201406033A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

精神・神経疾患特異的iPS細胞を用いた創薬研究

平成26年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　　岡野　栄之

平成 27（2015）年　3 月

目　　次

Ⅰ．総括研究報告
精神・神経疾患特異的iPS細胞を用いた創薬研究---------- 1
岡野　栄之

II. 分担研究報告
１．汎用性ヒト型双腕ロボットと既存薬ライブラリーを用いたiPS創薬研究--- 15
佐谷　秀行

２．次世代シーケンサーを用いた培養時遺伝子変異蓄積の網羅的解析系の開発-18
小崎　健次郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ---------- 21

Ⅳ．研究成果の刊行物・別刷 ---------- 27

Ⅰ．総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
総括研究報告書

精神・神経疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬研究

研究代表者	岡野　栄之	慶應義塾大学医学部　生理学教室	教授
研究分担者	佐谷　秀行	慶應義塾大学医学部　先端医科学研究所	教授
	小崎　健次郎	慶應義塾大学医学部　臨床遺伝学センター	教授

研究要旨

本研究では、神経疾患特異的iPS細胞を用いた効率的な創薬システムの基盤構築を通じて、創薬シーズを探索し、5年以内に実際に効果のある薬剤を臨床現場へ送り出すことを目標とする。特徴としては、①細胞表現型を高効率に解析する薬剤評価システムを構築し、多症例検体による創薬、②共同研究している製薬会社の新規薬剤ライブラリー（～10万種類）に加えて、毒性評価、安全性評価と薬物動態のデータが既に存在する既存薬ライブラリー(1500種)を用いることでスクリーニング対象薬剤の選択を戦略的に行うことである。

平成26年度は、疾患iPS細胞病態解析・創薬スクリーニングに特化した基盤技術構築とシステム稼働を中心に事業を推進した。具体的な成果として次の三点が挙げられる。1)CNV異常を認める統合失調症患者2名の選定及びiPS細胞を樹立した。双極性障害患者26名より、精神症状に関連する領域にCNV異常を認める3名を選定した。2)多検体疾患iPS解析に向けて、96ウェルプレートを用いて複数のiPS細胞を一括に神経分化させる迅速かつ高効率な神経分化誘導基盤を構築した。6つの神経変性疾患について、主たる病変が確認される脳領域の神経細胞に誘導し、定量的な表現型解析システムを開発した。3)非臨床POCとして、筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者iPS細胞由来神経細胞を用いた既存薬スクリーニングを開始した。定量的な表現型解析を評価項目としてIN Cell Analyzerを用いて一括解析を行い、3種類の治療薬候補を見出した。また多検体を用いた解析をするために、「まほろ」によるシステム構築を行った。培養細胞に対する既存薬ライブラリー(1500種)の作用を「まほろ」を用いて解析し、細胞散布、化合物調整、細胞増殖の定量について高い再現性を有し、清潔操作に問題を認めなかった。

疾患特異的iPS細胞の樹立・品質管理、多検体iPS細胞を用いた神経細胞一括分化誘導・病態解析、既存薬ライブラリーの安定的な供給と疾患iPS細胞を用いた既存薬スクリーニングシステムを実現化した。これらを複合的に稼働させALS患者由来iPS細胞、Pendred症候群患者由来iPS細胞を用いた既存薬スクリーニングを実施した結果、各々の治療薬候補を複数見出すことに成功した。本成果は新たな治療薬創出へつながるだけでなく、構築したシステムの有用性を示唆するものである。さらには薬効メカニズムが明らかな既存薬を用いていることから病態を引き起こす要因の推測も可能である。本システムにより得られた成果は神経変性疾患をはじめとする神経難病の根本的治療への足掛かりとなる極めて有用性の高いものである。

A．研究目的

iPS細胞技術によって疾患特異的iPS細胞を樹立し、各種分化細胞を誘導することが可能となった。様々な構成細胞を有する神経系において、これまで患者の生体内で起きていた現象を生体外で再現する唯一の手段であると言っても過言ではない。本研究では、神経疾患特異的iPS細胞を用いた効率的な創薬スクリーニングシステムを構築し、5年以内に実際に治療効果のある薬剤を臨床の現場へ送り出すことを目的とする。

具体的には、比較的稀少な神経疾患より疾患特異的iPS細胞を用い効率的な創薬システムの構築を行い、創薬シーズを同定する。その後、臨床試験により当該薬の中枢神経疾患に対する薬事承認を目指す。われわれは主に既存薬を用いたスクリーニングを行っており、副作用などに対する臨床試験は既に済んでおり、臨床現場へ早期に還元できると考える。

比較的稀少だが、均質性の高い疾患に対する創薬開発法が確立できれば、1)厚生労

働省の難治性疾患克服研究事業で未だ取り扱われていない稀少難病の治療法の開発、2)比較的患者数は多いが、均質性の低いと思われる中枢神経疾患（統合失調症・双極性障害・発達障害等）の効率的な治療薬の開発に応用が可能である。

これまでiPS細胞の表現型の解析は、研究者の主観的な判断に負うところが大きく、製薬企業の参入の障壁となっていた。解析の定量化とそのハイスループット化は、iPS細胞研究の産業化を促進するとともにiPS細胞研究分野における国際的な技術水準の向上に資すると期待される。また、既存薬の中に新たな活性をもつ薬剤を見出すことで、迅速な臨床応用に持ち込むことが可能であり、一日も早く安全な薬剤を求める社会の要求にこたえるものである。

本研究の成果は他の臓器系の難治性疾患の創薬シーズの探索や、他臓器に対する薬剤シーズの中枢神経系への副作用の評価にも利用可能であり、安全で効果的な新規薬剤の開発を目指すという、厚生労働行政の基本方針に合致する。特に中枢神経系に対する作用の多くは、動物を用いた検討が困難で、ヒト細胞の評価系を自動化することの臨床的な意義は大きい。

B．研究方法

（1）疾患特異的iPS細胞の樹立

患者末梢血や皮膚から体細胞を分離し、エピソーマルベクター等を用いて初期化因子の遺伝子を導入することでiPS細胞を樹立する。複数コロニー（平均60コロニー程度）をピックアップし、樹立に用いたベクターの残存、神経系細胞への分化能や必要に応じて点突然変異などを確認し、創薬スクリーニングに使用できるiPS細胞株を選定した。

（2）神経分化誘導系・表現型解析系の開発

iPS細胞から神経幹細胞へと直接誘導する方法を慶應義塾大学医学部生理学教室で独自に開発している。本システムを基盤としてiPS培養、神経幹細胞培養、神経培養の3つの分化段階に応じて最適な小分子の組み合わせを検討し、(A) 高効率な神経分化、(B)十分量の神経幹細胞の確保、(C)iPS細胞株によるばらつきの最小化、(D)神経分化誘導期間の短縮、の4つを満たす条件を選定し、新たな神経分化誘導基盤とした。

上記の系では、神経幹細胞培養・神経培養の段階で小分子を添加する。添加濃度を変更することにより任意の脳領域特異的な神経細胞誘導が可能である。ドパミンニューロンと運動ニューロンへの分化誘導をすでに確認している。誘導効率が高くなく、小分子濃度・添加時期による誘導条件の最適化を行った。

表現型解析系としてイメージングサイトメーターであるIN Cell Analyzer 6000を用いた複数評価項目一括解析システムを構築した。本システムは細胞の形態情報と複数のタンパク質の局在、発現情報をリンクさせることが可能である。多重染色を用いて多角的な病態解析を実施した。

（3）薬剤スクリーニング

未分化な細胞が非接着培養条件下において球体を形成して増殖する能力（スフィア形成能）を評価するアッセイ系をモデルとしてヒト型双腕ロボット「まほろ」によるシステムの構築を行った。細胞は骨肉腫癌幹細胞を使用し、化合物存在下で非接着丸底96穴細胞培養dishと接着平底細胞培養

dishにおける細胞増殖の差異を見ることによりヒット化合物の抽出を行った。

(2)で構築した神経分化誘導基盤・表現型解析システムを用いて見出した疾患由来の表現型をエンドポイントとして薬剤(既存薬)スクリーニングを実施した。スクリーニングに用いる薬剤は「まほろ」を用いて96ウェルプレートに分注されており、高精度かつ安定な既存薬ライブラリー提供が可能である。

(倫理面への配慮)

本研究は、慶應義塾大学の倫理委員会で人権擁護、不利益・危険性の排除、説明と同意に関して十分な審査を経た承認のもとに行われる。ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守し、下記の各種指針にもとづいて研究計画を立案・遂行している。

① ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針
② 臨床研究に関する倫理指針
③ その他(文部科学省研究振興局長通知19文科振第852号)

ヒト検体を採取する際には、試料等提供者の個人情報の保護、検体提供の任意性,提供を受けた検体の取り扱い、得られる研究成果の医学的貢献度等について、試料等提供者ないしはその保護者に充分に説明したうえで、文書により同意を得ている。試料等の匿名化など個人情報の保護に努め、個人情報の保護に関する法律、行政機関の保有する個人情報の保護に関する法律(平成15年法律第58号)、独立行政法人等の保有する個人情報の保護に関する法律(平成15年法律第59号)及び地方公共団体等において個人情報の保護に関する法律第11条の趣旨を踏まえて制定される条例等を遵守している。

iPS細胞株の樹立と解析に関しては、慶應義塾大学医学部倫理委員会により、課題名「神経疾患患者からのiPS細胞株の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究」が既に承認(平成20年6月18日)されている。

C. 研究結果

(1)疾患特異的iPS細胞の樹立

ゲノム構造異常と病態の関連が強く疑われるCNV(copy number variation)をもつ統合失調症患者からのiPS細胞樹立・解析を進めている。

(A) 統合失調症患者由来iPS細胞より神経細胞の誘導:平成25年度に樹立し、選抜したiPS細胞クローンを用いて、平成26年度から神経細胞誘導を行なった。ドパミンニューロンに注目し解析を進めている。

(B) 統合失調症患者由来iPS細胞の樹立:平成26年度に新たなCNVを持つ統合失調症患者2例からiPS細胞の樹立を開始した。

(C) 双極性障害患者由来iPS細胞樹立のための患者選定:平成25年度より開始した双極性障害の精神症状に強い影響を及ぼすと考えられるCNVの選定を開始した。平成26年度に、慶應義塾大学病院を受診した双極性障害患者26名の末梢血よりゲノムDNAを抽出し、CNV解析を行った。上記CNVを持つ患者3例を選定し、患者およびご家族よりiPS細胞を用いた研究についての説明を行い、研究協力についての同意を得た。内1例よりiPS細胞樹立を開始した。

(D) 次世代シーケンサーを用いた疾患原因遺伝子の網羅的解析;疾患エクソーム解析系の運用を開始し、本プロジェクトの対

象疾患の原因遺伝子の変異を、単一のアッセイ系によって高効率かつ網羅的に検出することが可能となった。

（２）神経分化誘導系・表現型解析システムの開発

平成25年度までに、多検体疾患iPS解析に向けて、96ウェルプレートを用いて複数のあらゆるiPS細胞を一括に神経分化させる迅速かつ高効率な神経分化誘導基盤を構築した。本誘導系は生理学教室が保有するiPS細胞から神経幹細胞へと直接分化誘導させる技術を基盤としている。

分化誘導系の改良：平成26年度には、新たに各分化誘導段階において最適な小分子を添加することで神経分化誘導効率の向上、分化誘導期間の短縮に成功した。神経幹細胞を介しており、この段階では自己増殖能を保持・促進させているため必要な量のサンプル確保も容易である。

T細胞由来iPS細胞を用いた多検体疾患iPS細胞の神経分化誘導系の確立：平成26年度には、新たに樹立しランダムにピックアップしたT細胞由来iPS(TiPS)細胞30コロニーのうち28コロニーを神経細胞へと分化誘導させることに成功した。株により分化指向性が大きく異なるという特徴をもつヒトiPS細胞にとって極めて有用性の高い神経分化誘導基盤となる。（図１）

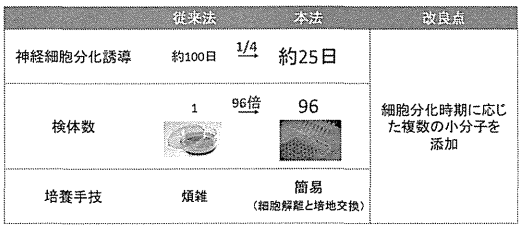

図1. 96ウェルプレートを用いた神経分化誘導基盤の構築

表現型解析としては、上述した神経分化誘導基盤に一続きになることを想定している。平成26年度に、iPS細胞由来神経細胞を用いて、長期培養による神経突起長減少、酸化ストレス、細胞内代謝、電気生理学的活動、異常物質の蓄積を定量する表現型解析システムを開発した。本解析系を筋萎縮性側索硬化症、ペンドレット症候群、パーキンソン病、アルツハイマー病、多系統萎縮症、脊髄小脳変性症、牟婁病、ペルツェウス・メルケバッハ病、シェーグレンラルソン症候群、チャージ症候群、神経フェリチン症、アンジェルマン症候群、プラダーウィリー症候群、ドラベ症候群といった複数の疾患iPS細胞由来神経細胞に適用し表現型解析を開始している。主だった表現型解析の成果を以下に述べる。

(A) 筋萎縮性側索硬化症(FUS 変異)

平成 25 年度までに患者 2 名から樹立した iPS 細胞(FUS-iPS)と健常者由来 iPS 細胞から高効率な運動ニューロンの分化誘導系を確立している。平成 26 年度は誘導した iPS 細胞由来運動ニューロンを用いて、神経突起長解析、FUS タンパク異常局在、FUS タンパクを伴うストレス顆粒形成、細胞死、アポトーシスマーカー発現解析を実施した。

平成 25 年度に確立した運動ニューロンの誘導系では樹立した iPS 細胞を浮遊培養下で神経幹細胞へと誘導後、運動ニューロン前駆細胞へと誘導していたが、平成 26 年度より新たにこの段階で小分子を添加し、幹細胞の性質をさらに抑制することで迅速かつ高効率な運動ニューロンへの分化誘導システムを構築した。本システムでは全神経細胞における運動ニューロンマーカー(HB9、ChAT)発現効率は約 60%ある。

本誘導系を用いて分化誘導した FUS-iPS

細胞由来運動ニューロンを解析した。平成26年度に、長期培養した患者由来運動ニューロンで神経突起長減少を見出した。また、神経突起長減少が確認された同時期に神経細胞数の減少もみられており、この病態時期において運動ニューロンマーカー(ChAT)陽性率も減少していることから運動ニューロン選択的な細胞死が示唆された。

平成25年度にFUS変異ALS患者において報告されているFUSタンパクの異常局在に関しても、FUS-iPS由来運動ニューロンにおいて観察されることを確認している。平成26年度にこれらを定量し、FUS-iPS細胞由来運動ニューロン細胞質におけるFUSタンパク質局在率(異常局在率)の増加を認めた。FUSタンパクに関しては、ストレス顆粒における共局在も見出した。

平成25年度にFUS-iPS細胞由来運動ニューロンにおいてアポトーシスマーカーであるCleaved Caspase-3の発現上昇を見出した。平成26年度にLDH漏出率の増大を見出しており、運動ニューロンの細胞死を示唆するデータであると考えている。これらのデータよりALS病態において細胞障害性・細胞死の促進が生じていると推察した。

(B) ペンドレット症候群

平成25年度に、患者3名からiPS細胞を樹立した。

平成26年度に、樹立した患者由来iPS細胞(Pendred-iPS)と健常者由来iPS細胞から分化誘導した内耳細胞を用いて、細胞内での疾患の原因タンパクであるPENDRINの局在解析、分子生物学的表現型について比較検討した。

独自に確立した内耳細胞誘導法により、ほぼ100%の高効率で内耳PENDRIN陽性細胞に誘導することが可能である。平成26年度に本誘導法を用いて患者および健常者iPS細胞から内耳細胞を誘導し比較検討した。Pendred-iPSに細胞内凝集体を認めることがわかり、同時にプロテアソーム阻害薬による細胞ストレスへの脆弱性を示すことが分かった。

これまで本疾患においてはヒトと同様の疾患表現型を呈するモデルマウスが存在せず、病態生理に不明な点が多かった。本疾患が神経変性疾患に類似した疾患であることが示唆され、新規病態生理解明につながるものと期待される。

（3）薬剤スクリーニング

平成26年度に、未分化な細胞が非接着培養条件下において球体を形成し増殖する能力（スフィア形成能）を評価するアッセイ系をモデルとして「まほろ」によるシステムの構築を行った。

骨肉腫癌幹細胞を使用し、化合物存在下で非接着丸底96穴細胞培養dishと接着平底細胞培養dishにおける細胞増殖の差異を見ることによりヒット化合物の抽出を行った。化合物は1500種の既存薬を用いた。その結果、非接着細胞に対して細胞増殖を抑制するが、接着細胞に対しては抑制をしない3種類の化合物が選択できた。その実験において、細胞散布、化合物調整、細胞増殖の定量等すべてのプロセスが極めて高い再現性を有し、3回の実験で全く同じ化合物を選択することができた。さらに、重要な点はこれまで各ウェルの観察において細菌、カビなどの感染事故は起こっておらず、清潔操作に関しても問題はなかった。

また平成26年度に、(2)-A.で述べたFUS-iPS由来の運動ニューロンを用いた既

存薬スクリーニングを開始した。神経突起長変化を指標に薬剤処置に適した病態時期を推測し、その同時期に確認される複数の表現型（上述したストレス顆粒におけるFUSタンパク質の局在、アポトーシスの誘導など）を評価項目として270種類の薬効評価を実施した（IN Cell Analyzerを用いた一括解析）。現時点で、3種類の有力な治療薬候補を見出しており、最終的に1500種の薬効評価を実施する予定である。(図2)

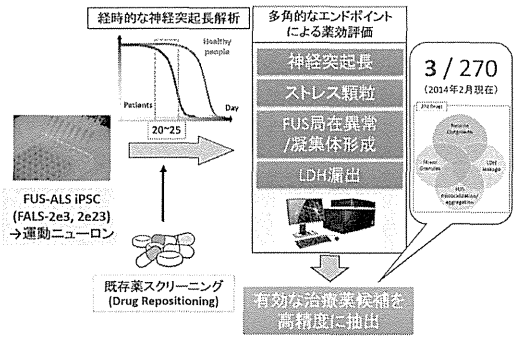

図2. FUS-ALS患者由来iPS細胞を用いた既存薬スクリーニング

(2)-B. で述べたPendred-iPSに対しても既存薬スクリーニングを実施した。本疾患では言語能を習得後に進行性難聴をきたす。この進行性難聴に対して、有効な治療法のが存在せず新規治療薬が期待されている。本疾患に対して既存薬スクリーニングを行い、2種類の有効な治療薬候補を同定した。

D．考察

(1)統合失調症患者や双極性障害などの精神神経疾患は既知の遺伝的素因のみでは、必ずしも疾患が発症しない。そのため、病態解析には複数症例の解析が必須となる。現時点でゲノム構造異常を認めるすべての症例よりiPS細胞を作成し、構築した神経分化誘導系・病態解析系を適用し、表現型検出が期待できる。

本年度より、疾患エクソーム解析系の運用を開始し、対象疾患の原因遺伝子変異を、単一アッセイ系により網羅的に検出することが可能となった。本システムから今後樹立したiPS細胞の遺伝子変異を高効率に検出することが可能となりスループットの向上が期待できる。

(2) 96ウェルプレートを用いた神経分化誘導基盤の構築は一人の研究者がハンドリング可能なiPS細胞株数・症例数を飛躍的に増加させることで疾患特異的な表現型検出を容易にし、対象疾患を孤発性疾患・一般的な疾患へと拡大させることが可能となる。神経分化誘導基盤と一続きとなる多角的な表現型解析システムを構築したことから、今後広範な疾患iPS細胞を用いた解析が可能となり、神経難病の病態解明への足掛かりとなる。上記の神経分化誘導基盤と表現型解析システムはいずれも特別な操作を必要とせず手技的に容易であることからシステム全体のオートメーション化によるさらなるスループットの向上が期待できる。

(3) 既存薬ライブラリーとスクリーニングシステムの構築により見出した疾患iPS細胞由来神経細胞の表現型をエンドポイントとした安定的かつ高精度な薬効評価が可能となった。本システムにより抽出した3種類のALS治療薬候補は、症状を改善させる新規薬剤が望まれるALSの治療への大きな一歩であるとともに、病態解明にも大きく寄与することが期待される。またPendred症候群において、iPS細胞由来内耳細胞を用いて新規の病態生理を示唆する所見を見出した。

さらに、2種類の有効な治療薬候補を同定した。本疾患の進行性難聴に対して治療薬が存在しない。治療薬候補の乏しい多くの難聴性疾患に対するスクリーニングプラットホームの確立という点においても、非常に意義のあるものと考えられる。

抽出した治療薬候補化合物の薬効メカニズムはその病態を示唆するものであり、さらなる病態解明、要因の探索が今後の検討課題である。

E．結論

本プロジェクトを通して、疾患特異的iPS細胞の樹立・品質管理、多検体iPS細胞を用いた神経細胞一括分化誘導・病態解析、既存薬ライブラリーの安定的な供給と疾患iPS細胞を用いた既存薬スクリーニングシステムを実現化した。

これらの系を、ALS患者iPS細胞由来運動ニューロンおよびPednred症候群患者iPS細胞由来内耳細胞に応用し、既存薬スクリーニングにより個々の疾患に治療薬候補を複数見出すことに成功した。本成果は新たなALS治療薬創出へとつながるだけでなく、構築したシステムの有用性を示す。我々はすでに薬効メカニズムが明らかな既存薬を用いている。そのため、見出したALS治療薬候補から病態を引き起こす要因が推測可能である。本システムにより得られた成果は、神経変性疾患の根本的治療への足掛かりとなる極めて有用性の高いものである。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

１：論文発表

【代表研究者：岡野栄之】

1. Kano SI, Yuan M, Cardarelli RA, Maegawa G, Horiuchi Y, Higurashi N, Gaval-Cruz M, Wilson AM, Tristan C, Kondo MA, Chen Y, Koga M, Obie C, Ishizuka K, Seshadri S, Srivastava R, Kato TA, Sedlak TW, Lee Y, Rapoport JL, Hirose S, Okano H, Valle D, O'Donnell P, Sawa A, Kai M. Clinical utility of neuronal cells directly converted from fibroblasts of patients for neuropsychiatric disorders: studies of lysosomal storage diseases and channelopathy. ***Curr Mol Med.*** 2015.[Epub ahead of print]

2. Itakura G, Kobayashi Y, Nishimura S, Iwai H, Takano M, Iwanami A, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Controlling Immune Rejection Is a Fail-Safe System against Potential Tumorigenicity after Human iPSC-Derived Neural Stem Cell Transplantation. ***PLoS One***. 23;10 (2),2015

3. Nori S, Okada Y, Nishimura S, Sasaki T, Itakura G, Kobayashi Y, Renault-Mihara F, Shimizu A, Koya I, Yoshida R, Kudoh J, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Long-Term Safety Issues of iPSC-Based Cell Therapy in a Spinal Cord Injury Model: Oncogenic Transformation with Epithelial-Mesenchymal Transition. ***Stem Cell Reports***. 2015 [Epub ahead of print]

4. Maekawa M, Yamada K, Toyoshima M, Ohnishi T, Iwayama Y, Shimamoto C, Toyota T, Nozaki Y, Balan S, Matsuzaki H, Iwata Y, Suzuki K, Miyashita M, Kikuchi M,

Kato M, Okada Y, Akamatsu W, Mori N, Owada Y, Itokawa M, Okano H, Yoshikawa T. Utility of Scalp Hair Follicles as a Novel Source of Biomarker Genes for Psychiatric Illnesses. ***Biol Psychiatry***. 2014 [Epub ahead of print]

5. Kondo T, Funayama M, Tsukita K, Hotta A, Yasuda A, Nori S, Kaneko S, Nakamura M, Takahashi R, Okano H, Yamanaka S, Inoue H. Focal Transplantation of Human iPSC-Derived Glial-Rich Neural Progenitors Improves Lifespan of ALS Mice. ***Stem Cell Reports***. 12;3(2):242-9,2014

6. Okano H. Stem cell research and regenerative medicine in 2014: first year of regenerative medicine in Japan. ***Stem Cells Dev***. 15;23(18): 2127-2128 ,2014

7. Matsuzaki Y, Mabuchi Y, Okano H. Leptin Receptor Makes Its Mark on MSCs. ***Cell Stem Cell***. 7;15(2): 112-4,2014

8. Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Involvement of ER Stress in Dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1 Missense Mutations Shown by iPSC-Derived Oligodendrocytes. ***Stem Cell Reports***. 24;2(5):648-61, 2014

9. Yoshida T, Ozawa Y, Suzuki K, Yuki K, Ohyama M, Akamatsu W, Matsuzaki Y, Shimmura S, Mitani K, Tsubota K, Okano H. The use of induced pluripotent stem cells to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa. ***Mol Brain***. 16;7(1): 45,2014

10. Bamba Y, Shofuda T, Kanematsu D, Nonaka M, Yamasaki M, Okano H, Kanemura Y. Differentiation, polarization, and migration of human induced pluripotent stem cell-derived neural progenitor cells co-cultured with a human glial cell line with radial glial-like characteristics. ***Biochem Biophys Res Commun***. 16;447(4):683-8, 2014

【研究分担者：佐谷秀行】

11. Shimizu T, Sugihara E, Yamaguchi-Iwai S, Tamaki S, Koyama Y, Kamel W, Ueki A, Ishikawa T, Chiyoda T, Osuka S, Onishi N, Ikeda H, Kamei J, Matsuo K, Fukuchi Y, Nagai T, Toguchida J, Toyama Y, Muto A and Saya H: IGF2 preserves osteosarcoma cell survival by creating an autophagic state of dormancy that protects cells against chemotherapeutic stress. ***Cancer Res*** 74: 6531-6541, 2014

12. Maruoka R, Takenouchi T, Torii C, Shimizu A, Misu K, Higasa K, Matsuda F, Ota A, Tanito K, Kuramochi A, Arima Y, Otsuka F, Yoshida Y, Moriyama K, Niimura M, Saya H and Kosaki K: The use of next-generation sequencing in molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: a validation study. ***Genet Test Mol Biomarkers*** 18: 722-735, 2014

【研究分担者：小崎健次郎】

13. Numasawa-Kuroiwa Y, Kosaki K, Okano H, et al., Involvement of ER

stress in dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1 missense mutations shown by iPSC-derived oligodendrocytes. ***Stem Cell Reports*** 2(5):648-661, 2014

2 ：学会発表

【代表研究者：岡野栄之】

【国外】

1. Hideyuki Okano : Modeling neurological and psychiatric disorders using iPSCs technologies and transgenic non-human primates. : Keystone Symposia Stem Cells and Reprogramming (Z4), 2014.4.10 *2014.4.6-11 (Resort at Squaw Creek・Olympic Valley, California USA)]

2. Hideyuki Okano: Brain science using iPS Cell technology and transgenic non-human primates. : 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology (CINP-The International College of Neuropsychopharmacology), Plenary Lecture, 2014.6.24 *2014.6.22-26 (Vancouver Convention Centre, Vancouver, Canada)

3. Hideyuki Okano: The Brain Mapping Project in Japan: Brain Mapping by Integrated Neurotechnologies for Disease Studies (Brain/ MINDS). : Human Brain Project (HBP) Summit 2014, 2014.9.29 *2014.29-10.1 (Kirchhoff Institute for Physics (KIP), Heidelberg, Germany)

4. Hideyuki Okano: Modeling neurological and psychiatric disorders using iPSC technologies and transgenic non-human primates. : BRIDGING BIOMEDICAL WORLDS (BBW 2014) - Turning obstacles into opportunities for stem cell therapy, 2014.10.14 *2014.10.13-15 (China National Convention Center (CNCC), Beijing, PR China)

5. Hideyuki Okano: Application of human iPS cells for inner ear biology and human disease modelin. :Inner Ear Biology Workshop 2014 in Kyoto, Lecture, 2014.11.3 *2014.11.1-4 (Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan)

6. Hideyuki Okano: iPS Cell Technologies:Significance and Applications to CNS Regeneration and Disease Research. :2014 WASF on Stem Cell Research and Regenerative Medicine "The Impact of Regenerative Medicine 2014", 2014.11.6 *2014.11.6-7 (Mission Bay Converence Center at UCSF, San Francisco, USA)

7. Hideyuki Okano : Brain Mapping by Integrated Neurotechnologies for disease Studies. : Marmoset Social, 2014.11.17 *2014.11.17 (Renaissance Washington, DC Downtown Hotel, Washington DC, USA)

8. Hideyuki Okano: Brain Mapping Project in Japan:Brain Mapping by Integrated Neurotechnologies for Disease Studies (Brain/ MINDS). : the Public Advocacy Forum at Neuroscience 2014, 2014.11.18 *2014.11.15-19 (the Walter E. Washington Convention Center, Washington DC, USA)

9. Hideyuki Okano: Transgenic marmosets for modeling human nuerological and psychiatric disorders: Minisymposium 668 "Transgenic Primate Models of

Human Brain" at Neuroscience 2014, 2014.11.19 *2014.11.15-19 (the Walter E. Washington Convention Center, Washington DC, USA)

10. Hideyuki Okano: Modeling psychiatric/neurological disorders using iPS cell technologies and transgenic non-human primates.: BROAD Institute Seminar, 2014.12.4 *2014.12.4 (Auditorium, BROAD Institute, MA, USA)

11. Hideyuki Okano: Cell transplantation therapies for spinal cord injury focusing on human iPS cells.: The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience"iPS Cells for Regenerative Medicine", 2015.1.15 *2015.1.15-17 (Center for Learning and Innovation (CLI), Takeda Pharmaceutical Company, Ltd., Suita, Japan)

12. 岡野栄之：Brain Science using Transgenic non-Human Primates：第5回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム BRI International Symposium 2015 Genome Editing Technology; its Current State-of-Art and Application to Brain Research, Keynote lecture, 2015.3.6 *2015.3.5-6 (Center for Integrated Human Brain Science (6F), Niigata University, Niigata, Japan)

【国内】

1. 岡野栄之：iPS細胞を用いた神経系の再生・疾患・創薬研究：大日本住友製薬社内学術講演会、2014.4.2 *2014.4.2 （大日本住友製薬株式会社大阪研究所、大阪）

2. 岡野栄之：iPS 細胞技術を用いた再生医療と疾患研究：第1回 Medical Frontier Consortium beyond the Organcentric Dogma、 2014.4.5 * 2014.4.5-6（第一ホテル東京シーフォート、東京）

3. 岡野栄之：iPS細胞を用いた神経系の再生・疾患研究：岡崎市医師会学術講演会、2014.4.17 *2014.4.17 （岡崎市医師会公衆衛生センター、岡崎）

4. 岡野栄之：iPS細胞の医療応用について：東京大学・教養学部全額自由研究ゼミナール、2014.4.30 *2014.4.30 （慶應義塾大学信濃町キャンパス北棟ラウンジ、東京）

5. 岡野栄之：iPS細胞技術を活用した未来の医療について：特別展「医は仁術（じんじゅつ）」～江戸の医から未来を眺める展覧会～・特別講演会、2014.5.10 *2014.5.10（国立科学博物館、東京）

6. 岡野栄之：iPS細胞技術を活用した未来の医療について：BIOtech2014/第1回個別化医療技術展「iPS細胞研究 最前線」、2014.5.15 * 2014.5.15（東京ビッグサイト、東京）

7. 岡野栄之：iPS細胞研究に伴う新たな倫理的な問題：第55回日本神経学会学術大会・シンポジウム、2014.5.23 *2014.5.21-24（福岡国際会議場、福岡）

8. 岡野栄之：iPS細胞技術を用いた神経系の再生・疾患研究：第55回日本神経学会学術大会・Super Expert Session 3、2014.5.24*2014.5.21-24（福岡国際会議場、福岡）

9. 岡野栄之：iPS細胞を用いた小児神経疾患の病態解析：第56回日本小児神経学会学術集会・シンポジウム、2014.5.29 *2014.5.29-31（アクトシティ浜松、浜松）

10. 岡野栄之：脳のアンチエイジングと先制医療：第14回日本抗加齢医学会総会・特別講演、2014.6.6 *2014.6.6-8（大阪国際会議場、大阪）

11. 岡野栄之：iPS細胞を用いた神経系の再生・疾患・創薬研究：第110回日本精神神経学会学術総会・特別講演、2014.6.27 *2014.6.26-28（パシフィコ横浜・横浜）

12. 岡野栄之：Neuroscience using iPS cell technologies and Transgenic non-human primates：沖縄科学技術大学院大学セミナー、2014.7.4 *2014.7.4（沖縄科学技術大学院大学、沖縄県国頭郡恩納村）

13. 岡野栄之：iPS細胞技術を活用した未来の医療について、第24回新世紀政経フォーラム、2014.7.9 *2014.7.9 （パレスホテル東京、東京）

14. 岡野栄之：iPS細胞技術による神経系の再生医学・疾患研究、第73回東京矯正歯科学会学術大会・特別講演、2014.7.10 *2014.7.10（有楽町朝日ホール、東京）

15. 岡野栄之：iPS細胞技術の基本概念と再生医療および疾患研究への応用、慶應義塾大学医学部第103回生涯教育研修セミナー、2014.7.12 *2014.7.12（ハイアットリージェンシー東京、東京）

16. 岡野栄之：iPS細胞技術と革新的脳科学を用いた医療革命、慶應義塾高等学校第56回招待会議・基調講演、2014.7.20（慶應義塾大学日吉キャンパス来往舎、横浜市）

17. 岡野栄之：iPS細胞と遺伝子改変霊長類を用いた神経疾患の病態解明と創薬研究、ゲノム創薬・医療フォーラム第2回談話会、2014.8.7 *2014.8.7（東京大学医科学研究所講堂、東京）

18. 岡野栄之：iPS細胞技術による神経系の再生医学・疾患研究、ダイアローグ株式会社オリジナルセミナー臓器再生を目指した再生医療開発の最前線～早期実用化に向けたStrategy～、2014.8.8 *2014.8.8 （品川コクヨホール、東京）

19. 岡野栄之：iPS細胞技術を活用した未来の医療について、iPS細胞技術を活用した未来の医療について、公益財団法人神奈川科学技術アカデミー（KAST）25周年記念式典・講演会、2014.9.2 *2014.9.2 （神奈川サイエンスパーク、川崎）

20. 岡野栄之：革新的な脳科学による認知症克服への挑戦、慶應義塾大学医学部百寿総合研究センター開所記念式-百寿者百万人時代を見据えて-、2014.9.2 *2014.9.2 （明治記念館、東京）

21. 岡野栄之：脊髄損傷の革新的な再生医療、第15回運動器科学研究会、2014.9.5 *2014.9.5 （ベルサール三田・東京）

22. 岡野栄之：iPS細胞技術が作り出す再生医療の未来、神奈川障害者職業能力開発校「特別講話」、2014.9.10 *2014.9.10 （神奈川障害者職業能力開発校、相模原）

23. 岡野栄之：iPS細胞技術：その再生医療と疾患研究への応用、第37回日本神経科学大会・シンポジウム、2014.9.11 *2014.9.11-13 （パシフィコ横浜、横浜）

24. 岡野栄之：RNA結合蛋白質Musashiによる幹細胞機能の転写後レベルでの調節機構、第37回日本神経科学大会・シンポジウム、2014.9.11 *2014.9.11-13（パシフィコ横浜、横浜）

25. 岡野栄之：iPS 細胞技術の神経系の再生医療および疾患研究への応用、第 50 回日本移植学会総会・特別講演、2014.9.12 *2014.9.10-12 （京王プラザホテル、東京）

26. 岡野栄之：iPS 細胞技術を用いた再生医療と脳科学、千葉市科学館・大人が楽しむ科学教室・健康と科学シリーズ・特別講演会、2014.9.14 *2014.9.14（千葉市科学館、千葉）

27. 岡野栄之：iPS 細胞・幹細胞技術と革新的脳科学を用いた認知症の克服への挑戦、北海道大学遺伝子病制御研究所・IGM スペシャルセミナー、2014.9.17 *2014.9.17 （北海道大学遺伝子病制御研究所、札幌）

28. 岡野栄之：iPS 細胞による中枢神経系の再生医療、日本せきずい基金創立 15 周年記念 Walk Again 2014・脊髄再生国際シンポジウム・慢性期への挑戦、2014.9.20 *2014.9.20 （東京国際交流館、東京）

29. 岡野栄之：ヒト iPS 細胞技術及び遺伝子改変動物を用いた ALS を始めとする神経変性疾患の病態の解明、厚生労働科学研究委託費　難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））「筋萎縮性側索硬化症（ALS）新規治療法開発をめざした病態解明」班・平成 26 年度ワークショップ、2014.9.26 *2014.9.26（都市センターホテル、東京）

30. 岡野栄之：iPS 細胞を用いた神経系の再生・疾患研究、Hypertension Expert Forum, 2014.10.4 *2014.10.4（ザ・プリンス　パークタワー東京、東京）

31. 岡野栄之：ヒト iPS 細胞と霊長類モデルを用いた治療開発の基盤整備、文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究（研究領域提案型）「脳タンパク質老化と認知症制御」　キックオフシンポジウム、2014.10.8 *2014.10.8（KKR ホテル、東京）

32. 岡野栄之：Investigation of Psychiatoric/Neurological disorders using iPS cell technologies and transgenic non-human primates、第 87 回日本生化学会大会・シンポジウム、2014.10.16 *2014.-10-15-18（国立京都国際会館、京都）

33. 岡野栄之：iPS 細胞と遺伝子改変霊長類を用いた神経疾患の病態解明と創薬研究、CBI 学会 2014 年大会・プレナリーレクチャー、2014.10.28 *2014.10.28-30（タワーホール船堀、東京）

34. 岡野栄之：iPS 細胞と脳科学が切り開く未来医療、読売テクノ・フォーラム ゴールド・メダル賞創設２０周年記念講演会、2014.11.26 *2014.11.26（読売新聞東京本社、東京）

35. 岡野栄之：iPS 細胞研究は、医学をどう変えるか？、東京三田倶楽部創立４０周年記念式記念講演・懇親会、2014.11.29 *2014.11.29（慶應義塾大学三田キャンパス西校舎、東京）

36. 岡野栄之：iPS 細胞技術を用いた新時代の医療：第 282 回早期食道癌診断勉強会・教育講演、2014.12.13 *2014.12.13（大手町ファーストスクエアカンファレンス、東京）

37. 岡野栄之：Brain Mapping Project using the common marmoset. ： 第 4 回日本マーモセット研究会、2015.1.23 *2015.1.22-23 （犬山国際観光センター　フロイデ、犬山）

38. 岡野栄之：iPS 細胞の現状・将来展望：

トレリーフ5周年記念講演会、2015.1.24 *2015.1.24 （虎ノ門ヒルズ、東京）

39. 岡野栄之：iPS細胞技術と遺伝子改変霊長類を用いた中枢神経系の再生と疾患研究：「再生医療実現拠点ネットワークプログラム（NWP）」新技術説明会、2015.1.27 *2015.1.27（独立行政法人科学技術振興機構 東京別館（K's 五番町ビル）1階ホール、東京）

40. 岡野栄之：iPS細胞技術を用いた再生医療と脳科学:理数フロンティア事業講演会、2015.1.28 *2015.1.28（東京都都立西高等学校、東京）

41. 岡野栄之：iPS細胞の臨床応用について：豊島区医師会学術講演会、2015.2.18 *2015.2.18 （豊島区医師会館、東京）

42. 岡野栄之：iPS細胞を用いた神経系の再生・疾患研究：第3回生活習慣病の分子細胞病態学研究会・特別講演、2015.3.21 *2015.3.21 （ホテルグランパシフィック LE DAIBA、東京）

43. 岡野栄之：iPS細胞と遺伝子改変霊長類を用いた神経疾患の病態解明と創薬研究：第88回 日本薬理年会学会年会・特別講演、2015.3.18 *2015.3.18-20 （名古屋国際会議場、名古屋）

44. 岡野栄之：iPS細胞を用いた脊髄損傷の再生医療について～京浜臨海部ライフイノベーション国際戦略総合特区の取組みから～：第14回日本再生医療学会総会ランチョンセミナー、2015.3.19 *2015.3.19-21 （パシフィコ横浜、横浜）

45. 岡野栄之：iPS細胞技術を用いた医療革命：第14回日本再生医療学会総会・会長講演、2015.3.20 *2015.3.19-21 （パシフィコ横浜、横浜）

46. 岡野栄之：iPS細胞を用いた神経系の再生・疾患・創薬研究：株式会社技術情報協会セミナー、2015.3.24 *2015.3.24（株式会社技術情報協会・セミナールーム、東京）

【研究分担者：佐谷秀行】
【国内】

47. 佐谷秀行：既存薬を用いた癌幹細胞標的治療の考案。シンポジウム1「ドラッグ・リポジショニング」。第42回日本潰瘍学会。10/31/2014、慶應義塾大学芝共立キャンパス、東京

48. 佐谷秀行：骨肉腫幹細胞の性状解析と分化制御による治療戦略の考案。特別講演2。第56回日本小児血液・がん学会学術集会、11/29/2014、岡山コンベンションセンター、岡山

H．知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得(出願)

【国外】

1.発明の名称：神経分化促進剤
出願番号（出願日）：
14/397,376 (2013/04/26)
PCT/JP2013/062490 の各国移行：米国
(米国移行日 2014/10/27)
13781077.6 (2013/04/26)
PCT/JP2013/062490 の各国移行：欧州
(欧州移行日 2014/11/21)
出願人名：学校法人 慶應義塾
発明者:岡野栄之 島崎琢也 金田勇人(理化学研究所)

【国内】

1. 発明の名称：内耳細胞誘導方法　　該当無し
出願番号（出願日）：
特願 2014-100017（2014/05/13）　　3. その他
出願人名：学校法人　慶應義塾　　該当無し
発明者：細谷誠、岡野栄之、藤岡正人

2. 発明の名称：神経分化促進剤
出願番号：
特願 2014-512727
出願日：2013/04/26
PCT/JP2013/062490　の各国移行：日本
（国内移行日　2014/10/24）
出願人名：学校法人　慶應義塾
発明者：岡野栄之　島崎琢也　金田勇人（理化学研究所）

特許取得（登録）
【国外】
1. 発明の名称：
霊長類動物の初期胚への外来遺伝子導入法及び該導入法を含むトランスジェニック霊長類動物を作出する方法
・オーストラリア
出願番号：2008349175
出願日：2008/12/9
特許番号:2008349175
特許取得日：2014/05/15
・中国
出願番号：　200880128383，3
出願日：2008/12/9
特許番号:ZL200880128383.3
特許取得日：2014/11/26
出願人：学校法人慶應義塾
発明者：岡野栄之、佐々木えりか

2. 実用新案登録

Ⅱ.分担研究報告書

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

汎用性ヒト型双腕ロボットと既存薬ライブラリーを用いたiPS創薬研究

研究分担者　佐谷秀行　慶應義塾大学医学部先端医科学研究所　教授

研究要旨

iPS細胞（iPSC）は、in vitroで様々な系譜の細胞に分化させることによって、その細胞特有の病態を解析することができる極めて優れたツールである。私たちは遺伝性疾患由来のiPSCから病的形質を発現する細胞を誘導し、それを用いて薬剤スクリーニングを行うことを目的として研究を行う。本年度は、汎用性ヒト型双腕ロボットを用い、骨肉腫細胞をモデルとして細胞アッセイ系を構築し、病的形質を有するiPSC由来細胞を用いて既存薬ライブラリーをスクリーニングするためのシステムを構築した。

A. 研究目的

遺伝性疾患、とくに神経系に症状をきたす疾患では、患者の神経系細胞を用いてその形質の問題点を解析することは不可能である。しかし、iPSCを使用することで、培養下で神経系の細胞を誘導できるようになり、その細胞を用いた創薬研究が可能となってきた。

細胞を用いた薬剤スクリーニング（Cell-based drug screening）は、スループットが低いことと、再現性の低さに問題がある。iPSCを用いて薬剤スクリーニングを行うためには、ハイスループットで再現性の高いシステムを構築する必要がある。

私たちは昨年度の研究において、ヒト型双腕ロボットにCell-based drug screeningを行えるアルゴリズムを構築し、スループットと実験再現性の高いシステムを確立した。本年度はそのシステムと既存薬ライブラリーを用いて薬剤探索のモデル実験を行った。

B. 研究方法

昨年度は、我が国で開発された汎用性ヒト型双腕ロボット（呼称「まほろ」）において、無菌条件でCell-based drug screeningを行えるアルゴリズムを構築し、再現性の高いハイスループット薬剤スクリーニングシステムを作った。今年度は、私たちが樹立した骨肉腫幹細胞（Shimizu et al., Oncogene 2010）を用いて、非付着培養での増殖（スフィア形成能）は抑制するが、付着培養での増殖は抑制しない化合物をスクリーニングする実験を行い、本システムが高い再現性をもって、ヒット薬剤を抽出できることを確認した。

実験の概略を図1に示す。細胞培養dishと接着平底細胞培養dishにおける細胞増殖の差異を見ることによりヒット化合物の抽出を行う。目的の化合物は、接着した条件では細胞増殖を阻害しないが、スフィア形成条件において増殖阻害を示す（図1）。

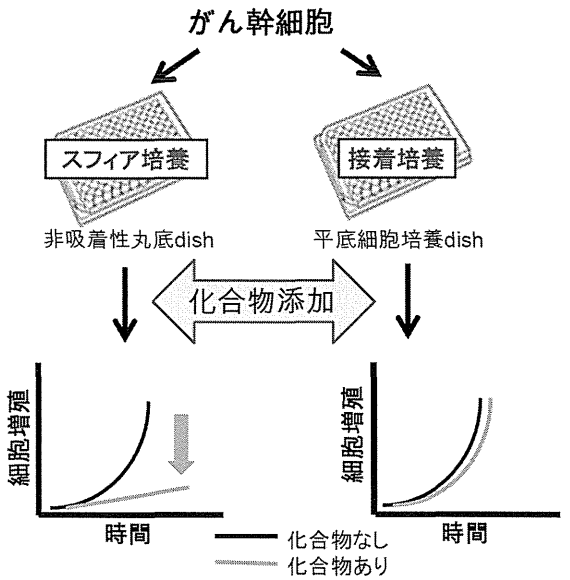

図1　スフィア形成能抑制剤のスクリーニング
がん幹細胞を非接着性丸底皿、接着性平底皿に散布し、化合物ライブラリーを添加する。接着条件では増殖阻害を示さないが、スフィア形成培養のみで阻害効果を示す化合物の取得を目指す。

細胞調整

細胞播種用 96 穴培養皿(丸底、平底)1 ウェル 50μl 中に細胞が 1000 個入るように細胞を散布した。スクリーニング工程は 8 連ピペットを用いておこなった。ウェルごとの散布細胞数の差が生じることを防ぐため、細胞浮遊液を 6 列散布するごとに撹拌操作を行った。細胞散布後 CO_2 インキュベーターへ収納し 2 日間培養を行った。

化合物調整

96 穴丸底プレートにあらかじめ準備された既存化合物ライブラリー(DL ナンバーにて表示)を図 2 のように希釈し濃度調整を行い、化合物含有細胞培養液 50 μl を上記の培養細胞各ウェルに添加する。添加後、細胞培養 96 穴プレートは CO_2 インキュベーターへ収納し培養を行った。

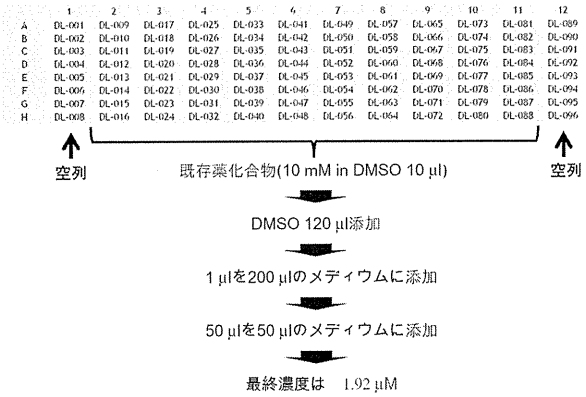

図 2 既存化合物ライブラリーの配置図と希釈法

細胞増殖の定量化

細胞を 48 時間インキュベートした後、Cell Titer Glo 細胞増殖アッセイキット(Promega 社)を使用し、発光強度により細胞増殖を定量化した。

倫理面の配慮

現時点ではヒト臨床検体の使用はないが、ヒト正常 iPSC、疾患 iPSC に対して化合物ライブラリーを用いたハイスループットの分化、増殖アッセイについては既に大学倫理委員会の承認を得ている。使用する iPSC は、インフォームドコンセントを十分に行った上で供与された細胞を用いて誘導する。

C. 研究結果

第1プレートのアッセイ結果を示す(図2)。4 バッチ(丸底、平底各 4 枚ずつ)施行したが、バッチ内、バッチ間の両者において細胞は均一に散布でき ており、薬剤による増殖抑制作用についてはプレート間の差異は極めて少なかった。さらに、各ウェルの観察において細菌、カビなどの感染事故は起こっていなかった。

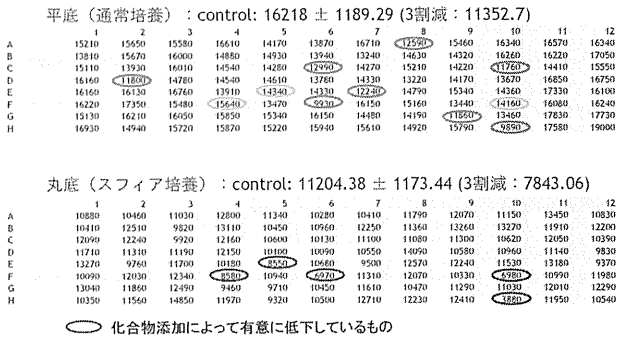

図 3 付着、非付着骨肉腫幹細胞に対する既存化合物の増殖抑制効果。
F4、E5、F10 の化合物は非付着(スフィア培養)に対しては有意に抑制をかけるが、付着(通常培養)に対しては抑制をかけない。

D. 考察

汎用性ヒト型双腕ロボットによる Cell-based drug screening を実施した。本研究では骨肉腫幹細胞を用いてスフィア形成能を特異的に阻害する化合物を抽出した。この細胞系においてスフィア形成能はマウスでの腫瘍形成能と相関する現象であることが分かっており(Ueki et al., ***PLoS One*** 2012)、その機能を選択的に抑制する薬剤は腫瘍の形成を阻害できる可能性があると考えている。

最初のプレートをスクリーニングした段階で既に非付着性増殖を有意に抑制する 3 種の化合物が高い再現性をもって抽出できた。現在準備中のヒト正常 iPSC、疾患 iPSC を用いた分化、増殖アッセイへの移行も微調整によって容易に行えるものと考える。

E. 結論

汎用性ヒト型双腕ロボットを用いた細胞スクリーニング系により既存薬をスクリーニングし、骨肉腫幹細胞の非付着性増殖を選択的に抑制できるヒット化合物を取得することができた。

F. 研究発表

1:論文発表

1. Shimizu T, Sugihara E, Yamaguchi-Iwai S, Tamaki S, Koyama Y, Kamel W, Ueki A, Ishikawa T, Chiyoda T, Osuka S, Onishi N, Ikeda H, Kamei J, Matsuo K, Fukuchi Y,