

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」
研究課題「iPS 細胞を用いた組織幹細胞誘導の確立と分子基盤の解明」

研究終了報告書

研究期間 平成21年10月～平成27年3月

研究代表者: 江良 択実
(熊本大学 発生医学研究所、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究では、ES/iPS 細胞を用いて間葉系幹細胞(MSC)・造血幹細胞・腎臓前駆細胞の分化経路を明らかにし、誘導方法の確立を行う。さらに、これらの細胞特異的に発現している分子群を明らかにし幹細胞の分子機構を明らかにする。そして細胞群のエピゲノムの解析を行ない、幹細胞の分化、増殖の分子機構を解明する、ことを目的とする。

MSC の研究では、まず、遺伝子改変マウスとマウス ES 細胞を用いて、神経上皮系細胞からの分化経路に加えて、中胚葉細胞が MSC の起源であることを明らかとし、中間段階細胞である中胚葉系細胞を同定するとともに、そこから MSC の誘導方法を確立した。このように多能性幹細胞から目的細胞までの分化経路に存在する中間段階細胞(中胚葉系細胞)をマーカーを使って明らかにしていく新しい手法は、造血細胞・腎臓細胞の分化誘導法の開発にも貢献できた。また、各グループで用いた多能性細胞や培養条件をグループ内で共有することでそれぞれのグループの目的とする細胞の誘導条件を確立することが加速化された。一方、ヒト iPS 細胞から MSC への分化では、マウス ES 細胞の知見をもとに、中胚葉系細胞からの分化経路と神経上皮系細胞からの分化経路を明らかとし、それぞれの分化誘導の条件を確立した。

一方、間葉系細胞や MSC で重要な役割を果たす新しい分子 PHF14 を明らかとし、肺線維症の発症メカニズムの一端を解明した。さらにこの知見をもとに、肺線維症の新しい治療コンセプトを提案した。MSC の幹細胞機構を解明するために、マウス ES 細胞から誘導した由来の異なる MSC とマウス個体から分離した MSC から遺伝子発現プロファイルを DNA アレイを用いて作成し、MSC 特異的に発現する遺伝子群を明らかにした。さらにこのような分子の機能を明らかにするため、MSC 特異的に遺伝子操作を可能とする遺伝子改変マウスも作成した。このマウスを用いて、現在、MSC の発生学的な起源を解析中である。

次に、本研究より得られた各グループの成果である、分化能力の高い iPS 細胞を識別する技術(後述)、MSC の分化誘導技術、血液・内皮細胞誘導技術、腎臓細胞誘導技術を統合して革新的医療技術開発のために、患者細胞やそれぞれの細胞が標的となる疾患の iPS 細胞解析も行い、治療薬候補の同定や治療薬開発基盤を一部の疾患で確立した(注:iPS 細胞の樹立の部分のみ他の研究費を使用)。

マウス ES 細胞から、いくつかのマーカーを用いて造血性内皮細胞を誘導することに成功した。一方、転写因子である c-Myb の発現の高低によって幹細胞活性が違うことを見出した。c-Myb^{low} 34KSL 細胞は c-Myb^{high} 34KSL 細胞に比べて高いキメラリズムを長期にわたり維持し、これは 2 次移植マウスでも観察された。

腎前駆細胞研究では、マーカー分子を可視化したマウス胚から試験管内でコロニー形成能を有する後腎ネフロン前駆細胞を分離、誘導することに成功し、新たに腎臓細胞の起源を同定した。さらに、ヒト iPS 細胞から腎臓細胞を誘導することに成功した。これら各細胞の誘導法を確立することがお互いの誘導技術を高め、研究を進める成果につながった。

エピゲノム解析では、iPS 細胞の細胞核構造(特異な PML ボディー等)を同定するとともに、染色体コンフォメーション捕捉法にて、INK4/ARF 遺伝子座で、クロマチン因子 CTCF による転写抑制型のクロマチンループ形成が特徴であることを明らかにした。さらに iPS 細胞の形態等から正しくリプログラミングされて多分化能をもっている iPS 細胞を識別できる方法をイメージ計測・分類ソフトウェアを使って開発した。これらは幹細胞の特徴の理解においてチーム全体に貢献した。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 間葉系幹細胞の増殖を司る新しい分子、Phf14 の発見とその知見を利用した肺線維症治療の基盤形成

ES 細胞の分化システムから間葉系細胞の増殖を司る新しい分子、Phf14 を同定した。この分子が PDGFR の発現をコントロールしながら、正常間葉系細胞の増殖をコントロールしていることを論証し、論文とした。さらに、肺線維症の初期に関与していることを見つけて PDGFR 抗体による新しい治療法を提案した (Kitagawa et al. J. Biol. Chem, 2012)。

2. 腎臓前駆細胞の発生学的同定とヒト iPS 細胞からの誘導

腎臓ネフロン前駆細胞の起源が、従来言われていた Osr1 陽性の前方中間中胚葉ではなく胎仔後端部の T 陽性の未分化細胞集団であることを見いだした。これをきっかけに、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞から5つのステップを経てネフロン前駆細胞を誘導し、さらにそこから糸球体と尿細管という3次元腎臓組織の作成に成功した (Taguchi et al. Cell Stem Cell, 2014)。

3. iPS 細胞の正しいリプログラミング識別法の開発とエピジェネティクス解析

イメージ計測・分類法を用いて、正しくリプログラムした iPS 細胞とリプログラムが不完全な non-iPS 細胞のコロニーを～90%の正確度で識別して、形態情報に基づく系統樹を作成した。また、iPS 細胞核では、特異な線状 PML ボディーが形成されることを見出した(特許出願、論文投稿中)。iPS 細胞では、転写調節とクロマチン高次構造に関わる CTCF タンパク質が高発現し、細胞制御に関わる *INK4/ARF* 遺伝子座の強い抑制、緩やかなクロマチンループの形成という特徴があることが分かった (Hirotsue et al, Aging Cell, 2012)。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 進行性骨化線維異形成症(FOP)の治療薬開発

本研究より得られた iPS 細胞の維持技術、さらに間葉系幹細胞を骨芽細胞へと分化させる技術を用いて FOP 由来の iPS 細胞の研究を行った。iPS 細胞の樹立・維持と骨芽細胞への分化法を用いて薬剤を開発中である。成果は、特許出願のほか、論文、前臨床試験を見据えた薬剤開発研究へと発展している (Hamasaki et al. Stem Cells, 2012)。

2. 正しい iPS 細胞の同定技術開発

顕微鏡の明視野イメージと計測・分類ソフトウェア wndchrm を組み合わせて、正しくリプログラムされたヒト iPS 細胞のコロニーを直接同定する技術を構築し、その応用として、分化誘導した細胞・組織の形態をそのまま診断できる技術の開発に取り組んでいる。免疫染色法を用いた特異な線状 PML ボディーの検出、3C (chromosome conformation capture) 法を用いたクロマチン高次構造などで、iPS 細胞とその分化の質検証につながる技術開発になることを期待している。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「江良」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
江良 択実	熊本大学発生医学研究所	教授	H21.10～
池谷 真	同上	准教授	H21.10～H22.8
北川 道憲	同上	助教	H21.10～H23.4
三輪 裕幸	同上	研究員	H22. 4～
續木 玄太	同上	D4	H23.10～H26.7
小川 峰太郎	同上	教授	H21.10～
坂本 比呂志	同上	助教	H21.10～
田村 潔美	同上	助教	H21.10～
角田 智実	同上	技術補佐員	H22.4～H22.10
江上 稔子	同上	技術補佐員	H23.11～H25.4
廣田 冴香	同上	D3	H22. 6～
橋口 篤史	同上	技術補佐員 (M2)	H24.6～H25.3
Ahmed Tanzir	同上	D3	H26.4～

研究項目

- ・ iPS 細胞から間葉系、造血幹細胞への分化過程と誘導方法の研究
- ・ ES/iPS 細胞から間葉系、造血幹細胞分化・増殖の分子機構の研究

②「西中村」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
西中村 隆一	熊本大学発生医学研究所	教授	H21.10～
田中 聡	同上	助教	H21.10～
太口 敦博	同上	助教	H21.10～
内山 裕佳子	同上	研究員	H22.4～H22.8
神田 祥一郎	同上	助教	H23.4～H25.3
Sazia Sharmin	同上	D3	H23.2～
Mariam Recuenco	同上	研究員	H23.5～H24.7
賀来 祐介	同上	D2	H23.10～
豊田 大地	同上	M2	H24.5～H26.3
大森 智子	同上	技術補佐員	H25.4～H26.9
谷川 俊佑	同上	特任助教	H25.4～
Fahim Haque	同上	D1	H26.4～

研究項目

- ・ iPS 細胞から腎前駆細胞への誘導法の開発
- ・ 腎臓前駆細胞による3次元構造再構築の検討

③「中尾」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
中尾 光善	熊本大学発生医学研究所	教授	H21.10～
斉藤 典子	同上	准教授	H21.10～
徳永 和明	同上	研究員	H21.10～H24.9
坂本 智代美	同上	技術補佐員	H22.1～
日野 裕子	同上	技術補佐員	H26.4～
井形 朋香	同上	技術補佐員	H26.4～
高瀬 隆太	熊本大学大学院医学教育部	D2	H26.4～

研究項目

- ・ iPS 細胞とその分化誘導における標的遺伝子座の高次エピゲノムの解析
- ・ iPS 細胞とその分化誘導における細胞核構造の解析

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

本研究では、新たにヒト iPS 細胞から MSC への分化誘導方法、そしてそこからの骨芽細胞への誘導方法を樹立した。これらの知見は、骨分化に異常をきたす疾患創薬研究に共同研究として発展している。具体的には、理化学研究所の創薬・医療技術基盤プログラム(総括:後藤俊男)との連携・共同研究をはじめ、製薬企業との連携研究へと発展している。加えて、疾患 iPS 細胞を用いてこの iPS 細胞の研究成果は、これまで iPS 細胞から分化誘導した細胞での薬剤スクリーニングが主体であった iPS 細胞研究に新たに、リプログラミングの過程や iPS 細胞の維持培養が薬剤スクリーニングとして使えるという新しい科学的・技術的なコンセプトを創出させた。これについても同様に理化学研究所との共同研究を進めている。

§ 3 研究実施内容及び成果

3. 1 iPS 細胞から間葉系、造血幹細胞への分化過程と誘導方法の研究 (熊本大学 江良グループ)

(1)研究実施内容及び成果

① 研究のねらい

ES/iPS 細胞から間葉系幹細胞(MSC)・造血幹細胞の分化経路を明らかにし、誘導方法を確立する。

② 研究実施方法

ES/iPS 細胞の分化誘導を行う中で、分化中間段階細胞と考えられる中胚葉系細胞、神経外胚葉系細胞を同定しながら分化の経路を解明する。またこれらの細胞を FACS を使って純化し、そこから間葉系幹細胞、造血幹細胞の分化方法を確立する。誘導後、血液前駆細胞は放射線照射マウスに移植して造血再建能を検討する。

③ 実地内容と成果

1. MSC について

MSC の中胚葉を経由する分化経路解析では、マウス ES 細胞を用いて、中間段階細胞を FACS にて分離し、間葉系幹細胞への分化誘導方法を確立した。誘導した間葉系幹細胞は、3つの重要な子孫細胞である脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞への分化能力(多分化能)を持ち、CFU-F を形成する。また、この細胞は、分化能を保持したまま、1 ヶ月以上にわたって試験管内にて維持可能である。

この知見をもとに、ヒト iPS 細胞から中間段階細胞を誘導しながら、MSC を誘導することに成功した。

以上、今回の研究にて、MSC の分化経路をすべて明らかとした。

2. 造血幹細胞について

造血幹細胞は内臓包葉に由来する背側大動脈の腹側内皮から発生すると考えられている。細胞系譜としては、VEGFR2+側板中胚葉細胞から分化した血管内皮細胞が造血幹細胞の前駆細胞であると考えられる。ES 細胞・iPS 細胞から造血幹細胞を誘導するためには、個体発生における造血幹細胞の発生経路を再現することが必要である。

本研究では、マウス ES 細胞を用いて、(1) VEGFR2+側板中胚葉細胞の誘導から、(2)VE-cadherin+血管内皮細胞の誘導を経て、(3)血管内皮細胞から造血幹細胞の誘導と増幅にいたる段階的な分化誘導系の確立を目指した。造血幹細胞の誘導を証明するために骨髓造血再構築能を持つことを示す必要があることから、ES 細胞は 129 系統ではなく(B6xCBA)F₁ 由来の KTPU8 細胞を用いた。

造血幹細胞が動脈内皮から発生することから、ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞を動脈化することによる造血能への影響について検討した。KTPU8 細胞から誘導した VEGFR2+側板中胚葉細胞を VEGF と cAMP の存在下で培養し VE-cadherin+血管内皮細胞へ分化誘導した。内皮細胞の動脈化は CXCR4 の発現上昇により確認されたが、逆に *in vitro* アッセイによる造血能は著しく減少した。血管内皮細胞の造血能を外来因子の作用により調節することが可能であることを示す結果である。

上述のように ES 細胞から分化誘導した VE-cadherin+血管内皮細胞、もしくは、マウス胎仔から分離した VE-cadherin+血管内皮細胞の中には、血液分化能を持つ細胞が存在する。造血幹細胞はこのような造血性内皮細胞から分化すると考えられているが、造血性内皮細胞自体は未だよく特徴づけられていない。本研究では、ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞の中に造血性内皮細胞を同定し、その分化メカニズムの解析を進めた。

造血幹細胞の誘導に向けて、造血性内皮細胞の分化決定過程を操作できる可能性を示す知見として意義がある。

ES細胞から造血幹細胞を分化誘導する最後のステップとして、血管内皮細胞から造血幹細胞を分化させると同時にこれを増幅する培養条件が必要である。胎生 9.5～10.5 日齢のマウス胚体から分離した多能性血液前駆細胞を、thrombopoietin (TPO)と stem cell factor (SCF)の存在下に無血清培養すると、6～12 倍に増幅できることを既に報告した(Huang *et al.* 2009)。TPO+SCF による強い増殖(自己複製)誘導は成体骨髄から採取した多能性血液前駆細胞では観察されないことから、胎生期の血液前駆細胞に特異的な活性である。そこで、TPO+SCF 存在下での無血清培養は、血管内皮細胞から分化した初期の造血幹細胞(もしくはプレ造血幹細胞)の増幅にも有効ではないかと考えられた。

本研究では、胎生 10.5 日齢のマウス胚体から CD45⁻ CD31⁺ VE-cadherin⁺細胞(造血性内皮細胞もしくはプレ造血幹細胞を含む集団)をソーティングにより採取し、直接もしくは培養後に放射線照射成体マウスに移植して骨髄造血再構築能を検討した。ドナーのマウス胚は KTPU8 細胞と同じ遺伝的背景を持つ(B6[Ly5.2]xCBA[Ly5.2]) F₁ マウス胚を用い、レシピエントは 10Gy のガンマ線を照射した(B6[Ly5.1]xCBA[Ly5.2]) F₁ 成体マウスを用いた。コンペティターとして 2×10⁵ 個の骨髄細胞を混合して尾静脈注射した。ドナーとレシピエント由来の血球は、それぞれ Ly5.2/Ly5.2 と Ly5.2/Ly5.1 の表現型により区別できる。TPO+SCF 存在下での無血清培養は、マウス胚のプレ造血幹細胞をある程度維持できることが示唆された。

KTPU8 細胞から分化誘導した CD31⁺ VE-cadherin⁺細胞を TPO+SCF 存在下で 3 日間培養して得られた血液前駆細胞の *in vitro* アッセイによる造血能を解析したところ、赤血球、骨髄球、B リンパ球への分化能力を保持する未熟な前駆細胞である事が確認された。そこで、この細胞の骨髄造血再構築能を前述と同じ方法で解析した。移植マウス末梢血の FACS 解析時のバックグラウンドや放射線照射によるアーティファクト等の擬陽性を除外するために、末梢血 B リンパ球において有意なキメリズムが観察されるマウスのみを陽性と判断した。これまで、種々の誘導因子や阻害剤を含む様々な培養条件下に分化誘導した CD31⁺ VE-cadherin⁺細胞等を直接もしくは培養後に放射線照射マウスに移植する実験を 270 例以上試行したが、12 週後の末梢血 B リンパ球において 0.1%を超えるキメリズムを示す移植例は得られていない。

3. 2 ES/iPS 細胞から間葉系、造血幹細胞分化・増殖の分子機構の研究 (熊本大学 江良グループ)

(1)研究実施内容及び成果

① 研究のねらい

ES/iPS 細胞から間葉系幹細胞(MSC)・造血幹細胞への分化・増殖の分子機構を明らかにする。

② 研究実施方法

ES/iPS 細胞の分化誘導を行う中で、分化中間段階細胞と考えられる中胚葉系細胞、神経外胚葉系細胞あるいはそこから誘導した間葉系幹細胞に発現している遺伝子を解析する。その中で特に機能不明分子については、さらにノックアウトマウス作製などを通してさらに詳しく解析する。また間葉系幹細胞特異的に分子の機能を *in vivo* にて解析できるシステムを確立し、それを用いて間葉系幹細胞の分化・増殖の分子機構を解析する。

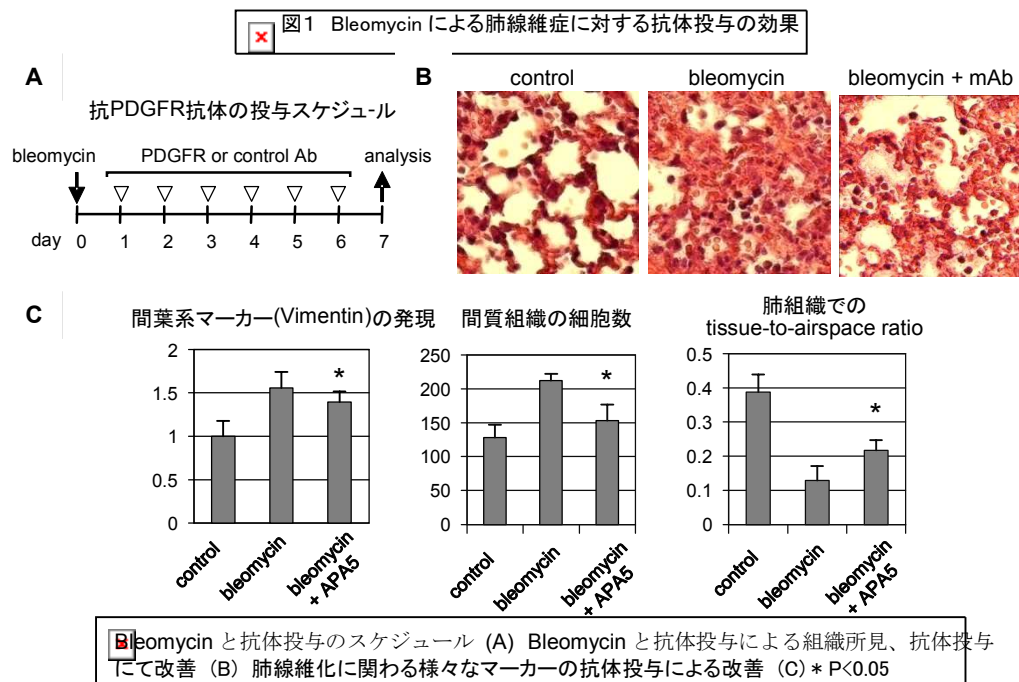
④ 実地内容と成果

A. 間葉系幹細胞について

1. 新規分子 Phf14 の研究

ES 細胞の分化系から新たに単離した Phf14 分子のノックアウトマウス(KO マウス)を作成した。このマウスは出生後すぐに呼吸不全にて死亡した。その原因は、PDGFR α ⁺の肺間質細胞増加による肺胞壁の肥厚によると考えられる。さらなる解析の結果、KO マウス由来の初代胎仔線維芽細胞(MEF)と MSC は正常に比べて増殖スピードが速く、PDGFR α 受容体の発現が高いことが明らかとなった。この受容体発現の増加が、シグナル反応性の増加をもたらし、KO 由来の線維芽細胞

や MSC の増殖優位性につながったことを論証した。さらにプロモーター解析から Phf14 は PDGFR α 発現を負に制御する転写因子であることが明らかとなった。さらに、Phf14 の研究結果は、1)PDGF 受容体シグナルが線維症に関与していること、2)そのシグナルが間質組織の増殖を促進することを示唆する。この成果をもとに、PDGF のシグナルを阻害する PDGFR α に対するモノクローナル抗体を薬剤誘発性の肺線維症に投与して線維化を抑制することを明らかにした(図1)。この結果は、治療困難である肺線維症に対しての新しい治療戦略のコンセプトとなり得る。



2. MSC に特異的に発現する分子の単離

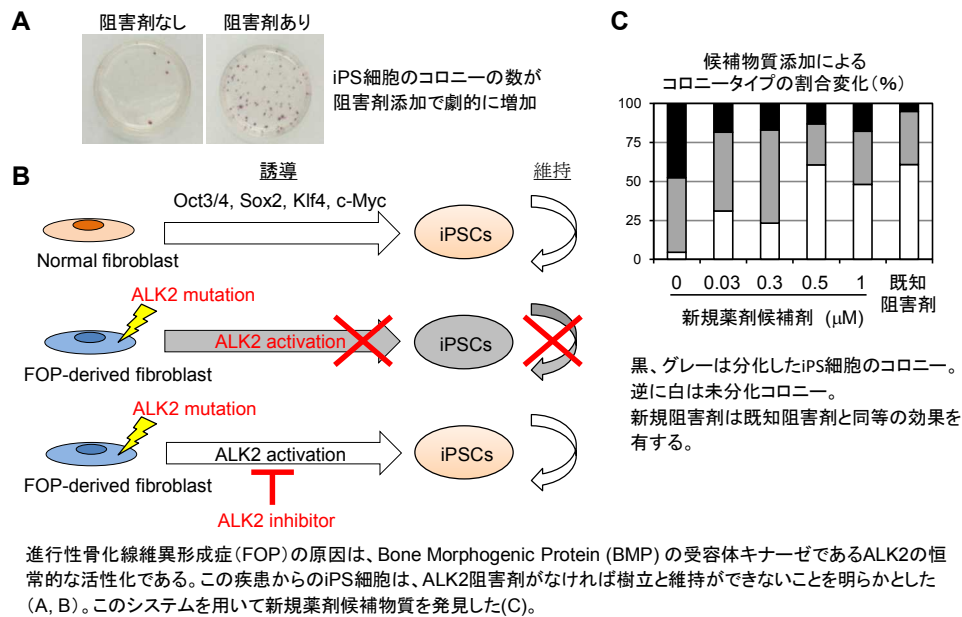
マウス ES 細胞の中胚葉由来 MSCs、神経上皮由来 MSCs、マウス胎仔由来 MSCs をそれぞれ DNA アレイを使って遺伝子発現解析を行い、網羅的遺伝子発現プロファイルを作成した。このうち同一の由来の MSCs を異なる条件で培養することで、多能性を失った細胞と多能性を保持している細胞を得ることに成功した。そこでこの2つの細胞間で遺伝子発現プロファイルを比較、さらにそれらを多能性を持つマウス胎仔由来 MSCs (F-MSC)と比較することで、多能性を持つ MSCs に共通に特異的発現する遺伝子と発現しない遺伝子群のリストを作成した。

3. 疾患解析と治療薬開発研究への応用

iPS細胞の研究から得られた知見を利用して、疾患治療技術の開発研究を行った。間葉系幹細胞の子孫細胞である骨細胞分化に異常のある難治性疾患の iPS 細胞の解析を行ったところ、予想しない興味深い結果を得ることができた(図 2)。進行性骨化線維異形成症 (FOP: Fibrodysplasia Ossificans Progressiva)は全身の皮下軟部組織や筋肉組織が炎症などに伴い骨化してしまう先天性の疾患である。無治療の場合、胸郭の異所性の骨化による換気障害から呼吸不全が起こり、40 歳ごろまでに死亡する。現在までに有効な治療方法は確立されていない。原因は、Bone Morphogenic Protein (BMP) の受容体キナーゼである ALK2 (BMP type 1 receptor) の遺伝子点変異による。この変異により、1 アミノ酸の置換が起こるが、これが ALK2 キナーゼの恒常的な活性化を引き起こし、骨化を促進する。私たちは、この疾患から iPS 細胞の樹立を試みたが、樹立できなかった(図 2A)。そこで、この失敗の原因が異常 ALK2 キナーゼ活性に

あると仮定し、キナーゼ阻害剤を加えて誘導を行ったところ、iPS 細胞作製に成功した。さらにこの ALK2 キナーゼの活性化はリプログラミングを阻害することがわかった。一方、病因である ALK2 の変異は iPS 細胞の維持においても、iPS 細胞の分化を促進することで未分化性維持の破綻をきたし、コロニー形成を阻害することが明らかとなった(図 2B、論文)。以上の結果から、この実験系は、薬剤スクリーニングに使用できると考え実験を行い(特許出願中)、東京大学、理化学研究所との共同研究の中で、化学物質ライブラリーから治療薬の候補となりえる新しいヒット化合物を同定した(図 2C)。

図 2 疾患由来 iPS 細胞を使った新薬開発



B. 造血幹細胞について

より未分化な造血幹細胞は休止状態にあり、移植後のキメリズムが高いことがよく知られている。移植効率の高い造血幹細胞を誘導するためには、造血幹細胞の細胞周期調節を理解し制御する必要がある。本研究では、c-Myb の発現量と造血幹細胞の増殖活性との相関性について解析を行ってきた。c-Myb 遺伝子最終エクソンの翻訳停止コドン直前に、ペプチドリンカーに連結したEGFPをコードするcDNAをインフレームで挿入したノックインマウスを、遺伝子相同組換えにより作製した(Sakamoto *et al.* Stem Cells, doi: 10.1002/stem.1855)。このc-Myb-EGFP レポーターマウスは、c-Myb のC末端に30アミノ酸から成るリンカーを介してEGFPが連結するキメラタンパクを発現する。その発現は内在性のc-Myb 遺伝子制御領域の支配下にあり、しかも細胞が生きたままでc-Myb タンパクそのものの発現量をモニターできることに特長がある。ノックイン・アリのホモ接合体マウスは、野生型マウスに比べても骨髄造血に異常が無く、c-Myb-EGFP キメラ蛋白が野生型c-Myb タンパクと同等の機能を保持していることが示された。

c-Myb-EGFP レポーターマウス成体の骨髄細胞のFACS解析では、分化過程にある各段階の血液前駆細胞だけでなく、長期骨髄造血再構築能を持つ造血幹細胞(LT-HSC)を含むCD34⁺c-Kit⁺Sca-1⁺Lineage⁻細胞(34KSL細胞)もc-Myb-EGFPを発現していた。34KSL細胞をc-Myb^{low}細胞とc-Myb^{high}細胞の二つの集団に分画し、放射線照射マウスに移植して骨髄造血再構築能を比較したところ、c-Myb^{low} 34KSL細胞はc-Myb^{high} 34KSL細胞に比べて高いキメリズムを長期にわたり維持することを見いだした。高いキメリズムは2次移植マウスでも観察された。c-Myb^{low} 34KSL細胞から再構築された骨髄造血において、リンパ球あるいは骨髄球分化への強いバイアスは認められなかった。c-Myb^{high} 34KSL細胞を移植されたマウスではキメリズムが低く、時間の経過と共にさらにキメリズムは減少した。

FACS による細胞周期の解析では、c-Myb^{low} 34KSL 細胞の 68%が G₀ 期であるのに対し、c-Myb^{high} 34KSL 細胞では 33%に過ぎなかった。また、BrdU の標識・チェイス実験でも、BrdU 保持細胞の 60%が c-Myb^{low} 34KSL 細胞分画に分布したのに対して、c-Myb^{high} 34KSL 細胞分画には 5%以下しか分布しなかった。したがって、定常状態の骨髄では、休止期の LT-HSC は c-Myb^{low} 34KSL 細胞中に含まれることが示唆される。対照的に、5-FU 投与 4 日後の骨髄の場合には、活性化した LT-HSC は c-Myb⁺ 34KSL 細胞中に含まれていた。

以上の結果から、LT-HSC の増殖活性化と c-Myb タンパクの発現量は逆の相関関係があることが明らかになった。これは、c-Myb タンパクの発現量に基づいて、休止期にある造血幹細胞を BrdU 標識等に頼ることなく予期的に生きたまま分離することができることを示した重要な成果であり、造血幹細胞の細胞周期調節機構の解明に道を開くものである。休止期造血幹細胞の詳細な解析は、ES 細胞・iPS 細胞から造血幹細胞への分化誘導を実現するためにも有用な知見を与えると期待される。

3. 3 iPS 細胞から腎前駆細胞への誘導法の開発 (熊本大学 西中村グループ)

(1)研究実施内容及び成果

本計画は iPS 細胞から中間中胚葉を経た腎臓方向への誘導法を開発することを目的とした。

1) 新たな腎臓の起源の同定とネフロン前駆細胞への分化誘導

腎不全による人工透析患者数は増加する一方であるにもかかわらず、腎臓のような3次元臓器を再構築することは極めて困難とされてきた。腎臓を作るには腎臓がどうやって発生するかを知ることが必須である。腎臓は後腎間葉と尿管芽の相互作用によって形成され、前者から糸球体や尿細管というネフロン(腎臓の最小機能単位)の主要構成要素が作られる。そして後腎間葉中には多能性のネフロン前駆細胞が存在することを、我々を含む複数のグループが報告してきた。一方、尿管芽は集合管と尿管に分化し、腎臓と膀胱が接続される。

後腎間葉(ネフロン前駆細胞)と尿管芽という2つの細胞群は初期中間中胚葉から発生するとされていたため、中間中胚葉で発現する転写因子 Osr1 の遺伝子座に蛍光蛋白 GFP を挿入した ES 細胞及びマウスを樹立した。一方で、ネフロン前駆細胞の存在を定量的に検知できる Wnt 依存性のコロニーアッセイも以前に構築していた。このコロニーアッセイを指標に、マウス胎生 8.5 日の Osr1 陽性細胞を様々な条件で培養したが、コロニーは形成されなかった。しかし予想外に Osr1 陰性の分画から少数のコロニーが形成されることに気づいたため、ネフロン前駆細胞の起源は従来言われていた Osr1 陽性の初期中間中胚葉ではない可能性が浮上した。Osr1 陰性の分画には、胎生 8.5 日胚の最後端に位置し、下半身の神経管や体節を形成する体軸幹細胞も含まれる。そこでこの領域に発現する T に着目し、T-GFP-CreER マウスを入手した(図1)。そして細胞系譜解析によって、確かに後腎間葉(ネフロン前駆細胞)が T 陽性細胞集団由来であることを確認した(体軸幹細胞との異同は今後の検討課題である)。興味深いことに、腎臓のもう一つの構成要素である尿管芽は T 陽性細胞由来ではなく、従来言われていた通り Osr1 陽性細胞由来であった。つまり後腎間葉と尿管芽は異なる細胞系譜であることが明らかになった。



図 1. 腎臓ネフロン前駆細胞は T 陽性細胞に由来する

胎生 8.5 日の T-GFP-CreER / tdTomato indicator マウス胚にタモキシフェンを投与すると腎臓

領域がラベルされる。

そこで胎生 8.5 日の T-GFP-CreER マウス胚から T 陽性細胞を FACS で単離し、これを試験管内で培養して遺伝子発現とコロニーアッセイを指標にネフロン前駆細胞への誘導を試みた。その

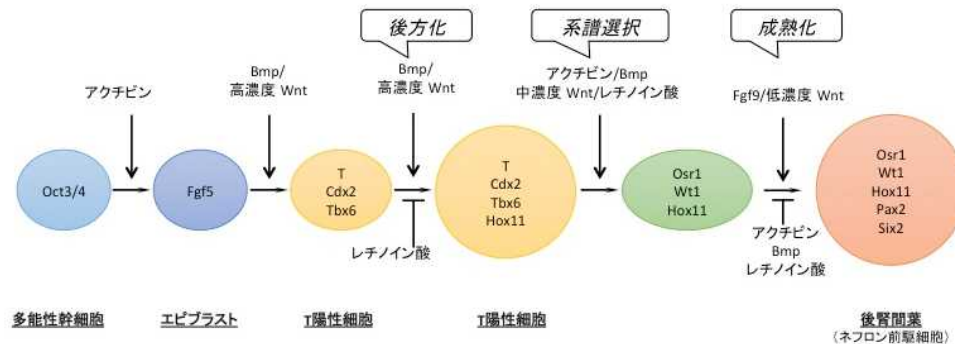


図 2. 幹細胞からのネフロン前駆細胞誘導法

結果、最初のステップ(8.5 日から 9.5 日相当)では、Bmp と高濃度の Wnt シグナルアゴニストで T 陽性状態を維持したまま後方 Hox 遺伝子群の発現を誘導する「後方化」と、それに引き続く「細胞系譜選択因子」すなわちアクチビン、レチノイン酸、Bmp、中濃度の Wnt シグナルアゴニストの投与が有効であることが明らかになった(図2)。次いで胎生 9.5 日目からネフロン前駆細胞(胎生 10.5 日目相当)へのステップでは Fgf9 と低濃度の Wnt シグナルアゴニストの組み合わせが有効であった。これによって、腎臓の起源である胎生 8.5 日の T 陽性細胞からネフロン前駆細胞を誘導することが可能になった。

2) マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞への誘導

まずアクチビンによってマウス ES 細胞からエピプラストを誘導した。次のステップである T 陽性細胞の誘導には、後方化因子・T 陽性維持因子として同定した Bmp と高濃度の Wnt シグナルアゴニストの組み合わせがここでも有効であった。さらに、この ES 細胞から誘導した T 陽性細胞に、胎生 8.5 日目胚の T 陽性細胞からのプロトコルを適応することにより、ネフロン前駆細胞が得られた(図2)。この誘導法はヒト iPS 細胞にも有効であった。マウス ES 細胞とヒト iPS 細胞は分化段階が異なるとされていることから誘導の初期ステップを一部改変し、発生スピードを考慮して培養日数を増やしたものの、それ以外は全く同じプロトコルでヒト iPS 細胞からもネフロン前駆細胞が誘導できた。これはマウスとヒトの腎臓発生が極めてよく保存されていることを意味する。このように、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞から5つのステップを経てネフロン前駆細胞が試験管内で誘導できた。

3) 腎臓前駆細胞からの三次元腎組織再構築

ネフロン前駆細胞は Wnt シグナルを引き金にして立体的なネフロン構造を構築する。このことを利用して、本来の Wnt シグナルの供給源である尿管芽に代えて Wnt を分泌する胎仔脊髄あるいは Wnt4 分泌細胞株とネフロン前駆細胞を共培養すると in vitro で三次元のネフロン構造が形成されることが報告されている。そこで、マウス ES 細胞から誘導したネフロン前駆細胞をこの系に投入すると、ネフロンの三次元構造すなわち糸球体と尿細管を形成できることが確かめられた(図 3)。糸球体のポドサイトは内在性のそれと同様に VEGF を発現しており、腎臓の被膜下に移植すると糸球体に毛細血管が取り込まれた。興味深いことに、ヒト iPS 細胞由来のネフロン前駆細胞もマウス胎仔の脊髄との共培養で三次元のネフロン構造へと分化し、ヒト胎児の腎臓に見られるような糸球体と尿細管構造が形成された(図 3)。つまりヒトの腎臓組織を試験管内で誘導することに成功した(Taguchi et al. Cell Stem Cell, 2014)。

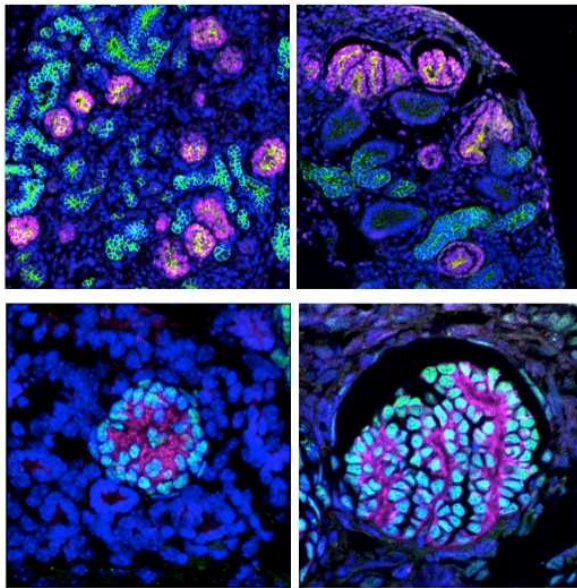


図 3. 幹細胞から作製した腎臓組織

(上段)マウス ES 細胞(左)とヒト iPS 細胞(右)から作製した腎臓組織桃色:Wt1(糸球体上皮細胞マーカー)、黄:Nephrin(スリット膜マーカー)、緑:E-cadherin(尿細管マーカー)(下段)マウス ES 細胞(左)とヒト iPS 細胞(右)から作製した糸球体 淡青:Wt1(糸球体上皮細胞マーカー)、赤:Nephrin(スリット膜マーカー)

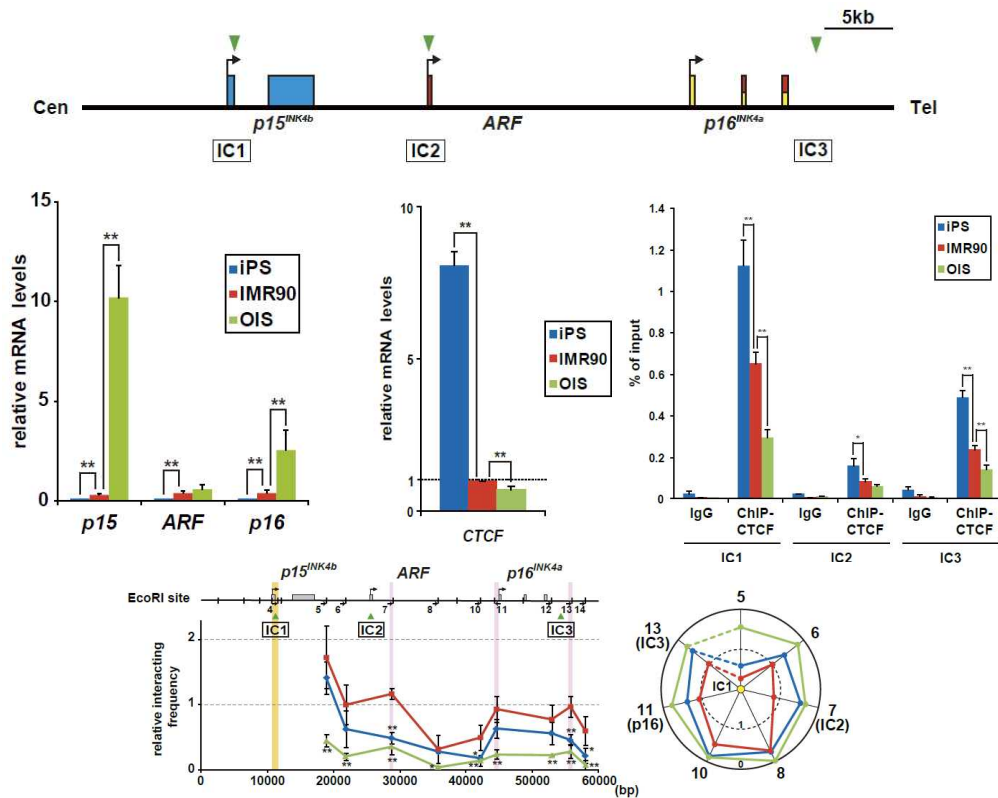
これらは世界初の成果であり、全国のメディアでも報道された。今回の知見は、多能性幹細胞から3次元の腎臓を構築することにつながるとともに、ヒト遺伝性腎疾患の試験管内での病態再現にも貢献することが期待される。既に江良グループと共同して、患者由来の iPS 細胞を樹立し、腎臓へと誘導中である。とはいえ、現時点で誘導できる組織は腎臓の一部であり、未熟でかつ小さい。これがさらに分化できれば、再現できる病態も飛躍的に増加する。そのためには腎臓を構成する他の細胞系譜である尿管芽や間質を誘導し、組み合わせることで真の腎臓構造を作る必要がある。さらには、血管をつないで機能する(つまり尿を産生する)腎臓を目指すことになる。これは困難を極めるプロジェクトになるが、挑戦していきたい。

3. 4 iPS 細胞とその分化におけるエピゲノムと細胞核構造の解析(熊本大学 中尾グループ)

(1)研究実施内容及び成果

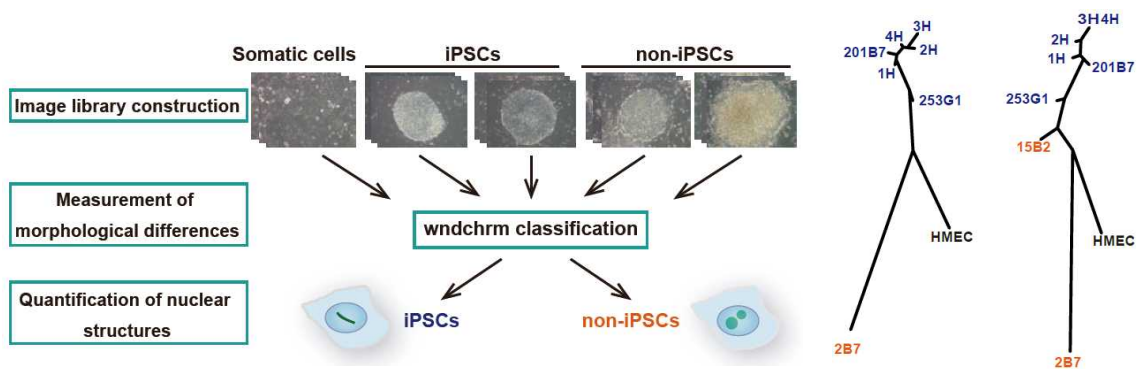
- 1) iPS 細胞とその分化誘導における標的遺伝子座の高次エピゲノムの解析
- 2) iPS 細胞とその分化誘導における細胞核構造の解析

エピゲノムの解析(ChIP-Chip/Seq, ChIP-PCR, qRT-PCR, 3C 法)を用いて、iPS 細胞では、細胞周期制御に関わる *INK4/ARF* 遺伝子座(p15/ARF/p16)の発現が強く抑制されており、高発現するインスレーター結合タンパク質 CTCF がその抑制状態を維持していることが分かった(*Aging Cell*, 2012)。線維芽細胞とそれから誘導した iPS 細胞において、同遺伝子座には3箇所の CTCF 結合部位(IC1, IC2, IC3)があった(図)。線維芽細胞では、これらの部位が相互作用してクロマチンループを形成していた。他方、iPS 細胞では、CTCFが高発現してIC部位に結合するにもかかわらず、クロマチンループは半解除の状態にあった。また、ヒストン H3 の 4 番目と 27 番目のリジン(K4/K27)の両方のメチル化を認めた。このように、iPS 細胞を特徴づける *INK4/ARF* 遺伝子座のクロマチン高次構造があることが明らかになった。(図の qRT-PCR と ChIP-PCR では、標準株の iPS 細胞(青)、線維芽細胞(赤)、RASで誘導した老化細胞(緑)のデータを示す。また、IC1を基点とした 3C 法による核内での相対距離を実際値と円グラフで示した。)



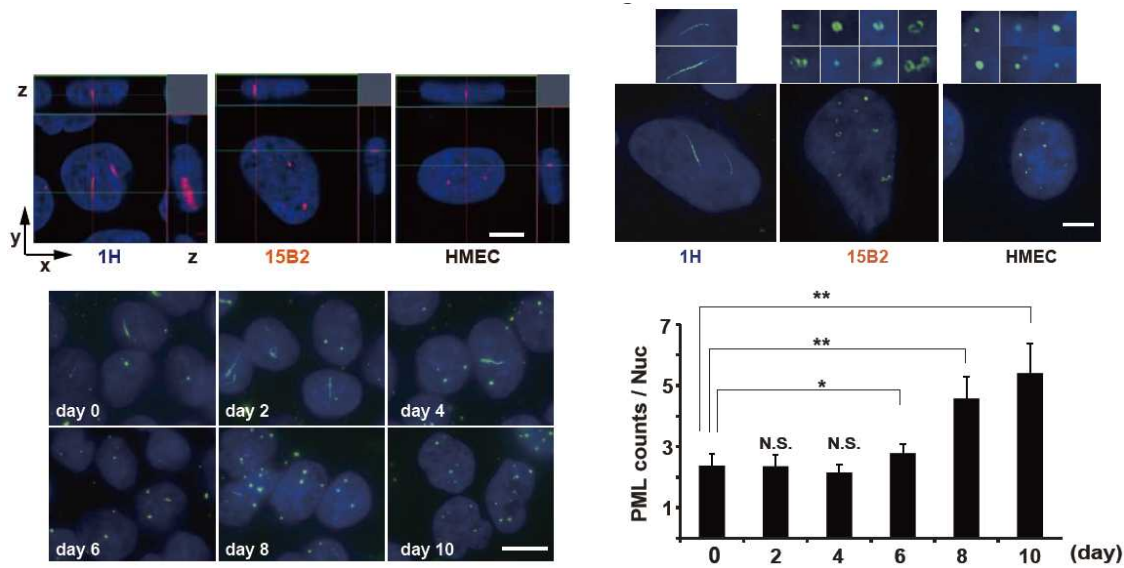
iPS 細胞の形態学的な特性を理解するために、ヒト iPS 細胞 (4 因子発現センダイウイルスで誘導した新規 H 株、標準株の 201B7 と 253G1)、乳腺上皮細胞 (HMEC)、線維芽細胞 (IMR90)、HeLa 癌細胞などについて、イメージ計測・分類ソフトウェアによる比較解析を行った (論文投稿中)。

iPS 細胞は、フィーダー細胞を用いた通常培養条件を用いて、Oct3/4 や Nanog 等の発現および浮遊培養下の 3 胚葉分化能を確認した。形態分類ソフトウェア wndchrm を用いて、iPS 細胞が形成するコロニー形態の分類を行った (図)。完全な iPS 細胞、不完全 にリプログラムされた non-iPS 細胞 (Nanog 等の内因性発現なく、3 胚葉分化能を欠く) を検討し、iPS 細胞と non-iPS 細胞のコロニー形態は ~90% の正確度で区別可能であり、形態特徴の近速度に基づく系統樹を作成した。(図中で、青字は iPS 細胞、オレンジ字は non-iPS 細胞、黒字が元になった乳腺上皮細胞を示す。)



次に、核構造体やクロマチン因子を認識する特異抗体を用いて、iPS 細胞 (1H) と non-iPS 細胞 (15B2) を識別できることが判明した (2011 年特許出願)。①転写因子 Sp1 が iPS 細胞コロニーの内側細胞に高発現する、②核膜構成タンパク質 Lamin A/C が iPS 細胞コロニーの外側細胞に高発現する、③iPS 細胞核で 1~2 個の Cajal ボディー (coilin) が形成される、④iPS 細胞核で傍核小体コンパートメント (PNC) の形成はない。とくに興味深い点として、⑤iPS 細胞核で線状の PML ボディー

が形成されることを見出した(図)。超解像度顕微鏡を用いて観察すると、iPS 細胞では数珠上に連なった線状の PML ボディーが観察されて、non-iPS 細胞では、極めて不規則な PML ボディーが観察された。さらに、embryoid body 形成による分化誘導において、iPS 細胞に特有の線状 PML ボディーは、通常見られるような複数の球状に変化していった。



§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 14件)

1. Aoki H, Hara A, Era T, Kunisada T, and Yamada Y. “Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis.”, *Development*. 139: 667–677, 2012 (DOI:10.1242/dev.072272).
2. Hirose A, Ishihara K, Tokunaga K, Watanabe T, Saitoh N, Chandra T, Narita M, Shinohara M, and Nakao M. “Quantitative assessment of higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus in human senescent cells.”, *Aging Cell*, 11, 553–555, 2012. (DOI:10.1111/j.1474-9726.2012.00809.x)
3. Usui J, Kobayashi K, Yamaguchi T, Knisely AS, Nishinakamura R and Nakauchi H. Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. *Am. J. Pathol.* 80: 2417–2426, 2012. (DOI:10.1016/j.ajpath.2012.03.007)
4. Kitagawa M, Takabe A, Ono Y, Imai T, Nakao K, Nishikawa SI and Era T. “Phf14, a Novel Regulator of Mesenchyme Growth via Platelet-derived Growth Factor (PDGF) Receptor- α .”, *J. Biol. Chem.* 287:27983–96, 2012 (DOI:10.1074/jbc.M112.350074)
5. Hamasaki M, Hashizume Y, Yamada Y, Katayama T, Hohjoh H, Fusaki N, Nakashima Y, Furuya H, Haga N and Era T. “Pathogenic mutation of ALK2 inhibits iPS cell reprogramming and maintenance: mechanisms of reprogramming and strategy for drug identification.”, *Stem Cells*, 30:2437–49, 2012 (DOI:10.1002/stem.1221)
6. Tanaka A, Woltjen K, Miyake K, Hotta A, Ikeya M, Yamamoto T, Nishino T, Shoji E, Sehara-Fujisawa A, Manabe Y, Fujii N, Hanaoka K, Era T, Yamashita S, Isobe K, Kimura E, Sakurai H. Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: Prospects for modeling Miyoshi Myopathy in vitro. *PLoS One* 8:e61540, 2013. (DOI:10.1371/journal.pone.0061540)
7. Yoshimura N, Motohashi T, Aoki H, Tezuka K, Watanabe N, Wakaoka T, Era T, Kunisada T. Dual origin of melanocytes defined by Sox1 expression and their region-specific distribution in mammalian skin. *Dev. Growth Differ.* 55: 270–281, 2013. (DOI:10.1111/dgd.12034)
8. Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, and Nishinakamura R. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 14: 53–67, 2014. (DOI:10.1016/j.stem.2013.11.010)
9. Hino S, Nagaoka K, and Nakao M. Metabolism–epigenome crosstalk in physiology and diseases. *J. Hum. Genet.* (Reviews, Special Section on Epigenomics: biological understanding and clinical application) , 58: 410–415, 2013. (DOI:10.1038/jhg.2013.57)
10. Isono K, Jono H, Ohya Y, Shiraki N, Yamazoe T, Sugasaki A, Era T, Fusaki N, Tasaki M, Ueda M, Shinriki S, Inomata Y, Kume S, Ando Y. Generation of familial amyloidotic polyneuropathy-specific induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 12:574–583, 2014. (doi:10.1016/j.scr.2014.01.004)
11. Huang GJ, Edwards A, Tsai CY, Lee YS, Peng L, Era T, Hirabayashi Y, Tsai CY, Nishikawa S, Iwakura Y, Chen SJ, Flint J. Ectopic cerebellar cell migration causes maldevelopment of Purkinje cells and abnormal motor behaviour in Cxcr4 null mice. *PLoS One*. 9:e86471, 2014. (doi: 10.1371/journal.pone.0086471)
12. Kanda S, Tanigawa S, Ohmori T, Taguchi A, Kudo K, Suzuki Y, Sato Y, Hino S, Sander M, Perantoni AO, Sugano S, Nakao M, and Nishinakamura R. Sall1 Maintains Nephron Progenitors and Nascent Nephrons by Acting as Both an Activator and a Repressor. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25:2584–2595, 2014 (doi:10.1681/ASN.2013080896)
13. Sakamoto H, Takeda N, Arai F, Hosokawa K, Garcia P, Suda T, Frampton J, and Ogawa M. Determining c-Myb protein levels can isolate functional hematopoietic stem cell subtypes.

Stem Cells, 33:479-90, 2014 (doi:10.1002/stem.1855)

14. Tokunaga K, Saitoh N, Goldberg IG, Sakamoto C, Yasuda Y, Yoshida Y, Yamanaka S, and Nakao M. Computational image analysis of colony and nuclear morphology to evaluate human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* 4:6996, 2014. (DOI:10. 1038/srep06996)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Kitagawa, M. and Era, T. Differentiation of mesodermal cells from pluripotent stem cells. *Int. J. Hematol.*, 91:373-83 2010. (DOI:10.1007/s12185-010-0518-8)
2. Sakamoto, H., K. Tsuji-Tamura and M. Ogawa. Hematopoiesis from pluripotent stem cell lines (Review). *Int. J. Hematol.*, 91:384-91. 2010 (doi:10.1007/s12185-010-0519-7)
3. 西中村隆一 「腎臓発生の分子機構と再生への展望」再生医療(メディカルレビュー社)9: 60-64, 2010.
4. 徳永和明、斉藤典子、習 陽、中尾光善. 組織幹細胞のエピジェネティック制御機構、最新医学、64:1286-1297, 2009.
5. Era T. Mesoderm cell development from ES cells. *Methods Mol Biol.* 636: 87-103, 2010.
6. 多能性幹細胞と中胚葉細胞 江良沢実 医学のあゆみ 239:1241-1246, 2011.
7. Era T. Pluripotent stem cell as a source of mesenchymal stem cell. *Inflammation and Regeneration.* 33:019-028, 2013 (doi:10.2492/inflammregen.33.019)
8. ES細胞からの分化 江良沢実 再生医療業書 朝倉書店.
9. 中尾光善. 3D-エピゲノムが生む新たな生命情報(基礎の基礎)、細胞工学、31: 858-862, 2012.
10. 斉藤典子、徳永和明、松森はるか、富田さおり、中尾光善. 細胞核内構造の計測・分類、細胞工学、31: 870-876, 2012.
11. 岡田光浩、江良沢実 多能性幹細胞を用いた疾患モデル/創薬への応用、希少疾患/難病の診断・治療と製品開発. 85-92, 2012.
12. 日野信次朗、中尾光善. エピジェネティック制御、シグナル伝達キーワード事典(山本雅、仙波憲太郎、山梨裕司 編集)、羊土社、327-334, 2012.
13. 太口敦博、西中村隆一 多能性幹細胞から腎臓細胞への誘導 内分泌・糖尿病・代謝内科(科学評論社) 35: 125-129, 2012.
14. 坂本比呂志、田村潔美、小川峰太郎 微小環境の血液幹細胞への働きかけー誕生から骨髄での維持まで 実験医学、31: 650-654, 2013.
15. 太口敦博、西中村隆一 腎臓の初期発生の新たなモデルと多能性幹細胞からの腎臓の組織の構築 ライフサイエンス新着論文レビュー Jan 14, 2014. on line
16. 竹林慎一郎、中尾光善. 哺乳類遺伝子発現に重要な高次エピゲノム制御、化学と生物、51: 597-599, 2013.
17. 斉藤典子、松森はるか、Mohamed O. Abdalla、藤原沙織、安田洋子、中尾光善. 核内高次構造、エピジェネティクスキーワード事典、羊土社、91-98, 2013.
18. 石原宏、中元雅史、中尾光善. 高次構造解析、エピジェネティクスキーワード事典、羊土社、282-289, 2013.
19. 斉藤典子、徳永和明、松森はるか、中尾光善. 核内ボディーの構造・機能・形成機序、染色体と細胞核のダイナミクス(平岡泰・原口徳子 編)、化学同人、147-168, 2013.
20. 阿南浩太郎、中尾光善、日野信次朗. エネルギー代謝病、遺伝子医学 MOOK25 号(エピジェネティクスと病気)(佐々木裕之、中尾光善、中島欽一 編)、メディカル・ドゥ、106-111, 2013.
21. 藤原沙織、富田さおり、中尾光善. 乳癌のエピゲノム異常と診断・治療への応用、遺伝子医学 MOOK25 号(エピジェネティクスと病気)(佐々木裕之、中尾光善、中島欽一 編)、メディカル・ドゥ、88-94, 2013.
22. 高瀬隆太、日野信次朗、中尾光善. エネルギー代謝のエピジェネティック制御と疾患、エピジェネティクスー基礎研究から産業応用への展望一、シーエムシー出版 189-197, 2014.

23. 太口敦博、西中村隆一 新しい腎臓発生モデルの構築と多能性幹細胞を用いた腎臓再生への展開 内分泌・糖尿病・代謝内科 39: 173-180, 2014.
24. 安田洋子、斉藤典子、藤原沙織、Mohamed O. Abdalla、松森はるか、坂本智代美、中尾光善. クロマチン構造と核異型. 病理と臨床、文光堂、32: 789-795, 2014.
25. 江良 択実 ES/iPS 細胞についての基礎と治療への応用 Schneller, 91: 3-9, 2014.

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 35 件、国際会議 13 件)

1. 斉藤典子、徳永明、富田さおり、木下佳世、中尾光善(熊本大学) 遺伝子の発現制御に関わる染色体間ドメインの形成機序 第 32 回日本分子生物学会年会 2009.12.10、神戸
2. 江良 択実 (熊本大学) 多能性幹細胞から間葉系幹細胞への分化 第 9 回日本再生医療学会総会 2010.3.19、広島
3. Era T. (Kumamoto University) Origin of mesenchymal stem cell. Personalized Stem Cell Medicine- A Canada-California-Japan discussion workshop. March 25-26, 2010, San Francisco
4. 西中村隆一(熊本大学) ネフロン前駆細胞からみた腎臓形成機構 第 115 回日本解剖学会 2010.3.30、岩手
5. Nishinakamura R. Progenitor cell populations in the metanephros. 11th International Workshop on Developmental Nephrology. New Paltz, NY, USA. Aug 25, 2010.
6. Nishinakamura R. Renal stem cells: Roles in the embryonic kidney. 15th Congress of the International Pediatric Nephrology Association. NY, USA. Aug 31, 2010.
7. Nishinakamura R. Nephron progenitors in the embryonic kidney. The 16th International Conference of the International Society of Differentiation: From Stem Cells to Organisms. Nara, Japan. Nov 17, 2010.
8. Era, T. Origin of mesenchymal stem cell. First European Conference on Mesenchymal Stem Cells. Toulouse, FRANCE, Nov. 18, 2010.
9. 江良 択実 難治性疾患からの iPS 細胞の樹立 第 10 回 日本再生医療学会総会 シンポジウム iPS 細胞・ES 細胞研究の最前線～夢の治療を目指して～ 東京 3 月, 2011
10. Era T. Origin of mesenchymal stem cell. 17th annual meeting of International Society of Cell Therapy (ISCT). Rotterdam, The Netherlands. May 18-21, 2011. (Invited speaker)
11. 中尾光善. エピジェネティクス機構による細胞制御と老化. 第 11 回日本抗加齢医学会総会 (シンポジウム)、京都市、2011.5.27
12. Nishinakamura R. Nephron progenitors in the embryonic kidney. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology. Fukuoka, Jun 2, 2011.
13. 江良 択実 ES/iPS 細胞の分化と臨床への応用 第 115 回 日本小児科学会学術集会 総合シンポジウム 2 iPS 細胞を利用した研究の展開 福岡 2012.4.20.
14. 江良 択実 iPS 細胞研究の進展 第 28 回 日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会 特別講演 福岡 2012.4.21.
15. 中尾光善 エピジェネティクス機構による細胞制御と病態. 第 55 回日本腎臓学会(教育講演)横浜 2012.6.2.
16. 江良 択実 初心者でも簡単。センダイウイルスベクターを使った外来因子フリー疾患由来 iPS 細胞の樹立とその応用 第 11 回 日本再生医療学会総会 ランチョンセミナー 横浜 2012.6.13.
17. Era T. Study for iPS cells derived from intractable diseases 第 18 回日本遺伝子治療学会、Corporate Seminar II、熊本、2012.6.28.
18. Era T. Studying the intractable diseases using pluripotent stem cells 第 18 回日本遺伝子治療学会、Symposium III、熊本、2012.6.29.
19. 江良 択実 多能性幹細胞から間葉系幹細胞への分化 第 33 回 日本炎症・再生医学会シンポジウム 4 間葉系幹細胞 福岡 2012.7.5.
20. Nishinakamura R. Nephron progenitors in the embryonic kidney. 第 18 回日本遺伝子治療学

- 会 熊本 2012.6.29.
21. 中尾光善 エピジェネティクス機構による細胞制御と病態. 第 35 回日本基礎老化学会大会 (特別講演) 千葉 2012.7.26.
 22. 斉藤典子、徳永和美、松森はるか、田代聡、中尾光善. 細胞核の画像定量解析による細胞状態の評価. 日本放射線影響学会第 55 回大会ワークショップ、仙台 2012.9.6.
 23. 石原宏、中尾光善. 高次エピゲノム機構による遺伝子発現の調節. 大阪大学蛋白質研究所セミナー 大阪 2012.9.27.
 24. 中尾光善. エピジェネティクス機構による細胞制御と病態. 新学術領域研究「性差構築の分子基盤」若手研究会 和歌山 2012.10.17.
 25. Nakao M. Gene regulation and cell function mediated by epigenetic factors. 8th 3R Symposium (International Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair. November 27, 2012 (Awaji, Japan)
 26. 徳永和美、斉藤典子、Goldberg Ilya G、中尾光善. 細胞核形態の定量的解析による iPS 細胞の識別. 第 35 回日本分子生物学会年会(ワークショップ:核内構造ネットワーク:分子構築と高次生命機能への寄与)、福岡 2012.12.12.
 27. 中尾光善、石原宏、斉藤典子. 高次エピゲノム機構による細胞プログラムの制御. 第 85 回日本生化学会大会(シンポジウム:生命活動における高次エピゲノム制御の分子基盤)、福岡 2012.12.15
 28. 江良沢実、濱崎 誠、房木ノエミ、難治性疾患由来 iPS 細胞の解析とバンク化、第12 回日本再生医療学会総会、横浜、2013.3.22.
 29. 江良沢実 iPS 細胞と再生医療 第14回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム 2013.9.28 東京
 30. 江良沢実 難治性疾患由来 iPS 細胞の樹立、解析とそのバンク化 第 130 回熊本小児科学会 2013.6.16 熊本
 31. 西中村隆一、太口敦博 腎臓の起源同定に基づく幹細胞からの腎臓誘導法の開発 第 119 回日本解剖学会総会シンポジウム 2014.3.29 栃木
 32. 中尾光善. エピジェネティクス機構によるエネルギー代謝調節と病態. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会(シンポジウム:糖尿病とエピジェネティクス)2013.5.18(熊本市)
 33. Nishinakamura R. The phosphatase Dullard is essential for nephron maintenance after birth. 12th International Workshop on Developmental Nephrology. Jun 24, 2013, Edinburgh, Scotland, UK.
 34. 斉藤典子、松森はるか、オサマ・アブラダ・モハメド、藤原さおり、中尾光善. 核スペckルと核小体の形成機序と機能. 第 86 回日本生化学会大会(シンポジウム:細胞核内構造体の構築原理と高次生命機能)2013.9.11(横浜市)
 35. 中尾光善. エピジェネティクス機構によるエネルギー代謝調節と病態. 第 21 回日本血管生物医学会学術集会(シンポジウム:細胞代謝が制御する動的恒常性と破綻～心血管疾患の制圧に向けて～)2013.9.27(大阪市)
 36. 中尾光善. エピジェネティクス機構によるエネルギー代謝調節と病態. 第 34 回日本肥満学会(シンポジウム:白色・褐色脂肪細胞研究の最前線)2013.10.11(東京)
 37. Hino S, Sakamoto A, Nagaoka K, Anan K, Takase R, and Nakao M. Metabolism-epigenome crosstalk through FAD/LSD1 pathway. International Symposium on Transcription and Metabolism. November 11, 2013 (Awaji, Japan)
 38. 斉藤典子、松森はるか、坂本智代美、中尾光善. 核スペckルの形成機序と遺伝子発現制御における機能. 第36回日本分子生物学会年会(ワークショップ:クロマチンと核構造のインタープレーが織りなす生命現象)2013.12.5(神戸市)
 39. 長岡克弥、日野信次朗、中尾光善. ヒストン脱メチル化酵素 LSD2 による肝細胞内脂質バランスの制御、第 3 回発生過程におけるエネルギー代謝を考える会 2014.2.14(熊本市)
 40. Nishinakamura R and Taguchi A. Redefining the *in vivo* origin of nephron progenitors enables generation of three-dimensional glomeruli and renal tubules from pluripotent stem cells *in*

vitro. The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. May 16, 2014, Tokyo, Japan

41. 西中村隆一 Redefining the *in vivo* origin of nephron progenitors enables generation of three-dimensional kidney structures *in vitro*. 第 57 回日本糖尿病学会 2014 年 5 月 24 日 大阪
42. 江良沢実 骨・代謝性疾患由来 iPS 細胞を使った疾患モデルと治療薬開発 第 35 回日本炎症・再生医学会年会 2014 年 7 月 2 日、沖縄
43. 西中村隆一 腎臓の起源同定に基づく 3 次元腎臓組織の試験管内構築 第 23 回日本小児泌尿器科学会総会 2014 年 7 月 11 日、横浜
44. Nakao M. Epigenetic cell regulation in energy metabolism and cancer. Epigenetics in development and diseases. 9th Asian Epigenomics Meeting. August 26, 2014 (Singapore)
45. Hino S, Sakamoto A, Nagaoka K, Anan K, Takase R, and Nakao M. The molecular mechanisms of metabolism-epigenome crosstalk. KEY forum: From Stem Cells to Organs. September 5, 2014 (Kumamoto, Japan)
46. 西中村隆一、太口敦博 多能性幹細胞からの 3 次元腎臓組織の誘導 第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日、京都
47. Nishinakamura R and Taguchi A. Programming stem cells toward the kidney. 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 26 日、横浜
48. 江良沢実、後藤瑞生、三輪裕幸 多能性幹細胞から間葉系幹細胞への分化 第 14 回日本再生医療学会総会 シンポジウム 20、2015 年 3 月 21 日 横浜

② 口頭発表 (国内会議 9 件、国際会議 3 件)

1. 西中村隆一 発生期におけるネフロン前駆細胞維持機構 第 54 回日本腎臓学会 横浜 2011.6.15.
2. Nishinakamura R. Nephron progenitors in the embryonic kidney. 第 34 回日本分子生物学会 横浜 2011.12.13.
3. Sakamoto, H., Takeda, N., Garcia, P., Tsuji-Tamura, K., Hirota, S., Frampton, J., Ogawa, M. Expression and function of c-Myb in hematopoietic stem cells. 第 74 回日本血液学会学術集会(京都市) 2012.10.20.
4. 竹林慎一郎、中尾光善、David M. Gilbert. 核内クロマチン相互作用解析により明らかになったマウス ES 細胞分化過程で制御を受ける染色体ドメインの特殊なクロマチン折りたたみ原理. 第 35 回日本分子生物学会年会(ワークショップ:細胞核構造体によるエピゲノム制御機構) 2012.12.12.
5. 三輪裕幸、江良沢実. 遺伝子改変マウスを用いた間葉系幹細胞の運命及び発現遺伝子の機能の解析. 第12回日本再生医療学会総会(横浜市)、2013.3.21.
6. 浜崎誠、橋爪良信、山田祥慎、片山朋彦、北條浩彦、房木ノエミ、中島康晴、古谷博和、芳賀信彦、高見陽一郎、江良沢実 Analysis of iPS cells derived from Fibrodysplasia ossificans progressiva. 第 11 回幹細胞シンポジウム 2013.5.18. 東京
7. 太口敦博、西中村隆一 腎臓の起源の新規同定とそれに基づく三次元腎臓組織誘導法の確立 第 13 回日本再生医療学会総会 2014.3.5. 京都
8. Taguchi A and Nishinakamura R. Redefining the *in vivo* Developmental Process of Nephron Progenitors Enables Generation of Three-dimensional Kidney Structures from Pluripotent Stem Cells *in vitro*. CDB symposium 2014, Mar 12, 2014, Kobe, Japan
9. Taguchi A and Nishinakamura R Redefining the *in vivo* origin of nephron progenitors enables generation of three-dimensional kidney structures *in vitro*. 腎臓初期発生の新規モデルと多能性幹細胞からの三次元腎臓組織の構築 第 47 回日本発生生物学会 2014.5.27. 名古屋
10. 太口敦博、西中村隆一 腎臓の起源の新規同定とそれに基づくヒト iPS 細胞から三次元腎臓組織誘導法の確立 2014 年 7 月 6 日、第 57 回日本腎臓学会 横浜
11. Taguchi A and Nishinakamura R. A novel model for kidney development and regeneration. 2nd Asia-Pacific Kidney Development Workshop. Sep 22-23, 2014, Queenstown, New Zealand

12. Taguchi A and Nishinakamura R. Redefining the *in vivo* origin of nephron progenitors enables generation of three-dimensional kidney structures *in vitro*. Key Forum: From Stem Cells to Organs, Sep 4, 2014, Kumamoto, Japan

③ ポスター発表 (国内会議13件、国際会議6件)

1. 續木玄太、江良択実 ES 細胞からの MSC 分化と維持 第7回宮崎サイエンスキャンプ 宮崎2、2011
2. Fusaki N, Ban H, Tabata T, Iida A, Hasegawa M, Ihn H and Era T: “Efficient generation of patient-specific iPSCs using temperature-sensitive Sendai virus vectors.” International Society of Stem Cell Research Annual Meeting (ISSCR), Toronto, Canada, 2011/6.16
3. 徳永和明、斉藤典子、小林民代、I. Goldberg、坂内誠、中尾光善. 細胞核形態の定量的解析による iPS 細胞の識別. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜パシフィコ(横浜市)、2011.12.15
4. Sakamoto H, Takeda N, Garcia P, Tsuji-Tamura K, Hirota S, Frampton J, Ogawa M: Expression and function of c-Myb in hematopoietic stem cells. 第 10 回幹細胞シンポジウム、淡路夢舞台国際会議場(淡路市)2012.5.31.
5. 三輪裕幸、江良択実. 遺伝子改変マウスを用いた間葉系幹細胞の運命及び発現遺伝子の機能の解析. 第11回日本再生医療学会総会、横浜パシフィコ(横浜市)、2012年6月14日
6. Takami Y, Hamasaki M, Yamada Y, Katayama T, Fusaki N and Era T. Generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells from the patients with intractable diseases. 10th International Society of Stem Cell Research. Jun 15, 2012, Yokohama, Japan.
7. Taguchi A and Nishinakamura R. Identification of early stage renal progenitors in E9.5 embryos by using Osr1-GFP knock-in mice. 10th International Society of Stem Cell Research. Jun 15, 2012, Yokohama, Japan.
8. Sakamoto H, Takeda N, Tsuji-Tamura K, Hirota S and Ogawa M. Levels of the c-Myb protein indicate repopulating capacity in long-term hematopoietic stem cells. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, December 8, 2012, Georgia World Congress Center, Atlanta, GA.
9. 濱崎誠、橋爪良信、山田祥慎、片山朋彦、北條浩彦、房木ノエミ、中島康晴、古谷博和、芳賀信彦、高見陽一郎、江良択実. 進行性骨化性線維異形成症からの iPS 細胞の樹立. 第 12 回日本再生医療学会総会(横浜市)、2013年3月22日
10. Hamasaki M, Hashizume Y, Katayama T, Houjo H, Fusaki N, Nakajima Y, Furuya H, Haga N, and Era T. iPS cells derived from Fibrodysplasia ossificans progressive. INTERNATIONAL SOCIETY FOR STEM CELL RESEARCH 11th annual meeting. Boston, June 13th, 2013.
11. 曾我美南、房木ノエミ、濱崎誠、米田香織、中村公俊、松尾宗明、入江徹美、遠藤文夫、江良択実 ニーマンピック病C型由来iPS細胞を使った疾患モデル作製とシクロデキストリン治療効果解析 第30回シクロデキストリンシンポジウム 熊本市、2013.9.13
12. 鈴木陽輔、江良択実 新規がん遺伝子 Arid3b と Mycn による腫瘍形成メカニズムの解析 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜市 2013.10.5.
13. 續木玄太、江良択実 Guided differentiation from ES/iPS cells to mesenchymal stem cells、第 75 回日本血液学会学術集会、札幌市、2013.10.12.
14. 坂本比呂志、竹田直樹、田村潔美、廣田冨香、橋口篤史、Tanzir Ahmed、小川峰太郎: Dormant hematopoietic stem cells suppress c-Myb protein to low level. 第 75 回日本血液学会学術集会、札幌市、2013.10.12.
15. 濱崎誠、橋爪良信、片山朋彦、北條浩彦、房木ノエミ、中島康晴、古谷博和、芳賀信彦、江良択実 Analysis of iPS cells derived from Fibrodysplasia ossificans progressiva. 第7回武田科学振興財団薬科学シンポジウム、大阪市、2014.1.16-18.
16. 濱崎誠、橋爪良信、片山朋彦、北條浩彦、房木ノエミ、中島康晴、古谷博和、芳賀信彦、江良択実 進行性骨化性線維異形成症iPS細胞の樹立と解析 第10回宮崎サイエンスキャンプ、宮崎市、2014.2.14.

17. 曾我美南, 濱崎誠, 米田香織, 中村公俊, 松尾宗明, 入江徹美, 遠藤文夫, 江良択実 ニーマンピック病 C 型由来 iPS 細胞を使った疾患モデルの確立 第 10 回宮崎サイエンスキャン
プ、宮崎市、2014.2.14.
18. 曾我美南, 房木ノエミ, 濱崎誠, 米田香織, 中村公俊, 松尾宗明, 入江徹美, 遠藤文夫, 江良択実 ニーマンピック病 C 型由来 iPS 細胞を使った疾患モデルの確立 第 13 回日本再生
医療学会総会 京都市 2014.3.5
19. Soga M, Hamasaki M, Yoneda K, Nakamura K, Matsuo M, Irie T, Endo F and Era T.
Establishment of disease model using induced pluripotent stem cells derived from
Niemann-Pick disease type C INTERNATIONAL SOCIETY FOR STEM CELL RESERCH
12th annual meeting. Vancouver, June 18th, 2014.

(4)知財出願

①国内出願 (5件)

1. 発明の名称:誘導多能性幹細胞の識別方法
発明者:中尾光善、斉藤典子、徳永和明、小林民代
出願人:オリンパス株式会社、国立大学法人熊本大学
出願日:2011/4/15
出願番号:特願 2011-091405
2. 発明の名称:物質のスクリーニング法
発明者:江良択実
出願人:国立大学法人熊本大学
出願日:2011/9/12
出願番号:特願 2011-197931
3. 発明の名称:骨分化誘導方法及び骨化促進・抑制分子のスクリーニング方法
発明者:江良択実
出願人:国立大学法人熊本大学
出願日:2013/2/21
出願番号:特願 2013-032333
4. 発明の名称:多能性幹細胞からの腎臓誘導法
発明者:西中村隆一、太口敦博
出願人:国立大学法人熊本大学
出願日:2013/10/18
出願番号:特願 2013-217029
5. 発明の名称:コレステロール蓄積疾患治療薬、およびそのスクリーニング方法
発明者:江良択実、入江徹美
出願人:国立大学法人熊本大学
出願日:2013/12/5
出願番号:特願 2013-252174

②海外出願 (2件)

1. 発明の名称:物質のスクリーニング方法
発明者:江良択実
出願人:国立大学法人熊本大学
出願日:2012/9/12
出願番号:PCT/JP2012/073272
2. 発明の名称:骨分化誘導方法及び骨化促進・抑制分子のスクリーニング方法
発明者:江良択実
出願人:国立大学法人熊本大学
出願日:2014/2/20

出願番号:PCT/JP2014/ 54055

3. 発明の名称:多能性幹細胞からの腎臓誘導法

発明者:西中村隆一、太口敦博

出願人:国立大学法人熊本大学

出願日:2014/10/16

出願番号:PCT/JP2014/077601

(5)受賞・報道等

①マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 中尾光善:新聞・通信等で、脂肪細胞におけるエネルギー代謝の制御機構に関する研究成果をプレス発表した(平成 24 年 3 月 28 日)。
2. NHK の全国ニュースで研究代表者の江良沢実の iPS 細胞を使った研究が紹介された(10 月 21 日)
3. 西中村隆一:NHK、TBS、熊本民放各局、日本経済新聞、朝日新聞、読売新聞、日刊工業新聞、熊本日々新聞、西日本新聞等 「世界で初めてヒト iPS 細胞から3次元腎臓組織作成に成功」 2013 年 12 月 13 日、プレス実施

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

本研究での成果を基に、新たに iPS 細胞を用いて骨・軟骨細胞等を分化誘導し、創薬解析研究に適した基盤を作るという厚生労働科学研究補助金 課題名「外来因子フリー難病由来 iPS 細胞のライブラリー構築とそれを使った疾患モデルと薬剤開発」(H25～29)に採択された。

②社会還元的な展開活動

得られた成果を難病支援団体が主催するいくつかの公開シンポジウムや講演会にて講演、その後、患者とそのご家族らと公開討論(質疑応答)を行ない、広く患者や市民らに iPS 細胞研究の必要性を説き、その成果を公開した。

§ 5 研究期間中の活動

(1) 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 22 年 8 月 18 日	くまもと県民カレッジ	くまもと県民交流会館パレア	40 人	iPS 細胞の再生医療への応用について市民に紹介した。
平成 22 年 10 月 2 日	市民公開シンポジウム	熊本県立劇場	150 人	iPS 細胞を利用した難治性疾患治療への応用について市民や難治性疾患の患者へ紹介した。
平成 23 年 6 月 3 日	八代中学校生徒の発生医学研究所見学会	熊本大学	80 人	iPS 細胞の再生医療への応用について講義を行った。
平成 23 年 7 月 10 日	市民・研究者公開シンポジウム	東京国際フォーラム	150 人	iPS 細胞の再生医療への応用について市民に紹介した。
平成 23 年 7 月 15 日	市民公開シンポジウム	熊本県難病相談・支援センター	150 人	iPS 細胞を利用した難治性疾患治療への応用について市民や難治性疾患の患者へ紹介した。
平成 23 年 9 月 10 日	腎臓病患者連絡協議会九州ブロック会議	宮崎市	30 人	iPS 細胞の再生医療への応用について患者や市民に紹介した。
平成 23 年 9 月 29 日	熊本赤十字病院での公開講演会	熊本市	100 人	iPS 細胞の再生医療への応用について医師、患者や市民に紹介した。
平成 23 年 11 月 19 日	市民公開シンポジウム 文部科学省 iPS 細胞等研究ネットワーク第3回合同シンポジウム	京都市	500 人	iPS 細胞の再生医療への応用について市民に紹介した。
平成 24 年 1 月 13 日	第 166 回 九州血液懇話会	福岡市	100 人	iPS 細胞の再生医療への応用について医師、研究者に紹介した。
平成 26 年 2 月 14 日	第 3 回発生過程におけるエネルギー代謝を考える会	熊本大学	70 人	若手研究者の活動促進のためのミーティング
平成 26 年 9 月 4-5 日	Key Forum: From Stem Cells to Organs	熊本大学	185 人	幹細胞と臓器形成についての国際シンポジウムを主催
平成 27 年 2 月 23 日	iPS 細胞を用いた疾患研究 科学者達による難病への挑戦 成果発表シンポジウム	東京有楽町	150 人	iPS 細胞を用いた疾患研究について CREST の成果を発表

§ 6 最後に

1. 研究の達成度

当初の計画では、ヒト iPS 細胞から誘導した MSC をマウスを使ったヒト疾患モデルに投与してその効果を確認するところまで行なう予定であったが、疾患モデルの条件樹立に時間がかかり、そこまでは到達しなかった。また、MSC 特異的に発現している分子について同定リストまでは作成したが、その機能解析は現在進行中である。これらの研究は、しっかり終了させ、MSC とは何かに答えて行きたい。造血幹細胞は未だにうまく誘導できていない。これも次の課題と考えている。

一方、腎臓細胞の iPS 細胞からの誘導や iPS 細胞のエピゲノムの解析は予定どおり、あるいは、予定以上に成果があがりよかったと考えている。

2. 今後の研究の展開

1) この研究での成果を応用した再生医学研究への展開を考えている。前述したように、モデル動物の疾患への効果が見られれば、すぐにでも応用研究を行いたい。

2) 疾患への創薬研究

今後の展開の部分にも書いたことに加えて、本研究と直接関連は無いのであるが、本研究で得られた iPS 細胞の維持や分化誘導方法を利用して、治療方法が無い先天代謝疾患の治療薬候補を発見した(論文投稿中)。これは、その成果が認められて、文部科学省橋渡し研究加速ネットワークプログラムのシーズ B として、拠点外であるのにもかかわらず、採択された。現在、非臨床試験を遂行中で、3 年程度で First in a human を目指している。現在、医薬基盤研等が中心となっていて創薬ネットワークでの支援課題にもほぼ内定して、来年度から支援を受ける予定となっている。これらは、すべてこの CREST 研究がなければ、そもそも始めることすらなかった研究であるから、非常に感謝しているし、できるだけ早くこの新薬をベットのサイドへ届けたいと考えている。また西中村グループが確立した腎臓細胞のヒト iPS 細胞誘導では、疾患由来 iPS 細胞を使った新しい研究を展開中である。これは、腎臓細胞誘導が国内外で成功している例がほとんどないことから、他の研究室の追随を許さない独自性と独創性が高い優れた研究へと発展できると期待している。

3. プロジェクト運営、おわりに

代表者としてプロジェクトの運営を初めてこの CREST 研究で行なった。また、教室を持って直後のサポートということもあり、何よりも安定して大型の研究費を 6 年もの間、提供していただいたのは非常にありがたく、感謝、感謝である。

最後に、研究を一緒に行った教室の仲間や研究分担者グループの方々にお礼を述べると共に、研究総括の須田先生をはじめアドバイザーの先生方、並びに、JST の担当者である、鈴木様、吉益様に厚くお礼を申し上げます。

ありがとうございました。