

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657147

研究課題名（和文）クローニングせずに最適の iPS 細胞を選ぶ新しい手法の開発

研究課題名（英文）Establishment of a novel approach to select the best iPSCs without cell cloning

研究代表者 齋藤 潤 (SAITO MEGUMU)

京都大学・iPS 細胞研究所・准教授

研究者番号：90535486

研究成果の概要（和文）：樹立過程でクローニングを行わず、最終分化させた時点で望まれる細胞種に分化した iPS 細胞だけを取り出し、これを再度リプログラミングする手法を開発することを目標に研究を行った。このような iPS 細胞システムに必要な遺伝子ベクターの作成と、血球分化系の整備を行った。ヒト iPS 細胞から効率よく血球系前駆細胞と成熟血球細胞を分化誘導する分化系を開発した。また、開発したベクターを iPS 細胞に導入し、相同組み替えクローンを回収中である。

研究成果の概要（英文）：I set out to develop a novel technology that enables to derivate iPSC cells which can differentiate into desired differentiated cell types without cell cloning during reprogramming. I constructed gene vectors that is required for this system, and developed a novel hematopoietic cell differentiation system which can efficiently derivate immature hematopoietic precursors and mature hematopoietic cells. I introduced constructed vectors into iPSC cells and recovering clones which have modified allele in AAVS1 site by homologous recombination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：幹細胞

1. 研究開始当初の背景

周知のように、疾患特異的 iPS 細胞は細胞レベルで患者の病態を再現することが可能なツールであり、創薬・病態解析への応用が期待されている。特に、既知の遺伝性疾患に対しては、その威力が最大限に発揮されるだろう。

疾患 iPS 細胞の応用として、病態解析や創薬、がよくあげられるが、いずれにせよ、患者さんの表現型を *in vitro* で忠実に再現することが、まず肝要なことである。今後、疾患 iPS 細胞の研究が進むと、数十人～数百人規模の大きなコホートの患者群から iPS 細胞を作り、対照群と比較するといった研究も

行われることが考えられる。しかしそれに要する労力は膨大である。従来のように iPS 細胞を樹立し、クローニングして、良い iPS 細胞を選択し、その中から数クローン適切な分化特性を持つものを選択するという実験を多数の患者さんを対象に行うことは人的・時間的資源を考慮すれば困難な場合があると思われる。また、明確な遺伝子変異が存在しない患者さんから iPS 細胞を作り、病因解析をする場合や、がん細胞から iPS 細胞を作成する場合など、数百万～数千万個の細胞から 3 クローンだけを抽出して検討を行うと、（例えば未知の体細胞モザイクがある場合やがん幹細胞からの iPS 細胞作製を狙う場

合など) 重要な遺伝的・生物学的な特質をもったわずかな割合の細胞を見逃すことになる可能性がある。

これらを解決し、クローニングを行う前に適切な分化能をもった機能的なクローンを取りもらしなく選ぶことができれば、iPS細胞を用いた疾患研究の対象が大幅に拡大できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

樹立過程でクローニングを行わず、最終分化させた時点で望まれる細胞種に分化したiPS細胞だけを取り出し、これを再度リプログラミングする手法を開発する。

3. 研究の方法

- ① ヒトES/iPS細胞を用いた、セカンダリiPSシステムを確立する。
- ② セカンダリiPSシステムを用いて、クローニングなしでiPS細胞の培養を行う。
- ③ 培養細胞を血球系細胞に分化させる。
- ④ 血球系前駆細胞に分化した細胞だけをソートして、そこからiPS細胞を誘導する。
- ⑤ 誘導したiPS細胞の血球分化能を調べる。

4. 研究成果

まず、血球分化系の整備を行った。血球分化系の分化段階を詳細に解析する必要があるため、モデルとして、ヒトiPS細胞からヘマンギオブラスト、血球系前駆細胞を経て単球、マクロファージ、樹状細胞へと分化する系を新規に開発した。ベクターを導入したiPS細胞をこの系で分化させ、セカンダリiPS細胞を各分化段階で作成していくこととした。

また、セカンダリiPS細胞システムに必要なベクターの作成を行った。ヒトで薬剤誘導性に山中4因子を発現するベクターを作成した。続いて、このベクターをTALENシステムを用いてAAVS1サイトへ導入すべく、新規TALENペアと相同組み替え用のコンストラクトを作製した。TALENペアが良好に目的の部位を切断することを確認した。現在このベクターをiPSCに導入し、相同組み替えクローンを回収中である。すでに幾つか同様の概念でiPS細胞を樹立している報告があるが、全てプライマリ細胞からの樹立に留まっているため、引き続き相同組み替えiPS細胞をこの系で分化させ、セカンダリiPS細胞を各分化段階で作成していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件, すべて査読あり)

1. Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK*. Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions. PLoS One. 2013;8(4):e59243
doi: 10.1371/journal.pone.0059243

2. Saito MK*, Niwa A. Disease associated iPS cell lines representing hematological and immunological disorders. Inflammation and regeneration. 2012 Sep;32(4): 171-7.
<http://www.jsir.gr.jp/journal/Vol32No4/contents.html>

3. Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuser JE, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito MK*. Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. Blood. 2012 Aug 9;120(6):1299-308. Epub 2012 Jun 21.
doi: 10.1182/blood-2012-03-417881

4. Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Mutara T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T. Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. Blood. 2012 Jun 7;119(23):5458-66. Epub 2012 Apr 19.
doi: 10.1182/blood-2011-05-354167

5. Kawai T, Saito M, Nishikomori R, Yasumi T, Izawa K, Murakami T, Okamoto S, Mori Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Ohmori K, Nakahata T, Heike T. Multiple reversions of an IL2RG mutation restore T cell function in an X-linked severe combined immunodeficiency patient. J Clin Immunol. 2012 Aug;32(4):690-7. Epub 2012 Mar 30.
doi: 10.1007/s10875-012-9684-1

6. Izawa K, Hijikata A, Tanaka N,

Kawai T, Saito MK, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O. Detection of Base Substitution-Type Somatic Mosaicism of the NLRP3 Gene with >99.9% Statistical Confidence by Massively Parallel Sequencing. *DNA Res.* 2012 Apr;19(2):143-52. Epub 2012 Jan 24. doi: 10.1093/dnares/dsr047

7. Kato I, Niwa A, Heike T, Fujino H, Saito MK, Umeda K, Hiramatsu H, Ito M, Morita M, Nishinaka Y, Adachi S, Ishikawa F, Nakahata T. Identification of hepatic niche harboring human acute lymphoblastic leukemic cells via the SDF-1/CXCR4 axis. *PLoS One.* 2011;6(11):e27042. Epub 2011 Nov 1. doi: 10.1371/journal.pone.0027042

8. Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T, Saito MK*. A Novel Serum-Free Monolayer Culture for Orderly Hematopoietic Differentiation of Human Pluripotent Cells via Mesodermal Progenitors. *PLoS One.* 2011;6(7):e22261. Epub 2011 Jul 27. doi: 10.1371/journal.pone.0022261

[学会発表] (計 12 件)

1. 講義：齋藤潤 「iPS 細胞研究の現状と展望」 GMCC 講習会，東京，2013/3/9
2. 特別講演：齋藤潤 「疾患 iPS 細胞を用いた小児難治性疾患の病態解析」 日本小児科学会京都地方会，京都，2012/12/15
3. セミナー：齋藤潤 「疾患特異的 iPS 細胞を用いた血液・免疫疾患の病態解析」 久留米大学膠原病内科セミナー，久留米，2012/11/8
4. シンポジウム講演：齋藤潤 「疾患 iPS 細胞を用いた血液疾患の病態解析」 CiRA mini symposium 2012，京都，2012/10/10
5. シンポジウム講演：齋藤潤 「ヒト iPS 細胞からの造血分化と疾患解析への応用」 第 22 回日本産婦人科・新生児血液学会，津，2012/6/29
6. 特別講演：齋藤潤 「疾患 iPS 細胞研究の最前線」 第 124 回遠江医学会，浜松，2012/6/17

7. セミナー：齋藤潤 「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた 難治性免疫・血液疾患の病態解析」 平成 24 年度第 1 回難治研大学院セミナー，川崎，2012/5/17

8. WS 講演：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」 第 39 回日本臨床免疫学会総会，東京，2011/9/15

9. シンポジウム講演：齋藤潤 「自己炎症性疾患」 第 114 回 日本小児科学会学術集会，東京，2011/8/12

10. シンポジウム講演：齋藤潤 「自己炎症性症候群と iPS 細胞」 第 55 回日本リウマチ学会，神戸，2011/7/18

11. Disease modeling of Chronic Infantile Neurologic Cutaneous and Articular syndrome with somatic mosaicism via patient-specific induced pluripotent stem cells.」 the 10th World Congress on Inflammation in Paris, Paris, France, 2011/6/25”

12. シンポジウム講演：齋藤潤 「Disease modeling of human immunological disorders with iPS cells」 JSIR2011/APFIR2011 (第 32 回日本炎症再生学会総会)，東京，2011/6/2

[図書] (計 7 件)

1. 齋藤潤 【総説】 【疾患特異的 iPS 細胞】 疾患特異的 iPS 細胞を用いた難治性血液・免疫疾患への取り組み *BIO clinica* 28 (3) pp49-52、2013
2. 齋藤潤、中畑龍俊 【総説】 疾患特異的 iPS 細胞 再生医療 12 (1) pp19-32、2013
3. 齋藤潤 【総説】 ヒト iPS 細胞からの造血分化と疾患解析への応用 *日本産科新生児血液学会雑誌* 22 (2) pp1-6、2013
4. 齋藤潤 【解説/特集】 【炎症シグナルの指揮者インフラマソーム】 インフラマソームと自己炎症性症候群 *実験医学* 30 (11) pp1736-1740、2012
5. 齋藤潤 【総説/特集】 【自己炎症疾患の新しい知見】 CAPS: クライオパイリン関連周期熱症候群 *日本臨床免疫学会会誌* 34 (5) pp369-377、2011

6. 齋藤潤 【解説/特集】 【iPS細胞の臨床応用の展望】 疾患特異的 iPS細胞の臨床応用 BIO clinica 26 (9) pp796-800、2011
7. 齋藤潤 【総説】 インフラマソームとその関連疾患の最近の知見 日本臨床免疫学会会誌 34 (1) pp20-28、2011

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: Blood analysis apparatus and blood analysis method

発明者: Matsui Eriko; Dowaki Suguru; Tatsuta Hirokazu; Kunihiro Takeshi; Niwa Akira; Saito Megumu; Nakahata Tatsutoshi

権利者: 同上

種類: US、EP、中国特許出願

番号: US:12/561,820

EP:12005597.5

中国 201210271673.1

出願年月日: US:2012/7/30

EP: 2012/8/1

中国: 2012/8/1

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/nakahata/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 潤 (SAITO MEGUMU)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号: 90535486