

201442030A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患実用化研究事業

疾患特異的iPS細胞を活用した  
特発性造血障害の病態解析と新規治療法開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 高折 晃史

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、高折晃史が実施した平成26年度「疾患特異的iPS細胞を活用した特発性造血障害の病態解析と新規治療法開発」の成果を取りまとめたものです。

## 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
疾患特異的iPS細胞を活用した特発性造血障害の病態解析と新規治療法開発に関する研究	1
高折晃史	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 骨髄異形成症候群に関わる研究開発	9
河原 真大・高折 晃史	
2. 骨髄異形成症候群に関わる研究開発	13
吉田 善紀・蝶名林 和久	
3. 骨髄異形成症候群に関わる研究開発	18
荒井 俊也	
4. 自己免疫性造血不全に関わる研究開発	20
中尾 眞二	
5. 先天性造血不全に関わる研究開発	23
中畑 龍俊	
III. 学会等発表実績	27

## 疾患特異的 iPS 細胞を活用した特発性造血障害の病態解析と新規治療法開発

業務主任者：高折 晃史（京都大学医学研究科）

### 研究要旨

本研究の目的は、難治性希少疾患である特発性造血障害を対象に、患者造血細胞由来の疾患特異的 iPS 細胞を用いて、病態の解明、新たな治療法の開発を目指すことである。本研究計画は、特発性造血障害のなかで、特に骨髄異形成症候群、自己免疫性骨髄不全、先天性骨髄不全に焦点をあて、①iPS 細胞レベルでの全ゲノム解析、②疾患特異的 iPS 細胞から誘導した造血前駆細胞レベルでのトランスクリプトーム解析、エピゲノム解析、③iPS 細胞由来造血前駆細胞に対する CTL 単離、④iPS 細胞を用いた低分子化合物スクリーニングを行う。本年度は、各種疾患からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立、血球系への分化能の解析、化合物スクリーニング系の構築において成果が見られた。

#### A. 研究目的

特発性造血障害は、様々な形態の造血障害により惹き起こされる難治性疾患の総称である。個々の疾患は様々な病因・病態を持つが、その疾患の希少性より十分な病態解析や治療法開発がなされておらず、厚労科研費「難治性疾患等克服事業」の支援のもと「特発性造血障害に関する調査研究（黒川班）」として、継続してその調査研究がなされてきている。

これらの疾患は、疾患の希少性や適切な病態解析モデルがないことが、その調査研究を困難にしており、そこに iPS 細胞技術を導入することにより、その克服を図り、より詳細な病態解析や新規治療法の開発に寄与することを目標とする。

#### B. 研究方法

本研究計画は、特発性造血障害のなかで、特に骨髄異形成症候群、自己免疫性造血不全、

先天性造血不全に焦点をあて、研究を推進する。①iPS 細胞レベルでの全ゲノム解析、②疾患特異的 iPS 細胞から誘導した造血前駆細胞レベルでのトランスクリプトーム解析、エピゲノム解析、③iPS 細胞由来造血前駆細胞に対する CTL 単離、④iPS 細胞を用いた低分子化合物スクリーニングを行う。

倫理面への配慮として、本研究に用いた細胞を採取した患者の個人情報保護を厳重に行い、そのデータは研究目的以外には利用していない。

#### C. 研究結果

当初の研究計画に沿って、H26 年度に下記の進捗があった。

##### 1. 骨髄異形成症候群 (MDS)

MDS 患者の末梢血および骨髄の細胞にエピソーマルプラスミド法で iPS 細胞樹立を引き続き行い、現在、20q 欠損症例など 4 症

例においてMDS細胞由来iPS細胞株と健常細胞由来iPS細胞株の樹立に成功している。樹立したMDS-iPS細胞株はGバンド法、SNP-CGHアレイ解析によりMDSと同一の染色体異常を保持していることを確認し、テラトーマ形成法によりテラトーマ形成能を有する多能性幹細胞であることを確認した。MDS-iPS細胞株から分化誘導した造血前駆細胞は健常細胞iPS細胞株と比べてコロニー形成能、赤血球分化能が低下していることを明らかにし、現在さらにMDS-iPS細胞株の細胞表現型の評価とそのメカニズムの解析を進めている。

上記のMDS患者細胞から樹立したiPS細胞を用いてMDS治療薬の探索を行うための実験系の構築を開始した。探索する薬剤はMDS患者に見られる造血不全を改善できるような薬剤とした。実験系構築のために、薬剤スクリーニングの材料となる血液前駆細胞(Hematopoietic progenitor cell: HPC)を作製するための分化誘導方法を構築した。さらに薬剤スクリーニングの効率を上げるために、血液前駆細胞を大量に得られるよう細胞密度、サイトカインコンビネーションや分化誘導時間などの分化誘導方法の最適化を行った。同時にiPS細胞の維持培養方法や保存方法の改良、また実際に薬剤スクリーニングに用いるMDS-iPS細胞株、健常細胞iPS細胞株の選択をそれぞれ行った。現在さらに赤血球系細胞や骨髄球系細胞の分化誘導方法の作製及び最適化を行っている。

#### 環状鉄芽球を伴う不応性貧血の疾患 iPS細胞から誘導した造血細胞の解析

スプライシング因子 SF3B1 に変異を有する、環状鉄芽球を伴う不応性貧血(RARS)の症例、および SRSF2 に変異を有する RARS

の症例より、疾患由来 iPS 細胞を樹立することに成功した。この iPS 細胞を iPS-Sac 法で血球に分化誘導し、さらに赤芽球系に分化させたところ、形態的に環状鉄芽球の出現が再現されたほか、表面抗原上、赤芽球の分化が遅延する傾向が見られた。RARS の特性が iPS 細胞より再分化した血球においても保持されていると考えられた。

#### 2. 自己免疫性造血不全

第6染色体短腕(6p)の片親性ダイソミーによる loss of heterozytosity (LOH)を来した白血球を有する再生不良性貧血患者単球(3例)およびB lymphoblastoid cell line (B-LCL, 2株)からiPS細胞の樹立を試みている。現在のところ、末梢血中に約50%のHLA-A2欠失単球を有する患者1例から計5個のiPS細胞が樹立されている。

#### 3. 先天性造血不全

先天性骨髄不全のうちFanconi貧血(FA)、Kostmann症候群の患者からiPS細胞の樹立を試みた。2名のFA(いずれもFANCA)の患者皮膚線維芽細胞を用いた検討では、通常の方法(導入遺伝子: OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC, retroviral or Sendai viral vectors)では従来の報告と同様にiPS細胞の樹立はできなかった。しかし、OCT3/4, SOX2, 1 KLF4, LIN28, L-MYC and a shRNA encoding a p53 knockdown sequence を搭載した episomal vectors を用いたところ、正常細胞に比べて低効率ではあったがiPS細胞を樹立することができた。これらのiPS細胞は核型異常を示したが、多能性幹細胞マーカーを発現し、3胚葉分化能を持っていた。患者iPS細胞、および患者iPS細胞にwild type FANCAを強制発現させたiPS細胞を用いて血球分化の比較検討を行っている。患者iPS細胞由来造

血・血管内皮前駆細胞から産生される血液細胞数は有意に低下していた。Shwachman 症候群 1 名より通常の方法で iPS 細胞が樹立された。患者 iPS 細胞からの血球分化の検討では、前骨髄球段階での maturation arrest が観察され、患者骨髄で観察される病態を反映していると考えられた。今後、本 iPS 細胞及び遺伝子修復した iPS 細胞を用いて、maturation arrest の起る分子メカニズムを明らかにし、そこに働く化合物の検索を進める予定である。

#### D. 考察

MDS をはじめとする特発性造血障害の患者検体からの疾患特異的 iPS 細胞の誘導は、通常のレトロウイルスベクターを用いた山中 4 因子の導入では樹立が不可能であった。エピゾーマルベクターや p53 shRNA を用いた、さらに効率のよい改良された方法により、ようやく数種の疾患において樹立が可能となった。これは、ある面で特発性造血障害の病態、細胞の特性を示唆する結果であると考えられる。樹立した iPS 細胞からの造血細胞への分化においても、同様に多くの例で障害が見られ、これもまた原疾患の病態を反映しているものと考えられる。

#### E. 結論

MDS をはじめとする特発性造血障害の患者検体から数株の疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。それらは原疾患の特性をある程度反映しており、病態の解析や治療法探索の上で有用なツールであると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kumagai S, Tashima M, Fujikawa J, Iwasaki M, Iwamoto Y, Sueki Y, Fukunaga

- A, Yanagita S, Nishikori M, Takaori-Kondo A, Arima N. Ratio of peripheral blood absolute lymphocyte count to absolute monocyte count at diagnosis is associated with progression-free survival in follicular lymphoma. *Int J Hematol.*99(6):737-42, 2014.
- 2) Hashimoto T, Fujimoto M, Nishikori M, Takeuchi K, Kimura M, Nakajima N, Miyagawa-Hayashino A, Takaori-Kondo A, Haga H. Plasmacytic ALK-positive large B-cell lymphoma: A potential mimic of extramedullary plasmacytoma. *Pathol Int.*64(6):292-4, 2014.
- 3) Matsui M, Shindo K, Izumi T, Io K, Shinohara M, Komano J, Kobayashi M, Kadowaki N, Harris RS, Takaori-Kondo A. Small molecules that inhibit Vif-induced degradation of APOBEC3G. *Virology.*511(1):122, 2014.
- 4) Arai Y, Yamashita K, Mizugishi K, Nishikori M, Hishizawa M, Kondo T, Kitano T, Kawabata H, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. Risk factors for late-onset neutropenia after rituximab treatment of B-cell lymphoma. *Hematology.* in press (2014).
- 5) Mikawa T, Leonart ME, Takaori-Kondo A, Yokode M, Kondoh H. RING-mutant Mdm2-M459I Confers Anti-apoptotic Effect in Primary Cells. *J Cytol Histol.* 5(6) 2014.
- 6) Sato K, Takeuchi JS, Misawa N, Izumi T, Kobayashi T, Kimura Y, Iwami S, Takaori-Kondo A, Hu WS, Aihara K, Ito M, An DS, Pathak VK, Koyanagi Y. APOBEC3D and APOBEC3F Potently Promote HIV-1 Diversification and

- Evolution in Humanized Mouse Model. *PLoS Pathog.* 10(10): e1004453, 2014.
- 7) Kobayashi T, Kuroda J, Fuchida S, Kaneko H, Yagi H, Shibayama H, Tanaka H, Kosugi S, Uoshima N, Kobayashi M, Adachi Y, Ohta K, Ishii K, Uchiyama H, Matsuda M, Nakatani E, Tsudo M, Shimazaki C, Takaori-Kondo A, Nomura S, Matsumura I, Taniwaki M, Kanakura Y. Impact of early use of lenalidomide and low-dose dexamethasone on clinical outcomes in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Int J Hematol.*101(1):37-45, 2015.
  - 8) Arai Y, Kondo T, Kitano T, Hishizawa M, Yamashita K, Kadowaki N, Yamamoto T, Yano I, Matsubara K, Takaori-Kondo A. Monitoring mycophenolate mofetil is necessary for the effective prophylaxis of acute GVHD after cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.*50(2):312-4, 2015.
  - 9) Mizugishi K, Inoue T, Hatayama H, Bielawski J, Pierce JS, Sato Y, Takaori-Kondo A, Konishi I, Yamashita K. Sphingolipid Pathway Regulates Innate Immune Responses at the Fetomaternal Interface during Pregnancy. *J Biol Chem.*290(4):2053-68, 2015.
  - 10) Mikawa T, ME LL, Takaori-Kondo A, Inagaki N, Yokode M, Kondoh H. Dysregulated glycolysis as an oncogenic event. *Cell Mol Life Sci.* in press (2015).
  - 11) Kawanishi M, Yano I, Yoshimura K, Yamamoto T, Hashi S, Masuda S, Kondo T, Takaori-Kondo A, Matsubara K. Sensitive and validated LC-MS/MS methods to evaluate mycophenolic acid pharmacokinetics and pharmacodynamics in hematopoietic stem cell transplant patients. *Biomed Chromatogr.* in press (2015).
  - 12) Kawabata H, Uchiyama T, Sakamoto S, Kanda J, Oishi S, Fujii N, Tomosugi N, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. A HAMP promoter bioassay system for identifying chemical compounds that modulate hepcidin expression. *Exp Hematol.* in press (2015).
  - 13) Tokunaga K, Saitoh N, Goldberg I, Sakamoto C, Yasuda Y, Yoshida Y, Yamanaka S, Nakao M. Computational image analysis of colony and nuclear morphology to evaluate human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 4:6996, 2014
  - 14) Chonabayashi K, Tamori S, Taniwaki M, Fujita H, Shimazu Y, Matsui Y, Hishizawa M, Usami K, Takaori-Kondo A. Refractory IGκ/IRF4-positive DLBCL with CDKN2A/2B deletion. *Ann Hematol.* 93:893-4, 2014.
  - 15) Chonabayashi K, Hishizawa M, Matsui M, Kondo T, Ohno T, Ishikawa T, Takaori-Kondo A. Successful allogeneic stem cell transplantation with long-term remission of ETV6/FLT3-positive myeloid/lymphoid neoplasm with eosinophilia. *Ann Hematol.* 93:535-7, 2014.
  - 16) Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, Takizawa N, Ichisaka T, Asano K, Morizane A, Doi D, Takahashi J, Nishizawa M, Yoshida Y, Toyoda T, Osafune K, Sekiguchi K, Yamanaka S. A novel efficient feeder-free culture system

- for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 4:3594, 2014.
- 17) 蝶名林 和久、吉田 善紀、高折 晃史. リプログラミング技術を用いた骨髄異形成症候群の病態解明と新規治療の可能性. *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. 遺伝子医学 MOOK27 号. メディカルドゥ社. 2015:27:147-151*
  - 18) 吉田善紀、山中伸弥: *iPS 細胞 医学のあゆみ 医学・医療のいまがわかるキーワード 医歯薬出版, 249 巻 5 号 p404-405*
  - 19) 吉田善紀: *iPS 細胞を用いた治療 臨床心不全のいちばん大事なところ 60 メディカ出版 p344-347*
  - 20) 吉田善紀: *ES 細胞と iPS 細胞 心臓 46 巻 12 号 2014 年 p. 1546-1549*
  - 21) 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.* 42:816-25, 2014.
  - 22) Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, Sato-Otsubo A, Sato Y, Liu D, Suzuki H, Wu C, Shiraishi Y, Clemente MJ, Kataoka K, Shiozawa Y, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Nagata Y, Katagiri T, Kon A, Sanada M, Scheinberg P, Miyano S, Maciejewski JP, Nakao S, Young NS, Ogawa S: Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia, *N Eng J Med*, in press.
  - 23) Inaguma Y, Akatsuka Y, Hosokawa K, Maruyama H, Okamoto A, Katagiri T, Shiraishi K, Murayama Y, Tsuzuki-Iba S, Mizutani Y, Nishii C, Yamamoto N, Demachi-Okamura A, Kuzushima K, Ogawa S, Emi N, Nakao S: Induction of HLA-B\*40:02-restricted T cells possessing cytotoxic and suppressive functions against hematopoietic progenitor cells from a patient with severe aplastic anemia. *Br J Haematol*, in press.
  - 24) Hosokawa K, Sugimori N, Katagiri T, Sasaki Y, Saito C, Seiki Y, Mochizuki K, Yamazaki H, Takami A, Nakao S: Increased glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient granulocytes define a benign subset of bone marrow failures in patients with trisomy 8. *Eur J Haematol*, 2014, in press.
- ## 2. 学会発表
- 1) Yoshinaga N, Matsui Y, Shindo K, Takiuchi Y, Tada K, Takeda S, Takaori-Kondo A. A screening for DNA repair enzymes related to HIV-1 life cycle (poster) . Cold Spring Harbor meeting on Retroviruses, NY, USA. May 19-24, 2014.
  - 2) Matsui Y, Shindo K, Nagata K, Yoshinaga N, Maruyama W, Shirakawa K, Kobayashi M, Takaori-Kondo A. CBF $\beta$  stabilizes HIV-1 Vif by inhibiting MDM2-mediated degradation (poster) . Cold Spring Harbor meeting on Retroviruses, NY, USA. May 19-24, 2014.
  - 3) Arai Y, Yamashita K, Mizugishi K, Takaori-Kondo A. Anti-lactoferrin autoantibodies contribute to the

- pathogenesis of IgG4 related disease by inducing neutrophil extracellular trap formation. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2014, Paris, France. June 11-15, 2014.
- 4) Sato T, Kitawaki T, Fujita H, Iwata M, Iyoda T, Inaba K, Ohteki T, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. Human DCs with high retinoic acid-producing capacity. the 13th International Symposium on Dendritic Cells, Tours, France. September 14-18, 2014.
  - 5) Sugino N, Kawahara M, Suzuki T, Nagai Y, Shimazu Y, Fujii S, Yamamoto R, Hishizawa M, Takaori-Kondo A. The Pharmacological Inhibition of KDM1A Displays Preclinical Efficacy in AML and MDS By Inducing Myelomonocytic Differentiation. The 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, USA. December 6-9, 2014.
  - 6) Nishikori M, Kishimoto W, Arima H, Shirakawa K, Kitawaki T, Takaori-Kondo A. Expression of Tim-1 and Its Pathogenetic Role in Primary CNS Lymphoma. The 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, USA. December 6-9, 2014.
  - 7) Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Totoki Y, Yasunaga J-i, Kotani S, Sato-Otsubo A, Sanada M, Shiraishi Y, Shimamura T, Chiba K, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Kon A, Yoshida K, Hishizawa M, Munakata W, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Ishiyama K, Miyawaki S, Ishii R, Nureki O, Nagae G, Aburatani H, Miyano S, Takaori-Kondo A, Watanabe T, Matsuoka M, Shibata T, Shimoda K, Ogawa S. Landscape of Genetic Alterations in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. The 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, USA. December 6-9, 2014.
  - 8) Chonabayashi K, Kawahara M, Okita K, Nishizawa M, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Yamanaka S, Yoshida Y. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate the Maturation Defect of Myelodysplastic Syndromes. The 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, USA. December 6-9, 2014.
  - 9) Arai Y, Yamashita K, Mizugishi K, Takaori-Kondo A. Presepsin (soluble CD14 subtype) Is Secreted from Human Monocytes after Phagocytosis – in Vitro Analyses and a Retrospective Cohort Study in Patients with Allogeneic Stem Cell Transplantation. The 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, USA. December 6-9, 2014.
  - 10) Takaori-Kondo A. Functional Interaction between APOBEC3 and HIV-1 Vif (AIDS Panel Meeting). 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases Taipei, Taiwan. Jan 28-29, 2015.
  - 11) Yoshinaga N, Matsui Y, Shindo K, Takeda S, Takaori-Kondo A. A Screening for DNA Repair Enzymes That Affect HIV-1 Infection. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2015, Seattle, USA. Feb 23-26, 2015.
  - 12) Kazuhiisa Chonabayashi, Masahiro Kawahara, Akira Watanabe, Naoki Amano, Keisuke Okita, Masatoshi Nishizawa, Norimitsu Kadowaki, Akifumi Takaori-Kondo, Shinya Yamanaka, Yoshinori Yoshida. iPS technology revealed the genetic and functional diversity present

- in a single MDS patient. The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. October 2014.
- 13) Funakoshi, S., Kimura, T., Yamanaka, S., and Yoshida, Y: What is the optimal differentiation stage of iPSC-derived cardiomyocytes for cardiac cell therapy? ISSCR 12th Annual Meeting 2014/6/19
  - 14) Nishizawa, M., Chonabayashi, K., Oishi, A., Takei, I., Nishikawa, M., Takaori-Kondo, A., Yamanaka, S., and Yoshida, Y: Differentiation Phase-Dependent Factors Responsible for Variation in Hematopoietic Differentiation Propensity among Human Pluripotent Stem Cells Revealed by Genome-wide Analysis of Gene Expression and DNA Methylation. ISSCR 12th Annual Meeting 2014/6/20
  - 15) Miki, K., Takahashi, S., Funakoshi, S., Yamanaka, S., Saito, H., and Yoshida, Y: A Novel Purification Method for Cardiomyocytes and Endothelial Cells Derived From Human Pluripotent Stem Cells Using MicroRNA-responsive Messenger RNA. American Heart Association Scientific Sessions 2014/11/15-19
  - 16) Shunsuke Funakoshi, Masaki Nomura, Chikako Okubo, Kenji Miki, Takeshi Kimura, Shinya Yamanaka, Akira Watanabe, Yoshinori Yoshida: Single Cell RNA Sequencing Reveals Dynamic and Heterogeneous Changes of Transcriptome During Cardiac Differentiation in vitro. American Heart Association Scientific Sessions 2014/11/15-19
  - 17) Shunsuke Funakoshi, Takeshi Kimura, Shinya Yamanaka, Yoshinori Yoshida: Very High Engraftment, proliferation, and therapeutic potential of iPSC-derived cardiomyocytes. American Heart Association Scientific Sessions 2014/11/15-19
  - 18) 吉田善紀: iPSC細胞を用いた心疾患の解析 日本生化学会大会シンポジウム疾患 iPSC細胞 2014/10/15
  - 19) 大久保周子、舟越俊介、野村真樹、三木健嗣、高木正、岡田千尋、中村正裕、山中伸弥、渡辺亮、吉田善紀: iPSC細胞から心筋細胞分化誘導過程におけるシングルセル遺伝子発現解析 第37回日本分子生物学会年会 2014/11/27
  - 20) Funakoshi, S., Miki, K., Kimura, T., Yamanaka, S., and Yoshid, Y: Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutics using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. The 18th Takada Science Foundation Symposium on Bioscience 2015/1/15-17
  - 21) Nishizawa, M., Nishikawa, M., Takei, I., Chonabayashi, K., Takaori, A., Yamanaka, S., and Yoshida, Y: Landscape of Transcriptional and Epigenetic Profile and Hematopoietic Differentiation Capacity of Human Pluripotent Stem Cells. The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience 2015/1/15-17
  - 22) Miki, K., Endo, K., Takahashi, S., Funakoshi, S., Yamanaka, S., Saito, H., and Yoshida, Y: Synthetic mRNA switches for detection and purification of cardiomyocytes and endothelial cells derived from human pluripotent stem cells. The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience 2015/1/15-17

- 23) 三木健嗣、遠藤慧、高橋誠弥、舟越俊介、山中伸弥、斎藤博英、吉田善紀 : Efficient detection and purification of cells by synthetic microRNA switches 第14回日本再生医療学会総会 2015/3/19-21
- 24) 舟越俊介、三木健嗣、木村剛、山中伸弥、吉田善紀 : Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes 第14回日本再生医療学会総会 2015/3/19-21
- 25) 大久保周子、舟越俊介、野村真樹、三木健嗣、高木正、岡田千尋、中村正裕、山中伸弥、渡辺亮、吉田善紀 : iPS 細胞から心筋細胞分化誘導におけるシングルセル遺伝子解析第14回日本再生医療学会総会 2015/3/19-21
- 26) Taoka K, Arai S, Hosoi M, Nakamura F, Miyachi M, Yamazaki S, Honda A, Kataoka K, Kumano K, Yoshimi A, Eto K, Nakauchi H, Nakahata T, Kurokawa M. Modeling chronic myelomonocytic leukemia through patient-derived induced pluripotent stem cells. 第76回日本血液学会学術集会 10月31日-11月2日, 2014, 大阪
- 27) **Yoshitaka Zaimoku**, Hiroyuki Maruyama, Kana Maruyama, Takamasa Katagiri, An T. T. Dao, Hiroyuki Takamatsu, Hirohito Yamazaki, Koichi Kashiwase and Shinji **Nakao**: Evidence that HLA-B\*40:02 and

HLA-A\*31:01 are strongly involved in the presentation of autoantigens to CTLs responsible for the development of acquired aplastic anemia: Poster Session, #2948: The American Society of Hematology 56th Annual Meeting, December 7, 2014. San Francisco, California, USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 骨髄異形成症候群等の治療/予防薬のスクリーニング方法

発明者：山中伸弥/吉田善紀/蝶名林和久

権利者：国立大学法人京都大学

特許出願番号：特願2013-109385

出願年月日：2013/5/23

2) 新規成熟心筋マーカー

発明者：吉田善紀/舟越俊介

権利者：国立大学法人京都大学

特許出願番号：特願 2014-262906

出願年月日：2014/12/25

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（難治性疾患実用化研究事業）

「疾患特異的 iPS 細胞を活用した特発性造血障害の病態解析と新規治療法開発」

委託業務成果報告書（業務項目）

## 骨髄異形成症候群に関わる研究開発

担当責任者：河原 真大、高折 晃史（京都大学医学研究科）

### 研究要旨

本研究の目的は、難治性希少疾患である特発性造血障害を対象に、患者造血細胞由来の疾患特異的 iPS 細胞を用いて、病態の解明、新たな治療法の開発を目指すことである。本研究では、骨髄異形成症候群に焦点をあて、①iPS 細胞レベルでの全ゲノム解析、②疾患特異的 iPS 細胞から誘導した造血前駆細胞レベルでのトランスクリプトーム解析、エピゲノム解析、③iPS 細胞由来造血前駆細胞に対する CTL 単離、④iPS 細胞を用いた低分子化合物スクリーニングを行う。本年度は、各種疾患からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立、血球系への分化能の解析、化合物スクリーニング系の構築において成果が見られた。

#### A. 研究目的

骨髄異形成症候群を対象に、エピゲノムレベルの異常を明らかにし、新たな治療法の開発を目指す。

#### B. 研究方法

骨髄異形成症候群患者から誘導した iPS 細胞から、血液前駆細胞を再誘導し、クロマチン免疫沈降+次世代シーケンス解析を組み合わせた ChIP-seq でヒストン修飾の変化を解析する。

#### （倫理面への配慮）

本研究計画は、京都大学医の倫理委員会の承認を得て行われている。患者検体（血液・骨髄）を採取する際に十分な説明を行い、同意が得られた検体から iPS を誘導し実験に供している。

#### C. 研究結果

本年は、骨髄異形成症候群由来の細胞株を

用いて、ChIP-seq の検定を行った。ヒストンメチル化修飾（H3K4me2, H3K4me3, H3K27ac）について、まず必要細胞数の検討を行い、 $1 \times 10^6$  細胞で解析可能であった。次に、転写因子の発現とヒストンメチル化との関連を検討した。複数の転写因子で、その発現が低下しており、エンハンサーの H3K27ac が低下していることを見いだした。

#### D. 考察

ChIP-seq が当初想定していたより少ない細胞数で可能であることがわかった。現在、複数のサイトカインの組み合わせで骨髄異形成症候群由来 iPS からおよそ  $2 \times 10^6$  程度の血液前駆細胞の誘導が技術的に可能である。従って、今後実際に骨髄異形成症候群由来 iPS を用いた ChIP-seq 解析が可能であると考えられる。また、転写因子の発現を抑制しているエンハンサー領域をターゲットにした薬剤が開発できれば、新しい治療法につながると思われる。

## E. 結論

来年度にむけての iPS から誘導した造血前駆細胞を用いての ChIP-seq 解析の実現可能性を明らかにした。新規治療薬開発にむけての標的の一端を明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kumagai S, Tashima M, Fujikawa J, Iwasaki M, Iwamoto Y, Sueki Y, Fukunaga A, Yanagita S, Nishikori M, Takaori-Kondo A, Arima N. Ratio of peripheral blood absolute lymphocyte count to absolute monocyte count at diagnosis is associated with progression-free survival in follicular lymphoma. *Int J Hematol.*99(6):737-42, 2014.
- 2) Hashimoto T, Fujimoto M, Nishikori M, Takeuchi K, Kimura M, Nakajima N, Miyagawa-Hayashino A, Takaori-Kondo A, Haga H. Plasmacytic ALK-positive large B-cell lymphoma: A potential mimic of extramedullary plasmacytoma. *Pathol Int.*64(6):292-4, 2014.
- 3) Matsui M, Shindo K, Izumi T, Io K, Shinohara M, Komano J, Kobayashi M, Kadowaki N, Harris RS, Takaori-Kondo A. Small molecules that inhibit Vif-induced degradation of APOBEC3G. *Viral J.*11(1):122, 2014.
- 4) Arai Y, Yamashita K, Mizugishi K, Nishikori M, Hishizawa M, Kondo T, Kitano T, Kawabata H, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. Risk factors for late-onset neutropenia after rituximab treatment of B-cell lymphoma. *Hematology.* in press (2014).
- 5) Mikawa T, Leonart ME, Takaori-Kondo A, Yokode M, Kondoh H. RING-mutant Mdm2-M459I Confers Anti-apoptotic Effect in Primary Cells. *J Cytol Histol.* 5(6) 2014.
- 6) Sato K, Takeuchi JS, Misawa N, Izumi T, Kobayashi T, Kimura Y, Iwami S, Takaori-Kondo A, Hu WS, Aihara K, Ito M, An DS, Pathak VK, Koyanagi Y. APOBEC3D and APOBEC3F Potently Promote HIV-1 Diversification and Evolution in Humanized Mouse Model. *PLoS Pathog.* 10(10): e1004453, 2014.
- 7) Kobayashi T, Kuroda J, Fuchida S, Kaneko H, Yagi H, Shibayama H, Tanaka H, Kosugi S, Uoshima N, Kobayashi M, Adachi Y, Ohta K, Ishii K, Uchiyama H, Matsuda M, Nakatani E, Tsudo M, Shimazaki C, Takaori-Kondo A, Nomura S, Matsumura I, Taniwaki M, Kanakura Y. Impact of early use of lenalidomide and low-dose dexamethasone on clinical outcomes in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Int J Hematol.*101(1):37-45, 2015.
- 8) Arai Y, Kondo T, Kitano T, Hishizawa M, Yamashita K, Kadowaki N, Yamamoto T, Yano I, Matsubara K, Takaori-Kondo A. Monitoring mycophenolate mofetil is necessary for the effective prophylaxis of acute GVHD after cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.*50(2):312-4, 2015.
- 9) Mizugishi K, Inoue T, Hatayama H, Bielawski J, Pierce JS, Sato Y, Takaori-Kondo A, Konishi I, Yamashita K. Sphingolipid Pathway Regulates Innate Immune Responses at the Fetomaternal

Interface during Pregnancy. *J Biol Chem.*290(4):2053-68, 2015.

- 10) Mikawa T, ME LL, Takaori-Kondo A, Inagaki N, Yokode M, Kondoh H. Dysregulated glycolysis as an oncogenic event. *Cell Mol Life Sci.* in press (2015).
  - 11) Kawanishi M, Yano I, Yoshimura K, Yamamoto T, Hashi S, Masuda S, Kondo T, Takaori-Kondo A, Matsubara K. Sensitive and validated LC-MS/MS methods to evaluate mycophenolic acid pharmacokinetics and pharmacodynamics in hematopoietic stem cell transplant patients. *Biomed Chromatogr.* in press (2015).
  - 12) Kawabata H, Uchiyama T, Sakamoto S, Kanda J, Oishi S, Fujii N, Tomosugi N, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. A HAMP promoter bioassay system for identifying chemical compounds that modulate hepcidin expression. *Exp Hematol.* in press (2015).
2. 学会発表
- 1) Yoshinaga N, Matsui Y, Shindo K, Takiuchi Y, Tada K, Takeda S, Takaori-Kondo A. A screening for DNA repair enzymes related to HIV-1 life cycle (poster) . Cold Spring Harbor meeting on Retroviruses, NY, USA. May 19-24, 2014.
  - 2) Matsui Y, Shindo K, Nagata K, Yoshinaga N, Maruyama W, Shirakawa K, Kobayashi M, Takaori-Kondo A. CBF $\beta$  stabilizes HIV-1 Vif by inhibiting MDM2-mediated degradation (poster) . Cold Spring Harbor meeting on Retroviruses, NY, USA. May 19-24, 2014.
  - 3) Arai Y, Yamashita K, Mizugishi K, Takaori-Kondo A. Anti-lactoferrin autoantibodies contribute to the pathogenesis of IgG4 related disease by inducing neutrophil extracellular trap formation. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2014, Paris, France. June 11-15, 2014.
  - 4) Sato T, Kitawaki T, Fujita H, Iwata M, Iyoda T, Inaba K, Ohteki T, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. Human DCs with high retinoic acid-producing capacity. the 13th International Symposium on Dendritic Cells, Tours, France. September 14-18, 2014.
  - 5) Sugino N, Kawahara M, Suzuki T, Nagai Y, Shimazu Y, Fujii S, Yamamoto R, Hishizawa M, Takaori-Kondo A. The Pharmacological Inhibition of KDM1A Displays Preclinical Efficacy in AML and MDS By Inducing Myelomonocytic Differentiation. The 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, USA. December 6-9, 2014.
  - 6) Nishikori M, Kishimoto W, Arima H, Shirakawa K, Kitawaki T, Takaori-Kondo A. Expression of Tim-1 and Its Pathogenetic Role in Primary CNS Lymphoma. The 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, USA. December 6-9, 2014.
  - 7) Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Totoki Y, Yasunaga J-i, Kotani S, Sato-Otsubo A, Sanada M, Shiraishi Y, Shimamura T, Chiba K, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Kon A, Yoshida K, Hishizawa M, Munakata W, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Ishiyama K, Miyawaki S, Ishii R, Nureki O, Nagae G, Aburatani H, Miyano S, Takaori-Kondo A, Watanabe T, Matsuoka M,

- Shibata T, Shimoda K, Ogawa S. Landscape of Genetic Alterations in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. The 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, USA. December 6-9, 2014.
- 8) Chonabayashi K, Kawahara M, Okita K, Nishizawa M, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Yamanaka S, Yoshida Y. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate the Maturation Defect of Myelodysplastic Syndromes. The 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, USA. December 6-9, 2014.
- 9) Arai Y, Yamashita K, Mizugishi K, Takaori-Kondo A. Presepsin (soluble CD14 subtype) Is Secreted from Human Monocytes after Phagocytosis – in Vitro Analyses and a Retrospective Cohort Study in Patients with Allogeneic Stem Cell Transplantation. The 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, USA. December 6-9, 2014.
- 10) Takaori-Kondo A. Functional Interaction between APOBEC3 and HIV-1 Vif (AIDS Panel Meeting). 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases Taipei, Taiwan. Jan 28-29, 2015.
- 11) Yoshinaga N, Matsui Y, Shindo K, Takeda S, Takaori-Kondo A. A Screening for DNA Repair Enzymes That Affect HIV-1 Infection. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2015, Seattle, USA. Feb 23-26, 2015.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
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（難治性疾患実用化研究事業）  
「疾患特異的 iPS 細胞を活用した特発性造血障害の病態解析と新規治療法開発」  
委託業務成果報告書（業務項目）

骨髓異形成症候群に関わる研究開発

担当責任者：蝶名林 和久（京都大学 iPS 細胞研究所）

吉田 善紀（京都大学 iPS 細胞研究所）

研究要旨

予後不良のクローン性造血障害である骨髓異形成症候群（MDS）には病態を再現し解析する疾患モデルがなく、新規治療法を開発するためのツールが殆どないのが現状である。我々は核型異常を有する複数の MDS 症例の異常クローンから iPS 細胞（MDS-iPS 細胞）の樹立に成功した。MDS-iPS 細胞から再分化した造血前駆細胞には、コロニー形成能の低下、赤芽球系及び顆粒系分化能の低下が見られた。MDS-iPS 細胞は、MDS の発症機構や病態に関する解析や MDS 特異的候補因子の探索などに大きく貢献できると予想され、同時に創薬スクリーニングにおいて強力なツールになることが期待できる。

A. 研究目的

MDS では、病態解明に有用なモデルマウスがなく、有効な治療法を開発するためのツールが無いのが現状である。MDS の病態が再現・解析でき、将来の治療法を開発を可能にするツールの開発、及び新規治療薬の開発が切望されている。

iPS 細胞は ES 細胞と同様に未分化性を維持したまま増幅可能かつ生体を構成する種々の細胞に分化することが可能であり、患者検体を得ることが困難な神経疾患領域などで iPS 細胞を利用した遺伝性疾患研究への応用が精力的に行われている。MDS のような後天性の遺伝子異常を伴う疾患においても、疾患特異的な iPS 細胞（MDS-iPS 細胞）が樹立できれば、iPS 細胞を再分化させることによって患者から直接採取することの出来ない多量の疾患細胞を必要な分化段階で得ることができる。本研究は MDS-iPS 細胞の網羅的ゲノム解析、MDS-iPS 細胞から再誘導された

造血前駆細胞の遺伝子発現及び血球分化能などの解析を行うことにより、MDS の発症機構及び病態を明らかにし、有望な標的因子について阻害剤等を同定することを目的とする。

B. 研究方法

1) 複数の MDS 患者の末梢血もしくは骨髓の単核細胞から MDS-iPS 細胞株及び正常 iPS 細胞株の作製を試みた。

2) 樹立できた MDS-iPS 細胞株及び正常 iPS 細胞株について、FISH 解析、G バンド法、SNP-CGH アレイで染色体異常の有無を検討した。

3) MDS-iPS 細胞株及び正常 iPS 細胞株を OP9 細胞共培養法及び胚様体形成法による分化誘導系を用いて *in vitro* で造血誘導し、その後、GM-CSF、G-CSF、IL3、IL-6、SCF、EPO 存在下でコロニーアッセイを行い、コロニー形成能力、分化能力（CFU-G、-M、GM、-GEMM、

-E、BFU-E など)を比較した。また EPO、G-CSF、TPO などの各サイトカイン単独での成熟血球誘導を行い、赤芽球系、顆粒球系などへの分化能を、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原マーカー解析により比較した。

4) 新規薬剤スクリーニングの材料となる血液前駆細胞を iPS 細胞から大量に作製するための分化誘導方法の検討を行った。

### C. 研究結果

当初の研究計画に沿って、H26 年度に下記の進捗があった。

1) MDS 患者の末梢血及び骨髄の細胞にエピソーマルプラスミド法で iPS 細胞樹立を引き続き行い、現在、20q 欠損症例など 4 症例において MDS 細胞由来 iPS 細胞株と健常細胞由来 iPS 細胞株の樹立に成功した。

2) 樹立した MDS-iPS 細胞株は G バンド法、SNP-CGH アレイ解析などにより MDS と同一の染色体異常を保持していることを確認し、テラトーマ形成法によりテラトーマ形成能を有する多能性幹細胞であることを確認した。

3) MDS-iPS 細胞株から分化誘導した造血前駆細胞は健常細胞 iPS 細胞株と比べてコロニー形成能の低下及び BFU-E、CFU-E、CFU-GEMM の減少を認めた。また造血前駆細胞から赤芽球系、顆粒球系への特異的分化誘導を行い、細胞表面抗原の解析を行ったところ、MDS-iPS 細胞株由来のものでそれぞれ赤芽球特異的 CD235a、顆粒球特異的 CD66 b が低下していた。現在さらに MDS-iPS 細胞株の細胞表現型の評価とそのメカニズムの解析を進めている。

4) 上記の MDS 患者細胞から樹立した iPS 細胞を用いて MDS 治療薬の探索を行うための薬剤スクリーニング系の構築を開始した。探索する薬剤は MDS 患者に見られる造血不全を改善できるような薬剤とした。分化誘導

系としては、OP9 細胞共培養法よりも血液前駆細胞を効率良く作成する事が可能である胚様体形成法を選択した。さらに薬剤スクリーニングの効率を上げるために、血液前駆細胞を大量に得られるよう細胞密度、サイトカインコンビネーションや分化誘導時間などの分化誘導方法の最適化を行った。同時に iPS 細胞の維持培養方法や保存方法の改良、また実際に薬剤スクリーニングに用いる MDS-iPS 細胞株、健常細胞 iPS 細胞株の選択をそれぞれ行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者の同意・協力を必要とする研究である。また、作製した 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、個人情報取り扱いに配慮を必要とする研究である。したがって、すでに京都大学で承認されている「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究」及び「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」に準拠して適切に研究を進める。組み換え DNA 実験については当施設を所掌する委員会に申請・承認を得、法令等を遵守して実施する。

### D. 考察

近年、SNP アレイや次世代シーケンサーを用いた MDS の網羅的ゲノム解析により de novo AML とは異なる遺伝子異常が次々に発見され、治療標的としての可能性など臨床への応用も加速すると期待されているが、遺伝子異常の意味や病態との関連についてはまだ不明な点が多い。MDS 患者ではこれらの遺伝子変異が複数あることが多く、次世代シーケンサーを用いた targeted resequencing の結果から同一症例においても MDS クローンの階層性が存在し、親クローン、複数の娘クローンが存在することが判明している。単

一細胞エキソーム解析や、コロニーアッセイを用いた単一クローン由来コロニーのゲノム解析などを用いることで、より詳細なクローン進化の解析が可能となるが、クローン優位性の獲得や病態の進展において各遺伝子異常が果たす意義についての解析は十分でない。我々は同一 MDS 症例から複数の MDS-iPS 細胞を樹立することに成功しており、今後より詳細に個々の MDS-iPS 細胞の網羅的ゲノム解析などを行うことによりその症例で見られる個々の遺伝子異常の機能的な解析を行い、それらを標的とした治療法の探索を行う予定である。

低リスク群 MDS では AML への移行のリスクは低く、骨髄不全への対策が治療の主目的となる。5 番染色体長腕欠失を有する MDS に対してはサリドマイド誘導体であるレナリドマイドが有効であり、貧血の改善に加えて細胞遺伝学的効果も期待できるが、他の病型での有効性は低くさらに有用な薬剤の開発が必要である。我々は新規薬剤スクリーニングの材料となる血液前駆細胞を iPS 細胞から大量に作成することに成功しており、現在さらに赤芽球系細胞や顆粒球系細胞の分化誘導方法の作製及び最適化を行っている。

## E. 結論

複数の MDS 細胞由来 iPS 細胞株から血球を再分化誘導し、MDS の病態の一部を再現することに成功した。MDS-iPS 細胞は、MDS の発症機構や病態に関する解析や MDS 特異的候補因子の探索などに大きく貢献できると予想され、同時に創薬スクリーニングにおいて強力なツールになることが期待できる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tokunaga K, Saitoh N, Goldberg I, Sakamoto C, Yasuda Y, Yoshida Y, Yamanaka S, Nakao M. Computational image analysis of colony and nuclear morphology to evaluate human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 4:6996, 2014
- 2) Chonabayashi K, Tamori S, Taniwaki M, Fujita H, Shimazu Y, Matsui Y, Hishizawa M, Usami K, Takaori-Kondo A. Refractory IGκ/IRF4-positive DLBCL with CDKN2A/2B deletion. *Ann Hematol.* 93:893-4, 2014.
- 3) Chonabayashi K, Hishizawa M, Matsui M, Kondo T, Ohno T, Ishikawa T, Takaori-Kondo A. Successful allogeneic stem cell transplantation with long-term remission of ETV6/FLT3-positive myeloid/lymphoid neoplasm with eosinophilia. *Ann Hematol.* 93:535-7, 2014.
- 4) Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, Takizawa N, Ichisaka T, Asano K, Morizane A, Doi D, Takahashi J, Nishizawa M, Yoshida Y, Toyoda T, Osafune K, Sekiguchi K, Yamanaka S. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 4:3594, 2014.
- 5) 蝶名林 和久, 吉田 善紀, 高折 晃史. リプログラミング技術を用いた骨髄異形成症候群の病態解明と新規治療の可能性. 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見聞. 遺伝子医学 MOOK27 号. メディカルドゥ社. 2015:27:147-151
- 6) 吉田善紀, 山中伸弥: iPS 細胞 医学の

- あゆみ 医学・医療のいまがわかるキーワード 医歯薬出版, 249 巻 5 号 p404-405
- 7) 吉田善紀: iPS 細胞を用いた治療 臨床心不全のいちばん大事なところ 60 メディカ出版 p344-347
- 8) 吉田善紀: ES 細胞と iPS 細胞 心臓 46 巻 12 号 2014 年 p. 1546-1549
2. 学会発表
- 1) Kazuhisa Chonabayashi, Masahiro Kawahara, Keisuke Okita, Masatoshi Nishizawa, Norimitsu Kadowaki, Akifumi Takaori-Kondo, Shinya Yamanaka, Yoshinori Yoshida. Patient-specific induced pluripotent stem cells recapitulate the maturation defect of myelodysplastic syndromes. The 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology. December 2014.
- 2) Kazuhisa Chonabayashi, Masahiro Kawahara, Akira Watanabe, Naoki Amano, Keisuke Okita, Masatoshi Nishizawa, Norimitsu Kadowaki, Akifumi Takaori-Kondo, Shinya Yamanaka, Yoshinori Yoshida. iPS technology revealed the genetic and functional diversity present in a single MDS patient. The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. October 2014.
- 3) Funakoshi, S., Kimura, T., Yamanaka, S., and Yoshida, Y: What is the optimal differentiation stage of iPSC-derived cardiomyocytes for cardiac cell therapy? ISSCR 12th Annual Meeting 2014/6/19
- 4) Nishizawa, M., Chonabayashi, K., Oishi, A., Takei, I., Nishikawa, M., Takaori-Kondo, A., Yamanaka, S., and Yoshida, Y: Differentiation Phase-Dependent Factors Responsible for Variation in Hematopoietic Differentiation Propensity among Human Pluripotent Stem Cells Revealed by Genome-wide Analysis of Gene Expression and DNA Methylation. ISSCR 12th Annual Meeting 2014/6/20
- 5) Miki, K., Takahashi, S., Funakoshi, S., Yamanaka, S., Saito, H., and Yoshida, Y: A Novel Purification Method for Cardiomyocytes and Endothelial Cells Derived From Human Pluripotent Stem Cells Using MicroRNA-responsive Messenger RNA. American Heart Association Scientific Sessions 2014/11/15-19
- 6) Shunsuke Funakoshi, Masaki Nomura, Chikako Okubo, Kenji Miki, Takeshi Kimura, Shinya Yamanaka, Akira Watanabe, Yoshinori Yoshida: Single Cell RNA Sequencing Reveals Dynamic and Heterogeneous Changes of Transcriptome During Cardiac Differentiation in vitro. American Heart Association Scientific Sessions 2014/11/15-19
- 7) Shunsuke Funakoshi, Takeshi Kimura, Shinya Yamanaka, Yoshinori Yoshida: Very High Engraftment, proliferation, and therapeutic potential of iPSC-derived cardiomyocytes. American Heart Association Scientific Sessions 2014/11/15-19
- 8) 吉田善紀: iPS 細胞を用いた心疾患の解析 日本生化学会大会シンポジウム疾患 iPS 細胞 2014/10/15
- 9) 大久保周子、舟越俊介、野村真樹、三木健嗣、高木正、岡田千尋、中村正裕、山中伸弥、渡辺亮、吉田善紀: iPS 細胞か

- ら心筋細胞分化誘導過程におけるシングルセル遺伝子発現解析 第 37 回日本分子生物学会年会 2014/11/27
- 10) Funakoshi, S., Miki, K., Kimura, T., Yamanaka, S., and Yoshida, Y.: Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutics using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience 2015/1/15-17
- 11) Nishizawa, M., Nishikawa, M., Takei, I., Chonabayashi, K., Takaori, A., Yamanaka, S., and Yoshida, Y.: Landscape of Transcriptional and Epigenetic Profile and Hematopoietic Differentiation Capacity of Human Pluripotent Stem Cells. The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience 2015/1/15-17
- 12) Miki, K., Endo, K., Takahashi, S., Funakoshi, S., Yamanaka, S., Saito, H., and Yoshida, Y.: Synthetic mRNA switches for detection and purification of cardiomyocytes and endothelial cells derived from human pluripotent stem cells. The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience 2015/1/15-17
- 13) 三木健嗣、遠藤慧、高橋誠弥、舟越俊介、山中伸弥、斎藤博英、吉田善紀: Efficient detection and purification of cells by synthetic microRNA switches 第 14 回日本再生医療学会総会 2015/3/19-21
- 14) 舟越俊介、三木健嗣、木村剛、山中伸弥、吉田善紀: Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes 第 14 回日本再生医療学会総会 2015/3/19-21
- 15) 大久保周子、舟越俊介、野村真樹、三木健嗣、高木正、岡田千尋、中村正裕、山中伸弥、渡辺亮、吉田善紀: iPSC 細胞から心筋細胞分化誘導におけるシングルセル遺伝子解析第 14 回日本再生医療学会総会 2015/3/19-21
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得
    - 1) 骨髄異形成症候群等の治療/予防薬のスクリーニング方法  
発明者：山中伸弥/吉田善紀/蝶名林和久  
権利者：国立大学法人京都大学  
特許出願番号：特願2013-109385  
出願年月日：2013/5/23
    - 2) 新規成熟心筋マーカー  
発明者：吉田善紀/舟越俊介  
権利者：国立大学法人京都大学  
特許出願番号：特願 2014-262906  
出願年月日：2014/12/25
  2. 実用新案登録  
該当なし
  3. その他  
該当なし