

201406032A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

外来因子フリー難病由来 iPS 細胞の
ライブラリー構築とそれを使った
疾患モデルと薬剤開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 江良 択実

平成27(2015)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

外来因子フリー難病由来 iPS 細胞の
ライブラリー構築とそれを使った
疾患モデルと薬剤開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 江良 択実

平成27(2015)年 3月

目 次

I. 平成26年度研究班名簿	3
II. 総括研究報告	
外来因子フリー難病由来iPS細胞のライブラリー構築とそれを使った疾患モデルと薬剤開発 江良 択実	4
III. 分担研究報告	
1. 外来因子フリー難病由来iPS細胞のライブラリー構築とそれを使った疾患モデルと薬剤開発 桑 昭苑	11
2. 難病由来iPS細胞からの腎臓細胞分化誘導法の開発 西中村 隆一	14
3. 遺伝子発現とエピゲノム解析、細胞代謝の解析 中尾 光善	17
4. ニーマン・ピック病C型治療薬開発を目指した病態モデル細胞・動物を用いた基礎検討 入江 徹美	19
5. ニーマンピック病C型病態モデル細胞の総合グライコミクスと治療薬候補が糖鎖発現に与える影響の解析 篠原 康郎	22
6. 外来因子フリー難病由来iPS細胞のライブラリー構築とそれを使った疾患モデルと薬剤開発 房木 ノエミ	26
7. 外来因子フリー難病由来iPS細胞のライブラリー構築とそれを使った疾患モデルと薬剤開発 松本 志郎	30
8. iPS細胞を使用したライソゾーム病治療薬の開発 有馬 英俊	34
9. 難病患者サンプルの収集とiPS細胞を使った疾患解析、薬剤開発 杉山 大介	37
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	40
V. 研究成果の刊行物・別刷	42

平成 26 年度 厚生労働省
再生医療実用化研究事業

外来因子フリー難病由来 iPS 細胞のライブラリー構築と
それを使った疾患モデルと薬剤開発

	氏名	所属等	職名
研究代表者	江良 択実	熊本大学 発生医学研究所 幹細胞誘導分野	教授
研究分担者	糸 昭苑	熊本大学 発生医学研究所 多能性幹細胞分野	教授
	西中村 隆一	熊本大学 発生医学研究所 腎臓発生分野	教授
	中尾 光善	熊本大学 発生医学研究所 細胞医学分野	教授
	入江 徹美	熊本大学生命科学研究部 薬剤情報分析学分野	教授
	篠原 康郎	北海道大学大学院先端生命科学研究院	特任教授
	房木 ノエミ	慶応義塾大学 医学部 眼科学	特任准教授
	松本 志郎	熊本大学医学部附属病院 総合周産期母子医療センター	講師
	有馬 英俊	熊本大学生命科学研究部 製剤設計学分野	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

外来因子フリー難病由来 iPS 細胞のライブラリー構築と

それを使った疾患モデルと薬剤開発

研究代表者 江良 択実 熊本大学発生医学研究所 教授

研究要旨

難治性疾患（難病）では細胞試料が少なく、創薬研究を進める上で障害となっている。一方、iPS 細胞は、多分化能をもつため疾病の標的細胞を誘導することが可能である。増幅し長期に保存できることから、試料が少ないという問題を解決し、創薬研究に効果を発揮すると考えられる。iPS 細胞を使った創薬研究を推進するために、本研究では、1. 外来因子フリー難病由来 iPS 細胞の作製とそのバンク化 2. 中・内胚葉系子孫細胞への分化誘導方法の確立とそれを用いた疾患解析と薬剤開発を行う。

平成 26 年度は、疾患由来 iPS 細胞を作製する線維芽細胞（20 症例、12 疾患）、血液細胞（19 症例、16 疾患）合計 39 例、28 疾患、樹立・収集した。また iPS 細胞作製については、計 42 症例、31 疾患から 420 株あまりの細胞株を樹立した。分化誘導では、誘導法を確立した中胚葉系細胞、内胚葉系細胞から血管内皮細胞等において疾患解析を可能にする評価系を構築すると同時に肝臓系細胞では代謝性疾患モデル系確立して、薬剤スクリーニング系と遺伝子発現解析系を構築した。さらにこれらを使って新たな薬剤候補物質として 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin を発見した。

研究分担者

糸 昭苑

熊本大学発生医学研究所 教授

西中村 隆一

熊本大学発生医学研究所 教授

中尾 光善

熊本大学発生医学研究所 教授

入江 徹美

熊本大学薬学部 教授

篠原 康郎

北海道大学大学院先端生命科学研究院
特任教授

房木 ノエミ

慶應義塾大学医学部 特任准教授

松本 志郎

熊本大学医学部附属病院 講師

有馬 英俊

熊本大学薬学部 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

A. 研究目的

iPS 細胞は、疾病の標的細胞誘導が可能であり、増幅し長期保存にも耐えられる。したがって、生体試料に限られる難治性疾患（難病）の創薬研究に優れた効果を発揮すると考えられる。iPS 細胞を用いて、創薬研究を幅広く展開するためには、多くの疾患由来 iPS 細胞を有するライブラリーと疾患標的細胞への安定した再現性の高い分化誘導方法を備えた基盤構築が求められる。申請者らは、これまでに 1000 株以上ものヒト疾患由来 iPS 細胞株の作製と保存・バンク化を行ってきた実績を有する。加えて、世界に先駆けて、分化中間段階細胞を可視化し同定する独創的な手法を用いて、中胚葉系（骨、軟骨、血液、血管内皮）と内胚葉系（肝臓、膵臓）細胞のヒト ES/iPS 細胞からの分化誘導方法を確立してきた。これらの成果をもとに難病由来 iPS 細胞を利用した創薬基盤開発研究を遂行する。

本研究の目的は、

- 1) 外来因子フリー難病由来 iPS 細胞の作製とそのバンク化
- 2) 中・内胚葉系子孫細胞への分化誘導方法の確立とそれを用いた疾患解析と薬剤開発

平成 26 年度には、難病由来 iPS 細胞作製を進めると共に、中胚葉・内胚葉系子孫細胞である、骨・軟骨、血管内皮、肝、膵β、腎細胞の分化誘導法の確立、誘導した細胞の機能評価系の確立、これらの細胞が侵される疾患由来 iPS 細胞を使ったモデル作製と薬剤開発を引き続き行う。iPS 細胞を使った難病研究班からも情報を交

換し連携する。本研究では、従来の方法と全く異なり外来因子が染色体上に残らず、短期間で作製可能な国内発のセンダイウイルスベクターを用い外来因子フリーの iPS 細胞を作製する特色を有する。特に平成 26 年度に新たに私たちが開発した新型センダイウイルスベクターは、iPS 細胞の作成効率が高く（線維芽細胞で 4%以上、血液細胞で 2%以上）、容易に細胞から除去できるという優れた利点を持つ。疾患由来 iPS 細胞の研究は年々増加しているが、作製 iPS 細胞数は未だ不十分であり、未作製な疾患が多く残されている。研究では、細胞表面マーカーを用いて中間段階細胞のモニタリングと分離を行いつつ、疾患異常を解析する特色ある手法を用いる。加えて、化学物質による誘導方法の確立や複合糖質を網羅的に解析し、疾患による異常を明らかにする点は、これまでの研究になかった視点であり独創的な点である。

B. 研究方法

1. 難病由来血液細胞、皮膚線維芽細胞の収集と樹立

熊本大学での iPS 細胞作製研究が倫理委員会の承認済である全国 20 以上の大学病院等から、同意済み線維芽細胞、血液細胞の収集を行う。血液細胞はヘパリン加にて採血を行い、単核球をフィコール遠心法を用いて分離する。線維芽細胞は、ヒトの皮膚生検（直径約 5mm 片）から、皮膚由来初代線維芽細胞を分離培養する。

2. 外来因子フリー難病由来 iPS 細胞の樹立と保存

新たに開発した新型センダイウイルス

ベクター (SeV) によって患者由来細胞へ初期因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を一過性に発現させ、iPS 細胞を作製する。血液細胞からの場合は、ConA や抗 CD3 抗体にてリンパ球(T 細胞)を5日間刺激後、iPS 細胞を誘導する。樹立した iPS 細胞については、1)アルカリフォスファターゼ染色 2)Nanog, Oct3/4, SSEA-4, TRA-1-60 の免疫染色による iPS 細胞の確認を行う。さらに、三胚葉系細胞への分化を誘導し多能性を確認する。誘導後、神経外胚葉マーカー : Sox1, Neurogenin, Nestin 等、中胚葉マーカー : Brachyury, Mesogenin、Mesp2 等、内胚葉マーカー : Sox17, CK18, CK19, Foxa2 等の発現を定量 RT-PCR にて調べる。さらに、必要に応じて、染色体解析、多分化能を解析のための免疫不全マウス移植での奇形腫形成実験を行う。

樹立した iPS 細胞は、すみやかに貯蔵し、同時に作製依頼者へ供与する。また、バンク登録に向けた患者の同意、研究者の同意を得てバンク化を進める。

3. ヒト iPS 細胞から中胚葉系・内胚葉系細胞への分化とそこからの子孫細胞への分化

成熟度の高い中・内胚葉由来の細胞誘導方法を確立する。中胚葉誘導では、PDGFR α と KDR を表面マーカーとして、FACS にて分離後、PDGFR α ⁺分画は、骨・軟骨細胞へ誘導し、KDR⁺分画は血管内皮、血液細胞への分化誘導を行う。また内胚葉表面マーカー CXCR4 を用いて分離後、HGF, OSM 等を用いて肝様細胞の誘導を行う。最終的に、肝臓細胞のマーカー (HNF6, AFP, Albumin 等) にて肝様細胞の誘導ができていることを確認する。

一方、血管内皮細胞へは Activin A, BMP, FGF を用いて行い FACS にて純化・精製後、チューブ形成実験系を確立する。

4. 疾患由来 iPS 細胞を用いた疾患モデル開発

平成 25 年度に確立したニューマンピック病 C 型 (NPC) 由来 iPS 細胞のモデル系を用いて薬剤スクリーニングの系を構築し化合物のスクリーニングを行う。さらに DNA アレイを用いて網羅的遺伝子解析を確立する。

(倫理面への配慮)

1. 倫理審査

正常と疾患由来の iPS 細胞作製とその解析、細胞のバンク化については研究代表者の所属する機関の倫理委員会で審査を行いすでに承認済みである。患者サンプルの所属機関以外からの提供については、提供機関の倫理審査委員会の承認があることを確認し研究を行う。

2. 人権擁護上の配慮

研究の成果を学術雑誌に投稿することや、学会等で発表する場合、個人が特定される個人情報公表されることはない。本研究のために特別に用意した番号によって管理し、人種・性別・年齢・診断名以外の患者情報はサンプル提供を行う臨床機関にて管理を行う。作製した iPS 細胞は所属機関において施錠できる研究室にて管理し、一般の人々やこの研究に関係ない他の研究者の目に触れることはない。したがって、iPS 細胞から個人の特定の情報につながることはない。また、ヒト iPS 細胞から個体を作製すること、ヒト胚への導入、ヒト胎児への導入、生殖細胞の作製は、行わない。

3. 不利益・危険性の排除や説明と同意

サンプル採取には、研究目的・予想される成果、患者情報の保護、予想される不利益等を同意書に記述している内容に準じて、担当医からの十分な説明の後(必要であれば代表申請者も同席して)、同意(インフォームド・コンセント)を得て行う。

皮膚由来線維芽細胞を得るための皮膚生検は通常の医学診療の範囲で行われている方法に準じて行う。生検は、直径5mmほどを前腕伸側から局所麻酔を使い行う。痛みは、局所麻酔注射の時のみである。瘢痕は普通のけがの場合と同じである。以上より、危険性はほとんどない。また、末梢血液採取も上腕の静脈より、通常医療で行われている方法に準じて行う。こちらも危険性はない。

本研究による成果が知的財産権の対象になる場合もあるが、提供者に権利が帰属したり、利潤を得ることはない。サンプル提供者にご負担していただく必要経費はなく、また、サンプル提供による謝金・交通費の支給もない。研究にかかる費用については、研究費から支出する。

4. 研究での利益相反について

本研究に関わる利益相反は代表者が所属する熊本大学利益相反審議委員会と分担者が所属するそれぞれの機関にて審議され、特に利益相反関連事項はない。

C. 研究成果

1. 疾患由来血液細胞と線維芽細胞の収集とiPS細胞の樹立

疾患由来iPS細胞を作製する線維芽細胞、血液細胞については、平成26年度(平成26年度4月～平成27年度3月)、線維

芽細胞(20症例、12疾患)、血液細胞(19症例、16疾患)合計39症例、28疾患、樹立・収集した。またiPS細胞作製については、計42症例、31疾患から420株あまりの細胞株を樹立した。これで、本研究を開始した平成25年10月から平成27年3月までで、iPS細胞作製の細胞については、線維芽細胞(30症例、19疾患)、血液細胞(25症例、21疾患)合計55症例、40疾患、樹立・収集した。またiPS細胞作製については、計55症例、42疾患から550株あまりの細胞株を樹立した。

2. 中胚葉系、内胚葉系細胞への誘導方法の確立と肝様細胞の評価系の確立

iPS細胞からの分化誘導方法や誘導後の細胞の機能評価系については、平成25年度に誘導方法を確立したヒトiPS細胞から骨芽細胞や軟骨細胞の誘導方法を確立した。またiPS細胞からの血管内皮細胞の誘導分化をFGF, BMPを用いて行い、CD31⁺, VE-Cadherin⁺の血管内皮細胞をFACSを用いて純化・精製することに成功した(図1)。

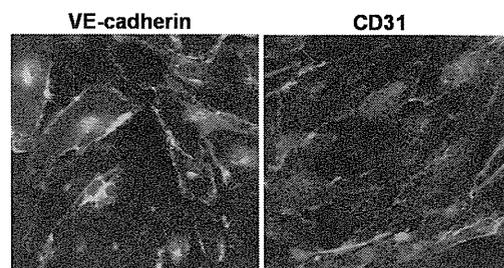


図1 ヒトiPS細胞から誘導した血管内皮細胞
ヒトiPS細胞から誘導後FACSを使って純化。血管内皮細胞のマーカールにて免疫染色(核はヘキストにて染色)

平成25年度にヒトiPS細胞からCXCR4⁺の内胚葉系細胞を効率よく誘導する条件を確立したが、この系を用いてアルブミン陽性の肝様細胞を誘導、新たにDNAアレイを用いて網羅的な遺伝子

解析を可能にする系を確立した。この系は後に記述する疾患由来 iPS 細胞から肝様細胞を誘導しその細胞の遺伝子発現解析に用いた。

3. 疾患由来 iPS 細胞を使ったニーマンピック病 C 型 (NPC) の治療薬開発

ニーマンピック病 C 型 (NPC) は、ライソゾーム内に遊離型コレステロール、糖脂質が蓄積する先天代謝異常症である。幼児期に発症し、肝障害、神経症状のために 20 歳ぐらいまでに死亡する。現在使われている治療薬ミグルスタットは効果が限定的であり、他に有効な治療薬はない。欧米で治験が進んでいる薬剤、2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HPBCD) は、国内 2 例での使用経験があるが、2 例とも重篤な肺障害 (急性呼吸不全) が起こり、全身投与は中止され、使用できる見通しがたっていない。したがって、全身投与可能な、有効性と安全性に優れる薬剤の開発が NPC 治療の課題である。平成 25 年度、NPC 由来 iPS 細胞を樹立し、それから誘導した肝様細胞にて、遊離型コレステロールの蓄積、ATP 産生能の低下、オートファジー異常を発見し、NPC の細胞レベルでの疾患モデルを確立した。加えて、HPBCD がこれらの異常を回復させることを見出し、このシステムが薬剤効果を解析する系として有用であることを実証した。平成 26 年度は、この系を用いた Dextrin 類縁物質 20 個の薬剤スクリーニングから、新たに 2-Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin (HPGCD) がこれらの異常を HPBCD と同様に改善することを見出した (図 2)。HPGCD は、コレステロールの溶解度が HPBCD よりもはるかに低く、そ

のためにこれまでは NPC に対し無効であると考えられており、NPC のコレステロール蓄積に対してその効果が検証されな

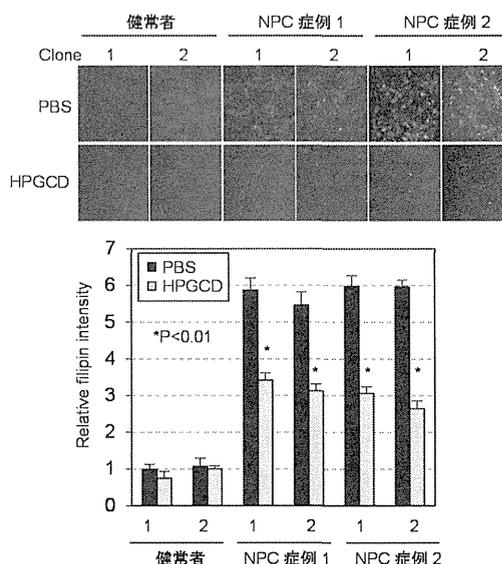


図2 HPGCDによるコレステロール蓄積減少
iPS細胞より誘導した肝様細胞 (上)
HPGCD処理でコレステロール蓄積が減少
コレステロールをfilipin染色にて可視化
コレステロール蓄積をグラフ化 (下)

かった化合物である。今回、私たちの研究で初めて、その効果が HPBCD と同等であることが発見された。さらに、HPGCD は NPC モデルマウスへの皮下投与実験でも、肝障害を著明に改善し、生存期間を有意に延長させた (図 3)。

次に、健常人と NPC 由来 iPS 細胞から肝様細胞を誘導後、DNA アレイにて発現プロファイルを作製し、NPC にて発現が異常となる分子群を同定した。さらに Gene Set Enrich Analysis (GSEA) を行ない、有意に異常となる Molecular Signature を同定した。これらの異常 Molecular Signature に含まれる遺伝子を用いたクラスター解析から、これら異常な遺伝子発現パターンを、HPBCD 処理よりも

HPGCD 処理のほうが、より正常発現パターンに近づけることが明らかとなった。さらに HPBCD 処理と HPGCD 処理では

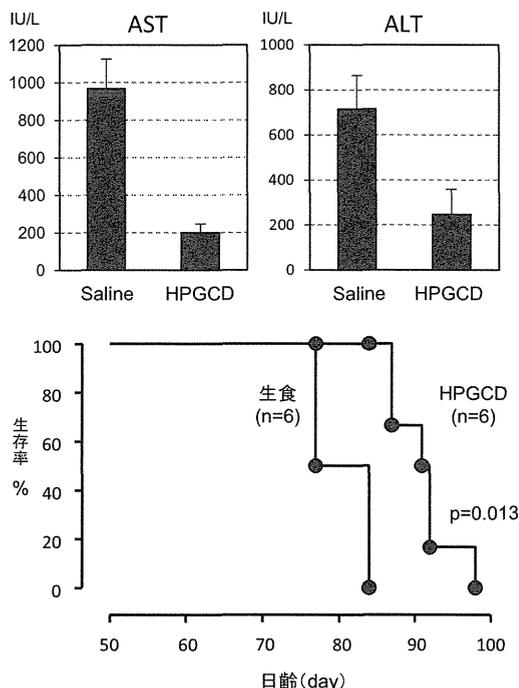


図3 NPCモデルマウスでのHPGCDの効果
8週齢マウスに週一回皮下注、計5回投与
血清トランスアミラーゼ値は激減（上）
生存期間も延長（下）

共通の Molecular Signature のほかに、HPGCD 特異的な Molecular Signature があることも明らかとなった。これら結果は、1) HPGCD のほうが HPBCD よりも、遺伝子発現をより正常化させること、2) HPGCD と HPBCD の作用機序は共通なものに加えて、異なる機序が存在することを示唆している。

D. 考察と結論

1. 線維芽細胞の収集と樹立、血液細胞の収集は計画を上回るペースで順調に進んでおり、今後もこのペースで進める。

2. 中胚葉系細胞、そこから骨細胞や軟骨細胞を誘導できたことは、今後、これらの骨・軟骨系統の難治性疾患由来 iPS 細胞の解析に応用できると考えられる。また、内胚
3. 内胚葉系細胞から肝様細胞への分化誘導では作成した細胞の網羅的な遺伝子発現解析を可能にするシステムを構築できた。このことにより、それぞれの難病由来 iPS 細胞をより詳細に解析することが可能となる。さらに薬剤の効果での遺伝子発現の変化をとらえることで薬剤の標的分子の解析にも応用できる。
4. 血管内皮細胞を iPS 細胞から細胞表面マーカーを使って容易に純化・精製する方法を確立した。この系を用いて血管内皮細胞が疾患標的となる疾患を中心に解析を進める予定である。
5. NPC から作成した iPS 細胞の疾患モデルを用いて、新たに 2-Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin (HPGCD) が、モデル見られ遊離型コレステロール蓄積、ATP レベルの減少、オートファジーの異常を回復させることを明らかにした。さらに NPC モデルマウスへの投与において肝障害の改善と生存期間の延長が見られたことは HPGCD が NPC の治療薬として有用であるの可能性を示唆している。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Soga M, Ishitsuka Y, Hamasaki M, Yoneda K, Furuya H, Matsuo M, Ihn H, Fusaki N, Nakamura K, Nakagata N, Endo F, Irie T and Era T. HPGCD outperforms HPBCD as a potential treatment for Niemann-Pick disease type C during disease modeling with iPS cells. *Stem Cells*, 33: 1075-1088, 2015.
2. Isono K, Jono H, Ohya Y, Shiraki N, Yamazoe T, Sugasaki A, Era T, Fusaki N, Tasaki M, Ueda M, Shinriki S, Inomata Y, Kume S, Ando Y. Generation of familial amyloidotic polyneuropathy-specific induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 12: 574-583, 2014.
3. Huang GJ, Edwards A, Tsai CY, Lee YS, Peng L, Era T, Hirabayashi Y, Tsai CY, Nishikawa S, Iwakura Y, Chen SJ, Flint J. Ectopic cerebellar cell migration causes maldevelopment of Purkinje cells and abnormal motor behaviour in Cxcr4 null mice. *PLoS One.* 9(2):e86471, 2014.

2. 学会発表等

1. 江良択実、後藤瑞生、三輪裕幸 多能性幹細胞から間葉系幹細胞への分化 第14回日本再生医療学会総会シンポジウム17、2015年3月21日、横浜
2. 江良択実 iPS細胞を使った疾患モデルと治療薬開発 公開シンポジウム 科学者たちによる難病への挑戦～iPS細胞を用いた疾患研究～ 2015年2月

23日 東京

3. 江良択実 iPS細胞を使った難病研究 第27回 日本動物実験代替法学会大会 シンポジウムヒト iPS細胞を用いた創薬研究の新たな展開 2014年12月7日 横浜
4. 江良択実 iPS細胞研究の進展 難治性疾患由来 iPS細胞の樹立、解析とそのバンク化 第87回日本生化学会大会 シンポジウム疾患 iPS細胞 2014年10月15日 京都
5. 江良択実 骨・代謝性疾患由来 iPS細胞を使った疾患モデルと治療薬開発 第35回 日本炎症・再生医学会年会 教育講演 平成26年7月2日 沖縄

G. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

外来因子フリー難病由来 iPS 細胞のライブラリー構築と それを使った疾患モデルと薬剤開発

研究分担者 糸昭苑 熊本大学・発生医学研究所・多能性幹細胞分野・教授

研究要旨

本研究の目的は、1. 外来因子フリー難病由来 iPS 細胞の作製とそのバンク化、2. 中・内胚葉系子孫細胞への分化誘導方法の確立とそれを用いた疾患解析と薬剤開発である。平成 26 年度においてはヒト iPS 細胞から機能的な膵臓細胞への分化誘導の構築のための検討を行った。分化誘導方法の最適化により、ヒト iPS 細胞から糖濃度に応答してインスリンを分泌する機能を持った成熟した膵臓 β 細胞の分化誘導に成功し、それを用いた低分子化動物のスクリーニングを実施した。

A.研究目的

本研究の目的は、1. 外来因子フリー難病由来 iPS 細胞の作製とそのバンク化、2. 中・内胚葉系子孫細胞への分化誘導方法の確立とそれを用いた疾患解析と薬剤開発である。

研究分担者である糸は、平成 26 年度においてはヒト iPS 細胞から効率的な膵臓分化誘導方法の構築および分化細胞を用いた低分子化合物スクリーニングを目的として研究を行なった。

B.研究方法

ヒト iPS 細胞株である Toe を用いて検討を行った。膵臓分化に利用する培養基材としてはヒト ES/iPS 細胞の未分化維持培養において実績のあるゼノフリー合成基質 Synthemax (Corning 社)を利用した。培地交換については、H24 年度の厚生労働省の臨床研究安全基盤整備支援事業で導入したラボラトリーオートメーションシステム Biomek NP (BECKMAN COULTER)を用いた。低分子化合物に関しては創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業「大型創薬研究基盤を活用した創薬オープンイノベーションの推進」からの支援により、東京大学より供与頂いた。約 1 か月かけて分化誘導した膵臓 β 細胞に低分子化合物を添加して、コントロールと比較

して細胞数が 1.5 倍以上増えるものをヒット化合物とした。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C.研究結果

ヒト iPS 細胞から膵臓 β 細胞への分化に関しては、ゼノフリー環境下で糖応答性を持つ膵臓 β 細胞を分化誘導することに成功した (Shahjalal, *J Mol Cell Biol.*, 2014)。この方法を元にスクリーニング系を構築した。本検討では、分化誘導した成熟膵臓 β 細胞の増殖を促す低分子化動物を探索した。2800 化合物を評価した結果、5 つの化合物に β 細胞増殖活性を見出した。現在、再現性を評価するとともに周辺化合物を用いた実験を検討中である。

D.考察

本年度の検討により、当初の目的である膵臓分化誘導系の構築およびスクリーニングの実施が達成できた。スクリーニングの結果得られた化合物については、今後詳細に検討していく予定であるが増殖メカニズムの解明は糖尿病治療の一助になると考える。また、構築したハイス

ループット評価系はモデル細胞を利用した薬剤開発研究にも利用可能である。

E. 結論

ヒト iPS 細胞から成熟した膵臓 β 細胞への分化誘導方法を構築し、それを用いて低分子化合物スクリーニングを実施した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

論文発表

1. Shiraki N, Ogaki S, Kume S*. Profiling of embryonic stem cell differentiation. **Rev Diabet Stud.** 11(1):102-14, 2014.
2. Shahjalal HM, Shiraki N, Sakano D, Kikawa H, Ogaki S, Baba H, Kume K., Kume S. Generation of insulin-producing beta-like cells from human iPS cells in a defined and completely Xeno-free culture system. **J. Mol. Cell Biol.** 6, 394-408, 2014.
3. Nakashima R, Yano T, Ogawa J, Tanaka N, Toda N, Yoshida M, Takano R, Inoue M, Honda T, Kume S and Matsumoto K. Potentiation of insulin secretion and improvement of glucose intolerance by combining a novel G protein-coupled receptor 40 agonist DS-1558 with glucagon-like peptide-1 receptor agonists. **Eur. J. Pharmacol.** 737, 194-201, 2014.
4. Shiraki N., Shiraki Y., Tsuyama T., Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H., Kume K, Endo F, Kume S*. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. **Cell Metab.** 19, 780-794, 2014.
5. Kikawa K, Sakano D, Shiraki N, Kume K, Endo F, Kume S*. The beneficial effect of insulin treatment on the outcome of islet transplantation in Akita mice. **PLoS ONE** 9(4): e95451, 2014.
6. 坂野大介 糸昭苑 「VMAT2 と β 細胞分

化」(科学評論社)内分泌・糖尿病・代謝内科 39, 153-159, 2014.

7. 坂野大介 糸昭苑 「ES 細胞を用いた発生分化の研究と再生医学への応用」『特集 器官の発生と再生の基礎』生体の科学 65. 197-202, 2014.

書籍

8. Sakano D, Shiraki N, Kume S. 'Pancreatic differentiation from murine ES cells' in "Human Embryonic Stem Cells, 3rd Edition" (Springer's Protocols On Line series) (Edited by Kursad Turksen), *in press*
9. Tsuyama T, Shiraki N, Kume S. "Definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells combined with selective elimination of undifferentiated cells by methionine deprivation", Human Embryonic Stem Cells, 3rd Edition (Springer's Protocols On Line series) (Edited by Kursad Turksen), *in press*
10. Umeda K, Shiraki N, Kume S, Hepatic differentiation from human iPS cells using M15 cells, in "iPS Cells: Generation Characterization and Differentiation – Methods and Protocols" Methods Mol Biol. 2014 [Epub ahead of print] (Edited by Andras Nagy and Kursad Turksen).
11. Yamazoe T, Shiraki N, Kume S, Hepatic differentiation from murine and human iPS cells using nanofiber scaffolds, Methods Mol Biol. 2014 Nov 20. Epub. in "ES Cells: Methods and Protocols- 2nd Edition" [Epub ahead of print] (Edited by Andras Nagy and Kursad Turksen).

学会発表

12. 坂野大介、崔 成翼、片岡正光、糸昭苑「膵 β 細胞の複製を促進する低分子化合物の探索」第 37 回日本分子生物学会 (横浜) 平成 26 年 11 月 26 日
13. 津山 友徳、白木 伸明、白木 恭子、小幡 史明、三浦 正幸、糸和彦、遠藤文夫、糸

- 昭苑、「ヒト多能性幹細胞における S-アデノシルメチオニンの重要性」“S-adenosylmethionine is crucial for maintaining human pluripotent stem cells” 第 37 回日本分子生物学会（横浜）平成 26 年 11 月 26 日
14. 条昭苑 熊本県眼科医学会研修会「iPS 細胞を用いた再生医療研究」平成 26 年 11 月 8 日
15. Shoen Kume, “Signals that control differentiation of ES/iPS cells into pancreatic beta cells” The 8th International Conference on Cell Therapy (held and organized by the Seoul National University Hospital, Innovative Research Institute for Cell Therapy (IRICT) supported by the Korea Ministry of Health and Welfare) Seoul, South Korea, Oct 23, 2014.
16. 条昭苑「多能性幹細胞モデルを用いた膵臓の発生分化研究 Pluripotent stem cells as a model for developmental biology of the pancreas」『細胞可塑性：膵内分泌細胞の可塑性を制御するシグナルネットワーク』シンポジウム（菊池裕・条昭苑 オーガナイザー）第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 16 日（京都）
17. 条昭苑「再生医療-2, iPS 技術を用いた膵β細胞の分化誘導研究」『糖尿病合併症を克服する新戦略』シンポジウム第 29 回日本糖尿病合併症学会 2014 年 10 月 4 日（東京）
18. 条昭苑「多能性幹細胞から消化器官を創る」New Insights of Molecular Genetics on Growth Disorders 平成 26 年 7 月 12 日（東京）
19. Sakano, D., Shiraki, N., Kikawa K., Yamazoe T, Kataoka, Umeda K, Araki K, Mao D, Matsumoto S, Nakagata N, Andersson O, Stainier D, Endo F., M., Kume, K, Uesugi, M. and Kume, S. VMAT2 identified as a regulator of late-stage pancreatic beta-cell differentiation. ISSCR, 2014, June 19 (Vancouver)
20. Shoen Kume Chemical genetic identification of signals that control late-stage pancreatic beta cell differentiation. “Diabetes” session. ISSCR, 2014, June 20. Oral presentation (Vancouver)
21. Shoen Kume “Signals that control differentiation of pluripotent stem cells into pancreatic beta cells” (Organizer, Erdal Karaoz) Tissue Engineering Regenerative Medicine International Society (TERMIS-EU 2014; Genova, June 10-13, 2014)
22. 条昭苑 第 57 回糖尿病学会シンポジウム『糖尿病研究はおもしろいー最先端糖尿病研究テクノロジーへのいざない』(座長:清野進、荒木栄一) 2014 年 5 月 22-24 日（大阪）
23. 条昭苑「再生医療を用いた糖尿病治療の今後の展望」クリニカルアワー6『新しい視点から見た糖尿病診療の今後の展望』日本内分泌学会学術総会 2014 年 4 月 25 日（福岡）

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

- | | |
|-----------|------|
| 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 |

難病由来 iPS 細胞からの腎臓細胞分化誘導法の開発

研究分担者 西中村 隆一 熊本大学発生医学研究所 教授

研究要旨

昨年度に、ヒト iPS 細胞から糸球体と尿細管という 3 次元の腎臓組織を試験管内で誘導することに成功した。今年度は、この方法で誘導される糸球体ポドサイトを詳細に調べることによって、形態的に未熟なスリット膜が形成されつつあること、遺伝子発現も *in vivo* のものに類似していることを見出した。これによって、難病患者から iPS 細胞を樹立し、腎臓へと誘導して病態を再現することが現実味を帯びてきた。しかし多くの腎臓疾患を対象とするには腎臓の分化をさらに進める必要がある。

A. 研究目的

難治性疾患（難病）は患者から入手できる細胞数が少なく、創薬研究を進める上での障害となっている。一方、多分化能をもつ iPS 細胞は、疾病の標的細胞を誘導できるうえ、増幅し長期保存できることから、上記の問題点を解決できる可能性をもっている。そのためには、多くの疾患由来 iPS 細胞（センダイウイルスベクターを用いた外来因子フリーのもの）からなるライブラリーの作成と疾患標的細胞への再現性の高い分化誘導法の開発が必須である。本研究は、創薬基盤の整備を目指して成熟度の高い中・内胚葉由来の細胞誘導方法を確立する計画の中で、腎臓細胞への誘導法開発を担当する。さらに腎臓患者から iPS 細胞を樹立し、それを腎臓方向へと誘導することによって、病態を再現して創薬の基盤とすることを旨とする。

B. 研究方法

腎臓は、糸球体や尿細管からなるネフロンという機能単位を 100 万個も有する複雑な臓器である。その複雑な構造と発生機序から、3 次元の腎臓組織を試験管内で誘導することは、極めて困難とされていた。我々は胎齢 10.5 日のマウス腎臓にネフロンの前駆細胞が存在すること、それを Wnt で刺激することによって糸球体や尿細

管の細胞が誘導できることを以前に報告していた (Osafune et al. *Development* 2006)。そこでまずマウスを使って、より早期の胎児細胞からネフロン前駆細胞を誘導できないか試みた。ネフロン前駆細胞を含めて腎臓はすべて、転写因子 Osr1 陽性の中間中胚葉から発生するとされていた。そこで Osr1 の GFP ノックインマウスと ES 細胞を作成し解析を進めたが、この過程で、前駆細胞は通説の中間中胚葉由来ではなく、別の細胞群（体軸幹細胞様の細胞）から派生することを見いだした。そしてその細胞群に Wnt, Bmp, アクチビン、レチノイン酸、Fgf9 が働いてネフロン前駆細胞が形成されることを見いだした。この発生過程を忠実に再現することによって、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞から体軸幹細胞様細胞を経由してネフロン前駆細胞を誘導し、それを Wnt で刺激することで糸球体と尿細管の試験管内構築に成功した (Taguchi et al. *Cell Stem Cell*, 2014)。

今年度は、この方法で誘導される腎臓組織の中で、特に糸球体の形成の程度を詳細に検討した。糸球体は、血液から原尿をろ過する腎臓の主要な機能を司るユニットであり、血管内皮をポドサイトが取り巻き、間隙をメサンギウムが埋めている。ポドサイトは apical/basal の極性をもった上皮の一種であるが、その basal 側におい

て複雑な突起（足突起）を多数伸ばし、足突起間にはスリット膜と呼ばれる分子のメッシュが存在する。このメッシュが血中蛋白の尿への漏出を防いでおり、その主要構成分子がネフリンである。そこで、ネフリンの遺伝子座に緑色蛍光タンパク（GFP）を挿入したヒト iPS 細胞を樹立し、そこから腎臓組織を誘導することによって、糸球体ポドサイトを緑色に蛍光ラベルすることを計画した。さらにポドサイトの構造と遺伝子発現を詳細に調べることとした。

(倫理面への配慮)

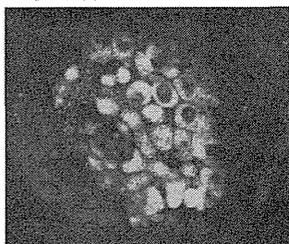
DNA 組換え実験、動物実験は、所属機関委員会の許可を得て、機関内の指針を遵守し行った。

C.研究結果

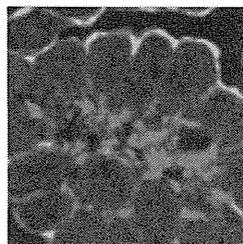
ネフリン遺伝子の配列を含むノックインベクターを、TALEN とともにヒト iPS 細胞に導入したところ、高頻度で相同組換え体を得た。それを上記の方法でネフロン前駆細胞に誘導し、Wnt で刺激したところ、腎臓組織が誘導され、糸球体が緑に蛍光発色した（図左）。この蛍光シグナルの分布はネフリン陽性のポドサイトと一致しており、GFP が内在性のネフリン発現を忠実に模倣することがわかった。

ヒトiPS細胞から誘導した糸球体

緑に蛍光発色する
糸球体ポドサイト



極性をもつポドサイト
(桃色:ネフリン)



また誘導ポドサイトは apical/ basal の極性を有しており、ネフリン蛋白は basal 側に限局していた（図右）。電子顕微鏡での観察では、basal 側に多数の突起がみられ、これは足突起より前の段階で形成される一次突起と思われた。さらにその突起の間に梯子状の構造物が形成されており、未熟なスリット膜ができつつあることが確

認された。

GFP の挿入によって誘導ポドサイトの FACS による単離が可能となった。GFP 陽性率は 7%前後であり、陽性細胞はネフリン、ポドシン、synaptopodin などポドサイト特異的な遺伝子を発現していることが RT-PCR で確かめられた。さらにマイクロアレイ解析によって、誘導ポドサイトで発現する遺伝子群を網羅的に明らかにした。このリストの中には、ヒト及びマウスでネフローゼ症状を呈することが知られている遺伝子群はほぼすべて含まれていた（論文投稿中）。

D.考察

我々の成果は、西中村が 1990 年代にカエルを用いていた腎臓の試験管内誘導を、哺乳類で実現したことになる。これには腎臓の起源が通説と異なることを見いだしたこと、腎臓の発生過程を詳細に明らかにしたこと、という発生学的知見の積み上げが大きく貢献している。またマウスとヒトでほとんど誘導法が同じであり、種を越えた共通性が示唆された。さらにアクチビンとレチノイン酸の必要性はカエルから保存されおり、興味深い。

今年度は、この方法によって誘導される糸球体のポドサイトが構造的にも遺伝子発現的にも in vivo のものに類似していることを示しており、我々の誘導法の正しさを実証したものである。一次突起とスリット膜をもつポドサイトを幹細胞から誘導した報告は初めてである。また遺伝子も、in vivo のポドサイトに特徴的なものや疾患に関わるものはほぼすべて発現しており、かなり分化が進んだ状態といえる。これらが血管内皮やメサンギウム細胞との相互作用なしで実現されたことは意外でもあり、ポドサイトの自己組織化能は非常に高いことになる。残念ながら二次突起（足突起）と完全なスリット膜の形成には至っておらず、更なる分化が必要である。これにはおそらく血管内皮の導入が必要と思われ、その点の解決を試みている。

この成功によって、難病患者から iPS 細胞を樹立し、腎臓へと誘導して病態を再現することが現実味を帯びてきた。とはいえ、今回誘導できたのは糸球体と尿細管であり、集合管や尿管、

血管、間質はできていない。よって、現時点で iPS 細胞を樹立する対象になるのは、糸球体や尿管に症状を呈する疾患のみである。また分化の程度も上記のように早期段階にとどまるため、それまでに症状を出す疾患に限られる。また今回使用したヒト iPS 細胞は山中伸弥博士が 4 因子を使って最初に樹立した 201B7 株であるが、患者から多数の iPS 株を樹立する場合、その度にまた株間でも性質に差があることが予測される。そのような状況でも、安定して再現性良く腎臓組織が誘導できなければならない。よって iPS 細胞を樹立して誘導を目指す際に、誘導条件を改善していくことが必須である。

E. 結論

ヒト iPS 細胞において、相同組換え技術と独自に開発した誘導法を使って、糸球体ポドサイトが蛍光発色する 3 次元腎臓組織を試験管内で構築した。誘導されたポドサイトは構造的にも遺伝子発現上も *in vivo* のそれに近いものであった。しかし多くの腎臓疾患の病態を再現するにはさらに成熟度を高める必要がある。今後は難病患者由来の iPS 細胞を作成するとともに、どのクローンでも安定して腎臓組織を誘導できる再現性の高い方法に向けて改善していきたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Taguchi A and Nishinakamura R. Nephron reconstitution from pluripotent stem cells. **Kidney Int.** 2014 Dec 3 [Epub ahead of print].

2. 学会発表

Nishinakamura R and Taguchi A. Redefining the *in vivo* origin of nephron progenitors enables generation of three-dimensional glomeruli and renal tubules from pluripotent stem cells *in vitro*. The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. May 16, 2014, Tokyo, Japan

Nishinakamura R and Taguchi A. Programming

stem cells toward the kidney. 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 26 日、横浜

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

多能性幹細胞からの腎臓誘導法 熊本大学（西中村隆一、太口敦博） PCT/JP2014/077601
2014 年 10 月 16 日

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特になし

遺伝子発現とエピゲノム解析、細胞代謝の解析

研究分担者 中尾光善 熊本大学発生医学研究所 教授

研究要旨

iPS 細胞を用いた疾患解析と薬剤開発を行うために、対照および疾患由来の細胞について、遺伝子発現とエピゲノム、細胞形態や細胞代謝等の機能を解析することで、発症や病態の分子機序の理解を目指した研究基盤を確立する。細胞病態を客観的に評価できる解析系を用いて、新たな治療薬剤の探索と開発などに資する。

A. 研究目的

iPS 細胞を用いた疾患解析と薬剤開発を行うために、対照および疾患由来の細胞について、細胞形態や細胞代謝等の機能、遺伝子発現とエピゲノムを解析することで、発症や病態の分子機序を理解する研究基盤の確立を目指す。

B. 研究方法

対象細胞を用いて、遺伝子発現の解析、細胞イメージングを用いた細胞形態の計測を行った。マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム、高速シーケンサーを用いたエピゲノム、細胞外フラックスアナライザーを用いた細胞代謝等の機能解析について準備した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

本研究課題に貢献するため、遺伝子発現とエピゲノム、細胞形態や細胞代謝等の機能を解析する研究基盤を用いて、以下の解析を進めた。

とりわけ、ヒト iPS 細胞(標準株)について、イメージング計測解析を実施した。形態分類ソフトウェアを用いて、iPS 細胞が形成するコロニーの分類を行い、完全な iPS 細胞(多能性を有する)、不完全な non-

iPS 細胞を検討し、90%程度に区別可能であることが分かった。また、核内構造体を認識する特異抗体を用いて、完全および不完全な iPS 細胞の識別できることを報告した(**Sci. Rep.**, 2014)。

D. 考察

対照および疾患由来の iPS 細胞について、細胞の遺伝子発現とエピゲノム、細胞形態を解析することで、細胞状態の特徴を評価することが可能であると考えられる。

E. 結論

本研究課題で用いる疾患由来 iPS 細胞について、遺伝子発現とエピゲノム、細胞形態や細胞代謝等の機能を解析することで、発症や病態の分子機序の理解を目指した研究を促進できることが明らかになった。細胞病態を客観的に評価できる解析系を構築することは、新たな疾患モデルと薬剤開発などに大いに資することが期待できる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

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

Kanda S, Ohmori T, Taguchi A, Kudo K, Horiuchi T, Sato Y, Hino S, Suzuki Y, Sander M, Sugano S, Nakao M, and Nishinakamura R. Sall1 co-operates with Six2 to actively maintain nephron progenitors. **J. Am. Soc. Nephrol.** 25: 2584-2595, 2014.

安田洋子、斉藤典子、藤原沙織、Mohamed O. Abdalla、松森はるか、坂本智代美、中尾光善. クロマチン構造と核異型. 病理と臨床、文光堂、32: 789-795, 2014.

2. 学会発表

阿南浩太郎、日野信次郎、遠藤文夫、中尾光善. 骨格筋細胞における、ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 による代謝制御. 第 117 回日本小児科学会学術集会、平成 26 年 4 月 12 日 (名古屋市)

M. Nakao. Epigenetic cell regulation in energy metabolism and cancer. Epigenetics in development and diseases. 9th Asian Epigenomics Meeting. August 26, 2014 (Singapore)

S. Hino, A. Sakamoto, K. Nagaoka, K. Anan, R. Takase, and M. Nakao. The molecular mechanisms of metabolism-epigenome crosstalk. KEY forum: From Stem Cells to Organs. September 5, 2014 (Kumamoto)

中尾光善. Epigenetic cell regulation in energy metabolism and cancer. 第 87 回日本生化学会大会、平成 26 年 10 月 18 日 (京都)

中尾光善. エピジェネティクス：現代人の生命のプログラム、日本老年医学会北陸地方会、2014 年 10 月 25 日 (金沢市)

N. Saitoh, S. Tomita, M.O. Abdalla, S. Fujiwara, H. Matsumori, and M. Nakao. Activation of the ESR1 locus with novel non-coding RNA cloud in breast

cancer cell. 第 37 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ) 平成 26 年 11 月 27 日 (横浜市)

K. Anan, S. Hino, A. Sakamoto, K. Nagaoka, R. Takase, and M. Nakao. Histone demethylase LSD1 regulates metabolism in skeletal muscle cells. 第 37 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ) 平成 26 年 11 月 25 日 (横浜市)

坂元顕久、日野信次郎、長岡克弥、阿南浩太郎、高瀬隆太、中尾光善. 癌細胞内代謝の細胞外微小環境への適応におけるヒストン脱メチル化酵素 LSD1 の役割. 第 37 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ) 平成 26 年 11 月 26 日 (横浜市)

松森はるか、徳永和明、中尾光善、斉藤典子. ハイコンテントスクリーニングによる核小体制御因子の同定とその分子機構の解明. 第 37 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ) 平成 26 年 11 月 26 日 (横浜市)

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

発明の名称：ミトコンドリア機能向上剤 (特許第 5685764 号)

発明者：中尾光善、日野信次郎

特許権者：熊本大学

登録日：平成 27 年 1 月 30 日

2. 実用新案登録 該当なし。

3. その他

ニーマン・ピック病 C 型治療薬開発を目指した 病態モデル細胞・動物を用いた基礎検討

研究分担者 入江徹美 熊本大学生命科学研究部薬剤情報分析学分野 教授

研究要旨

ニーマン・ピック病 C 型(NPC)は、細胞内脂質代謝・転送系の破綻を呈する稀少難病であり、治療薬の開発が急務である。現在、NPC 患児に対する 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD)脳室内投与療法が人道的使用として特認されているが、至適投与条件および安全性に関する情報は極めて少ない。本報告では、NPC 病態モデル細胞を用い HPBCD の至適投与条件に関する検討を行った。その結果、1) モデル細胞において見られるコレステロール蓄積やライソゾーム滞留に対し、HPBCD は 0.1~1 mM の濃度範囲で顕著な改善効果を示すこと、2) HPBCD の 2-hydroxypropyl 基の置換度の違いは、少なくとも平均置換度 2.8~7.4 の範囲では、モデル細胞における病態改善効果に大きな影響を与えないこと、3) 他の β -cyclodextrin 誘導体 (2-hydroxyethyl (HE)および 2-hydroxybutyl(HB)体) と比較して、HPBCD は有効性と安全性のバランスに優れていること、4) 一方で、正常マウスを用いた予備的検討において、HPBCD を脳室内投与する際、投与速度依存的に、異常体温上昇や血圧低下が見られることが示された。今後の iPS 細胞を用いた評価系構築にあたり、重要な基礎的知見が得られた。

A.研究目的

ライソゾーム病の一種であるニーマン・ピック病 C 型 (NPC) は、細胞内脂質代謝・転送を司るたんぱく質である NPC1 もしくは NPC2 の遺伝子変異で生じ、細胞内脂質代謝・転送系の破綻を呈する稀少難病である。現在でも有効な治療薬・治療法が確立されておらず、新規治療薬の開発が切望されている。近年、2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD) を NPC 病態モデルマウスや細胞に投与すると、細胞・臓器中コレステロールの異常蓄積を改善し、病状改善や延命に有効であることが報告され、米国 FDA において HPBCD (静脈内投与及び髄腔内投与) の人道的使用を特認された。本邦においても 2009 年より佐賀大学医学部附属病院で HPBCD 静脈内投与療法が開始され、肝脾腫の縮小や脳波上の改善に一定の効果が得られたが、神経症状の改善には至っておらず、より有効な治療薬が切望されている。また、NPC に対する HPBCD 療法自体もこれまでに HPBCD 大量投与・長期投与がおこなわれた前例がないため、有効性および安全性に関する情報が極めて少ない。

研究分担者らは、cyclodextrin 誘導体 (CDs) を基盤とした各種化合物から NPC 治療薬候補の探索、

および臨床における NPC に対する HPBCD 療法の情報不足を補うことを目的とした創薬・臨床研究を推進している。本研究では、NPC 病態モデル細胞を用い、HPBCD の至適投与に資する基礎情報を収集することを目的に検討を行った。

B.研究方法

1) NPC病態のin vitroモデルであるNpc1遺伝子欠損 Chinese hamster ovary cells (Npc1欠損CHO細胞)を用いて、細胞内コレステロール代謝・転送異常およびライソゾーム滞留を指標に、HPBCDが最も有効性を発揮する添加濃度を調べた。2) Npc1欠損CHO細胞に、平均置換度が2.8、4.4および7.4のHPBCDを0.1および1 mM添加したときの有効性を比較した。3) 2-hydroxyethyl- β -cyclodextrinおよび2-hydroxybutyl- β -cyclodextrin (HEBCDおよびHBBCD)とHPBCDの有効性と細胞毒性を比較した。4) BALB/c系野生型マウスにHPBCDを脳室内投与した際の体温や血圧の変動を予備的に調べた。

C.研究結果

1) Npc1 欠損 CHO 細胞における HPBCD の至適添加濃度に関する検討

Npc1 欠損 CHO 細胞で、NPC 病態に類似した遊