

これらの結果から、この iPS 細胞は疾患の病態を反映していると考え、疾患の病態解析と創薬開発に有効であると考えられた。

D. 考察および E. 結論

血液腫瘍細胞由来の iPS 細胞を用いることで、本研究のように希少疾患であり、造血幹細胞移植以外に有効な治療法のない疾患に対して、新たな治療法の可能性を見いだすことができた。さらなる病態生理を明らかにし、それとともに新しい治療法の開発に努める。本研究による血液腫瘍細胞由来の iPS 細胞を用いた研究成果は PLoS ONE に掲載予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nasuno M, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nakagaki S, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, **Imai K**, Shinomura Y. Mesenchymal stem cells cancel azoxymethane-induced tumor initiation. **STEM CELLS** 32(4):913-25, 2014.
- 2) Ito M, Mitsuhashi K, Igarashi H, Nosho K, Naito T, Yoshii S, Takahashi H, Fujita M, Sukawa Y, Yamamoto E, Takahashi T, Adachi Y, Nojima M, Sasaki Y, Tokino T, Baba Y, Maruyama R, Suzuki H, **Imai K**, Yamamoto H, Shinomura Y. MicroRNA-31 expression in relation to BRAF mutation, CpG island methylation and colorectal continuum in serrated lesions. **Int J Cancer**. 135(11):2507-15, 2014.
- 3) Adachi Y, Ohashi H, Imsumran A, Yamamoto H, Matsunaga Y, Taniguchi H, Nosho K, Suzuki H, Sasaki Y, Arimura Y, Carbone DP, **Imai K**, Shinomura Y. The effect of IGF-I receptor blockade for human esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. **Tumor Biol** 35(2): 973-85, 2014.
- 4) Yasui H, Ishida T, **Imai K**. The role of DNA methylation in the genetics and epigenetics of multiple myeloma. In: Steve Holt, editors. Multiple myeloma: risk factors, diagnosis and treatments. **Series: Cancer Etiology, Diagnosis and Treatments**. Hauppauge NY: Nova Science Publishers. 147-156, 2014.
- 5) Harada T, Yamamoto E, Yamano H, Nojima M, Maruyama R, Kumegawa K, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Harada E, Takagi R, Tanaka Y, Aoki H, Nishizono M, Nakaoka M, Tuyada A, Niinuma T, Kai M, Shimoda K, Shinomura Y, Sugai T, **Imai K**, Suzuki H. Analysis of DNA methylation in bowel lavage fluid for detection of colorectal cancer. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)**, 7(10):1002-10, 2014.
- 6) **Imai K**. Overview and Future prospect of “Promotion plan for the platform of human resource development for cancer”. **Juntendo Medical Journal**, 60(3): 234-237, 2014.
- 7) Yamamoto M, Yajima H, Takahashi H, Yokoyama Y, Ishigami K, Shimizu Y, Tabeya T, Suzuki C, Naishiro Y, Takano K, Yamashita K, Hashimoto M, Keira Y, Honda S, Abe T, Suzuki Y, Mukai M, Himi T, Hasegawa T, **Imai K**, Shinomura Y. Everyday clinical practice in IgG4-related dacryoadenitis and/or sialadenitis: Result from the SMART database. **Modern Rheumatology**. 27:1-6, 2014.
- 8) Naito T, Nosho K, Ito M, Igarashi H, Mitsuhashi K, Yoshii S, Aoki H, Nomura M, Sukawa Y, Yamamoto E, Adachi Y,

- Takahashi H, Hosokawa M, Fujita M, Takenouchi T, Maruyama R, Suzuki H, Baba Y, Imai K, Yamamoto H, Ogino S, Shinomura Y. IGF2 differentially methylated region hypomethylation in relation to pathological and molecular features of serrated lesions. **World J Gastroenterol**. 20(29): 10050-61, 2014.
- 9) Yamamoto M, Shimizu Y, Takahashi H, Yajima H, Yokoyama Y, Ishigami K, Tabeya T, Suzuki C, Matsui M, Naishiro Y, Imai K, Shinomura Y. CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α)+ M2 macrophages contribute to fibrosis in IgG4-related disease? **Mod Rheumatol**, 2:1-3, 2014.
- 10) Yasui H, Tsurita G, Imai K. DNA synthesis inhibitors for the treatment of gastrointestinal cancer. **Expert Opin Pharmacother**. 15(16):2361-72, 2014.
- 11) Kagami H, Agata H, Inoue M, Asahina I, Tojo A, Yamashita N, Imai K. The Use of Bone Marrow Stromal Cells (Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells) for Alveolar Bone Tissue Engineering: Basic Science to Clinical Translation. **Tissue Engineering Part B: Reviews**. 20(3): 229-232, 2014.
- 12) Igarashi H, Kurihara H, Mitsuhashi K, Ito M, Okuda H, Kanno S, Naito T, Yoshii S, Takahashi H, Kusumi T, Hasegawa T, Sukawa Y, Adachi Y, Okita K, Hirata K, Imamura Y, Baba Y, Imai K, Suzuki H, Yamamoto H, Nosho K, Shinomura Y. Association of microRNA-31-5p with clinical efficacy of anti-EGFR therapy in patients with metastatic colorectal cancer. **Annals of Surgical Oncology**. [Epub ahead of print], 2014.
- 13) Yamamoto S, Otsu M, Matsuzaka E, Konishi C, Takagi H, Hanada S, Mochizuki S, Nakauchi H, Imai K, Tsuji K, Ebihara Y. Screening of drugs to treat 8p11 myeloproliferative syndrome using patient-derived induced pluripotent stem cells with fusion gene CEP110-FGFR1. **Plos One**, in press, 2015.
- 14) Nosho K, Igarashi H, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, Kanno S, Yoshii S, Mikami M, Takahashi H, Kusumi T, Hosokawa M, Sukawa Y, Adachi Y, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Clinicopathological and molecular characteristics of serrated lesions in Japanese elderly patients. **Digestion**. 91(1):57-63. 2015.
- 15) Yamamoto M, Nojima M, Takahashi H, Yokoyama Y, Ishigami K, Yajima H, Shimizu Y, Tabeya T, Matsui M, Suzuki C, Naishiro Y, Takano KI, Himi T, Imai K, Shinomura Y. Identification of relapse predictors in IgG4-related disease using multivariate analysis of clinical data at the first visit and initial treatment. **Rheumatology**. 54(1):45-9, 2015.
- 16) Yamamoto M, Takahashi H, Shimizu Y, Yajima H, Suzuki C, Naishiro Y, Imai K, Shinomura Y. Seasonal allergies and serial changes of serum levels of IgG4 in cases treated with maintenance therapy for IgG4-related disease. **Modern Rheumatology**. 13:1-2. 2015.
- 17) Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability. **Archives of Toxicology**. in press, 2015.
- 18) Mitsuhashi K, Nosho K, Sukawa Y,

- Matsunaga Y, Ito M, Kurihara H, Kanno S, Igarashi H, Naito T, Adachi Y, Tachibana M, Tanuma T, Maguchi H, Shinohara T, Hasegawa T, Imamura M, Kimura Y, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis. *Oncotarget*. in press, 2015.
- 19) Nakagaki S, Arimura Y, Nagaiishi K, Isshiki H, Nasuno M, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Contextual niche signals towards colorectal tumor progression by mesenchymal stem cell in the mouse xenograft model. *J Gastroenterol*, [Epub ahead of print], 2015.
- 20) 今井浩三. 総説 橋渡し研究の展開と我が国の医療. *東京都病院薬剤師会雑誌* 63(2): 5-8, 2014.
- 21) 湯地晃一郎, 井元清哉, 山口類, 宮野悟, 上昌広, 今井浩三. 人口動態に基づいた日本医療の未来予測—高齢多死社会の到来, 特集「超高齢者に対する外科治療の問題点」*南江堂臨床雑誌「外科」*, 76(5): 457-463, 2014.
- 22) 能正勝彦, 五十嵐央祥, 伊藤美樹, 三橋 慧, 栗原弘義, 菅野伸一, 内藤崇史, 須河安恭敬, 松永康孝, 足立 靖, 野島正寛, 今井浩三, 丸山玲緒, 鈴木 拓, 山本博幸, 篠村恭久. 大規模コホートをを用いた大腸癌のノンコーディングRNA発現異常と生活習慣の分子疫学的解析. *日本癌病態治療研究会誌*, 20(1):60-63, 2014.
- 23) 鈴木拓, 今井浩三. がんエピゲノム異常を理解し、応用し、そして制御するために. *実験医学* Vol.32 No.19, 3024-3029, 2014.
- 24) 安井寛, 今井浩三. 抗体医薬, *DDS 研究* 30年, PHARMA TECH JAPAN 臨時増刊号, 31(2): 94-101, 2015.
- 25) 佐々木茂, 篠村恭久, 今井浩三. 抗体治療特集「DDS がもたらした新しい臨床の風景」. *Drug Delivery System*, 30(1): 16-24, 2015.
2. 学会発表
- 【国際学会】
1. Kato Y, Hiromi H, Tujisaki M, Matsune T, Sasaki S, Hinoda Y, Shinomura Y, Imai K. A combination of the anti-fibroblast growth factor receptor 1 monoclonal antibody and interferon- α/β suppresses human hepatic cancer cells in vitro and in vivo. 41st Congress of the International Society of Oncology and Biomarkers. 2014, Barcelona.
- 【国内学会】
1. 今井浩三. 東京大学医科学研究所におけるTRの現状と展望. シンポジウム2「我が国におけるトランスレーショナルリサーチの現状とこれからの展望」第51回日本臨床分子医学会学術集会, 東京国際フォーラム. 2014, 東京
2. 今井浩三. 招聘講演「東大医科研における橋渡し研究とその発展」第103回日本病理学会総会 特別企画, 広島国際会議場フェニックスホール. 2014, 広島
3. 今井浩三. 特別講演「最先端医療の開発とDNA情報に基づく新たな社会」. 多摩大学寺島実郎監修リレー講座. 2014, 東京
4. 今井浩三. 東京理科大学生命医科学研究所シンポジウム「東京大学医科学研究所における橋渡し研究の現状とその展開」、東京理科大学ヒト疾患モデル研究センター, 2014, 千葉県.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願

1) 谷口博昭、今井浩三、片岡一則、西山伸宏、宮田完二郎、前田芳周、「転写因子 PRDM14 のがん幹細胞診断マーカーへの応用とがん幹細胞を標的とした治療法の開発」出願日:2014年07月09日(出願番号 2014-141278)

用」出願日:2015年03月05日(出願番号 2015-043459)

2. 実用新案登録
該当なし。

3. その他
該当なし。

2) 辻祥太郎、今井浩三「結合体及びその使

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 細胞を用いた難行研究を支える基盤体制の整備と運用

研究分担者：大津 真
(東京大学医科学研究所・准教授)

研究要旨

疾患 iPS 細胞を活用した難病研究の遂行に必要な基盤技術の開発、確立、維持と、拠点内研究者への技術供与を行った。拠点内の他の分担研究者と共同して難治性眼疾患患者より iPS 細胞を樹立した。また、拠点外研究者からの依頼に応じて先天性免疫不全症、遺伝性歯牙放出異常症患者からの iPS 細胞の樹立も行った。分化培養系では、造血細胞全般に適用可能な造血前駆細胞分化法の至適化と、脂肪細胞分化、骨芽細胞分化に適用可能な間葉系幹細胞分化法の至適化を行った。

A. 研究目的

東京大学拠点において、創薬を目的として行なう iPS 細胞の樹立、維持、分化培養の基盤技術を整備し、研究全体の進捗に寄与するとともに、自身においても特定の難治疾患に対する画期的創薬を目指す。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞の基本培養法（フィーダー培養、無フィーダー培養）を維持し、需要に応じて拠点内研究者への技術供与を行った。難治性眼疾患患者からの iPS 細胞樹立が可能になるよう、ゲノム倫理研究計画書の変更を行い、樹立を行った。同様に、先天性免疫不全症患者 1 例、遺伝性歯牙放出異常症患者 1 例からの iPS 細胞の樹立にも着手した。脂肪細胞分化を目的として、iPS 細胞から間葉系幹細胞の樹立を試行した。

(倫理面への配慮)

iPS 細胞の樹立は、東京大学医科学研究所ゲノム倫理委員会にて承認された計画書に基づき、対象者または代諾者からインフォームドコンセントを

取得し、個人情報管理における十分な配慮のもと施行した。

C. 研究結果

前年度に引き続き、難病全般を網羅しつつ iPS 細胞の樹立が行えるよう、研究課題「疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬・疾患研究」に適宜変更を加え都度承認を受けた。これにより、分担研究者渡辺と共同して他大学より眼疾患患者検体を受け入れ、1 例は iPS 細胞の樹立を完了し、1 例は樹立を開始した。さらに適用疾患範囲を拡大し、遺伝性歯牙放出異常症患者からの iPS 細胞の樹立に成功した。また、自身の専門とする先天性免疫不全症患者についても 1 例 iPS 細胞の樹立を完了した。分化培養系では、さまざまな血液・免疫難病に対応すべく、現存する造血前駆細胞分化培養法に対して至適化を試行し、系の標準化を図った。また、研究代表者および分担研究者の要望に応え、脂肪萎縮症における創薬研究の基盤整備を共同して行った。具体的には 1 名の博士課程学生を一定期間受け入れ、iPS 細胞培養の基本技術を習得するトレーニングを行った。また、脂肪細胞分化培養系の試行を開始し、より汎用性、定量性に優れると

考えられる MSC を経由する分化培養系の確立に着手した。東京大学医科学研究所の有するヒト iPS 細胞標準株を用いて検討を行い、2-3 週間の工程で、徐々にさい帯由来 MSC と共通の細胞表面抗原の発現パターンへと変化する様子をフローサイトメトリー解析にて確認した。これに次いで樹立した iPS 細胞由来 MSC の培養安定性、多分化能の確認作業を開始した。

D. 考察

前年度から行っている、末梢血前駆細胞を標的とし、センダイウイルスベクターを用いて行なう iPS 細胞樹立法にて、新たに 4 疾患からの樹立に成功し、特に問題を認めていないことから、本法を東京大学拠点における iPS 細胞樹立法の標準法として用いることは妥当と判断している。全工程約 2 ヶ月で backup ストックを 20 株程度、フィーダーフリー馴化株を 5 株程度凍結する手技が安定して行えており、技術者の充実を図ることで月に 2-3 例の疾患 iPS 細胞の樹立が行えるようになると考えられる。分化培養系では造血前駆細胞への分化培養系の至適化に加え、新たに MSC への分化培養系を採用し確立を試みた。結果はまだ確実ではないものの、細胞表面マーカー解析では対照として比較したさい帯由来 MSC とほぼ同一の発現パターンを示す均一な細胞集団を得ることに成功しており、有望な方法であると考えられた。既に脂肪細胞への分化を試行し、良い感触を得ている。

E. 結論

疾患 iPS 細胞研究に必要な基盤技術、特に樹立法に関しては東京大学拠点としての標準法の確立をほぼ終了した。造血細胞分化法に加え、MSC 分化法について確立の目処が立ったことから、iPS 細胞を用いた創薬研究が対象としうる難治性疾患の適用範囲が拡大した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Yokoi K, Akiyama K, Kaneshiro E, Higuchi T, Shimada Y, Kobayashi H, Akiyama M, Otsu M, Nakauchi H, Ohashi T, Ida H. Effect of donor chimerism to reduce the level of glycosaminoglycans following bone marrow transplantation in a murine model of mucopolysaccharidosis type II. *Journal of inherited metabolic disease* 2014.
- Nakahara F, Kitaura J, Uchida T, Nishida C, Togami K, Inoue D, Matsukawa T, Kagiya Y, Enomoto Y, Kawabata KC, Chen-Yi L, Komeno Y, Izawa K, Oki T, Nagae G, Harada Y, Harada H, Otsu M, Aburatani H, Heissig B, Hattori K, Kitamura T. Hes1 promotes blast crisis in chronic myelogenous leukemia through MMP-9 upregulation in leukemic cells. *Blood* 123: 3932, 2014
- Matsunawa M, Yamamoto R, Sanada M, Sato-Otsubo A, Shiozawa Y, Yoshida K, Otsu M, Shiraishi Y, Miyano S, Isono K, Koseki H, Nakauchi H, Ogawa S. Haploinsufficiency of Sf3b1 leads to compromised stem cell function but not to myelodysplasia. *Leukemia* 28: 1844, 2014.
- Lee H, Lee JK, Park MH, Hong YR, Marti HH, Kim H, Okada Y, Otsu M, Seo EJ, Park JH, Bae JH, Okino N, He X, Schuchman EH, Bae JS, Jin HK. Pathological roles of the VEGF/SphK pathway in Niemann-Pick type C neurons. *Nature communications* 5: 5514, 2014.
- Lai CY, Yamazaki S, Okabe M, Suzuki S, Maeyama Y, Iimura Y, Onodera M, Kakuta S, Iwakura Y, Nojima M, Otsu M, Nakauchi H. Stage-specific roles for CXCR4 signaling

in murine hematopoietic stem/progenitor cells in the process of bone marrow repopulation. *Stem Cells* 32: 1929, 2014.

- Itaba N, Wairagu PM, Aramaki N, Yasui T, Matsumi Y, Kono Y, Phan AN, Otsu M, Kunisada T, Nakamura Y, Okano H, Jeong Y, Shiota G. Nuclear receptor gene alteration in human induced pluripotent stem cells with hepatic differentiation propensity. *Hepatology research* 44: E408, 2014.
- Hosoi M, Kumano K, Taoka K, Arai S, Kataoka K, Ueda K, Kamikubo Y, Takayama N, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells derived from primary and secondary myelofibrosis patient samples. *Experimental hematology* 42: 816, 2014.
- Higuchi T, Kawagoe S, Otsu M, Shimada Y, Kobayashi H, Hirayama R, Eto K, Ida H, Ohashi T, Nakauchi H, Eto Y. The generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from patients with infantile and late-onset types of Pompe disease and the effects of treatment with acid-alpha-glucosidase in Pompe's iPSCs. *Molecular genetics and metabolism* 112:44, 2014.
- Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Crawford BE, Brown JR, Ohashi T. Enzyme augmentation therapy enhances the therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type II mice. *Molecular genetics and metabolism* 111: 139, 2014.

- Abdul Razak SR, Baba Y, Nakauchi H, Otsu M, Watanabe S. DNA Methylation Is Involved in the Expression of miR-142-3p in Fibroblasts and Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem cells international* 2014:101349, 2014.

2. 学会発表

- Huan-Ting Lin, Makoto Otsu, Hideki Masaki, Tomoyuki Yamaguchi, Axel Schambach, Kerstin Kaufmann, Manuel Grez, Taizo Wada, Akihiro Yachie, Hiromitsu Nakauchi. Ectopic gp91phox expression is detrimental to XCGD iPSC cell-derived neutrophils. *The XXIIInd Annual ESGCT Congress*. 2014.10.23-26. Hague, Netherlands.
- Mozhgan Khalaj Amirhosseini, Tomohiro Morio, Kohsuke Imai, Hiromitsu Nakauchi, Makoto Otsu. Modeling Platelet Abnormality in Wiskott Aldrich Syndrome using Patient-derived induced Pluripotent Stem Cells. *The XXIIInd Annual ESGCT Congress*. 2014.10.23-26. Hague, Netherlands.
- Makoto Otsu. Patient-Specific iPSC Cells as an Ideal Model System for Optimizing Gene Therapy Procedures. *33th International Congress of the ISBT*. 2014. 2014.6.1-5. Seoul, Korea.

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」

iPS 細胞用臍帯血細胞の提供と保存

分担研究者：長村 登紀子（東京大学 医科学研究所 附属病院・准教授）、

研究要旨

臍帯血・臍帯由来細胞は、ドナーへの肉体的負担のない生後の影響を受けていない未熟な体細胞である。臍帯血は、増殖力の高い造血幹細胞や naïve リンパ球を含み、臍帯は、豊富な間葉系細胞を含む。ともに再生医療や免疫療法への応用が期待されており、iPS 細胞のソースとしても注目されている。本研究では、臍帯血・臍帯バンクプロジェクトと連携し、iPS 細胞ソースとして疾患特異的臍帯血・臍帯由来間葉系細胞を収集・保存、提供する体制を構築することを目的としている。これまで、臍帯血・臍帯バンクにおいて、有疾患児の細胞を収集する体制を確立したが、平成 26 年度は、さらに疾患特異的臍帯・臍帯血を積極的に収集するために、他大学からの疾患特異的臍帯を収集するシステムを構築した。

A. 研究目的：

本研究では、適切な動物モデルや細胞株がない難治性疾患の病態解明や新規治療法の開発用として疾患を有した患者の臍帯血・臍帯を保存し、iPS 細胞ソースとして提供できるシステムを構築することを目的とする。臍帯血・臍帯は、胎児由来細胞であり、環境因子の影響が最も少なく、かつ増殖力が良好であるため、iPS 細胞化して疾患の発症段階等を検討するには適すると思われる。さらに、臍帯血と臍帯は元来医療廃棄物として扱われていたものであり、ドナーへの肉体的負担がなく、倫理的にも受け入れやすい。臨床用の公的臍帯血バンクは、基本的に健常母児の臍帯血の採取を対象としており、それと連携する形で実施している文科省「ナショナルバイオリソース事業(NBRP) ヒト研究用臍帯血幹細胞バンク事業（代表 長村登紀子）」においても健常者由来の臍帯血の提供である。一方で、東大医科研セルプロセッシング・輸血部では、臍帯血・臍帯由来間葉系幹細胞(MSCs)の国内製剤化とバンキング（厚労省科研費（H26-再生医療-一般-010）代表:長村登紀子）を進めており、このプロジェクトでは、疾患がある場合

でも、研究用として保管し、疾患発症の鶏鳴や創薬に資することとしており、本研究との連携が可能である。平成 25 年度より臍帯血・臍帯バンキングにおける有疾患児の収集を始めたが、疾患特異的臍帯血・臍帯の収集効率をさらに上げるために、平成 26 年度は、島根大学医学部附属病院 輸血部と連携した収集を行うためのシステムを構築した。島根大学は、これまで遺伝性骨形成不全症（低フォスファターゼ症等）に対する骨髄移植と骨髄由来 MSCs 移植等を実施しており、こういった遺伝性疾患検体収集の実績もあり、効率的に疾患特異的臍帯血・臍帯の収集が期待された。

B. 方法

東大医科研臍帯血・臍帯バンク：臍帯血と臍帯は、協力産婦人科にて帝王切開を予定している妊婦より、紙面にて同意書を取得し、出産時に臍帯血・臍帯の採取を行った。その後、臍帯血と臍帯は、東大医科研細胞リソースセンターに搬送され、細胞を調製・保管した。児の疾患の有無を確認するために、臍帯由来 MSCs の初期培養時に染色体検査、さらに 6 か月以降の健

康調査を行う。

島根大学医学部との連携：

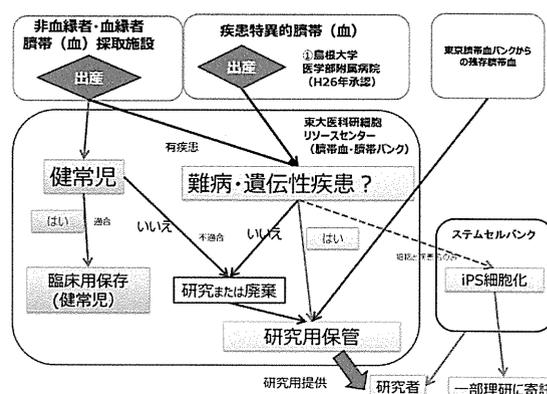
島根大学医学部附属病院にて出産予定の小児の遺伝性疾患の患者および保因者から臍帯血・臍帯を採取・保管・提供するためのシステムを構築した。即ち、出産前で予め遺伝性疾患が判明している場合や保因者と判っている場合に、母親より書面にて同意を得た後に、出産に際して臍帯血・臍帯を採取する。臍帯血採取は児の安全性が確保できる範囲内での採取とした。採取後、個人情報を削除した後に臍帯（血）を東大医科研細胞リソースセンターに搬送する。東大医科研では、これら臍帯血と臍帯の調製保管を行う。臍帯の大部分は、組織ごと凍結保管する。保管した細胞の一部は、ステムセルバンクにて iPS 細胞化して保存し、依頼に応じてステムセルバンク経由にて提供する体制とした（図 1）。

さらに平成 26 年度にて事業を中止した東京臍帯血バンクから、研究使用目的にて凍結臍帯血 1,337 ユニットが移管された。臍帯血採取に関する同意書が年代とともに変遷しているため、同意書の内容に即した対応が必要であるとともに、東大医科研輸血部および東京臍帯血バンク(設置事業体：献血供給事業団)のホームページに、移管した臍帯血を研究用に使用することについて情報公開を行った。

臍帯血・臍帯由来 MSCs の提供：これまで、バンキングした臍帯血・臍帯由来細胞(MSCs)を、所内外の研究者の希望に応じて提供する体制を整えてきたが、平成 26 年度は、臍帯血・臍帯由来 MSCs 由来 iPS 細胞に関しても同様な手順での供給体制を整えた。iPS 細胞に関しては、当該研究者の所属機関のヒトゲノム倫理審査委員会で承認されたことを確認して提供する体制とした。提供に当たって、所定様式を使用し、3rdID を付けて提供する。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京大学医科学研究所（以下、「医科研」）および協力産婦人科所属の病院倫理審査委員会にて承認された「臍帯血と臍帯由来細胞の基礎的研究」およびヒトゲノム倫理審査委員会承認の「臍帯および臍帯血由来細胞の系統的資源化（バンキング）とその応用に関する研究」にもとづいて実施した。医科研内外への試料提供の手続きに準じて、臍帯血・臍帯由来 MSCs、および臍帯血・臍帯 MSCs 由来 iPS 細胞の提供体制を整えた。なお、採取時の ID を東大医科研に



て 2nd ID と連結置換し、母親を含めて採取者にわからないように匿名化し、さらに外部に提供する場合には 3rd ID を付与することとした。

図 1. 臍帯血と臍帯採取対象と系統的資源化

C. 研究結果および D. 考察

これまで、臍帯血の調製保管および臍帯からの MSCs 調製培養・凍結保管に関する手順を検討し、研究用の提供を行ってきた。また、臍帯に関しては、組織の大部分は、組織ごと凍結保管する技術を確立した(Cytherapy,2015, in press)。

平成 26 年度は、臨床用・非臨床用合わせて 26 例の臍帯（血）を保管した。そのうち臍帯由来 MSCs の初期培養にて染色体異常を認めたのは 2 例、うち 1 例は 8 trisomy および,t(4;11)(q27;p15) のモザイク症例であり、もう 1 例は-12 のやはりモザイク症例であった。2 例とも、分娩時には、特に異常所見は認められていない。8 trisomy モ

ザイク症例は、心疾患等の異常を認める場合が多く、現在、採取から6か月以降の児の健康調査を実施する（採取時同意済み）際に、疾患の有無等について確認する予定である。この染色体異常は、培養した臍帯由来MSCsを検査したものであり、培養による影響も否定はできない。同ユニットの臍帯血の染色体検査も実施する予定である。今後、培養によって、さらに8 trisomyの比率が増加するか否か、DNAの脆弱性について検討する予定である。また染色体異常の頻度に関しては、2例と比較的高率とも考えられるが、帝王切開を必要とする出産に限定しているために、何らかのバイアスがかかっている可能性はある。頻度や染色体異常と疾患の発症について、今後も症例を増やして検討していきたい。

一方で、遠方からの臍帯搬送に関して、凍結前臍帯として、どのくらい保管できるか、検討を行った結果、4°Cにて3日間までは特に問題なく細胞が回収できることが分かった。さらに、臍帯組織が新鮮臍帯と遜色なく凍結できる技術を開発したことから、所外（遠方）からの疾患児の臍帯の搬送も可能となった。これにより島根大学医学部附属病院からの臍帯（血）採取搬送も可能な体制ができ、2015年3月より採取を開始した。

さらに、平成26年度、これまで研究用臍帯血バンク等にて連携していた臨床用の東京臍帯血バンクが事業中止し、これによって多くの臍帯血が廃棄対象となった。これらは廃棄対象のうち、再生医療等に関する同意説明がある臍帯血1,337ユニットが、東大医科研細胞リソースセンターに移管し、研究用に有効利用することとなった。このうち心室中隔欠損肺動脈閉鎖症等の心血管疾患7例、臼蓋形成不全3例、胆道閉鎖症2例、多肢症1例の臍帯血を得ている。東京臍帯血バンクの移管臍帯血に関して、特にiPS細胞化とその利用に関しては、さらに倫理的な検討を慎重に行う必要があるが、臍帯血・臍帯は

身体的侵襲の無い方法で採取され比較的効率的に有疾患の検体が採取できる可能性が示唆された。

次年度は、収集した臍帯血・臍帯のうち、有用な遺伝性疾患または保因者の検体の一部については、ステムセルバンクと連携してiPS細胞の樹立を検討する。

E. 結論

創薬研究のためのiPS細胞ソースとして、疾患を有する臍帯血・臍帯の効率的収集・調製・凍結保管・提供システムを構築した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimazu T, Mori Y, Takahashi A, Tsunoda H, Tojo A, Nagamura-Inoue T, Serum- and Xeno-free Cryopreservation of Human umbilical cord tissue as mesenchymal stromal cell source, *in press*, 2015
- 2) Nagamura-Inoue T., and He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility, *World J Stem Cells* 2014, 6,195-202
- 3) Nakane T, Fukuda T, Kanda J, Taniguchi S, Eto T, Ohashi K, Nakamae H, Kurokawa M, Mori T, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Atsuta Y, Murata M. Age influences post-graft-versus-host disease non-relapse mortality in adults with acute graft-versus-host disease of varying severity following allogeneic hematopoietic cell transplant. *Leuk Lymphoma. In press*, 2015
- 4) Nakasone H, Fukuda T, Kanda J, Mori T, Yano S, Kobayashi T, Miyamura K, Eto T, Kanamori H, Iwato K, Uchida N, Mori S, Nagamura-Inoue T, Ichinohe T, Atsuta Y, Teshima T, Murata M.

- Impact of conditioning intensity and TBI on acute GVHD after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant. In press*, 2014
- 5) Tanaka M, Miyamura K, Terakura S, Imai K, Uchida N, Ago H, Sakura T, Eto T, Ohashi K, Fukuda T, Taniguchi S, Mori S, Nagamura-Inoue T, Atsuta Y, Okamoto S. Comparison of Cord Blood Transplantation with Unrelated Bone Marrow Transplantation in Patients Older than Fifty Years. *Biol Blood Marrow Transplant. In press*, 2014
 - 6) Mori Y, Ohshimo J, Shimazu T, He H, Takahashi A, Yamamoto Y, Tsunoda H, Tojo A, Nagamura-Inoue T. Improved Explant Method To Isolate Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells And Their Immunosuppressive Properties. *Tissue Eng Part C Methods. In press*, 2014
 - 7) Konuma T, Ooi J, Uchida N, Ogawa H, Ohashi K, Kanamori H, Aotsuka N, Onishi Y, Yamaguchi H, Kozai Y, Nagamura-Inoue T, Kato K, Suzuki R, Atsuta Y, Kato S, Asano S, Takahashi S. Granulocyte colony-stimulating factor combined regimen in cord blood transplantation for acute myeloid leukemia: a nationwide retrospective analysis in Japan. *Haematologica*. 99,e264-8,2014
 - 8) Ohashi K, Nagamura-Inoue T, Nagamura F, Tojo A, Miyamura K, Mori T, Kurokawa M, Taniguchi S, Ishikawa J, Morishima Y, Atsuta Y, Sakamaki H. Effect of graft sources on allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcome in adults with chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors: a Japanese Society of Hematopoietic Cell Transplantation retrospective analysis. *Int J Hematol*. 100, 296-306,2014
 - 9) He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Yuzawa M., Yamamoto Y., Yorozu P., Agata H., Tojo A. Stage-Specific Embryonic Antigen 4 in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency. *Tissue Engineering., Tissue Eng Part A*. 20,1314-24,2014
 - 10) Atsuta Y, Suzuki R, Yamashita T, Fukuda T, Miyamura K, Taniguchi S, Iida H, Uchida T, Ikegame K, Takahashi S, Kato K, Kawa K, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Sakamaki H, Kodera Y; Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Continuing increased risk of oral/esophageal cancer after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults in association with chronic graft-versus-host disease. *Ann Oncol*. 25,435-41.,2014
 - 11) Murata M, Nishida T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Fukuda T, Mori T, Kobayashi H, Nakaseko C, Yamagata N, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Atsuta Y, Suzuki R, Naoe T. Allogeneic transplantation for primary myelofibrosis with BM, peripheral blood or umbilical cord blood: an analysis of the JSHCT. *Bone Marrow Transplant*. 49, 355-60,2014
 - 12) Kanda J, Nakasone H, Atsuta Y, Toubai T, Yokoyama H, Fukuda T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Eto T, Miyamura K, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Murata M. Risk factors and organ involvement of chronic GVHD in Japan. *Bone Marrow Transplant*. 49,228-35,2014

書籍

- 1) 長村登紀子 公的臍帯血バンク, 臍帯血移植の基礎と臨床 医学書院 2014

2.学会発表

(国内)

1. 長村 (井上) 登紀子, 何 海萍, 森 有加, 高橋 敦子, 山本由紀, 島津貴久, 中井未来, 東條 有伸, 臍帯血・臍帯由来間葉系幹細胞のセミパブリックバンク樹立について, 第62回日本輸血・細胞治療学会(奈良)2014/5/16
2. He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Takahashi A, Yamamoto Y, Mori Y, and Tojo A. The Immunosuppressive Effect of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells for the treatment of GVHD, 第76日本血液学会学術集会総会(大阪) 2014/11/1

(海外)

1. Yuka Mori, Tokiko Nagamura-Inoue, Jun Ohshimo, Takahisa Shimazu, Haiping He,

Astuko Takahashi, Hajime Tsunoda, and Arinobu Tojo, Improved, Improved explants method to isolate umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and their immunosuppressive properties (poster), ISCT, Paris, 2014/4/23-27

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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

免疫・血液系希少疾患由来 iPS 細胞を利用した創薬研究

研究分担者：東條 有伸
(医科学研究所 分子療法分野・教授)

研究要旨

本研究では、根治療法あるいは標準治療がない免疫・血液領域の希少疾患を対象として、患者細胞の遺伝子解析情報を利用して分子標的薬または遺伝子医薬を探索し、患者由来 iPS 細胞を用いた病態解析ならびに治療モデルにおいてその検証を行う。今年度は、前年度の終わりに樹立した iPS 細胞が骨髄異形成症候群 (MDS) の腫瘍クローン由来か否かを検証するために、複数の MDS 関連遺伝子について変異解析を行う一方、今後ヒト iPS 細胞から造血発生モデルを構築するための予備研究として、マウス iPS 細胞を用いた造血幹細胞の基盤研究を行った。

A. 研究目的

免疫・血液系の希少疾患由来の iPS 細胞を作製する一方で、同一症例の遺伝子解析によって収集される情報をもとに治療標的分子を同定する。iPS 細胞モデルを利用して、候補分子に対する分子標的薬や遺伝子医薬を探索する。

B. 研究方法

本研究は、医科学研究所倫理審査委員会により承認された課題：「難治性造血器疾患由来 iPS 細胞の樹立と iPS 細胞を用いた病態解析」ならびにゲノム倫理審査委員会により承認された課題：「疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬・疾患研究」と「臨床検体を用いた造血器腫瘍関連遺伝子の解析」にもとづき実施した。研究内容を説明のうえ文書による同意を取得した当該疾患患者 (MDS-RCMD) の骨髄検体より CD34+細胞を分離し、使用するまで凍結保存した。また、末梢血より成熟好中球 (腫瘍クローン) と T リンパ球 (正常クローン) を分離し、それぞれから DNA を抽出した。

iPS 細胞は、医科学研究所ステムバンクとの共同研究により 4 つの初期化因子 (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*,

c-Myc) をそれぞれ有するセンダイウイルスベクター (SeV) を用いて作製された。

患者検体を用いたスプライスソーム遺伝子 (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF35*) の DNA-PCR は、変異の hot spot を増幅するプライマーペアを用いて常法通りに施行した。増幅された遺伝子産物は、直接または pcR-Blunt ベクターにクローン化した後シーケンス解析した。

また、iPS 細胞からの造血発生に関する基盤研究として *HoxB4* が iPS 細胞由来造血幹・前駆細胞 (HS/PC) の多能性維持に及ぼす影響を解析した。まず、iPS 細胞から HS/PC を誘導する際の指標として転写因子 *GATA2* に着目し、*GATA2* 遺伝子座に *GFP* 遺伝子をノックインした B6 マウス骨髄細胞から iPS 細胞を樹立した。これにタモキシフェン (4-HT) 誘導型 *HoxB4* を発現させ、4-HT 添加により活性化した *HoxB4* が iPS 細胞から分化誘導した *GFP* 発現 (*GATA2* 陽性) 細胞の動態に及ぼす影響について経時的に解析した。

C. 研究結果

MDS-RCMD 患者 CD34+細胞に初期化因子を発

現する SeV を感染させ、生じた細胞塊を継代する過程で siRNA 導入により SeV を排除して iPS 細胞の樹立に成功した。しかしながら、本症例はマーカーとなる染色体異常がないため、樹立された iPSC が MDS クローン由来か、残存する正常細胞由来かの判別は遺伝子解析を要する。RCMD で比較的高頻度に検出される 3 つのスプライソーム遺伝子の変異の有無を患者 DNA 検体について調べたが、いずれも変異は検出されなかった。

なお、マウス iPS 細胞からの造血発生では、予想に反して、4-HT の有無にかかわらず、GATA2 陽性細胞は二ヶ月間の培養中持続して観察された。いっぽう同系マウスへの移植実験では、二ヶ月間 HoxB4 を活性化し続けた細胞群にのみ長期造血再構築能および多分化能を認めた。さらに詳細に解析した結果、CD45 陰性 GATA2 強陽性細胞群は長期造血再構築能、弱陽性細胞群は一過性の造血再構築能をそれぞれ示した。

D. 考察

われわれが樹立した患者由来 iPS 細胞が MDS クローン由来であることの検証には、当該患者骨髓系細胞と同一の遺伝子変異が iPS 細胞にも検出されることが必須である。今回、RCMD で最も高頻度に変異の見つかるスプライソーム遺伝子に関して調べたが、スクリーニングした領域には変異がなかったため、現在、次世代シーケンサーを用いたより広範な MDS 関連遺伝子の標的シーケンスを準備中であり、次年度には結果を明らかにする予定である。

iPS 細胞から造血系への分化誘導過程で HoxB4 を恒常的に活性化すると、CD45 陰性 GATA2 強陽性の細胞分画中に HS/PC の前駆細胞ともいふべき細胞が長期間維持される可能性が示唆された。

E. 結論

樹立した患者由来 iPS 細胞株が MDS クローン由来かどうかは決定できなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

●Shimazu T, Mori Y, Takahashi A, Tsunoda H, Tojo A, Nagamura-Inoue T. Serum- and xeno-free cryopreservation of human umbilical cord tissue as mesenchymal stem cell source. *Cytotherapy*. 2015 Mar 2

●Konuma T, Kato S, Ishii H, Takeda R, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. HLA-DRB1 mismatch is associated with a decreased relapse in adult acute myeloid leukemia after single-unit myeloablative cord blood transplantation. *Ann Hematol*. 2015 Feb 25

●Shimada N, Yuji K, Ohno N, Koibuchi T, Oyaizu N, Uchimaruk K, Tojo A. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with bendamustine in an HIV-infected patient on antiretroviral therapy: a case report and review of the literature. *Clin Case Rep*. 2015 Feb 20.

●Kobayashi S, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Nakano K, Yamochi T, Watanabe N, Tojo A, Watanabe T, Uchimaruk K. Advanced HTLV-1 carriers and early-stage indolent ATLs are indistinguishable based on the CADM1 vs. CD7 plot in flow cytometry. *Cancer Sci*. 2015 Feb 20. doi: 10.1111/cas.12639. [Epub ahead of print]

●Konuma T, Kato S, Ooi J, Ebihara Y, Mochizuki S, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Third allogeneic stem cell transplantation (SCT) using unrelated cord blood for relapsed acute leukemia after second allogeneic SCT. *Int J Hematol*. 2015 Feb 6. [Epub ahead of print]

●Konuma T, Kato S, Yuji K, Ohno N, Uchimaruk K, Takahashi S, Tojo A. Clearance of blasts from peripheral blood during induction chemotherapy using exponential decay model predicts complete remission and long-term survival in adult acute

myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol.* 2014 Oct 12. doi: 10.1111/ijlh.12302. [Epub ahead of print]

●Mori Y, Ohshimo J, Shimazu T, He H, Takahashi A, Yamamoto Y, Tsunoda H, Tojo A, Nagamura-Inoue T. Improved explant method to isolate umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and their immunosuppressive properties. *Tissue Eng Part C Methods.* 2014 Sep 13 [Epub ahead of print]

●Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Single-unit cord blood transplantation for acute lymphoblastic leukemia and lymphoma using an intensified conditioning regimen of total body irradiation, high-dose cytarabine, and cyclophosphamide. *Leuk Lymphoma.* 2014 Sep 8:1-3. [Epub ahead of print]

●Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Myeloablative unrelated cord blood transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison with other graft sources from related and unrelated donors. *Ann Hematol.* 94(2):289-96, 2015

●Sato A, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ishihara M, Tashiro Y, Gritli I, Shimazu H, Munakata S, Yagita H, Okumura K, Tsuda Y, Okada Y, Tojo A, Nakauchi H, Takahashi S, Heissig B, Hattori K. Inhibition of plasmin attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality by suppressing the matrix metalloproteinase-9-dependent inflammatory cytokine storm and effector cell trafficking. *Leukemia.* 29:145-56, 2015

●Ishigaki T, Zaike Y, Nojima M, Kobayashi S, Ohno N, Uchimar K, Tojo A, Nakauchi H, Watanabe N. Quantification of adult T-cell leukemia/lymphoma cells using simple four-color flow cytometry. *Clin Chem Lab Med.* 2014 53(1):85-93, 2015

●Kobayashi M, Tojo A. BRAF-V600E mutation in circulating cell-free DNA is a promising biomarker of high-risk adult Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 124(16):2610-1, 2014

●Kawamata T, Ohno N, Sato K, Kobayashi M, Jo N, Yuji K, Tanosaki R, Yamano Y, Tojo A, Uchimar K. A case of post-transplant adult T-cell leukemia/lymphoma presenting myelopathy similar to but distinct from human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy. *SpringerPlus.* 3:581, 2014

●Ohashi K, Nagamura-Inoue T, Nagamura F, Tojo A, Miyamura K, Ishikawa J, Morishima Y, Mori T, Atsuta Y, Sakamaki H, on behalf of Choric Myeloid Leukaemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Effect of graft sources on allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation outcome in adults with chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors: a Japanese Society of Hematopoietic Cell Transplantation retrospective analysis. *Int J Hematol.* 100(3):296-306, 2014

●Kato S, Konuma T, Tojo A, Takahashi S. Hemorrhagic hepatic cyst after allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol.* 100(3):214-5, 2014

●Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Kawamata T, Tojo A, Takahashi S. Comparable long-term outcome of unrelated cord blood transplantation with related bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation for patients aged 45 years or older with hematologic malignancies after myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 20(8):1150-5, 2014

●Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Oyaizu N, Asanuma S, Yamagishi M, Yamochi T, Watanabe N, Tojo A, Watanabe T, Uchimar K. CADM1 expression and stepwise

down-regulation of CD7 is closely associated with clonal selection of HTLV-1-infected T cells potentially evolving into adult T cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res.* 20(11):2851-61, 2014

●Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Tojo A, Takahashi S. Impact of sex incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 49(5):634-9, 2014

●Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Pretransplant hyperferritinemia has no effect on the outcome of myeloablative cord blood transplantation for acute leukemia and myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol.* 93(6):1071-2, 2014

●Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Tojo A, Takahashi S. Effect of ABO blood group incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation after myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 20(4): 577-81, 2014

●Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Uchimaru K, Asano S, Tojo A, Takahashi S. Single-unit cord blood transplantation after granulocyte colony-stimulating factor-combined myeloablative conditioning for myeloid malignancies not in remission. *Biol Blood Marrow Transplant.* 20(3):396-401, 2014

●He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Yuzawa M, Yamamoto Y, Yorozu P, Tojo A. Stage-Specific Embryonic Antigen 4 is not a marker for

proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* 20(7-8): 1314-24, 2014

2. 学会発表

●Ishigaki T, Uchimaru K, Kobayashi S, Ohno N, Tojo A. Comprehensive Analysis of Surface Antigens on Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma (ATL) Cells and Search for ATL-Initiating Cell Markers. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 2014.12.6-9, San Francisco CA, USA

●Kobayashi M, Tojo A. BRAF-V600E mutation on circulating cell-free DNA is a promising biomarker of high-risk adult Langerhans cell histiocytosis. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 2014.12.6-9, San Francisco CA, USA

●Tsuda M, Nishiwaki K, Sugimoto K-J, Yokoyama H, Igarashi T, Shimizu S, Yujiri T, Wakita H, Tojo A. Impact of Ph⁺ stem cell burden on clinical findings and molecular responses to first-line nilotinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: the results from the interim analysis of N-road, a multi-center phase II study. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 2014.12.6-9, San Francisco CA, USA

●Izawa K, Yamamoto M, Tojo A. Enforced HoxB4 sustains CD45-c-kit⁺ pre-hematopoietic stem cells (HSCs) derived from murine induced-pluripotent stem cells, which develop long-term and short-term repopulating HSCs according to GATA2 expression level. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 2014.12.6-9, San Francisco CA, USA

●Futami M, Sato K, Nakamura T, Tojo A. Thymidine kinase-deleted, let7a-regulated vaccinia virus specifically infects and lyses myeloma cells in a mouse myeloma model. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 2014.12.6-9, San Francisco CA, USA

- 東條有伸、許 泰一、山本一仁、高橋直人、中前博久、小林幸夫、田内哲三、岡本真一郎、宮村耕一、岩崎浩己、松村 到、薄井紀子、Yanase K、Hu S、Turner S、直江知樹. Update of a phase 1/2 study of ponatinib in Japanese patients with Philadelphia positive leukemia. 第 76 回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2、大阪
- 加藤せい子、小沼貴晶、川俣豊隆、城 憲秀、海老原康博、望月慎史、東條有伸、高橋 聡. Post-transplant lymphoproliferative disorders after cord blood transplantation. 第 76 回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2、大阪
- 二見宗孔、佐藤広太、中村貴史、東條有伸. Oncolytic virotherapy against multiple myeloma using a multi-regulated vaccinia virus. 第 76 回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2、大阪
- 石垣知寛、内丸薫、小林誠一郎、大野伸広、東條有伸. Establishment of a stroma-dependent ATL cell-line and analysis of its proliferation in vivo. 第 76 回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2、大阪
- 小沼貴晶、加藤せい子、湯地晃一郎、大野伸広、川俣豊隆、横山和明、城 憲秀、内丸 薫、高橋聡、東條有伸. Impact of clearance of blasts from peripheral blood during induction chemotherapy in AML. 第 76 回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2、大阪
- 大島康雄、谷本哲也、湯地晃一郎、内丸 薫、高橋 聡、東條有伸. Scouting risk factors for CMV reactivation in 4,361 non-transplant malignant lymphoma case. 第 76 回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2、大阪
- 川俣豊隆、内丸 薫、東條有伸. Differential diagnosis by flowcytometric analysis of post allo-SCT myelopathy; a case of ATL. 第 76 回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2、大阪
- 石垣知寛、小林誠一郎、東條有伸. 急性型 ATL における細胞表面抗原の網羅的クラスタリング解析と ATL 幹細胞マーカーの探索. 第 73 回日本癌

学会学術総会、2014.9.25-27、横浜

- 二見宗孔、中村貴史、東條有伸. Oncolytic virotherapy against multiple myeloma using a multi-regulated vaccinia virus. 第 73 回日本癌学会学術総会、2014.9.25-27、横浜
- 平野光人、大野伸広、小林誠一郎、石垣知寛、田野崎隆二、鴨居功樹、望月 學、内丸 薫、東條有伸. Simultaneous development of acute type ATL and HTLV-1 uveitis. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会 2014.8.23、東京
- 石垣知寛、内丸薫、小林誠一郎、大野伸広、東條有伸. 急性型 ATL における細胞表面抗原のクラスタリング解析と ATL 幹細胞マーカーの探索. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会 2014.8.23、東京
- 石垣知寛、内丸薫、小林誠一郎、大野伸広、東條有伸. 成人 T 細胞白血病(ATL)における細胞表面抗原の網羅的解析と ATL 幹細胞マーカーの探索. 成人 T 細胞白血病(ATL)における細胞表面抗原の網羅的解析と ATL 幹細胞マーカーの探索. 第 24 回日本サイトメトリー学会学術集会. 2014.6.28、大阪
- 竹田玲奈、平野光人、福山朋房、大野伸広、横山和明、中村聡介、川俣豊隆、大田泰徳、内丸 薫、東條有伸. MDS の治療中に合併した骨髄浸潤を伴う DLBCL の 1 例. 第 54 回日本リンパ網内系学会、山形

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

発明の名称：メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ-2 阻害薬に対する反応性を予測する方法
 東京大学知財部管理番号：25B148002-1

発明者：東條有伸、後藤典子

出願人：国立大学法人 東京大学

出願日：2014/12/3

出願番号：特願 2014-244956

出願国：日本

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：渡邊 すみ子 （東京大学医科学研究所・特任教授）

研究要旨

iPS 樹立効率をあげることが期待されたキナーゼについてより詳細な検討をおこない、マウス、ヒトいずれにおいてもキナーゼ過剰発現により iPS 樹立効率が著しく上昇する事、またキナーゼ領域が必要であることが明らかになった。網膜疾患 iPS 樹立について疾患・患者を選定し一例について iPS を樹立した。この iPS の解析のため最新の網膜分化プロトコールを導入した。

A. 研究目的

難治性の網膜遺伝性疾患の病態の正確な解析とその分子基盤を明らかにすることを目的として、患者由来末梢血より iPS を樹立し、解析すると同時に創薬スクリーニングのために系を開発する。このために樹立 iPS の品質管理(QC)の指標の選定、樹立効率改善の技術開発なども目指す。

B. 研究方法

着目しているキナーゼの野性型に加えキナーゼドメインにアミノ酸置換をもつ変異型を構築し、輸入ヒト皮膚細胞にレトロウイルスで4因子とともに導入し、iPS 樹立効率を検討した。

順天堂大学眼科における遺伝性網膜変性症患者症例について、変異遺伝子と病態の関連についての知見、薬剤スクリーニングの必要性と可能性について検討し、数症例を選択し、第一例について iPS 樹立を医科研ステムセルバンクと共同で開始した。これまで蓄積した miRNA 発現パターン、microarray, RNAseq による遺伝子発現パターンの解析結果とそのデータの安定性を検討し、樹立 iPS の QC と未分化状態での変異遺伝子の影響について検討するプロトコールを作製した。

iPS より網膜へ分化の最新プロトコールを移入し、さらにエピジェネティックな因子の制御をくわえ

効率を改善するための基礎研究をおこなった。

(倫理面への配慮) 研究対象者に対する人権擁護上の配慮：東京大学の指針にもとづき、研究計画について倫理、ゲノム審査をへて承認ののち、研究を開始する。研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意は、東大医科研コアラボで確立された方法を統一して利用する。動物実験は指針にもとづき、東大医科研動物実験委員会により承認をえて行っている。

C. 研究結果

1. 現在注目しているキナーゼがマウス iPS の樹立効率を著しくあげることがすでに示したが、ヒト iPS 樹立効率についてもその過剰発現により、著しく改善されることが明らかになった。
2. その効果にはキナーゼドメインが必須であることが明らかになった。
3. miRNA array, RNAseq により樹立 iPS の QC を行う事とし、プロトコールを決定した。
4. 眼科領域のある遺伝性疾患について、iPS 樹立を開始した。
5. 網膜分化プロトコールの移入をおこなった。エピジェネティックな機構をもちいた iPS からの網膜分化を目的として、その発生における役割を解析し、HistoneH3K27 メチル化の網膜分化におけ

る役割を明らかにした。

D. 考察

現在着目しているキナーゼはマウス、ヒトいずれでも iPS 樹立を強力に促進することがあきらかになり、そこにキナーゼドメインが必要であることから何らかの標的分子のリン酸化を介していることが予測された。しかし、樹立効率改善にこれを利用するには現在の情報では遺伝子導入をおこなう必要があり、本キナーゼを誘導する薬剤の検討などが今後実用化には必要になってくる事が予測される。網膜疾患における iPS を利用した薬剤スクリーニング系は報告がなく、病態メカニズムの理解と薬剤スクリーニングは社会的要請も高いと考えられる。

E. 結論

着目しているキナーゼは種をとわずリン酸化を介して細胞の初期化を誘導する活性をもつ。網膜視細胞変性疾患の病態の理解と薬剤スクリーニングの一刻も早い体制作りが必要であり、品質管理の行き届いた iPS での進展をおしすすめる準備がととのった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Umebayashi M., Sumita, Y., Kawai, Y., Watanabe, S., Asahina, I. Gene activated-matrix comprised of atelocollagen and plasmid DNA encoding Bmp4 or Runx2 promotes rat cranial bone augmentation. *Bio Research Open Access*, 2015
- Arai, E., Baba, Y., Iwagawa, T., Kuribayashi, H., Mochizuki, Y., Watanabe, S. Ablation of Kcnj10 expression in retinal explants revealed pivotal roles for Kcnj10 in the proliferation and development of Müller glia. *Mol Vis*, 21, 148-159, 2015
- Iida, A., Iwagawa, T., Baba, Y., Satoh, S., Mochizuki, Y., Nakauchi, H., Furukawa, T., Koseki, H., Murakami, A., Watanabe, S. Roles Histone H3K27 tri-methylase Ezh2 in retinal

proliferation and differentiation, *Developmental Neurobiology*, in press, 2015

- Abdul Razak, S. A., Baba, Y., Nakauchi, H., Otsu, M., Watanabe, S. DNA methylation is involved in the expression of miR-142-3p in fibroblasts and induced pluripotent stem cells, *Stem Cells International*, 101349, 2014
 - Iida, A., Tabata, Y., Baba, Y., Fujii, T., Watanabe, S. Critical Roles of DNase1l3l in Lens Nuclear Degeneration in Zebrafish, *Biochimie*, 106, 68-74, 2014
 - Iida, A., Iwagawa, T., Kuribayashi, H., Satoh, S., Mochizuki, Y., Baba, Y., Nakauchi, H., Furukawa, T., Koseki, H., Murakami, A., and Watanabe, S. Jmjd3 is required for the development of subsets of retinal bipolar cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.,USA*, 111, 3751-3756, 2014
 - Kuribayashi, H., Baba, Y., Watanabe, S. BMP signaling participates in late phase differentiation of the retina, party via upregulation of Hey2, *Developmental Neurobiology*, 74, 1172-1183, 2014
 - Koso, H., Tshako, A., Lyons, E., Ward, J. M., Rust, A. G., Adams, D. J., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Watanabe, S. Transposon mutagenesis identifies Foxr2 as a putative oncogene in medulloblastoma, *Can Res*, 74, 2351-2361, 2014
 - Mochizuki, Y., Iida, A., Lyons, E., Kageyama, R., Nakauchi, H., Murakami, A., Watanabe, S. Use of cell type-specific transcriptome to identify genes specifically involved in Müller glia differentiation during retinal development, *Dev Neurobiol*, 74, 426-437, 2014
- ##### 2. 学会発表
- Watanabe, S., The 2nd Ad Hoc IRCMS seminar “Neuro-vascular interaction ~Cutting edge in retinal biology~, Oct 27, 2014 (Kumamoto, Japan), Invited speaker.
 - Watanabe, S. Asia ARVO (The Association for research in vision and ophthalmology) 2015 meeting, February 16-19, 2015 (Yokohama, Japan), Symposium “Epigenetics in ocular development and diseases), Invited speaker and invited chair
 - Watanabe, S. OIST mini-symposium “Microglia: Key to understanding neural