

血液・免疫系難病由来人工多能性幹（iPS）細胞の樹立と新規薬剤探索研究

分担研究者 谷 憲三朗 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。

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血液・免疫系疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。平成 25 年度に樹立された疾患と併せて、合計 10 疾患の疾患特異的 iPS 細胞と、7 例の正常対照 iPS 細胞の樹立に成功している。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。また、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正常対照 iPS 細胞の品質にも問題は認められなかった。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疾患特異的 iPS 細胞においては、患者細胞で観察された X 染色体不活性化の異常が引き継がれていることを確認した。

次年度以降は、樹立された疾患特異的 iPS 細胞と血液細胞への分化誘導系を組み合わせることで *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。

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）、安全性に優れた自己開発・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、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の評価を行う。

平成 26 年度

(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。一部の実験では T リンパ球を拡大培養した後に (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、DनावेC) 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 細胞の樹立を行った。

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。得られた細胞の更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。また、平成 25 年度に「XV」として報告した独自開発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) 遺伝子変異の機能的影響の検討

(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、原らと協力し、樹立したiPS細胞を活用した新規創薬スクリーニング法の開発に着手した。

(6)GMP規格に準拠したiPS細胞樹立に向けた準備

平成25年度に引き続き、(2)で樹立した正常対照iPS細胞を異種成分不含細胞外基質・培養液を用いて培養し、未分化マーカーの維持に優れた組合せを決定した。

(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。

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、骨髄異形性症候群および急性骨髄性白血病の合併により致死的となる事がある。	東大でiPS細胞樹立
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塞栓症、腎不全の合併のほか、出血、感染、骨髄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デロシス合併例や、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、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・座瘡症候群(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、壊疽性膿皮症と膿胞性座瘡を伴う事を特徴とする疾患。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。重症例は虹性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。重症例ではヘモジデロシス合併がある。	樹立済
正常対照	九大	-	-	樹立済

C. 研究結果

(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免疫不全マウスを用いた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。

(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、骨髄球系マーカー 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 陽性骨髄球系分画の割合は、赤血球より遅れて増加した (図 1)。一方、造血能をもつ血管内皮細胞 (hemogenic endothelium) 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 (図 1)。

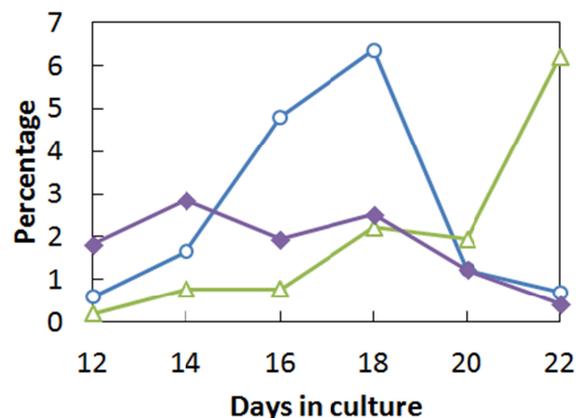


図 1. 胚様体形成法により誘導される血球系列細胞の経時変化

全胚様体細胞中に占める CD34 陰性 GlyA 陽性 ()、CD45 陽性 CD11b 陽性 () および VEC 陽性 CD34 陽性 () 細胞の割合。

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% まで CD34 陽性細胞を純化することができた (図 2)。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 (図 3)。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リンパ球系細胞が検出された。

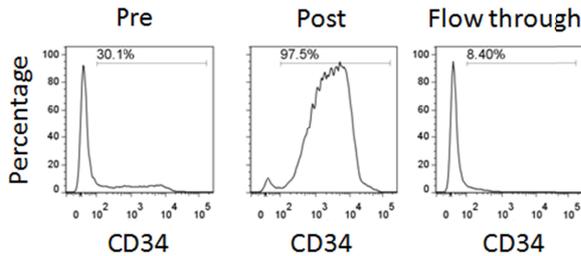


図2. 磁気ビーズ細胞分離法によるiPS細胞由来CD34陽性細胞の純化

分離前の全胚様体細胞（Pre）分離後のCD34陽性細胞（Post）および分離中にカラムを通過したCD34陰性分画（Flow through）のヒストグラム。

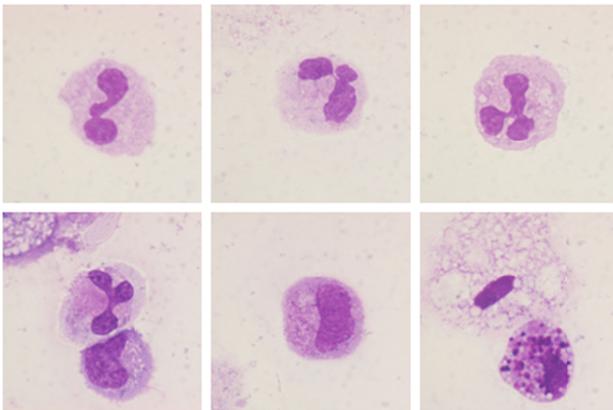


図3. 形態学的解析

iPS細胞より分化誘導した骨髄球系細胞を回収し作製したサイトスピン標本のメイ-ギムザ染色像。

(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染色体活性化状態の解析を行ったところ、XLA患者由来iPS細胞では、平成25年度におこなった患者末梢血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、同様にWAS患者由来iPS細胞でも、X染色体は患者父由来X染色体が不活性化していた。本研究成果を踏まえて、iPS細胞を活用した新規創薬スクリーニング法の開発を開始した。

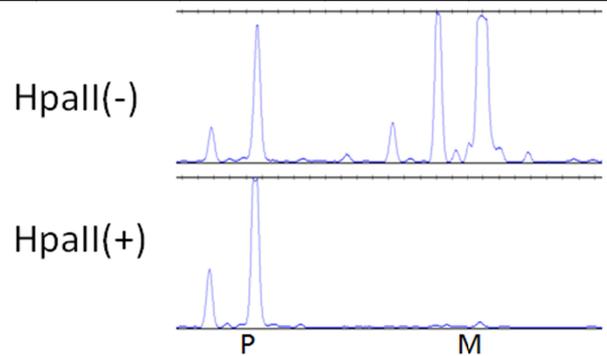


図4. X染色体活性化状態の解析

X連鎖劣性遺伝性疾患特異的iPS細胞における患者父由来X染色体（P）と母由来X染色体（M）のHpaII処理前後におけるHUMARAフラグメント解析の結果。

(6) GMP規格に準拠したiPS細胞樹立に向けた準備

平成25年度に京都大学iPS細胞研究所より提供されたヒトiPS細胞409B2株で行った予備的実験の成果を踏まえ、(2)で樹立した正常対照iPS細胞を用いて種々の異種成分不含細胞外基質・培養液中でのiPS細胞の未分化性維持能を検討した。その結果、rhVitronectin（VTN, Life Technologies）あるいはiMatrix-511（ニッピ）をコートした培養皿上で培養液StemMACS（Miltenyi）で培養したときに未分化iPS細胞が良好に維持された（表2）。また、種々の条件でヒト末梢血単核球からのiPS細胞樹立効率を検討したところ、iMatrix-511をコートした培養皿上でStemFit（味の素）で培養した時に最も良好な結果が得られた。

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

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 細胞のゲノムシークエンス解析を開始し、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薬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を得られているため、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液細胞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。

本年度は、我々が樹立した iPS 細胞を用いて種々のフィーダーフリー、異種成分不含培養法を検討し、iPS 細胞の未分化性維持により有効な組合せを明らかにした。同様に、iPS 細胞の GMP レベルでの樹立に有効な組合せも明らかにした。次年度以降は、本研究成果を踏まえて各疾患特異的 iPS 細胞の樹立、維持を行うことで、安定した結果が得られることが期待できる。

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 病態モデルの再現度等を考慮し、創薬スクリーニングに必須な再現性、特異性が高いアッセイ系の構築に取り組む。X 連鎖劣性遺伝性疾患女性例は、極めて希少ではあるが、重要であると考えて創薬スクリーニングの実施を計画している。X 連鎖劣性遺伝性疾患女性例では常に決まった 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、血友病 A・B、赤緑色覚異常、ディシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、脆弱 X 症候群、ファブリー病、グルコース-6-リン酸脱水素酵欠損症、レッシュ・ナイハン症候群、ハンター症候群などの 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。また、X 連鎖劣性遺伝性疾患は、両親が健康であった場合には母親がキャリアとして原因遺伝子を持っていたとして自責の念を抱きやすい等家族内での問題に発展しやすいため、希少であっても社会的に治療法が強く望まれる疾患であると考えている。

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の分化誘導系を確立した。平成 27 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

総括研究報告書へ記載

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 IAI.3B 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

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, 廖紀元, 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瘍様コモンマーモセット腫瘍の特性. 第 4 回日本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 .

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. ウイルスベクター、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