

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

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

研究分担者 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

研究要旨

サラセミア患者検体使用に向けて九州大学の倫理審査委員会へ書類を提出し、承認を得た。また、質量分析装置を応用してグロビン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ビン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。

A.研究目的

サラセミアは、遺伝性ヘモグロビン異常症の一種であり、グロビンタンパク質の合成障害により溶血性貧血が引き起こされる疾患である。現在、その診断は主にヘモグロビンの定量により行われている。

本研究では、ヒト iPS 細胞から赤血球系細胞を効率よく分化誘導する方法を確立するとともに、作製した細胞の品質を評価するための基盤技術を開発する。そこで、患者由来 iPS の細胞作製に向けた、難病の遺伝性血液疾患(サラセミア)の皮膚繊維芽細胞の情報収集、患者検体入手体制の整備、及び iPS 細胞から分化誘導後のヒト患者 iPS 細胞由来赤血球の品質を解析するための基盤技術を開発することを目的とする。

B.研究方法

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ビン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する。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ビンタイピングの技術を開発する。

(倫理面への配慮)

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。

C.研究結果

分担研究者は、サラセミア研究における実績があり、膨大な患者検体を保有するマヒドン大学サラセミアリサーチセンターの Saovaros Svasti 博士と共同で研究を行っており、サラセミアの皮膚繊維芽細胞に関する情報を提供して頂いている。また、平成 27 年 1 月のマヒドン大学サラセミアリサーチセンターへの訪問時(研究分担者グループ・杉山、田中)に面談を設定し、サラセミア患者検体提供に関して詳細の打ち合わせを行った。

グロビンタンパク質の解析に関して、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、ヒト成体末梢血、K562 赤白血病細胞株を

用いて質量分析装置で解析し、下表の通り有望なペプチドを選出した。

表 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]

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、グロビタンパク質を解析する予定である。

D.考察

平成 26 年度は、マヒドン大学サラセミアリサーチセンターを訪問し、サラセミアの皮膚繊維芽細胞に関する情報を収集すると共に、サラセミア患者検体入手に関して体制を整備した。

また、グロビタンパク質の定性・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。本研究では、グロビタンパク質解析のため、様々なグロビンの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 赤白血病細胞株）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。

E.結論

マヒドン大学サラセミアリサーチセンターを訪問してサラセミアの皮膚繊維芽細胞に関する情報を収集し、患者検体入手に関して体制を整備した。また、質量分析装置を応用してグロビタンパク質を解析する技術の開発を試み、ヒト細胞を用いた解析から有効なペプチドをスクリーニングした。

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) 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).

2) Kummalue T, Inoue T, Miura Y, 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.*, 2015 (in press).

3) 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.

4) 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.

5) 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.

2. 学会発表

口頭発表

1) 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年10月

2) 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

ポスター発表

1) 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年10月

2) 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年10月

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得

2.実用新案登録

3.その他

特になし。