意取得後、末梢血のみ採取し、匿名化作業を行った。健常人の臍帯血についても同様に匿名化作業を行った。得られた検体は密度勾配遠心法により単核球分画を濃縮して凍結保存して(2)の実験に備えた。一部の試験では、Tリンパ球を拡大培養して(2)の実験に使用した。

(2) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立

(1) で得られた末梢血単核球あるいは T リンパ球より、平成 25 年度に作成した手順書に従ってセンダイウイルスベクター (CytoTune-iPS 2.0、DNAVEC 社) を用いて iPS 細胞を樹立した。各疾患ごとに少なくとも 6 株の iPS 細胞を樹立し、手順書に従い保存した。加えて、当研究室にて開発した新規ウイルスベクターを用いて iPS 細胞を樹立した。

樹立した iPS 細胞の品質評価のため胚様体形成法による分化誘導を実施し、分化誘導開始約 2 週間後に血液細胞が高効率で同程度に誘導される 3 株を選定した。得られた細胞のさらなる品質評価のため、細胞形態の観察、未分化マーカーの発現解析、核型解析、in vitro での 3 胚葉分化誘導試験および免疫不全マウスでの奇形腫形成試験を実施した。平成 25 年度に「XV」として報告した遺伝子非挿入型組換え麻疹ウイルスベクターを用いて樹立した iPS 細胞についても同様の品質評価を行った。

(3) 遺伝子変異による細胞機能変化の検討

(2) で樹立した iPS 細胞のうち品質に問題がなかった株を用いて、各疾患特異的 iPS 細胞における責任遺伝子配列を解析した。

(4) 細胞分化障害機構、細胞死誘導機構等の解析

(2) で樹立した疾患特異的 iPS 細胞を用いて細胞レベルでの病態再現モデルを確立することを目的に、(2) で樹立した正常対照 iPS 細胞を胚様体形成法またはマウス骨髄あるいは胎仔組織由来フィーダー細胞 (MS5、AGM-S3) との共培養により分化誘導を行った。続いて、誘導された血液細胞の血球マーカー発現解析および形態学的解析を行った。

(5) X 連鎖劣性遺伝性疾患女性例の X 染色体不活性化の評価

平成 25 年度に樹立した XLA 患者由来 iPS 細胞と平成 26 年度に樹立した WAS 患者由来 iPS 細胞を長期間培養し、ヒトアンドロゲン受容体 (HUMARA) 遺伝子のフラグメント解析 (HUMARA 法) により X 染色体不活性化の状態を解析した。HUMARA 遺伝子は X 染色体上の遺伝子であり、CAG の繰り返し塩基配列からなる多型領域により母由来、父由来 X 染色体を区別できる。また、この多型領域近傍にはメチル化認識制限酵素 HpaII の認識配列があることが知られている。不活性化された X 染色体上の

HUMARA 遺伝子は高度にメチル化されていることが知られているため、HpaII により活性化 HUMARA 遺伝子フラグメントを選択的に切断できることを利用して、X 染色体の活性化状態を評価できる。

また、原らと樹立した XLA 患者由来 iPS 細胞を活用した新規薬剤スクリーニング法の開発を開始した。

さらに、X 染色体不活性化異常を起こしたメカニズムを解析するために、女性 XLA 患者および女性 WAS 患者末梢血のエキソーム解析、および RNA Seq 解析を実施した。

(6) GMP 規格 iPS 細胞樹立に向けた準備

平成 25 年度に引き続き、正常対照 iPS 細胞を異種成分不含培養液・基質を用いて培養し、未分化マーカーの維持に優れた組合せを決定した。

(7) X 染色体活性化状態の評価

谷・原らは、(2) で樹立した XLA 患者由来 iPS 細胞の X 染色体活性化状態を評価する新規手法の開発に着手した。

(8) iPS 細胞の樹立、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞の分化誘導、解析

原らは、FMF、PAPA 症候群の疾患由来 iPS 細胞を樹立した。CINCA 症候群 iPS 細胞は、熊本大学の協力を得て樹立した。疾患由来および健常人由来 iPS 細胞より、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞へ分化誘導を行い、得られた細胞を解析した。

(9) 質量分析装置を用いたグロブintaiピングの技術開発

杉山らは質量分析装置を応用し、赤血球系細胞の酸素運搬を司るグロブintaiタンパク質を解析する技術を開発するため、alpha-, beta-, delta-, epsilon-, gamma-, mu-, theta-, zeta-globin を特異的に認識するペプチドをデザインし合成した。デザインしたペプチドとヒト臍帯血細胞、ヒト成人末梢血細胞、K562 赤白血病細胞株を用いて、質量分析装置によるグロブintaiピング技術を開発中である。

(10) 先天性貧血症患者の遺伝子変異の同定

菅野らは、全国の医療機関において先天性溶血性貧血と診断された症例についてインフォームド・コンセントを取得の上、末梢血を得て遺伝子変異に関して解析した。

(11) PNH 患者血漿中の遊離型 ULBP1 濃度測定

花岡らは、遊離型 ULBP1 の血漿中濃度測定法(サンドイッチ ELISA 法 : Human ULBP-1 DuoSet、R&D systems、Minneapolis、MN) を確立し、これまでに確保している 20 名の PNH 患者血漿を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究では試料としてヒト細胞、ヒト幹細胞を用い、ヒトゲノム解析を行う。そこで、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」に準拠し、人権の保護に十分配慮し適正に研究を行う。KU-MCPC で加工、保存する検体に関しては「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、受け入れ前に実施計画書に記載される倫理面への配慮に関する項目(研究対象者に対する利益、不利益の説明ならびにリスクファクターとその排除、波及する影響等の記述内容および説明・同意文書の内容) について、九州大学病院および関連機関内に設置されている臨床研究倫理審査委員会、ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査専門委員会、研究内容によってはヒト ES 細胞の使用に関する倫理審査専門委員会による承認を得るものとする。さらに、有害事象発生時の対応マニュアルを完備し、病院ならびに総長を最高責任者とする体制のもと、厚生労働省への連絡手順を明らかにさせる。

実験動物を用いる研究に関しては、文部科学省および九州大学の定める「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守して動物愛護、生命倫理の観点に十分配慮しながら動物に苦痛を与えることなく実験を行う。全ての遺伝子組換え実験は、文部科学省の定める「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」および九州大学の定める「九州大学遺伝子組換え実験指針」に従って実施し、安全性の確保に最大の注意を払う。そのため、実験室内に P2 レベルの培養室、P2A レベルの SPF 動物管理室において厳密な管理のもとに実験を行い、ウイルス汚染や人畜共通感染症の発症伝播を防止する。

本研究で得られた新規候補薬剤を用いた臨床試験実施が可能となった際には、九州大学 ARO 次世代医療センターの支援のもと「臨床研究に関する倫理指針」を遵守した医師主導治験を薬事法、ICH-GCP ガイドラインに準拠して実施する。

マヒドン大学サラセミアリサーチセンター(タイ)よりサラセミア患者検体の提供を受けるにあたり、

倫理委員会への提出書類を作成し、九州大学医系地区部局：ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会における審査を受け、既に承認済みである。マヒドン大学においても、同様に申請準備中である。

以上のように倫理指針へ配慮した研究を行っているため、倫理的妥当性に問題がないと考えられる。

C . 研究結果

谷らは(1)～(6)の研究成果を得た。

(1) 患者由来組織の採取

表 1 に示す各疾患について、九州大学あるいは分担研究機関において患者由来末梢血を採取し、単核球分画を凍結保存した。また、正常対照群として健康人由来の末梢血(3 例)および臍帯血(4 例)についても同様の処理を行った。

(2) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立

(1) で分離した末梢血単核球分画を用いて、平成 25 年度に作成した手順書に従いセンダイウイルスベクターを用いて iPS 細胞を樹立した。得られた iPS 細胞は少なくとも 10 回以上継代したのちに胚様体形成法により分化誘導を行い、約 2 週間後に血球マーカー CD34・CD45 の発現をフローサイトメトリ解析により評価した。各疾患ごとに少なくとも 6 株の iPS 細胞を用いて実験を行い、各血球系列細胞を安定して同程度に誘導できる 3 株を選定し、更なる解析に用いた。

選定した iPS 細胞の形態学的観察と未分化マーカー NANOG、OCT3/4、SSEA4、TRA1-60 の免疫蛍光染色を行い、未分化性維持に異常がないことを確認するとともに、核型解析により核型に異常がないことを確認した。さらに、胚様体形成法および奇形腫形成試験により iPS 細胞の分化能を検討し、3 胚葉への分化能をもつことを確認した。

遺伝子非挿入型組換え麻疹ウイルスベクターを用いて樹立した iPS 細胞についても同様の結果が得られた(特許出願中)。

(3) 遺伝子変異の機能的影響の検討

(2) で得られた iPS 細胞を用いて順次ゲノムシークエンス解析を行い、得られた結果をもとに責任遺伝子配列を解析済みもしくは解析中である。

表 1. 対象疾患と進捗状況

疾患名	施設	病因・病態	治療・予後	iPS 細胞
重症先天性好中球減少症 (SCN)	東京大学 医科 研	好中球エラスターゼ遺伝子 (ELANE) などの異常により、好中球の成熟障害および減少を来す疾患	重篤な感染症を繰り返し、骨髓異形性症候群および急性骨髓性白血病の合併により致死的となる事がある。	東大で iPSC 樹立
X連鎖性無ガンマグロブリン血症 (female XLA)	九大 小児科	BTK 遺伝子欠損による B 細胞の分化障害および無ガンマグロブリン血症を来す疾患。(一般的には男児に発症)	定期的なガンマグロブリンの補充治療が必要。	樹立済
X連鎖性無ガンマグロブリン血症-急性リンパ性白血病 (XLA-ALL)	東京医歯大	XLA を基礎疾患に持ち、急性リンパ性白血病を発症した症例	-	樹立中
Wiscott-Aldrich 症候群 (WAS)	九大 小児科	WASP 遺伝子変異による血小板減少、先天性免疫不全症を来す疾患。(一般的には男児に発症)	自己免疫疾患や悪性腫瘍の合併頻度が高く、幼少期に造血幹細胞移植が必要。	樹立済
発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH)	和歌山医大	PIG-A 遺伝子変異による赤血球膜の補体抵抗性の低下、溶血性貧血を来す疾患。	溶血性貧血に対し、免疫抑制剤や抗補体抗体が必要。死亡原因として主に血栓症、腎不全の合併のほか、出血、感染、骨髓機能不全などがあげられる。	樹立済
ビルビン酸キナーゼ異常症 (PKD)	東京女子医大	赤血球 PK 活性低下により ATP 産生が低下し、溶血性貧血を来す疾患。	治療は、脾臓摘出以外は特異的なものはなく、重症例では頻回の輸血によるヘモジロース合併例や、造血幹細胞移植が必要な例がある。	樹立済
不安定ヘモグロビン症 (UHD)	東京女子医大	赤血球内部において Hb が変性および沈殿し、溶血性貧血を来す疾患。慢性溶血や急性溶血発作を招く。	治療は、脾臓の有効性が認められる。重症例では輸血が必要となる。	樹立中
家族性地中海熱 (FMF)	九大 小児科	遺伝性周期性発熱症の中で最も頻度の高い疾患。MEFV 遺伝子の異常により、抗炎症物質と考えられている pyrin の発現低下あるいは機能障害を生じる。	第一選択薬はコルヒチンであるが、耐性を示す症例に抗サイトカイン製剤が試みられている。	樹立済
化膿性関節炎・壊疽性膿皮症・産痘症候群 (PAPA 症候群)	九大 小児科	無菌性化膿性関節炎を臨床像の主体とし、壊疽性膿皮症と裏膿性産痘を伴う事の特徴とする重症の自己炎症候群。PSTPIP1 や CD2BP1 遺伝子の異常により、抗炎症作用が减弱すると考えられている。	副腎皮質ステロイドが有効であるとの報告がある。重症例に抗サイトカイン製剤が試みられている。	樹立済
CINCA 症候群	九大 小児科/ 熊本大	乳児期早期より発症する関節症、中枢神経病変、皮疹を特徴とする重症の自己炎症候群。NLRP3 遺伝子異常による IL-1 の過剰産生が病因。	治療薬として抗サイトカイン製剤が用いられる。重症例は虹彩アミロイドーシスを合併し、臓器障害を呈する。	熊大で 樹立済
若年性サルコイドーシス	九大 小児科	NOD2/CARD15 遺伝子異常により、皮膚・関節・眼に肉芽腫を来す疾患。	関節症状の進行に伴う脱臼や拘縮、眼症状の進行による失明の可能性がある。副腎皮質ステロイドの他、サリドマイドや抗 TNF 製剤の使用報告がある。	樹立済
先天性赤血球異形性貧血 (CDA)	東京女子医大	赤血球の形成異常により貧血を引き起こす疾患。本症例は型で、KIF11 遺伝子変異を認めている。	確立した治療法はない。重症例ではヘモジロース合併がある。	樹立済
正常対照	九大	-	-	樹立済

(4) 細胞分化障害機構、細胞死誘導機構等の解析

(2) で得た iPS 細胞のうち正常対照群を用いて胚様体形成法により分化誘導を行い、経時的に血球マーカー CD34・CD45、骨髓球系マーカー CD11b、赤血球系マーカー Glycophorin A (GlyA)、血管マーカー VE カドヘリン (VEC) の発現をフローサイトメトリー解析により評価した。GlyA 陽性赤血球分画の割合は分化誘導開始 18 日目頃に最大となり、CD45 陽性 CD11b 陽性骨髓球系分画の割合は、赤血球より遅れて増加した。一方、造血能をもつ血管内皮細胞を含むと考えられる VEC 陽性分画は、解析期間中ゆるやかに減少した。

より高効率に血液細胞を得るために胚様体中の CD34 陽性未分化造血細胞を磁気ビーズ細胞分離法により分離したところ、約 98% になるまで CD34 陽性細胞を純化することができた。純化した CD34 陽性細胞を、我々が過去に確立した好中球誘導法 (Hiramoto, T., et al., PNAS, 2013) に従い AGM-S3 ストローマ細胞上で G-CSF 等の存在下で培養すると、浮遊細胞の 99% 以上が CD45 陽性 CD11b 陽性であり、形態学的に顆粒球およびマクロファージ系列であった。一方、CD34 陽性細胞を既報 (Carpenter, L., et al., Blood, 2011) に従い MS-5 ストローマ細胞上で IL-7 等の存在下で培養すると、低効率 (浮遊細胞の 1% 未満) ではあるが CD19 陽性 CD10 陽性 B リンパ球系列細胞が検出された。

(5) X連鎖劣性遺伝性疾患女性例の X 染色体不活性化の評価

HUMARA 法による X 染色体活性化状態を解析したところ、XLA 患者由来 iPS 細胞では、平成 25 年度におこなった患者細胞の解析結果と一致して、患者母由来 X 染色体が不活性化していた (図 4)。また WAS 患者由来 iPS 細胞でも X 染色体が不活性化していたが、X 染色体は患者父由来であった。この研究成果を踏まえて、樹立した XLA 患者由来 iPS 細胞を用いた新規薬剤スクリーニング法の開発に取り組んでいる。女性 XLA 患者および女性 WAS 患者末梢血のエキソーム解析および RNA Seq 解析については、現在データを解析中である。

(6) GMP 規格 iPS 細胞樹立に向けた準備

(2) で樹立した正常対照 iPS 細胞を用いて、フィーダーフリー、異種成分不含培養法を検討し、iPS 細胞の未分化性維持に優れた細胞外マトリックスと培養液の組み合わせを検討したところ、iPS 細胞の

樹立には iMatrix-511 (ニッピ) と StemFit (味の素) が優れているという結果を得た (表 2)。

表 2. 培養条件と iPS 細胞の未分化性維持の関係

	rhVTN(Life Technologies)	iMatrix (Nippi)	VTN-XF (Veritas)
Essential 8 (Life Technologies)	×	-	-
S-Medium (DS Pharma)	○	-	-
StemMACS (Miltenyi)	◎	◎	-
TeSR-E8 (Stem Cell Technology)	×	-	-

◎: コロニー形態の維持が良好
○: コロニー形態の維持が可能
×: コロニー形態の維持が不可能
-: 未検討

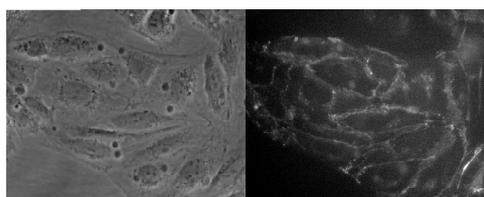
(7) X 染色体活性化状態の可視化

谷・原らは、X 染色体の活性化状態を評価する新規手法の開発に取り組んでいる。

(8) iPS 細胞の樹立、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞の分化誘導、解析

原らは、(2) で樹立した健常人由来 iPS 細胞の胚葉体形成を行い、血管内皮細胞および平滑筋細胞への分化誘導を行った。それぞれ、VE-cadherin (図 1) および SMA α の発現を免疫染色で確認した。

図 1. 正常 iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞 (左: 位相差 右: VE-cadherin)



(9) 質量分析装置を用いたグロビンタイピングの技術開発

杉山らは、alpha-, beta-, delta-, epsilon-, gamma-, mu-, theta-, zeta-globin を認識するペプチドをそれぞれデザインし、合成した。ヒト臍帯血、ヒト成人末梢血、K562 赤白血病細胞株を用いて質量分析装置で解析し、有望なペプチドを選出した (表 3)。

さらに、これらのペプチドを用いてグロビンタイピングの最適化を行っている。最適化後、タイ国マヒドン大学サラセミアリサーチセンターにて収集されたサラセミア患者の血液検体を用いて、グロビンタンパク質を解析する予定である。

表 3. グロビン認識ペプチド

Symbol	Description	PTD	Pep seq
HBA1; HBA2	hemoglobin, alpha 1; hemoglobin, alpha 2	TB239262	[MT3]-FLASVS TVLTSK[MT3]
HBB	Hemoglobin, beta	TB252412	[MT3]-GTFATL SELHC[CAM]D K[MT3]
HBD	hemoglobin, delta	TB532763	[MT3]-LLGNVL VC[CAM]VLA R
HBD	hemoglobin, delta	TB533133	[MT3]-GTFSQL SELHC[CAM]D K[MT3]
HBE1	hemoglobin, epsilon 1	TB412708	[MT3]-AAVTSL WSK[MT3]
HBG1	hemoglobin, gamma A	TB110344	[MT3]-VLTSLG DATK[MT3]
HBG1; HBG2	hemoglobin, gamma A; hemoglobin gamma G	TB110550	[MT3]-EFTPEV QASWQK[MT3]]
HBM	hemoglobin, mu	TB532757	[MT3]-LFTVYP STK[MT3]
HBQ1	hemoglobin, theta 1	TB125559	[MT3]-TYFSLH DLSPGSSQVR
HBZ	hemoglobin, zeta	TB467098	[MT3]-FLSVVS SVLTEK[MT3]
HBZ	hemoglobin, zeta	TB467032	[MT3]-SIDDIG GALSK[MT3]

(10) 先天性貧血症患者の遺伝子変異の同定

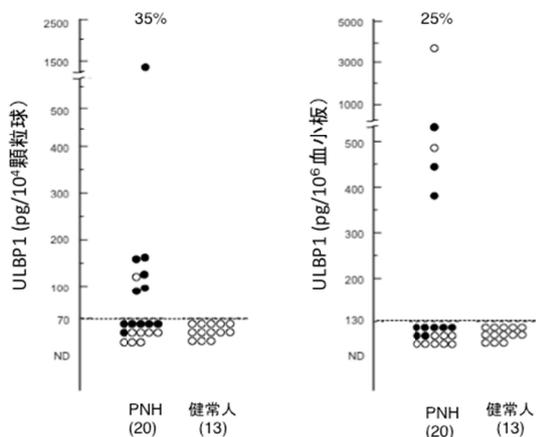
菅野らは、遺伝性有口赤血球症の一例について、PIEZO1 遺伝子変異を同定した。先天性溶血性貧血との鑑別がしばしば困難である CDA の一例に

KLF1 遺伝子変異を同定した。

(11) PNH 患者血漿中の遊離型 ULBP1 濃度測定

花岡らは、単クローン抗体 2 種類を利用した ELISA 法の最適条件を決定後に、PNH 患者血漿を解析した。健常人 13 名の ULBP1 濃度の平均+2SD をカットオフ値（破線）としたところ顆粒球数換算で 35%、血小板数換算で 25%の PNH 患者血漿中に遊離型 ULBP1 発現が認められた。膜発現を欠く患者より有する患者に遊離型リガンドも検出される傾向が見られた（図 2）。

図 2 . 血漿中の遊離型 ULBP1 濃度



D . 考察

平成 26 年度は、平成 25 年度に作成した手順書に従い、センダイウイルスベクターを用いて種々の血液・免疫系疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。得られた iPS 細胞は形態、未分化マーカーの発現、3 胚葉分化能の点で現在のところ iPS 細胞としての品質に問題がなく、各血球系列へ安定して分化が可能であった。同様に、独自開発した組換え麻疹ウイルスベクターにより樹立された iPS 細胞の品質にも問題は認められなかった。疾患特異的 iPS 細胞における遺伝子変異の機能的影響をトランスオミクス解析により明らかにしてデータベース化するために、本年度より iPS 細胞のゲノムシーケンス解析を開始し、責任遺伝子配列を解析中である。さらに、創薬スクリーニングに利用可能な in vitro 病態モデルを確立するために、正常対照 iPS 細胞を用いて各血球系列への分化誘導系を確立した。X 連鎖劣性遺伝性疾患女性例の X 染色体不活性化の評価については、患者細胞で観察された X 染色体不活性化の異常が、疾患特異的 iPS 細胞においても引き継がれていることを

確認した。

平成 25 年度に行った種々の条件検討の結果として作成された手順書に従い平成 26 年度に樹立した疾患特異的 iPS 細胞は、その未分化性の維持・核型・多分化能の点において問題がなかったため、得られた iPS 細胞は本研究の目的である対象疾患治療候補物質の選定に十分利用可能であると考えられる。我々が独自開発した組換え麻疹ウイルスベクターを用いて樹立した iPS 細胞についても同様の結果が得られているため、この新規ウイルスベクターも本研究の更なる遂行に極めて有用であると期待される。

得られた iPS 細胞を用いたトランスオミクス解析による遺伝子変異の機能的影響の解析については、当初予定していた未分化な iPS 細胞の段階での解析に加えて、血液系細胞へ分化誘導したのちに行うことがより有益な情報源となるであろうとの考えに基づき、平成 26 年度には次に述べる血球系列への分化誘導系の確立を優先した。

本研究では血液・免疫系疾患を対象としているため、疾患特異的 iPS 細胞からの各血球系列細胞の高効率で安定した分化誘導が極めて重要である。平成 26 年度には、既報に従い赤血球系列、顆粒球・マクロファージを含む骨髄球系、およびリンパ球系列への分化誘導に成功した。現在は創薬スクリーニングを想定し、更なる分化誘導の効率化や細胞純化についての検討を行っている。これらの成果をもとに、赤血球系列に異常が期待できる PKD 特異的 iPS 細胞等の赤血球系列への分化、骨髄球系に機能異常が期待できる FMF 特異的 iPS 細胞等の骨髄球系への分化、B リンパ球の分化障害が期待できる XLA 特異的 iPS 細胞等の B リンパ球系への分化を試みる事が可能となった。

X 連鎖劣性遺伝性疾患である XLA および WAS の女性例については、患者細胞で観察された X 染色体不活性化の異常が、疾患特異的 iPS 細胞においても引き継がれていた。これらの疾患は X 染色体の活性化異常を原因としていることから、前述の分化誘導系の活用と同時に、iPS 細胞そのものを用いた病態の理解や X 染色体活性化制御機構の解明も期待できる。

近年、動脈硬化における炎症病態の関与が明らかになってきた。慢性関節リウマチや全身性エリテマトーデス (SLE) 患者における病勢の強さと、心血管系合併症との関連が報告されている。炎症性サイトカインによる血管内皮障害がアテローム性動脈硬化病変を誘発しているものと考えられる。また炎症

病態における脂質代謝異常も、血管内皮、血管平滑筋細胞、およびアテローム動脈硬化病変における免疫担当細胞なども、この病態に関与しているものと推測される。疾患由来 iPS 細胞を用いる事により、疾患の特徴を持つ血管内皮細胞および血管平滑筋細胞を詳細に検討することにより、自己炎症疾患における血管炎・動脈硬化の機序解明に寄与する可能性がある。平成 26 年度には自己炎症疾患由来 iPS 細胞を樹立し、血管構成細胞への分化誘導を行った。この研究成果を進展させ、自己炎症疾患の新規病態モデルの確立と創薬スクリーニングの実施が十分に可能であると考えている。

グロビンタンパク質の定性・定量は困難であることから、これまで遺伝子発現解析が主として行われてきた。グロビンタンパク質解析のため、様々なグロビンを特異的に認識するペプチドをデザインし、ヒト血液細胞（臍帯血、成人末梢血、K562 赤白血球細胞株）と質量分析装置を用いた解析により有望なペプチドをスクリーニングした。今後本法を応用することにより、ヒト iPS 細胞から分化誘導した赤血球系細胞の品質解析技術の開発に寄与することが見込まれる。

CDA は溶血性貧血と鑑別すべき疾患であり、従来骨髓所見によってのみ鑑別診断が可能であった。近年 CDA1～4 型に原因遺伝子が同定され、遺伝子レベルでの確定診断が可能となった。この疾患も無効造血疾患であり、脾摘の効果は無いと考えられる。

遺伝性有口赤血球症は赤血球膜異常症の一型であるが、さらに数種のサブタイプがあり、なかでも今回の症例 3 の病歴が示すように、Dehydrated Stomatocytosis(DHSt)は脾摘が禁忌とされており、静脈血栓症や鉄過剰症などの合併により、著しい QOL 低下が生じる。遺伝子解析技術の進歩により稀少遺伝子疾患の原因遺伝子が次々と明らかにされる中で、先天性溶血性貧血の病型診断においても効率よく遺伝子検査を行い、早期に診断を確定することが、適正な治療の選択と患者の予後改善に重要である。

PNH 患者血漿中において遊離型 ULBP1 が MICA と同様に検出された。膜型または遊離型のいずれかのリガンドを有する患者が約 7 割認められたことから、PNH 造血障害発生への NKG2D 免疫の関与が強く示唆された。

平成 27 年度以降は、創薬スクリーニングの本格的実施にむけて各対象疾患における新規薬剤の必要性、in vitro 病態モデルの再現程度等を考慮し、創

薬スクリーニングに必須である再現性、特異性が高いアッセイ系の構築に取り組む。例えば X 連鎖劣性遺伝性疾患女性例は極めて希少ではあるが、常に決まった X 染色体が不活性化する状態にあるため、根源的な X 染色体不活性化機構を制御することにより、種々の X 連鎖劣性遺伝性疾患の治療へ広範に応用可能な新規薬剤候補を得られる可能性が十分に期待できる。

E . 結論

平成 26 年度には、平成 25 年度に作成した手順書を元に種々の疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。さらに、並行して樹立した正常対照 iPS 細胞を用いて血液細胞への分化誘導系を確立した。種々の血液・免疫系難病について生化学・生物学的な新規病態解析手法を確立し、それらが病態解析や診断に活用可能であることを明らかにしてきた。これらの研究を通じて得られた成果は、血液・免疫系難病に対する新規治療薬開発のための創薬スクリーニングへ応用できるものと考えられる。次年度以降は、これらの研究成果を組合せることにより in vitro 疾患モデルを確立し、それを活用した創薬スクリーニングを実施する予定である。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Kummalue T, Inoue T, Miura Y, Narusawa M, Inoue H, Komatsu N, Wanachiwanawin W, Sugiyama D, Tani K. Ribosomal protein L11 and retinol dehydrogenase 11 induced erythroid proliferation without erythropoietin in UT-7/Epo erythroleukemic cells. *Exp Hematol. Exp Hematol.* 43(5), 414-423, 2015.
2. Hamada K, Shirakawa T, Terao S, Gotoh A, Tani K, Huang W. Biosafety studies of carrier cells infected with a replication-competent adenovirus introduced by IAL3B promoter. *Mol Ther Meth Clin Develop.* 2014 (in press).
3. Yamaguchi S, Marumoto T, Nii T, Kawano H, Liao J, Nagai Y, Okada M, Takahashi A, Inoue H, Sasaki E, Fujii H, Okano S, Ebise H, Sato T,

- Suyama M, Okano H, Miura Y, Tani K. Characterization of common marmoset dysgerminoma like tumor induced by the lentiviral expression of reprogramming factors. *Cancer Science*. 105(4), 402-408, 2014.
4. Nii T, Marumoto T, Kawano H, Yamaguchi S, Liao J, Okada M, Sasaki E, Miura Y, Tani K. Analysis of essential pathways for self-renewal in common marmoset embryonic stem cells. *FEBS Open Bio*. 4:213-219. 2014.
 5. Narusawa M, Inoue H, Sakamoto C, Matsumura Y, Takahashi A, Inoue T, Watanabe A, Miyamoto S, Miura Y, Hijikata Y, Tanaka Y, Inoue M, Takayama K, Okazaki T, Hasegawa M, Nakanishi Y, Tani K. TLR7 ligand augments GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Immunology Research*. 2(6), 568-580, 2014.
 6. Takimoto T, Takada H, Ishimura M, Kirino M, Hata K, Ohara O, Morio T, Hara T: Wiskott-Aldrich syndrome in a girl caused by heterozygous WASP mutation and extremely skewed X-chromosome inactivation: A novel association with maternal uniparental isodisomy 6. *Neonatology*. 107(3), 185-90, 2015.
 7. Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Bexon M, Rojavin M, Hu W, Kobayashi M, Lawo JP, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T: Efficacy and safety of IgPro20, a subcutaneous immunoglobulin, in Japanese patients with primary immunodeficiency diseases. *J Clin Immunol*. 34(2), 204-11, 2014.
 8. Yamamura K, Takada H, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Morihana E, Ohga S, Hara T: Early progression of atherosclerosis in children with chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 53(10), 1783-7, 2014.
 9. Koga Y, Takada H, Suminoe A, Ohga S, Hara T: Successful treatment of non-Hodgkin's lymphoma using R-CHOP in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome followed by a reduced-intensity stem cell transplant. *Pediatr Transplant*. 18(6), E208-11, 2014.
 10. Kanno S, Nishio H, Tanaka T, Motomura Y, Murata K, Ihara K, Onimaru M, Yamasaki S, Kono H, Sueishi K, Hara T: Activation of an Innate Immune Receptor, Nod1, Accelerates Atherogenesis in Apoe^{-/-} Mice. *J Immunol*. 194(2), 773-8, 2015
 11. 石村匡崇、高田英俊、原 寿郎：限られたウイルスに易感染性を示す免疫不全症(単純ヘルペス脳炎、EBV、パピローマウイルス、細胞融解型感染形式をとるウイルス)小児内科 2014.
 12. 戸田尚子、原 寿郎：先天性免疫不全症と低栄養臨床栄養(別冊 JCN セレクト9) 2014
 13. Tan KS, Inoue T, Kulkeaw K, Tanaka Y, Mei I Lai, Sugiyama D. Localized SCF and IGF-1 secretion enhances erythropoiesis in the spleen of murine embryos. *Biology Open*, 2015 (in press).
 14. Inoue T, Kulkeaw K, Muennu K, Tanaka Y, Nakanishi Y, Sugiyama D. Herbal drug ninjin'yoeito accelerates myelopoiesis but not erythropoiesis in vitro. *Genes to Cells*, 19(5): 432-440, 2014.
 15. Inoue T, Swain A, Nakanishi Y, Sugiyama D. Multicolor analysis of cell surface marker of human leukemia cell lines using flow cytometry. *Anticancer Res.*, 34(8): 4539-4550, 2014.
 16. Tanaka Y, Kulkeaw K, Inoue T, Tan KS, Nakanishi Y, Shirasawa S, Sugiyama D. Dok2 likely down-regulates Klf1 in mouse erythroleukemia cells. *Anticancer Res.*, 34(8): 4561-4568, 2014.
 17. Viprakasit V, Ekwattanakit S, Riolueang S, Chalaow N, Fisher C, Lower K, Kanno H, Tachavanich K, Bejrachandra S, Saipin J, Juntharaniyom M, Sanpakit K, Tanphaichitr VS, Songdej D, Babbs C, Gibbons RJ, Philipsen S, Higgs DR. Mutations in Kruppel-like factor 1 cause transfusion-dependent hemolytic anemia and persistence of embryonic globin gene expression. *Blood*. 2014;123:1586-1595.
 18. Hikosaka K, Ikutani M, Shito M, Kazuma K, Gulshan M, Nagai Y, Takatsu K, Konno K, Tobe K, Kanno H, Nakagawa T. Deficiency of

nicotinamide mononucleotide adenyltransferase 3 (nmnat3) causes hemolytic anemia by altering the glycolytic flow in mature erythrocytes. *J Biol Chem.* 2014; 289:14796-14811.

19. Kobayashi Y, Hatta Y, Ishiwatari Y, Kanno H, Takei M. Human parvovirus B19-induced aplastic crisis in an adult patient with hereditary spherocytosis: a case report and review of the literature. *BMC Res Notes.* 2014; 11:137.
20. 守屋友美、岡本好雄、小林博人、松田和樹、久保田友晶、緒方康貴、及川美幸、李 舞香、木下明美、青木貴子、千野峰子、岡田真一、高源ゆみ、青木正弘、中林恭子、今野マユミ、槍澤大樹、小倉浩美、菅野 仁. ABO 血液型不適合腎移植におけるアルブミン製剤の必要性. *日本輸血細胞治療学会誌* 2014;60:521-526
21. Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Sato-Otubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E. Loss of function mutation in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol.* 2015;168:854-864.
22. 岡本好雄、槍澤大樹、小林博人、小倉浩美、菅野 仁 自己血漿製剤という観点から見た CART. *日本アフェシス学会雑誌* 2014; 33:178-184
23. 菅野 仁 先天性溶血性貧血の病型および鑑別診断法の進歩と今後の課題. *日本小児血液・がん学会雑誌* 2014;51:446-451
24. Hanaoka N. Cold haemagglutination in bone marrow. *BloodMed.com. Images* 411, 2015

2. 学会発表

1. Nii T, Marumoto T, Yamaguchi S, Liao J, Tani K. Improved Hematopoietic Differentiation of Primate Embryonic Stem Cells. The 56th American Society of

Hematology (ASH) Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, 12/6-12/9, 2014.

2. Narusawa M, Inoue H, Sakamoto C, Matsumura Y, Takayama K, Nakanishi Y and Tani K. The role of plasmacytoid dendritic cells in GM-CSF-based antitumor immunity. The 24th Hot Spring Harbor International Symposium, Fukuoka, 11/7-11/8, 2014.
3. Miyamoto S, Inoue H, Sagara M, Kai M, Kuroda M, Shimizu H, Nakanishi Y, and Tani K. MicroRNA-targeted coxsackievirus B3 abrogates its pathogenicity retaining oncolytic activity. The 24th Hot Spring Harbor International Symposium, Fukuoka, 11/7-8, 2014.
4. Inoue H, Nakano Y, Wang B, Miyamoto S, Narusawa M, Sakamoto C, Takayama K, Shimizu H, Nakanishi Y and Tani K. Coxsackievirus A11 possesses extensive oncolytic activity against human non-small cell lung cancer cells. The 17th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Washington DC, USA, 5/21-5/24, 2014.
5. Wang B, Inoue H, Miyamoto S, Nakano Y, Sakamoto C, Narusawa M, Takayama K, Shimizu H, Nakanishi Y and Tani K. Coxsackievirus A11 displays remarkable oncolytic activity against oxaliplatin-resistant human colorectal cancer cells. The 17th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Washington DC, 5/21-5/24, 2014
6. Sagara M, Kai M, Inoue H, Miyamoto S, Takishima Y, Kobayashi K, Nakano Y, Takayama K, Shimizu H, Nakanishi Y and Tani K. Coxsackievirus B3 exhibits potent oncolytic activity against both human malignant pleural mesothelioma and triple-negative breast cancer cells. The 17th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Washington DC, USA, 5/21-5/24, 2014.
7. Sakamoto C, Inoue H, Narusawa M, Matsumura Y, Miyamoto S, Inoue M,

Takayama K, Hasegawa M, Nakanishi Y, and Tani K. Therapeutic vaccination with irradiated GM-CSF gene-transduced cancer side population cells effectively suppress tumor growth and lung metastasis. The 17th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Washington DC, USA, 5/21-5/24, 2014.

8. Inoue H, Watanabe A, Narusawa M, Sakamoto C, Hiramoto T, Miyamoto S, Inoue M, Takayama K, Hasegawa M, Nakanishi Y, Todo T and Tani K. Therapeutic vaccination with GM-CSF gene-transduced iPS cells induces potent T cells-mediated antitumor immunity. The 105th Annual Meeting of American Association of Cancer Research, San Diego, CA, USA, 4/5-4/9, 2014.
9. Hijikata Y, Inoue H, Murahashi M, Okano S, Tanaka Y, Takahashi A, Okazaki T, Nakanishi Y, Yoshida K, Tsunoda T, Nakamura Y, Tani K. A phase I clinical trial of RNF43 peptide-specific immune cell therapy combined with low-dose cyclophosphamide for patients with advanced solid tumors. The 105th Annual Meeting of American Association of Cancer Research, San Diego, CA, USA, 4/5-4/9, 2014.
10. Li Y, Kobayashi K, Mona MM, Satomi C, Tani K, Takahashi A. FEAT inhibits cell death by modifying intracellular localization of apoptotic signaling factors. Gordon Research Conference on Cell Death, West Dover, VT, USA, 6/8-13, 2014.
11. Li Y, Kobayashi K, Mona MM, Satomi C, Tani K, Takahashi A. Biochemical and intracellular functions of antiapoptotic FEAT protein. Cell Symposia: Hallmarks of Cancer: Asia, Beijing, China, 11/9-11/11, 2014.
12. Tani K. Our immune and gene therapy trials towards conquering cancers. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014, 9/25-9/27 .
13. 山口沙織, 丸本朋稔, 二井偉暢, 河野紘隆, 寥紀元, 永井陽子, 岡田美智代, 高橋淳, 井上博之, 佐々木えりか, 藤井浩, 岡野慎士, 海老瀬速雄, 佐藤哲也, 須山幹太, 岡野栄之, 三浦由恵, 谷憲三朗. 初期化因子搭載レンチウイルス

ベクターにより誘導された未分化胚細胞腫様コモンマーマーモセット腫瘍の特性. 第 4 回日本マーマーモセット研究会大会, 愛知, 2015, 1/22-1/23 .

14. Nii T, Marumoto T, Yamaguchi S, Kawano H, Liao J, Sasaki E and Tani K. Transient inhibition of PI3K-AKT pathway promotes hematopoietic differentiation in common marmoset embryonic stem cells. 第 4 回日本マーマーモセット研究会, 愛知, 2015, 1/22-1/23 .
15. Narusawa M, Inoue H, Sakamoto C, Takayama K, Hasegawa M, Nakanishi Y and Tani K. Plasmacytoid dendritic cells play an essential role in induction of GM-CSF-based antitumor immunity. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪, 2014, 10/31-11/2 .
16. Sakamoto C, Inoue H, Narusawa M, Matsumura Y, Yamada K, Hiramoto T, Takahashi A, Inoue M, Takayama K, Hasegawa M, Nakanishi Y, and Tani K. Therapeutic tumor vaccination with GM-CSF gene-transduced cancer stem cells provokes potent antitumor immunity. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪, 2014, 10/31-11/2 .
17. Nii T, Marumoto T, Yamaguchi S, Liao J, Yamada K, Hijikata Y, Tsuruta T and Tani K. Improved hematopoietic differentiation of primate ESCs by inhibition of PI3K-AKT pathway. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪, 2014, 10/31-11/2.
18. Inoue H, Nakano Y, Wang B, Narusawa M, Miyamoto S, Sakamoto C, Takayama K, Shimizu H, Nakanishi Y and Tani K. Coxsackievirus A11 exhibits ICAM-1-mediated oncolysis against human non-small cell lung cancer cells. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014, 9/25-9/27 .
19. Hijikata Y, Okazaki T, Yamada K, Yoshida K, Inoue H, Ishihara S, Tani K. A Phase I Clinical Trial of Immune Cell Therapy Combined with Cyclophosphamide for Patients with Advanced Solid Tumors. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014, 9/25-9/27 .
20. Wang B, Inoue H, Miyamoto S, Nakano Y, Sakamoto C, Narusawa M, Takayama K, Shimizu H, Nakanishi Y and Tani K. Coxsackievirus A11 is a promising oncolytic

virus agent against oxaliplatin-resistant human colorectal cancer cells. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014, 9/25-9/27.

21. Sagara M, Kai M, Miyamoto S, Inoue H, Takishima Y, Kobayashi K, Takayama K, Shimizu H, Nakanishi Y and Tani K. Coxsackievirus B3 confers robust oncolytic activity in malignant pleural mesothelioma and triple-negative breast cancer. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014, 9/25-9/27.
22. Narusawa M, Inoue H, Sakamoto C, Matsumura Y, Takayama K, Hasegawa M, Nakanishi Y and Tani K. A role of plasmacytoid DCs in GM-CSF-induced antitumor immunity. 第6回血液疾患免疫療法研究会学術集会, 京都, 2014, 9/6.
23. Inoue H, Nakano Y, Wang B, Miyamoto S, Narusawa M, Sakamoto C, Takayama K, Shimizu H, Nakanishi Y and Tani K. Coxsackievirus A11 displays remarkable oncolytic activity against human non-small cell lung cancer cells. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会, 東京, 2014, 8/6-8/8.
24. Sakamoto C, Inoue H, Narusawa M, Matsumura Y, Miyamoto S, Inoue M, Takayama K, Hasegawa M, Nakanishi Y, and Tani K. Therapeutic vaccination with irradiated GM-CSF gene transduced cancer stem cells induces potent antitumor immunity in mice. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会, 東京, 2014, 8/6-8/8.
25. Wang B, Inoue H, Miyamoto S, Nakano Y, Sakamoto C, Narusawa M, Takayama K, Shimizu H, Nakanishi Y and Tani K. Oncolytic virotherapy for oxaliplatin-resistant colorectal cancer cells using coxsackievirus A11. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会, 東京, 2014, 8/6-8/8.
26. Sagara M, Inoue H, Miyamoto S, Kai M, Takishima Y, Kobayashi K, Takayama K, Shimizu H, Nakanishi Y and Tani K. Coxsackievirus B3 displays remarkable oncolytic activity against both malignant pleural mesothelioma and triple-negative breast cancer cells. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会, 東京, 2014, 8/6-8/8.

27. Nii T, Marumoto T, Yamaguchi S, Kawano H, Liao J, Tani K. Improved hematopoietic differentiation of common marmoset embryonic stem cell. 第12回幹細胞シンポジウム, 福岡, 2014, 5/30-5/31.
28. Inoue H, Watanabe A, Sakamoto C, Narusawa M, Miyamoto S, Takayama K, Hiramoto T, Nakanishi Y, and Tani K. Therapeutic vaccination using irradiated iPS cells induces potent antitumor immunity against poorly immunogenic lung tumors. 第54回日本呼吸器学会学術講演会, 大阪, 2014, 4/25-4/27.
29. Tani K. シンポジウム1, 癌免疫療法の現状と展望. 第27回日本バイオセラピー学会学術集会総会, 大阪, 2014, 12/4-12/5.
30. Hara T, Ishimura M, Takada H, Kusuda Y, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H: Association between primary immunodeficiency diseases and vasculitis syndrome. 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies 10/29-11/1, 2014
31. Takada H, Takimoto T, Ishimura M, Urata M, Morio T, Hara T: Wiskott-Aldrich syndrome in a girl caused by heterozygous WASP mutation and extremely skewed X-chromosome inactivation: an association of non-random X-chromosome inactivation and uniparental isodisomy 6. 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. 10/29-11/1, 2014
32. Ishimura M, Mizuno Y, Takada H, Ohga S, Hara T: An Early and Non-invasive Diagnostic Method for Histiocytic Necrotizing Lymphadenitis. FISP/M, 8/30, 2014.
33. 原 寿郎: 自然免疫異常と小児疾患. 第94回日本小児科学会大分地方会例会 12/7, 2014.
34. 原 寿郎: 自然免疫異常と小児・成人疾患. 第134回熊本小児科学会 10/19, 2014.
35. Inoue T, Kulkeaw K, Muennu K, Keai Sinn T, Tanaka Y, Kojima N, Swain A, Nakamichi C, Svasti S, Sugiyama D. Igfbp3 promotes erythroid differentiation via competitive binding to lgf1 in mouse fetal liver. 第76回

日本血液学会、大阪、2014、10/31-11/2

36. Tan KS, Inoue T, Lim Wai Feng, Mizuochi C, Kulkeaw K, Preedagasamzin S, Tanaka Y, Kojima N, Lai MI, Sugiyama D. Mouse embryonic spleen cells accelerate erythropoiesis through SCF and IGF-1 secretion. 第2回赤血球研究会、大阪、2014年10月
37. Tanaka Y, Kulkeaw K, Inoue T, Kojima N, Swain A, Nakamichi C, Shirasawa S, Nakanishi Y, Sugiyama D. Dok2 down-regulates Klf1 in mouse erythroleukemia cells. 第76回日本血液学会、大阪、2014、10/31-11/2
38. Kojima N, Kulkeaw K, Inoue T, Tan KS, Swain A, Nakamichi C, Nakanishi Y, Shirasawa S, Sugiyama D. Aifm2 down-regulates globin gene expression through binding to Klf1 promotor in vitro. 第76回日本血液学会、大阪、2014、10/31-11/2.
39. 青木貴子、市東正幸、小倉浩美、高橋秀弘、岩井朝幸、濱端隆行、渡邊健一郎、常松健一郎、奥野友介、村松秀城、吉田健一、宮野悟、大賀正一、小川誠司、小島勢二、菅野 仁 病因未確定の先天性溶血性貧血に対する全エクソーム解析. 日本人類遺伝学会第59回大会、2014、11/20.
40. 尾上佳子、石谷健、内山智貴、青木貴子、市東正幸、川上和之、松井英雄、林和彦、斎藤加代子、菅野 仁 イリノテカンによる重症下痢症を予測する PGx 바이오マーカーとしての CYP2F1 遺伝子多型. 日本人類遺伝学会第59回大会、2014、11/20.
41. 神尾英則、神尾孝子、尾上佳子、市東正幸、青木貴子、内山智貴、亀岡信悟、斎藤加代子、菅野 仁 テガフル・ウラシル投与による肝機能障害を予測する新規 PGx 바이오マーカーの探索. 日本人類遺伝学会第59回大会、2014、11/20.
42. Utsugisawa T, Uchiyama T, Ogura H, Aoki T, Ohara A, Ishiguro A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Elevated red cell reduced glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia. 56th ASH Annual Meeting & Exposition, Blood 2014; 124(21):1342(abstract). 12/6, 2014.
43. 市東正幸、青木貴子、槍澤大樹、小倉浩美、大賀正一、岩井朝幸、末延聡一、伊藤悦朗、奥野友介、小島勢二、小川誠司、菅野 仁 原因不明先天性溶血性貧血症例の全エクソーム解析による膜骨格蛋白遺伝子変異の同定. 第76回日本血液学会学術集会、2014、10/31.
44. 菅野 仁、青木貴子、市東正幸、槍澤大樹、小倉浩美 わが国における G6PD 異常症の現状. 第76回日本血液学会学術集会、2014、10/31.
45. 菅野 仁 新生児・乳児期に発症する先天性溶血性貧血の病因と診断. 第24回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会、2014、6/13.
46. 槍澤大樹、岡本好雄、松田和樹、久保田友晶、守屋友美、及川美幸、李舞香、木下明美、千野峰子、岡田真一、高源ゆみ、青木正弘、中林恭子、今野マユミ、小林博人、小倉浩美、菅野 仁 安全な CART の運用と適応拡大への新たな試み. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会、2014、5/15.
47. 岡本好雄、松田和樹、久保田友晶、守屋友美、及川美幸、李舞香、木下明美、千野峰子、岡田真一、高源ゆみ、青木正弘、中林恭子、今野マユミ、槍澤大樹、小林博人、小倉浩美、菅野 仁 クリオプレシピテート製剤の院内調製と心臓血管外科手術への応用. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会、2014、5/15.
48. 久保田友晶、松田和樹、守屋友美、及川美幸、李舞香、木下明美、千野峰子、岡田真一、高源ゆみ、青木正弘、中林恭子、岡本好雄、今野マユミ、槍澤大樹、小林博人、小倉浩美、菅野 仁 非溶血性輸血副作用発生状況と副作用報告回収率改善への取り組み. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会、2014、5/15.
49. 松田和樹、久保田友晶、守屋友美、及川美幸、李舞香、木下明美、千野峰子、岡田真一、高源ゆみ、青木正弘、中林恭子、岡本好雄、今野マユミ、槍澤大樹、小林博人、小倉浩美、菅野 仁 当院における静注用免疫グロブリン (IVIG) の使用状況について. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会、2014、5/15.
50. 槍澤大樹、岡本好雄、菅野 仁 安全な CART の運用と低温保存腹水を用いた適応拡大への新たな試み. 第35回日本アフェレシス学会学術集会ワークショップ、2014、9/27.
51. 村田祥吾、花岡伸佳、畑中一生、栗山幸大、細井裕樹、蒸野寿紀、西川彰則、田村志宣、園木

孝志、中熊秀喜:造血器疾患治療における
Real-time AUD monitoring system を用いた
耐性菌抑制効果の検討, 第 76 回日本血液学会
学術集会, 大阪. 2014, 10/31-11/2 .

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. ウイルスペクター、細胞およびコンストラクト

代表発明者：谷 憲三朗
出願番号：特願 2014-225642
出願日：2014 年 11 月 5 日出願

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし