

201406034A

厚生労働科学研究費補助金
(再生医療実用化研究事業)

小児難病患者及び成育疾患患者由来 iPS 細胞の樹立と
薬剤スクリーニング系の確立

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 梅澤 明弘

平成27(2015)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

小児難病患者及び成育疾患患者由来 iPS 細胞の樹立と 薬剤スクリーニング系の確立	3
梅澤 明弘	

II. 分担研究報告書

1. iPS 細胞の由来疾患に関する臨床情報の収集	11
松原 洋一	
2. iPS 細胞薬剤スクリーニングに向けた 薬事的有用性の明確化	17
早川 堯夫	
3. iPS 細胞の特性解析と安全性指標の確立	25
佐藤 陽治	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
---------------------------	----

VI. 研究成果の刊行物・別刷	39
-----------------------	----

I. 総括研究報告書

小児難病患者及び成育疾患患者由来 iPS 細胞の樹立と薬剤スクリーニング系の確立
(H25－実用化（再生）－指定－022)

研究代表者：梅澤 明弘

独立行政法人国立成育医療研究センター 再生医療センター長

研究要旨：難病等の患者由来の iPS 細胞等を利用し、当該疾患に対する創薬シーズを探索する体制の構築し、それらの iPS 細胞を肝細胞等に分化させ、その細胞を利用した薬剤候補物質の安全性を評価する体制の整備である。我々の保有する細胞群の特色を生かし、稀少疾患である「遺伝子修復に係る遺伝子に変異を伴う疾患」についての iPS 細胞を樹立し、創薬シーズを探索する。また、iPS 細胞を肝細胞等に分化させて、その細胞を利用した薬剤候補物質の安全性スクリーニング体制を整備する。本研究により DNA 修復機構に関し、対照的な iPS 細胞株を樹立することができ、さらにその特性を活かして継代を重ねた細胞に対しても同様なデータを取得することで、変異パターンに関する知見も蓄積している。これらのデータは発症機序の解明に大きく貢献することはもちろん、細胞は DNA 修復異常全般に関し治療法の開発や創薬に大いに貢献しうるものである。

研究分担者

松原洋一（（独）国立成育医療研究センター
研究所長）

早川堯夫（近畿大学薬学総合研究所・教授）

佐藤陽治（国立医薬品食品衛生研究所・部長）

A. 研究目的

本事業の目的は、難病等の患者由来の iPS 細胞等を利用し、当該疾患に対する創薬シーズを探索する体制の構築および、iPS 細胞を肝細胞等に分化させ、その細胞を利用した薬剤候補物質の安全性を評価する体制の整備である。（独）国立成育医療研究センターの特色を生かし、稀少疾患である「遺伝子修復に係る遺伝子に変異を伴う疾患」についての iPS 細胞を樹立し、創薬シーズを探索する。また、iPS 細胞を肝細胞等に分化させて、その細胞を利用した薬剤候補物質の安全性スクリーニング体制を整備することである。

B. 研究方法

安定的な疾患由来 iPS 細胞と正常組織由来ヒト iPS 細胞樹立培養システム確立

すでに収集済みの毛細血管拡張性運動失調症（Ataxia telangiectasia: AT）を始め、Bloom 症候群、Cockayne 症候群、Xeroderma pigmentosus 等の疾患 iPS 細胞の樹立および解析を進め、創薬シーズ探索の体制を構築する。

iPS 細胞の樹立後、次世代シーケンサー等の大規模高速配列解析機器を用い、全ゲノムシーケンス、全エクソンシーケンス、ターゲットリシーケンス、rare SNPs 同定を行う。また、薬剤スクリーニング系の体制として、iPS 細胞由来肝細胞の作製及び品質管理を行う。

ターゲットリシーケンスによる既知・未知変異同定

すでに疾患責任領域が同定・推定されている疾患では、責任領域の任意配列を網羅したオリゴプローブを設計し、疾患責任領域を選択的に回収し、次世代シーケンサーで網羅的に配列解析する。

モデル細胞を用いた毒性評価系の確立

モデル細胞を用いた毒性評価系に対して、薬物毒性試験に使用するプラットフォームの検討、分化誘導イメージングが可能なヒト誘導肝細胞作製、毒性評価系構築に関する研究を継続的に行う。

（倫理面への配慮）

1. 本研究の倫理面での特徴とその対策

本研究の対象疾患は、すでに iPS 細胞の樹立および創薬探索のための遺伝子解析に必要な倫理申請を国立成育医療研究センターの倫理委員会に行い、承認を得ている。また、一部の研究は、次世代シーケンサーを用いた包括的網羅的遺伝子配列解析についても承認を

得ている（国立成育医療研究センター倫理委員会 受付番号374）。未承認の解析対象疾患は、改めて包括的網羅的遺伝子配列解析を行う旨を倫理申請し、提供者の再同意を得た後に遺伝子解析を行う。外部の医療機関から臨床検体の提供を受ける際は、双方の機関の倫理委員会に申請を行い、全ての研究を適正に遂行する。

創薬探索のための次世代配列解析を行うに当たっては、網羅的配列解析に対する包括的同意を得る必要があるが、加えて本研究の検体提供者は、ほとんどが未成年者であり、代諾により同意を得るという特異性を伴う。この点に関しては、特段の配慮と検討を行い、決して拙速な結論に至らぬよう、十分な社会的合意のもとに研究を進めていく必要がある。前述のバイオバンク事業の推進の為に、すでに6つのナショナルセンターが合同で、これらの倫理的問題の取り扱いの検討作業を共同で開始しており、これらの作業と協調し、適正かつ厳格な倫理面の運用の枠組みを作成する。また、当センターでは、定期的（年2回以上）に生命倫理に関する講演を開催し、申請者のみならず大部分のセンター医師・研究者が受講しており、適切な生命倫理観を身につける事に機関として努力を払っている。

2. 難治性疾患を取り扱うための倫理的配慮

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究、遺伝子解析、臨床研究が予定されているので、機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。成育医療研究センターでは、下記の倫理申請が既に承認されており、遺伝子解析研究を行う際の倫理的な手続きに関しては十分な配慮がなされている。また、包括的網羅的遺伝子配列解析についても、必要に応じて追加申請を行う。

受付番号39 : 先天奇形症候群の遺伝子解析

受付番号234 : 子宮内胎児発育異常の遺伝子・ゲノム解析

受付番号350 : 先天性代謝異常症および自己免疫性肝炎、劇症肝炎、突発性門脈圧亢進症、肝外門脈閉塞症、Budd-Chiari症候群、肝内結石症、肝内胆管傷害等の病態解明と患者に由来する生体試料の収集・バンク化

受付番号351 : ヒト神経組織・細胞の保存及びそれを用いた遺伝子解析

受付番号362 : アトピー性皮膚炎、尋常性魚鱗癬における皮膚バリア機能遺伝子変異の解析

受付番号365 : 新生児、乳児消化管アレルギー（Food-Protein Induced Enterocolitis Syndrome ; N-FPIES）の診断検査法開発、病態解明に関する研究

受付番号371 : 新生児、乳児消化管アレルギー（Food-Protein Induced Enterocolitis Syndrome ; N-FPIES）の病態解析のための患者登録システムの開発と発症頻度に関する研究

受付番号372 : 先天代謝異常症に関する研究

受付番号374 : 肥厚性皮膚骨膜炎における原因遺伝子変異の検索

受付番号379 : リンパ管腫に関する基盤研究

受付番号382 : Rubinstein-Taybi症候群の臨床診断基準の策定と新基準にもとづく有病率に関する調査

受付番号391 : X染色体の数的・構造的異常に起因する疾患におけるX染色体からの遺伝子発現解析

受付番号394 : 小児におけるリウマチ性・自己免疫性疾患の病態にかかわる遺伝子機能解析

受付番号396 : ヒト肝細胞・組織を用いた創薬研究および肝疾患・病態に関する基礎研究

受付番号398 : アレルギー発症機序の解明に向けたアレルギー出生コホート研究と免疫ヒト化マウス作製

受付番号399 : 自然免疫異常により発症するNEMO異常症ならびに慢性肉芽腫症における難治性腸炎の全国実態調査

受付番号406 : 早産のゲノム疫学研究

受付番号410 : 肝移植後のEBウイルス関連リンパ増殖性疾患に関する研究

受付番号435 : 不育症における原因遺伝子のゲノムワイド関連解析

受付番号440 : 新生児および乳幼児肝血管腫に対する研究

受付番号454 : ダウン症者の退行症状に関する横断調査

3. 対照となるヒトES細胞に関する倫理

国立成育医療研究センターでは「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づきヒトES細胞に関する医学研究が適正に行われるよう、ヒトES細胞研究倫理審査委員会が組織されている。ヒトES細胞研究に関する各種規程（「ヒトES細胞研究倫理審査委員会規程」、「ヒトES細胞樹立に関する規程」、「ヒトES細胞分配に関する規程」、「ヒトES細胞使用に関する規程」）も整備され、機関全体として生命倫理及び医の倫理に基づき適切に行う（国立成育医療センターヒトES細胞研究倫理審査委員会：

<http://www.ncchd.go.jp/essaibou/es.htm>）。申請者らは、当該センターが定期的（年2回以上）に開催している生命倫理に関する講演を受講し、適切な生命倫理観を身につけ常に配慮し研究を実施する。

国立成育医療センター研究所（機関内番号ES倫2）

文部科学大臣確認番号:18諸文科振第832号

4. 正常ヒトiPS細胞の樹立および取り扱いに関する倫理

倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療研究センター受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認、受付番号197、平成18年6月承認、受付番号201、237、238、平成19年6月承認）。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う予定である。

5. 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して

研究を実施する(承認番号2003-002,2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

1) 安定的な疾患由来 iPS 細胞と正常組織由来ヒトiPS 細胞樹立培養システム確立:

すでに収集済みの毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia telangiectasia:AT) を始め、Cockayne 症候群、Xeroderma pigmentosus等の疾患iPS細胞の樹立および解析を進め、創薬シーズ探索の体制の構築に着手した。薬剤スクリーニング系の体制として、iPS細胞由来肝細胞の作製も着手した。この肝幹細胞が薬物代謝活性および薬剤応答性を有する肝細胞へと分化可能であるという結果も得られた。

2) ターゲットリシークエンスによる既知・未知変異同定:

すでに疾患責任領域が同定・推定されている疾患では、責任領域の任意配列を網羅したオリゴプローブを設計し、疾患責任領域を選択的に回収し、次世代シークエンサーで網羅的に配列解析を行った。マイクロ・アレイ解析は、イルミナ社の最新の稠密なSNPアレイチップであるBeadChip (HumanOmni 2.5M)を用い、同社iScanシステムによってスキャンしてデータを収集した。

3) モデル細胞を用いた毒性評価系の確立:

モデル細胞を用いた毒性評価系に対して、薬物毒性試験に使用するプラットフォームの検討、分化誘導イメージングが可能なヒト誘導肝細胞作製、毒性評価系構築に関する研究を行った。ヒトiPS細胞から成熟肝細胞の分化過程における遺伝子発現変化を網羅的に解析した。

D. 考察

DNA 修復は生体維持にとってきわめて重要なプロセスで、相同組換え等による二本鎖修復、および塩基除去修復等による一本鎖修復の 2 つに分けることができる。それぞれの分子機構の異常に関わる疾患として、毛細血管拡張性運動失調症(AT)や色素性乾皮症(XP)といった悪性腫瘍を発生させる遺伝性疾患が知られており、本研究ではこれらの患者の線維芽細胞から

iPS 細胞を樹立し、発症機序の解明や治療法の開発、創薬に向けて研究を進めている。もとの線維芽細胞株および樹立された細胞株に対し、次世代シーケンサを用いたエクソーム解析と SNP アレイを用いた構造変異解析を行い、細胞のリプログラミング前後において獲得されたと考える変異を調べた結果、AT と XP 両疾患の間に対照的な違いが得られた。全コーディングおよび周辺配列に見つかった一塩基置換の変異数の平均は AT が 41 であったのに対し、XP では約 5 倍の 202。通常のエクソーム解析で検出される全バリエーションのうち約 1 割は短い挿入欠失であるが、AT および XP ではそれぞれ全体の 30.1%および 9.8%が挿入欠失変異であり、また AT では平均 3 箇所の大規模な構造変異が観察された一方、XPA では全株で構造変異は一つも見られなかった。これらの結果はそれぞれの原因遺伝子とされる ATM および XPA の分子機序を如実に反映した結果であると考えられる。本研究により DNA 修復機構に関し、対照的な iPS 細胞株を樹立することができ、さらにその特性を活かして継代を重ねた細胞に対しても同様なデータを取得することで、変異パターンに関する知見も蓄積している。これらのデータは発症機序の解明に大きく貢献することはもちろん、細胞は DNA 修復異常全般に関し治療法の開発や創薬に大いに貢献しうるものであると考えている。

E. 結論

創薬探索における遺伝子解析情報と臨床情報を有機的に関連付け、iPS 細胞のバイオリソースとしてより一層の付加価値を生み出すための体制を実現化し、創薬探索、薬剤スクリーニング体制の構築が可能となる。ヒト iPS 細胞を用いた in vitro 毒性評価系の開発成果として実用性・汎用性の高い新規毒性評価系が構築され、将来はそれを基に薬事法上の新薬承認審査に反映させる毒性ガイドライン作成及び世界の主要な新薬開発国が参加する ICH のグローバル・スタンダードへ発展させる事が可能となる。本プロジェクトで得られる分化誘導技術、iPS 細胞由来のモデル細胞、モデル細胞を用いたスクリーニング系、スクリーニングで得られた薬物毒性データベースなどの研究成果により、医薬品開発段階における大幅な開発効率の向上が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukawatase Y, Toyoda M, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Higuchi A, Takubo K, **Umezawa A**. Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability. *Sci Rep*. 4:5421, 2014.
2. Takeuchi M, Higashino A, Takeuchi K, Hori Y, Koshiba-Takeuchi K, Makino H, Monobe Y, Kishida M, Adachi J, Takeuchi J, Tomonaga T, **Umezawa A**, Kameoka Y, Akagi K. Transcriptional Dynamics of Immortalized Human Mesenchymal Stem Cells during Transformation. *PLoS One*. 10(5):e0126562, 2015.
3. Akutsu H, Machida M, Kanzaki S, Sugawara T, Ohkura T, Nakamura N, Yamazaki-Inoue M, Miura T, Vemuri MC, Rao MS, Miyado K, **Umezawa A**. Xenogeneic-free defined conditions for derivation and expansion of human embryonic stem cells with mesenchymal stem cells. *Regenerative Therapy*. 1:18-29, 2015.
4. Watada Y, Yamashita D, Toyoda M, Tsuchiya K, Hida N, Tanimoto A, Ogawa K, Kanzaki S, **Umezawa A**. Magnetic resonance monitoring of superparamagnetic iron oxide (SPIO)-labeled stem cells transplanted into the inner ear. *Neurosci Res*. 95:21-26, 2015.
5. Mizutani T, Kawabe S, Ishikane S, Imamichi Y, **Umezawa A**, Miyamoto K. Identification of novel steroidogenic factor 1 (SF-1)-target genes and components of the SF-1 nuclear complex. *Mol Cell Endocrinol*. 408:133-137, 2015.
6. Lu S, Kanekura K, Hara T, Mahadevan J, Spears LD, Oslowski CM, Martinez R, Yamazaki-Inoue M, Toyoda M, Neilson A, Blanner P, Brown CM, Semenkovich CF, Marshall BA, Hershey T, **Umezawa A**, Greer PA, Urano F. A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(49):E5292-301, 2014.
7. Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggen K, Akutsu H, **Umezawa A**. The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. *Nat Commun*. 5: 5464, 2014.

8. Higuchi A, Ling QD, Kumar SS, Munusamy MA, Alarfaj AA, Chang Y, Kao SH, Lin KC, Wang HC, **Umezawa A**. Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material. *Lab Invest.* 95(1):26-42, 2015.
9. Inoue T, **Umezawa A**, Takenaka T, Suzuki H, Okada H. The contribution of epithelial-mesenchymal transition to renal fibrosis differs among kidney disease models. *Kidney Int.* 87(1):233-238, 2015.
10. Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, **Umezawa A**, Sato Y. A novel in vitro method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One.* 9(10):e110496, 2014.
11. Ninomiya E, Hattori T, Toyoda M, **Umezawa A**, Hamazaki T, Shintaku H. Glucocorticoids promote neural progenitor cell proliferation derived from human induced pluripotent stem cells. *Springerplus.* 3:527, 2014.
12. Nishi M, Akutsu H, Kudoh A, Kimura H, Yamamoto N, **Umezawa A**, Lee SW, Ryo A. Induced cancer stem-like cells as a model for biological screening and discovery of agents targeting phenotypic traits of cancer stem cell. *Oncotarget.* 5(18):8665-8680, 2014.
13. Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, **Umezawa A**, Terada N. A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples. *Lab Invest.* 95(1):4-13, 2014.
14. Okamoto N, Aoto T, Uhara H, Yamazaki S, Akutsu H, **Umezawa A**, Nakauchi H, Miyachi Y, Saida T, Nishimura EK. A melanocyte--melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27(6):1039-1050, 2014.
15. Izumi Y, Suzuki E, Kanzaki S, Yatsuga S, Kinjo S, Igarashi M, Maruyama T, Sano S, Horikawa R, Sato N, Nakabayashi K, Hata K, **Umezawa A**, Ogata T, Yoshimura Y, Fukami M. Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril.* 102(4):1130-1136.e3, 2014.
16. Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, **Umezawa A**, Katayama I, Takeda J. Removal of reprogramming transgenes improves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 3(9):992-1001, 2014.
17. Ichida JK, TCW J, Williams LA, Carter AC, Shi Y, Moura MT, Ziller M, Singh S, Amabile G, Bock C, **Umezawa A**, Rubin LL, Bradner JE, Akutsu H, Meissner A, Eggan K. Notch inhibition allows oncogene-independent generation of iPS cells. *Nat Chem Biol.* 10(8):632-639, 2014.
18. Toyoda M, **Umezawa A**. Stem cells bond our organs/tissues and engineering products. *Circ J.* 78(7):1582-1583, 2014.
19. Migita O, Maehara K, Kamura H, Miyakoshi K, Tanaka M, Morokuma S, Fukushima K, Shimamoto T, Saito S, Sago H, Nishihama K, Abe K, Nakabayashi K, **Umezawa A**, Okamura K, Hata K. Compilation of copy number variants identified in phenotypically normal and parous Japanese women. *J Hum Genet.* 59(6):326-331, 2014.
20. Yazawa T, Imamichi Y, Miyamoto K, **Umezawa A**, Taniguchi T. Differentiation of mesenchymal stem cells into gonad and adrenal steroidogenic cells. *World J Stem Cells.* 6(2):203-212, 2014.
21. Kawano N, Miyado K, Yoshii N, Kanai S, Saito H, Miyado M, Inagaki N, Odawara Y, Hamatani T, **Umezawa A**. Absence of CD9 reduces endometrial VEGF secretion and impairs uterine repair after parturition. *Sci Rep.* 4:4701, 2014.
22. Sugawara K, Hamatani T, Yamada M, Ogawa S, Kamijo S, Kuji N, Akutsu H, Miyado K, Yoshimura Y, **Umezawa A**. Derivation of human decidua-like cells from amnion and menstrual blood. *Sci Rep.* 4:4599, 2014.
23. Kami D, Kitani T, Kishida T, Mazda O, Toyoda M, Tomitaka A, Ota S, Ishii R, Takemura Y, Watanabe M, **Umezawa A**, Gojo S. Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer. *Nanomedicine.* 10(6):1165-1174, 2014.
24. Kawano N, Araki N, Yoshida K, Hibino T, Ohnami N, Makino M, Kanai S, Hasuwa H, Yoshida M, Miyado K, **Umezawa A**. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111(11):4145-4150, 2014.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告書

iPS 細胞の由来疾患に関する臨床情報の収集

研究分担者：松原洋一

独立行政法人国立成育医療研究センター 研究所長

研究要旨： iPS 細胞の由来疾患に関する臨床情報を収集する。特に創薬に用いる難病等の患者由来の iPS 細胞等を利用し、疾患に対する創薬シーズを探索する体制の構築する。特に毛細血管拡張性運動失調症（Ataxia telangiectasia:AT）を始め、Bloom 症候群、Cockayne 症候群、Xeroderma pigmentosus 等を中心に情報収集を展開する。（独）国立成育医療研究センターの特色を生かし、稀少疾患である「遺伝子修復に係る遺伝子に変異を伴う疾患」についての iPS 細胞を樹立し、創薬シーズを探索する。

A. 研究目的

iPS細胞の由来疾患に関する臨床情報を収集する。特に創薬に用いる難病等の患者由来のiPS細胞等を利用し、疾患に対する創薬シーズを探索する体制の構築する。特に毛細血管拡張性運動失調症（Ataxia telangiectasia:AT）を始め、Bloom症候群、Cockayne症候群、Xeroderma pigmentosus等を中心に情報収集を展開する。（独）国立成育医療研究センターの特色を生かし、稀少疾患である「遺伝子修復に係る遺伝子に変異を伴う疾患」についてのiPS細胞を樹立し、創薬シーズを探索する。

B. 研究方法

毛細血管拡張性運動失調症（Ataxia telangiectasia:AT）を始め、Bloom症候群、Cockayne症候群、Xeroderma pigmentosus等の細胞に関する情報を適切に入手し、その病態と疾患由来iPS細胞の情報にかかる連関を明らかにする。

（倫理面への配慮）

1. 本研究の倫理面での特徴とその対策

本研究の対象疾患は、すでにiPS細胞の樹立および創薬探索のための遺伝子解析に必要な倫理申請を国立成育医療研究センターの倫理委員会に行い、承認を得ている。また、一部の研究は、次世代シーケンサーを用いた包括的網羅的遺伝子配列解析についても承認を得ている（国立成育医療研究センター倫理委員会 受付番号374）。未承認の解析

対象疾患は、改めて包括的網羅的遺伝子配列解析を行う旨を倫理申請し、提供者の再同意を得た後に遺伝子解析を行う。外部の医療機関から臨床検体の提供を受ける際は、双方の機関の倫理委員会に申請を行い、全ての研究を適正に遂行する。

創薬探索のための次世代配列解析を行うに当たっては、網羅的配列解析に対する包括的同意を得る必要があるが、加えて本研究の検体提供者は、ほとんどが未成年者であり、代諾により同意を得るという特異性を伴う。この点に関しては、特段の配慮と検討を行い、決して拙速な結論に至らぬよう、十分な社会的合意のもとに研究を進めていく必要がある。前述のバイオバンク事業の推進の為に、すでに6つのナショナルセンターが合同で、これらの倫理的問題の取り扱いの検討作業を共同で開始しており、これらの作業と協調し、適正かつ厳格な倫理面の運用の枠組みを作成する。

また、当センターでは、定期的（年2回以上）に生命倫理に関する講演を開催し、申請者のみならず大部分のセンター医師・研究者が受講しており、適切な生命倫理観を身につける事に機関として努力を払っている。

2. 難治性疾患を取り扱うための倫理的配慮

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究、遺伝子解析、臨床研究が予定されているので、機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。成育医療研究センターでは、下記の倫理申請が既に承認されており、遺伝子解析研究を行う際の倫理的な手続きに関

しては十分な配慮がなされている。また、包括的網羅的遺伝子配列解析についても、必要に応じて追加申請を行う。

- 受付番号39 : 先天奇形症候群の遺伝子解析
- 受付番号234 : 子宮内胎児発育異常の遺伝子・ゲノム解析
- 受付番号350 : 先天性代謝異常症および自己免疫性肝炎、劇症肝炎、突発性門脈圧亢進症、肝外門脈閉塞症、Budd-Chiari症候群、肝内結石症、肝内胆管傷害等の病態解明と患者に由来する生体試料の収集・バンク化
- 受付番号351 : ヒト神経組織・細胞の保存及びそれを用いた遺伝子解析
- 受付番号362 : アトピー性皮膚炎、尋常性魚鱗癬における皮膚バリア機能遺伝子変異の解析
- 受付番号365 : 新生児、乳児消化管アレルギー（Food-Protein Induced Enterocolitis Syndrome；N-FPIES）の診断検査法開発、病態解明に関する研究
- 受付番号371 : 新生児、乳児消化管アレルギー（Food-Protein Induced Enterocolitis Syndrome；N-FPIES）の病態解析のための患者登録システムの開発と発症頻度に関する研究
- 受付番号372 : 先天代謝異常症に関する研究
- 受付番号374 : 肥厚性皮膚骨膜炎における原因遺伝子変異の検索
- 受付番号379 : リンパ管腫に関する基盤研究
- 受付番号382 : Rubinstein-Taybi症候群の臨床診断基準の策定と新基準のもと

づく有病率に関する調査

- 受付番号391 : X染色体の数的・構造的異常に起因する疾患におけるX染色体からの遺伝子発現解析
- 受付番号394 : 小児におけるリウマチ性・自己免疫性疾患の病態にかかわる遺伝子機能解析
- 受付番号396 : ヒト肝細胞・組織を用いた創薬研究および肝疾患・病態に関する基礎研究
- 受付番号398 : アレルギー発症機序の解明に向けたアレルギー出生コホート研究と免疫ヒト化マウス作製
- 受付番号399 : 自然免疫異常により発症するNEMO異常症ならびに慢性肉芽腫症における難治性腸炎の全国実態調査
- 受付番号406 : 早産のゲノム疫学研究
- 受付番号410 : 肝移植後のEBウイルス関連リンパ増殖性疾患に関する研究
- 受付番号435 : 不育症における原因遺伝子のゲノムワイド関連解析
- 受付番号440 : 新生児および乳幼児肝血管腫に対する研究
- 受付番号454 : ダウン症者の退行症状に関する横断調査

3. 対照となるヒトES細胞に関する倫理

国立成育医療研究センターでは「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づきヒトES細胞に関する医学研究が適正に行われるよう、ヒトES細胞研究倫理審査委員会が組織されている。ヒトES細胞研究に関する各種規程（「ヒトES細胞研究倫理審査委員会規程」、「ヒトES細胞樹立に関する規程」、「ヒトES細胞分配に関する規程」、「ヒトES細胞使用に関する規程」）も整備され、機関全体として生命倫理及び医の倫理に基づき適切に行う（国立成育医療センター

ヒトES細胞研究倫理審査委員会: <http://www.ncchd.go.jp/essaibou/es.htm>)。申請者らは、当該センターが定期的（年2回以上）に開催している生命倫理に関する講演を受講し、適切な生命倫理観を身につけ常に配慮し研究を実施する。

国立成育医療センター研究所(機関内番号 ES倫2)

文部科学大臣確認番号:18諸文科振第832号

4. 正常ヒトiPS細胞の樹立および取り扱いに関する倫理

倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療研究センター受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認、受付番号 197、平成 18 年 6 月承認、受付番号 201、237、238、平成 19 年 6 月承認）。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないよう、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う予定である。

5. 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号 2003-002,2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

1. 疾患特異的多能性幹細胞は、これまでに適切なモデルがなく、患者数が非常に少ないために臨

床研究が遅れている希少難病疾患の病態解明や新規治療法の開発へとつながることが期待されている。

2. 毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia telangiectasia:AT)について

細胞のDNAは様々な内在性因子および環境因子により絶えず損傷を受けている。その頻度は一日に一万回にも及ぶと考えられており、DNA 損傷修復系は細胞の恒常性を保つ上で最も重要な仕組みの 1 つである。DNA 損傷を認識・修復しゲノムの安定性を保つ機構は細胞の癌化を防ぐうえでも非常に重要な役割を担っている。これまでに DNA 修復の異常に基づく疾患としては AT の他 Nijmegen breakage syndrome (NBS)や AT-like disorder(ATLD)、BRCA1/2 familial breast/ovarian cancer syndromes などが知られており、いずれも高発癌性を示すことが知られている。本研究で注目している AT は進行性小脳変性運動失調を初発兆候として、免疫不全、高頻度の腫瘍発生、毛細血管拡張、早老など多様な症状を呈する常染色体劣性遺伝の遺伝性疾患である。また γ 線をはじめとする放射線に対する感受性が高く、転座などの染色体異常が高頻度に見られる。この疾患の原因遺伝子は染色体 11q23 に存在する細胞内情報伝達に関与する ATM 遺伝子であることが分かっている。ATM は DNA 損傷により活性化されて DNA 損傷修復に関与するほか、細胞周期、アポトーシスなどを制御している。適切なプロセスを経て入手した細胞の臨床経過は以下であった。

臨床経過 (Jinrui Idengaku Zasshi 28, 1-10 (1983).)

10 歳の少年。出生時の体重は 2500 グラム。生後 14 か月にて一人歩き。2 歳のとき、両親は足取りが不安定であることに気が付いた。4 歳のときに化膿性鼓室炎を患い、再発する上気道炎に罹患した。学齢に達する前に、失調性歩行の症状を

呈して、10歳時は短距離しか一人で歩行することができなかった。神経学的検査では、低反射状態、舞蹈病アテトーシス、動眼失行症と小脳性構音障害がみられた。また、毛細管拡張症が結膜で見られた。軽度精神遅滞 (IQ、72)。臨床検査では、IgA (17mg/dl) 血清値の減少と、 α -フェトプロテイン (560ng/ml) 値の著しい上昇が明らかになった。血清 IgE と IgM は正常値の範囲内であった。彼の両親はいとこ関係にあった。

3. Xeroderma pigmentosus について

色素性乾皮症 (XP) は、欧米では25万人に1人、日本では8万人に1人の割合で発症する、常染色体劣性遺伝の難治性疾患である。XPは、ヌクレオチド除去修復 (Nucleotide excision repair;NER) の欠損を伴うXPA群からXPG群とNER自体は正常であるXP variant (XPV) 群の計8つの群に分けられる。臨床症状や、疾患の重症度、症状が表れる年齢は紫外線の露光量や相補グループ、欠損箇所により様々であるが、主な臨床症状は皮膚癌と進行性の神経変性である。特に神経変性については、XPA、XPB、XPD、XPF、XPGにおける欠損が原因となり、出生時の体重、身長は正常だが、やがて進行性の小脳神経変性、進行性の聴力低下、けいれん、機能障害、発作、知的障害などが表れる。しかし興味深い事に、XPC、XPE群の患者には（過度の日焼けを除けば）神経変性は表れない。このことから、XPにおける神経変性の発病にはNERの機構の1つであるTCRの機構の重要性が示唆されている。

D. 考察

iPS 細胞技術の特徴は、ES 細胞などと比べ簡単に再現性よく様々な細胞源からそれぞれ疾患遺伝子を保持したまま幹細胞を容易に樹立できることにある。これまで各種細胞源から iPS 細胞が樹立され

てきたが、患者由来の iPS 細胞は、*in vitro* で患者の病変部位の体細胞へ分化することが可能であるという点で、疾患の発症機構あるいは病態の解明のための分子レベルでの解析が可能となり疾患の解明に向けた治療法の開発に有力な武器となると期待されている。さらに新規創薬ターゲット分子の発見や疾患モデル細胞を用いた新薬のスクリーニングにも利用できる新たなツールとしても期待できる。

E. 結論

iPS 細胞は再生医療に対しての期待が大きいが、実際に臨床応用するためには多くの課題が残されている。一方 iPS 細胞に対してもう一つ期待されるのが疾患発症機構の解明やその基づく創薬開発の分野である。iPS 細胞を用いることで *in vitro* で疾患の発症過程が再現できれば、従来の個体レベルでの解析では非常に困難であった分子レベルでの解析が可能になり、疾患に対する治療法開発や創薬開発につながっていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ogata T, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakashima S, Kato F, Fukami M, Aoki Y, **Matsubara Y**. TBX1 mutation identified by exome sequencing in a Japanese family with 22q11.2 deletion syndrome-like craniofacial features and hypocalcemia. *PLoS One*. 9(3):e91598, 2014.
2. Dragneva S, Szyszka-Niagolov M, Ivanova A, Mateva L, Izumi R, Aoki Y, **Matsubara Y**. Seven Novel Mutations in Bulgarian Patients with Acute Hepatic Porphyrrias (AHP). *JIMD Rep*. 16:57-64, 2014.
3. Inoue S, Moriya M, Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Niihori T, Oba D, Ono M, Kure S, Ogura T, **Matsubara Y**, Aoki Y. New BRAF knockin mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Hum Mol Genet*. 23(24):6553-6566, 2014.
4. Izumi R, Niihori T, Suzuki N, Sasahara Y, Rikiishi T, Nishiyama A, Nishiyama S,

- Endo K, Kato M, Warita H, Konno H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Kure S, **Matsubara Y**, Aoki Y, Aoki M. GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: a report of two siblings. *Neuromuscul Disord*. 24(12):1068-1072, 2014.
5. Nakano E, Masamune A, Niihori T, Kume K, Hamada S, Aoki Y, **Matsubara Y**, Shimosegawa T. Targeted next-generation sequencing effectively analyzed the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 60(5):1297-1307, 2015.
6. Nishi E, Mizuno S, Nanjo Y, Niihori T, Fukushima Y, **Matsubara Y**, Aoki Y, Kosho T. A novel heterozygous MAP2K1 mutation in a patient with Noonan syndrome with multiple lentigines. *Am J Med Genet A*. 167A(2):407-411, 2015.
7. Kon M, Suzuki E, Dung VC, Hasegawa Y, Mitsui T, Muroya K, Ueoka K, Igarashi N, Nagasaki K, Oto Y, Hamajima T, Yoshino K, Igarashi M, Kato-Fukui Y, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, **Matsubara Y**, Moriya K, Ogata T, Nonomura K, Fukami M. Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. *Hum Reprod*. 30(3):499-506, 2015.

2. 学会発表

1. 松原洋一. RAS-MAPK症候群 (RASopathies)をめぐって～希少疾患研究の展望. 第18回小児内分泌研究会特別講演. 2014年7月5日.
2. 松原洋一. 小児疾患の遺伝子解析～最近の進歩～. 第15回熊本内分泌代謝フォーラム. 2014年9月12日.
3. 松原洋一. 小児慢性特定疾患と遺伝子診断. 第48回日本小児内分泌学会学術集会シンポジウム. 2014年9月27日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

iPS 細胞薬剤スクリーニングに向けた薬事的有用性の明確化

研究分担者：早川 堯夫

近畿大学薬学総合研究所 所長・特任教授

研究要旨：本事業を通じ、創薬探索における遺伝子解析情報と臨床情報を有機的に関連付け、iPS 細胞のバイオリソースとしてより一層の付加価値を生み出すための体制を実現化し、創薬探索、薬剤スクリーニング体制の構築が可能となる。ヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 毒性評価系の開発成果として実用性・汎用性の高い新規毒性評価系が構築され、将来はそれを基に薬事法上の新薬承認審査に反映させる毒性ガイドライン作成及び世界の主要な新薬開発国が参加する ICH のグローバル・スタンダードへ発展させる事が可能となる。本プロジェクトで得られる分化誘導技術、iPS 細胞由来のモデル細胞、モデル細胞を用いたスクリーニング系、スクリーニングで得られた薬物毒性データベースなどの研究成果により、医薬品開発段階における大幅な開発効率の向上が期待される。

研究協力者：

森山 博由 近畿大学薬学総合研究所
先端バイオ医薬研究室
准教授
森山 麻里子 近畿大学薬学総合研究所
先端バイオ医薬研究室
研究員
近畿大学アンチエイジング
センター 特任准教授

A. 研究目的

本事業の目的は、難病等の患者由来のiPS細胞等を利用し、当該疾患に対する創薬シーズを探索する体制の構築することである。

B. 研究方法

標的細胞へのウイルス感染

今回 iPS 細胞のソースとして胎児肺組織由来繊維芽細胞(MRC5)と毛細血管拡張性運動失調症患者由来線維芽細胞(AT10S : JCRB0308)を用いた。培地はいずれも DMEM を基礎培地として FBS（終濃度 10%）と penicyrin/streptomycin(10000U/ml)を 5ml 加えた培地で培養した。感染前日に 6 穴プレートに 1×10^5 cell/well で播種し、翌日終濃度 $4 \mu\text{g/ml}$ になるように Polybrene(SIGMA)を添加しレトロウイルス液を 4 因子それぞれ $500 \mu\text{l}$ 添加した。37℃、5%CO₂ で 14 時間静置し感染させた。このときの感染効率は同様の方法で作製した EGFP ウイルス液を感染させることで確認した。

iPS 細胞のクローニングと維持培地

ウイルス液を標的細胞に添加した日を 0 日目として 5 日目にトリプシン/EDTA 液を用いて感染細胞を回収し Feeder(MEF)細胞を播種した 100mmdish に再播種した。その翌日に ES 細胞用培地に交換し、毎日半量ずつ培地交換した。(図 3) 感染後 17 日目頃から ES 細胞様コロニーが出現した。このコロニーをガラスキャピラリーで機械的にはがし取り、feeder 細胞を播種した 4 穴プレートに播種することで iPS 細胞のクローニングを行った。ES 細胞培養用培地は DMEM/F12 380ml、KSR 100ml、Penicillin - Streptomycin 5ml、Non Essential Amino Acids (NEAA) 5ml、Sodium Pyruvate 5ml、Glutamine (GlutaMAX) 5ml、 β -mercaptoethanol $500 \mu\text{l}$ 、bFGF（終濃度 10ng/ml)の組成のものを用いた。継代には主に StemPro EZPassage を用いた。

ヒト iPS 細胞の特性解析

RT-qPCR によって幹細胞未分化マーカーである遺伝子(OCT3/4、SOX2、NANOG、DNMT3B)および ES 細胞で高発現している KLF4 と c-MYC、幹細胞や不死化細胞で発現が認められる hTERT の発現量をヒト ES 細胞の発現量を基準に定量した。

また、免疫組織化学染色で幹細胞未分化マーカーである遺伝子(OCT3/4、SOX2、NANOG、SSS4、TRA1-60)の発現を評価した。

(倫理面への配慮)

本分担研究課題では、倫理面に係る研究実施ならびに懸案事項は発生しない。

本研究は、近畿大学薬学総合研究所の動物実験指針、研究倫理審査委員会規程等にある倫理面の審査・承認に係る一切の研究項目に該当しない。また、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞及びヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞由来 iPS 細胞はヒト検体より得られるが、検体提供元での倫理委員会にて近畿大学薬学総合研究所との共同研究を明記した倫理審査で研究が認められている。また、今回の研究実施用途から考えて、上述以上、特段に倫理面への配慮に該当するような事項はないと考えられる。

C. 研究結果

iPS 細胞の樹立

毛細血管拡張性運動失調症患者由来線維芽細胞の 4 株について RT-qPCR と免疫組織化学染色を行った結果、いずれも未分化能性を有していることが分かった。また同細胞株において奇形腫形成能を確認することができた。これをもって iPS 細胞と同定した。用いた株に関する RT-qPCR、免疫組織化学染色、奇形腫形成についてまとめた。またこれらの細胞株が独立したものであることはサザンブロッティングにおける 4 プローブ (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) において外来遺伝子挿入数の違いを検出することで確認した。

長期培養における iPS 細胞の未分化能性と多能性解析

iPS 細胞をモデル細胞として用いるためには iPS 細胞が性質を維持したまま安定に培養できる必要がある。そこで ATiPS 細胞 4 株 (ATiPS26-2、ATiPS26-3、ATiPS26-4、ATiPS2-4) を長期培養し RT-qPCR による未分化マーカーの発現定量による未分化能性の検定と奇形腫形成による多分化能性の検定を行った。RT-qPCR では継代数 13~23 を初期、40 を中期、60 を長期として ES 細胞を基準として遺伝子発現量を比較した。その結果 MRCiPS 細胞では継代数初期の未分化マーカーの発現量と比較すると継代を重ねるにつれて右肩下なりに発現が低下することが分かった

D. 考察

iPS 細胞は再生医療の細胞ソースばかりでなく創薬応用や難治性疾患の発症機構解明など様々な場面で期待されている。iPS 細胞の登場以来数多くの研究が報告されているが、体細胞から多能性幹細胞へのリプログラミング過程、未分化性を安定的に維持するのに関与する分

子やその機構についてはほとんどわかっていない。一方で ATM 遺伝子は難治性疾患である AT の原因遺伝子であり DNA 修復機構に重要な役割を担っている。(ref)さらに細胞周期、DNA 損傷応答アポトーシスなど様々な過程におけるキー分子として知られている。そこで本研究では AT 患者由来の細胞から iPS 細胞を作成することでリプログラミング過程や未分化性維持過程における ATM の機能について解析した。これらの実験系を用いて iPS 細胞薬剤スクリーニング系を構築することは可能であり、難治性疾患に対する薬剤スクリーニングに応用していく。

E. 結論

毛細血管拡張性運動失調症患者由来線維芽細胞の核型はその半数で染色体異常が起こっており、AT 患者の特徴である高頻度での染色体異常発生を再現していた。一方、樹立された iPS 細胞 10 株のうち 9 株について核型解析を行うと 6 株が正常な核型を有していたことを考えると、iPS 細胞は正常な核型を有する体細胞からでなければ効率的に樹立することが難しいと考えられた。このことが樹立効率の低さと関係しているかもしれない。ただそれを考慮しても効率が低いことから、ATM がリプログラミング過程で何らかの役割を担っていることが示唆された。これらの実験系を用いて iPS 細胞薬剤スクリーニング系を構築することは可能であり、難治性疾患に対する薬剤スクリーニングに応用していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takao Hayakawa, Takashi Aoi, Akihiro Umezawa, Keiya Ozawa, Yoji Sato, Yoshiki Sawa, Akifumi Matsuyama, Shinya Yamanaka, and Masayuki Yamato. Study on Ensuring the Quality and Safety of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from the Processing of Autologous Human Somatic Stem Cells. Regenerative Therapy 2015 in press.
2. Takao Hayakawa, Takashi Aoi, Akihiro Umezawa, Keiya Ozawa, Yoji Sato, Yoshiki Sawa, Akifumi Matsuyama, Shinya Yamanaka, and Masayuki Yamato. Study on Ensuring the Quality and Safety of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from the Processing of Allogenic Human Somatic Stem Cells. Regenerative Therapy 2015 in press.
3. Takao Hayakawa, Takashi Aoi, Akihiro

- Umezawa, Keiya Ozawa, Yoji Sato, Yoshiki Sawa, Akifumi Matsuyama, Shinya Yamanaka, and Masayuki Yamato. Study on Ensuring the Quality and Safety of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from Processing of Autologous Human Induced Pluripotent Stem Cell (-Like Cells). Regenerative Therapy 2015 in press.
4. Takao Hayakawa, Takashi Aoi, Akihiro Umezawa, Keiya Ozawa, Yoji Sato, Yoshiki Sawa, Akifumi Matsuyama, Shinya Yamanaka, and Masayuki Yamato. Study on Ensuring the Quality and Safety of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from Processing of Allogenic Human Induced Pluripotent Stem Cell (-Like Cells). Regenerative Therapy 2015 in press.
 5. Takao Hayakawa, Takashi Aoi, Akihiro Umezawa, Keiya Ozawa, Yoji Sato, Yoshiki Sawa, Akifumi Matsuyama, Shinya Yamanaka, and Masayuki Yamato. Study on Ensuring the Safety and Quality of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from the Processing of Human Embryonic Stem Cells. Regenerative Therapy 2015 in press.
 6. Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, Ishihara S, Okura H, Ichinose A, Ozawa T, Matsuyama A, Hayakawa T. Role of notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *Stem Cells Dev.* 2014 Sep 15;23(18):2211-24.
 7. Moriyama M, Moriyama H, Uda J, Matsuyama A, Osawa M, Hayakawa T. BNIP3 plays crucial roles in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2014 Jun;134(6):1627-35.
 8. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Inamura M, Ohashi K, Okuno H, Yamaguchi T, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Okano T, Furue MK, Mizuguchi H. CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF β receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision. *Development.* 2014 Jan;141(1):91-100.
 9. Yagi Y, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Application of microchip electrophoresis sodium dodecyl sulfate for the evaluation of change of degradation species of therapeutic antibodies in stability testing. *Anal Sci.* 2014;30(4):483-8.
 10. Toshio Morikawa, Kiyofumi Ninomiya, Katsuya Imura, Takahiro Yamaguchi, Yoshinori Akagi, Masayuki Yoshikawa, Takao Hayakawa, Osamu Muraoka, Hepatoprotective triterpenes from traditional Tibetan medicine *Potentilla anserina*. *Phytochemistry*, 102, 169—181 (2014).
 11. Toshio Morikawa, Yusuke Nakanishi, Kiyofumi Ninomiya, Hisashi Matsuda, Souichi Nakashima, Hisako Miki, Yu Miyashita, Masayuki Yoshikawa, Takao Hayakawa, Osamu Muraoka, Dimeric pyrrolidinoindoline-type alkaloids with melanogenesis inhibitory activity in flower buds of *Chimonanthus praecox*. *J. Nat. Med.*, 68, 539—549 (2014).
- ## 2. 学会発表
1. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露を介する脂肪由来間葉系幹細胞のドーパミン産生細胞分化誘導. Mar, 4-6, 2014. 第13回日本再生医療学会総会. 京都.
 2. Mariko Moriyama, Junki Uda, Hiroyuki Moriyama, Akifumi Matsuyama, Masatake Osawa, Takao Hayakawa. オートファジー関連分子 BNIP3は、表皮分化ならびに表皮形態維持に重要な働きをする. Mar 4-6, 2014. 第13回日本再生医療学会総会. 京都.
 3. 森山麻里子, 宇田純輝, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. オートファジーと皮膚構築. 皮膚の会（総会）, Mar 15-16, 2014. 松山.
 4. 森山博由. 再生医療を照らす脂肪由来幹細胞の製造法と派生効果. 5/14～5/16, 2014, BIO tech 2014 -国際バイオテクノロジー展/技術会議-アカデミックフォーラム. 東京
 5. Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ueda Ayaka, Nishibata Yusuke, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. ROLE OF NOTCH SIGNALING IN THE MAINTENANCE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER HYPOXIC CONDITIONS. June 18 – 21, 2014, 12th ISSCR at Vancouver, CANADA.
 6. Uda Junki, Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Osawa Masatake, Hayakawa Takao. BNIP3 PLAYS CRUCIAL ROLES IN THE

- DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. June 18 – 21, 2014, 12th ISSCR at Vancouver, CANADA.
7. Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Sawaragi Kei, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. Development of a single tet-off lentiviral vector system with tightly regulated and homogeneous expression of target genes in human adipose-derived mesenchymal stem cells. June 18 – 21, 2014, 12th ISSCR at Vancouver, CANADA.
 8. Ohmori Shigenari, Taniguchi Yuki, Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Hayakawa Takao. DIFFERENTIATION OF DOPAMINERGIC NEURONAL CELLS FROM HUMAN ADIPOSE-DERIVED MULTILINEAGE PROGENITOR CELLS. June 18 – 21, 2014, 12th ISSCR at Vancouver, CANADA.
 9. 大森重成、森山麻里子、谷口祐紀、深瀬堯哉、松山晃文、早川堯夫、森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPc)を用いたドパミン産生細胞への誘導法の確立. 2014年8月28～29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
 10. 大森重成、森山麻里子、谷口祐紀、深瀬堯哉、松山晃文、早川堯夫、森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPc)を用いたドパミン産生細胞への誘導法の確立. 2014年8月28～29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
 11. 河野真有香、森山麻里子、中北和樹、早川堯夫、森山博由. 幹細胞資材におけるウイルス混入及び残存試験法確立を目的とした高感度・高精度な新規核酸増幅基盤技術開発. 2014年8月28～29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
 12. 谷口祐紀、森山麻里子、大森重成、早川堯夫、森山博由. キンドラー症候群患者由来ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPc)より樹立したiPS細胞の皮膚ケラチノサイトへの分化誘導法確立. 2014年8月28～29日生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
 13. 山田 翼、森山麻里子、宇田純輝、森山博由、早川堯夫. BCL-2ファミリー分子BNIP3が表皮分化および表皮形態維持に及ぼす影響. 2014年8月28～29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
 14. 百合祐樹、森山麻里子、森山博由、早川堯夫. 新規ヒト脂肪組織由来多能性前駆細胞に存在するOCT4陽性細胞は真の多能性幹細胞たりうるのか?. 2014年8月28～29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
 15. 石原慎、森山麻里子、阪口公一、石濱里穂、大倉華雪、松山晃文、早川堯夫、森山博由. 低酸素状態におけるNotchシグナルと解糖系の関係. 2014年8月28～29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
 16. 曾根千晶、森山麻里子、大倉華雪、松山晃文、早川堯夫、森山博由. 新規ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPc)を用いたインスリン産生細胞の作製. 2014年8月28～29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
 17. Tadashi Michiyama, Horoyuki Moriyama, Mario Moriyama, Takao Hayakawa, Kiyofumi Ninomiya, Osamu Muraoka, Saowanee Chaipech, Toshio Morikawa. Inhibitory effects of oligostilbenoids from bark of Shorea roxburghii on malignant melanoma cell growth: implications for a candidate of novel topical anticancer agents. The 27th International Conference on Polyphenols (ICP2014), (Nagoya, Japan), 2014.9.
 18. MARIKO MORIYAMA, JUNKI UDA, MASATAKE OSAWA, TAKAO HAYAKAWA, HIROYUKI MORIYAMA. BNIP3 Plays Crucial Roles in the Differentiation and Maintenance of Epidermal Keratinocytes. Sept 11-15, 2014. European society for dermatological research (ESDR). Copenhagen, Danmark.
 19. JUNKI UDA, MARIKO MORIYAMA, MASATAKE OSAWA, TAKAO HAYAKAWA, HIROYUKI MORIYAMA. BNIP3 PLAYS CRUCIAL ROLES IN THE

- DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. Sept 22-26, 2014. Austrarian society for Dermatology Research (ASDR). Sydney, Australia.
20. ○宇田純輝, 森山麻里子, 北川綾弓, 野村昇吾, 早川堯夫, 森山博由. Bcl-2ファミリー分子BNIP3が表皮構築に及ぼす影響. 第64回 日本薬学会近畿支部総会・大会. [口頭発表] 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
 21. 雨宮有佑, 北野亮介, 古谷圭史, 村上健太, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. 日本の新薬承認格差の現状とその打開策についての検討. [ポスター発表] 第64回 日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
 22. 山田翼, 森山麻里子, 宇田純輝, 早川堯夫, 森山博由. BCL-2ファミリー分子BNIP3と表皮分化および形態維持機構との関連性. [ポスター発表] 第64回 日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
 23. 石原慎, 森山麻里子, 阪口公一, 上村充香, 大石実央, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 低酸素状態におけるNotchシグナルと解糖系の相関性. [ポスター発表] 第64回 日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
 24. 石濱里穂, 森山麻里子, 鈴木格, 早川堯夫, 森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたメラノサイトの作製. [ポスター発表] 第64回 日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
 25. 曾根千晶, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 新規ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたインスリン産生細胞の作成. [ポスター発表] 第64回 日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
 26. 大森重成, 森山麻里子, 谷口祐紀, 深瀬堯哉, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたドパミン産生細胞への誘導法の確立. [ポスター発表] 第64回 日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
 27. 道山 忠史, 森山 麻里子, 二宮 清文, Saowanee Chaipech, 村岡 修, 森川 敏生, 早川 堯夫, 森山 博由. 悪性黒色腫細胞に対するShorea roxburghii 由来オリゴスチルベノイドの影響. 第64回 日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
 28. 北野亮介, 雨宮有佑, 古谷圭史, 村上健太, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. 再生医療製品実用化における規制制度の課題について. [ポスター発表] 第64回 日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
 29. 野村昇吾, 森山麻里子, 宇田純輝, 早川堯夫, 森山博由. 表皮構築過程におけるFoxo3aの関与. [ポスター発表] 第64回 日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
 30. 森山 麻里子, 宇田 純輝, 石濱 里穂, 大森 重成, 石原 慎, 曾根 千晶, 谷口 祐紀, 百合 祐樹, 早川 堯夫, 森山 博由. 「贅肉は贅沢!? ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞の魅力」 【講演】 Nov 23, 2014, 第5回生命機能研究会, 甲南大学ポートアイランドキャンパス, 神戸.
 31. 宇田 純輝, 森山 麻里子, 早川 堯夫, 森山 博由. オートファジー制御関連分子BNIP3は表皮分化ならびに表皮形態維持に重要な働きをする. [口頭発表] Nov 23, 2014, 第5回生命機能研究会, 甲南大学ポートアイランドキャンパス, 神戸. [最優秀口頭発表賞受賞]
 32. 大森重成, 森山麻里子, 谷口祐紀, 深瀬堯哉, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたドパミン産生細胞への誘導法の確立. [ポスター発表] Nov 23, 2014, 第5回生命機能研究会, 甲南大学ポートアイランドキャンパス, 神戸.
 33. 石濱里穂, 森山麻里子, 鈴木格, 早川堯夫, 森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたメラノサイトの作製. [ポスター発表] Nov 23, 2014, 第5回生命機能研究会, 甲南大学ポートアイランドキャンパス, 神戸.
 34. 百合祐樹, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. 新規ヒト脂肪組織由来多能性前駆細胞に存在するOCT4陽性細胞は真の多能性幹細胞たりうるのか? 【ポスター発表] Nov 23, 2014, 第5回生命機能研究