

20144100/A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患等実用化研究事業

疾患特異的単球株を用いた横断的な免疫疾患創薬スクリーニング系構築と新規候補化合物探索

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 齋藤 潤

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、国立大学法人京都大学が実施した平成26年度「疾患特異的単球株を用いた横断的な免疫疾患創薬スクリーニング系構築と新規候補化合物探索」の成果を取りまとめたものです。

委託業務成果報告書目次

目 次

I. 委託業務成果報告（総括） 疾患特異的単球株を用いた横断的な免疫疾患創薬スクリーニング系構築と 新規候補化合物探索 齋藤 潤	-----	1
II. 委託業務成果報告（業務項目）		
1. 単球細胞株の樹立・表現型の検証とスクリーニング系への実装 齋藤 潤	-----	7
2. 疾患特異的iPS細胞の樹立・性状評価 中畑 龍俊	-----	12
3. CINCA症候群の化合物スクリーニング 太田 章	-----	18
III. 学会等発表実績	-----	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	23

厚生労働科学研究委託費(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業)
委託業務成果報告(総括)

疾患特異的単球株を用いた横断的な免疫疾患創薬スクリーニング系構築と
新規候補化合物探索

業務主任者 齋藤 潤 京都大学 iPS 細胞研究所 准教授

研究要旨：本研究の目的は、iPS 由来単球株を用いて、汎用性の高い化合物スクリーニングプラットフォームを確立し、横断的探索により新規創薬シーズを得ることである。本年度は CINCA 症候群と Chediak 東症候群患者由来 iPS 細胞より分化させた単球系細胞を株化し、マクロファージ・樹状細胞へ分化できることを確認した。CINCA 症候群由来単球株を用いて高スループットの化合物スクリーニング系を構築した。活性既知の化合物約 4905 種のスクリーニングを行った。384 穴プレート 16 枚全てで Z' factor は 0.5 以上であった。プライマリスクリーニングとして IL-1b 分泌抑制率>30%を基準としたところ、238 化合物(4.9%)がヒットした。さらに、これらのうち IL-6 産生を抑制しなかったものを抽出すると、36 化合物(0.7%)が抽出された。

単球細胞株の樹立・表現型の検証とスクリーニング系への実装	京都大学 iPS 細胞研究所・准教授・齋藤潤
疾患特異的 iPS 細胞の樹立・性状評価	京都大学 iPS 細胞研究所・教授・中畑龍俊※
コアライブラリスクリーニング	京都大学 iPS 細胞研究所・教授・太田章※

※研究代表者一括計上

A. 研究目的

本研究の目的は、iPS 由来単球株を用いて、汎用性の高い化合物スクリーニングプラットフォームを確立し、横断的探索により新規創薬シーズを得ることである。炎症の制御はヒト疾患の制御において重要な課題である。ヒトと他の動物種では炎症制御経路が異なることがあり、ヒト試料による探索は有用であるが、患者由来サンプルを用いた免疫疾患の研究では、得られる細胞数が限られることや、生体内のサイト

カイン環境などに影響されることもあり、治療薬候補をスクリーニングする試みはあまり行われていない。ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立が解決策となり得るが、目的の分化細胞の純度・収量や成熟度が不十分でバッチ毎にばらつくこと、分化のコストが高いことなどの問題がある。そこで、本研究では(遺伝子改変)疾患 iPS 細胞より分化誘導した単球を株化し、大量に増幅することにより、ヒト患者由来の細胞を用いた、安定かつ高スループットの化合物探索を行う。得られたヒット化合物を創薬シーズとして、製薬企業との共同研究へ移行する。平成 25 年度は、1~複数の単球株(単一遺伝子疾患)を作成し、うち 1 疾患程度でスクリーニングを開始する。

なお、研究者らは、多くの疾患 iPS 細胞樹立を行っており、免疫疾患由来 iPS 細胞を用いて化合物スクリーニングが行えることも示している(Tanaka, Blood, 2012) 他、効率のよい単球分化系を開発している(Yanagimachi, PlosONE, 2013)。

B. 研究方法

平成 26 年度は CINCA 症候群、Chediak 東症候群 (CHS) について、検討を行った。

疾患特異的 iPS 細胞の樹立・性状評価
CINCA、CHS については、すでに樹立された iPS 細胞を用いる。iPS 細胞の性状評価は別途実施する。

単球細胞株の樹立

iPS 細胞について、単球分化を行う。分化方法は、無血清・無フィーダー二次元培養法で行い、未熟な単球系前駆細胞を回収する。この細胞を、熊本大学の千住覚先生らが開発した遺伝子導入法 (Koba, PlosONE, 2013, Haruta, Gene Ther, 2013) を用いて、株化する。千住先生から供与いただいたプラスミドを用いて、ウイルスベクターを作製し、単球に感染させる。最大 30 万化合物程度のスクリーニングが可能な細胞数を同一バッチで作製し、保存する。また、一部の細胞を用いて、表現型が再現されるか確認する。

表現型の検証とスクリーニング系への実装
疾患 iPS 細胞から樹立した単球細胞株の機能的解析により、疾患に関連した表現型が表出するかを確認する必要がある。CINCA については、IL-1 β と IL-6 産生能を検出し、単球とマクロファージ系での優劣を検討する。HTRF による検出系を構築し、コストパフォーマンスを最大化するための条件を検討する。具体的には、Z' factor、CV 値、S/B 比が基準内にあり、かつコストが最小となる条件を模索する。

コアラライブラリスクリーニング

CINCA については、大規模スクリーニングに移行を目指すために、企業との共同研究として東京大学・創薬オープンイノベーションセンターのコアラライブラリを入手し、validation を行う。

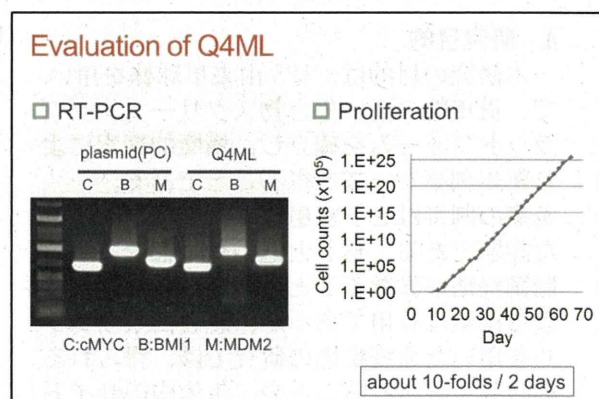
(倫理面への配慮)

本研究は、疾患を有する患者さんから検体を頂き iPS 細胞を作成して行う研究であるため、患者さんの同意・協力を必要とする研究である。また、作成する iPS 細胞を用いた疾患解析においては、遺伝子解析が必須であり、個人情報の取り扱いの配慮を必要とする研究である。この 2 点に対して、京都大学医学部医の倫理委員会に、ヒトを対象とした医学の研究および臨床応用実施申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究」およびヒト遺伝子解析申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」の 2 申請を行った。その後、京都大学医学部医の倫理委員会での審査を頂き、平成 20 年 6 月 4 日付けで、実施に関して承認を頂いた。本研究においては、その内容を忠実に順守して行った。また、組み替え遺伝子指針、ヒト ES 指針に則って実験計画を提出し、それを遵守して研究を行っている。

C. 研究結果

CINCA 症候群患者 iPS-ML の作製

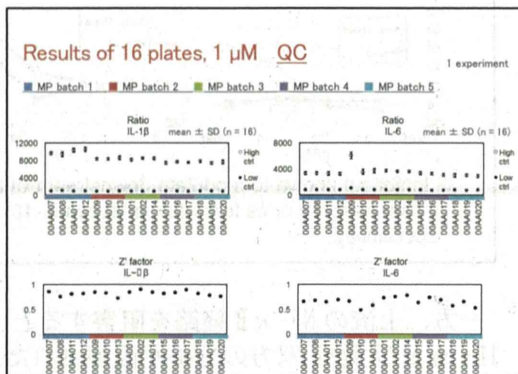
モザイク型 CINCA 症候群患者由来の iPS 細胞 2 株 (Q4:NLRP3 変異有り、Q5:NLRP3 変異なし) を既報を用いて単球系細胞へ分化させ、21-22 日目に回収し、遺伝子導入を行った。細胞は約 1 週間後より M-CSF 依存性に増殖し、2 日で約 10 倍と高率な増殖率を示した。トランスジーンを組み込みをゲノム PCR を用いて確認した。



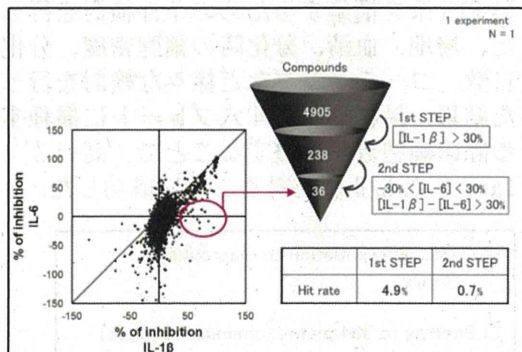
CINCA-iPSMLMP を用いた活性既知化合物スクリーニング

次に、このプロトコルを用いて、活性既知の化合物約 4905 種のスクリーニングを行った。

384 穴プレート 16 枚全てで Z' factor は 0.5 以上であった。



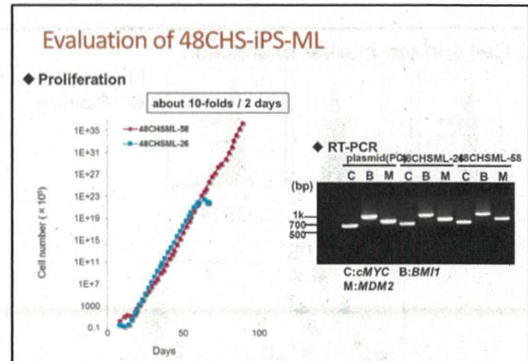
プライマリスクリーニングとして IL-1 β 分泌抑制率 >30% を基準としたところ、238 化合物 (4.9%) がヒットした。さらに、これらのうち IL-6 産生を抑制しなかったものを抽出すると、36 化合物 (0.7%) が抽出された。



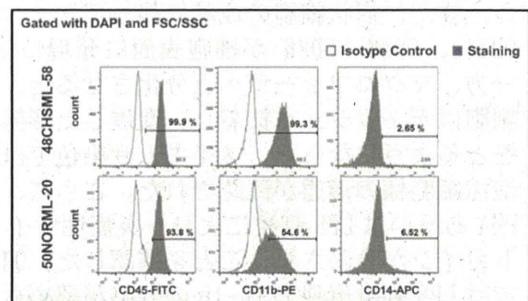
CHS 患者由来 iPS-ML の作製

LYST 変異を伴う CHS 患者 1 名とその母親 (LYST 変異なし) から樹立した iPS 細胞を単球系に分化させ、21-22 日目に回収して遺伝子導入を行った。細胞は約 1 週間後より M-CSF 依存性に増殖し、患者では 2 日で

約 10 倍と高率な増殖率を示したが、母親由来株では 2 日で 3 倍程度の増殖率にとどまった。トランスジーンを組み込みをゲノム PCR を用いて確認した。



また、得られた細胞はメイギムザ染色で血球様の形態を示した、エステラーゼ染色陽性であった。興味深いことにこれらの iPS-ML は、CD45、CD11b が陽性であったが、CD14 の発現は低下していた。



しかし、マクロファージ分化を行うと、CD14 の発現が上昇し、単球系へのコミットが行われていることが確認された。

D. 考察

疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬開発、患者細胞を用いた免疫疾患の新規治療法開発、はいずれも多大な成果が見込まれる領域であるが、様々な問題点のため、世界的に見ても有用なスクリーニング系は確立していない。本研究提案では、iPS 細胞の遺伝子改変による「厳密な対照細胞」「レポーター」作成、及び単球株化による「均質

かつ大量の疾患特異的分化細胞の取得」を組み合わせ、大幅に汎用性の高く、低コストのスクリーニング系を確立できると期待される。

次年度は、CINCA 症候群のスクリーニングで同定された候補化合物のバリデーション、コア・ジェネラルライブラリのスクリーニングを進める。また、CHS については、疾患特異的な表現型の導出と検出系の HTS への最適化を進める予定である。

E. 結論

疾患特異的 iPS 細胞より単球株を樹立し、HTS を行うための基盤構築に成功した。次年度以降、研究を進める予定である。

F. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

論文発表

1. Yoshida M, Kitaoka S, Egawa N, Yamane M, Ikeda R, Tsukita K, Amano N, Watanabe A, Morimoto M, Takahashi J, Hosoi H, Nakahata T, Inoue H, Saito MK*, Modeling the early phenotype at the neuromuscular junction of spinal muscular atrophy using patient-derived iPSCs. *Stem Cell Reports*. 2015;4(4):1-8.

2. Suzuki NM, Niwa A, Yabe M, Hira A, Okada C, Amano N, Watanabe A, Watanabe K, Heike T, Takata M, Nakahata T, Saito MK*, Pluripotent cell models of Fanconi anemia identify the early pathological defect in human hemoangiogenic progenitors. *Stem Cells Transl Med*. In press

3. Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura N, Koizumi N, Sato T,

Nakahata T, Saito M, Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M, Ikeya M, Toguchida J. Derivation of Mesenchymal Stromal Cells from Pluripotent Stem Cells through a Neural Crest Lineage using Small Molecule Compounds with Defined Media. *PLoS One*. 2014 Dec 2;9(12):e112291. doi: 10.1371/journal.pone.0112291. eCollection 2014.

4. Yokoyama K, Ikeya M, Umeda K, Oda H, Nodomi S, Nasu A, Matsumoto Y, Izawa K, Horigome K, Kusaka T, Tanaka T, Saito MK, Yasumi T, Nishikomori R, Ohara O, Nakayama N, Nakahata T, Heike T, Toguchida J. Enhanced chondrogenesis of iPS cells from neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase-1-independent cAMP/PKA/CREB pathway. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Jan;67(1):302-14. doi: 10.1002/art.38912.

5. 明日の診療に役立つ細胞分子生物学再生医療-iPS細胞の応用. 齋藤潤 日本呼吸器学会雑誌 3(5) 625-629, 2014

6. 患者由来 iPS 細胞を用いた疾患モデル作成研究: 血液免疫疾患. 齋藤潤 医学のあゆみ. 252 899-903, 2015

7. 吉田路子, 齋藤潤 脊髄性筋萎縮症. 遺伝子医学 MOOK. 2015 : 27 : pp66-70

8. 鈴木直也, 齋藤潤 Fanconi 貧血患者特異的 iPS 細胞研究の現状と展望. 遺伝子医学 MOOK. 2015 : 27 : pp120-125

学会発表

1. 齋藤潤 疾患特異的 iPS 細胞を用いた免疫疾患の解析について 大阪リウマチカンファレンス 2014/4/19 大阪
2. 齋藤潤 疾患 iPS 細胞を用いた血液・免疫疾患の病態解析 第 5 回小児炎症研究会 2014/6/21 東京
3. 齋藤潤 疾患特異的 iPS 細胞を用いた免疫疾患の病態解析 第 6 回炎症性腸疾患と免疫を語る会 2014/6/26 横浜
4. 齋藤潤 疾患特異的 iPS 細胞を用いた免疫疾患の病態解析 横浜小児先端セミナー 2014/9/12 横浜
5. 齋藤潤 再生医療用 iPS 細胞ストックのドナーリクルートについて 日本臓器保存生物医学会 2014/11/28 大阪
6. 齋藤潤 疾患 iPS 細胞を用いた血液疾患の病態解析 京大病院 iPS 細胞・再生医療研究会 2015/1/30 京都
7. 齋藤潤 iPS 細胞研究の現状について 徳洲会グループ平成 27 年 1 月度医療経営戦略セミナー 2015/1/31 横浜
8. 齋藤潤 疾患特異的 iPS 細胞を用いた血液疾患の病態解析第 14 回日本再生医療学会総会 2015/3/19 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究委託費(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業)
委託業務成果報告(業務項目)

単球細胞株の樹立・表現型の検証とスクリーニング系への実装

担当責任者 齋藤 潤 京都大学 iPS 細胞研究所 准教授

研究要旨：本研究の目的は、iPS 由来単球株を用いて、汎用性の高い化合物スクリーニングプラットフォームを確立し、横断的探索により新規創薬シーズを得ることである。本年度は CINCA 症候群と Chediak 東症候群患者由来 iPS 細胞より分化させた単球系細胞を株化し、マクロファージ・樹状細胞へ分化できることを確認した。CINCA 症候群由来単球株を用いて高スループットの化合物スクリーニング系を構築した。

A. 研究目的

本研究の目的は、iPS 由来単球株を用いて、汎用性の高い化合物スクリーニングプラットフォームを確立し、横断的探索により新規創薬シーズを得ることである。

炎症の制御はヒト疾患の制御において重要な課題である。ヒトと他の動物種では炎症制御経路が異なることがあり、ヒト試料による探索は有用であるが、患者由来サンプルを用いた免疫疾患の研究では、得られる細胞数が限られることや、生体内のサイトカイン環境などに影響されることもあり、治療候補をスクリーニングする試みはあまり行われていない。ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立が解決策となり得るが、目的の分化細胞の純度・収量や成熟度が不十分でバッチ毎にばらつくこと、分化のコストが高いことなどの問題がある。そこで、本研究では (遺伝子改変) 疾患 iPS 細胞より分化誘導した単球を株化し、大量に増幅することにより、ヒト患者由来の細胞を用いた、安定かつ高スループットの化合物探索を行う。得られたヒット化合物を創薬シーズとして、製薬企業との共同研究へ移行する。平成 25 年度は、1~複数の単球株 (単一遺伝子疾患) を作成し、うち 1 疾患程度でスクリーニングを開始する。

なお、研究者らは、多くの疾患 iPS 細胞樹立を行っており、免疫疾患由来 iPS 細胞

を用いて化合物スクリーニングが行えることも示している (Tanaka, Blood, 2012) 他、効率のよい単球分化系を開発している (Yanagimachi, PlosONE, 2013)。

B. 研究方法

平成 26 年度は CINCA 症候群、Chediak 東症候群 (CHS) について、検討を行った。

疾患特異的 iPS 細胞の樹立・性状評価
CINCA、CHS については、すでに樹立された iPS 細胞を用いる。iPS 細胞の性状評価は別途実施する。

単球細胞株の樹立

iPS 細胞について、単球分化を行う。分化方法は、無血清・無フィーダー二次元培養法で行い、未熟な単球系前駆細胞を回収する。この細胞を、熊本大学の千住覚先生らが開発した遺伝子導入法 (Koba, PlosONE, 2013, Haruta, Gene Ther, 2013) を用いて、株化する。千住先生から供与いただいたプラスミドを用いて、ウイルスベクターを作製し、単球に感染させる。最大 30 万化合物程度のスクリーニングが可能な細胞数を同一バッチで作製し、保存する。また、一部の細胞を用いて、表現型が再現されるか確認する。

表現型の検証とスクリーニング系への実装疾患 iPS 細胞から樹立した単球細胞株の機能的解析により、疾患に関連した表現型が表出するかを確認する必要がある。CINCA については、IL-1 β と IL-6 産生能を検出し、単球とマクロファージ系での優劣を検討する。HTRF による検出系を構築し、コストパフォーマンスを最大化するための条件を検討する。具体的には、Z' factor、CV 値、S/B 比が基準内にあり、かつコストが最小となる条件を模索する。

(倫理面への配慮)

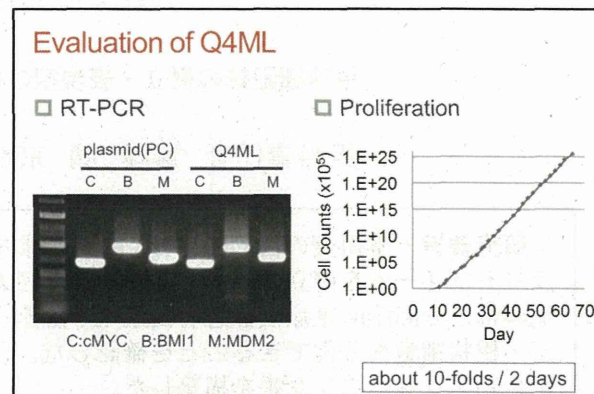
本研究は、疾患を有する患者さんから検体を頂き iPS 細胞を作成して行う研究であるため、患者さんの同意・協力を必要とする研究である。また、作成する iPS 細胞を用いた疾患解析においては、遺伝子解析が必須であり、個人情報取り扱いの配慮を必要とする研究である。この2点に対して、京都大学医学部医の倫理委員会に、ヒトを対象とした医学の研究および臨床応用実施申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究」およびヒト遺伝子解析申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」の2申請を行った。その後、京都大学医学部医の倫理委員会での審査を頂き、平成20年6月4日付けで、実施に関して承認を頂いた。本研究においては、その内容を忠実に順守して行った。また、組み替え遺伝子指針、ヒト ES 指針に則って実験計画を提出し、それを遵守して研究を行っている。

C. 研究結果

CINCA 症候群患者 iPS-ML の作製

モザイク型 CINCA 症候群患者由来の iPS 細胞 2 株 (Q4:NLRP3 変異有り、Q5:NLRP3 変異なし) を既報を用いて単球系細胞へ分化させ、21-22 日目に回収し、遺伝子導入を行った。細胞は約 1 週間後より M-CSF 依存性に増殖し、2 日で約 10 倍と高率な増殖

率を示した。トランスジーンの組み込みを



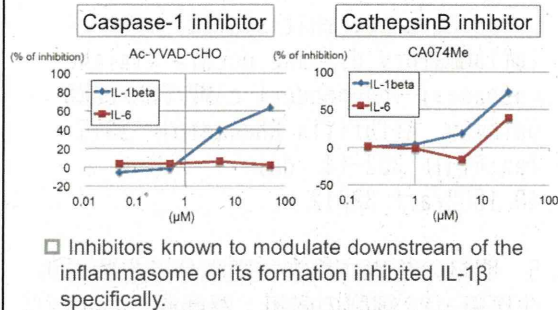
ゲノム PCR を用いて確認した。

次にこれらの細胞を樹状細胞とマクロファージへ分化させた。樹状細胞に分化させると、細胞より樹状突起の伸長が確認された。また、樹状細胞の成熟に伴って、CD11c、CD80、CD86 が細胞表面に発現した。一方、マクロファージへと分化させると、細胞はディッシュへ接着し、進展した形態をとるようになった。メイギムザ染色では泡沫細胞様の形態が確認された。さらに、PMA あるいは LPS 刺激により、炎症性サイトカインが分泌されることを確認した。Q4 では LPS 刺激単独で IL-1b の分泌が認められたが、Q5 では IL-1b の分泌には second signal が必要であった。従って、iPS-ML より分化させたマクロファージ (iPS-MLMP) は、疾患特異的な表現型を保持していると考えられた。

CINCA-iPS-MLMP を用いた化合物スクリーニング系の構築

次に、CINCA-iPS-MLMP を用いた高スループットスクリーニング系の構築に着手した。まず、既存の IL-1b 産生経路阻害剤が容量依存的にサイトカイン産生を阻害するか検討した。CINCA-iPS-MLMP を NLRP3 インフラマソーム下流の阻害剤である YVAD あるいは CA074Me で前処理すると IL-1b 分泌が阻害されたが、IL-6 分泌は相対的に保たれていた。

Q4ML validation for drug screening



一方、上流の NF- κ B 経路を阻害すると、IL-1b 及び IL-6 双方の分泌が阻害された。従って、CINCA-iPS-MLMP は化合物パネルに

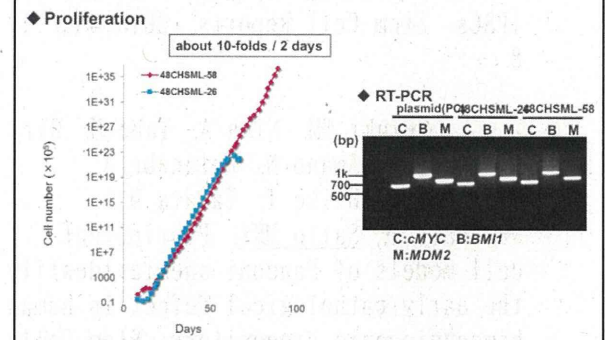
- Q4ML differentiation to macrophages
7 days
- Seeding to 384 plates (chemical libraries)
37°C 4hr incubation 14,000 cells / well
- LPS stimulation
37°C 18hr incubation
- Sup + HTRF reagent
RT 2hr incubation
- Microplate reader

対して予測された通りの挙動を示すと考えられた。次に、iPS 細胞より分化させたマクロファージを用いて構築した化合物スクリーニング系を流用して、OCDD コアライブラリのスクリーニングを行ったが、Z' factor と S/B 値が安定しなかった。そこで、CINCA-iPS-MLMP に最適化された検出力の高い HTS 系を構築するための条件検討を行った。培地、血清、分化時の細胞密度、分化日数、コーティングなど様々な検討を行った結果、最終的に 384 穴プレートに播種する際の細胞数を調整することで、高い Z' factor と S/B 値を得ることに成功した。

CHS 患者由来 iPS-ML の作製

LYST 変異を伴う CHS 患者 1 名とその母親 (LYST 変異なし) から樹立した iPS 細胞を単球系に分化させ、21-22 日目に回収して遺伝子導入を行った。細胞は約 1 週間後より M-CSF 依存性に増殖し、患者では 2 日で約 10 倍と高率な増殖率を示したが、母親由来株では 2 日で 3 倍程度の増殖率にとどまった。トランスジーンを組み込みをゲノム PCR を用いて確認した。

Evaluation of 48CHS-iPS-ML



D. 考察

疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬開発、患者細胞を用いた免疫疾患の新規治療法開発、はいずれも多大な成果が見込まれる領域であるが、様々な問題点のため、世界的に見ても有用なスクリーニング系は確立していない。本研究提案では、iPS 細胞の遺伝子改変による「厳密な対照細胞」「レポーター」作成、及び単球株化による「均質かつ大量の疾患特異的分化細胞の取得」を組み合わせ、大幅に汎用性の高く、低コストのスクリーニング系を確立できると期待される。

次年度は、CINCA 症候群のスクリーニングで同定された候補化合物のバリデーション、コア・ジェネラルライブラリのスクリーニングを進める。また、CHS については、疾患特異的な表現型の導出と検出系の HTS への最適化を進める予定である。

E. 結論

疾患特異的 iPS 細胞より単球株を樹立し、HTS を行うための基盤構築に成功した。次年度以降、研究を進める予定である。

F. 研究発表

論文発表

1. Yoshida M, Kitaoka S, Egawa N, Yamane M, Ikeda R, Tsukita K, Amano N, Watanabe A, Morimoto M, Takahashi J, Hosoi H, Nakahata T, Inoue H, Saito MK*, Modeling the early phenotype at the neuromuscular junction of spinal muscular atrophy using patient-derived iPSCs. *Stem Cell Reports*. 2015;4(4):1-8.
2. Suzuki NM, Niwa A, Yabe M, Hira A, Okada C, Amano N, Watanabe A, Watanabe K, Heike T, Takata M, Nakahata T, Saito MK*, Pluripotent cell models of Fanconi anemia identify the early pathological defect in human hemoangiogenic progenitors. *Stem Cells Transl Med*. In press
3. Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura N, Koizumi N, Sato T, Nakahata T, Saito M, Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M, Ikeya M, Toguchida J. Derivation of Mesenchymal Stromal Cells from Pluripotent Stem Cells through a Neural Crest Lineage using Small Molecule Compounds with Defined Media. *PLoS One*. 2014 Dec 2;9(12):e112291. doi: 10.1371/journal.pone.0112291. eCollection 2014.
4. Yokoyama K, Ikeya M, Umeda K, Oda H, Nodomi S, Nasu A, Matsumoto Y, Izawa K, Horigome K, Kusaka T, Tanaka T, Saito MK, Yasumi T, Nishikomori R,

Ohara O, Nakayama N, Nakahata T, Heike T, Toguchida J. Enhanced chondrogenesis of iPS cells from neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase-1-independent cAMP/PKA/CREB pathway. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Jan;67(1):302-14. doi: 10.1002/art.38912.

5. 明日の診療に役立つ細胞分子生物学再生医療-iPS細胞の応用. 齋藤潤 日本呼吸器学会雑誌 3(5) 625-629, 2014
6. 患者由来 iPS 細胞を用いた疾患モデル作成研究: 血液免疫疾患. 齋藤潤 医学のあゆみ. 252 899-903, 2015
7. 吉田路子、齋藤潤 脊髄性筋萎縮症. 遺伝子医学 MOOK. 2015 : 27 : pp66-70
8. 鈴木直也、齋藤潤 Fanconi 貧血患者特異的 iPS 細胞研究の現状と展望. 遺伝子医学 MOOK. 2015 : 27 : pp120-125

学会発表

1. 齋藤潤 疾患特異的 iPS 細胞を用いた免疫疾患の解析について 大阪リウマチカンファレンス 2014/4/19 大阪
2. 齋藤潤 疾患 iPS 細胞を用いた血液・免疫疾患の病態解析 第5回小児炎症研究会 2014/6/21 東京
3. 齋藤潤 疾患特異的 iPS 細胞を用いた免疫疾患の病態解析 第6回炎症性腸疾患と免疫を語る会 2014/6/26 横浜
4. 齋藤潤 疾患特異的 iPS 細胞を用いた免疫疾患の病態解析 横浜小児先端セミナー 2014/9/12 横浜

5. 齋藤潤 再生医療用 iPS 細胞ストックのドナーリクルートについて 日本臓器保存生物医学会 2014/11/28 大阪

6. 齋藤潤 疾患 iPS 細胞を用いた血液疾患の病態解析 京大病院 iPS 細胞・再生医療研究会 2015/1/30 京都

7. 齋藤潤 iPS 細胞研究の現状について 徳洲会グループ平成 27 年 1 月度医療経営戦略セミナー 2015/1/31 横浜

8. 齋藤潤 疾患特異的 iPS 細胞を用いた血液疾患の病態解析第 14 回日本再生医療学会総会 2015/3/19 横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

厚生労働科学研究委託費(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業)
委託業務成果報告(業務項目)

疾患特異的 iPS 細胞の樹立・性状評価

担当責任者 中畑龍俊 京都大学 iPS 細胞研究所 特定拠点教授

研究要旨：本研究の目的は、iPS 由来単球株を用いて、汎用性の高い化合物スクリーニングプラットフォームを確立し、横断的探索により新規創薬シーズを得ることである。本年度は CINCA 症候群と Chediak 東症候群患者由来 iPS 細胞の単球への分化能を検討した。いずれの患者由来 iPS 細胞も、効率よく単球を産生することができた、また、単球株を樹立すると、CINCA では CD14 陽性細胞が株化されたが、CHS では CD14 は陰性であった。

A. 研究目的

本研究の目的は、iPS 由来単球株を用いて、汎用性の高い化合物スクリーニングプラットフォームを確立し、横断的探索により新規創薬シーズを得ることである。炎症の制御はヒト疾患の制御において重要な課題である。ヒトと他の動物種では炎症制御経路が異なることがあり、ヒト試料による探索は有用であるが、患者由来サンプルを用いた免疫疾患の研究では、得られる細胞数が限られることや、生体内のサイトカイン環境などに影響されることもあり、治療薬候補をスクリーニングする試みはあまり行われていない。ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立が解決策となり得るが、目的の分化細胞の純度・収量や成熟度が不十分でバッチ毎にばらつくこと、分化のコストが高いことなどの問題がある。そこで、本研究では(遺伝子改変)疾患 iPS 細胞より分化誘導した単球を株化し、大量に増幅することにより、ヒト患者由来の細胞を用いた、安定かつ高スループットの化合物探索を行う。得られたヒット化合物を創薬シーズとして、製薬企業との共同研究へ移行する。平成 25 年度は、1~複数の単球株(単一遺伝子疾患)を作成し、うち 1 疾患程度でスクリーニングを開始する。

なお、研究者らは、多くの疾患 iPS 細胞樹立を行っており、免疫疾患由来 iPS 細胞を用いて化合物スクリーニングが行えることも示している(Tanaka, Blood, 2012)他、効率のよい単球分化系を開発している(Yanagimachi, PlosONE, 2013)。

B. 研究方法

平成 26 年度は CINCA 症候群、Chediak 東症候群(CHS)について、検討を行った。

疾患特異的 iPS 細胞の樹立・性状評価

CINCA、CHS について、それぞれ 2 例、1 例より iPS 細胞を樹立している。本研究項目では、単球株への分化能を検討する。分化系は、我々が開発した血清・フィーダーフリーの単球系細胞分化系を用いる。

(倫理面への配慮)

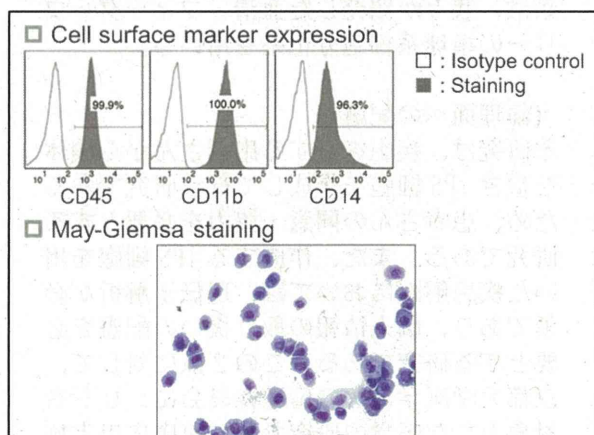
本研究は、疾患を有する患者さんから検体を頂き iPS 細胞を作成して行う研究であるため、患者さんの同意・協力を必要とする研究である。また、作成する iPS 細胞を用いた疾患解析においては、遺伝子解析が必須であり、個人情報取り扱いの配慮を必要とする研究である。この 2 点に対して、京都大学医学部医の倫理委員会に、ヒトを対象とした医学の研究および臨床応用実施申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の

作成とそれを用いた疾患解析に関する研究
およびヒト遺伝子解析申請書として「ヒト
疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研
究」の 2 申請を行った。その後、京都大学
医学部医の倫理委員会での審査を頂き、平
成 20 年 6 月 4 日付けで、実施に関して承
認を頂いた。本研究においては、その内容
を忠実に順守して行った。また、組み替え
遺伝子指針、ヒト ES 指針に則って実験計
画を提出し、それを遵守して研究を行って
いる。

C. 研究結果

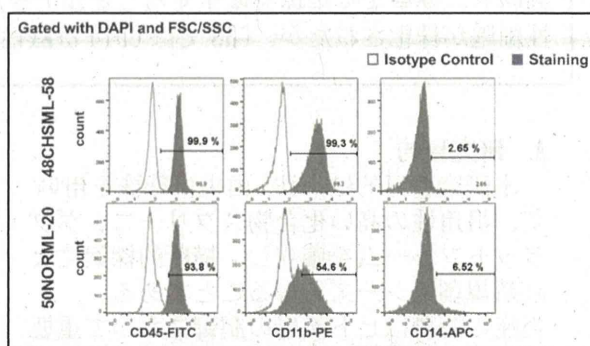
CINCA 症候群患者 iPS の分化能評価と iPS- ML の作製

モザイク型 CINCA 症候群患者由来の iPS
細胞 2 株 (Q4:NLRP3 変異有り、Q5:NLRP3
変異なし) を既報を用いて単球系細胞へ分
化させ、21-22 日目に回収し、遺伝子導入
を行った。いずれも分化能に問題はなく、
繰り返しの施行で高効率に単球へ分化した。
また、単球株のサイトカイン産生能を検討
したところ、LPS 刺激により十分量のサイ
トカインが産生されることを確認した。単
球株を樹立すると、細胞表面マーカー解析
では CD45、CD14 及び CD11b が陽性であり、
単球として矛盾しなかった。また、得られ
た細胞はメイギムザ染色で血球様の形態を
示した。



CHS 患者由来 iPS-ML の作製

LYST 変異を伴う CHS 患者 1 名とその母親
(LYST 変異なし) から樹立した iPS 細胞を
を既報を用いて単球系細胞へ分化させ、
21-22 日目に回収し、遺伝子導入を行った。
いずれも分化能に問題はなく、繰り返しの
施行で高効率に単球へ分化した。探求株を
樹立すると、また、得られた細胞はメイギ
ムザ染色で血球様の形態を示した、エステ
ラーゼ染色陽性であった。興味深いことに
これらの iPS-M1 は、CD45、CD11b が陽性で
あったが、CD14 の発現は低下していた。



しかし、マクロファージ分化を行うと、
CD14 の発現が上昇し、単球系へのコミット
が行われていることが確認された。

D. 考察

疾患 iPS 細胞の分化能に問題はなかった。
また、CHS においては、株化により CD14 の
発現が低下したが、マクロファージ分化に
より回復した。これらの細胞は CD11b が陽
性であることから、単球よりより幼弱な細
胞が株化されていることが示唆された。

E. 結論

疾患特異的 iPS 細胞の分化能を確認し、
単球株の細胞表面マーカーを評価した。次
年度以降、研究を進める予定である。

F. 研究発表

論文発表

1. Daifu T., Kato I., Kozuki K., Umeda K., Hiramatsu H., Watanabe K., Kamiya I., Taki T., Nakahata T.,

- Heike T., Adachi S.: The clinical utility of genetic testing for t(8;16)(p11;p13) in congenital acute myeloid leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 36(5):e325-7. 2014 Jul doi: 10.1097/MPH.000000000000099.
2. Sakaguchi H, Nishio N, Hama A, Kawashima N, Wang X, Narita A, Doisaki S, Xu Y, Muramatsu H, Yoshida N, Takahashi Y, Kudo K, Moritake H, Nakamura K, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S: Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica* 99:1312-6. 2014.
 3. Honda Y., Tsuchida M., Zaike Y., Masunaga A., Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic leukemia who developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology (JSPHO). *Br J Haematol.* 165(5):682-7. 2014 Jun, doi: 10.1111/bjh.12796. Epub 2014 Mar 4.
 4. Hasegawa D, Chen X, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics and treatment outcome in 65 cases with refractory cytopenia of childhood defined according to the WHO 2008 classification. *Br J Haematol.* 166(5):758-66. 2014 Sep. doi: 10.1111/bjh.12955.
 5. Ochi K., Takayama N., Hirose S., Nakahata T., Nakauchi H., Eto K.: Multicolor staining of globin subtypes reveals impaired globin switching during erythropoiesis in human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 3(7):792-800. 2014 Jul, doi: 10.5966/sctm.2013-0216. Epub 2014 May 29.
 6. Sakashita K., Kato I., Daifu T., Saida S., Hiramatsu H., Nishinaka Y., Ebihara Y., Feng M., Matsuda K., Saito S., Hirabayashi K., Kurata T., Le U., Nakazawa Y., Tsuji K., Heike T., Nakahata T., Koike K.: In vitro expansion of CD34+CD38- cells under stimulation with hematopoietic growth factors on AGM-S3 cells in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 08/2014; DOI: 10.1038/leu.2014.239
 7. Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura N, Koizumi N, Sato T, Nakahata T, Saito M, Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M, Ikeya M, Toguchida J.: Derivation of Mesenchymal Stromal Cells from Pluripotent Stem Cells through a Neural Crest Lineage using Small Molecule Compounds with Defined Media. *PLoS One.* 9(12):e112291. 12/2, 2014. 10.1371/journal.pone.0112291.
 8. Moriwaki K., Manabe A., Taketani T., Kikuchi A., Nakahata T., Hayashi Y.: Cytogenetics and clinical features of pediatric myelodysplastic syndrome in Japan. *Int. J. Hematol.* 100:478-484, 2014.
 9. Yokoyama K., Ikeya M., Umeda K., Oda H., Nodomi S., Nasu A., Matsumoto Y., Izawa K., Horigume K., Kusaka T., Tanaka T., Saito MK., Yasumi T., Nishikomori R., Ohara O.,

- Nakayama N., Nakahata T., Heike T., Toguchida J.: Enhanced chondrogenesis of induced pluripotent stem cells from patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase 1-independent cAMP/protein kinase. *Arthritis and Rheumatism* 67(1):302-34, 2015.
10. Suzuki N., Niwa A., Yabe M., Hira A., Okada C., Amano N., Watanabe A., Watanabe K., Heike T., Takata M., Nakahata T., Saito M.: Pluripotent cell models of Fanconi anemia identify the early pathological defect in human hemoangiogenic progenitors. *Stem Cells Translational Medicine* 4:1-6, 2015.
 11. Yoshida M., Kitaoka S., Egawa N., Yamane M., Ikeda R., Tsukita K., Amano N., Watanabe A., Morimoto M., Takahashi J., Hosoi H., Nakahata T., Inoue H., Saito M.K.: Modeling the early phenotype at the neuromuscular junction of spinal muscular atrophy using patient-derived iPSCs. *Stem Cell Reports* in press.
 12. 中畑龍俊：iPS 細胞から HTS に耐える疾患モデル評価系の構築. *国際医薬品情報 通巻第 1026 号*: 25-27 2015 年 1 月 26 日
 13. 中畑龍俊：特集によせて. (iPS 細胞を用いた難病研究—臨床病態解明と創薬に向けた研究の最新知見、編集：中畑龍俊) ; *遺伝子医学 MOOK27*: 23-26, 2015 年 2 月 5 日 メディカルドゥ発行
- 者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節症病態の解明. 第 117 回日本小児科学会学術集会 2014 年 4 月 11-13 日 (11 日) 名古屋国際会議場口演
2. 中畑龍俊：招待講演、iPS 細胞が変えるリハビリテーションの未来—臨床応用の可能性—. 第 49 回日本理学療法学術大会 (市民公開講座) 2014 年 5 月 30 日~6 月 1 日 (6/1) パシフィコ横浜
 3. Niwa Akira, Nakahata Tatsutoshi, Saito Megumu: Efficient and less labor-intensive methods for inducing vascular endothelial cells from human pluripotent stem cells. ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center (CANADA) June 18-21, 2014 (6/18, poster)
 4. Suzuki Naoya, Samata Bumpei, Habu Toshiyuki, Watanabe Akira, Nakahata Tatsutoshi, Takahashi Jun, Saito Megumu: Impaired neuronal maturation on seckel syndrome is caused by loss of self-organization and centrosome integrity during early neuronal development. ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center (CANADA) June 18-21, 2014 (6/20, poster)
 5. Iki Takehiro, Tanaka Michihiro, Saito Megumu, Fijibuchi Wataru, Nakahata Tatsutoshi: Microarray analyses cochlea-derived otospheres reveal putative transcription factors which regulate characters of the otospheres. ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center (CANADA) June 18-21, 2014 (6/20, poster)
- 学会発表
1. 横山宏司、西小森隆太、納富誠司郎、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、池谷真、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男：患

6. 桐野浩輔、尾崎富美子、丹羽明、中畑龍俊、齋藤潤、平家勇司：末梢血 Natural Killer 細胞を用いた人口多能性幹細胞の樹立. 第 35 回日本炎症・再生医学会 2014 年 7 月 1-4 日 (2 日) 万国津梁館 (沖縄) ポスター発表
7. 王茂治、丹羽明、齋藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞を用いた Chediak-東症候群の病態解析. 第 35 回日本炎症・再生医学会 2014 年 7 月 1-4 日 (2 日) 万国津梁館 (沖縄) ポスター発表
8. 伊藤眞理、村上美帆、丹羽明、齋藤潤、中畑龍俊、西本憲弘：疾患 iPS 細胞を用いた破骨細胞分化系の構築と分化能の検討. 第 1 回日本骨免疫会議 2014 年 7 月 1-4 日 (1 日) 万国津梁館 (沖縄) ポスター発表
9. 中畑龍俊：iPS 細胞－臨床への挑戦. 第 3 回不整脈薬物治療サミット～不整脈薬物治療の近未来を考える～ (第 29 回日本不整脈学会学術大会/第 31 回日本心電学会学術集会合同学術大会サテライトシンポジウム) 2014 年 7 月 25 日 ザ・プリンスパークタワー東京
10. 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞を用いた小児医療の将来. 第 50 回中部日本小児学会, 2014 年 8 月 10 日 信州大学医学部付属病院
11. 中畑龍俊：アカデミアの立場から (テーマ：日本から発信するレギュラトリーサイエンス). 第 4 回レギュラトリーサイエンス学会学術大会－レギュラトリーサイエンスの世界展開 2014 年 9 月 5-6 日 (6 日) 一橋大学一橋講堂
12. 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞時代：医療はどうか変わるか. 日本早期認知症学会 (JSED) 第 15 回学術大会 in 佐倉 2014 年 9 月 12-14 日 (14 日) ウィシュトンホテル・ユーカーリ (佐倉市)
13. 中畑龍俊：特別講演、臍帯血中の造血幹細胞発見秘話と最近の iPS 細胞研究. 第 38 回日本血液事業学会総会 2014 年 10 月 29-31 日 (29 日) 広島国際会議場
14. Shigeharu Oh, Akira Niwa, Megumu K. Saito, Tatsutoshi Nakahata: Modeling Chediak-Higashi Syndrome using patient's specific iPS cells. (一般口演) 第 76 回日本血液学会学術集会 2014 年 10 月 31 日-11 月 2 日 (31 日) 大阪国際会議場
15. Kazuki Taoka, Syunya Arai, Masataka Hosai, Fimihiko Nakamura, Masashi Miyauchi, Sho Yamazaki, Akira Honda, Keisuke Kataoka, Keiki Kumano, Akihide Yoshimi, Koji Eto, Hiromitsu Nakauchi, Tatsutoshi Nakahata, Mineo Kurokawa: Modeling chronic myelomonocytic leukemia through patient-derived induced pluripotent stem cells. (一般口演) 第 76 回日本血液学会学術集会 2014 年 10 月 31 日-11 月 2 日 (31 日) 大阪国際会議場
16. Norihiro Nishimoto, Miho Murakami, Mari Ito, Yukari Saito, Megumu Saito, Akira Niwa, Tatsutoshi Nakahata: Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Rheumatoid Arthritis (RA) Patients Reproduce CD14 (+) CD15 (+) Abnormal Myeloid Cells Observed in Bone Marrow of Severe RA Patients. The American College of Rheumatology (ACR) and the Association of Rheumatology Health Professionals (ARHP) annual meeting 2014 November 14 - 19, 2014, Boston Convention and Exhibition Center (USA), 口演
17. Nishinaka Yoko, Akira Niwa, Mitsujiro Osawa, Akira Watanabe, Tatsutoshi Nakahata, Megumu K Saito: Exploring the Pathogenesis of Down Syndrome-Related