

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：難治性疾患創薬シーズの探索と薬剤安全性評価法開発
2. 研究開発代表者：国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所 教授 井上 治久
3. 研究開発の成果：

難治性疾患では、病態解明に基づく新規治療法の開発が必要である。患者由来 iPS 細胞を用いて、多種類の難治性疾患治療薬シーズを探索すること、および心筋・肝細胞・神経細胞に対して毒性を検出する細胞とアッセイ系を iPS 細胞から作製することが、本研究の目的である。

神経毒性評価法開発シーズ探索と薬剤安全性評価法の開発：神経疾患については、ALS およびアルツハイマー病の大規模薬剤スクリーニング方法を施行、数種類のヒット化合物の濃度依存性を検討した。また、ヒト iPS 細胞由来の神経細胞を用いて、薬剤の神経毒性を検出するアッセイ系を構築した。

iPS 細胞技術を用いた難治性肝疾患治療薬シーズの探索と臨床試験ドロップアウト予測用肝細胞パネルの作製：新生児型シトルリン血症特異的 iPS 細胞由来の肝細胞において尿素代謝異常を再現可能であることを確認した。また、マイクロアレイ解析にて発現の変動する複数の遺伝子を同定した。成人型シトルリン血症特異的 iPS 細胞由来の肝細胞においても尿素代謝異常と細胞質内脂肪滴貯留増加の予備的データを得た。新規肝細胞誘導化合物を用いてヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞においてアセトアミノフェンによる肝毒性が評価可能であることを確認した。マウス線維芽細胞から独自の転写因子導入にて肝細胞を誘導する方法を確立し、さらに誘導効率を上げる方法と機能的成熟度を高める維持培養法を開発し、CYP 活性などの評価を行った。

遺伝性心疾患における創薬シーズ探索と薬剤安全性評価法の開発：合成 RNA を用いて細胞内のマイクロ RNA の発現量の差を利用して目的の細胞を選別する技術を用いて心筋細胞を高純度で選別する技術開発 (miRNA-switch 法)を行った(Miki et al. Cell Stem Cell 2015)。本技術は、心筋以外の血管内皮細胞、肝細胞、膵 β 細胞にも適応可能である。QT 延長症候群 1 型患者の血液より樹立した iPS 細胞 (LQT1-iPS)を心筋細胞に分化誘導し、健常 iPS 細胞由来心筋細胞と比較することにより、パッチクランプ法、多点電極アレイ(MEA)によるフィールドポテンシャル測定法等によって細胞の脱分極時間の延長を確認した。さらに MEA 法についてはマルチウェルプラットホームでの解析系を確立し、健常 iPS 細胞由来心筋および LQT1-iPS 細胞心筋それぞれにおいて解析データを収集中である。

血球系細胞の創薬基盤構築：難治性血液・免疫疾患の新規治療法開発の基盤とするため、iPS 細胞由来血球を用いた化合物スクリーニング系及び病態解析系を確立することを分担研究の目的として、「1. 単球系の分化系・株化系を用いたスクリーニング系構築」及び「2. iPS 細胞由来赤芽球系の増殖系の構築」について、研究開発を実施した。1 について、複数の多能性幹細胞から単球株を樹立した（熊本大学の千住覚先生らの手法）。単球株をマクロファージへ分化させたのち、細胞内顆粒の定量、炎症性サイトカイン産生の定量などの細胞機能評価を行った。2 について、前年度までに確立した血球前駆細胞からの赤芽球系の分化・増殖系を改良し、小スケールでの分化誘導系の構築を行った。

難治性筋疾患創薬スクリーニング：FOP 患者 iPS 細胞を用いて化合物ライブラリ (6,826 化合物：既存薬、活性既知化合物、天然物) をスクリーニングし、特異性、用量依存性を指標に 76 化合物を選抜した。POMPE 病 iPS 細胞の冷凍ストックからも Feeder Free の条件で筋への誘導を同等にできることを確認し、同一継代数での数千化合物のスクリーニングを実施できる手法を確立した。また化合物の評価結果も既存薬と活性既知化合物のライブラリー4,881 化合物 (既存薬、活性既知化合物) をスクリーニングし、263 化合物が検出される蛍光強度をおさえる作用があった。それらを再評価し、活性が再現し細胞毒性が低い化合物を、37 選抜した。