

Thrombopoietin/MPL signaling confers growth and survival capacity to CD41-positive cells in a mouse model of Evi1 leukemia. *Blood* 124:3587-3596, 2014

●Kagoya Y, Yoshimi A, Tsuruta-Kishino T, Arai S, Satoh T, Akira S, Kurokawa M. JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasm clones evoke paracrine DNA damage to adjacent normal cells through secretion of lipocalin-2. *Blood* 124:2996-3006, 2014

●Sato T, Goyama S, Kataoka K, Nasu R, Tsuruta-Kishino T, Kagoya Y, Nukina A, Kumagai K, Kubota N, Nakagawa M, Arai S, Yoshimi A, Honda H, Kadowaki T, Kurokawa M. Evi1 defines leukemia-initiating capacity and tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia. *Oncogene* 33:5028-5038, 2014

●Shinohara A, Imai Y, Nakagawa M, Takahashi T, Ichikawa M, and Kurokawa M. Intracellular reactive oxygen species mark and influence the megakaryocyte-erythrocyte progenitor fate of common myeloid progenitors. *Stem Cells*. 32:548-557, 2014

●Ueda K, Yoshimi A, Kagoya Y, Nishikawa S, Marquez VE, Nakagawa M, Kurokawa M. Inhibition of histone methyltransferase EZH2 depletes leukemia stem cell of mixed lineage leukemia fusion leukemia through upregulation of p16. *Cancer Sci*. 105:512-519, 2014

●Kagoya Y, Nannya Y, Nakamura F, Kurokawa M. Gene expression profiles of central nervous system lymphoma predict poor survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 166:794-7, 2014

●Nukina A, Kagoya Y, Watanabe-Okochi N, Arai S, Ueda K, Yoshimi A, Nannya Y, Kurokawa M. Single-cell gene expression

analysis reveals clonal architecture of blast-phase chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 165(3):414-416, 2014

●Harms MJ, Ishibashi J, Wang W, Lim HW, Goyama S, Sato T, Kurokawa M, Won KJ, and Seale P. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metabolism* 19: 593-604, 2014

●Kobayashi CI, Takubo K, Kobayashi H, Nakamura-Ishizu A, Honda H, Kataoka K, Kumano K, Akiyama H, Sudo T, Kurokawa M, and Suda T. The IL-2/CD25 axis maintains distinct subsets of chronic myeloid leukemia-initiating cells. *Blood* 123:2540-2549, 2014

●Tanaka M, Suzuki HI, Shibahara J, Kunita A, Isagawa T, Yoshimi A, Kurokawa M, Miyazono K, Aburatani H, Ishikawa S, Fukayama M. EVI1 oncogene promotes KRAS pathway through suppression of microRNA-96 in pancreatic carcinogenesis. *Oncogene* 33: 2454-2463, 2014

●Little JL, Serzhanova V, Izumchenko E, Egleston BL, Parise E, Klein-Szanto AJ, Loudon G, Shubina M, Seo S, Kurokawa M, Ochs MF, and Golemis EA. A requirement for Nedd9 in luminal progenitor cells prior to mammary tumorigenesis in MMTV-HER2/ErbB2 mice. *Oncogene* 33:411-420, 2014

●Riccomagno MM, Sun LO, Brady CM, Alexandropoulos K, Seo S, Kurokawa M, and Kolodkin AL. Cas adaptor proteins organize the retinal ganglion cell layer downstream of integrin signaling. *Neuron* 81: 779-786, 2014

2. 学会発表

<国際学会>

●Mineo Kurokawa, Akihide Yoshimi, Masashi

Miyauchi, Tomohiko Sato, Keiki Kumano. Generation of iPSC from primary CML patient samples. (Oral) 16th Annual John Goldman Conference on Chronic Myeloid Leukemia: Biology and Therapy, September 4-7, 2014, Philadelphia, USA.

●Akihide Yoshimi, Takashi Toya, Masahito Kawazu, Toshihide Ueno, Ayato Tsukamoto, Hiromitsu Iizuka, Masahiro Nakagawa, Yasuhito Nannya, Shunya Arai, Motoshi Ichikawa, Hironori Harada, Kensuke Usuki, Yasuhide Hayashi, Etsuro Ito, Keita Kirito, Hideaki Nakajima, Hiroyuki Mano, Mineo Kurokawa. Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML. (Oral) American Association for Cancer Research 2014, April 5-9, 2014, San Diego, USA.

●Tomohiko Sato, Susumu Goyama, Keisuke Kataoka, Ryo Nasu, Takako Tsuruta-Kishino, Yuki Kagoya, Arika Nukina, Katsuyoshi Kumagai, Naoto Kubota, Masahiro Nakagawa, Shunya Arai, Akihide Yoshimi, Hiroaki Honda, Takashi Kadowaki and Mineo Kurokawa. Evi1 Defines Leukemia-initiating Capacity and Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. (Poster) American Association for Cancer Research 2014, April 5-9, 2014, San Diego, USA.

●Uni M, Kagoya Y, Nannya Y, Nakamura F, and Kurokawa M. Central Nervous System Relapse in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Analysis of Incidence and Prognostic Factors. (Poster) 56th ASH Annual Meeting and Exposition, December 6-9, 2014, San Francisco, CA, USA.

●Morita K, Masamoto Y, Kagoya Y, Kataoka

K, Koya J, Yashiroda H, Sato T, Murata S and Kurokawa M. BAALC promotes leukemogenesis by balancing MEK/ERK-dependent proliferation with KLF4-derived differentiation block (Poster) 12th ISSCR Annual Meeting, June 20, 2014, Vancouver, Canada.

●Yosuke Masamoto, Shunya Arai, Tomohiko Sato, Akihide Yoshimi, Iseki Takamoto, Naoto Kubota, Yoichiro Iwakura, Takashi Kadowaki, Mineo Kurokawa. Anti-obese hormone Adiponectin regulates emergency hematopoiesis and antibacterial response through suppression of TNF- α production in bone marrow and downregulation of Socs3 in hematopoietic stem/progenitor cells. (Poster) 12th ISSCR Annual Meeting, 2014, June 18-21. Vancouver, Canada.

<国内学会>

●田岡 和城、荒井 俊也、細井 雅孝、中村 文彦、宮内 将、山崎 翔、本田 晃、片岡 圭亮、熊野 恵城、吉見 昭秀、江藤 浩之、中内 啓光、中畑 龍俊、黒川 峰夫。Modeling chronic myelomonocytic leukemia through patient-derived induced pluripotent stem cells. (口演) 第76回日本血液学会学術総会、大阪, 2014/10/31-11/2.

●Uni M, Nakamura F, Yamazaki S, Yoshimi A, Shinohara A, and Kurokawa M. Comparison of garenoxacin with levofloxacin as antimicrobial prophylaxis in acute myeloid leukemia. (口演) 第76回日本血液学会学術総会、大阪, 2014/10/31-11/2

●正本 庸介、荒井 俊也、佐藤 智彦、吉見 昭秀、高本 偉碩、窪田 直人、門脇 孝、黒川 峰夫。Adiponectin promotes G-CSF-induced hematopoietic stem and progenitor cell

mobilization. (口演)第76回日本血液学会学術集会. October 31- November 2, 2014, 大阪.

●宇仁 暢大、中村 文彦、山崎 翔、吉見 昭秀、篠原 明仁、黒川 峰夫. Comparison of garenoxacin with levofloxacin as antimicrobial prophylaxis in acute myeloid leukemia. (口演)第76回日本血液学会学術集会. October 31- November 2, 2014, 大阪.

●山崎 翔、中村 文彦、吉見 昭秀、黒川 峰夫. Marrow myeloid: Erythroid ratio predicts the latency of erythroid response after azacitidine therapy. (ポスター)第76回日本血液学会学術集会. October 31- November 2, 2014, 大阪.

第73回日本癌学会学術集会

●Kazuki Taoka, Shunya Arai, Masataka Hosoi, Fumihiko Nakamura, Masashi Miyachi, Sho Yamazaki, Akira Honda, Takashi Kobayashi, Keisuke Kataoka, Keiki Kumano, Akihide Yoshimi, Koji Eto, Hiromitsu Nakauchi, Tatsutoshi Nakahara,

Mineo Kurokawa. Modeling chronic myelomonocytic leukemia through patient-derived induced pluripotent stem cells. (Oral)

September 25-27, 2014, 横浜.

●森田 剣、正本庸介、籠谷勇紀、片岡圭亮、古屋 淳史、八代田英樹、佐藤智彦、村田茂穂、黒川 峰夫. BAALC promotes leukemogenesis by balancing MEK/ERK-dependent proliferation with KLF4-derived differentiation block. (口演) 第73回日本癌学会学術総会. 2014.9.26. 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況 (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」

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
「疾患由来 iPS 細胞を利用した難治性疾患の創薬研究」 分担研究報告書

iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いたヒト三次元心筋組織の再生と移植の可能性

研究分担者：小野 稔
(東京大学大学院医学系研究科心臓外科教授)

研究要旨

細胞シート工学を用いてヒト iPS 細胞より分化誘導させたヒト心筋細胞を細胞シートにし、生体内で積層化することで、機能的で移植可能なヒト心筋組織を作製する。

A. 研究目的

重症心不全治療に対する根治療法は現在、心臓移植のみである。わが国では臓器移植法改正などで社会的環境は整備されてきたが、それでも心臓移植件数は年 30 件ほどに過ぎず、ドナー心臓は圧倒的に不足しているのが現状である。近年、再生医療による細胞を用いた新しい治療法が模索されており、種々の細胞を移植することで低下した心機能を回復させれば、あるいは心筋組織そのものを構築し移植できればこの深刻なドナー不足の問題を解決できるのではないかと考えられている。その方法の一つとして、細胞シート工学を用いるものがある。細胞シートを用いることで scaffold-free な組織を構築することができる利点がある。今回、ヒト iPS 細胞から分化誘導させた心筋細胞を用いて細胞シートを作製し、生体内で積層化し、機能的な厚いヒト心筋組織の作製を目指した。

B. 研究方法

理研より購入した iPS 細胞株を用い、東京女子医科大学の松浦らの報告する方法で培養・分化させたヒト心筋細胞でヒト心筋細胞シートを作製した。
① 作製したヒト iPS 心筋細胞シートが生体内で生着するかを確認するために心筋細胞シートを 3 層に重ねたものをヌードラットの背部皮下に移植

し、2 週間後に観察した。また、長期の生着を確認するため 1 カ月おきに最長 13 か月まで観察した。
② 厚い心筋組織が構築できるかを確認するためにヌードラット皮下にシート 3 層を連続 3 日間積層して計 9 層とし、2 週後に観察した。
③ この方法で構築した心筋組織を、灌流する動脈とともに取り出し、血管吻合することで異所的に移植できるかどうか検証するために、ヌードラットの鼠径部皮下にヒト心筋細胞シート 6 層を移植し、2 週間後に移植部を灌流する大腿動脈を含めて血管付きグラフトとして摘出、別個体の頸部の動脈に吻合し、1 週間後に評価した。
(倫理面への配慮)
動物を手術する際には麻酔深度を十分に保った。犠牲死させる際も苦痛を与えないよう深麻酔下に行った。

C. 研究結果

① 移植 2 週間後に移植部位は全体が同期して肉眼的に拍動しており、電氣的にも一定の周期の電位変化を計測できた。組織学的検査により機能的血管網を伴う心筋様組織となっていることが確認された。移植後 13 カ月でも全体が同期した肉眼的拍動や電氣的活動が観察できた。電子顕微鏡で観察したところ、時間経過とともに心筋組織として成熟していくことが確認できた。

② 3層の細胞シートを連続3日間積層して計9層移植した方が3層移植よりも分厚い心筋組織ができており、機能的血管網を伴っていた。

③ 頸部への移植1週間後も全体が同期した肉眼的拍動・電位変化を認め、組織学的にも機能的な心筋組織であり、生着していることが確認できた。

D. 考察

ヒト iPS 細胞から分化誘導させた心筋細胞を細胞シートにし、積層化するには細胞シート内に効率的に機能的な毛細血管網を導入しなければならない。東京女子医科大学の清水らはラット胎児心筋細胞シートを生体内で積層化してラット心筋組織を再構築することに成功しているが、一度に構築できる心筋組織の厚さの限界は単純拡散で栄養できる 80 μm であると報告している。一方で、移植1日後には、移植した細胞シート内に毛細血管網が構築され、ホストからの血液灌流を受けていることがわかった。その上に細胞シートを重ねて移植すれば、毛細血管網がさらにホスト側から発達し、血液灌流を受けることでさらに分厚い心筋組織として生着させられることが分かっている。

この方法を踏襲することで1日たてばヒト心筋細胞シート内にも毛細血管網が構築されることがわかり、その上に細胞シートを移植すれば厚い組織が構築できることが示された。理論的には1日おきの移植を繰り返せば構築する厚さの限界は問題にならないことになる。

また、最終的な移植場所は心臓表面や心臓周囲がターゲットになるため1日おきの移植を行うには侵襲が大きく非現実的であるため、異所移植は必須となる。移植する際の吻合血管先としては、冠動脈バイパス術で用いられている内胸動脈や大網動脈が吻合動脈、動脈の伴走静脈や右房などが静脈吻合の候補になるだろう。それゆえにグラフトを作製する場所は、吻合血管の太さに見合った動脈が体表面付近を走る皮下組織が候補になるだろう。さらに細胞シート移植の侵襲を軽減するた

め、血管付きの組織を体外に取り出して灌流培養系で心筋細胞シートを積層化してグラフトを作製する方法や、流路付きのゼラチンゲルの上で心筋細胞シートを積層化する研究も行われている。

また、時間経過でヒト心筋細胞として成熟していることは重要である。生体内の環境では様々な成長因子がある程度自然に分泌される環境にある。また、自律的に心筋細胞として拍動するストレッチの効果も成熟する要因になっている可能性はある。このメカニズムが詳しく解明できれば効率よく成熟した心筋組織の作製が可能になると考えられる。

E. 結論

ヒト iPS 細胞より分化誘導させた心筋細胞を細胞シートにし、生体内で積層化することで機能的なヒト心筋組織を作製することができた。このヒト心筋組織を血管付きグラフトとして作製して、血管吻合することで目的の場所へ異所性移植できることが示された。

将来的にこの方法をスケールアップできれば分厚い成熟した機能的なヒト心筋組織を構築することができ、新しい治療法の一つとなる可能性がある。また、この成熟させた機能的なヒト心筋組織と、病的な iPS 由来ヒト心筋組織との力学的、電気生理学的な相違を解析ことによって、創薬のターゲットを見いだせる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

● Yamauchi H, Motomura N, Chung UI, Sata M, Takai D, Saito A, Ono M, Takamoto S: Growth-associated hyperphosphatemia in young recipients accelerates aortic allograft calcification in a rat model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2013; 145: 522-30

● Umeki A, Nishimura T, Ando M, Takewa Y, Yamazaki K, Kyo S, Ono M, Tsukiya T, Mizuno

T, Taenaka Y, Tatsumi E: Change of Coronary Flow by Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device With Cardiac Beat Synchronizing System (Native Heart Load Control System) in Acute Ischemic Heart Failure Model. *Circ J* 2013; 77: 995-1000

● Umeki A, Nishimura T, Takewa Y, Ando M, Arakawa M, Kishimoto Y, Tsukiya T, Mizuno T, Kyo S, Ono M, Taenaka Y, Tatsumi E: Change in myocardial oxygen consumption employing continuous-flow LVAD with cardiac beat synchronizing system in acute ischemic heart failure models. *J Artif Organs* 2013; 16: 119-128

● Ando T, Kawashima D, Kim H, Joung S, Liao H, Kobayashi E, Gojo S, Kyo S, Ono M, Sakuma I. Direct minimal-invasive intraoperative electrophysiological mapping of the heart. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2013; 22: 372-80

● Ono M, Nishimura T, Kinoshita O, Shiga T, Kinugawa K, Nagai R, Kyo S: Improved survival in patients with continuous-flow ventricular assist device for bridge to heart transplantation. *Transplant Proc* 2013; 45:2017-8

● Kimura M, Kinoshita O, Nishimura T, Imamura T, Shiga T, Kashiwa K, Kinugawa K, Kyo S, Ono M: Successful weaning from the DuraHeart with a low left ventricular ejection fraction. *J Artif Organs* 2013; 16: 504-507

● Inoue T, Kitamura T, Torii S, Hanayama N, Oka N, Itatani K, Tomoyasu T, Irisawa Y, Shibata M, Hayashi H, Ono M, Miyaji K: Five-week use of a monopivot centrifugal blood pump as a right ventricular assist device in severe dilated cardiomyopathy. *J Artif Organs*. 2014; 17: 95-98

● Imamura T, Kinugawa K, Hatano M, Fujino

T, Muraoka H, Inaba T, Maki H, Kagami Y, Endo M, Kinoshita O, Nawata K, Kyo S, Ono M: Preoperative beta-blocker treatment is a key for deciding left ventricular assist device implantation strategy as a bridge to recovery. *J Artif Organs* 2014; 17: 23-32

● Komae H, Sekine H, Dobashi I, Matsuura K, Ono M, Okano T, Shimizu T.: Three-dimensional functional human myocardial tissues fabricated from induced pluripotent stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015 Jan 28. doi: 10.1002/term.1995. [Epub ahead of print]

● Imamura T, Kinugawa K, Kato N, Muraoka H, Fujino T, Inaba T, Maki H, Kinoshita O, Hatano M, Kyo S, Ono M: Late-Onset Right Ventricular Failure in Patients With Preoperative Small Left Ventricle After Implantation of Continuous Flow Left Ventricular Assist. *Circ J* 2014; 78: 625-33.

● Fujino T, Kinugawa K, Hatano M, Imamura T, Muraoka H, Minatsuki S, Inaba T, Maki H, Kinoshita O, Nawata K, Yao A, Ono M, Komuro I: Low Blood Pressure, Low Serum Cholesterol and Anemia Predict Early Necessity of Ventricular Assist Device Implantation in Patients With Advanced Heart Failure at the Time of Referral From Non-Ventricular Assist Device Institutes. *Circ J* 2014; 78: 2882-2889.

2. 学会発表

● Komae H, Sekine H, Matsuura K, Dobashi I, Shimizu T, Ono M, Okano T: Three-dimensional beating human myocardial tissues fabricated from induced pluripotent stem cells and cell sheet technology. American Heart Association Scientific Sessions 2013, Nov 2013, Dallas, Texas, USA.

- 小前 兵衛, 関根 秀一, 土橋 泉, 松浦 勝久, 清水 達也, 小野 稔, 岡野 光夫: iPS細胞由来心筋細胞シートを用いたヒト三次元心筋組織の再生. 第4回 Molecular Cardiovascular Conference II. 2013年9月, Hokkaido
- 小前 兵衛, 関根 秀一, 土橋 泉, 松浦 勝久, 清水 達也, 小野 稔, 岡野 光夫: iPS細胞由来心筋細胞シートを用いたヒト三次元心筋組織の再生と移植の可能性: 第17回循環器再生医療研究会. 2013年11月, 東京
- 小前 兵衛, 関根 秀一, 松浦 勝久, 土橋 泉, 清水 達也, 小野 稔, 岡野 光夫: iPS細胞由来心筋細胞シートを用いたヒト三次元心筋組織の再生と移植の可能性. 第13回日本再生医療学会総会. 2014年3月, 京都
- Komae H, Matsuura K, Shimizu T, Ono M, Okano T: Three-dimensional functional human myocardial tissues fabricated from human induced pluripotent stem cells and foresight for clinical application. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2014.3, Tokyo
- 小前 兵衛, 関根 秀一, 土橋 泉, 松浦 勝久, 清水 達也, 小野 稔, 岡野 光夫: iPS細胞由来心筋細胞シートを用いたヒト三次元心筋組織の再生と移植の可能性. 第114回日本外科学会定期学術集会. 2014年4月, 京都
- Komae H, Sekine H, Dobashi I, Matsuura K, Ono M, Shimizu T, Okano T.: Successful Transplantation Of Three-Dimensional Human Myocardial Tissues Fabricated From Induced Pluripotent Stem Cells With Cell Sheet Technology. American Thoracic Society 2014, May 2014, San Diego, USA.
- 小前 兵衛, 関根 秀一, 松浦勝久, 清水達也, 小野稔: iPS細胞由来心筋細胞シートを用いたヒト三次元心筋組織の構築. 第14回再生心臓血管外科治療研究会. 2015年2月 京都
- 小野 稔, 木下 修, 木村光利, 梅木昭秀, 西村 隆, 許 俊鋭: わが国における植込み型補助人工心臓治療の最適化はいかに達成できるか? 第42回日本心臓血管外科学会学術総会. 2013年2月 東京
- 木村光利, 木下 修, 西村 隆, 内藤敬嗣, 安藤政彦, 梅木昭秀, 山内治雄, 竹谷 剛, 齋藤 綾, 師田哲郎, 本村 昇, 村上 新, 許 俊鋭, 小野 稔: 当施設における植込み型左室補助人工心臓 25例の臨床経験. 第42回日本心臓血管外科学会学術総会. 2013年2月 東京
- 小野 稔, 絹川弘一郎, 木下 修, 木村光利, 札 琢磨, 波多野将, 今村輝彦, 小室一成: 心臓移植ブリッジとしての補助人工心臓の現状と課題. 第49回日本移植学会. 2013年9月 京都
- 絹川弘一郎, 今村輝彦, 波多野将, 小室一成, 許 俊鋭, 小野 稔: 重症心不全治療の現状と問題 - 薬物治療から補助人工心臓への最善手は? 第49回日本移植学会. 2013年9月 京都
- 小野 稔, 木下 修, 木村光利, 札 琢磨, 安藤政彦, 梅木昭秀, 山内治雄, 齋藤 綾, 本村 昇, 許 俊鋭: 重症心不全における左室形成・僧帽弁形成・補助人工心臓の術式選択. 第66回 日本胸部外科学会定期学術集会. 2013年10月 仙台
- 小野 稔, 絹川弘一郎, 木下 修, 木村光利, 齋藤 綾, 安藤政彦, 許 俊鋭: 当院における心臓移植の遠隔成績. 第66回 日本胸部外科学会定期学術集会. 2013年10月 仙台
- 小野 稔: わが国における心臓移植の現状と将来展望. 第9回日本移植・再生医療看護学会. 2013年10月 東京
- 小野 稔, 縄田 寛, 木下 修, 木村光利, 札琢磨, 許 俊鋭: 植込み型補助人工心臓の普及とその課題. 第44回日本心臓外科学会学術総会シンポジウム. 2014年2月 熊本
- Ono M, Kinugawa K, Nawata K, Kinoshita O, Kimura M, Hatano M, Imamura T, Komuro I, Kyo S: Progress in surgical treatment of

end-stage heart failure. 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Plenary session). March 2014, Tokyo

● 小野 稔、縄田 寛、木下 修、木村光利、波多野 将、今村輝彦、小室一成、絹川弘一郎：重症心不全に対する補助人工心臓治療の現況. 第35回日本循環制御医学会総会シンポジウム. 2014年7月 福岡

● 小野 稔、縄田 寛、木下 修、山内治雄、木村光利、波多野 将、今村輝彦、遠藤美代子、加賀美幸江、絹川弘一郎：心臓移植におけるマー

ナルドナーはどこまで移植可能か？第50回日本移植学会総会シンポジウム. 2014年9月 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況（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

厚生労働省科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
「疾患由来 iPS 細胞を利用した難治性疾患の創薬研究」 分担研究報告書

疾患由来 iPS 細胞を利用した難治性疾患の創薬研究

研究分担者：山内 敏正（糖尿病・代謝内科・准教授）

研究要旨

疾患患者からの作成した iPS 細胞は、疾患に関連した細胞や臓器へと分化させることにより、疾患の病態を反映した疾患モデルが構築され、より詳細な病態の解明や新たな治療ターゲットの探索や創薬スクリーニングを利用した新規治療法の開発に有用と考えられている。本研究の目的は、遺伝異常を有する糖尿病・代謝疾患患者から疾患特異的 iPS 細胞を作成し、全身の糖・脂質代謝の主要臓器である膵島・脂肪細胞・肝細胞へ分化させ疾患モデルを構築し、エピゲノム解析を含むオミクス解析やゲノム編集ツール、化合物スクリーニングなどを駆使した病態解析と新規治療法開発の基盤をつくることである。作成する希少疾患の疾患モデルの確立のみならず、その病態解析からの知見を利用して、より幅広い糖尿病などの common disease への還元も図る。

A. 研究目的

本研究では主として遺伝異常を有する糖尿病・代謝疾患患者から疾患特異的 iPS 細胞を作成し、全身の糖・脂質代謝の主要臓器である膵島・脂肪細胞・肝細胞へ分化させ、疾患モデルを構築し、エピゲノム解析を含むオミクス解析やゲノム編集ツールを用いた病態解析を行う。本研究成果により厚労省難治性疾患克服研究事業の対象疾患の病態解明や治療法の開発につながる可能性に加えて、それらの成果がより幅広い一般の糖尿病などの common disease へと還元されることが期待され、潜在的な経済効果や医療への貢献をもたらす可能性は大きいと考えられる。

B. 研究方法

疾患特異的 iPS 細胞の樹立については、東京大学医科学研究所附属病院のステムセルバンク/CRC(医科研)の天津分担研究者との共同研究により、患者末梢血とエピゾーマルベクターを用いて樹立を行う。対象疾患は糖尿病・代謝内科におい

て遺伝子異常を伴うと想定される脂肪萎縮性糖尿病、ミトコンドリア糖尿病、MODY（単一遺伝子による糖尿病）を主として収集する。取得された疾患特異的 iPS 細胞に合わせて、創薬研究に適合する膵β細胞、脂肪細胞、肝細胞への分化系の確立を進める。樹立した疾患 iPS 細胞由来の各組織細胞が患者個体における疾患の性質を有しているかについて、マーカー遺伝子の発現や免疫染色などによる細胞分化能の検討、疾患において鍵となる遺伝子の転写解析、インスリン分泌能など細胞の機能解析により確認する。疾患特異的 iPS が疾患の特性を有しており疾患のモデルとして成立する場合には、その十分な細胞量を活かし、網羅的なエピゲノム解析などのオミクス解析、過剰発現や siRNA によるノックダウン、ゲノム編集ツールなどを駆使して病態解析を行う。更に疾患病態の追究を通して標的のシグナルやタンパク質を同定し、その機序に基づいた創薬スクリーニングを施行する。

(倫理面への配慮)

疾患特異的 iPS 細胞の樹立と創薬・疾患研究における倫理面への配慮としては、東京大学医科学研究所でヒトゲノム・遺伝子解析研究として承認されている「疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬・疾患研究」に共同研究者として参画している。対象患者に対しては、計画書に基づいたインフォームド・コンセントを取得し、個人情報の管理など十分な配慮を行っている。

C. 研究結果

対象患者の選定について、当該年度においては、脂肪織炎を伴う後天性脂肪萎縮性糖尿病 1 名、インスリン抵抗性を伴う高インスリン血症 1 名については本研究による iPS 細胞の樹立と樹立細胞用いた研究のインフォームド・コンセントの取得を施行した。また、両親から片アレルずつ引き継いだ、複合ヘテロ接合体遺伝子変異が同定されている先天性脂肪萎縮性糖尿病 1 名については 3 月中に同意取得を行う。いずれの疾患も来年度前半で iPS 細胞樹立を予定している。

iPS 細胞の作成技術と樹立後の維持・管理技術については、東京大学医学部附属病院糖尿病・代謝内科より東京大学医科学研究所大津研究室に人員が出向し、末梢血由来の造血前駆細胞からの iPS 細胞樹立に至適化された、オンフィーダー培養系およびフィーダーフリー系培養系による iPS 細胞の維持・保管培養技術を取得した。iPS 細胞の分化系においては、iPS 細胞から脂肪細胞への分化プロトコルを検討した。レチノイン酸をもちいた胚様体形成を介する脂肪細胞への分化プロトコルと、間葉系幹細胞様の細胞へと一旦誘導させてから脂肪細胞へ分化させるプロトコルの両方を試行した。特に後者は、培養面の細胞外基質の工夫により FACS 上で間葉系幹細胞特異的なマーカーの発現パターンを有する細胞へ効率よく分化することが確認できた。間葉系幹細胞からの脂肪細胞分化実験では、脂肪蓄積や特異的遺伝子マーカー

の発現を確認できた。

D. 考察

脂肪細胞への分化系のプロトコルの最適化においては、レチノイン酸をもちいた胚様体形成を介した脂肪細胞分化のプロトコルと、間葉系幹細胞様の細胞へ一旦誘導したのちに脂肪細胞へ分化させるプロトコルの両者を試みた。前者は、胚様体形成を介する分、実験における均一性や分化効率のコントロールに難点があるが、後者では、線維芽細胞様で均一な様式で培養が可能な間葉系幹細胞様の細胞を経由するために、細胞のハンドリングや実験のコントロールに利点があると考えられた。来年度施行する疾患特異的 iPS 細胞の病態解析において、FACS を用いた定量的な解析や特定の細胞集団の採取による実験が可能となる点があり、有利であると考えられる。

E. 結論

本年度は iPS 細胞の作成技術と樹立後の維持・管理技術の習得による体制の整備、対象疾患患者からの同意取得、iPS 細胞から脂肪細胞への分化系のプロトコルの最適化を行った。今後、同意取得済みおよび予定の対象患者からの iPS 細胞樹立を行い、最適化した脂肪細胞への分化系の実験において、分化過程や脂肪蓄積の解析を行うことにより、疾患の発症のメカニズムが同定されることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Tanabe H, Motoyama K, Ikeda M, Wakiyama M, Terada T, Ohsawa N, Hosaka T, Hato M, Fujii Y, Nakamura Y, Ogasawara S, Hino T, Murata T, Iwata S, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Hirata K, Kawano Y, Yamamoto M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Yamauchi T, Kadowaki T, Yokoyama S.

Expression, purification, crystallization, and preliminary X-ray crystallographic studies of the human adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2. *J Struct Funct Genomics*. 16(1) 11-23. 2015.

• Yamada T, Hara K, Svensson AK, Shojima N, Hosoe J, Iwasaki M, Yamauchi T, Kadowaki T.. Successfully achieving target weight loss influences subsequent maintenance of lower weight and dropout from treatment. *Obesity* (Silver Spring). 23(1) 183-91. 2015.

• Hwang JY, Sim X, Wu Y, Liang J, Tabara Y, Hu C, Hara K, Tam CH, Cai Q, Zhao Q, Jee S, Takeuchi F, Go MJ, Ong RT, Ohkubo T, Kim YJ, Zhang R, Yamauchi T, So WY, Long J, Gu D, Lee NR, Kim S, Katsuya T, Oh JH, Liu J, Umemura S, Kim YJ, Jiang F, Maeda S, Chan JC, Lu W, Hixson JE, Adair LS, Jung KJ, Nabika T, Bae JB, Lee MH, Seielstad M, Young TL, Teo YY, Kita Y, Takashima N, Osawa H, Lee SH, Shin MH, Shin DH, Choi BY, Shi J, Gao YT, Xiang YB, Zheng W, Kato N, Yoon M, He J, Shu XO, Ma RC, Kadowaki T, Jia W, Miki T, Qi L, Tai ES, Mohlke KL, Han BG, Cho YS, Kim BJ.. Genome-wide association meta-analysis identifies novel variants associated with fasting plasma glucose in East Asians. *Diabetes*. 64(1) 291-8. 2015.

2. 学会発表

• Tomohisa Aoyama, Hironori Waki, Toshimasa Yamauchi, Ken-ichi Wakabayashi, Tsuyoshi Inoue, Masahiro Nakamura, Jing Yu, Kazumi take, Wei Sun, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Ueki Kojiro, Youichiro Wada, Shuichi Tsutsumi,

Tatsuhiko Kodama, Juro Sakai, Hiroyuki Aburatani and Takashi Kadowaki. Long-Range Transactivation of C/EBPa Gene Expression by PPARg through Distal Enhancers during Adipocyte Differentiation.. American Diabetes Association 74th Scientific Sessions (San Francisco, USA, 2014.06)

• Hironori Waki, Yuta Hiraike, Jing Yu, Kana Miyake, Masahiro Nakamura, Ken Suzuki, Kohjiro Ueki, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Toshimasa Yamauchi and Takashi Kadowaki. Genome-wide Profiling of Brown Fat-Specific Open Regulatory Regions Identifies NFIA as a Transcriptional Regulator of Brown Fat Muscle Cell Lineage Specification.. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (Kyoto, Japan, 2014.09)

• Tomohisa Aoyama, Hironori Waki, Toshimasa Yamauchi, Ken-ichi Wakabayashi, Tsuyoshi Inoue, Masahiro Nakamura, Jing Yu, Kazumi take, Wei Sun, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Ueki Kojiro, Youichiro Wada, Shuichi Tsutsumi, Tatsuhiko Kodama, Juro Sakai, Hiroyuki Aburatani and Takashi Kadowaki. Long-Range Transactivation of C/EBPa Gene Expression by PPARg through Distal Enhancers during Adipocyte Differentiation.. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (Kyoto, Japan, 2014.09)

• Tomohisa Aoyama, Hironori Waki, Toshimasa Yamauchi, Ken-ichi Wakabayashi, Tsuyoshi Inoue, Masahiro Nakamura, Jing Yu, Kazumi take, Wei Sun,

Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Takuya Sugiyama, Ueki Kohjiro, Youichiro Wada, Shuichi Tsutsumi, Tatsuhiko Kodama, Juro Sakai, Hiroyuki Aburatani and Takashi Kadowaki. Long-Range Transactivation of C/EBP α Gene Expression by PPAR γ through Distal Enhancers during Adipocyte Differentiation.. The 4D Nucleome 2014 (Hiroshima, Japan, 2014.12)

- 青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上 剛、中村正裕、于静、武和巳、富岡恵、孫威、平池勇雄、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、植木浩二郎、和田 洋一郎、堤修一、児玉龍彦、酒井寿郎、油谷浩幸、門脇孝. 脂肪細胞における遠位エンハンサーを介したPPAR γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析. 第87回日本内分泌学会学術総会 (2014年4月 福岡)
- 脇裕典、平池勇雄、于静、山内敏正、中村正裕、孫威、青山倫久、富岡恵、岩部真人、岩部美紀、植木浩二郎、堤修一、油谷浩幸、門脇孝. ゲノムワイドFAIRE-seqを用いた褐色脂肪細胞特異的な転写制御機構におけるNFIAの役割の同定. 第87回日本内分泌学会学術総会 (2014年4月 福岡)
- 青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上剛、中村正裕、于静、武和巳、富岡恵、孫威、平池勇雄、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、植木浩二郎、和田洋一郎、堤修一、児玉龍彦、酒井寿郎、油谷浩幸、門脇孝. 脂肪細胞における遠位エンハンサーを介したPPAR γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析. 第57回 日本糖尿病学会年次学術集会 (2014年 5月 大阪)
- 于静、脇裕典、山内敏正、亀井望、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、植木浩二郎、堤修一、油谷浩幸、門脇孝. PPAR γ プロモーター領域のBivalentヒストン修飾は脂肪細胞分化ポテンシャルを規定する. 第57回 日本糖尿病学会

年次学術集会 (2014年 5月 大阪)

- 脇裕典、平池勇雄、于静、山内敏正、中村正裕、孫威、青山倫久、富岡恵、岩部真人、岩部美紀、植木浩二郎、堤修一、油谷浩幸、門脇孝. 褐色脂肪細胞特異的な転写制御領域のFAIRE-seqによる新規制御因子の同定.
- 于静、脇裕典、亀井望、羽田裕亮、岩部真人、岩部美紀、植木浩二郎、堤修一、油谷浩幸、山内敏正、門脇孝. PPAR γ プロモーター領域のBivalentヒストン修飾は脂肪細胞分化ポテンシャルを規定する. 第8回日本エピジェネティクス研究会年会 (2014年5月 東京)
- 山内敏正. 糖尿病と合併症の治療戦略. 第26回糖尿病と血管合併症 up-to-date (2014年6月 西宮)
- 青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上 剛、中村正裕、于静、武和巳、富岡恵、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、植木浩二郎、和田 洋一郎、堤修一、児玉龍彦、酒井寿郎、油谷浩幸、門脇孝. 脂肪細胞における遠位エンハンサーを介したPPAR γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析. 第32回内分泌代謝学サマーセミナー (2014年7月 南都留郡)
- 脇 裕典. 白色・褐色脂肪細胞におけるクロマチン構造変化とエピゲノム制御の役割. 第32回内分泌代謝学サマーセミナー (2014年7月 南都留郡)
- 青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上剛、中村正裕、于静、武和巳、富岡恵、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、植木浩二郎、和田洋一郎、堤修一、児玉龍彦、酒井寿郎、油谷浩幸、門脇孝. 脂肪細胞における遠位エンハンサーを介したPPAR γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析. 第19回アディポサイエンス・シンポジウム (2014年8月 豊中)
- 平池勇雄、于静、脇裕典、中村正裕、孫威、三宅加奈、鈴木頭、廣田雄輔、青山倫久、富岡恵、杉山拓也、植木浩二郎、堤修一、油谷浩幸、

山内敏正、門脇孝. 褐色脂肪特異的な転写制御・エピゲノム制御におけるNFIAの役割の解明. 第19回アディポサイエンス・シンポジウム (2014年8月 豊中)

● 青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上剛、中村正裕、于静、武和巳、富岡恵、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、植木浩二郎、和田洋一郎、堤修一、児玉龍彦、酒井寿郎、油谷浩幸、門脇孝. 脂肪細胞における遠位エンハンサーを介したPPAR γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析. 第29回日本糖尿病合併症学会 (2014年10月 東京)

● 山内敏正. 糖尿病と肥満症. 第29回日本糖尿病合併症学会 (2014年10月 東京)

● 脇裕典、平池勇雄、于静、中村正裕、鈴木顕、孫威、青山倫久、富岡恵、杉山拓也、植木浩二郎、堤修一、油谷浩幸、山内敏正、門脇孝. 褐色脂肪分化と遺伝子制御におけるNFIAの役割. 第29回日本糖尿病合併症学会 (2014年10月 東京)

● 青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上剛、中村正裕、于静、武和巳、富岡恵、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、植木浩二郎、和田洋一郎、堤修一、児玉龍彦、酒井寿郎、油谷浩幸、門脇孝. 脂肪細胞における遠位エンハンサーを介したPPAR γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析. 第35回日本肥満学会 (2014年10月 宮崎)

● 平池勇雄、于静、脇裕典、中村正裕、孫威、三宅加奈、鈴木顕、廣田雄輔、青山倫久、杉山拓也、富岡恵、堤修一、油谷浩幸、山内敏正、

門脇孝. 褐色脂肪特異的な転写制御・エピゲノム制御におけるNFIAの役割の解明. 第35回日本肥満学会 (2014年10月 宮崎)

● 脇裕典、平池勇雄、于静、中村正裕、青山倫久、孫威、鈴木顕、若林賢一、井上剛、武和巳、富岡恵、三宅加奈、廣田雄輔、岩部真人、岩部美紀、杉山拓也、和田洋一郎、植木浩二郎、堤修一、油谷浩幸、山内敏正、門脇孝. 白色・褐色脂肪細胞におけるクロマチン構造変化とエピゲノム制御の役割. 第35回日本肥満学会 (2014年10月 宮崎)

● 青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上剛、中村正裕、于静、武和巳、富岡恵、岩部真人、岩部美紀、杉山拓也、藤田隆教、植木浩二郎、和田洋一郎、堤修一、児玉龍彦、酒井寿郎、油谷浩幸、門脇孝. 脂肪細胞における遠位エンハンサーを介したPPAR γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析. 第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 (2015年2月 京都)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (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

心血管細胞への分化誘導と創薬に関する研究

研究分担者：森田 啓行

（東京大学大学院医学系研究科健康医科学創造講座・特任准教授）

研究要旨

現時点で特異的治療法が存在しない遺伝性循環器疾患の病態解明および特異的治療法開発を目指し、遺伝性循環器疾患患者末梢血から iPS 細胞を樹立、iPS 細胞由来心血管細胞へと分化誘導し、病態メカニズム解明、治療薬スクリーニングをおこない、さらに、病態メカニズム特異的な治療薬のシーズとなる化合物を同定するのが、本分担研究の目的である。今年度は、遺伝性循環器疾患患者の遺伝子変異スクリーニングをおこない、iPS 細胞樹立、さらに心筋細胞への分化誘導という一連のフローを確立した。また、心筋細胞の表現系を指標とする再現性の高い評価系を確立した。

A. 研究目的

現時点で特異的治療法が存在しない遺伝性循環器疾患の病態解明および特異的治療法開発を目指し、遺伝性循環器疾患患者末梢血から iPS 細胞を樹立、iPS 細胞由来心血管細胞へと分化誘導し、病態メカニズム解明、治療薬スクリーニングをおこない、さらに、病態メカニズム特異的な治療薬のシーズとなる化合物を同定する。

B. 研究方法

遺伝性心血管病患者の末梢血からゲノム DNA を抽出し、既知原因遺伝子をスクリーニング (Haloplex 法)、引き続き、原因のわからない症例に関して全エクソーム解析をおこない、原因遺伝子変異およびその他の遺伝的背景を明らかにし、iPS 細胞樹立の対象として適切な患者を選ぶ。

末梢血単核球からエピソーマルベクター法を用いて iPS 細胞を樹立、心筋細胞へと分化誘導させる。心房筋型の心筋細胞と心室筋型の心筋細胞を選別し、心室筋型の心筋細胞をもちいて解析をおこなう。

健常者 iPS 細胞由来心筋細胞と肥大型心筋症患者

者 iPS 細胞由来心筋細胞をもちいて、明確に差を捉えやすく、再現性が高く、かつ病態を反映する評価指標を確立する。

（倫理面への配慮）

東京大学医学部研究倫理委員会において、全ゲノム解析および iPS 細胞関連研究に関して既に承認を取得している。

C. 研究結果

遺伝性心血管病患者の末梢血からゲノム DNA を収集し、既知原因遺伝子をスクリーニング (Haloplex 法)、12 名の遺伝性心筋症患者の原因変異を同定し、iPS 細胞樹立の対象にした。引き続き、原因のわからない症例に関しては、全エクソーム解析を継続中である。

独自に開発した培養液をもちいて安価でかつ再現性高く純度の高い心筋細胞へ分化誘導させる系を確立した。さらに心室型ミオシン軽鎖遺伝子を蛍光標識してフローサイトメーターをもちい純度の高い心室筋型心筋細胞のみを得るといった精製系を開発し運用している。

ハイコンテンツ表現型解析機器をもちいて、分

化心筋細胞の形態解析をおこない、肥大型心筋症患者で細胞面積拡大など数種類の指標の明確な差異を再現性高く認めている。遺伝子発現パターン、細胞内電位変化をもちいた評価系に関しては、再現性を検討中である。

D. 考察

iPS 細胞樹立対象患者のリクルートをさらに進める必要がある。解析コントロール症例として、変異陰性血縁者が最適であり、その意味でも大きな家系を構成している患者を今後優先的に解析対象にする。

iPS 細胞樹立および心室筋型心筋細胞への分化誘導はスムーズに行うことができている。また、今年度は、表現型解析をもちいた評価系を確立することができた。遺伝子発現パターン、細胞内電位変化をもちいた評価系開発に関しては現在進行形であり早急な確立を目指す。

E. 結論

病態解明および特異的治療法開発を見据えて、遺伝性循環器疾患患者の遺伝子変異スクリーニングをおこない、iPS 細胞樹立、さらに心筋細胞への分化誘導という一連のフローを確立できた。また、心筋細胞の表現系を指標とする再現性の高い評価系を確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Morita H, Komuro I. The metabolic syndrome and *DYRK1B*. *New England Journal of Medicine* 371: 785, 2014
- Morita H, Komuro I. Somatic mutations in cerebral cortical malformations. *New England Journal of Medicine* 371: 2037, 2014
- Hirokawa M, Morita H, Tajima T, Takahashi A, Ashikawa K, Miya F, Shigemizu D, Ozaki K, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Imai Y, Tanaka

T, Tsunoda T, Matsuda K, Kadowaki T, Nakamura Y, Nagai R, Komuro I, Kubo M. A genome-wide association study identifies *PLCL2* and *AP3D1-DOT1L-SF3A2* as new susceptibility loci for myocardial infarction in Japanese. *European Journal of Human Genetics* 23: 374-380, 2015

- Sumida T, Naito AT, Nomura S, Nakagawa A, Higo T, Hashimoto A, Okada K, Sakai T, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee JK, Minamino T, Offermanns S, Noda T, Botto M, Kobayashi Y, Morita H, Manabe I, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. Complement C1q-induced activation of β -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. *Nature Communications* 6: 6241, 2015

- Nakayama A, Morita H, Hamamatsu A, Miyata T, Hoshina K, Nagayama M, Takanashi S, Sumiyoshi T, Komuro I. Coronary atherosclerotic lesions in patients with a ruptured abdominal aortic aneurysm. *Heart and Vessels* (in press)

- Yagi H, Hatano M, Takeda N, Harada S, Suzuki Y, Taniguchi Y, Shintani Y, Morita H, Kanamori N, Aoyama T, Watanabe M, Manabe I, Akazawa H, Kinugawa K, Komuro I. A case of congenital contractural arachnodactyly without *FBN1* or *FBN2* gene mutation, complicated with dilated cardiomyopathy. *Internal Medicine* (in press)

- Kimura K, Daimon M, Morita H, Kawata T, Nakao T, Okano T, Lee SL, Takenaka K, Nagai R, Yatomi Y, Komuro I. Evaluation of right ventricle by speckle tracking and conventional echocardiography in rats with right ventricular heart failure. *International Heart Journal* (in press)

- 森田啓行. 脈圧と心房細動新規発症. *Medical*

Practice 31(5):836, 2014

●森田啓行. ファブリー病患者における血管障害.

Medical Practice 31(7):1172, 2014

●森田啓行. 心房性期外収縮の頻度とリスク因子.

Medical Practice 31(8):1347, 2014

●森田啓行. 栄養素摂取と血圧との相関. *Medical Practice* 31(10):1684, 2014

●森田啓行. 朝食摂取と冠動脈疾患. *Medical Practice* 31(11):1839, 2014

●森田啓行. アメリカンフットボールと高血圧.

Medical Practice 32(1):167, 2015

●小室一成, 山崎力監修, 森田啓行編集主幹, 細谷弓子, 網谷英介編集

循環器大規模臨床試験要約集 2014 年版

メディカルレビュー社

●森田啓行. 心内膜心筋生検の安全性と診断率

Medical Practice 32(2):356, 2015

2. 学会発表

●森田啓行. 肥大型心筋症・病因. 第18回日本心不全学会学術集会. 2014.10.12, 大阪

●森田啓行. 循環器疾患における遺伝子解析. 第18回南房総心臓病Conference. 2014.11.11, 千葉

G. 知的財産権の出願・登録状況（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

厚生労働省科学研究費補助金（再生医療実現化研究事業）
「疾患由来 iPS 細胞を利用した難治性疾患の創薬研究」分担研究報告書

研究倫理・臨床倫理上の検討

研究分担者：瀧本 禎之（東京大学・医療倫理学・心身医学（同施設）・准教授）

研究要旨

iPS を使用した創薬研究への研究参加への積極性や忌避感の程度を評価するために、iPS 細胞のバンク化を視野に入れてバイオバンクおよびデータベースへ研究参加者として試料を提供する際の意識を調査した。全国 20～69 歳男女の調査モニター集団から、日本の人口動態に合わせて無作為に抽出した一般成人を対象とし Web 調査を実施した。一般市民 2416 名より回答を得た（回収率 31.6%）。包括的同意に賛意を示したのは 37.5%であったのに対し、個別的同意に賛意を示したのは 62.5%に及んだ。年齢が高ければ高いほど包括的同意に対して賛意を示し、学歴の高さや忌避感が高いほど個別同意への賛同が高かった。個別的同意を望むという試料の提供に慎重な層が一定数いるということは研究計画の説明の段階において考慮すべき結果であると思われた。

A. 研究目的

希少難病の克服を目的として実施される iPS 細胞を利用した創薬研究の遂行に関しては、患者、患者家族の研究協力は元より、一般市民の研究に対する理解が不可欠であると考えられる。先行研究から、iPS 細胞を使用した創薬研究の推進に関しては一般市民の期待が強いことが示されているが、しかしながら、実際に自分の細胞を研究に提供するなど、iPS を使用した創薬研究への研究参加への積極性や忌避感の程度について必ずしも明らかではない。そこで、とりわけ、iPS 細胞のバンク化を視野に入れてバイオバンクおよびデータベースへ研究参加者として試料を提供する際の意識を調査した。データベースに参加する際の同意のあり方はどうしても包括的な同意を考慮に入れざるを得ず、そうした包括的な同意の許容性について特に着目して調査を行った。

B. 研究方法

調査会社を介した Web 調査を実施した。調査票は、東京大学大学院医学系研究科医療倫理学分野で作成し、調査票の配布および収集は調査会社 A に委託して行った。全国 20～69 歳男女の調査モニター集団から、日本の人口動態に合わせて無作為に抽出した一般成人を対象とし、予想回収数を約 2400 名として、WEB 上で調査票を配布した。iPS 細胞バンクへ血液や皮膚を提供するという想定し、4 つのシナリオを提示して包括的な同意への賛同率を調査した。提示したシナリオは以下のとおりであり、(A) 包括的同意、(B) 包括的同意+

情報提供、(C) 層別同意、(D) 個別同意、に分類される。

(共通部分) 細胞を提供して頂く際には、iPS 細胞が長い期間にわたっていろいろな研究に使われる可能性があることをご説明し、同意を頂きます。

(A) その後は、我々研究者の判断を信頼して、今後 iPS 細胞をどのような研究に利用するかは、研究者に任せて頂きましょう。

(B) その後は、新たな研究計画が立ち上がるごとに、研究内容を冊子やホームページを通じて、どんな研究が行われているかを協力して頂いた方にお伝えしていきましょう。

(C) その際に、自分の iPS 細胞をつかってほしくない種類の研究について大まかな希望をお聞きし、その後はその希望に沿って研究していきましょう。

(D) その後は、新たな研究計画が立ち上がるごとに、研究内容をあらためて研究参加者の方々一人ひとりに説明をし、そのつど研究利用に対する同意を頂きましょう。

併せて、包括的同意、あるいは個別的同意に賛同する層の特徴を調べるため、二項ロジスティック回帰分析を行った。

(倫理面への配慮)

本調査は東京大学医学部研究倫理委員会の承認を受けて行った（「iPS 細胞を使用した難病の研究に

関する意識調査」審査番号 10437)。なお、対象患者のリストおよび対象患者家族のリストは、調査会社 A が保有している。また、本研究で用いる調査票で用いる画像及び絵図は、すべて無料で使用できる著作権の発生しないものを、作成者の許可を得た上で使用した。また本調査は、回答者個人の特定を出来ない無記名自記式調査として行った。

C. 研究結果

一般市民 2416 名より回答を得た(回収率 31.6%)。その結果、(A) 包括的同意に賛同したのは 221 名 (9.2%)、(B) 情報公開付きの包括的同意に賛同したのは 685 名 (28.4%)、(C) 層別同意に賛同したのは 492 名 (20.4%)、(D) 個別的同意に賛同したのは 1018 名 (42.1%) であった (図 1)。(A) と (B) を比較的に包括的同意に賛成の層、(C) と (D) を比較的に個別的同意に賛成の層とすれば、包括的同意に賛意を示したのは 37.5% であったのに対し、個別的同意に賛意を示したのは 62.5% に及んだ。

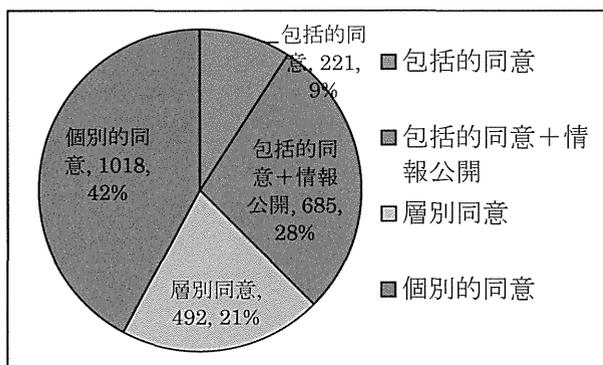


図 1 包括的同意への賛同

また、表 1 に示すとおり、試料を国内の大学のみならず海外の大学や国内外の営利企業に提供しても良いと考える人ほど包括的同意に対して賛意を示しやすく (オッズ比 1.16, $p < .001$)、年齢が高ければ高いほど包括的同意に対して賛意を示すことが分かった (オッズ比 1.01, $p = .002$)。反対に、個別同意への賛同と関連があるのは、iPS 細胞を神経の再生に利用することの忌避感 (オッズ比 0.78, $p = .032$)、iPS 細胞を生殖補助医療に利用することの忌避感 (オッズ比 0.84, $p = .002$)、学歴の高さであった (オッズ比 0.86, $p = .001$)。

| | B | 標準誤差 | Wald | df | 有意確率 | Exp (B) | EXP (B) の 95% 信頼区間 | |
|---------------------------|-------|------|--------|----|------|---------|--------------------|-------|
| | | | | | | | 下限 | 上限 |
| iPS細胞に関する知識の主観的判断 | -.042 | .100 | .176 | 1 | .675 | .959 | .789 | 1.166 |
| iPS細胞研究に関する情報収集の多寡 | -.126 | .074 | 2.920 | 1 | .088 | .882 | .764 | 1.019 |
| iPS細胞を臓器の再生に利用することの忌避感 | .081 | .099 | .667 | 1 | .414 | 1.084 | .893 | 1.316 |
| iPS細胞を神経の再生に利用することの忌避感 | -.251 | .117 | 4.603 | 1 | .032 | .778 | .619 | .979 |
| iPS細胞を創薬研究に利用することの忌避感 | .179 | .106 | 2.870 | 1 | .090 | 1.196 | .972 | 1.471 |
| iPS細胞を生殖補助医療に利用することの忌避感 | -.175 | .055 | 9.987 | 1 | .002 | .840 | .754 | .936 |
| 試料の提供の範囲の広さ (国内大学⇒海外営利企業) | .149 | .029 | 26.303 | 1 | .000 | 1.160 | 1.096 | 1.228 |
| 年齢 | .010 | .003 | 9.678 | 1 | .002 | 1.010 | 1.004 | 1.017 |
| 学歴 | -.150 | .046 | 10.726 | 1 | .001 | .861 | .787 | .942 |

D. 考察

白紙委任のようなしかたで同意を与えることに肯首する層は少ないことから、包括的同意を得る際にはできる限りの情報を提供し、さらにできればおおまかな研究領域までを提示した層別同意までを考慮に入れる必要がある。こうした方策は平成 27 年 4 月より実施される「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」に定められている「同意を受ける時点で特定されなかった研究への試料・情報の利用の手続」の規程に沿ったものであると言える。また、再生医療や生殖補助医療に iPS 細胞を使用することに忌避感を有し、個別同意を望むという試料の提供に慎重な層が一定数いるということは考慮すべきであり、研究計画の説明の際には研究への不参加を含めた選択肢の提示と、できる限りの情報提供が必要であると考えられる。

E. 結論

iPS 細胞を利用した医学研究に関するバイオバンクへの同意については、包括的同意に賛意を示す層と個別同意に賛意を示す層が分かれて存在している。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (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

厚生労働省科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
「疾患由来 iPS 細胞を利用した難治性疾患の創薬研究」 分担研究報告書

疾患由来 iPS 細胞を利用した難治性疾患の創薬研究

研究分担者：今井 浩三（東京大学医科学研究所 特任教授）
（研究協力者：海老原 康博 特任准教授）

研究要旨

（8 ; 9）転座型白血病は極めて稀な白血病であり、その希少さゆえに、造血細胞移植以外有効な治療法は分かっていない。我々が経験した（8 ; 9）転座型白血病患者（Yamamoto, Ebihara et al: Leuk & Lymph, 2013）の血液腫瘍細胞から iPS 細胞を樹立した。この iPS 細胞から血液細胞を分化誘導すると、血液細胞への分化は亢進しているが、特に、マクロファージの異常増殖が認められ、これがこの疾患の本体であると考えられた。また、imatinib はマクロファージ増殖を抑制できなかったが、ponatinib などの tyrosine kinase inhibitor は有意にマクロファージ増殖を抑制できた。これらの結果から、今回樹立された iPS 細胞は疾患の病態解析と創薬開発に有効であると考えられた。

A. 研究目的

極めて稀な疾患のため、有効な薬剤の分かっていない（8 ; 9）転座型白血病患者由来 iPS 細胞を作成し、その白血病細胞の病態生理を探索し、新たな治療方法を開発を試みた。

B. 研究方法

我々が経験した（8 ; 9）転座型白血病患者（Yamamoto, Ebihara et al: Leuk & Lymph, 2013）白血病細胞に山中 4 因子を遺伝子導入して、iPS 細胞の樹立を作製し、teratoma 形成能など多能性幹細胞であることを確認する。多能性幹細胞であることが証明された iPS 細胞を用いて、マウス由来のフィーダー細胞との共培養法を用いて、血液細胞への分化増殖能を検討した。

（倫理面への配慮）

研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）に

関わる状況について、十分な配慮をして、これを家族からいただいております。倫理面の問題がないと判断する。

C. 研究結果

我々が経験した（8 ; 9）転座型白血病患者の血液腫瘍細胞から iPS 細胞を樹立した。teratoma 形成能など種々の評価を行い多能性幹細胞であることを確認した。また、患者と同じ染色体異常を有していることを確認した。この iPS 細胞をマウス由来のフィーダー細胞との共培養により、血液細胞へ分化誘導すると、CD34 陽性細胞を含む血液前駆細胞や血液細胞の産生が亢進しており、特に、マクロファージの異常増殖が認められ、これがこの疾患の本体であると考えられた。また、各種 tyrosine kinase inhibitor (TKI) を添加してみると、imatinib はマクロファージ増殖を抑制できなかったが、CHIR258、PKC412 と ponatinib は有意にマクロファージ増殖を抑制できた。患者 primary 細胞でも TKI 添加による同様の結果が確認された。