

研究要旨

本研究では、OECDと共有している化学物質のリストをもとに、インビトロと動物実験による神経毒性評価を行う。分担研究の目的は、インビトロ神経毒性評価に用いるヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)を選別し、その分化能を評価することである。既に別事業で樹立した健康人ドナー由来ヒトiPS細胞を6株を対象として、遺伝子発現プロファイルと*in vitro*三胚葉分化能を検討した。OCT4、NANOG遺伝子の発現量を評価したがいずれも標準範囲であった。また、*in vitro*の三胚葉分化について、いずれの株も良好な分化能を示した。特に神経細胞の前駆細胞である外胚葉前駆細胞については、いずれも70%以上の分化能を示した。今回検討したiPS細胞株はいずれも良好な外胚葉への分化指向性を示し、本研究での神経分化実験も効率よく実施できる可能性が示された。

研究分担者

齋藤潤 京都大学 iPS細胞研究所 准教授

A. 研究目的

本研究では、OECDと共有している化学物質のリストをもとに、インビトロと動物実験による神経毒性評価を行う。分担研究の目的は、インビトロ神経毒性評価に用いるヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)を選別し、その分化能を評価することである。

B. 研究方法

既に別事業で樹立した健康人ドナー由来ヒトiPS細胞を6株を対象として、遺伝子発現プロファイルと*in vitro*三胚葉分化能を検討した。選択基準として、以下を設定した。

- 外胚葉分化能(PAX6+)が良い
- 中胚葉分化と内胚葉分化に問題がない(平均的に分化)
- 細胞増殖が平均的(doubling time: 25-30h)
- iPSコロニー形態が良い
- 分化細胞の出現が低い、もしくはほとんど存在しない

遺伝子発現については、OCT4とNANOGの発現量をqPCRで評価した。三胚葉分化能については、フローサイトメトリーで各胚葉特異的転写因子の発現量を評価した(図1)。

(倫理面の配慮)

患者の遺伝子情報の取り扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”に沿って、京都大学倫理審査委員会の審査承認を受けているが、人権及び利益の保護について、十分配慮しながら実験を行う。iPS細胞作製にあたり、“人を対象とする医学系研究に関する倫理指針”に基づいて、「ヒト疾患特異的iPS細胞の作製とそれをを用いた疾

患解析に関する研究」について、京都大学医学部倫理委員会の承認を頂いている。その内容を忠実に順守しドナーさんの同意・協力を得て行う。

C. 研究結果

OCT4、NANOG遺伝子の発現量を評価したがいずれも標準範囲であった。また、*in vitro*の三胚葉分化について、いずれの株も良好な分化能を示した。特に神経細胞の前駆細胞である外胚葉前駆細胞については、いずれも70%以上の分化能を示した(図2)。

D. 考察

今回検討したiPS細胞株はいずれも良好な外胚葉への分化指向性を示し、本研究での神経分化実験も効率よく実施できる可能性が示された。

E. 結論

既存の健康人ドナー由来iPS細胞株6株について、良好な分化能を確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Grajcarek J, Monlong J, Nishinaka-Arai Y, Nakamura M, Nagai M, Matsuo S, Loughed D, Sakurai H, Saito MK, Bourque G, Woltjen K. Genome-wide microhomologies enable precise template-free editing of biologically relevant deletion mutations. *Nat Commun.* 2019 Oct 24;10(1):4856. doi: 10.1038/s41467-019-12829-8.
2. Shiba T, Tanaka T, Ida H, Watanabe M, Nakaseko H, Osawa M, Shibata H, Izawa K, Yasumi T, Kawasaki Y, Saito MK, Takita J, Heike T, Nishikomori R. Functional evaluation of the pathological significance of MEFV variants using induced pluripotent stem cell-derived macrophages. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 Sep 13. pii: S0091-6749(19)31039-5. doi: 10.1016/j.jaci.2019.07.039. [Epub ahead of print]

- PPMID: 31542286.
3. Lin CY, Yoshida M, Li LT, Ikenaka A, Oshima S, Nakagawa K, Sakurai H, Matsui E, Nakahata T, Saito MK*. iPSC-derived functional human neuromuscular junctions model the pathophysiology of neuromuscular diseases. **JCI Insight**. 2019 Sep 19;4(18). pii: 124299. doi: 10.1172/jci.insight.124299. PubMed PMID: 31534050.
 4. Ohta R, Sugimura R, Niwa A, Saito MK*. Hemogenic Endothelium Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells in A Feeder- and Xeno-free Defined Condition. **J Vis Exp**. 2019 Jun 16;(148). doi: 10.3791/59823. PMID: 31259914
 5. Kanazawa N, Honda-Ozaki F, Saito MK. Induced pluripotent stem cells representing Nakajo-Nishimura syndrome. **Inflamm Regen**. 2019 May 23;39:11. doi: 10.1186/s41232-019-0099-8. eCollection 2019. Review.
 6. Kunitomo K, Honda-Ozaki F, Saito MK, Furukawa F, Kanazawa N. Beneficial effect of methotrexate on a child case of Nakajo-Nishimura syndrome. **J Dermatol**. 2019 May 6. doi: 10.1111/1346-8138.14907. [Epub ahead of print].
 7. Matsubara H, Niwa A, Nakahata T, Saito MK*. Induction of human pluripotent stem cell-derived natural killer cells for immunotherapy under chemically defined conditions. **Biochem Biophys Res Commun**. 2019 Apr 2. pii: S0006-291X(19)30474-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.085. [Epub ahead of print]
 8. 齋藤潤. 希少難治性疾患研究の将来展望 分子リウマチ治療. 12(1):1-3, 2019
 9. 齋藤潤. iPS 細胞を用いた自己炎症疾患の病態解明 リウマチ科. 61(5):447-452, 2019
- 2. 学会発表**
1. Megumu K. Saito : PRULIPOTENT STEM CELL DERIVED MYELOID CELL LINES FOR DISSECTING THE MECHANISM OF AUTOINFLAMMATION. . ISSAID2019 , 2019/04/01, 口頭, 国内.
 2. Megumu K. Saito : Disease Modeling of Pediatric Diseases with iPSCs. The 4th TMU International Symposium for Cell Therapy and Regenerative Medicine, 2019/09/19, 口頭, 国内.
 3. 齋藤潤 : 疾患 iPS 細胞の病態解析と創薬への応用について. 再生医療 JAPAN, 2019/10/11, 口頭, 国内.
- G. 知的所有権の取得状況**
1. 特許取得
 1. (特許申請) 分化誘導のために馴化された多能性幹細胞の作製方法(齋藤潤, 丹羽明, 杉村竜一, 太田諒)出願番号 : 特願 2019-086767

図1：分化能評価法の概要（上）と代表的な分化能評価結果（下）

1) STEMdiff Trilineage differentiation kit (StemCell Technologies)

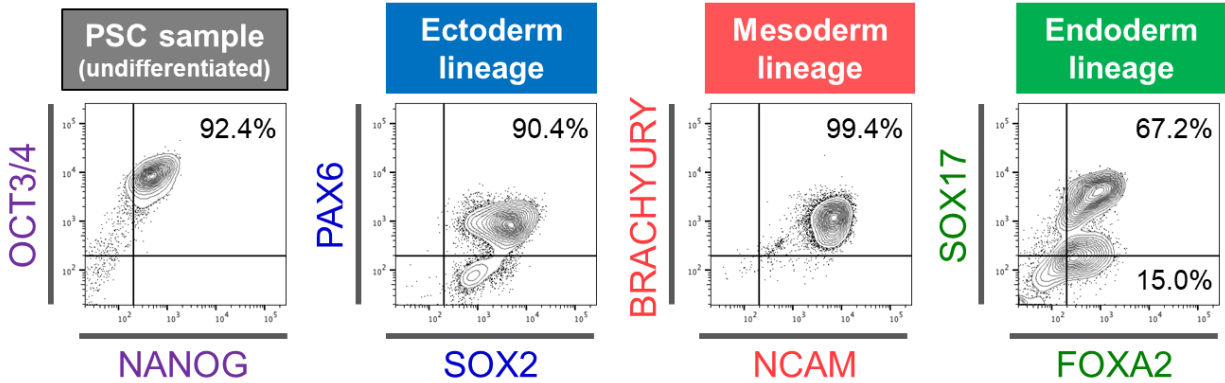
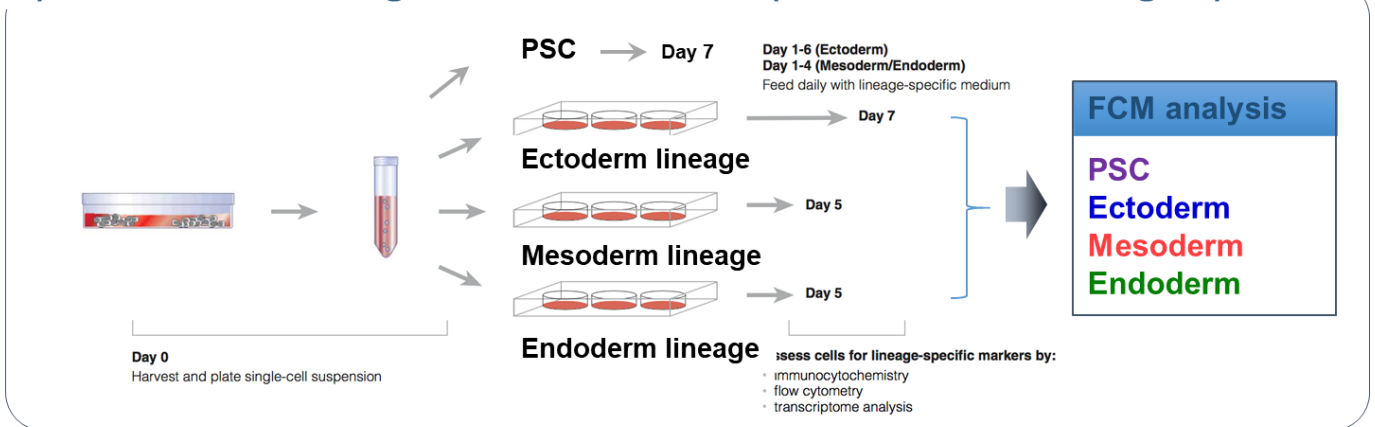
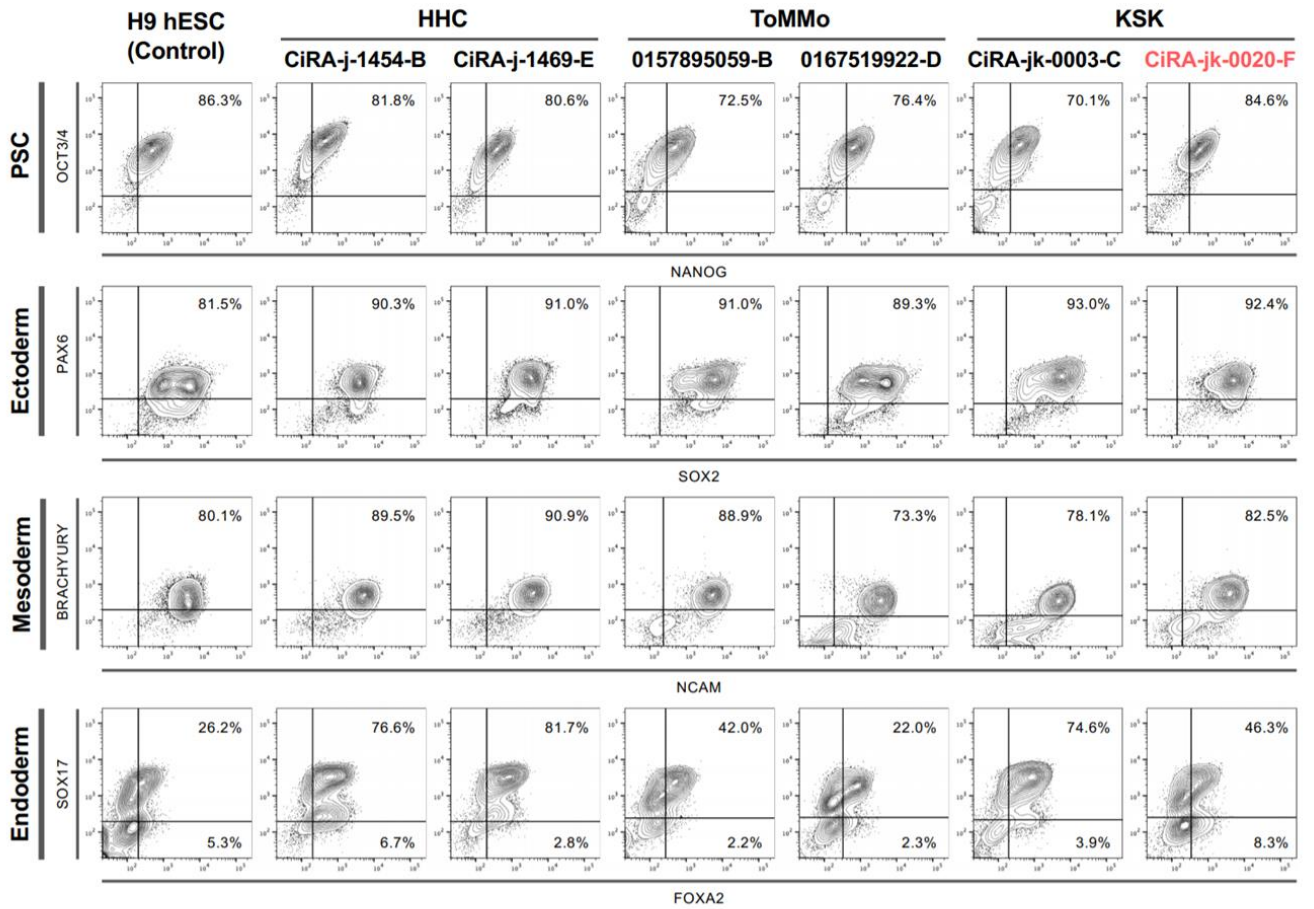


図2：iPS細胞株の分化能。右端は対照ES細胞株(H9)。



Copyright © 2019 Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University. All rights reserved