

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実用化研究事業
(英語) Research Project for Practical Applications of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) 精神・神経疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬研究
(英語) Research for drug discovery using mental/neurological disease-specific iPS cells

研究開発担当者 (日本語) 生理学 教授 岡野 栄之
所属 役職 氏名： (英語) Professor, Department of Physiology, Keio University School of Medicine

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 疾患 iPSC を用いたロボットによる薬剤スクリーニング
開発課題名： (英語) Drug screening by using patient-derived iPS cells and Robot system.

研究開発分担者 (日本語) 佐谷 秀行
所属 役職 氏名： 慶應義塾大学医学部・教授
(英語) Hideyuki Saya
Keio University School of Medicine
Professor

分担研究 (日本語) 神経疾患患者および iPS 細胞の体細胞変異の網羅的スクリーニング系の開発
開発課題名： (英語) Comprehensive genetic screening of germline mutations of neurologic disorders and somatic mutations of iPS cells.

研究開発分担者 (日本語) 小崎 健次郎
所属 役職 氏名： 慶應義塾大学医学部・教授

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

1. 統合失調症や双極性障害などの精神疾患、滑脳症などの精神発達障害や神経難病の疾患特異的 iPS 細胞の樹立：これまでに構築した上記の複数患者由来細胞から iPS 細胞を一括して 96well plate を用いて樹立するシステムにおいて、これらを一括して凍結保存し、効率よく融解し培養維持する条件を確立した。また樹立した疾患関連遺伝子の欠失を有する双極性障害患者由来 iPS 細胞と、同じ欠失をゲノム編集技術により健常人由来 iPS 細胞に導入した。

2. 創薬スクリーニング構築のための分化誘導システムと表現型の定量アッセイシステムの開発

分化誘導の開発、表現型解析：①オリゴデンドロサイトへの分化誘導効率の向上：オリゴデンドロサイトの誘導には 70-100 日程度を要し、誘導効率は 5%以下である。そのため薬剤スクリーニングを実施することが可能な表現型を見出すために、分化誘導の改良を行い、いくつかの化合物を組み合わせると誘導効率を2倍にあげることに成功した。②興奮性ニューロンの選択的誘導の開発 (統合失調症における標的病変部位)：iPS 細胞に一過的な *NEUROG2* 遺伝子の強制発現を行い、誘導開始 1 ヶ月に 95%以上の VGLUT (興奮性神経細胞マーカー) 陽性細胞が得られ、多点電極解析システムで電気生理的な活性を確認した。③抑制性ニューロンの選択的誘導の開発 (統合失調症における標的病変部位)：iPS 細胞に対する一過的な遺伝子 X の強制発現により、誘導開始 1 ヶ月後に 95%以上の VGAT (抑制性神経細胞マーカー) 陽性細胞を得た。統合失調症では神経細胞における電氣的活動性やカルシウムシグナルの破綻、樹状突起やシナプス形態異常および機能異常が知られているため、これらを表現型解析のターゲットとして分化誘導を行う。上記で作成した興奮性ニューロン (おもにドーパミン作動性ニューロン、グルタミン酸作動性ニューロン) および抑制性ニューロン (主に GABA 作動性ニューロン) に注目して解析を進めている。

3) 薬剤スクリーニング：

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)：これまでに表現型解析に適した時期を見出し、その時点で神経突起長変化、異常タンパク質蓄積、アポトーシス誘導を評価項目として既存薬 1232 種類の薬効評価 (10 μ M) を行った。2 つの遺伝型 (FUS 変異、TDP43 変異) ALS 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンに共通して薬効をみとめた薬剤を 9 種まで絞り込んだ。H28 年度選別した 9 薬剤について、より希釈した濃度 (0.1 μ M, 1 μ M) での効果を検討した。既知の情報 (薬剤組織移行性、有害事象)、スクリーニングでの表現型改善率を用いて、スコア化による順位付けをし、薬剤 X を治験薬として選定した。薬剤 X (0.1 μ M) により 10 例の孤発性 ALS 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンで表現型改善を認めた。(本事業外：家族性&孤発性 ALS を対象とした治験を計画し、本年 5 月に PMDA と事前面談を実施した。)

ペンドレッド症候群：独自に開発した内耳細胞の誘導方法、および疾患表現型を指標とした創薬スクリーニングより、既存薬 3 剤を候補薬として見出した。(本事業外) 出口企業と話し合いをすすめ、薬剤 A について、医師主導治験を行う準備を進めている。治験のプロトコルを含めた詳細は、PMDA に相談している。

家族性パーキンソン病 (PARK2)：患者 iPS 細胞由来ニューロンを用いて薬剤スクリーニング (1165 種) を実施し各薬剤の効能をスコア化し、候補薬剤をスコア化し上位 29 薬剤を選定した。選定した上位薬剤の中で、

他の家族性パーキンソン病(PARK6) iPS 細胞由来-ドーパミン作動性ニューロンを用いた二次スクリーニングや血液脳関門透過性、低濃度での反応性を確認し、さらなる候補薬の選別を実施している。

英文

1. Generation of disease-specific iPS cells derived from psychiatric disorders such as schizophrenia and bipolar disorder, mental development disorders such as lissencephaly and intractable neurological disorders: We had invented a system to generate iPS cells collectively from the plural, at a maximum 96, patient-derived cells. In a system established using 96 well plates, we have established the adequate conditions for cryopreservation and maintenance collectively. iPS cells derived from patients with bipolar disorder with deletion of disease-related genes reported before and the same deletion were introduced into iPS cells from healthy subjects by genome editing techniques.

2. Development of assay systems for drug discovery: ① Improvement of differentiation from iPS cells into oligodendrocytes: Generation of oligodendrocyte form iPS cells takes about 70 - 100 days, and the induction efficiency is 5% or less. Therefore, in order to find a phenotype capable of performing drug screening, we improved the efficiency of differentiation and succeeded in doubling generation efficiency by combining several compounds. ② Development of selective induction of excitatory neurons (target lesion site in schizophrenia): By forced expression of transient NEUROG2 gene on iPS cells, more than 95% of VGLUT (excitatory neurons marker) positive cells were obtained. Their electrophysiological activities were confirmed by the multipoint electrode analysis system. ③ Development of selective induction of inhibitory neurons (target lesion site in schizophrenia): By forced expression of transient gene X on iPS cells, more than 95% VGAT (inhibitory neuronal marker) positive cells were obtained. In schizophrenia, electrical activity in neurons, failure of calcium signal, dendrite and synaptic morphology abnormality and dysfunction are known, so they are considered as phenotypic analysis targets. We are focusing on establishing *in vitro* schizophrenia model the excitatory neurons (mainly dopaminergic neurons, glutamatergic neurons) and inhibitory neurons (mainly GABAergic neurons).

3. Drug Screening: Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): We found a suitable time-point for phenotypic analysis so far, and evaluated the efficacy of 1232 existing drugs (10 μ M) using the phenotypic analysis such as neurite length change, abnormal protein accumulation, and induction of apoptosis in motor neurons derived from ALS patients iPS cells. Candidates for ALS treatment were narrowed down to 9 drugs. Effects at more diluted concentrations (0.1 μ M, 1 μ M) were examined for 9 drugs, and drug X was selected as an investigational drug by score ranking using known information (drug organization transferability, adverse event) and phenotypic improvement rate in screening. Phenotypic improvement was also observed in motor neurons derived from 10 patients with sporadic ALS patients iPS cells by drug X (0.1 μ M). (As another project): We are planning clinical trials for familial & sporadic ALS and preliminary interview with PMDA in May this year.) Pendred syndrome: Three existing drugs were found as candidate drugs from the proprietary method for inducing inner ear cells from iPS cells and drug discovery screening using disease phenotype as

an indicator. We are preparing to conduct a doctor-initiated clinical trial for drug (outside this project). Details including the trial protocol are now consulted with PMDA.

Familial Parkinson's disease (PARK 2): Drug screening with 1165 existing drugs was performed using patients iPS cell-derived neurons, the efficacy of each drug was scored and the top 29 drugs were selected. Among the selected high-ranking drugs, secondary screening using other familial Parkinson's disease (PARK 6) iPS cell-derived dopaminergic neurons, blood-brain barrier permeability, low-concentration reactivity are now conducted.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 件、国際誌 12 件)

1. Ishikawa KI, Yamaguchi A, Okano H, Akamatsu W. Assessment of Mitophagy in iPS Cell-Derived Neurons. *Methods Mol Biol.* 2017 Mar 22.
2. Andoh-Noda T, Akamatsu W, Miyake K, Kobayashi T, Ohyama M, Kurosawa H, Kubota T, Okano H. Differential X Chromosome Inactivation Patterns during the Propagation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Keio J Med.* 2017 Jan 20.
3. Suzuki S, Akamatsu W, Kisa F, Sone T, Ishikawa KI, Kuzumaki N, Katayama H, Miyawaki A, Hattori N, Okano H. Efficient induction of dopaminergic neuron differentiation from induced pluripotent stem cells: reveals impaired mitophagy in PARK2 neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jan 29;483(1):88-93.
4. Hosoya M, Fujioka M, Sone T, Okamoto S, Akamatsu W, Ukai H, Ueda HR, Ogawa K, Matsunaga T, Okano H. Cochlear Cell Modeling Using Disease-Specific iPSCs Unveils a Degenerative Phenotype and Suggests Treatments for Congenital Progressive Hearing Loss. *Cell Rep.* 2017 Jan 3;18(1):68-81.
5. Yamazaki K, Fukushima K, Sugawara M, Tabata Y, Imaizumi Y, Ishihara Y, Ito M, Tsukahara K, Kohyama J, Okano H. Functional Comparison of Neuronal Cells Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cells under Different Oxygen and Medium Conditions. *J Biomol Screen.* 2016 Dec;21(10):1054-1064.
6. Okuno H, Nakabayashi K, Abe K, Ando T, Sanosaka T, Kohyama J, Akamatsu W, Ohyama M, Takahashi T, Kosaki K, Okano H. Changeability of the fully methylated status of the 15q11.2 region in induced pluripotent stem cells derived from a patient with Prader-Willi syndrome. *Congenit Anom (Kyoto).* 2016 Dec 21.
7. Hoashi Y, Okamoto S, Abe Y, Matsumoto T, Tanaka J, Yoshida Y, Imaizumi K, Mishima K, Akamatsu W, Okano H, Baba K. Generation of neural cells using iPSCs from sleep bruxism patients with 5-HT2A polymorphism. *J Prosthodont Res.* 2016 Dec 1. pii: S1883-1958(16)30106-2.
8. Fujimori K, Tezuka T, Ishiura H, Mitsui J, Doi K, Yoshimura J, Tada H, Matsumoto T, Isoda M, Hashimoto R, Hattori N, Takahashi T, Morishita S, Tsuji S, Akamatsu W, Okano

H. Modeling neurological diseases with induced pluripotent cells reprogrammed from immortalized lymphoblastoid cell lines. *Mol Brain*. 2016 Oct 3;9(1):88.

9. Bamba Y, Shofuda T, Kato M, Pooh RK, Tateishi Y, Takanashi J, Utsunomiya H, Sumida M, Kanematsu D, Suemizu H, Higuchi Y, Akamatsu W, Gallagher D, Miller FD, Yamasaki M, Kanemura Y, Okano H. In vitro characterization of neurite extension using induced pluripotent stem cells derived from lissencephaly patients with TUBA1A missense mutations. *Mol Brain*. 2016 Jul 19;9(1):70.
10. Takenouchi T, Shimizu A, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Saya H and Kosaki K. Multiple café au lait spots in familial patients with MAP2K2 mutation. *Am J Med Genet* 164: 392-396, 2014 Feb.
11. Yachie N; Robotic Biology Consortium, Saya H and Natsume T: Robotic crowd biology with Maholo LabDroids. *Nat Biotechnol* 35(4): 310-312, 2017
12. Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Kosaki K. Somatic CTNBN1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation. *Am J Med Genet*.164A(4):993-7. 2014 Apr.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

すべて口頭発表

<国際 (招待) >

1. Hideyuki Okano : Modeling Psychiatric/Neurological disorders using iPS cell technologies and transgenic non-human primates. : International Symposium on Cell Physiology and Aging Research, 2016. 4. 12 *2016. 4. 12 (Kaohsiung Medical University (KMU), Kaohsiung, Taiwan)
2. Hideyuki Okano : Modelling human neurological diseases using iPS cells and transgenic non-human primates. :11th International Conference for Neurons and Brain Disease, 2016. 7. 16 *2016. 7. 14-16 (Sheraton Vancouver Wall Centre Hotel, Vancouver, Canada)
3. Hideyuki Okano : Modeling Human Neurological/ Psychiatric Disorders using iPS Cells and Transgenic Non-human Primates. : Joint Symposium on Regenerative Medicine and Longevity, Washington University in St. Louis and Keio University, 2016. 8. 20 *2016. 8. 20 (Large Conference Room, 11F, Building 2, Keio University Hospital, Tokyo, Japan)
4. Hideyuki Okano : Modeling of Human Neurological/Psychiatric Disorders using IPS cells and Transgenic Non-Human Primates. : Special Gus Gurley Seminar, 2016. 10. 6 *2016. 10. 6 (Rathmann Auditorium, Neuroscience Research Institute · University of California, Santa Barbara, Santabarbara, California, USA)
5. Hideyuki Okano : New Insights from the Brain Mapping Project in Japan: Modeling Human Diseases with iPS cells and Transgenic Non-Human Primates. : UC San Diego Medical Education

& Telemedicine Building Learning Center Seminar, 2016.11.16*2016.11.16 (UC San Diego Medical Education & Telemedicine Building Learning Center, San Diego, California, USA)

<国内 (招待) >

1. 岡野栄之 : iPS 細胞技術を用いた中枢神経系の新しい医療 : 第 8 回医療と産業の国際交流シンポジウム in 関西、2016.4.2 *2016.4.2 (大阪大学中之島センター、大阪)
2. 岡野栄之 : iPS 細胞技術を用いた中枢神経系の再生医療と疾患研究(CNS Regeneration and Disease Investigation using iPS cell technologies.) : 第 15 回国際バイオテクノロジー展 BIOteck2016・特別講演、2016.5.12 *2016.5.11-13 (東京ビッグサイト、東京)
3. 岡野栄之 : Regenerative Medicine and Disease Modeling with iPS cells technologies. : 第 14 回幹細胞シンポジウム・特別講演、2016.5.20 *2016.5.20-21 (淡路夢舞台国際会議場、淡路)
4. 岡野栄之 : iPS 細胞を使った研究について : 日医工株式会社講演会「iPS 細胞を使った研究について」、2016.6.8*2016.6.8 (日医工株式会社グローバル開発センター、滑川市)
5. 岡野栄之 : iPS 細胞技術と遺伝子改変霊長類による革新的医療の開発 : 第 36 回東邦耳鼻咽喉科会総会・特別講演、2016.6.11 *2016.6.11 (大森 REI ホテル、東京)
6. 岡野栄之 : iPS 細胞技術を用いた神経疾患病態解明と創薬研究 : 第 37 回日本炎症・再生医学会・シンポジウム、2016.6.16*2016.6.16-17 (京都市勧業館みやこめっせ、京都)
7. 岡野栄之 : iPS 細胞と遺伝子改変霊長類を用いた神経疾患研究 : 第 14 回鹿児島ニューロフォーラム・特別講演、2016.7.5*2016.7.5 (鹿児島大学鶴陵会館中会議室、鹿児島)
8. 岡野栄之 : iPS 細胞技術を用いた神経疾患病態解明と創薬研究 : ソニー ライフサイエンス学術セミナー2016、2016.7.23 *2016.7.23 (ソニーシティー大崎、東京)
9. 岡野栄之 : iPS 細胞と遺伝子改変霊長類技術を用いた神経疾患病態解明と創薬研究 : 第 27 回日本抹消神経学会学術集会・特別講演、2016.8.26 *2016.8.26-27 (大阪国際会議場・グランキューブ大阪、大阪)
10. 岡野栄之 : iPS 細胞と遺伝子改変霊長類技術を用いた神経疾患病態解明と創薬研究 : 第 3 回包括的緩和医療科学学術研究会・第 4 回 Tokyo 疼痛緩和次世代研究会・合同研究会、2016.8.28 *2016.8.28 (TKP ガーデンシティー永田町、東京)
11. 岡野栄之 : 幹細胞技術を用いた中枢神経系の再生と疾患・創薬研究 : 第 39 回高血圧学会総会・シンポジウム、2016.10.2 *2016.9.30-10.2 (仙台国際センター・新展示施設、仙台)

12. 岡野栄之：iPS 細胞技術を用いた未来の医療の開発：日中医学学術交流大会 2016 東京・基調講演、2016. 10. 14*2016. 10. 14（新宿ベルサール、東京）
13. 岡野栄之：iPS 細胞技術と遺伝子改変霊長類を用いた神経疾患病態解明と創薬研究：第 5 回実験動物科学・シンポジウム、2016. 10. 21*2016. 10. 21（信州大学、松本）
14. 岡野栄之：革新的技術を用いた脳科学研究：その光と影：【JST-RISTEX】 科学技術と知の精神文化 第 42 回研究会、2016. 11. 28 *2016. 11. 28（JST 東京本部内会議室、東京）
15. 岡野栄之：再生医療と先制医療で健康寿命を延ばす！：第 20 回・生命科学シンポジウム『高齢社会を科学する』、2016. 12. 17 *2016. 12. 17（学習院大学、東京）
16. 岡野栄之：iPS 細胞技術による神経系の再生と疾患研究：第 15 回京大病院 iPS 細胞・再生医学研究会、2017. 1. 19*2017. 1. 19（京都大学・芝蘭会館、京都）
17. 岡野栄之：iPS 細胞と遺伝子改変霊長類技術を用いた精神・神経疾患の病態解明と創薬研究：MAC メディカル賀詞交換会、2017. 1. 25*2017. 1. 25（ホテルニューオータニ東京、東京）
18. 岡野栄之：iPS 細胞技術の神経系の再生医療および疾患研究への応用：第 44 回日本集中治療医学会学術集会・特別講演、2017. 3. 9 *2017. 3. 9-11（ニトリ文化ホール、札幌）
19. 岡野栄之：iPS 細胞技術と遺伝子改変霊長類を用いた精神・神経疾患の病態解析と創薬研究：第 90 回日本薬理学会年会・ランチョンセミナー、2017. 3. 16 *2017. 3. 15-17（長崎ブリックホール、長崎）
20. 岡野栄之：iPS 細胞分化誘導薬理学研究と疾患 iPS 細胞治療薬理学研究の最潮流、第 90 回日本薬理学会年会・シンポジウム、2017. 3. 16 *2017. 3. 15-17（長崎ブリックホール、長崎）
21. 岡野栄之：iPS 細胞と遺伝子改変霊長類技術を用いた精神・神経疾患研究、立教大学 ブランディング事業シンポジウム、2017. 3. 23 *2017. 3. 23（立教大学、東京）
22. 岡野栄之：iPS 細胞技術を用いた中枢神経系の再生医療と創薬研究：平成 28 年度 神戸再生医療勉強会（第 6 回）・特別講演、2017. 3. 30 *2017. 3. 30（神戸臨床情報センター、神戸）

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 岡野栄之：再生医療と脳科学の最先端：2016 東進大学学部研究会、2016. 8. 5 *2016. 8. 5 (TKP ガーデンシティ品川、東京)
2. 岡野栄之：iPS 細胞と遺伝子改変霊長類技術を用いた未来の医療の開発：第 58 回歯科基礎医学会・ロッテ基金特別講演（市民公開講座）、2016. 8. 25 *2016. 8. 24-26 (札幌コンベンションセンター、札幌)
3. 岡野栄之：iPS 細胞研究 10 年のあゆみ：Walk Again 2016、2016. 10. 1 *2016. 10. 1 (秋葉原コンベンションホール、東京)

(4) 特許出願