

離型コレステロールの異常蓄積および lysotracker で測定したライソゾームの滞留に対し、0.1mM 以上の HPBCD 添加により改善したが、その一方で HPBCD 添加濃度が 2mM 以上では対する改善効果が消失し、昨年度までの検討で明らかとなった細胞内コレステロールバランス改善効果を示した濃度域と一致していた。

2) HPBCD の治療効果におよぼす HP 基の置換度の影響評価

Npc1 欠損 CHO 細胞に対し、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 添加したところ、遊離型コレステロールの異常蓄積およびライソゾーム滞留に対する改善効果に顕著な違いは見られなかった。

3) 類似する β -CD 誘導体との有効性・安全性比較

Npc1 欠損 CHO 細胞に対し、HEBCD および HBBCD を 0.01-1 mM の範囲で添加したところ、HBBCD の遊離型コレステロールの異常蓄積およびライソゾーム滞留に対する改善効果は HPBCD とほぼ同程度であったが、HEBCD の効果は極めて弱かった。一方で、*Npc1* 欠損 CHO 細胞に対する細胞傷害性について、HPBCD と HEBCD はほぼ同程度であったが、HBBCD では約 18 mM で、HPBCD および HEBCD と比し、細胞傷害性が強かった。

4) 野生型マウスにおける HPBCD 脳室内投与時の安全性に関する予備的検討

NPC モデルマウスで延命効果を示すことが報告されている HPBCD40 mg/kg 脳室内投与する際の安全性を予備的に評価する目的で、投与速度を 0.1-1.5 μ L/kg の範囲で変化させ BALB/c 系野生型マウスに投与した際の体温や血圧変動を調べたところ、1.0 μ L/kg 以上の投与速度では、顕著な体温上昇や血圧低下が見られた。

D. 考察

Npc1 欠損 CHO 細胞において、コレステロールの異常蓄積だけでなく、ライソゾームの滞留異常に対しても、HPBCD が有効性を発揮するには、至適濃度があることが明らかとなった。HPBCD の生体成

分や化合物との相互作用を調べるにあたり置換度が重要であるが、*Npc1* 欠損 CHO 細胞における有効性においては、少なくとも平均置換度 2.8~7.4 の範囲では、顕著な影響を与えないことが示された。また、HE および HBBCD と比較し、HPBCD は有効性と安全性のバランスに優れていることが示された。一方で、HPBCD を脳室内投与する際、1.0 μ L/kg 以上の投与速度で、異常体温上昇や血圧低下が見られることが示され、臨床使用の際にも十分注意する必要があることが示唆された。

E. 結論

本研究により、iPS 細胞を用いた評価系の構築に当たり、至適添加条件などの重要な基礎的知見が得られた。今後、iPS 細胞による評価系を用いて NPC 患者に対して、より安全かつ有効な治療戦略を確立するため、ヒトにおける最適な血中濃度範囲の検討、未だ解明されていない HPBCD の作用メカニズムの解明、有用な治療薬候補の探索を実施していく予定である。

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

Matsuo M, Shraishi K, Irie T et al. Effects of intracerebroventricular administration of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in a patient with Niemann-Pick Type C disease, *Mol Genet Metab Rep.*, 2014, 1, 391-400.

Umezaki Y, Irie T, Hirayama F et al. Preparation of hydrophilic C60(OH)10/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin nanoparticles for the treatment of a liver injury induced by an overdose of acetaminophen, *Biomaterials*, 2015, 45, 115-123

Soga M, Irie T, Era T et al. Preparation of hydrophilic HPGCD

Outperforms HPBCD as A Potential Treatment for Niemann-Pick Disease Type C During disease Modeling with iPS Cells, *Stem Cells*, 2015, 33, 1075-1088.

Maeda Y, Irie T, Arima H et al. Effects of Cyclodextrins on GM1-gangliosides in Fibroblasts from GM1-gangliosidosis Patients, *J Pharm Pharmacol.*, in press

Tanaka Y, Yamada Y, Irie T et al. Efficacy of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in Niemann-Pick disease type C model mice and its pharmacokinetic analysis in a patient with the disease, *Biol Pharm Bull.*, in press

2.学会発表

石塚洋一、田中雄太、入江徹美 他
Niemann-Pick 病 C 型治療薬 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin の病態モデルにおける安全性評価
第 9 回 トランスポーター研究会年会 (名古屋, 6/14-15, 2014)

近藤悠希、石塚洋一、入江徹美 他
Niemann-Pick 病 C 型治療薬 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin の有効性に関する Translational Research
第 9 回 トランスポーター研究会年会 (名古屋, 6/14-15, 2014)

深浦まど香、近藤悠希、入江徹美 他
Niemann-Pick 病モデルマウスを用いた HPBCD 脳室内投与の有効性・安全性評価、
第 56 回日本先天代謝異常学会総会 (仙台, 11/13-15, 2014)

石塚洋一
有効性・安全性に優れた新規 Niemann-Pick 病 C 型治療薬の開発を目指した TR-rTR
第 8 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (熊本, 11/15-16, 2014)

白石広葵、石塚洋一、入江徹美 他
Niemann-Pick 病 C 型患児と病態モデルマウスにおける 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin の体内動態解析
第 31 回 日本薬学会九州支部大会 (福岡, 12/6-7, 2014)

徳丸博子、近藤悠希、入江徹美 他
Niemann-Pick 病 C 型に対する各種 Cyclodextrin 誘導体の有効性・安全性 In Vitro 評価
第 31 回 日本薬学会九州支部大会 (福岡, 12/6-7, 2014)

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

該当事項なし

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

研究分担者 篠原康郎 北海道大学大学院先端生命 特任教授
古川潤一 北海道大学大学院先端生命 特任助教

研究要旨

ニーマン・ピック病 C 型 (NPC) は、主にコレステロールの代謝酵素 (NPC1) の変異に基づく機能欠損により起こる。NPC の罹患に伴う糖鎖の発現変動を解析するためのモデルとして、CHO 細胞および *Npc1* 遺伝子欠損 CHO 細胞 (CHO_NP) を用い、主要な複合糖質糖鎖の網羅的な発現解析を行い、総計 190 種類の N-、O-結合型糖鎖、遊離オリゴ糖、スフィンゴ糖脂質糖鎖、グリコサミノグリカン定量した。両者間で発現が異なる多くの糖鎖を見出した。また NPC の治療薬候補の 1 つである β -CD を CHO_NP に添加したときの糖鎖発現に与える影響を精査し、疾患や治療効果の判定に利用できる可能性のある複数の糖鎖を同定した。

A. 研究目的

ニーマン・ピック病 C 型 (NPC) の原因遺伝子である *Npc1* を欠損したときに認められる糖鎖発現変動の全容をモデル細胞で解明するとともに、治療薬候補を添加したときの糖鎖発現変動に与える影響を精査する。

B. 研究方法

熊本大学・入江研究室から供与された Chinese hamster ovary (CHO) 細胞ならびに *Npc1* 遺伝子欠損 CHO 細胞 (CHO_NP)、またそれぞれの細胞に β -CD を添加した細胞群について、分担者らが確立した方法論 (*PNAS*, 110, 2105-2110, 2013) により、N-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖、スフィンゴ糖脂質 (GSL) 糖鎖、グリコサミノグリカン (GAG) のへパラン硫酸・コンドロイチン硫酸・ヒアルロン酸の構成 2 糖、および遊離オリゴ糖 (FOS) の網羅的な定量解析を行った。検出された糖鎖の絶対定量値 (タン

パク質 100 μ g 当たりの pmol) を用いて細胞間の相関、比較分析を行った (倫理面への配慮) 該当なし

C. 研究結果

本解析により、N-結合型糖鎖 86 種、FOS 42 種、O-結合型糖鎖 12 種、GSL 糖鎖 34 種、GAG2 糖 16 種、総計 190 種類の糖鎖を定量的に解析することができた。以下、糖鎖の種類ごとに結果を示す。

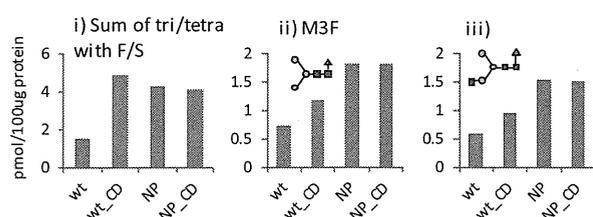
N-結合型糖鎖

細胞間の相関係数はいずれも 0.939 以上と高く、細胞間での変動は比較的少なかった。しかし、構造を詳細にみると以下のことが明らかになった。

- i. フコースまたはシアル酸修飾を受けた 3 本/4 本分岐糖鎖は CHO_NP 細胞で CHO 細胞の 2 倍以上の発現を示した。

- ii. フコース修飾を受けたパウチマンノース (PM)型糖鎖である M3F, M4F, M5F は CHO_NP 細胞で 2 倍程度の高値を示した。
- iii. ハイブリッド型糖鎖の多くが CHO_NP 細胞で 1.5~2 倍程度の高値を示した。

このうち、(i)は β -CD のみを添加した場合にも認められた。(ii)と(iii)は CHO_NP 細胞に特異的な傾向が認められた。CHO_NP 細胞に β -CD を添加したとき、(iii)の糖鎖の幾つかは CHO 細胞レベルに発現が低下した。

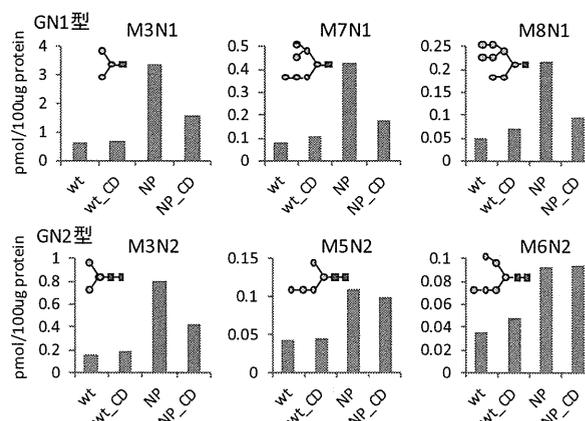


FOS

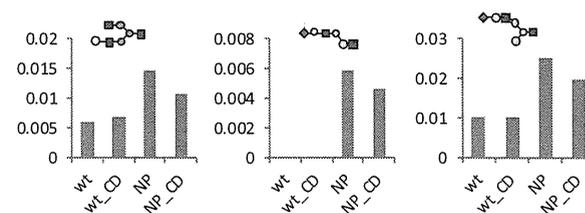
今回解析した糖鎖の中で、FOS が最も大きく細胞間で変動した。FOS の生成経路は、(i)小胞体でフォールディングに失敗した糖タンパク質が細胞質に輸送され PNGase の働きで N-結合型糖鎖が切断されて生成する経路、(ii)小胞体の細胞質側に局在するドリコールリン酸上の N-結合型糖鎖前駆体からピロフォスファターゼによって生成する経路、(iii)小胞体の中でおそらく OST の作用で生成する経路の 3 つが知られている。いずれも高マンノース (HM) 型 (Man が 5-8 個と GlcNAc が 2 個) あるいは PM 型 (Man が 1-4 個と GlcNAc が 2 個) の構造をとり、細胞質で ENGase の働きにより還元末端のキトビオース間が切断されるため、還元末端に GlcNAc が 1 つのもの (GN1 型) と 2 つのもの (GN2 型) が存在する。

CHO_NP 細胞ではこれらの FOS の総量が CHO 細胞と比べて 1.7 倍に増加した。この増加は構造特異的で、GN1 型では M₂₋₄N₁, M₆₋₉N₁ が増大し、特に M₃N₁, M₇N₁ と M₈N₁ はそれぞれ 5.4, 5.5, 4.3 倍と大きく増大した。GN2 型では M₂₋₉N₂ の全てが増加したが、M₃N₂ が 5.1 倍、次

いで M₅₋₇N₂ が 2.5 倍程度の増加を示した。興味深いことにこれらの変動の幾つかは、 β -CD の添加で大幅に低下した。CHO 細胞と CHO_NP 細胞間の相関係数は 0.814 であるのに対し、CHO_NP に β -CD を添加したとき相関係数は 0.985 となった。これらのことから、これらの糖鎖が薬剤の治療効果を判定するマーカーとなる可能性が期待される。



また、今回我々は生成経路が全く明らかにされていない複合型 (Cp) あるいはハイブリッド型 (Hy) の FOS を解析対象とし、23 種類の Cp/Hy 型の FOS を検出した。これらの FOS は HM・PM 型の FOS の総量の 1-2% 程度しか存在しない極めて微量の糖鎖であった。Cp/Hy 型の FOS の総量は CHO_NP で CHO 細胞の約 30% 増大したが、発現量に大きな変化が認められないものと CHO_NP で 2 倍以上発現が増大する 2 つのグループに大きく分けられた。前者の多くがフコース修飾を受けていたのに対して、後者は全てフコース修飾を受けていなかった。HM/PM 型 FOS と同様に、 β -CD の添加に伴い Cp/Hy 型 FOS の発現変動は CHO 細胞に近づく傾向が認められた。



O-結合型糖鎖

細胞間の相関係数はいずれも 0.978 以上と高く、細胞間での変動は比較的少なかった。最も主要な糖鎖である Core1 型の糖鎖の発現は細胞間でほとんど差が認められないのに対して、Core2 または伸長型 Core1 型の糖鎖は CHO 細胞にはほとんど検出されなかったのに対して CHO_NP 細胞では発現が認められ、特に Hex₁HexAN_{c2} と Hex₂HexAN_{c2} は CHO_NP 細胞で 20 倍以上の発現増大が認められた。ただし、これらの糖鎖の増加は β-CD のみを添加した場合にも認められたことから、NP に特異的な変動ではなかった。

GSL

GSL は細胞間の相関係数が最も高かった ($r > 0.986$)。これは CHO 細胞 CHO_NP 細胞で最も主要な GSL であるガングリオ(Gg)系列の糖鎖の発現が細胞間で非常に似ているためであるが、マイナーな構成成分であるグロボ(Gb)系列に属する糖鎖は、CHO 細胞と CHO_NP 細胞間で比較的大きな差が認められた。特に SSEA-3 は CHO_NP 細胞で CHO 細胞の約 3 倍の発現が認められた。CHO_NP 細胞に β-CD を添加したとき、SSEA-3 の発現量はやや低下した。

GAG

コンドロイチン硫酸とヘパラン硫酸の比率は CHO 細胞で 52:48 であったのに対して CHO_NP 細胞では 64:36 であり、CS と HS の構成比に変動が認められた。これは CS の総量は両細胞間で同等であるのに対して、HS 総量が CHO_NP 細胞で約 60%に低下したことによる。興味深いことに、CHO_NP 細胞に β-CD を添加すると、この組成は 51:49 と CHO 細胞と同等になった。

CS の約 90%を占める CS-4S は細胞間で発現変動はほとんど認められなかったが、CHO_NP 細胞では CHO 細胞に比べて CS-2S の減少、CS-4S6S の増加などの変動を認めた。HS は前述の通り総量で約 60%に低下したが、中でも CHO 細胞で最も量の多い HS-0S や HS-2S6S の低下

が顕著であった。

D. 考察

NPC の原因遺伝子である *Npc1* を欠損したときに認められる包括的な糖鎖発現変動解析を行った。N-, O-結合型糖鎖、GSL 糖鎖、GAG, FOS の全てで CHO 細胞と CHO_NP 細胞を区別し得る糖鎖を見いだした。また β-CD のみを添加した場合にも多分岐型 N-結合型糖鎖や Core2 または伸長型 Core1 型の O-結合型糖鎖の発現が増大するという結果が得られたが、これはこれで化合物により糖鎖構造を制御できる可能性を示唆していて興味深い。

今回変動が認められた糖鎖の発現メカニズムは不明であるが、これまで研究例の少ない細胞の FOS が最も大きく変動したのは興味深い。生合成過程が明らかにされている HM/PM 型の FOS だけではなく、生成経路が全く分かっていない Cp/Hy 型の FOS も *NPC1* 変異に伴い発現が変動した。FOS の発現量や構造が小胞体ストレス等に応じて変動する可能性が示唆されていることから、今回 CHO_NP で認められた FOS の変化は疾患に伴う細胞内のストレスを反映している可能性が考えられる。

E. 結論

NPC の細胞モデルで疾患特異的な糖鎖や治療効果の判定に利用できる可能性のある複数の糖鎖を同定することができた。今後、得られた知見について疾患 iPS を用いた研究で検証していく。

G. 研究発表

24. 論文発表

特記なし

2. 学会発表

特記なし

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

特記なし

2.実用新案登録

特記なし

3.その他

特記なし

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 房木ノエミ 慶應義塾大学 医学部 眼科学教室 特任准教授

研究要旨

研究分担者は、非組込型 RNA ウイルスベクターであるセンダイウイルス (SeV) ベクターに初期化 4 因子 KLF4, OCT4, SOX2 および c-MYC (KOSM) を搭載し、これらを用いて、ヒト線維芽細胞や血球細胞から効率よく外来遺伝子フリー iPS 細胞を樹立する方法を開発してきた。また温度感受性新型ベクターにより、より高効率にウイルス由来遺伝子が除去出来るように誘導系の改善を行ってきた。本ベクターは、疾患 iPS 細胞樹立にもよりよいツールとして貢献している。今回、3 因子を同時搭載した温度感受性 SeV ベクターを用いて外来因子フリー疾患 iPS 細胞樹立効率をアップした。これを用いて種々の疾患 iPS 細胞を樹立した。また、今まで報告の少ない眼科領域の難治性疾患 iPS 細胞樹立を行った。これらの研究技術は国内疾患研究を加速するものである。

A.研究目的

難治性疾患の生体試料は、希少性が高く有限であり、要求に応じて幅広く供給することは困難な部分が多い。そこで、この問題点を克服するために、難治性疾患由来の人工多能性幹細胞(iPS細胞)の委託作製と作製した iPS 細胞のバンク化と薬剤開発に向けての基盤研究を行っている。本研究の特徴は、国内で開発された最新のセンダイウイルス(SeV)ベクターを用いることで、遺伝的背景が均一で外来因子フリーの iPS 細胞が簡便に、かつ、最も効率よく樹立され、従来法のもつ外来因子の遺伝子挿入という欠点を無くした画期的な方法であるという点である。本研究の公共性を鑑み、各方面からの要請により昨年、SeV ベクターの特許権を所有するディナベック社は樹立 iPS 細胞に対する権利を放棄している。本研究分担者は、本年度は 3 因子を同時搭載した温度感受性 SeV ベクターを用いて効率をアップした。これを用いて種々の疾患 iPS 細胞を樹立し、ニーマンピック病

やチンパンジーの血液からの iPS 細胞樹立に貢献した。また、今まで報告の少ない眼科領域難治性疾患 iPS 細胞樹立を行った。

B.研究方法

血液、皮膚組織、あるいは頬粘膜組織から、4 因子(OCT4, KLF4, SOX2, c-MYC) 搭載 SeV ベクターを用いて iPS 細胞を樹立する。ベクターは P2 にて使用し、樹立を行う。樹立方法は房木らによる既報の通り (PNAS, 2011)。樹立された疾患特異的 iPS 細胞については、iPS 細胞としての品質管理、発症機構解析の見地より、以下の解析を行う。

① 外来遺伝子フリーの確認:iPS 細胞樹立に用いた、染色体非組込型 SeV ベクターの残存の有無を、RT-PCR もしくは抗 SeV 抗体による免疫染色にて確認を行う。② ヒト ES 細胞特異的発現マーカーの確認:免疫染色およびフローサイトメトリーにて解析する。③ 発現プロファイル解析:樹

立した iPS 細胞株の万能性、分化能の検討のため、PCR、マイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを解析する。④ ID の確認：樹立した iPS 細胞株と元となった血液細胞の DNA を fingerprinting 法で確認を行う。⑤ メチル化プロファイル解析：樹立した iPS 細胞株のエピジェネティックな状態の検討のため、Bisulfate PCR 等を用いてメチル化プロファイルを解析する。⑥ 疾患関連遺伝子の解析：原因遺伝子の変異が同定されている患者に対して、樹立された iPS 細胞が同じ変異を有していることを確認する。⑦ iPS 細胞の分化誘導と解析：樹立した iPS 細胞株を試験管内で分化誘導や免疫不全マウスへの移植実験を行い、生理学的、病理学的、細胞生物学的特性を解析する。

(倫理面への配慮)

慶應義塾大学にて行われる疾患 iPS 細胞作製に関しては、慶應義塾大学医学部の倫理委員会を通し、倫理的に問題のないことを確認した。患者から採取された体組織試料と患者の家族歴・臨床所見・検査所見に関する情報は連結可能匿名化し管理する。個人情報管理者は各患者に対して連結可能な匿名コードを当て、患者名と匿名コードの対照表を施錠可能な保管場所に保管する。実施責任者および分担研究者は、患者より採取した組織・iPS 細胞株・患者の臨床所見・検査所見を上記の匿名コードを用いて使用・保存する。

C.研究結果

本年度、3 因子同時搭載ベクターを用いることで、従来よりさらに効率よく外来因子フリー疾患 iPS 細胞を樹立できることを報告した⁽¹⁾⁽²⁾。このベクターを用いて、本年度は眼科領域の原因不明の疾患である、Fuchs 角膜内皮変性症の疾患 iPS 細胞の樹立を行った。Fuchs 角膜内皮変性症 (FCD: Fuchs corneal dystrophy) は常染色体優性遺伝形式をもち、滴状角膜 (guttata cornea)

という特徴的所見を伴い、原発性に角膜内皮が障害され、進行性に内皮細胞数の減少をきたす角膜内皮ジストロフィの一つである。多くの FCD は成人後 (多くは 50 代~70 代) で発症する late-onset FCD だが、10 歳未満からすでに滴状角膜が発症する early-onset FCD の家系もあり、early-onset FCD に関しては 8 型コラーゲン遺伝子異常が原因であることがわかっている。また、一部の late-onset FCD では、SLC4A11 遺伝子異常等が指摘されている。他の多くの late-onset FCD の原因遺伝子として最も有力なのは TCF4 である。TCF4 の SNPs (single-nucleotide polymorphism) が FCD と関連している。角膜内皮のストレスや障害が加わった時に、TCF4 の異常のため創傷治癒機転がきちんと機能しないと考えられている。きっかけとなる角膜内皮のストレスや障害に関しては、活性酸素説や異常タンパク蓄積による小胞体ストレス説が有力であるが、いまだに病態の詳細な解明はなされていない。進行した FCD は水疱性角膜症を生じ視力が著しく低下する (図 1)。

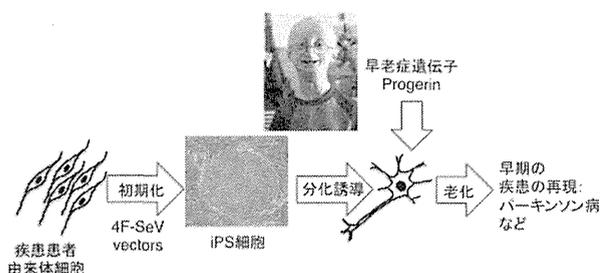
眼科疾患 フックス角膜内皮変性症



水疱性角膜症:角膜内皮細胞が減少しポンプ機能が低下することから、実質に水が溜まり角膜がむくむ。

現在のところ視力の回復のためには角膜移植以外に方法がなく、薬物療法等の保存的治療は開発されていない。従って FCD の病因解明、治療法開発のためには、患者自身の病的角膜内皮組織を用いた研究が最も望ましい。本年度は、6 症例の患者血液から iPS 細胞を作製した。Late-onset 発症の Fuchs 6 症例 (うち 1 例はオランダ人) の血液を抗 CD3 抗体と IL-2 で活性化し (Seki, et al., 2011)、新型 SeV ベクター (KOS + cMyc) にて疾患 iPS 細胞 (TiPS) を各々複数株樹立した。hES 細胞マーカー (SSEA3, Tra1-60, NANOG, SOX2)

の発現を FACS あるいは免疫染色で確認し、ID に間違いがないことを Fingerprinting で確認した。これらの遺伝子配列を既報の欧米人 Fuchs 変異と比較したところ、オランダ人検体のみ TCF4 に変異が認められたが、日本人 5 症例に異常は認められなかった。このことは、日本人特有の変異が存在することが示唆される。NGS によるエクソーム解析を検討中である。現在症状を再現するため、これら iPS 細胞から神経堤細胞誘導を介して角膜内皮細胞誘導を行っている。Late-onset 症例であることを考慮すると、昨年度報告した Progerin (早老症 Progeria 原因遺伝子) 導入の必要性が考えられ(Miller JD., et al., 2013)、発現効率を高めるため Progerin/SeV ベクターの作製を検討中である (図 2)。



海外との共同研究では、当ベクターを用いて、モザイク性ダウン症の疾患 iPS 細胞の樹立と解析を報告した⁽³⁾。また歯髄細胞由来 iPS 細胞作製に関する国内共同研究成果 (iPS 細胞樹立に適した培地) を報告した⁽⁴⁾。

D. 考察

3 因子同時搭載非組込型 RNA ベクターを用いて高効率に疾患 iPS 細胞を樹立することが可能になった。疾患の再現と今後のスクリーニングに極めて有用なツールであり、疾患研究を加速する。

E. 結論

非組込型 RNA ベクターである 3 因子同時搭載 SeV ベクターを用いて、高効率に各種疾患 iPS 細胞を樹立し、一部については疾患の再現に成功し報告している。また Fuchs 角膜内皮変性証

由来 iPS 細胞を樹立し、遺伝子解析と疾患の再現を試みている。今後はこれら細胞を用いて治療用薬剤スクリーニングを行いたいと考えている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. Fujie Y, *Fusaki N, et al. PLoS ONE, 2014, Dec 5;9(12):e113052. *equal contribution.

2. HPGCD Outperforms HPBCD as A Potential Treatment for Niemann-Pick Disease Type C During disease Modeling with iPS Cells. Soga M., et al. Stem Cells. 2014 Dec 17. doi: 10.1002/stem.1917.

3. Isogenic Induced Pluripotent Stem Cell Lines from an Adult with Mosaic Down Syndrome Model Accelerated neuronal Ageing and Neurodegeneration. Murray A., et al. Stem Cells. 2015 Feb 19. doi: 10.1002/stem.1968.

4. Derivation of iPSCs after Culture of Human Dental Pulp Cells under Defined Conditions. Takeda-K. T., et al. PLoS One. 2014 Dec 18;9(12):e115392. doi: 10.1371/journal.pone.0115392. eCollection 2014.

2. 学会発表

・ N. Fusaki and M. Ema. "GENERATION OF TRANSGENE-FREE HUMAN NAIVE-LIKE PLURIPOTENT STEM CELLS USING SENDAI VIRUS VECTORS." ISSCR, Vancouver, Canada, 2014/6/19

・ N. Fusaki and M. Ema "Generation of Transgene-free naive-like human iPS cells." Keystone Symposia, Stem Cells and

Reprogramming (Z4), CA, USA. 2014/4/9.

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得 無
- 2.実用新案登録 無
- 3.その他 無

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 松本 志郎 熊本大学医学部附属病院 講師

研究要旨

先天代謝異常症は希少難病に分類される。希少難病においては、その発症頻度、母集団が極めて少なく、同時に希少難病を専門とする医師、研究者が少ないことから十分な基礎研究、病態研究が遅延してきた。このような状況は、治療方法の開発が行われにくいという状況を長く続ける要因となってきた。このような状況を鑑み、昨年度から引き続き希少難病患者から採取した生体サンプルを用いて疾患特異的 iPS 細胞を作成し、ライブラリー化することで、希少難病研究の研究材料の供給源となるとともに、それを用いて疾患病態を解明し、薬剤のスクリーニングシステムの基盤を作成することを目的として実施した。分担研究者である熊本大学小児科では、特に小児の先天代謝異常症の専門であり、外来患者から説明と同意の上、定期的に生体サンプルを採取・提供をおこなった。本年度は、プロピオン酸血症2例(重症新生児型)、メチオニン代謝異常症1例、糖原病III型2例、シトリン欠損症1例がライブラリーに追加された。さらに、昨年度に続いて当研究室では先天代謝異常症の中でも比較的頻度が高く、致死性で治療薬が全く開発されていないプロピオン酸血症患者から得られた iPS 細胞を用いて疾患の病態解明および治療薬の開発を試みた。

A.研究目的

希少難病のなかでも特に小児の希少難病に関する病態研究および治療薬開発は長い間、進んでこなかった。その大きな要因の一つが、患者数が少ないことに起因する生体サンプルの不足である。本研究室は、先天異常・先天性代謝異常症の国内の中心的役割を担ってきた施設であり、国内有数の患者数を誇っている（先天代謝異常学会調査：非公開情報）。そのため、本分担研究者らは当院の外来患者を対象に、希少難病の生体サンプル（皮膚繊維芽細胞および末梢血単核球）を採取し、研究代表者（江良教授）と共同して iPS 細胞のライブラリー作成を行う。また、この疾患特異的 iPS 細胞を用いて、病態の解明と薬剤のスクリーニングシステムの基盤の構築を目指す。

B.研究方法

1. 生体サンプルの収集

場所は熊本大学医学部附属病院の外来もしくは病棟とした。主治医および分担研究者である松本が同席の上説明を行った。患者は、小児であるため同意書は両親からえた。採取は、末梢血単核球の場合は、日常診療に用いられる採血機材および手技を用いた。採取されたサンプルは単核球分離ののちに研究代表者である江良教室へ搬送した。皮膚生検は、まず皮膚採取予定部位に局所麻酔を行い、十分麻酔が効いたことを確認して、5mmx5mm の皮膚を剥離し、採取した。採取されたサンプルは小児科培養室にて培養を行い、研究代表者である江良教室へ搬送した。

2. プロピオン酸血症の病態解明

①患者皮膚を用いたプロピオン酸毒性試験

患者由来繊維芽細胞を前培養した。80%コンフルエントの状態ですべて5x10³cell/wellの割合で、96wel

collagen coated dish へ播種した。ブランクには培地のみ加えた。5%CO₂インキュベータにて24時間前培養した。種々の濃度(0.1μM, 1μM, 2.5μM, 5μM, 10μM, 100μM)のMMAを培地に加えた。24時間後の吸光度を測定する。

④患者皮膚繊維芽細胞を用いた薬剤スクリーニングのための評価系の確立

患者由来繊維芽細胞を前培養した。80%コンフルエントの状態で5x10³cell/wellの割合で、96well collagen coated dish へ播種した。ブランクには培地のみ加えた。5%CO₂インキュベータにて24時間前培養した。前培養開始24時間後に候補薬剤を種々の濃度で添加した。

(倫理面への配慮)

本研究は、熊本大学倫理委員会の承認を得ている。また、各患者家族もしくは本人より倫理委員会の許可を得た同意書を用いて同意を得たうえで情報の収集と生体サンプルの採取を行った。

本研究のために特別に用意した番号を用いた。具体的には、採取された生体サンプルおよび疾患特異的iPS細胞はデジタルIDとパスワードを必要とするオートロック式の研究室内部に保管・管理した。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と申請者らで管理し、連結可能な暗号化処理を行った。一般の立ち入りは禁止されており、iPS細胞から個人の特定の情報につながることはない。本研究では、iPS細胞の解析中必要に応じて患者のゲノム情報を取り扱っている。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守して研究を行なっている。得られた情報は、インターネットに接続しないコンピューターにて管理を行い、ID登録した個人しかコンピューターを起動できない処置を行なっている。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は公表されない。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。細胞バンクからの提供についてはゲノム指針に準じて

行っている。

C.研究結果

1. 生体サンプル採取結果

H26年度は、

- ・メプロピオン酸血症2例(重症新生児型)
 - ・メチオニン代謝異常症1例
 - ・糖原病III型2例、
 - ・シトリン欠損症1例
- を採取した。

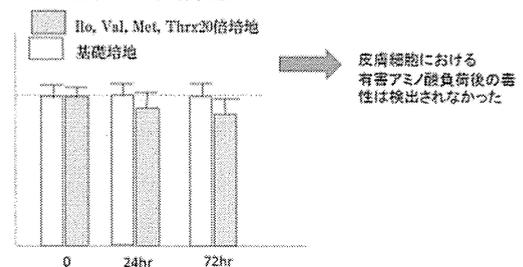
2. 病態解明研究結果

①患者皮膚を用いたアミノ酸毒性試験

患者皮膚繊維芽細胞にメプロピオニル CoA mutaseの基質アミノ酸であるイソロイシン、バリン、メチオニン、スレオニンを20倍濃度となるように添加し、72時間後まで細胞数を測定した。その結果、メチルマロン酸の昨年の結果と同様に、プロピオン酸血症についても皮膚繊維芽細胞に対するアミノ酸毒性は認めなかった。

A 方法：薬剤スクリーニングに適した条件の確立

- ・ 繊維芽細胞を前培養する。
- ・ 80%コンフルエントの状態(1x10⁴cell/well)の割合で、96well collagen coated dishへ播種する。
- ・ ブランクには培地のみ加える。
- ・ 5%CO₂インキュベータにて24時間前培養する。
- ・ 種々の濃度のMMAの前駆アミノ酸物質を加える。
- ・ 24時間、48時間後、72時間後の吸光度を測定する。

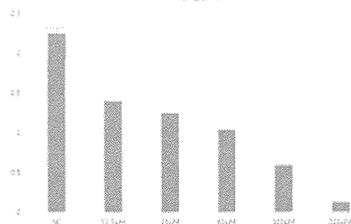


③患者皮膚を用いたプロピオン酸毒性試験

プロピオン酸は培養液に添加した濃度に比例して細胞障害を示した。

方法：薬物スクリーニングに適した条件の検証

- 患者由来幹線芽細胞を培養する。
- 5%のCO₂インキュベーターの状態で37°C(37°C)の割合で、96well cellplates spotted 反応を評価する。
- プランクには細胞のみが加えられる。
- 5%のCO₂インキュベーターにて24時間培養する。
- 種々の濃度のPAを添加に加える。
- 24時間後の吸光度を測定する。

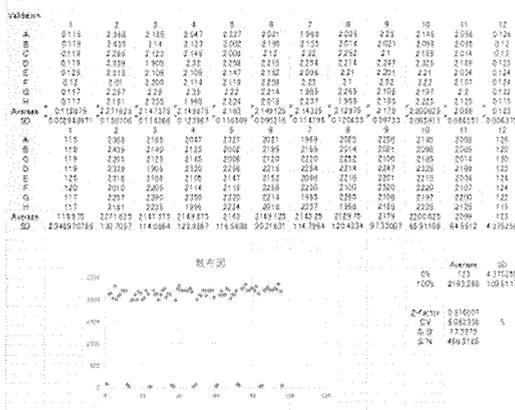


PAの細胞増殖に及ぼす毒性は、モル換算でMMAの1/20であった。以降の実験は、分散の少ない200μM (SD0.03)とした。

④患者皮膚繊維芽細胞を用いた薬剤スクリーニングのための評価系の確立

培養液には200μMの濃度のプロピオン酸を添加し、その障害性が抑制される系の確立を目指した。

プロピオン酸を用いた毒性試験のバリデーション結果 1



その結果、Z-factor 0.81, CV 5.01 と良好な評価系を確立できた。

D. 考察

プロピオン酸血症は、イソロイシン、バリン、メチオニン、スレオニンの代謝経路にあるプロピオニル CoA カルボキシラーゼの機能異常により、主に肝臓と筋肉でプロピオン酸が産生され、これにより全身の臓器に障害をきたす疾患である。細胞内で産生されたプロピオン酸およびプロピオニル CoA が細胞機能障害（主にミトコンドリア内の酵素障害）を引き起こすため、多臓器に障害を与えると考えられているが明確に証明したものは無い。プロピオン酸血症の結血中濃度を下げる試みがされており、肝臓移

植、腎臓移植、透析などの治療が試みられているが、血中濃度が正確に組織障害を反映しているかどうかは定かではない。一般的には基質アミノ酸負荷が増悪因子として考えられており、基質アミノ酸を20倍濃度とした場合の毒性を調べた。その結果、皮膚繊維芽細胞に対しては、基質アミノ酸の負荷による毒性は認めなかった。患者にとって、どの程度のアミノ酸負荷が必要であるのかは定まっておらず、アミノ酸毒性試験は重要であり、現在、iPS細胞を用いて肝臓、神経に誘導し、重要標的臓器における基質アミノ酸毒性試験を行っている。

また、薬剤スクリーニング系の確立については、皮膚繊維芽細胞を用いて、200μMのプロピオン酸を添加した培地を用いた系が発作期の患者血中濃度に相当するため、これを用いることとした。評価系として用いるための精度・感度評価は良好な結果がえられた。

E. 結論

プロピオン酸血症患者における病態解析を行った。皮膚繊維芽細胞に対する基質アミノ酸毒性の有無を調べたが、皮膚繊維芽細胞に対して基質アミノ酸は毒性を示さなかった。次に、プロピオン酸自体が細胞毒性を示すか否かを調べた。その結果、皮膚繊維芽細胞に対して、濃度依存性に細胞障害を示した。本研究結果は、プロピオン酸の毒性を減弱する薬剤のスクリーニングに有効である可能性を示唆した。

また、新たにプロピオン酸血症2例、糖原病III型2例、メチオニン代謝異常症1例、シトリン欠損症1例の生体サンプルがライブラリーに追加された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Early intervention for late-onset ornithine transcarbamylase deficiency. Fujisawa D, Mitsubuchi H, Matsumoto S, Iwai M, Nakamura K, Hoshide R, Harada N, Yoshino M, Endo F. *Pediatr Int.* 2015 Feb;57(1):e1-3.

2. 新しいアミノ酸代謝異常症 松本志郎、遠藤文夫、ILSI No 118

3. Organ and cell-based replacement therapy for the treatment of urea cycle disorders. Shirou Matsumoto and Fumio Endo. eBOOK, March, 2015 Copyright © 2015 Future Medicine Ltd. Pages 180-194.

4. Living donor liver transplantation from a heterozygous parent for classical maple syrup urine disease. Kadohisa M, Matsumoto S, Sawada H, Honda M, Murokawa T, Hayashida S, Ohya Y, Lee KJ, Yamamoto H, Mitsubuchi H, Endo F, Inomata Y. *Pediatr Transplant.* 2015 May;19(3):E66-9.

5. Diagnosis and treatment of hereditary tyrosinemia in Japan. Nakamura K, Matsumoto S, Mitsubuchi H, Endo F. *Pediatr Int.* 2015 Feb;57(1):37-40.

6. ラット母乳中アミノ酸と乳腺組織のアミノ酸代謝 松本志郎、中村賢治、松本秀希、新保和高、中村公俊、遠藤文夫、アミノ酸研究 Vol.8. No.2.

7. 遺伝子診断による早期診断「先天性アミノ酸代謝異常症」松本志郎、遠藤文夫 周産期医学 Vol.44, No.2, 2014, Feb. pp225-228.

8. Biochemical and clinical features of hereditary hyperprolinemia. Mitsubuchi H, Nakamura K, Matsumoto S, Endo F. *Pediatr Int.* 2014 Aug;56(4):492-6.

2. 学会発表

1) Shirou Matsumoto, Hideki Matsumoto, Kazutaka Shinbo, Kimitoshi Nakamura,

Fumio Endo.

Amino Acid profile in rodent's mother milk and amino acid metabolism in mammary gland. The 8th annual meeting of JSAAS 2014 in Tokyo. Nov. 22. 2014.

2) 松本志郎、登録制度を利用した新規薬物研究の取り組み 第3回先天代謝異常症患者会フォーラム 2014年11月9日(日) TKP 品川カンファレンスセンター

3) 松本志郎、中村公俊、三渕浩、奥宮敏可、遠藤文夫 熊本県におけるポンペ病新生児スクリーニングの報告 2014年10月3日(土)、東京慈恵医科大学大学1号館3階講堂

4) Shirou Matsumoto, Kimitoshi Nakamura, Takumi Era, Hiroshi Mitsubuchi, Fumio Endo. In vitro modeling of Methylmalonic Aciduria (MMA) using patient specific induced pluripotent stem cells. The 56th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (同時開催) The 12th Annual Symposium of the Asian Society for Inherited Metabolic Diseases. Nov. 13-15. Sendai, Japan.

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

iPS 細胞を使用したライソゾーム病治療薬の開発

研究分担者 有馬英俊 熊本大学大学院生命科学研究部 製剤設計学分野 教授

研究要旨

GM1-ガングリオシドーシスは、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子の変異に基づく神経遺伝病であり、代表的なライソゾーム病の一つである。本症は致死的で、難病に指定されており、有効な治療法はない。本研究では、新規 GM1-ガングリオシドーシス治療薬として、シクロデキストリン (CyD) 誘導体の可能性を検討した。その結果、GM1-ガングリオシドーシス患者由来 iPS 細胞から繊維芽細胞へ分化させた A138 細胞に対して、CyDs 誘導体は、エンドライソゾームに蓄積した GM1-ガングリオシド量を低下させることが示唆された。これらの結果より、CyDs が GM1-ガングリオシドーシスの新規治療薬として有用である可能性が示された。

A. 研究目的

ガングリオシドは、疎水性のセラミド、親水性のオリゴ糖鎖にシアル酸残基が結合した糖脂質で、神経系の修復、細胞の分化増殖、レセプター機能、リン酸化酵素活性化などの生理活性を有する。GM1-ガングリオシドーシスの原因は、ライソゾーム酵素の一つである、 β -ガラクトシダーゼが欠損することにより、その基質である GM1-ガングリオシドやアシアロ GM1-ガングリオシドなどの糖脂質が脳や内臓（肝臓、脾臓）などに蓄積し、ケラタン硫酸などのムコ多糖が骨に蓄積する疾患である（図 1）。 β -ガラクトシダーゼはスフィンゴ脂質活性化タンパク質の一つであるサポシン A の存在下、GM1 糖鎖の β -ガラクトースを切断したり、ガラクトースを含むオリゴ糖やケラタン硫酸を分解したりする。遺伝形式は常染色体劣性遺伝であり、分類としては、乳児期早期から発症し痙性対麻痺をはじめとする広汎な中枢神経障害、眼底のチェリーレッドスポット、肝脾腫、骨異常を伴う乳児型（1 型）、幼児期から発症し、中枢神経障害は進行する若年型（2 型）、さらに学童期から構音障害などの症状が現れ、錐体外路症状が中心となる成人型（3 型）の 3 病型がある。

対症療法として、ジストニアに対してトリヘキ

シフェニジル塩酸塩が有効とされる。骨髄移植も試みられているが著名な効果はこれまで確認されていない。現在、ケミカルシャペロン療法の開発が進められており、N-オクチル-4-エピ-バリエナミン (NOEV) は GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスの中枢神経系を含む全ての臓器で β -ガラクトシダーゼ活性の回復が認められ、GM1-ガングリオシドの蓄積の減少が確認されている。しかしながら、まだ実用段階ではなく、依然として安全性が高く、効果に優れる新規治療薬の開発が期待されている。

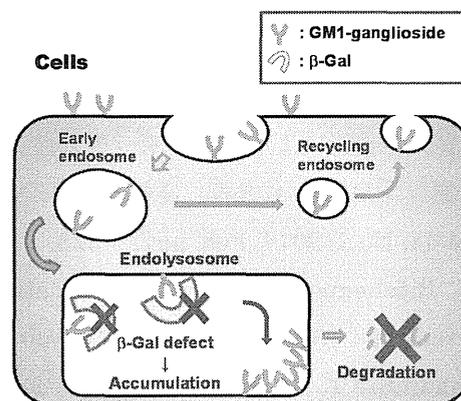


図 1. GM1-ガングリオシドーシスの発症機序

環状マルトオリゴ糖であるシクロデキストリン (CyDs) はその空洞径に応じて、生体膜からリ

ン脂質やコレステロールなどの脂質類を熱力学的平衡に基づいて可溶化し、生体膜の構造や機能に影響を与えることが知られている。また、生体膜にはリピッドラフトと呼ばれるコレステロールや ganglioside などの sphingolipid が豊富な領域が存在し、メチル- β -CyD (M- β -CyD) や ヒドロキシプロピル- β -CyD (HP- β -CyD) は細胞形質膜上のリピッドラフトからコレステロールを漏出させ、その構造を破壊することが報告されている。近年、コレステロールが脳や内臓に蓄積する ニーマンピック症候群タイプ C 病に対して、医師主導の人的臨床応用として、HP- β -CyD が投与され、肝脾腫を改善することが報告された。しかしながら、他のライソゾーム病に対する CyD の有用性評価はほとんど行われていない。そこで本申請課題では、新規 GM1- gangliosidosis 治療薬としての CyD 誘導体の可能性を検討するために、GM1- gangliosidosis 患者から樹立した線維芽細胞 (EA1 細胞) を用いて、細胞内 GM1- ganglioside 量に及ぼす各種 CyD 誘導体の影響を検討した。さらに、GM1- gangliosidosis モデルマウスを作成し、各種 CyD 誘導体の影響を検討した。

B. 研究方法

1. 細胞

GM1- gangliosidosis 患者由来線維芽細胞である EA1 細胞 (研究代表者 江良氏より提供) を使用した。

2. 細胞障害性

EA1 細胞 (1×10^6 cells/well) を 10 mM、1 時間もしくは 1 mM、24 時間で処理した後、WST-8 試薬を用いて細胞生存率を測定した。

3. リピッドラフトと各種 CyDs との相互作用

EA1 細胞 (1×10^6 cells/well) を 10 mM、1 時間もしくは 1 mM、24 時間で処理した後、培養上清中のコレステロールおよびリン脂質をそれぞれ

コレステロール E テストワコーおよびリン脂質 C テストワコーを用いて定量した。

4. GM1- ganglioside 量に及ぼす CyDs の影響

EA1 細胞 (1×10^6 cells/well) を 10 mM、1 時間もしくは 1 mM、24 時間で処理した後、FITC ラベル化コレラトキシン B および Alexa-ラベル化コレラトキシン B を添加し、それぞれフローサイトメーターおよび共焦点レーザー顕微鏡にて細胞内 GM1 ganglioside 量を測定した。

5. GM1- gangliosidosis モデルマウス

松田ら (医薬基盤研究所) によって樹立された β -ガラクトシダーゼノックアウトマウスを使用した。

GM1- gangliosidosis モデルマウスおよび WT マウスの脳切片を作成した後、FITC ラベル化コレラトキシン B にて免疫染色を行い、脳内の GM1 ganglioside 量を観察した。

(倫理面への配慮)

GM1- gangliosidosis モデルマウスの使用に際し、熊本大学遺伝子組み換え生物等第二種使用等安全管理規則に則り、承認を得ている (承認番号 25-016)。

6. 脳室内投与

GM1- gangliosidosis モデルマウスは麻酔後、脳定位固定装置に固定し、頭蓋骨を露出させ、頭骸骨表面のブレグマを起点とし、尾側へ 1.0 mm、左右側へ 0.4 mm、腹側へ 2.8 mm の部位に CyDs (0.6 mg/brain) を投与した。

C. 研究結果および考察

本研究では、GM1- gangliosidosis 治療薬としての各種 CyDs 誘導体の可能性を検討した。EA1 細胞に対して、6 種の CyDs は高濃度短時間処理 (10 mM, 1 時間) あるいは低濃度長時間処理 (1 mM, 24 時間) 後も、ほとんど細胞

障害性を示さなかった。共焦点レーザー顕微鏡による検討から、各種 CyDs (1 mM) で 24 時間処理後、EA1 細胞内の GM1-ガングリオシド量は有意に低下することが明らかとなった。また、その効果は、ジメチル- α -CyD (DM- α -CyD) や M- β -CyD 添加系において高い傾向が示された。また、フローサイトメトリーによる検討からも、同様に GM1-ガングリオシド量の低下が認められたことから、CyDs が細胞内エンドライソゾームの過剰な GM1-ガングリオシドの蓄積を減少させる可能性が示唆された。さらに、各種 CyDs の高濃度短時間処理 (10 mM, 1 時間) ではコレステロールやリン脂質が培地中に漏出したが、低濃度長時間処理 (1 mM, 24 時間) では、漏出作用は認められなかった。これらの結果より、CyDs の低濃度長時間処理 (1 mM, 24 時間) により惹起された細胞内 GM1-ガングリオシド量の低下に、リピッドラフトからの脂質成分の漏出効果の影響は少ないものと推察される。また、GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスは、WT マウスと比較して、脳切片における過剰な GM1 ガングリオシドの蓄積が確認された。現在、GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスに対して CyDs の脳室内投与を行い、行動実験をもとに治療効果を検討中である。今後、CyDs が細胞内 GM1-ガングリオシド量を低下させる詳細な機構を明らかにするとともに、GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスを用いた治療効果に関する検討を行う必要がある。

D. 結論

本研究では、新規 GM1-ガングリオシドーシス治療薬として、CyD 誘導体の可能性を検討した。その結果、GM1-ガングリオシドーシス患者由来線維芽細胞である EA1 細胞に対して、CyDs 誘導体は、エンドライソゾームに蓄積した GM1-ガングリオシド量を低下させることが示唆された。これらの結果より、CyDs が GM1-ガングリオシドーシスの新規治療薬として有用である可能性が示された。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yuki Maeda, Keiichi Motoyama, Taishi Higashi, Yuka Horikoshi, Toru Takeo, Naomi Nakagata, Yuki Kurauchi, Hiroshi Katsuki, Yoichi Ishitsuka, Yuki Kondo, Tetsumi Irie, Takumi Era, Hirokazu Furuya, Hidetoshi Arima, Effects of Cyclodextrins on GM1-gangliosides in Fibroblasts from GM1-gangliosidosis Patients, J. Pharm. Pharmacol., in press (2015).

2. 学会発表

①Yuki Maeda, Keiichi Motoyama, Taishi Higashi, Yuka Horikoshi, Toru Takeo, Naomi Nakagata, Yuki Kurauchi, Hiroshi Katsuki, Yoichi Ishitsuka, Yuki Kondo, Tetsumi Irie, Takumi Era, Hidetoshi Arima, Effects of Cyclodextrin Derivatives on GM1 Ganglioside in Fibroblasts Differentiated from iPS Cells Derived from GM1 Gangliosidosis Patients, 17th International Cyclodextrin Symposium, (Saarland University in Saarbrücken, May 29-31, 2014)

②前田有紀、本山敬一、東 大志、堀越裕佳、竹尾 透、中瀨直己、石塚洋一、入江徹美、江良択実、有馬英俊、「GM1 ガングリオシドーシス患者由来線維芽細胞の GM1 ガングリオシド量に及ぼすシクロデキストリン誘導体の影響」第 56 回日本先天代謝異常学会総会・第 12 回アジア先天代謝異常症シンポジウム (仙台, 11/13-15, 2015)

③前田有紀、本山敬一、東 大志、堀越裕佳、竹尾 透、中瀨直己、石塚洋一、入江徹美、江良択実、有馬英俊、「GM1 ガングリオシドーシスモデル細胞に及ぼすシクロデキストリン誘導体の影響」第 36 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (徳島, 11/20-21, 2015)

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

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

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

質量分析装置を応用した、ヒトグロビタンパク質解析技術の開発を試みた。ヒト由来の血液細胞（臍帯血細胞、末梢血細胞、赤白血病細胞株）よりタンパク質を抽出し、それらを用いてグロビ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、ヘモグロビンを構成するグロビタンパク質をコードする遺伝子の異常によって引き起こされる貧血疾患である。現在、その診断は主にヘモグロビンの定量によって行われている。

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し、作製した細胞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している。サラセミア患者の血液検体を測定することを前提として、iPS 細胞から赤血球系細胞を分化誘導する際に、細胞内に含まれるグロビタンパク質の種類、及び含有量を測定する。そこで、グロビタンパク質の種類と含有量を同定する手法の開発を目指す。

B.研究方法

質量分析装置を応用して、赤血球系細胞の酸素運搬を司るグロビタンパク質を解析する技術を開発する。具体的には、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、ヒト臍帯血細胞、ヒト末梢血細胞、K562 赤白血病細胞株を

用いて、質量分析装置によるグロビタンピングの技術を開発する。

（倫理面への配慮）

インドネシア・アイックマン研究所よりサラセミア患者検体の提供を受けるにあたり、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。

C.研究結果

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て、質量分析装置による有望なペプチドのスクリーニングを行ったところ、下表に示すような感度の高いペプチドが同定された。

これらのペプチドを用いてグロビタンピングの最適化を行い、インドネシア・アイックマン研究所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。

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]- FLASVSTVLTSK[M T3]
HBB	Hemoglobin, beta	TB252412	[MT3]- GTFATLSELHC[CA M]DK[MT3]
HBD	hemoglobin, delta	TB532763	[MT3]- LLGNVLVC[CAM] VLAR
HBD	hemoglobin, delta	TB533133	[MT3]- GTFSQLSELHC[CA M]DK[MT3]
HBE1	hemoglobin, epsilon 1	TB412708	[MT3]- AAVTSLSK[MT3]
HBG1	hemoglobin, gamma A	TB110344	[MT3]- VLTSLGDK[MT3]]
HBG1; HBG2	hemoglobin, gamma A; hemoglobin gamma G	TB110550	[MT3]- EFTPEVQASWQK[MT3]
HBM	hemoglobin, mu	TB532757	[MT3]- LFTVYPSTK[MT3]
HBQ1	hemoglobin, theta 1	TB125559	[MT3]- TYFSHLDLSPGSSQ VR
HBZ	hemoglobin, zeta	TB467098	[MT3]- FLSVVSSVLTEK[M T3]
HBZ	hemoglobin, zeta	TB467032	[MT3]- SIDDIGGALS[MT 3]

D. 考察

サラセミアの診断に際してグロビタンパク質の定量は困難であることから、これまでは遺伝子発現解析が主として行われてきた。そこ

で、グロビタンパク質を定量的に評価するため、各種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（臍帯血細胞、末梢血細胞、K562 赤白血病細胞株）、及び質量分析装置を利用した方法により、有効なペプチドをスクリーニングした。今後は本法を応用して、ヒト iPS 細胞から分化誘導した赤血球系細胞の品質を解析する基盤技術を開発する。

E. 結論

平成 26 年度は、質量分析装置とヒト血液細胞を使用して、ヒトグロビタンパク質の解析に有効なペプチドを同定した。

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）

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, Muenu 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 lgfl in mouse fetal liver.

第76回日本血液学会、大阪、2014年10月

3) 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

2) 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

3) 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

特になし。

2.実用新案登録

特になし。

3.その他

特になし。