「iPS 細胞と生命機能」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成25年度中間評価実施研究課題－

研究総括　西川　伸一

1．研究領域の概要

本研究領域は、日本発となる iPS 細胞を樹立する技術によって大きなブレークスルーがもたらされると考えられる分野、すなわち、細胞のリプログラミング、分化転換、幹細胞生物学などを対象としている。また、これまでにはない自由で創意に満ちた発想による基礎研究とともに、医療などに将来貢献できる基礎研究も対象としている。

具体的には、1）リプログラム機構の分子レベルでの解析に基づくリプログラミング技術の高度化・簡便化、2）幹細胞分化転換過程の解析と人的調節、3）iPS 細胞を用いたエピジェネティック過程の分子機構解析、4）iPS 細胞を駆使する疾患発症機構の解析、5）ヒト疾患モデルの構築などの研究を対象とする。

これら研究の成果は、疾患の原因の解明や新治療薬の開発に寄与するとともに、倫理的問題や拒絶反応のない細胞移植療法の実現に向けて貢献できるものと信じている。

2．中間評価対象の研究課題・研究者名

件数：　2件（うち、通常型2件）

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3．研究実施期間

平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月（※平成 28 年 3 月終了予定）

4．中間評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会（領域会議等）での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

（中間評価の流れ）

平成 26 年 1 月　評価会開催

平成 26 年 1 月　研究総括による中間評価

平成 26 年 2 月　被評価者への結果通知、研究計画見直し

5．中間評価項目

（1）研究の進捗状況と今後の見込み

（2）研究成果の現状と今後の見込み

6．評価結果

第三期・五年型の研究者2名については、ほぼ期待通りの研究成果が現時点で得られつつあるが、さらなる研究進展を目指して頑張っていただくとともに、今後とも最大限の研究支援を行いたいと考える。なお各研究者の現時点での研究成果とそれに対する中間評価を、以下に個別に記載する。

1．下島　圭子　研究者　「疾患 iPS 細胞を用いた大脳皮質構造形成メカニズムの解明」

さきがけ研究開始当初、iPS 細胞樹立やその神経細胞への分化誘導に苦労していた事を考えると、この中間評価時点においても、既に患者さんから iPS 細胞を樹立し、一部病態の解析まで辿り着けたのは期待以上の進展であり、評価に値する。元々、小児神経疾患の遺伝学では十分な実績があり、また症例蓄積もあり、それぞれの患者さんは病態解析が進む事を心待ちにしている。従って、さきがけの残り期間、治療可能性を念頭に置いて、計画通りに着実に本研究を推進すれば良いと考えている。また既に Proof of concept は確立することが出来たので、終了後においても患者さんのための研究を持続できるよう、基礎・基盤を固めてくれるよう期待する。

2．竹内　純　研究者　「心臓細胞未分化性とクロマチン結合因子群」

研究計画は正攻法で心臓幹細胞に迫ろうとしており、時間や手間を惜しまず必要な材料を用意している点

は評価できる。また従来の論文実績も十分であるが、唯一の懸念は、本研究成果に関する論文が投稿中、あるいは準備中である点である。研究計画から考えて、一つの仕事に時間がかかるのは予想できるが、最終的な評価が論文でなされる事を念頭に置き、論文発表に最大の努力を払う事が重要である。従って現時点で、投稿中、準備中の論文の掲載を最優先に考えて欲しい。その上で、さきがけ研究期間の残りで、大量調製された細胞を用いて、計画通りエピジェネティック因子の解析へと進むことを期待する。

7.　評価者

研究総括　西川　伸一　　JT 生命誌研究館　顧問

領域アドバイザー（五十音順。所属、役職は平成 26 年 3 月末現在）

石野　史敏　　東京医科歯科大学　難治疾患研究所・教授
岡野　栄之　　慶応義塾大学　医学部・教授
相賀　裕美子　情報−システム研究機構　国立遺伝学研究所・教授
中内　啓光　　東京大学　医科学研究所・教授
丹羽　仁史　　理化学研究所　発生・再生科学総合研究センター・プロジェクトリーダー
花園　　豊　　自治医科大学　分子病態治療研究センター・教授
春山　英幸　　第一三共 RD ノバーレ株式会社・代表取締役社長

（参考）

件数はいずれも、平成 26 年 1 月末現在。

（1）外部発表件数

	国　内	国　際	計
論　文	0	7	7
口　頭	18	14	32
その他	9	0	9
合　計	27	21	48

（2）特許出願件数

国　内	国　際	計
1	1	2

（3）受賞等

・竹内　純

ゴットフリード・ワグネル賞 2010　ドイツイノベーションアワード（平成 24.5）
万有生命科学振興国際交流財団　第一回万有医学奨励賞　優秀賞（平成 24.12）

（4）招待講演

国際　7 件
国内　12 件

別紙

「iPS 細胞と生命機能」領域　中間評価実施　研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 （参加形態）	研　究　課　題　名 （研究実施場所）	現　職（平成 26 年 3 月末現在） （応募時所属）	研究費（3 年間） （百万円）
下島　圭子 （専任）	疾患 iPS 細胞を用いた大脳皮質構造形成メカニズムの解明 （東京女子医科大学　統合医科学研究所）	（独）科学技術振興機構　さきがけ研究者 （東京女子医科大学　統合医科学研究所　研究生）	76
竹内　純 （兼任）	心臓細胞未分化性とクロマチン結合因子群 （東京大学　分子細胞生物学研究所）	東京大学　分子細胞生物学研究所　准教授 （同上）	79

研 究 報 告 書

「疾患 iPS 細胞を用いた大脳皮質構造形成メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 28 年 3 月

研 究 者: 下島 圭子

1. 研究のねらい

ヒトの中枢神経は胎児期における神経細胞の遊走によって形成される。側脳室に面した脳室帯と呼ばれる増殖層において神経前駆細胞から最終分裂の結果生成された神経細胞が脳表に向かって移動し、あとから遊走してきた細胞がより脳表に到達する inside-out のパターンによって全6層からなる大脳皮質が形成される。この神経細胞の遊走異常により、滑脳症や多小脳回などの脳形成障害を生じ、発達障害やてんかんの原因となる。滑脳症は脳形成障害のうち最も重篤で重度の精神運動発達遅滞をきたし、生涯寝たきりとなることが多い。近年のゲノム解析技術の進歩により、脳形成障害の原因となる遺伝子が次々と明らかにされている。*LIS1* や *RLN*、*FLNA*、*DCX*、*ARX*、*TUBA1A*、*TUBB2B*、*TUBB3* など、細胞の骨格形成や接着に関わる遺伝子が多くを占めている。このうち 17 番染色体短腕末端に位置する *LIS1* は、1992 年にハプロ不全によって滑脳症を生じることが Miller-Dieker 症候群における genotype-phenotype 関連解析によって明らかにされた。モデルマウスも作成され、*LIS1* の細胞遊走における機能もかなり明らかになってきた。しかし、ヒトにおける病態はまだ完全に明らかになったわけではない。ヒトにおける病態解析が困難な理由として患者の脳組織を採取したり中枢神経細胞を生きたまま採取したりすることができないということが挙げられる。疾患 iPS 細胞の利用はこの状態に風穴を開けることに成功した。脳形成障害患者から皮膚線維芽細胞を採取し iPS 細胞を樹立し、生体外で神経系細胞に分化誘導させることで、胎児期に起こった脳の発生、あるいは形成過程を再現することが可能となったのである。本研究では、まず脳形成障害の原因となったゲノム変異が明らかな患者から皮膚線維芽細胞を採取して iPS 細胞を樹立し、in vitro で神経系細胞に分化誘導させることにより病態解析を行い、これまでのモデル動物による研究では明らかになっていないヒト固有の病態を明らかにし、今後の疾患 iPS 細胞によるヒトの中枢神経疾患の病態解析のモデルとすることを目指した。本研究において脳形成障害を対象としたのは発生初期の段階から神経細胞遊走障害を生じるため、疾患 iPS 細胞からの分化誘導で病態を再現しやすいモデルと考えたからである。疾患 iPS 細胞を用いた病態解析の手法を確立させることで、次の段階として、より発症頻度が高く、社会的インパクトの高い自閉症や発達障害などについて、神経細胞レベルでの病態解析に応用していきたいと考える。

2. 研究成果

(1)概要
本研究の目的は、ヒト疾患患者由来 iPS 細胞を使った中枢神経の病態解析を行うことである。特に遺伝的要因により先天的な発達障害を示す疾患の病態解析を行うことを目的としている。この目的のためには、疾患の原因となるゲノム変異が明らかな発達障害患者から疾患

iPS 細胞を樹立することが何よりも重要となる。次に、得られた疾患 iPS 細胞を神経系細胞に分化誘導する系を確立させ、疾患の病態に迫る解析を行うことが必要となる。

そこで本研究においては、これまでの先行研究において、発達障害を来たしたゲノム変異が明らかな 12 疾患、計 22 人から皮膚線維芽細胞を採取し、そのうち 13 人に関して iPS 細胞の樹立に成功した。得られた疾患 iPS 細胞のうち２－４割において何らかのゲノムコピー数の変化が 2 次的に生じていたため、それらを除外して次の病態解析に供した。iPS 細胞は、浮遊培養を経て接着培養を行う SFEBq 法を用いて神経系細胞に分化誘導した。qPCR による遺伝子発現定量や免疫組織学的解析により神経系細胞への分化を確認した。

この系を用いて、モデル動物での解析報告がある *LIS1* 異常による脳形成障害について、解析のモデルとして先行して解析することとした。脳形成障害の中でも滑脳症は極めて稀な疾患であり、ゲノム変異が明らかな患者は非常に限られるが、先行研究により、*LIS1* のハプロ不全により滑脳症を示した患者を特定しており、皮膚線維芽細胞の提供を受けて患者由来 iPS 細胞を樹立し、神経系細胞に分化誘導し、分化の過程での遺伝子発現の状況を正常対象と比較検討した。これにより、特定の遺伝子（gene X）の発現が低下していることを明らかにした。この結果が神経細胞の遊走障害に普遍的に関連しているものかどうかを検証するために、*LIS1* 変異ではなく、*TUBA1A* 変異による滑脳症患者由来 iPS 細胞でも検証したところ、同様に発現が低下していた。胎児期脳切片における gene X の発現を確認したところ、神経細胞が遊走する在胎 26-28 週の胎児脳において発現が確認され、特に遊走中の神経細胞で発現が認められたことから、この遺伝子が神経細胞における遊走に関連していることが明らかとなった。現在、タイムラプス解析により、神経細胞の遊走能を検証中である。

このほか、世界で初めて複数例の先天性大脳白質形成不全症患者から疾患 iPS 細胞を樹立し、そのうち極めて稀な *PLP1* の部分的な重複例において、*PLP1* の発現が null になっていることが発症原因であることを明らかにした。

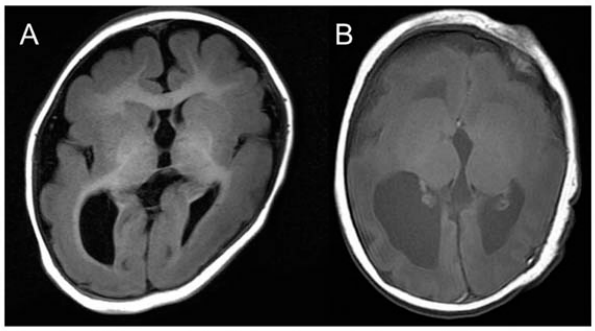
（2）詳細

研究テーマ A「中枢神経疾患患者由来 iPS 細胞の樹立と神経系細胞への分化誘導」

本研究の目的は、ヒト疾患患者由来 iPS 細胞を使った中枢神経の病態解析を行うことである。特に遺伝的要因により先天的な発達障害を示す疾患の病態解析を行うことを目的としている。この目的のためには、疾患の原因となるゲノム変異が明らかな発達障害患者から疾患 iPS 細胞を樹立することが何よりも重要となる。次に、得られた疾患 iPS 細胞を神経系細胞に分化誘導する系を確立させ、疾患の病態に迫る解析を行うことが必要となる。

そこで本研究においては、これまでの先行研究において、発達障害を来たしたゲノム変異が明らかな 12 疾患、計 22 人から皮膚線維芽細胞を採取し、そのうち 13 人に関して iPS 細胞の樹立に成功した。皮膚線維芽細胞の採取においては、家族から研究の趣旨への賛同が得られ、書面によるインフォームド・コンセントが得られた患者を対象とした。なお、本研究は実施施設である東京女子医科大学の倫理委員会の承認を得て行っている。研究に着手した当初の 6 例においてはレンチ・レトロウイルスによる遺伝子導入により iPS 細胞を樹立した。レンチ・レトロウイルスによる樹立法では染色体への integration が起こるため、より natural でより簡便なエピソーマルベクターによる遺伝子導入法を導入し、以後、9 例においてこの方法で

iPS 細胞を樹立した。



本研究で対象とした滑脳症の2例。（A）*LIS1*欠失による滑脳症。（B）*TUBA1A*変異による滑脳症。

得られた iPS 細胞に関して、レンチ・レトロウイルスによる樹立法の場合には導入した外来性遺伝子のサイレンシングを RT-PCR で確認し、エピソーマルベクターによる方法の場合にはベクタープラスミドの残存を genomic PCR で確認する系を確立した。得られた iPS 細胞の多能性の評価をアルカリフォスファターゼ染色、qPCR、免疫組織染色にて確認する系を確立した。2 次的な染色体再構成については、染色体標本を作製して G-band 法で確認し、さらに元の皮膚線維芽細胞から抽出した DNA をリファレンスサンプルとして利用し、アレイ CGH 法を行うことにより微細な 2 次的ゲノムコピー数変化の発生を検証する系を確立した。

レンチ・レトロウイルスによる樹立法の場合には導入した外来性遺伝子がサイレンシングされていない株が 2-3 割存在した。エピソーマルベクターによる方法の場合には約 1 割でベクタープラスミドの残存が認められた。多能性の評価ではほぼ全ての株がクリアできた。染色体再構成に関しては、G-band 法で明らかになる変化は認められなかったが、２－４割の株において何らかの 2 次的ゲノムコピー数変化が生じていた。正常対象とされた細胞にもゲノムコピー数の変化が認めるものがあった。これらの全ての評価をクリアし、真に解析に供することができる iPS 細胞を 1 例につき複数株選定することができた。

iPS 細胞の神経系細胞への分化誘導は、理化学研究所が開発した SFEBq 法を modify して用いた。具体的には iPS 細胞コロニーをばらばらにして細胞を正確にカウントし、低吸着 dish 上で浮遊培養を行い、8 日後にマトリゲルコートした dish 上で接着培養を行うことで成功した。神経系細胞への分化誘導の成否は、qPCR による遺伝子発現定量や免疫組織学的解析によって行った。正常コントロールの iPS 細胞では 56 日まで培養することができ、Tuj や Maps の発現を確認できた。

研究テーマ B「疾患 iPS 細胞による先天性大脳皮質形成障害における病態解析」

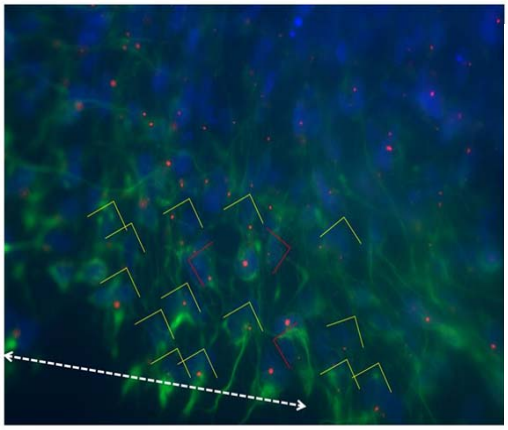
研究テーマAで確立した iPS 細胞から神経系細胞に分化誘導する系を用いて、疾患患者由来 iPS 細胞を用いた病態解析に着手した。大脳皮質形成障害患者由来 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞においては、分化誘導の比較的初期から何らかの形態的な変化を示すことが予測される。したがって病態解析モデルとしてふさわしいと考え、まず大脳皮質形成障害患者由来 iPS 細胞を用いた病態解析に着手した。

ヒトの大脳新皮質はモデル動物に比して非常に発達しており、そのことがヒトの知能が他の動物と比べて著しく発達している要因となっている。ヒトの脳が進化し得た理由として、ヒト固有であって、モデル動物にはホモログが存在しない分子が脳形成障害に関連していることも明らかになりつつある。その中で、*LIS1* は種を超えて細胞遊走の重要な役割を果たしており、モデル動物を用いた細胞レベルでの解析も進んでいる。*LIS1* は細胞内微小管結合蛋白であり、微小管の重合と安定性に関わっている。*LIS1* 機能障害があると、核-中心体連結に

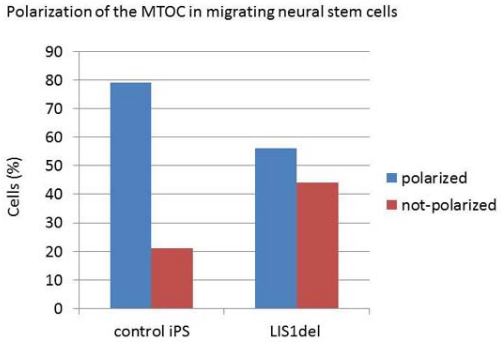
障害が生じ、細胞遊走障害を来たすことで脳形成障害を生じると考えられている。大脳皮質形成障害は非常に稀な疾患である上に、原因となる遺伝子は多岐に亘ることが明らかになっており、疾患 iPS 細胞研究を用いた病態解析を行うためには、その患者のゲノム異常が特定できていることが何よりも重要である。今回、先行研究により、滑脳症患者において *LIS1* のハプロ不全を明らかにすることができた。この貴重な症例を対象として、疾患 iPS 細胞による病態解析を行うこととした。

LIS1 ノックアウトマウスなどを利用した細胞レベルでの研究成果の報告はあるが、*LIS1* のハプロ不全による滑脳症患者において、ヒト固有神経細胞での遺伝子発現状態に関する報告はない。そこでまず患者由来 iPS 細胞を神経系細胞に分化誘導し、分化の過程での遺伝子発現の状況をマイクロアレイを用いた網羅的解析により、正常対象と比較検討することとした。この解析により、gene X の発現が低下していることが明らかになった。gene X は細胞遊走障害を示す遺伝子のスクリーニングで明らかになった遺伝子であるが、その機能の詳細は明らかでない。次に gene X の発現低下が単に *LIS1* のハプロ不全によるものか、神経細胞の遊走障害に普遍的に関連しているものかどうかを検証することとした。この目的のために、*LIS1* 以外の遺伝子異常で生じた滑脳症患者由来 iPS 細胞を利用することとした。並行して行っていた滑脳症患者のゲノム解析で、*TUBA1A* の de novo 変異を同定することができた。この患者からも iPS 細胞を樹立し、神経系細胞に分化誘導して qPCR による発現定量を行ったところ、gene X は *TUBA1A* 変異を有する細胞においても発現低下を示していた。このことは gene X の発現が、単に *LIS1* のハプロ不全を直接的に反映しているのではなく、細胞遊走異常の結果を反映していることを示唆している。次に gene X が脳内で時間的・空間的にどのように発現しているかを検証した。この目的のため、ヒトの脳切片における免疫組織染色を行った。その結果、gene X は、神経細胞が遊走する在胎 26-28 週の胎児脳において発現が確認され、特に遊走中の神経細胞で発現が認められた。このことから、gene X はまさに神経細胞における遊走に関連している遺伝子であることが明らかとなった。この結果は現在論文として投稿中である。

上記の研究で用いた疾患 iPS 細胞を用いて、細胞の遊走障害を直接的に解析することを検討している。実際、患者由来細胞では接着培養後からの遊走が視覚的にも遅いことが見受けられた。この事象を統計的に検証するため、まず、細胞における pericentrin と細胞核と



細胞核(blue)とpericentrin(red)の位置関係を計測し、進行方向に向かって45° 以内をpolarized (yellow)とした。



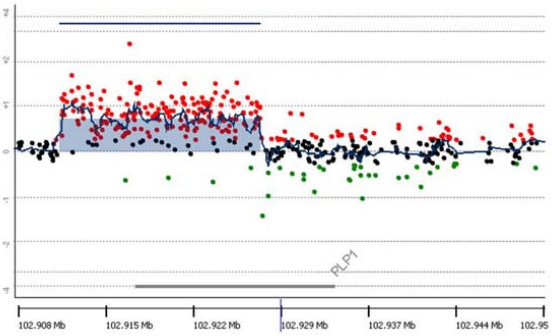
The frontier line of the outgrowth area から45° 以内を polarized として解析した

の位置を計測し、polarization（極性）が整然と行われているかどうか検討した。Pericentrin は *LIS1* 分子が接着し、細胞を遊走させるためのアンカーとなる分子である。細胞が直線的に遊走していれば、Pericentrin と細胞核の位置関係は常に一定のはずである。しかし、この手法で得られた結果では、*LIS1* 欠失患者由来細胞では not-polarized が優位に上昇していた。この現象をさらに検証するため、遊走中の細胞を経時的に撮像し、タイムラプス解析を行うことを検討した。予備実験において、微分干渉である程度細胞遊走を観察することができたため、次にレンチウイルスにより iPS 細胞に GFP を導入して観察中である。今後神経細胞に分化誘導させ、タイムラプス解析により遊走能を検証する予定である。

研究テーマ C「疾患 iPS 細胞による先天性大脳白質形成不全の病態解析」

先天性大脳白質形成不全症は、出生直後から筋緊張低下、眼振、喉頭喘鳴などを示し、次第に運動発達の遅れや四肢の痙性麻痺を来たす希少神経難病である。大脳白質を構成する神経細胞の軸策を取り囲む髄鞘の先天的な形成不全が疾患の本質である。そのため MRI による頭部画像診断で大脳白質における特徴的なシグナルパターンから診断されることが多い。原因遺伝子が複数明らかになっているが、最も頻度が高く認められるのが X 染色体に位置する proteolipid protein 1 (*PLP1*)遺伝子の変異ないし重複である。この場合 X 連鎖劣性遺伝形式をとるため基本的に患者は男性であり、女性は保因者となる。*PLP1* は中枢神経のオリゴデンドロサイト（髄鞘形成細胞）で高発現しており、ミスセンス変異のために高次構造に変化を来たした PLP1 タンパクがオリゴデンドロサイトの小胞体に蓄積し、小胞体ストレスを誘発してアポトーシスを来たすことが発症原因であると理解されている。*PLP1* の重複も PLP1 発現の over dose からアポトーシスを誘発すると考えられている。これまでに多くの先天性大脳白質形成不全症患者のゲノム解析に関わり、さまざまなミスセンス変異や多彩なサイズのゲノム重複を明らかにしてきたが、その中で過去に報告の無い *PLP1* の部分重複を同定した。しかし、この部分重複がミスセンス変異例や重複例のような発症メカニズムで説明できるかどうか明らかでなかったため、*PLP1* の発現状況を解析することを考えた。

ここで問題になるのが *PLP1* の発現解析のためのサンプル収集である。*PLP1* は中枢神経のオリゴデンドロサイトで高発現しているものの、他の臓器・組織ではほとんど発現していない。iPS 細胞における発現状態は知られていなかったため、in-silico library から遺伝子発現データをダウンロードして皮膚線維芽細胞と比較検討したところ、iPS 細胞では皮膚線維芽細胞に比べ、30 倍以上高い発現を示していることが明らかとなった。そこで、*PLP1* の部分重複例に全 *PLP1* 領域の重複例、ミスセンス変異例、さらに正常男性コントコールを加え、全 4 例の iPS 細胞を樹立し、各 3 株ずつ選定した。そして、ノーザンブロッティングで *PLP1* の発現を解析したところ、部分重複例だけは *PLP1* の発現が null になっていることを明らかにした。



アレイCGH法で明らかになった*PLP1*の部分重複

この研究においては iPS 細胞の分化誘導を行わなかった。それは神経系細胞に分化誘導すると、*PLP1* 重複例やミスセンス変異例においては PLP1 がストレスを引き起こし、結果的にアポトーシス誘発を来して一見 *PLP1* 発現が低下した状態を再現してしまう恐れがあると考えられたからである。今回樹立した疾患 iPS 細胞のオリゴデンドロサイトにおける病態の解析は、今後共同研究者と連携して行っていく予定である。

研究テーマ D「疾患 iPS 細胞による中枢神経発達障害の病態解析」

本研究においては、脳形成障害を病態解析のモデルとして選定し、まず着手した。本研究で確立した疾患 iPS 細胞の樹立方法と評価法、そして神経系への分化誘導法や細胞遊走の解析方法などを、モデル動物では解析できないヒト固有分子の解析に応用することを目指している。本研究に先立ちすでに樹立している多くの発達障害関連疾患 iPS 細胞を用いて、神経細胞レベルでの病態解析を行っていく予定である。それらの疾患には、*SCN1A* 変異による難治てんかん脳症や *CDKL5* 欠損による重度知的障害、*ARFGEF9* による自閉性障害などの中枢神経発達障害が含まれる。

3.　今後の展開

これまでの研究によって疾患患者由来 iPS 細胞の樹立と評価、そして神経細胞への分化誘導を行う系が確立した。そして分化誘導できた神経細胞の遊走能を評価する系もほぼ確立してきた。これから得られる正常対象と *LIS1* 異常などによる脳形成障害患者のデータを基礎データとして、今後様々な疾患における細胞遊走能を評価する計画である。21 trisomy などのように、MRI による頭部画像診断では脳形成障害が認められない疾患であっても、ミクロのレベルでは大脳皮質の層構造の乱れが認められたりすることが知られている。希少疾患のため剖検による病理所見が明らかでない疾患、またヒトホモログがなく、モデル動物では解析できない遺伝子の異常を示す患者における病態解析においてはこの手法が有効であると考える。

分化誘導した神経細胞レベルでの遺伝子発現状態の解析も有効な方法である。本研究においては脳形成障害患者に共通して認められる遺伝子発現変化から、細胞遊走に関わる可能性が高い遺伝子を明らかにすることができた。正常対象と比較することにより、まだ明らかになっていない神経細胞内での遺伝子発現変化を明らかにすることができると考える。

本研究では基本的に疾患患者由来 iPS 細胞を使った病態解析を目指してきた。しかしながら、患者由来細胞を得るためには希少な患者の情報を得る必要があり、誰からでも得られるものではない。皮膚線維芽細胞を得るには皮膚のバイオプシーが必要になる。バイオプシーは比較的侵襲性が低いとは言え、同意が得られない場合もある。そのため、中枢神経発達障害に重要な役割を果たす遺伝子の変異による影響を iPS 細胞を使って再現するためには、ノックダウンやノックインと言った手法で正常細胞に変化を加えて病態を解析することも必要と思われる。疾患 iPS 細胞でのノウハウを今後より広い分子の解析にノックダウンやノックインと言った手法を用いて取り組んで行くことを計画している。

4.　評価

（1）自己評価

本研究においては、臨床医として診断に関わる立場から、患者由来疾患 iPS 細胞を小児神経難病の病態解析に、そして治療研究に結び付けたいという思いで取り組んできた。先天性大脳白質形成不全症に関しては、以前から継続して遺伝子診断に関わってきており、過去に報告の無い *PLP1* 部分重複例を同定できた。そして、世界で初めて先天性大脳白質形成不全症患者由来 iPS 細胞を樹立して遺伝子発現状態を解析し、論文発表することができた。この疾患の研究に携わる医師として、1つの礎を築くことができたものと考える。先天性大脳白質形成不全症に関しては、病態の本質であるオリゴデンドロサイトへの分化誘導法が確立していない状態であり、今後は多施設共同研究としてさらに前進させたい。

白質障害に比べ、大脳皮質形成不全は疾患 iPS 細胞による病態解析のモデルとなると考え、中心的テーマとして取り組んできた。自ら診断した患者から疾患 iPS 細胞を樹立し、解析に供することが可能かどうかを検証するシステムを確立させ、神経系細胞への分化誘導法も確立できた。2 人の脳形成障害患者由来 iPS 細胞を使って新たな細胞遊走因子を同定でき（現在投稿中）、形にすることができた。このことで当初の予定はほぼ達成できたと考えている。今後はさらに評価方法を確固としたものにし、発達障害を来す疾患の病態解析に広く応用していきたい。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、中間評価を行った）。

さきがけ研究開始当初、iPS 細胞樹立やその神経細胞への分化誘導に苦労していた事を考えると、この中間評価時点においても、既に患者さんから iPS 細胞を樹立し、一部病態の解析まで辿り着けたのは期待以上の進展であり、評価に値する。元々、小児神経疾患の遺伝学では十分な実績があり、また症例蓄積もあり、それぞれの患者さんは病態解析が進む事を心待ちにしている。従って、さきがけの残り期間、治療可能性を念頭に置いて、計画通りに着実に本研究を推進すれば良いと考えている。また既に Proof of concept は確立することが出来たので、終了後においても患者さんのための研究を持続できるよう、基礎・基盤を固めてくれるよう期待する。

5.　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Shimojima K, Inoue T, Imai Y, Arai Y, Komoike Y, Sugawara M, Fujita T, IdeguchiH, Yasumoto S, Kanno H, Hirose S, Yamamoto T. Reduced PLP1 expression in induced pluripotent stem cells derived from a Pelizaeus-Merzbacher disease patient with a partial PLP1 duplication. *J Hum Genet* 2012, 57, 580-586
2. Shimojima K, Mano T, Kashiwagi M, Tanabe T, Sugawara M, Okamoto N, Arai H, Yamamoto T. Pelizaeus-Merzbacher disease caused by a duplication-inverted triplication-duplication in chromosomal segments including the PLP1 region. *Eur J Med Genet* 2012, 55, 400-403
3. Shimojima K, Okamoto N, Suzuki Y, Saito M, Mori M, Yamagata T, Momoi M, Hattori H, Okano Y, Hisata K, Okumura A, Yamamoto T. Subtelomeric deletions of 1q43q44 and severe brain impairment associated with delayed myelination. *J Hum Genet* 2012, 57, 593-600
4. Shimojima K, Tanaka R, Shimada S, Sangu N, Nakayama J, Iwasaki N, Yamamoto T. A novel homozygous mutation of GJC2 derived from maternal uniparental disomy in a female patient with Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *J Neurol Sci* 2013, 330, 123-126
5. Shimojima K, Shimada S, Tamasaki A, Akaboshi S, Komoike Y, Saito A, Furukawa T,

Yamamoto T. Novel compound heterozygous mutations of POLR3A revealed by whole-exome sequencing in a patient with hypomyelination. *Brain Dev* (in press)

（2）特許出願

研究期間累積件数： 0件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

Shimojima K, Isidor B, Le Caignec C, Kondo A, Sakata S, Ohno K, Yamamoto T. A new microdeletion syndrome of 5q31.3 characterized by severe developmental delays, distinctive facial features, and delayed myelination. International Congress of Human Genetics 2011, Montreal, Canada, Oct, 2011.

下島圭子, 山本俊至.【シンポジウム3：先天性大脳白質形成不全症-疾患概念の確立から、病態解析・治療展望まで-】疾患患者由来 iPS 細胞の樹立と病態解析への応用. 第 54 回日本小児神経学会総会 2012/5/19, 札幌

下島圭子, 山本俊至. iPS 細胞の小児神経疾患の病態解析への応用. 脳21 2011, 14, 218-223

下島圭子, 山本俊至. 疾患患者由来 iPS 細胞の樹立と病態解析：中枢神経障害への応用. 脳と発達 2013, 45, 137-142

研 究 報 告 書

「心臓前駆細胞未分化生とクロマチン結合因子」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成22年10月～平成28年3月
研 究 者： 竹内 純

1． 研究のねらい

心不全が主たる原因による死亡率は成人第2位を誇り、その罹患率はガン患者のそれをも凌ぐと報告されている。よって、心不全原因究明及び機能改善を目指した再生研究は重要な課題とされている。いままで、心臓の主たる構成細胞である心筋は増殖活性が無く再生不可能とされてきたが、年間1%程度の心筋が新たにリニューアルしていることが報告され、このリニューアルに関わる未分化細胞（心臓幹・前駆細胞）の存在が重要視され始めた。さらに心臓前駆細胞は心臓を構成する心筋以外には分化し難い特徴を持つことから、臨床応用を見越した循環器研究には ES/iPS 細胞から分化させるよりも有効的であると期待される。

本研究は、心臓幹・前駆細胞分化を制御する因子の同定し、直接心臓前駆細胞及び心筋誘導法の開発を目指す。また、心臓幹・前駆細胞制御因子を用いて、どのようなメカニズムで心臓前駆細胞が未分化状態を維持し、どのようなときに分化状態へと転ずるのか、体発生過程と心臓再生過程の両方の視点から明らかにすることを目標としている。

2． 研究成果

（1）概要

心臓幹・前駆細胞の表面抗原マーカーは種々報告されているが、これらの細胞がどのように派生し未分化性を維持しているのかについて詳細な報告はない(van Weerd 2011)。本研究の理念は、心臓幹・前駆細胞共通の制御因子を探索し、ES 細胞と組織前駆細胞との相違を理解することである。

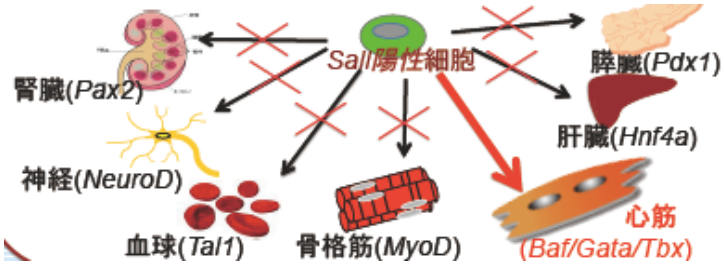
我々の先行研究により、心臓前駆細胞特異的に発現する遺伝子プロファイルから、クロマチンと結合する因子が 5 つ単離されてきた。本研究過程において、その中の一つである転写因子 Spalt-like 1（Sall1）は新規の心臓前駆細胞であることが示され、Sall 陽性の中胚葉性細胞は効率良く心筋に分化することが明らかにされた（特願 2012-011458） 。Sall1 由来の細胞は既知の心臓前駆細胞因子 Islet1 や Mesp1 よりも広範囲の心臓を構成する細胞分化に関わっていることも細胞系譜解析により確認された。さらに、Sall1+α因子の強制発現系においては ES 細胞から心筋誘導を引き起こすだけでなく（国際出願 PCT/2012/011458）、Sall1+α因子の機能を阻害すると心臓運命を持つ細胞が消失することも明らかとなった。Sall1 は ES 細胞の未分化性維持や腎臓形成においても重要な因子であることから、特異的パートナー因子との協調的な作用により標的遺伝子群のクロマチン構造-ヒストン修飾変換を引き起しながら心臓運命決定がされることと、心臓構成細胞となる可能性を持った細胞群は既知の運命図よりも早期に決定されていると推測される。

上記研究の知見から、心臓再生過程においても心臓前駆細胞がどのように誘導され分化するかが課題であると推測された。そのため、両生類と哺乳類を用いて心臓再生モデルを立ち上げ、心臓に存在する前駆細胞が活性化し心筋へと分化することを突き止めた。この研究は心臓前駆細胞が休眠状態から分化状態へ移行するメカニズムの理解へつながると考えられる。本項目では組織幹・前駆細胞の休眠と分化機構について新たな概念を提唱し、この結果が他の臓器に存在する幹細胞や iPS 細胞研究にも貢献出来るものと期待している。

（2）詳細

研究テーマ A:「心臓前駆細胞制御因子の単離・同定」

候補因子の中で Sall1 に焦点を当てて研究を行なってきた。Sall1 遺伝子座に GFP をノックインされた Sall1-GFPtg マウスを用いて胎性 8.5 日胚マウス胎児から GFP 陽性細胞を選別し、この陽性細胞の性質理解を試みた。GFP 陽性細胞では cKit、Sca1、PDGFRa 等の既知の心臓前駆細胞特異的な表面抗原の発現及び Islet1/Tbx18/Nkx2-5 等の転写因子の発現が確認され、心臓転写因子である Tbx5/Tbx20 及び心筋マーカーである心トロポニンや心ミオシン等の発現は確認できなかった。興味深いことに、この GFP 陽性細胞塊を培地で培養すると、細胞全体がトロポニン陽性から細胞塊が誘導された。さらに、パッチクランプを用いた電気生理学的解析およびカルシウムイメージング解析により分化誘導された心筋は機能心筋であることが明らかとなった。Sall1-GFPtg ES 細胞の分化誘導系を用いて同様な実験を行なったところ、GFP 陽性細胞は未分化性を保っているが、誘導培地で培養すると効率良く心筋細胞が分化してくることが確認された。以上のことから、Sall1 は新規の心臓前駆細胞のマーカーであることが示された。次に、実際に Sall1 由来の細胞が心臓を構成する細胞へと分化しているのかを確認する為に、Sall1-ERT2cre マウスとレポーターとなる ROSA-YFP マウスを交配し、胎性 7.5 日から 8.5 日にかけてタモキシフェン投与し細胞系譜追跡を行なった。胎性 14.5 日胚において YFP 陽性細胞を観察すると、心室筋／心房筋／プルキンエ線維／ペースメーカー細胞／心血管内皮／血管平滑筋にラベルされていることが確認され、実際に生体で心臓構成細胞に分化していることが示された（論文投稿中）（下記挿絵参照）。



次の課題として Sall 陽性細胞に特異的に発現している遺伝子のプロファイル作製を試みた。このプロファイルから8遺伝子まで絞り込みを行ない、時系列発生解析を行なったところ、Sall1 と酷似した発現挙動をする4遺伝子が未分化細胞特異的な候補遺伝子として解析を進めた。レンチウイルスを用いたマウス胚 *ex vivo* 強制発現系において、Sall+α で心臓誘導を引き起すことが示された。マウス ES 細胞を用いた *in vitro* 分化誘導系においてもウイルス投与後２日後には心臓前駆細胞マーカーである Islet1/Baf60c/Nkx2-5 の発現が認められ 3-4 日に細胞全体で心トロポニン陽性細胞が確認された。Sall+α では Islet1 及び Nk2-5 のプロモ

ーター上でのクロマチン構造変改が起っており、Sall+αは特異的な遺伝子領域でのエピジェネティック作用を引き起す機能を持っていることも明らかとなった（投稿準備中）。

研究テーマ B:「候補因子の遺伝子破壊マウス及び系譜追跡用レポーターマウスの作製

研究テーマ A で単離された前駆細胞候補因子が真の心臓前駆細胞をマークする因子とし機能しているであるならば、心臓形成領域で発現していないが遺伝子破壊すると心臓形成に異常が生じることが必要である。よって、候補因子群各々の遺伝子破壊マウスの作製を試みた。まず候補因子の一番手として単離された Sall1/Sall4 の遺伝子破壊(KO)マウスを作製した。Sall1 も Sall4 も mRNA レベルでもタンパク質レベルでも未分化細胞が多く存在する細胞領域(SHF)にて酷似した発現パターンを示しており、分化細胞が存在する心臓形成領域では発現していない。このような遺伝子が心臓形成に寄与するのか調べる為には、遺伝子破壊マウスを作製することで証明出来る。Sall1KO マウスでは心臓に目立った異常は見受けられず、Sall4KO マウスは e7.5 程度での早期致死となった。よって、心臓で詳細な解析を行なう為に Sall1/Sall4 のダブル KO(Sall1/4DKO)マウスの作製(Sall1$^{flox/flox}$;Sall4$^{flox/flox}$;Msp1cre)を試みた。Sall1/4DKO マウスは e9.0 迄に胎性致死となり、Islet1/Nkx2-5 の発現減少を伴った極度な心臓低形成異常が見受けられた。よって、Sall1 と Sall4 は機能的な代償作用があり、Sall1 及び Sall4 があれば心臓前駆細胞が維持されると示唆される。ES を用いた機能阻害（ノックダウン：KD）系を用いても同様な実験を行なった。ES を分化誘導後、siRNA による Sall の KD(siSall)のみで心筋収縮因子の発現減少及び消失が見受けられた。さらに、siSall+α因子の KD により心筋転写因子群の消失と完全に心筋誘導が抑制された。この系では中胚葉因子の極度の発現減少も見受けられたことより、心臓細胞に分化する可能性を持った細胞群は中胚葉因子が発現する時期にコミットされていると考えられる。

次に、Sall1 を発現した細胞の系譜追跡のため creERT2 をノックインした Sall1creERT2 マウスを作製した。このマウスとレポーターマウスである ROSA-YFP または ROSA-RFP マウスと交配し、e6.5/e7.5/e8.5 でタモキシフェンを投与し細胞系譜追跡を行なった。Sall1 は未分化細胞が多く存在する第二心臓予定域(SHF)にて発現するが、この細胞群は e10.5/e14.5 のマウス心臓にて心臓構成細胞に分化していることが確認された（投稿準備中）。

研究テーマ C:「分化細胞のリプログラム能の研究」

本研究テーマでは2つの視点から未分化細胞の性質理解に努めた。一つめは、心臓再生時における心臓前駆細胞の分化能を Smarcd3/Sall/Islet1/cKit/Flk1/Sca1 とする細胞マーカーを指標として調べた。心臓再生時にはクロマチン構造変換因子 Smarcd3/Sall1/Islet1 の再誘導が見受けられ、これらの核内機能因子が機能することで細胞増殖・分化・を制御していると考えられる。ふたつめは、線維芽細胞を始め分化細胞を心臓前駆細胞因子へと巻き戻せるのか、cKit/Flk1/Sca1 を指標として分化細胞の運命巻き戻しがどこまで可能か、強制発現系を樹立し、ゲノムワイドでのクロマチン・ヒストン変化領域の特定を目指している。いま迄は、未成熟な心筋細胞が哺乳類の心臓再生時に主たる寄与細胞群と報告されていたので、新しい発見である（後半の主たるテーマとなる）。

３．　今後の展開

１）未分化の維持と分化への転換するゲノム構造変化の総括的研究

２）心臓再生機能向上と前駆細胞因子の役割と未分化維持機構

４．　評価

（1）自己評価

単離された心臓前駆細胞をマークする因子各々を解析していきながら、心臓前駆細胞の制御機構だけでなく、心臓前駆細胞の由来について新しい現象を明らかにした。ES から直接心臓誘導を引き起すことも明らかに出来、創薬研究へ発展すると考えられる。さらに、本研究で明らかにされた新しい点として、本来考えられていた運命図（中胚葉誘導後）より以前に心臓予定マップが決定されていることを突き止めた（特願 2012;国際特許 2013;論文投稿中）。Sall を指標にすることにより、心臓前駆細胞と分化細胞とのエピジェネティック変化を特定することも可能と考えられ、今後は未分化細胞の維持メカニズムの理解へ発展研究できると考えている。さらに、本心臓前駆細胞研究によって心臓再生に寄与する細胞群の可塑機構の研究理解へも発展できた。研究結果は特許・招待講演・総説で最大限に取り組んできたつもりである。本さきがけ研究者と iPS 研究についての数課題に渡る共同研究も開始出来た。残された課題は、本研究結果を国際科学論文として報告することが間に合わなかった点である。一刻も早期に仕上げることを心がける。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年２回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、中間評価を行った）。

研究計画は正攻法で心臓幹細胞に迫ろうとしており、時間や手間を惜しまず必要な材料を用意している点は評価できる。また従来の論文実績も十分であるが、唯一の懸念は、本研究成果に関する論文が投稿中、あるいは準備中である点である。研究計画から考えて、一つの仕事に時間がかかるのは予想できるが、最終的な評価が論文でなされる事を念頭に置き、論文発表に最大の努力を払う事が重要である。従って現時点で、投稿中、準備中の論文の掲載を最優先に考えて欲しい。その上で、さきがけ研究期間の残りで、大量調製された細胞を用いて、計画通りエピジェネティック因子の解析へと進むことを期待する。

５．　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Takeuchi JK, Lou X, Alexander JM, Sugizaki H, Delgado-Olguín P, Holloway AK, Mori AD, Wylie JN, Munson C, Zhu Y, Zhou YQ, Yeh RF, Henkelman RM, Harvey RP, Metzger D, Chambon P, Stainier DY, Pollard KS, Scott IC, Bruneau BG. Chromatin remodelling complex dosage modulates transcription factor function in heart development. ***Nature Commun.***2:187, 1-11, (2011)
2. van Weerd JH., Koshiba-Takeuchi K., Kwon C., and *Takeuchi JK. Epigenetic factors and cardiac development. ***Cardiovascular Research*** 91, 203–211, (2011)

（2）特許出願

研究期間累積件数: 3件

1.

発　明　者: 竹内純、森田唯加、塚原由布子

発明の名称: 特定因子による心臓幹・前駆細胞の誘導／活性化方法

出　願　人: 東京大学

出　願　日: 2013/1/22

出 願 番 号:東京大学知財部管理番号：32B121002-1

国際出願番号：PCT/2012/011458　（国際特許へ移行）

2.

発　明　者: 竹内純、森田唯加、塚原由布子

発明の名称: 高効率心臓細胞分化能を持った新規心臓前駆（幹）細胞制御因子の樹立法

出　願　人: 東京大学

出　願　日: 2012/1/23

出願番号：特願 2012-011458

東京大学知財部管理番号：32B121002-1

整理番号：12-0021-001JP01

（2）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

①本人招待講演

（国際学会：7件）

1. Takeuchi JK., **Berlin Cardiovascular Development Meeting 2013 in Europe Society of Cardiology　(Germany)** 9 月 28 日（2013）
2. 竹内純「Cardiomyocyte Survival and Regeneration～How can we get anti-aging hearts?～」**Merck Millipore BioScience Forum 2013(東京)** 9 月 10 日（2013）
3. Takeuchi JK., Heart cells survival by the defined factors. **The 7th TAKAO International Symposium 2013** (Tokyo)（2013）
4. Takeuchi JK., Epigenetic Factors in Cardiac Development and Regeneration. 第 7 回日仏先端科学**(JFFoS)**シンポジウム（滋賀） **1** 月 **25** 日（2013）
5. Takeuchi JK., Epigenetic control of animal development and organogenesis. 第 **34** 回日本分子生物学会シンポジウム（**Yokohama**）**12** 月 **13** 日（2011）
6. Takeuchi JK., Rate-limiting Function of Chromatin/Histone Modulation for Cardiac Specification. **The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research (ISHR)** （**Tokyo**）**12** 月 **3** 日（2011）
7. 竹内純　「Cardiac induction by defined factors 」　第 **75** 回日本循環器学会総会・学術集会国際シンポジウム（京都）　**3** 月 **18** 日（2011）

（国内学会:12 件）

1. 竹内純「ヒト心疾患発症に関わるエピジェネティック因子群と心不全予防を目指して」第１７回日本心血管内分泌代謝学会学術総会シンポジウム（大阪）１１

月２２日(2013)

2. 竹内純「哺乳類心臓再生が維持されるには？」第３５回日本心筋生検研究会シンポジウム（東京）11 月 2 日（2013）

3. 竹内純「心臓再生はどのようにして可能となるのか？」日本動物学会シンポジウム（岡山） 9 月 26 日（2013）

4. 竹内純 「心疾患発症重篤化とエピジェネティック因子の制御」第 53 回日本先天性異常学会学術集会 教育シンポジウム 1 （大阪） 7 月 21 日（2013）

5. 竹内純 「心臓再生能力を司るクロマチン結合因子群」第 33 回日本炎症・再生医学会（福岡） 7 月 5 日（2012）

6. 竹内純 「クロマチンから見る心臓再生と心筋可塑性」 第 55 回日本腎臓学会学術総会シンポジウム(横浜) 6 月 1 日（2012）

7. 竹内純 「心臓構成細胞の運命決定と分化可塑性」次世代医学セミナーワークショップ（福島）2 月 28 日（2012）

8. 竹内純 「心臓発生と心筋分化誘導のマスター因子」 第 41 回日本心脈管作動物質学会シンポジウム(秋田) 2 月 11 日（2012）

9. 竹内純 「マウスが紐解く心臓研究のアプローチ」日本遺伝学会第 83 回大会（京都） 9 月 3 日（2011）

10. 竹内純 「心臓誘導と心疾患：エピジェネティック因子群の機能解析からわかったこと」 第５回神戸生活習慣病研究会 7 月 23 日（2011）

11. Takeuchi KJ., 「Chromatin Regulates Cardiac Cell Fates and Keep a Healthy Heart」 第 33 回日本分子生物学会シンポジウム（神戸） 12 月 7 日（2010）

12. 竹内純 「心臓誘導を引き起す特定因子」日本心不全学会(東京) 10 月 8 日（2010）

②本人ポスター発表

国際学会1件、国内学会0件

③口頭発表（本研究関連分野）

（国際学会：5件）

1. Yuika Morita, Yuko Tsukahara, Peter Anderson, Kazumi Hirabayashi, Hiroe Sugizaki, Ryuichi Nishinakamura, Chulan Kwon, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Jun K. Takeuchi, A novel defined factor directly specifies cardiac lineages from pluripotent stem cells and promotes heart regeneration. **European Society of Cardiology (ESC) Berlin Cardiovascular Development Meeting 2013 (Berlin, Germany)9 月 27 日**(2013)

2. Yuika Morita, Yuko Tsukahara, Peter Andersen, Junko Kurokawa, Hiroe Sugizaki, Ryuichi Nishinakamura, Tetsushi Furukawa, Chulan Kwon, Kazuko Koshiba-Takeuchi & Jun K. Takeuchi, A novel defined factor specifies cardiac-vascullar cell fate and promotes heart regeneration 第 46 回日本発生生物学会大会（島根）5 月 29 日(2103)

3. Yuika Morita, Kazuko Koshiba-Takeuchi and Jun K. Takeuchi, Direct Differentiation from Pluripotent Stem Cells to Cardiac Lineages by Defined Factors. **2013 Weinstein Conference (Arizona, USA)** 5 月 17 日(2013)

4. Ryo Nakamura, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Yuko Tsukahara, Tetsuo Sasano, Mizuyo

Kojima, Testushi Furukawa, Hesham A Sadek, Jun K Takeuchi, The novel mechanism of histone-chromatin regulation for cardiomyocytes regeneration. **2012 Weinstein cardiovascular development conference (Chicago, USA)**5 月 3 日(2012)

５．Kazuko Koshiba-Takeuchi, Ryo Nakamura, Sawaka Yamada, Mizuyo Kojima, Jun K. Takeuchi, Chromatin Formation is Necessary for Cardiomyocyte Regeneration in Mammal/Amphibiam Models. **Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (Keystone, USA)**1 月 23 日(2012)

（国内学会：５件）

１．森田唯加、塚原由布子、Anderson Peter、黒川洵子、杉﨑弘江、相賀裕美子、西中村隆一、Kwon Chulan、古川哲史、小柴和子、竹内純「特定転写因子による心臓幹・前駆細胞運命プログラム機構」**第 11 回日本心臓血管発生研究会(福島)** 10 月 19 日(2012)

２．中村遼、小柴和子、塚原由布子、笹野哲郎、安藤由貴、小島瑞代、富田江一、古川哲郎、Hesham A Sadek、竹内純**「心筋再生におけるエピゲノム制御機構」第 11 回日本心臓血管発生研究会(福島)** 10 月 19 日(2012)

３．森田唯加、塚原由布子、Anderson Peter、黒川洵子、杉崎弘江、Kwon Chulan、古川哲史、小柴和子、竹内純「特定転写因子による心臓幹・前駆細胞運命プログラム機構」**第 3 回 Molecular Cardiovascular ConferenceⅡ(北海道)** 9 月 8 日(2012)

４．中村遼、小柴和子、塚原由布子、竹内純「心臓再生向上因子としてのクロマチン制御機構」**第 11 回日本再生医療学会総会(横浜)** 6 月 13 日(2012)

５．森田唯加、塚原由布子、小柴和子、竹内純「Sall は心臓前駆細胞必須因子とし全心臓細胞系譜を制御する」**第 11 回日本再生医療学会総会シンポジウム(横浜)** 6 月 13 日

④ポスター発表

国際学会４件、国内学会４件

（受賞）

1. ゴットフリード・ワグネル賞 2010 ドイツイノベーションアワード（平成 24 年 5 月）

2. 公益財団法人万有生命科学振興国際交流財団 第 1 回万有医学奨励賞 優秀賞（平成 24 年 12 月 8 日）

（著作物）

1. 堀優太郎、森下環、中村遼、小柴和子、竹内純「エピジェネティック因子と心臓発生・心疾患」イラストで徹底理解する エピジェネティクス キーワード事典 実験医学 (2013)

2. **竹内純**（企画・編集）

実験医学 Vol.30 No.18, 2896-2901, 2012（羊土社）特集「受精卵から多様な組織を造り出す　発生のエピジェネティクス」「エピジェネティクスで組織可塑性を理解する」

3. 中村遼、塚原由布子、**竹内純**

実験医学 Vol.30 No.18, 2923-2931, 2012（羊土社）特集「受精卵から多様な組織を造り出す　発生のエピジェネティクス」「心臓発生と心疾患のエピジェネティクス－クロマチンモデリング因子・ヒストン修飾因子が織りなす複雑な臓器発生機構のモデルとして－」

4. 森田唯加、小柴和子、**竹内純**

血管医学 Vol.13, 97-113, 2012（メディカルレビュー社）「心臓発生とその分子メカニズム」

5. 塚原由布子、小柴和子、**竹内純**、

月刊「Heart View」Vol. 15 No. 8(2011)　特集「血管・心筋再生はどこまできたか」「心臓発生にかかわるクロマチン・ヒストン制御の役割」

6. **竹内純**、宮川－富田幸子、笹岡陽介、小柴和子.

Annual Review 循環器、中外医学社 1-16.（2011）「心臓発生と心筋分化誘導のマスター因子」

7. 杉崎弘江、**竹内純**

実験医学 28, 62-69.（2010）「心臓再生医療を目指した幹・前駆細胞からの利用状況と応用戦略」

（プレスリリース等）

1. 竹内純　「今さら聞けないプラス:いきている化石」**朝日新聞朝刊 6 月 18 日(2011)**