

201442059A

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患克服研究事業

脊髄性筋萎縮症患者細胞により新たに同定した
薬剤候補による iPS 細胞を用いた
非臨床試験及び薬剤臨床治験準備研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

研究代表者 船 戸 道 徳

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の難治性疾患克服研究事業による委託業務として、国立病院機構長良医療センター（船戸道徳）が実施した平成26年度「脊髄性筋萎縮症患者細胞により新たに同定した薬剤候補によるiPS細胞を用いた非臨床試験及び薬剤臨床治験準備研究」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）

脊髄性筋萎縮症患者細胞により新たに同定した薬剤候補による iPS 細胞を用いた非臨床試験及び薬剤臨床治験準備研究	1
船戸道徳（国立病院機構長良医療センター再生医療研究室）	

II. 委託業務成果報告（分担）

1. 各種遺伝子異常を有する脊髄性筋萎縮症患者からの iPS 細胞の樹立	5
金子英雄（国立病院機構長良医療センター臨床研究部）	
2. 脊髄性筋萎縮症に対する甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン 類似薬の薬効解析	9
大内一輝（岐阜薬科大学 / 国立病院機構長良医療センター）	
3. SMA-iPS 細胞由来運動神経細胞に対する開発候補薬剤 E の 神経保護作用の解析	13
安藤 栞（岐阜薬科大学 / 国立病院機構長良医療センター）	
4. iPS 細胞技術を用いた高効率な骨格筋細胞への分化誘導法の確立	15
亀山 翼（岐阜薬科大学 / 国立病院機構長良医療センター）	
5. 脊髄性筋萎縮症モデルマウスを用いた非臨床試験の構築	17
原 英彰（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）	
6. 脊髄性筋萎縮症に対する甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン 類似薬の治療効果に関する臨床研究	19
船戸道徳（国立病院機構長良医療センター再生医療研究室）	
7. 脊髄性筋萎縮症における TRH 療法 :3 次元運動解析による 臨床評価法の検討	23
加藤善一郎（岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科構造医学）	

8. 脊髄性筋萎縮症に対するバルプロ酸投与の評価に関する研究	25
齊藤利雄（国立病院機構刀根山病院神経内科・小児神経内科）	
（資料）SMA に対する VPA 投与の報告	
9. 希少疾病用医薬品開発における承認申請に提出された 臨床試験のデータパッケージに関する研究	29
半田宣弘（医薬品医療機器総合機構）	
（資料）希少疾病用医薬品の臨床試験一覧	
 Ⅲ. 学会等発表実績	 37
 Ⅳ. 研究成果の刊行物・別冊	 41

I. 委託業務成果報告（総括）

脊髄性筋萎縮症患者細胞により新たに同定した薬剤候補によるiPS細胞を用いた
非臨床試験及び薬剤臨床治験準備研究

研究代表者 船戸道徳 国立病院機構長良医療センター再生医療研究室 室長

研究要旨

脊髄性筋萎縮症（Spinal Muscular Atrophy, SMA）は、難病の患者に対する医療等に関する法律に規定される指定難病である。非臨床試験や医師主導治験を進めることなどによって、SMAのさらなる病態の解明並びに新たな治療戦略を確立する必要がある。

本研究班では、これまでに以下のことを中心に研究を進めた。

- ①SMA患者のiPS細胞を樹立した。
- ②SMA患者のiPS細胞を用いた試験管内疾患モデルを構築した。
- ③SMAにおけるTRHの薬剤効果を確認した。
- ④SMAにおける開発候補薬剤Eの薬剤効果を確認した。
- ⑤開発候補薬剤XのSMAに対する薬効を確認した。
- ⑥iPS細胞の高効率な骨格筋細胞への分化誘導法を確立中である。
- ⑦SMAモデルマウスを用いた*in vivo*試験の実験系を構築した。
- ⑧遺伝的背景の異なる複数の患者iPS細胞を用いたテーラーメイド医療の基盤研究を開始した。
- ⑨真のアウトカムメジャーとなる臨床機能評価法を確立した。
- ⑩適応拡大に向けて臨床試験プロトコール（SMA-TRH）を作成した。

共同研究者

原英彰（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）
齊藤利雄（国立病院機構刀根山病院神経内科）
半田宣弘（医薬品医療機器総合機構レギュラトリーサイエンス部）
加藤善一郎（岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科）
金子英雄（国立病院機構長良医療センター臨床研究部）
西尾久英（神戸大学大学院医学研究科地域社会医学・健康科学講座）
粟屋智就（京都大学医学部附属病院小児科）
嶋澤雅光（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）
長原悠樹（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）
大内一輝（岐阜薬科大学薬効解析学研究室/国立病院機構長良医療センター臨床研究部）
亀山翼（岐阜薬科大学薬効解析学研究室/国立病院機構長良医療センター臨床研究部）
安藤栞（岐阜薬科大学薬効解析学研究室/国立病院機構長良医療センター臨床研究部）
服部良（岐阜大学医学部附属病院リハビリテーション部）
松丸直樹（岐阜大学医学部附属病院先端医療・臨床

研究推進センター）

内田靖（国立病院機構長良医療センター小児科）
舘林宏治（国立病院機構長良医療センター小児科）
森田秀行（国立病院機構長良医療センター小児科）
木村豪（国立病院機構長良医療センター小児科）
下川祐子（国立病院機構長良医療センター小児科）
宮崎久美子（国立病院機構長良医療センター小児科）
丸田香奈子（国立病院機構長良医療センター小児科）
玉井裕也（国立病院機構長良医療センター臨床研究部）
後藤良彰（国立病院機構長良医療センター薬剤科）
伊藤洋貴（国立病院機構長良医療センター薬剤科）
藤澤智子（国立病院機構長良医療センター治験管理室）
荒川幸子（国立病院機構長良医療センターリハビリテーション科）
鬼頭良輔（国立病院機構長良医療センターリハビリテーション科）
小川陽子（国立病院機構長良医療センターリハビリテーション科）
横山茂（国立病院機構長良医療センター臨床検査

科)

松井彩（国立病院機構長良医療センター臨床検査科）

梅田和則（国立病院機構長良医療センター臨床検査科）

関順子（国立病院機構長良医療センター臨床研究部）

川瀬千鶴（国立病院機構長良医療センター臨床研究部）

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症（Spinal Muscular Atrophy, SMA）は、脊髄の運動神経細胞（脊髄前角細胞）の変性による筋萎縮と進行性の筋力低下を主徴とする難治性疾患である。

① 推定患者数 1000 人前後の希少疾患である。

② *SMN1*（Survival Motor Neuron 1）遺伝子の欠失が主たる原因と判明しているが、*SMN* 蛋白の神経細胞における機能については未解明な部分がある。

③ *SMA* の臨床試験としてバルプロ酸ナトリウムなどが試されているが、臨床試験において必ずしも明らかな臨床効果が示されず、有効な治療薬の開発までには至っていない。

このため、さらなる病因・病態の解明を通して、さらに多くの薬剤候補について研究を進めることが必須である。

一方で、臨床試験の際に、真のアウトカムメジャーとなる臨床評価法が確立していないことも問題となっている。

そこで本研究では、

① *SMA* 患者由来細胞にて新たに同定した開発候補薬剤 *X* 及び関連薬剤（Thyrotropin releasing hormone, *TRH*）等について、すでに樹立した患者 *iPS* 細胞由来の神経細胞を用いて、*SMN* 蛋白の回復や機能回復を直接確認し、*SMA* の新たな治療戦略を確立すること

② その開発候補薬剤 *X* 等を臨床試験で評価する際の真のアウトカムメジャーとなる臨床評価法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

（１）患者 *iPS* 細胞由来の神経系細胞における新規開発候補薬剤の効果の確認

1. 患者 *iPS* 細胞を用いた試験管内での病態の再現

SMA III 型患者の線維芽細胞からエピゾーマルベクターによりリプログラミング因子を導入し、患者 *iPS* 細胞を樹立する。そして、既報の無血清凝集浮

遊培養法による分化誘導法を用いて、運動神経細胞及び神経膠細胞を試験管内で作製し、*SMA* の試験管内疾患モデルを構築する。

2. 新規のシーズ（開発候補薬剤 *X*）の試験管内での薬剤効果の確認

これまでの薬物スクリーニングにより見出した *SMN* 蛋白の発現を上昇する新規のシーズ（開発候補薬剤 *X*）を患者 *iPS* 細胞由来の神経系細胞に添加して、薬剤効果を確認する。

薬物の効果の評価としては、以下を指標とする。

① *SMN* 蛋白の発現量及び *SMN* 遺伝子の発現量

② *iPS* 細胞を神経系細胞に分化誘導する際に認められる運動神経細胞の神経突起の伸長

③ 誘導される運動神経細胞と神経膠細胞の数のバランス

さらに、最適な濃度の評価やこれまでの *SMA* に対する治験で評価されてきた薬物（バルプロ酸ナトリウムなど）との相違や相加相乗効果も検討する。

3. 遺伝的背景の異なる複数の患者 *iPS* 細胞を用いたテーラーメイド医療の確立

遺伝子異常の判明していない *SMA* 患者や *NAIP* 遺伝子異常患者由来の *iPS* 細胞を用いても薬剤効果があるかどうか調べる。

（２）*SMA* モデルマウスを用いた *in vivo* 試験

上記、試験管内のアッセイで判明した最も効果的な薬物条件を用いて、モデルマウスの体内での薬剤効果を確認する。本研究はこれまでに多数の卓越したマウス実験を行ってきた岐阜薬科大学で行う。*SMA* モデルマウスが出生後、まず尾からゲノム DNA を抽出し遺伝子系を確認する。その後、開発候補薬剤 *X* を投与する。通常、本マウスは治療なしでは平均 13.5 日で死亡するが、本治療による延命効果・運動機能改善などを評価する。

（３）試験参加可能な患者群についての臨床評価

これまでの臨床試験にて行われている運動機能評価スケール Modified Hammersmith Functional Motor Scale for Children with Spinal Muscular Atrophy（MHFMS-*SMA*, 2012）や他の運動機能解析、呼吸機能検査、末梢血白血球を用いた RT-PCR 法による *SMN* 遺伝子の発現量等の評価方法をさらに検討し、研究期間内に最適化を行うとともに、特に、申請者らが開発してきた 3 次元運動解析法を使用するシステムを確立する。

（倫理面への配慮）

本研究における患者 *iPS* 細胞樹立や病態の解析に関しては、国立病院機構長良医療センターの倫理審査委員会（ヒト遺伝子解析研究を含む）の審査を

受け、承認を得て行う。樹立したヒト幹細胞の取り扱いに関しては、厚生労働省からの「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の改正」に従って、研究を施行する。また、患者の遺伝子診断に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省・経済産業省）等の規定に基づいて行う。

研究対象者（患者本人やその家族）には、説明文及び同意文書を用いて、本研究の目的・方法・利益・不利益について直接説明し、同意書にて同意を得る。また、研究に参加する患者及び家族に対しては、本人だけでなく家族の人権も同等に擁護し、個人情報 は厳重に保護され、連結可能匿名化にて研究を行う。

動物実験に関しては、岐阜薬科大学動物舎運営委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた後、厚生労働省からの「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」及び岐阜薬科大学動物舎運営委員会の定める倫理規定に従って、研究を遂行する。

C. 研究結果

（１）非臨床試験等

1. 患者iPS細胞の樹立

SMAIII 型患者（診断時 3 歳の女兒、主訴は歩行障害、*SMN* 遺伝子のエクソン 7,8 の欠失あり）から同意の下に皮膚線維芽細胞を作製し、さらにその皮膚線維芽細胞にエピゾーマルベクターによる初期化誘導 6 因子の遺伝子導入を行い、iPS 細胞株を樹立した（金子ら）。

2. SMA患者のiPS細胞を用いた試験管内疾患モデルの構築

患者iPS細胞を神経系細胞に分化誘導することにより試験管内で以下の病態を再現した（大内ら）。

- (1) SMN蛋白の低下
- (2) 神経突起の伸長低下
- (3) 神経膠細胞の活性化
- (4) 脊髄運動神経細胞のアポトーシス増加
- (5) 脊髄運動神経細胞数の減少

3. SMAにおけるTRHの薬剤効果の確認

SMA患者のiPS細胞を用いた試験管内疾患モデルにTRHを添加することによって、SMN蛋白の発現上昇及び神経突起の伸長効果を確認した（大内ら）。

また、TRHの作用メカニズムとしては、*SMN2* 遺伝子の転写活性化及びGlycogen Synthase Kinase-3β（GSK-3β）の機能を抑制することによるSMN蛋白の安定化が示唆された（大内ら）。

4. SMAにおける開発候補薬剤Eの薬剤効果の確認 SMA患者のiPS細胞由来の神経細胞に開発候補薬

剤Eを添加することなどによって、SMN蛋白の上昇やアポトーシスの抑制効果、神経突起の伸長効果を確認した（安藤ら）。

5. 開発候補薬剤XのSMAに対する薬効の確認

TRHや開発候補薬剤Eの薬剤効果を確認したSMAの試験管内疾患モデルを用いて、開発候補薬剤Xの効果を確認した。

6. iPS細胞の高効率な骨格筋細胞への分化誘導法の確立

iPS細胞から高効率な骨格筋細胞を作製する分化誘導法の確立に向けて、まずはiPS細胞から沿軸中胚葉への分化誘導を促進する成長因子のスクリーニングを行った。結果、Bisindolylmaleimide Iの添加により沿軸中胚葉への誘導効率が上昇することを見出した（亀山ら）。

7. SMAモデルマウスを用いた*in vivo*試験の実験系の構築

SMAモデルマウスを作製するためのmouse *Smn* ヘテロ欠損マウス (*mSmn*^{+/−}*SMN2*^{+/+}*SMNΔ7*^{+/+}) の施設内申請手続きが完了した。今後、実験に必要なSMAモデルマウス (*mSmn*^{+/−}*SMN2*^{+/+}*SMNΔ7*^{+/+}) を得るため、*mSmn*ヘテロ欠損マウスの交配を行う予定である（原ら）。

8. 遺伝的背景の異なる複数の患者iPS細胞を用いたテラーメイド医療の基盤研究

遺伝的背景の異なる患者間では、その表現型や背景にひそむ病態は大きく異なり、病態特性に応じたテラーメイドの治療を必要とする場合が少なくない。複数のSMA患者からのiPS細胞を樹立し、テラーメイド医療に向けた解析の準備を開始した（金子ら）。

（２）臨床試験へ向けた準備研究等

1. 真のアウトカムメジャーとなる臨床評価法の確立

臨床試験に不可欠な真の臨床機能評価法（3次元運動解析法）を見出した（加藤ら）。

2. 臨床試験プロトコル（SMA-TRH）の作成

関連薬剤（TRH）において、臨床試験プロトコルを作成した（船戸ら）。その後、齊藤らのバルプロ酸投与の既報告の分析並びに半田らの希少疾患に対する薬剤開発戦略等によって改良を行った。

D. 考察

これまでに世界各地で線維芽細胞や SMA モデルマウスを用いて本疾患に対する薬物治療や遺伝子治療の開発が行われてきたが（Nurputra DK et al. *Ann Hum Genet.* 2013）、実際の患者への投与で効果が認められた薬物は少ない。本研究は本邦発の革新

的技術であるヒト iPS 細胞技術を主たるツールとして SMA に対して多くの薬剤を開発することに特色がある。特に、本研究の成果は広く開発の遅れている神経系難治性疾患の治療適応拡大に繋がる可能性もある。

これまでに、

- (1) SMA の患者登録から臨床試験への効率化
- (2) 新規運動機能評価指標の確立
- (3) SMA モデルマウス実験系の構築
- (4) 新規開発候補薬の開発
- (5) SMA のテーラーメイド医療の構築

について研究を進めてきた。今後さらにこれらの研究を綿密に進めていくとともに、臨床試験での効果判定が簡便かつ正確に測定可能な新規のバイオマーカーの確立も目指したいと考えている。最終的には、現在開発中の複数の薬剤の適応拡大並びにテーラーメイドの治療法の確立を行う。

E. 結論

- ① SMA 患者の iPS 細胞を樹立した。
- ② SMA 患者の iPS 細胞を用いた試験管内疾患モデルを構築した。
- ③ SMA における TRH の薬剤効果を確認した。
- ④ SMA における開発候補薬剤 E の薬剤効果を確認した。
- ⑤ 開発候補薬剤 X の SMA に対する薬効を確認した。
- ⑥ iPS 細胞の高効率な骨格筋細胞への分化誘導法を確立中である。
- ⑦ SMA モデルマウスを用いた *in vivo* 試験の実験系を構築した。
- ⑧ 遺伝的背景の異なる複数の患者 iPS 細胞を用いたテーラーメイド医療の基盤研究を開始した。
- ⑨ 真のアウトカムメジャーとなる臨床機能評価法を確立した。
- ⑩ 適応拡大に向けて臨床試験プロトコール (SMA-TRH) を作成した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Toyoda T, Mae SI, Tanaka H, Kondo Y, Funato M, Hosokawa Y, Sudo T, Kawaguchi Y, Osafune K. Cell aggregation optimizes the differentiation of human ESCs and iPSCs into pancreatic bud-like progenitor cells. Stem Cell Res. 2015 14:185-197.

2. Gotoh S, Ito I, Nagasaki T, Yamamoto Y, Konishi S, Korogi Y, Matsumoto H, Muro S, Hirai T, Funato M, Mae S, Toyoda T, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Osafune K, Mishima M. Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. Stem Cell Reports. 2014 3:394-403.

2. 学会発表

1. 船戸道徳、大内一輝、関順子、丸田香奈子、宮崎久美子、下川祐子、森田秀行、舘林宏治、内田靖、加藤善一郎、嶋澤雅光、原英彰、金子英雄 患者由来 iPS 細胞を用いた脊髄性筋萎縮症の新規治療薬の探索 第 50 回中部日本小児科学会 信州 2014.8.10

H. 知的所有権の出願・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

Ⅱ. 委託業務成果報告（分担）

各種遺伝子異常を有する脊髄性筋萎縮症患者からのiPS細胞の樹立

研究分担者 金子英雄 国立病院機構長良医療センター臨床研究部 部長

研究要旨

脊髄性筋萎縮症（Spinal Muscular Atrophy, SMA）においても遺伝的背景の異なる患者間では、その表現型や背景にひそむ病態は大きく異なり、病態特性に応じたテララーメイドの治療を必要とする場合が少なくない。本研究では遺伝的背景の異なる複数の患者からiPS細胞を樹立し、将来的には、そのiPS細胞由来の神経細胞を同時に解析し、比較検討することでテララーメイド医療へのさらなる道筋を提示することを目的とする。

これまでに、国立病院機構長良医療センターの倫理審査委員会にて承認された研究計画に基づき、SMAIII型患者（SMN遺伝子のエクソン7,8の欠失あり）からiPS細胞を樹立した。また、SMAI型患者（SMN遺伝子のエクソン7,8及びNAIP遺伝子のエクソン5,6の欠失なし）から線維芽細胞を作製した。今後さらに、遺伝的背景の異なる複数の患者からiPS細胞を樹立し、テララーメイド医療に向けた解析を進めたいと考えている。

共同研究者

船戸道徳（国立病院機構長良医療センター小児科）
森田秀行（国立病院機構長良医療センター小児科）
内田靖（国立病院機構長良医療センター小児科）
館林宏治（国立病院機構長良医療センター小児科）
木村豪（国立病院機構長良医療センター小児科）
下川祐子（国立病院機構長良医療センター小児科）
宮崎久美子（国立病院機構長良医療センター小児科）
丸田香奈子（国立病院機構長良医療センター小児科）
関順子（国立病院機構長良医療センター臨床研究部）
川瀬千鶴（国立病院機構長良医療センター臨床研究部）

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症（Spinal Muscular Atrophy, SMA）のような希少疾患においても背景にひそむ病態は多種多様である。特に、遺伝的背景の異なる患者間ではその差が大きく、病態特性に応じたテララーメイドの治療を必要とする場合が少なくない。本研究では遺伝的背景の異なる複数の患者からiPS細胞を樹立することを第一の目的とする。将来的には、そのiPS細胞由来の神経細胞を同時に解析し、比較検討することでテララーメイド医療へのさらなる道筋を提示することを目的とする。

B. 研究方法

SMA患者由来のiPS細胞の樹立

SMA患者から、末梢血リンパ球の採取、または、皮膚線維芽細胞を作製する。その後、既報（Okita et al. 2011）に準じて、エピゾーマルベクターによる初期化誘導6因子（*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *LIN28*, *p53shRNA*）の遺伝子導入にてiPS細胞株の樹立を行う。

さらに、樹立したiPS細胞株の中から、PCR法によりエピゾーマルベクターの染色体への組み込みを否定したクローンを選別する。その後、免疫染色法にてヒトES細胞と同様の未分化マーカーの発現や胚様体形成による多分化能の確認を行う。奇形腫形成による多分化能の確認については、作製したiPS細胞を免疫不全マウスの精巣上体に移植することにより確認する。核型解析は日本遺伝子研究所で行う。

（倫理面への配慮）

本研究は、国立病院機構長良医療センターの倫理審査委員会（ヒト遺伝子解析研究を含む）にて承認された研究計画に基づき行われる。研究対象者には、患者本人と代諾者へ説明文及び同意文書を用いて、本研究の目的・方法・利益・不利益について直接説明し、同意書にて同意を得る。患者本人が16歳以下である場合は、代諾者からも同意書を取得する。また、研究に参加する患者に対しては、個人の権利を擁護し、個人情報厳重に保護され、連結可能匿

名化にて研究を行う。

樹立したヒト幹細胞の取り扱いに関しては、厚生労働省からの「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の改正」に従って、研究を施行する。また、患者の遺伝子診断に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省・経済産業省）等の規定に基づいて行う。

C. 研究結果

SMA患者由来のiPS細胞の樹立

SMAIII型患者（診断時3歳の女兒、主訴は歩行障害、*SMN* 遺伝子のエクソン7,8の欠失あり）から同意の下に皮膚線維芽細胞を作製し、さらにその皮膚線維芽細胞にエピゾーマルベクターによる初期化誘導6因子の遺伝子導入を行い、iPS細胞株を樹立した。

次に、樹立したiPS細胞株において、エピゾーマルベクターが染色体へ組み込まれていないかどうかをPCR法で確認した。ゲノムインテグレーションが否定されたクローンについては、核型解析を行い、正常核型であることを確認した。さらに免疫染色法を用いて、ヒトES細胞と同様の未分化マーカーの発現を確認した。*OCT3/4*、*SOX2*、*NANOG*、*SSEA4*、*TRA1-60*、*TRA1-81*の発現が確認され、マウスES細胞の未分化マーカーである*SSEA1*の発現がないことを確認した。また、染色キットを用いて、アルカリフォスファターゼ（ALP）染色が陽性であることも確認した。

胚様体形成による多分化能の確認では、免疫染色法で樹立したiPS細胞の三胚葉への分化能を確認

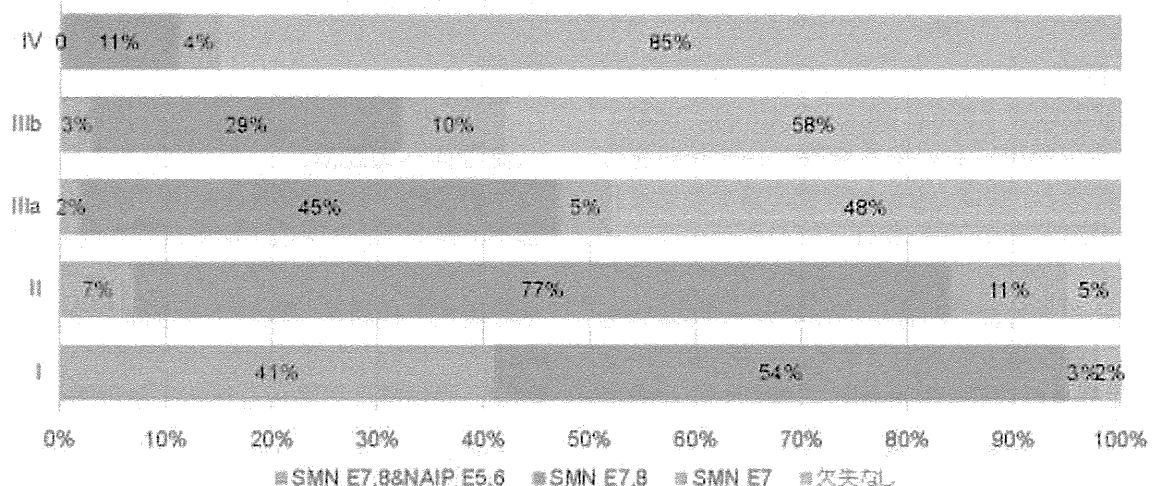
した。今後、奇形腫形成による *in vivo* での多分化能の確認を行う予定である。

次に、当院受診中のSMA患者から同意の下に皮膚線維芽細胞を作製した。患者は在胎38週0日、体重2440gで出生した。出生後から筋力低下と呼吸障害を認め、生後9ヶ月から人工呼吸器管理を行っている。*SMN* 遺伝子エクソン7,8及び*NAIP* 遺伝子エクソン5,6に欠失はなく、筋生検を施行したところ、*Small-large group atrophy* が著明な所見を認めた。さらに、今回、作製した線維芽細胞において、*SMN* 蛋白の蛍光免疫染色を行ったところ、*SMN* 蛋白の発現低下を認めた。今後、*SMN* 遺伝子のシーケンス解析による確定診断並びにエピゾーマルベクターによる初期化誘導6因子（*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、*L-MYC*、*LIN28*、*p53shRNA*）の遺伝子導入にてiPS細胞株の樹立を行う予定である。

D. 考察

SMA患者は大きく、1) *SMN* 遺伝子のエクソン7,8及び*NAIP* 遺伝子のエクソン5,6の欠失、2) *SMN* 遺伝子のエクソン7,8のみの欠失、3) *SMN* 遺伝子のエクソン7のみの欠失、4) *SMN* 遺伝子のエクソン7,8及び*NAIP* 遺伝子のエクソン5,6の欠失なしの4つのグループに分けられる（脊髄性筋萎縮症診療マニュアル．SMA診療マニュアル編集委員会編）。今回、SMAIII型で*SMN* 遺伝子のエクソン7,8のみの欠失の患者及びSMAI型で*SMN* 遺伝子のエクソン7,8及び*NAIP* 遺伝子のエクソン5,6の欠失なしの患者から線維芽細胞を作製した。さらに、これまでにSMAIII型の患者においてはiPS細胞の樹立に成功した。

表 脊髄性筋萎縮症の遺伝背景の割合



今後、上記SMAI型の患者由来のiPS細胞を樹立するとともに、他の遺伝子型のSMA患者由来のiPS細胞の樹立を行いたいと考えている。また、最近ではSMN2遺伝子のコピー数の違いによる重症度の違いも知られており、その点に注目した複数の患者iPS細胞の樹立も試みる必要があると考えている。

研究の効率性からは、これまでに他施設で樹立されたSMA患者由来のiPS細胞を共同研究契約等により供与いただく手続きなども行いたいと考える。

E. 結論

- ①SMAIII型患者（SMN遺伝子のエクソン7,8の欠失あり）からのiPS細胞の樹立に成功した。
- ②SMAI型患者（SMN遺伝子のエクソン7,8及びNAIP遺伝子のエクソン5,6の欠失なし）から線維芽細胞を作製した。
- ③遺伝的背景の異なる複数の患者からのiPS細胞を樹立し、さらなる解析に向けた準備を進めている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的所有権の出願・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

脊髄性筋萎縮症に対する甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン類似薬の薬効解析

研究協力者 大内一輝 岐阜薬科大学薬効解析学研究室 大学院生
国立病院機構長良医療センター臨床研究部 研究員

研究要旨

脊髄性筋萎縮症（Spinal Muscular Atrophy, SMA）は、脊髄の運動神経細胞の変性による筋萎縮と進行性の筋力低下を主徴とする遺伝病である。現在までのところ、有効な治療法は開発されていない。そこで SMA 疾患特異的 iPS 細胞（SMA-iPS 細胞）モデルを構築し、新規の薬剤開発を行っているが、今回、以前から臨床試験で効果を確認してきた甲状腺ホルモン放出ホルモン類似薬（Thyrotropin-Releasing Hormone analog, TRH）の薬効解析を行ったので報告する。SMA-iPS 細胞から分化誘導した脊髄運動神経細胞に TRH を添加することで、SMN（Survival Motor Neuron）蛋白及び mRNA レベルの発現量の変化、軸索伸長作用などを解析した。SMA-iPS 細胞由来脊髄運動神経細胞は、TRH の添加により、SMN2 遺伝子の転写活性化及び SMN 蛋白の発現上昇を認めた。さらに、TRH は SMA-iPS 細胞由来の脊髄運動神経において神経突起の伸長作用も示した。今後、本モデルを用いてさらなる SMA の新規治療薬の開発・解析を進めていく予定である。

共同研究者

船戸道徳（国立病院機構長良医療センター再生医療研究室）
加藤善一郎（岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科）
関順子（国立病院機構長良医療センター臨床研究部）
川瀬千尋（国立病院機構長良医療センター臨床研究部）
安藤栞（岐阜薬科大学薬効解析学研究室/国立病院機構長良医療センター臨床研究部）
亀山翼（岐阜薬科大学薬効解析学研究室/国立病院機構長良医療センター臨床研究部）
小野陽子（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）
長原悠樹（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）
野田泰裕（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）
鶴間一寛（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）
嶋澤雅光（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）
原英彰（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）
金子英雄（国立病院機構長良医療センター臨床研究部）

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症（Spinal Muscular Atrophy, SMA）は、脊髄の運動神経細胞（脊髄前角細胞）の変性による筋萎縮と進行性の筋力低下を主徴とする難治

性疾患である。以下に対象疾患の特徴をまとめた。①推定患者数 1000 人前後の希少疾患である。②主な原因は *SMN1*（Survival Motor Neuron 1）遺伝子のエクソン 7、8 の欠失と判明しているが、そこから合成される SMN 蛋白の神経細胞における機能については未解明のままである。③現在までに世界各地で第 2 相までの臨床試験が行われ、治療薬の開発が継続して行われてきたが、有効な治療薬の開発までには至っていない。④本患者は人工呼吸器がない状態では多くの場合 2 歳までに死亡し、医療的対症療法を行ったとしても、長期に日常生活の多くの活動が困難な状態のままである。

このため、さらなる病因・病態の解明を通して、画期的な治療薬を開発することが必要である。そこで、本研究では、SMA 患者の疾患特異的 iPS 細胞（SMA-iPS 細胞）モデルを用いて以前から臨床試験で効果を確認してきた甲状腺ホルモン放出ホルモン類似薬（Thyrotropin-Releasing Hormone analog, TRH）の薬効解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

（1）SMA-iPS 細胞の未分化能・多分化能の確認

SMA 患者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞株を作製し、染色体異常の有無（核型解析）、*SMN1* 遺伝子の欠損（RT-PCR 法）、iPS 細胞の未分化性（免疫染色法）及び多能性（免疫染色法）を確認する。

（２）iPS細胞からの運動神経細胞の作製

・正常な運動神経発生を模倣した既報の分化誘導法を改良し、健常人から樹立されているiPS細胞株が神経幹細胞及び脊髄運動神経細胞に分化しているかを運動神経細胞特異的なマーカー（CHAT、HB9、SMI-32）を用いて免疫染色法で確認する。

・運動神経細胞特異的な遺伝子（*PAX6*、*OLIG2*、*HB9*、*CHAT*）の経時的発現をRT-PCR法で確認する。

（３）SMA-iPS細胞モデルの確立（iPS細胞から誘導した運動神経細胞を用いた病態再現）

上記の誘導法を用いて作製したSMA患者由来運動神経細胞（SMA-iPSCs-MNs）において、神経突起の伸長（免疫染色法を用いたTUJ1陽性細胞領域の定量）、神経膠細胞の活性化（免疫染色法を用いたGFAP陽性細胞領域の定量）、運動神経細胞の誘導効率（免疫染色法を用いたHB9陽性細胞領域の定量）、神経細胞死（フローサイトメトリーを用いたcleaved-caspase 3陽性細胞数）の評価を行う。

（４）TRHの薬効評価及び作用メカニズムの解析

確立したSMA-iPS細胞モデルを用いて、TRHの薬理作用を検討するために、まず、TRH処置におけるSMN蛋白の発現量変化（免疫染色、ウエスタンブロット）の解析を行う。次に、TRHの作用メカニズムの解析をするために、*Full-length SMN/Δ7-SMN*のmRNA発現量解析（q-PCR）、Glycogen Synthase Kinase-3β（GSK-3β）のリン酸化レベルでの発現解析（ウエスタンブロット）を行う。最終的には、TRH処置におけるSMA-iPSCs-MNsの神経突起の伸長を、免疫染色法を用いて解析する。

（倫理面への配慮）

本研究は、国立病院機構長良医療センターの倫理審査委員会（ヒト遺伝子解析研究を含む）にて承認された研究計画に基づき行われる。研究対象者には、患者本人と代諾者へ説明文及び同意文書を用いて、本研究の目的・方法・利益・不利益について直接説明し、同意書にて同意を得る。患者本人が16歳以下である場合は、代諾者からも同意書を取得する。また、研究に参加する患者に対しては、個人の人權を擁護し、個人情報厳重に保護され、連結可能匿名化にて研究を行う。

樹立したヒト幹細胞の取り扱いに関しては、厚生労働省からの「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の改正」に従って、研究を施行する。また、患者の遺伝子診断に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省・経済産業省）等の規定に基づいて行う。

C. 研究結果

（１）SMA-iPS細胞の未分化能・多分化能の確認

作製したSMA-iPS細胞に染色体異常は確認されなかった。また、*SMN1*遺伝子に欠損がみられた。作製したSMA-iPS細胞の未分化性及び多分化能を有することは、未分化マーカー（ALP、OCT3/4、NANOG、SOX2、SSEA1、SSEA4、TRA-1-60、TRA1-81）及び多分化能マーカー（外胚葉: TUJ1、中胚葉: VIMENTIN、内胚葉: SOX17）を用いた免疫染色法で確認した。

（２）iPS細胞からの運動神経細胞の作製

神経幹細胞及び運動ニューロンに正常に分化していることを免疫染色法及びRT-PCR法を用いて確認した。

（３）SMA-iPS細胞モデルの確立（iPS細胞から誘導した運動神経細胞を用いた病態再現）

SMA-iPS細胞から作製した運動神経細胞は健常人コントロールに比べて、以下の特徴を示した。

- （１）明らかに神経突起の伸長が短い
- （２）神経膠細胞の活性化が起きている
- （３）運動神経細胞の誘導効率が悪い
- （４）神経細胞死が起きている

以上から、本患者のSMA病態を試験管内で再現することに成功した。

（４）TRHの薬効評価及び作用メカニズムの解析

まず、最初にTRHの受容体（TRH receptor, TRHR1）が、SMA-iPSCs-MNsに発現していることを確認した。次に、SMA病態においてSMN蛋白の発現レベルは低下していたが、TRH処置によって上昇することを免疫染色法及びウエスタンブロットにて確認した。さらに、mRNAレベルでは、TRH処置によってSMA病態において発現が低下している*Full-length SMN*遺伝子の発現が上昇していることを見出した。これらのことから、TRHは少なくとも*SMN2*遺伝子の転写活性の上昇により、SMN蛋白の発現の上昇を示すことを見出した。また、TRHはGSK-3βのリン酸化を促進し、SMN蛋白の安定化にも寄与していることを見出した。

最後に、SMA病態において短くなっていた神経突起がTRH処置によって有意に伸長することを確認した。

D. 考察

本研究において、我々は以前からSMA患者に対して臨床試験で効果を確認してきたTRHの効果はSMA-iPS細胞モデルを用いて検討した。SMA病態において低下しているSMN蛋白の発現レベルがTRH処置によって回復した。このTRHの作用メカニ

ズムを解析するために、遺伝子の転写活性化及び SMN 蛋白の安定化の 2 つの側面から解析を行った。前者においては、本来 SMN2 遺伝子から 10% が Full-length SMN、90% が $\Delta 7$ -SMN の転写が行われているが、今回、SMN2 遺伝子の転写産物である Full-length SMN の有意な転写活性化が認められた。今後、種々の転写補助因子の発現量解析等の追加検討によって、さらなるメカニズムの解明に向けた研究を行いたいと考える。さらに、後者においては、GSK-3 β が SMN 蛋白の分解機構に関与するという報告がなされている（Makhortova NR et al. Nat Chem Biol. 2011）。また、アルツハイマー病態においては、TRH が GSK-3 β のリン酸化を介して tau のリン酸化を抑制するという報告がある（Luo L et al. J Alzheimers Dis. 2004）。このような報告をうけて、我々は TRH が SMA 病態において、SMN の安定化に関与するのではないかという仮説をたて、検討を行った。結果、TRH は GSK-3 β のリン酸化レベルを上昇させ、GSK-3 β の機能を抑制することによって SMN 蛋白の安定化を促すことが示唆された。すなわち、TRH は脊髄運動神経において、SMN2 遺伝子の転写活性化及び SMN 蛋白の安定化を介して神経突起伸長を促進することが示唆された。

E. 結論

- ①薬物評価に有用な SMA-iPS 細胞モデルを開発した。
- ②TRH は上記モデルに対して SMA 病態を改善し、新規治療薬になりうることを示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 大内一輝、船戸道德、小野陽子、長原悠樹、鶴間一寛、嶋澤雅光、金子英雄、原英彰 患者由来 iPS 細胞を用いた脊髄性筋萎縮症の新規治療薬の探索 日本薬学会第 134 年会 熊本 2014.3.27-30
2. 大内一輝、船戸道德、加藤善一郎、嶋澤雅光、金子英雄、原英彰 患者由来 iPS 細胞を用いた脊髄性筋萎縮症の新規治療薬の探索 第 126 回日本薬理学会近畿部会 和歌山 2014.10.24
3. 大内一輝、船戸道德、加藤善一郎、嶋澤雅光、

金子英雄、原英彰 脊髄性筋萎縮症の疾患特異的 iPS 細胞モデルを用いた TRH の薬効解析 第 14 回日本再生医療学会 横浜 2015.3.19

4. Kato Z., Matsumaru N., Hattori R., Shimizu N., Shii Y., Ohnishi H., Kimura T., Kawamoto N., Fukao T., Kato T., Aoki T., Miyamoto K., Akiyama H., Ohuchi K., Hara H., Funato M. Thyrotropine releasing hormone therapy on SMA: iPS cell evaluation and 3D-motion-capture. 第 57 回日本小児神経学会学術集会 大阪 2015.5.28-30
5. Funato M., Ohuchi K., Kato Z., Kameyama T., Ando S., Shimazawa M., Hara H., Kaneko H. Establishment and application of stem cell model of spinal muscular atrophy. 第 57 回日本小児神経学会学術集会 大阪 2015.5.28-30

H. 知的所有権の出願・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

SMA-iPS 細胞由来運動神経細胞に対する開発候補薬剤 E の神経保護作用の解析

研究協力者 安藤 栞 岐阜薬科大学薬効解析学研究室 大学院生
国立病院機構長良医療センター臨床研究部 研究員

研究要旨

脊髄性筋萎縮症（Spinal Muscular Atrophy, SMA）の治療において、現在、臨床における有効な治療薬は確立されておらず、早急な治療薬の開発と確立が求められている。開発候補薬剤 E は、フリーラジカル消去作用を有する脳保護剤として開発された薬剤であり、フリーラジカル消去作用を通し、さまざまな神経変性疾患に対して有効性を示す可能性があると考えられている。そこで、本研究では開発候補薬剤 E の SMA に対する新規治療薬としての可能性を探索するため、開発候補薬剤 E の SMA 患者由来 iPS 細胞由来運動神経細胞に対する神経保護作用について検討を行った。

SMA 患者由来 iPS 細胞由来運動神経細胞において開発候補薬剤 E が SMN タンパクの発現を増加させ、またアポトーシスを抑制することで神経保護効果を示すことを明らかにした。以上から、開発候補薬剤 E が SMA の治療において有効な治療薬となりうる可能性が示唆された。

共同研究者

船戸 道德（国立病院機構長良医療センター再生医療研究室）

金子 英雄（国立病院機構長良医療センター臨床研究部）

大内 一輝（岐阜薬科大学薬効解析学研究室/国立病院機構長良医療センター臨床研究部）

亀山 翼（岐阜薬科大学薬効解析学研究室/国立病院機構長良医療センター臨床研究部）

鶴間 一寛（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）

嶋澤 雅光（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）

原 英彰（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症（Spinal Muscular Atrophy, SMA）の治療において、現在、臨床における有効な治療薬は確立されておらず、早急な治療薬の開発が求められている。開発候補薬剤 E は、フリーラジカル消去作用を有する世界初の脳保護剤として開発された薬剤であり、フリーラジカル消去作用を通し、さまざまな神経変性疾患に対して、有効性を示す可能性があると考えられている。そこで本研究では開発候補薬剤 E の SMA に対する新規治療薬としての可能性を探索するため、開発候補薬剤 E の SMA 患者由来 iPS 細胞由来運動神経細胞に対する神経保護作用について検討を行うことを目的とする。

B. 研究方法

患者由来の皮膚線維芽細胞や SMA 患者由来 iPS 細胞由来運動神経細胞を用いて、開発候補薬剤 E を添加することなどによって、その神経保護作用について評価を行う。SMA 患者由来の iPS 細胞を解析に有用な脊髄運動神経細胞へと分化誘導する方法については、正常の脊髄運動神経細胞の発生を模倣した既報の無血清凝集浮遊培養法を改良して行う。

（倫理面への配慮）

本研究は、国立病院機構長良医療センターの倫理審査委員会（ヒト遺伝子解析研究を含む）にて承認された研究計画に基づき行われる。研究に参加する患者に対しては、個人の人権を擁護し、個人情報厳重に保護され、連結可能匿名化にて研究を行う。

樹立したヒト幹細胞の取り扱いに関しては、厚生労働省からの「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の改正」に従って、研究を施行する。また、患者の遺伝子診断に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省・経済産業省）等の規定に基づいて行う。

C. 研究結果

これまでに以下のことが判明した。

（1）SMA 患者由来皮膚線維芽細胞に対し開発候

補薬剤 E を添加し、免疫染色により染色された Gems の核に対する面積率を評価項目とし検討を行った結果、濃度依存的に核内の Gems の割合は有意に増加した。

（２）SMA 患者由来 iPS 細胞由来運動神経細胞に開発候補薬剤 E を添加し、ウェスタンブロット法により SMN タンパクの発現量について評価を行った結果、開発候補薬剤 E の添加により SMN タンパクの発現量が増加する傾向が観察された。

（３）SMA 患者由来 iPS 細胞由来運動神経細胞に開発候補薬剤 E を添加し、免疫染色法により成熟神経細胞マーカーである TUJ1 陽性の軸索の面積について評価を行った結果、開発候補薬剤 E の添加により TUJ1 陽性軸索面積が有意に増加した。

（４）開発候補薬剤 E の SMA 患者由来 iPS 細胞由来運動神経細胞におけるアポトーシスに対する作用については、抗 cleaved-caspase 3 抗体を用いた免疫染色により評価を行った。結果として、開発候補薬剤 E の添加により、cleaved-caspase 3 の発現が抑制される傾向が示された。

（５）開発候補薬剤 E の添加による SMN タンパクの増加の機序について検討するため、SMN mRNA の発現量について RT-PCR 法によって評価を行った。結果として、*Full-length SMN* mRNA, *Δ7 SMN* mRNA とともに、開発候補薬剤 E の添加による発現の変化は確認されなかった。

D. 考察

今回の解析により、開発候補薬剤 E は以下の効果を示した。

- （１）SMN タンパク発現上昇効果
- （２）神経細胞死の減少
- （３）運動神経細胞突起の伸長

疾患特異的観点から考察すると、まず開発候補薬剤 E の添加により SMN タンパクが増加し、SMA 患者由来 iPS 細胞由来運動神経細胞の軸索面積が増加したことで神経保護効果が示されたと考えられる。SMN タンパクの代表的な増加機構として *SMN2* 遺伝子における転写の活性、Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) の阻害による SMN タンパクの分解抑制などが知られている。本研究において、開発候補薬剤 E は *SMN2* 遺伝子における転写の活性には関与しないことが示唆された。今後、開発候補薬剤 E がどのように SMN タンパクの発現量を増加させるのか引き続き検討を行っていく予定である。

また、開発候補薬剤 E はフリーラジカル消去作用、引き続くアポトーシス抑制作用によって、脳保

護剤としての働きだけでなく、運動神経細胞においても同様の機序で保護作用を示すと考えられている。SMA 病態では運動神経細胞におけるアポトーシスが亢進しており、本研究において開発候補薬剤 E が SMA 患者由来 iPS 細胞由来運動神経細胞のアポトーシスを抑制することが示唆された。このアポトーシス抑制作用に関しては、開発候補薬剤 E がフリーラジカル消去作用に基づき p38 及び JNK の活性化を抑制することにより、SMA 患者由来 iPS 細胞由来運動神経細胞においてアポトーシス抑制作用を示している可能性があると考えられる。今後、この点についてもさらに解析を進める予定である。

E. 結論

- ① SMA 患者由来 iPS 細胞由来運動神経細胞において開発候補薬剤 E が SMN タンパクを増加させ、またアポトーシスを抑制することで神経保護効果を示すことを明らかにした。
- ② 開発候補薬剤 E が SMA の治療において有効な治療薬となりうる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表

1. 安藤菜、大内一輝、船戸道徳、亀山翼、長原悠樹、金子英雄、嶋澤雅光、原英彰 脊髄性筋萎縮症患者由来 iPS 細胞由来脊髄運動ニューロンに対するエダラボンの神経保護作用 第 88 回日本薬理学会年会 名古屋 2015.3.18-23

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

iPS 細胞技術を用いた高効率な骨格筋細胞への分化誘導法の確立

研究協力者 亀山翼 岐阜薬科大学薬効解析学研究室 大学院生
国立病院機構長良医療センター臨床研究部 研究員

研究要旨

iPS 細胞から高効率な骨格筋細胞を作製する分化誘導法の確立に向けて、健常者由来 iPS 細胞株（201B7）を用いて骨格筋細胞の前段階の細胞である沿軸中胚葉への分化誘導法の確立を行った。既報の分化誘導法を改良し、iPS 細胞から沿軸中胚葉への分化誘導促進作用を有する成長因子のスクリーニングを行った結果、Bisindolylmaleimide I の添加により沿軸中胚葉への誘導効率が上昇することを見出した。つぎに、分化誘導促進作用を有すると考えられるこの成長因子の濃度検討等を行い、分化誘導法の最適化を行った。今後、沿軸中胚葉以降の分化誘導法の確立を行い、高効率な骨格筋細胞の分化誘導法の確立を行いたいと考えている。

共同研究者

船戸道徳（国立病院機構長良医療センター再生医療研究室）

金子英雄（国立病院機構長良医療センター臨床研究部）

鶴間一寛（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）

嶋澤雅光（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）

原英彰（岐阜薬科大学薬効解析学研究室）

A. 研究目的

現在、脊髄性筋萎縮症（Spinal Muscular Atrophy, SMA）や筋ジストロフィー等といった神経筋疾患の多くは、根本的な治療薬がない。罹患細胞を簡便かつ大量に入手出来ないことが一つの要因であるが、最近、iPS 細胞技術を用いた試験管内の病態モデルによる新規治療薬開発が話題となっている。そこで本研究では、神経筋疾患の新規治療薬探索に有用な iPS 細胞由来の骨格筋細胞を高効率に作製することを目的とする。

B. 研究方法

まず、健常者由来 iPS 細胞株（201B7）を用いて、既報の中間中胚葉への分化誘導法を改良し、iPS 細胞から沿軸中胚葉への分化誘導促進作用を有する成長因子のスクリーニングを行う。沿軸中胚葉を識別する方法として、まずは血小板由来成長因子受容体 α （Platelet-Derived Growth Factor Receptor α , PDGFR α ）に対する抗体を用いて、フローサイトメトリーにより誘導効率を検討する。つぎに、分化誘導促進作用を有すると考えられる成長因子を追加

した分化誘導法において、それぞれの成長因子の濃度及び培養日数による誘導効率の検討を行い、分化誘導法の最適化を行う。

（倫理面への配慮）

本研究は、国立病院機構長良医療センターの倫理審査委員会（ヒト遺伝子解析研究を含む）にて承認された研究計画に基づき行われる。研究対象者には、患者本人と代諾者へ説明文及び同意文書を用いて、本研究の目的・方法・利益・不利益について直接説明し、同意書にて同意を得る。患者本人が 16 歳以下である場合は、代諾者からも同意書を取得する。また、研究に参加する患者に対しては、個人の人權を擁護し、個人情報厳重に保護され、連結可能匿名化にて研究を行う。

樹立したヒト幹細胞の取り扱いに関しては、厚生労働省からの「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の改正」に従って、研究を施行する。また、患者の遺伝子診断に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省・経済産業省）等の規定に基づいて行う。

C. 研究結果

図に示すような方法によって、分化誘導促進作用を有する成長因子のスクリーニングを行った結果、プロテインキナーゼ C の阻害剤である Bisindolylmaleimide I（BISI）を添加した際に、PDGFR α 陽性細胞率が有意に上昇することを見出した。また、BISI は濃度依存的に PDGFR α 陽性細胞率を上昇させ、1 μ M から有意な上昇を示した。

培養日数検討に関しては、培養 6 日目に PDGFR α 陽性細胞率が大きく上昇し、その後は大きな変化は見られなかった。

D. 考察

これまでに報告された中間中胚葉への分化誘導法に BISI を添加することで、PDGFR α 陽性細胞率が上昇した。このことから、沿軸中胚葉への分化誘導に BISI の作用機序であるプロテインキナーゼ C の阻害作用またはグリコーゲン合成酵素キナーゼの抑制作用が関与していることが示唆された。これまでの報告によれば、BISI のプロテインキナーゼ C $\alpha/\beta/\gamma$ に対する *in vitro* における 50%阻害濃度は 10～20 nM と比較的低濃度であり、グリコーゲン合成酵素キナーゼに対する *in vitro* における 50%阻害濃度は 360 nM とプロテインキナーゼ C の阻害作用に比較して高い濃度である。この報告と今回の実験である BISI が 1 μ M から有意に PDGFR α 陽性細胞率を上昇させたという結果から BISI の分化誘導促進作用にはグリコーゲン合成酵素キナーゼが関与しているのではないかと考えられる。今後さらに、検討を重ねて、分化誘導のメカニズムの解明、沿軸中胚葉から骨格筋細胞への誘導法の確立などを進めたいと考えている。

E. 結論

①健常者由来 iPS 細胞から沿軸中胚葉への分化誘導を行う際に、BISI が有効である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 亀山翼、船戸道徳、大内一輝、嶋澤雅光、金子英雄、原英彰 iPS 細胞を用いた高効率な骨格筋細胞への分化誘導法の確立 日本薬学会第 135 年会 神戸 2015.3.25-28

H. 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

図 分化誘導促進作用を有する成長因子のスクリーニング

