

II. 分担研究報告書

悪性神経膠腫手術検体よりの脳腫瘍幹細胞の樹立とその分子遺伝学的因子の解析

研究分担者：斉藤 延人（脳神経外科・教授）

研究要旨

我々は、引き続き、神経膠芽腫の患者検体より脳腫瘍幹細胞の樹立を行うとともに、樹立した脳腫瘍幹細胞株をヌードマウスの脳内に移植し、*in vivo* 環境での腫瘍増大速度を評価した。続いて、腫瘍増大速度に関連する因子を同定すべく、腫瘍幹細胞株から抽出した DNA を用いて解析を行った。

A．研究目的

脳腫瘍幹細胞の樹立と、樹立した脳腫瘍幹細胞株の悪性度に関わる分子遺伝学的因子の解析を行う。

B．研究方法

前年度と同様の方法にて、悪性神経膠腫手術検体からの脳腫瘍幹細胞の樹立を行った。

さらに、患者の脳腫瘍検体より樹立した 12 種類の脳腫瘍幹細胞株を使用し、分子遺伝学的因子の解析を施行した。各細胞株を 1×10^5 細胞ずつ 4 匹のヌードマウスの脳内に移植し、死亡直前までの期間を記録した。死亡直前に安楽死させ、脳を摘出して病理標本を作成し、腫瘍形成を確認した。腫瘍 DNA に関しては、凍結検体を破碎し、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を用いて、プロトコールに従って DNA 抽出を行った。悪性度に関わる因子として、以下の解析を行った。各種がん遺伝子の増幅に関して、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法を用いて解析を行った。TP53 遺伝子の変異、TERT プロモーター遺伝子の変異に関して、サンガー法によるダイレクトシーケンスにて解析を行った。これらの悪性度に関わると思われる因子が、*in vivo* 環境下での腫瘍増殖速度と関連するかを評価した。

(倫理面への配慮)

患者の臨床検体・材料を使用する実験は、東京大学の倫理委員会の承諾のもと、患者もしくは家族よりのインフォームドコンセントを所定の用紙を用いて取得した後に行った。また、実験およびデータ解析の際、患者の個人情報が漏れないよう匿名化して施行した。

マウスは SPF (Specific Pathogen Free) 規格の施設で飼育され、自然界の環境に影響を与えないよう十分な配慮がなされている。また、実験は東京大学動物実験マニュアルを遵守し、必要最小限の数の動物を使用し、十分に苦痛を取り除いた状態で行った。

C．研究結果

平成 26 年度は、2 人の患者検体より脳腫瘍幹細胞株を樹立した。この新たに樹立した 2 つの細胞株に関しては、まだ *in vivo* での腫瘍原性を確認していないため、今回行った解析には含まれていない。

今回使用した 12 種類の脳腫瘍幹細胞株の内、5 種類の細胞株で移植した 4 匹全てのマウスにおける腫瘍形成を確認した。腫瘍形成を認めた細胞株間においても、腫瘍増大速度に差を認めた。

MLPA 法にて解析を行った 24 種類のがん遺伝

子の内、EGFR、MDM4、PDGFRA、METの4種の遺伝子の増幅を一部の細胞株において認めた。TP53遺伝子の変異は4つの細胞株、TERT遺伝子プロモーターの変異は9つの細胞株で認めた。これらの因子と*in vivo*環境下での腫瘍増大速度および腫瘍形成の有無について相関の有無を評価したが、いずれの因子に関しても明らかな関連は認めなかった。

D．考察

今回解析を行った因子に関しては、樹立した腫瘍幹細胞株の悪性度と有意に関連するものは認めなかった。悪性度に関連する他の因子に関して、さらなる解析が必要である。今回はDNAを用いた解析を中心に行ったが、今後RNAを用いた網羅的発現解析を行い、悪性度に関連する因子に関して検討を行う必要あるものと思われる。

E．結論

脳腫瘍幹細胞株の樹立と、樹立した脳腫瘍幹細胞株の*in vivo*環境下での腫瘍増大速度と関連する因子に関して検討を行ったが、今回のDNA解析の結果からは、有意に関連する因子は見出だせなかった。今後、RNAを用いた網羅的発現解析を含めてさらなる検討が必要である。

F．研究発表

1. 論文発表

Takai H, Masuda K, Sato T, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Katou Y, Ogawa H, Morishita Y, Kozuka-Hata H, Oyama M, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Toyoshima C, Shirahige K, Akiyama T. 5-Hydroxymethylcytosine Plays a Critical Role in Glioblastomagenesis by Recruiting the CHTOP-Methylosome Complex. *Cell Rep.* 9:48-60, 2014.

Takami H, Mukasa A, Ikemura M, Shibahara J, Takahashi M, Momose T, Saito N. Findings from positron emission tomography and genetic analyses for cerebellar liponeurocytoma. *Brain Tumor Pathol.* 2014 Dec 20. [Epub ahead of print]

van Thuijl HF, Mazor T, Johnson BE, Fouse SD, Aihara K, Hong C, Malmström A, Hallbeck M, Heimans JJ, Kloezeman JJ, Stenmark-Askmal M, Lamfers ML, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger MS, Söderkvist P, Taylor BS, Molinaro AM, Wesseling P, Reijneveld JC, Chang SM, Ylstra B, Costello JF. Evolution of DNA repair defects during malignant progression of low-grade gliomas after temozolomide treatment. *Acta Neuropathol.* 2015 Feb 28. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

Mukasa A, Aihara K, Gotoh D, Saito K, Nagae G, Tsuji S, Tatuno K, Yamamoto S, Takayanagi S, Narita Y, Shibui S, Aburatani H, Saito N. *H3F3A* K27M Mutations in Thalamic Gliomas from Young Adult Patients (poster) American Association for Cancer Research(AACR) Annual Meeting 2014. 2014.4.5-9, San Diego, USA

武笠晃丈. 化学療法がもたらすがんゲノム不安定性の加速 第18回日本がん分子標的治療学会. 2014.6.26-27, 仙台

Mukasa A, Aihara K, Gotoh D, Saito K, Nagae G, Tsuji S, Tatuno K, Yamamoto S, Takayanagi S, Narita Y, Shibui S, Aburatani H, Saito N. Frequent *H3F3A* K27M Mutations in Thalamic Gliomas from Young Adult Patients. 20th International Conference on Brain Tumor Research and

Therapy. 2014.7.20-23, Truckee, USA

武笠晃丈. Clonal evolution of glioma induced by anti-cancer therapy (グリオーマにおける治療誘導性のクローン進化) 第 73 回日本癌学会. 2014.9.25-27, 横浜

武笠 晃丈、相原 功輝、齊藤 邦昭、Johnson BE、高柳 俊作、上田 宏生、山本 尚吾、辰野 健二、永江 玄太、成田 善孝、永根 基雄、西川 亮、植木 敬介、Costello JF、油谷 浩幸、齊藤 延人. 化学療法剤による神経膠腫ゲノム不安定性の加速の可能性 第 73 回日本脳神経外科学会. 2014.10-11, 品川

武笠晃丈. グリオーマの腫瘍内多様性に及ぼす抗がん治療の影響 第 87 回日本生化学大会. 2014.10.15-18, 京都

武笠晃丈. グリオーマの発生・進展にかかわるエピゲノム異常 第 37 回日本分子生物学会. 2014.11.25-27, 横浜

武笠 晃丈、齊藤 邦昭、相原 功輝、永江 玄太、Johnson BE、高柳 俊作、大谷 亮平、田中 將太、柳澤 俊介、上田 宏生、山本 尚吾、辰野 健二、Costello JF、西川 亮、永根 基雄、成田 善孝、植木 敬介、油谷 浩幸、齊藤 延人. 神経膠腫悪性転化症例のオミクス解析から考える個別化治療戦略 第 32 回日本脳腫瘍学会 学術集会. 2014.11.30 -12.2, 浦安

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

悪性リンパ腫・多発性骨髄腫・良性疾患由来 iPS 細胞を用いた新規治療薬の開発

研究分担者：黒川 峰夫
（東京大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科 教授）

研究要旨

血液疾患の中でも悪性リンパ腫・多発性骨髄腫・良性疾患は細胞株やマウスモデルが少なく、大量の細胞を用いるマルチオミクス解析、薬剤スクリーニングが困難であった。我々はこれまで、末梢血や骨髄細胞といった患者検体のリプログラミング方法の最適化を行うことにより、複数の造血器疾患から iPS 細胞を樹立してきた。これらの技術を生かして上記疾患由来 iPS 細胞を樹立し、再分化させた造血幹・前駆細胞を用いて、マルチオミクス解析のみならず、未知の疾患発症機構を同定する。また、ハイスループットの薬剤スクリーニングにより新規治療法を探索する。

A．研究目的

悪性リンパ腫・多発性骨髄腫・良性疾患患者由来 iPS 細胞を樹立する。作成した複数の患者由来 iPS 細胞を血球に再分化させ、in vitro および in vivo での細胞表面マーカーやシグナル伝達異常などの病態解析を行う。また、化合物ライブラリーを用いて治療につながる薬剤スクリーニングを実施する。

B．研究方法

患者検体の末梢血、リンパ球、骨髄細胞から iPS 細胞を樹立し血球に再分化させる。再分化させた血球が疾患の病態を反映するか検討する。その造血幹細胞・前駆細胞分画を用いてコロニー形成能や細胞表面マーカーの解析、メチロームおよびトランスクリプトーム等のマルチオミクス解析を行う。さらに、化合物ライブラリーを用いた大規模薬剤スクリーニングを行う。

（倫理面への配慮）

幹細胞医療研究の倫理支援は赤林朗教授を委員長とする「医学系研究科倫理委員会」、武藤教授を室長とする「研究倫理支援室」が対応し、研究計

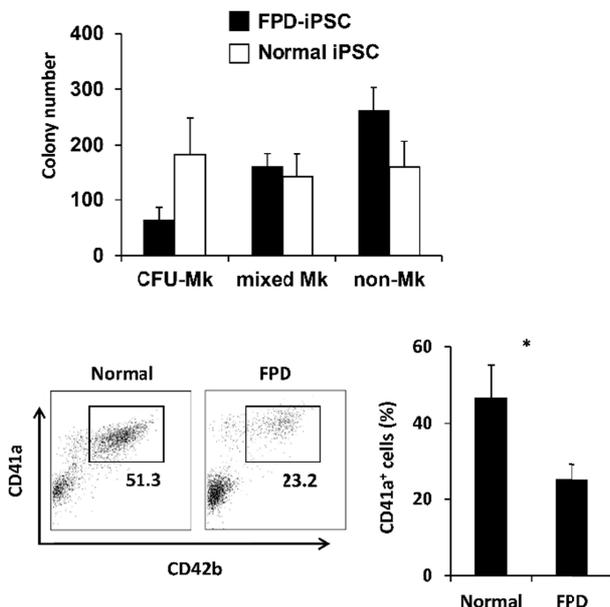
画と説明同意文書のチェックや実地調査等を行っている。臨床試験は山崎力教授をセンター長とする「臨床研究支援センター」、長村文孝教授を室長とする「臨床試験管理推進室」が対応し、プロトコルと説明同意文書のチェックや体制整備及び規制対応を行っている。これらは連携して基礎から臨床までの一貫した支援体制を構築しており、ヒト幹細胞臨床研究審査委員会、倫理審査委員会、ゲノム審査委員会等の委員会の運営支援を行っている。各委員会は外部機関からの倫理申請も受け付けており、個人情報保護に関しても所内で規定を設けている。医科研病院では臨床試験実施時には、被験者への説明と理解状況の確認に重点をおいたコーディネーターを配置し、心理状況を適切に把握するために外部から先端医療に通じた臨床心理士（大木桃代文教大学教授）にも適宜患者面接を行っている。以上のような対応により、研究対象者の人権に配慮し、同意撤回の自由を保護し、それによる不利を受けないことを保証する。

動物実験は各組織の動物実験委員会が研究の審査を行い、動物実験施設と共に動物愛護を含めた実験講習を実施し、研究内容の確認も行った。また動物実験の自己点検・評価を行い、東京大学本

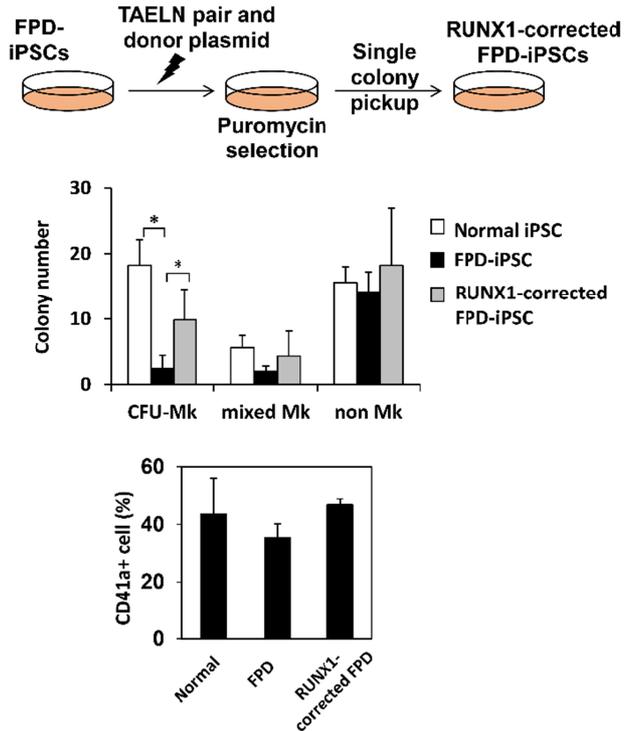
部ライフサイエンス研究倫理支援室と内容の確認を行った。

C. 研究結果

われわれは平成 25 年度までに、慢性骨髄性白血病(CML)細胞や JAK2V617F 変異陽性骨髄線維症(MF)をはじめとする骨髄増殖性腫瘍(MPN)細胞、家族性血小板異常症(FPD)患者の皮膚線維芽細胞から、レトロウイルスベクターによる OCT3/4, SOX2, C-MYC, KLF4 の導入によって疾患 iPS 細胞を樹立することに成功している。平成 26 年度は FPD 由来 iPS 細胞 (FPD-iPS 細胞) を用いて病態を反映するかどうかを検討した。FPD-iPS 細胞を 10T1/2 上で VEGF 添加により血球に分化させたところ、CD34 陽性 CD43 陽性の造血前駆細胞と考えられる血球細胞を得ることができたが、この時点で正常細胞由来の iPS 細胞との差異は認められなかった。さらにコロニーアッセイを行ったところ、FPD-iPS 細胞から CD41a 陽性、CD42b 陽性細胞への分化が正常と比較して阻害されていることが示された(下図)。このことから、FPD-iPS 細胞から血球分化させた細胞は疾患の特性をよく反映することがわかった。さらに、FPD の原因は RUNX1 遺伝子変異と言われていることから、この巨核球系への分化障害が RUNX1 遺伝子変異のために生じていることを示すため、TALEN シス



テムを用いた Gene editing の手法を用いることにより FPD における RUNX1_R174X 変異に修復を施した。その結果、阻害されていた巨核球分化は下図のように部分的に回復したことから、Proof of concept (POC) を獲得することができた。



一方で、悪性リンパ腫および多発性骨髄腫からの iPS 細胞樹立は難航している。平成 25 年度までに我々はリプログラミング方法を最適化することによって効率的に造血器疾患由来 iPS 細胞を樹立する取り組みを進め、新たにセンダイウイルスベクター(CytoTune™-iPS)やエピゾーマルベクター (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL)を用いた iPS 細胞樹立法を試み、ゲノムへの外来遺伝子の組み込みがなく (Science. 324:797-801, 2009)形質転換などのリスクが最小限に抑えられた疾患由来 iPS 細胞を樹立することに成功した。一例として、それまで樹立が困難であった慢性骨髄単球性白血病(CMMoL)患者由来末梢血 CD34 陽性細胞の iPS 細胞の樹立に成功した。続いて、末梢血細胞からエピゾーマルベクターを用いて iPS 細胞を樹立する際の最適条件の検

討を行ったところ、SCF、IL-3、GM-CSF、TPOを添加して2日間前培養を行うこと、5%O₂ 低酸素培養条件でブチル酸、Y27632などの小分子化合物を付加することで樹立の効率を高めることができた。しかしながら、同様の方法を用いても悪性リンパ腫および多発性骨髄腫からiPS細胞を樹立することは不可能であり、iPS細胞の樹立方法をさらに改変する必要があることが判明した。

D．考察

疾患由来iPS細胞から再分化させた造血細胞と正常骨髄由来iPS細胞から同様に再分化させた造血細胞は、患者検体を表面マーカーで選別して比較するよりも、均一かつ分化段階が揃った細胞が得られる可能性が高い。よって、患者検体同士の比較に比べてサンプル間のばらつきが小さく、疾患に関係する分子生物学的な特徴が表れやすいと考えられる。この点を生かして、これまでに樹立した疾患由来iPS細胞を用いて網羅的な遺伝子発現解析やエピゲノム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析といったマルチオミクス解析を行い、疾患に特異的な異常を同定する。また、大量の造血幹・前駆細胞を用いてハイスループットの化合物スクリーニングを行い、新規治療薬を探索する。

FPD-iPS細胞を用いた解析から、疾患由来iPS細胞が確かに疾患の特性をよく反映すること、また、RUNX1遺伝子修復を介してPOCを得ることができることがわかり、疾患由来iPS細胞の病態解析ツールとしての価値が示された。このことは同時に創薬スクリーニングにも最適であることを示し、今後の解析においても重要な役割を果たすものと考えられた。

一方で、悪性リンパ腫および多発性骨髄腫からのiPS細胞樹立は困難を極め、低酸素培養系やMbd3の発現抑制、マイクロRNAの使用、p53経路やp16経路の阻害・エピゲノム修飾試薬・小分子化合物の併用等の手法を組み合わせ、樹立方法

の効率化・適性化を行う必要があることが判明した。

E．結論

血液疾患の患者検体を用いて、疾患由来iPS細胞の樹立とその最適化を行ってきた。この系を用いて、病態解明の意義が高いと考えられる悪性リンパ腫・多発性骨髄腫・良性疾患を中心に疾患由来iPS細胞の樹立を進める。疾患由来iPS細胞から均質な血球を十分な量得られる長所を生かし、分化血球を用いた治療薬候補探索スクリーニングを東大薬学部が所有する創薬ライブラリーや製薬会社との共同研究などを活用して行う。

F．研究発表

1. 論文発表

- 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. *Exp Hematol.* 42:816-825, 2014
- Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, Nakagawa M, Kumano K, Arai S, Kobayashi H, Saito T, Iwakura Y, Kurokawa M. NF- κ B/TNF- α positive feedback loop with active proteasome machinery supports myeloid leukemia initiating cell capacity. *J Clin Invest.* 124:528-542, 2014
- Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, Ueno T, Tsukamoto A, Iizuka H, Nakagawa M, Nannya Y, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Ichikawa M, Mano H, Kurokawa M. Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML. *Nat Commun.* 5:4770, 2014
- Nishikawa S, Arai S, Masamoto Y, Kagoya Y, Toya T, Watanabe-Okochi N, Kurokawa M.

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。

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。

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。

この方法で構築した心筋組織を、灌流する動静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静脈を含めて血管付きグラフトとして摘出、別個体の頸部の動静脈に吻合し、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

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、電気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気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。

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。

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80μm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静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ング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 . 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、両親から片アリルずつ引き継いだ、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、鈴木顕、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

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

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ム法を用いて 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疾患

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ことを想定し、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

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。

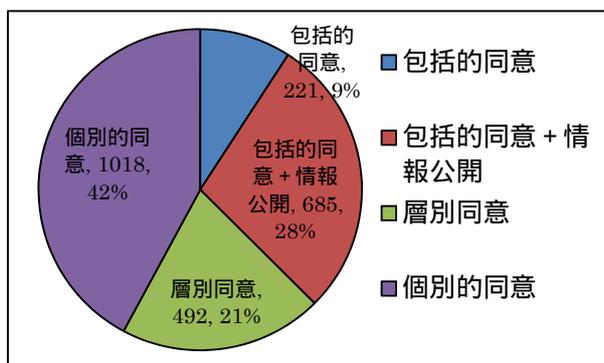


図 1 包括的同意への賛同

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的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。

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, Mitsunashi K, Igarashi H, Noshō 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, Noshō 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, Noshō K, Ito M, Igarashi H, Mitsunashi 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, Noshō 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) Noshō 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, Noshō 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, Nagaishi 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最適化に加え、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.
 - Mozghan 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」

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、基本的に健康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）」においても健康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：

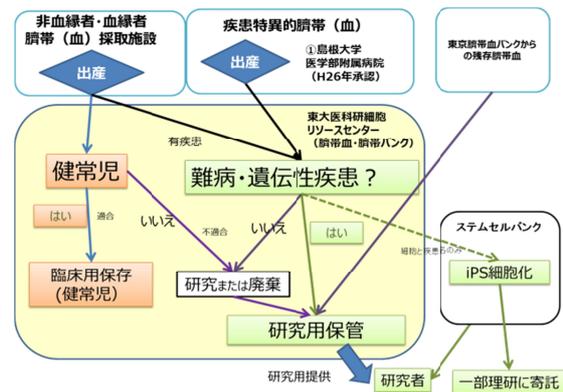
島根大学医学部附属病院にて出産予定の小児の遺伝性疾患の患者および保因者から臍帯血・臍帯を採取・保管・提供するためのシステムを構築した。即ち、出産前で予め遺伝性疾患が判明している場合や保因者と判っている場合に、母親より書面にて同意を得た後に、出産に際して臍帯血・臍帯を採取する。臍帯血採取は児の安全性が確保できる範囲内での採取とした。採取後、個人情報削除後に臍帯(血)を東大医科研細胞リソースセンターに搬送する。東大医科研では、これら臍帯血と臍帯の調製保管を行う。臍帯の大部分は、組織ごと凍結保管する。保管した細胞の一部は、ステムセルバンクにて iPS 細胞化して保存し、依頼に応じてステムセルバンク経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

iPS より網膜へ分化の最新プロトコルを移入し、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てをすでに示したが、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あり、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., Tsuhako, 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

development and pathology, Feb 27- Mar1, 2015 (Okinawa, Japan), Organizer, Speaker

●Watanabe, S.Symposium “Biopharmaceutical frontiers 2014”, National Taiwan Normal University, May 23, 2014 (Taipei, Taiwan), Invited speaker.

●Watanabe, S.XVI international symposium on retinal degeneration RD2014, July 13-18, 2014, (California, USA), Poster presentation.

●Watanabe, S., UK-Japan Retinal Degeneration Symposium, March 12, 2015

(London, UK), Invited speaker.

●馬場行広、渡辺すみ子、遺伝子導入によるマウス網膜再生誘導の試み、第14回日本再生医療学会、3月21日、横浜

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

