

平成 23 年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術部

1. 件名：プログラム名 健康安心イノベーションプログラム
(大項目) ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第 15 条第 1 項第 2 号

3. 背景及び目的・目標

多能性を有する幹細胞は様々な細胞に分化する能力を有している。適切に誘導を行うことで神経、心筋、膵臓β細胞など様々な細胞を得ることができる。このため、創薬における薬効評価や安全性薬理試験などの創薬スクリーニング、発生・分化や疾患メカニズムの解明、再生医療への応用など生命科学や医療への貢献が大きく期待されている。中でも iPS 細胞（人工多能性幹細胞）は、皮膚等の組織から作製可能であることから倫理的な障壁が低く、加えて遺伝的に多様な細胞を容易に得られること、免疫拒絶反応を回避あるいは軽減可能であることなどから、有用な細胞源として期待が大きい。

しかし、ヒト幹細胞を産業利用に繋げるためには、細胞の効率的な確保方法、腫瘍化の問題、様々な状態が混在したヘテロな細胞集団から目的細胞を選別する方法、品質を維持・管理し培養する方法の確立など、「品質の確保されたヒト幹細胞の安定的な大量供給」を可能とすることが、幅広い応用に繋げていくうえでの根幹となる基盤技術として極めて重要である。このためには幹細胞の性質をよりよく理解した上で「幹細胞の品質評価指標」を設定することが必要である。

一方、ヒト幹細胞の産業応用として最も早い実用化が期待されている創薬分野では、ヒト幹細胞から分化誘導を行った各種ヒト細胞を、開発候補薬の有効性や安全性の評価に用いることで、開発効率の向上やリスクを低減する技術の開発が求められている。中でも安全性評価については、製薬企業全体で共通的に用いることが可能である。薬効と副作用は表裏一体の関係にあり、創薬研究のより早い段階で、ヒトに対する安全域の程度が許容範囲となるかどうかを的確に推測することが、開発候補薬として臨床開発に進めるかどうかを判断する上で重要な情報である。このため、現在用いられている動物細胞ベースの技術を革新し、ヒト個体での薬効と安全性をより精度高く予測する基盤技術の開発が重要な課題となっている。

こうした状況を踏まえ、本研究開発は、様々な細胞に分化する能力を有するヒト幹細胞の産業利用促進の重要な基盤となる、品質の管理されたヒト幹細胞の安定的な大量供給を可能とする基盤技術の開発を行う。また、ヒト幹細胞から心筋などの細胞に効率よく分化させ、これを利用して、開発候補薬の潜在的な致死性不整脈を誘発する可能性を、ヒト個体と高い相関性をもって予測する創薬スクリーニングシステムの開発を行う。

これにより、我が国が世界を先導している科学的成果である iPS 細胞等幹細胞を、いち早く産業応用に繋げるとともに、培養装置や基材などの周辺産業を含めた国際市場への展開を図り、産業競争力の確保に繋げることが期待できる。加えて、①品質の管理された細胞源の安定的な供給体制の構築が促進され、再生医療の早期実現の促進、②創薬研究のより早い段階において、開発候補薬を効率よく絞り込むことが可能となり、開発期間の短縮や研究開発費の削減、さらにはより安全な医薬品の開発の促進が期待される。

なお、本研究開発は、遺伝子やタンパク質等の生体分子の機能・構造解析等を行うとと

もに、それらの研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に利用するためのデータベース整備や先端技術を応用した高度医療機器開発等により、個別化医療・予防医療・再生医療の実現や画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指すことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施する。

【最終目標】

本研究開発では、ヒト幹細胞の産業応用、とりわけ臨床応用を妨げている根本原因となっている「ヒト幹細胞の品質評価指標」を策定し、再生医療への応用を可能とする品質レベルで管理されたヒト幹細胞を、安定的に大量供給可能とする技術を開発する。

また、ヒト iPS 細胞等幹細胞から効率的に分化誘導したヒト心筋細胞等を用い、開発候補薬の潜在的な致死性不整脈を誘発する可能性を、ヒト個体と高い相関性と再現性をもって予測する心毒性評価システムを確立する。

4. 実施内容及び進捗（達成）状況

財団法人先端医療振興財団 先端医療センター長 鍋島 陽一氏をプロジェクトリーダーとして、「iPS 細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発」において以下の研究開発を実施した。また、研究開発推進委員会を半期に一度の割合で開催し、研究開発目的・目標と照らし合わせながら、研究進捗の確認をおこなった。

4. 1 平成 21～22 年度（委託）事業内容

平成 22 年度までの事業内容については、「iPS 細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発」の中で実施してきたものである。

(1) 研究開発項目 1 「安全かつ効率的な iPS 細胞作製のための基盤技術の開発」

平成 21 年度は、山中 4 因子として発見された 4 遺伝子のうち、3 遺伝子でマウス三胚葉分化、キメラマウスの作製が確認され、ヒト線維芽細胞でも iPS 細胞が確認された。また、山中 4 因子以外に代替因子候補を新たに数個発見した。さらに、世界最大の天然物ライブラリーから、ヒト正常細胞で山中 4 因子の遺伝子発現を上昇させる新規化合物を発見した。

山中 4 因子の順番を並び替え、一つのベクターに搭載した持続発現型センダイウイルスベクターを作成し、外来遺伝子が染色体に挿入されていないマウスおよびヒト iPS 細胞を作成することに成功した。また、ウイルスベクターを使用しない iPS 細胞作製技術として、細胞質へ蛋白質を導入するセミインタクト細胞シーリング法をシステム化し、山中 4 因子の蛋白質を導入したところ iPS 様コロニー形成に成功した。

平成 22 年度は、山中 4 因子と異なる新規な多能性誘導因子を探索し 22 種類発見した。これらの因子の遺伝子を細胞導入するプラスミッドの改変を行い高効率化、高品質な iPS 細胞作製を可能にした。線維芽細胞を iPS 細胞化する能力のある低分子化合物はヒト歯髄細胞の iPS 細胞化を誘導しなかった。センダイウイルスベクターの改良を行い、iPS 細胞をより高品質、高効率に作製することに成功した。誘導された iPS 細胞から不要になったセンダイウイルスを除去する化合物は得られなかったが、センダイウイルスを効率的に除去する条件を見出した。

また、セミインタクト細胞リシーリング法により山中 4 因子を導入した iPS 様細胞の評価を、ES 細胞 T-DMR 領域の少量細胞での発現解析と DNA メチル化解析法により評価を行った。

（実施体制：東京大学、JBiC）

(2) 研究開発項目 2 「細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

① iPS 細胞等幹細胞の評価・選別技術の開発

平成 21 年度は、4 種類の異なる器官から iPS 細胞を多数樹立し、100 検体以上に対して網羅的遺伝子発現解析、細胞表面の糖鎖プロファイリング等を実施した。その結果、iPS 細胞間の遺伝子発現の違いを同定し、親株と iPS 細胞を識別するレクチンの抽出に成功した。また、生殖幹細胞から多能性幹細胞への転換系を用いて、効率的な iPS 生成機構を構築し、この系により新規リプログラミング因子を発見した。さらに、経時的解析が可能となり、iPS 形成細胞を培養 3 日目で捉えることに成功した。

平成 22 年度は、成人ヒトの間葉系細胞から新たな多能性幹細胞 Muse 細胞を見いだしたが、その性質として 3 胚葉性細胞に分化可能であり腫瘍性を示さないことを明らかにした。疾患 iPS 細胞作製のため分化・培養方法の開発を行い、新規の血球分化系を開発した。単能性の生殖系列細胞から多能性幹細胞の誘導過程を検討し、始原生殖細胞の多能性誘導に伴い速やかに元々の細胞の性質が失われること、その後に多能性の誘導と維持の少なくとも 2 要素のステップが起こること、リプログラミングの際に導入因子の最適化が行なわれることを明らかにした。単能性細胞から多能性幹細胞へのリプログラミング過程を網羅的遺伝子発現解析法で行なったところ、1000 個の細胞でも遺伝子発現測定が可能であることを確立した。

また、樹立方法の違いによる iPS 細胞株の性質の差を調べるため、同じ親株から異なるウイルスベクターにより樹立した iPS 細胞の解析を、新たにエピゲノム解析を加えて行った。さらに未分化状態の解析が終了した iPS 細胞について、EB 形成法による分化指向性の解析を行った。

糖鎖プロファイリングにおいては、レクチン数を 96 種類に増やした高密度レクチンアレイを開発した。これを用いて、異なる糖鎖プロファイルを持つ親株から作成された iPS 細胞でも、iPS 化することで ES 細胞に類似した共通の糖鎖プロファイルを獲得することを明らかにした。これら各種解析結果を用いて、バイオインフォマティックスの手法を用いた解析に着手した。

その他、ヒトおよびマウス ES 細胞の D-REAM 法による DNA メチル化プロファイル解析により、ヒト・マウス分化多能性細胞に共通するエピゲノム情報を明らかにし、それらの情報を基盤としたヒトおよびマウス iPS 細胞のエピゲノム解析による評価が可能となった。

(実施体制：(独)産業技術総合研究所、国立成育医療センター、アルブラスト(株)、東京大学、JBIC)

② iPS 細胞等幹細胞の品質管理、安定供給技術の開発

平成 21 年度は、iPS 細胞の選別に用いる広視野と詳細画像の両方を取得できる平行光を使った細胞観察装置を開発し、これを用いた画像処理により iPS 細胞の選別を自動的に行う技術の開発に着手した。また、凍結溶解後の iPS 細胞の生存率を向上させる「緩慢凍結法」を考案した。さらに、自動培養装置に用いる技術として、iPS 細胞を回収するためトリプシン等の酵素を用いない温度応答性培養機材が使用できることを確認した。

平成 22 年度は、開発した自動培養装置を用いて未分化を維持しながら 5 ヶ月の連続培養に世界で初めて成功した。それに合わせて、未分化コロニーの自動識別技術や選択的ピペッティング技術の開発を進めた。

開発した温度応答性培養基材では、連続継代培養試験を行い、連続 10 継代後も未分化で染色体異常も起こらないことを確認した。

iPS 細胞の予備凍結には「緩慢凍結法」が有効であることを複数のサンプルで確認した。自動凍結装置に緩慢法による自動予備凍結装置を組み込み、解凍後の細胞生存率平均 50% 以上を達成した。

さらに、自動培養装置への温度応答性培養基材導入のプログラムの開発、自動培養装

置と自動凍結保存システムの一体化に着手した。

(実施体制：国立成育医療センター、川崎重工業㈱、大陽日酸㈱、㈱セルシード)

(3) 研究開発項目 3 「iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」

① iPS 細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

平成 21 年度は、従来法の 30 倍の効率（世界最高レベル）で iPS 細胞を心筋細胞に誘導するプロトコルの構築を行い、さらにオンチップ創薬支援評価システムで利用するための品質の安定した iPS 細胞由来心筋細胞の大量供給体制の構築に成功した。

平成 22 年度は、心毒性検出システムの基幹技術である電気刺激計測技術、薬剤濃度制御・計測技術、ノイズ低減技術等の開発で目標を達成した。ヒト ES 細胞由来の心筋細胞クラスターを用い自律拍動下での心毒性評価を行い、偽陰性薬剤を含む 10 薬剤で正しく評価できるシステムであることを確認した。(実施体制：JBiC)

② iPS 細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

平成 21 年度は、オンチップ心筋細胞ネットワークの環状回路（リエントリーモデル）への誘発刺激による致死性頻脈発生の再現に成功し、チップ上での除細動刺激（AMD）による回復の再現にも成功した。また、この技術を用いて、既知薬剤での検証を行った。さらに、細胞の応答ゆらぎに基づいた「致死性頻脈発生予測法」を新たに考案し、その実用開発に成功した。この手法により、原理的には細胞ベースでの毒性検査法についての目途が立った。

平成 22 年度は、ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を用いた測定では 3 薬剤について評価し、ヒト ES 細胞由来心筋細胞の場合と同様の結果を得た。心毒性検出システム関連技術の医科歯科大からの移管・導入と既知薬剤 15 剤の評価、既存技術との相関性を調べた。ユーザーフォーラムを開催し国内製薬企業、海外メガファーマへ技術紹介し、海外企業から提供された薬剤による評価を実施した。(実施体制：JBiC)

4. 2 実績推移

	H20 年度	H21 年度	H22 年度
	委託	委託	委託
実績額推移			
一般勘定：補助金（百万円）	1,000	—	—
一般勘定：交付金（百万円）		1,010	992
特許出願数（件）	—	7	12
論文発表数（報）	—	9	62
フォーラム等（件）	—	0	0

5. 事業内容

目標を達成するために、以下の研究開発項目について、NEDO が指名する研究開発責任者（プロジェクトリーダー）を置き、その下に研究者を可能な限り結集して効果的な研究開発を実施する。

研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」

(平成 22～27 年度)

(本研究開発項目は、平成 20～22 年度に実施した「安全かつ効率的な iPS 細胞作製のための基盤技術の開発」及び「iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」を発展的に統合し、平成 23 年度から 5 年計画で新規に開始する。)

研究開発項目②「ヒト iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」

(平成 20～25 年度)

(本研究開発項目は、平成 20～22 年度に実施した「iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スク

リーニングシステムの開発」を継続して推進する。)

5. 1 平成 23 年度（委託）事業内容

研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」

(1) ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発

研究者の手技の違いを排除し、一定条件での安定した培養操作を可能とするため、ロボット技術や画像処理技術などを組み合わせた自動培養技術の開発をする。また、ヒト幹細胞の有用な性質を損なわずに安定培養が可能な、成分が明確かつ異種生物由来の成分を含まない培養液・培養基材の開発をする。さらに、凍結融解後の回収率が高く、ユーザーへの提供方法を考慮した凍結保存技術の開発をする。

(2) ヒト幹細胞の品質評価指標の開発

由来する組織や樹立方法によってヒト幹細胞が示す異なる分化指向性や造腫瘍性等の性質の違いを、未分化な状態において簡便かつ迅速に評価・判別可能とする品質評価指標の開発をする。具体的には、明らかにしようとする性質を設定し、様々なヒト幹細胞、iPS 細胞の由来となる細胞、5. (1)①の技術を用いて継代培養したヒト幹細胞などから、多次元の情報（核型、エピゲノム、ncRNA、遺伝子発現、タンパク発現、糖鎖など）を取得する。これらの情報をバイオインフォマティクス技術により統合的に関連づけたデータベースの構築を開始するとともに、データの比較等によってヒト幹細胞の性質の記述に重要な項目をキーインデックスとして整理し、品質を評価する指標の開発をする。

(3) ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発

(1) と (2) の緊密な連携の下、インフォマティクスによる仮説の提示とウェットによる検証を繰り返すことによって双方向の情報フィードバックを行い、培養・保存技術と品質評価指標を同時並行的に向上させる。さらに、確立した品質評価指標に基づき、再生医療用の細胞源として利用可能な品質を担保したヒト幹細胞を、安定的に大量供給するシステム（一連の処理を連続的に自動処理可能な自動継代・大量調製システム）を構築する。本結果を踏まえ、ヒト幹細胞の評価基盤技術を確立するとともに、これを用いたヒト幹細胞の標準化原案の策定を行う。

研究開発項目②「ヒト iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」

(1) ヒト iPS 細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

入手可能な健常人由来のヒト iPS 等幹細胞及び心毒性等評価に有用な心疾患等患者由来のヒト iPS 細胞等幹細胞から、心筋細胞への誘導効率を高める因子の探索や誘導工程の改良を、②の機能評価データを踏まえ、効率的な分化誘導技術を開発する。

(実施体制：慶応大学、JBIC)

(2) ヒト iPS 細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

心毒性等が報告されている既存薬等を用いて、既存法との比較等によって心毒性等評価システムの有用性を評価するとともに、5. (2)①で分化誘導を行ったヒト心筋細胞の機能の検証を行う。また、製薬企業等によるユーザー評価結果を踏まえてシステムの改良を行う。これにより、健常人及び心疾患患者における薬物の心毒性等を高精度に予測可能な創薬スクリーニングシステムの開発を行う。

(実施体制：東京医科歯科大学、東邦大学、JBIC)

5. 2 平成 23 年度事業規模

	委託事業	
一般勘定	871 百万円	(継続)
平成 22 年度補正予算	1,500 百万円	(継続・繰越)
(合計)	2,371 百万円	

※事業規模については、変動があり得る。

6. その他重要事項

(1) 評価の方法

研究開発全体の管理・執行に責任を有する NEDO は、経済産業省及び研究開発実施者と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて設置される技術検討会等における外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、四半期に一回程度プロジェクトリーダー等を通じてプロジェクトの進捗について報告を受けること等を行う。

(2) 運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（平成 22 年厚生労働省告示第 380 号）、「ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律」（平成 12 年法律第 146 号）、「特定胚の取扱いに関する指針」（平成 13 年文部科学省告示第 173 号）、「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針（平成 19 年文部科学省告示第 87 号）」等、関連指針を厳守する。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」（平成 16・12・24 製局第 1 号）を厳守する。なお、関連指針等が改正されたときは、改正後の指針を適用するものとする。

(3) 複数年度契約の実施

研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」については、平成 22 年度補正予算による契約は平成 22 年度からの単年度（13 カ月）契約、平成 23 年度当初予算による契約は平成 23 年度からの単年度契約を行う。また、研究開発項目②「ヒト iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」については平成 20～23 複数年度契約を行う。

7. スケジュール

（平成 23 年 2 月中旬 …… 公募締切 ）
3 月中旬 …… 契約・助成審査委員会
3 月中旬 …… 採択決定

研究開発の進捗状況を把握し、目標達成に向けた着実な進展を図るため、半期に一度の頻度で研究開発推進委員会を開催する。

8. 実施方針の改定履歴

(1) 平成 23 年 3 月 10 日 制定。

(別紙) 事業実施体制の全体図

研究開発項目②「ヒト iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」

