

が有意に延長していることを確認した。肥大型心筋症 iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を用いた解析においてはコントロール健常者 iPS 細胞由来心筋細胞と比べて高頻度にサルコメア組織化異常が認められることを確認した。

また健常者 iPS 細胞由来心筋細胞において既知の IKr 阻害薬である E4031 によってフィールド電位間隔と活動電位持続時間がともに用量依存的に延長することを確認した。

今後ハイスループット系を構築するためには大量の心筋細胞が必要となるためこれまでに開発した高効率心筋細胞分化誘導系を用いてラージスケールで心筋細胞の分化誘導を行った。また、合成 RNA を用いた心筋細胞の選別純化法を開発し、これまで報告されている心筋細胞の純化法と比較最適化を行うことにより、ハイスループットスクリーニング系に使用できる品質の高純度心筋細胞の培養が可能になった。

D. 考察

QT 延長症候群 1 型、2 型患者由来 iPS 細胞より分化した心筋細胞を用いて活動電位持続時間が健常者由来 iPS 細胞から分化した心筋細胞より延長していることを確認した。今後は様々な薬剤への反応性を LQT-iPS 細胞、健常者 iPS 細胞由来心筋細胞において検討していく予定である。フィールド電位間隔の測定についてはマルチウェルシステムの導入などを行いスループットの高い測定系を構築する必要がある。

心筋症 iPS 細胞の解析についてはサルコメア組織化の異常が再現されることが確認されたが、これらの異常は創薬スクリーニング等には使用するのは困難であるため、創薬スクリーニングのためにはより robust な表現型がみられる系の構築が必要と思われる。

分化心筋細胞は殆ど増殖しないが、非心筋細胞は増殖性であるため、培養細胞に非心筋細胞が混入するとスクリーニング系などに大きな影響を与える。合成

RNA を用いて特異性高く心筋細胞を選別する方法を開発し分化誘導法や従来の選別法と組み合わせ高純度の心筋細胞を得ることが容易になってきたため、スクリーニング系の構築への応用が期待される。

E. 結論

QT 延長症候群、肥大型心筋症患者由来 iPS 細胞を用いて in vitro で心筋細胞の病態再現が可能であることを確認した。今後スループットの高い検出系の開発をすすめ、創薬系、心毒性物質検出系の構築を進めたいと考えている。

F. 研究発表

<論文発表>

1. Tokunaga K, Saitoh N, Goldberg I, Sakamoto C, Yasuda Y, Yoshida Y, Yamanaka S, Nakao M. Computational image analysis of colony and nuclear morphology to evaluate human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 4:6996, 2014

<学会発表>

1. Funakoshi, S., Kimura, T., Yamanaka, S., and Yoshida, Y: What is the optimal differentiation stage of iPSC-derived cardiomyocytes for cardiac cell therapy? ISSCR 12th Annual Meeting 2014/6/19
2. Nishizawa, M., Chonabayashi, K., Oishi, A., Takei, I., Nishikawa, M., Takaori-Kondo, A., Yamanaka, S., and Yoshida, Y: Differentiation Phase-Dependent Factors Responsible for Variation in Hematopoietic Differentiation Propensity among Human Pluripotent Stem Cells Revealed by Genome-wide Analysis of Gene Expression and DNA Methylation. ISSCR

3. 吉田善紀 : iPS 細胞を用いた心疾患の解析 日本生化学会大会シンポジウム疾患 iPS 細胞 2014/10/15
4. Chonabayashi, K., Kawahara, M., Watanabe, A., Amano, N., Okita, K., Nishizawa, M., Kadowaki, N., Takaori-Kondo, A., Yamanaka, S., and Yoshida, Y: iPS technology revealed the genetic and functional diversity present in a single MDS patient. The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2014/10/31
5. Miki, K., Takahashi, S., Funakoshi, S., Yamanaka, S., Saito, H., and Yoshida, Y: A Novel Purification Method for Cardiomyocytes and Endothelial Cells Derived From Human Pluripotent Stem Cells Using MicroRNA-responsive Messenger RNA. American Heart Association Scientific Sessions 2014/11/15-19
6. Shunsuke Funakoshi, Masaki Nomura, Chikako Okubo, Kenji Miki, Takeshi Kimura, Shinya Yamanaka, Akira Watanabe, Yoshinori Yoshida: Single Cell RNA Sequencing Reveals Dynamic and Heterogeneous Changes of Transcriptome During Cardiac Differentiation in vitro. American Heart Association Scientific Sessions 2014/11/15-19
7. Shunsuke Funakoshi, Takeshi Kimura, Shinya Yamanaka, Yoshinori Yoshida: Very High Engraftment, proliferation, and therapeutic potential of iPSC-derived cardiomyocytes. American Heart Association Scientific Sessions 2014/11/15-19
8. 大久保周子、舟越俊介、野村真樹、三木健嗣、高木正、岡田千尋、中村正裕、山中伸弥、渡辺亮、吉田善紀 : iPS 細胞から心筋細胞分化誘導過程におけるシングルセル遺伝子発現解析 第 37 回日本分子生物学会年会 2014/11/27
9. Chonabayashi, K., Kawahara, M., Okita, K., Nishizawa, M., Kadowaki, N., Takaori-Kondo, A., Yamanaka, S., and Yoshida, Y: Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate the Maturation Defect of Myelodysplastic Syndromes. 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2014/12/6-9
10. Funakoshi, S., Miki, K., Kimura, T., Yamanaka, S., and Yoshida, Y: Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutics using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. The 18th Takada Science Foundation Symposium on Bioscience 2015/1/15-17
11. Nishizawa, M., Nishikawa, M., Takei, I., Chonabayashi, K., Takaori, A., Yamanaka, S., and Yoshida, Y: Landscape of Transcriptional and Epigenetic Profile and Hematopoietic Differentiation Capacity of Human Pluripotent Stem Cells. The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience 2015/1/15-17
12. Miki, K., Endo, K., Takahashi, S., Funakoshi, S., Yamanaka, S., Saito, H., and Yoshida, Y: Synthetic mRNA switches for detection and purification of cardiomyocytes and endothelial cells derived from human pluripotent stem cells. The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience 2015/1/15-17
13. 三木健嗣、遠藤慧、高橋誠弥、舟越俊介、山中伸弥、斎藤博英、吉田善紀 : Efficient detection and

purification of cells by synthetic microRNA switches

第 14 回日本再生医療学会総会 2015/3/19-21

14. 舟越俊介、三木健嗣、木村剛、山中伸弥、吉田善

紀 : Enhanced engraftment, proliferation, and

therapeutic potential in heart using optimized

human iPSC-derived cardiomyocytes 第 14 回日

本再生医療学会総会 2015/3/19-21

15. 大久保周子、舟越俊介、野村真樹、三木健嗣、高

木正、岡田千尋、中村正裕、山中伸弥、渡辺亮、

吉田善紀 : iPS 細胞から心筋細胞分化誘導におけ

るシングルセル遺伝子解析第 14 回日本再生医療

学会総会 2015/3/19-21

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許出願

特願 2014-262906 名称:新規成熟心筋マーカー

発明者:吉田善紀/舟越俊介 権利者:国立大学法人

京都大学 出願日:2014/12/25

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

難治性血液・免疫疾患の新規治療法開発の基盤構築

研究分担者 齋藤 潤 (京都大学 iPS 細胞研究所 准教授)

研究要旨

難治性血液・免疫疾患の新規治療法開発の基盤とするため、これらの疾患を対象とした、iPS 細胞由来血球を用いた化合物スクリーニング系の構築を試みた。CINCA 症候群患者由来 iPS 細胞及び Chediak 東症候群患者由来 iPS 細胞より誘導した単球系前駆細胞へレンチウイルスベクターにより遺伝子導入を行い、単球細胞株を樹立した。昨年度までに開発したフィーダーフリー血球分化系を改良し、前駆細胞を回収して浮遊培養に移行することにより、赤芽球系の細胞増殖を誘導する系を構築した。

A. 研究目的

ヒト人工多能性幹細胞(iPS 細胞)は、様々な疾患に罹患した患者由来の体細胞より樹立することができる(疾患 iPS 細胞)。疾患 iPS 細胞は創薬・病態解析に有用なツールになり得ると期待されている。たとえば、罹患細胞・組織に分化させ、患者の病態を *in vitro* で再現し、それを正常化する化合物を探索することにより、新たな創薬につながる可能性がある。一方、問題点として、目的の分化細胞の純度・収量や成熟度が十分でないこと、分化にかかる金銭的・人的コストが高いこと、分化系のバッチごとに表現型がばらつくこと、細胞の表現型と *in vivo* の表現型の関連が薄いこと、などが挙げられる。

近年、様々な疾患に慢性炎症が関与していることが知られてきており、炎症の制御はヒト疾患の制御において重要な課題である。動物モデルなどのほか、患者由来サンプルを用いた免疫疾患の研究も医学の進歩に多大な貢献をしているが、実際の患者細胞を用いて治療薬候補をスクリーニングする試みはあまり行われていない。しかし、ヒトとその他の動物種では炎症制御に関わるシグナルが異なっていることも多く、ヒトサンプルによる探索はきわめて有用と思われる。

分担研究の目的として、難治性血液・免疫疾患の新規治療法開発の基盤とするため、これらの疾患を対象とした、iPS 細胞由来血球を用いた化合物スクリーニング系を確立する。

B. 研究方法

1. 単球系の分化系・株化系を用いたスクリーニング系の構築:

患者由来 iPS 細胞を既報にしたがって単球へ分化させた。分化開始後 20-28 日後に単球系前駆細胞を浮遊細胞として回収し、これらにレンチウイルスベクターを用いて 3 因子(cMYC,BMI1, MDM2)を導入した。その後、M-CSF 存在下に培養を継続し、増殖する細胞を単球細胞株として回収した。単球細胞株を MCSF 存在下でマクロファージへ分化させ、マクロファージと単球の増殖・分化・機能発現における最適な培養条件をそれぞれ検討した。

2. iPS 細胞由来赤芽球系の増殖系の構築 :

我々は、昨年度までにフィーダーフリー・血清フリーの 2 次元血球分化系を開発している。この系は、赤芽球・

巨核球・単球及び骨髄球への分化誘導が可能であり、その多くは機能的である。本年度は、この分化系を改良し、前駆細胞を回収して浮遊培養に移行する系の構築を目指す。

(倫理面への配慮)

本研究は、疾患を有する患者さんから検体を頂き iPS 細胞を作成して行う研究であるため、患者さんの同意・協力を必要とする研究である。また、作成する iPS 細胞を用いた疾患解析においては、遺伝子解析が必須であり、個人情報の取り扱いの配慮を必要とする研究である。この2点に対して、京都大学医学部医の倫理委員会に、ヒトを対象とした医学の研究および臨床応用実施申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究」およびヒト遺伝子解析申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」の2申請を行った。その後、京都大学医学部医の倫理委員会での審査を頂き、平成20年6月4日付けで、実施に関して承認を頂いた。本研究においては、その内容を忠実に順守して行った。

C. 研究結果

1. 単球系の分化系・株化系を用いたスクリーニング系の構築:

本年度は、昨年度までに構築した iPS 細胞からの単球分化系に千住らの報告による遺伝子導入を行って作成する単球株の性状評価を行った。CINCA 症候群患者由来 iPS 細胞及び Chediak 東症候群患者由来 iPS 細胞より誘導した単球系前駆細胞へレンチウイルスベクターにより遺伝子導入を行い、単球細胞株を樹立した。両者とも良好な増殖を示し、単球様用の形態を呈した。また、Chediak 東症候群患者由来単球細胞株では、CD14 の発現が低下していた。しかし、両者ともマクロファージ及び樹状細胞への分化は良好であった。これらの細胞

株の培養条件および凍結条件を最適化し、マクロファージへの分化パイプラインを整備することにより、大量増殖・保存システムを構築した。

2. iPS 細胞由来赤芽球系の増殖系の構築:

昨年度までに開発したフィーダーフリー血球分化系を改良し、前駆細胞を回収して浮遊培養に移行することにより、赤芽球系の細胞増殖を誘導する系を構築した。この系では、浮遊細胞の回収により、赤芽球の分化ステージごとの回収が可能となった。分化開始 20 日後の CD71+/CD235a 陽性細胞の比率は、6-44%と良好であった。

D. 考察

疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬開発、2)患者細胞を用いた免疫疾患の新規治療法開発、はいずれも多大な成果が見込まれる領域であるが、様々な問題点のため、世界的に見ても有用なスクリーニング系は確立していない。今回、単球株化により、均質かつ大量の疾患特異的分化細胞の取得が可能となった。これを用いることにより、汎用性の高く、相対的に低コストのスクリーニング系を確立できる可能性がある。

赤芽球系の分化系は従来より報告があったが、フィーダー細胞を必要としたり、分化効率が悪いなど、そのままで、創薬系への応用は困難であった。今回開発を進めている系では、血球系前駆細胞を浮遊細胞のまま維持・増殖及び分化誘導可能である。このため、白血病や骨髄不全症など由来の iPS 細胞から誘導した造血前駆細胞を用いた分化誘導療法などの開発に用いることができる可能性がある。今後、多クローンでの分化効率の比較、誘導した赤芽球系細胞の機能評価、96well plate などの小スケールでの培養条件の決定などを行う予定である。

E. 結論

本年度は所定の目標に沿った進捗を達成した。来年度以降も引き続き研究を継続する。

F. 研究発表

<論文発表>

1. Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura N, Koizumi N, Sato T, Nakahata T, Saito M, Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M, Ikeya M, Toguchida J. Derivation of Mesenchymal Stromal Cells from Pluripotent Stem Cells through a Neural Crest Lineage using Small Molecule Compounds with Defined Media. PLoS One. 2014 Dec 2;9(12):e112291. doi: 10.1371/journal.pone.0112291. eCollection 2014.
2. Yokoyama K, Ikeya M, Umeda K, Oda H, Nodomi S, Nasu A, Matsumoto Y, Izawa K, Horigome K, Kusaka T, Tanaka T, Saito MK, Yasumi T, Nishikomori R, Ohara O, Nakayama N, Nakahata T, Heike T, Toguchida J. Enhanced chondrogenesis of iPS cells from neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase-1-independent cAMP/PKA/CREB pathway. Arthritis Rheumatol. 2015 Jan;67(1):302-14
3. 齋藤潤. 明日の診療に役立つ細胞分子生物学再生医療-iPS細胞の応用. 日本呼吸器学会雑誌 3(5) 625-629, 2014

<学会発表>

1. 齋藤潤. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた 免疫疾患の解析について. 大阪リウマチカンファレンス, 大阪. (2014/04/19)
2. 齋藤潤. 疾患iPS細胞を用いた血液・免疫疾患の病

態解析. 第 5 回小児炎症研究会, 東京. (2014/06/21)

3. 齋藤潤. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた 免疫疾患の病態解析. 第 6 回炎症性腸疾患と免疫を語る会, 横浜. (2014/06/26)
 4. 齋藤潤. 再生医療用 iPS 細胞ストックの ドナーリクルートについて . 日本臓器保存生物医学会, 大阪. (2014/11/28)
 5. 齋藤潤. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた 免疫疾患の病態解析. 横浜小児先端セミナー, 横浜. 2014/09/12)
- #### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)
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

難治性疾患創薬シーズの探索と薬剤安全性評価法の開発

研究分担者 太田 章 (京都大学 iPS 細胞研究所 特命教授)

研究要旨

進行性骨化性線維異形成症(Fibrodysplasia Ossificans Progressiva、以下 FOP)とは、小児期より線維性結合組織(筋、筋膜、腱、靱帯など)が徐々に骨化していく疾患である。罹患率は約 200 万人に1人とされており、本邦では 50 人ほどの患者がいると考えられている。原因遺伝子は、骨形成因子(Bone Morphogenetic Protein、BMP)の I 型受容体の1つである ACVR1/ALK2 遺伝子の経配偶子性変異であり、変異により受容体は恒常的活性型に変化し、野生型 ACVR1/ALK2と比較して、より強力に BMP シグナルを伝達することが知られている。これまでの研究から、FOP の患者でみられる異所性の骨形成は、軟骨形成を経て起こる内軟骨性骨化であることが示唆されている。また、京都大学 iPS 細胞研究所の戸口田らは、FOP 患者由来 iPS 細胞は、健常人由来 iPS 細胞と比較して、軟骨化能が亢進している事を見出した。本研究では、iPS 細胞を軟骨細胞へと分化誘導し、その培地に化合物ライブラリーを添加する事により、治療効果のある化合物を見出すためのスクリーニング評価系を構築した。この評価系は施可能 HTS 評価系の感度と信頼性の指標である Z' -factor が 384 穴プレートにおいても 0.5 以上となり、当初所有の化合物ライブラリー(約 6900)の評価を進める。

A. 研究目的

FOP 患者由来 iPS 細胞を軟骨細胞へと分化誘導する方法を用い、化合物ライブラリーから、その治療薬の候補を見出す。それらの化合物の作用点を解明し治療薬のターゲットを同定する。

iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究』(承認番号第 824 番)および『ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究』(承認番号第 G259 番)として承認されている。

B. 研究方法

iPS 細胞から軟骨細胞への誘導系に、化合物ライブラリーを 1 μ M で添加するため DMSO を濃度 0.1%として評価系の Validation を実施した。評価のために軟骨化を定量的に検出する方法を開発し、軟骨誘導条件の Well (High Control)の平均を 100%、軟骨非誘導条件の Well (Low Control)平均を 0%として化合物の効果を % Inhibition として評価した。

本研究は倫理委員会により、課題名『ヒト疾患特異的

C. 研究結果

プレートに High および Low Control の Well を設け、それらの平均の比 ($[High\ Control]/[Low\ Control]$)と Z' -factor はそれぞれ 3.40、0.54 の範囲となり良好なアッセイであった。

D. 考察

High および Low Control の比と Z' -factor から判断して、今回構築した系は良好なスクリーニング系であると考えられた。

E. 結論

FOP 治療薬の候補を得るため、FOP 患者由来 iPS 細胞の軟骨化能の阻害作用を指標とし、当研究所で構築した化合物ライブラリー（既存薬、活性既知化合物、天然物を含む）を用いてスクリーニングを 384 穴プレートで行えると判断した。1 次スクリーニングで選抜された化合物について、濃度依存性と細胞生存率への影響を評価、細胞生存率に影響せず、軟骨化阻害作用が強い化合物を選抜していく。

F. 研究発表

<論文発表>

- 論文発表なし

<学会発表>

- 学会発表なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

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

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表
(平成26年度)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
森井英貴 子、水野敏 樹、中川正 法、井上治 久	iPS細胞を用いた神 経変性疾患病態解 析	川崎洋志	脳神経系の発 生・再生の融 合的新展開(仮)	診断と治療 社	日本	印刷中	第4章2-6
吉田善紀	iPS細胞を用いた治 療	佐藤幸人	臨床心不全の いちばん大事 なところ60	メディカ出 版	日本	2014	p344- 347

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kondo, T., Funayama, M., Tsukita, K., Hotta, A., Yasuda, A., Nori, S., Kaneko, S., Nakamura, M., Takahashi, R., Okano, H., Yamanaka, S., <u>Inoue, H.</u>	Focal transplantation of human iPSC-derived glial-rich neural progenitors improves lifespan of ALS mice.	Stem Cell Reports	3	242-249	2014
<u>Inoue, H.</u>	Regenerative medicine for ALS using human iPS cells.	Research Frontiers	4(2)	30	2014
Kutoku, Y., Ohsawa, Y., Kuвано, R., Ikeuchi T., <u>Inoue, H.</u> , Ataka, S., Shimada, H., Mori., Sunada, Y.	A Second Pedigree with Amyloid-less Familial Alzheimer's Disease Harboring an Identical Mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene (E693delta).	Internal medicine	54(2)	205-208	2015

Yoshida, M., Kitaoka, S., Egawa N., Yamane M., Ikeda R., Tsukita K., Amano N., Watanabe A., Morimoto, M., Takahashi J., Hosoi H., Nakahatan, T., <u>Inoue, H.</u> , Saito, Megumu K.	Modeling the early phenotype at the neuromuscular junction of spinal muscular atrophy using patient- derived iPSCs.	Stem Cell Reports			[In Press]
浅井将、城谷圭朗、 近藤孝之、 <u>井上治久</u> 、 岩田修永	アルツハイマー病における 個別化医療の可能性 孤 発性および家族性アルツ ハイマー病患者由来 iPS 細胞を用いたアルツハイマ ー病の病態解析	日本薬理学雑誌	143(1)	23-26	2014
江川齊宏、 <u>井上治久</u>	iPS細胞を用いた筋萎縮 性側索硬化症の病態解析	難病と在宅ケア	19(11)	7-9	2014
村上永尚、和泉唯 信、梶 龍兒、 <u>井 上治久</u>	iPS細胞を用いたアルツハ イマー病モデルと小細胞ス トレス	遺伝子医学MOOK	27	48-51	2014
江川齊宏、井上治 久	筋萎縮性側索硬化症 (ALS)	遺伝子医学MOOK	27	60-65	2014
大原亮、水野敏樹 、中川正法、 <u>井上 治久</u>	幹細胞研究と神経変性	BRAIN MEDICAL	26(3)	59-66	2014
佐藤裕、 <u>井上治久</u>	iPS細胞を用いた神経疾 患研究への応用と課題	日本老年医学会雑誌 老年医学の展望	51(6)	504-509	2014
<u>井上治久</u>	天からの蜘蛛の糸を生か すには	日経サイエンス社		26	2015
津下到、鈴木茂彦 、内藤素子、 <u>井上 治久</u>	患者由来iPS細胞を用い た神経疾患研究	医学のあゆみ			印刷中
Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Sasaki A, Yamamoto M, Nakamura M, Sutou K, <u>Osafune K.</u> Yamanaka S.	Induction of pluripotency in human somatic cells via a transient state resembling primitive streak-like mesendoderm.	Nature Communications	5	3678	2014
安田勝太郎、上本 伸二、 <u>長船健二</u>	臨床応用にむけた再生医 学研究、iPS細胞	消化器外科（へるす出 版）	37	1303-1313	2014

Tokunaga K, Saitoh N, Goldberg I, Sakamoto C, Yasuda Y, <u>Yoshida Y</u> , Yamanaka S, Nakao M.	Computational image analysis of colony and nuclear morphology to evaluate human induced pluripotent stem cells.	Sci Rep.	4	6996	2014
吉田善紀、山中伸 弥	iPS細胞	医学のあゆみ 医学・ 医療のいまがわかるキ ーワード	249巻 5号	404-405	2014
吉田善紀	ES細胞とiPS細胞	心臓	46巻 12号	1546-1549	2014
Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura N, Koizumi N, Sato T, Nakahata T, <u>Saito M</u> , Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M, Ikeya M, Toguchida J	Derivation of Mesenchymal Stromal Cells from Pluripotent Stem Cells through a Neural Crest Lineage using Small Molecule Compounds with Defined Media.	Plos ONE	9(12)	E112291	2014
Yokoyama K, Ikeya M, Umeda K, Oda H, Nodomi S, Nasu A, Matsumoto Y, Izawa K, Horigome K, Kusaka T, Tanaka T, <u>Saito MK</u> , Yasumi T, Nishikomori R, Ohara O, Nakayama N, Nakahata T, Heike T, Toguchida J	Enhanced chondrogenesis of iPS cells from neonatal- onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase- 1-independent cAMP/PKA/CREB pathway.	Arthritis Rheumatol.	67(1)	302-314	2015

V. 研究成果の刊行物・印刷物

60

iPS細胞を用いた治療

京都大学 iPS 細胞研究所
初期化機構研究部門 講師

吉田善紀

そうだったのか!

POINT 1

多能性幹細胞は、さまざまな細胞に分化できる能力（分化多能性）と自身を増やす能力（自己複製能）をもった細胞。

POINT 2

遺伝子を導入することで、皮膚の線維芽細胞や末梢血の単核細胞からiPS細胞を樹立することが可能。

POINT 3

iPS細胞から作製した心筋細胞は、心筋再生医療の細胞移植ソースとして期待されている。

心不全に対しては、薬物治療や基礎疾患に対する治療（虚血に対する血行再建術や弁膜症に対する外科的治療など）を行うが、これらの治療でコントロールできない心不全に対して心移植も検討される。しかし、心移植のためのドナー数は限られている。再生医療は、薬物治療によりコントロールできず、心移植などの適応にならない症例に対する新しい治療として期待されている。

移植する細胞は、心筋細胞、心臓幹細胞、間葉系幹細胞などの細胞が挙げられるが、特に心筋細胞は生着すれば心臓の収縮力の改善に寄与することが期待される。しかし、心筋細胞は増殖能をほとんどもたないため、心筋細胞を採取し *in vitro* で増殖させることは困難である。ES 細胞、iPS 細胞などの多能性幹細胞は *in vitro* で増殖させることが可能で、心筋細胞を含めさまざまな細胞に分化させることが可能であるため、心筋再生治療における心筋細胞のソースとして期待されている。

iPS 細胞は特定の転写因子を遺伝子導入することにより、皮膚線維芽細胞や末梢血単核細胞などの比較的容易に採取できる体細胞を多能性幹細胞へとリプログラミングすることにより作製され^{1, 2)}、再生医療、疾患研究、創薬などにおいてその応用が期待されている。

iPS 細胞から心筋細胞の分化誘導

iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を再生医療に用いるためには、iPS 細胞から純度の高い心筋細胞を誘導する技術や、心筋細胞のみを選別する技術が必要である。これまで ES/iPS 細胞を胚様体と呼ばれる細胞凝集体にして血清存在下で培養することにより拍動する心筋細胞が出現することが知られていたが、一部の細胞のみが心筋細胞に分化し、心筋細胞の分化誘導効率は低かった。近年、*in vitro* で Activin A、BMP4 などのサイトカインを添加することにより、効率よく心筋細胞を分化誘導することが可能になってきた^{3, 4)}。また抗体を用いることにより心筋細胞を、セルソーターを用いて純化することが可能になりつつある。

再生医療による心機能の改善

細胞移植治療による心不全の改善のメカニズムは主に2点、すなわち、①心筋細胞の補充による心機能の改善、②移植細胞が分泌する因子による効果 (trophic effect) によると考えられている。心筋細胞を生着させることができれば心臓の収縮能の改善が期待できるが、細胞の生着率が低いことが問題である。生着率を高めるために、心筋細胞シートを作製する方法が開発されている。また、移植された細胞からはさまざまな成長因子が分泌されるため、これらの因子が作用して血管新生、心筋保護などの作用がもたらされ、心臓のリモデリングを抑制し、心機能を改善することが知られている。

自家移植と同種移植

iPS細胞は患者自身の細胞を用いて樹立が可能なため、自身の細胞を用いた治療、すなわち自家移植 (autologous transplantation) が可能である。しかし、治療が必要な患者が現れてから iPS細胞を樹立し、目的の細胞へ分化誘導し、品質評価を行った後に移植を行うとなると、多くの時間と費用を要する。疾患や症例によっては時間的な猶予がなく速やかな治療が望まれる場合も少なくなく、自家 iPS細胞を準備することは困難である。

一方、他人の iPS細胞を用いた治療、すなわち他家移植 (allogeneic transplantation) の場合、治療が必要な患者が現れた場合に品質管理された移植用細胞を速やかに準備することが可能で費用も少なくてすむ。他家移植の場合、拒絶による生着不全が起こり得るが、HLA (組織適合性抗原) を一致させたドナーの細胞を用いることにより拒絶を最小限にすることが期待できる。

再生医療用 iPS 細胞ストック

再生医療用 iPS細胞ストックとは、臨床で利用できる GMP 準拠の iPS細胞株のストックを作製するプロジェクトである。HLA-A, B, DR がホモになっているドナーより iPS細胞を樹立することにより、HLA3 座ホモの細胞 50 株

で日本人全体の約73%, 75株で80%をカバーできる⁵⁾。再生医療用iPS細胞ストックプロジェクトにより作製されたiPS細胞株を用いて、心筋細胞移植を含めさまざまな臓器の再生医療のための研究が進められている。

Point of view

みんなここがわかってない!

幹細胞とは

幹細胞は再生医療の主役であるが、さまざまな種類の幹細胞がある。幹細胞は他の細胞に分化できる能力と自身を増やす能力（自己複製能）をもつ細胞と定義される。体内には造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞などの幹細胞が存在し、組織の再生に重要な働きをしている。これらの幹細胞は特定の細胞に分化する能力を持ち、成体幹細胞（組織幹細胞）と呼ばれる。成体幹細胞は体内から採取することができるため、再生医療に用いる研究が進められている。

一方、受精卵から発生した胚盤胞を培養することで樹立される胚性幹細胞（ES細胞）は体を構成するさまざまな細胞に分化できる能力（分化多能性）をもち、多能性幹細胞（いわゆる万能細胞）と呼ばれる。iPS細胞は皮膚線維芽細胞や血液細胞などの体細胞にリプログラミング因子と呼ばれる遺伝子を導入することにより樹立される多能性幹細胞であり、ES細胞とほぼ同等の分化多能性と自己複製能をもっている。

参考文献

- 1) Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 126, 2006, 663-76.
- 2) Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 131, 2007, 861-72.
- 3) Yang L, et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. Nature, 453, 2008, 524-8.
- 4) Laflamme MA, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. Nat Biotechnol. 25, 2007, 1015-24.
- 5) Okita K, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. Nat Methods. 8, 2011, 409-12.

Focal Transplantation of Human iPSC-Derived Glial-Rich Neural Progenitors Improves Lifespan of ALS Mice

Takayuki Kondo,^{1,2,3} Misato Funayama,^{1,3} Kayoko Tsukita,^{1,3} Akitsu Hotta,^{1,3,4,5} Akimasa Yasuda,⁶ Satoshi Nori,⁶ Shinjiro Kaneko,^{6,7} Masaya Nakamura,⁶ Ryosuke Takahashi,² Hideyuki Okano,⁸ Shinya Yamanaka,^{1,9} and Haruhisa Inoue^{1,3,*}

¹Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

²Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

³CREST, JST, Saitama 332-0012, Japan

⁴PRESTO, JST, Saitama 332-0012, Japan

⁵iCeMS, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

⁶Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Keio University, Tokyo 160-8582, Japan

⁷Department of Orthopaedic Surgery, National Hospital Organization, Murayama Medical Center, Tokyo 208-0011, Japan

⁸Department of Physiology, School of Medicine, Keio University, Tokyo 160-8582, Japan

⁹Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco, CA 94158, USA

*Correspondence: haruhisa@cira.kyoto-u.ac.jp

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.017>

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

SUMMARY

Transplantation of glial-rich neural progenitors has been demonstrated to attenuate motor neuron degeneration and disease progression in rodent models of mutant superoxide dismutase 1 (SOD1)-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). However, translation of these results into a clinical setting requires a renewable human cell source. Here, we derived glial-rich neural progenitors from human iPSCs and transplanted them into the lumbar spinal cord of ALS mouse models. The transplanted cells differentiated into astrocytes, and the treated mouse group showed prolonged lifespan. Our data suggest a potential therapeutic mechanism via activation of AKT signal. The results demonstrated the efficacy of cell therapy for ALS by the use of human iPSCs as cell source.

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a disorder of motor neurons (MNs) that is characterized by their relatively rapid degeneration, resulting in progressive muscle weakness and respiratory failure (Bruijn et al., 2004). Approximately 90%–95% of ALS cases are sporadic in nature, with 20% of the remaining familial cases linked to various point mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1) gene. Transgenic mice and rats carrying ALS-associated mutant human SOD1 genes (mSOD1) recapitulate many features of the human disease (Gurney et al., 1994).

Despite the relative selectivity of MN loss in ALS, studies in mSOD1 rodent and tissue culture models show non-neuronal (glial) cell involvement in the disease process (Boillée et al., 2006; Yamanaka et al., 2008). Astrocytes in particular are hypothesized to play a role in both mSOD1 and sporadic forms of ALS (Haidet-Phillips et al., 2011; Howland et al., 2002; Papadeas et al., 2011). Regardless of whether astrocyte dysfunction is a cause of the disease or a consequence of neuronal death, altered astrocyte physiology results in further susceptibility to MN loss (Boillée et al., 2006). Targeted enrichment of normal astrocytes in mSOD1 rat spinal cord via intraspinal transplantation of rodent glial-restricted progenitors promoted focal MN protection, delayed decline in respiratory function, and extended disease progression (Xu et al., 2011).

Various kinds of cells have been investigated for transplantation studies (Corti et al., 2004; Garbuzova-Davis et al., 2008; Iwanami et al., 2005; Piccini et al., 1999). Neuronal cells are probably the most relevant cell type for ALS treatment, but such cells suffer from a limited supply, ethical issues, and/or invasive harvest from human donors. On the other hand, human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) can be obtained from a donor less invasively and can be expanded indefinitely in vitro. In this context, here we established a differentiation protocol of glial-rich neural progenitors (GRNPs) from hiPSCs and investigated the potential of hiPSC-derived glial-rich neural progenitors (hiPSC-GRNPs) as a cell source for intraspinal transplantation therapy of ALS.

RESULTS

Cell Resource Establishment for Transplantation

As a cell resource, we selected human iPSC line “201B7 clone,” which had been previously evaluated as possessing low tumorigenicity after transplantation therapy (Kobayashi et al., 2012; Nori et al., 2011). To distinguish the transplanted cells from host cells, we introduced a *piggyBac* vector, which stably expresses GFP gene under the control of the ubiquitous EF1 α promoter, into hiPSCs and observed continuous GFP fluorescence even after neural-lineage

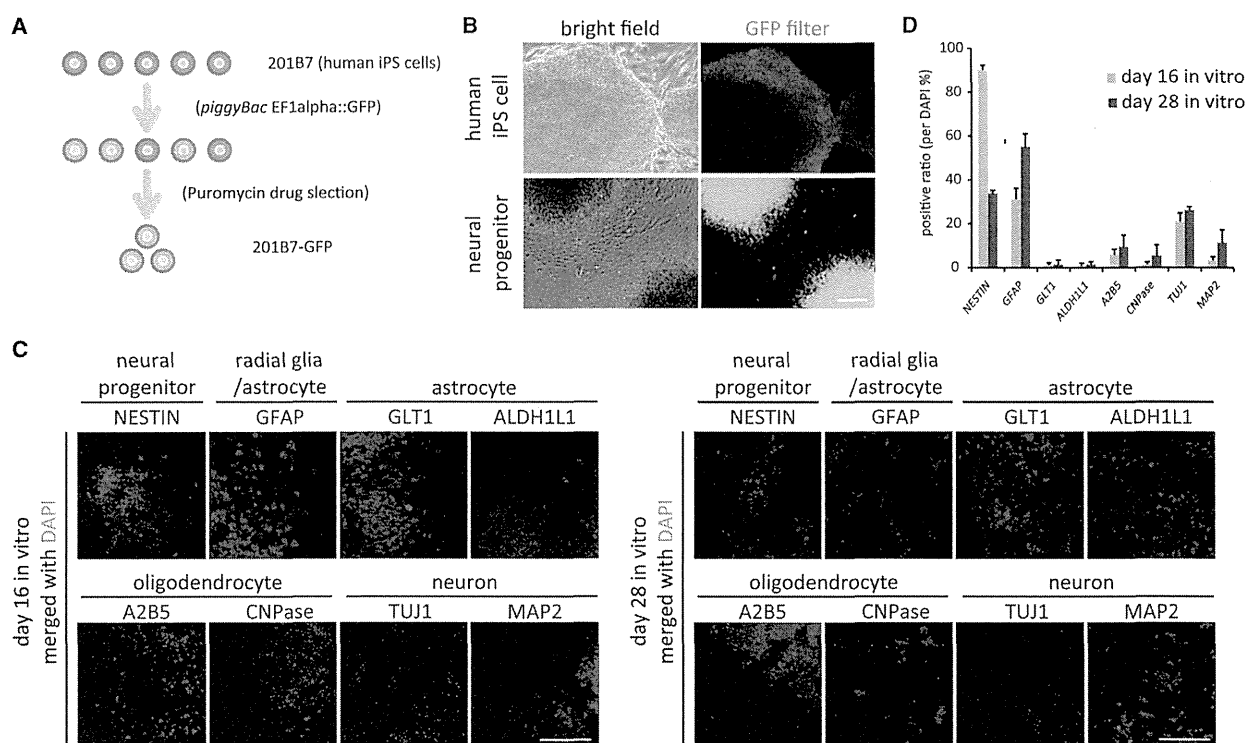


Figure 1. Human iPSCs Were Labeled with GFP, and They Differentiated into Neural Precursors

(A) hiPSCs were labeled with GFP by a *piggyBac* vector.

(B) GFP-labeled hiPSCs retained GFP signals after neural induction.

(C) hiPSC-derived neural precursors exhibited immunoreactivities for NESTIN (neural precursor marker), GFAP (astroglial or radial-glia marker), GLT1/ALDH1 (functional/mature astrocyte marker), A2B5/CNPase (oligodendrocyte lineage marker), and TUJ1/MAP2 (neural lineage marker).

(D) Quantification of hiPSC differentiation in (C).

Data represent mean $\pm$ SD ($n = 3$ experiments). Scale bars, 200 μ m.

differentiation (Figures 1A and 1B). We differentiated GFP-labeled hiPSCs into neural stem cells by the serum-free floating culture of embryoid bodies-like aggregates method with SMAD-pathway inhibition (Kondo et al., 2013). Neural stem cells were efficiently differentiated into hiPSC-GRNPs by stimulation of the LIF/BMP signaling. This protocol provided highly enriched neural precursors, $68.4\% \pm 7.2\%$ positive for NESTIN and $54.9\% \pm 6.1\%$ positive for GFAP (Figures 1C and 1D). At day 16 in vitro, most of the differentiated grafts were positive for NESTIN or GFAP. At this very early stage, GFAP⁺ cells include either radial glia, a subtype of developmental neural progenitors with a neuron-like spine, or immature astrocytes (Liour and Yu, 2003). At day 28 in vitro, NESTIN⁺ neural progenitors differentiated into TUJ1⁺ neurons, A2B5⁺ oligoprogenitors, and GFAP⁺ astrocytes. The differentiation method used in the present work could augment the GFAP⁺ glial population and attenuate TUJ1 neural differentiation, as compared with our previous method (Kondo et al., 2013).

However, GFAP⁺ astrocytes were not positive for GLT1 or ALDH1L1, which were thought to be functionally mature astrocytes before transplantation.

hiPSC-GRNPs Transplantation Improved Motor Function and Survival in ALS Model Mice

All animal experiments were approved by the CiRA Animal Experiment Committee (nos. 24 and 27). We transplanted 40,000 hiPSC-derived GRNPs each into bilateral lumbar spinal cords of transgenic SOD1-G93A mice. Transplantation operations were performed after onset of ALS phenotype, at 90 days of age to mimic the clinical situation (Figure 2A). Littermates of transplanted mice received only a vehicle (PBS) injection and were used as control group. We designed the study so that siblings were distributed equally in the control ($n = 24$, male:female = 17:7) and transplanted ($n = 24$, male:female = 17:7) groups. By using a 35 gauge needle and a relatively small injection volume, we could avoid motor disturbance at 24 hr after the surgical

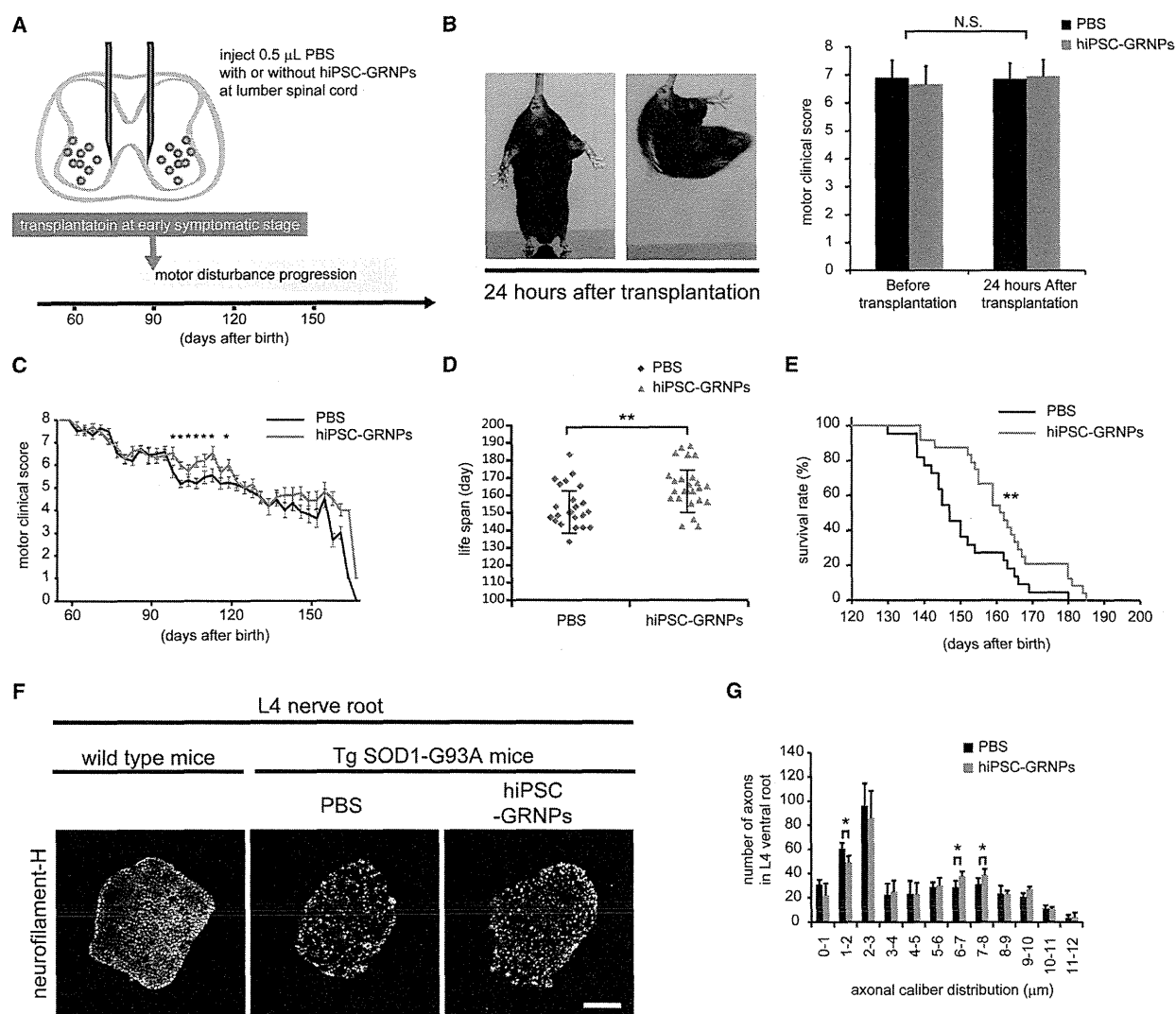


Figure 2. hiPSC-GRNPs Transplantation Improved Motor Score and Survival in ALS Model Mice

(A) Transplantation schedule and schema of spinal cord injection site. Transplantation was performed after disease onset.

(B) Mice presented with no side effects after transplantation and made vigorous twisting movements with hind-limb extension, as shown by representative photos at tail suspension. Both groups showed no change in motor clinical score at 24 hr after surgical insult.

(C) Clinical motor scoring change by sequential evaluation showed significant difference from 100 to 120 days after birth ($*p < 0.05$). Data represent mean $\pm$ SEM ($n = 21$ mice per group).

(D) Lifespan was prolonged in the hiPSC-GRNPs transplantation group (162.2 ± 12.8 days) compared to the control group (150.4 ± 12.1 days) ($**p < 0.01$). Data represent mean $\pm$ SD ($n = 21$ mice per group).

(E) Survival (Kaplan-Meier plot) analysis shows a significant difference between the PBS injection group survival (black line) and the hiPSC-GRNPs transplantation group survival (green line) throughout the course of the study ($n = 21$ mice per group, $p = 0.00691$ stratified log-rank test), suggesting that the hiPSC-GRNPs transplantation group had better survival ($**p < 0.01$).

(F) The number of axons in L4 ventral nerve root was counted to estimate surviving motor neurons at the middle stage of disease progression. At 120 days after birth, transverse sections of ventral nerve roots were stained with an anti-neurofilament-H antibody. Compared to littermates without transgene, the number of axons in Tg SOD1-G93A mice was decreased. Each axon caliber was measured and classified according to size.

(G) Cumulative axon caliber distribution at L4 ventral root at 120 days after birth of both groups. Two-way ANOVA with repeated-measures was used to study the effect of transplantation (transplanted and nontransplanted mice) on axonal caliber distribution. Pairwise

(legend continued on next page)