

「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発／
ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」

中間評価報告書

表紙

平成25年12月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構

研究評価委員会

平成25年12月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
理事長 古川 一夫 殿

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会 委員長 西村 吉雄

NEDO技術委員・技術委員会等規程第33条の規定に基づき、別添のとおり
評価結果について報告します。

「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発／
ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」
中間評価報告書

平成25年12月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会

目 次

はじめに	1
分科会委員名簿	2
審議経過	3
評価概要	4
研究評価委員会におけるコメント	6
研究評価委員会委員名簿	7
第1章 評価	
1. プロジェクト全体に関する評価結果	1-1
1. 1 総論	
1. 2 各論	
2. 個別テーマに関する評価結果	1-14
2. 1 ES 細胞領域	
2. 2 iPS 細胞領域	
2. 3 滑膜由来間葉系幹細胞領域	
2. 4 Muse 細胞領域	
2. 5 間葉系幹細胞領域	
3. 評点結果	1-26
第2章 評価対象プロジェクト	
1. 事業原簿	2-1
2. 分科会における説明資料	2-2
参考資料1 評価の実施方法	参考資料 1-1
参考資料2 分科会議事録	参考資料 2-1

はじめに

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構においては、被評価プロジェクトごとに当該技術の外部専門家、有識者等によって構成される研究評価分科会を研究評価委員会によって設置し、同分科会にて被評価対象プロジェクトの研究評価を行い、評価報告書案を策定の上、研究評価委員会において確定している。

本書は、「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発／ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」の中間評価報告書であり、第35回研究評価委員会において設置された「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発／ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」（中間評価）研究評価分科会において評価報告書案を策定し、第37回研究評価委員会（平成25年12月4日）に諮り、確定されたものである。

平成25年12月
独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会

「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発／

ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」

中間評価分科会委員名簿

(平成25年6月現在)

	氏名	所属、役職
分科 会長	うへだ みのる 上田 実	名古屋大学大学院 医学系研究科 頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学 教授
分科会長 代理	なかにし あつし 中西 淳	武田薬品工業株式会社 医学研究本部 先端科学研究所 主席研究員
委員	あかざわ ちひろ 赤澤 智宏	東京医科歯科大学大学院 保健衛生学研究科 分子生命情報解析学分野 教授/副医学部長
	くにさだ たかひろ 國貞 隆弘	岐阜大学大学院 医学系研究科 組織・器官形成分野 教授
	くめ しょうえん 糸 昭苑	熊本大学 発生医学研究所 幹細胞部門 多能性幹細胞分野 教授
	こむろ いっせい 小室 一成	東京大学大学院 医学系研究科 循環器内科学 教授
	なかむら ゆきお 中村 幸夫	独立行政法人理化学研究所 バイオリソースセンター 細胞材料開発室 室長

敬称略、五十音順

注*：実施者の一部と同一大学であるが、所属部署が異なるため（実施者：名古屋大学 大学院創薬科学研究所、名古屋大学 細胞生理学研究センター、東京大学 医学研究所、独立行政法人理化学研究所 基盤研究所）「NEDO 技術委員・技術評価委員規程(平成23年7月7日改正)」第34条（評価における利害関係者の排除）により、利害関係はないとする。

審議経過

● 第1回 分科会（平成25年6月26日）

公開セッション

1. 開会、分科会の設置、資料の確認
2. 分科会の公開について
3. 評価の実施方法について
4. 評価報告書の構成について
5. プロジェクトの概要説明

非公開セッション

6. プロジェクトの詳細説明
7. 全体を通しての質疑

公開セッション

8. まとめ・講評
9. 今後の予定、その他
10. 閉会

● 第37回研究評価委員会（平成25年12月4日）

評価概要

1. 総論

1) 総合評価

ES/iPS 細胞のみならず、体性幹細胞の重要性にも着眼して、幹細胞領域全体を俯瞰している見識は高く評価できる。体性幹細胞に関しては間葉系に絞って実用化に必要な研究を進めることは、プロジェクトが散漫に陥るのを防止し、わが国が大きく遅れを取っている間葉系幹細胞を用いた再生医療の一般化・産業化の促進のためには正しい判断である。さまざまな幹細胞の特性を活かした、我が国独自の培地・大量培養技術を集約的に支援する取り組みは極めて意義深い。また、産業化に直結する技術や周辺産業の活性化につながる技術が複数創出されており、研究成果の一部は既に製品化され、今後の再生医療への応用も期待でき、順調に進捗しているように見受けられる。中間目標は概ね達成されており、評価できる。

一方、ES 細胞と iPS 細胞、滑膜細胞と間葉系幹細胞など、技術開発が連携することなく独立して走っている。細胞種が異なっても、培養法、選別法など、共通する部分も多いので、細胞腫間での連携を密にして効率的な開発を考慮すべきである。また、今後のマーケット戦略や国際的な特許戦略を具体的に検討する必要がある。

2) 今後に対する提言

世界におけるこの分野の開発競争は非常に激しい。常に世界の研究状況や市場を予測して、ユーザーニーズを意識した開発を進めることが重要である。プロジェクト前半の予算配分は適切であったと判断できる。プロジェクトの後半においては進捗著しい領域や産業化への波及効果のある技術に重点的に追加資金を投下し、研究開発の加速を図ることを望む。また、プロジェクトの実施期間中であっても、開発された技術に関して、可能なものは出来るだけ早期の実用化・ユーザー評価を進め、パブリシティの向上を目指すべきである。

2. 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

我が国が先導している iPS を始めヒト幹細胞はこれからの再生医療への貢献度が大きく期待される。特に、iPS 細胞分野は日本発の技術であり、発信国としての国際貢献が強く求められている。その産業応用のため、ヒト幹細胞の安定な培養・保存方法の開発、品質評価指標の開発、品質管理・安定供給技術の確

立は非常に重要だが、新たな技術開発はリスクを伴う長期の投資が必要であるため、NEDOの関与が必須である。

2) 研究開発マネジメントについて

幅広い、適切な実績のある企業との産学連携により、効率の良い技術開発を行っていると評価できる。また、全体として目標達成の要素技術が適切に組み立てられており、目標達成度を測定・判断できる具体的かつ明確な開発目標も設定している。また、各テーマは、適切にマネジメントされており中間評価時点での成果も計画を上回るものが多く、グループによっては、成果の実用化・事業化につなげる戦略が明確になっている。

一方、テーマ間の連携が必ずしも図られておらず、特にES細胞とiPS細胞との間でさらに連携を進めることが望まれる。そのためにも、全体を統括するプロジェクトリーダーのリーダーシップとNEDOのマネジメントに期待する。

3) 研究開発成果について

ES細胞やiPS細胞の大量培養法や培養基材など、世界的にも競争力のある成果が数多く出ており、中間目標は概ね達成されている。成果の製品化も出てきており、将来的に市場の拡大あるいは市場の創造につながることを期待できる。

一方、いくつかの細胞領域で独自の市場調査等が行われていたが、本プロジェクトにおける機器開発・培地開発等に有効な調査が行われたか疑問である。細胞の特性を活かした開発技術に対するニーズの把握が必要。一部特許出願数（特に国際特許）と論文発表数が少ない領域もあり、研究成果の積極的な発信が望ましい。

4) 実用化・事業化に向けての見通し及び取り組みについて

ES細胞の閉鎖式浮遊大量培養方法、成長増殖因子(bFGF)代替化合物、iPS細胞の培養基材、滑膜間葉系幹細胞の大量培養法など、早期の実用化・事業化が期待できる複数の成果が短期間で出ていることは、評価できる。

一方、実用化・事業化に向け、競合技術と比較し性能面、コスト面を含み優位性を世界市場で確保する道のりは厳しいが、コスト意識をさらに高めた製品開発を行うことが必要。また、内外の技術動向、市場動向等を踏まえ、特許戦略、あるいは製品化についての今後の目標、計画を具体的に検討する必要がある。

研究評価委員会におけるコメント

第37回研究評価委員会（平成25年12月4日開催）に諮り、以下のコメントを評価報告書へ附記することで確定した。

- ES細胞やiPS細胞では、その分化誘導が一番難しいので、更に力を入れるべき。

研究評価委員会

委員名簿（敬称略、五十音順）

職 位	氏 名	所属、役職
委員長	西村 吉雄	技術ジャーナリスト
委員長 代理	吉原 一紘	オミクロンナノテクノロジージャパン株式会社 最高顧問
委員	安宅 龍明	独立行政法人産業技術総合研究所 つくばイノベーション アリーナ推進本部 共用施設調整室 招聘研究員
	伊東 弘一	学校法人早稲田大学 理工学術院 招聘研究員 公立大学法人大阪府立大学 名誉教授
	稲葉 陽二	学校法人日本大学 法学部 教授
	小林 直人	学校法人早稲田大学 研究戦略センター 副所長／教授
	佐久間一郎	国立大学法人東京大学 大学院工学系研究科 附属医療 福祉工学開発評価研究センター センター長／教授
	佐藤 了平	国立大学法人大阪大学 産学連携本部 名誉教授／特任 教授
	菅野 純夫	国立大学法人東京大学 大学院新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 教授
	宮島 篤	国立大学法人東京大学 分子細胞生物学研究所 教授
	吉川 典彦	国立大学法人名古屋大学 大学院工学研究科 マイク ロ・ナノシステム工学専攻 教授

第1章 評価

この章では、分科会の総意である評価結果を枠内に掲載している。なお、枠の下の「○」「●」「・」が付された箇条書きは、評価委員の主な指摘事項を、参考として掲載したものである。

1. プロジェクト全体に関する評価結果

1. 1 総論

1) 総合評価

ES/iPS 細胞のみならず、体性幹細胞の重要性にも着眼して、幹細胞領域全体を俯瞰している見識は高く評価できる。体性幹細胞に関しては間葉系に絞って実用化に必要な研究を進めることは、プロジェクトが散漫に陥るのを防止し、わが国が大きく遅れを取っている間葉系幹細胞を用いた再生医療の一般化・産業化の促進のためには正しい判断である。さまざまな幹細胞の特性を活かした、我が国独自の培地・大量培養技術を集約的に支援する取り組みは極めて意義深い。また、産業化に直結する技術や周辺産業の活性化につながる技術が複数創出されており、研究成果の一部は既に製品化され、今後の再生医療への応用も期待でき、順調に進捗しているように見受けられる。中間目標は概ね達成されており、評価できる。

一方、ES 細胞と iPS 細胞、滑膜細胞と間葉系幹細胞など、技術開発が連携することなく独立して走っている。細胞種が異なっても、培養法、選別法など、共通する部分も多いので、細胞腫間での連携を密にして効率的な開発を考慮すべきである。また、今後のマーケット戦略や国際的な特許戦略を具体的に検討する必要がある。

〈主な肯定的意見〉

- ES 細胞、iPS 細胞、滑膜間葉系幹細胞についての大量培養法の確立、増殖因子代替技術による低コスト化、革新的な培養基材など、産業化に直結する技術や周辺産業の活性化につながる技術が複数創出されており、プロジェクトの中間時点として評価できる。これらの技術開発は日本の幹細胞関連の標準化、産業化に向けた根幹を成すものであり、最終目標達成のため継続して支援すべきである。
- iPS 細胞のベンチマークとしてのみならず、ヒト ES 細胞の実用化を促進することを目標に掲げた本プロジェクトの意義を認める。体性幹細胞に関しては間葉系に絞って実用化に必要な研究を進めることは、プロジェクトが散漫に陥るのを防止し、わが国が大きく遅れを取っている間葉系幹細胞を用いた再生医療の一般化・産業化の促進のためには正しい判断と認める。
- ヒト幹細胞を用いて、創薬スクリーニングや発生メカニズムの解明、疾患解明、再生医療への応用が期待されており、世界的に見ても今後波及効果の高いテーマであり、意義は高い。得られた成果は今後の再生医療への応用も期待できるものである。
- さまざまな幹細胞の特性を活かして、我が国独自の培地・大量培養技術を集

約的に支援する取り組みは極めて意義深い。とりわけ、本課題の支援期間内に山中先生のノーベル賞受賞が実現し、より一層、我が国独自の技術開発に期待が寄せられている。

- iPS 細胞がブームとなっている中、ES/iPS 細胞のみならず、体性幹細胞の重要性にも着眼して、幹細胞領域全体を俯瞰している見識は高く評価できる。すべての課題で、目標に向けて着実な進展を遂げている。
- 研究成果の一部製品化が実施され、順調に進捗しているように見受けられる。中間目標は概ね達成されている状態であり、目標の期間設定は妥当であった。
- 概ねヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発という目的が達成されている。

〈主な問題点・改善すべき点〉

- ヒト ES 細胞とヒト iPS 細胞についての技術は共通する部分も多いので、最初から 2 つに分けることには若干疑問があるが、内容的に若干異なるものを開発することで進めていると認識している。プロジェクトリーダーの下、それぞれ別々に進めている印象が強い。しかしながら、オーバーラップする技術も多いこと、世界中でしのぎを削る分野でもあるので、ヒト ES と iPS 細胞間の連携のみならず、間葉系幹細胞と Muse 細胞間の連携が必要です。
- すべての開発項目を並行して進めるのではなく、産業化の波及力、世界標準に向けた競争力のある技術に重点的に資源を投下し、開発の加速化を図るべきである。ES 細胞と iPS 細胞に関して、多能性幹細胞として共通の項目も多く、それらの項目について連携を密にし、共同で開発することを考慮すべき。
- しかしながら個々の幹細胞領域によって取り組みがまちまちであり、このままではバラマキの印象が否めない。進捗著しい領域に集約的に資金を投入するなど大胆な改革が必要である。また、ES 細胞と iPS 細胞、滑膜細胞と MSC など、共通の評価項目、技術開発が連携することなく独立して走っており、このままでは有効な資金投資になっていない。全体を俯瞰したマネジメントが強く求められている。
- ES/iPS 細胞分野に関しては、その臨床応用を考えた場合の最大の障壁は造腫瘍性であり、大量培養系の開発の後に、そうした大量培養系で培養した細胞において造腫瘍性が増大していないか否かの検証がもう少し厳密に行われるべきかと思う。
- 今回は幹細胞実用化・産業化に関する技術開発が目的であるが、今後のマーケット戦略や臨床応用に対する一貫した計画を具体的に示す必要がある。
- テーマ間に差がある。一部は製品化まで行っているものがあるのに対し、かなり前の段階にとどまっている研究もある。

〈主なその他の意見〉

- 大型培養装置など、実際利用者の数がかなり限られると予想されます。大型培養装置の開発が本当に必要なのか、市場がどれくらいあるのかの調査結果の裏付けが必要である。部分技術でも（冷凍技術など）利用できるようにする、他社に技術移転するなど、製品としての成果を多く出すためのマネジメントが必要である。
- テーマごとに重要なことを行っているのは確かだが、それが世界的に見た場合、世界初、世界一、になれるか否か、を真剣に考え、戦略を練る必要があろう。
- 国際的な特許戦略については、企業任せでプロジェクト間でバラツキがみられるので、プロジェクト全体として検討するシステムが必要と考える。

2) 今後に対する提言

世界におけるこの分野の開発競争は非常に激しい。常に世界の研究状況や市場を予測して、ユーザーニーズを意識した開発を進めることが重要である。プロジェクト前半の予算配分は適切であったと判断できる。プロジェクトの後半においては進捗著しい領域や産業化への波及効果のある技術に重点的に追加資金を投下し、研究開発の加速を図ることを望む。また、プロジェクトの実施期間中であっても、開発された技術に関して、可能なものは出来るだけ早期の実用化・ユーザー評価を進め、パブリシティの向上を目指すべきである。

〈主な今後に対する提言〉

- ヒト ES 細胞、iPS 細胞の培養方法、評価基準の設定は言うまでもなくたいへん重要であるが、そこから各組織の細胞に分化できなければ意味をなさなくなる。ここで開発した技術を用いて、分化細胞の作成について、検討を早期に進めることが大変重要と思われる。
確実に分化誘導の技術につなげていけることが求められる。この部分は手薄に感じられる。これについての今後の研究を加速することが望まれる。
- ユーザーからの要望に応えない機器開発は無用の長物である。既存の技術の集大成だけでなく、何が要素技術として必要であるかの市場調査は極めて重要。巨額の資金を投資するからには、単なる市場調査でお茶を濁すことは許されない。本プロジェクトがコミュニティからの声を集約し、需要に根ざした産業化を目指すように強く期待する。
- 世界におけるこの分野の開発競争は非常に激しい。よって、プロジェクトの中間地点ではあるが、これまで開発された技術に関して、再生医療実現拠点や企業に広く情報を提供し、可能なものは出来るだけ早期の実用化につながる道を追求すべきである。
- 幹細胞それぞれに独特の技術開発がある一方、横串をさせる共通技術も多数存在する。したがって、課題間の連携は極めて大切である。今後、事業後半にむけて、半期に一度程度、関連領域のプログレスを共有する場を設けてはどうか。
- 最小限の研究経費をセットにして、本プロジェクトで開発された試薬・培地・細胞を利用した橋渡しの研究や臨床研究への参加者・機関を募集すれば研究者・国民へのパブリシティ向上へも役立つのではないか。多くの国内研究者に、文科省などとの多少の重複感を気にせず NEDO の意気込みを示すことは重要。
- 今後、開発した技術を産業化へつなげるためには、法規制や標準化施策に加えて具体的にそのニーズやマーケティングの方法を具体的に示す必要があ

る。

- 今後連携体制をさらに強め、より一層研究の加速化を図り、得られた成果をプロジェクト内外に、利用できるようにして頂きたい。
- 細胞種がことなっても、培養法、選別法など、共通する部分も多いので、協力して、戦略的に進める必要がある。

〈主なその他の意見〉

- ・ 産業利用について、大型機械の開発を進めるよりも、ライフサイエンス研究試薬などの消耗品に占める国産品の割合が低いことを考慮すると、試薬の方についても、実用化、産業化につなげられるように、戦略的に進めるべきである。ES細胞を使った研究はノウハウの占める部分が多い。こういったノウハウが普及できるように(たとえば、試薬として販売するなど)、民間企業への技術移転の仕組みも考えていただきたい。
- ・ 日本発のiPS細胞についてはもとより、他の幹細胞についても国際標準化を目指した研究は非常に重要であるが、重厚すぎる評価により国内のみで通用する標準化にならないよう、常に世界の研究状況や市場を予測して、開発を進めてほしい。
- ・ 多くの研究で世界一を目指すのは、困難である。従って最も強い1点を追及すべきではないか。

1. 2 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

我が国が先導している iPS を始めヒト幹細胞はこれからの再生医療への貢献度が大きく期待される。特に、iPS 細胞分野は日本発の技術であり、発信国としての国際貢献が強く求められている。その産業応用のため、ヒト幹細胞の安定な培養・保存方法の開発、品質評価指標の開発、品質管理・安定供給技術の確立は非常に重要だが、新たな技術開発はリスクを伴う長期の投資が必要であるため、NEDO の関与が必須である。

〈主な肯定的意見〉

- 大型自動培養装置の需要予測は難しく、従って、民間の営利活動としてのみでは開発が困難であり、公的資金の提供は妥当と考える。
幹細胞の様々な分野への応用は、世界中が目指している分野であり、目的は妥当と考える。特に、iPS 細胞分野は日本発の技術であり、発信国としての国際貢献が強く求められている分野と思われる。
- ヒト ES 細胞、iPS 細胞を創薬、再生医療へ向けて応用する技術は必要であり、様々な未解決な問題も多く抱えている。その状況を踏まえて、評価基盤を構築することは今後の医薬品産業、医学関連産業に大きな貢献をもたらすと期待できる分野である。しかしながら民間の財源、あるいは、科研費ではカバーできない領域であり、まさに NEDO プロジェクトとして推進すべき課題である。
- 健康安心イノベーションプログラムの目標達成のために寄与している。本研究は基礎研究とは異なり、応用研究であることより、国の強力な支援が必要である。また民間活動のみでは世界的な製品化は不可能であり、また公共性が高いことにより、NEDO の関与が必要とされる事業である。
- 基盤的研究と産業化を睨んだ技術開発は車の両輪である。技術開発を民間企業に任せっきりにすることなく、NEDO として積極的に支援することが極めて重要。そのために、NEDO は、基盤研究を行う研究者と技術開発を行う企業との間に介在して、全体像を把握する進捗管理が必要。
- 我が国が先導している iPS を始めヒト幹細胞はこれからの再生医療への貢献度が大きく期待されるため、法制度を見据えて NEDO 事業として行うことは妥当である。
- 産業応用のため、幹細胞の安定的供給と品質基準の確立は非常に重要で、新たな技術開発はリスクを伴う長期の投資が必要であるため、NEDO の関与が必須である。
- 本事業の公共性に鑑み、妥当である。

〈主な問題点・改善すべき点〉

- 目的設定について一言。原材料としての幹細胞を大量培養することに軸足が置かれているが、実際に移植する細胞、創薬でスクリーニングに用いる細胞は、幹細胞そのものではなく分化誘導した細胞である。従って、分化誘導法の技術革新とは不分離の関係であり、幹細胞をただ増やせばよいというものではないだろう。このプロジェクトの周辺技術として、分化誘導に関する進捗、品質評価項目などをどのように取り入れていくのかマネジメントの問題である。
- 国際競争力、市場動向を予測し、総花的にすべて開発するのではなく、日本の強みを生かした分野により多くのリソースを投入し、開発を加速化すべき。
- 大型培養機械は使用する研究者に限られる。このため、得られた成果を広く社会へ還元できるように、たくさんの研究者が利用できるような、試薬、消耗品の開発の方に力を注ぐことが望まれる。
- 製品化することも容易ではないが、競争の激しい再生医療において、世界的に競争力のある製品を開発するには、強力な国のリーダーシップが必要なのではないか。

〈主なその他の意見〉

- ・ 再生医療と創薬等の応用分野があるが、技術開発の要求性も違うので、目的を明確にした開発を進めて欲しい。

2) 研究開発マネジメントについて

幅広い、適切な実績のある企業との産学連携により、効率の良い技術開発を行っている」と評価できる。また、全体として目標達成の要素技術が適切に組み立てられており、目標達成度を測定・判断できる具体的かつ明確な開発目標も設定している。また、各テーマは、適切にマネジメントされており中間評価時点での成果も計画を上回るものが多く、グループによっては、成果の実用化・事業化につなげる戦略が明確になっている。

一方、テーマ間の連携が必ずしも図られておらず、特に ES 細胞と iPS 細胞との間でさらに連携を進めることが望まれる。そのためにも、全体を統括するプロジェクトリーダーのリーダーシップと NEDO のマネジメントに期待する。

〈主な肯定的意見〉

- 特許出願が少ないようにも見受けるが、プロジェクト開始以前にも出願した事例があるようであり、大きな問題はないと考える。
成果の実用化・事業化につなげる戦略として多数の企業も参画しており、その方向で取り組んでいる」と評価できる。
成果の実用化・事業化につなげる知財戦略は方向性として間違っていない妥当なものと評価できる。
- 複数の企業研究者が同じフロアで研究開発を進めている KISTIC での事業は、実際の連携具合はともあれ今後必要な、この分野にも取り入れるべきスタイルではないか。この中にアカデミアの研究者もチームの一員として常在するようになれば（あくまでも特定の製品の開発でコラボするというスタンスで）面白いのでは。
- 目標達成度を測定・判断できる具体的かつ明確な開発目標を設定しているとはいえる。
グループによっては、成果の実用化・事業化につなげる戦略が明確になっている。
- 業界企業と産学連携することにより、効率の良い技術開発・産業化を行うことができるという点で評価できる。
- 各プロジェクトは、適切にマネジメントされており中間評価時点での成果も計画を上回るものが多く、評価できる。
- 幅広い、適切な企業が参加している。実績のある企業が参加しているので、産業化が期待できる。全体として目標達成の要素技術が適切に組み立てられている。

〈主な問題点・改善すべき点〉

- 特に ES は iPS と、iPS は ES と、それぞれ研究者間に距離があるような印

象を感じたので、両者の連携のマネジメントに関して、専門的な見地からアドバイスできる人材が必要なのではないか。

- 目標は妥当ではあるが、他の多くの国でも掲げている目標であり、戦略的という観点からは少し見劣りがする気もする。即ち、まだまだ工夫の余地がある。

細胞の標準化に関しては、要素技術間の関連性・互換性・相補性というような観点からの工夫が必要と思われる。

- 実施者同士の連携が必ずしも図られていないと思われるので、今後一層情報の共有化がのぞまれる。大型予算が組まれていることを考慮すると、もう少し特許戦略、あるいは製品化についての今後の目標、計画を具体的に示す必要がある。
- 個々のグループの裁量に任していることが多く、内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているとはいいがたい。
グループによっては成果の実用化・事業化につなげる戦略が明確になっていない。
- ES細胞とiPS細胞との間でさらに連携を進め、共通の開発項目については一本化など効率化を図るべきであり、そのためにも、全体を統括するプロジェクトリーダーのリーダーシップに期待する。

〈主なその他の意見〉

- 本ミッションの性格上、臨床研究や治験を目指す研究を多く取り入れられないことは理解できるが、日本で再生医療を行う際の細胞のコストは実際に臨床に適用してみなければわからないし、逆にコストを厳しく管理しなければ真の実用化は望めない。NEDOの組織ならこのような視点を各研究者に浸透させることが可能であろうから、将来は思いきって（厚労省との棲み分けなどといわずに）間葉系幹細胞の臨床研究も取り入れるべきと考える。
- プロジェクト全体として世界市場を視野に入れた特許戦略を早急に確立すべき。

3) 研究開発成果について

ES 細胞や iPS 細胞の大量培養法や培養基材など、世界的にも競争力のある成果が数多く出ており、中間目標は概ね達成されている。成果の製品化も出てきており、将来的に市場の拡大あるいは市場の創造につながることを期待できる。

一方、いくつかの細胞領域で独自の市場調査等が行われていたが、本プロジェクトにおける機器開発・培地開発等に有効な調査が行われたか疑問である。細胞の特性を活かした開発技術に対するニーズの把握が必要。一部特許出願数（特に国際特許）と論文発表数が少ない領域もあり、研究成果の積極的な発信が望ましい。

〈主な肯定的意見〉

- 成果は物足りないテーマもあるが、全体として一定の進展は認める。
体性幹細胞課題がより早期に市場の創造につながるものと期待できる。
ロボットを駆使した自動培養装置は世界に先駆けて開発されたものであり、その技術力は高く評価できる。
- ES 細胞や iPS 細胞の大量培養法や培養基材など、世界的にも競争力のある成果が数多く出ており、今後の開発の更なる加速化を期待する。
- 一部のグループは、成果は目標を達成しており、成果は将来的に市場の拡大あるいは市場の創造につながることを期待できる。
- 成果の製品化も出てきているので、今後より多くの製品化の成果が期待できる。
- 中間目標は概ね達成されている。
- 中間評価という視点では良好である。

〈主な問題点・改善すべき点〉

- 各細胞領域で独自の市場調査等が行われていたが、果たして機器開発・培地開発等に真に有効な調査が行われたか疑問である。細胞の特性を活かした調査が行われるべきであった。その結果、受益者の意見を必ずしも反映しない重厚長大な技術開発が散見され、このような自己満足的な開発で真の産業競争力が生まれるとは思えない。技術開発が自己目的化している印象が否めない。
- 開発技術に対するニーズの把握が必要。
各企業におけるマーケティング具体案の提示が必要。
- 品質評価方法については、世界基準から見た有用性、競争力により、重点的に開発する項目を絞るべきである。標準化に向けての取組みは評価できるが、日本のみで通用する標準化ではなく、真に世界標準を取れる技術開発のため、

先行技術に対して大幅な優位性を追及して欲しい。

- 大量培養装置について、ES 細胞用、iPS 細胞用それぞれがバラバラな印象。投資した資金に見合った成果が出ているのか疑問。企業の壁を乗り越えてそれぞれ得意分野を発揮して効率的な複合機を作った方が良いのではないか。
- 一部特許数と論文発表数が少ない領域もあるが、この分野の競争の厳しさを考慮すると、知財を国際的に確保できるような戦略が重要と思われる。
- 多くのグループは、目標が達成されておらず、特に成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか否か、疑問である。
- 知財出願が極めて低い。特に国際特許が少ない。

〈主なその他の意見〉

- ・ 他の競合技術はまだアンダーグラウンドのものが多くと予想され、優位性を判断するのは難しい。
日進月歩の領域であり、どこの国でも標準化を掲げているが、未だにその道筋は明瞭にはなっていないと思われる。
- ・ 研究成果を出来るだけ早く再生医療拠点や企業に開示するシステムを検討してほしい。
- ・ 社会への普及ができるように、成果の論文化も早期にできるようにして頂きたい。

4) 実用化・事業化に向けての見通し及び取り組みについて

ES細胞の閉鎖式浮遊大量培養方法、成長増殖因子(bFGF)代替化合物、iPS細胞の培養基材、滑膜間葉系幹細胞の大量培養法など、早期の実用化・事業化が期待できる複数の成果が短期間で出ていることは、評価できる。

一方、実用化・事業化に向け、競合技術と比較し性能面、コスト面を含み優位性を世界市場で確保する道のりは厳しいが、コスト意識をさらに高めた製品開発を行うことが必要。また、内外の技術動向、市場動向等を踏まえ、特許戦略、あるいは製品化についての今後の目標、計画を具体的に検討する必要がある。

〈主な肯定的意見〉

- ヒト ES細胞の培養について、一部の成長増殖因子を代替する低分子化合物を見出したことは大きな成果として評価できる。ほかの要素技術も実用化へ向けての取り組みも着実に進めている。中間評価としては、まずまずの成果である。
- bFGFの代替化合物には期待したい。また、凍結保存法に関しても、複数の開発があり、優位性があると見受けた。
量産化後の品質管理が万全となれば、見通しはあると判断できる。
- ES細胞の閉鎖式浮遊大量培養方法、FGF代替化合物、iPS細胞の培養基材、滑膜間葉系幹細胞の大量培養法など、早期の産業化が期待できる複数の成果が短期間で出ていることは、評価できる。
- ES細胞、iPS細胞領域においては、それぞれ具体的な製品化へ向けた方向性が確立した。今後、需要を見据えた製品化に努力して欲しい。
- ES細胞・iPS細胞に関しては、培地、凍結保存、自動培養装置を含む様々な大量培養手法に関していずれも当初の設定目標に沿う形で、いくつか予想以上の成果も含みつつ、中間評価段階では良好に進展していると判断する。
- 一部実用化に向けて課題が明確になっており、成果は市場やユーザーのニーズに合致している。

〈主な問題点・改善すべき点〉

- 細胞の標準化に関しては、未だに現象論の蓄積段階にあると見受けた。なるべく早期に、有用な解析方法を絞り込む必要がある。複数の解析方法の融合でも勿論構わないと考える。
自動培養装置に関しては、小型の低価格帯の製品開発も重要であると思われる。大型装置は多数の需要は見込めないが、特定の目的には重要な装置であるとする。

- 自動培養装置に関しては、ロボットを駆使した装置の開発は、優位性はあるが、今後の課題は生産コスト面（販売価格）と思われる。
- 産業化に向けては、世界の市場予測に基づいたコスト意識をさらに高めてほしい。
- 市場規模を正確に把握し、対費用効果が得られる製品開発が必要。大量培養技術のみに目を奪われるのではなく、分化誘導法や iPS 細胞の新しい樹立法など、産業化した際に時代遅れとならないように最新の研究成果を反映させる必要がある。
- 評価基盤の確立のためには、分化能の評価が必要であるが、この観点での検討が必ずしも明確にされていないように感じた。
- 実用化に向けて、競合技術と比較し性能面、コスト面を含み優位性は確保される見通しは厳しい。

〈主なその他の意見〉

- ・ 技術予測、市場予測に基づき、競争力・有用性が期待できる項目について、さらに資源を重点的に投下し、開発を加速化することを期待する。

2. 個別テーマに関する評価結果

2. 1 ES 細胞領域

ES 細胞大量培養を実施するにあたり必要な機械ならびに技術の開発は十分になされ、個々の技術開発からは注目すべき成果が得られている。特に、閉鎖系 3D 大量培養法および自動培養装置の開発、成長増殖因子 (FGF) を代替する低分子化合物の発見は優れた成果といえる。早期の高品質低価格の培地開発を期待する。品質評価法についても、製品化につながっている成果も複数出ており、高く評価できる。汎用性の高い技術であるので、今後の進展が期待される。

一方、ES 細胞は世界的に競争が激しい分野なので、ポイントを絞って優先順位を付けた戦略的な開発が必要。また、多くの開発項目が iPS 細胞と共通性を持つので、連携を拡大して効率的に開発を進めるべき。

〈主な肯定的意見〉

- 多種類の開発項目に取り組んでおり、一定の成果を出している。特に、閉鎖系 3D 大量培養法および自動培養装置の開発、FGF 代替低分子化合物の発見は優れた成果といえる。早期の高品質低価格の培地開発を期待する。品質評価法についても、製品化につながっている成果も複数出ており、高く評価できる。
- 成長増殖因子を代替する低分子化合物の開発、培地開発、ES 細胞培養容器の開発、幹細胞の品質評価の指標開発、特性解析のためのメタボローム解析、エピゲノム解析、糖鎖解析は順調に進められており、多くの成果を出している。すでに、産業化の目途がついているものが多数あり、汎用性の高い技術であるので、今後の進展が期待される。
- ES 細胞大量培養を実施するにあたり必要な機械ならびに技術の開発は十分になされている。
- 個々の技術開発からは注目すべき成果が得られている。これらの要素技術を全体としてどのように集約していくのか、具体的な戦略が必要ではないか。
- 成果は概ね目標を達成している。
成果は将来的に市場の拡大或いは市場の創造につながることを期待できる。
バッグによる大量培養は特に優れていると感じた。
- 一定の進展を遂げていると評価できる。
bFGF を代替する化合物は、作用機序等をしっかり見極めた後には、需要は高いと大いに期待できる。また、細胞保存液の開発も需要が高いものと期待できる。
知的財産権等の取扱は海外特許も申請しており、評価できる。

論文数はまだ少ないが、学会発表数は十分と思われる。

最初から（本プロジェクト開始以前から）臨床応用を目指している課題であり、妥当と考える。

実用化に向けて、競合技術と比較し性能面、コスト面を含み **bFGF** を代替する化合物の開発や、新規細胞保存液の開発は優位性があるものと評価できる。量産化後の品質に関してはさらなる検討が必要であるが、量産化技術が確立される見通しは見えてきたと評価できる。

企業の参画もあり、事業化する製品も明確であると評価できる。また、言うまでもなく、本課題の成果は **iPS** 細胞分野へも応用が可能である。

〈主な問題点・改善すべき点〉

- 多数の開発項目について並行して進めているが、これまでの成果を革新性、競争力、波及効果から分析し、優先順位を付けて重要な項目にリソースの配分を増やし、開発を加速化すべきである。

- 事業後半に向けて、限られた時間と経済的・人的資源を有効に活用するよう期待する。そのためには、個々の要素技術について、**priority** をつけた選択と集中も必要。

品質評価項目について、必要かつ最小限の項目に集約する事が今後の産業化には重要ではないか。The more, the better.な印象であった。

- **bFGF(FGF2)**の代替化合物の発見は大きな成果であると認めるが、特許取得後にはその作用機序 (**FGFR** を直接活性化しているのか、**FGFR** シグナル経路のどこを活性化（あるいは抑制分子を阻害）しているのか、あるいは全く無関係の経路の活性化により **FGF** と類似の効果を誘導しているのかを解明して欲しい。作用機構がわかれば安心して使用できる。

分化の評価を各分担者でまちまちに行っているのは、現時点では仕方ないかもしれないが、一ヶ所で統一したフォーマットで行えないか？ 実費+ α でその様な作業を、例えば必要十分な技術基盤を持っている大学の希望する研究室に委託し、事業として育成していくようなことは？

ナノファイバーゼラチン、浮遊スフェア培養を容易にするポリマー1などの開発はきわめて魅力的なので、特許や細かな条件に拘泥せず積極的に広めて欲しい。モニター票に記入を条件に多少の研究費を付けて（50万円程度？）使用を呼びかけるなどしてパブリシティ向上に努めて欲しい。**iPS** 細胞・**ES** 細胞が本格的に実用化段階に入ったときの基本培地の需要は現在の1,000倍を超えると予想され、シェア上位に食い込む製品のもたらす利益は大きいと予想される。日本から出版される論文は信用が高く（個人的な印象

かもしれないが)、少なくとも日本で行われた研究では良く引用される培地であることは、本技術開発が最終的に成功したかどうかを判断する必須条件ではないか。

論文発表は少ない。

- 細胞の品質評価に関しては、進展はあるものの、新規性がきわめて高い解析方法という訳ではなく、優位性に関しては疑問である。

ES 細胞のユーザーは現時点では少ないが、iPS 細胞分野にも水平展開が可能な技術開発及び成果であると考えるので、iPS 細胞分野との連携協力を深めるべきである。

細胞の標準化に関しては、解決の道筋が明確に示されているという段階には達していないと思われる。本テーマに限らず、世界的な情勢からしても、今後さらなる検討、技術開発が必要な分野である。

- 多くの共同実施先において、分化の指向性についての研究を進めている。ES 細胞の培養方法との関連性について、それぞれ一定の成果が得られている。今後どこを目標にするかを明確にすることが望ましい。

〈主なその他の意見〉

- ・ 培地開発、基材、品質評価など多くの開発項目が iPS 細胞と共通性を持つので、連携を拡大して効率的に開発を進めるべき。
- ・ ES 細胞は世界的に競争が激しい分野なので、ポイントを絞って、戦略的な、開発を目指す必要がある。
- ・ わが国の再生医療が iPS 細胞を中心に組み立てられつつある現状で ES 細胞の開発目標の設定は難しい面があるが、培地、凍結保存、自動培養装置を含む様々な大量培養手法などは共通の技術であり iPS 細胞チームによる検証を素早く本プロジェクト内で行うことにより ES 細胞・iPS 細胞に共通の革新的技術として早期に実用化・一般化（国内外でしばしば利用される）して欲しい。
- ・ 本成果が、他の競合技術と比較して優位性があるか否かのリサーチが重要である。
- ・ iPS 細胞と比較した場合の ES 細胞の優位性に関しては、今後の課題。一般市民のみならず、研究者コミュニティに対しても広く情報発信が必要。

2. 2 iPS 細胞領域

中間評価として、設定された目標をほぼ達成できている。複数の企業がプロジェクトリーダーの下で、CiRA（京都大学 iPS 細胞研究所）との連携を図りつつ、共通の開発課題に取組み、自動培養装置と凍結保存装置を連結させた試作機の作製まで達成したことは非常に評価できる。また、ラミニン活性フラグメントに基づく培養基材の開発は非常に重要な成果であり、iPS 細胞のフィーダーフリー培養の簡便化につながり実用化を加速することが期待される。iPS 細胞の凍結技術は、煩雑なガラス化法から簡単な緩慢法が開発されるなど、注目すべき成果があがっている。

一方、iPS 細胞自動培養・観察・凍結保存の実証機は非常に多くの機能を盛り込んでいるが、サイズが大きく価格も高い。このままでは、予算規模の大きい限られた機関や特殊な用途の活用しか期待できないため、成果をフルスペックで使用する製品のみでなく、機能を限定して普及を目指す製品も市場に提供する等、市場やユーザーニーズに合致する製品開発を行い、世界の市場の獲得を目指して欲しい。培養基材も同様で、商品化の際には高品質であっても価格競争力のある製品を開発して欲しい。また、世界的にみた競合技術の有無や優位性について示されておらず、実用化後の市場シェアが明確でない。ヒト ES 細胞のテーマとの連携についても今後一層推進していくことが望ましい。

〈主な肯定的意見〉

- 複数の企業が京都リサーチパーク内で共通の開発課題に取組み、自動培養装置、凍結保存装置、細胞観察装置を連結させた実証機の作製まで達成したことは非常に評価できる。また、ラミニン活性フラグメントに基づく培養基材の開発は非常に重要な成果であり、iPS 細胞のフィーダーフリー培養の簡便化につながり実用化を加速することが期待される。
- iPS 細胞の凍結技術は、煩雑なガラス化法から簡単な緩慢法が開発されるなど、注目すべき成果があがっている。緩慢法による iPS 細胞の凍結・融解が可能となれば、より簡便に iPS 細胞を使う施設も増えることが期待される。と、同時に、どこでもできる緩慢法に特化したモジュールが果たして一台必要なのか？ という疑問も生じる。
- 中間評価として、設定された目標をほぼ達成できており、実用化、事業化の見通しは立っている。より早期に製品化可能である印象を受ける。
- 多くの企業と実施者が参画している。プロジェクトリーダーの下で、CiRA との連携が図られている。
- 目標はほぼ達成されている。
凍結保存と取り出しを自動化することもきわめて重要であり、実用化段階で

各医療機関が細胞を利用する（一時的に保存する）場合にフェイルセーフな保存・取り出し環境（サンプルの取り違えがない）は、保存技術並んで重要になる。世界市場に類似品のない今、使用しやすい、エレガントな自動保存装置を目指して開発を進めて欲しい。

- 成果は目標を達成に向け、一定の進展はあると評価できる。
コロニー形態による画像解析装置、市販細胞保存液による緩慢冷却凍結保存を可能とするプログラムフリーザーの開発などは市場の創造につながる事が期待できる。
実用化に向けて課題はほぼ明確になっていると思われる。ただし、細胞の標準化に関しては、さらなる努力と工夫が必要と見受けた。
すべての成果ではないが、市場やユーザーのニーズに合致している成果があると評価できる。特に、コロニー形態による画像解析装置、市販細胞保存液による緩慢冷却凍結保存を可能とするプログラムフリーザーの開発などは、ニーズに合致したものである。
事業化した場合に対象となる市場規模や成長性等により経済効果等が見込めるものとなっているか。⇒iPS 細胞を活用した分野は発展拡張中であり、経済効果を期待できる。
多数の企業が参画しており、実用化・事業化に向けた具体的な見通しも立っていると評価できる。
- 目標に向かって着実に研究を進めている。

〈主な問題点・改善すべき点〉

- iPS 細胞自動培養・観察・凍結保存の実証機は非常に多くの機能を盛り込んでいるが、サイズが大きく価格も高い。このままでは予算規模の大きい CiRA のような限られた機関でしか導入できない。サイズのコンパクト化、低価格化により、世界の市場の獲得を目指して欲しい。培地、基材も同様で、商品化の際には価格競争力のある製品を開発しなければ、高品質であっても意味がない。
- 大きな予算が動いているが、それに見合う特許出願などの数が少ないように思う。
大型培養機器の開発が本当に必要なのかについて、NEDO プロジェクトとして進めることについて再度精査する必要がある。特許等の成果が多く出せるような戦略が必要であり、NEDO 側のマネジメントが求められる部分と思われる。
ヒト ES 細胞のプロジェクトとの連携についても今後一層推進していくことが望ましい。

- 世界的にみた競合技術の有無や優位性について示されておらず、実用化後の市場シェアが明確でない。特許出願件数があまりに少なく、このままでは知財が確保できるか不透明である。
- 3年後の本格的上市を目指した際に、受益者として誰を想定し、どの程度の市場規模を見積もっているのか？実証機を拝見すると、過度に重厚長大であって、特殊な用途の活用しか期待できない。自動培養技術、細胞観察評価技術、凍結保存技術の三つのモジュールをこのままバラバラにくみ上げると、ますます金額・スペースを浪費する非実用的な巨大な機器開発に終わりそう。三社連携というスキーム自体が足を引っ張ることのないように全体像を把握して欲しい。開発すること自体を自己目的化してはならない。
- 最終的にこのままの培養技術と自動装置で市場に支持される製品ができるか若干疑問。今後、ES細胞で開発された技術も取り入れたオールジャパン体制でより良い製品を目指して欲しい。
- 自動培養技術、細胞観察評価技術、凍結保存技術を組み合わせたシステム等が製品化されていない。
- 外部発表は行っているようであるが、論文発表がもう少しあってもよいように思う。
細胞の標準化に関しては未だ明瞭な道筋が見えてきていない状況と思われ、さらなる検討及び技術開発が必要と思われる。
自動培養装置の開発は、量産化に向けた優れた成果と評価できる。ただし、今後は小型化や低価格化による汎用性の向上のための努力も必要である。

〈主なその他の意見〉

- ・ ES細胞のプロジェクトと連携を密にして、iPS細胞およびES細胞で共同開発が可能な項目は積極的に共同で取り組むべきである。
- ・ NEDOが関与すれば、世界的なiPS細胞の臨床・創薬応用の調査（企業や個人によりある程度秘匿された事項に関しても）が可能ではないか？このような調査は戦略的にも重要。

2. 3 滑膜由来間葉系幹細胞領域

本研究により滑膜由来間葉系幹細胞の品質を維持した大量培養法の開発と GMP レベルの無血清培地の開発ができたことで、従来法に比較し、細胞増殖率、培養期間、培地必要量の点で大きく改善できており、中間目標を達成できている。技術開発に際しては、軟骨再生医療の産業化を目標に、実用的な観点から常にコスト競争力を考慮して技術開発に取り組んでおり、企業ならではの緻密な開発は好感が持てる。

〈主な肯定的意見〉

- 滑膜由来間葉系幹細胞の品質を維持した大量培養法の開発と GMP レベルの無血清培地の開発は高く評価できる。技術開発に際しては、軟骨再生医療の産業化を目標に、実用的な観点から常にコスト競争力を考慮して技術開発に取り組んでいる。
- 本研究により新たな培地および培養方法が確立できたことで、従来法に比較し、細胞増殖率、培養期間、培地必要量の点で大きく改善できており、中間目標を達成できている。安定的かつ大量に幹細胞を供給できる体制の確立が期待できる。
- 実用化に着実に近づいている。完全無血清培地の開発、全成分のアニマルフリー化、PET フィルム、新しいマーカー等実用化に目標を絞った企業ならではの緻密な開発は好感が持てる。
- 概ね計画通りに事業が順調に進んでいる。
当初の事業目標の大量培養の達成が期待できそう。
- 成果は将来的に新規治療分野につながるものと大いに期待できる。
最終目標の達成可能性は高いと評価できる。そのための道筋も明瞭に示されている。
事業化までの道筋をしっかりと持っているとは評価できる。ただし、より具体的な普及の見通し（連携協力する病院や医師の確保等）は今後の大きな課題である。
- 無血清下大量培養技術の開発が進んでいる。

〈主な問題点・改善すべき点〉

- 他の組織（骨髄、脂肪、臍帯、羊膜など）由来の間葉系幹細胞よりも優位性が明確とは判断できない。
海外特許出願も期待したい。
学会発表等も行われているようだが、論文がゼロなのは少し物足りない。
将来のユーザーとなる病院や整形外科医をもっと積極的にリクルートした

方が良い。

- 市場予測に関しては、対象となる患者セグメントを抽出し、製品単価および治療実施可能施設数などを考慮し、もう少し現実的な数値を出すべきである。
- プレゼンでは、無血清下大量培養技術の開発がどれほど大変なことであるかが理解しにくかった。

〈主なその他の意見〉

- 単に技術だけでなく、保険や術後のフォローに関しても少なくとも当初は本プロジェクトによる十分な予算付けを行い、一日でも早く全国的にこの細胞治療の普及に努めて頂きたい。

2. 4 Muse 細胞領域（基礎・基盤）

Muse 細胞に関する研究が多くの施設で行われるようになり、第 3 者による多分化能についての再現性が確認されつつある。FACS（蛍光細胞分離分析装置）に代わる分離法としてストレス負荷や磁気分離法の活用、また、新たな分離マーカーの開発に取り組んでおり評価できる。日本で Muse 細胞の特許が成立したことは産業化に向け重要な一歩である。

一方、実用化上の第 3 者による細胞利用が容易に行えるレベルには達していないので、早期に最適化されたプロトコルの確立が望まれる。実用化に向けて多くのハードルが存在し、例えば、細胞選別法のみでなく、増幅法の根本的なブレイクスルーが必要と考える。

〈主な肯定的意見〉

- Muse 細胞に関する研究が多くの施設で行われるようになり、多分化能についての再現性が確認されつつある。今後さらに分離・培養法を検討し、最適化されれば再生医療、細胞アッセイ系での活用に期待できる。
- 第 3 者による Muse 細胞の評価に関しては、ある程度達成できている。FACS に代わる分離法としてストレス負荷や磁気分離法の活用、また、新たな分離マーカーの開発に取り組んでおり評価できる。日本で Muse 細胞の特許が成立したことは産業化に向け重要な一歩である。
- 成果は、他の競合技術と比較してきわめて優位性が高い。
世界各地で再現性が得られてきており、普及の見通しは立ってきたと判断できる。
目標を達成できると期待できる。課題解決のための道筋も比較的明瞭である。
- Muse 細胞をもちいた independent な研究成果が発信されており、基礎的なデータが蓄積しつつある。
- 目標は十分クリアしている。
論文は多く、インパクトの高い雑誌へ掲載されている。

〈主な問題点・改善すべき点〉

- 再生医療、細胞アッセイ系での実用化の為に、大量供給技術は必要であるが、Muse 細胞の分離法、マーカー等については検討が続けられており、早期に最適化されたプロトコルの確立が望まれる。
- 第 3 者による細胞利用が容易に行えるレベルには達していないので、さらに、実用的な分離法、培養法の開発を期待する。また、大量培養法については、細胞選別法のみでなく増幅法の根本的なブレイクスルーが必要と考える。
- Muse 細胞の性質に関する解析が主であり、実用化に向けて多くのハードル

が存在する。患者に投与可能な生物製剤の制作には厳格な規格化基準の設定と遵守が求められるが、Muse 細胞の純度が低く不安定な場合、一定の治療効果や安全性が得られるのか不透明である。患者に投与可能な Muse 細胞の制作には純化システムの開発と規格化基準の設定が不可欠である。

- 他の機関による検証も大事だが、一日も早く臨床応用に向けた取り組みを具体的に策定し、進めて欲しい。
- 間葉系幹細胞プロジェクトと連携して進めることが重要と思われる。論文が多く出されているが、特許はそれに比べると少ない。今後再生医療の細胞源として考えるならば、特許戦略を強化しておきたい。
- 実施者が既に取り組んでいる事ではあるが、どここの組織に由来する MUSE 細胞が一番目的に叶ったものなのかを見極めて欲しい。臍帯血由来がそうであるならば、入手が容易であり（倫理面等でも）、きわめて有望なソースになると期待される。
- もっと多施設で研究を展開し、共通の研究手法を早く広めたほうがよいのではないか。

〈主なその他の意見〉

- ・ 国内外の多数の施設で Muse 細胞の研究が行われ、多分化能についての再現性は確認されつつあるが、細胞ソース・細胞分離・培養法、疾患モデル等は各施設で個別に検討が行われており、コンセンサスを得るまでのデータ蓄積はなされていない印象を受ける。
- ・ 米国における物質特許の取得が大きな鍵である。間葉系幹細胞の中に分化多能性をもつポピュレーションが存在することは以前から報告されており、臨床応用されている間葉系幹細胞の一部に過ぎないとの見方もあるので、先願との差別化、新規性の主張が重要である。

2. 5 間葉系幹細胞領域（基礎・基盤）

幹細胞の増殖性、分化能低下のマーカーとして 15 の候補が見出されており、目標は達成されている。この成果は、間葉系幹細胞の研究者や医師にとって非常に有用な情報であり、間葉系幹細胞を利用した再生医療分野を進展させるものと大いに期待できる。

一方、5 細胞株の研究で、普遍的な細胞評価因子を同定できるか不明である。品質カタログデータの構築に関してはさらなる洗練化が必要である。また、最も重要な骨髄由来間葉系幹細胞がカタログから抜けていることは不完全感が否めない。歴史的に見ても、研究者人口の多さからいっても、骨髄由来-間葉系幹細胞と臍帯血は必須であり、今後、予定されている両細胞の解析を進める必要がある。

〈主な肯定的意見〉

- 今回の研究において幹細胞の増殖性、分化能低下のマーカーとして 15 の候補が見出されており、目標は達成されている。
- 間葉系幹細胞カタログデータの構築に関し、多様な品質評価項目について分析し、有望なマーカーの発見に至っている。この成果は、間葉系幹細胞の研究者や医師にとって非常に有用な情報となる。
- プロスペクティブに間葉系幹細胞を選別できる可能性のある細胞表面マーカーを特定できた事は、きわめて画期的なことであり、間葉系幹細胞研究分野の進展に大いに貢献するものと期待できる。
間葉系幹細胞を利用した再生医療分野を進展させるものと大いに期待できる。
- MSC（間葉系幹細胞）は各施設で様々な培養が行われ、統一的な標準化の議論が行われたことが少なかった。その点で、この事業において 3 施設間の培養、分化誘導に伴う細胞のカタログ化がなされることは極めて重要。
- 培養条件の均質化で細胞も均質化されること、逆に条件次第でマーカーによる判定が正反対になる、という発見は印象的であった。目標を十分クリアする成果を上げている。きわめて論理的に発見された **geneX** は実用価値の高い(現時点でまともなマーカーがない)製品に発展すると期待される。
間葉系細胞を用いた再生医療の動向調査はきわめて印象的で、多くの関係者に有用であると信じている。
- 間葉系幹細胞のマーカーの同定において、増殖能と分化能の対応できるマーカーを見出したことは評価できる。今後の MSC の品質評価に資することができるかと期待する。特許の数と論文数もある程度の成果が出ている。
- 細胞品質カタログデータが開発されつつある。

〈主な問題点・改善すべき点〉

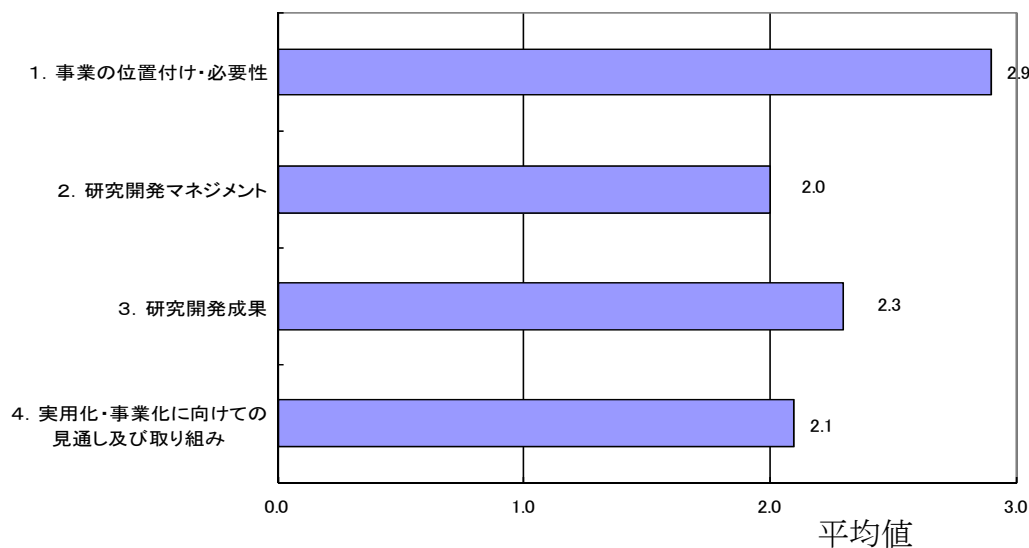
- 最も重要な骨髄由来 MSC（間葉系幹細胞）がカタログから抜けていることは画竜点睛を欠くの感が否めない。歴史的に見ても、研究者人口の多さからいっても、BM-MSC（骨髄由来-間葉系幹細胞）と臍帯血は必須ではないか。細胞バイオマーカー等に関する知財の波及効果が不明。研究成果から産業化に結びつくビジネスモデルが見えない。
- 国内特許は適切に行われているが、海外特許取得にも期待したい。品質カタログデータの構築に関してはさらなる洗練化が必要と思われる。ある意味では、かなり長期的な（当面は終焉がない）課題と考える。該当分野の研究者への普及活動は今後の課題と思われるが、成果が公開されれば研究者は自ずと増える分野であると思われる。
- ある程度道筋が見えているが、樹立された MSC の分化能の評価も気になるところである平行して進めておきたい。
- たった 5 細胞株の研究で、普遍的な細胞評価因子を同定できるか不明である。
- ほとんどの項目が大幅達成と自己評価しているが、実施したかどうかのみでなく、その成果について実用性、競争力、革新性の面から客観的に評価すべきである。
- 難しいテーマであると思うが、ぜひともよりシンプルな細胞品質カタログデータを確立していただきたい。

〈主なその他の意見〉

- ・ 担当機関では臨床研究も行えるはずであり、マーカーを直ちに臨床に反映させることも視野に入れて欲しい。標準的な自己間葉系幹細胞の細胞治療を行っている機関と共同でもよいので、マーカーにより選別されたエリート細胞の効果を是非臨床的に確認して今後市場をリードして欲しい。骨髄細胞も鋭意追加準備中との答えがあり、担当機関の独自性も評価したいがやはり安心した。
- ・ 欧米では間葉系幹細胞製品の臨床応用が進んでおり、それらを開発しているベンチャー企業等が品質評価基準についても精力的に開発を進めているので、国際競争力の面からそれらとの比較が必須である。
- ・ 目標に設定されていた「安定供給技術開発」も行われておらず、事業後半は規模を縮小し、BM-MSC を含むバイオマーカーを入れたカタログ作りに専念すべき。
- ・ 実用化前に大きなスケールで因子の意義を明らかにする必要がある。
- ・ 間葉系幹細胞には、ES/iPS 細胞とは異なる独自の利用価値があると考えられる。

3. 評点結果

3. 1 プロジェクト全体



評価項目	平均値	素点 (注)							
		A	A	A	A	A	A	B	B
1. 事業の位置付け・必要性について	2.9	A	A	A	A	A	A	B	B
2. 研究開発マネジメントについて	2.0	A	B	B	B	B	C	B	B
3. 研究開発成果について	2.3	B	A	A	B	B	B	B	B
4. 実用化・事業化に向けての見通し及び取り組みについて	2.1	B	A	B	A	C	B	B	B

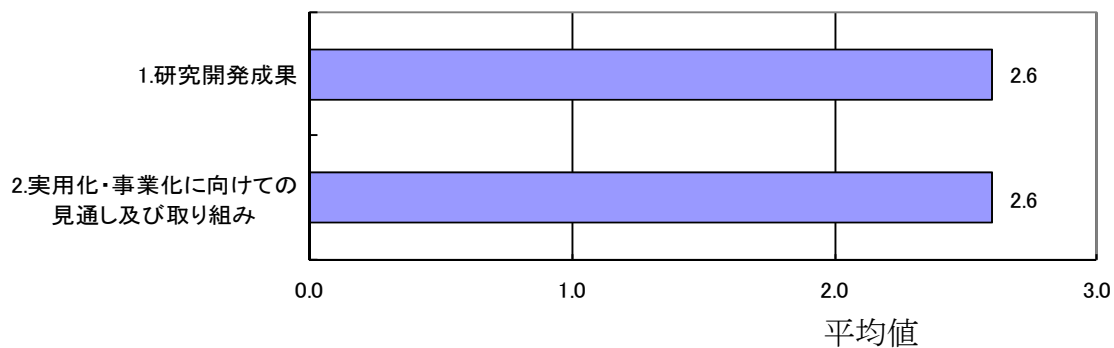
(注) A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

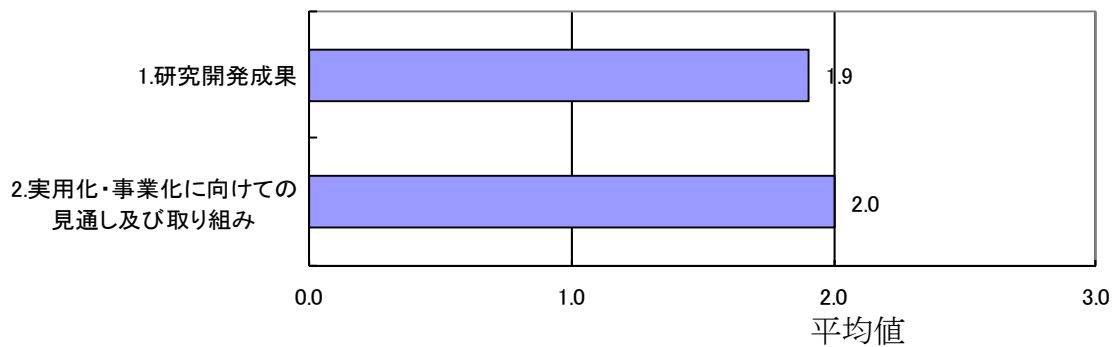
1. 事業の位置付け・必要性について	3. 研究開発成果について
・非常に重要 →A	・非常によい →A
・重要 →B	・よい →B
・概ね妥当 →C	・概ね妥当 →C
・妥当性がない、又は失われた →D	・妥当とはいえない →D
2. 研究開発マネジメントについて	4. 実用化・事業化に向けての見通し及び取り組みについて
・非常によい →A	・明確 →A
・よい →B	・妥当 →B
・概ね適切 →C	・概ね妥当 →C
・適切とはいえない →D	・見通しが不明 →D

3. 2 個別テーマ

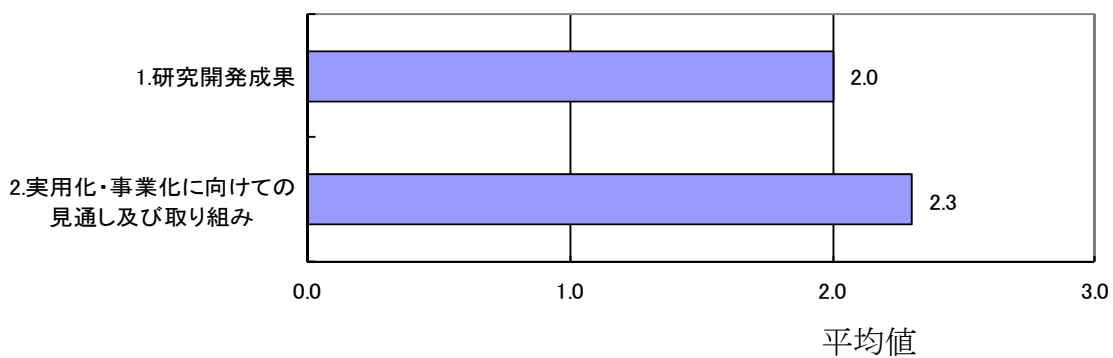
3.2.1 ES 細胞領域 (標準)



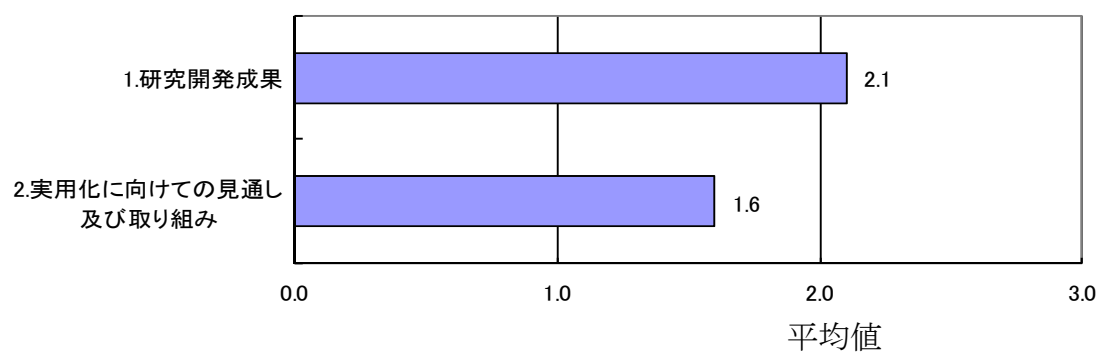
3.2.2 iPS 細胞領域 (標準)



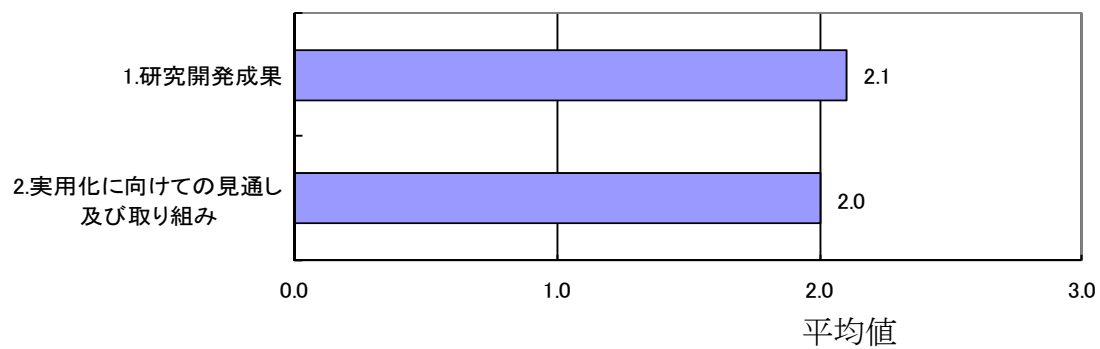
3.2.3 滑膜由来間葉系幹細胞領域 (標準)



3.2.4 Muse 細胞領域（基礎・基盤）



3.2.5 間葉系幹細胞領域（基礎・基盤）



個別テーマ名と評価項目	平均値	素点 (注)							
3.2.1 ES 細胞領域 (標準)									
1. 研究開発成果	2.6	B	A	A	A	A	B	B	
2. 実用化・事業化に向けての見通し及び取り組みについて	2.6	B	B	A	A	A	A	B	
3.2.2 iPS 細胞領域 (標準)									
1. 研究開発成果	1.9	B	B	B	B	C	B	B	
2. 実用化・事業化に向けての見通し及び取り組みについて	2.0	B	B	A	B	B	C	B	
3.2.3 滑膜由来間葉系幹細胞領域 (標準)									
1. 研究開発成果	2.0	B	A	B	B	B	C	B	
2. 実用化・事業化に向けての見通し及び取り組みについて	2.3	A	A	A	A	B	D	B	
3.2.4 Muse 細胞領域 (基礎・基盤)									
1. 研究開発成果	2.1	A	A	A	C	B	B	C	
2. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて	1.6	A	C	B	C	B	C	C	
3.2.5 間葉系幹細胞領域 (基礎・基盤)									
1. 研究開発成果	2.1	B	A	A	C	B	B	B	
2. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて	2.0	B	A	A	B	C	C	B	

(注) A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

1. 研究開発成果

- ・ 非常によい →A
- ・ よい →B
- ・ 概ね適切 →C
- ・ 適切とはいえない →D

2. 実用化(・事業化)に向けての見通しについて及び取り組みについて

- ・ 明確 →A
- ・ 妥当 →B
- ・ 概ね妥当 →C
- ・ 見通しが不明 →D

以上

第2章 評価対象プロジェクト

1. 事業原簿

次ページより、当該事業の事業原簿を示す。

「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発／
ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」

事業原簿
【公開版】

担当部	独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術部
-----	--

— 目次 —

概要

プロジェクト用語集

I. 事業の位置付け・必要性について	
1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性	I-1
1.1 NEDOが関与することの意義	I-1
1.2 実施の効果（費用対効果）	I-1
2. 事業の背景・目的・位置づけ	I-2
II. 研究マネジメントについて	
1. 事業の目標	II-1
2. 事業の計画内容	II-2
2.1 研究開発の内容	II-2
2.2 研究開発の実施体制	II-4
2.3 研究の運営管理	II-5
2.4 研究開発成果の実用化・事業化に向けたマネジメントの妥当性	II-6
3. 情勢変化への対応	II-6
4. 評価に関する事項	II-7
III. 研究開発成果について	
1. 事業全体の成果	III-0-1
2. 研究開発項目ごとの成果	III-0-4
[ES細胞領域]	III-1-1
1. 全体の成果	III-1-3
2. 研究開発項目ごとの成果	III-1-4
2.1 ヒトES細胞の安定的な培養・保存技術の開発	III-1-4
2.1.1 安定、安全にヒトES細胞を維持するペプチド・タンパク質などの成長因子をはじめ、化学合成困難な高分子成分を代替できる低分子化合物による合成培地の開発	III-1-4
2.1.2 化学合成／高分子技術を用いたヒトES細胞の三次元大量培養を可能にするための培養基質および培養基材の開発	III-1-7
2.1.3 閉鎖系細胞培養容器と三次元培養方法を組み合わせたヒトES細胞の培養法の開発	III-1-9
2.1.4 ヒトES細胞の状態を培養下で生きたまま検定するための、多パラメータ観察技術などのイメージング技術による生細胞検査技術の開発	III-1-10
2.1.5 自動化が可能なヒトES細胞の高効率凍結保存技術の開発	III-1-11
2.2 ヒトES細胞の品質評価指標の開発	III-1-13
2.2.1 ヒトES細胞の分子生物学的情報の取得および解析技術・検定キットの開発	III-1-23
2.2.2 ヒトES細胞の効率的で再現性の良い分化誘導法を用いた多分化能および分化指向性の評価	III-1-30
2.2.2.1 外胚葉系（神経系細胞）への分化能と分化指向性評価	III-1-30
2.2.2.2 中胚葉系（心筋細胞、血球系細胞）への分化能と分化指向性評価	III-1-34
2.2.2.3 内胚葉系（肝臓細胞など）への分化能と分化指向性評価	III-1-38
3. 実用化・事業化に向けての見直しおよび取り組みについて	III-1-40

[iPS細胞領域]	III-2-1
1. 全体の成果	III-2-3
2. 研究開発項目ごとの成果	III-2-6
2.1 ヒトiPS細胞の安定的な培養・保存技術の開発	III-2-6
2.1.1 幹細胞自動培養装置の開発	III-2-6
2.1.2 幹細胞自動凍結・解凍装置の開発	III-2-18
2.1.3 幹細胞評価画像解析装置の開発	III-2-26
2.1.4 培養基材の開発	III-2-40
2.1.5 培地および凍結保存液の開発	III-2-47
2.2 ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発	III-2-54
2.2.1 ヒトiPS細胞に係る技術等の標準化案の策定	III-2-54
2.3 実証機の開発	III-2-63
2.3.1 市場ニーズ調査と目標市場の検討	III-2-53
2.3.2 目標市場に対する実証機仕様の検討	III-2-62
3. 実用化・事業化に向けての見通しおよび取り組みについて	III-2-70
[滑膜由来間葉系幹細胞領域]	III-3-1
1. 全体の成果	III-3-1
2. 研究開発項目ごとの成果	III-3-2
2.1 滑膜由来MSC大量培養基盤技術の開発	III-3-2
2.1.1 滑膜由来MSCの無血清培地検討	III-3-2
2.1.2 滑膜由来MSCの大量培養方法	III-3-2
2.1.3 培養細胞評価技術の検討	III-3-2
2.2 培養した滑膜由来MSCの保存基盤技術開発	III-3-3
2.2.1 細胞保存液・保存条件の検討	III-3-3
3. 実用化・事業化に向けての見通しおよび取り組みについて	III-3-4
[Muse細胞領域]	III-4-1
1. 全体の成果	III-4-2
2. 研究開発項目ごとの成果	III-4-4
2.1 第三者による客観的な評価	III-4-4
2.2 Muse細胞のcharacterization	III-4-8
3. 実用化に向けての見通しおよび取り組みについて	III-4-11
[間葉系幹細胞領域]	III-5-1
1. 全体の成果	III-5-6
2. 研究開発項目ごとの成果	III-5-7
2.1 間葉系幹細胞品質管理マーカーの確立	III-5-7
2.1.1 2機関での細胞培養過程における同等性の検討	III-5-8
2.1.2 培地条件、由来組織の違いによる間葉系幹細胞プロファイルの変化	III-5-9
2.1.3 遺伝子発現解析からみた増殖能／分化能の維持を担保する品質管理マーカーの抽出	III-5-12
2.1.4 糖鎖解析からみた増殖能の維持と相関性のある因子の抽出	III-5-15
2.2 間葉系幹細胞品質カタログデータの構築	III-5-18
2.2.1 間葉系幹細胞培地の市場調査に関して	III-5-19
2.2.2 間葉系幹細胞品質カタログデータの構築	III-5-20
3. 実用化に向けての見通しおよび取り組みについて	III-5-22
IV. 実用化・事業化に向けての見通しおよび取り組みについて	IV-1
1. 実用化・事業化に向けての見通しおよび取り組みについて	IV-1

【添付資料】

- ・「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発」基本計画
- ・事前評価書
- ・特許論文リスト

概 要

	最終更新日	平成 25 年 6 月 26 日	
プログラム(又は 施策) 名	健康安心イノベーションプログラム		
プロジェクト名	ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発/ ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発	プロジェクト番号	P10027
担当推進部/担当 者	バイオテクノロジー・医療技術部 主査 武井 良之 (平成 23 年 5 月～) 主査 岡本 豊 (平成 23 年 11 月～) 主査 上村 研一 (平成 22 年 10 月～平成 23 年 11 月)		
事業の概要	<p>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を安定的に大量供給する技術の開発を行う。</p> <p>これらの研究開発は、京都大学 iPS 細胞研究所 副所長 中畑龍俊氏をプロジェクトリーダーとし、その下に細胞ソース毎に設置した 5 つのサブプロジェクトにおいてサブプロジェクトリーダーが、それぞれの研究テーマの達成目標を実現すべく研究開発を実施するとともに、研究テーマ間に共通する事項に対しては連携の上で効率的に研究開発を進める。</p>		
I. 事業の位置付 け・必要性につい て	<p>1. 事業の位置付け</p> <p>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。本事業では、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を安定的に大量供給する技術の開発を行う。</p> <p>2. 事業の必要性</p> <p>幹細胞は、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。</p> <p>しかし、ヒト幹細胞の示す性質は、提供者の年齢、由来する組織の違いや疾患の有無によって、特に iPS 細胞においては樹立方法や樹立後の培養方法の違い等によっても異なることが指摘されている。こうした細胞源を産業応用、とりわけ再生医療のための細胞源として応用可能とするためには、安全かつ均一な性質をもった細胞の選別と、その品質を維持・管理することが必要である。</p>		

II. 研究開発マネジメントについて

事業の目標	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を安定的に大量供給する技術の開発を行う。						
事業の 計画内容	研究開発項目	H22fy	H23fy	H24fy	H25fy	H26fy	H27fy
	① ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発						
	② ヒト幹細胞の品質評価指標の開発						
	③ ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発						
開発予算 (百万円)	会計・勘定	H22fy	H23fy	H24fy	H25fy	総額	
	一般会計	(1,495) 補正→	1,586	1,222	935	3,743	
	開発成果創出促進制度	0	0	0	0	0	
	総予算額	(1,495)	1,586	1,222	935	3,743	
(契約種類)	(委託)	○ (1,495)	1,586	1,222	935	3,743	
	(助成)：助成率△/□	—	—	—	—		
	(共同研究)：負担率△/□	—	—	—	—		
経産省担当原課		製造産業局生物化学産業課					
プロジェクトリーダー (研究開発責任者)		京都大学 iPS 細胞研究所 副所長・特定拠点教授 中畑 龍俊					
サブプロ ジェクト リーダー	ES 細胞 領域	京都大学 物質－細胞統合システム拠点 教授／設立拠点長					
	iPS 細胞 領域	京都大学 再生医科学研究所 教授 戸口田 淳也					
	滑膜由来 間葉系	株式会社ツーセル 代表取締役社長 辻 紘一郎					
	Muse 細胞 領域	東北大学大学院医学系研究科 教授 出澤 真理					
	間葉系 幹細胞領域	独立行政法人 国立成育医療センター 再生医療センター 生殖・細胞医療研究部 幹細胞・生殖学研究室 室長					

	委託先	ES 細胞 領域	京都大学（再委託先：独立行政法人 医薬基盤研究所、慶應義塾大学、東京大学、千葉大学、独立行政法人 理化学研究所）、ジェネティン株式会社、株式会社島津製作所、住友ベークライト株式会社、タカラバイオ株式会社、日産化学工業株式会社、ニプロ株式会社、浜松ホトニクス株式会社、株式会社リプロセル
		iPS 細胞 領域	幹細胞評価基盤技術研究組合（川崎重工業株式会社、大陽日酸株式会社、株式会社ニコン、独立行政法人 国立成育医療センター、一般財団法人バイオインダストリー協会、共同実施先：名古屋大学、再委託先：独立行政法人 医薬基盤研究所）、大阪大学 蛋白質研究所
		滑膜由来 間葉系 幹細胞領域	株式会社ツーセル（共同実施先：有限会社スリーブラケット）、株式会社スペース・バイオ・ラボラトリーズ、DSファーマバイオメディカル株式会社、株式会社丸菱バイオエンジニア、広島大学、大阪大学、大阪保健医療大学
		Muse 細胞 領域	東北大学、名古屋大学、株式会社 Clio（共同実施先：首都大学東京、大阪大学）
		間葉系 幹細胞領域	幹細胞評価基盤技術研究組合（独立行政法人 国立成育医療センター、独立行政法人 産業技術総合研究所、共同実施先：東京都健康長寿医療センター）
情勢変化への 対応	財源の追加について、2012年の山中伸弥 教授（京都大学 iPS 細胞研究所）のノーベル医学生理学賞受賞や、前政権/新政権を通しての再生医療分野を重視した政策など、社会的にもヒト幹細胞・再生医療研究にとって追い風となっている。中間評価の結果を受けて、開発成果創出促進制度（旧：加速等追加配賦制度）による財源の追加を計画 中である。		
評価に関する 事項	事前評価	平成 22 年度実施	担当部 バイオテクノロジー・医療技術部
	中間評価	平成 25 年度実施	担当部 バイオテクノロジー・医療技術部
	事後評価	平成 28 年度実施予定	

III. 研究開発成果
について

● 事業全体

安定的な培養を実現するために、自動培養装置の試作機及び機能評価機をヒト ES 細胞及び iPS 細胞領域において開発した。試作機ではバッグでの接着培養、機能評価機では、京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) のフィーダー細胞を用いた培養法を再現できることが実証された。一方、細胞をより効率的に培養するために培地・培養基材等についての検討がなされ、その成果として生物あるいは動物由来成分を含まない培地の開発に成功した。更に増殖因子の機能を代替する低分子化合物の開発も行われ開発候補化合物の最適化が進められている。培養基材についてもそれぞれの細胞領域において開発され、細胞特性に応じた様々な素材を足場にするこ
とにより効率的に細胞を培養出来ることが明らかになってきた。

細胞の凍結保存については、緩慢法などの凍結法の検討や DMSO を含まない凍結剤などの開発も行われ、細胞の凍結保存に対する基盤技術が構築出来た。

細胞の分化能・増殖能に関連する複数のマーカー候補がそれぞれの細胞種において見いだされ、ヒト幹細胞の有用な品質評価マーカーになり得ることが示され、ヒト幹細胞関連発現遺伝子プロファイルキットならびにヒト幹細胞糖鎖解析キット等についてはすでに商品化された。他方でマーカーを用いない細胞評価技術についての検討もなされ、形態評価を基本とする非侵襲的なコロニー評価技術が開発された。形態評価アルゴリズムに更なる改良を加え、より高い精度で培養状態を判別できるシステムの構築を目指している。

産官学共同でヒト幹細胞の種類及びこれらの加工・製造に関する合計 10 種類の用語と定義の規格案を作成した。本案をもとに ISO/TC276 の第 1 回総会における「ヒト幹細胞技術：用語と定義」(案) の ISO 国際提案 (NWIP) を目指す。

以上より、本プロジェクトにおける中間目標は達成されたと判断できる。

○ 研究開発項目ごとの成果

研究開発項目①「ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発」

ES 細胞及び iPS 細胞領域において、自動培養装置の試作機及び機能評価機を開発した。また、滑膜細胞領域では大量培養を実現するための培養基材を見出した。

細胞の凍結保存については、細胞種に適した凍結法、凍結保存液が開発され、iPS 細胞領域では自動凍結保存装置を用いた凍結保存法が確立された。

生物由来成分を含まない培地や一部の増殖因子を代替する低分子化合物を見出した。更に、フィーダー細胞の機能を代替する基材についても開発され、ES 細胞、iPS 細胞での有効性が検証されるとともに、間葉系細胞領域での検証を実施している。

	<p><u>研究開発項目②「ヒト幹細胞の品質評価指標の開発」</u></p> <p>それぞれの細胞の品質評価を可能とするマーカー候補が見出され、一部のマーカーについては、その有用性が検証されるとともに、測定用機器が商品化された。</p> <p>形態評価を基本とする非侵襲的なコロニー評価技術も開発され、商品化を目的とした種々の検証試験を実施中である。</p> <p><u>研究開発項目③「ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発」</u></p> <p>ヒト幹細胞種（含、前駆細胞）の定義に関する国際規格の国内案を作成した。また、幹細胞に係る研究の進捗及び再生医療の産業化を巡る国内外の動向について調査し、幹細胞の安定的な大量調整技術に関する標準化案の骨子作成に着手した。</p>	
	投稿論文	「査読付き」37件
	特許	24件（うち国際出願6件）
	学会・その他	206件
IV. 実用化・事業化の見通しについて	<p>① 自動培養装置に関しては機能評価機、試作機が既に完成しているが、市場調査を実施しながら必要な改良を加えユーザーニーズに適した商品開発を目指す。また、滑膜領域ではこれまでの成果をベースにしてGMPに適合する細胞培養法・保存法を確立する。</p> <p>② 増殖因子を代替する低分子化合物については第一世代に対する最適化を図りながら最終化合物合成を目指す。生物由来成分を含まない培地に代替化合物を加え、より安価で安全性の高い培地開発を行う。また、フィーダー細胞の代替機能を有する基材については種々の培地での併用効果を検討し、生物由来成分を含まない幹細胞培養系を構築する。</p> <p>③ それぞれの幹細胞において特徴的に発現するマーカーについて更なる検証を加え種々の幹細胞に適した品質評価キット開発を目指す。また、形態評価を基盤としたコロニー評価技術に関しては、評価精度ならびに処理速度の向上を図る。</p>	
V. 基本計画に関する事項	作成時期	平成21年1月 制定。
		平成23年1月 改定。
	変更履歴	平成24年3月 改定。
		平成25年2月 改定。

プロジェクト用語集

【ES細胞領域】

用語	解説
【ヒト ES 細胞の安定な培養・保存技術の開発】	
FACS	FACS(fluorescence activated cell sorting)は、蛍光抗体で染色した細胞を液流に乗せて流し、レーザー光の焦点を通過させ、個々の細胞が発する蛍光を測定することによって細胞表面にある抗原量を定量的に測定することのできる機器
GFP	Green Fluorescent Protein (緑色蛍光タンパク質) の略称。励起光を当てると発光する。
KSR	<u>K</u> nock <u>O</u> ut <u>S</u> erum <u>R</u> eplacementのことでES/iPS細胞培養液の血清の代わりに用いられる。Invitrogenから購入可能。
核型	染色体の形、数、大きさに関すること指す。ヒトの場合、通常は合計46本の染色体を持っている。
化合物ライブラリ	HTS に供与する何万～百万種類という化合物群のこと。
合成培地	化学的に明確な物質のみを混合して調整された細胞の培養に用いる溶液のこと。英語ではdefined mediumと呼ぶ。
スクリーニング	選択あるいは選別検査の意味。条件に合うものを選び出すことを意味する。
ゼノフリー培地	ヒト以外の動物成分が含有されていない培地のこと。英語ではxeno-free mediumという
テラトーマ	テラトーマは奇形腫ともいい内胚葉、中胚葉、外胚葉に由来する組織が種々の程度に腫瘍化し、混ざり合った混合腫瘍のこと。
ハイコンテンツ アナリシス	蛍光色素などを用いて、個々の細胞の形態変化、内部の核酸、タンパク質などの発現、局在変化を生化学的に数値解析すること。
ハイスループット スクリーニング (HTS)	薬初期に薬の種となる化合物を探すために、何万～百万種類という化合物を一斉にテストする手法、HTS (high throughput screening)と略される。
胚様体	初期胚に似た形態を示す細胞塊のこと。この胚様体の中にはさまざまに分化した細胞が観察される。
ヒット化合物	HTSなどの行うことにより目的とする作用をもつことが検出された化合物をいう。
フィーダー細胞	ES 細胞を未分化維持状態で培養する際、下敷きとして用いる細胞のこと。通常フィーダー細胞は増殖しないようにマイトマイシンなどで処理して後で用いる。
プロモーター	転写開始に関与するゲノム DNA 上の塩基配列。
プロモーターレポーターベクター	ある遺伝子のプロモーターの下流に蛍光タンパク質などをコードするレポーター遺伝子を連結し、その融合遺伝子産物の活性（蛍光など）を測定する事によって元の遺伝子の発現の有無や、その発現の強さを知るために用いられる遺伝子のこと。
マトリゲル	EHS 肉腫の腫瘍組織の抽出物で、ラミニン-111 を大量に含む。上皮系細胞の培養基質として利用されている。BD(Becton, Dickinson and Company)から購入可能な細胞外基質タンパク質の商品名。

用語	解説
EDTA	エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid) は金属キレーション剤の一種でありEDTA・2Na、などと記述される。EDTAはキレート剤であり、Ag ⁺ 、Ca ²⁺ 、Cu ²⁺ 、Fe ³⁺ 、Zr ⁴⁺ などのそれぞれ1価、2価、3価、4価の金属イオンとキレート錯体を形成する(キレート結合)。特にカルシウム、銅、鉄(3価)、コバルト(3価)とは強く結合する。多能性幹細胞の継代に用いられている。
FGF	線維芽細胞成長因子(fibroblast growth factor)は線維芽細胞をはじめとするさまざまな細胞に対して増殖活性や分化誘導など多彩な作用を示す多機能性細胞間シグナル因子
TGF	トランスフォーミング増殖因子(Transfoming growth factor)は、自然に存在する多くの特色ある増殖因子の1つ。他の多数のシグナル経路と同様に組織発生、細胞分化、胚発育における極めて重要な役割を果たす。
Wnt シグナル	Wnt シグナルは成体内において幹細胞の増殖と分化を調節することで再生臓器(腸管、皮膚、血液など)の恒常性を維持する役割を果たしている。また、Wnt シグナルの異常活性化がガン発症に強く関係していることも知られている。
リコンビナントタンパク質	大腸菌や培養細胞等で作らせたタンパク質
アンタゴニスト	細胞内外の受容体や接着因子に結合してその働きを阻害する物質。
クロスリンカー	蛋白質などの高分子物質を架橋させる際に用いられる物質。
スフェア	数十～数百の細胞が凝集して三次元状態になったもの。
低分子化合物	分子量が1000以下であり、化学合成或いは天然成分からの単離により得られる化合物。
ハイドロゲル	架橋されることで三次元的な網目構造を形成し、その内部に水を取り込んでいる高分子材料のこと。
未分化マーカー	幹細胞が未分化な状態にある際に特異的に発現される遺伝子或いは蛋白質のこと。ES細胞の表面に発現する未分化マーカーの例としては、SSEA-1、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、Oct-4等が挙げられる。
レポーター遺伝子	ある遺伝子の発現状態を判別するために、その遺伝子に組み替える別の遺伝子のこと。緑色蛍光蛋白質(GFP)がその代表例。
ALP 染色	アルカリフォスファターゼ染色。ES細胞の未分化状態を評価する方法の一種。
FACS 解析	蛍光抗体で染色した細胞を液流に乗せて流し、レーザー光の焦点を通過させ、個々の細胞が発する蛍光を測定し抗原量を定量的に測定する解析方法
ゼノフリー培地	異種生物由来の成分を含まない培地
フィーダーレス接着培養	フィーダー細胞を用いず、細胞外マトリクスを基質に接着を促し、培養する培養方法
免疫染色	抗原抗体反応を利用して、組織または細胞内における標的分子の局在を明らかにする実験手法。

用語	解説
FISH	蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションの略称。目的遺伝子と相補的な配列を持つヌクレオチド (DNA、RNA) 断片を蛍光標識し、スライドグラスに展開した染色体と複合体形成をさせて蛍光顕微鏡で検出する実験手法。染色体上における目的遺伝子の有無および、局在が可視化できるため、遺伝子の欠損、増幅、転座の検出に用いられる。
奇形腫	ES 細胞、iPS 細胞など未分化な細胞を免疫不全マウスに皮下移植することにより形成させる腫瘍。通常の腫瘍とは異なり、様々な組織が混在している。奇形腫が三胚葉 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) に分化したかを観察することで、移植した細胞が分化多能性を有していたか否かを確認できる。
細胞外マトリックス	細胞外 (細胞の周辺、細胞間) に存在する超分子複合体。主な構成成分としてコラーゲンなどの線維状タンパク質、ファイブロネクチンなどの糖タンパク質、プロテオグリカンを含む。上皮細胞の形成するシート状の基底膜型細胞外マトリックスと間葉系細胞の形成する無定形の間質型細胞外マトリックスの 2 種類に分類される。
ナノファイバー	直径が数十～数百ナノメートルの繊維状物質。
胚葉体	ES 細胞、iPS 細胞を分化培地中で浮遊培養することで形成させる球状の細胞塊。細胞の分化誘導法の 1 つで、細胞の分化多様性を調べることができる。
フローサイトメトリー	細胞浮遊液など、微粒子を含む溶液を高速で流し、レーザー光の照射により個々の粒子 (細胞) を光学的に解析する実験手法。細胞数や細胞種、細胞表面や細胞内における目的分子の発現量などを測定するために用いられる。
マトリゲル	マウス EHS 肉腫細胞由来の細胞外マトリックス抽出物。ラミニン、IV型コラーゲンなどの基底膜成分を豊富に含む。
ガラス化法 (Vitrification法)	ガラス化法 では水を結晶化させずにガラス状態で固化、凍結する方法。ガラス化凍結法とも言う。
緩慢凍結法	緩慢冷却法あるいは緩速凍結法とも呼ばれる。1°C/1分程度でゆっくり冷却を行い凍結していく方法。プログラムフリーザーなどを用いて行われることも多く、大量細胞の調製に適している。
接着細胞	(別表現：付着細胞) 増殖する際に何らかの足場 (生体内では細胞外基質など、生体外では培養容器底面など) に付着して増殖していく特性を持つ細胞。
バッグ	2枚のプラスチックフィルムを貼り合わせた柔らかい容器。例としては、医療用では輸液バッグなど。
バッグ培養	ガス交換可能な素材でできたプラスチック製のバッグで細胞培養が可能。
表面処理	バッグ内側表面を特殊な処理により表面を親水化し、細胞接着性を向上させています。
FACS	FACS (fluorescence activated cell sorting) は、蛍光抗体で染色した細胞を液流に乗せて流し、レーザー光の焦点を通過させ、個々の細胞が発する蛍光を測定することによって細胞表面にある抗原量を定量的に測定することのできる機器。
核型	染色体の形、数、大きさに関すること指す。ヒトの場合、通常は合計 46本の染色体を持っている。
スフェア	球状の細胞塊

用語	解説
スフェア培養	細胞をスフェアで培養すること
定量 RT-PCR	細胞などから抽出した全 RNA を逆転写して得られた cDNA を鋳型とし、PCR 法によって目的遺伝子の cDNA を増幅する際の増加率を測定することで、もとの目的遺伝子 RNA の発現量を相対的に定量する方法。
テラトーマ	テラトーマは奇形腫ともいい内胚葉、中胚葉、外胚葉に由来する組織が種々の程度に腫瘍化し、混ざり合った混合腫瘍のこと。
胚葉体	初期胚に似た形態を示す細胞塊のこと。この胚様体の中にはさまざまに分化した細胞が観察される。
マルチカラー-FISH 法	核型解析の一つの方法。すべての染色体を別々の色に染色することで、転座や異数性の解析が容易にできる。
光学厚さ	細胞の実厚さと屈折率、両方を含む指標。実厚さ、また、屈折率が大きいと大きな数値となる。
定量位相顕微鏡法	細胞の立体的な情報を光学的に測定する手法の 1 つ。光の波面の歪み（光路長の差）は屈折率と厚さの違いで発生し、「光学的な厚さ」の違いを生ずる。
非侵襲	細胞に蛍光染色などの標識をせず無標識で測定する方法。 染色等の前処理を必要としないことから、培養中の細胞をディッシュに入れたまま精密測定し、測定後も何ら細胞にダメージを与えることなく培養を続けることができるので、幹細胞の品質管理を行う実用的な手法として考えることができる。
【ヒト ES 細胞の品質評価指標の開発】	
CNV	Copy number variation
DNA 修復	細胞の DNA は常に損傷に晒されており DNA 修復遺伝子の働きにより一定の頻度以下の変異率に収められている
ES 細胞	胚性多能性幹細胞、培養によりほぼ無制限に増殖が可能
SNP	Single nucleotide polymorphism
SV	Structural variation
遺伝性疾患	生殖細胞を経由した DNA 変異が原因となり起こる疾患
エクソンキャプチャー	DNA/RNA 等の相補鎖認識により特定の塩基配列（エクソン）の DNA/RNA 等を濃縮し次世代シーケンスで解析する為の技術
エピジェネティクス	DNA にコードされる遺伝情報の発現を制御する DNA メチル化、ヒストン修飾等の分子メカニズム
核型解析	細胞の分裂中期の染色体解析によりゲノムの大きな構造異常等を検出する技術
ゲノム多型	ヒト DNA 配列は個々に完全に同一では無く 1%以下程度の多型が存在する
癌遺伝子	Genome wide association study や遺伝学的解析等により発癌との関連が密接に示唆される遺伝子
次世代シーケンス	大量の塩基配列情報を取得可能な次世代の DNA シーケンサー
体細胞変異	受精卵の DNA 配列から各体細胞が獲得した変異
多能性	様々な種類の細胞に分化する能力
マイクロアレイ解析	DNA/RNA 等の相補鎖認識により RNA の発現量やゲノム多型等を解析する技術

用語	解説
デファクト標準	市場取引プロセスを経てドミナント・デザインを獲得したものが得られる、事実上の標準。
デジュリ基準	市場で最も利用されていたり、質的に優れている仕様が規格案として提出され決定する標準。規格標準。
コンセンサス標準	国際的フォーラム等や業界団体等のグループの合意に基づいて設定される標準。フォーラム標準。
質的標準	最終製品／サービス或いは中間財の品質を規定する標準。品質標準。
互換性標準	製品／サービス或いはモジュール間の互換性を確保するための標準。電話機のように同様の製品間での互換性を確保するもの（水平互換性）、OS とミドルウェアのように全体のシステムの中で相互補完する製品やサービスなどの間で互換性を確保するもの（垂直互換性）に大別される。
BlotGlyco®	住友ベークライト（株）と北海道大学が開発した高密度にヒドラジド基が導入されたポリマービーズ。糖鎖のみを選択的かつ網羅的に捕捉回収し、糖鎖以外のあらゆる夾雑物を容易に排除可能。更に糖鎖回収後に測定機器に合わせた任意のラベル化が可能。
MALDI-TOF-MS	マトリックス支援レーザー脱離を用いてイオン化されたイオンを、真空の管中で飛行させ、検出器まで到達する時間の違いによってイオンを m/z 値に応じて分離する方式の質量分析計
LC/MS	液体クロマトグラフと質量分析計とを結合した装置を用いて行う分析方法。混合物の試料を液体クロマトグラフで分離した後、溶出順に各成分の質量分析を行う。
N型糖鎖	糖タンパク質の糖鎖のうち、タンパク質のアスパラギン残基に結合している糖鎖のこと。
高マンノース型糖鎖	2分子のN-アセチルグルコサミンと多数のマンノース残基からできているN型糖鎖。
混成型糖鎖	高マンノース型糖鎖と複合型糖鎖の2種が混ざったN型糖鎖
糖鎖	各種の糖（例えばグルコースなど）がグリコシド結合によってつながった一群の化合物。タンパク質やDNAに続く第3の鎖状の鎖状高分子と言われており、その構造は多様性に富んでいる。細胞表面には様々な種類の糖鎖が存在し、細胞の性質を表す「細胞の顔や衣装」とも呼ばれている。
複合型糖鎖	Galβ1-4GlcNAc構造（ラクトサミン構造）をもつN型糖鎖
GC-MS	ガスクロマトグラフ(GC)と質量分析装置(MS)を結合した装置。
LC-MS	液体クロマトグラフ(LC)と質量分析装置(MS)を結合した装置。
Targeted metabolomics	特定の代謝産物に標的を絞った定量的解析
TCA 回路	TCA (tricarboxylic acid) 回路またはクエン酸回路などと呼ばれている。酸化的リン酸化反応を行うために必要な化合物（NADH）を生成するための重要な代謝経路である。
一次代謝産物	生物個体の維持、増殖、再生産に必須の代謝産物。

用語	解説
解糖系	ほとんど全ての生物が持つ代謝経路であり、グルコースをエネルギー（ATP）に変換していくための代謝過程である。グルコースは代謝過程によりピルビン酸に変換される。好氣的条件では、ピルビン酸はアセチル CoA に変換された後、TCA サイクルに入る。嫌氣的条件では、乳酸やエタノールに変換される。
グリセロリン脂質	グリセロールを骨格として、構造中にリン酸エステルを持つ脂質の総称。
主成分分析	統計的多変量解析法の基本的手法。多次元のデータからなる情報量をなるべく落とさずに低次元に要約する手法。
多価不飽和脂肪酸	不飽和結合を 2 つ以上持つ不飽和脂肪酸。
トリメチルシリル誘導体化	生体分子の多くはそのままではGC-MSでの分析が困難であるため、揮発性でしかも熱安定性のよい誘導体に変える必要がある。その際に最もよく用いられる誘導体化手法であり、分子中の-OH、-COOH、=NH、-NH ₂ 及び-SH基中の活性水素がトリメチルシリル基に置換される。
メタボローム解析	細胞の活動によって生じる代謝産物（代謝中間体、ホルモン、シグナル分子、二次代謝産物など全ての小分子）を網羅的に解析すること。
保持指標	成分の保持時間を基準化合物（n-アルカンなど）ピークの保持時間により指標化したもの。化合物を同定するために重要な指標となる。
保持時間	カラムに物質が導入されてから溶出されるまでの時間。
BWA	高速シーケンス解析で得られたリード配列情報を参照配列にマッピングする際に使用されるソフトウェア
Cancer Gene Census	ガンに関与する遺伝子情報をまとめたサイト。12 カテゴリー、488 遺伝子が登録されている。
CNV	コピー数多型 = CNV (Copy Number Variation)の略。対照ゲノムと比較してコピー数が異なる 1 kb 以上の DNA 断片と定義している。
common SNPs	マイナーアレル頻度が 2.5%以上の SNP のこと。
CpG	シトシンの次にグアニンが現れるタイプの 2 塩基配列のこと
CpG Island	CpG サイトの出現頻度が、ゲノム中で他と比べ高い領域のこと
DNA 修復	様々な原因で発生する DNA 分子の損傷を修復するプロセス。
EpiXplore Methylated DNA Enrichment Kit	Methyl-CpG binding domain protein2 (MBD2) と磁気ビーズを利用し、低密度 (hypo) および高密度 (hyper) にメチル化された DNA を、全ゲノム中から簡便に濃縮・分画するためのキット (クロンテック社)。メチル化 DNA サンプルの濃縮によって、シーケンス解析ほか様々な解析でよりクリアな解析結果が得られる。
Exome 解析	ゲノム全体ではなく、エクソンのみの特異的に選択し、次世代シーケンサーなどを用いて DNA をシーケンスする解析。
FDR	統計学において多重検定を行ったとき、棄却された帰無仮説のうち真に帰無仮説が正しいものの割合の期待値統計学において、多重検定を行ったとき、棄却された帰無仮説のうち真に帰無仮説が正しいものの割合の期待値
GeneOntology	Gene Ontology(GO)とはこれまで様々な種で得られてきた遺伝子や遺伝子産物に関する知識をまとめ、用語(GO Term)や用語間の関係を統一して定義したものである。

用語	解説
HiSeq2000	イルミナ社が提供する高速シーケンサー。一度の解析でヒト 5 人分のシーケンス解析が可能である。
Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit	イルミナ社の製品。ビーズアレイ。世界の専門家が選定した RefSeq 遺伝子領域、および遺伝子領域以外の領域も含む全ゲノムを包括的にカバーした 45 万以上のメチル化サイトをターゲットとする。
iScan	イルミナ社の製品。高速マイクロアレイスキャナー。
KEGG Pathway	細胞レベルでの生命システムの機能に関する知識を、分子間相互作用ネットワーク（代謝、シグナル伝達、遺伝情報等）の二項関係に基づいた情報としてデータベース化したもの。
LOH	Loss of Heterozygosity（ヘテロ接合性の喪失）。特定の遺伝子座に正常アレルと異常アレルが存在している場合、片方のアレルが消失してヘテロな状態ではなくなること。
oneway-ANOVA	一元配置分散分析。統計解析手法の一つ。多群の検定に用いる。
PValue	統計的仮説検定において、帰無仮説のもとで得られた検定統計量が実現する確率。
q-value	P-value の代わりに用いるために作られた 多重検定用の仮説有意性指標である。
RefSeq	ゲノム配列や cDNA 配列などを登録した塩基配列データベース。重複を取り除くなどマニュアルで整備されたデータベースになる。
SAMtools	リードのアラインメント結果から変異塩基を検出するソフトウェア。
SNP	ある生物種集団のゲノム塩基配列中に一塩基が変異した多様性がみられ、これを一塩基多型と呼ぶ。
snpEff	SNP や短い挿入・欠失等の変異が遺伝子に与える影響についてアノテーションを行うソフトウェア。
SureSelect	アジレント・テクノロジー株式会社より提供されている DNA の特定領域を濃縮する技術。
エクソン領域	DNA から転写された mRNA 前駆体よりスプライシングで残る部分。タンパク質に翻訳されるコーディング領域（CDS）と、翻訳されない非翻訳領域（UTR）で構成される。
エピジェネティクス	ゲノム上の塩基配列の変化（変異）ではなく、クロマチンの化学修飾（DNA やヒストンタンパク質に対するメチル化などの化学修飾）による後天的な変化によって行なわれる遺伝子発現の制御についての研究分野である。このような修飾は、発生の各過程で確立された後、細胞の記憶として働き、胚発生、遺伝子発現、癌などの疾病といった実に様々な生物現象と関わっていることが知られている。
クラスタリング解析（クラスター解析）	データ解析手法の一種である。与えられたデータを外的基準なしに自動的に分類する手法、またはそのアルゴリズム。データの分類が階層的になされる階層型手法と、特定のクラスター数に分類する非階層的な手法とがある。
ジェノタイピング	ある個体の DNA 配列を決定し、他の個体や基準となる DNA 配列を比較して、遺伝子型の違いを検出すること。DNA シーケンシングや DNA マイクロアレイなどの様々な技術でジェノタイピングを行うことができる。

用語	解説
スフェア培養	もとは神経幹細胞の培養法として確立されたもの。1個の細胞から球状の細胞塊（スフェア）が形成される。
ビーズアレイ	直径 2-3um のシリカビーズ表面に DNA プローブを結合させ、それをスライドガラス上に高密度に配置したアレイである。1解析でヒトゲノムにおける 430 万種以上の SNP または、48 万種以上のメチル化部位を検出することができる技術である。
プロモーター領域	転写 (DNA から RNA を合成する段階) の開始に関与する遺伝子上流領域。
マイクロ RNA	18 から 26 塩基程度の低分子の 1 本鎖 RNA で、タンパク質をコードしていない機能性ノンコーディング RNA である。特定の他の遺伝子の mRNA に対する相補的配列を有し、その遺伝子の発現を抑制することが知られ、基本的な代謝から個体発生や細胞分化までの実に様々な生命現象に関与すると考えられている。
マイクロアレイ	DNA チップとも呼ばれる、多数の DNA 断片がスライドガラス等の基板上に高密度に配置されたチップを用いることによって、数万種類といった遺伝子の発現量を一度に調べることができる技術である。
マスターセルバンク	「マスターセルバンク」とは、すべての製造用細胞シードの元になる種株を一定の培養条件下で最低限の継代数を経て増殖させ、複数のアンプルに分注したものをいう。
マッピング	DNA シーケンシングで得られた塩基配列（リード）を、参照配列の類似の領域にアラインメントすること。
メチル化	エピジェネティクスにおけるゲノムの修飾は、ゲノム配列に存在する塩基の 1 つであるシトシンのメチル化と非メチル化の状態変化として観察される。シトシンがメチル化されることにより、ゲノム DNA から mRNA への転写が抑制される。したがって、各種細胞におけるシトシンのメチル化状態を解析して比較することが、その細胞の特性を明らかにする上で重要となる。
リアルタイム PCR(リアルタイム RT-PCR)	従来の PCR 法は、サーマルサイクラーという機器で目的 DNA を増幅した後、増幅産物を電気泳動で解析するという手順で行われる。リアルタイム PCR 法は、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した機器を用いて、PCR での DNA 増幅産物の生成過程をリアルタイム（実時間）で検出し、解析を行う。DNA 増幅産物の生成の過程を連続して観察できるため、より正確な定量ができる。また電気泳動を行う必要がないため、解析時間の大幅な短縮が可能となる。増幅する対象が DNA の場合は、リアルタイム PCR、RNA の場合は、リアルタイム RT-PCR と呼ぶ。
リード	DNA シーケンシングで得られた塩基配列。
リシーケンス	ヒトなど参照ゲノム配列が公開されているモデル生物の個体をシーケンスすること。参照ゲノム配列との比較からゲノムの変異などを解析することが多い。
リピート配列	ゲノムの DNA 配列で、反復して見られる同じ配列のこと。同じ配列が連続して続く単純反復配列、ゲノム上に同じ配列が散在する散在反復配列などがある。

用語	解説
ワーキングセルバンク	「ワーキングセルバンク」とは、マスターセルバンクの一個又は複数個をプールして得た細胞を十分に安定であることを確認した条件下でさらに培養させ、複数のアンプルに分注したものをいう。
遺伝子発現	遺伝子の情報が読み取られ、タンパク質として機能する過程を指す。狭義には mRNA もしくはノンコーディング RNA が合成された時点で、その遺伝子が発現しているという場合もある。
一元配置分散分析	3 つ以上の平均値の差の検定：1 つの要因の効果を確認しようとする実験計画において、その効果の違いを 2 群の差でみる場合と、3 つ以上の条件群（水準）で見ることがある。後者の場合、その差は t 検定ではなく一元配置の分散分析を使う必要がある。
階層クラスタリング解析	クラスタリング解析と同じ
高速シーケンサー	従来のサンガー法を基にしたシーケンサーとは異なる原理に基づいた塩基配列解析装置で、数百万から数億個の塩基配列データを並列に大量取得することができる。高速（次世代）シーケンサーとしては、イルミナ社の HiSeq システムや MiSeq システム、ロシュ社の GS FLX、ライフテクノロジー社の Ion PGM などがある。
参照ゲノム配列	全ゲノム配列をシーケンスし、その生物のゲノム配列をデジタルデータとして組み立てた塩基配列データ。多くのモデル生物の参照ゲノム配列は公共データベースに公開されている。
主成分分析	多くの特性を持つ多変量のデータを互いに相関の無い少ない個数の特性値にまとめる手法。principal component analysis、PCA と略すこともある。
濃縮プローブ	ゲノム上の目的領域を特異的に選択できるように、目的領域に相補的に設計された核酸配列。
ヒストンメチル化	ヒストンは様々な化学修飾を受けており、メチル化はその中の一つの修飾
エピゲノム情報	ヒストンや DNA は様々な化学修飾を受けており、これらを総称してエピゲノム情報と呼ぶ。エピゲノム情報は、細胞の形質（たとえば分化状態、多能性から腫瘍原性など様々な細胞の性質）を規定しており、細胞の世代を超えて長期に維持される情報でもあることから、ES 細胞のような多能性の細胞の品質評価の指標となりうる事が期待される
ビバレントドメイン	ヒストンの複数のリジン残基はメチル化修飾を受けている。その中でヒストン H3 の 4 番目のリジン残基がトリメチル化(H3K4me3)は遺伝子の転写開始点近傍に多く存在し、標的となっている遺伝子の活性化と強く相関することが知られている。一方、H3K27me3 が転写開始点付近に存在すると、それは転写の抑制と強く相関する。多くの細胞では、通常この 2 つエピゲノムは転写開始点付近には重複して存在しないのであるが、ES 細胞のような多能性幹細胞では特に発生分化に関わる遺伝子で両方の修飾を持つことが知られている。H3K4me3 と H3K27me3 両方を有するクロマチン領域のことをビバレントドメインと呼ぶ。
転写開始点	通常遺伝子の転写開始点付近にプロモーター部分があり、この機能を制御することで遺伝子の発現が調節される。

用語	解説
エピゲノム・エピジェネティクス	エピゲノムとは、細胞内で起こっている DNA メチル化やヒストン修飾など、遺伝子配列の変化を伴わない化学的修飾。この変化により遺伝子発現の「スイッチング」が制御される。この機構を研究する学問をエピジェネティクスという。幹細胞の分化や初期化はいずれもエピジェネティック変化と考えられる。
メチル化 DNA 免疫沈降 (MeDIP), ヒドロキシルメチル化免疫沈降 (h-MeDIP)	特異的に結合する抗体を用いて、メチル化或いはヒドロキシメチル化（脱メチル化の前駆体と考えられる）されたシトシン残基を含む染色体 DNA を選択的に濃縮する方法。いままではいずれもマニュアル操作で行われた。
ACME アルゴリズム	マイクロアレイを用いたメチル化解析において、各ターゲット領域のメチル化度合いを算出するための統計的処理方法。カイ 2 乗検定を応用した算出方法。特定の統計的モデルに依存しない単純な処理方法で、統計的に陽性の確率の高い部分での偽陽性率が低いといわれている。
Batman アルゴリズム	マイクロアレイを用いたメチル化解析において、各プローブ位置でのメチル化度合いを算出するための統計的処理方法。メチル化度合いに特定のモデル系を導入して、算出する方法。特に、遺伝子のプロモータ領域に見られる CG が高頻度に現れる CpG 領域の解析に用いられている。
UCSC Genome Browser	米カルフォルニア大学サンタクルーズ校がネット上で公開しているオンラインソフト。各種の測定シグナル値とともに、その測定対象領域の遺伝子上での位置情報を与えてやると、模式的な染色体上で測定値を比較することのできるソフトで、新規発見の手助けをするソフトである。
P 値	統計学上で統計対象を比較する指標。対象間での差がないということの確率を示す。したがって、数値が小さいほど比較対象間で差があるという可能性が高くなる。
P スコア	わかりやすく表示するための P 値の数学的処理値。P 値は少数で、確率が高いものほどヒストグラムのバーが低くなる。そこで、グラフ化する際に、 $-\text{Log}_2(\text{P 値})$ を用いることで直感的に理解しやすくしたものである。したがって、ヒストグラムのバーが高いほど、比較対象間との差がある確率が高くなる。
神経幹細胞	神経細胞（ニューロン）、グリアを生み出し増殖性のある神経系の幹細胞
ニューロスフェア	神経幹細胞を含む細胞塊
浮遊培養	細胞を培地中で浮遊させて培養すること
WNT	発生や細胞分化に関わる分泌性タンパク質
WNT 活性化剤	WNT シグナルを活性化させる化合物（CHIR99021 や BIO など）
WNT 阻害剤	WNT シグナルを阻害する化合物(KY02111、XAV939 など)
既知組成培地	構成成分が判明している（無血清）細胞培養液。
CD34	中胚葉系細胞、および未分化血液細胞に発現する細胞表面抗原
CD43	CD45 と同様に未分化血液細胞を含む血液細胞に発現する細胞表面抗原 CD45 よりも数日早く発現し、CD45 よりも発現が強く、また赤血球系細胞においても発現が認められることから、CD34 と共に造血幹前駆細胞の解析に用いる

用語	解説
CD45	未分化血液細胞を含む血液細胞に発現する細胞表面抗原.
CD34+CD43+細胞	CD34 陽性 CD43 陽性の造血幹前駆細胞を多く含む細胞群
CD34+CD43-細胞	CD34 陽性 CD43 陰性の血管内皮前駆細胞を多く含む細胞群
FACS	蛍光細胞分離分析装置 (フローサイトメーター) : 蛍光標識抗体等を用い、任意の抗原 (蛋白質、多糖類、化合物等) を発現する細胞の解析を行う装置
コロニーアッセイ	高い増殖能を有する未分化血液細胞数の計測する解析方法
造血幹前駆細胞	赤血球、白血球、巨核球、リンパ球といった、すべての血液細胞系譜への分化能 (多分化能) と高い細胞増殖能を有する未分化な血液細胞
ALP	Alkaline phosphatase: アルカリフォスファターゼ。好中球 ALP は特に NAP とも呼ばれる。分化成熟の進んだ好中球の顆粒中に貯蓄される酵素である。その活性を指標とした染色が可能であることから、成熟好中球のマーカーとして用いられる。
DHR	Dihydrorhodamine. 活性酸素種により酸化されることで蛍光を発する色素である。本プロジェクトにおいては DHR123 を用いている。膜を透過することで細胞内にトラップされ、活性酸素の産生に応じて強い蛍光を発し、フローサイトメトリ解析等による評価を可能にする。
MPO	Myeloperoxidase: ミエロペルオキシダーゼ。造血細胞の中でも骨髄球系へ分化した細胞中で産生されるようになり、その活性を指標とした染色が可能であることから、骨髄球系細胞のマーカーとして用いられる。
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate. プロテインキナーゼ活性化剤。天然のプロテインキナーゼ活性物質であるジアシルグリセロールに構造が擬態することからこの活性を有する。本事業においては、好中球に活性酸素を誘導するための刺激剤として用いる。
ROS	Reactive oxygen species. 種々の活性酸素種の総称である。本プロジェクトにおいては、ES 細胞を好中球へと分化誘導した後、刺激後の ROS 産生能をもって機能評価を行う。
ALB	アルブミンの略称。肝細胞の代表的マーカー。
FOXA2	forkhead box protein A2 の略称。内胚葉形成に必須の遺伝子
HGF	hepatocyte growth factor の略称。肝分化・肝増殖に働く液性因子。
OsM	oncostatin M. 肝成熟化に関与する液性因子。
内胚葉	三胚葉のうち、肝臓、膵臓、小腸、肺などの組織に分化できる葉

【iPS細胞領域】

用語	解説
【自動培養関連】	
フィーダー細胞	細胞を培養する際に、目的とする細胞の増殖や分化に必要な環境を整えるために補助的に用いられる細胞。iPS細胞の培養では、京大 CiRA は、フィーダー細胞としてマウスの細胞である SNL を使用する。
継代培養	細胞培養において、細胞の一部を新しい培地に移し、再び培養すること。
セルスクレーパ	接着系細胞を培養容器から剥がすために使用するヘラ。
定量 PCR	DNA、cDNA または RNA の増幅が行われる前の総量を間接的に測る方法である。そして通常は目的の遺伝子配列が存在するかどうか、何コピー存在するのかを確かめる目的で利用される。
バイアル	ガラス製の小瓶。特に、薬剤を入れゴム栓と金属キャップで密閉したガラス瓶。樹脂製瓶、樹脂製栓の場合も多い。
【凍結保存関連】	
生細胞数	iPS細胞懸濁液に存在する生きた細胞数。
生細胞率	同ロットの iPS細胞懸濁液の凍結前生細胞数に対する解凍後生細胞数の割合。この値を装置性能を評価する判断基準の一参考値として使用する。
予備凍結（緩慢凍結法）	温度と時間がプログラム制御された条件で iPS細胞を-80℃まで徐々に凍結する工程。
ドライエリア	凍結保存装置（クライオライブラリー）のロボット稼働エリアで窒素雰囲気空間。
【細胞観察関連】	
クラスタリング	情報の類似度によって多次元情報で構成されるデータをいくつかの集団に分類すること。
モデル化	一定のデータ量から構成される入力信号と出力信号セットの関係性をコンピュータに学習させることによって、入力信号だけをもとに出力信号を計算予測する情報処理的手法。
コロニー形態情報	iPS細胞が形成するコロニーの画像的情報。コロニーの形のカルテとも言える。長さや丸さなどの輪郭的情報、密度や凹凸などのテクスチャ的情報、大きさなどのサイズの情報などの大きく3群の多次元情報から構成され、20~100程度の指標から構成される（多くはこれまでの経験則およびヒアリングに基づいて準備された指標）。各形のカルテは、画像中で認識される全ての iPSコロニー様のオブジェクトに対して計測・数値化されデータベースとして、その後の形態情報解析に利用される。解析では、形態評価に最も有効な情報がコンピュータ処理によって自動的に選択され、必要な個数が解析に利用される。
コロニーの異常形態	通常とは異なる様相を呈するコロニー、として画像班が定義する形。ヒト iPS細胞はヒト ES細胞様の形態を呈し、細胞質が少なく、細胞と細胞の境界が見えないほどにパックされた細胞が集まってコロニー状に集合している。異常な形態というのは、そのような典型的なコロニーの形態から逸脱した状態の「形」を表現するものである。軽微な遺伝子発現変化から染色体異常までを含む様々なレベルの生物学的な性質の変化を含むもので、どの程度の生物的变化が見た目に現れているかの定義は現在進行中。現状では、形の上で「おかしい状態」として現れたもので、通常細胞培養熟練者が日常の培養の中で検出している状態を呼称している。
免疫染色	タンパク質として発現されたマーカーを、酵素標識抗体などを用いて染色する手法。マーカーの局在（細胞内、細胞外など）によってその見え方および染色量は異なる。

幹細胞コロニー形態法	画像班が開発した3つのiPS解析アルゴリズムのうち一つ。「目利き」による異常形態コロニー判別を実装した画像処理アルゴリズム。iPS細胞からなるコロニーを評価対象とした評価法であり、シングルコロニー単位での品質診断アルゴリズム。画像中のコロニー1つ1つの形を複数の形態情報（上記：コロニー形態情報）を用いて診断し、通常とは異なる様相を呈するコロニーかどうかを診断する。
幹細胞形態法 (エッジアルゴリズム法)	画像班が開発した3つのiPS解析アルゴリズムのうち一つ。「目利き」による異常形態細胞の評価を行う画像処理アルゴリズム。画像中のiPS細胞においてコロニー以外の部分（コロニーからこぼれだした細胞や、コロニーになりきれない細胞、など）をトータルで評価する評価法であり、培養容器内の総合的品質診断アルゴリズム。画像中にこれらの「コロニー状以外のiPS細胞」を認識して数値化することで、その増加量から、通常とは異なる培養の状況の評価する。
幹細胞増殖率法	画像班が開発した3つのiPS解析アルゴリズムのうち一つ。「目利き」による異常検出原理の一つである「増殖度合いの違い」を数値化するための評価法であり、培養容器内の総合的品質診断アルゴリズム。画像中のコロニー面積増殖率の違いから、正常状態を逸脱した急激な増殖をリアルタイムでモニタリング評価する方法。
【培養基材関連】	
マトリゲル	マウス EHS 肉腫の腫瘍組織の粗抽出物。ラミニン-111 ほか基底膜成分を大量に含む。基底膜様の活性をもつ培養基材として広く利用されている。
ラミニン	基底膜の主要構成蛋白質の一つ。強い細胞接着活性をもつ。α鎖、β鎖、γ鎖からなるヘテロ三量体分子で、ヒトでは5種類のα鎖（α1～α5）、3種類のβ鎖（β1～β3）とγ鎖（γ1～γ3）があり、それらの組み合わせが異なる15種類のアイソフォームが存在する。
ラミニン 511	ラミニンアイソフォームの一つでα5鎖、β1鎖、γ1鎖からなる。上皮系細胞の基底膜を構成する主要なアイソフォームであり、初期胚の多能性幹細胞もラミニン 511を足場としている。幹細胞が表面に発現するインテグリンα6β1と非常に強く結合する。
パールカン	基底膜を構成する主要構成分子の一つ。ヘパラン硫酸鎖をもつプロテオグリカン。様々な増殖因子／形態形成因子とヘパラン硫酸鎖を介して結合し、これら因子を基底膜に組み込む役割を担う。
基底膜	上皮と結合組織の境界に形成されるシート状の細胞外マトリックス。上皮細胞だけでなく、心筋、骨格筋、平滑筋等の筋細胞、脂肪細胞、血管内皮細胞、神経幹細胞も基底膜を足場としている。初期胚の多能性幹細胞も基底膜を足場としている。
【培地および凍結保存液関連】	
血清	ウシ胎児血清（FBS：Fetal Bovine Serum）はあらゆる細胞培養に用いられ、研究や医薬品製造での細胞培養にも応用されています。ヒトiPS細胞培養では、ウシ胎児血清代替物（KSR：KnockOut™ Serum Replacement）が汎用されている。
ゼノフリー	動物由来異種成分を含まないこと。医療への応用を目指す際に、異種成分を含まないゼノフリー化の培養システム構築が求められている。
不死化マーカー	体性細胞や体性幹細胞はその増殖性に限界があり、細胞老化することが知られている。ヒト多能性幹細胞は自己複製能をもつ細胞で、無限に細胞増殖が可能であり、テロメラーゼ逆転写酵素（TERT）の活性が高くそのバイオマーカーの一つとなっている。
染色体核型解析	ヒトのゲノムは2セット（22組の常染色体と1組の性染色体）あり、男性は46,XY、女性は46,XXの核型が正常染色体核型である。培養細胞では、数的な染色体異常などを解析するのにQ-band解析（キナクリン・ヘキスト染色）やG-band解析（ギムザ染色）などの簡易核型解析が行われる。

DMSO	細胞の凍結では、凍結保護剤として DMSO (ジメチルスルホキシド, Dimethyl sulfoxide) が汎用されている。しかし、細胞毒性と人体への有害性が知られている。
ガラス化法	一般的な細胞凍結法である緩慢凍結法と比較し、急速凍結を行うガラス化 (Vitrification) 法がある。細胞はガラス化法用の細胞凍結液で懸濁し液体窒素で急速に凍結する。一般的に、緩慢法よりも生存率が高いとされているが、手技が簡易的ではない。
【標準化関連】	
標準化	実在又は潜在の問題に関し、与えられた状況の下で最大限の秩序を実現するため、共通かつ繰り返し使用するための取決めを確立する活動。(ISO/IEC Guide 2)
コンセンサス	重要な利害関係者による実質的問題への反対がない こと、及び全ての関係当事者の意見を考慮し、意見の不一致を調停させる努力の過程があることを特徴とする全体的合意。
ISO 規格	国際標準化機構 (ISO) が制定する国際規格。
ヒト幹細胞	自己複製能 (自分と同じ能力を持った細胞を複製する能力) 及び多分化能 (異なる系列の細胞に分化する能力) を有するヒト細胞。
ヒト iPS 細胞	ヒト体細胞を遺伝子導入・タンパク質導入・薬剤処理等により人為的に初期化して得られる細胞又は当該細胞の分裂により生ずる細胞であって、内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞に分化する性質を有し、かつ、自己複製能力を維持しているもの又はそれに類する能力を有することが推定されるもの。

【滑膜由来間葉系幹細胞領域】

用語	解説
【培養関連】	
間葉系幹細胞	組織と組織の間に存在する多分化能を持った細胞。MS 細胞 (Mesenchymal Stem Cell) とも呼ばれる。骨髄や脂肪などには比較的多くの幹細胞が存在することが最近の研究により明らかとなっている。ES 細胞のように受精卵を使用せず、各個人の生体から得られるため、倫理的な問題点が少ないので新たな再生医療のソースとして注目されている。
滑膜由来間葉系幹細胞	内視鏡下で採取が可能な膝関節側面の滑膜から分離培養できる。骨髄等その他の細胞源に比べ、組織中に含まれる幹細胞の数が多く、非常に旺盛に増殖し、未分化能を維持させることができる。
他家移植	自己以外の組織を移し変えること。 他家移植に対し、自己の組織を自己の他の場所に移し変えることを自家移植という。
スキャフォールドフリー三次元人工組織	大阪保健医療大学中村らの発明による、滑膜組織から分離し増殖させた MSC より scaffold を用いずに細胞組織のみで 3 次元的な組織を構築する技術を用いて作製した人工的な組織。
微小重力環境培養法	スペース・バイオ・ラボラトリーズが開発した重力分散型模擬微小重力発生装置 (3D-clinostat) を用いた培養方法。重力分散型模擬微小重力発生装置とは、直行二軸のまわりに試料を 360°回転させ、重力ベクトルを時間軸で積分することにより 10-3G の環境をつくる装置。
マイクロキャリア	小さなビーズ。ビーズの上に細胞を単層に生育させ、ビーズをフラスコ内で攪拌し、浮遊培養を行うものである。この方法によると、培養面積を極めて増大させることが可能になるため、細胞の大量培養に応用されている。
【培地関連】	
血清	血液が凝固する際に血餅(けっぺい)から分離してできる、透明な淡黄色の液体。血漿(けっしょう)から凝固因子を除いたもの。免疫抗体やグロブリンなどを含む。細胞培養においては、ホルモンの供給源としての働き、培地の緩衝作用の増強、フェノールレッドや各種プロテアーゼからの保護効果などが知られているが、未知の物質が多い。ヒトの細胞にはヒトの血清、マウスの細胞にはマウスの血清を使うのが良いが、入手が困難なためウシ胎児血清が多く用いられている。
アニマルフリー	動物由来タンパク質成分を含まないこと。感染因子混入のリスク低減から医療への応用を目指す際に、異種成分を含まない培養システム構築が求められている。
有血清培地	基礎培地にヒト血清またはウシ胎児血清を添加して調整した培地。
無血清培地	ウシ胎児血清などの血清を添加しなくても細胞が増殖するように考案された培地の総称です。 無血清培地の中でも、すべての組成が化学的に明らかになっている培地を CD 培地 (Chemically-Defined) と呼びます。
STK2	ツーセルが開発し、ライセンス契約をした DS ファーマバイオメディカル株式会社販売している。すべての組成が化学的に明らかになっているケミカルディファイン培地であり、ウシ胎児血清やヒト血清等の血清を添加せずに MSC を培養できる。
STK1	初代細胞培養用培地。 ツーセルが開発し、ライセンス契約をした DS ファーマバイオメディカル株式会社販売している。すべての組成が化学的に明らかになっているケミカルディファイン培地であり、ウシ胎児血清やヒト血清等の血清を添加せずに MSC を培養できる。

【凍結保存関連】	
CAS	<p>CASは「Cells（細胞） Alive（生きている） System」の略で、アビー社が保有する国際特許の冷凍技術。冷却しながら磁場環境の中におき微弱エネルギーを与えることで細胞中の水分子を振動させることにより過冷却状態に保ち、その後瞬時に同時に冷凍させることにより水分の氷結晶化を抑える。</p> <p>冷凍技法による食品の凍結融解に伴う食味の低下を大幅に低減することを可能にした冷凍技術で、医療では移植技術などの分野で開発が進んでいる。</p>
セルバンカー	細胞の凍結保存液
DMSO	ジメチルスルホキシド（Dimethyl sulfoxide、略称 DMSO）

【Muse細胞領域】

用語	解説
Muse 細胞	生体の特に間葉系組織に存在する多能性幹細胞として見出された。 Multilineage-differentiating stress enduring 細胞の略。三胚葉性の細胞に分化する能力と自己複製能を有するが腫瘍形成能は示さない。

【間葉系幹細胞領域】

用語	解説
PDL	細胞の分裂回数のこと。正常細胞では、ある一定の分裂回数を経て老化、死滅することから、継代数に比べてより厳密な細胞履歴の管理方法として利用される。一般的には、 \log （培養終了時の細胞数/培養開始時の細胞数） $\times 3.33$ で算出する。
セネッセンス	細胞老化のこと。細胞が分裂を停止し、増殖できなくなった状態が不可逆的に起こること。
相関係数	本課題における相関係数とは、約60000遺伝子のDNAマイクロアレイデータを2検体で比較した際、それぞれ算出された約60000の相関係数の平均値である。この値が1に近いほど2検体の遺伝子発現に差はないことになる。
プロファイル	個々の細胞が有する性質。遺伝子発現、糖鎖修飾、各種目的細胞への分化能、増殖能などをリスト化したもの。
レクチン	植物、動物など自然界に広く存在する糖鎖構造を認識する蛋白質である。マンノース、ガラクトース、シアル酸、フコースなど特定の糖鎖構造を認識する多様なレクチンの存在が知られている。植物レクチンの中には抗癌作用や免疫調節作用があるレクチンも存在し、健康食品として注目されているものもある。また動物レクチンは細胞接着の重要な分子として、形態発生、炎症・免疫反応などに重要な役割を果たしている。
レクチンマイクロアレイ	レクチン複数種を、スライドガラスの様な基板に並列に固相化したものがレクチンマイクロアレイである。これにより、糖タンパク質上に付加する糖鎖の構造をおおよそ網羅することができる。細胞は分化やがん化に伴い表面の糖タンパク質や糖脂質の糖鎖構造を劇的に変化させるため、最近レクチンアレイを細胞判別システムとして用いる動きがある。同時に、がんマーカー探索のツールとしての利用価値も高く、いくつかの成果が公表されている。
糖鎖	DNA、タンパク質に継ぐ生命鎖で生命に不可欠な生体高分子で主要な翻訳後修飾。全ての細胞は糖鎖で覆われており、細胞間相互作用を媒介している。分泌タンパク質のほとんどは糖鎖付加されている。糖鎖はその存在様式により糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンに分類される。糖鎖の免疫動物にも元来発現している自己抗原であるため抗原性が低く、そのため抗体産生が困難であった。糖鎖結合プローブとしては古くからレクチンが用いられてきた。
β ガラクトシダーゼ	糖を分解する酵素の一種で、継代を重ねた細胞では、高い活性が検出され、その活性の増加が継代数に比例することなどから、老化のマーカーとして広く知られている。

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性

1.1. NEDO が関与することの意義

ヒト幹細胞は、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。しかし、ヒト幹細胞の示す性質は、提供者の年齢、由来する組織の違いや疾患の有無によって、特に iPS 細胞においては樹立方法や樹立後の培養方法の違い等によっても異なることが指摘されている。こうした細胞源を産業応用、とりわけ再生医療のための細胞源として応用可能とするためには、安全かつ均一な性質をもった細胞の選別と、その品質を維持・管理することが必要である。

そのためには、法制度の整備や標準化などを見据えて、産官学一体となった研究開発基盤を国の支援のもとで構築することが不可欠であり、本事業をナショナルプロジェクトとして NEDO が実施することには意義がある。

なお、本事業は、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」の中の「幹細胞産業応用促進基盤技術開発」の一環として実施する。また、関係省庁が有機的に連携し、再生医療の実現に向けた取り組みを一体的に促進する「再生医療実現化ハイウェイ」において、経済産業省のミッションである「ヒト幹細胞の産業応用促進を下支えする『品質の安定したヒト幹細胞を、安定的に低コストで供給可能とする技術』の開発・実用化」の一翼を担う。

さらに「医療イノベーション 5 か年戦略」（平成 24 年 6 月医療イノベーション会議策定）においても、「再生医療やその他幹細胞関連産業の実現化のため、iPS 細胞等幹細胞を安定的に大量供給可能とする基盤技術を開発」することが位置づけられている。

1.2. 実施の効果（費用対効果）

本事業では、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を安定的に大量供給する技術の開発を行う。

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ヒト iPS 細胞や、その他のヒト幹細胞等を、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、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が期待される。

平成 25 年 2 月に経済産業省が取りまとめた「再生医療の実用化・産業化に関する報告書」では、今後再生医療の実用化・産業化が促進されることに伴い、細胞そのものの製品・加工品に加えて試

薬・培地や自動培養装置等の周辺産業の成長が期待され、双方を合算した 2030 年における国内の再生医療の市場を 1.6 兆円、世界市場を 17 兆円と試算している。しかしながら、2012 年時点では『ヒト幹細胞を利用した再生医療』は産業として確立していない。

本事業によって、治療の一般化や高精度の創薬支援ツール作製を可能とする、『品質および生産性の双方を兼ね備えたヒト幹細胞の実用化技術開発』が達成され、複数種類のヒト幹細胞に対応した自動培養装置・培地・品質評価用装置/試薬・冷凍保存装置などが市場で優位に立ち、数千億円規模のアウトカムが期待できる。

2. 事業の背景・目的・位置付け

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。また、2012年に「成熟細胞が初期化され多能性を獲得し得ることの発見」がノーベル生理学・医学賞の対象となり、社会的にもiPS細胞を始めとする各種のヒト幹細胞の活用の促進につなげることが注目され期待が高まっている。

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。

国内の幹細胞・再生医療研究動向としては、2007年の山中伸弥京都大学教授による「ヒト人口多能性幹（iPS）細胞を生成する技術」の発表を機に研究機運が高まり、それ以後既に始動していた再生医療に関連するプロジェクトともに予算・人員が増加している。一方海外では、米国国立衛生研究所（NIH）再生医療センターに2002年以降10億ドル/年の予算が付き、現政権の政策も追い風となって積極的に基礎・臨床研究や技術開発を行っている。また、欧州（EU）では幹細胞研究・再生医療研究ともに第7次研究枠組み計画（FP7、2007～2013）に組み込まれ、安定した資金を背景に基礎・臨床研究が進んでいる。

再生医療が実現し一般化するためには、細胞そのものや疾患の研究だけではなく再生医療を支える周辺産業の確立と成長が不可欠である。再生医療周辺産業のおもな分野を以下に示す。

- ・ 消耗品類：細胞培養のための試薬類
- ・ 細胞評価機器：調製・加工した細胞の品質検査
- ・ 細胞培養機器：細胞の調製、加工に利用

・医薬品評価システム・機器：医薬候補の安全性評価など

これらの分野に参入し、市場へ製品を提供している企業のほとんどが米国企業であり、規模こそ違え医薬品の輸入超過と同様の産業構造となっている。また、一部の特殊な試薬・製品については、特許による制約や得られたデータの信頼性に影響があるため、少量で高価な輸入品を購入せざるを得ない状況にある。

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を安定的に大量供給する技術の開発を行う。ここでいう技術開発には、細胞の大量培養が可能な自動化装置の開発、品質評価指標・品質評価装置の開発、および凍結保存装置の開発を含む。

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ヒトiPS細胞や、その他のヒト幹細胞等を、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、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が期待される。

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

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を安定的に大量供給する技術の開発を行う。そのために、下記のマイルストーンを設定する。

最終目標（平成 27 年度）：

「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4種以上のヒト幹細胞を、安定的に大量供給可能とするシステムを確立する。加えて、確立した品質評価技術をベースとするヒト幹細胞の標準化原案を策定する。

中間目標（平成 25 年度）：

ヒト幹細胞の培養操作を自動化した安定培養装置のプロトタイプを完成させるとともに、本装置を用いて複数の異なる性質を持ったヒト幹細胞の培養実験を通じて、改良の基礎となる培養液・培養基材のプロトタイプを完成させる。また、融解後の生存率が80%以上となる結保存技術を構築する。

加えて、細胞から得られる多次元情報の統合によって説明される、ヒト幹細胞の品質管理に有効な評価指標候補を複数策定する。

2. 事業の計画内容

2.1. 研究開発の内容

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。

これらの技術開発達成のため、以下の4つの研究開発項目を実施する。

なお、本研究開発の実施期間は、平成22年度から平成27年度までの6年間とする。

(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」および「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。なお、平成22年度補正予算により前倒しで着手する。)

研究開発項目①「ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発」

研究開発項目②「ヒト幹細胞の品質評価指標の開発」

研究開発項目③「ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発」

以下に、研究開発項目毎の研究概要を示す。

研究開発項目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を開発する。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・培養基材を開発する。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併せて行う。

研究開発項目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を開発する。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、2.(1)の技術を用いて継代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を構築するとともに、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を開発する。

研究開発項目③「ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発」

2.(1)と2.(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。

2.2. 研究開発の実施体制

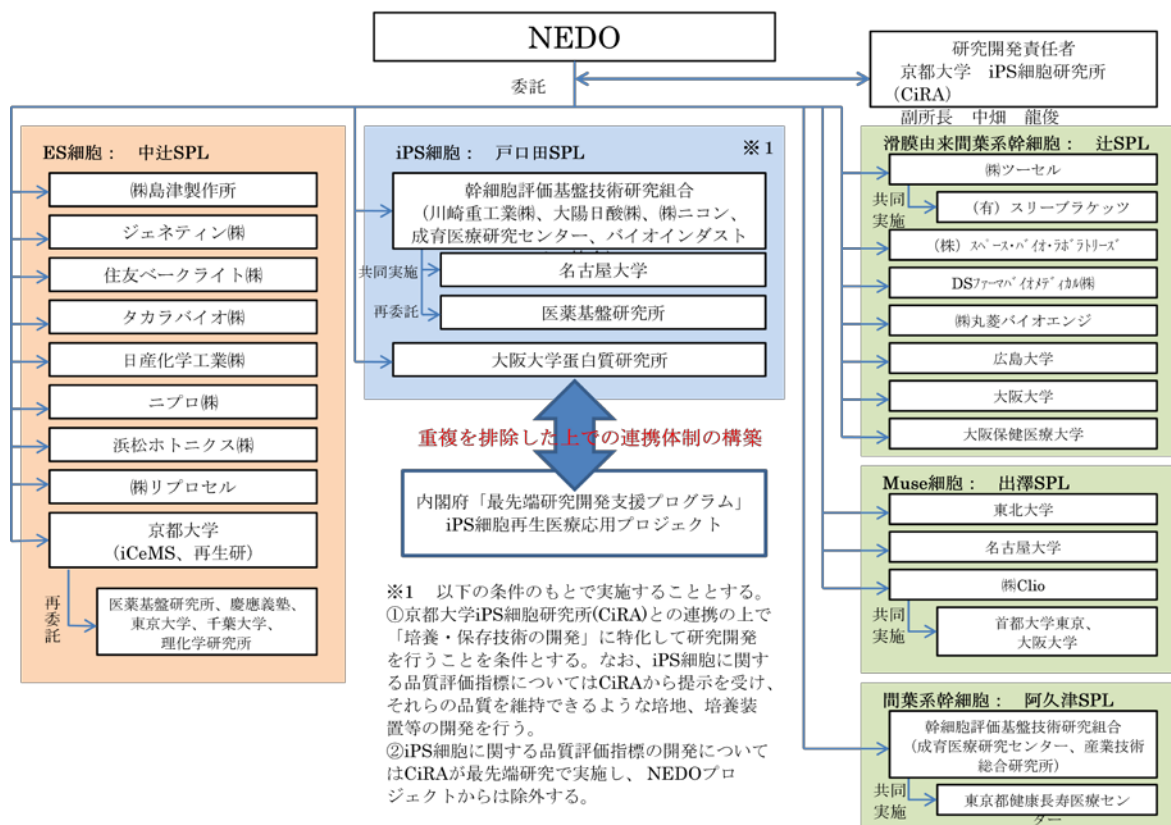
本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構が、単独ないし複数の国内に研究開発拠点を有する本邦企業及び大学等の研究機関から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託して実施する。

本研究開発に参加する各研究開発グループの有する研究ポテンシャルの最大限の活用により効率的な研究開発の推進を図る観点から、研究体にはNEDOが委託先決定後に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。

本研究開発では、国立大学法人京都大学 i P S細胞研究所 副所長 中畑龍俊氏をプロジェクトリーダーとし、その下で細胞ソース毎に設置したサブプロジェクトリーダーが、それぞれの研究テーマの達成目標を実現すべく研究開発を実施するとともに、研究テーマ間に共通する事項に対しては連携の上で効率的に研究開発を進める。

【細胞ソース毎に設置するサブプロジェクトリーダー】

- ①ES細胞領域： 国立大学法人京都大学物質－細胞統合システム拠点 設立拠点長 中辻憲夫
- ②iPS細胞領域： 国立大学法人京都大学 i P S細胞研究所 副所長 戸口田淳也
- ③滑膜由来間葉系幹細胞領域： 株式会社ツーセル 代表取締役社長 辻紘一郎
- ④Muse細胞領域： 国立大学法人東北大学大学院医学系研究科 教授 出澤真理
- ⑤間葉系幹細胞領域： 独立行政法人国立成育医療研究センター 研究所
生殖・細胞医療研究部 幹細胞・生殖学研究室 室長 阿久津英憲



2.3. 研究開発の運営管理

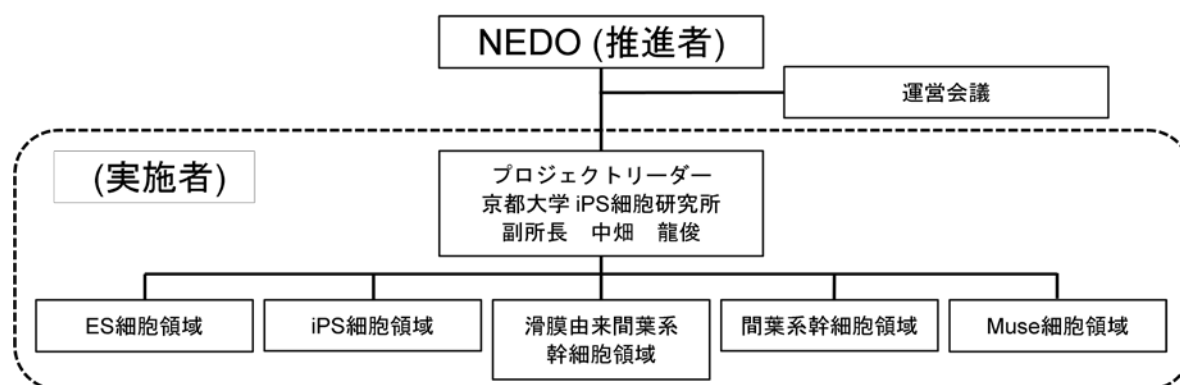
プロジェクトを効率的かつ効果的に遂行するために、下図の通り NEDO 主催のプロジェクト運営会議を設置する。

プロジェクト運営会議は、プロジェクト全体の運営に対する提言を行うものであり、中立性を保つために、プロジェクトに参加していない外部有識者で構成され、目標達成に向けた研究開発マネジメント体制を構築する。なお、採択時の審査結果との連続性を担保するために、複数名の採択審査委員を運営委員に加えている（下表）。

第1回プロジェクト運営会議を、平成25年3月28日に開催した。

第2回プロジェクト運営会議は中間評価後に開催予定であり、中間評価結果を受け、必要に応じてプロジェクト推進方針の見直しを行う。

その後も最終年度に向けてプロジェクト運営会議を適宜開催し、最終研究開発成果のとりまとめ、及びその実用化に向けた具体的な提言を行うものとしている。



プロジェクト運営会議運営委員リスト

区分	氏名	所属役職
委員長	齋藤 英彦*	独立行政法人 国立病院機構 名古屋医療センター 名誉院長
委員	江良 拓実	熊本大学 発生医学研究所 幹細胞誘導分野 教授
	紀ノ岡 正博	大阪大学大学院工学研究科 教授
	松岡 厚子*	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 部長
	大和 雅之	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 教授

* 採択審査委員

2.4. 研究開発成果の実用化・事業化に向けたマネジメントの妥当性

研究開発成果に係わる知的財産権については、「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第 25 条の規定等に基づき、原則として、全て受託先に帰属させるものとする。

各サブプロジェクトにおいてはそれぞれ知財に関する規約を定め、実用化に向けた戦略を踏まえて参画企業の権利範囲を明らかにした上で、参画企業とアカデミアの共同で特許出願することを原則としている。

成果の製品化の状況としては、「ES 細胞領域」、「iPS 細胞領域」および「滑膜由来間葉系幹細胞領域」の各グループには、技術力と事業化能力を有する複数の企業が参画しており、各社の事業戦略のもと研究成果を製品化している。事業開始から 2 カ年で製品化（プロトタイプ機作製含む）されたものを以下にあげる。

「ES 細胞領域」

- ・ヒト幹細胞発現遺伝子リアルタイム PCR 用プライマーセット：タカラバイオ
- ・接着培養用自動細胞培養装置（プロトタイプ）：ニプロ
- ・ヒト幹細胞品質評価用エピジェネティクス自動化システム：ジェネティン
- ・ヒト幹細胞糖鎖生成ラベル化キット：住友ベークライト

「滑膜由来間葉系幹細胞領域」

- ・滑膜由来間葉系幹細胞培養用培地：DS ファーマ

基礎・基盤技術を担う、「間葉系幹細胞領域」および「Muse 細胞領域」においても、ヒト幹細胞の特性解析あるいは品質管理のための指標として有望な複数のマーカー類を見出しており、各種測定キットやヒト幹細胞の特性判断ツールとしての実用化が期待される。

標準化戦略については、ES 細胞領域で、「ヒト ES 細胞の品質評価技術をベースとした、ヒト幹細胞の標準化原案策定」を実施している。また、iPS 細胞領域では、「ヒト iPS 細胞に係る技術等の標準化案の策定」を実施している。国際標準化機構（ISO）での新 TC 設立提案を受け、我が国では一般財団法人バイオインダストリー協会が主管する「幹細胞技術の用語と定義に関する国際規格（案）の作成」に関する委員会に、双方のグループから参画している。本事業の成果を基に、ヒト幹細胞の国際標準化原案策定に貢献する。

3. 情勢変化への対応

財源の追加について、2012 年の山中伸弥 教授（京都大学 iPS 細胞研究所）のノーベル医学生理学賞受賞や、前政権/新政権を通しての再生医療分野を重視した政策など、社会的にもヒト幹細胞・再生医療研究にとって追い風となっている。中間評価の結果を受けて、開発成果創出促進制度（旧：加速等追加配賦制度）による財源の追加を計画中である。

4. 評価に関する事項

NEDO は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による中間評価を平成 25 年度、事後評価を平成 28 年度に実施する。

III. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

本プロジェクトは由来の異なる 5 種のヒト幹細胞（ES 細胞、iPS 細胞、滑膜幹細胞、間葉系幹細胞及び Muse 細胞）を対象として①ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発、②ヒト幹細胞の品質評価指標の開発、③ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発を目的として実施された。

ES 細胞、iPS 細胞及び滑膜幹細胞の 3 種の細胞領域では安定な培養・保存に対して自動培養装置を開発することにより、目的を達成するアプローチがなされた。このうち ES 細胞、iPS 細胞の 2 領域においては既に試作機あるいは機能評価機が開発が終了した。試作機においてはバックでの接着培養、機能評価機では CiRA におけるフィーダー細胞を用いた培養法を再現させることが出来た。更なる改良を加え、市場ニーズに沿った商品開発を目指している。現状では市場ニーズが不明確であり、継続的な調査を行いながら開発を進める。一方、滑膜幹細胞領域では、細胞培養に適した基材を見出すことが出来たため、既に試作が終了している大量培養槽あるいは無重力培養槽での検証試験をこれより実施し、GMP に適合するレベルの培養系を順次構築する。

種々の幹細胞をより効率的に培養するために、細胞種に適した生物あるいは動物由来成分を含まない培地及び培養基材の開発も進めてきたが、増殖因子を代替する低分子化合物合成、フィーダー細胞機能を代替する培養基材の開発、生物あるいは動物由来成分を含まない培地開発に成功している。特に GMP に適合した培養技術がより早期に求められる滑膜幹細胞領域において動物由来成分を含まない培養系が構築できたことは、意義が大きい。増殖因子を代替する低分子化合物については、リード化合物を最適化することで最終製品を目指す。また、フィーダー細胞機能を代替する基材については、種々の培地での検証試験を更に加えるとともに、安定性の向上ならびに多機能性を目指した開発を進める。

細胞の凍結保存技術に関しては、それぞれの細胞特性に応じた凍結法や凍結保存剤、更に自動凍結保存装置等が開発され、高い生存率を示す凍結保存技術の基盤が構築できたため、緩慢法などの凍結法と DMSO を含まない凍結保存剤等を組み合わせる手法の確立を目指す一方で自動凍結保存装置を併用する方法についても検討することで安全性が高く効率の良い細胞の凍結保存技術開発を目指す。

細胞の分化能・増殖能に関連する複数のマーカー候補がそれぞれの細胞種において見いだされ、ヒト幹細胞の有用な品質評価マーカーになり得ることが示された。これらの一部についてはヒト幹細胞関連発現遺伝子プロファイルキットならびにヒト幹細胞糖鎖解析キットとしてすでに商品化されている。他方でマーカーを用いない細胞評価技術についての検討もなされ、形態評価を基本とする非侵襲的なコロニー評価技術が開発された。形態評価アルゴリズムに更なる改良を加え、より高い精度で培養状態を判別できるシステムの構築を目指している。

再生医療の実用化・産業化を実現するためには、そこで用いられる技術を標準化することが重要で、そのためには技術に係わる用語の国際統一が急務となる。そこで本プロジェクトではヒト幹細胞種（含、前駆細胞）の定義に関する国際規格の国内案を産官学共同で作成した。本テーマに関しては本事業から再生医療の基盤技術に関する国際標準化事業に移管し、引き続き ISO/TC276 の第 1

回総会における国際提案（NWIP）を目指すことになった。一方、幹細胞に係る研究の進捗及び再生医療の産業化を巡る国内外の動向についても継続的な調査を行ってきたが、それらの結果をもとに幹細胞の安定的な大量調整技術に関する標準化案の骨子作成を開始した。

事業全体の成果のまとめ

目 標	研究開発成果	達成度
事業全体	<p>安定的な培養を実現するために、自動培養装置の試作機及び機能評価機を開発した。また、生物由来成分を含まない培地及び培養基材等を開発すると共に、細胞の凍結保存についても基盤技術が構築出来た。本プロジェクトで開発された新規培養基材の一部については、プロジェクト内での横断的技術活用がなされた。</p> <p>細胞の分化能・増殖能に関連する複数のマーカー候補がそれぞれの細胞種において見いだせ、一部のマーカーについてはキットが商品化された。他方でマーカーを用いない細胞評価技術についての検討もなされ、形態評価を基本とする非侵襲的なコロニー評価技術が開発された。</p> <p>ヒト幹細胞種（含、前駆細胞）の定義に関する国際規格の国内案を産官学共同で作成した。</p>	達成
研究開発項目① 「ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発」	<p>ヒト ES 細胞及び iPS 細胞領域において自動培養装置の試作機及び機能評価機を開発した。また、滑膜細胞領域では大量培養を実現するための培養基材を見出した。細胞の凍結保存については、細胞種に適した凍結法、凍結保存剤が開発され、iPS 細胞領域では自動凍結保存装置を用いた凍結保存法が確立された。生物あるいは動物由来成分を含まない培地や一部の増殖因子を代替する低分子化合物を見出した。更に、フィーダー細胞の機能を代替する基材についても開発され、ES 細胞、iPS 細胞での有効性が検証された。</p>	達成
研究開発項目② 「ヒト幹細胞の品質評価指標の開発」	<p>それぞれの細胞の品質評価を可能とするマーカー候補が見出され、一部のマーカーについてはキットで商品化されている。形態評価を基本とする非侵襲的なコロニー評価技術も開発され、商品化を目的とした種々の検証試験を実施中である。</p>	達成
研究開発項目③ 「ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発」	<p>ヒト幹細胞種（含、前駆細胞）の定義に関する国際規格の国内案を作成した。また、幹細胞に係る研究の進捗及び再生医療の産業化を巡る国内外の動向について調査し、幹細胞の安定的な大量調整技術に関する標準化案の骨子作成に着手した。</p>	達成

特許・論文・その他学会発表数

	iPS 細胞 領域	ヒト ES 細胞 領域	滑膜細胞 領域	間葉系細胞 領域	Muse 細胞 領域
特許出願 (うち外国出願)	1 (0)	9 (5)	5 (0)	4 (0)	5 (1)
論文 (査読付き)	2	5	0	6	24
その他	29	57	36	15	70
計	32	71	41	25	99

2. 研究開発項目毎の成果

本プロジェクトは由来の異なる 5 種のヒト幹細胞 (ES 細胞、iPS 細胞、滑膜幹細胞、間葉系幹細胞及び Muse 細胞) を対象として研究が実施された。それぞれの細胞の特性が大きく異なるため、本来であれば研究開発項目毎に記載すべきところをここでは細胞種ごとに記載することにした。

IV 実用化・事業化に向けての見通しおよび取り組みについて

本プロジェクトではサブプロジェクト毎に実用化・事業化の評価基準を下表のとおり設定した。実用化・事業化に向けての見通しおよび取り組みについては、「第三章：研究開発成果について」においてサブプロジェクトごとに記した。

各サブプロジェクトにおける実用化・事業化の評価基準

領域	実用化・事業化の評価基準
ES 細胞領域	<p>① 再生医療や創薬スクリーニング(これらに関わる研究用途含む)に用いるヒト ES 細胞等の多能性幹細胞を安定的かつ大量に供給するため、本プロジェクトの成果を基に自動培養技術、細胞観察評価技術、凍結保存技術を組み合わせたシステム等が製品化されること。</p> <p>② 或いは各事業者が個々に保有する自動培養装置、細胞観察装置、凍結保存装置等の既製品に本プロジェクトの成果を取り込んだ改良品が製品化されること。</p> <p>③ また、ヒト ES 細胞等の多能性幹細胞の特性解析及び品質評価に関する標準化技術を開発すると共に、ゲノム解析、エピゲノム解析、糖鎖解析、メタボローム解析および分化能解析の標準的プロトコルを確立し、さらには試薬等として製品化されること。</p>
iPS 細胞領域	<p>① 再生医療や創薬スクリーニング(これらに関わる研究用途含む)に用いるヒト iPS 細胞を京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) プロトコルに基づき安定的かつ大量に供給するため、本プロジェクトの成果を基に自動培養技術、細胞観察評価技術、凍結保存技術を組み合わせたシステム等が製品化されること。</p> <p>② 或いは各事業者が個々に保有する自動培養装置、細胞観察装置、凍結保存装置等の既製品に本プロジェクトの成果を取り込んだ改良品が製品化されること。</p>
滑膜由来間葉系幹細胞領域	<p>本プロジェクトの成果である培地、大量培養技術等を用いて細胞の大量培養が行われると共に、これが臨床治験において利用されること。</p>
Muse 細胞領域	<p>第三者による細胞利用が容易に行える細胞の分離・採取・培養法が確立されること。</p>
間葉系幹細胞領域	<p>① 本プロジェクトの成果を基に構築された細胞品質カタログデータが幹細胞に係る研究者や再生医療に係る医師等に利用されること。</p> <p>② 或いは本プロジェクトの成果として得られた細胞バイオマーカー等に関する特許が民間企業にライセンスされること。</p>

【ES細胞領域】

Ⅲ. 研究開発成果について

はじめに

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 B 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。

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、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。

研究開発の内容

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を安定的に大量供給する技術の開発を目的として、細胞源をヒト ES 細胞に限定し、以下の2つの技術開発を実施する。

- ① ヒト ES 細胞の安定な培養・保存技術の開発
- ② ヒト ES 細胞の品質評価指標の開発

研究開発の実施体制

本研究開発（サブプロジェクト）では、上記の技術開発項目に対して以下に示す中項目を設定する。カッコ内は各項目を担当する大学、企業および研究機関を示す。（再委託先を含む。）

① ヒト ES 細胞の安定な培養・保存技術の開発

- 1.1. 安定、安全にヒト ES 細胞を維持するペプチド・タンパク質などの成長因子をはじめ、化学合成困難な高分子成分を代替できる低分子化合物による合成培地の開発（京都大学、日産化学工業、リプロセル）
- 1.2. 化学合成／高分子技術を用いたヒト ES 細胞の三次元大量培養を可能にするための培養基質および培養基材の開発（京都大学、日産化学工業、リプロセル）
- 1.3. 閉鎖系細胞培養容器と三次元培養方法を組み合わせたヒト ES 細胞の培養法の開発（京都大学、ニプロ、リプロセル）
- 1.4. ヒト ES 細胞の状態を培養下で生きたまま検定するための、多パラメータ観察技術などのイメージング技術による生細胞検査技術の開発（京都大学、浜松ホトニクス、リプロセル）
- 1.5. 自動化が可能なヒト ES 細胞の高効率凍結保存技術の開発（京都大学、ニプロ、リプロセル）

② ヒト ES 細胞の品質評価指標の開発

- 2.1 ヒト ES 細胞の分子生物学的情報の取得および解析技術・検定キットの開発（京都大学（再委託先：理化学研究所）、島津製作所、ジェネティン、住友ベークライト、タカラバイオ、リプロセル）
- 2.2 ヒト ES 細胞の効率的で再現性の良い分化誘導法を用いた多分化能および分化指向性の評価（京都大学、医薬基盤研究所、慶應義塾大学、千葉大学、東京大学）

研究開発の運営管理

研究開発の進捗管理として、平成 23 年 5 月より「技術開発推進会議」を京都大学で隔月に開催、研究担当の実務担当者に口頭での研究内容の進捗報告を実施（半日）、特に培養技術開発について毎月「技術開発推進会議」を平成 24 年 5 月まで実施し、研究の加速を図った。参加者は、NEDO プロジェクトに参加している方に限定して実施。NEDO から武井主査及び必要に応じて三代川主任研究員、森田部長および中畑 PL の参加も行った。平成 24 年 5 月以後、「技術開発推進会議」は、隔月開催とした。さらに、平成 24 年 9 月より、成果をいち早く実用化するために、参加企業の代表者と京大から数名からなるコアメンバーで具体的な戦略プラン作成、成果実現のためのワーキングチームを結成し、通常の「技術開発推進会議」に加えて「NEDO プロジェクト戦略会議」を隔月開催し、プロジェクトの戦略的推進と実用化の加速を行っている。

1. 事業全体の成果

基本計画に記載された「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を安定的に大量供給する技術の開発を行う」ことに対して、大量培養が可能な自動培養装置の開発及び品質管理に必要な検査キットの開発についていくつか製品化に成功した。

事業全体の成果のまとめ

目 標	研究開発成果	達成度
事業全体	<p>基本計画に記載された「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を安定的に大量供給する技術の開発を行う」ことに対して、大量培養が可能な自動培養装置の開発及び品質管理に必要な検査キットの開発についていくつか製品化に成功した。</p>	達成
研究開発項目① 「ヒト ES 細胞の安定的な培養・保存技術の開発」	<p>①安定、安全にヒト ES 細胞を維持するペプチド・タンパク質などの成長因子をはじめ、化学合成困難な高分子成分を代替できる低分子化合物による合成培地の開発については bFGF を代替可能な低分子化合物候補化合物を見出した。</p> <p>②化学合成／高分子技術を用いたヒト ES 細胞の三次元大量培養を可能にするための培養基質および培養基材の開発については具体的に有望な基質及び基材について性能を確認中。</p> <p>③閉鎖系細胞培養容器と三次元培養方法を組み合わせたヒト ES 細胞の培養法の開発については小型のプロトタイプを作製し、培養条件を検討中。</p> <p>④ヒト ES 細胞の状態を培養下で生きたまま検定するための、多パラメータ観察技術などのイメージング技術による生細胞検査技術の開発については、可能性の高い解析法でのイメージング技術開発を実施中。</p> <p>⑤自動化が可能なヒト ES 細胞の高効率凍結保存技術の開発については、新たな凍結液による緩慢凍結法に成功した。</p>	達成
研究開発項目② 「ヒト ES 細胞の品質評価指標の開発」	<p>①ヒト ES 細胞の分子生物学的情報の取得および解析技術・検定キットの開発については、国際データベース等を活用したゲノム品質指標を設定し、解析技術関係ではヒト幹細胞のエピゲノム自動解析システムの構築に成功、またヒト幹細胞関連発現遺伝子プロファイルキットを商品化、さらに幹細胞特異的糖鎖解析キットを商品化した。</p> <p>またヒト幹細胞技術標準化についても国内の関係部署との連携を行っている。</p> <p>②ヒト ES 細胞の効率的で再現性の良い分化誘導法を用いた多分化能および分化指向性の評価については京大ヒト ES 株を中心として、外胚葉（神経系細胞）、中胚葉（心筋細胞、血球系細胞）及び内胚葉（肝臓細胞など）への分化能と分化指向性の評価を行い、株により分化能及び分化指向性に違いがあることを見出した。今後、新規な培養法で作製されたヒト ES 細胞株について検討予定。</p>	達成

年度毎の特許、論文、学会発表の件数

区分 年度	特許出願			論文 (査読付き)	学会発表
	国内	外国	PCT*出願		
H22fy	0件	0件	0件	0件	0件
H23fy	0件	1件	0件	2件	18件
H24fy	7件	3件	1件	3件	25件

※Patent Cooperation Treaty：特許協力条約

2. 研究開発項目毎の成果

2.1 ヒト ES 細胞の安定的な培養・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自動培養技術、ヒト ES 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、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目的に、以下の技術開発を行なう。

2.1.1 安定、安全にヒト ES 細胞を維持するペプチド・タンパク質などの成長因子をはじめ、化学合成困難な高分子成分を代替できる低分子化合物による合成培地の開発（京都大学、日産化学工業、リプロセル）

品質不安定な動物や生体から精製したタンパク質などの成分を代替する低分子化合物／高分子化合物を見だし、成分が明確かつ異種生物由来の成分を含まない合成培養液および合成基質の開発を行う。

京都大学（再生医科学研究所）

事業目的と背景

ヒト ES 細胞は通常マウスの線維芽細胞をフィーダーとして用い、また培養液としては Life Technologies 社から発売されている Knockout Serum Replacement (KSR) を含む培地が最も一般的に使われている。この場合、フィーダー細胞の使用という問題と、培養液に関しても化学的に明確な物質のみを混合して調整された合成培地ではないこと、またロット差が多いという問題点がある。このような培地で培養されたヒト ES 細胞は未分化状態が不均一となり、均質の大量調整は難しい。また臨床応用にも使うことができない。そのため、フィーダー細胞を必要としない培地(合成培地、あるいはゼノフリー培地と呼ばれている)の開発が不可欠である。しかしながら、現在市販されている合成培地、ゼノフリー培地では KSR ほどのロット差は少ないものの、どれも高価であり、依然としてヒト ES 細胞の大量培養に対して大きな障害となっている。本担当プロジェクトでは、ヒト ES 細胞の未分化維持増殖に効果のある低分子化合物を同定し、より安価で且つ均質な培地の開発を目指している。

ヒト ES 細胞の未分化増殖には bFGF と TGF/Activin が重要な役割を果たしており、ほとんどの合成培地ではこれらの増殖因子が含まれている。特に bFGF は通常の細胞培養で使われるよりもはるかに高濃度で使われており、例えば合成培地として最も販売実績がある mTeSR1 (Stem Cell Technologies) では、培地中における bFGF の最終濃度が 100 ng/ml である。また高濃度の bFGF を用いることで、TGF/Activin は不要な合成培地もある (N2B27 ベースの培地など)。このようにヒト ES 細胞の未分化維持に用いられる培地においてほとんど不可欠な役割を果たす bFGF に着目し、その代替機能を有する化合物の同定を本事業目的とする。bFGF の代替化合物を既知のシグナルパスウェイ

関連の化合物から同定していくというアプローチは行われているが、未だ十分は機能を持つ化合物は見いだせていないことから、その同定には化合物スクリーニングという手法が必要となってきた。

事業内容と目標

本プロジェクトでは京都大学の上杉教授と日産化学が有する化合物ライブラリから独自に選抜した低分子化合物を用いることとし、多くの化合物を客観的に評価が可能なハイスループットスクリーニング、ハイコンテツスクリーニング系の構築し、その評価系を用いて選抜された化合物を評価することにした。

中間目標：bFGFの代替効果を有するヒット化合物の同定を行う。

最終目標：ヒット化合物の中でより大きな効果が期待できる低分子化合物(リード化合物)を決定し、この低分子化合物を日産化学で有機合成展開することにより構造の最適化を行い、サンプルワークを行う。

研究成果

複数のヒトES細胞株の培養においてbFGFの代わりになりうる低分子化合物を2種類得ることに成功した。長期継代後も未分化能を維持していることがわかった。

ヒトES細胞培養における(リプロセルで開発されたゼノフリー培地)Repro XFの評価を行い、KhES-1、H9ともに5回の継代が可能であることを見出した。

京都大学(物質-細胞統合システム拠点)

<概要>

2000年に血清置換物とフィーダー細胞を用いた安定したヒトES細胞の培養システムが開発され、現在までに報告されているフィーダー細胞を用いないヒト未分化幹細胞(ES/iPS)用培地で、最も動物およびヒト由来成分(含リコンビナントタンパク質)が少ないものは、WisconsinのThomsonらのグループがNature Methods 2011年5月号に発表したE8培地である(図1の上3段)。これらの培地は全て、2000年に発表された培地から、不必要なものを排除し、化合物で置換可能なものを置換する方法で開発されている。しかし最もシンプルなE8培地にはまだ、4種のリコンビナントタンパク質(bFGF 100ng/ml, TGFβ/Nodal, Insulin, Transferrin)が含まれており、これら4成分のうちで、医療使用等に用いられおらず、かつ高価であるbFGFとTGFβが、ヒト未分化幹細胞の幅広い産業への利用の妨げとなっている。また現在まで、世界中でbFGFとTGFβを置換可能な化合物のスクリーニングが行われているものの、未だ化合物を合成できたという報告はなされていない。このことは、bFGFとTGFβに依存しない新規の合成培地を開発出来れば、ヒト未分化幹細胞の幅広い産業利用が可能となることを示唆している。

そこで我々は、本事業において、新規で安価な合成培地の開発を目標に、Wntシグナル目し、bFGFとTGFβ非依存の合成培地の開発を実施している。



図1. これまでの培地と今回開発した培地の比較

<目標>

本事業では、新規の完全合成培地の開発を目標としている。具体的には以下の4点の研究開発を行っている。

- 1) ヒトES細胞を維持する化合物の同定
- 2) 化合物を利用した合成培地の開発
- 3) 開発した培地に適した培養法の開発
- 4) 開発した培地・培養法で長期培養した細胞の評価

<研究開発成果>

bFGFとTGFβに依存しない新規の合成培地を開発出来れば、ヒト未分化幹細胞の幅広い産業利用が可能となることを示唆している。そこで我々は、本事業において、新規で安価な合成培地の開発を目標に、Wntシグナルに着目し、bFGFとTGFβ非依存の合成培地の開発を実施している。

我々はWntを置換可能な化合物のスクリーニングを行い、ヒトES細胞の維持が可能ないくつかの候補化合物を得、これらの化合物群を用い、長期間培養可能な化合物を得た。

またナノファイバーグループおよび浮遊培養グループへの技術的サポートおよび浮遊培養法の開発をおこなった。

日産化学工業株式会社

研究計画

品質不安定な動物や生体から精製したタンパク質などの成分を代替する低分子化合物／高分子化合物を見出し、成分が明確かつ異種生物由来の成分を含まない合成培養液及び合成基質の開発を目指す。そのため、レポーター遺伝子を組み込んだヒトES細胞を用いたスクリーニング系を活用し、多能性幹細胞の未分化性を維持したまま培養することを可能とする代替因子に関してリード化合物を取得する。

研究成果

日産化学が所有する化合物ライブラリーから、共同研究先の京都大学が所有する化合物ライブラリーとは異なる視点に基づき化合物を選抜し、作成されたライブラリープレートを京都大学に送付し、京都大学でのスクリーニングに供試した。

- ・細胞間接着因子アンタゴニストの合成及び評価：ES 細胞の細胞間接着因子を細胞足場の候補として設定し、本因子のアンタゴニストペプチドを分子内に含有するクロスリンカーを合成しヒト ES 細胞増殖に対する活性を京都大学にて評価。
- ・接着基材として各種合成ポリマーをコーティングした基板の作成及び評価：本ポリマー及びそのファイバーの作成条件を種々検討し、ES 細胞の接着と増殖に対する効果を京都大学にて確認。
- ・三次元培養を促進する培地組成物の作成及び評価：ヒト ES 細胞の効率的な三次元培養方法を確立するため、日産化学にて見出されたポリマーを ES 細胞用培地に含有させた培地組成物の調製方法を種々検討し、ヒト ES 細胞の未分化性と多能性に対するポリマーの影響を京都大学にて確認。

2.1.2 化学合成／高分子技術を用いたヒト ES 細胞の三次元大量培養を可能にするための培養基質および培養基材の開発

コンタミリスクを最小限にできる、ヒト ES 細胞の大量培養を可能とする、三次元培養技術の開発を行う。それを実現するために、平面培養の改良発展型技術開発、浮遊培養系開発、三次元的培養基材開発など、目的に応じて使い分けることも想定した多面的な技術開発を行う。

京都大学（物質-細胞統合システム拠点）

高品質のヒト ES 細胞を安定的に大量供給するには、従来の接着培養法は、生産性の低さから、大量培養には不向きである。そこで、浮遊培養法が注目されているが、これまで報告されている浮遊培養系では、継代時の細胞生存率の低さや制御できない自発的細胞塊の融合、細胞塊の不均一なサイズという問題がある。また、大量供給を目指してスピナーフラスコ等を用いて攪拌する三次元浮遊培養法の報告があるが、これらは力学的ストレスによる細胞ダメージがある。これらの問題を解決する為に、京都大学では、非酵素処理による幹細胞スフェアの継代、および培地の改善を試み、ヒト ES 細胞の大量培養と供給システムの実用化を目指している。

従来の多能性幹細胞の浮遊培養法における生存率の低さは、継代時の酵素処理による単一細胞への分離が原因と考えられる。そこで我々は、酵素を用いない方法でヒト ES 細胞スフェアを分割し、小さなサイズの均一なスフェアにする事に成功した。スフェアのサイズは培養期間に比例して大きくなるが、継代後 7 日目以降では、内部に不均一な構造体が現れるため、5 日毎の継代を行った。また、継代時における Rock 阻害剤である Y27632 の添加は、従来の浮遊培養法と同様、細胞の損失を改善した。次に、不均一な細胞塊サイズや自発的な細胞死や分化の原因となる細胞塊同士の融合を抑制する為に、ポリマー1 を培地に添加した。その結果、融合スフェアの割合は、H9 細胞株では 20.7%から 3.5%、253G1 細胞株では 19.5%から 9.8%となり、大幅な減少に成功した。このように、これら 2 つの改良手法を組合せた新規スフェア培養法を開発した。

<研究成果>

化学合成／高分子技術を用いたヒト ES 細胞の三次元大量培養を可能にするための培養基質および培養基材の開発

酵素を用いない方法でヒト ES 細胞スフェアを分割し、小さなサイズの均一なスフェアにする事に成功した。不均一な細胞塊サイズや自発的な細胞死や分化の原因となる細胞塊同士の融合を抑制する為に、ポリマー1 を培地に添加し、これら 2 つの改良手法を組合せた新規スフェア培養法を開発した。この新規スフェア培養法は、多能性幹細胞の特徴的性質を保持した状態で細胞を長期継代維持することができた(特許出願済)。

次に、平面的なスフェア培養から更に大量培養を可能にする技術開発を目指し、従来使用されている攪拌培養による三次元培養の問題点を解決するポリマー2 を基本培地に添加することで、培地の大

幅な粘度上昇やハイドロゲル形成の必要なしで、攪拌の不必要な三次元スフェア培養を可能とし、この培養法は多能性幹細胞の特徴的性質を保持した状態で、長期継代維持できた(特許出願済)。

リプロセル

目標

コンタミリスクを最小限にできる、ヒトES細胞の大量培養を可能とする、三次元培養技術の開発を行う。

成果

京都大学で開発されている三次元培養方法に 1.1.で開発したReproXFを使用可能かの予備検討を行うため、すでに論文で報告されている三次元培養方法への応用に着手した。

日産化学

研究計画

平面接着系培養或いは浮遊系培養に用いられる培養基材・基質に関してヒトES細胞に対する増殖促進効果を評価検討するとともに、これら培養基材・基質の添加条件等の最適化に着手する。

研究成果

① ヒトES細胞支持体としてのハイドロゲルの合成及び評価

日産化学にて選抜し、合成したハイドロゲル4点に関して、種々の構造変換を実施し、京都大学においてヒトES細胞増殖に対する効果を検討した。その結果、本ハイドロゲルはヒトES細胞の未分化性を維持する基板として機能することが示唆されたが、細胞増殖を促進する効果は認められなかった。

② 細胞間接着因子アンタゴニストの合成及び評価

ES細胞の細胞間接着因子を細胞足場の候補として設定し、本因子のアンタゴニストペプチドを分子内に含有するクロスリンカーを合成した。更に、本クロスリンカーを用いて蛋白質の修飾が可能であることを京都大学にて確認した(図1)。また、別の接着因子のペプチド配列を有するクロスリンカーを合成し、京都大学に供試した(図2)。現在、これらのクロスリンカーを用いて得られた修飾蛋白質について、ヒトES細胞増殖に対する活性を京都大学にて評価中

京都大学 (物質・細胞統合システム拠点)

ヒトES細胞の大量培養を可能にするために、三次元大量培養を開発することが重要である。本研究では、新規培養基質及び培養基材の開発を行なっている。本研究においては、①ナノファイバーを細胞培養用基材として用いた新規ヒト多能性幹細胞培養法の開発、②日産化学との共同研究により新規培養基材の開発とその評価、に取り組んでいる。

<研究成果>

ヒトES細胞の大量培養を可能にするために、三次元大量培養を開発することが重要である。本研究では、新規培養基質及び培養基材の開発を行なっている。本研究においては、新規ヒト多能性幹細胞培養法の開発に取り組んでいる。現在、ヒトES細胞の細胞培養基材として使用されているのはマトリゲルのような動物由来の細胞外マトリックスである。しかし、このマトリゲルを用いて培養したヒトES細胞は当然、動物由来の夾雑物質が混入していることになり、これを細胞移植治療などに用いることは、免疫拒絶反応などの観点から難しい。近年、ポリマーやペプチド、組み換えタンパク質等を細胞培養基材として用いた培養系が開発されてきているが、非常に高価であり、またヒトES細胞大量培養系への応用は困難である。そこで、本研究では、大量培養へ応用可能な新規細胞培養基材

の開発を行った。

本研究では、生体材料を用いた新規細胞培養基材を開発することで、ヒト ES 細胞の細胞培養基材への接着性を向上できることを見出した。mTeSR-1 等の合成培地を用いた結果、20 継代以上の長期培養後でも、その多能性を保持していることを免疫染色法、フローサイトメトリー、胚葉体形成、マウス内での奇形腫形成等で確認できた。また、長期培養後においても、細胞核が正常であることがマルチカラー-FISH 等でも確認した。

2.1.3 閉鎖系細胞培養容器と三次元培養方法を組み合わせたヒト ES 細胞の培養法の開発

開発した各種の培養液、培養基材（基質を含む）を組み合わせ、ヒト ES 細胞の三次元培養の実用的なパッケージ技術の開発を行う。

ニプロ

接着培養用自動培養装置

閉鎖系細胞培養容器として培養バッグを用いた接着系培養の検討としては、培養方法、培養容器の要求仕様の検討を実施し、自動培養装置のプロトタイプを開発した。その装置、培養容器にて接着細胞を用いた培養評価を実施し、培地交換、継代等の一連の培養行程が実施できることを確認した。



図 1.自動培養装置外観図



図 2-1.自動培養装置全体像



図 2-2.運転時の様子

浮遊培養用自動培養装置

以下の検討を実施した。

- ①各種小型装置と培養装置
- ②コロニーの浮遊培養
- ③細胞回収率の改善とコロニー融合の抑制
- ④コロニー継代時の流速検討試験

リプロセル

目標

開発した各種の培養液、培養基材（基質を含む）を組み合わせ、ヒトES細胞の三次元培養の実用的なパッケージ技術の開発を行う。

成果

これまでに閉鎖系自動培養装置の要素技術である(1)供給培地の長期安定性試験、(2)細胞懸濁液送液の自動化、(3)閉鎖系培養容器を用いた培養、の3つについて開発を行い、閉鎖系自動培養装置の開発を大きく前進させた。今後は、本プロジェクトで開発中である成分が明確かつ異種生物由来の成分を含まない合成培養液および合成基質を本システムに組み合わせ、閉鎖系自動培養装置を使ったES細胞の大量培養システムの開発に取り組む。

2.1.4 ヒト ES 細胞の状態を培養下で生きたまま検定するための、多パラメータ観察技術などのイメージング技術による生細胞検査技術の開発

増殖させたヒト ES 細胞の状態と特性を評価検定し、理想的な状態の標準的なヒト ES 細胞を供給するため、経時的に、連続して、培養増殖中のヒト ES 細胞の状態をモニターし、細胞の状態変化や自発的分化細胞の出現などの培養中の不具合を素早く検出することを可能とするイメージング技術による生細胞検査技術の開発を行う。

浜松ホトニクス株式会社

目標

増殖させたヒト ES 細胞の状態と特性を評価検定し、理想的な状態の標準的なヒト ES 細胞を供給するため、培養増殖中のヒト ES 細胞の状態をモニターし、細胞の状態変化や自発的分化細胞の出現などの培養中の不具合を素早く検出することを可能とするイメージング技術による生細胞検査技術の開発を行う。

研究成果

(1) イメージング装置試作機

培養された状態でヒト ES 細胞コロニーの多面的な形態を定量的に測定することができる顕微鏡をベースとしたヒト ES 細胞イメージング装置を開発した。各種分化細胞ならびにヒト ES 細胞を用いて培養環境下でイメージングを行った。ヒト ES 細胞については培養開始1日目から3日目までの形態像、光学厚さ画像、接着画像等の多面的な形態情報を取得した後、合わせて抗体を用いた免疫染色を実施し同一コロニーの未分化マーカーの発現を蛍光画像で取得した。ヒト ES 細胞コロニーそれぞれの多面的な形態情報と未分化マーカーの比較を細胞レベルで行った。

(2) イメージング装置を用いたヒト ES 細胞の品質評価指標の探索

ヒト ES 細胞を未分化維持培地で培養したコロニーと、過度に成長させて一部もしくは全体が分化細胞に転化したコロニーについて、多面的な形態情報の比較を行ったところ、未分化状態を維持して

いるヒト ES 細胞について特徴的なパターンが見出された。

今後は更にサンプル数を増やし、未分化ヒト ES 細胞について見出した形態的特徴が確かなものであることを確認し、また、細胞増殖の過程と多面的な形態情報の時間変化を追跡する事で、ヒト ES 細胞を未分化状態から方向性のある分化状態に転化していく過程を様々な分化条件で試験し、見出した形態的特徴情報が未分化状態の指標として有効かどうかを検定する。

リプロセル

イメージング装置開発を行うため、ヒト ES 細胞の取り扱い経験の無い浜松ホトニクス株式会社の研究実施のために、初期の立ち上げに尽力すると共に、ヒト iPS 細胞の培養法についての技術教育を行った。

京都大学（物質・細胞統合システム拠点）

イメージング装置開発を行うため、ヒト ES 細胞の取り扱い経験の無い浜松ホトニクス株式会社の研究実施のために、ヒト iPS 細胞の培養法についての技術教育、文部科学省関係の使用計画書作成指導、イメージング装置のプロトタイプ京大導入後の研究内容についての相談及び結果についてのアドバイスを実施。

2.1.5 自動化が可能なヒト ES 細胞の高効率凍結保存技術の開発

手技の熟練度を問わず、自動化が容易な安全性の高い閉鎖系凍結保存技術の開発を行う。

京都大学（再生医科学研究所）

ヒト ES 細胞はマウス ES 細胞と同じ凍結保存方法で行うと、細胞生存率が低く、ほとんどの細胞が死滅してしまうという大きな問題点があった。そこで、京都大学再生医科学研究所では DAP213 を用いたガラス化法を開発し、一般的に用いられるスタンダードな方法となったが、この方法はいくつかの問題点を含む。まず、DMSO は劇・毒物化合物であること、アセトアミドは発がん性の高い物質であることである。さらにガラス化凍結法では、凍結・融解をすばやく行うことが必須であり、研究者、作業者の熟練が必要であることから、自動化も難しく、大量細胞の凍結にあまり適していない。そこで本研究会開発項目では、まず毒性の極めて低い不凍ポリアミノ酸などに着目し、この二つ問題点を解決していくことを目的と、以下に述べるようにガラス化法、緩慢凍結法いずれにおいても成果を取めた。

ガラス化法を用いた凍結保存法では、従来京都大学が開発した DAP213 よりも、(1)劇・毒物である DMSO を含まない、(2)発がん性の高い物質であるアセトアミドを含まない、(3)細胞を懸濁してから 10 秒以内で液体窒素に浸し凍結をする必要がない、不凍ポリアミノ酸ベース凍結液の開発に成功した。

緩慢凍結法に関しては、DMSO を用いない新規化合物 A を用いた凍結保存液の開発に成功した。ヒト ES 細胞の大量凍結には緩慢凍結法が適しており、今後は不凍ポリアミノ酸ではなく、化合物 A に特化し、検討を重ね、実用化の検討と事業化へ進めて行く。

事業目的と背景

ヒト ES 細胞はマウス ES 細胞と同じ凍結保存方法で行うと、細胞生存率が低く、ほとんどの細胞が死滅してしまうという大きな問題点があった。そこで、京都大学再生医科学研究所では DAP213 を用いたガラス化法を開発し、一般的に用いられるスタンダードな方法となったが、この方法はいくつかの問題点を含む。まず、DMSO は劇・毒物化合物であること、アセトアミドは発がん性の高い物質であることである。さらにガラス化凍結法では、凍結・融解をすばやく行うことが必須であり、研究者、作業者の熟練が必要であることから、自動化も難しく、大量細胞の凍結にあまり適していない。そこ

で本研究会開発項目では、まず毒性の極めて低い不凍ポリアミノ酸などに着目し、この二つ問題点を解決していくことを目的とした。

事業内容と目標

京都大学再生医科学研究所にて開発された DAP213 によるガラス化凍結法は、上記のように二つの問題点を含む。本研究では、DAP213 が毒性の高い化合物を含むことから、不凍ポリアミノ酸など毒性の極めて低い化合物に着目し、代替凍結液の開発を行う。またガラス化凍結法ではなく、大量細胞の凍結により適した緩慢凍結法(緩速凍結法とも呼ばれる)の開発を行う。

中間目標：

融解後の細胞生存率が 80%以上となる凍結保存技術を構築する。

最終目標：

緩慢凍結法による融解後の細胞生存率が高い凍結保存技術を構築する。

研究成果

ヒト ES 細胞は、マウス ES 細胞で一般的に行われている緩慢凍結方法ではほとんどの細胞が死んでしまうという問題点があった。京都大学再生医科学研究所では、DMSO、アセトアミド、プロピレングリコールからなる DAP213 という凍結保存液を開発した。しかしながら、この凍結保存液を用いたガラス化凍結法は以下の問題点を含む。第一に劇・毒物化合物である DMSO が含まれている。DMSO は培養細胞の凍結保存液として最も一般的に使われている化合物であるが、劇・毒物化合物であっても代替品がないが故に使われているのが実情である。さらにアセトアミドは発がん性の高い物質であることが知られている。第二の問題点としては、ガラス化法は一般的に行われている緩慢凍結法に比べて、実験者の熟練が必要であり、大量調整が困難である。特に DAP213 の場合、凍結保存液に細胞を懸濁した後、素早く(通常は 10 秒以内に)液体窒素中で凍結を行い、また融解時も同様に素早く融解を行い、さらに DAP213 を細胞から除去する必要がある。そのため、手技の熟練度を問わず、自動化が容易な安全性の高い閉鎖系凍結保存技術の開発を行うためにはこれらの問題点を解決していく必要がある。

そこで、京都大学では細胞毒性が極めて低いカルボキシル化ポリリジン(不凍ポリアミノ酸)の不凍活性に着目し、これをベースに開発した凍結保存液を用い、まずガラス化法による凍結保存効果を比べた。この不凍ポリアミノ酸をベースとした新規ガラス化液と従来の DAP213 を用いてヒト ES 細胞のガラス化凍結保存効果を比較検討したところ、凍結解凍後のヒト ES 細胞の細胞数とコロニー数、及び細胞生存率において優位に高く、新規ガラス化液の優れた保存効果が認められた。一例を図 1 に示す。同数の細胞をガラス化法で凍結、そして融解し培養を行った。融解 1 日後においても不凍ポリアミノ酸では DAP213 よりも接着しているヒト ES 細胞コロニーの数が多く且つ培養基質に伸展していることが確認された。培養二日目、三日目となるに従って、その差はよりはっきりした。

細胞毒性が極めて低いカルボキシル化ポリリジン(不凍ポリアミノ酸)の不凍活性に着目し、これをベースに開発した凍結保存液を用い、まずガラス化法による凍結保存効果を比べた。この不凍ポリアミノ酸をベースとした新規ガラス化液と従来の DAP213 を用いてヒト ES 細胞のガラス化凍結保存効果を比較検討したところ、凍結解凍後のヒト ES 細胞の細胞数とコロニー数、及び細胞生存率において優位に高く、新規ガラス化液の優れた保存効果が認められた。

化合物 A を用いた緩慢凍結法と従来我々が用いた DAP213 によるガラス化凍結法での比較を行った。新規化合物 A を用いた緩慢凍結法では、融解時における細胞の生存率も DAP 法とほぼ同等であり、培養 3 日後では DAP 法よりもほぼ 2 倍の細胞数であることがわかった。

緩慢凍結法に関しては、DMSO を用いない新規化合物 A を用いた凍結保存液の開発に成功した。ヒ

ト ES 細胞の大量凍結には緩慢凍結法が適しており、今後は不凍ポリアミノ酸ではなく、化合物 A に特化し、検討を重ね、実用化の検討と事業化へ進めて行く。

ニプロ

自動化が可能なヒトES細胞の高効率凍結保存技術の開発

以下の事項について検討し、部材については仕様（案）をまとめ、次年度より試作品についての検証を行う。

- ①従来品の課題の克服
- ②閉鎖型凍結保存容器の特徴
 - 細胞懸濁液を充填後にシーラーで封止することで液体窒素が流入しない。
 - 従来のケーンなどでの保存が可能。 ●プラスチック素材のため破損し難い。
- ③閉鎖系凍結保存容器の形状仕様案

リプロセル

京都大学で行っている凍結保存技術の開発に話し合いの場を設けアイデアを提供した。

2.2 ヒト ES 細胞の品質評価指標の開発

樹立機関が異なるヒト ES 細胞株、培養維持方法の異なるヒト ES 細胞株、さらに親細胞株から派生したサブライン細胞株などを用いて、未分化状態における分子生物学的情報と、現時点で最も信頼性の高い分化誘導方法を用いた分化能および分化指向性情報を用いて、標準的な多能性細胞株の特性を保有するかどうかを検定判断するための品質評価指標の開発を目的に、以下の技術開発を行う。

京都大学（再生医科学研究所）

国産ヒトES細胞株の標準サンプル調製

遺伝子発現、ゲノム/エピゲノム、メタボローム、糖鎖解析のためヒト ES 細胞より試料を調製し、それぞれの分析に供した。ヒト ES 細胞は通常マウスフィーダー細胞上で維持培養されるためそのままではいずれの分析も困難である。そこで細胞試料はフィーダー細胞非存在下で培養したものを使用した。フィーダーフリー培養条件として、マトリゲルコートした培養皿と、フィーダー細胞で馴化した ES 細胞用培地を採用した。この培養条件はヒト ES 細胞のフィーダーフリー培養にもっとも早く報告され、世界的にも広く用いられている手法であり、信頼性が高くまた細胞株間での再現性も期待されるものである。さらに iPS 細胞も同様の手技での維持培養が可能であることが示されており、より広範な適用に適した方法である。このような利点の一方で、通常維持培養条件と比較して、より高度な培養技術が要求されることから実施者の手技により細胞の状態が変化しやすいとされている。本事業において、信頼出来るデータの取得によるデータの標準化が重要であり、この目的の達成のため、以下のように分析用の試料の調製を行った。

ヒト ES 細胞株として、我々が樹立した KhES-1, KhES-3 を選定した（表 1）。これらの細胞株はこれまでに ISCI による国際共同研究においても解析にもちいられ、遺伝子発現プロファイルやゲノム安定性についてのデータが取得されている。培養過程で生じうる ES 細胞の変化を分析するため、これらの細胞株の比較的樹立直後の継代数が少ない細胞と、長期間の培養を経た細胞とを比較することが精度良い解析には必要であるが、我々は樹立した細胞株について 1 年以上連続的に継代（100-200 継代）した細胞の様々な時期のストックを保有している。これらは他では利用困難な価値の高い試料である。

表1 国産ヒト ES 細胞株 (KhES 株) 概要

株名			KhES1	KhES2	KhES3	KhES4	KhES5
由来	「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき樹立		国内でインフォームドコンセントを得た余剰ヒト凍結胚を由来とする。京大再生研附属幹細胞医学研究センター豊長類幹細胞研究領域により樹立。				
性別			Female	Female	Male	Male	Male
HLA	HLA-A,B,DR	DNA level	データ取得済				
増殖速度	細胞数計数		株により異なる				
無菌否定試験	嫌気性菌、好気性菌	培養法 (薬局方準拠)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
マイコプラズマ試験		培養法 (薬局方準拠)+PCR法 (欧州薬局方準拠)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
エンドキシン試験		簡易法	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
ウイルス試験	HBV,HCV,HIV-1,HTLV-1 CMV,HP19,HHV6,HHV7,HSV,E B	PCR	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
未分化性	Alkaline Phosphatase , SSEA-3,4,TRA-1-60,81, Oct3/4 Nanog,Rex-1	抗体染色 FACS RT-PCR	All Posi.	All Posi.	All Posi.	All Posi.	All Posi.
	SSEA-1	FACS	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
多分化能	In vitro In vivo	EB Teratoma Assay	In vitroで神経細胞、色素細胞等への分化能、in vivoで三胚葉への分化を確認				
遺伝的安定性	核型	G-band	安定 (early, late)				
	CGH	Micro Array	データ取得中				
培養法			培地:DMEM/F12 base, defined >> 改良中 基質: recombinant protein or synthetic material				
凍結保存法	ガラス化法/緩凍凍結法		改良中				

また、世界的に広くもちいられているヒト ES 細胞株としてアメリカ ウィスコンシン大学で樹立された H1 株を用いた。さらに、我々が樹立した細胞株のうちこれまでの解析により、比較的ゲノム変異を生じやすいことが明らかになっている細胞株である KhES-4 株もあわせて解析に供した。

これらうちまず KhES-1,-3 株の試料をもっとも熟練した作業員 1 名 (京都大学再生医科学研究所末盛博文准教授) により調製した。細胞は継代初期、30 継代前後の early passage 細胞とこれをレチノイン酸により分化誘導した細胞および継代後期の 100-200 継代にあたる late passage 細胞の 3 種の調製を行った。これらをたとえば不適切な培養環境に置かれた場合の細胞変化や、長期間の継代維持により細胞に生じる変化の典型的な試料として利用した。2 x 10⁶ 個の細胞を 1 サンプルとして、分析方法に応じてそれぞれを 5-10 サンプルずつが各研究機関に提供された。これらにより得られたデータをまず標準データとして分析し、その後 H1 細胞、KhES-4 細胞についても比較解析を進めた。

細胞分化能の検定は KhES-1,-3 の 2 株について early, late での分化指向性の検討を外胚葉として神経組織、内胚葉として肝細胞、中胚葉として造血幹細胞と血液細胞への分化誘導効率の分析に供した。このために本プロジェクト内の研究機関間での比較検討が可能ないように、early, late それぞれについて同一の継代レベルの細胞ストックを作製しこれを各機関に分配し解析を進めた。

ヒト ES 細胞の品質評価指標の選定

様々な細胞に分化する能力を有する ES 細胞は培養下ではほぼ無限に増殖を行う事が出来る為、大規模な培養を行った後に各種の分化誘導を行う細胞源として大量供給する事が出来る。細胞の品質管理指標としてゲノム DNA の配列情報の変化の有無は極めて重要だが、一般に細胞/生物の DNA はゲノム複製/細胞分裂に伴い必ず変異する。この DNA 変異率は通常の生体環境では大凡 10 の -9 から -10 乗 /塩基/細胞分裂と見積もられており、ヒトゲノムの場合はハプロイド当たり約 3 x 10 の 9 乗の塩基が存在する事から、1 度の細胞分裂でゲノム全体に数個程度の変異が起こる事になる。仮に 1 個~数個の ES 細胞をサブクローニング等を経て 10 の 9 乗個のオーダーまで増殖させて利用する場合を想定す

ると10の9乗 = 約2の30乗で有る事から、大凡30回の細胞分裂が起こる事になり（継代に伴う細胞数のロスを考慮しない場合）、培養中に新たに獲得するDNA変異はゲノム全体で数十個/各細胞程度になる。これら細胞リソースを増殖する過程で「自然」に起こるゲノム変異とそれに伴うリスクは現状では避ける事が困難である。

一方、培養条件が最適では無く genotoxic stress が大きい場合、もしくは細胞増殖の過程でゲノム修復遺伝子等に変異が起きた場合、上述のDNA変異率は1桁～2桁以上上昇する。この場合、細胞集団が全体として蓄積する変異が大幅に増えると共に、増殖/生存に有利な変異を持つ細胞が出現、増加して細胞リソースが同サブクローンで置き換わりその特性が変化する可能性が高くなる。特に後者の変化は造腫瘍性（もしくは細胞増殖制御）との密接な関連が危惧される事からリスク要因として重大である。本事業で開発するヒトES細胞の品質管理技術で評価を行うのはこの「培養システム中における特定の変異細胞の増殖」である。

幹細胞リソースを再生医療分野で応用を目指す場合に注意すべき重要な課題の一つは上述の造腫瘍性のリスクである。これまでに国際的な癌研究のゲノム解析プロジェクト等からヒトの癌関連遺伝子は約500程度がリストアップされている(Cancer Gene Census, Wellcome Trust Sanger Institute)。これら癌関連遺伝子に変異のある細胞が培養システム中に検出可能な頻度まで増加した場合は同培養細胞は再生医療分野で利用すべきではない。また一般にDNA修復遺伝子に異常が起きた場合は直接癌化の原因とははならなくてもDNA変異率が増加して前癌状態になる危険があるものと考えられている。ヒトのDNA修復遺伝子はこれまでに約150程度が同定されており(Human DNA Repair Genes, Wood RD, Mitchell M, & Lindahl T)、癌化の他にも発生異常や各種疾病、老化等との関連が示唆されている。これらの事から癌関連遺伝子及びDNA修復遺伝子は既知の医学生物学的情報から推定される最も重要な幹細胞リソースのリスク要因になると判断し、それぞれゲノム品質指標のclass1, class2遺伝子に選定した(図1, 表2(抜粋))。

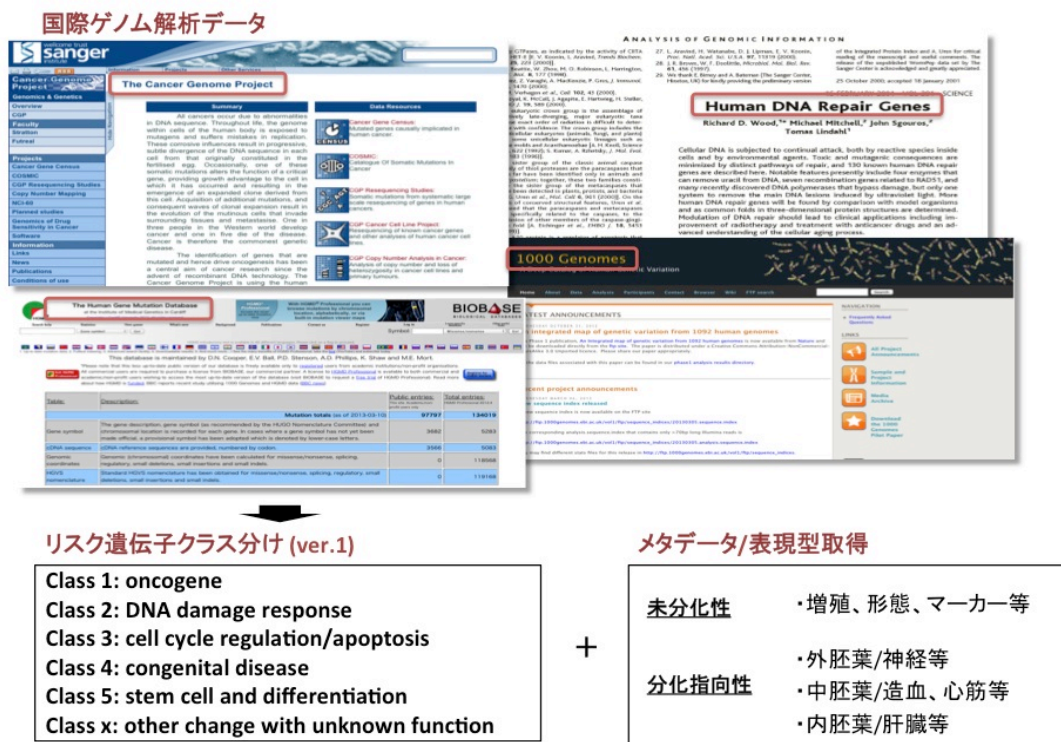


図1 国際データベース等を活用したゲノム品質指標の選定

また癌化、DNA 修復との直接の関連は明らかになっていないが細胞周期、細胞死に関わる遺伝子群は細胞増殖制御に重要な関連が有る事から class3、また各種遺伝性疾患の原因となる事が明らかとなっている遺伝子群は class4 (HGMD、Institute of Medical Genetics in Cardiff)、更にヒト ES 細胞の幹細胞特性と代表的な分化誘導細胞の機能に必要な遺伝子群を class5 として選定する作業を進めた。尚、既知の医学生物学的情報からは遺伝子機能との関連が明らかでは無いがヒト ES 細胞培養の過程で特定の変異/変化を持つ細胞クローンの増殖が検出された場合は、同変異/変化を潜在的なリスク要因として classX として分類する事とした。DNA 変異については近年の大規模ヒトゲノム解析プロジェクト (1000 Genomes Project 等) で報告されている snp や cnv、sv と同一のものは、ヒト集団中で一定の割合で存在する多型である事から重大なリスク要因とはならないものと考え、別途分類する事とした。

また上記の遺伝子クラスのリストは医学生物学研究の進展に伴い新たな情報が得られる性質のものである事から、定期的にアップデートを行う事とした (2 回/年等)。classX に分類される機能未知の変異/変化 (DNA 配列の他にエピジェネティクス、遺伝子発現制御等を含む) については、本事業の項目 1 「ヒト ES 細胞の安定な培養・保存技術の開発」の新規培養システムにおけるヒト ES 細胞の幹細胞特性や 2.2 「ヒト ES 細胞の効率的で再現性の良い分化誘導法を用いた多分化能および分化指向性の評価」の各種体細胞への分化誘導に対する応答性と比較解析を進める事で機能的なアノテーション付けと新たな品質評価指標の開発を目指す。

表 2.ゲノム品質指標 class1、class2 遺伝子リスト (抜粋)

Symbol	Chr Band	Symbol	Chr Band	Symbol	Chr Band	Symbol	Chr Band
ABL1	9q34.1	FGFR1OP	6q27	NRAS	1p13.2	ALKBH2	12q24.11
ABL2	1q24-q25	FGFR2	10q26	NSD1	5q35	ALKBH3	11p11.2
ACSL3	2q36	FGFR3	4p16.3	NTRK1	1q21-q22	APEX1	14q11.2
AF15Q14	15q14	FH	1q42.1	NTRK3	15q25	APEX2	Xp11.23
AF1Q	1q21	FHIT	3p14.2	NUMA1	11q13	APLF	2p14
AF3p21	3p21	FIP1L1	4q12	NUP214	9q34.1	APTX	9p13.3
AF5q31	5q31	FLI1	11q24	NUP98	11p15	ATR	3q23
AKAP9	7q21-q22	FLJ27352	15q21.3	OLIG2	21q22.11	ATRIP	3p24.3-p22.1
AKT1	14q32.32	FLT3	13q12	OMD	9q22.31	CGNH	5q13.3-q14
AKT2	19q13.1-q13.2	FNBP1	9q23	P2RY8	Xp22.3; Yp11.3	CDK7	5q12.1
ALDH2	12q24.2	FOXO2	3q23	PAFAH1B2	11q23	CETN2	Xq28
ALK	2p23	FOXO1	13q14.1	PALB2	16p12.1	CHAF1A	19p13.3
ALO17	17q25.3	FOXO3A	6q21	PAX3	2q35	CHEK1	11q24.2
APC	5q21	FOXP1	3p14.1	PAX5	9p13	CLK2	1q21
ARHGEF12	11q23.3	FSTL3	19p13	PAX7	1p36.2-p36.12	DCLRE1A	10q25.1
ARHH	4p13	FUS	16p11.2	PAX8	2q12-q14	DCLRE1B	1p11.1
ARID1A	1p35.3	FVT1	18q21.3	PBRM1	3p21	DCLRE1C	10p13
ARNT	1q21	GAS7	17p	PBX1	1q23	DDB1	11q12-q13
ASPSOR1	17q25	GATA1	Xp11.23	PCM1	8p22-p21.3	DMC1	22q13.1
ASXL1	20q11.1	GATA2	3q21.3	PCSK7	11q23.3	DUT	15q21.1
ATF1	12q13	GATA3	10p15	PDE4DIP	1q12	EME1	17q21.33
ATIC	2q35	GMPS	3q24	PDGFB	22q12.3-q13.1	EME2	16p13.3
ATM	11q22.3	GNA11	19p13.3	PDGFRA	4q11-q13	ERCC1	19q13.32
ATRX	Xq21.1	GNAQ	9q21	PDGFRB	5q31-q32	ERCC6	10q11
BAP1	3p21.31-p21.2	GNAS	20q13.2	PER1	17p13.1-17p12	ERCC8	5q12.1
BCL10	1p22	GOLGA5	14q	PHOX2B	4p12	EXO1	1q42-q43
BCL11A	2p13	GOPC	6q21	PICALM	11q14	FAN1	15q13.2-q13.3
BCL11B	14q32.1	GPC3	Xq26.1	PIK3CA	3q26.3	FANCB	Xp22.2
BCL2	18q21.3	GPHN	14q24	PIK3R1	5q13.1	FANCI	15q26.1
BCL3	19q13	GRAF	5q31	PIM1	6p21.2	FANCL	2p16.1
BCL6	3q27	HCFC1	Xq28	PLAG1	8q12	FANCM	14q21.3
BCL7A	12q24.1	HCMOGT-1	17p11.2	PML	15q22	FEN1	11q12
BCL9	1q21	HEAB	11q12	PMS1	2q31-q33	GEN1	2p24.2
BCR	22q11.21	HERPUD1	16q12.2-q13	PMS2	7p22	GTF2H1	11p15.1-p14
BHD	17p11.2	HIP1	7q11.23	PMX1	1q24	GTF2H2	5q13.2
BIRC3	11q22-q23	HIST1H4I	6p21.3	PNUTL1	22q11.2	GTF2H3	12q24.31
BLM	15q26.1	HLF	17q22	POU2AF1	11q23.1	GTF2H4	6p21.3
BMPR1A	10q22.3	HLXB9	7q36	POU5F1	6p21.33	GTF2H5	6q25.3
BRAF	7q34	HMGA1	6p21	PPARG	3p25	H2AFX	11q23.3
BRCA1	17q21	HMGA2	12q15	PPP2R1A	19q13.41	HELQ	4q21.23
BRCA2	13q12	HNRNPA2B1	7p15	PRCC	1q21.1	HLTF	3q25.1-q26.1
BRD3	9q34	HOOK3	8p11.21	PRDM1	6q21	HUS1	7p13-p12
BRD4	19p13.1	HOXA11	7p15-p14.2	PRDM14	8q13.3	LIG1	19q13.2-q13.3
BRIP1	17q22	HOXA13	7p15-p14.2	PRDM16	1p36.23-p33	LIG3	17q11.2-q12
BTG1	12q22	HOXA9	7p15-p14.2	PRF1	10q22	LIG4	13q33-q34
BUB1B	15q15	HOXC11	12q13.3	PRKAR1A	17q23-q24	MAD2L2	1p36
C15orf21	15q21.1	HOXC13	12q13.3	PRO1073	11q31.1	MBD4	3q21.3
C15orf55	15q14	HOXD11	2q31-q32	PSIP2	9p22.2	MDC1	6p21.3
C16orf75	16p13.13	HOXD13	2q31-q32	PTBP1	19p13.3	MGMT	10q26
CANT1	17q25	HRAS	11p15.5	PTCH	9q22.3	MLH3	14q24.3

表 2.ゲノム品質指標 class1、class2 遺伝子リスト (抜粋) (続き)

CARD11	7p22	HRPT2	1q21-q31	PTEN	10q23.3	MMS19	10q24-q25
CARS	11p15.5	HSPCA	14q32.31	PTPN11	12q24.1	MNAT1	14q23
CBFA2T1	8q22	HSPCB	6p12	RAB5EP	17p13	MPG	16p13.3
CBFA2T3	16q24	IDH1	2q33.3	RAD51L1	14q23-q24.2	MRE11A	11q21
CBFB	16q22	IDH2	15q26.1	RAF1	3p25	MSH3	5q11-q12
CBL	11q23.3	IKZF1	7p12.2	RALGDS	9q34.3	MSH4	1p31
CBLB	3q13.11	IL2	4q26-q27	RANBP17	5q34	MSH5	6p21.3
CBLC	19q13.2	IL21R	16p11	RAP1GDS1	4q21-q25	MUS81	11q13
CCNB1IP1	14q11.2	IL6ST	5q11	RARA	17q12	NBN	8q21-q24
CCND1	11q13	IRF4	6p25-p23	RB1	13q14	NEIL1	15q33.33
CCND2	12p13	IRTA1	1q21	RBM15	1p13	NEIL2	8p23.1
CCND3	6p21	ITK	5q31-q32	RECQL4	8q24.3	NEIL3	4q34
CD273	9p24.2	IWS1	2q14.3	REL	2p13-p12	NHEJ1	2q35
CD274	9p24	JAK1	1p32.3-p31.3	RET	10q11.2	NTHL1	16p13.3
CD74	5q32	JAK2	9p24	ROS1	6q22	NUDT1	7p22
CD79A	19q13.2	JAK3	19p13.1	RPL22	1p36.31	OGG1	3p26
CD79B	17q23	JAZF1	7p15.2-p15.1	RPN1	3q21.3-q25.2	PARP1	1q41-q42
CDH1	16q22.1	JUN	1p32-p31	RRP12	10q24.2	PARP2	14q11.2-q12
CDH11	16q22.1	KDM5A	12p11	RTF1	15q14	PARP3	3p22.2-p21.1
CDK4	12q14	KDM5C	Xp11.22-p11.2	RUNDC2A	16p13.13	PCNA	20pter-p12
CDK6	7q21-q22	KDM6A	Xp11.2	RUNX1	21q22.3	PNKP	19q13.3-q13.4
CDKN2A -p16	9p21	KDR	4q11-q12	RUNXBP2	8p11	POLB	8p12-p11
CDKN2C	1p32	KIAA1549	7q34	SALL4	20q13.2	POLD1	19q13.3
CDX2	13q12.3	KIT	4q12	SBDS	7q11	POLE	12q24.3
CEBPA	19q13.1	KLK2	19q13.41	SDH5	11q12.2	POLG	15q24
CEP1	9q33	KRAS	12p12.1	SDHB	1p36.1-p35	POLH	6p21
CHCHD7	8q11.2	KTN1	14q22.1	SDHC	1q21	POLI	18q21.1
CHEK2	22q12.1	LAF4	2q11.2-q12	SDHD	11q23	POLK	5q13
CHIC2	4q11-q12	LASP1	17q11-q21.3	41523	Xq24	POLL	10q23
CHN1	2q31-q32.1	LCK	1p35-p34.3	SET	9q34	POLM	7p13
CIC	19q13.2	LCP1	13q14.1-q14.3	SETD2	3p21.31	POLN	4p16.3
CIITA	16p13	LCX	10q21	SFPQ	1p34.3	POLQ	3q13.3
CLTC	17q11-qter	LHFP	13q12	SFRS3	6p21	PRKDC	8q11
CLTCL1	22q11.21	LIFR	5p13-p12	SH3GL1	19p13.3	PRPF19	11q12.2
CMKOR1	2q37.3	LMO1	11p15	SIL	1p32	RAD1	5p13
COL1A1	17q21.31-q22	LMO2	11p13	SLC45A3	1q32	RAD17	5q13
COPEB	10p15	LPP	3q28	SMARCA4	19p13.2	RAD18	3p25-p24
COX6C	8q22-q23	LYL1	19p13.2-p13.1	SMARCB1	22q11	RAD23A	19p13.2
CPSF3	2p25.1	MADH4	18q21.1	SMO	7q31-q32	RAD23B	9q31.2
CREB1	2q34	MAF	16q22-q23	SOCS1	16p13.13	RAD50	5q23-q31
CREB3L1	11p11.2	MAFB	20q11.2-q13.1	SOX2	3q26.3-q27	RAD51	15q15.1
CREB3L2	7q34	MALT1	18q21	SRGAP3	3p25.3	RAD51B	14q23-q24.2
CREBBP	16p13.3	MAML2	11q22-q23	SS18	18q11.2	RAD51C	17q25.1
CRLF2	Xp22.3; Yp11.3	MAP2K4	17p11.2	SS18L1	20q13.3	RAD51D	17q11
CRTC3	15q26.1	MDM2	12q15	SSH3BP1	10p11.2	RAD52	12p13-p12.2
CTNNB1	3p22-p21.3	MDM4	1q32	SSX1	Xp11.23-p11.2	RAD54B	8q22.1
CTR9	11p15.3	MDS2	1p36	SSX2	Xp11.23-p11.2	RAD54L	1p32
CYLD	16q12-q13	MECOM	3q26	SSX4	Xp11.23	RAD9A	11q13.1-q13.2
D10S170	10q21	MECT1	19p13	STAT3	17q21	RBBP8	18q11.2
DAXX	6p21.3	MEN1	11q13	STK11	19p13.3	RDM1	17q11.2
DD2	11p12	MET	7q31	STL	6q23	RECQL	12p12.1

表 2.ゲノム品質指標 class1、class2 遺伝子リスト (抜粋) (続き)

DDIT3	12q13.1-q13.2	MITF	3p14.1	SUFU	10q24.32	RECQL5	17q25
DDX10	11q22-q23	MKL1	22q13	SUZ12	17q11.2	REV3L	6q22
DDX5	17q21	MLF1	3q25.1	SYK	9q22	RNF168	3q29
DDX6	11q23.3	MLH1	3p21.3	TAF15	17q11.1-q11.2	RNF4	4p16.3
DEK	6p23	MLL	11q23	TAL1	1p32	RNF8	6p21.3
DICER1	14q32.13	MLL2	12q12-q14	TAL2	9q31	RPA1	17p13.3
DNMT3A	2p23	MLL3	7q36.1	TBX3	12q24.1	RPA2	1p35
DPPA4	3q13.13	MLLT1	19p13.3	TCEA1	8q11.2	RPA3	7
DUX4	4q35	MLLT10	10p12	TCF1	12q24.2	RPA4	Xq21
EBF1	5q34	MLLT2	4q21	TCF12	15q21	RRM2B	8q23.1
EED	11q14.2-q22.3	MLLT3	9p22	TCF3	19p13.3	SETMAR	3p26.2
EGFR	7p12.3-p12.1	MLLT4	6q27	TCL1A	14q32.1	SHFM1	7q21.3
EIF4A2	3q27.3	MLLT6	17q21	TCL6	14q32.1	SHPRH	6q24.2
ELF4	Xq26	MLLT7	Xq13.1	TET2	4q24	SMUG1	12q13.11-q13.3
ELK4	1q32	MN1	22q13	TFE3	Xp11.22	SPO11	20q13.31
ELKS	12p13.3	MPL	p34	TFEB	6p21	TDG	12q24.1
ELL	19p13.1	MSF	17q25	TFG	3q11-q12	TDP1	14q32.11
ELN	7q11.23	MSH2	2p22-p21	TFPT	19q13	TDP2	6p22.3-p22.1
EML4	2p21	MSH6	2p16	TFRC	3q29	TOPBP1	3q22.1
EP300	22q13	MSI2	17q23.2	THRAP3	1p34.3	TP53BP1	15q15-q21
EPS15	1p32	MSN	Xq11.2-q12	TIF1	7q32-q34	TREX1	3p21.31
ERAS	Xpter-q26	MTCP1	Xq28	TLX1	10q24	TREX2	Xq28
ERBB2	17q21.1	MUC1	1q21	TLX3	5q35.1	UBE2A	Xq24
ERCC2	19q13.2-q13.3	MUTYH	1p34.3-1p32.1	TMPRSS2	21q22.3	UBE2B	5q31.1
ERCC3	2q21	MYB	6q22-23	TNFAIP3	6q23	UBE2N	12q22
ERCC4	16p13.3-p13.13	MYC	8q24.12-q24.13	TNFRSF14	1p36.32	UBE2V2	8q11.21
ERCC5	13q33	MYCL1	1p34.3	TNFRSF17	16p13.1	UNG	12q23-q24.1
ERG	21q22.3	MYCN	2p24.1	TNFRSF6	10q24.1	UVSSA	4p16.3
ESRRB	14q24.3	MYD88	3p22	TOP1	20q12-q13.1	XAB2	19p13.3
ETV1	7p22	MYH11	16p13.13-p13.1	TP53	17p13	XRCC1	19q13.2
ETV4	17q21	MYH9	22q13.1	TPM3	1q22-q23	XRCC2	7q36
ETV5	3q28	MYST4	10q22	TPM4	19p13.1	XRCC3	14q32.3
ETV6	12p13	NACA	12q23-q24.1	TPR	1q25	XRCC4	5q14.2
EWSR1	22q12	NANOG	12p13.31	TRIM27	6p22	XRCC5	2q35
EXT1	8q24.11-q24.13	NBS1	8q21	TRIM33	1p13	XRCC6	22q13.2
EXT2	11p12-p11	NCOA1	2p23	TRIP11	14q31-q32	SLX4	16p13.3
EZH2	7q35-q36	NCOA2	8q13.1	TSC1	9q34	C1orf86	1p36.33
FACL6	5q31	NCOA4	10q11.2	TSC2	16p13.3	C19orf40	19q13.11
FANCA	16q24.3	NF1	17q12	TSHR	14q31	ENDOV	17q25.3
FANCC	9q22.3	NF2	22q12.2	TTL	2q13	SLX1A	16p11.2
FANCD2	3p26	NFE2L2	2q31	UBE2M	19q13.43	SLX1B	16p11.2
FANCE	6p21-p22	NFIB	9p24.1	USP6	17p13	REV1	2q11.1-q11.2
FANCF	11p15	NFKB2	10q24	VHL	3p25	SPRTN	14q21.2-q43
FANCG	9p13	NIN	14q24	WAS	Xp11.23-p11.2	NABP2	12q13.3
FBXW7	4q31.3	NKX2-1	14q13	WDR5	9q34	PMS2P3	7q11.23
FCGR2B	1q23	NONO	Xq13.1	WHSC1	4p16.3	MPLKIP	7p14
FEV	2q36	NOTCH1	9q34.3	WHSC1L1	8p12		
FGFR1	8p11.2-p11.1	NOTCH2	1p13-p11	WIF1	12q14.3		
NR4A3	9q22	NPM1	5q35	WRN	8p12-p11.2		

ヒトES細胞の品質評価指標の統合解析と多次元情報データベース構築

ヒト ES 細胞の幹細胞特性、分化指向性及び造腫瘍性リスク等を評価する為に多次元の分子生物学的情報を取得する解析ワークフローをプロジェクトチーム内で構築した。具体的には上述の【国産ヒト ES 細胞株 (KhES) の標準サンプル調製】で京都大学から供給した国産ヒト ES 細胞 (KhES 細胞) 株や国際株 (H1 株) の解析用サンプル (継代初期、継代後期、分化誘導) を用いて、G バンディングや M-FISH を用いた核型解析 (京都大学)、マイクロアレイを用いた SNP/LOH/CNV 解析 (タカラ)、カスタムデザインを行ったエクソンキャプチャー法と次世代シーケンシングによるエクソーム解析 (タカラ)、MeDIP-マイクロアレイ法による DNA メチル化解析 (ジェネティン)、ChIP-seq によるヒストン修飾解析 (理研)、マイクロアレイによる mRNA 発現解析 (タカラ)、GC-MS によるメタボローム解析 (島津)、Blotglyco と MALDI-TOF 及び LC-MS を用いた糖鎖解析 (住友ベークライト)、を併せて進めた。

ゲノム・エピゲノム・発現解析

Cell line	Condition	Karyotype	SNP/LOH/CNV	Target exon sequence	DNA methylation	Histone modification	mRNA expression
KhES1	Early	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Late	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Diff		✓	✓	✓		✓
	Sphere	✓			✓	✓	
	Sphere middle						
KhES3	Early	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Late	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Diff		✓	✓	✓	✓	✓
	Sphere	✓					
	Sphere middle						
KhES4	Early	✓	✓		✓		✓
	Late	✓	✓		✓		✓
	Diff		✓		✓		✓
H1	Early	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Late	✓	✓	✓	✓		✓
	Diff	✓	✓	✓	✓	✓	✓

(京大)

(京大)

(Takara)

(Takara)

(ジェネティン)

(理研)

(Takara)

リスク遺伝子 class 1~5 + X 統合解析
(京大)

+

・メタボローム、糖鎖解析
(島津、住友)
・分化指向性評価
(東大、慶應大、千葉大、医薬基盤研)

計測機器、試薬開発、キット化 + 品質評価パイプライン構築

表 3. ヒト ES 細胞の品質評価指標の統合解析 (チェックマークは完了、空欄は解析中)

これら解析により得られた各種 1 次データ (生データ) を細胞株また培養条件により整理、統合して SQL データベースに収録し、上述の【ヒト ES 細胞の品質評価指標の選定】に設定した品質評価指標の各クラスの遺伝子群についてゲノム、エピゲノム、遺伝子発現等の変異/変化の有無を評価解析する為のワークフロー (オープンソースである Linux/Fedora、CentOS 及び Awk、Perl、リレーショナルデータベース SQLite、統計解析環境 R、WebDav プロトコール等を使用) の構築を進めた。

これら解析パイプラインを用いて、ゲノム変異を生じやすい事が既に明らかになっている KhES-4 株では長期培養により確実に異常細胞の出現を捉える事が出来る事、また海外由来の H1 株では分化誘導に伴ってゲノム異常が観察される場合がある事などが明らかとなった。一方、KhES-1、3 株は現在最も信頼性の高い熟練した培養技術者によるディッシュ培養法 (上記【国産ヒト ES 細胞株 (KhES) の標準サンプル調製】) では大きなリスク要因と判定される異常は検出されない事が明らかとなった。

そこで KhES-1、3 株を用いて本事業項目 1「ヒト ES 細胞の安定な培養・保存技術の開発」で用いる新規培養システムであるスフェア培養を行ったサンプルについてゲノム、エピゲノム解析を開始した。スフェア培養についてはまず通常のディッシュ培養と同程度の小規模の培養継代を行ったサンプルおよび培養液数百ミリリットルの中規模スケールで調製を行った細胞サンプルの核型、ゲノム解析データを取得して培養装置開発チームに評価結果のフィードバックを開始した。

また事業項目 2.2「ヒト ES 細胞の効率的で再現性の良い分化誘導法を用いた多分化能および分化指向性の評価」の各種体細胞への分化誘導に対する指向性、応答性の表現型データ（メタデータ）については、各細胞系譜で機能的に重要で有る事が知られている遺伝子群（上記 class5）を中心にそれぞれのヒト ES 細胞株の幹細胞の状態でのゲノム、エピゲノム、mRNA 発現データ等と比較、解析する為のパイプライン構築を進めた。

これらヒト ES 細胞の品質評価指標となる多次元情報は、まず（1）マスターセルバンクの細胞について情報をデータベース化すると共にキーインデックスを中心とした評価結果のサマリーを作成し、（2）大量培養システム等を用いて調製した実際の細胞リソースについて各ロット毎に経時的にデータを取得して保存し、（3）開発した培養システムのユーザーサイドが品質管理モニタリングを実施して簡便に解析可能な形式でデータ表示を行う必要が有る。これらヒト ES 細胞の培養システムの品質モニタリング項目として取得する多次元情報（material data）の保存、解析、表示の為のデータベース設計の検討を現在進めている。

京都大学（物質-細胞統合システム拠点）

研究開発項目の概要（目的意義など）

研究開発項目「①ヒト ES 細胞の安定な培養・保存技術の開発」で得られるヒト ES 細胞の安全性並びに有用性（分化能）を評価する基盤技術を開発する。

本研究開発ではこれまでに、科学・技術経営及び産業論的見地から、技術標準化の現状を観察し、課題を整理のうえ、ヒト ES 細胞の技術標準化コンセプトを再考した。さらに、我が国におけるかかる標準化の取り組みがどうあるべきか、その推進体制を検討した。

研究開発項目の成果

(1) ヒト ES 細胞の技術標準化コンセプトの再考

標準化のフレームワークを考案するにあたっては、多様な技術機会や応用範囲を網羅し、標準化の対象やアプローチを考慮する必要がある。本研究開発では、技術経営学の知見との整合性、及び多様な技術機会に対する汎用性の観点から、技術標準化の戦略的フレームワークを提案した（表 1）。

表 1. ヒト幹細胞技術標準化の戦略フレームワーク

標準化のアプローチ/ 標準化の対象	デファクト標準	コンセンサス標準	デジュリ標準
質的標準	最終製品/サービス	製品/サービスの主要コンポーネント (ヒト幹細胞株等)	規制(GMP、安全性等) 安全性・有効性ガイドライン等
垂直互換性標準	最高品質を保証するプロセス技術	要求品質を確保するためのプロセス 技術	規制・ガイドライン等を満足するための プロセス技術
水平互換性標準	最高品質を保証する評価技術	要求品質を確保するための評価技 術	規制・ガイドライン等を満足するための 評価技術

出典：論文 No.5

そのうえで、コア・コンポーネント技術（ヒト ES 細部株）、プロセス技術、評価技術の 3 点について、技術標準化の方向性を下記の通り検証した。

(a) コア・コンポーネント技術（ヒト ES 細胞株）

以下の各点を確認した。

ヒト ES 細胞株に関しては、国際フォーラムによるコンセンサス標準の形成が進められている。

- 例：ISCI (International Stem Cell Initiative)：幹細胞研究の基盤整備、ヒト ES 細胞の基礎研究と応用の信頼性向上を念頭に、ヒト ES 細胞株として満たすべき特徴や基準について検討
- 例：ISCBI (International Stem Cell Banking Initiative)：ヒト ES 細胞株のバンキング機能に備えて、ヒト ES 細胞株の質的標準における最小標準の設定、世界の異なる機関で作出される細胞株のデータを比較するための基準の策定、ヒト ES 細胞株やマテリアルを国際的に技術移転するための体制やガイドラインの構築

とりわけ、米国ウィスコンシン大学とその関連機関が樹立・分配した 3 株のデファクト標準化が進行している。かかる成功要因として、下記の要因を仮説的に提起する。

- デファクト標準の形成努力（積極的な細胞株の分配等を通じた、いわゆるオープン・ソース戦略の奏功）
- コンセンサス標準への対応努力（ISCI/ISCBI への参画）
- デジュリ的標準への対応努力（脊髄損傷患者の治療を目的とした臨床試験への提供）

しかしながら、ヒト ES 細胞株の利活用に伴う最大の課題は、いわゆる倫理問題への対応であり、割球からヒト ES 細胞を樹立する（すなわち、胚全体を破壊しない）等の新手法で樹立されたヒト ES 細胞株による代替可能性も否定できない。

(b) プロセス技術と標準

プロセス技術とは、R&D プロセス上の半製品或いは製品間を繋ぐ一連の技術を意味する。各々の最終製品／サービスにとってヒト幹細胞種の選択肢が複数あることを考慮すれば、優れたプロセス技術の開発は、垂直互換性標準の形成に貢献すると考えられる。

(c) 評価技術と標準

ヒト多能性細胞の品質評価は、異なる幹細胞株間幹細胞種間、また異なる由来或いは方法で誘導された分化細胞の品質や特性を検定するうえで必須であり、その評価項目や評価手法は水平互換性標準の形成に直結すると考えられる。

(2) 国際標準化に向けた国内推進体制の検討

去る 2011 年 10 月に、国際標準化機構(ISO)中央事務局主催のワークショップにて今後の規範となるバイオテクノロジーの新 TC 立ち上げが ISO 上層委員会に対して勧告され、産業化に向けて米国及び英国が新 TC 参画を表明した。そのことを受け、独国が ISO/TMB に対して、幹事国と議長を請け負う前提で、新 TC の設立を正式提案し（2012 年 7 月 19 日）、TSO/TMB が 3 ヶ月間の期限付きで告知した（同 25 日）。結果、新 TC の最優先課題として語彙の標準化が、2 年以内を目標期限として明記された。

この流れを受け、NEDO 委託事業「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発／ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発／研究開発項目② ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発／②-1 ヒト iPS 細胞に係る技術等の標準化案の策定」に係る幹細胞評価基盤技術研究組合の分担研究として、一般財団法人バイオインダストリー協会（JBA）で行っている「幹細胞技術の用語と定義に関する国際規格（案）の作成」に関する委員会が設置され、委員として参画した。尚、本委員会の検討範囲は、ヒト幹細胞種全般に及んでおり、ヒト ES 細胞もその内に含まれる。

本検討等を通じて、標準化形成のステークホルダと、標準化推進のコンセンサス形成体の組織体制を仮説的に提示した（図 1）。

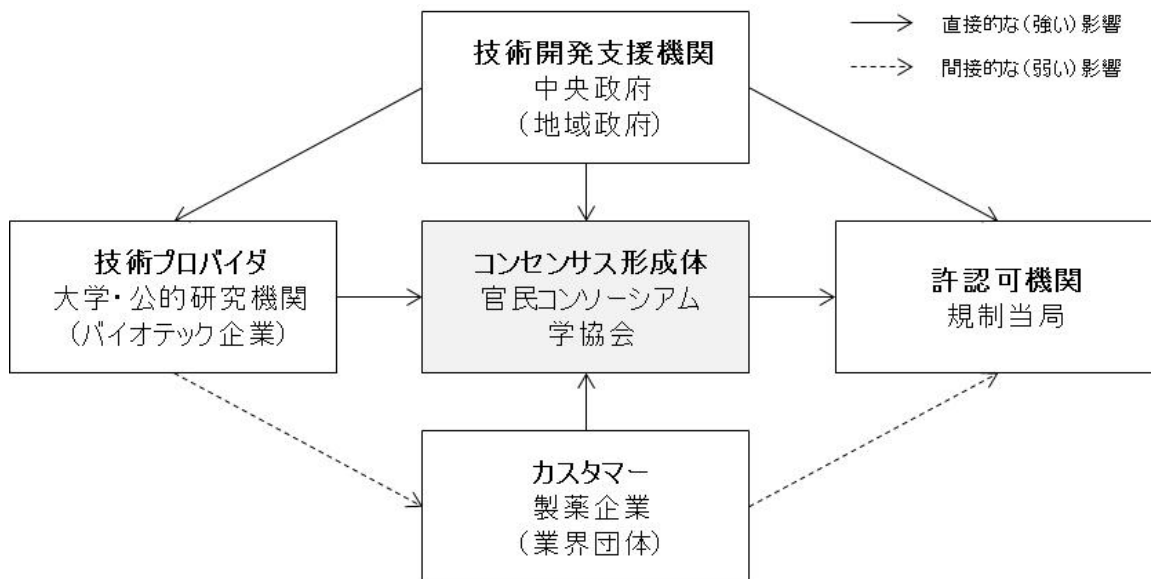


図 1. 標準化形成のステークホルダーとコンセンサス形成体（出典：論文 No.5）

2.2.1 ヒト ES 細胞の分子生物学的情報の取得および解析技術・検定キットの開発

国際的検討枠組み（ISCI、ISSCR 等）との連携のもと、既知の遺伝学的・生物学的情報を最大限に活用し、複数の異なるヒト ES 細胞株を対象に、核型、ゲノム、エピゲノム、遺伝子発現、プロテオミクス、糖鎖およびメタボロミクス等の分子生物学的情報の中から、予め限定した分析指標の網羅的な取得を行う。また、有用な分子生物学的情報の簡便な取得を可能とする検定試薬キットの開発を行なう。

住友ベークライト

研究開発の内容及び成果等

■幹細胞の品質評価における糖鎖解析の意義

細胞表面に存在するほとんど全ての膜タンパク質は糖鎖修飾を受けている。細胞表面の糖鎖は細胞の分化、癌化において糖鎖構造や糖鎖プロファイルの変化が見られることから、糖鎖は「細胞の顔」にしばしば例えられ、発生段階や環境の変化によりその構造が著しく変化することが古くから知られている。したがって、幹細胞の「品質」と糖鎖構造には関係があると予想される。

これまでに、Lebrilla らはヒト ES 細胞および各種培養細胞の膜糖タンパク質糖鎖を MALDI-TOF MS および LC/MS を用いて解析した結果、ES 細胞において高マンノース型糖鎖が主要糖鎖であり、通常の体細胞では複合型/混成型糖鎖が主であることを報告した。高マンノース型糖鎖は ES 細胞において cellular binding や recognition に重要な役割を果たしていると考え、表面糖鎖の違いを利用して ES 細胞と他の細胞を識別する方法の開発可能性について述べている（参考文献 1）。また、Wearne ら、Satomaa ら、Amano らはそれぞれ、ES 細胞の N 型糖鎖プロファイルが分化誘導によりドラステイックに変化する、言い換えると、糖鎖プロファイリングにより分化ステージを定義することが可能であると述べている（参考文献 2～4）。

本研究開発では、ヒト幹細胞の産業利用促進に向けた品質の管理されたヒト幹細胞を安定的に大量供給する技術開発の一環として、細胞の状態変化を最も鋭敏に反映する生化学的な指標の一つである糖鎖に着目し、ヒト幹細胞の品質評価の指標として糖鎖を用いることが可能か検討を行う。

(1)ヒト幹細胞糖鎖解析システムの開発

① 定量性の高いヒト幹細胞糖鎖解析法の開発

糖鎖は枝分かれ構造や立体異性の違いに基づく複雑な構造を持ち、構造的な不均一性を有するため、糖鎖の解析手法は時間と手間のかかるものであった。例えば、古典的な手法であるゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いた場合、糖タンパク質からの糖鎖精製とラベル化に数日～2週間を要し、さらに熟練作業員でないと再現性が得られにくいといった難点があった。住友ベークライトが開発し、販売している「糖鎖精製キット BlotGlyco®」は、糖鎖と固相ビーズの選択的結合に基づいて迅速かつ高精度に糖鎖を精製可能な手法である（図1および参考文献5）。我々はこの手法を用いて幹細胞の糖鎖をハイスループットに精製・ラベル化し、品質評価指標となりえる糖鎖の探索を試みた。

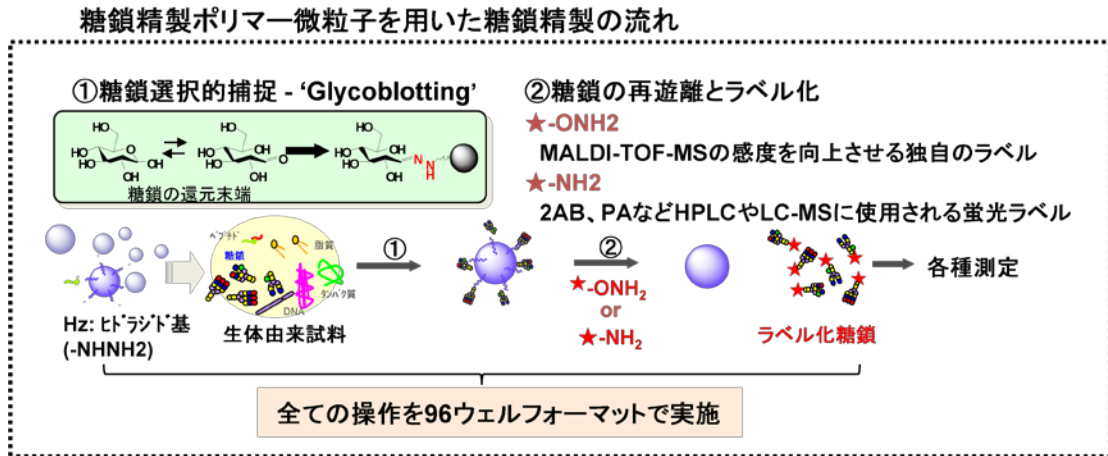


図1 糖鎖精製キット BlotGlyco®の概念図

糖鎖分析の手段としては、HPLC、NMR、質量分析など種々の方法が用いられている。我々は当初、迅速性の観点から MALDI-TOF MS を用いて分析を行ったが、MALDI-TOF MS よりも定量性に優れた LC-MS を用いることで、定量性の高い糖鎖解析が可能となった。

② 自動精製装置による幹細胞糖鎖解析法の開発

糖鎖解析のスループット向上のため、また、ヒューマンエラーの低減のため糖鎖自動精製装置を導入し、立ち上げを行った。モデル細胞として用いた HeLa 細胞の HPLC を用いた糖鎖解析においては、マニュアルで行った場合と同様の糖鎖ピークパターンが得られている。

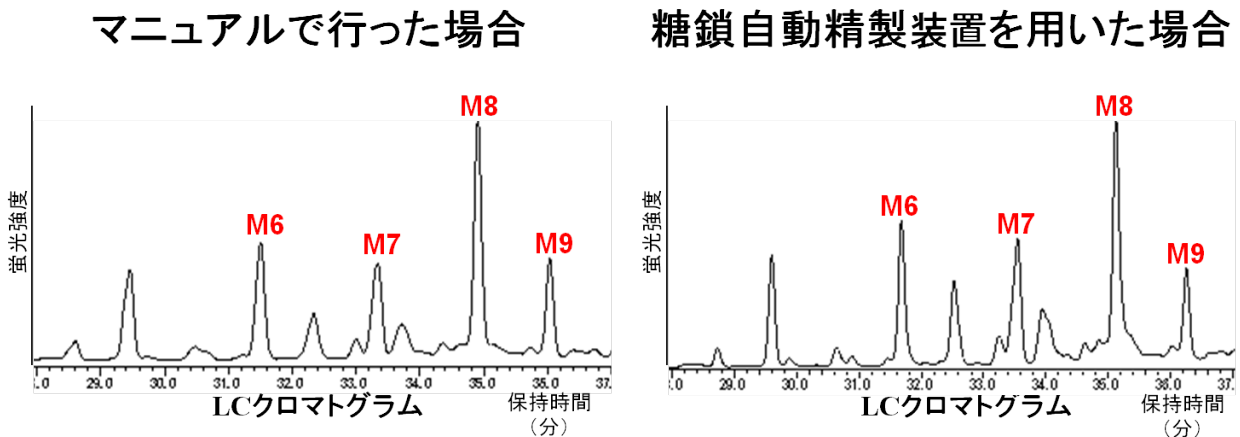


図3. マニュアル操作（左）および自動精製装置（右）で調製した HeLa の N 型糖鎖の HPLC 分析の比較

③ ヒト幹細胞糖鎖精製キットの開発

BlotGlyco®キットをベースに、ヒト幹細胞の特徴的な糖鎖が簡便に精製・解析できるようにキット化した(図4)。本キットを用いることで、ヒト幹細胞の糖鎖を網羅的に精製・ラベル化することが可能である。更に目的に応じて、ヒト幹細胞中に多く含まれる糖鎖を簡便に除去することが可能で、これにより発現量の少ない糖鎖を再現よく分析できるようになった(図5)。



図4. ヒト幹細胞糖鎖精製キットの構成

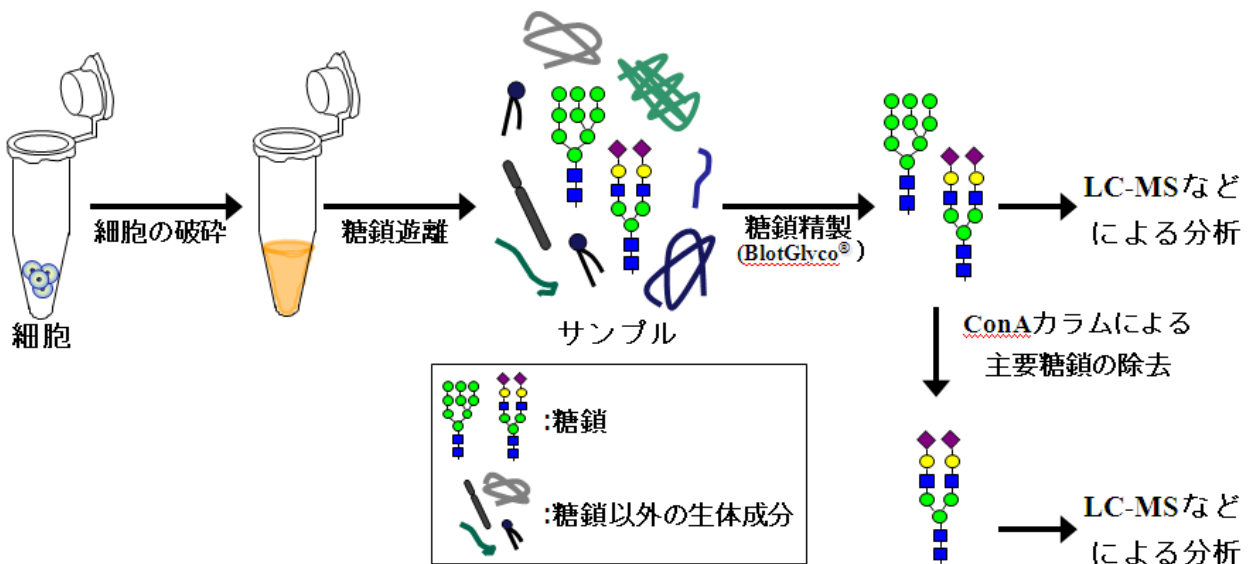


図5. キットを用いたヒト幹細胞糖鎖解析操作の流れ

(2) ヒト幹細胞の品質評価指標の開発

現在ヒト ES 細胞マーカーとして汎用されている抗体は SSEA-3,-4 や Tra1-60, Tra 1-81 など糖鎖を認識するものが多いことから、糖鎖に着目した幹細胞品質管理指標を探索することを目的としている。まず、糖鎖の中でタンパク質のアスパラギン残基に結合している N 型糖鎖に着目して幹細胞品質管理指標を探索した。

① ヒト幹細胞（未分化・分化後）の糖鎖解析

細胞が分化する際に、細胞の表層に存在する糖鎖が変化することは広く知られている。本プロジェクトで用いるヒト ES 細胞に関し、未分化ヒト ES 細胞と分化させたヒト ES 細胞の違いを規定する N 型糖鎖の探索を行った。未分化ヒト ES 細胞およびレチノイン酸で分化させたヒト ES 細胞 (KhES1 株) をホモジナイズ後、N-グリコシダーゼ処理により N 型糖鎖を遊離させ、BlotGlyco®キットを用いて糖鎖を精製・ラベル化した。調製した糖鎖を LC-MS で分析した。さらに、LC-MS のデータ抽出、多変量解析、候補糖鎖の絞り込みまで行った。その結果、未分化 ES 細胞と分化させた ES 細胞の判別に寄与率の高い糖鎖バイオマーカー候補を見出した。これらの結果は、他のヒト ES 細胞 (H1 株) の糖鎖が高マンノース型を主に含む知見 (参考文献 1) と同様な傾向を示した。

② ヒト幹細胞品質評価の為の糖鎖指標の開発

A) 継代回数の違いによる ES 細胞の品質を判別可能な糖鎖指標の探索

未分化ヒト ES 細胞と分化させたヒト ES 細胞 (KhES1) を判別可能な N 型糖鎖の探索において、高マンノース型糖鎖が判別への寄与が高い糖鎖として見出すことができた。同様な手法を用いて、次に、ヒト ES 細胞の継代回数の違い (early, late) による品質を判別可能な N 型糖鎖の探索を試みた。高マンノース型糖鎖に絞って糖鎖プロファイルと比較すると、Early ではマンノースが 5 ~ 7 個の糖鎖が多く、Late ではマンノースが 8 ~ 9 個の糖鎖が多い傾向が見られた (図 9)。

B) ヒト ES 細胞の高マンノース型糖鎖以外の糖鎖の分析

高マンノース型糖鎖以外の糖鎖に着目した分析を可能にする方法を開発した。高マンノース型糖鎖除去を組み合わせた方法を用いて実際のヒト ES 細胞 KhES1 株 (未分化、分化後) の糖鎖を解析した。各 LC クロマトグラムを図 11 で示す。未分化と分化後でそれぞれ異なる糖鎖が増加していることが確認できた。

今後、今回開発した方法を用いてヒト幹細胞の品質評価指標になりうる糖鎖の探索を再生医療分野および創薬支援分野での産業応用に貢献していく。

(参考文献)

1. An HJ, Gip P, Kim J, Wu S, Park KW, McVaugh CT, Schaffer DV, Bertozzi CR, Lebrilla CB. 'Extensive Determination of Glycan Heterogeneity Reveals an Unusual Abundance of High-Mannose Glycans in Enriched Plasma Membranes of Human Embryonic Stem Cell' Molecular & Cellular Proteomics 2012 Jan 27 (ePub ahead of print)
2. Wearne AK, Winter CH, O'Shea K, Goldstein JI. 'Use of lectins for probing differentiated human embryonic stem cells for carbohydrates.' Glycobiology, 16, 981-990, (2006)
3. Satomaa T, Heiskanen A, Mikkola M, Olsson C, Blomqvist M, Tiittanen M, Jaatinen T, Aitio O, Olonen A, Helin J, Hiltunen J, Natunen J, Tuuri T, Otonkoski T, Saarinen J, Laine J. 'The N-glycome of human embryonic stem cells.'

BMC Cell Biology 10:42 (2009)

4. Amano M, Yamaguchi M, Takegawa Y, Yamashita T, Terashima M, Furukawa J, Miura Y, Shinohara Y, Iwasaki N, Minami A, Nishimura S.

‘Threshold in stage-specific embryonic glycotypes uncovered by a full portrait of dynamic N-glycan expression during cell differentiation.’

Molecular and Cellular Proteomics 9(3) pp.523-37 (2010)

5. Furukawa J, Shinohara Y, Kuramoto H, Miura Y, Shimaoka H, Kurogochi M, Nakano M, Nishimura S.

‘Comprehensive approach to structural and functional glycomics based on chemoselective glycoblotting and sequential tag conversion.’

Analytical Chemistry 80(4) pp.1094-1101 (2008)

6. Fujitani N, Furukawa J, Araki K, Fujioka T, Takegawa Y, Piao J, Nishioka T, Tamura T, Nikaido T, Ito M, Nakamura Y, Shinohara Y.

‘Total cellular glycomics allows characterizing cells and streamlining the discovery process for cellular biomarkers.’

Proc Natl Acad Sci U S A. 110(6) pp.2105-2110 (2013)

島津製作所

ヒトES細胞のメタボローム情報取得

メタボローム解析技術は幹細胞にも適用されはじめており、ES細胞に特徴的な代謝産物なども報告されてきている。上記既報のES細胞に特徴的な代謝産物を、質量分析法により簡便かつ定量的に解析する技術開発を行なう。平成22年度補正事業では、GC-MSおよびLC-MSによるヒトES細胞に特徴的な代謝産物を解析する技術開発に着手した。また、GC-MS分析に適したヒトES細胞からのサンプル調製方法についても検討を開始した。平成22年補正事業では2種のヒトES細胞株と分化誘導細胞株の総脂質中の脂肪酸分析を実施し、既報の論文と同様にリノール酸、リノレン酸、エイコサペンタエン酸などの多価不飽和脂肪酸がES細胞で強く検出されることを確認した。平成24年度は、平成22年度補正事業で確立した評価方法を用い、複数のヒトES細胞株に対して、ES細胞に特徴的な代謝産物を解析した。また、質量分析による脂質の分子種同定を行なうための解析技術の検討を行った。

タカラバイオ

幹細胞関連発現遺伝子の発現プロファイルの簡便な評価キット構築

幹細胞関連発現遺伝子の発現プロファイルを簡便に評価するリアルタイムPCR系のキット構築を行った。幹細胞関連発現遺伝子は、ISCIの文献情報(International Stem Cell Initiative, et.al., Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. Nat Biotechnol. 2007 Jul;25(7):803-16.)を参考に、幹細胞関連発現遺伝子を選定した。

プライマーセットの構築については、タカラバイオバイオがすでに運用しているリアルタイムPCR用プライマー設計システムを用いて行い、Human Reference total RNAを材料とし、非特異的な増幅が確認されないかなど実サンプルを用いた検証を行い、一定の基準を満たすプライマーセットをその候補とした。

リアルタイムRT-PCRで得られたearly/differentiationの発現比率とマイクロアレイで得られたearly/differentiationの発現比率、すなわち解析原理が異なる2種の方法で得られた発現比率は高い相関を示していた。

この成果をもとに、当社のリアルタイムRT-PCR試薬を用いて、幹細胞の遺伝子発現の特徴を検証するための試薬キット（プライマーセット）として製品化し、2012年10月1日に発売することで本目的を達成した。

本製品は、1枚の96穴プレートに幹細胞の多分化能と自己増幅能に関連する88種類の遺伝子と8種類の標準（ハウスキーピング）遺伝子のプライマーが搭載されたものである。

がん遺伝子関連Exome解析によるがん化リスク評価指標候補の開発

ES細胞など幹細胞の作製過程において、培養期間中にゲノムが変異・異常化することが考えられ、細胞機能に異常をきたす可能性がある。そこで、培養期間や細胞株が異なる各ES細胞のがん関連遺伝子群と未分化性維持に関連する遺伝子群のエクソン領域を次世代シーケンサーによるリシーケンスを行い、それらの変異の有無を確認した。

がん関連遺伝子群はFutrealらの文献 (Futreal PA, et al., A census of human cancer genes. Nat Rev Cancer. 2004 Mar;4(3):177-83.)を参考にがん関連遺伝子のデータベースサイトCancer Gene Census (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/>)より候補遺伝子を収集し、それに未分化状態の維持に関連する遺伝子を加え、合計466遺伝子の標的遺伝子群を選定した。

その結果、多くの検体において培養条件におけるがん関連遺伝子の変異の影響が高いものはほとんど確認されなかった。

ゲノムの不安定化に関する遺伝子群として新たにDNA修復に関連する遺伝子の変異を選択し、同様の解析を行うこととした。DNA修復関連遺伝子群は、WoodらのHuman DNA Repair Genes (http://sciencepark.mdanderson.org/labs/wood/dna_repair_genes.html)の遺伝子リストを参考に追加標的遺伝子として147遺伝子を選出し、先に選定した遺伝子群と合わせて濃縮プローブを再設計した。現在キットの作製が完了し、各ES細胞由来のゲノムDNAからシーケンス用ライブラリーを作製中である。

各種の分子生物学的既知指標候補の確認

(3.1) マイクロアレイによる遺伝子発現指標データの取得

クラスタリング解析の結果、未分化細胞株間の遺伝子発現パターンは類似性が高く、スフェア培養や長期培養が未分化ES細胞の遺伝子発現に与える影響は軽微であると考えられ、本手法を用いることで、分化、未分化で変動差のある遺伝子群を選出し、それらの遺伝子を用いてクラスタリング解析を行うことでES細胞株を分類できる解析の系構築は達成された。今後は培養条件、細胞株が異なる検体を多く用いてその精度およびより簡便に評価可能な遺伝子の絞り込みなどを行っていく予定である。

(3.2) ジェノタイピングアレイによる既知指標候補の確認

ES細胞やiPS細胞など幹細胞の作製過程において、培養期間中にゲノムが変異・異常化することが考えられ、細胞機能に異常をきたす可能性がある。そこで、ビーズアレイ Illumina BeadChip HumanOmni2.5-Quad (イルミナ社)ならびに Illumina BeadChip HumanOmni5-Quad (イルミナ社)によるSNP/LOH/CNV解析を、各検体について行い、標準的な培養方法によるゲノム構造変化についての知見を確認した。Table 12に解析に使用した検体を示す。

(3.3) 幹細胞ゲノムのエピジェネティクスプロファイル指標の確認

培養を行ったヒトES細胞株に関してメチル化状態の変化を確認し、培養期間によってメチル化に変化が起きているかどうかの確認を行った。またES細胞をエピジェネティクスの観点から評価を行う際に、マーカーとなり得る領域の探索を行った。

解析の結果、得られたのは上記の1クラスターのみであった。ただし、これらもp-valueとFDRの

値が高いことから有意な差を示すものではないと考えられた。別途、KEGG Pathway 解析では有意に働きがあると認められる Pathway は存在しなかった。同様に初期から後期にかけてメチル化を獲得した遺伝子に関しても解析を行ったが、有意に働いていると考えられる GeneOntology のクラスターと KEGG Pathway は存在しなかった。

b. HumanMethylation450 を用いた DNA メチル化解析

幹細胞ゲノムのエピジェネティクスプロファイル指標の開発において、Methyl-CpG binding domain protein2 (MBD2) に結合したメチル化 DNA をシーケンス解析で確認する手法、既知のメチル化領域を搭載した Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit (イルミナ社) で確認する手法のいずれにおいても培養期間によるメチル化領域の変化はほとんど確認されないことが解った。今後はより操作が簡便である Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit (イルミナ社) を用いて解析を行い、易分化の細胞、難分化の細胞などを材料とし解析を進めることで、ES 細胞として機能するために必要なメチル化領域の候補を絞り込んで行く予定である。

理化学研究所

研究開発項目の概要 (目的意義など)

研究開発項目「①ヒト ES 細胞の安定な培養・保存技術の開発」で得られるヒト ES 細胞の安全性並びに有用性 (分化能) を評価する基盤技術を開発する。その評価指標としては、核型、ゲノム、エピゲノム、遺伝子発現、プロテオミクス、糖鎖およびメタボロミクス等の分子生物学的情報を用いる。特に我々のグループでは、核型、ゲノムや遺伝子発現の情報では判断できないような違いをエピゲノム情報によって評価する基盤技術の作出を目指す。

研究開発項目の成果

ES 細胞の特徴的なエピゲノムクロマチン状態として、転写抑制のマーク (ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化 H3K27me3) と転写活性化のマーク (H3K4me3) が同時に入っているビバレントドメインという状態が存在している。そこで、この 2 つのエピゲノム状態のゲノム全体における分布の解析を、京大で樹立されたヒト ES 細胞株 2 種 KhES-1, KhES-3 と海外の株 H1 を用いて行った。さらに、短期培養と長期培養間あるいは通常の接着培養と浮遊培養間でこれらのエピゲノム状態に違いが生まれるのかを調べるために、それぞれの細胞においてもこの 2 つのヒストンメチル化の解析を進めた。

ジェネティク

<開発目標>

1. 将来のヒト幹細胞品質評価に対応するための進歩したエピジェネティクス自動化システム (ソフトウェア・ハードウェア) を構築する。
2. ヒト幹細胞のエピゲノム解析
 - 2-1: 自動化システムを用いた幹細胞エピゲノム解析法の開発
自動化システムを用いてヒト幹細胞より抽出した DNA についてメチル化 DNA 免疫沈降を行い、得られたサンプルをマイクロアレイによりメチル化解析するエピゲノム解析法を開発する
 - 2-2: 幹細胞品質評価のためのエピゲノム指標の開発
新たに開発した解析法を用いてヒト幹細胞品質評価のための具体的指標を開発する。

<開発成果>

1. H23 及び H24 年度において、将来のヒト幹細胞品質評価に耐える性能を有するソフトウェア及びハードウェア（基板）の開発を行い、これらを搭載した自動化システムを完成した。
- 2-1: H24 年度において、京都大学より提供された 3 種のヒト ES 細胞について、自動化システムを用いて免疫沈降を行い、得られたサンプルにつきマイクロアレイをもちいてメチル化 DNA 及び脱メチル化 DNA 解析を行った。この結果に基づき、ヒト幹細胞の性質を識別する新規な方法を見出し、特許申請を行った。
- 2-2: 今後、確立したエピジェネティクス自動化システム及び新規に開発した解析法を用いてステージの異なる ES 細胞につきエピゲノム解析を行い、品質評価のための具体的指標の絞り込みを行ない、これらの指標による実用的な方法を確立する。

2.2.2 ヒト ES 細胞の効率的で再現性の良い分化誘導法を用いた多分化能および分化指向性の評価

新たに開発した培養技術により増殖させたヒト ES 細胞株が、従来の標準的な培養方法による ES 細胞と同等の多分化能や分化指向性を保持しているかについて、現時点で最も信頼性の高い分化誘導方法を用いることで、ヒト ES 細胞の多分化能と分化指向性の効率的な評価を行う。

2.2.2.1 外胚葉系（神経系細胞）への分化能と分化指向性評価

慶應義塾大学

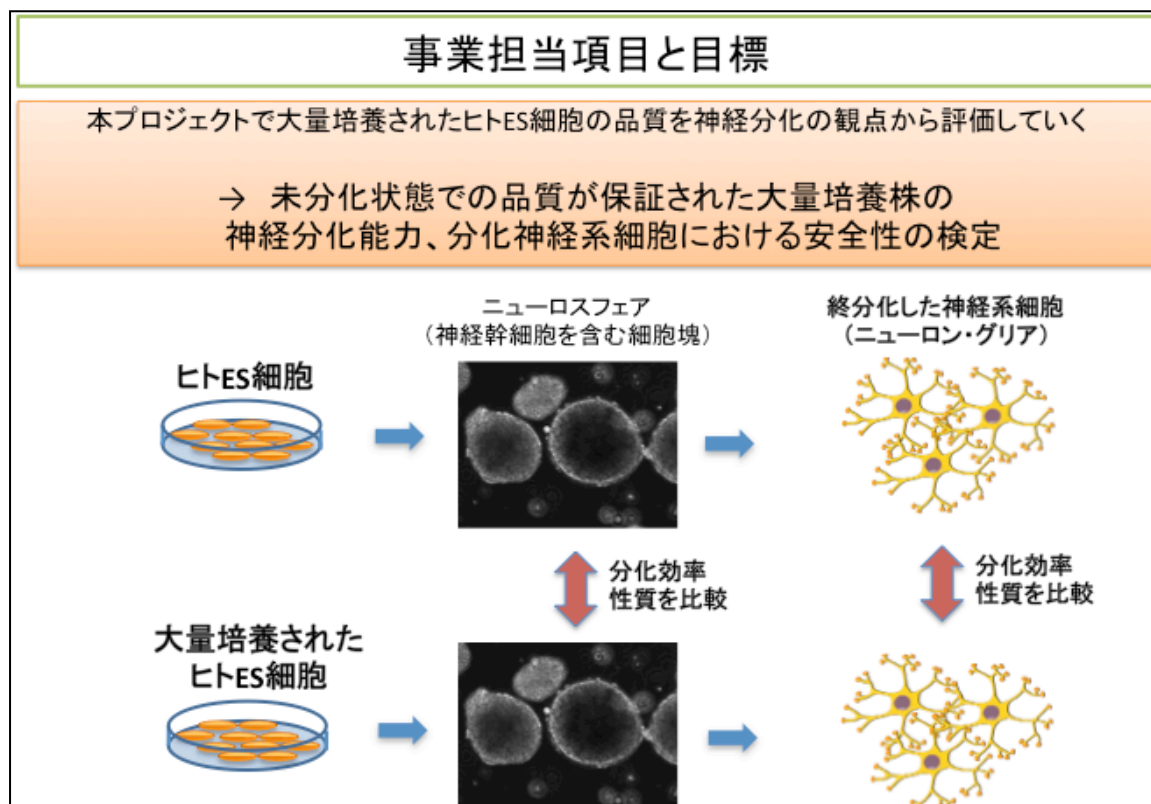


図 1. 事業担当項目 2.2.1 の概要

ヒト ES 細胞と新しい方法で大量培養された同一の細胞株を神経分化誘導させ、その分化効率と分化細胞の性質を比較することにより大量培養法の有効性を保証することが目的である。

本プロジェクトで新たに開発した培養技術により大量に増殖させたヒト ES 細胞株が、従来の標準的な培養方法によって培養した同じヒト ES 細胞株と同等の神経分化能や神経分化指向性を保持して

いるかについて検証する。すなわち、新しい大量培養技術で元の細胞と比べて大きな変化が無いかどうかを神経系への分化に関して検証する。現時点で最も信頼性の高いヒト多能性幹細胞から神経系細胞への分化誘導方法を用いることで、ヒト ES 細胞の多分化能と分化指向性の定量的かつ効率的な評価を行う。

具体的には、まず神経系への分化能と分化指向性の評価システムを確立し、現存するヒト ES 細胞株細胞株の基本的なデータを様々な方法で取得する。次に、大量培養した ES 細胞株において同様のデータを取得し、それらのデータを元のデータと比較しながら評価を行う。神経分化の方法は慶應義塾大学・岡野グループで開発されたニューロスフェア法と呼ばれる神経幹細胞を細胞塊の状態ですべて培養で形成させる方法を用いて分化効率の評価および分化途中あるいは分化細胞についての分子生物学的評価に着手していく。

これまで岡野グループではヒト ES 細胞から神経系の細胞を分化誘導するために、まず ES 細胞から三胚葉成分を全て含む胚葉体と呼ばれる細胞塊を培養して形成し、その胚葉体を単一細胞に分離し、神経幹細胞を誘導する培地で培養することにより、そこからニューロスフェアと呼ばれる細胞塊を形成させてきた。このニューロスフェアは単一の神経幹細胞から形成させる細胞塊で、形成されたニューロスフェア中にも神経幹細胞を多く含んでいる。この方法を岡野グループではヒト ES 細胞の恭順的な神経分化誘導法として用いてきた。この方法は未分化細胞（多能性を有する細胞）の残存が非常に少なく、ヒト ES 細胞および iPS 細胞から誘導した神経幹細胞の移植がマウス脊髄損傷モデルマウスに対して有効であるなど (Takahashi et al. 未発表データ, Nori et al. PNAS 2011)、誘導された細胞の安全性や有効性は極めて高く、再生医療の領域においては重要な方法と位置づけられている。一方でこの方法のデメリットとしては分化誘導に必要な培養期間が 3 ヶ月程度と長期間の培養期間を必要とする点と、神経分化指向性の低い細胞株ではニューロスフェア形成自体が不可能で、神経分化誘導そのものが行われず、それ以降の評価が難しいという点がある。

本プロジェクトではさまざまな細胞株を神経分化して評価していくのがその目標であるが、今まで主に使われていた胚葉体を経由して ES 細胞を神経分化させる方法のみを細胞の評価の方法として用いると、培養期間が極めて長いために、評価のための実験効率が低くなるという問題点があった。また、この方法では評価するヒト ES 細胞株の神経分化能・分化指向性が低いと培養を継続することが極めて困難になるため、最終的な分化細胞（神経系の場合はニューロンもしくはグリア細胞）の機能を評価することが極めて難しい。また、神経系への分化指向性が高い細胞株でも、この胚葉体を経由する方法はニューロスフェアに含まれる神経幹細胞が比較的若い状態で保たれるため、ほとんどの分化細胞がニューロンとなる。すなわち、アストロサイトやオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞に分化可能な成熟した神経幹細胞を得るのが難しく、グリア細胞への分化における品質評価には適していなかった。

そこで、我々が以前から開発しつつあった新しい神経分化誘導法に着目した。この方法はヒト多能性幹細胞を単一細胞に分離し、直接にニューロスフェアの培養条件で浮遊培養を行うことにより、多能性幹細胞から胚葉体を介さずにニューロスフェアを得る培養法である。この方法の第一のメリットは培養操作が極めて簡便で高価な試薬や特殊な培養条件を必要としないため、技術移転がしやすいという点である。培養期間も大幅に短縮され、約 2 週間程度でニューロスフェアが得られる。この方法を用いると、頻度はそれほど高くはないが、グリア細胞（アストロサイト）を生み出す成熟神経幹細胞を得ることができる。一方で、デメリットとしては、胚葉体を介した方法と比べ、多能性を持つ残存未分化細胞が一定の数存在するため、安全性を要求する細胞調製に用いることはできないと考えられている。

我々は本プロジェクトでは、新しい方法を改良しながら 2 つの分化誘導法で各クローンの神経分化能を比較定量し、最終的には評価の目的によって最適な培養法を選択して評価ができるシステムを確立することを念頭に置いた。

表 1. 従来の胚葉体を介する方法方法 (EB 法) と直接法の比較

神経分化の方法	EB法	直接法
	ES→EB(胚葉体) →Neurosphere	ES→Neurosphere
メリット	<ul style="list-style-type: none"> ・未分化細胞の混入が少ない。 ・再生医療(細胞移植)に実績あり。(Nori.et.al PNAS 2011) 	<ul style="list-style-type: none"> ・培養期間が短い(約2週間) ・GFAP陽性Astrocyteがin vitroで誘導可能
デメリット	<ul style="list-style-type: none"> ・培養期間が長い(神経幹細胞を得るために3ヶ月以上必要) ・クローンによっては細胞が増殖せず培養不可能 ・グリア誘導は難しい 	<ul style="list-style-type: none"> ・未分化細胞の混入が多い ・安全性は未検証

それぞれの利点と欠点を示している。再生医療には EB 法が適しているが、直接法ではヒト ES 細胞から神経系の細胞へ迅速に分化誘導可能である。

既存の神経分化誘導方法 (EB法) による神経分化能の評価系の確立

まず、EB 法を用いてヒト ES 細胞京都株(KhES)の 1-3 の神経分化指向性を評価した。ES 細胞の神経分化指向性は、胚葉体を単一細胞に解離した後に形成させる 1 次ニューロスフェアの形成効率で定量を行った。その結果、KhES1,2 では播種した細胞の 1%弱からニューロスフェアを誘導することが可能であったが、KhES3 においてはほとんどニューロスフェアが形成されず、それ以降の評価を行うことが不可能であった(図 2)。

さらに、KhES4,KhES5,海外株である H1,H9 の神経分化誘導能を評価した。H1,H9 は極めて良好に神経分化誘導を行うことができた。KhES4 は核型異常を示しやすいこともあり、正常の神経分化誘導を行うことが極めて難しい印象であった。KhES5 も比較的神経分化誘導効率が低く、KhES2 と KhES3 の中間程度であった。現在統計処理に必要な分化のデータを取得中であるため、定性的な評価となるが、現状では EB 法を用いた 1 次ニューロスフェアの形成効率での神経分化の指向性は下記の順となる。

$$\mathbf{KhES1 = H1 = H9 > KhES2 \gg KhES5 > KhES4 > KhES3}$$

新たに開発した神経分化誘導方法 (直接法) による神経分化能の評価系の確立

我々はすでに開発しつつあった新しい神経分化誘導法 (直接法) の誘導条件を検討し、約 2 週間でニューロスフェアを得るプロトコルの確立に成功した。途中で胚葉体を經由することなく、単一分離したヒト ES 細胞をスタートとしてニューロスフェア形成のための浮遊培養を行うことにより、直接に効率よくニューロスフェアを誘導した。この方法を用いて、KhES1,KhES ヒト ES 細胞からニューロスフェアを誘導し、分化を行ったが、EB 法で得られたニューロスフェアと同様に多くのニューロンが分化誘導された。さらにニューロスフェアを継代培養すると、EB 法で得られたニューロスフェアよりも多くの数の GFAP 陽性アストロサイトを得た。ヒト iPS 細胞を含めて誘導を行った全てのヒト多能性幹細胞株で安定してニューロスフェアを得ることに成功した。ニューロスフェア形成効率はどのクローンも大きな差は無かった。

EB 法でほとんどニューロスフェアが形成されなかったヒト ES 細胞 KhES3 でも、ニューロスフェ

アのサイズ、形態はやや異なるものの、他のクローンと同等の数のニューロスフェアを形成した。形はやや不整であるが、他の神経分化良好なヒト iPS 細胞 (201B7 WD39 PA8) と同等の数のニューロスフェアを誘導することが可能であった。

次に KhES3 株から直接法で誘導されたニューロスフェアを単一細胞に解離し、再度浮遊培養で培養し継代することにより増殖可能かを検討した。直接法を用いた場合、1 次スフェアの形成から 14 日後に 2 次スフェアを形成させることが可能であった。この段階で細胞数は 1 次スフェアの 10 倍以上に増加しており、さらに同様の継代を行うことにより 7 日後に 3 次スフェアを形成することが可能であった。このように直接法を用いると少なくとも 2 回以上の継代が可能であり、順次細胞を増殖させることが可能であり、神経分化指向性の低いクローンでも最終分化細胞を定量的に得ることができることが示された。この方法を用いることにより、分化細胞の品質評価において生化学的解析やゲノム解析など、一定の細胞数が必要な解析も行うことが可能である。

つぎに、KhES3 から直接法で得たニューロスフェアを接着培養させて神経系細胞へ終分化させた。KhES3 から誘導したニューロスフェアからも β III チューブリン陽性のニューロンが観察されたが、全細胞に占める割合は、KhES1 から誘導したニューロスフェアと比べると 10-20%程度と低かった。この結果から、神経分化指向性の低い多能性幹細胞株から最終的な分化細胞を大量に得る際は、直接法においても十分なニューロスフェアを誘導する必要があると考えられた。直接法を用いた培養のスケールをアップにより、神経分化指向性の十分な数の終分化神経系細胞を得ることができると思われる。

ヒト ES 細胞(KhES1)からのニューロスフェア形成期間を約 6 日に短縮した。さらに 10 日間の接着培養を加えることにより多数のニューロンを得ることができる。分化誘導培地の組成を変更することにより運動ニューロンもしくはドーパミンニューロンを高効率に誘導可能である。特定の種類のニューロンに分化させる必要があるヒト ES 細胞の分化後の細胞の品質評価を迅速に行える分化誘導系を確立した。この方法は極めて簡便で、特殊な培養試薬・技術を必要とせず、技術移転も容易である。

京都大学 (物質・細胞統合システム拠点)

本研究で開発される新規スフェア培養法で培養されたヒト ES 細胞の神経系細胞への分化能および分化指向性を、京都大学物質・細胞統合システム拠点 (iCeMS) で通常行っている神経分化誘導因子を用いた神経分化誘導方法で確認することが目的である。従って、新規スフェア法がある程度確立された後に、本研究開発項目を開始した。

新規スフェア培養法で培養されたヒト ES 細胞 KhES-1 を、スフェアを継代するときと同様な手法で小さな細胞塊にし、神経分化誘導因子を含む神経分化誘導培地へ移し、神経分化誘導を開始した。通常行っている接着培養による神経分化誘導の条件と異なる点として、神経分化誘導過程をすべて浮遊培養として行った。最終段階で、細胞塊を酵素処理によってシングル細胞にした後、播種し、10-14 日後に観察したところ神経細胞を検出できた(図 1 a)。この結果は、スフェア培養したヒト ES 細胞は、神経分化能を保持しており、かつ浮遊培養状態で神経分化誘導を行っても神経細胞へ分化できることを示している。

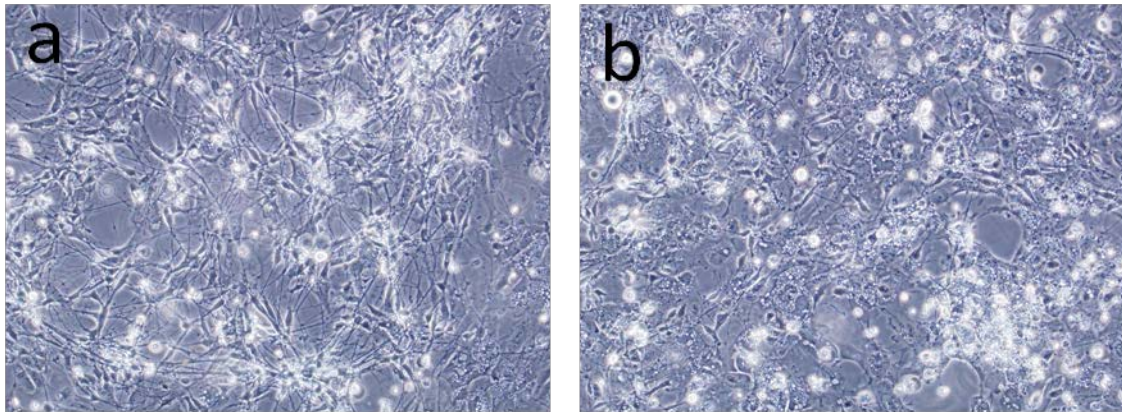


図1 新規スフェア培養法で培養されたヒトES細胞からの神経分化誘導
a: 神経細胞、b: 非神経細胞

ここまでの結果をまとめると、未分化維持での培養条件もしくは培地に関わらず、神経細胞への誘導は問題なく進行しているが、最終段階での神経分化に未分化維持で使用していた培地が影響を与えている可能性が高い。また、株による分化の指向性を表している可能性も否定できないため、今後は別の株による神経分化を確認することで、培地による影響か、分化指向性なのかを明らかにしていく。

2.2.2.2 中胚葉系（心筋細胞、血球系細胞）への分化能と分化指向性評価

京都大学（物質・細胞統合システム拠点）

ヒトES細胞の品質評価の一つとして心筋細胞への分化能を検定するために、京都大学中辻Gでは同グループが発見した低分子化合物KY02111を用いた心筋分化誘導法を用いて評価を行った(Minami et al., Cell Reports 2012)。このKY02111を用いた心筋分化誘導法はサイトカインや組み換えタンパク質を用いない、既知組成培地による安価で安定した分化誘導法であり、分化能の評価に適している。動物由来成分を含まず、比較的低コストの培養法である。分化培養後8日～30日の間は心筋細胞の成熟化が進み、成熟心筋マーカーが発現する。サイトカインを用いた従来の心筋分化誘導法は細胞株ごとにサイトカインの濃度を変えなければならないため、安定した分化能の評価には向いていない(Kattman et al., Cell Stem Cell 2011)が、我々の化合物を用いた誘導法では、同じ化合物濃度の条件で安定した分化能の評価が可能である。

ヒトES細胞の計4株（ヒトES京大株（KhES-1、KhES-3）、ヒトESウイスコンシン株（H1、H9））について分化能を解析したところ、どのヒトES細胞株についても、コントロールのDMSO添加群に比べてKY02111添加群は顕著に拍動心筋コロニーが増加し、心筋分化が促進されていた。ヒトES京大ライン（KhES-1、KhES-3）やヒトESウイスコンシンライン（H1、H9）については、それぞれ88%、92%、95%、85%の細胞コロニーが拍動しており、全体的に分化効率が高かったものの、KhES-3やH1株が比較的分化効率が高く、KhES-1やH9株が低い傾向が見られた。

次に、KY02111と他のWNTシグナル調節剤を組み合わせた既知組成培地による分化誘導法を用いてヒトES細胞株の心筋分化能評価を行った。分化培養後30日目に、拍動心筋コロニーの割合と心筋マーカーであるcardiac troponin T(cTnT)の抗体染色によるフローサイトメトリー法により解析を行った。その結果、ヒトES京大ライン（KhES-3）やヒトESウイスコンシンライン（H1、H9）については、拍動コロニー率はそれぞれ95%、94%、84%であり、フローサイトメトリーによるcTnTポジティブの心筋細胞の割合は、それぞれ92%、95%、88%であった。このように、これらの細胞株の中ではH9株が比較的分化しにくい傾向が見られ、図2におけるKY02111のみの分化誘導データと一致した結

果となった。

次に、スフェア培養で継代されたES細胞株 (KhES1) についてもこの心筋分化誘導法を適用し、拍動コロニーの割合やcTnTポジティブの心筋細胞の割合について、84~95%とフィーダー上のES細胞株と同程度の比較的高い分化効率を示した。このスフェア培養系の心筋分化能についても、25年度以降、いくつかの細胞株について評価する予定である。

千葉大学

【目標】中胚葉系細胞への分化能と分化指向性評価

新規培養システムで培養された細胞を用い、中胚葉系細胞の1つである血液細胞、特に造血幹前駆細胞への分化能と分化指向性について評価を行なう。

概要

千葉大学グループ (千葉大学大学院医学研究院細胞分子医学・岩間研究室) は、胚様体を介した分化誘導系を用いヒト多能性幹細胞 (ヒト ES/iPS 細胞) から血液系細胞、特に造血幹前駆細胞への分化能や分化指向性の評価を行っている。本プロジェクトにおいては、標準ヒト ES 細胞株 (京都株、ウイスコンシン株) や継代数の異なる同一株についての基本評価データの取得し、その後本プロジェクトで開発された新規培養システムで培養されたヒト ES 細胞を用いて造血幹前駆細胞への分化能や分化指向性の評価を行う (図1)。

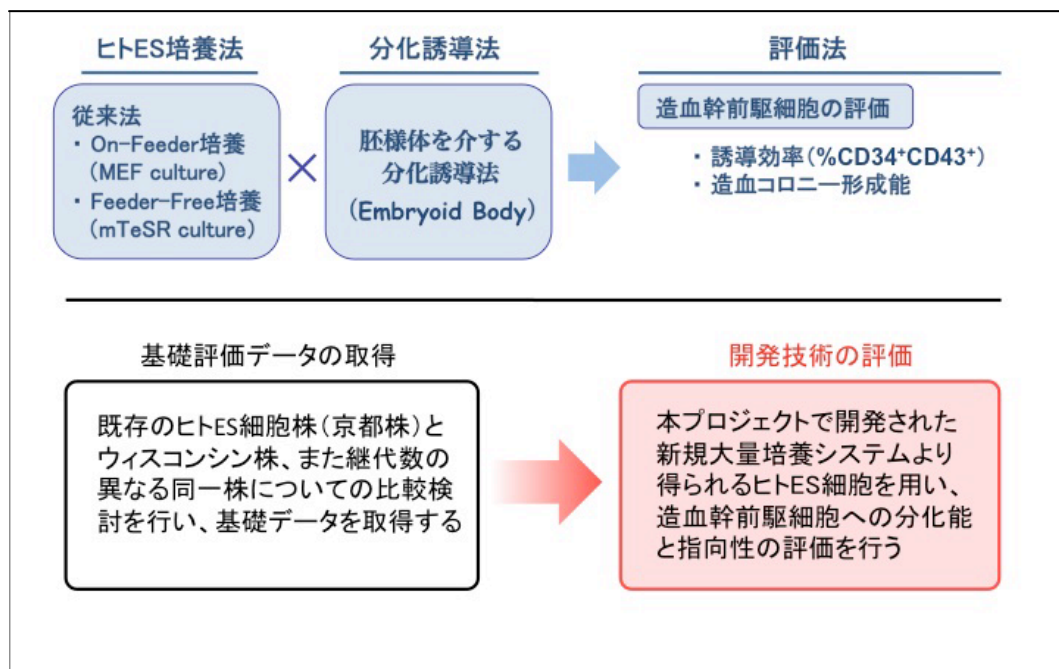


図1.造血幹前駆細胞への分化能と分化指向性の評価

<研究成果>

既存ヒトES細胞株における造血幹前駆細胞への分化能と分化指向性の比較評価

京大株 (KhES-1, KhES-3, KhES-4, KhES-5) および利用頻度の高い外国株 (H1, H9)、また継代数の異なる京大株 (KhES-1 early/late, KhES-3 early/late) を用い、造血幹前駆細胞への分化能や分化指向性についての基礎データを取得している。分化能や分化指向性の解析では、造血幹前駆細胞の指標となる細胞表面抗原CD34+CD43+細胞の出現頻度、またコロニーアッセイ法を用いた多能性と高い増殖能を有する造血幹前駆細胞数の比較評価を行った。その結果、すべてのヒトES細胞株および継代数の異なる同一株において造血幹前駆細胞への分化能が確認されたが、株間 (例えば、KhES-1 と

KhES-3) や継代数の異なるKhES-3 株 (KhES-3 early/late) では造血幹前駆細胞への分化指向性に差が認められている (図 7 : 評価結果)。今後、新規培養システムで培養された細胞を用いて造血幹前駆細胞への分化誘導を行い、分化能と分化指向性についてデータを取得する予定である。

ヒト ES 細胞から各種体細胞への分化誘導に関わる遺伝子リスト作成

千葉大学グループは、造血幹細胞の発生・分化・増殖・自己複製に関与する代表的な 18 遺伝子のデータリストを作成した。今後、白血病等の血液疾患に関与する遺伝子や SNPs 情報を加えたデータリストの作成を行なう。

東京大学

目的

多様なヒト ES 細胞株を用いて、信頼性の高い分化誘導方法を用いた分化能および分化指向性情報を蓄積し、標準的な多能性細胞株の特性を検定判断するための品質評価指標を開発することを目的とする。

<背景>

東京大学においては、事業開始時点において、既にいくつかの成熟血球系への分化誘導法を確立していたことから、複数の成熟血球への分化培養系を評価として用いるべく業務を開始した。業務を開始するにあたり、いくつかの細胞系譜へと分化を誘導しその効率を比較することの必要性、有用性について以下のように考察した。

<複数の血球培養系の比較・検討・至適評価系の選択>

本事業における最終目標は産業化に適した ES 細胞株の安定した大量培養系を実用化することである。この場合、フィーダーレスで無血清である等、可及的に不確定要因を減じた方法が求められる。これにより、大量培養後、長期培養後にも元の細胞と変わらぬ特性を保持することを可能とすることが究極には必要とされている。ここで、「変わらぬ特性」を客観的な指標をもって評価することが重要であることは論を待たない。

「変わらぬ特性」を評価する第一の方法は、その未分化性の評価である。この場合、左図に示すように、本事業で確立すべき大量培養法で増やした ES 細胞と、元の ES 細胞集団とをその未分化状態において比較することとなる。これには培養安定性、未分化マーカーの発現比較等が行われ、またエピゲノム比較も行い、大量培養前後での異同が評価される。

分化指向性を評価軸とした品質評価系の意義



図1. 大量培養後の ES 細胞における未分化性保持を指標とした品質評価

一方、ES 細胞は多能性がその最大の特徴であることから、大量培養後にも分化指向性が保持されることが求められる（図1）。この評価では内胚葉系、中胚葉系、外胚葉系全てについて同様に評価することが必要とされる。東京大学では、千葉大学と共同して中胚葉系、中でも血球系への分化培養系を用いた ES 細胞の特性評価系の確立と応用を担当することとした。事業開始時までには確立していたいくつかの成熟血球系について、まずは試行するところから開始した。複数の分化培養系を試行することは、未分化状態では一見、特性に差がない細胞集団であっても、分化という一種の「ストレス」を負荷することでその特性に、例えば特定の細胞系譜へと分化しない等の偏りが生じることで差が明らかとなる可能性が考慮されることから、本事業の目的上重要である（図2）。

分化指向性を評価軸とした品質評価系の意義

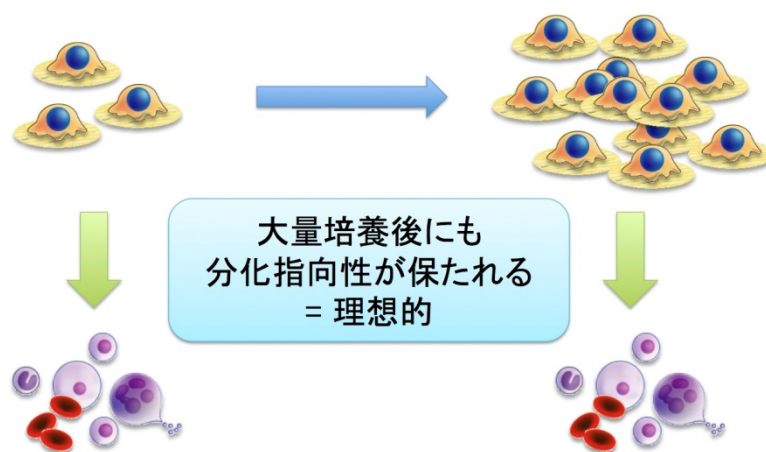


図2. 大量培養後の ES 細胞における分化特性の保持を指標とした品質評価

＜研究成果＞

ヒト ES 細胞からの好中球分化培養系について検討した。成熟好中球の *in vitro* 機能評価系として簡便で再現性に優れ、かつ客観的な定量が可能であり、さらに好中球の機能的成熟の指標として、活性酸素産生能の評価系を選択し用いた。複数の ES 細胞株における好中球分化指向性の比較を行い現在までに、ヒト ES 細胞 5 株 (H1, H9, KhES1, KhES3, KhES5)、また継代数の異なる KhES3 株について複数回の分化誘導を行い比較した。ROS 産生能評価系は再現性、定量性において優れていた。KhES-3 を除くほぼ全ての株では末梢血好中球とはヒストグラムは似ておらず、ROS 産生能における評価では機能的に未成熟な細胞を多く含むと判断される。実際の評価では鋭いピークを一定の基準によりゲートし、全体における成熟好中球 (ROS 高産生) の割合として表した。この結果は再現性が高く、5 株間では常に KhES-3 株が好中球分化指向性が高く、KhES-1 株、H9 株は低指向性との評価であった。次に同一株 (KhES-3) に関して、若継代株 (27-33 継代) と長期継代株 (123-129 継代) を事業全体の共通被験細胞として入手し、好中球培養系の独立試行を行い分化指向性の比較を行った。両者間には顕著な差が認められ、常に若継代株においてより多くの ROS 高産生細胞が検出された。4 回の試行結果をまとめたところ、分化指向性には統計学的な有意差をもって差を認める結果となった。次年度以降は、培養開発グループにより開発される方法で培養された ES 細胞株と、通常のフィーダー培養株との比較を中心に業務を行う。一方で、評価系についてはキット化について事業全体の中で意見交換を行いつつ実現を目指す。

ヒト ES 細胞から各種体細胞への分化誘導に関わる遺伝子リスト作成

東京大学グループは、造血分化細胞の発生・分化・増殖・自己複製に関与する代表的な遺伝子のデータリスト作成を担当した。

2.2.2.3 内胚葉系 (肝臓細胞など) への分化能と分化指向性評価

医薬基盤研究所

ヒト胚性幹細胞の品質評価のうち、染色体検査・遺伝型検査・各種未分化マーカー解析などが非常に重要であるが、分化能の検定も重要な評価項目のひとつである。医薬基盤研究所・水口グループでは各種ヒト ES 細胞株の内胚葉および肝細胞への分化指向性を検定した。ヒト ES/iPS 細胞は、中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞 (肝細胞の前駆細胞) 等を経由して成熟した肝細胞へと分化することが知られており、各分化過程で、適切な液性因子 (増殖因子やサイトカイン等) を作用させて分化させる方法が一般的である (図 1)。我々のグループは、細胞分化の適切な時期に適切な (細胞分化に関与する) 転写因子を改良型アデノウイルスベクターを用いて発現させることで効率良く内胚葉 (PLoS One. 2011;6(7):e21780.)、肝幹前駆細胞 (Mol Ther. 2011 Feb;19(2):400-7.)、および肝細胞 (Mol Ther. 2012 Jan;20(1):127-37.) を分化誘導可能なことを報告済みである。

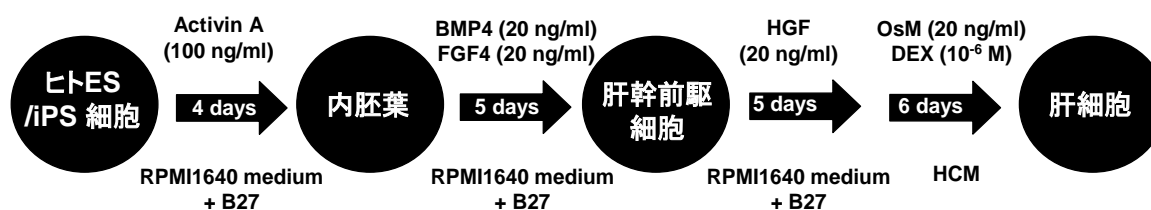


図 1. ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導

ヒト ES/iPS 細胞は内胚葉、肝幹前駆細胞を経て肝細胞へと分化する。ヒト ES/iPS 細胞から内胚葉への分化誘導過程は、高濃度 (100 ng/ml) の Activin A を作用させることで分化が促進される。内胚葉から肝幹前駆細胞への分化誘導過程は、BMP4 (20 ng/ml) および FGF4 (20 ng/ml) を作用させることで

分化が促される。肝幹前駆細胞から肝細胞への肝成熟化の過程は、HGF (20 ng/ml)を5日間作用させたのち、OsM (20 ng/ml)およびDEX (10⁻⁶ M)を作用させることで、成熟化が促進する。

本研究ではまず、遺伝子導入を行わないで、適切な液性因子（増殖因子やサイトカイン等）を付加させる従来の分化誘導法でヒト ES 細胞（H1、H9、KhES1、KhES2、KhES3、KhES4、KhES5）を内胚葉に分化させ、その分化効率、分化指向性について検討した。各ヒト ES 細胞における内胚葉への分化指向性を評価するため、各ヒト ES 細胞を内胚葉へ分化誘導し、培養4日目に内胚葉特異的な遺伝子（*FOXA2* ; *forkhead box protein A2*）の発現レベルを real-time RT-PCR 法を用いて評価した（図2）。その結果、ヒト ES 細胞株によって大きく *FOXA2* の遺伝子発現レベルが異なることが確認された。H9 および KhES3 由来内胚葉においては高い *FOXA2* 遺伝子発現が確認されたのに対して、KhES1 由来内胚葉では低い *FOXA2* 遺伝子発現が確認された。

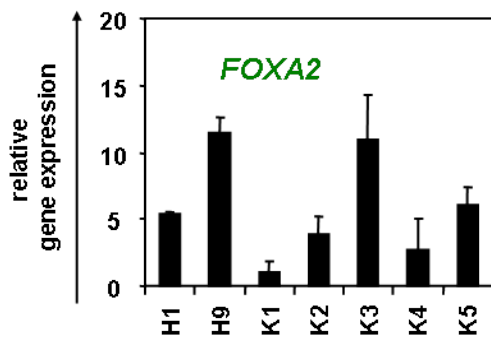


図2. ヒト ES 細胞由来内胚葉における *FOXA2* 遺伝子発現解析

次に、各ヒト ES 細胞における内胚葉への分化効率を比較するため、図1のプロトコールにしたがって各ヒト ES 細胞を内胚葉へ分化誘導し、培養4日目に内胚葉マーカーである CXCR4 (chemokine (C-X-C motif) receptor 4) を発現する細胞の割合をフローサイトメトリーを用いて評価した（図3）。その結果、ヒト ES 細胞株によって、CXCR4 陽性細胞率が異なることが確認された。H9 および KhES3 由来内胚葉においては CXCR4 陽性率は 70%程度であった。これに対して、KhES1 由来内胚葉では CXCR4 陽性率は 55%程度であった。以上の結果から、H9 および KhES3 は内胚葉への分化指向性が高いヒト ES 細胞であり、KhES1 は内胚葉への分化指向性が低い株であることが示唆される。また、他のヒト ES 細胞株においても、*FOXA2* 遺伝子発現および CXCR4 陽性率の結果がほぼ相関していたことから、内胚葉への分化指向性は H9 ≒ KhES3 ≧ KhES4 ≧ KhES5 ≧ H1 ≧ KhES2 ≧ KhES1 の順であることが示唆される。

各ヒト ES 細胞における内胚葉への分化指向性および肝細胞への分化指向性はほぼ同様であった。そこで、ヒト ES 細胞由来内胚葉における内胚葉マーカー遺伝子の発現と肝機能（ALB 産生量および尿素産生量）の相関性を調べた。その結果、ALB 産生量・尿素産生量のいずれもが内胚葉マーカー遺伝子の遺伝子発現と強く相関することが確認された。以上の結果から、肝分化指向性は内胚葉への分化指向性を評価することで、ほぼ正確に予想可能であると考えられる。

3. 実用化・事業化に向けての見通しおよび取り組みについて

3.1 ヒト ES 細胞の安定的な培養・保存技術の開発

3.1.1 安定、安全にヒト ES 細胞を維持するペプチド・タンパク質などの成長因子をはじめ、化学合成困難な高分子成分を代替できる低分子化合物による合成培地の開発（京都大学、日産化学工業、リプロセル）

京都大学（再生研）

実用化には二つの方向性を考えている。第一にこれらの化合物自体を提供し、ユーザーが自分の研究に使うヒト ES 細胞培養の基本培地に添加する（培地サプリメント）。実際にヒト ES 細胞用培地から bFGF などの重要な因子を除いた培地も販売されており、これらも候補となる。第二に、京都大学とリプロセルでは本 NEDO プロジェクトでヒト ES 細胞の未分化増殖のための基本培地の開発を行っており、本研究開発の成果として見出された化合物を予め添加したパッケージを調製することにより、完全培地の提供を行う（完全合成培地）。また本研究成果をヒト ES 細胞だけではなく、ヒト iPS 細胞においても確認することにより汎用性についてもアピールを行う。

ヒト ES 細胞の培地は消耗品であり、研究開発規模が大きくなるほど、大きな市場となっていくことが期待される。その中でヒト ES 細胞の未分化維持に不可欠な役割を有する bFGF の代替機能を持つ化合物というのは、非常に大きなセールスポイントになる。mTESR1 以降も多くの培地が開発、そして販売されているが、その一方でこれらの培地はあまり使われていない。これらの後発培地は、その構成成分が不明であるという問題点に加え、培地をアピール出来るセールスポイントがないからである、本研究開発で進めている bFGF の代替化合物はその点大きなアピールできるポイントとなる。

京都大学（物質・細胞統合システム拠点）

少なくとも接着培養条件において、我々の開発した新規合成培地は、世界で最もシンプルであり、最もタンパク質成分の種類と量が少ない。このため、今すぐに特許申請可能であり、実用化も可能である。しかし、これまでの市販品に比べて細胞増殖が遅く、長期培養の安定性を示すにはデータが揃っていないので、特許を所得してもライセンス契約は難しく、市販したとしても良い販売高価は望めない。また、現実には良い雑誌に論文発表を行わなければ、消費者の関心は薄い。このため、平成25年度中に増殖速度の問題を解決し、長期培養での安定性のデータをとり、平成26年度には特許申請および論文発表を行い、実用化につなげる予定である。

日産化学

本研究により得られた低分子化合物については、化学構造を種々変換することによる最適化を実施し、細胞増殖効果の更なる向上と安全性の確保を目指す。この品質が安定した（ロット間差が無い）廉価かつ細胞増殖効果の高い完全合成培地の製品化が期待される。製品化に際しては、あらゆる ES 細胞用培地に添加して性能を発揮できることから、ES 細胞用培地の添加剤として開発できるだけでなく、本低分子化合物を予め含有した新しい ES 細胞用培地も開発可能である。また、ES 細胞以外の幹細胞に対して増殖や分化を促進する効果も期待できることから、培地としての様々な用途展開が期待される。また、日産化学は農薬や医薬等の低分子化合物を製造し、規格を設定する技術とノウハウを有しており、本研究で見出された活性化合物の製品化においてもこれらの技術を有効に活用することができる。

実用化までのステップを次ページに示す。

年次	2012	2013	2014	2015
目標	シード取得	開発候補化合物取得	培地開発	培地上市
実施項目	スクリーニング	合成展開 安全性評価 高次活性評価	作用機序解明 培地組成検討 製造検討	サンプルワーク 規格設定

リプロセル

新規開発培地である **ReproXF** は、一部精製成分を含むものの、動物由来成分は含まないゼノフリー培地であり、コスト的にも実用可能な水準となっている。今後、多細胞株での評価や分化能の検討を行い、京都大学と共同で、培地の完全合成化にも取り組む。さらに、京都大学および日産化学社と共同で、新たな三次元培養方法であるスフェア培養（および三次元自動培養）に適した培地の開発も行う。開発スケジュールは順調に推移しており、実用化の見通しは極めて高いと考えている。

また、現時点の **ReproXF** については、一部精製成分を含むものの国産のゼノフリー培地としての価値は高く、要素技術として切り出し、2013 年度中に製品化する予定である。

2008 年で幹細胞の培養試薬（研究用）の市場規模は 700-800 億円と言われており、2020 年にはその数倍の数千億円の需要が見込まれる。これらの培養システムが国際標準化された場合、シェアは 50% 以上と過程すると、2,000-3,000 億円の売上が見込める。また、本培養システムが臨床応用された場合、将来的にはその数倍程度の売上が見込める。

3.1.2 化学合成／高分子技術を用いたヒト ES 細胞の三次元大量培養を可能にするための培養基質および培養基材の開発

京都大学（物質・細胞統合システム拠点）

開発したスフェア培養法で維持したヒト多能性幹細胞を評価チームに供給し、ゲノムやエピゲノムなどの特性解析評価、さらに神経細胞や造血系細胞への分化能評価を行うことで、今回開発した浮遊培養法によって品質の確保されたヒト多能性幹細胞を増殖させて供給できることを示す。また、新たに開発した攪拌の不必要な三次元スフェア培養の更なる技術検討を行い、ヒト多能性幹細胞の安定供給への適合性検討を行う予定である。さらに、ニプロ社などが開発を進めている培養バッグを用いた自動培養装置に組み込むための技術検討を行い、実用化につなげる予定である。

日産化学

本研究により得られたこれらの培養基材・基質に関して、更なる化学構造の変換、調製条件の検討を実施することにより、細胞を高密度で培養し、培養容量を最小限にした培養システムの開発が可能になる。

一方、合成足場材料として見出された部材については、二次元平面培養の際の基材として用いるだけでなく、基板上に ES 細胞を接着させた条件で三次元培養を実施する際にも好適に用いることができる。

京都大学（物質・細胞統合システム拠点）

本研究で開発しているゼラチンを用いたナノファイバー新規細胞培養基材は、現在市販されているヒト ES 細胞培養用基材などとも比較し、非常に安価であり、大量培養に向けたものだけでなく、一般的な幹細胞研究室においても使用することができる。現在、広く使われている細胞培養ディッシュにコーティングしてある形で製品化が可能である。

3.1.3 閉鎖系細胞培養容器と三次元培養方法を組み合わせたヒト ES 細胞の培養法の開発

ニプロ

接着培養用自動培養装置

再生医療・細胞治療への応用を目標として、CPC（細胞調整施設）などに導入・設置可能となるサイズ・価格にて、大量に安定に幹細胞を培養可能な自動培養装置の実用化を進める。

昨年度のプロトタイプ開発後に、経済産業省による平成 24 年度「iPS 細胞等自動培養装置開発加速事業」の対象機器に選定されたことから、平成 25 年度中は大学などの評価機関 8 研究施設にて、研究者の意見を踏まえた改良を加えつつ装置プロトタイプの評価を受けることとなった。当事業での評価結果を踏まえ、再生医療や新薬スクリーニングを実施する大学・研究機関のニーズに合致した仕様となるよう改良を加えて最終仕様を決定し、平成 26 年度製品化に向けて進める。

浮遊培養用自動培養装置

接着細胞用自動培養装置と同じく、再生医療・細胞治療への応用を目標とするが、細胞数がより大量スケールで必要となる用途（心疾患、肝疾患など）を視野に開発を進める。平成 25 年度自動培養プロトコルの検討と培養行程毎の要素技術の検討、装置仕様の検討を実施し、平成 26 年度に自動培養装置プロトタイプの開発を実施し、平成 27 年度に製品化を進める。

3.1.4 ヒト ES 細胞の状態を培養下で生きたまま検定するための、多パラメータ観察技術などのイメージング技術による生細胞検査技術の開発

浜松ホトニクス

平成 25 年度に細胞状態を評価する候補パラメータを選定する。選定されたパラメータは目視と同等以上の判別精度を持つことが重要である。パラメータが定まった後、市場ニーズを十分考慮しながら、迅速性、導入しやすい価格、大きさなど小型化、コストダウンのために最適化されたスタンドアロンシステムを構想する。光学系、アルゴリズム最適化、モデル設計を経て、平成 27 年度に小型化、早期診断スタンドアロンシステムモデル実現可能性を検討してゆく。更に市場性をはじめ事業化検討のうえ、実用化を目指す。

3.1.5 自動化が可能なヒト ES 細胞の高効率凍結保存技術の開発

京都大学（再生医科学研究所）

ヒト ES 細胞を、安定的に大量供給可能とするためには、それに適した凍結技術の開発が不可欠である。本研究成果である劇・毒物である DMSO 使用しない凍結保存液の開発は世界で初めてという極めてユニークな成果であり、他社競合品との相違も明確である。また医薬品グレードの調整も容易であることから、新規凍結保存液として競争力のあるものであり、製品化・販売を目指している。

ニプロ

平成 24 年度までに形状案の検討、予備評価可能な試作品の作製に着手しており、平成 25 年度に試作品の予備評価（生物学的安全性、耐凍性など）・改良を実施し、平成 26 年度に最終仕様の確定・本評価を実施し、平成 27 年度に製品化を進める。

3.2 ヒト ES 細胞の品質評価指標の開発

京都大学（再生医科学研究所）

平成 24 年度までに国産ヒト ES 細胞株（KhES）の標準サンプルの調製を行いプロジェクトチーム内で品質評価の基礎的な統合解析ワークフローを構築すると共に、大量培養サンプルと比較する為の基準/コントロールとなる参照データを取得した。特にマイクロアレイ、次世代シーケンス等を用いたゲノム、エピゲノムデータから実際の品質評価を行う指標となる遺伝子群をクラス分けして選定し、多次元データの集約と解析を行う為のデータベース構築を進めた。更に大量培養の基礎となるスフェア培養サンプルの解析を開始した。培養システムの開発/改良に細胞の品質評価データの取得とフィードバックは必須であり本事業で開発する培養装置の技術検定に重要な役割を果たす。

一方、産業レベルで細胞リソースから解析用サンプル調製、核型解析、ゲノム構造及び DNA 配列解析、エピゲノム解析、mRNA 等の遺伝情報発現解析、既知多型との比較、造腫瘍性や疾患リスク要因の判定、分化指向性の確認等、多次元情報を一括して取得して統合解析を行う手法は、解析費用、ノウハウ等の問題から世界的にも集約/確立されて居らず、本事業による開発支援と参加チームの技術結集により構築を進める事が可能となったヒト ES 細胞の品質管理工程は今後の幹細胞の産業実用化に極めて重要な技術要素となる。特にマスターセルバンクの品質評価指データの取得と共に、実際に大量培養装置で得られる細胞リソースのロット毎の経時的な品質管理データの取得/保存/解析を行う解析パイプラインとデータベースシステムは培養装置と共に実用化され提供される事が望ましい事から、ヒト ES 細胞の標準化原案の策定と共に、これら「幹細胞の品質管理データの取得/解析/保存システム」の開発、実用化を目指す。

京都大学（物質・細胞統合システム拠点）

上述の研究開発結果を踏まえ、最終目標（平成 27 年度）に向け、今後確立する品質評価技術をベースとして、ヒト幹細胞の標準化原案を策定する。

3.2.1 ヒト ES 細胞の分子生物学的情報の取得および解析技術・検定キットの開発

住友ベークライト

細胞表面の糖鎖は、細胞の状態を鋭敏に反映するため、糖鎖は幹細胞の有望な品質管理指標の一つになる可能性がある。住友ベークライト（株）は本研究開発の成果としてヒト幹細胞糖鎖精製キットラベル化キットの販売を 2013 年 4 月 15 日より開始した。操作に特別なスキルが不要な本キット製品の普及は、幹細胞を取り扱っている生物学研究者や医療現場の研究者などの糖鎖専門研究者以外へ拡大するであろう。

更にヒト幹細胞の品質評価指標となる糖鎖バイオマーカー候補が見出されている。今後、再現性等を検証し、品質評価指標を確立できれば、創薬支援分野や再生医療分野において、創薬スクリーニング基礎研究や未分化・分化細胞の品質管理、更に幹細胞の臨床基礎研究～応用研究で使用するヒト幹細胞の品質評価が簡便に実施できる。これらの成果によって、ヒト幹細胞の産業応用が加速される。

島津製作所

メタボローム解析は、代謝産物を網羅的に解析する方法であり医療分野における診断マーカー探索や病因解析、製薬分野における薬効や毒性を示すバイオマーカー探索、食品分野における品質管理・予測など、幅広い分野へ適用されている。本研究開発では GC-MS や LC-MS を用いたヒト ES 細胞の一次代謝産物に関する分析手法の開発を行っており、その成果は基礎研究分野への波及効果が期待できる。

具体的な例として、代謝産物の同定のためのマススペクトルデータベースとしての製品化が期待で

きる。メタボロミクス分野では、さまざまなクロマトグラフ（液体クロマトグラフやガスクロマトグラフなど）に質量分析計を接続した機器が頻繁に用いられる。この際、検出された化合物の定性分析（同定）には、クロマトグラフにおける保持時間や質量分析におけるスペクトルパターンが極めて有用である。島津製作所では、GC-MS の定性分析用に、311 種の代謝物(アミノ酸・脂肪酸・有機酸)について、その保持指標、マススペクトルなどをデータベース化した『GC/MS 代謝成分データベース』を販売している。本研究開発では、約 100 種類の細胞内代謝産物について、その標準物質を分析した保持指標情報およびマススペクトルデータを取得した。これらの中には、『GC/MS 代謝成分データベース』に含まれない代謝産物も多数含まれているため、既存データベースの拡充および改良版としての商品化の可能性が考えられる。

メタボローム解析では、検出された化合物の同定（定性分析）のみならず、定量分析も重要である。目的とする化合物の正確な定量のために、その化合物に特徴的なイオンを選択する必要がある。本研究開発では、上記標準物質のマススペクトルデータおよびヒト ES 細胞の実サンプル分析データより、それぞれの化合物に対して最適と考えられるイオンの選択を行い、定量メソッドを構築した。その結果、GC-MS を用いたメタボローム解析にて、約 100 種類の代謝産物の定量情報を得ることができた（GC-MS を用いたヒト ES 細胞のメタボローム解析は、米、独 2 つのグループより報告があるが、いずれも 100 種程度が対象である）。生体試料からの前処理をプロトコール化し、代謝成分データベース、定量メソッド、及び既存の質量分析装置と組み合わせることで、生体（細胞）試料のメタボローム解析システムとしての製品化の可能性が考えられる。

タカラバイオ

幹細胞発現遺伝子のPrimerArray

2012 年 10 月に発売した製品PrimerArray® Embryonic Stem Cells (Human)は、ES細胞の未分化／分化を特徴づけると考えられる 88 種類の遺伝子の発現状況をリアルタイムRT-PCRを用いて解析し、幹細胞の遺伝子発現の特徴を検証するための試薬（プライマーセット）として製品化した。これを用いて、各種培養条件で調製された ES 細胞サンプルの遺伝子発現を比較することで、対象が未分化（多能性）幹細胞の状態を維持しているかの判別を簡便に調べることが可能である。また、本製品は iPS 細胞への適用も可能であり、培養条件の評価はもとより、新たに確立された iPS 細胞の品質評価などにも利用できるものと考えられる。今後、解析対象の ES 細胞培養サンプル（およびその分化細胞培養サンプル）の数を増やして、評価指標の信頼性の検証と改良を進めながら、より実用性の高いシステムへ完成していかないと考えている。

がん遺伝子関連Exome解析による指標候補の開発

幹細胞の安全性評価において、がん化に関連する遺伝子に起きている変異の検出は重要な点と考えられている。この変異は大量培養過程などで起きる可能性があるものであるため、体細胞変異の検出と同様に対象となる変異を容易に限定できるようなものではなく、かつ非常に感度の高い検出が求められる。したがって、本研究では、次世代シーケンサーを利用した解析が適していると考えているが、ゲノム全体を対象とする解析では、現在のコストと時間には実用上の大きな壁が存在する。そこで、これまでの知見から、がん化のリスクを増大させる可能性が高いと考えられる遺伝子などを選定して、それらの遺伝子上の変異発生の有無を効率的に解析できる系の構築を目指している。現在は既存の市販サービスを利用して検討を開始した段階だが、ターゲット濃縮用のプローブ設計のノウハウをこの系で取得したうえで、独自の濃縮キットを開発し、製品化を目指している。

その他（遺伝子発現、ゲノム構造変化など）の指標の確認と開発

マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析のデータは、先に述べた PrimerArray の製品化にも

活用している。それに加えて、様々な ES 細胞株について、分化前の遺伝子発現プロファイルと分化誘導性との紐付を行って、各細胞株の特性を明らかにすれば、各種組織への分化特性による株の使い分けや分化手法の検討に役立つと考えられる。そのような分化特性のキーとなるマーカー遺伝子を特定し、リアルタイム RT-PCR 系の構築を行えば、簡便に特性を検査できる製品として実用化することが可能である。

LOH/CNV などゲノム構造変化に関しては、変化の起きやすい領域（ホットスポット）を報告されている ES 細胞株などが存在し、同様の変化が他の ES 細胞株でも起きるのか検討を進めているが、今回、ビーズアレイによってある程度の CNV 検出を確認できているものの、いまだ明確な答えを得るには至っていない。しかし、細胞株それぞれにゲノム構造の安定性に差を持つ可能性があり、実用に際し、たとえば各細胞株のマスターセルバンクやワーキングセルバンクの性質の良し悪しの評価にとっては、これらの解析は非常に重要な指標であると考えられる。今後は、さらに解析対象を広げ、培養条件や細胞株の違いによるゲノム構造変化のデータを蓄積し、細胞株毎のゲノム構造変化のホットスポットの検証を行って、適切な評価指標の確立を目指す。

一方、幹細胞におけるマイクロ RNA の発現プロファイルを指標とする評価が注目されており、様々な知見が得られつつある。マイクロ RNA には各種のファミリーが存在し、一般的に用いられているマイクロ RNA のマイクロアレイ解析では、ファミリー内の分子種を識別できないなどの問題がある。本研究では、その解決のために LNA を使用したマイクロアレイとリアルタイム RT-PCR の解析系の利用を検討し、マイクロ RNA 指標の評価系の実用化を目指す。

理化学研究所

今後、細胞分化指向性に違いがあることが見えてきた細胞株間あるいは培養期間あるいは培養状態の違いでどのようなヒストンメチル化情報に違いがあるか、その比較解析を進め、エピゲノム情報に基づく実用的な評価系の確立を目指す。

ジェネティク

自動化システムの構築

新規なソフトウェア・ハードウェアを搭載したエピジェネティクス自動化システムについては、目標とする実用化を達成し、平成 25 年 3 月より国内及び欧米市場に販売を開始した。本自動化システムはメチル化 DNA 免疫沈降を始めとするエピジェネティクス解析に必要なサンプル調製を自動的することにより、実験者に、習熟度によるバラツキのない再現性・信頼性の高いデータを提供できるものと思われる。

一方、ヒト幹細胞において、その分化、リプログラミングなどの変化はすべて遺伝子配列の変化を伴わない「エピジェネティクス変化」であり、これらヒト幹細胞の変化の遺伝子レベルにおける解明にも役立つと考えられる。

ヒト幹細胞のエピゲノム解析

①自動化システムを用いた幹細胞エピゲノム解析法の開発

ヒト幹細胞品質評価のための具体的指標については、自動化システムを用いて免疫沈降を行い、得られたサンプルをマイクロアレイにより、各細胞の DNA のメチル化状態を定量化した。ヒト幹細胞の各遺伝子のプロモータ（および一部、CpG 領域）における各プローブのメチル化、脱メチル化（ヒドロキシメチル化）の P スコアを算出し、その P スコアのパターンを比較することで、DNA のメチル化の度合いを識別する新規解析法を見出し、特許出願を行った。

②幹細胞品質評価のためのエピゲノム指標の開発

新規に開発した自動化メチル化解析法を用いて、ステージの異なるヒト幹細胞について更なる解析を行い、遺伝子の絞り込みを行うことにより、具体的なエピゲノム指標を見出し、実用化を達成する。

3.2.2 ヒト ES 細胞の効率的で再現性の良い分化誘導法を用いた多分化能および分化指向性の評価

3.2.2.1 外胚葉系（神経系細胞）への分化能と分化指向性評価

慶應義塾大学

当該実施項目で開発した2つの培養方法を組み合わせて既存株と大量培養株の評価を行う。最終的には大量培養された ES 細胞が製品化されることを念頭に置き、最終製品での品質管理を確実な物にするために下記を目標に開発を進める。

今回開発した簡便で迅速な神経分化誘導方法のパッケージ化

(H25,26 年度までに完了を目標)

評価項目の制定とキット化

(H26,H27 年度を目標に神経分化を規定する標準評価項目を決定)

京都大学（物質・細胞統合システム拠点）

新規スフェア培養法によって培養されたヒト ES 細胞株の分化指向性評価を通して、mTeSR1 培地によるフィーダーなし培養によって培養されたヒト ES 細胞株に、分化指向性が明らかになった場合、多能性幹細胞株の神経系細胞への分化指向性を明らかにする受託研究や、品質評価指標と合わせた分化指向性解析キットの製品化が考えられる。

また、細胞株による分化指向性に大きな違いが見られないが、その神経分化誘導に影響する場合、神経分化誘導に影響しない新規ヒト ES 細胞培地の開発・製品化、または神経分化誘導効率を向上させることができる因子が今後同定されれば、その因子の製品化や、その因子を含んだ従来のフィーダーなし培養培地または神経分化誘導培地の製品化が考えられる。

3.2.2.2 中胚葉系（心筋細胞、血球系細胞）への分化能と分化指向性評価

京都大学（物質・細胞統合システム拠点）

本研究により開発された新規低分子化合物 KY02111 を用いた心筋分化誘導法は、信頼性が高く安価である上に、血清やサイトカインを含まない既知組成培地による安定した心筋分化誘導法である。従って ES 細胞株の心筋分化効率を比較評価するのに適した系となっており、早期の実用化が期待される。また動物由来成分を含まない分化誘導法でもあるため、細胞株の評価後、そのまま臨床応用への実用化も期待できる。

千葉大学

平成 25 年度中には本プロジェクトで新たに開発された培養技術により増殖させたヒト ES 細胞株における造血幹前駆細胞への分化能と分化指向性についてデータを取得する予定であり、各胚葉系の評価データを組み合わせた総合的評価が可能と考える。

東京大学

現在までの検討により、好中球分化誘導系は、ES 細胞の品質評価系として再現性、定量性に優れていることが示されたことからそのキット化が望まれる。しかしながら現状、効率良い好中球誘導にはフィーダー細胞の使用が必須であり、また、全ての工程に牛胎仔血清を用いていることから、手技者の技術、フィーダー細胞の状態、血清ロット差等による効率の変化が懸念事項として残されている。今後、これらの課題の解決に注力することで、2~3 年の間に実用化を見込むことが可能である。

3.2.2.3 内胚葉系（肝臓細胞など）への分化能と分化指向性評価

医薬基盤研究所

肝毒性の判明は医薬品の市場撤退や開発中止の主な原因の1つである。医薬品開発の非臨床試験の段階において、医薬品候補化合物の肝毒性を予測できれば、医薬品開発の迅速化および効率化が実現される。現在、製薬企業においては医薬品候補化合物の肝毒性を予測するために、ヒト（凍結）初代培養肝細胞を用いている。しかしながら、ヒト初代培養肝細胞は非常に高価であり、ロット差が大きく取り扱いが難しいことが問題となっている。ヒト ES/iPS 細胞はこれらの問題点を克服できる可能性があるため、無限に増殖可能なヒト ES/iPS 細胞からヒト初代培養肝細胞と同等の機能を有する肝細胞を作製できれば、分化誘導肝細胞がヒト初代培養肝細胞に代わる新たな肝毒性予測ツールとなりうる。したがって、本プロジェクトにおいて大量生産された高品質なヒト ES 細胞から創薬応用可能な分化誘導肝細胞を作製する技術が開発されることによって、創薬スクリーニングにこれらの細胞を安価かつ大量に供給することが可能になると考えられる。また、本プロジェクトによって開発される技術は、創薬スクリーニングに限らず、大量の細胞を必要とする再生医療へも応用できる可能性がある。したがって、本プロジェクトは、当該分野の研究開発が促進でき、なおかつ産業応用に大きく近づく一歩となりうる。

平成25年度からは、継代数の異なるヒト ES 細胞株について、内胚葉および肝細胞への分化指向性の検定を行う。また、本プロジェクトにおいて開発された大量培養系で維持されたヒト ES 細胞の肝分化誘導能を通常培養系で維持されたヒト ES 細胞と比較する。産業応用を目指すためには、各種組織への分化能の検定も含めたヒト ES 細胞の品質評価が非常に重要であるので、今後も種々のヒト ES 細胞について品質評価のための基礎データの取得を継続する。

【まとめ】

事業全体：

基本計画に記載された「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を安定的に大量供給する技術の開発を行う」ことに対して、大量培養が可能な自動培養装置の開発及び品質管理に必要な検査キットの開発についていくつか製品化に成功した。

個別テーマ毎の研究開発目標と目標に対する成果：

(1) ヒト ES 細胞の安定な培養・保存技術の開発

- ①安定にヒト ES 細胞を維持するタンパク質などの成長因子をはじめ、化学合成困難な高分子成分を代替できる低分子化合物による合成培地の開発については、bFGF を代替可能な低分子化合物候補化合物を見出した。また、ゼノフリーの合成培地を開発中。
- ②化学合成／高分子技術を用いたヒト ES 細胞の三次元大量培養を可能にするための培養基質および培養基材の開発については、具体的に有望な基質及び基材について性能を確認中。
- ③従来の世界標準である接着培養法で、閉鎖系培養バッグを用いて、培地交換や継代を自動化した培養装置の開発に成功した（現在、複数機関における試用を経産省プロジェクトで実施中）。更に大量培養を可能にする新規三次元スフェア培養法を開発し、新培養法を組込んだ閉鎖系自動化培養装置の開発を進めている。
- ④自動化が可能なヒト ES 細胞の高効率凍結保存技術の開発については、懸念リスクがある DMSO を使わない、新たな凍結液による緩慢凍結法に成功した。
- ⑤ヒト ES 細胞の状態を培養下で生きたまま検定するための、多パラメータ観察技術などのイメージング技術による生細胞検査技術の開発については、可能性の高い解析法でのイメージング技術開発を実施中。

(2) ヒト ES 細胞の品質評価指標の開発

- ①ヒト ES 細胞の分子生物学的情報の取得および解析技術・検定キットの開発については、国際データベース等を活用したゲノム品質指標を設定し、解析技術関係ではヒト幹細胞のエピゲノム自動解析システムの開発に成功、またヒト幹細胞関連発現遺伝子プロファイルキットを商品化、さらに幹細胞糖鎖解析キットを商品化した。またヒト幹細胞技術標準化についても国内の関係組織との連携を行いながらシステム構築を進めている。
- ②ヒト ES 細胞の効率的で再現性の良い分化誘導法を用いた多分化能および分化指向性の評価については、京大ヒト ES 株を中心として外胚葉（神経系細胞）、中胚葉（血球系細胞、心筋細胞）及び内胚葉（肝臓細胞など）への分化能と分化指向性の評価を行い、株により分化能及び分化指向性に違いがあることを見出した。今後、新規な培養法で作製されたヒト ES 細胞株について検討すると共に、標準的な分化誘導法のプロトコルとキット構築を目指す。

【iPS 細胞領域】

はじめに

多能性を有する iPS 細胞(人工多能性幹細胞)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、肝臓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。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。

本研究開発は、様々な細胞に分化する能力を有するヒト iPS 細胞の産業利用促進の重要な基盤となり、品質の管理された細胞を安定的に大量供給する技術の開発を目的として実施するが、細胞の培養・保存技術の開発に関しては以下の2項目、細胞の品質管理・安定技術に関しては1項目について検討を行うことにした。

① ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発

①-1. 安定した培養に必要な自動培養装置、凍結保存装置の開発

幹細胞安定大量供給・保存や無侵襲画像解析システムなどの培養供給技術を整備し各応用へと適切な細胞を選別し創薬や医療などの確固とした産業応用促進のため、CiRA と連携し、幹細胞の大量培養調製と保存の自動化システムを開発する。

①-2. 幹細胞の安定供給に最適化した培養基材および培地の開発

臨床応用を見据え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基材・培地を開発する。国際的なあらゆる情勢の変動にも産業への影響を極力排除するため all made in Japan から構成される日本ブランドの幹細胞培養を構築する。

② ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発

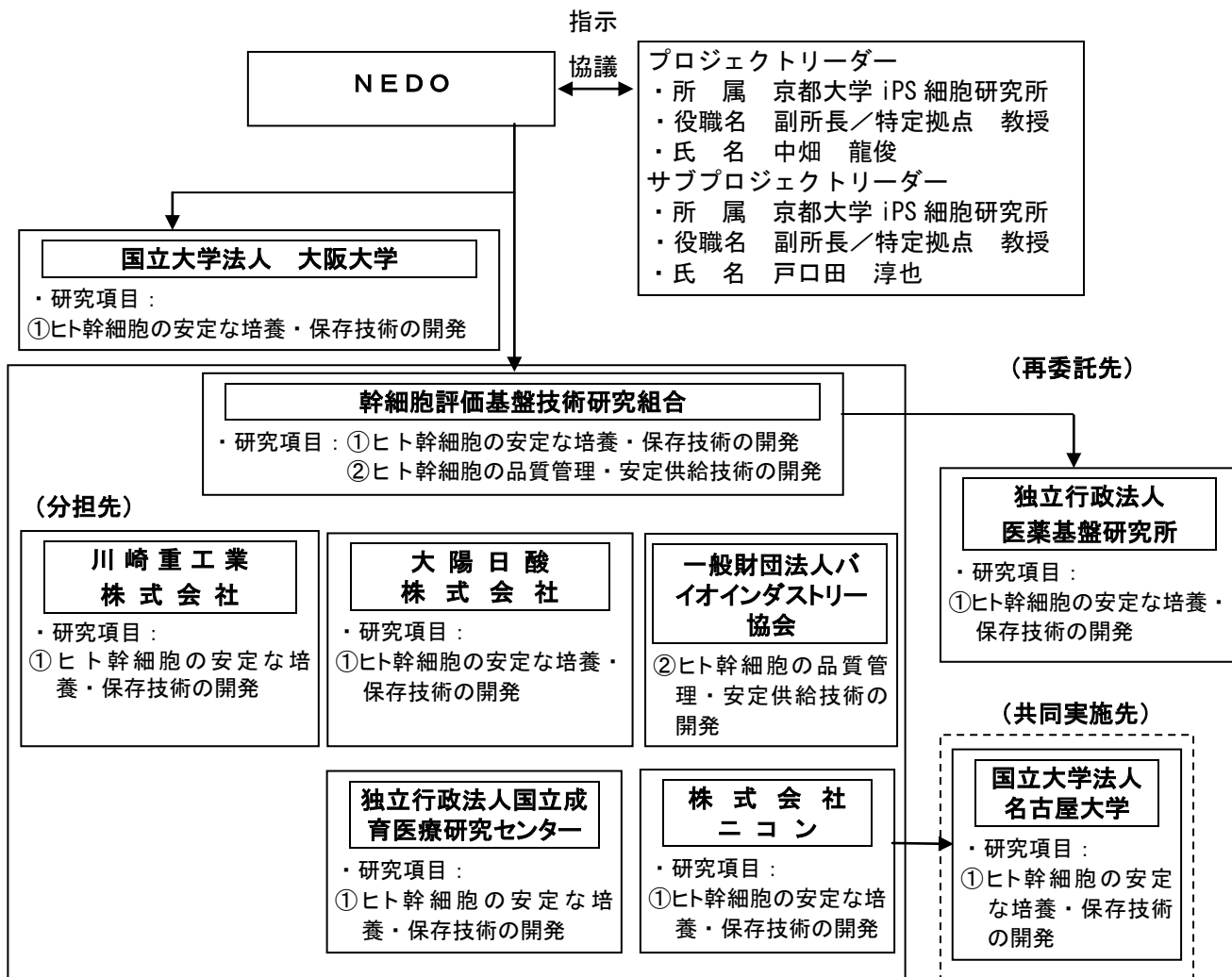
②-1. ヒト iPS 細胞に係る技術等の標準化案の策定

ヒト iPS 細胞等幹細胞の技術に関する用語や、ヒト iPS 細胞の大量調整を容易にするための自動培養、凍結保存、及び非侵襲的三次元観察に係る基盤技術群の標準化案を作成し、幹細胞医学の進展、創薬の効率化及び医療応用・産業応用の推進に資する。

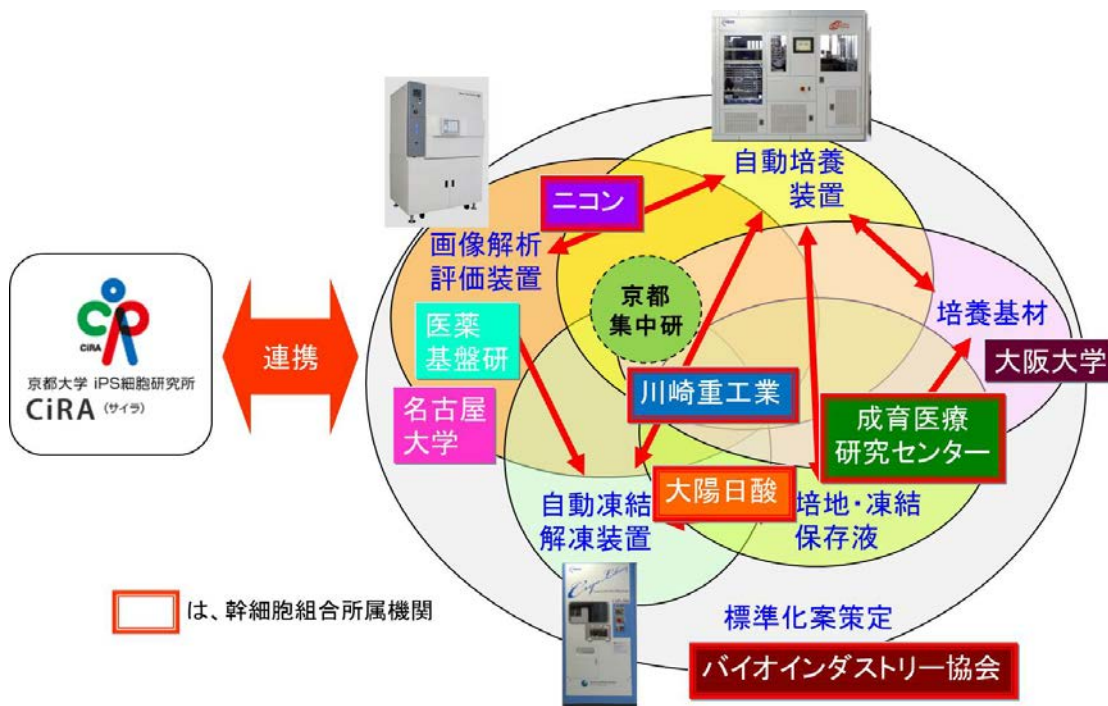
【研究開発の実施体制】

事業を担う研究開発実施の体制を、次頁の上図に示す。研究開発面では京都大学 iPS 細胞研究所 CiRA との連携が大きな特徴である。本プロジェクト参加の全機関(組合員である機関は組合として契約)が CiRA と共同研究契約を結んでいる。CiRA から研究に使用する iPS 細胞株の提供を受け、iPS 細胞の評価技術の指導を受けた。また、プロジェクトを統括するサブ P/L は、CiRA の副所長の戸口田京都大学教授である。

また、研究開発テーマの面でも、1 テーマ 1 機関ではなく、1つのテーマを複数の機関が共同で担当し、かつ、全体が CiRA と連携することに特徴がある。これを次頁の下図に図示する。中央にある京都集中研は、開発機関が複数に分かれる装置開発を効率よく進め、かつ、CiRA との連携が効率的に行えるように、京都に設置した研究所である。この研究開発体制を研究面で連携させるために研究分科会を設置している。この他に装置開発3社での装置開発研究者会議、ヒト iPS 細胞に係る技術等の動向調査を行うための動向調査研究者会議を設けている。



研究開発体制図



テーマの関連と CiRA との連携

【研究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメント】

本事業では、装置3社－川崎重工業、大陽日酸3社が共同し、製品の試作機の位置付けで実証機を試作する。この実証機から製品化までには、自動培養装置と自動凍結・解凍装置及び観察装置との連携が必要となる。これら一連の作業を経て、プロジェクト終了前後に3社で製品販売について協議を行い、契約を締結し、期日を決めて、実証機の製品販売を目指す。

一方、大阪大学が開発中の培養基材は、装置には依存しない製品である。大阪大学では幹細胞用培養基材としてのラミニン 511E8 フラグメントの有用性を踏まえ、同フラグメントの製造および販売に関する権利を株式会社ニッピにライセンスアウトしており、平成 25 年夏以降に同社が販売を開始する予定である。

1. 全体の成果

本研究開発の実施項目は、以下に示すように、2つの大項目、3つの中項目、6つの小項目(研究項目②は単一の項目)からなる。

研究開発項目① ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発

- ①-1. 安定した培養に必要な自動培養装置、凍結保存装置の開発(幹細胞評価基盤技術研究組合(分担先:川崎重工業、大陽日酸、ニコン、国立成育医療研究センター、共同実施先:名古屋大学)、医薬基盤研究所)
 - A. 幹細胞自動培養装置の開発(幹細胞評価基盤技術研究組合(分担先:川崎重工業、国立成育医療研究センター))
 - B. 幹細胞自動凍結・解凍装置の開発(幹細胞評価基盤技術研究組合(分担先:大陽日酸、国立成育医療研究センター))
 - C. 幹細胞評価画像解析装置の開発(幹細胞評価基盤技術研究組合(分担先:ニコン、共同実施先:名古屋大学)、医薬基盤研究所)
- ①-2. 幹細胞の安定供給に最適化した培養基材および培地の開発(幹細胞評価基盤技術研究組合(分担先:国立成育医療研究センター、川崎重工業、大陽日酸)、大阪大学)
 - A. 成分が明確かつ異種生物由来の成分を含まない培養基材の開発(幹細胞評価基盤技術研究組合(分担先:国立成育医療研究センター、川崎重工業)、大阪大学)
 - B. 成分が明確かつ異種生物由来の成分を含まない培地および凍結保存液の開発(幹細胞評価基盤技術研究組合(分担先:国立成育医療研究センター、川崎重工業、大陽日酸))

研究開発項目② ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発

- ②-1. ヒトiPS細胞に係る技術等の標準化案の策定(幹細胞評価基盤技術研究組合(分担先:バイオインダストリー協会))

研究開発成果の説明は、6つの小項目を、それぞれ、1つの節とし、さらに、成果機の開発を別の節とし、以下で報告する。

6項目毎の中間目標と達成度及び最終目標と達成見通しを、それぞれ、表 1-1 及び表 1-2 に示す。

表 1-1 中間目標と達成度

開発項目	目標	成果	達成度
① ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発			
①-1. 安定した培養に必要な自動培養装置、凍結保存装置の開発			
A. 幹細胞自動培養装置の開発	・細胞凍結保存のために、無菌操作が必要な凍結・解凍操作を細胞自動培養システムによって実現し、細胞凍結保存装置と連携し、培養から保存までの自動システムを開発する。	・自動培養ロボットによる無菌的な凍結・解凍操作を実現し、培養から保存までの自動システムを完成させた。 ・京大 CiRA 方式によるフィーダーを用いた京大ヒト iPS 細胞の自動安定培養を実現した。	大幅達成
B. 幹細胞自動凍結・解凍装置の開発	・自動培養装置とマッチングさせた一連の自動化装置を開発する。 ・ヒト iPS 細胞で凍結解凍後の細胞生存率を平均 80%以上とする。	・自動化装置を試作し、フィーダーを用いた京大ヒト iPS 細胞の自動凍結保存/解凍処理を確認完了した。 ・凍結解凍後の細胞生存率で平均 80%以上、凍結解凍後の正常な性状を確認。	大幅達成
C. 幹細胞評価画像解析装置の開発	・非侵襲画像評価解析装置の試作品完成、及び自動培養装置と連携するための技術要素開発が完了する。	・ヒト iPS 細胞株の見た目を定量的に定義し、数値化することにより、細胞形態評価アルゴリズムを設計できた。	大幅達成
①-2. 幹細胞の安定供給に最適化した培養基材および培地の開発			
A. 成分が明確かつ異種生物由来の成分を含まない培養基材の開発	・改良型ラミニン活性フラグメントのプロトタイプを作製し、その有用性を検証する。	・増殖因子活性制御型と接着活性増強型の2種類の改良型ラミニンフラグメントを作製した。 ・培養器にプレコートしたラミニン活性フラグメントの活性を長期間安定に保持する条件を見出した。	大幅達成
B. 成分が明確かつ異種生物由来の成分を含まない培地および凍結保存液の開発	・市販培地を自動培養装置や培養基材との相性を中心に評価した結果から、新規開発、あるいは、改良の必要性を判断し、必要性が認められた場合には、開発目標を明確にし、培地開発に着手する。 ・ヒト iPS 細胞を凍結保存できる有効成分の検討を終了	・全市販培地(フィーダー細胞有・無)を評価し、自動培養装置や培養基材との相性から効果的な培地を選定し、統一ロットストックを作製の上、自動培養装置適応プログラムの開発を実施した。 ・異種生物由来成分を含まない市販の ES 細胞用凍結保存液のうち緩慢法でヒト iPS 細胞の自動凍結保存/解凍が効果的なものを選定し、自動凍結/解凍プログラムの開発を実施した。	大幅達成
② ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発			
②-1. ヒト iPS 細胞に係る技術等の標準化案の策定	・ヒト iPS 細胞に係る研究の進捗及び再生医療の産業化を巡る国内外の動向について実時間で調査(海外現地調査を含む。)、検討、分析し、CiRA と協調しながら確立した「未分化のヒト iPS 細胞を、目的とする機能細胞への分化能を損なうことなく大量培養し、かつ凍結保存、解凍できる一連のヒト iPS 細胞の安定的な大量調整技術」について、FIRM と連携しながらその標準化案の骨子を作成する。	・用語標準化案の策定: ヒト幹細胞の定義が国際的に統一されていない現状を明らかにし、かつ ISO を巡る欧米の動向監視を実時間で継続し、有識者のコンセンサスに基づくヒト幹細胞種(含、前駆細胞)の定義に関する国際規格の国内案を実施計画5年に対して、2年にて達成した。 ・技術動向調査: 自動化装置の小型化及び一体化が欧米では共に開発途上にあることを確認し、本プロジェクト開発目標への速やかな反映を図った。	大幅達成

表 1-2 最終目標と達成見通し

開発項目	目 標	達成可能性	課題とその解決方法
① ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発 ①-1. 安定した培養に必要な自動培養装置、凍結保存装置の開発			
A.幹細胞自動培養装置の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・プロトコルが確定した幹細胞を大量培養できる小型の自動培養装置を開発する。現状の装置に対し、体積 1/2、培養量 10 倍を目標とする。なお、中間評価、および、ユーザーの要望を聞き、市場の最も求めるものを開発する。 	達成見込	<ul style="list-style-type: none"> ・培養量を増大させるため、装置で取り扱う培養容器数を増やす。現状では、増大した培養量を処理できないため、装置の処理速度の向上を図り対応する。 ・培養量増大化によりインキュベータ数が増え装置が大型化するが、増大した培養容器をインキュベータに効率的に収めることが出来るように改造し、装置を小型化する。
B.幹細胞自動凍結・解凍装置の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・装置の小型化を図り自動培養装置とマッチングさせた一連の自動化装置において、ヒト iPS 細胞を安定的に自動凍結・解凍可能なシステムを確立する。 	達成見込	<ul style="list-style-type: none"> ・既存の自動凍結保存装置は単独運用に限られ、また試料の収納数も比較的少ないため、今後のニーズをカバーしきれないと予想される。この課題を解決するため、装置規模を維持しながら高収納化を図り、さらに自動凍結保存装置の複数設置も考慮の上、ヒト iPS 細胞に適した自動凍結/解凍装置を組み込み、大量培養可能な自動培養装置と一連のシステムとして共同開発する。
C.幹細胞評価画像解析装置の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・幹細胞を安定に培養・保存する自動培養・保存装置と動作連携する各種幹細胞の品質を評価可能な非侵襲画像評価解析装置を確立する。 	達成見込	<ul style="list-style-type: none"> ・取得した画像の解析により品質評価する手法を細胞の状態により変更する必要がある。そのため、それらを自動選択できるようなソフトウェア、及びハードウェアを開発し、自動培養・保存装置と動作連携した非侵襲画像評価解析装置を確立する。
①-2. 幹細胞の安定供給に最適化した培養基材および培地の開発			
A.成分が明確かつ異種生物由来の成分を含まない培養基材の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ヒト幹細胞の安定した大量培養に適した高機能ラミニン活性フラグメントを完成し、その有用性を様々なヒト幹細胞株で立証する。 	達成見込	<ul style="list-style-type: none"> ・増殖因子制御型フラグメントの場合は、培地と一体化させた有用性の検証が必要となる。この課題を解決するため、国内培地メーカーと連携して本フラグメントに最適化させた組成の培地を共同開発する。 ・乾燥による失活を防ぐ安定化技術はほぼ目途がたっており、最終年度までにラミニン活性フラグメントおよびその改良型をプレコーティングしたディッシュの上市を目指す。
B.成分が明確かつ異種生物由来の成分を含まない培地および凍結保存液の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・成分が明確かつ異種生物由来成分を含まない培地の開発終了 ⇒最終目標の変更 最適培地を用いて、ラミニン活性フラグメントとの相性や自動化装置開発への適応性をさらに検証し、自動培養装置適応プログラムを確立する ・成分が明確かつ異種生物由来成分を含まない凍結保存液の開発終了 ⇒最終目標の変更 フィーダーフリーで培養された細胞の 	達成見込	<ul style="list-style-type: none"> ・最適培地のラミニン活性フラグメントとの相性や自動化装置開発への適用性が課題で、これらの検証を積み重ね、自動化装置の培養プログラムを確立する。 ・ラミニン活性フラグメントを用いた培養における凍結保存が課題で、自動培養と連動した自動凍結保存装置により凍結保存法を確立する。

	凍結保存に最適な凍結保存液を選択し、自動化システムを確立する		
② ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発			
②-1.ヒト iPS 細胞に係る技術等の標準化案の策定	<ul style="list-style-type: none"> ヒト iPS 細胞に係る研究の進捗及び再生医療の産業化を巡る国内外の動向について調査(海外現地調査を含む。)、検討、分析し、FIRMと連携しながら、ヒト iPS 細胞等幹細胞の技術に関する用語については、ISO/TC における新規作業項目提案(NWIP)採択を目指す。また、ヒト iPS 細胞の大量調整を容易にするための自動培養、凍結保存、及び非侵襲的 3 次元観察に係る基盤技術群の標準化案を作成する。 	達成見込	<ul style="list-style-type: none"> ヒト iPS 細胞等幹細胞の技術に関する用語の国際標準化ロードマップ確定:国内体制(FIRM/標準化WG)構築・ISO/TC276 主要メンバー国7カ国との国際連携強化を加速し、日本提案によるNWIP(H25年度)を経て、用語のISO規格化を達成する。 iPS細胞の大量調整に係る基盤技術群の体系化及び日本の秘匿コア技術の明確化:TERMIS(the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society)及びISO等の実時間動向監視・現地調査を強化し、医工連携・新規周辺産業振興の視点で、ISO提案も視野に入れて、基盤技術群の標準化案を作成する。

2.研究開発項目毎の成果

2.1 ヒト iPS 細胞の安定的な培養・保存技術の開発

2.1.1 幹細胞自動培養装置の開発

本プロジェクトでは、iPS 細胞の安定大量供給・保存や無侵襲画像解析システムなどの培養供給技術を整備し、適切な細胞を選別し iPS 細胞の実用化のため、CiRAと連携し、iPS 細胞の大量培養調製と保存の自動化システムを開発する。

そのために、自動培養装置と自動凍結・解凍装置との連携を実現させ、自動培養ロボットによる無菌的な凍結・解凍操作を実現した。

それに加えて、京大 CiRA 方式によるフィーダー細胞を用いた iPS 細胞の自動安定培養を実現した。

以下に、詳細について報告する。

2.1.1-1 フィーダー細胞を使った iPS 細胞の自動培養技術の開発

iPS 細胞の自動培養技術の開発を行うにあたり、必要となる各種機器を開発し、その開発機器を使った試験を効率的に実施するための試験スペースを有した細胞自動培養装置を開発し、研究開発用プラットフォームとして京都集中研に設置した。その概要を図 2.1.1-1-1 に示す。

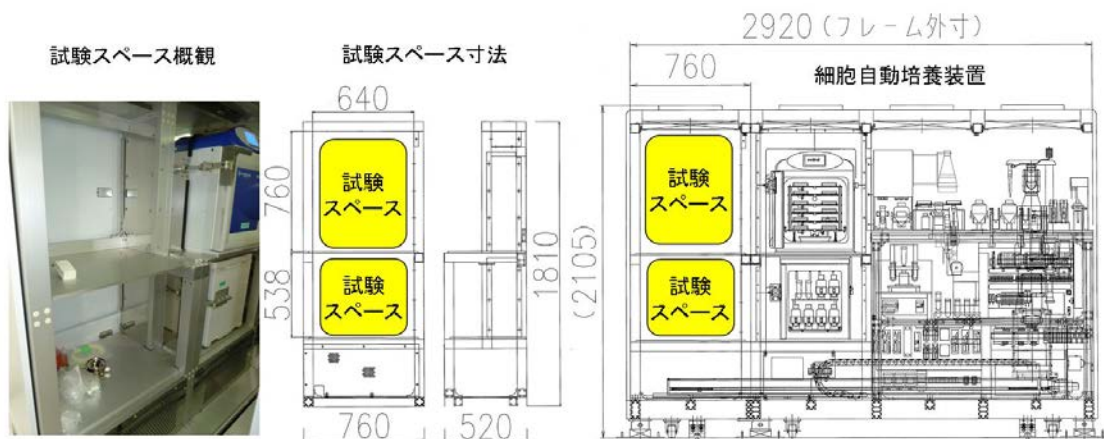


図 2.1.1-1-1 研究開発用プラットフォーム

このプラットフォームを使用すれば、要素試作した機器を試験スペースに設置し、ロボットの動作を追加することにより、簡単に要素試作機を組み込んだ培養試験を実施することが可能となり、研究開発の効率化を図ることができる。

今回の研究開発のベースとなった自動培養装置では、成育医療研究センターにて樹立された iPS 細胞の MRC5 由来#25 株などで、フィーダー細胞としては MEF を使った自動培養において実績はあるものの、201B7 などの京大株の自動培養実績は無かった。

そこで、京大株 201B7 に対して京大 CiRA に倣ってフィーダー細胞に SNL を使った自動培養の実現を目指した。まず装置にて、iPS 細胞の剥離試験、生着試験などの要素試験を実施し、個別の操作が自動培養装置にて実施可能であること確認したうえで、5 継代の自動培養試験を行った。その時のスケジュールを図 2.1.1-1-2 に示す。

フィーダー細胞の SNL の播種は人が行うため、この作業が土日にならないようにスケジュールを組んだ。培地交換、継代培養などの作業は土日でも自動で実施されている。

月	火	水	木	金	土	日
2/27	28	29	3/1	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
		SNL播種	試験開始 継代1回目	培地交換	培地交換	培地交換
12	13	14	15	16	17	18
培地交換 SNL播種	継代2回目	継代2回目	培地交換	培地交換	培地交換	培地交換
19	20	21	22	23	24	25
培地交換 SNL播種	継代3回目	培地交換	培地交換	培地交換 SNL播種※	培地交換	継代4回目
26	27	28	29	30	31	4/1
培地交換	培地交換	培地交換 SNL播種	培地交換	継代5回目	培地交換	培地交換
2	3	4	5	6	7	8
培地交換	培地交換	評価試験				

図 2.1.1-1-2 5 継代培養のスケジュール

本試験での位相差顕微鏡画像および 5 継代培養試験を行った後の評価試験結果を図 2.1.1-1-3 に示す。ES 細胞様のコロニーの形態が確認でき、ディッシュ全体のコロニーが陽性となることが確認できた。また、主な未分化マーカーの発現も確認できた。なお、培養結果の評価については、成育医療研究センターが実施した。

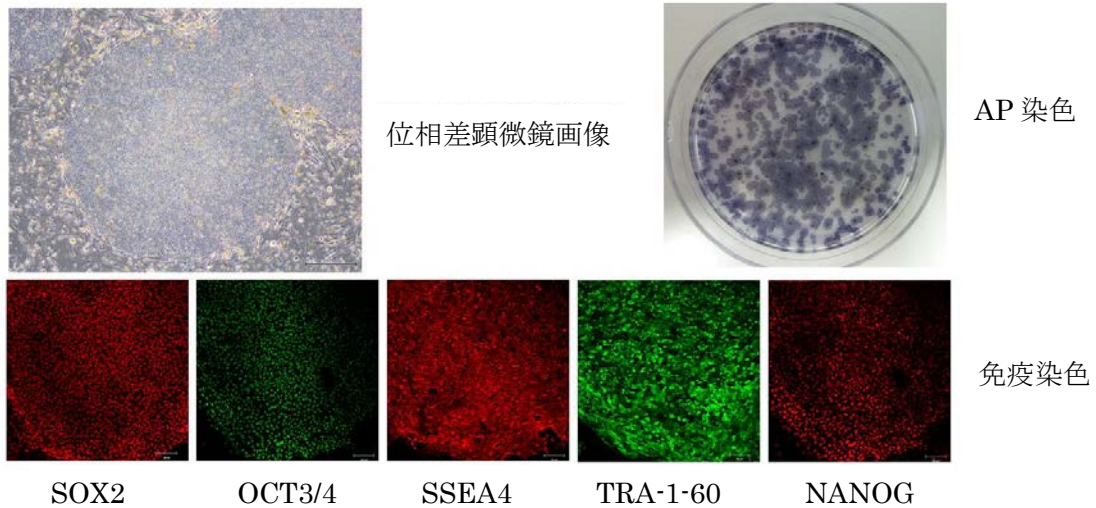


図 2.1.1-1-3 5 継代培養評価結果

京大株 201B7 の 5 継代の自動培養を未分化状態を維持して、実施することが出来た。次には、より継代数を重ねた場合も未分化状態を維持した自動培養が可能であるかを確認するため、京大株 201B7 で 15 継代の自動培養試験を実施した。その時のスケジュールを図 2.1.1-1-4 に示す。やはり、手作業となるフィーダー播種作業が平日になるようにスケジュールを組んだ。

Mon	Tue	Wed	Thu	Fri	Sat	Sun
9/24	25	26	27	28	29	30
		F	P1			
10/1	2	3	4	5	6	7
F	P2			※F		P3
8	9	10	11	12	13	14
		F		P4		
15	16	17	18	19	20	21
F		☆P5				
22	23	24	25	26	27	28
F	P6			※F		P7
29	30	31	11/1	2	3	4
		F		P8		
5	6	7	8	9	10	11
F		☆P9				
12	13	14	15	16	17	18
F	P10			※F		P11
19	20	21	22	23	24	25
		F		P12		
26	27	28	29	30	12/1	2
F		☆P13				
3	4	5	6	7	8	9
F	P14			※F		P15
10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28	29	30
31						

P: 継代、F: フィーダー播種、☆: 継代間隔6日

図 2.1.1-1-4 15 継代培養のスケジュール

15 継代培養後の評価試験結果を図 2.1.1-1-5 に示す。ディッシュ全体のコロニーが陽性となることが確認でき、また、主な未分化マーカーの発現も確認できた。

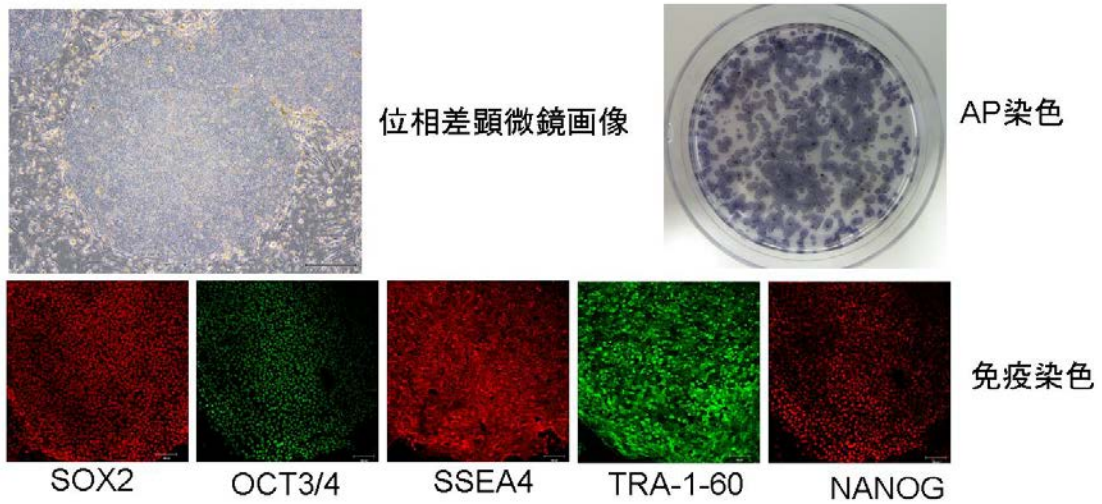


図 2.1.1-1-5 15 継代培養評価結果

フィーダー細胞を使った iPS 細胞の自動培養では、フィーダー細胞を播種したディッシュの準備作業が必要であり、この作業は図 2.1.1-1-6 に示すように、大変手間のかかる作業である。

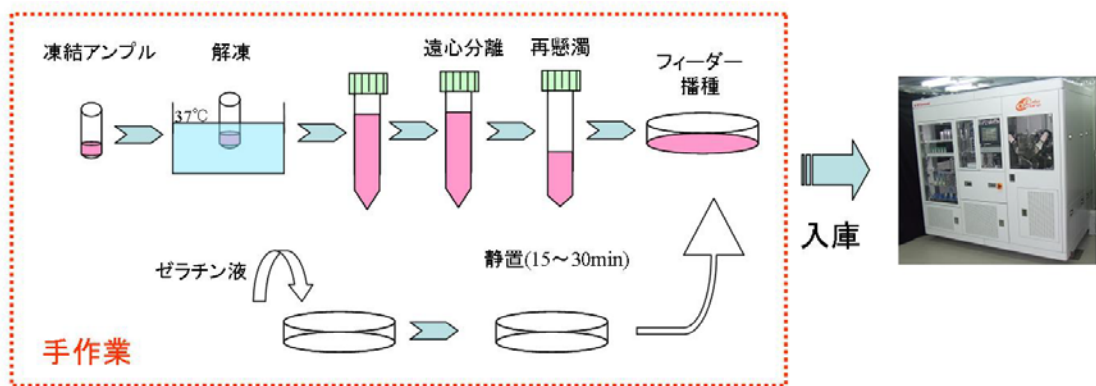


図 2.1.1-1-6 フィーダー細胞の準備作業

そこで、フィーダー細胞のディッシュを自動培養装置で自動準備出来る機能を開発した。図 2.1.1-1-7 に示すように、解凍したフィーダー細胞を装置に入れば、後の作業は自動で行えるようになった。

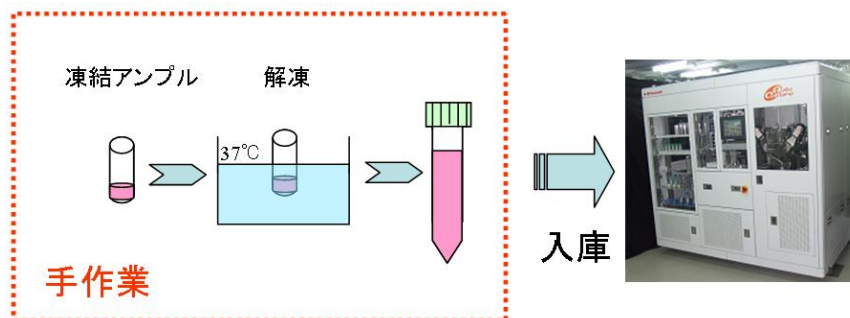


図 2.1.1-1-7 自動化されたフィーダー細胞の準備作業

2.1.1-2 自動凍結・解凍装置との連携のための自動培養技術の開発

自動培養装置と自動凍結・解凍装置および評価画像解析装置とを連携させるため、京都集中研では、図 2.1.1-2-1 に示すように 3 台の装置を設置した。自動培養装置と自動凍結・解凍装置とは既に、ハード的およびソフト的な連携が可能な状態となっている。自動培養装置と評価画像解析装置とは、まだハード的な連携は出来ていないが、連携のための開発を進めている。



図 2.1.1-2-1 京都集中研での装置の設置状況

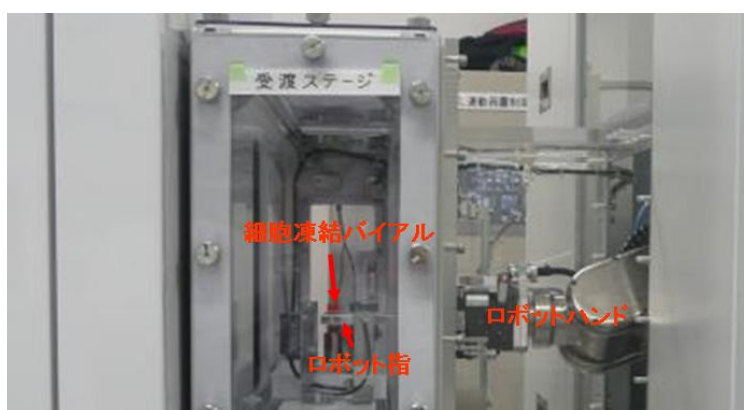


図 2.1.1-2-2 受渡ステージでのバイアルの受渡し

自動培養装置と自動凍結・解凍装置との間でのバイアルの受渡しは、それぞれの装置が受渡ステージにあるバイアル用スタンドにバイアルを設置する方式により実現した(図 2.1.1-2-2)。ソフト的にはバイアルの凍結方向では、自動培養装置からの指令によって、自動培養装置のロボットが搬送してきたバイアルを予備凍結し、引き続いて凍結保存される。バイアルの解凍方向では、自動培養装置からの指令によって、指定されたバイアルが凍結保存装置から取り出され、引き続き解凍作業が行われた後、自動培養装置のロボットへとバイアルが渡される。

自動培養装置内で安定的にバイアルを取り扱うためには、ハード的にはバイアルのキャップの開閉を行うことが必要になるとともに、バイアルを固定するためのバイアル用スタンドの設置、ならびにバイアルを安定把持するためのロボットの指の改造を行った。

2.1.1-3 画像解析装置との連携のための自動培養技術の開発

画像解析装置と自動培養装置とは現状機械的な連携は出来ていないが、これからの連携実現に向け、まずは培養容器の受渡し技術の確立を図った。自動培養装置内で取り扱ったディッシュを画像解析装置に渡して画像解析を行うが、その際安定した画像を取得するためには、同じ

コロニーを確実に観察できるための位置決め精度が必要となる。位置決め精度を確保するために、治具を試作した。

受渡し治具にディッシュを固定し、画像解析装置内では、受渡し治具を高精度に位置決めすることにより、必要とされる高精度のディッシュの位置決めを実現した。自動培養装置内では、受渡し治具を円形の治具で受けることにより、通常のディッシュと同様に操作することができるようにした。自動培養装置内で自動培養を行いながら、毎日手動操作で画像解析装置にディッシュを渡し、ディッシュ上の定点観察を行った結果を図 2.1.1-3-1 に示す。正しく位置決め出来て、狙ったコロニーが日々増殖していく様子を観察することが出来た。

今後、培養容器の受渡しを自動で行えるようにし、自動でこのような画像を記録し、自動品質判定も可能となる装置にまとめあげる計画である。

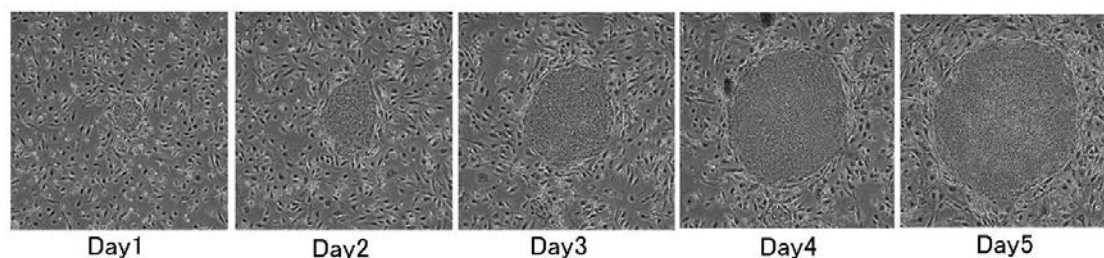


図 2.1.1-3-1 継代からの定点観察(1日目から5日目まで)

2.1.1-4 フィーダー細胞を使った iPS 細胞の自動培養技術の評価

自動培養装置の評価をヒト iPS 細胞の評価を通して効果的に行うために、培養条件の確定を第一に行った。CiRA での培養を基準にフィーダー細胞下で山中 iPS 細胞株 201B7 と 409B2 により培養評価を行った。重要な評価項目として、手培養と自動培養装置によって培養したヒト iPS 細胞の評価を形態評価、幹細胞マーカー発現そして定量 PCR による遺伝子発現解析を選定した。さらに、自動培養装置下で長期培養後の細胞評価のため、自動培養装置で 15 継代した 201B7 と 409B2 細胞株の定量的遺伝子発現解析を行った。

表 2.1.1-4-1 ヒト iPS 細胞用培地(国内外市販)の検証結果(フィーダー細胞使用条件)

	フィーダー細胞	
培地	201B7	409B2
培地 A	○	○
培地 B	○	○
培地 C	△	△
培地 D	○	○
培地 E	○	○

培地評価については、培地開発(2.1.5)の項目でも報告するが、フィーダー細胞(SNL)条件下で山中細胞株であるヒト iPS 細胞、201B7 と 409B2 の 2 つを用いて、培地を国内外の 5 種を選定し未分化維持性について 3 継代培養し評価を行った(表 2.1.1-4-1;赤字:国内製品, 評価:△; 培養維持できたが分化コロニーの割合が 50%を超える状態. ○;良好に維持できる.)。CiRA 培養方法として使用されてきた培地 A が成育拠点でも問題なく使用可能であった(図 2.1.1-4-1)。培地 A を候補培地として選定し、201B7 と 409B2 細胞株の統一ロット管理が可能な細胞ストックの作製を行った。手培養と自動培養装置下でのヒト iPS 細胞特性を評価するため、幹細胞形態、未分化マーカーアルカリンフォスファターゼ(ALP)染色と定量PCR解析を行った。自動培養装置下でヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞特徴的なコロニー形態(辺縁明瞭でフラット)と ALP 染色陽性であった(図 2.1.1-4-1~図 2.1.1-4-4)。さらに、90 幹細胞マーカーに対する定量PCR解析の結果、手培養下 iPS 細胞と自動培養装置(継代 5)によるヒト iPS 細胞は近似した品質であることを確認した(相関係数 0.726-0.829)。



図 2.1.1-4-1 自動培養装置によるヒト iPS 細胞評価
(位相差顕微鏡撮影 上段:201B7 下段:409B2)

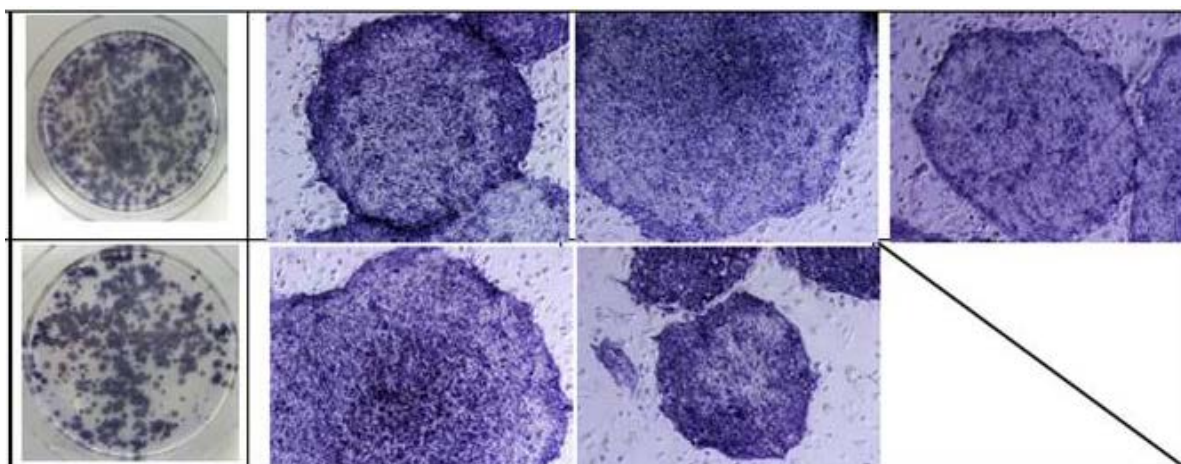


図 2.1.1-4-2 自動培養装置によるヒト iPS 細胞評価
(AP 染色 上段:201B7 下段:409B2)

・ 免疫染色

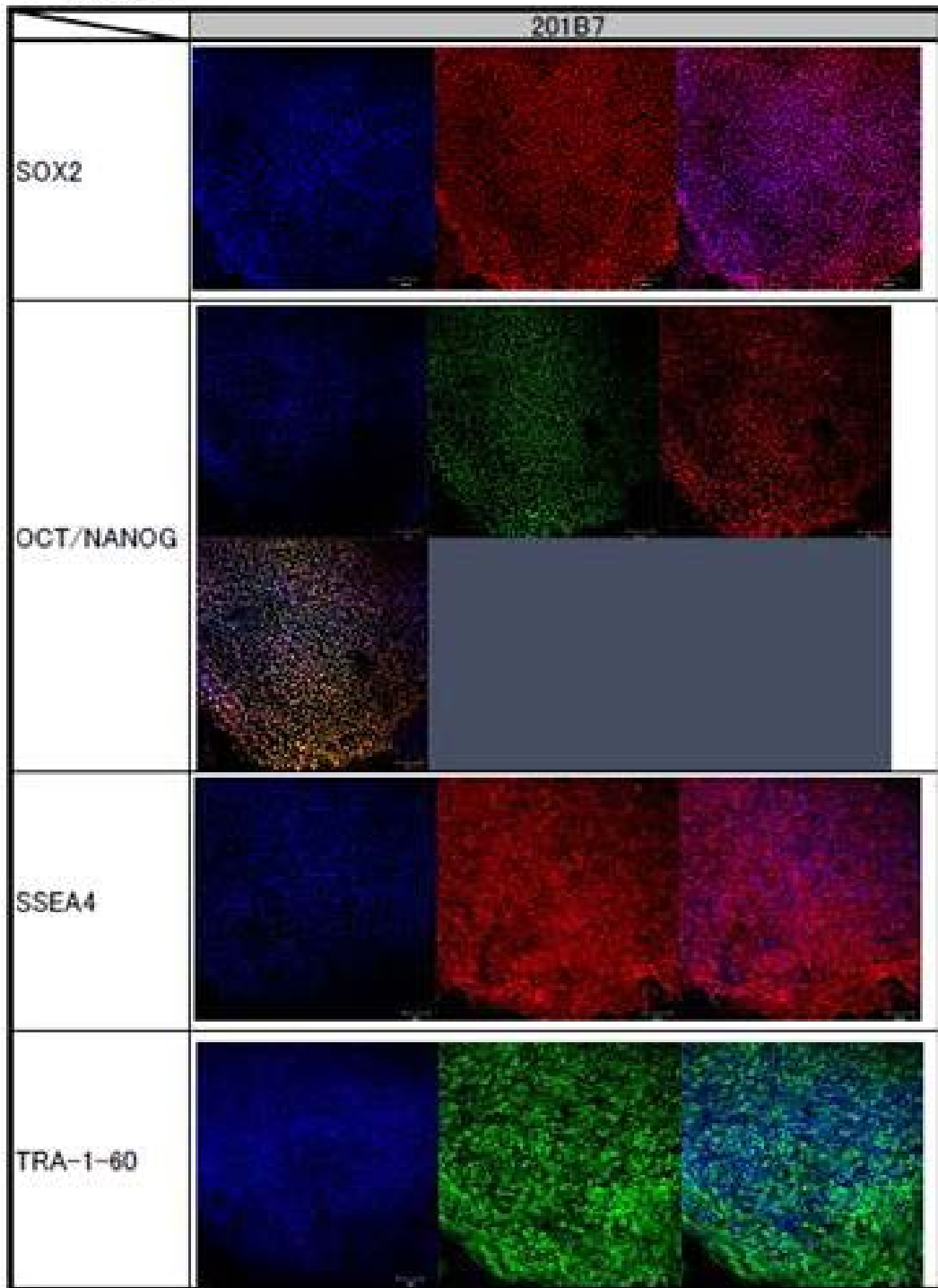


図 2.1.1-4-3 自動培養装置によるヒト iPS 細胞評価 (201B7 の免疫染色)

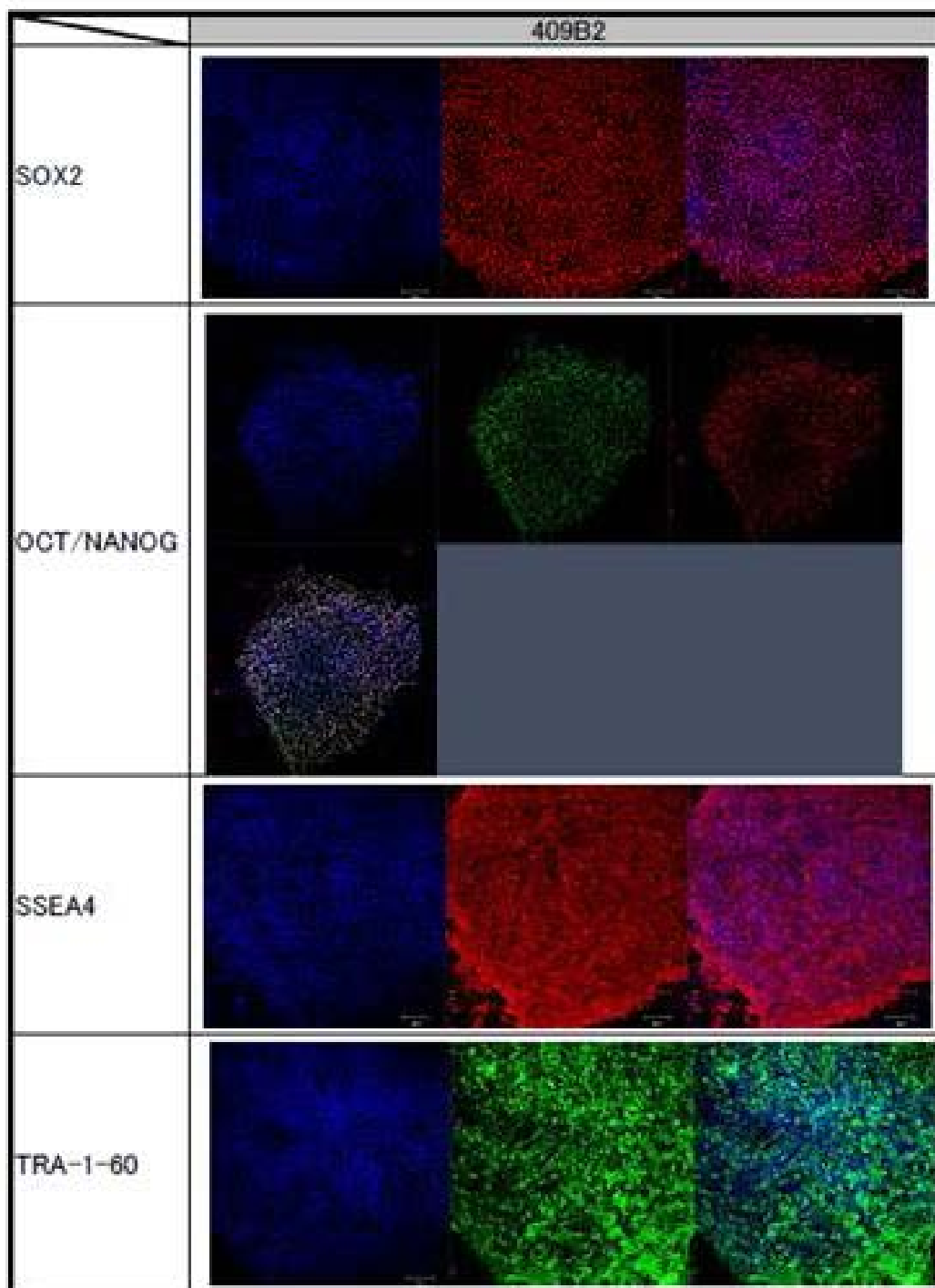


図 2.1.1-4-4 自動培養装置によるヒト iPS 細胞評価 (409B2 の免疫染色)

CiRA 法であるフィーダー細胞 (SNL) 使用し培地 A 培地下で培養した 201B7 と 409B2 細胞の統一ロットストックを作製した。201B7 と 409B2 細胞をそれぞれ 97 本と 99 本ホームストックとして構築した。これにより、自動培養装置および自動凍結保存装置の評価を上記細胞株で行なっている。各開発で均一したサンプルによる評価を行うことで、連関した評価が可能となる。手培養によるホームストックと自動培養装置により 5 継代培養したヒト iPS 細胞を定量 PCR 解析により幹細胞マーカーの評価を行った。201B7 細胞および 409B2 細胞ともに手培養との 90 遺伝子数の定量遺伝子発現解析の結果、相関係数は 0.726-0.829 で近似しており自動培養装置によるヒト iPS 細胞は手培養と同等の培養精度があることが示された (図 2.1.1-4-5)。

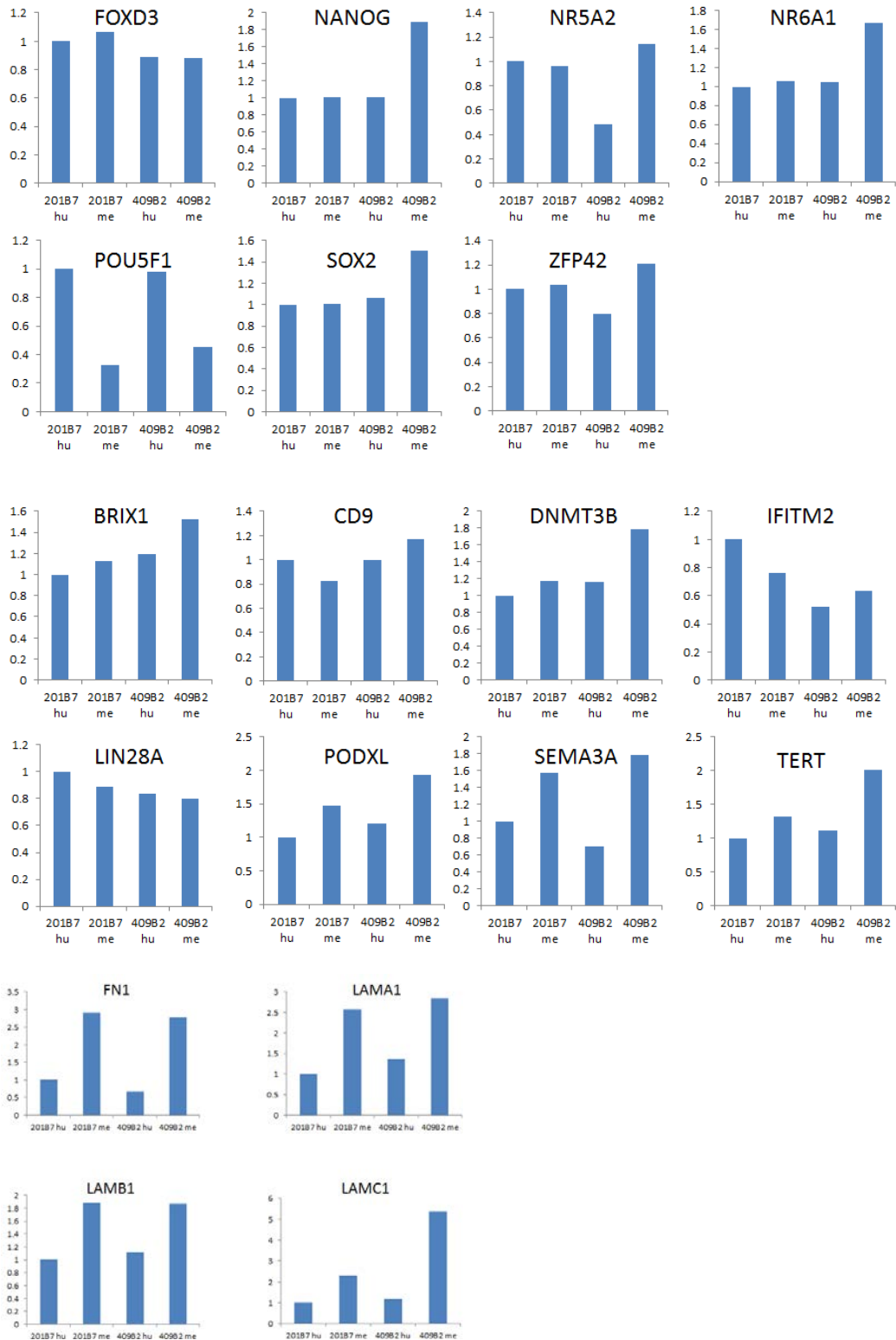
自動培養下(継代5)と手培養(マザーストック)では明確に区別できない



図 2.1.1-4-5 自動培養装置と手培養によるヒト iPS 細胞評価: 定量 PCR 解析 1

201B7 のホームストックの定量 PCR データを 1 として、自動培養装置下 201B7 と 409B2iPS 細胞の幹細胞マーカー結果を示す(図 2.1.1-4-6; hu; 手培養, me; 自動培養装置による培養)。自動培養装置でも幹細胞マーカーの発現動態の乱れは認められなかった。つまり、自動培養装置(5 継代)でのヒト iPS 細胞(フィーダー細胞有)は分子レベルでも未分化性が維持されていることが判明した(図 2.1.1-4-6)。

遺伝子発現相対比(201B7ホームストックの遺伝子発現量を1とした)



か

図 2.1.1-4-6 自動培養装置と手培養によるヒト iPS 細胞評価: 定量 PCR 解析 2

自動培養装置の長期培養(継代数 15)の評価も定量遺伝子発現解析により行った(図 2.1.1-4-7; hu; 手培養(赤)、me; 自動培養装置による培養(青))。15 継代を経ても安定した培養が可能であり、幹細胞マーカーの免疫染色(図 2.1.1-4-8)や多数の定量的な遺伝子発現解析からも自動培養装置によるヒト iPS 細胞培養(フィーダー細胞有)の安定性が十分に示された。

自動培養装置培養：継代評価

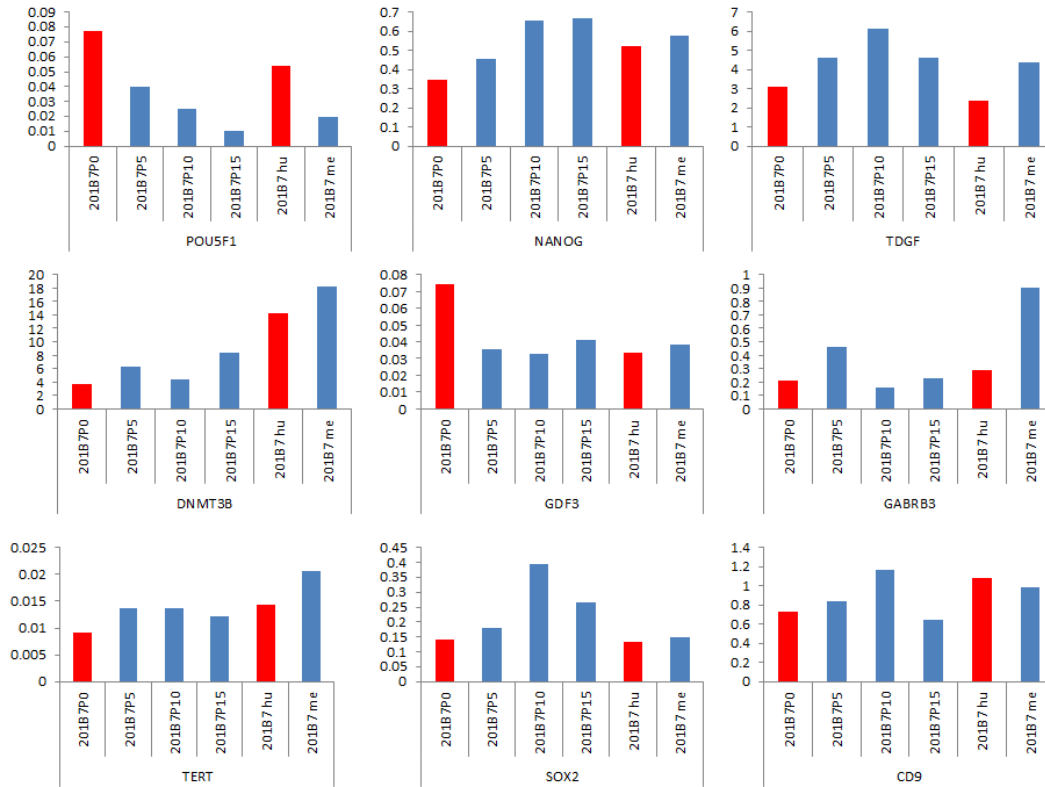


図 2.1.1-4-7 自動培養装置による長期培養のヒト iPS 細胞評価：定量 PCR 解析

201B7 Passage 15

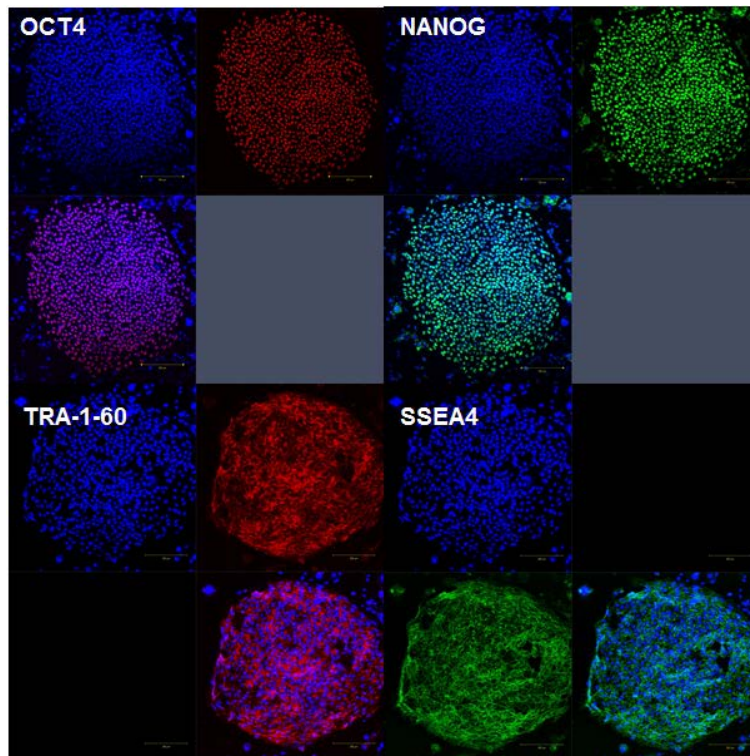


図 2.1.1-4-8 自動培養装置による長期培養のヒト iPS 細胞幹細胞マーカー

自動培養装置の評価を細胞のロット統一したヒト iPS 細胞のホームストックを作製することで、安定して比較検討できるバイオツールを構築した。さらに、「良く培養できている」ということを最も重要な細胞形態のみならず、より客観的に評価できるように 96 遺伝子 (うち 6 遺伝子は内在性コントロール) の定量発現解析が有用であることを示した。これは、基本となる統一ロットの基盤データを基準とすることでより効果的に判定可能となっている。

さらに、自動培養装置の評価を定量的かつより簡易的に行うことができれば、開発が促進できると考え、本開発プロジェクトで得た膨大な定量 PCR 解析データから分化・未分化の判定式を作成した。39 細胞 (分化 12、未分化 27) から分化細胞、未分化細胞をそれぞれランダムに抽出し、訓練データセットと検証データセットを作成した。訓練データセットを用いて、2⁸ 遺伝子の全組み合わせを変数とした 2.1.47 通りの式を作成し、検証データセットによるブラインドテストを行い最も判別率の高い式を見出した (図 2.1.1-4-9)。自動培養装置で継代培養した細胞を判定式で判別した結果、他の特性解析と齟齬のない結果であった (図 2.1.1-4-9)。特定遺伝子の定量発現による判定式が簡便に「良く培養できている」状態を評価でき、開発プロジェクトの加速化に貢献できる。

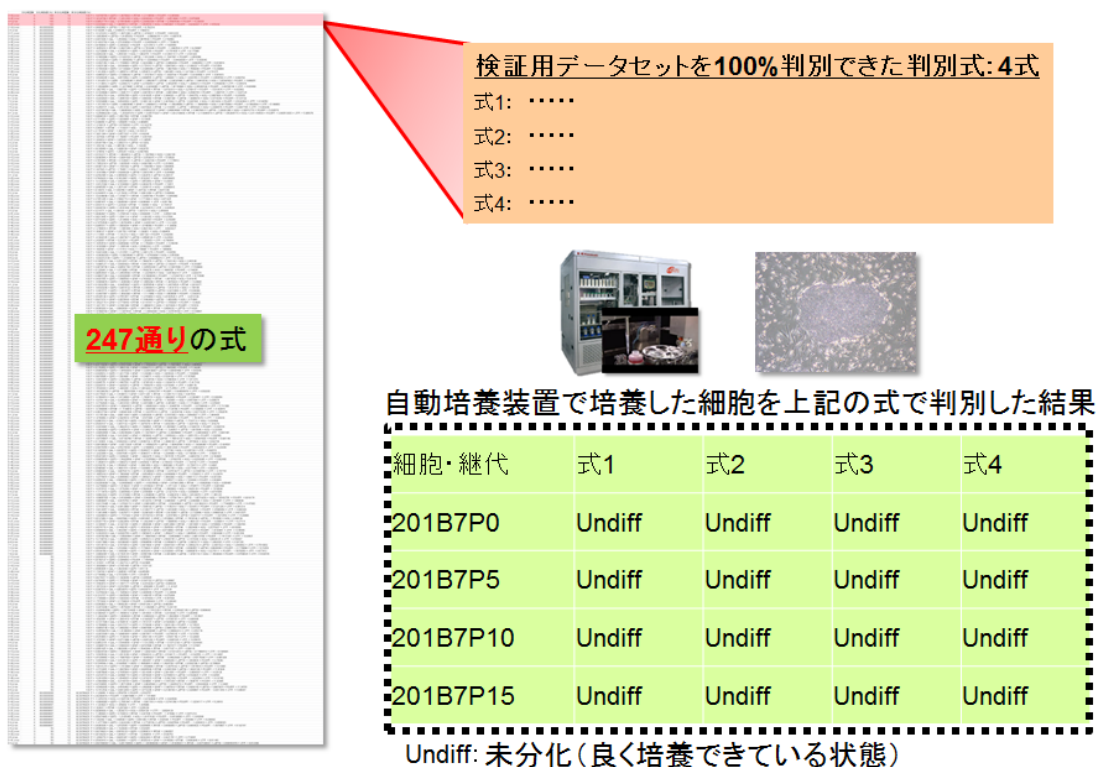


図 2.1.1-4-9 判定式作成と自動培養装置継代培養の評価

2.1.2 幹細胞自動凍結・解凍装置の開発

2.1.2-1 iPS 細胞の自動凍結・解凍技術の開発

(1) 事業の目的と背景

幹細胞の製造技術を考えた場合、細胞凍結保存の必要性は非常に高い。しかも、ほとんど人の手を介さずに自動的に目的の細胞を凍結保存し、また自動的に、そして正確にその情報を管理できる事は大変重要である。

本開発では、太陽日酸㈱が保有する自動凍結保存装置の技術を基に、iPS 細胞用の自動予

備凍結装置及び自動解凍装置を開発し、プロセスを最適化し、さらに自動培養装置との連動を可能としたシステムとする。

・ベースとする自動凍結保存システム

太陽日酸株が製品として発売している自動凍結保存システム“クライオライブラリー®”（図 2.1.2-1-1）の基本仕様として、凍結保存容器は真空断熱式容器を用い液体窒素を冷媒とした気相保存によって-170～-180℃の安定した温度域に保存可能である。バイアル1本毎の管理が可能で、パソコンによる試料情報管理と、バーコードの自動読み取りにより、バイアルの保存場所管理が可能となっている。

- ・保存方式:液体窒素 気相式
- ・収納形態:ケーン方式
- ・収納本数:3,128 本(2cc バイアル)
- ・外径寸法:幅 1,150mm 奥行 1,320mm 高さ 2,235mm



図 2.1.2-1-1 自動凍結保存システム“クライオライブラリー®”

ヒト iPS 細胞の凍結保存には、これまで、ガラス化法が使われることが多かったが、凍結保存液を細胞に添加してから凍結を完了するまで短時間で行う必要があり、結果が実施する人の技量に左右された。自動化においては、凍結保存液を細胞に添加してから予備凍結を開始するまでの時間を考慮して緩慢凍結法を採用し、ばらつきの小さい結果を目指した。既に予備凍結から凍結保存までを自動化し、平成22年度までに凍結解凍後の細胞生存率を平均で 50%以上を実現したが、更にこれまで手動で行っていた解凍プロセスの自動化及び、自動培養装置との連携に必要な機能の開発を行う。予備凍結についても最適化を行い、自動培養装置の処理能力に適合させる。

これらにおいては、自動培養装置との連携に必要な機能を開発し、予備凍結処理は自動培養装置の処理能力に適合させた上で機能を最適化する。細胞は、京都大学ヒト iPS 細胞株(201B7 及び 409B2)を用い CiRA と連携した評価を行い、自動培養装置からの細胞を自動搬送して予備凍結、凍結保存、解凍までの一連のプロセスを完全自動化する。また自動凍結保存装置は市場ニーズに合わせてコンパクトな高収納型装置として開発する。

(2)事業の目標

中間目標(平成 25 年度末)

- ・自動培養装置とマッチングさせた一連の自動化装置を開発する。
- ・ヒト iPS 細胞で凍結解凍後の細胞生存率を平均 80%以上とする。

ヒト iPS 細胞において自動化による予備凍結、凍結保存、解凍後の生細胞率(解凍後生細胞数/凍結前生細胞数×100)において従来のガラス化法で規定通り実施した場合と同等の80%以上とし、解凍後培養した細胞の性状が正常である事を確認する。

最終目標(平成 27 年度末)

- ・装置の小型化を図り自動培養装置とマッチングさせた一連の自動化装置において、ヒト iPS 細胞を安定的に自動凍結・解凍可能なシステムを確立する。

2.1.2-2 自動培養装置との連携のための自動凍結・解凍技術の開発

(1) 自動培養装置との連携

既存の自動凍結保存装置を基に、自動培養装置との連携を検討し、自動予備凍結装置、自動解凍装置及び、連携用搬送装置を組み込んだ装置の試作を行った(図 2.1.2-2-1)。



図 2.1.2-2-1 自動培養装置、自動凍結保存装置連携試作

試作機ではバイアル単位の入出庫データの送受信による連携制御を実施しデータ管理を行う。バイアル凍結保存の際は、自動培養装置で凍結保存液に交換し、凍結保存用バイアルに詰め替えた後、凍結保存装置に移送して、バイアル収納具(ケーン)に収納し、最大8本のバイアルを1ロットとして凍結保存装置内に設置した予備凍結装置で液体窒素冷媒によるプログラムフリージングにより予備凍結を行う(図 2.1.2-2-2)。

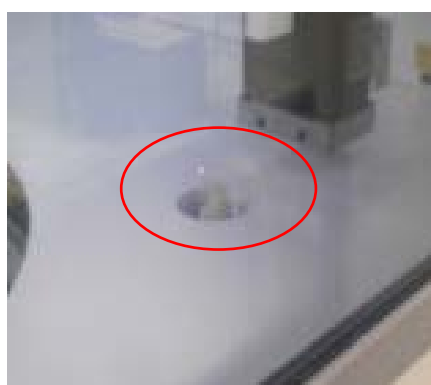


図 2.1.2-2-2 自動予備凍結装置

予備凍結完了後、自動的にケーン単位で凍結保存容器の保存場所に搬送し、凍結保存容器内に保存する(図 2.1.2-2-3)。

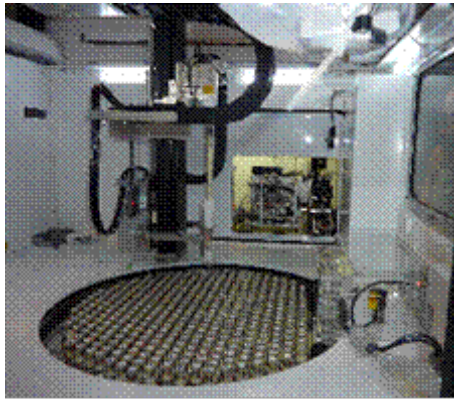


図 2.1.2-2-3 凍結保存容器収納部

なお、予備凍結際、バイアルはケーンのアルミ製の鞘管の中に収納されており、液体窒素冷媒に直接曝露しない。また、凍結保存容器内ではバイアルは気相部に保存され、液体窒素に直接浸漬することが無いため、凍結したバイアルの汚染の可能性は抑制できる。

バイアル解凍の際は、自動培養装置からのデータ通信による指示により自動的に指定バイアルの出庫が行われ、搬送装置内に設置したアルミブロック式解凍装置による解凍を行う。

アルミブロック方式の解凍は、ドライな環境での実施が可能のため、従来の湯せん法に比べ、作業時の汚染の可能性を著しく抑制することができる(図 2.1.2-2.1.4)。

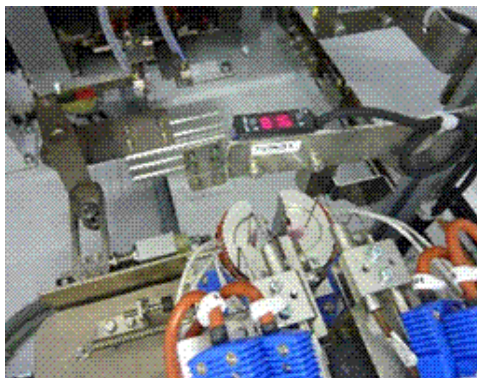


図 2.1.2-2.1.4 自動解凍装置

2.1.2-3 自動凍結・解凍後のヒト iPS 細胞評価

(1) 緩慢凍結法による iPS 細胞の自動凍結評価用プロトコル

自動凍結保存装置の自動培養装置との連携に向け、緩慢法による iPS 細胞の自動凍結用プロトコルを検討し以下の通りとして評価を行った(図 2.1.2-3-1)。

・凍結プロトコル

- ① hiPS 培地を調製。
- ② 培養皿各々に、所定量の hiPS 培地を加え、37°C でインキュベート
- ③ 分化しているコロニーを除去
- ④ hiPS 培地を除去し、PBS で洗浄する
- ⑤ PBS を除去し、CTK 液を加え、37°C でインキュベート
- ⑥ フィーダー細胞が剥がれたら、CTK 液を吸引
- ⑦ ピペットマンで、PBS を添加して、洗浄
- ⑧ PBS を除去し、hiPS 培地添加

- ⑨ ピペットマンで、ピペッティングにより、細胞を剥がし、細胞懸濁液を遠心チューブに回収
- ⑩ 遠心チューブに、回収した細胞懸濁液を分注
- ⑪ 遠心操作
- ⑫ 遠心チューブから、上清を除去し、hiPS 培地を加えて、ピペットマンを用いて、再懸濁
- ⑬ 遠心チューブの上清を除去し、凍結保存液を加えて、ピペッティング操作を行い、再懸濁
- ⑭ 氷上の凍結バイアルにサンプルを移し、自動凍結保存装置で予備凍結後、保存

・解凍プロトコル

- ① hiPS 培地ボトルから遠心チューブの培地を移し、常温に戻す。
- ② hiPS 培地を調製し、37℃で保温する。
- ③ hiPS 培地を常温に戻した後、自動凍結保存装置から凍結バイアルを出庫する。
- ④ アルミブロック式解凍装置にて解凍する。
- ⑤ 解凍後、ピペットマンを用いて、常温の hiPS 培地凍結バイアルに加え、ピペッティング操作により、遠心チューブに移す。
- ⑥ 遠心操作を行う。
- ⑦ 遠心チューブ 1 本から上清を除去し、hiPS 培地を加えて、ピペッティング操作を行い再懸濁する。

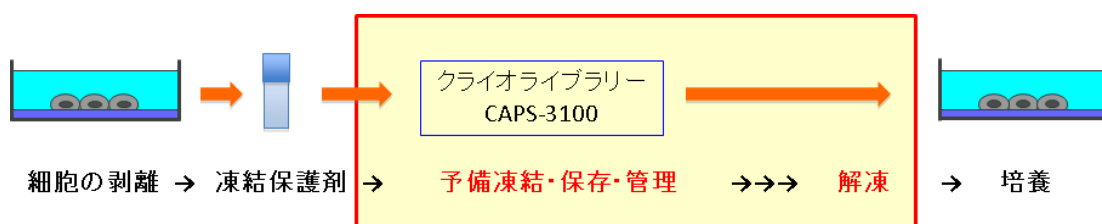


図 2.1.2-3-1 凍結解凍評価のフロー

(2) 緩慢凍結法による予備凍結プログラムの検討

予備凍結プログラムは当初、ディープフリーザーと簡易凍結容器を用いた簡易緩慢法により行い、1ロットの予備凍結処理に約4時間かかった。しかし解凍後の生細胞率の向上と自動培養装置とのマッチングを考慮し、4℃から-80℃迄を45分とした。

但し、予備と凍結プログラムについてはさらに検討を行い、時間短縮による処理の効率化を検討する。

(3) 自動解凍装置の検討

解凍は手培養では湯煎を使うことが多いが、コンタミ防止や将来の GMP 対応を考慮し、アルミブロック方式の解凍装置を採用した。アルミブロックを予めヒーター制御により37℃に保温しておく。1本毎に出庫した凍結バイアルを半割形状のアルミブロックで挟み込み解凍を完了する。解凍後、自動培養装置に搬送され培地交換後、再培養される。

(4) 凍結解凍後の生細胞率と細胞性状評価

自動培養装置単独での評価による生細胞率(解凍後生細胞数/凍結前生細胞×100)において検討を実施したところ、平均で80%を上回る生細胞率が確認できた(図2.1.2-3-3)。なお、細胞数の計測には自動カウント装置を用いた。但し結果のやや劣る 201B7 については、今後N数を

増やして確認を進める。

なお、凍結保存液として血清を含まない市販の凍結保存液(A)を用い、緩慢凍結法による予備凍結を行い、解凍後、再培養の際、Rock 阻害剤を添加することによって解凍後の生細胞率の向上及び、コロニー形成において好結果が得られた。

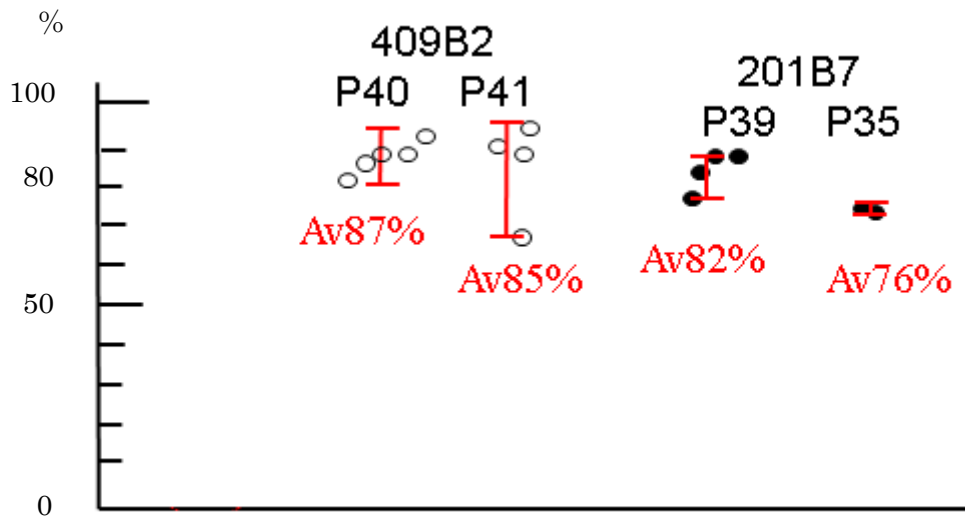


図 2.1.2-3-3 解凍後生細胞率

なお、iPS 細胞の性状評価として国立成育医療研究センターの指導のもと、ALP 染色による凍結解凍後の培養細胞の未分化能確認及び、未分化マーカーによる確認、細胞表面マーカーによる確認、核型解析による確認を行い正常であることを確認した(図 2.1.2-3-4~8)。

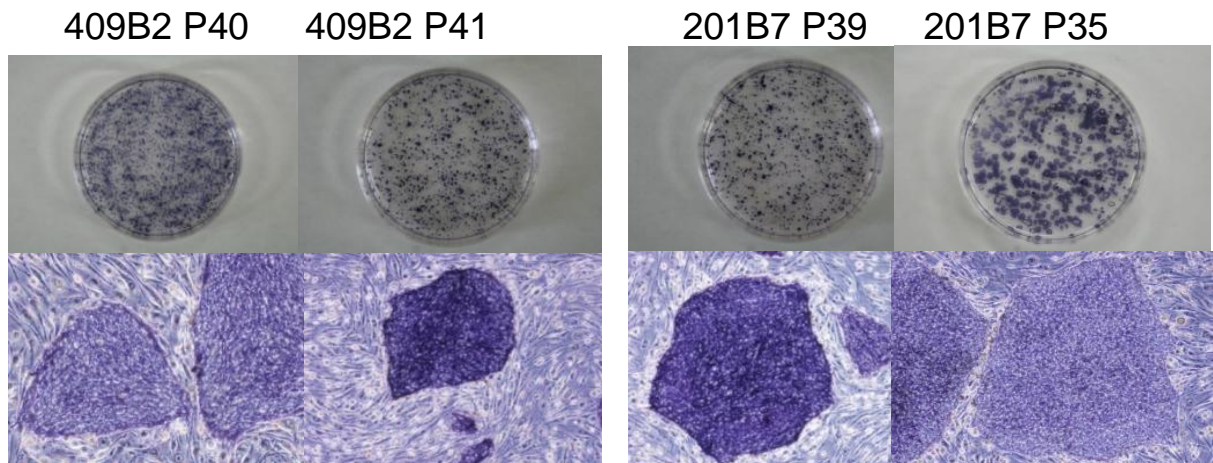


図 2.1.2-3-4 ALP 染色による未分化能確認

免疫組織化学染色 未分化マーカー (409B2株 解凍後)

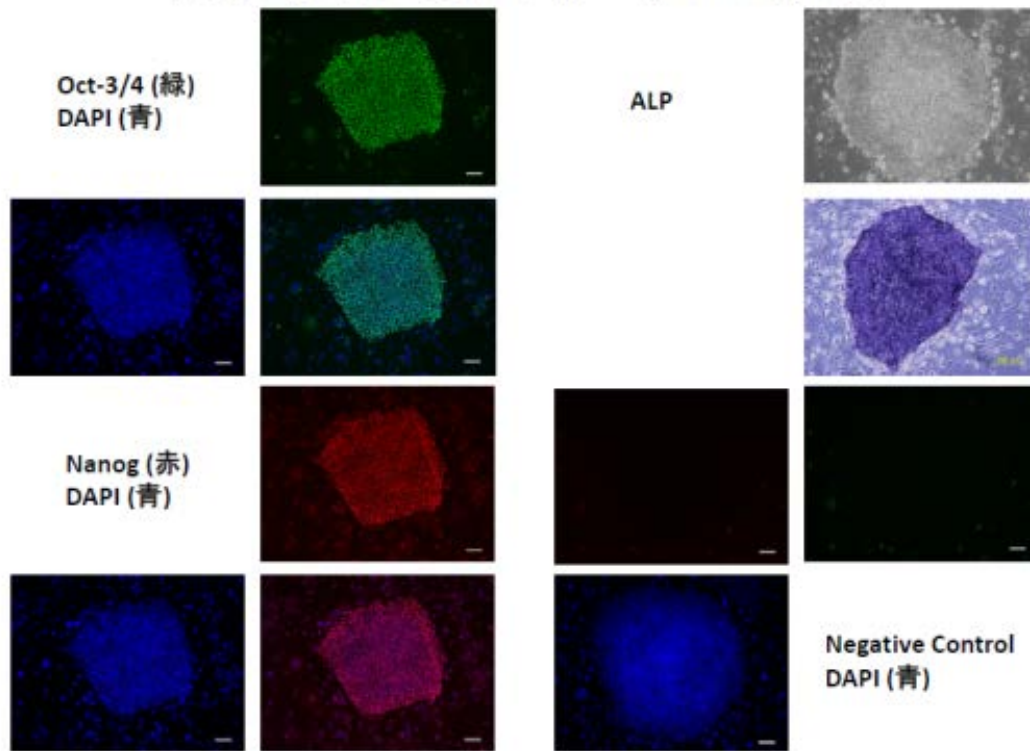


図 2.1.2-3-5 未分化マーカーによる確認

免疫組織化学染色 細胞表面マーカー (409B2株 解凍後)

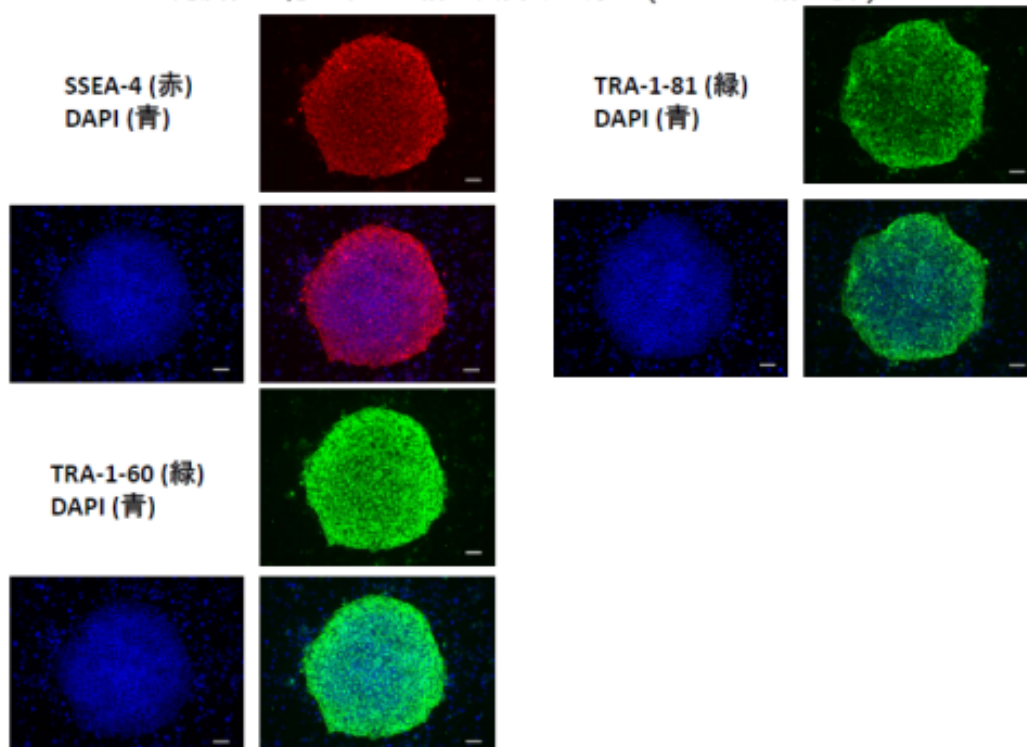


図 2.1.2-3-6 細胞表面マーカーによる確認



図 2.1.2-3-7 核型解析による確認/凍結前(409B2 株)



図 2.1.2-3-8 核型解析による確認/解凍後(409B2 株)

また、自動培養装置との連動による自動凍結、解凍後、再培養を行った場合においてもヒトiPS細胞のコロニーが形成することを確認できた(図 2.1.2-3-9)。

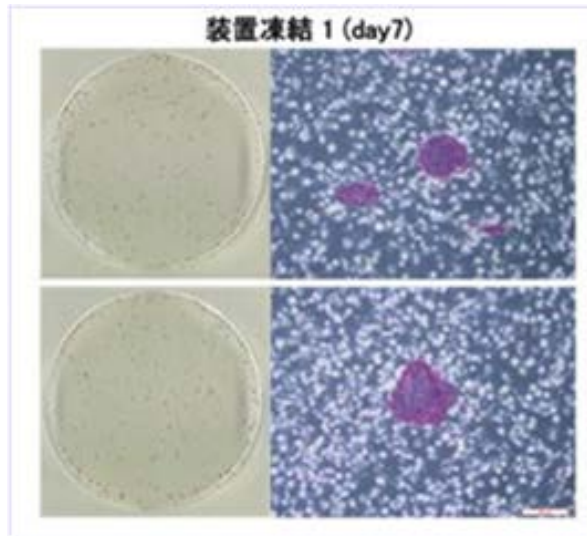


図 2.1.2-3-9 解凍後再培養したコロニー・ALP 染色(培養 7 日)

2.1.2-4 自動凍結保存装置コンパクト化による高収納化のための開発

既存の自動凍結保存装置のバイアル収納数は 3,128 本だが、市場調査の結果バイアルの収

納数は既存装置の倍程度は必要と判断し、実証装置においては、既存装置と同様の設置占有面積でバイアル保存数は増加させる開発を行う事とした。これまでに高収納化の要素技術の検討を行い、一部実現に向けての目途をつけた。

主要要素技術として、液体窒素気相温度域(-196℃～-180℃)において容器内のトレイを回転制御し、庫内に収納したバイアル収納具(ケーン)を入出庫可能なことを確認した。

2.1.3 幹細胞評価画像解析装置の開発

2.1.3-1 幹細胞評価画像解析装置の成果概要

再生医療や創薬分野で産業応用では、幹細胞を適切に保管、大量に増やす必要がある。その細胞の品質を評価する手法として、従来は、使用する同等の細胞を試験用として採取し、細胞を固定あるいはRNAを抽出するなど細胞を損傷して評価を行っている。しかし、細胞を損傷せずに、直接評価した細胞を継続して使用できる評価方法が望ましい。このような要望に基づき、本事業では、凍結・解凍装置、及び自動培養装置と連携する機構を有し、自動培養装置から搬出入される培養容器上で培養された幹細胞を非侵襲的に品質評価が可能な幹細胞評価解析装置の開発を目標とした。下記に、本事業開始時の開発テーマ、及びスケジュールを表 2.1.3-1-1 に示す。

表 2.1.3-1-1 本事業起案時の開発テーマ、及びスケジュール

研究開発項目		平成23年度	平成24年度	平成25年度	平成26年度	平成27年度
幹細胞評価画像解析装置の開発 (ニコン、医薬基盤研、名古屋大学、川崎重工業)				中間評価		
1	品質評価画像解析技術の基礎設計	画像解析技術 基礎設計完了				
2	2次元非侵襲解析装置の開発		2次元品質評価画像解析技術の完成		品質評価画像解析技術 (3次元形態)の完成	
	2.1 幹細胞コロニー形態法の技術開発		2次元幹細胞コロニー形態法 品質評価技術の評価完了			
3	3次元非侵襲解析装置の開発 (要素開発含む)	3次元観察技術 要素試験機開発・評価完了		3次元観察技術 試作品完成	3次元幹細胞コロニー形態法 品質評価技術の評価完了	
4	自動培養装置連携技術の開発		自動培養装置要素試作品 連携部要素評価完了		自動培養装置との連結部開発・ 解析装置の連携評価・修正完了	

起案時は、幹細胞評価の対象として幹細胞コロニーのみを想定していたが、研究開発を進め

る中で、幹細胞の品質を評価する方法に関する新たな知見が出たため開発テーマを増やし、現在は表 2.1.3-1-2 として進めている。追加した開発テーマとは、

2.2 幹細胞形態法(幹細胞の細胞単位を対象とした手法)

2.3 幹細胞増殖率法(幹細胞コロニーの増殖率を用いた手法)

であり、これらを追加することにより更に汎用性のある品質評価技術が確立できると考える。

表 2.1.3-1-2 現在の開発テーマ、及びスケジュール

研究開発項目		平成23年度	平成24年度	平成25年度	平成26年度	平成27年度
幹細胞評価画像解析装置の開発 (ニコン、医薬基盤研、名古屋大学、川崎重工業)				中間評価		
1	品質評価画像解析技術の基礎設計	画像解析技術 基礎設計完了				
2	2次元非侵襲解析装置の開発		2次元品質評価画像解析技術の完成		品質評価画像解析技術 (3次元形態)の完成	
	2.1 幹細胞コロニー形態法の技術開発		2次元幹細胞コロニー形態法 品質評価技術の評価完了			
	2.2 幹細胞形態法の技術開発		2次元幹細胞形態法 品質評価技術の評価完了			
	2.3 幹細胞増殖率法の技術開発		2次元幹細胞増殖率法 品質評価技術の評価完了			
3	3次元非侵襲解析装置の開発(要素開発含む)	3次元観察技術 要素試験機開発・評価完了		3次元観察技術 試作品完成	3次元幹細胞コロニー形態法 品質評価技術の評価完了	
4	自動培養装置連携技術の開発		自動培養装置要素試作品 連携部要素評価完了	自動培養装置との連結部開発・ 解析装置の連携評価・修正完了		

表 2.1.3-1-3 には上記研究開発テーマの平成 25 年 3 月末時点での達成状況を示す。前述した新規に研究開発テーマを追加したにも関わらず、予定に比べ前倒しで研究が進んでいる。

表 2.1.3-1-3 研究テーマと達成状況

研究開発項目		達成状況 (2013年3月末時点)	備考
幹細胞評価画像解析装置の開発 (二コソ、医薬基盤研、名古屋大学、川崎重工業)			
1	品質評価画像解析技術の基礎設計	予定どおり完了	
2	2次元非侵襲解析装置の開発	予定に対し、進んでいる	開発テーマを増やし、より汎用性の高い評価技術の開発を目標として進めている
	2.1 幹細胞コロニー形態法の技術開発	予定に対し、進んでいる	
	2.2 幹細胞形態法 (エッジアルゴリズム法)	予定外だが、期間内に完了予定	新規に追加した開発項目
	2.3 幹細胞増殖率法の技術開発	予定外だが、期間内に完了予定	新規に追加した開発項目
3	3次元非侵襲解析装置の開発 (要素開発含む)	予定通り	今年度以降本格的に技術開発を実施予定
4	自動培養装置連携技術の開発	予定に対し、進んでいる	今年度下期から本格的に技術開発を実施予定

特に、幹細胞品質評価技術開発の成果として

2.1 幹細胞コロニー形態法 : 「目利き」による異常形態コロニーを判別

2.2 幹細胞形態法 (エッジアルゴリズム法) : 「目利き」による異常形態細胞を判別

2.3 幹細胞増殖率法 : コロニー面積増殖率の違いから正常・異常を判別

が可能となっており十分な成果が挙げられていると考える。

2.1.3-2 幹細胞評価画像解析装置の開発時における対象定義

本技術開発起案時の幹細胞品質評価対象とした培養条件 (対象細胞株、培養プロトコル、及び培養培地)、及び品質評価結果を以下に記す。

2.1.3-2.1 起案時の培養条件定義

◎評価対象細胞株 CiRA 樹立 (201B7)、CiRA 樹立 (iPS-X 株)

◎評価対象培養条件 フィーダーあり、なし

◎評価対象培養培地 2 種

評価対象株 201B7 の品質評価として、ヒト多能性幹細胞の長期培養過程でしばしば出現する染色体異常を検出するために、201B7 細胞の継代培養維持の過程で出現した染色体 12 番が 3 本となった亜株 201B71A を比較評価株として使用した。また、iPS-X 株は分化能が低い株である。

ただし、各種培養条件に対する対応可能性を検討するために必要と想定した表 2.1.3-2-1 に記す培養条件も本技術開発内で評価・検証を実施することとする。253G1B1 細胞株は、253G1 細胞株継代培養維持の過程で出現した異常細胞で染色体 12 番が 3 本となった株である。ただし、グレーで塗りつぶした部分を必須対象とし、X 社培地は準備でき次第着手、それ以外は努力目標とした。

表 2.1.3-2-1 本研究開発での品質評価対象とする培養条件

細胞株	培養培地	培養基質	培養培地				
			mTeSR	KSR	hESF92ai	hESF-FX	Essential8
201B7	MEF						
	SNL						
	ラミニンE8						
201B7IA	MEF						
	SNL						
	ラミニンE8						
iPS-X	MEF						
	SNL						
	ラミニンE8						
iPS-TIG-114-4f	MEF						
	SNL						
	ラミニンE8						
253G-1	MEF						
	SNL						
	ラミニンE8						
253G1B1	MEF						
	SNL						
	ラミニンE8						

2.1.3-3 幹細胞品質評価の定義

安定的に、幹細胞の増殖培養を可能とする自動培養装置に求められる機能として、培養工程中での品質評価は必須である。自動培養装置は、幹細胞評価画像解析装置によって判断される品質評価結果を利用して幹細胞培養を行う。

以下では、幹細胞の状態として正常、及び異常、また、除去対象幹細胞と表現するが、それぞれは以下の状態であると定義する。

正常:通常の様相を呈するもの

異常:通常とは異なる様相を呈するもの

除去対象幹細胞: iPS 細胞の継代維持を行う際、分化していたり、通常とは異なる様相を呈する細胞集団をパスツールピペットやチップなどを用いて除去して継代を行う。そのような手培養で必ず除きたいコロニーや細胞集団を除去対象幹細胞と言う。

2.1.3-3.1 品質評価結果の定義

上記正常、異常、及び除去対象幹細胞の品質評価を行う際に必要とされる品質評価結果として 1)培養継続可否、2)除去対象幹細胞有無の 2 種類と定義した。また、本品質評価結果を導出するために手法として 3 つの手法を開発した。

表 2.1.3-3-1 に、判断結果の定義、及びそれを実現するための手法を記載する。

表 2.1.3-3-1 自動培養装置で必要とされる品質評価結果とその実現手段

評価結果	判断指標	手法
培養継続可否判断	培養容器内の異常幹細胞の割合により判断	幹細胞コロニー形態法
		幹細胞形態法
		幹細胞コロニー増殖率法

除去対象有無判断	培養容器内の異常幹細胞の位置を特定	幹細胞コロニー形態法
		幹細胞形態法
		幹細胞コロニー増殖率法

一般的に、iPS 細胞は従来研究ツールとして用いられてきた癌細胞株などとは異なり非常にデリケートな細胞であり、培養工程中の細胞の品質の維持が難しいと言われている。培養工程の培養手技や培地などの影響によって容易に未分化状態が損なわれたり、また、ゲノムが変異するなどして形質が変化する。ゲノムの変異により形質が変化した場合、コロニーの形態が通常の状態とは異なることが知られている。適正にiPS細胞を増殖させるためには培養工程内のより正確な培養状態の判断が必要である。

そのため、より高精度に幹細胞状態を評価できる技術を開発することを目標におき、上記3手法の研究開発を行っている。

2.1.3-3.2 幹細胞品質評価結果の算出に必要な解析項目

以下には、幹細胞画像を用いて品質を評価するために開発した3つの手法の概要とその手法により算出することができる画像解析結果項目を表2.1.3-3-2に記載する。

表 2.1.3-3-2 品質評価結果の算出に必要な解析項目

	手法	概要	出力結果
品質評価技術の開発	幹細胞コロニー形態法	培養容器内の所定領域を位相差画像撮影、画像解析にて幹細胞コロニー領域を抽出。抽出されたコロニーの形態情報パラメータから異常コロニーを特定	1)異常コロニー数 2)異常コロニー領域 3)異常コロニー位置
	幹細胞形態法	培養容器内の所定領域を位相差画像撮影、画像解析にて幹細胞コロニー・幹細胞の領域を抽出。抽出された細胞形態をもとに異常領域(細胞)を特定	1)異常細胞領域面積 2)異常細胞領域位置 3)正常細胞領域面積 4)正常細胞領域位置 5)細胞塊領域面積 6)細胞塊領域位置
	幹細胞コロニー増殖率法	経時間的に培養容器全域を位相差画像撮影、画像解析にて幹細胞コロニー領域を抽出、更にコロニー面積増殖率の算出、及び増殖率の違いによる良否判断	1)コロニー面積増殖率 2)コロニー毎の増殖率による正常・異常判断 3)異常コロニーの位置

2.1.3-4 幹細胞評価画像解析装置の研究開発手順及び結果詳細

本画像解析技術の開発に当たり、細胞培養観察装置(BioStation CT)を用いて画像取得を行っている。本装置の培養過程の細胞を適切な状態に維持するためのインキュベータ部には、ダイレクトヒート方式、アクティブ加湿方式を採用し、温度、湿度を高精度に制御可能である。対象の幹細胞などを網羅的に観察するために、容器全域を高精度で観察することを可能とした顕微鏡部をドッキングしており、この培養環境空間には30個の培養容器を同時に収納でき、それらを自動的に顕微鏡部へ運ぶ精密搬送ロボットが内蔵されている。こ

れら機構をトータルで制御可能であり、数多くの培養条件の実験を同時にスケジュールすることが可能となり、開発を効率的に進めることができた。図 2.1.3-4-1 に本装置の構成図を、図 2.1.3-4-2 に実際の幹細胞撮影状況を示す。

本章では、本開発技術の詳細な研究ステップ、及び成果を記載する。

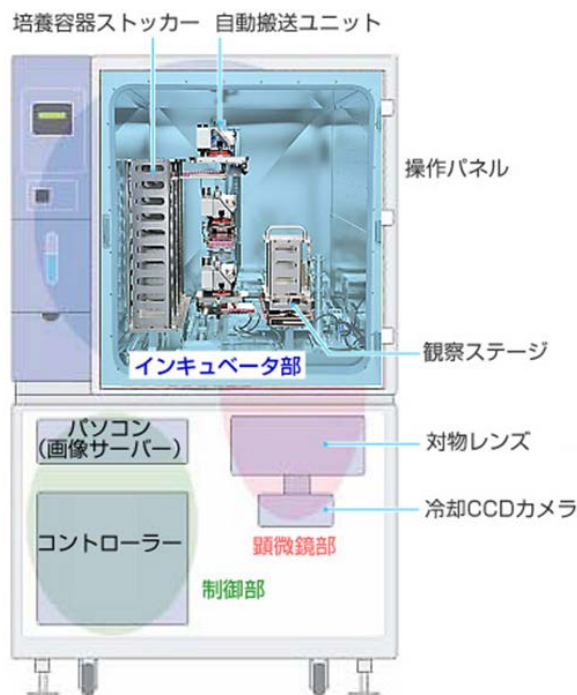


図 2.1.3-4-1 細胞培養観察装置(正面のパネルをはずし、内部が見える状態)



図 2.1.3-4-2 細胞培養観察装置(実際の幹細胞撮影状況)

2.1.3-4.1 非侵襲的 2 次元幹細胞画像解析技術の開発

本技術開発において、2013 年 3 月末時点で非侵襲的 2 次元幹細胞画像解析技術の細胞形態による品質評価技術として 3 つの評価手法を確立した。幹細胞コロニー形態法、幹細胞形態法は、経時的な幹細胞画像を必要としない手法に対して、幹細胞コロニー増殖率法は経時的な幹細胞画像を用いて行うことを特徴としたものである。以下には、まず経時的な幹細胞画像を必要としない 2 つの手法に関して紹介する。図 2.1.3-4.1-1 は、2 つの評価手法の違いを概念的に説明するものである。

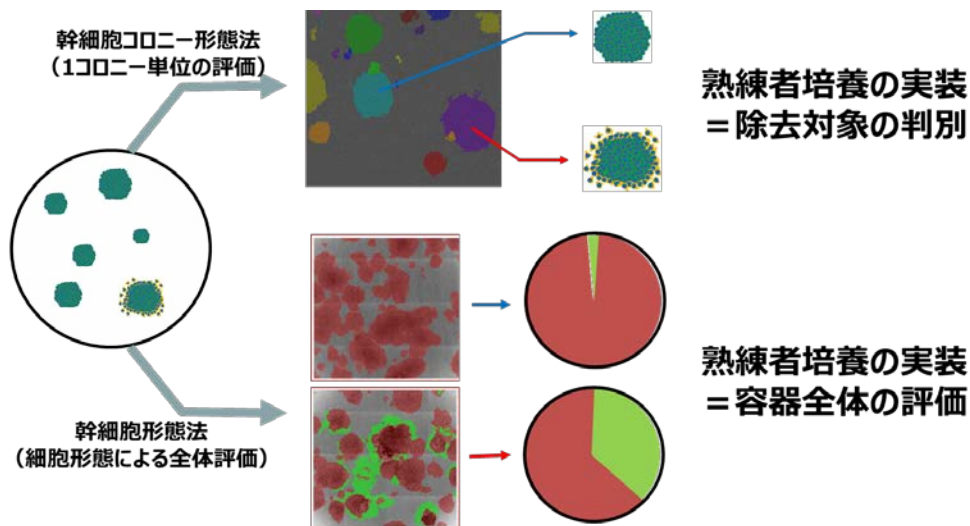


図 2.1.3-4.1-1 2つの評価手法の違い(幹細胞コロニー形態法、幹細胞形態法)

以下に、それぞれの開発技術の詳細を記す。

2.1.3-4.2 幹細胞コロニー形態法(コロニー単位での幹細胞評価技術)

本開発は、以下の手順にて技術確立を行い、良好な結果を得た。

a-1)医薬基盤研における幹細胞培養、及び培養工程中の幹細胞撮影

a-1-1)観察条件の規定

a-1-2)規定条件による幹細胞の培養工程撮影

a-2)「目利きによる」幹細胞コロニーの良否特定

a-2-1)撮影された幹細胞コロニーを熟練者により正常・異常の判定

a-2-2)正常・異常判定に分けて幹細胞コロニー画像のデータベース化

a-3)正常・異常特定された幹細胞コロニーのクラスタリング、判別技術の開発

a-3-1)撮影された幹細胞コロニー領域を抽出するアルゴリズムの開発

a-3-2)抽出した幹細胞コロニーから各種形態情報パラメータの算出

a-3-3)算出した形態情報パラメータを用いて幹細胞コロニーを複数クラスに分類

a-3-3)複数分類されたクラスに対して「目利きによる」分類の適合

a-3-4)「目利き」により異常と判定される幹細胞コロニーのクラス定義が可能

クラス分類は27の数値の大小(赤・緑)によって定義される。また、一例の数値パターンが写真下に表示されている。各指標の大小の組み合わせが重要な数値プロファイルとなっており、口や文字で表現することは困難であるが、コンピュータ内では指紋認証のような形で認識・判別することが可能である。図 2.1.3-4.2-1 参照のこと

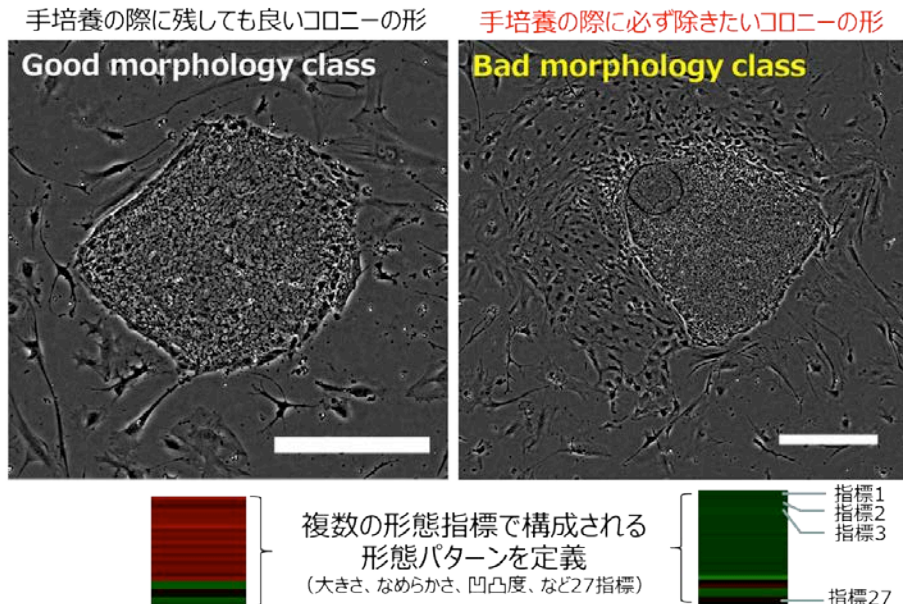


図 2.1.3-4.2-1 幹細胞コロニー形態法により分類した正常・異常クラスの幹細胞画像

a-4) 生化学的な相関評価

a-4-1) 幹細胞コロニー単位で無作為に採取し、遺伝子解析を実施

a-4-2) 正常・異常と判別される幹細胞コロニー間に遺伝子プロファイルに差が存在
開発した評価法で定義した異常コロニー (B) が、全遺伝子プロファイルでも「異常」或
いは「除去対象幹細胞」となることが判別可能となった。

上記により、幹細胞コロニー形態を形態パラメータにより異常形態を有するものを自動的に他の
ものと分類することが可能となった。

2.1.3-4.3 幹細胞形態法(細胞単位での幹細胞評価技術)

本開発は、以下の手順にて技術確立を行い、良好な結果を得た。最初の工程である幹細胞コ
ロニー画像撮影及び観察条件の規定は同様である(図 2.1.3-4.3-1)。

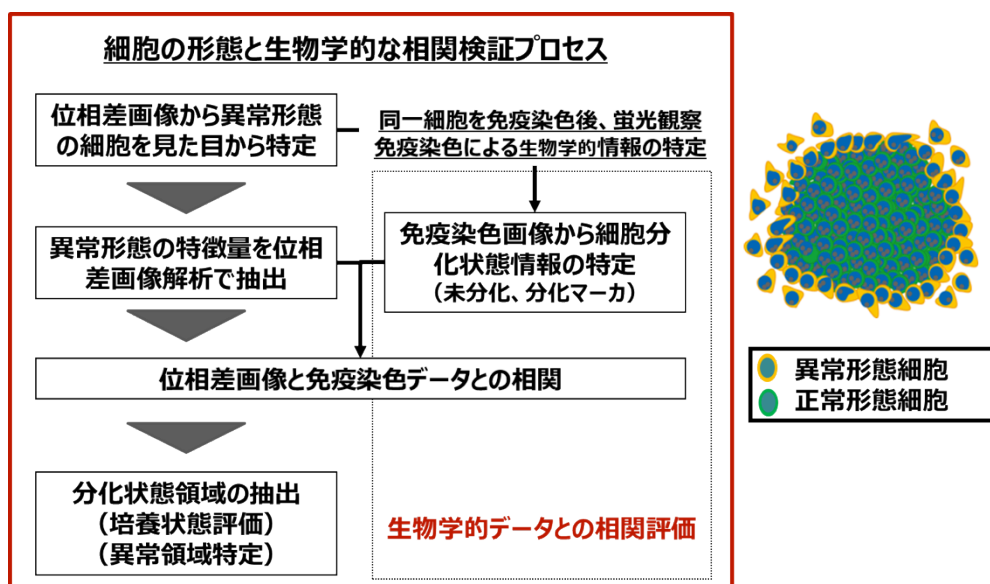


図 2.1.3-4.3-1 幹細胞形態法の概要

- b-1)医薬基盤研における幹細胞培養、及び培養工程中の幹細胞コロニー画像撮影
 - b-1-1)観察条件の規定
 - b-1-2)規定条件による幹細胞の培養工程撮影
- b-2)「目利きによる」幹細胞の異常領域の特定
 - b-2-1)撮影された幹細胞を熟練者により正常・異常領域の判定
- b-3)正常・異常領域の抽出技術の開発
 - b-3-1)正常・異常領域内に分布する細胞形態を抽出するアルゴリズムの開発
 - b-3-2)抽出された正常・異常領域の細胞形態情報パラメータの算出
 - b-3-3)算出された形態情報パラメータを用いて正常・異常領域の分類
- b-4)生化学的な相関評価
 - b-4-1)解析対象幹細胞に対し未分化マーカー、分化マーカーを免疫染色
 - b-4-2)未分化、分化マーカー発現領域と形態を用いた正常・異常領域の相関評価

上記により、幹細胞の細胞形態により異常形態を有す細胞が存在する領域を自動的に他のものと分類することが可能となった。

また、この正常形態と分類される細胞の存在する領域は、免疫染色による未分化マーカー発現領域、また異常形態と分類される細胞が存在する領域と免疫染色による分化マーカーそれぞれ非常に高い相関を持つことを検証し、細胞形態による判定が有効なことを示していると考ええる。

更に、上記にて開発した幹細胞形態法を用いて検出精度の検証試験を行った。幹細胞形態法による異常領域と分化マーカー免疫染色領域の検出比較時の相関係数は $r^2=0.85$ と高い値を示し、異常領域が正しく判別されていることを検証した。

次に、幹細胞コロニー増殖率法(幹細胞増殖特性による品質評価技術)の開発成果について記載する。

2.1.3-4.4 幹細胞増殖率による幹細胞評価技術

本開発は、以下の手順にて技術確立を行い、良好な結果を得た。

- c-1)医薬基盤研における幹細胞培養、及び培養工程中の幹細胞コロニー画像撮影
 - c-1-1)観察条件の規定
 - c-1-2)規定条件による幹細胞の培養工程撮影
- c-2)幹細胞コロニー領域の抽出技術の開発
 - c-2-1)培養面全体に分散する幹細胞コロニー領域の抽出アルゴリズム(図 2.1.3-4.4-1)開発

【正確なコロニー領域の抽出】

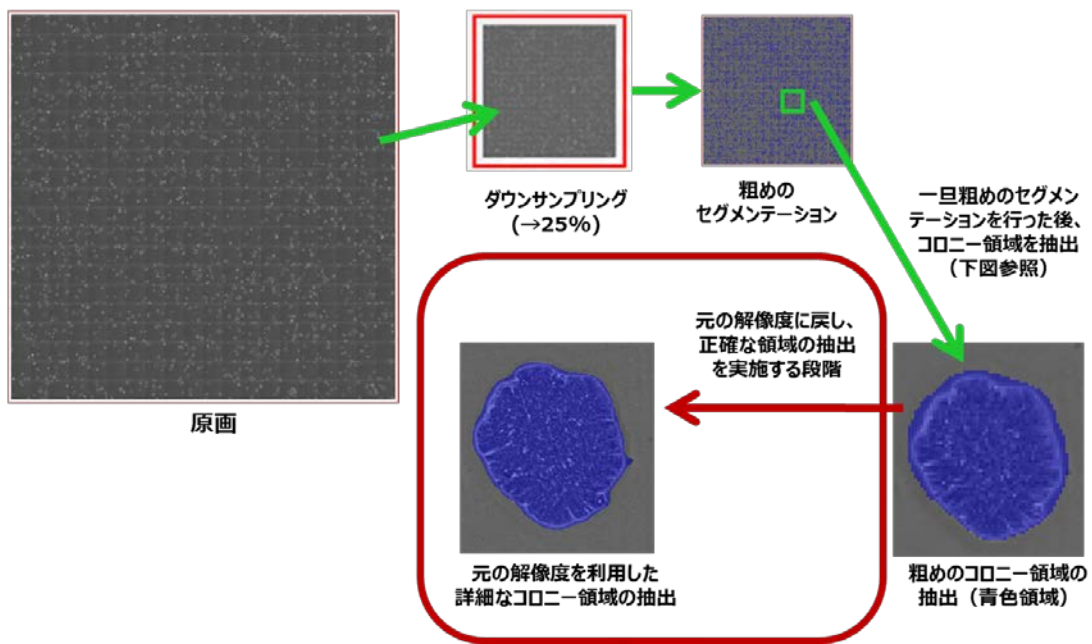


図 2.1.3-4.4-1 コロニー領域抽出アルゴリズムフロー

本手法は、一旦画像を圧縮して大まかに幹細胞コロニー領域を抽出、その後画像を元の解像度に戻し、正確な輪郭を抽出する手法を採用した。この手法を採用することにより、従来の方法に比べ、50%の処理時間を達成した。

c-2-2)抽出された幹細胞コロニー毎に識別を行い、コロニー形態をとっている未分化な幹細胞の面積の算出 (図 2.1.3-4.4-2 iPS 細胞コロニー増殖率特性解析を参照)

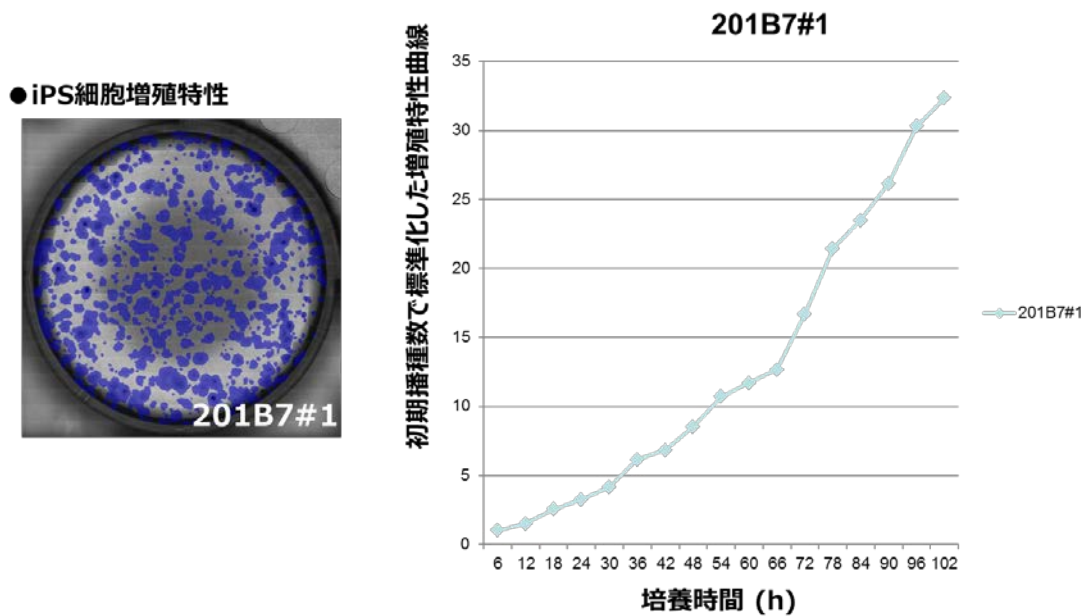


図 2.1.3-4.4-2 コロニー形態をとる幹細胞の面積増殖率特性解析

c-2-3)コロニー毎に識別された面積の増殖率をもとに正常・異常コロニーを判別する
c-3)増殖特性による品質評価の妥当性検証

- c-3-1)幹細胞親株、及び蛍光にて直接ラベルした染色体異常幹細胞重株を共培養する
- c-3-2)幹細胞親株及び染色体異常幹細胞重株をコロニー面積から増殖率の算出と検定

本幹細胞増殖率による幹細胞評価技術をもちいて、幹細胞親株と染色体異常幹細胞重株のそれぞれの増殖率の特性評価を行い、親株に比べて、染色体異常重株とで生着率を含む増殖率が大きく異なることを検証し、幹細胞の異常を自動的に検出することが可能となった。

2.1.3-4.5 非侵襲的 3 次元幹細胞画像解析技術の開発

本非侵襲的 3 次元幹細胞画像解析技術は、反射干渉計測法を用いた OCT (オプティカル・コヒーレンス・トモグラフィ) を利用したものであり、これまで細胞に用いた例はほとんどない。そのため、本開発により幹細胞評価が実現されれば世界最初のものとなる。

ただし、本非侵襲 3 次元幹細胞画像解析技術は、非侵襲幹細胞画像解析装置のオプションとして開発を行ったおり、2 次元的な観察手法である位相差観察では解析困難である 3 次元形態を有する細胞塊を本技術で解析し、その解析結果を非侵襲幹細胞画像解析装置内にデータベース化します。このデータベースを用いて、2 次元手法にて解析が困難であった部分の正常・異をより正確に判断することを目標としている。

非侵襲 3 次元幹細胞画像解析装置によって達成を目指す品質評価の指標を下記とした。

- d)幹細胞塊の立体的な形状による品質評価
- e)幹細胞塊内の細胞核形状・分布による品質評価

現在は、細胞を観察することが可能な要素試作品が完成した状態であり、これを用いて各種細胞の 3 次元画像の撮影、表示の技術開発を行っている。

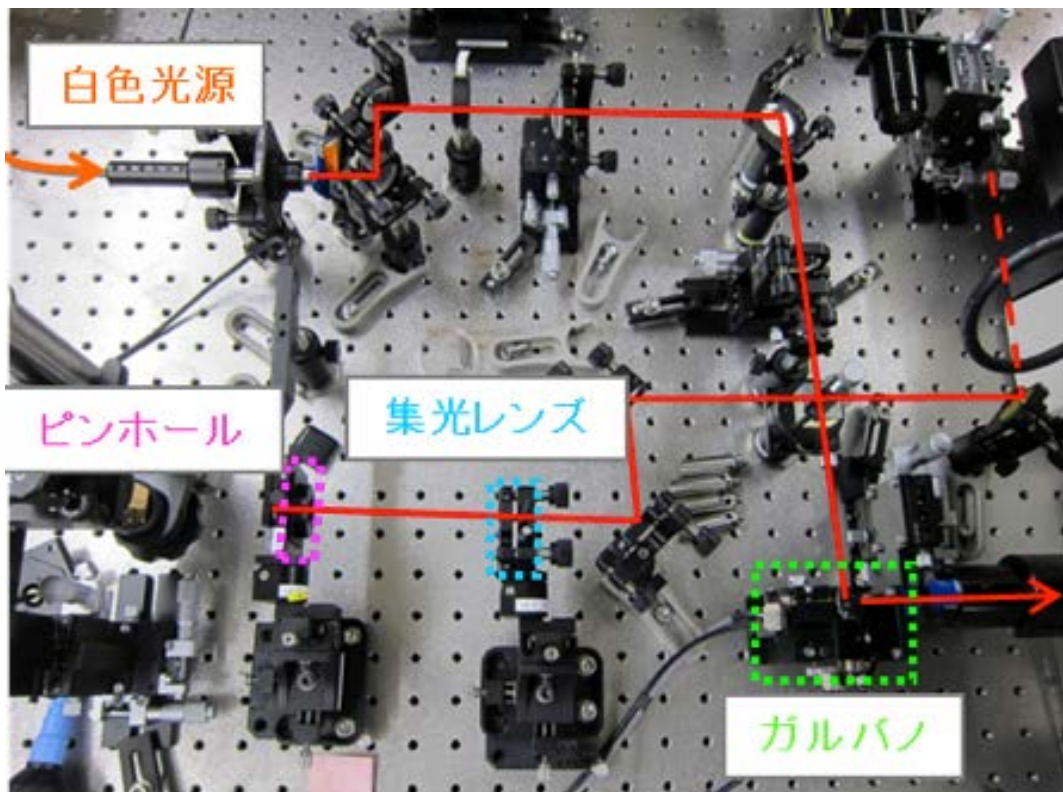


図 2.1.3-4.5-1 要素試作品の構成概要

2.1.3-4.5.1 幹細胞塊の立体構造解析技術の開発

本開発は、以下の手順にて技術確立を行っているところである。

- d-1)要素試作品の機能・仕様決定
- d-2)要素試作品の開発
 - d-2-1)試作品の設計
 - d-2-2)試作品の加工・組立
 - d-2-3)試作品の基本性能評価
- d-3)要素試作品による細胞塊の撮影・表示技術の開発
 - d-3-1)試作品による細胞塊の撮影(図 2.1.3-4.5.1-1)
 - d-3-2)撮影された画像から3次元形態の復元
 - d-3-3)復元された細胞塊の形状計測

2.1.3-4.5.2 幹細胞塊内の細胞核形状・分布解析技術の開発

本開発は、以下の手順にて技術確立を行っているところである。

- e-1)要素試作品の機能・仕様決定
- e-2)要素試作品の開発
 - e-2-1)試作品の設計
 - e-2-2)試作品の加工・組立
 - e-2-3)試作品の基本性能評価
- e-3)要素試作品による幹細胞コロニー内細胞核の撮影・表示技術の開発
 - e-3-1)試作品による細胞塊の撮影
 - e-3-2)撮影された画像から幹細胞コロニー内の核領域の特定及び細胞核分布の表示
 - e-3-3)特定された細胞核の形状計測

2.1.3-4.6 自動培養装置との連携技術の開発

本開発では、培養行程中の幹細胞状態評価が必要であるため、幹細胞評価解析装置と自動培養装置との連携が必須となる。特に、培養工程中の幹細胞状態評価には、繰り返し観察時の位置再現性が重要な要素である。

繰り返し観察時の位置再現性を確保するためには、両装置(図 2.1.3-4.6-1)にて使用可能であり、かつ装置間を行き来する際にしっかり固定できる機構を開発し、幹細胞コロニーのトレースができることを確認した。

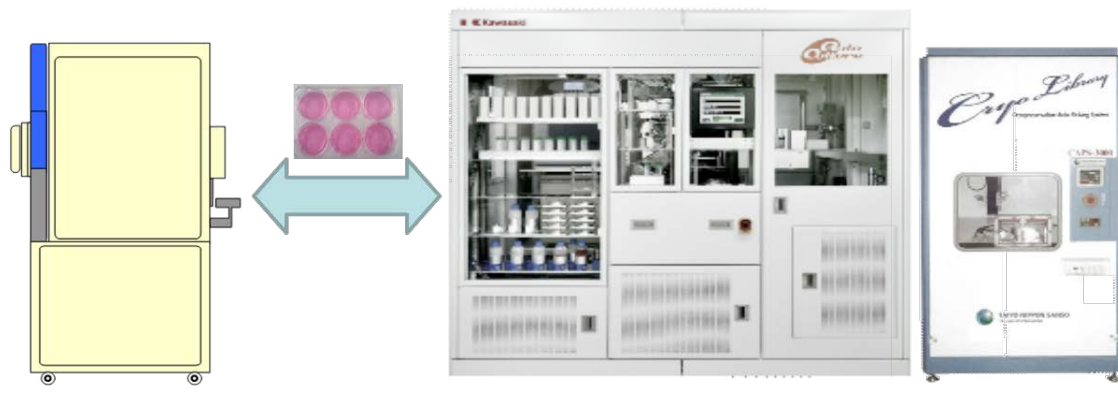


図 2.1.3-4.6-1 自動培養装置との連携概念図

2.1.3-4.6.1 自動培養装置との連携技術の開発

繰り返し観察位置再現性を実現するための開発は、以下の手順にて技術確立を行い、良好な結果を得た。

f-1)培養容器固定技術の開発

f-1-1)自動培養装置及び幹細胞評価解析装置試作品で使用可能な培養容器の特定

f-1-2)両装置間で固定可能なアダプタ機構の検討

f-2)アダプタの開発

f-2-1)幹細胞評価解析装置試作品用アダプタの設計(図 2.1.3-4.6.1-1)

f-3)アダプタの性能評価

f-3-1)アダプタを装着した培養容器を両装置で所定作業を行い、位置再現性を確認

f-3-3)撮影された画像から位置再現性を評価

試験方法としては、

- 1) 幹細胞評価解析装置試験機内の評価対象である上述のアダプタに取り付けられた培養容器を設置。
- 2) 基準位置を確認するために、試験機で培養容器内の固定マークを撮影。
(固定マーク:再現性確認のため容器培養面に張り付けたグリッドシールのこと)
- 3) 自動培養装置で培地交換のため試験機からアダプタがついた培養容器を取り出す
- 4) アダプタ付容器を自動培養装置に入れ、培地交換作業を実施
- 5) 自動培養装置からアダプタ付の培養容器を取り出し、再度試験機に導入
- 6) 導入後、再度固定マークを撮影する

上記を3回繰り返し、マークの中心位置ずれ量を測定する。

図 2.1.3-4.6-2 は、培地交換前後の撮影画像であり、再現性結果として細胞のトレースが可能な再現性精度を確保した。

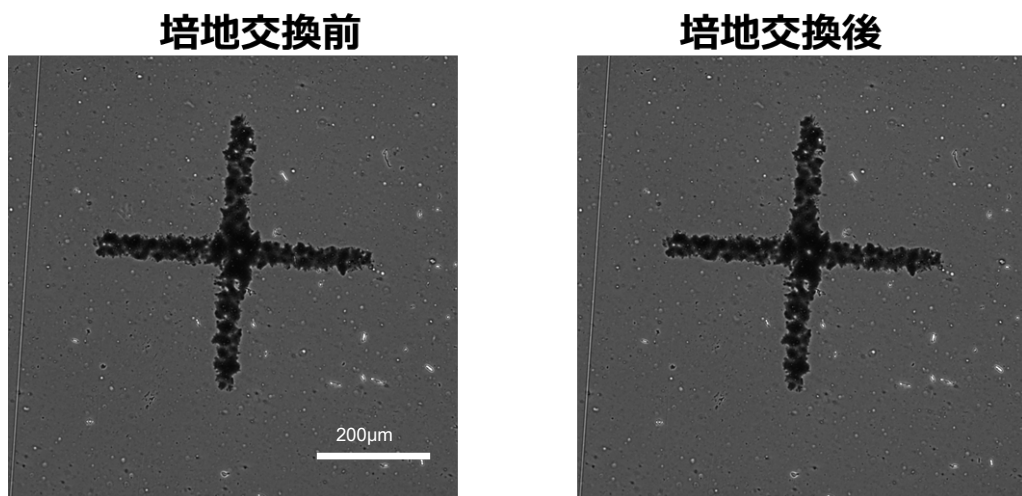


図 2.1.3-4.6-2 培地交換前後の固定マーク撮影画像

2.1.4 培養基材の開発

現在、iPS 細胞等のヒト多能性幹細胞の標準的培養法は、マウス線維芽細胞をフィーダー細胞として、適度な大きさに砕いた細胞集塊(コロニー)をその上に播種する方法である。しかし、高品質のフィーダー細胞を安定的に供給・維持することは容易ではなく、またマウス線維芽細胞を使う限り異種抗原の持ち込みが避けられない。また、多能性幹細胞が分化しないように“適度な大きさ”にコロニーを砕いて播種するには経験と習熟が必要であり、これがヒト多能性幹細胞の培養を難しくしている要因の一つとなっている。株化細胞の場合、トリプシンで単一細胞まで分散して播種する方法が一般的であるが、ヒト多能性幹細胞を単一細胞にすると速やかにアポトーシスがおこるため、このような方法は禁忌とされている。自動培養装置を用い、ヒト iPS 細胞を安定的に培養・増幅するためには、フィーダー細胞を使わず、可能な限り単一細胞まで分散して培養が可能な基材の開発が求められている。

フィーダー細胞を使わずにヒト多能性幹細胞を培養する技術は国内外で精力的に研究されており、マトリゲルを培養基材とする方法が今のところ最も広く使われている。しかし、マトリゲルは基底膜を過剰産生するマウス腫瘍の粗抽出物であり、化学組成が完全には解明されておらず、異種成分の持ち込みが避けられない。マトリゲル以外にも、組換えビトロネクチンやその活性部位由来ペプチドを使う方法、組換えラミニン 511/521 を使う方法が報告されている。しかし、ビトロネクチンは細胞の生着が十分ではなく、単一細胞での継代には十分対応できていない。組換えラミニン 511/521 はビトロネクチンよりも接着が強く、単一細胞での継代も可能であるが、余りに高価であり(国内販売価格は1 mgが50万円程度)、培養基材として大量使用するには不向きである。

我々はマウス初期胚の多能性幹細胞が足場としている基底膜の分子組成を網羅的に解析し、その主成分がラミニン 511 であること、実際にラミニン 511 をコーティングしたディッシュ上でヒト多能性幹細胞をフィーダーフリー条件下で培養できることを見いだしている(Miyazaki et al, Biochem Biophys Res Commun 375, 27-32, 2008)。また、ヒトラミニン 511 の活性部位を探索する過程で、そのインテグリン結合活性と細胞接着活性をほぼ 100%保持した組換えフラグメント(以下、“E8”フラグメント)を作製し(Ido et al, J Biol Chem 282.1.1144-11154, 2007)、このフラグメントがヒト多能性幹細胞の培養基材として有効であることを京都大学・中辻憲夫教授との共同研究により見いだしている(図 2.1.4-1 参照)。

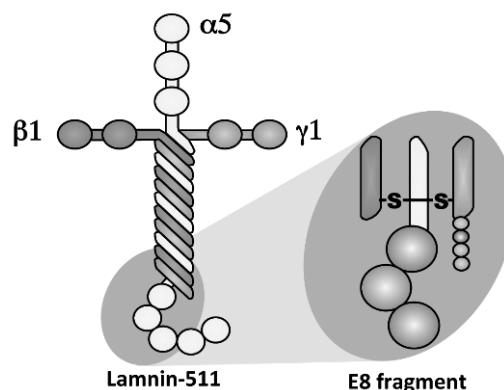


図 2.1.4-1 ラミニン 511 の構造とその活性部位

本研究開発では、我々がこれまでに得た知見を基盤とし、ラミニン 511 およびその類縁ラミニンアイソフォームの E8 フラグメントを利用した新たなヒト多能性幹細胞用フィーダーフリー培養基材の開発を目標とする。具体的には、ラミニン 511 E8 フラグメント(以下“511E8”)のヒト iPS 細胞用

培養基材としての有用性を京都大学 iPS 細胞研究所(以下、CiRA)の中川誠人講師と共同して検証するとともに、511E8を超えるより高機能なラミニンE8フラグメントの創製を目指して研究開発を進めた。また、自動培養装置での使用を念頭におき、プレコーティングしたディッシュを製品化する際に必要となる511E8フラグメントの安定化技術の開発を併せて行った。

2.1.4-1 ヒト iPS 細胞用培養基材としての 511E8 フラグメントの活性評価

511E8 のヒト iPS 細胞用フィーダーフリー培養基材としての有用性を京都大学 CiRA の中川誠人講師との共同研究により検証した。京都大学 CiRA で樹立した様々なヒト iPS 細胞を 511E8 をコーティングしたディッシュ上で培養し、細胞の増殖性と未分化性維持を検討した結果、511E8 をコーティングしたディッシュ上ではヒト iPS 細胞が未分化性を維持したまま10継代以上にわたって安定に培養できること、さらに、トリプシン様酵素で単一細胞まで分散しても培養ができ、急速拡大培養が可能であることが明らかとなった。なお、京都大学再生医科学研究所・中辻憲夫教授との共同研究によっても同様の結果が得られている。

511E8 のフィーダーフリー培養基材としての有用性をさらに確認するため、ヒト iPS 細胞の樹立→拡大培養→分化誘導までの一連の操作をすべて 511E8 上で行うことが可能かどうかを、京都大学 CiRA・中川講師との共同研究により検証した。その結果、エピゾーマルベクターを用いて初期化した様々な細胞由来のヒト iPS 細胞を 511E8 をコーティングしたディッシュ上で効率よく樹立し、かつ拡大培養できること、さらにこのようにして樹立した iPS 細胞は未分化性を維持しており、三胚葉への分化能を保持していることを *in vitro* および *in vivo* の実験系で確認した(中川誠人ほか、論文投稿準備中)。以上の結果は、511E8 をコーティングしたディッシュを使うことにより、フィーダーフリーかつゼノフリー条件下でヒト iPS 細胞の樹立から分化誘導までを一貫して操作できることを示している。

2.1.4-2 ラミニン 311、321.1-332 の E8 フラグメントの調製とその機能評価

ラミニンにはサブユニット組成の異なる15種のアイズフォームが存在する。我々はラミニン 511に加えてラミニン 332 もヒト ES 細胞の培養基材として有効であることを既に見いだしている(Miyazaki et al. *Biochem Biophys Res Commun* 375;27-32, 2008)。ラミニン 511, 332 以外のラミニンアイズフォームがヒト多能性幹細胞用基材として利用可能であることを検討するため、ラミニン 511と類似のインテグリン結合特異性をもつ3種類のラミニンアイズフォーム—ラミニン 311($\alpha 3 \beta 1 \gamma 1$), 321($\alpha 3 \beta 2 \gamma 1$), 332($\alpha 3 \beta 3 \gamma 2$)—の E8 フラグメントを作製し、それらのインテグリン結合活性とヒト iPS 細胞の増殖支持活性を検討した。これらの E8 フラグメント(311E8, 321E8, 332E8)は 511E8 と同様、ヒト 293-F 細胞を用いる一過的組換え蛋白質発現系(Invitrogen 社)を利用して発現させ、 α 鎖と γ 鎖のN末端に付加した6×His タグおよびFLAG タグを利用してアフィニティー精製した。いずれも 511E8 と同等の高純度精製品が得られている。

ラミニンには $\alpha 3 \beta 1$ 、 $\alpha 6 \beta 1$ 、 $\alpha 6 \beta 4$ 、 $\alpha 7 \beta 1$ の4種類のインテグリン受容体が結合する。ヒト多能性幹細胞では $\alpha 6 \beta 1$ が主要なラミニン受容体として発現している(Miyazaki et al. *Biochem Biophys Res Commun* 375;27-32, 2008)。インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ に対する311E8、321E8、332E8の結合を固相結合アッセイで測定した結果から求めた解離定数は311E8が $5.89 \text{ nM} \pm 1.18 \text{ nM}$ 、321E8が $2.60 \text{ nM} \pm 0.26 \text{ nM}$ 、332E8が $>3 \text{ nM}$ であり、解離定数が $0.76 \text{ nM} \pm 0.11 \text{ nM}$ の511E8と比較すると、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ に対する親和性は $\sim 1/3$ (321E8)から $1/10$ 以下(332E8)であることが判明した。これらの結果はラミニン 511 および $\alpha 3$ 鎖を含む類縁アイズフォームの E8 フラグメントの中で511E8がインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ に対する最強のリガンドであることを示している。

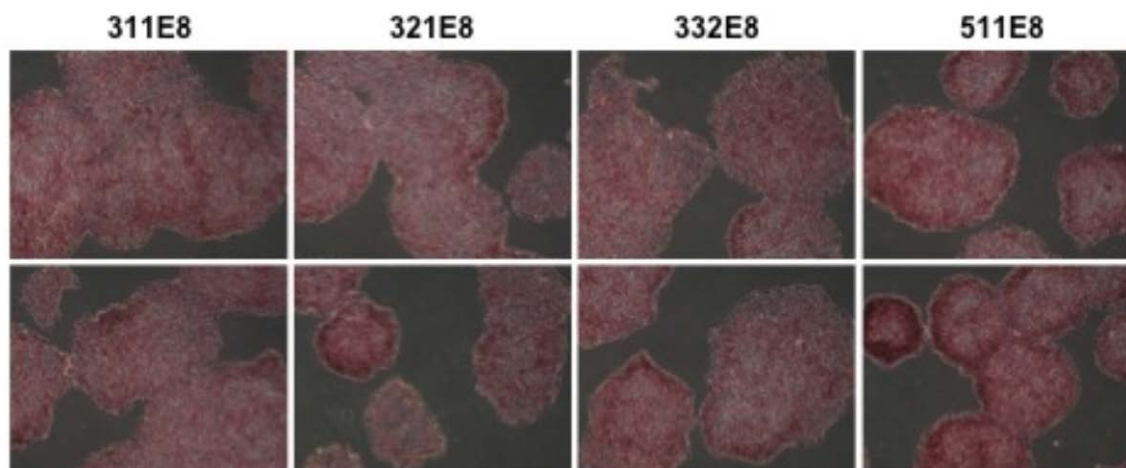


図 2.1.4-2-1 311E8、321E8、332E8 上でのヒト iPS 細胞の培養

この結果を踏まえ、311E8、321E8、332E8 をコーティングしたディッシュ上でヒト iPS 細胞 201B7 株を培養し、培養基材としての活性を 511E8 と比較検討した。播種後7日目の細胞をアルカリフォスファターゼ活性染色した結果を図 2.1.4-2-1 に示す。311E8、321E8、332E8 のいずれをコーティングしたディッシュ上でも iPS 細胞は増殖し、アルカリフォスファターゼ陽性のコロニー群を形成した。コロニーの形態に着目すると、311E8 と 332E8 上では周縁部の丸みが失われる傾向が認められたが、321E8 上では 511E8 上と類似の形態のコロニーが形成していた。しかし、321E8 上のコロニーは 511E8 上のものと比べてアルカリフォスファターゼ陽性の度合いが弱く、インテグリン結合活性も 321E8 の方が 511E8 よりも弱いことを勘案すると、検討した4種類の E8 フラグメントの中では 511E8 がヒト iPS 細胞の培養基材として最も有効であると判断された。

2.1.4-3 改良型ラミニン 511E8 フラグメントの開発

ヒト iPS 細胞用培養基材としての 511E8 の有用性を踏まえ、さらに性能を高めた改良型 511E8 の創製を目指し、“増殖因子制御型”と“接着活性増強型”と名付けた2種類の改良型 511E8 のプロトタイプを作製した(図 2.1.4.3-1 を参照)。ヒト ES/iPS 細胞のような上皮様シートを形成する細胞では、間葉系細胞から分泌される増殖因子／形態形成因子は基底側から細胞に作用する(換言すれば、増殖因子受容体は細胞の基底側でリガンドを受容する)。このような細胞極性を反映した増殖因子本来の作用機序を模倣し、増殖因子を基底側で捕捉して細胞に作用させる 511E8 が“増殖因子制御型”である。一方、“接着活性増強型”は細胞表面のインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ だけでなく、ビトロネクチン受容体として知られているインテグリン $\alpha V \beta 5$ にも結合できる“二刀流” 511E8 である。ヒト多能性幹細胞は $\alpha 6 \beta 1$ に加えて $\alpha V \beta 5$ を表面に発現している。ビトロネクチンがヒト多能性幹細胞の培養基材として使われているのはそのためである。本研究開発では、ビトロネクチンを凌ぐ高親和性 $\alpha V \beta 5$ リガンドを探索し、当該リガンドの $\alpha V \beta 5$ 結合ドメインを合体させた 511E8 の創製を目指した(図 2.1.4-3-1 右)。

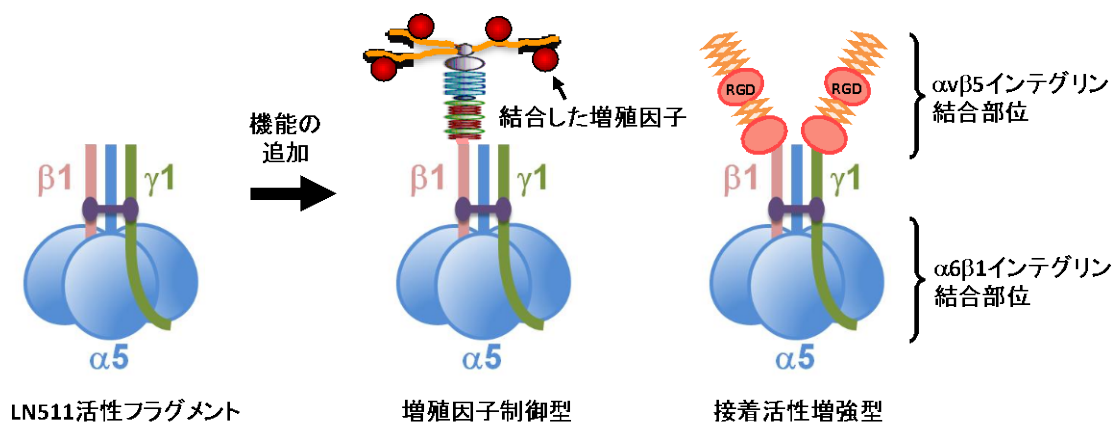


図 2.1.4-3-1 改良型多機能 511E8 フラグメントの設計

2.1.4-3.1 増殖因子制御型 511E8 の創製とその活性評価

増殖因子／形態形成因子の多くはヘパラン硫酸プロテオグリカンのヘパラン硫酸鎖に結合して基底膜に組み込まれ、その局在と活性が制御されている。初期胚の多能性幹細胞の場合、足場となる基底膜の主要なヘパラン硫酸プロテオグリカンはパールカンである。

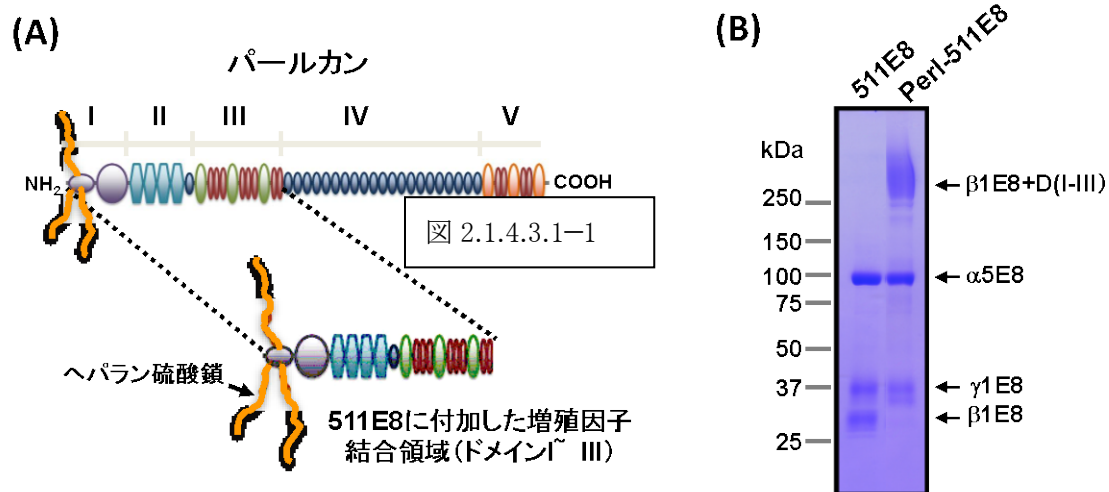


図 2.1.4.-3.1-1 パールカンの構造とそのヘパラン硫酸鎖結合部位(A)および増殖因子制御型 511E8 の SDS ゲル電気泳動パターン(B)

パールカンはコア蛋白質の分子量が約 480,000 の巨大なプロテオグリカンで、5つの機能ドメイン(I~V)から構成されている(図 2.1.4-3.1-1 (A))。ヘパラン硫酸鎖はN末端に位置するドメイン I に3本結合している。このドメイン I を含む N 末端領域(ドメイン I~III)を 511E8 の $\beta 1$ 鎖の N 末端に付加した改良 511E8 (以下、“perl-511E8”と呼ぶ)を作製した(図 2.1.4-3-1 および図 2.1.4-3.1-1 (A))。パールカンの完全長 cDNA (約 13,000 bp) は我々の研究室でクローニング済みである(Li et al. J Biol Chem 285:35545-36655, 2010)。perl-511E8 はヒト 293-F 細胞を用いる一過的組換え蛋白質発現系を利用して調製し、511E8 の場合と同様、 α 鎖と γ 鎖の N 末端に付加したタグを利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製した perl-511E8 の SDS ゲル電気泳動(還元条件下;CBB 染色)の結果を図 2.1.4-3.1-1 (B)に示す。

perl-511E8 が増殖因子と結合するかを確認するため、多能性幹細胞の培養に使用される増殖因子 Activin との結合を固相結合アッセイにより検討した。perl-511E8 は全長パールカンと同等の Activin 結合活性を示し、期待どおりの増殖因子結合活性をもつことが確認された。また、

perl-511E8 をコーティングした培養基材上でヒト iPS 細胞を培養したところ、非常に良好な細胞の増殖が観察され、perl-511E8 がヒト iPS 細胞用培養基材として有効であることが示された(京都大学 CiRA・中川誠人講師との共同研究)。

2.1.4-3.2 接着活性増強型 511E8 の創製とその活性評価

iPS 細胞等の多能性幹細胞はラミニン 511 受容体であるインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ のほかにインテグリン $\alpha v \beta 5$ を発現している。インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ に加えて $\alpha v \beta 5$ も同時に利用できれば、511E8 単独よりも高活性の培養基材の創出が期待できる。

インテグリン $\alpha v \beta 5$ は Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を認識するインテグリンの一つでビトロネクチンと結合することが知られている。しかし、RGD 配列を有する蛋白質はビトロネクチン以外にもフィブロネクチン、フィブリノーゲン、オステオポンティン(別名 secreted phosphoprotein 1 (SPP1))など多数知られており、ビトロネクチンよりも高親和性の $\alpha v \beta 5$ リガンドが存在する可能性は十分に残されている。本研究開発では、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ と $\alpha v \beta 5$ の両方に結合できる“接着活性増強型”511E8 を創製にむけて、インテグリン $\alpha v \beta 5$ との結合親和性が高い新規リガンドの探索し、ビトロネクチンよりも高いインテグリン $\alpha v \beta 5$ 結合活性を有する新規リガンドの同定に成功した。

この新規インテグリン $\alpha v \beta 5$ リガンドの活性部位を 511E8 の β 鎖と γ 鎖に付加したハイブリッド型 511E8 を作製し、その活性を評価した。はじめにインテグリン $\alpha v \beta 5$ への結合活性を保持していることを精製インテグリン $\alpha v \beta 5$ を用いた固相結合アッセイにより確認した。結果を図 2.1.4-3.2-1 (A)に示す。またハイブリッド型 511E8 をコーティングした基質上でヒト iPS 細胞(201B7 株)を培養し、511E8 と同様、iPS 細胞が単一細胞分散条件下で培養できることを確認した(図 2.1.4-3.2-1 (B))。

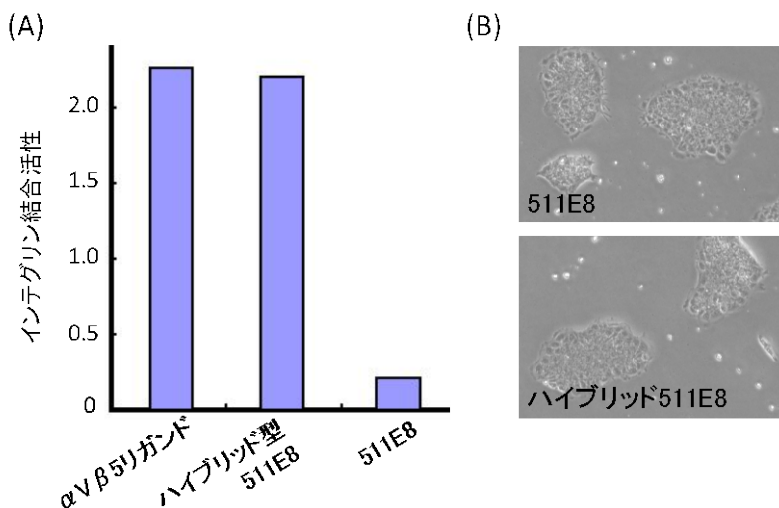


図 2.1.4-3.2-1 FBN1-511E8 のインテグリン $\alpha v \beta 5$ 結合活性(A)とiPS細胞の培養支持活性(B)

今後、様々な濃度でハイブリッド型 511E8 をコーティングしたディッシュで iPS 細胞を培養し、至適コーティング濃度を決定するとともに、長期にわたって継代培養した際の細胞の未分化性維持等について検証を進める予定である。

2.1.4-4 ラミニン 511E8 フラグメントのコーティング条件の最適化

511E8 をコーティングしたディッシュ上でヒト iPS 細胞を培養する際の培養条件を標準化するため、はじめにコーティング条件の最適化をはかった。具体的には、コーティング濃度、コーティング温度、コーティング時間について詳細な検討を行い、最も安定に iPS 細胞が継代培養できる条件を選定した。また、自動培養装置での利用を前提として、プレコーティングしたディッシュの安定性を評価した。

異なる濃度 (0~4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) の 511E8 をコーティングしたディッシュ上にヒト iPS 細胞を播種し、細胞の増殖と培養1週間後の未分化マーカーの発現を指標として至適コーティング濃度を検索した。細胞は京都大学 CiRA で樹立した 201B7 株と国立成育医療研究センターで樹立された Tic 株の2種類を使用した。ディッシュは細胞培養用 2.1.4 穴プレート (BD 社) を使用し、コーティングは 4°C 一晩静置にて行った。201B7 株を使った実験結果を図 2.1.4-4-1 に示す。0.5~1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ でコーティングしたウェルでは、どちらの細胞株でも十分な増殖が観察されたが、0.125 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ では 201B7 株で有意な接着の低下がみられた。一方、>2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でコーティングした場合は、予想に反して増殖がやや抑制され、コロニーの数、大きさとも 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の場合より減少した。これらの結果を踏まえ、至適コーティング濃度を 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ に設定した。

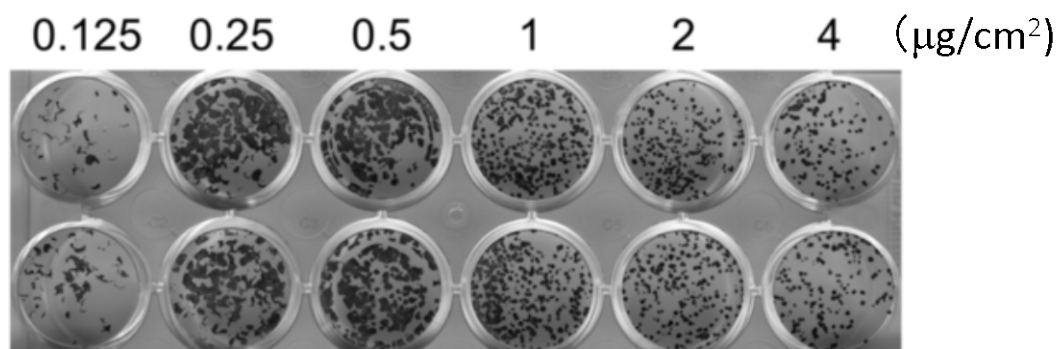


図 2.1.4-4-1 各濃度の 511E8 でコーティングしたウェル上でのヒト iPS 細胞の増殖

511E8 を培養基材として自動培養装置で使用する場合、511E8 でプレコーティングしたディッシュをそのまま実装できることが望ましい。そこで 511E8 をコーティングしたディッシュをクリーンベンチ内で 0~2.1.4 時間風乾し、プレコーティングした状態で使用が可能なかを検討した。その結果、0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ でコーティングした場合、2 時間の風乾で著しい活性低下が認められた。

プレコーティングした 511E8 の乾燥による活性低下は iPS 細胞の培養によっても確認された。511E8 でコーティングしたディッシュをクリーンベンチ内で 1 時間風乾し、その上に iPS 細胞 (201B7 株) を播種して 1 週間培養した結果、細胞の接着と増殖が著しく低下していた。プレコーティングしたディッシュを製品化し、自動培養装置に実装するにはプレコーティングした 511E8 を安定化する技術開発が必要である。

2.1.4-5 ラミニン 511E8 フラグメントの安定化剤の探索

蛋白質の安定化剤としてはグリセロール、トレハロース、ポリエチレングリコール等のポリオールが広く使われている。しかし、これらは溶液状態の蛋白質の凝集を阻害することを主目的とした安定化剤であり、ディッシュ表面に固相化された蛋白質の活性維持に有効とは限らない。そこで種々のポリオールやアミノ酸を含む様々な候補物質を 511E8 (終濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) と混合してディッシュに加え、表面をコーティングした後、クリーンベンチ内で 18 時間乾燥させ、さらに 4°C で 1 週間保管した後、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 結合活性を指標として 511E8 の安定化効果を評価した。その

結果、蛋白質の安定化剤として汎用されるグリセロール、スクロース、トレハロースでは乾燥による511E8の失活を抑えることができず、保水効果が期待される界面活性剤(Tween 20)や鎖長が異なるポリエチレングリコール(PEG)も若干の安定化効果は認められるものの、乾燥前の活性の70%以上が失われることが判明した。そのような中で物質Xを511E8と混合してディッシュ上にコーティングすると、511E8の活性が乾燥後も90%近く保持されることを見いだした。

物質Xによる安定化効果が長期間持続するかを調べるため、511E8と物質Xを混合してディッシュをコーティングした後、室温で1時間乾燥させ、密封して4°Cで保存し、経時的に取り出してインテグリン結合活性を測定した(図2.1.4-5-1)。その結果、乾燥後に2.1.4週間保管した後も511E8の活性はほぼ100%保持されていることが確認された。

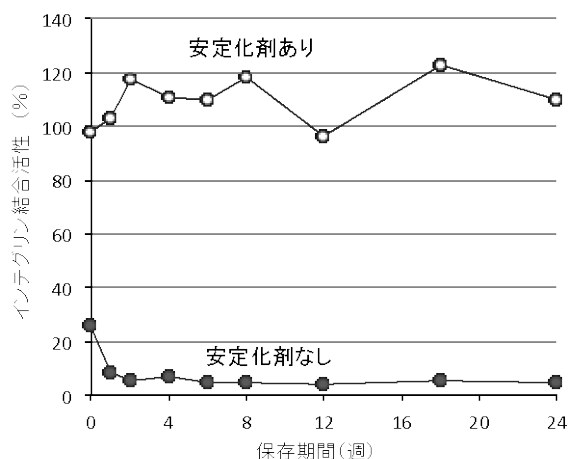


図 2.1.4-5-1 物質 X の安定化効果の持続性

この結果をさらにヒト iPS 細胞の培養で確認するため、コーティングしたディッシュを乾燥後、4°Cで8週間保管した後、ヒト iPS 細胞をその上で培養した。図2.1.4-5-2に結果を示す。乾燥後8週間保管したディッシュ上では細胞が接着せず、コロニーも形成されないが、物質 X 共存下でコーティングしたディッシュ上では未乾燥のディッシュと同等の細胞の増殖が観察され、未分化状態の指標であるアルカリフォスファターゼの活性染色の結果も良好であった。安定化剤共存下で511E8をコーティングしたディッシュ上で培養した iPS 細胞が未分化性を維持していることは、Tra-1-60 や Tra-1-81 の未分化マーカーの発現により確認している。

以上の結果は、物質Xを安定化剤として用いることにより、511E8をプレコーティングしたディッシュを安定に長期間保管・供給できることを示している。511E8をヒト多能性幹細胞用培養基材として製品化する上での重要な課題が一つクリアされたといえる。



図 2.1.4-5-2 物質 X による 511E8 の安定化効果:iPS 細胞の培養による検証

2.1.5 培地および凍結保存液の開発

2.1.5-1 培地の開発

ヒト iPS 細胞の開発研究も含めた産業応用では、安定的に維持され拡大培養できる条件が必須である。ヒト iPS 細胞培養では、培養環境の要素として1)フィーダー細胞を使用、2)フィーダー細胞を使用しない(フィーダーフリー)系の大きく 2 つに大別できる。通常のヒト iPS 細胞培養では、フィーダー細胞が使用された条件が汎用されてきた。一方で、ヒト iPS 細胞応用の可能性が広がり、世界的にもヒト iPS 細胞をベースとした研究が急速に拡大するなか、ヒト幹細胞の培養では、混入因子による未分化性維持・分化誘導などへの悪影響を排除し、安全性を確保するために、成分が明確かつ異種生物由来成分を含まない血清代替品に転換する動きが進んで来ている。

本プロジェクトでは、ヒト iPS 細胞のオリジナル培養法を基準とするべく CiRA と連携しプロジェクトを遂行する。自動化装置へヒト iPS 細胞培養をフィットさせ、幹細胞評価を通して自動化装置開発を効果的に行うための基盤作りが第一に行われる。すでに国内外から多くのヒト ES/iPS 細胞培地が販売されている。そこで、1)フィーダー細胞を使用と2)フィーダーフリー系の双方において、市販培地を自動培養装置や培養基材との相性を中心に評価し、新規開発、あるいは、改良の必要性を判断し、必要性が認められた場合には、開発目標を明確にし、培地開発に着手する。本項目の開発研究を効率よく効果的に施行するため、「培地検証実験計画」を策定し検証を行った。

●培地検証実験計画

・目的:本実験は、培地開発に関する実施計画書記載を具体化するものである。即ち、CiRAでの基礎研究の結果、現時点ではヒト活性化ラミニンフラグメント(ラミニン E8) + 培地 H が再生医療用に適しているとされているため、これらの培養法を自動培養装置にも適応することとなるが、現時点で対象となる培地が市販されておらず、複数の検討で使用する培地の確保が困難なことや、様々な培地のコスト・培養成績、更に自動培養装置を用いた場合の利便性などを総合的に検討した結果が得られていないことなどから、本実験においてヒト iPS 細胞(CiRA“山中 iPS 細胞”)を用いて安定的に培養可能な培地を選定することを目的とする。

・方法

i) 対象市販培地

1)フィーダー細胞使用培地

【国内】

- ・培地 A
- ・培地 B
- ・培地 C

【海外】

- ・培地 D
- ・培地 E

2)フィーダーフリー培地

【国内】

- ・培地 F
- ・培地 G
- ・培地 H

【海外】

- ・培地 I
- ・培地 J
- ・培地 K
- ・培地 L
- ・培地 M
- ・培地 N
- ・培地 O

ii) 使用細胞株

CiRA より提供された 201B7 株及び 409B2 株を使用する。

iii) 検証方法

- ・フィーダー細胞使用培地の検証

手培養による検証

① 平成 23 年 8 月～平成 2.1.4 年 3 月、国立成育医療研究センターにおいて、手培養による培地

検証を実施した。その結果、培地 A を候補培地として選定した(2.1.5)。

自動培養による検証

② 平成 2.1.4 年 9 月～12 月、国立成育医療研究センターにおいて、自動培養による培地検証を実施した。培地 A を使用し、15 継代、約 2.5 ヶ月の検証を実施し、その特性評価を行った。

- ・フィーダーフリー培地の検証

手培養による検証

① 平成 2.1.4 年 9 月～12 月、国立成育医療研究センターにおいて、活性ラミニンフラグメント(ラミニン E8)と Vitronectin (ライフテクノロジー社)を使用した手培養による培地検証を実施し、有力培地を選定する。

iv) 評価方法

3 継代培養し各評価を行った。幹細胞特性解析として、細胞形態評価、未分化マーカー(ALP)染色解析、及びアレイ定量 PCR 法によるヒト多能性幹細胞マーカー(96 種)解析を行う。ホームストックのデータを基準に自動培養後の細胞の比較評価を定量的に行う。

以上が培地実証実験計画であり、そこで選定された培養システム(培地とフィーダー細胞および細胞外マトリックス)で統一ロット管理されたヒト iPS 細胞ストック(ホームストック)を構築する。それにより、機器開発を一定した iPS 細胞で評価できるため、各開発研究および時系列的な評価も安定して行える。さらに、ロット管理された細胞株なので、いつでも基準となるデータと比較して評価が可能となる。

表 2.1.5-1-1 ヒト iPS 細胞用培地(国内外市販)の検証結果(フィーダーフリー条件)

培地	Laminin E8		Vitronectin	
	201B7	409B2	201B7	409B2
培地 F	X (P1)	X (P1)	-	-
培地 G	○	○	○	○
培地 I	△	△	△	△
培地 J	X (P1)	X (P1)	X (P1)	X (P1)
培地 H	○	○	-	-
培地 K	X (P1)	X (P1)	X (P2)	X (P1)
培地 L	○	○	-	-
培地 M	○	○	○	○
培地 N	X (P2)	X (P1)	X (P1)	X (P1)
培地 O	X (P1)	X (P1)	X (P2)	X (P1)

山中細胞株であるヒト iPS 細胞、201B7 と 409B2 の 2 つを用いて、細胞外基質として本プロジェクト開発のラミニン E8 と市販物である Vitronectin (ライフテクノロジー社)そして培地を国内外の 10 種を選定し未分化維持性について 3 継代培養を行った結果を示す(表 2.1.5-1-1;赤字:国内製品, 評価:X;未分化性を維持できない。()内の P は継代数. 3 継代まで培養維持できなかったことを示す. △;培養維持できたが分化コロニーの割合が 50%を超える状態. ○;良好に維持できる.)。

フィーダーフリー条件でヒト iPS 細胞が継代培養可能であった 4 種類の培地の中でも最も安定的に培養が可能であったのは、培地 H であった(図 2.1.5-1-1)。ヒト iPS 細胞 201B7 と 409B2 の双方とも、培地 H と細胞外基質ラミニン E8 により極めて良好に培養維持されている。フィーダーフリー条件でのヒト iPS 細胞ホームストックを作製するための培養条件として、培地 H とラミニン E8 を選定し、201B7 と 409B2 それぞれに対して 60 本の細胞ストックを構築した。培地 H とラミニン E8 下でのヒト iPS 細胞は極めて安定して培養維持され、継代数 10 を超えても未分化性維持に問題がなかった(図 2.1.5-1-2)。ヒト iPS 細胞 201B7 と 409B2 の双方とも、培地 H と細胞外基質ラミニン E8 により極めて良好に培養維持され比較的長い継代期間(P11)でも安定して培養可能であった。

継代方法は 0.5mM EDTA と Tripleselect を使用した比較的容易な方法で行うことができ、細胞が単離されても死滅または分化することが少ないため、継代効率が極めて高い。一方、多くのケースで継代を行う毎に死滅または分化してしまっていた。半数の培地では、フィーダーフリー下での培養では継代する毎に未分化性を保持することが極めて困難になり、P1 でほとんど未分化な細胞は認められない(図 2.1.5-1-3)。フィーダーフリーと異種由来成分を排除した(ゼノフリー)培地での培養はヒト iPS 細胞を用いた開発研究や産業応用に対して次世代のスタンダードになる可能性がある有望なものであり、国内外の企業は製品の開発を進めている。

自動培養装置もユーザーの期待する用途に対応するためにもそれに合わせたプログラム開発は

必要である。国内外で販売されているフィーダーフリー用の主立った培地選定し評価を行った結果、培地 H はどの市販培地よりも極めて安定してヒト iPS 細胞が培養可能であるという重要な結果を得た。本プロジェクトで大阪大学関口研究室が開発中の活性型ラミニン E8 との相性もよいことが判明した。ヒト iPS 細胞培養のフィーダーフリーの系として培地 H とラミニン E8 がこれまで市販されているどの培地よりも良好な組み合わせであることを見出した。本プロジェクトで機器の開発に用いるフィーダーフリー用の細胞として培地 H とラミニン E8 下で構築した 201B7 と 409B2 細胞ストックに対して、定量的な評価判定を可能とするために、96 個の幹細胞マーカーに対する定量 PCR 解析 (TaqMan® Array Gene Signature Cards) を行った (図 2.1.5-1-4)。

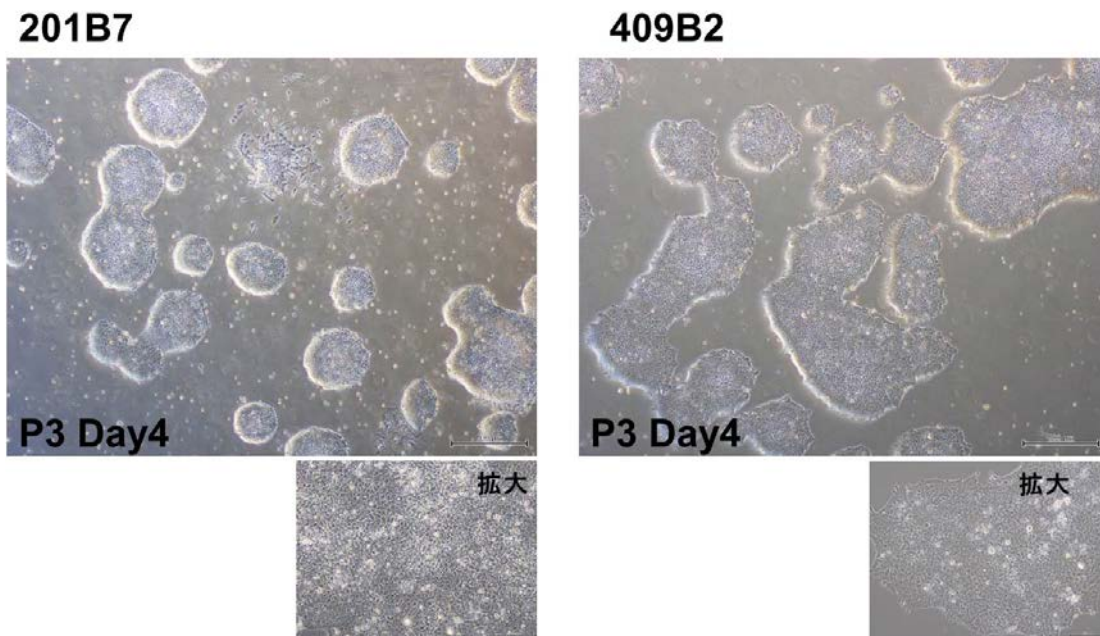


図 2.1.5-1-1 フィーダーフリー下 (培地 H と Laminin E8) の良好に培養されているヒト iPS 細胞

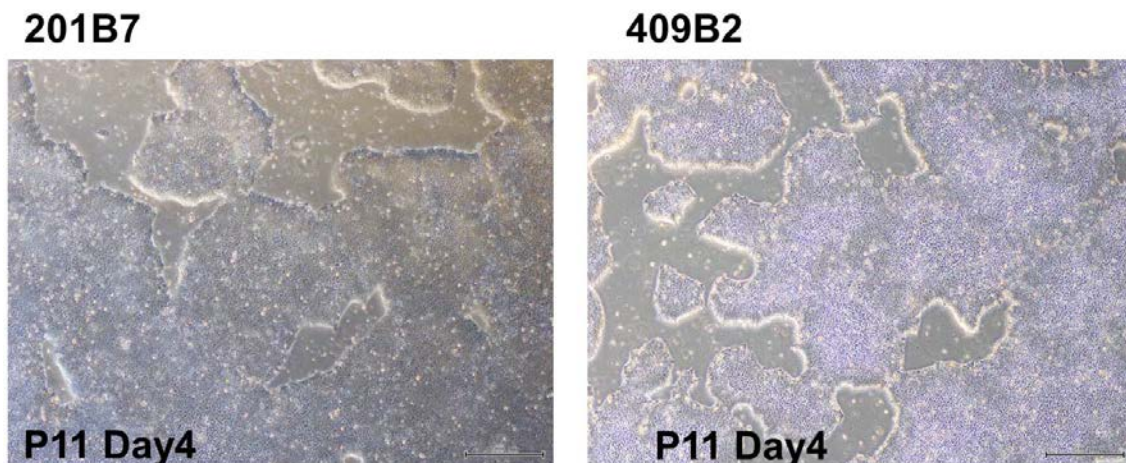


図 2.1.5-1-2 培地 H とラミニン E8 によるヒト iPS 細胞培養

201B7

409B2

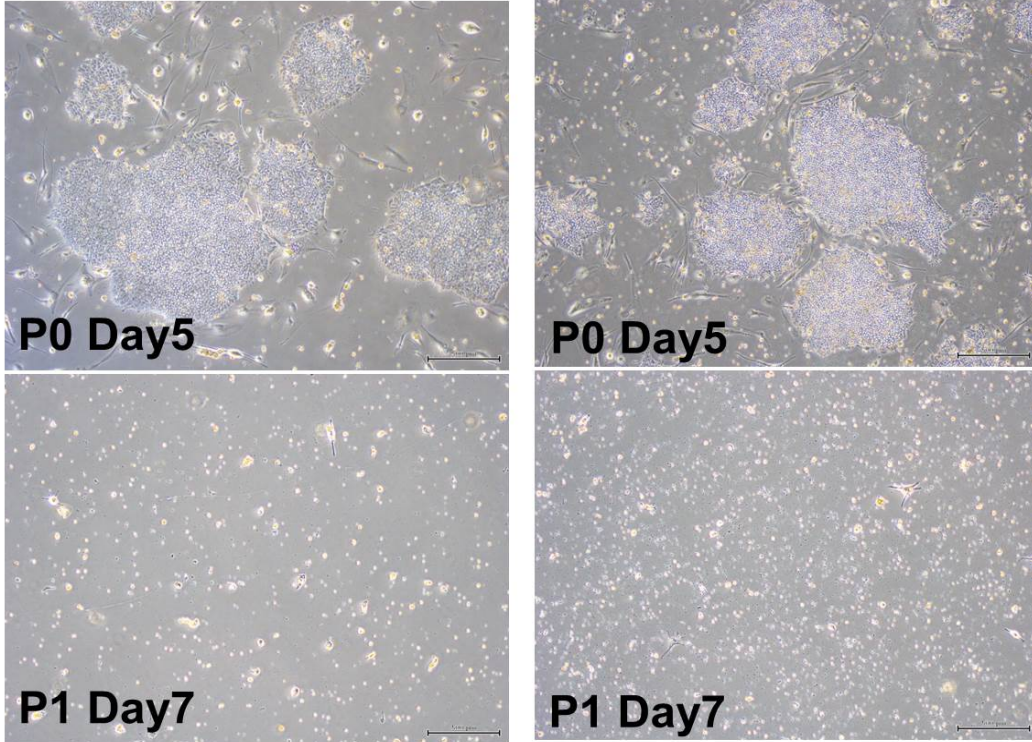


図 2.1.5-1-3 フィーダーフリー下で培養維持できないヒト iPS 細胞

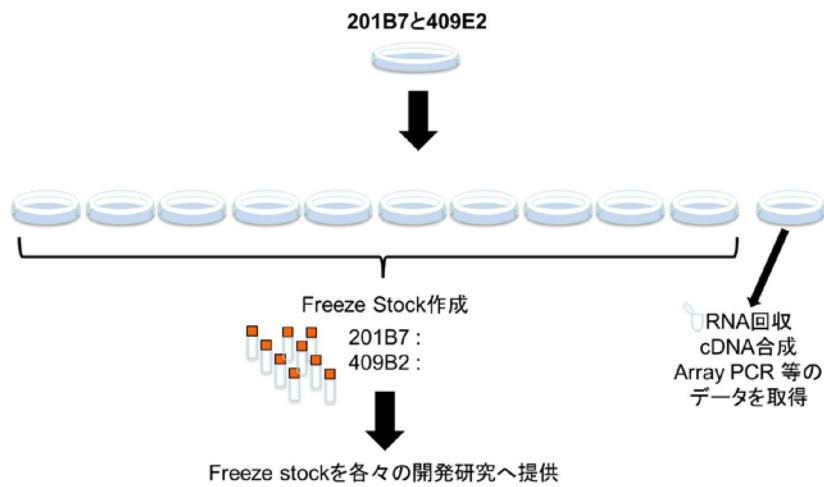


図 2.1.5-1-4 統一ロットの評価用ヒト iPS 細胞ストック整備

統一ロットを整備することは、均一な細胞で各開発研究を行うこととなり、関連した評価が可能で定量的なデータも整備することで、プロジェクト内の連携した開発評価が可能となる。幹細胞マーカー90もの遺伝子発現の定量データは極めて有用である。培地 H とラミニン E8 下で構築した 201B7 と 409B2 細胞ストック及び培地 M 下で得られた細胞に対して定量 PCR 解析を行った。幹細胞マーカーは典型的なヒト多能性幹細胞発現動態を示していた(図 2.1.5-1-5)。主要な未分化幹細胞マーカーである POU5F1, NANOG, SOX2, FOXD3, LIN28, CD9 と不死化マーカー TERT の発現を定量的なデータとして保存している。

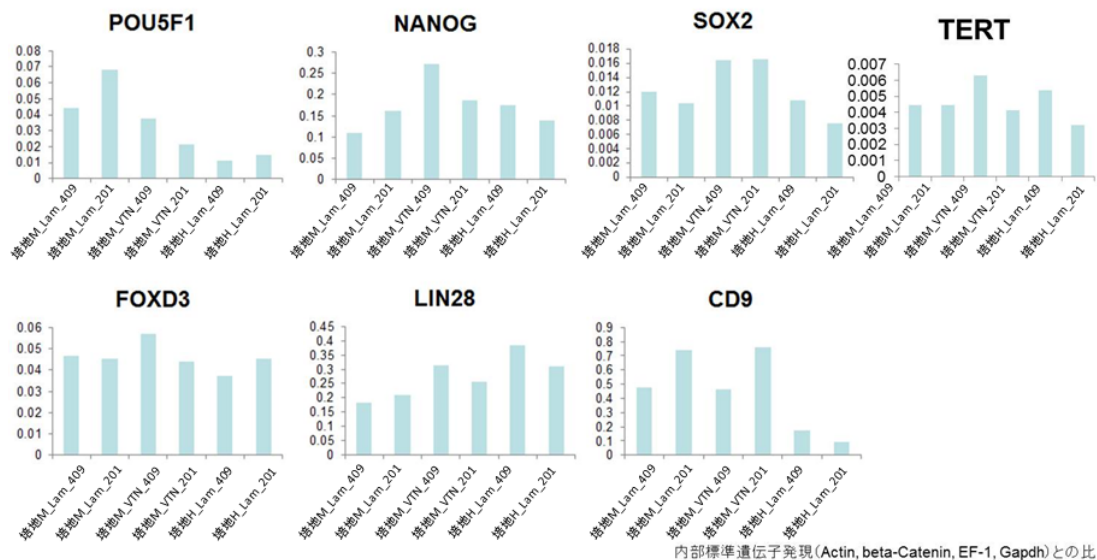


図 2.1.5-1-5 フィーダーフリー下のヒト iPS 細胞幹細胞マーカー定量 PCR 解析

選定培地とラミニン E8 下で構築した 201B7 と 409B2 細胞ストックに対しては、染色体核型解析を行った結果、どちらも正常ヒト染色体核型である 46,XX であった (図 2.1.5-1-6)。これらデータも基準のデータとなる。

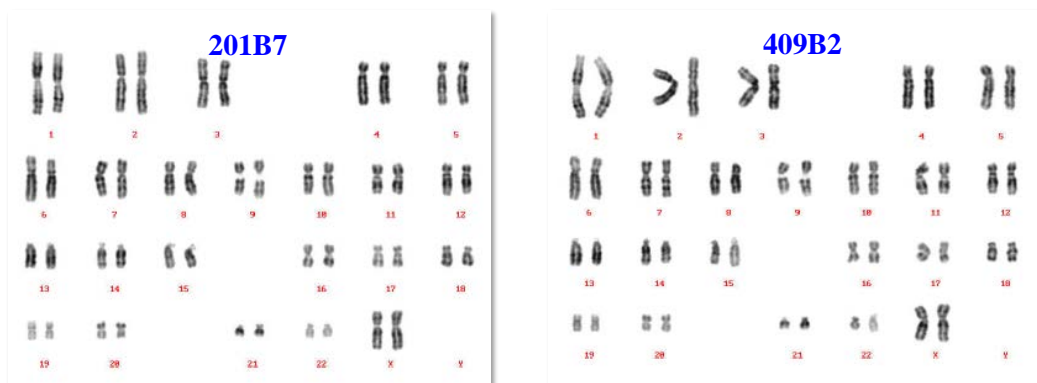


図 2.1.5-1-6 ストックとなるヒト iPS 細胞の染色体核型解析

現状国内外で市販されている培地の山中 iPS 細胞株に対する評価を予定通り終了し、開発に適した培地を選定できた。今回選定した培地は国産培地であり、ラミニン E8 との併用により非常に安定的にヒト iPS 細胞が培養維持されることを見出した。他にも、国産培地である培地 G もフィーダーフリーでヒト iPS 細胞培養は可能であることなど、十分な培地評価データを取得することができ、今後の機器開発に生かせる。

2.1.5-2 凍結保存液の開発

iPS 細胞の凍結には、従来、凍結保存液として DAP2.1.1-3 をもちいたガラス化法が用いられていた。しかし、凍結前の凍結保存液を添加してから凍結するまでの時間及び、解凍後の培地交換までの時間は秒単位の時間で制限されており、凍結前及び解凍後の液体状の凍結保存液中に細胞を時間以上さらすと細胞が死滅してしまうことが知られている。これは DAP2.1.1-3 には DMSO が高濃度で用いられており、高い浸透圧のため、液体の状態では細胞の膜構造を破壊してしまうことが考えられる。熟練した凍結作業者が短時間で処理を行う必要があるガラス化法は、

自動化で大量に処理する場合には向かないと考えられる。

そこで、凍結保存液については、凍結保存の自動化が実現可能な緩慢凍結法を用い、主な有効成分として低濃度の DMSO を含む市販の緩慢凍結法用凍結保存液の中から、まずH2.22年度実施の“iPS 細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発”では、凍結保存液(B)を用い、Ticにおいて解凍後生細胞率Av70.9%を得た。さらに本プロジェクトでは京都大学 iPS 研究所でも既に手作業による評価により好結果が得られていた血清等の異種生物由来の成分を含まない凍結御保存液(A)を選択して自動凍結/解凍の評価をしたところ、解凍後 Rock 阻害剤を添加する事により、生細胞率でAv80%を上回る好結果を得た(図 2.1.5-2-1)。現状、国内で市販されている凍結保存液で、山中 iPS 細胞株に対する評価し、開発に適した凍結保存液を選定できた。

なお、急速凍結の DAP2.1.1-3 を用いたガラス化法では規定時間内に凍結解凍処理した場合は、高い生細胞率と良好な解凍後コロニー形成が確認でき少量の処理では問題ないが、規定の処理時間を超えると急に生細胞数が減りはじめ、液体の DAP2.1.1-3 中に曝す時間が約1分を超えると細胞はほぼ全滅するものと考えられる。

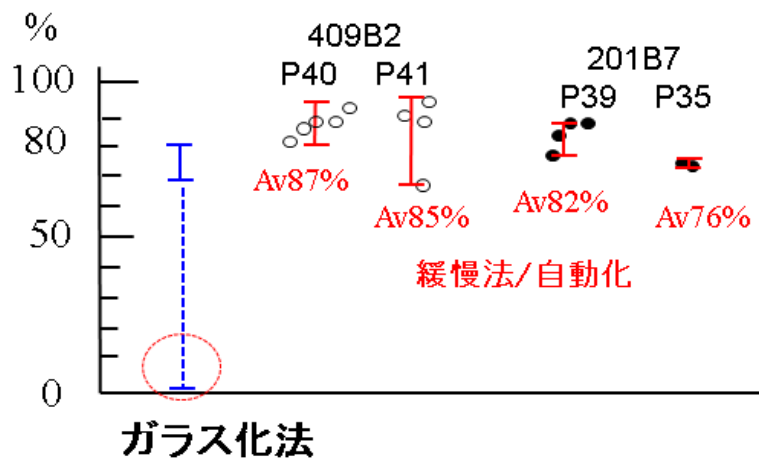


図 2.1.5-2-1 解凍後生細胞率比較

凍結保存液(A)を用いた緩慢凍結法による評価において解凍後した iPS 細胞の性状は、ALP 染色による凍結解凍後の培養細胞の未分化能確認及び、未分化マーカーによる確認、細胞表面マーカーによる確認、核型解析による確認を行いいずれも正常であることを確認した(図 2.2-3-4～図 2.2-3-8 参照)。

緩慢法の自動化による凍結/解凍では、密に培養された iPS 細胞を細胞剥離液(CTK 液: 柵リプロセル)を用いて剥離回収し、PBS で洗浄、細胞を回収して15ml遠心チューブに分注、遠心(1した後、上澄みを除去し、hiPS 培地を加えて再懸濁後さらに上澄みを除去して凍結培地(A)の中に懸濁、+4℃から-80℃まで45分かけて緩慢凍結法により予備凍結し(図 2.2-3-2 参照)液化窒素温度で保管した iPS 細胞を、アルミブロック式解凍装置によりバイアル 1 本毎に 37℃約 3 分を保持して解凍し、Rock 阻害剤を添加した hiPS 培地を用いて再培養した後に性状を確認した。

その結果、国立成育医療研究センターの指導のもと、ALP 染色による未分化能の確認・未分化マーカーによる確認・細胞表面マーカーによる確認・核型解析による確認のいずれにおいても凍結前の同ロット iPS 細胞と同様に正常な結果となった(図 2.2-3-4～図 2.2-3-8 参照)。

なお、これまでの結果は、+4℃から-80℃迄を45分で冷却する予備凍結プログラムで得られた結果であるが、今後自動培養装置との連動時の処理効率向上のため、さらに短時間での予備

凍結処理が可能か検討を行う。また、ラミンを用いたフィーダーフリー培養に合わせた、凍結解凍評価を行い、同様の市販凍結保存液を用いて、最適な予備凍結プログラムの検討を行う。

2.2 ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発

2.2.1 ヒト iPS 細胞に係る技術等の標準化案の策定

標準化(図 2.2.1-1)は産業の発展と相補的であり、特にヒト幹細胞技術の国際標準化は、新規な細胞初期化の方法論が今後出現する可能性を想定すれば、特定の多能性幹細胞において確立された技術の他細胞種への展開などが求められるため慎重な議論が必要である(Sengoku, S., Sumikura, K., Oki, T. and Nakatsuji, N., (平成 23) Redefining the concept of standardization for pluripotent stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports* 7(2):2.2-1.226.)。また、技術が成熟していない初期の段階では、用語と定義の標準化(規格文書の作成)がその後の実用化、産業化に向けて重要な役割を担う(BS0:2011 “A standard for standards — Principles of standardization”)。

経済産業省の website で公開された直近の「再生医療の実用化・産業化に関する報告書」(平成 25 年 2 月)によれば、再生医療への取り組みは研究活動において我が国は世界のトップレベルにあるにもかかわらず、その実用化においては、格差の拡大が懸念される状況にある。一方、欧米等各国では多能性幹細胞の臨床・医療応用を巡る市場規模の将来予測及び自己・同種の各特性を見極めながら産業化に向けた動きが加速され、ISO における関連 TC の新設がこれらの現状にも呼応して平成 25 年 2 月中旬に正式承認された。

ISO の動向に対峙し、当初 5 年間の実施計画を 3 年前倒し、2 年間で掲題に係る用語の ISO 国際規格原案の作成を完了した。

概要を次に示す。

注記 再生医療周辺産業の将来市場規模予測(経済産業省、試算)

- ・ 国内:170 億円(平成 2.1.4 年)⇒1.3 兆円(平成 62 年)
- ・ 世界:2.1.400 億円(平成 2.1.4 年)⇒15 兆円(平成 62 年)

標準化

Standardization

実在又は潜在の問題に関し、与えられた状況の下で最大限の秩序を実現するため、共通かつ繰返し使用するための取決めを確立する活動。

(ISO/IEC Guide 2)

自由に放置すれば多様化、複雑化、無秩序化する事柄を少数化、単純化、秩序化する行動。具体的には、様々な「もの」や「事柄」について、「品質・性能の確保」、「安全性の確保」、「互換性の確保」、「試験・評価方法の統一」等を目的に、一定の基準を定めること。

図 2.2.1-1 標準化の定義

注記 ISO の役割:ISO は工業製品およびサービスなどの国際的な商取引の促進を目的とする国際標準化機関(参加国、163 ヶ国)であり、国際標準規格文書(ISO 規格)を制定している。ISO 規格は単独では法的拘束力を持たないが、各種規制や認証制度などに引用されることで強制力が生ずる。

2.2.1-1 標準化案(用語と定義)の策定(図 2.2.1-1)

国内外のコンセンサス形成に向けて ISO 中央事務局及び主要各国に対するロビー活動の一環として ISO ワークショップ(於、スイス・ジュネーブ)(2.6.2.1 参照)に参加した。次いで、再生医療学会、国研、アカデミア(生物工学分野)、産業界(FIRM)の各有識者、府省(内閣府、文科省、厚労省、経産省)担当者参画による研究討論会で国内コンセンサスを形成し、幹細胞技術分野の用語と定義に関する ISO 標準化原案の暫定日本案を ISO 仕様にて作成した。

引き続き、ISO/TC276-Biotechnology(P メンバー登録済)国内検討委員会(事務局、FIRM)において国の平成 25 年度新規予算措置で ISO 国際提案に向けた検討を継続し、平成 25 年秋の ISO 国際提案(NWIP)及び平成 27 年秋の ISO 国際規格(ISO/IS)発行(いずれも予定)を目指す。

掲題に係る平成 25 年 4 月以降の取り組みは、ヒト iPS 細胞技術の応用研究及び革新的技術開発の動向調査及び iPS 細胞の大量培養技術・自動培養装置に係る周辺要素技術の標準化に重点を移し、その成果の開発目標への速やかな反映を図る。

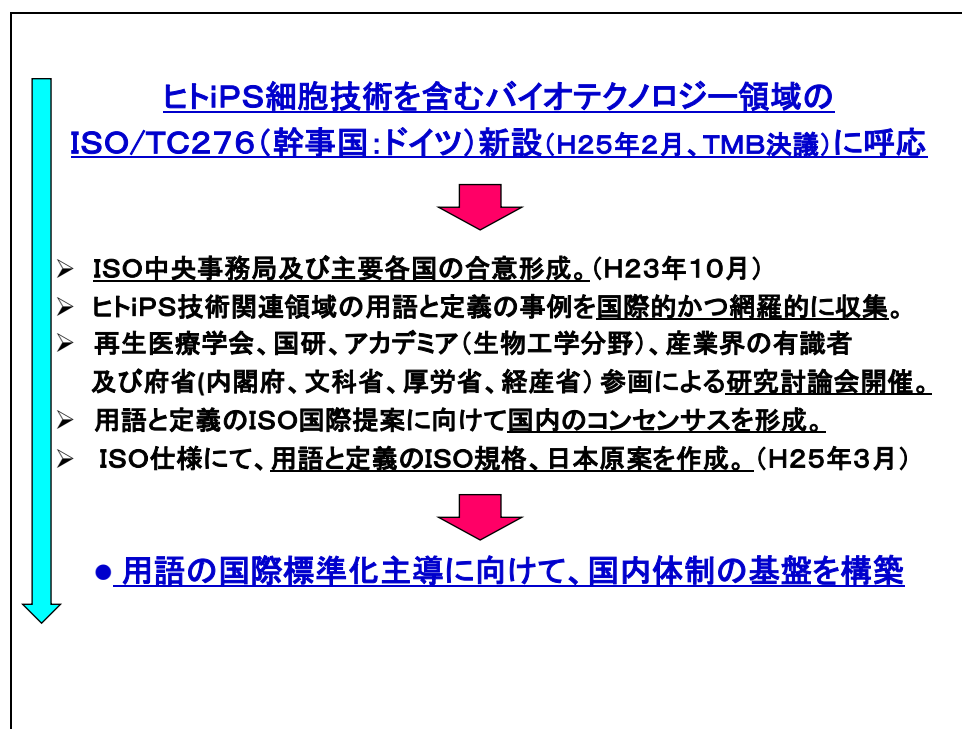


図 2.2.1-1 幹細胞技術分野の用語と定義の ISO 国際標準化への取り組み

2.2.1-1.1 ISO/IS 規格「ヒト幹細胞技術:用語と定義」(案)の作成

国際標準化の分野で世界を主導する英国・BSI では標準化の段階に応じて、次に示す 7 種類に分類される。

1. a specification(仕様、要求事項)
2. a code of practice(規則、指針)

3. a guide(手引)
4. a method of test(試験方法)
5. a method of specification(指定方法)
6. a vocabulary(語彙:用語と定義)
7. a classification(分類)

一方、ISO 規格の種類は、国際規格としての要件であるコンセンサスの程度に基づく、次に示す6種類で構成される。

1. International Standard (IS) (国際規格)
2. Technical Specification (TS) (技術仕様書)
3. Publicly Available Specification (PAS) (公開仕様書)
4. Technical Report (TR) (技術報告書)
5. International Workshop Agreement (IWA) (国際ワークショップ協定)
6. Guide(ガイド)

本事業では、全てのISO 会員による最高レベルのコンセンサスのプロセスを経て開発されるISO 分類1(注、ISO/IEC 専門業務指針第一部に準拠してISO 会員および当該TCのPメンバーによって賛成2/3以上、反対1/4以下で承認され、ISO/中央事務局より発行される。)(図2.2.1-1.1-1)に該当する規格文書としてISO/IS規格「ヒト幹細胞技術:用語と定義」(案)を作成した



図 2.2.1-1.1-1 ISO 規格の作成手順

1) ISO/IS 規格の付属書(参考)(案)作成

主要な国際学会、アカデミア、国際機関、国内団体、国内標準化機関の幹細胞技術に関連する各用語集から約 6,000 語を網羅的に収集した。

次いで、用語の重なり等を排除した約 3,000 語について ISO 仕様(規定すべき内容をひとつの paragraph で記述する)にて定義案を作成し、標題を次に示す 4 種類の付属書(参考)(案)として取りまとめた。

1. Glossary related to stem cell technology
2. Glossary related to clinical and medical applications of stem cell technology
3. Glossary related to regenerative medicine and tissue engineering
4. Glossary in the field of biotechnology

2) 研究討論会の開催

国内のアカデミア、学会、産業界の各有識者及び府省関係者による「幹細胞技術及び再生医療分野の用語と定義の標準化に関する研究討論会」(別紙 1 参照)を開催(合計 3 回)し、用語の標準化に向けた国内コンセンサスを形成した。

(第 1 回研究討論会)(平成 2.1.4 年 11 月)

当該分野の要素技術及び応用産業の分類及び重要な用語(再生医療及び細胞治療)の定義について既存の定義事例を踏まえて意見交換し、今後の進め方として、工学分野に馴染む定義の策定等を確認した。

(第 2 回研究討論会)(平成 2.1.4 年 12 月)

ASTM 及び BSI のヒト幹細胞技術に係る用語集を事務局にて編集した主要な用語及び定義(案)の事例(約 100 語)を参考にして意見交換し、以下の方針を確認した。

- 1) iPS 細胞と再生医療を組み合わせる日本独自の取り組みを主張する。
- 2) iPS 細胞の定義を日本から発信し、再生医療の実現に資する。

(第 3 回研究討論会)(平成 25 年 2 月)

ISO 提案等に係る我が国唯一の窓口である経済産業省/JISC の仕組み、経済産業省の公募提案型国際標準開発事業の平成 25 年度新規公募情報、再生医療学会における「医家向けの手軽な用語集」編纂の動向等を踏まえて、ISO/IS 規格の本文(案)では、ヒト幹細胞に加えて、前駆細胞についても定義すること、及び ISO 提案に向けて公式の場で検討継続することを確認した。

3) ISO/IS 規格(案)作成

第 1 回～第 3 回研究討論会の結果を踏まえて、ヒト幹細胞の種類及びこれらの加工・製造に関する合計 10 種類の用語と定義の規格案を「ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」第 1 章第 2 定義 1(薬食発 0907 第 4 号、平成 2.1.4 年 9 月 7 日、厚生労働省医薬食品局長発信)に準拠して標題“Human stem cell technology — Selected terms and definitions”にて作成した。

なお、規格本文(案)では現行の関連 4 規格を引用規格とした。引用規格を次に示す。

- ・ ISO 13022, Medical products containing viable human cells – Application of risk management and requirements for processing practices
- ・ ISO 18113-1, In vitro diagnostic medical devices – Information supplied by the manufacturer (labelling) – Part 1: Terms, definitions and general requirements
- ・ ASTM F2.1.1-3-12.1.1, Standard Terminology Relating to Tissue Engineered Medical Products
- ・ BSI PAS 84:2012, Cell therapy and regenerative medicine – Glossary

第1回研究討論会で課題として指摘された、幹細胞技術分野における加工及び利用技術の分類を取りまとめ付属書(参考)とした。

2.2.1-1.2 ISO 国際提案に向けた国内体制の構築及び今後の取り組み

1) 国内体制の構築

平成2.1.4年2月のISO/TMB(技術管理評議会)シドニー会議において新規設立が承認されたISO/TC276-Biotechnology(幹事国:ドイツ)(事務局及び議長:ドイツ・DIN)に対する新規国際提案に向けて、当該TCの国内検討委員会(事務局:FIRM(一般社団法人再生医療イノベーションフォーラム))を新設する方向で経済産業省関係部署の同意を得た。なお、予算措置は、「ISO国際規格の開発を目的とする国際標準開発事業(閣議決定等で示された国際標準化戦略分野)」の「再生医療の用語のISO化及び周辺産業機器類の基準のISO化に向けた素案作成を目指す」新規テーマ(名称:再生医療の基盤技術に関する国際標準化)(事業期間:平成25年度から3年間))による。

2) 今後の取り組み

FIRM(平成25年4月現在の法人会員数約50社)の作業部会(規制制度WG、サポーティングインダストリーWG、標準化WG)等と連携して、ISO/TC276の第1回総会(開催予定時期:平成25年12月上旬)における「ヒト幹細胞技術:用語と定義」(案)のISO国際提案(NWIP)を目指す。

注記 ISO/TC276 –Biotechnology 参加登録国(平成25年5月現在)

- ・ P メンバー(11カ国):ベルギー、カナダ、ドイツ、日本、韓国、オランダ、スペイン、スリランカ、スウェーデン、タンザニア、英国
- ・ O メンバー(14カ国):アルゼンチン、オーストラリア、オーストリア、チェコ、エクアドル、フィンランド、フランス、ハンガリー、イスラエル、イタリア、リビア、ノルウェー、スイス、米国

2.2.1-2 動向調査

2.2.1-2.1 標準化の動向調査

iPS細胞の自動・大規模培養を巡る周辺技術の産業化及び標準化の動き等について平成23年6月から平成2.1.4年10月にかけて欧米(米国、カナダ、ドイツ、英国)7都市で予備調査した。

また、ISO中央事務局の主導で開催されたワークショップ(平成23年10月)において幹細胞技術分野の用語の国際標準化について提言し、主要各国より一定のコンセンサスを得た。さらに、

新 TC (ISO/TC276) 立ち上げの動きと呼応して、ISO/TC2.2 総会(平成 2.1.4 年 8 月)の場で議長より今後の連携について前向きな回答を得た。

1) 欧米における幹細胞技術の産業化動向調査(別紙 2 参照)

1. 培養規模大規模化(当面の目標: 10^{12} 個/ロット)により、培養細胞の収率は平成 37 年に向けて指数関数的に改善し、設備投資、労務費の占める割合は相対的に軽微となると予測。その結果、製造コストに占める培地の割合は、現行の 2.1.4%から 58%に増加し、標準化/産業化は安くて良い培地の開発が要。
2. 培養規模はサスペンション方式(10^{11} 個/ロット)を経て、 10^{12} 個/ロットのレベルを超える超大量培養へ向かう可能性も具体的に示唆。(例: DNA Encoded Libraries - A Disruptive Innovation for Molecular Discovery? GlaxoSmithKline 等)
3. また、幹細胞の大規模培養に関連する周辺技術の標準化に関して、米国 NIST で具体的な動き。(NIST workshop/Functional Imaging for Regenerative Medicine Workshop)
4. 再生医療の市場は米国が先行して席卷(占有率は約 56%)し、ドイツを中心とする欧州各国とも連携強化を推進。アジアの占有率は、5%でいまだ途上。
5. Hoffmann-La Roche 等、欧米の大手企業は centralized (同種細胞)と de-centralized (自己細胞)のどちらにでも対応できる体制で当面对処する模様。ただし、アカデミア、大手製薬企業などが関心のある幹細胞技術を基盤とする発生生物学分野の新たな知見のその先にある、産業化・臨床応用の流れは、自己細胞ではなく、明らかに同種細胞と想起。
6. バイオリクター攪拌翼の形状は、ヒト iPS 細胞の培養収率に微妙に影響(例: 8 枚羽の角度が、 $45^{\circ} 30'$ と $45^{\circ} 60'$ で、収率に明らかな差が発生)。生化学的な影響(継代に伴う遺伝子変異の蓄積による再生サイクルの停止など)に加えて、3次元培養時のせん断応力など物理的な要因の影響についても検討の必要性が浮上。
7. 英国では、過去 10 年間のデータに基づき peak cell density(現在 $1.5-3 \times 10^7$)の doubling time を約 6.3 年(10^{12} 個/ロットのレベルを超える超大量培養は目前)と予想。
8. 欧米における iPS 細胞自動培養装置の培養規模は、フラスコのレベルであり(図 2.6.2.1.1)、培養後の凍結モジュールの開発も進んでいるが、装置全体の小型化、一体化を含めて、実用化に向けての課題が山積し、将来展望の見極めは時期尚早。



図 2.2.1-2.1-1 TAP Biosystems の市販 iPS 細胞自動培養装置

2) ISO における標準化動向調査(別紙 3 参照)

ISO 中央事務局の主導で開催された ISO ワークショップ(平成 23 年 10 月 25 日~26 日)にお

いて TC 新設に向けてのタスクフォースへの積極的な関与/貢献の意向を ISO 中央事務局の含む複数の関係者に対面にて伝達した。

さらに、“Terminology on techniques of analysis for industry- focused applications: a personal view, and Japanese biotech industry trends and standardization” と題して非公開で口頭発表を行い、我が国からの幹細胞技術分野の用語の ISO 国際提案に対して、主要各国より一定のコンセンサスを得た。

当該ワークショップでは、最大の成果として幹細胞技術を含むバイオテクノロジー分野の専門委員会 (Technical Committee, TC) の新設を ISO 上層委員会 (技術管理評議会 (Technical anagement Board, TMB) (図 2.6-6) に勧告することが合意された。(注、1 年 4 カ月後の平成 25 年 2 月 28 日付で ISO/TC276-Biotechnology として TC 新設が正式承認された)。

2.2.1-2.2 幹細胞培養技術の動向調査

海外の創薬や再生医療に向けた幹細胞研究・開発の動向と幹細胞の出口応用に焦点をあて企業、行政や患者団体等の幹細胞研究に対する規制や産業化について調査を行うために、米国フロリダ州ウェスト・パーム・ビーチで開かれた世界幹細胞サミット (World Stem Cell Summit) に参加した。京都大学物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS) は共催機関として参加しており、iCeMS の中辻憲夫教授は、本研究事業「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術開発」のうち中辻教授を代表とするプロジェクトの成果を報告した。京都大学の山中伸弥教授のノーベル賞の受賞もあり、世界が日本の動向に強い関心を持っていることがうかがえた。



図 2.2.1-2.2-1 World Stem Cell Summit の様子

応用を見据えた技術、規制と支援の仕組みに関する数々のセッションが活発に行われていた。幹細胞培養に関する各要素の産業化は臨床応用や創薬開発などの研究をそれぞれ見据えた製品開発が行われていた。企業展示では、北米のみならず、北欧やイスラエルそして日本の各出展社が応用に根ざした製品を紹介していた。幹細胞培養では、培地について培地、マトリックス、基材、酵素等の継代製品が主となるが、動物由来フリー製品は基本でありその上で性質 (幹細胞拡大培養を可能とする) 勝負のステージに来ていた。北欧やイスラエルの企業製品では、かなり品質の高い製品 (培地やマトリックス) を紹介していた。さらに、培養の自動化は萌芽期からいかにユーザーの要望に応える実働機を提供するかというステージであるように感じられた。

今回のサミットでは、ES 細胞や iPS 細胞のみならず、実際に臨床が行われている間葉系幹細胞や脂肪組織由来幹細胞などの体性幹細胞による臨床現場からの報告も多かった。安全性は

議論の余地無しというレベルで行われている体性幹細胞による再生医療でも、数々の問題点があることが報告された。全体的に、本プロジェクトで行っているような技術開発や製品が世界的にも研究や産業応用に貢献できると確信した。

2.2.1-2.3 幹細胞自動培養装置の動向調査

海外の自動培養装置の動向調査を行うために、米国フロリダ州のオーランド(ディズニーワールドの所在地)の近くのホテル併設のコンベンションセンターGaylord Palms Resort & Convention Centerで開催された SLAS2013(Society for laboratory automation and Screening)に出張し、動向調査を実施した。

今回、HTS (High-Throughput Screening)、創薬(新薬開発)で薬剤の候補物質を細胞等を使って高速でスクリーニングする装置として使用する分注機は、数多くのメーカーが出展した。スクリーニング用の細胞の準備を行う自動培養装置も本展示会の重要な対象なのだが、接着系の細胞を対象とした実機はTAP社が展示したのみであった。TAP社、TAP Biosystems社は英国の企業で、海外のメジャー製薬企業が作ったコンソーシアムを母体とし、自動培養装置を開発し、販売する企業である。本展示会には、CompacT SelecT を出展し、初めて、同社のカタログ(CompacT SelecT と SelecT を紹介)を入手した。説明担当者との話では、iPS細胞の自動培養を行っている、明確に答えた。CompacT SelecT は、中央にロボットが動作するエリアがあり、その左にインキュベータがある。右側は、何も無い機種とプレートへの播種機器がある装置があるが、iPS細胞対応機では、この右側に、イメージング機器があり、コロニーピックアップを行っていると言明した。どのような方式でピックアップを行っているかの詳細は不明で、展示機は、右側に何も無い装置だったため、実際の機構は確認できなかった。

一方、Hamilton社は、成育阿久津先生の情報によると、SLASにiPS細胞の自動樹立対応機を展示するとされていた。どうも、Hamilton社が出展するとの聞き間違いだったらしく、自動培養装置の出展はなかった。説明担当者に聞くと、MatoriCal社のMACCSという自動培養装置を紹介された。阿久津先生が見られたニューヨークの装置(近くのペンシルバニア州にある)も、MACCSを使用しているとのこと。MACCSの存在そのものは、Junicon社の調査で知っていたが、カタログを初めて入手し、詳細がわかった。それによると、大きさは、3.2m×1.8m×2.7m(H)で、インキュベータは、T175サイズ(体積なので、トリプルやハイパーも可)が270個入り、最大3台まで増設できる。-80℃の凍結保存モジュールがあり、凍結チューブは48本と少ないのですが、解凍は5本同時にできます。大陽日酸のように、バンク的な感じではなく、培養工程の一時保存と位置付けているらしい。

他にも、Cultureをキーワードに実機展示(自動培養装置の展示はない)したメーカーがあったので、資料の送付を依頼したが、どこからもカタログは送られてこなかった。



2.2.1-2.4 幹細胞自動凍結・解凍装置の動向調査

-180℃の極低温温度域でケーン式バイアル収納具を用いて個々の凍結バイアルが確実に保存・管理でき、さらに予備凍結も同じ装置内で可能な自動凍結保存装置(当社商品名:クライオライブラリー)は当社以外に存在しない。よってクライオライブラリーのようなシステムを使用して幹細胞を凍結し保存・管理している例は他に確認されていない。しかし、一般的な凍結保存容器に簡易ロボット機構を付けた装置で、ボックスでバイアルを収納する装置はチャート社などからも販売されているため、ガラス化凍結もしくは緩慢凍結(予備凍結)後の幹細胞を半自動で保存・管理している研究所などは存在すると予測される。また、解凍装置に関しては、その機能を-180℃極低温温度域の自動凍結保存装置に付随させて販売しているものは現在のところ確認されていない。



図 2.6.2.1.4-1 チャート社 MVE1800 Series (ボックス収納タイプ)

幹細胞の凍結保存装置に求める顧客の要望を探るべく、平成 23 年 6 月にカナダのトロント市で開催された国際幹細胞学会 (ISSCR) で自動凍結保存装置に関する動向調査をクライオライブラリーのパンフレットを使用して実施した。また、平成 21.4 年 6 月に横浜で開催された再生医療学会(国際幹細胞学会 (ISSCR) に併設)では実際にクライオライブラリー実機を展示することで更なる動向調査を行った。

これらの調査で、クライオライブラリーは従来の凍結保存容器と比較して、収納本数に対する装置価格が高すぎるという意見が大半を占めていた。現状の収納本数 3128 本(2ml/本)で販売するには装置価格は現状より低減することが必要との指摘が多かった。凍結バイアルを間違いなく管理できる機能については高評価を得ており、管理ソフトのみの販売はできないかといった内容の問い合わせもあった。その一方で、再生医療や生殖医療向けには非常に良い管理機能だが、研究機関や細胞バンクなどでは高機能すぎるのではないかといった意見も一部見られた。

また、収納本数への意見はユーザーの使用目的により分かれたが、3128 本だと少なく、最低でも 2 倍以上の本数は必要であるといった声が多く聞かれた。

2.2.1-2.5 幹細胞評価画像解析装置の動向調査

幹細胞評価画像解析装置は、現時点で市場流通していない。そのため、動向調査として生細胞を観察することが可能な自動化機器を対象として動向調査を行った。現時点で、存在するのは下記の 4 社。顕微鏡性能を重視したオリンパス社の LCV110 が存在するが画像解析機能がない

ため、主に基礎研究分野で使用されている。

Essen社のIncucyteは装置本体をインキュベータ内に組み込んで使用するものであり、自動化に対応していない。またChipman社のCell IQは同時に使用することが可能な培養容器数は、2個と限定されており、またCO2や湿度の供給は特殊な容器を用いて行うため汎用性が低い。

各社、装置のオプションとして画像解析装置を有している。ただし、位相差画像を解析できるものはCM-Technology社のみである。本ソフトで実現可能な解析は、幹細胞コロニーの輪郭抽出、それを基にした増殖率解析である。

下記に調査対象とした装置の比較を表2.2.1-2.5-1に示す。

表 2.2.1-2.5-1 競合製品比較表

		CM- Technology	Essen	Olympus	Nikon
モデル名		Cell-IQ PC	Incucyte Zoom	LCV110	BioStation CT
主使用用途		タイムラプス、画像解析	タイムラプス、画像解析	蛍光タイムラプス観察	タイムラプス、画像解析
顕微鏡構成	対物レンズ	10倍 (NA0.25)	4倍、10倍、20倍	40倍 (NA0.9)	4倍 (NA0.2) 10倍 (NA0.3)
	透過照明光源	LED		LED	LED
	使用可能容器	スライド、ディッシュ、フラスコ、ウェルプレート	フラスコ、ディッシュ、ウェルプレート	35mmディッシュ	フラスコ、ディッシュ、ウェルプレート
	対象サンプル	生細胞	生細胞	生細胞	生細胞
	観察方法	位相差観察 蛍光観察	位相差観察 蛍光観察	DIC観察 位相差観察 蛍光観察	位相差観察 蛍光観察
その他	装置サイズ	1130x703x884(mm3)	315x450x470(mm3)	1160x710x630(mm3)	1850x1100x800(mm3)
	観察時状態	インキュベーション	通常環境	インキュベーション	インキュベーション
	制御ソフト	専用	専用	メタモルフ	専用
画像解析	解析ソフト	専用	専用		専用
	対象画像	位相差、蛍光	蛍光		位相差、蛍光
	アプリケーション	細胞カウント コロニーカウント	細胞カウント スクラッチヒーリング		細胞数カウント スクラッチヒーリング 細胞増殖率評価 神経突起伸長評価

2.3 実証機の開発

本事業の成果を3社が共同し、製品化することを考えた場合、本事業で実証した結果を生かした製品開発を行う必要があり、その発売時期は平成30年度頃になると想定される。そこで平成30年度頃、iPS細胞を使用する目標市場に対応した製品機を想定し、製品試作機を実証機として本事業で開発する。以下では、実証機の仕様決定のプロセスを説明する。

2.3.1 市場ニーズ調査と目標市場の検討

川崎重工業では、独自の調査として、H23年度に自動培養装置の市場調査を、米国Junicon社に委託し、実施した。対象は世界市場であり、自動培養装置が使用される分野別に市場予測を行った。

Junicon社が設定した分野は、細胞治療、創薬、ガンワクチン、細胞バンク、細胞生産、美容整形、再生医療、化粧品試験、モノクローナル抗体、T細胞ワクチン、遺伝子治療、幹細胞移植、インフルエンザワクチン、医療ツーリズムのための幹細胞、インフルエンザ試験、培養肉、不妊治療の17分野で、上位9分野に注力した。その結果、世界の自動培養装置の市場で大きな市

場は以下である。まず、創薬で、製薬会社で新薬開発のために、スクリーニングに使用する細胞を製薬会社自身が培養する場合の自動培養装置の市場である。現在、もっとも市場は大きい
が、伸びは、ほとんどない。次に続くのが、細胞生産、細胞治療、再生医療の伸びは大きい。

この市場調査は iPS 細胞のみを対象としたわけではないが、対象分野には、多くの iPS 細胞のニーズが含まれると考えられる。各社の技術を総合した製品が発売される時期を平成 30 年度頃と想定し、その時点のメジャーな市場であり、iPS 細胞の使用が想定される「創薬」、「細胞生産」、「細胞バンク」を本プロジェクトの出口としての目標市場とし、実証機の仕様の議論を進めることにする。

2.3.2 目標市場に対する実証機仕様の検討

2.3.1 の市場検討結果を踏まえ、装置3社－川崎重工業、大陽日酸、ニコンで実証機に求められる仕様を検討した。

(0)実証機の位置付け(前提条件)

仕様は、製品化時での実現性も考慮する。ただし、現時点で製品化時での要求仕様を推定するのは困難なため、ある程度推測可能な、本プロジェクト終了時点である 2015 年でのメジャー3市場－創薬、細胞生産、細胞バンク(目標市場)の想定要求仕様をベースに決定する。

実証機は、「iPS 細胞を安定供給する装置」と位置付ける。各市場では、最終的には iPS 細胞を目的に合わせて分化誘導させた細胞を提供する機能の必要性が考えられるが、現時点では分化誘導手法が確立されていないため、本実証機としての機能の範囲は未分化の iPS 細胞を安定して供給するところまでとする。製品化時には分化誘導への拡張性を考慮する必要があるが、実証機で実装する機能の組み換えや改良でもある程度は対応可能と考えている。

(1)各分野の要件と製品機仕様

まず、各分野の要件及び、そこから想定した製品機(製品化時)に関する要求仕様を表 2.3-2-1 に示す。

製品化時には、要件の根拠でも記載してあるように要求仕様が増量されたり、他分野からの要件が追加されることが予想される。ただし、扱う量は大きくなるが、スループットはそれほど変わらないと想定している。培養容器や出庫容器の製品機仕様を各種という記載にしているのは、培養量によっては 90mm や 150mm のディッシュ、分野によっては 12 や 2.1.4、48 穴のウェルプレートが仕様に追加される可能性を考慮している。

表 2.3.2-1 各分野の要件と製品機仕様

		要件			製品機仕様
		(1-1)創薬	(1-2)細胞生産	(1-3)細胞バンク	
機能	培養	培養 培地交換 継代	培養 培地交換 継代	培養 培地交換 継代	培養 培地交換 継代
	凍結・ 解凍	凍結保存 解凍	凍結 凍結保存 解凍	凍結 凍結保存 解凍	凍結 凍結保存 解凍
	画像解析	未分化状態/細胞量	未分化状態/細胞量	未分化状態/細胞量	未分化状態/細胞量

容器 形態	培養	60mm ディッシュ	60mm ディッシュ	60mm ディッシュ	各種ディッシュ
	出庫	96・6 ウェルプレート	バイアル	バイアル	各種ウェルプレート バイアル
	凍結・ 解凍	バイアル	バイアル	バイアル	バイアル
	画像解析	60mm ディッシュ か 96・6 ウェルプレート	60mm ディッシュ	60mm ディッシュ	各種ディッシュ 各種ウェルプレート
年間培養 回数	2015 年	年 20 回	年 20 回	年 20 回	年 160 回
	製品化時	年 160 回	年 160 回	年 160 回	
同時 培養量	2015 年	ディッシュ 16 枚	ディッシュ 32 枚	ディッシュ 32 枚	ディッシュ 2.1.40 枚
	製品化時	ディッシュ 120 枚	ディッシュ 2.1.40 枚	ディッシュ 2.1.40 枚	
凍結 ストック量	2015 年	大容量不要	12,000 バイアル	2,000 バイアル	6,400 バイアル
	製品化時	6,400 バイアル	12,800 バイアル (6,400×2台)	6,400 バイアル	
性能(スループット)		基本的には、細胞が必要となるタイミングに合わせて事前に指示を出す運用を想定すると、凍結・解凍、培養、画像解析それぞれにスループットの明確な要求要件はない。ただし、少なくとも一回に提供する単位の細胞の品質評価が開始から終了までに二日間に渡ることが無いようにする必要がある。			

(2)実証機仕様

製品化時に(1)で定義した製品機仕様を実現できることを実証するための実証機に関する要求仕様を表 2.3-2-2 に示す。容器形態は製品仕様の一部となっているが、部分的な検証で製品化時の実現可能性は検証可能と考えている。性能面についても同様である。

この仕様に基づいた実証機を開発して検証することで、製品化時には実証機での成果を反映した製品機を実現できることが期待できる。

表 2.3.2-2 実証機仕様

		製品機仕様	実証機仕様
機能	培養	培養 培地交換 継代	培養 培地交換 継代
	凍結・解凍	凍結 凍結保存 解凍	凍結 凍結保存 解凍
	画像解析	未分化状態/細胞量	未分化状態/細胞量
容器形態	培養	各種ディッシュ	60mm ディッシュ
	出庫	各種ウェルプレート バイアル	6 ウェルプレート バイアル
	凍結・解凍	バイアル	バイアル
	画像解析	各種ディッシュ 各種ウェルプレート	60mm ディッシュ 6 ウェルプレート
年間培養回数		年 160 回	年 20 回
同時培養量		ディッシュ 2.1.40 枚	ディッシュ 2.1.40 枚
凍結ストック量		6,400 バイアル	6,400 バイアル
性能(スループット)		基本的には、細胞が必要となるタイミングに合わせて事前に指示を出す運用を想定すると、凍結・解凍、培養、画像解析それぞれにスループットの明確な要求要件はない。ただし、少なくとも一回に提供する単位の細胞の品質評価が開始から終了までに二日間に渡ることが無いようにする必要がある。	

2.3.2-1 幹細胞自動培養装置実証機の仕様検討

2.3.1 での検討から、メジャーな 3 市場(目標市場)における培養の状況は、

- (1) 創薬では、1 バイアルから 17 日間かけて 60mm ディッシュ 16 枚に増やす
- (2) 細胞生産および細胞バンクでは、2 バイアルから 17 日間かけて 60mm ディッシュ 32 枚に増やす

の 2 ケースが想定されることが分かった。(2) が可能であれば、(1) も可能であるため、以後(2) を想定して考える。

培養の流れをより細かく見ると

2 バイアル → 60mm ディッシュ 2 枚 - (7 日間) → 60mm ディッシュ 2 枚 - (5 日間) → 60mm ディッシュ 8 枚 - (5 日間) → 60mm ディッシュ 32 枚

と増殖させる。最後の継代において、1 枚のディッシュから回収した iPS 細胞を 4 枚のディッシュに播種している。つまり、継代直前のインキュベータの中には、8 枚の iPS 細胞の入ったディッシュと、32 枚のフィーダー細胞の入ったディッシュとが共存している。即ち、培養装置(インキュベータ)は合計 40 枚のディッシュ容量が必要である。

一方、このような培養を年間何回行うかは装置を運用する機関の必要とする細胞量によるが、平成 27 年時点では年間 20 回程度の培養と想定した。1 回の培養が 17 日間であるので、40 枚

容量のインキュベータをフル稼働すれば、 $365/17=2.1.5$ 回 (>20 回) の培養をこなすことが可能であり、平成 27 年時点では 40 枚容量のインキュベータ 1 台で対応可能となる。

平成 30 年度に市販予定の製品機においては将来の培養量増大も見込んで処理量を 8 倍とすると、年間 $20 \times 8 = 160$ 回の培養が必要となる。インキュベータ容量 40 枚で年間 2.1.5 回の培養が可能であるので、年間 160 回の培養に対応するために必要なインキュベータ容量は、 $40 \times 160 \div 2.1.5 = 297.7$ 枚となる。そこで製品機では、装置 1 台当たり 300 枚の培養が可能とし、現状 1 インキュベータ当たり 29 枚の容量を製品機では $40 \times 1.5 = 60$ 枚まで容量アップさせ、5 台のインキュベータで 300 枚をカバーする。なお、実証機では 60 枚容量のインキュベータ 1 台装備とする。

表 2.3.2-1 -1 細胞自動培養装置の製品機および実証機の仕様

項目	現状の自動培養装置	実証機	現状の装置で 300 枚に対応	製品機	製品化装置の体積、培養量の相対比較
インキュベータ台数	1 台	1 台	5 × 2 台	5 台	—
ディッシュ枚数	29 枚	60 × 1 = 60 枚	29 × 5 × 2 = 290 枚	60 × 5 = 300 枚	培養量: 300/29 = 10.3 倍
装置体積	6.5 m ³	6.5 m ³	14.7 × 2 m³	14.7 m³	体積: 14.7/(14.7×2) = 0.5 倍
操作部処理量 (培地交換)	現状: 30 枚/時間	処理量倍増 60 枚/時間	30 枚/時間	処理量倍増 60 枚/時間	処理量: 60/30 = 2 倍
凍結・解凍装置	連結装置あり	連結装置無しで小型化		連結装置無し	
	—	フィーダー細胞の自動準備		フィーダー細胞の自動準備	
観察装置	培養容器手動受け渡し	培養容器自動受け渡し		培養容器の自動受け渡し	
	—	自動品質判定機能実現		自動品質判定機能付き	

細胞自動培養装置の製品機および実証機の仕様を表 2.3-3-1 に示す。

製品機では、培養量を増大するために、装置のディッシュ収容枚数を 300 枚と、現状の 29 枚に比べて、 $300/29 = 10.3$ 倍に増大させる。ただし、現状のディッシュ 29 枚収納のインキュベータのままでは、インキュベータ台数が $300/29 = 10.3 \approx 10$ 台必要になる。自動培養装置としては、インキュベータ 5 台搭載の装置が 2 台必要となり、装置体積は $14.7 \times 2 = 29.4 \text{ m}^3$ となる。そこで小型化のため、インキュベータの収容量をほぼ倍増の 60 枚とする。こうすることにより、300 枚のディッシュは 5 台のインキュベータに収容可能となり、実証機はインキュベータが 5 台で、装置体積は 14.7 m^3 と、現状技術で構成した場合の装置体積 29.4 m^3 の 1/2 の小型化が可能となる。

培地交換などの培養操作を行う操作部の処理量については、現状では、1 時間当たり 30 枚の培地交換が可能であるが、培養量増大に対応して、処理量を 1 時間当たり 60 枚と倍増する。

凍結・解凍装置との連結においては、現状の連携装置を大幅に小型化し、実証機では原則連

係装置無しの状態では装置間の連結を実現し、装置の小型化を図る。そして、iPS 細胞だけではなく、フィーダー細胞も凍結保存することにより、実証機ではフィーダー細胞の準備も自動で行うことを可能とする。

細胞観察装置との連携も、実証機では自動での培養容器の受け渡しを実現し、自動で必要な画像記録、品質判定が可能な装置としてまとめ上げる。

なお、実証機においては、製品機仕様のうち、インキュベータの台数 5 台を 1 台に減らした装置を開発し、技術的実証を行うこととする。

2.3.2-2 幹細胞自動凍結・解凍装置実証機の仕様検討

iPS 細胞に最適な予備凍結プログラムを搭載した予備凍結装置と iPS 細胞に最適な解凍プログラムを搭載した解凍装置を自動凍結保存装置(クライオライブラリー)に付随させた装置であり、自動培養装置との連携が可能なものとする。さらに実証機においては、市場動向調査を反映して装置設置スペースはほぼ現行の試作機と同様に保ったまま保存バイアル数を既存試作機の 3,128 本(2ml/本)から約 2 倍の 6,400 本(2ml/本)前後に増加させたものとする。これならば、創薬、細胞バンクには 1 台、細胞生産には 2 台で対応可能となる。さらに今後、対象ユーザーの要求や培養方法の変化に対応し、凍結保存本数が増える場合は、自動培養装置に自動凍結保存装置を増設することで対応できるものとする。

2.3.2-3 幹細胞評価画像解析装置実証機の仕様検討

iPS 細胞に最適な良否評価アルゴリズムを搭載した観察機能と、iPS 細胞の長期的変化を観察できるタイムラプス観察(一定期間培養しながらの画像撮影)のためのインキュベータ機能を持ち、自動培養装置との連携が可能なものとする。自動培養装置から受け渡された培養容器に対して、必要範囲を観察撮影したうえで、良否判定を行い、判定情報と容器を自動培養装置側に受け渡す。

インキュベータ機能は自動培養装置にも実装されており、機能が重複しているが、幹細胞評価画像解析方法の一つとして検討中のタイムラプス観察を実行する際には幹細胞評価画像解析装置にインキュベータ機能が必要であり、特に再生医療分野での使用では、各時点での状態評価が必要になる可能性があるため、実証機としてはインキュベータ機能を持つ構成とする。

装置小型化の観点に関しては将来的には、必要に応じて観察機能のみを独立したユニット対応も考慮する可能性がある。

各シナリオに対して、スループットを試算する。

(1) 創薬： 1 実験に必要な数を 96Well×10 枚と想定した。この処理時間として、実証機では 400 分=6 時間 40 分掛かる(各穴中心部観察×96 穴×10 枚)。1 日に 1 穴当たり 1 回観察というシーケンスを想定すると、実証機では 1 日当たり最大 3 実験(20 時間)まで流すことが可能。平成 27 年度は導入期なので 1 日 1 実験を想定したが、平成 30 年には平成 27 年の 10 倍(1 日当たり 10 実験)程度の処理要求が想定されるが、モジュール構成を有しているため、画像解析装置の観察部の搭載数を増やすことで対応可能と考える。

(2) 細胞生産： ストック補充においては、位相差観察で 60 mm Dish の観察可能な中心領域のみを採取するシーケンスとした。これは 60 mm Dish の中心部(40×40 mm)のみを採取する構成である。1 マスターを補充するのに最終的に 32 枚の 60 mm Dish を必要とする計算とした。これは 60 mm Dish 2 枚からスタートして、7 日培養(2 枚)⇒継代⇒5 日培養(8 枚)⇒継代

⇒5日培養(32枚)という増殖計算である。よって1マスター当たり1日平均14枚=(2+8+32)/3)を処理する必要となるが、この処理時間として本装置では140分掛かる。

よって1日あたりの処理量はおよそ10マスター分(140×10=1400分÷2.14時間)となる。前述のように1マスターの培養に17日(7日培養⇒継代⇒5日培養⇒継代⇒5日培養)掛かる想定より、17日にて10マスター分、1年当たり2.15マスター分の補充が完了できるスループットとなる。

平成27年時には100患者分×3ライン=300マスター分の培養が行われているとの想定をするが、販売数量には細胞株によるバラつきがあるため年間100マスター分程度の補充が必要と見込む。よって実証機は平成27年時においても倍程度のスループット余裕があると考えられる。

平成30年には平成27年度の10倍程度の処理量、1000マスター程度の培養補充が必要と想定する。実証機は年間2.15マスター分の補充処理能力であるが、装置はモジュール構成を有しているため、平成30年度には画像解析装置の搭載数を増やすことで対応可能。

(3) 細胞バンク：1回のマスターストック補充シーケンス当たり、60mm Dish×14枚の処理時間として140分掛かる(詳細前述(2))。よって1日あたりのチェック量はおよそ10マスター分となる。17日(7日培養⇒継代⇒5日培養⇒継代⇒5日培養)にて、1マスターの補充分となる想定より17日にて10マスター分、1年当たり2.15マスター分の補充が完了できるスループットとなる。

平成27年時には50マスター分の培養が行われている想定であるが、販売数量にはバラつきがあるため、年間20マスター分程度の補充が必要と見込む。実証機は10倍程度のスループット余裕がある。平成30年には平成27年度の10倍程度の培養処理量が想定されるが、実証機のスループットであれば対応可能。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数(内訳)

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表 (プレス発表等)
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
H23FY	0件	0件	0件	0件	0件	3件
H21.4FY	1件	0件	1件	2件	4件	27件

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)

2.4 実用化、事業化の見通しについて

2.4.1 実用化、事業化の見通し

実用化・事業化は、装置と培養基材で実施する。

装置3社は、既に関連の製品を保有しており、今回の開発成果は、各社の製品単独でも活用できる技術である。例えば、川崎重工業の開発中の iPS 細胞の自動培養技術は、同社の非臨床用自動培養装置の製品に組み込める技術である。顧客の要求に応じて、オプション扱いで、製品に組み込み、販売する。大陽日酸、ニコンにおいても同様であり、既存製品に組み込める技術は、開発が終了次第、製品に追加され、販売される。

2.4.1-1 幹細胞自動培養装置の事業化

開発中の iPS 細胞の自動培養技術は、製品として発売中の非臨床用自動培養装置に組み込める技術である。顧客の要求に応じて、オプション扱いで、製品に組み込み、販売する。

2.4.1-2 幹細胞自動凍結・解凍装置の事業化

開発中の iPS 細胞の自動予備凍結装置は、製品として発売中の自動凍結保存装置(クライオライブラリー®)に組み込める技術である。顧客の要求に応じて、オプション扱いで、製品に組み込み凍結保存装置単独でも販売する。また、自動凍結保存装置を自動培養装置に組み合わせて販売する場合、iPS 細胞の自動凍予備結装置と自動解凍装置を製品に組み込み、販売する。

2.4.1-3 幹細胞評価画像解析装置の事業化

開発中の iPS 細胞評価画像解析技術は、製品として発売中の細胞培養観察装置に組み込める技術である。顧客の要求に応じて、オプション扱いで、製品に組み込み、販売する。

2.4.1-4 培養基材の事業化

大阪大学が開発中の培養基材は、装置には依存しない製品である。本プロジェクトで開発する川崎重工業の自動培養装置は、この培養基材を念頭に開発されているので、使用上、最も相性のいい製品であるが、他社の自動培養装置、あるいは、手培養における使用も可能である。

大阪大学では幹細胞用培養基材としてのラミニン 511E8 フラグメントの有用性を踏まえ、同フラグメントの製造および販売に関する権利を株式会社ニッピにライセンスアウトしており、平成 25 年夏以降に同社が販売を開始する予定である。量産によるコストダウンも期待できる。なお、iPS 細胞を医療応用する上で、フィーダーフリーかつゼノフリーの培養基材への期待は大きく、再生医療の発展とともにラミニン 511E8 フラグメントおよびその改良型フラグメントに対する需要は急速に拡大することが予想される。

2.4.1-5 実証機の事業化

実証機の形での技術は、各社単独での製品とはならない。製品化するには、例えば、川崎重工業の自動培養装置では、大陽日酸の自動凍結・解凍装置との連携部分と、ニコンの観察装置との連携部分が必要となる。逆に言えば、これらの連携部分をオプションで追加すれば、さらには、大陽日酸、ニコンにおいても、連携部分をオプションで追加すれば、実証機の製品発売が可能となる。そこで、プロジェクト終了前後に3社で製品販売について協議を行い、契約を締結し、期日を決めて、実証機の製品販売を目指す。そこでは、各社は、連携部分をオプションとし、3社

の内、いずれかが実証機の製品版を受注した場合、他の2社が自社製品の供給義務を負う。そのため、受注した企業は、他の2社の製品部分は OEM 供給を受ける形となる。

実証機の製品版は、自動培養装置と観察装置、あるいは、自動培養装置と凍結保存装置という2社の成果の組合せも存在すると考えられるので、2社の組合せの受注も想定される。

2.4.2 事業化の工程

想定している事業化の工程と実施者を図 2.4.2-1 に示す。

	H25 年度	H26 年度	H27 年度	H28 年度	H29 年度	H30 年度
自動培養装置 (川重)	開発技術を順次、製品に組み込み			実証機技術の製品化開発		
				実証機技術の製品化開発		
凍結保存装置 (大陽日酸)	開発技術を順次、製品に組み込み			実証機技術の製品化開発		
				実証機技術の製品化開発		
細胞観察装置 (ニコン)	開発技術を順次、製品に組み込み			実証機技術の製品化開発		
				実証機技術の製品化開発		
実証機製品化 (3社)						▽ 製品発売
培養基材 (阪大+企業)	▽ (株)ニッピ 販売開始					
	GMP規格の511E8の製造					
	安定化剤を利用したプレコートディッシュの製品化					
	改良型511E8のライセンスアウトによる製品化					

図 4.2-2-1 想定している事業化の工程と実施者

(添付資料)

- ・標準化案(用語と定義)の策定 別紙
- ・欧米における幹細胞技術の産業化動向調査 別紙
- ・ISO における標準化動向調査 別紙

標準化案(用語と定義)の策定 別紙

(別紙 1)研究討論会参加者名簿

幹細胞技術及び再生医療分野の用語と定義の標準化に関する研究討論会

(平成 2.1.4 年 11 月-平成 25 年 3 月)参加者名簿

平成 25 年 2 月 26 日現在

		氏名	所属
1	共同 座長	紀ノ岡正博	大阪大学大学院 工学研究科、教授
2		廣瀬志弘	産業技術総合研究所 ヒューマンライフテクノロジー研究部門、主任研究員
3	有識者	青井貴之	京都大学 iPS 細胞研究所、教授
4		伊藤弓弦	産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター、チーム長
5		黒澤 尋	山梨大学 生命環境学部 生命工学科、教授
6		斎藤充弘	大阪大学医学部附属病院 未来医療開発部、講師
7		酒井康行	東京大学 生産技術研究所 物質・環境系部門、教授
8		澤田留美	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第三室、室長
9		末盛博文	京都大学 再生医科学研究所 附属幹細胞医学研究センター、准教授
10		仙石慎太郎	京都大学 物質-細胞統合システム拠点、准教授
11		中江裕樹	バイオチップコンソーシアム(JMAC)、事務局長
12		中島秀典	再生医療イノベーションフォーラム(FIRM)(アステラス製薬株式会社 分子医学研究所、主席研究員)
13		古江-楠田 美保	医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室、研究リーダー
14		松浦勝久	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所、特任講師
15		松山晃文	先端医療振興財団 再生医療研究開発部門、部門長補佐(兼務) 再生医療開発支援部、部長
16		大和雅之	日本再生医療学会(東京女子医科大学 先端生命医科学研究所、教授)
17		関係者	安田 太
18	浅野武夫		内閣官房 健康・医療戦略室、企画官
19	板倉康洋		文部科学省 研究振興局ライフサイエンス課、課長
20	福島靖正		厚生労働省 大臣官房厚生科学課、課長
21	荒木裕人		厚生労働省 医政局研究開発振興課再生医療研究推進室、室長
22	坂元耕三		経済産業省 産業技術環境局環境生活標準化推進室、室長
23	江崎禎英		経済産業省 製造産業局生物化学産業課、課長
2.1.4	三代川洋一郎		新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術部 バイオシステムグループ、主任研究員
25	岡本 豊		新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術部 健康バイオグループ、主査
26	的場 亮		株式会社 DNA チップ研究所、代表取締役社長
27	中村吉宏	幹細胞評価基盤技術研究組合、専務理事	
28	事務局	堀 友繁	バイオインダストリー協会 先端技術・開発部、部長

・欧米における幹細胞技術の産業化動向調査 別紙

(別紙 2) 産業化を巡る動向調査

第 9 回 ISSCR 年会(於、トロント)

ISSCR は、幹細胞研究についての情報交換の促進を促す目的でハーバード大学の Len Zon 教授らによって、平成 14 年に設立された国際学会である。また、開催都市トロントは、幹細胞生物学と幹細胞工学の発祥の地であり、第 9 回 ISSCR 年会が開催された平成 23 年は幹細胞発見から 50 年目の記念すべき年であった。

主観に基づいて総括した掲題に関連する年会の調査・検討結果を次に示す。

- ① 欧米では、幹細胞技術は、すでに産業化の段階。
- ② 品質評価の標準化が課題。
- ③ 安くなければ売れない。
- ④ 産業化に向けてサスペンション方式による大規模培養(1000 億個/ロット)とオンサイト培養の普及が当面、同時進行の様相。
- ⑤ 産業化は、培地のコストが律則。
- ⑥ iPS 細胞由来の心筋は、新薬の事前毒性評価に有用。
- ⑦ しかし iPS 細胞は、いまだに“tricky”である。

開会式に先立ち Industry Wednesday Symposia として開催された、複数の企業シンポジウムの内、幹細胞の大量培養に向けて戦略的に取り組んでいるロンザ(Lonza)社の半日シンポジウムに参加した。大量培養に係る発表講演(Dr. Jon Rowley:“Scalable Manufacturing Processes for Therapeutic Stem Cells”)の要点を次に示す。

- ・ ロンザ社は 1897 年、スイス・バーゼルで起業。年商約 20 億米ドル。
- ・ 欧米では、幹細胞生物学および幹細胞工学から、再生医療の段階へ移行し、すでに産業化が始まっている。
- ・ 再生医療の本格化、細胞医薬の産業化は、スピード、規模、コストが決め手。特に、安さが重要であり、高いと売れない。
- ・ ロンザ社は、長年研究されている血液幹細胞に着目して事業を展開している。
- ・ ロンザ社がノウハウとして確立した分化方法は、山中方式の 100~1000 倍、安い。
- ・ アルツハイマー病で有効性を検証済み。
- ・ 神経細胞の再生は、ドーパミンの生成で、化学的に判定。
- ・ 運動ニューロン疾患(Motor Neuron Disease, MND)用の細胞医薬の開発に向け、コスト低減も含めて取り組み済み。
- ・ 培養細胞の収率は平成 22 年から平成 37 年に向けて指数関数的に改善し、製造ロットの規模も直線的に増加すると予想。
- ・ 培養はサスペンション方式による超大規模化(~1000 億個/ロット)へと向かうと想定。
- ・ 超大規模化に伴い、製造コストに占める培地コストの割合が現行の 2.1.4%から 58%に増加し、設備投資、労務費の占める割合は相対的に軽微となる見込み。
- ・ 結論:産業化は、培地のコストが律則となる。

その他、展望講演等の話題を列記する。

- ・ Molecular Devices 社は iPS 細胞由来の心筋が、新薬の事前毒性スクリーニング試験に際し

て、毒性があると脈が速くなることを根拠にして、簡易かつ確実な方法への応用を示唆した。

- ・ 年会の直前、*Nature* 平成 23 年 6 月 9 日号に掲載され、わが国では多くのメディアが取り上げた、山中 3 因子 (Oct3/4、Sox2、klf4) と一緒に利用される c-Myc に取って代わる、(iPS 細胞の作製効率と安全性の向上に寄与する) Glis1 に関する質疑応答はなかった。
 - ・ リプログラミング(初期化)の過程を体細胞から“point of no return”とそれに続く“危険地帯”を経て多能性獲得に至る“Journey”に例えた解説は分かり易かった。(Dr. Andras Nagy, “Transposon-Mediated Reprogramming Provides a Powerful Tool for Understanding Somatic Cell Reprogramming to Pluripotency”)
 - ・ 中山伸弥教授が言及した iPS 細胞に係る“tricky”云々に関して、地元の地方誌『The Global Mail』が速報で特集を組み、“trickier than expected”と論評した。
 - ・ 幹細胞治療の具体的な効能に関して、Plenary VII: Therapeutic Approaches to Stem Cells において詳細に報告された。
- ① 心筋再生: Dr. Kenneth R. Chien, *Massachusetts General Hospital, USA*. “Driving Heart Progenitor Fate *in vivo* with Modified RNA”
 - ② 角膜再生: Dr. Michele De Luca, *University of Modena and Reggio Emilia, Italy*. “Limbal Stem-Cell Therapy and Long-Term Corneal Regeneration”

Stem Cells USA & Regenerative Medicine Congress (於、ボストン)

Stem Cells USA & Regenerative Medicine Congress は、企業幹部が多数参加する幹細胞工学および再生医療の産業化に関する北米地域最大規模の会合であり、幹細胞の分野で世界を先導する企業、機関から招聘された 60 名以上の専門家による講演に加えて、特に講演後のパネル討議が活発であり、ISSCR の年会等とは一線を画す実務的な内容であった(重要課題の場合は各セッションの司会者兼議長の判断で、講演を省略し、全ての時間をパネル討議に費やされた)。1 時間で 30 社以上と面談する高速ネットワーキングに参加し人脈構築を図った。主要な面談者を次に示す。

- ・ Dr. David Sourdivé, VP Corporate Development, Cellectis SA, France. (www.cellectis.com)
- ・ Dr. Oliver Bartelsen, Global Head of Business Development & Industrial Services, Miltenyi Biotec GmbH, Germany (www.miltenyibiotec.com)
- ・ Dr. Petter Bjorquist, Senior Principal Scientist, project Manager, Cellartis AB, Sweden. (www.cellartis.com)

概要(含、pre-conference: Cord Blood Banking and Therapy)を次に示す。

- ・ 再生医療の市場は米国が先行して席卷。占有率は約 56%。
- ・ 一方アジアの占有率は、5%でいまだ途上。
- ・ 多くの利点(例えば“search time”に関して 1 日対 3~4 ヶ月の差がある。)により、臍帯血が骨髄に取って代わりつつある。臍帯血の利用は 5 年ほど前から劇的に増加し、すでに 80 種類以上の疾患治療に用いられている。
- ・ 最初の事例は 1988 年、パリで 1 例が報告されたが、平成 20 年の時点では 80 例程に増えている。米国では生涯に移植される確率が 1988 年の 1/300,000 から平成 20 年には 1/1,666 に増加した。
- ・ 新生児を対象にして、臍の緒を幹細胞源として保存する取り組みも行われている。(Jim

Corbett, President, ViaCord Inc.)

- ・ Stem Cell Health 分野の新たなビジネスモデルとして Cord Blood Banking Technology の紹介を通じて、アラブ世界へ進出。key word は、“Patients want options.” 具体的には NGO として公共病院に無償で移植用の細胞を提供するビジネスモデルを提案。(Dr. Rajan Jethwa, CEO, Virgin Health Bank)
- ・ まず米国で、それからアジアへ。FDA 対応は中国進出に有用。しかしブラジルは仕組みが異なるため、なかなか伝わらない。(Kenneth Giacini, CEO, Stemcyte)
- ・ ロシュ (F. Hoffmann-La Roche) 社 : 脳科学の分野に進出。
- ・ サノフィ・アベンティス (Sanofi-Aventis) 社 : social driver として 8 分野を特化し、再生医療をその一つとして位置付け。重点領域はスクリーニングと細胞治療。
- ・ ジェンザイム (Genzyme) 社 : 再生医療分野への重点取り組みの加速を表明。
- ・ 産業化の視点で長時間続いた討議の結論は、次に示す一つの問いかけと二つの基本認識であった。
 - ① 幹細胞技術は社会にいったい何をもたらすのか？
 - ② 資金調達が要。
 - ③ 小企業は大企業が失った大切なものを持っている。
- ・ 米国では iPS 細胞 に対する企業関係者の反応は、欧州と同様に総じて冷静。
- ・ ヒト iPS 細胞はワクチン製造に有用。
- ・ セレクトイス (Celectis) 社 : 安全な iPS 細胞を作製して、自家細胞製品から他家細胞製品への移行を目指す。
- ・ 安全な iPS 細胞製品のために Haplobank の利用を想起。
- ・ SMC4 を iPS 細胞の培養に利用。
- ・ 幹細胞の大規模製造に係る標準化に関して、米国 NIST でシンポジウム開催の動きあり。(注:平成 2.1.4 年 5 月下旬、NIST 中央施設内で“Functional Imaging for Regenerative Medicine”が開催された。)
- ・ 米国議会が H.R.12.1.49 を承認し、直ちにオバマ大統領が America Invest Act に署名(平成 23 年 9 月 16 日)。59 年ぶりの米国特許法の大改正であり、施行 18 ヶ月後から米国も日本、欧州と同様に先出願主義 (first-to-file) に移行。
- ・ 事業戦略上の最重要課題である“Scale-up and Manufacture:centralized vs. de-centralized manufacture and scale-up; chances and challenges”に関するセッションにおいて Miltenyi Biotec 社が司会者兼議長となって参加者の関心を de-centralized manufacture へ誘導しようと試みたが不調に終わり、3 時間を越える討議でも結論が出なかった。
- ・ 上記に関連して、ロシュ等の大手企業は centralized と de-centralized のどちらにでも対応できる体制で当面对処する模様。平成 20 年に米国で設立された Alliance for Regenerative Medicine (創立者 Michael Werner) の動向も要監視。

WRM2011 (於、ドイツ・ライプツィヒ)

再生医療分野のこの種の会議としては欧州最大規模である。EC およびドイツの政府、州、拠点大学、マックス・プランク研究所 (Max-Planck-Gesellschaft)、フラウンホフファー研究所 (Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI) 等が連携して平成 17 年に設立され、会議の開催は今回で 3 回目となる。なお、会議が開催されたライプツィヒ市は、再生医療の取り組みに対して 300 万ユーロ/年の財政支援を行っており、ドイツで 2 番目に古いライプツィヒ大学

(学生数 28,000 人)の副学長も再生医療分野に対する教育・研究の強化をしている。

欧州では、再生医療および細胞治療の本格化を目指す産業界の行方はまだ定かではなく、規制機関の動向も流動的である。ただし、動物からヒトへ、さらにヒトから動物への再生医療を志向し、競走馬の足首の機能改善に向け、実用化の進捗が期待される IVRMS (the International Veterinary Regenerative Medicine Society) の取り組みは、実験動物中心の現状で、当然の成り行きとして注目された。

注記 欧米における再生医療の規制機関

- ① 米国: FDA (米国食品医薬品局)
- ② 欧州連合: EMA (欧州医薬品庁)
- ③ 英国: MHRA (医薬品庁)
- ④ ドイツ: PEI (ポール・エールリッヒ研究所)
- ⑤ フランス: AFSSAPS (保健製品衛生安全庁)
- ⑥ イタリア: ISS (国立衛生研究所)、AIFA (イタリア医薬品庁)

概要を次に示す。

- ・ 体性幹細胞の供給源(線維芽細胞)に関して、ドナー(17才~72才)の年齢差は認められない。
- ・ 間葉系幹細胞の収率は、骨髄より臍帯血の方が2倍程度、良好。
- ・ エピジェネティクスは後天的に獲得された遺伝子情報のようなものであり、幹細胞が複製されても引き継がれる。一方、癌化した体性細胞では引き継がれない。
- ・ 統計解析の視点で、患者のデータはよく選別して使うことが肝要。
- ・ バイオリクターの攪拌翼の形状は、ヒトiPS細胞の収率に微妙に影響する。例えば、8枚羽の角度が45° 30' と45° 60' の場合でも収率に明らかな差が生じる。
- ・ 初期化によって作製された幹細胞のドイツ国内への移動は法律で禁止されている。
- ・ 再生医療の臨床応用に向けて、単細胞での検討を終えて多細胞(~臓器)の段階に移行しつつある。
- ・ 造血細胞治療(Hematopoietic Cell Therapy)に関して、末梢血は使い易い。幹細胞かどうか、分らなくても使うことがある。

注記 医療経済との関連: 開会式において披露されたアート・トレス(Art Torres)上院議員の講演によると、病人が多いといわれる米国では、再生医療の実現には1.5兆ドル(約150兆円)(平成25年4月現在)かかるが、総医療費の削減効果は5兆ドル(約500兆円)を超えるとの予想もある。一方、我が国の国民総医療費は約40兆円(平成23年度、39.1兆円)であり、その内訳は保険料負担49.1%、公費負担36.1%、自己負担4.8%(いずれも平成23年度)である。急激な高齢化や医療の高度化を想定すると再生医療の本格化による一定の総医療費削減効果はわが国でも十分に期待できる。

Stem Cells 2012 Conference(於、サンジエゴ)

民間団体主催のローカルな集まりであり、参加者は全体で約170人(内、講演者約70名)、実質的には約100人程度ではあった。

- Christopher Hewitt 氏 (Loughborough University): “Challenges for Stem Cell Bioprocessing - Scale-Up or Scale-Out?”
 (米国では)生物学者は、工学を知らない。産業化に対する生物学者の認識の低さが、再生医療の本格化に際して、最大の障壁のひとつであることを示唆。
- Veit Bergendahl 氏 (Miltenyi Biotec GmbH): “Improvement of Cell Culture Technology for Primary Cells and Stem Cell Manipulation”
 治療現場密着型の細胞培養技術に特化した小規模ベンチャー企業として設立された Miltenyi Biotec GmbH が周辺技術を取り込んだ体系的な事業構造に急激な変貌を遂げ、自発的に成長するレベルに移行した経緯を報告。

The 2012 London Regenerative Medicine Event (於、ロンドン)

産業化に向けて、いかにして細胞の大規模培養 (10^{12} 個/バッチ) を実現するかに的を絞った極めてローカル色の強い実務的な研究集会であり、参加者は延 30 名前後であった (日本からの参加者は 1 名のみ)。講演内容は、再生医療の産業化を目指す “英国の国内事情” も色濃く反映しながら、多くの有用な情報が披露された。ただし、秘匿開示されていない情報を含むため、撮影・録音禁止、配布資料なし、事後の会議報告も作成しないとの条件が付けられた。

閉会に際して、英国政府は規制制度も含めて再生医療に前向きかつ体系的に取り組んでいるとの意見表明があったが、フィンランド政府も同様であるとの声が会場から聞こえた。主な発表講演の要旨を次に示す。

- Robert Thomas 氏 (EPSRC Centre for Innovative Manufacturing in Regenerative Medicine): “Scaling Red Blood Cell Manufacture from Cord Blood and Placenta Derived CD34+ Haematopoietic Stem Cells”
 実用化に向けて数値目標を設定。現行の 10^6 cell/unit から 10^{12} cell/unit に、またコストは 10^{12} cell/unit 製品で \$ 500/unit 以下に変更。
- Julian B. Chaudhuri (Centre for Regenerative Medicine, University of Bath): “The role of bioreactor technology in regenerative medicine”
 「再生医療はバイオリクターによって支えられる」と明言。具体的な方策として、従来の平板フラスコやマイクロキャリアの表面利用を超える、その先の方法について報告。hollow fiber 方式のバイオリクターの導入により大規模化とコスト低減の同時実現が可能と想定し、「Research → Innovation → Design (scale-up) → Research → …」の循環による、らせん上昇型の研究開発を推奨。バイオリクターの設計基本要件について詳細、かつ具体的に解説。
- Farlan Veraitch (Department of Biochemical Engineering, University College London, UK): “Improving the yield of pluripotent stem cell differentiation processes”
 分化および多能性の発現に関する新知見として、母体内における胎児の酸素分圧に近い状態 (~4%) 条件下では、酸素分圧 20% の場合に比べて、分化誘導が促進されることを ES 細胞の系で定量的に実証。

Cell Culture World Congress 2012 (於、ミュンヘン)

細胞培養の大規模化 (例えば、10 基以上の 12000 リットル培養タンクを同時稼働) は、産業化が進んでいる従来の細胞培養でも依然として多くの開発要素があり、体系化は未だ途上ともいえ

る。参加者は主要 3 カ国(ドイツ、英国、米国)および欧州諸国を含む 26 カ国、約 200 名(講演者 40 名を含む)であった。主要な知見を次に示す。

- ・ TAP Biosystems(わが国の代理店:GE ヘルスケア・ジャパン):新たな陣容を整え、iPS 細胞の作製を含む幹細胞系列の培養、分化誘導の自動化装置市場に参入(商品名:Compact Select SC)。当面、市場は欧米に特化する模様。(面談者:Dr. Wolfgang Kusser, European Sales Executive;Invitrogen Germany より移籍)
Compact Select SC は、滅菌系の装置仕様として装置内にヘパフィルターを介して空気を導入し、垂直層流にて空気清浄度クラス II を実現。また iPS 細胞の画像品質評価法を採用。(注:第 10 回 ISSCR 年会展示場における平成 2.1.4 年 6 月時点の対面聴取によると、凍結保存装置も開発中。)
- ・ ドイツバイオ産業協会(Association of German Biotechnology Companies, VBU)(3500 企業が参加):代表の Dr. Ulrich Behrendt(ロシュ社出身)が自ら来日して「日本見聞録:わが国バイオ産業の現状“Biotechnologie in Japan”」(平成 2.2.1.4 発刊、ドイツ語)を執筆・発行した。
- ・ 中国、インドの進出に関するパネル討論:概ね次の 5 項目に総括された。
 - ① 中国、インドの進出(注、スピードが早い)について警戒感あり。
 - ② バイオシミュラー(バイオ後発薬)の分野に中国が進出している。
 - ③ 中国がこのゲームに勝つかもわからない。
 - ④ 高価格は受け入れられるであろう。
 - ⑤ この分野でも一番でなければ利益は期待できない。
- ・ 制御方法の改良(Dr. Herve Broly, Merck Serono):
scale-dependent parameter(例、O₂、CO₂ 分布、pH、粘度)を一定の条件下で scale-independent parameter に変換し、かつ 1 変数とする、具体的には scale-dependent とならない level を各 parameter について決定し、単一の parameter として制御に用いる idea を提案(注、ある上限値以下ならば、粘度は scale-independent となる。)
- ・ 次世代細胞培養法の提案(Dr. Thomas Ryll, Biogen Idec):
過去 10 年間のデータに基づくと培養濃度曲線の極大値(peak cell density)(現在 15~30 × 10⁶)は、約 6.3 年で 10¹² のオーダーに達すると見積もられる。オンライン・センサー類のデイスポーザブル化が課題であるが、O₂ については完了。pH は途上のため、更なる改良が必要。culture performance/viability 用として波長 785nm の NIR を用いる“on-line culture capacitance Raman 法”を提案(注、幹細胞に関するデータはない。スケールダウンも課題となる。細胞培養技術は、まだ発展途上にある)。
- ・ 大規模バイオリアクターのデイスポーザブル化(Dr. Florian Wurm, Professor of Biochemistry, Univ. of Lausanne):
2000L~3000L のデイスポーザブル・バイオリアクターを提案。10,000L 迄スケールアップ可能と強調。他の方法(例、かく拌法:気泡が混じる。)ではスケールアップに伴う不均一性が予測できない。一方、デイスポーザブル法では旋回流が巻き込まれるため、大型の系でも均一性が維持されると主張。

9th Stem Cell Research and Therapeutics(於、フィラデルフィア)

ヒト幹細胞技術を巡る生物学、医学、規制制度を含むあらゆる分野(具体的には、幹細胞を利

用する前臨床・臨床治験、再生医療、組織工学、幹細胞リプログラミング、規制・政策論等)に関する最新の進捗動向に関する 29 講演を聴取した。さらに、複数の研究者より対面にて情報聴取すると同時に、新たな人脈構築を進め、幹細胞技術を基盤とする発生生物学分野の新たな知見のその先にある、産業化・臨床応用の流れは、自家ではなく、明らかに他家であることを把握した。

従来の細胞治療・再生医療から、生細胞を利用する医療全体を再生医療(従って、細胞治療は再生医療と並列ではなく、その中に含まれる)と捉えて、薬事法改正及び新法(理念法、再生医療促進法(規制法))で構成される再生医療を取り巻く法整備を進める直近の我が国の動きと齟齬がないことを確認した。

また、 10^{12} 個レベルを超える幹細胞の大量培養も産業化・再生医療の実現に向けてすでにいくつかの breakthrough ともいえる新発見の兆しが示唆された(例えば、DNA Encoded Libraries - A Disruptive Innovation for Molecular Discovery? Barry Morgan, Vice President, Molecular Discovery Research, GlaxoSmithKline 等)。

・ISOにおける標準化動向調査 別紙

(別紙 3)標準化動向調査

ISO ワークショップ(於、ジュネーブ)

ISO 中央事務局の主導で開催されたワークショップ(平成 23 年 10 月 25 日～26 日)において TC 新設に向けてのタスクフォースへの積極的な関与/貢献の意向を ISO 中央事務局の含む複数の関係者に対面にて伝達した。

さらに、“Terminology on techniques of analysis for industry-focused applications: a personal view, and Japanese biotech industry trends and standardization” と題して非公開で口頭発表を行い、我が国からの幹細胞技術分野の用語の ISO 国際提案に対して、主要各国より一定のコンセンサスを得た。

当該ワークショップでは、最大の成果として幹細胞技術を含むバイオテクノロジー分野の専門委員会(Technical Committee, TC)の新設を ISO 上層委員会(技術管理評議会(Technical Management Board, TMB)(図 2.6-6)に勧告することが合意された。(注、1 年 4 カ月後の平成 25 年 2 月 28 日付で ISO/TC276-Biotechnology として TC 新設が正式承認された)。

概要を次に示す。

平成 20 年 11 月、ISO 理事会の決議および ISO 事務総長の依頼によりバイオテクノロジー(図 2.6-7)分野の標準化に関するタスクフォースが設置され、約 5%の TC が何らかの形でバイオテクノロジー分野の標準化に関与していることを明らかにした。次いで、2 度の webinar を経て、平成 23 年 10 月 25 日～26 日、ジュネーブにおいて 12 ヶ国、約 40 名の関係者が一堂に会して ISO 中央事務局主催のワークショップ(ISO Workshop “International Standards for Biotechnology”)が開催された。

参加者の内訳は、国際度量衡局(Bureau International des Poids et Mesures, BIPM)、経済協力開発機構(Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD)、米国の国立標準技術研究所(National Institute of Standards and Technology, NIST)、英国の LGC、関連する機関などに所属する専門家、およびわが国からタスクフォース日本委員(産業技術総合研究所、湯元理事)、JBA 堀、その他であった。

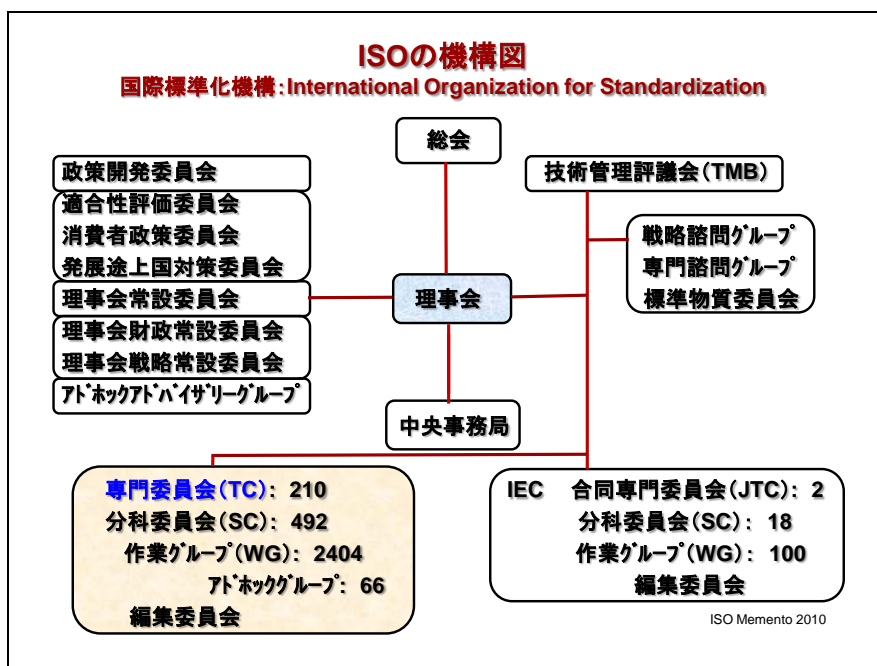


図 2.6-6 ISO の機構図

Definition of Biotechnology

A broad single definition and an indicative list-based definition of biotechnology (OECD)

The OECD has both a single definition and a list-based definition of biotechnology. The single definition is broad. It covers all modern biotechnology but also many traditional or borderline activities. For this reason, the single definition should always be accompanied by the list-based definition. ***The single definition*** is:

"The application of science and technology to living organisms, as well as parts, products and models thereof, to alter living or non-living materials for the production of knowledge, goods and services."

The list-based definition has seven categories which are:

DNA/RNA, proteins and other molecules, cell and tissue culture and engineering, process biotechnology techniques, gene and RNA -vectors, bioinformatics, and nanobiotechnology.

OECD Science, Technology and Industry Scoreboard 2011

図 2.6-7 バイオテクノロジーの定義事例

当該ワークショップでは、1) 重要な利害関係者間の相互理解の促進、2) 既存の規格文書・勧告などの情報収集、3) 優先事項の選別を目的として、

- ① 既存の標準化活動
- ② 技術的な課題(用語と定義、計測、特性評価)

具体的には次の3項目に関する:

- Terms and definitions regarding biotechnology
 - Measurement and characterization: techniques of analysis (horizontal)
 - Methods of analysis specific to industrial applications
- ③ ISO として活動する意義

などに関する討議が行われた。

その結果、基本的な考え方として、1) 産業分野に横断的な基盤技術の (horizontal) 課題を優先させ、2) 個別分野に特化した具体的な (vertical) 課題はそれぞれの分野に関連する現行の ISO/ TC で討議されるべきであることを確認し、今後の規範となる勧告を行った。

主な勧告の概要を次に示す。

- ① 産業ニーズに応える課題であること。
- ② 学会等と協調し、研究から産業応用への連続的な展開を考慮する。
- ③ バイオテクノロジーに関する既存の OECD ガイドラインも活用する。
- ④ ISO において新しい TC を設立する。
- ⑤ 新 TC では基本的に分野横断的な (horizontal) 課題を扱う。
- ⑥ 新 TC は TC229(ナノテクノロジー)の体制および活動を参照する。

ISO 規格には企業の経済的利益という視点が入り込み、バイオテクノロジーに関する TC の新設が勧告されたということは、主要国がバイオテクノロジーを成長産業分野として重要視していることの表れであり、個々の製品化の段階から、ビジネスとして産業分野が成立する段階にきている証左である。

なお、ISO における規格作りはコンセンサス、すなわち“重要な利害関係者による実質的問題

への反対がないこと、および全ての関係当事者の意見を考慮し、意見の不一致を調停させる努力の過程があることを特徴とする全体的合意。ただし、必ずしも満場一致を意味しない。”(図 2.6-8)が基本である。

ISO Consensus Principle

- TC chairman, in consultation with TC secretary and WG convenor, judges whether there is sufficient support, bearing in mind the ISO/IEC definition of consensus.

Source: ISO Directive § 2.5.4

Consensus means general agreement, characterized by absence of sustained opposition to substantial issues by any important part of the concerned interests, by a process that involves seeking to take into account the views of all parties concerned and to reconcile any conflicting arguments.

Source: ISO/IEC Guide 2:2004]

図 2.6-8 ISO におけるコンセンサスの定義

英国・LGC 訪問

上記 ISO ワークショップの 3 ヶ月後(平成 21.4 年 2 月中旬)に別途、LGC を訪問し、標準化の関係者と対面にて情報交換・討議を行い、ISO における今後の標準化活動の連携強化に向けて更なる人脈構築を進めた。

主な面談者を次に示す。

- Ms. Helen Parks, Principal Consultant, International Measurement
- Dr. Julian Braybrook, Head of Strategy, Measurement Research
- Dr. Damian Marshall, Principal Scientist, Cell biology
- Dr. Carol Foy, Principal Scientist, Molecular Biology
- Mr. Jeffrey Anthony, Head of Business Development (オーストラリア出身)
- Dr. Marc-Olivier Baradez (Dr. Damian Marshall 研究室の客員研究員)

LGC は、国立物理学研究所(National Physical Laboratory, www.npl.co.uk)と同じ敷地内で隣接する LGC (www.lgc.co.uk, www.lgcgroup.com) はロンドン中心部とヒースロー空港の中間点に位置する地の利も幸いして、かつて大学で化学を専攻し、先日(平成 25 年 4 月)死去した元サッカー首相の強力な主導により体制強化が進められた経緯にあり、約 20 年前の 200 名規模から現在では英国内 1000 名、海外拠点 500 名、合計 1500 名の規模を誇る英国化学研究の拠点である。

すでに米国・NIST と共に上記新 TC への参画を表明しており、再生医療分野の標準化に関する活動も開始している。例えば、英国内の標準化に関するガイドラインとして BSI が発行した PAS 93: Characterization of human cells for clinical applications の作成に関与するとともに、幹

細胞大量培養の産業化に向けて、フランスから専門家を招聘し、レーザーによる精密加工技術を利用した単一細胞の分離操作と多次元 imaging 技術を組み合わせて、受精卵の 8 分割段階から多能性獲得に至る、現時点では未知の現象解明に挑戦中である。

ISO/TC2.2 総会出席(於、ベルリン)

ISO/TC2.2(Clinical Laboratory Testing and *In Vitro* Diagnostic Test Systems) (1994 年設立)の総会及び WG2 会議(平成 2.1.4 年 8 月)に ISO/TC2.2 国内検討委員会の専門家委員として参加し、TC2.2 会長に再選された Dr. Donald M. Powers(米国・CLSI)に対して総会最終日の議長席において、ドイツ(DIN)提案による Biotechnology の新 TC 設置申請を巡る動きについて直接、コメントを求め、将来的なリエゾンについて別途検討するとの返答を得た。

Dr. Donald M. Powers の人柄から、今後の働きかけ次第で TC2.2 の scope (患者のために)に準拠し、米国・CLSI とも連携して幹細胞技術・再生医療領域の用語の統一に取り組む可能性が想起された。

なお、DIN の新 TC 立ち上げ提案に関して、同議長より総会の場で出席者に対して告知いただき、ISO/TC2.2 の重鎮と目される出席者より次のコメントを得た。

- ・ Dr. Dybkær (デンマーク代表。TC2.2 の最長老、元 ISO/TC2.2/WG2 コンビーナ、元 IFCC 会長):ISO/TC は TC ごとに独自の用語を規定しており “fantastic” である。
- ・ Dr. Scassellat (TC2.2 で最も多弁なイタリア代表、18 年間貢献したが今回限りで引退):CEN/TC2.1.1-3-3 Biotechnology で 50 規格発行しているが、現在は、休眠状態である。
- ・ Dr. Noble(カナダ代表):カナダは、“小さな宇宙(cosmic world)”であり、用語の統一は重要と位置付けている。ISO の場における CSA(Canadian Standards Association)主導の意思も示唆。

引き続き関連 ISO/TC の監視を強化し、本事業にて取りまとめた ISO/IS 規格案の国際提案及び早期国際規格発行に資する。

【滑膜細胞領域】

はじめに

生体幹細胞・多能性幹細胞を用いた細胞治療を実現させるためには、安定した一定品質の細胞を大量に供給することが重要なテーマとなっている。本プロジェクトの目標は、ヒト滑膜由来間葉系幹細胞を未分化性・有用性・有効性・安全性を維持した状態で 10^{12} 個まで大量培養し保存するための技術を開発する。そこでこの事業ではヒト幹細胞を産業利用に繋げるために、細胞の効率的な確保方法、安全性品質及び有効性品質を維持・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ので、その基盤技術の構築を目標とした。そ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。本研究開発では、間葉系幹細胞（以下MSC）の中で細胞の増殖能が高く、分化能を維持している滑膜由来MSCに限定して、大量（細胞数 10^{12} 個以上）に安定的に供給するための無血清培地の開発、培養基盤技術の開発、未分化能確認マーカーと保存基盤技術の開発を実施する。

尚、本サブプロジェクトの開発技術は、「滑膜幹細胞を原料とする軟骨再生用製剤(gMSC)」(2012年12月から開始したPMDA薬事戦略相談実施中)で実用化を図る計画である。「既に目標を達成した①無血清培地の成果」を適用したgMSCの非臨床試験を現在実施している。その他の開発技術を使って、2014年に開始する予定の臨床試験(治験)および製造販売承認申請を行う予定である。

1. 全体の成果

【大量培養基盤技術の開発】

1-1 無血清培地の開発

「生物由来原料基準」(平成15年厚生労働省告示210号)の規定を満たす原材料のみを使用した無血清培地を開発した。その培地を用い、細胞増殖率が有血清培地に比べ100倍以上、培養期間が1/3に短縮できる培養法を開発した。

1-2 大量培養技術の開発

無血清培地と新培養法による大量培養技術基盤が構築できた。

1-3 細胞保存基盤技術の開発

1年保存時細胞生存率70%以上に維持できる細胞保存技術を開発した。

以上より、厚生労働省告示の「生物由来原料基準」の規定を満たす原材料のみを使用する無血清培地を開発し、その培地による大量培養法の樹立及び自動培養装置設計に必要な情報を入手することができた。

2. 研究開発ごとの成果

2.1 滑膜由来 MSC 大量培養技術の開発

2.1.1 滑膜由来 MSC 用の無血清培地の検討

A) 組成改良

培地に含まれるタンパク成分をアニマルフリー化したうえで、「生物由来原料基準」[厚生労働省告示第 210 号]の規定を満たす原材料のみを使用する培地の設計を完了した。

さらに、中間目標である「元の培地に比べ、100 倍以上の増殖率向上及び培養期間の 1/3 への短縮を行う」を達成するため、滑膜組織からの MSC の分離法と培養細胞の分離法を検討した。

B) 安全性確認

大阪大学病院から提供されたヒト滑膜組織のうち代表的な 3 株から、新しい細胞調整法で樹立・培養した滑膜由来 MSC を、軟寒天コロニー形成法で造腫瘍性試験を行った。いずれの株も形成転換してコロニーを形成することはなかった。

大阪大学病院から提供されたヒト滑膜組織のうち代表的な 3 株 (SYN-004, SYN-012, SYN015) を新しい細胞調整法で樹立・培養した滑膜由来 MSC は、染色体検査の結果 (C バンド分染法)、P5 の段階でいずれの染色体でも異常を認めなかった。

急性毒性試験及び埋植試験は、重度免疫不全マウス (NOG マウス) を用いた造腫瘍性試験を実施しており、3 ヶ月間の経過観察中である。

C) 有効性確認

家畜ブタ 3 頭を用いた予備試験及び家畜ブタ 18 頭を用いた本試験を実施している。現在、培養した家畜ブタ滑膜由来 MSC より作製したスキャフォールドフリー三次元人工組織を他家移植し、術後経過観察中である。移植時及び移植短期間での炎症、拒絶反応は見られなかった。

D) 大量生産技術の開発及び品質・安全性確認

平成 25 年 6 月に培地製造工場の GMP 製造設備が完成した。本年度中に本事業で設計した無血清培地を 100 リットル以上生産できる方法を確認し、品質・安全性を確認する。

2.1.2 滑膜由来 MSC 大量培養方法の開発

A) 浮遊培養法の検討

非接触系のコーティングあるいは比重調製培養液を用いた浮遊培養、培養担体としてマイクロキャリアを用いた浮遊培養について検討した。浮遊培養はヒト滑膜由来 MSC が増幅せず、マイクロキャリアを使うと細胞接着が難しいこと、キャリアから細胞を剥がして回収する際の効率が悪く、コンタミのリスクが高い。中空糸での培養実験では細胞の回収が難しく、ほとんど回収できなかった。

B) 低重力培養法の検討

微小重力環境培養法では、通常の 1G 環境と比較して約 3 倍早く増殖することを確認した。

MSC は培養容器の底面に接着して増殖するので、接着面積を大きくする各種形状、構造を検討した結果、フィルムを使った開発中の X 培養法は、培養容器単位容積当たりの細胞培養量は 18 倍になり、必要な培地量が 1/3 以下となる画期的な自動培養法を開発できる可能性が見つかった。

現在、本事業で開発した無血清培地、フィルムを使った培養容器と微小重力環境の組み合わせでプロトタイプを設計・試作するためのデータ採りの実験を行っている。

C) プロトタイプ試作

上記 A)、B)の成果を基にプロトタイプ試作のため、培養実験を行い、設計に必要なデータを蓄積している。

D) 安全性確認

本事業で開発した無血清培地とフィルムを使った新規の培養容器を使い、低重力培養した滑膜由来 MSC の未分化性、分化能等をチェックしているが培養ディッシュを用いる従来の用手法培養との差異はない。本年度、C)で試作したプロトタイプを使って大量培養した滑膜由来 MSC の安全性（急性毒性、埋植試験、軟寒天培養試験及び染色体試験）を確認する予定。

2.1.3 培養細胞評価基盤技術の開発

A) 滑膜由来 MSC の未分化マーカー解析

DNA マイクロアレイによる滑膜由来 MSC 特定マーカー候補を探索した結果、滑膜由来 MSC ポジティブマーカー16 候補、ネガティブマーカー7 候補について qPCR による発現解析を行い繊維芽細胞 (FB) に対して発現が高いまたは低い 8 遺伝子マーカーを選別した。

2.2 培養した滑膜由来 MSC 保存技術の開発

2.2.1 細胞保存液・保存条件の検討

CAS を用いることによってセルバンカーでは生存率 80%以上を達成した。DMSO 不含の保存液（2 種類）も CAS の使用により生存率の向上が確認されたのでさらに継続して調査する。

(1)大量培養基盤技術	中間目標	成果	達成度	今後の課題
① 無血清培地	<ul style="list-style-type: none"> ・培地原料のアニマルフリー化 ・有血清培地に比べ100倍以上の増殖率 ・培養期間1/3 	<ul style="list-style-type: none"> ・培地に含まれるタンパク成分をアニマルフリー化 ・増殖率、培養期間とも目標を達成 	◎	<ul style="list-style-type: none"> ・GMP培地製造法確立 ・コスト低減
② 大量培養技術	<ul style="list-style-type: none"> ・有血清培地によるディッシュでの用手法の100倍以上の増殖率達成 ・プロトタイプを試作し、動作確認と大量培養確認 ・大量培養の自動化 	<ul style="list-style-type: none"> ・無血清培養による増殖率目標の達成 ・大量培養法候補を決定しシステム設計のためのデータ取りを実施中 	○	<ul style="list-style-type: none"> ・プロトタイプで試作した細胞の安全性確認
③ 評価基盤技術	<ul style="list-style-type: none"> 滑膜由来MSCの遺伝子発現を解析し、実用的に使用しやすい数遺伝子を選択する。 	<ul style="list-style-type: none"> 滑膜由来MSC特定マーカーの発現レベルを継代培養毎に調査し、使用する遺伝子を選定 	△ (H26年3月達成予定)	<ul style="list-style-type: none"> ・品質評価コスト低減のための遺伝子マーカーの絞り込み

(2)保存基盤技術	中間目標	成果	達成度	今後の課題
① 細胞保存液検討	動物由来成分を含まず、培養細胞を2年以上保存し、生存率を70%以上に維持できる。	・中間目標の1年保存時生存率70%は達成	△ (H26年3月達成予定)	・DMSO含有量低減またはフリー化
② 保存条件検討	培養細胞を2年以上保存し、生存率を70%以上に維持できる保存条件	・中間目標の1年保存時生存率70%は達成	△ (H26年3月達成予定)	・DMSO含有量低減またはフリー化を可能にする保存条件の検討

◎ 大幅達成、○達成、△達成見込み、×未達

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数（内訳）

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表 （プレス発表等）
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
H23FY	0件	0件	0件	0件	0件	1件
H24FY	4件	0件	1件	0件	0件	35件

（※Patent Cooperation Treaty：特許協力条約）

3. 実用化、事業化の見通しについて

本サブプロジェクトの実用化は2018年までに軟骨再生治療用の細胞源として利用可能な品質を担保したヒト滑膜由来MSCを安定的に大量供給する技術が確立され、医療機関への供給が開始される所までを指す。そこで、本サブプロジェクトの開発技術は、「滑膜幹細胞を原料とする再生医療用移植材（gMSC）」（2012年12月から開始したPMDA薬事戦略相談中）で実用化を図る計画である。既に目標を達成した①無血清培地の成果を適用したgMSCの非臨床試験を現在実施している。その他の技術を使って2014年に開始する予定の臨床試験（治験）及び製造販売承認申請を行う予定である。

【Muse細胞領域】

Ⅲ. 研究開発成果について

はじめに

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 B 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等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、再生医療への応用等、生命科学や医療への貢献が大きく期待されている。

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、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等、「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。

研究開発の内容と実施体制

本研究開発は、成人ヒト間葉系組織から見いだされた、造腫瘍性を持たない多能性幹細胞である Muse 細胞を対象として、他者(間葉系幹細胞を利用する者)による客観的評価に供し、その性質の再現性の確認を行なうことを目的に、品質評価指標の技術開発を実施する。

Muse 細胞を用いた自家移植用細胞治療製剤及び他家移植用細胞治療製剤の両面での開発を念頭におき、Muse 細胞の性状解析や臨床応用への可能性等の研究に、より多くの研究者が参加できるようにするため、事業開始当初の2カ年の研究項目を「Muse細胞のcharacterization」とする。本評価結果を踏まえ、装置開発等その後の開発を本格化するかどうかを判断する。

なお、それぞれの機関は、以下の担当で研究開発を進める。

東北大学	: 分化方向性の違いの検討
名古屋大学	: ヒト Muse 細胞に関する指標となるタンパク質の検討
Clio	: Muse 細胞の精製・培養や発現解析、様々な組み合わせでの培養の効率性の検討、他家移植関連指標の探索
首都大学東京	: プロテオーム解析
大阪大学	: Muse 細胞の分離精製・培養等の再現性の検証

1. 全体の成果

Muse 細胞は、成人ヒト間葉系組織から見出された、増腫瘍性を持たない多能性幹細胞であり、再生医療における活用が期待されている。本サブプロジェクトでは、Muse 細胞を用いた再生医療や細胞アッセイ等での活用を念頭におき、Muse 細胞の性状解析や臨床応用への可能性の研究に、より多くの研究者が参加できる基盤を作ることを目標としている。

しかしながら、本プロジェクトの公募・採択審査時には「Muse 細胞自体の新規性は非常に高い。一方で、非常に未知の部分が多く、再現性に関するコミュニティのコンセンサスはまだ得られていない。」との評価により、以下の条件を付した採択となった。

【審査結果】 条件付き採択
【評価コメント及び採択条件】 Muse 細胞自体の新規性は非常に高い。一方で、非常に未知の部分が多く、 <u>再現性に関するコミュニティのコンセンサスはまだ得られていない</u> 。また、装置開発については提案に具体性が無く、必ずしも十分なチーム構成ではないことから、 <u>提案者以外の研究者による客観評価に供すること等の条件を付した上で採択とする</u> 。 (採択の条件) Muse 細胞を他者(間葉系幹細胞を利用する者)による <u>客観的評価に供することを条件として</u> 、その分離・培養等に限って開発を行う。なお、 <u>研究期間は当面2年程度とし</u> 、他者による評価結果を踏まえて、装置開発等その後の開発を本格化するかどうかを判断する。

よって、本サブプロジェクトでは、当初の目的である、Muse 細胞の大量供給を見据えた、Muse 細胞の characterization に基づく品質評価指標の開発を行うとともに、他者(間葉系幹細胞を利用する者)による客観的評価により、その性質の再現性の確認を行うこととしている。

当チームでは、現在、国内外で 50 以上の研究機関が Muse 細胞に関する研究開発を行なっていることを確認している。そのうちの複数の機関から当チームと独立して Muse 細胞の分離や多能性の確認等、再現性を示すデータが出てきており、論文による発表も出始めている。これらの結果により、採択時に懸念された Muse 細胞の再現性は、十分に立証された。

また、Muse 細胞の characterization については、主に以下の 4 つの課題について研究開発を進めている。

- ①最適な細胞ソースの検討
- ②Xeno-free な Muse 細胞樹立方法の検討
- ③FACS に代わる分離方法の検討
- ④多能性活性の高い Muse 細胞のマーカー検索

それぞれについて以下の結果を得ている。

①最適な細胞ソースの検討

骨髄、皮膚及び脂肪由来の Muse 細胞の特徴について検討を行った。

②Xeno-free な Muse 細胞樹立方法の検討

ウシ血清を使わず、Muse 細胞の多能性を失わない樹立方法を確立した。

③FACS に代わる分離方法の検討

細胞にダメージを与えず、高収率の分離方法を確立した。

④多能性活性の高い Muse 細胞のマーカー検索

複数のマーカー候補を同定し、それぞれについて検討を行なっている。

全体の成果のまとめ

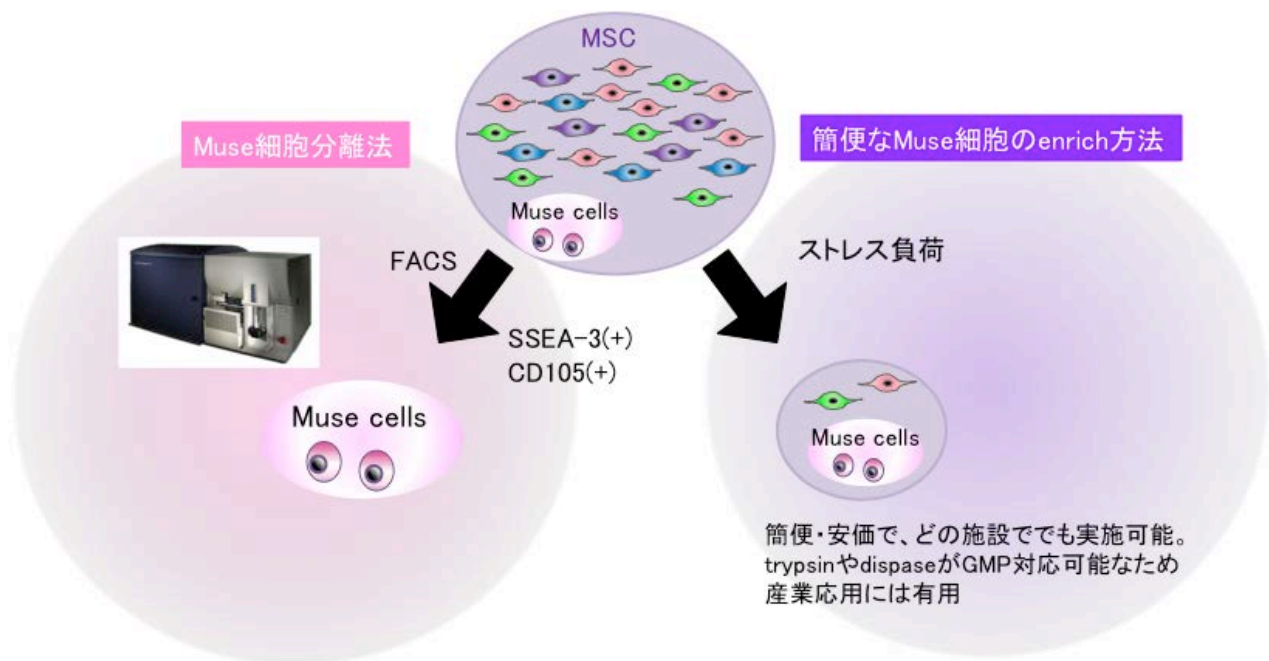
目 標	研究開発成果	達成度
<p>ヒト幹細胞の産業応用、とりわけ臨床応用を妨げている根本原因となっている「ヒト幹細胞の品質評価指標」を策定し、再生医療への応用を可能とする品質レベルで管理されたヒト幹細胞を、安定的に大量供給可能とする技術を開発する(出典：基本計画 p2)</p> <p>(1) 第三者による客観的な評価</p> <p>(2) Muse 細胞の characterization</p> <p>(2)-1 最適な細胞ソースの検討</p> <p>(2)-2 Xeno-free な Muse 細胞樹立方法の検討</p> <p>(2)-3 FACS に代わる分離方法の検討</p> <p>(2)-4 多能性活性の高い Muse 細胞のマーカー検索</p>	<p>国内外の複数の研究機関において Muse 細胞について再現性が確認された。</p> <p>骨髄、皮膚及び脂肪由来の Muse 細胞の特徴について検討を行い、その特徴を示した。今後、さらに臨床応用等を念頭においたソースの検討を行う。</p> <p>ウシ血清を使わず、Muse 細胞の多能性を失わない樹立方法を確立した。今後、より効率的で、商業ベースに乗る Muse 細胞の樹立方法の検討を行う。</p> <p>細胞にダメージを与えず、高収率の分離方法を確立した。今後、臨床応用に適した分離方法の検討を行う。</p> <p>複数のマーカー候補を同定し、それぞれについて検討を行なっている。分離に適した新たなマーカーを同定する。</p>	<p>達成</p> <p>達成見込み</p> <p>達成見込み</p> <p>達成見込み</p> <p>達成見込み</p>

2. 研究開発項目ごとの成果

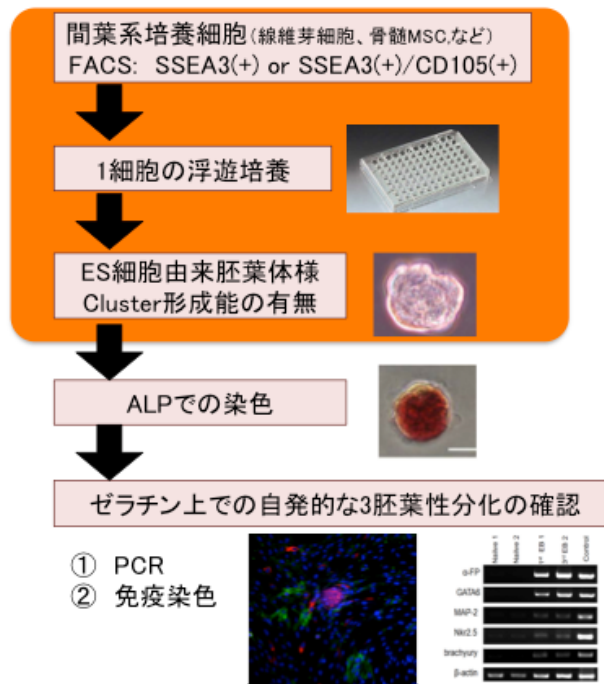
2-1 第三者による客観的な評価

先に述べたように、本サブプロジェクトは、採択時に「Muse 細胞を他者(間葉系幹細胞を利用する者)による客観的評価に供することを条件として、その分離・培養等に限って開発を行う。なお、研究期間は、当面 2 年程度」とする条件を付した採択となっている。

まず、Muse 細胞は、間葉系組織又は間葉系細胞群のなかにある多能性幹細胞であり、多能性マーカーSSEA-3 と間葉系マーカーCD105 の二重陽性細胞として採取可能なものである。分離方法としては、上記の 2 種類のマーカーにより、FACS を用いた分離を行なっているが、Muse 細胞にストレス耐性の性質を活用した、ストレス負荷による enrich の方法も、簡便・安価で、どの施設でも実施可能であり、ストレス負荷に用いる trypsin 等が GMP グレードなものが存在することから臨床・産業応用には有用である。



出澤らは、FACS を用いた Muse 細胞の分離方法についてすでにプロトコルを公開している。その内容は、以下のような流れに沿うものである。



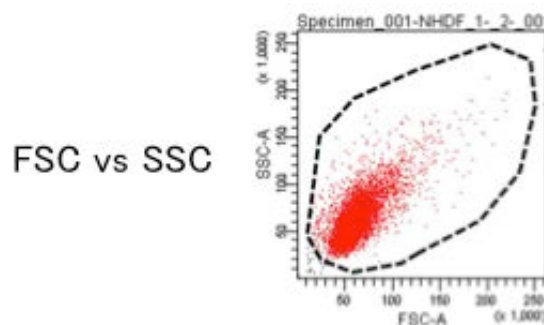
ただし、Muse 細胞以外の間葉系細胞は、ES 細胞様 cluster を形成しないため、ルーチンでは cluster 形成までで Muse 細胞が採れているかを確認すれば十分である。

様々な研究施設での成功・失敗例から、このプロトコルにおける分離のポイントが以下のように明らかになってきている。

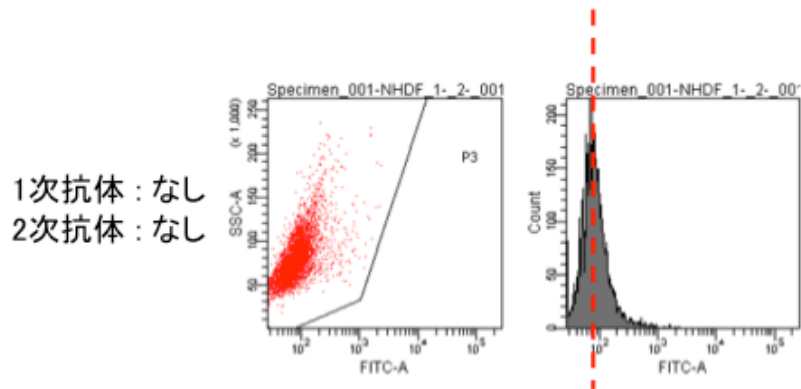
- ・ Millipore 社の SSEA3 抗体を 50 倍希釈で使う。他社の抗体は機能しない場合がある。
- ・ 間葉系の培養細胞では、ほぼ 100%が CD105 陽性なので、SSEA3 のみでよい。
- ・ 極端に老化した細胞は望ましくない。
- ・ 大元となる間葉系細胞の維持においてサイトカインは入れないほうが望ましい。
- ・ 血清はロットを選ばない。
- ・ 培地は α MEM, DMEM など、一般的なものでも構わない。
- ・ 細胞を凍結保存から起こしてすぐは使わない。

特に、FACS の扱いにより、Muse 細胞の分離に失敗する例も見受けられるので、そのポイントについても整理をした。

- ① 間葉系細胞集団のサイズがまちまちであるため、FSC vs SSC のゲートは広く取ってよい。

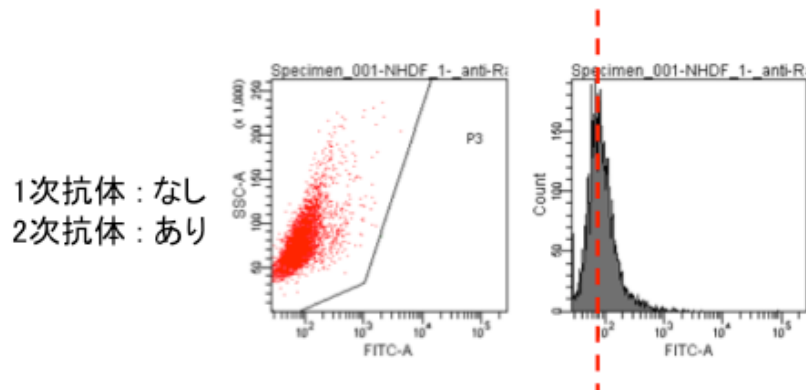


②ピークの位置をどこか決まった場所(下の図では 10^2 付近)に定めておく。



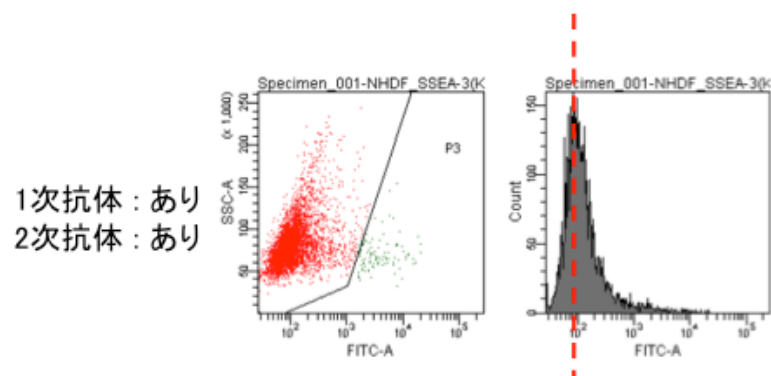
③ピークがシャープなほど細胞の状態が良いことが多い。

④ピークが2次抗体を入れただけでずれていないことを確認する。この段階でずれてしまうのは、悪い結果につながるが多い。

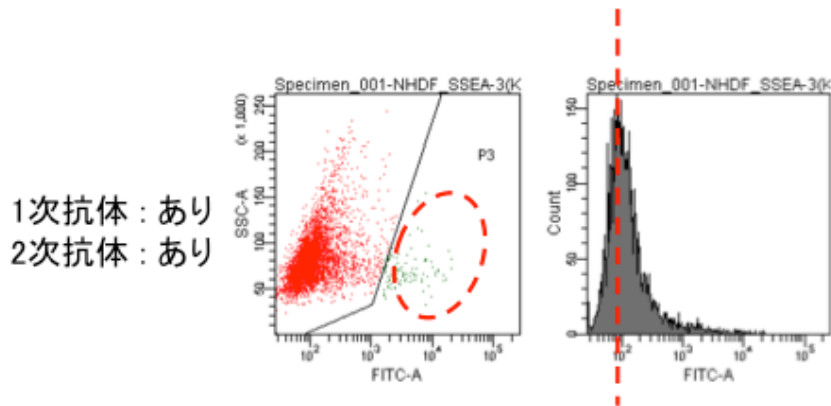


⑤この段階でP3に細胞が入らないギリギリの位置でゲートを設定する。

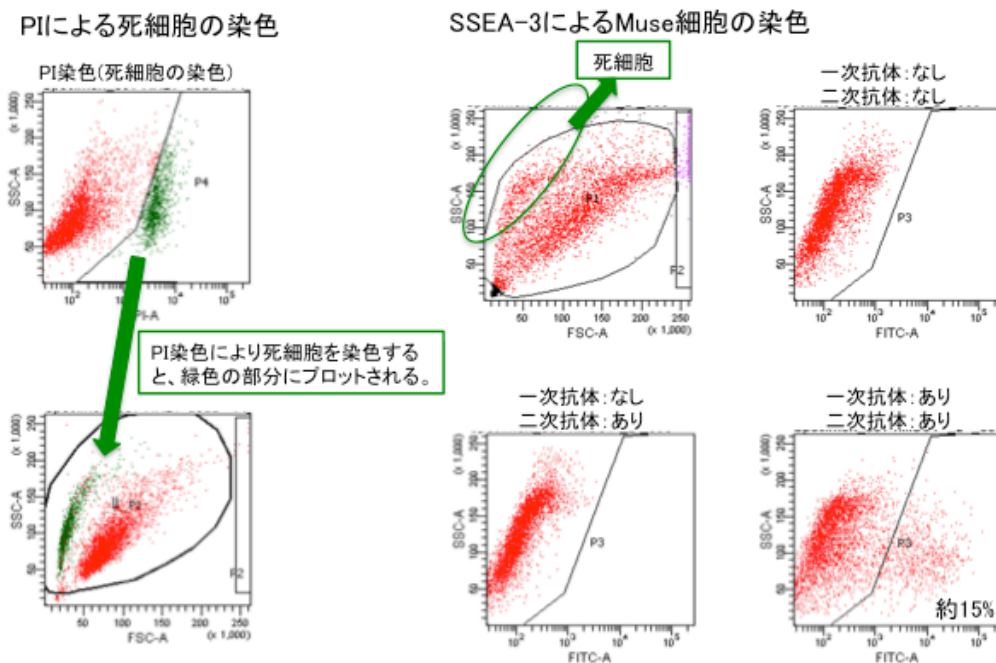
⑥1次抗体を入れてもピークがずれていないことを確認する。



⑦下の図において点線で囲まれた部分を Muse 細胞として回収する。



典型的な失敗例として、死細胞が増えると偽陽性が増加することが分かっており、先に提示したプロトコルのポイントを順守し、死細胞を出さないようにすることが重要である。



上記のように、Muse 細胞の分離を正確に行う方法を示してきたが、その成果もあり、現在までのところ Muse 細胞研究は、国内外での広がりを見せており、我々が把握しているだけでも 50 以上の研究機関で実施されていることがわかっている。

上記研究機関について本サブプロジェクト外の Muse 細胞に関する動きまで含め情報収集を行ったところ、当チームとは独立した研究によって Muse 細胞の再現性が得られている。我々が把握している再現性の例を以下にまとめる。

研究機関	研究者	概要	細胞ソース		SSEA-3(+)	3胚葉性分化
				CD105(+)		
海外大学A (未発表)	A'	Museの単離 疾患モデル動物実験 投稿準備中	間葉系組織(詳細未発表)	○	○	○
UCLA	Prof. G. Chazenbalk	Museの同定 多能性の再現 PLOS ONE掲載(13年6月)	ヒト脂肪組織	○	○	○
Northwest A&F University	Dr. Zhang	Museの単離 Cell Reprogram掲載 (13年5月)	ヤギ皮膚線維芽細胞	○	○	○
国内大学B (未発表)	B'	Museの同定 多能性の再現	間葉系組織(詳細未発表)	△	○	○
国内大学C (未発表)	C'	Museの同定 ある特定の細胞への分 化	間葉系組織(詳細未発表)	—	○	外胚葉

上記のように、複数の研究機関が独立して、間葉系組織/細胞の中に S 胚葉を超えた分化能を持つ Muse 細胞が存在することを示しており、本プロジェクトの採択条件であった再現性が確認されている。

2-2 Muse 細胞の characterization

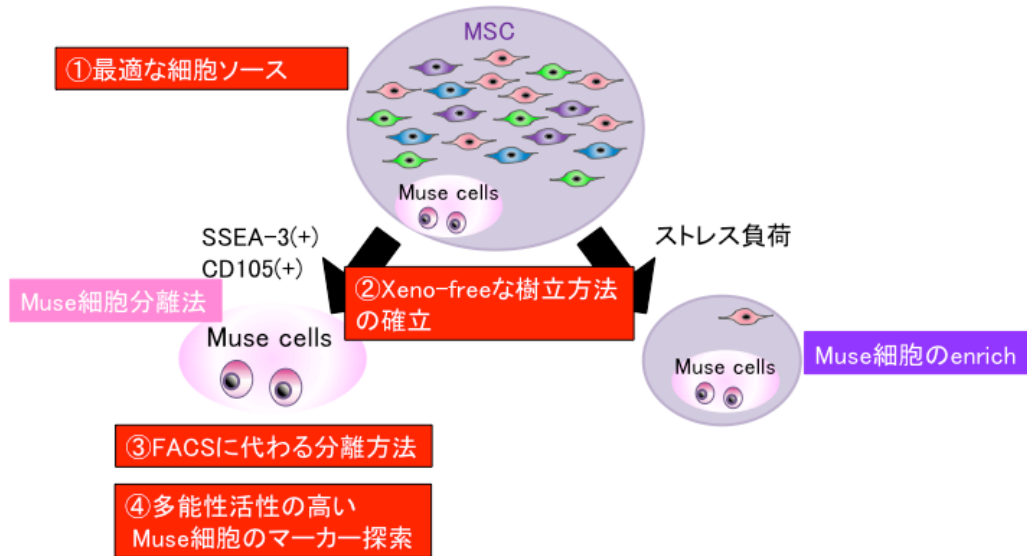
本サブプロジェクトは、2-1 の客観的評価のほかに、Muse 細胞の大量供給技術を確立するための基盤となる技術開発を目的としている。2-1 で記載した Muse 細胞の研究開発の拡大により、Muse 細胞を活用した再生医療や、Muse 細胞を用いた hepatocyte や 3 次元培養皮膚等を用いたアッセイ系の実現が現実のものとして具体的な検討がなされている。

再生医療については、国内研究機関においてある疾患についてまずは自家 Muse 細胞の移植試験が早ければ 2 年後にも開始する方向で準備が進んでいる。細胞アッセイ系の提供についても、出澤、Clio らが別の NEDO プロジェクトで開発した Muse 細胞由来 melanocyte を用いた 3 次元培養皮膚について、皮膚透過性等の試験に活用したい旨、国内外企業からのアプローチを受けており、Clio を中心に細胞アッセイ系の提供ビジネスをある国内企業と共同で検討しているところである。

このような実用化のためには、Muse 細胞の大量供給技術を確立することが基盤となる。よって、本サブプロジェクトでは、Muse 細胞の characterization を進めることで、大量供給の基となる分離方法の改善されたプロトコルを確立することを目的と定め、将来の Muse 細胞供給体制の整備や自動化機器の開発につなげることを目指している。

具体的には、主に以下の 4 つの課題を検討することにより、上記の目的を達成する予定である。

- ①最適な細胞ソースの検討
- ②Xeno-free な Muse 細胞樹立方法の検討
- ③FACS に代わる分離方法の検討
- ④多能性活性の高い Muse 細胞のマーカー検索



以下、それぞれの課題についての成果を述べる。

①最適な細胞ソースの検討

Muse 細胞は、間葉系組織に広く存在し、由来する組織によらずに多能性を有している。しかしながら、それぞれの由来に応じた特徴を有している可能性があることから、当チームは、骨髄、皮膚及び脂肪の由来別に Muse 細胞を分離し、Q-PCR を用いた遺伝子発現量の比較やクラスター形成能・接着培養での 3 胚葉への分化効率等を比較することで、それぞれの組織由来 Muse 細胞の特徴を示した。

②Xeno-free な Muse 細胞樹立方法の検討

再生医療において、ヒトへの投与を念頭に置いた場合、Xeno-free での Muse 細胞の樹立方法を確立しておくことが望ましい。当チームは、Xeno-free な Muse 細胞樹立方法を確立することに成功した。さらにこの方法で得られた Muse 細胞が従来方法と同様の性質を持つことを確認するため、三胚葉系の細胞への分化を試みたところ、多能性を失わないことが確認された。

③FACS に代わる分離方法の検討

FACS は、対象となる細胞にレーザーを当てることで分離を行うが、そのことが細胞にダメージを与え、活性を落とすことがあることが知られている。Muse 細胞の場合も、SSEA-3 陽性細胞として分取した細胞群のうち、このダメージによりクラスターを形成する細胞が一定の割合に留まる。よって、FACS に比べてより細胞にダメージを与えない方法で Muse 細胞を分離することができれば、活性の高い、実用に供することのできる Muse 細胞を高効率で取得できることにつながる。当チームは、そのような分離方法の検討を行い、Muse 細胞の濃縮を行い、効率よく回収する方法を確立した。

④多能性活性の高い Muse 細胞のマーカー検索

FACS により分離した細胞群には、上記のようにレーザーのダメージ等により様々な状態の Muse 細胞が存在していることが想定される。その中でより活性の高い Muse 細胞を分離するため、プロテオーム解析による Muse 細胞に特徴的なタンパク質の同定や、他の生物種での Muse

細胞の同定し、それらの比較等の手法を通じて、新たなマーカーの探索を行なっている。

上記によって characterize されたそれぞれの Muse 細胞の細胞治療での有効性を in vivo で確認をするため、肝硬変モデルマウスでの Muse 細胞投与による組織修復能の評価系の確立を検討した。

上記の研究開発結果を、以下のような形で発表している。特に特許戦略については、プロジェクト開始前に出願している、Muse 細胞の物質についてのクレームも含めた基本特許の成立に注力しつつ、今後の特許戦略を検討しているところである(IV で後述)。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数 (内訳)

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表 (プレス発表等)
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
H23FY	0 件	0 件	0 件	5 件	5 件	4 件
H24FY	1 件	0 件	0 件	8 件	3 件	1 件

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)

3. 実用化の見通しについて

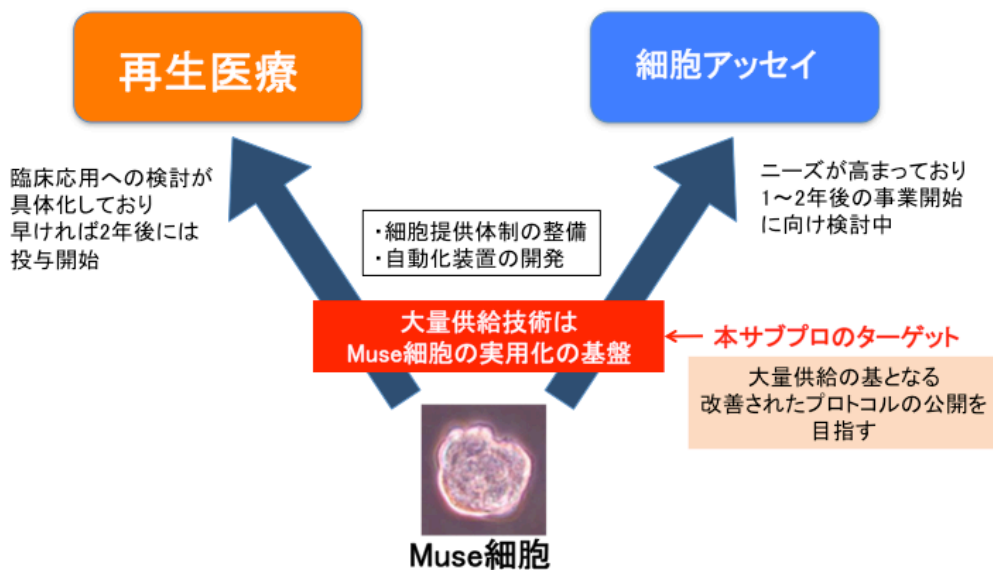
3.1 実用化の見通し

Muse 細胞は、現在、国内外 50 以上の研究機関が様々な疾患や応用を念頭に置きつつ研究開発を行っており、近い将来、具体的な実用化が見込まれる。当チームは、再生医療と細胞アッセイ系の 2 つを Muse 細胞実用化の大きな柱と位置づけて、事業展開を検討している。

再生医療は、Muse 細胞を用いた細胞治療、さらには他家未分化 Muse 細胞製剤を最終的なターゲットとして検討している。現在、複数の疾患のモデル動物で Muse 細胞投与の有効性が確認されてきており、早ければ 2 年後にもある特定の疾患について、自家未分化 Muse 細胞の投与による臨床試験を開始すべく準備を進めている。特に、Muse 細胞は、あらゆる細胞に分化することができる多能性幹細胞であることから適応となる疾患が幅広く考えられることに加え、造腫瘍性を有しないことから安全に、かつ未分化なままの状態でも簡単に投与できるというメリットを持ち、再生医療のための有力な細胞ソースとして期待されているところである。

また、近年、動物実験に代わり細胞アッセイに対する期待が高まっているが、細胞ソースをどのようにするかという点が問題となっている。特に入手が難しい細胞については、幹細胞から分化させたものを活用するという流れが出てきており、iPS 細胞を用いた細胞アッセイ系の構築は、国内外でビジネスとして成立しつつある。当チームは、より人体に存在する細胞に近いアッセイ系の構築に Muse 細胞が適しているものと考えて、Clio を中心にプレマーケティングを行なっているが、潜在的なニーズの強い hepatocyte に加え、当チームが別の NEDO プロジェクトにより確立した Muse 細胞由来 melanocyte を用いた 3 次元培養皮膚について非常に高い関心を得ており、1~2 年後のビジネスインを想定しつつ、ある国内企業との提携につき具体化している。

このように、Muse 細胞は、数年後には、様々な場面で用いられることが想定されているが、そのためには、Muse 細胞を大量に供給できることが基盤となる。本サブプロジェクトのテーマは、まさにその課題の解決を目指すものであり、その波及効果は、極めて広範囲に亘るものである。

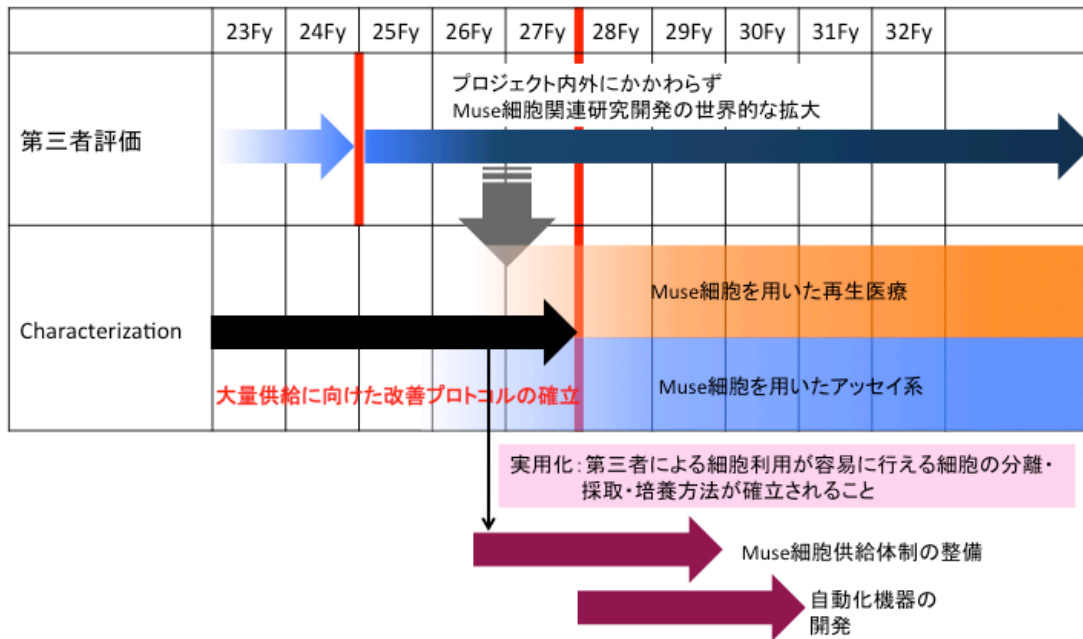


当チームは、Muse 細胞の発見者である出澤、藤吉らを含んでおり、Muse 細胞の発表前に出願をしている Muse 細胞の基本特許の権利を有している。本特許は、職務発明として、出澤、藤吉らが所属する大学に発明届を提出したものの、大学が権利を継承しない旨の結論を出したことで、出澤らが個人で出願したものであり、Clio が独占的实施権を取得している。基本特許の中には、Muse 細胞の物質に関するクレームのほか、ストレスを用いた分離方法、SSEA-3/CD105 を用いた分離方法、再生医療等への幅広い用途等をクレームしており、PCT 出願等を経て、各国移行を行い、個別の審査対応をしている。いち早く早期審査請求を行った日本においては、基本特許のクレームのうち、Muse 細胞の物質特許及び SSEA-3/CD105 を用いた分離方法について、2013 年 1 月に特許が成立した。このことは、少なくとも日本においては、Muse 細胞を用いた研究開発やビジネスは、この特許を活用したことになるため、知財戦略上、極めて有意な立場に立ったことを意味している。当チームは、Clio を中心として、引き続き基本特許の残るクレームの権利化を目指すことに加えて、米国等においても物質特許を含めた特許の成立を目指した対応を行なっているところである。



上記のような強い知財を基盤とする本サブプロジェクトであるが、Muse 細胞の分離方法については、より簡便・安価な方法が発明されれば、分離方法の改良特許として、他の研究機関等が特許を取得することが可能となる。その国際的な競争の中で、本サブプロジェクトでの Muse 細胞の characterization の成果を用いて、いち早く Muse 細胞の分離方法の改善プロトコルを確立し、権利化することを目指している。

さらに、このプロトコルを基に、Muse 細胞供給体制の整備や自動化機器の開発といった、当初本サブプロジェクト内での実施を検討していた項目を、Clio を中心に事業化ベースで実現していくことにより、さらなる Muse 細胞の研究開発さらには実用化を後押ししていくことを想定している。



【間葉系細胞領域】

はじめに

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、肝臓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。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を安定的に大量供給する技術の開発を行う。最終的に、均質なヒト幹細胞を大量に作るための基盤技術に関する標準化案を作成し、幹細胞による臨床研究の活発化、創薬の効率化及び再生医療の産業化を目指す。その中で世界的に高まっている幹細胞の医療及び産業応用への期待に応えていくためには、提供者の年齢、由来する組織の違いによって異なる細胞を産業応用、とりわけ再生医療に利用するための品質を維持・管理しながら大量培養・供給するシステムの構築が課題となる。そこで本研究開発の中で、最も臨床に近い位置づけにある幹細胞としての間葉系幹細胞による効果的な治療の設計や治療効果の検証などに体系的に応用可能な品質カタログデータを構築し実証研究を進め、間葉系幹細胞を用いた再生医療促進への貢献を目指す。

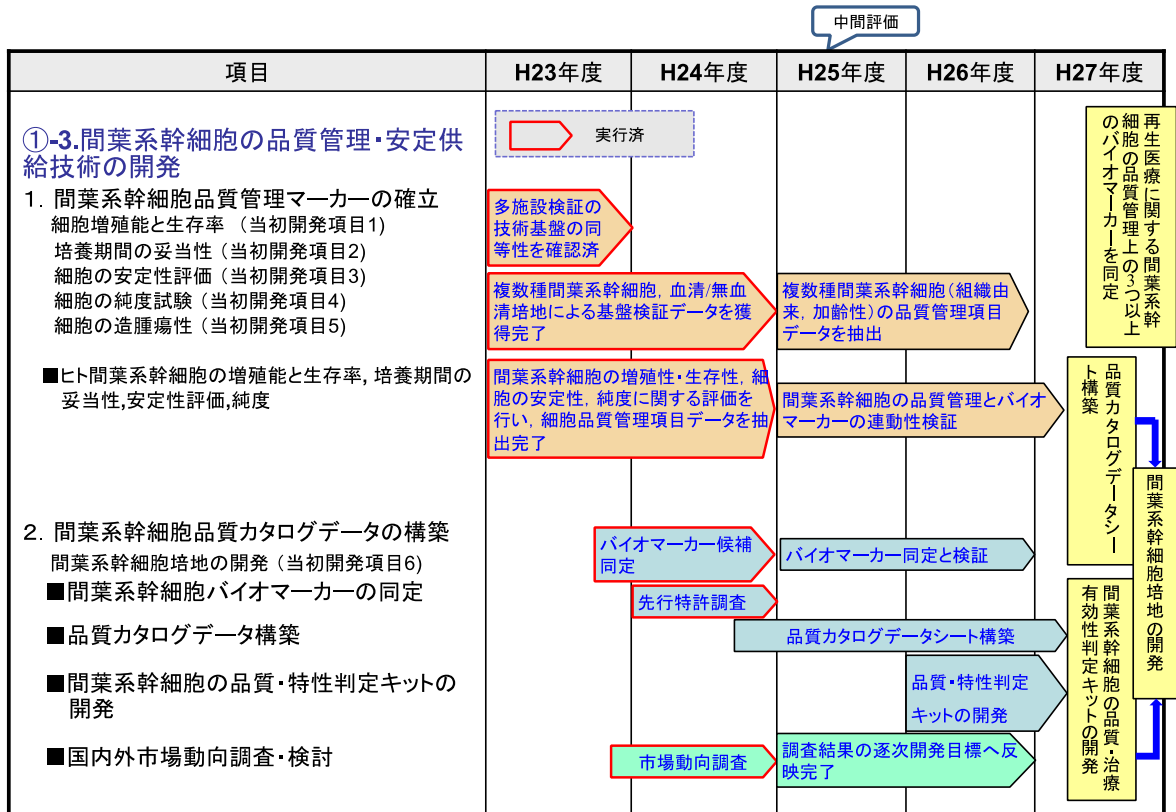
本研究開発項目は、次の6種である。1) 細胞増殖能と生存率、2) 培養期間の妥当性、3) 細胞の安定性評価、4) 細胞の純度試験、5) 細胞の造腫瘍性、6) 間葉系幹細胞培地の開発

研究開発を遂行するに当たって、6つの小項目を、研究開発の関連性から2つの中項目に整理することにした。すなわち1) 間葉系幹細胞品質管理マーカーの確立(上記項目 1-5)を包含): 1)-5)にあげた各項目の検証を目指し、「多検体+複数機関培養実験」及びそれらからのデータ抽出を行う。さらに 1)~5)のポイントを鑑みて、間葉系幹細胞の品質管理マーカーを3つ以上同定する; 2) 間葉系幹細胞品質カタログデータの構築(上記項目 1)-5)のデータ解析に基づき項目 6) 間葉系幹細胞培地の開発に繋げる): 1)-5)の検討から抽出した間葉系幹細胞品質管理マーカーをもとにした品質カタログデータの構築を行う。

本開発項目では、間葉系幹細胞培地の開発を目標として研究開発を開始し、培地の評価系としてのマーカー開発に取り組んだが、培地開発の動向調査の結果、既に数多くの培地が開発されていることから、まず多様な間葉系幹細胞の品質カタログデータの構築を行い、それを培地開発に繋げていくこととした。さらに間葉系幹細胞の品質・特性判定キットの開発を行う。

研究開発の5年間のスケジュールを表に示す。

研究開発 5 年間のスケジュール



【研究開発の実施体制】

事業を担う研究開発実施の体制図、研究連携図及び研究開発実施主体の体制表を以下に示す。

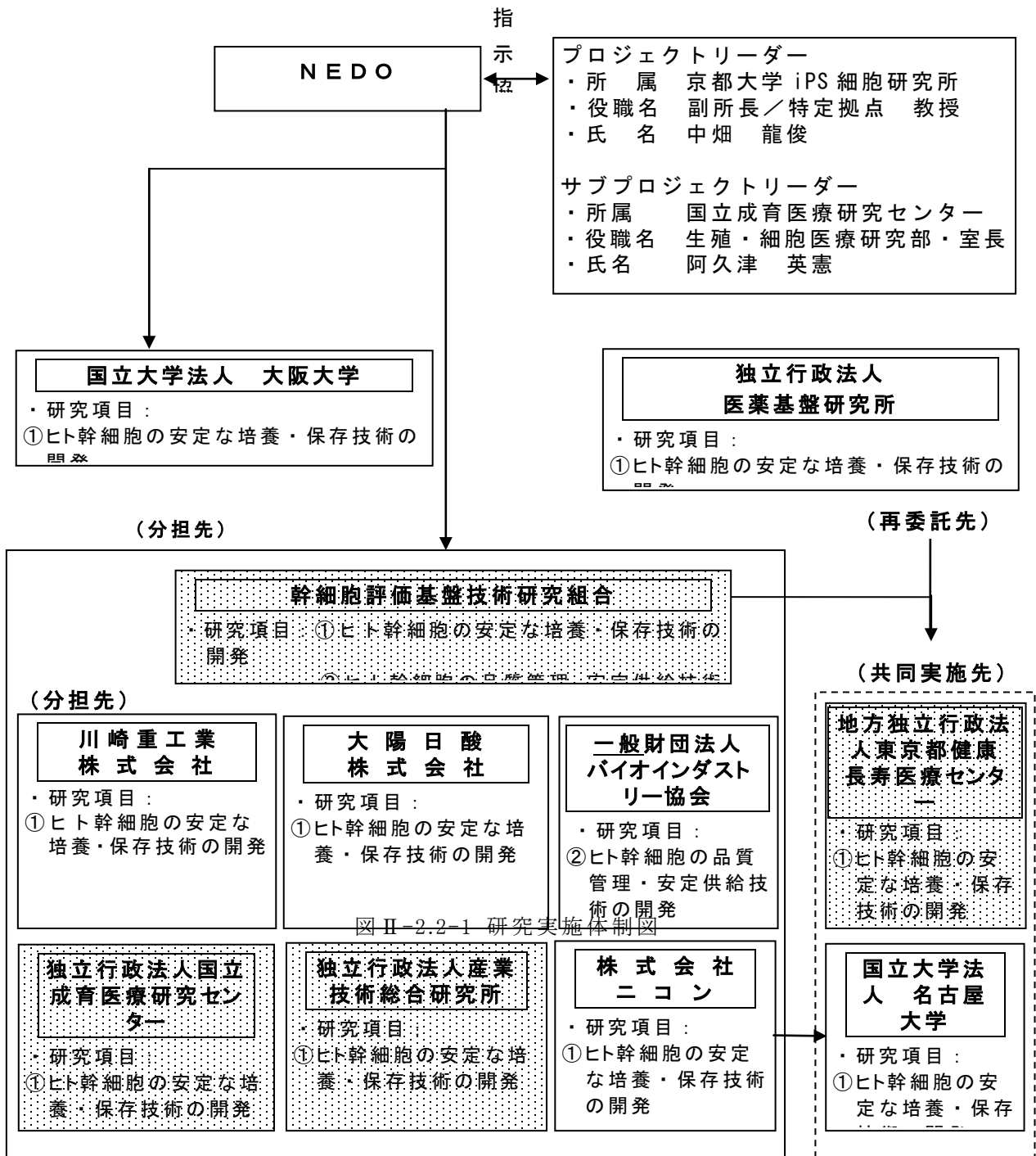
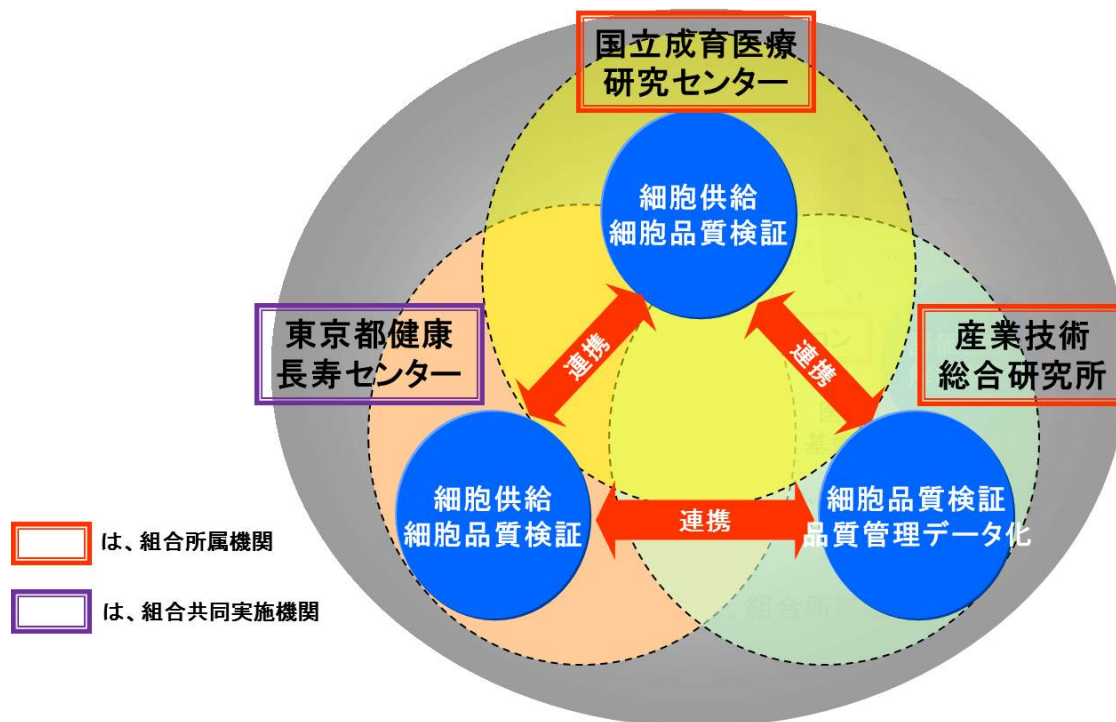


図 II-2.2-1 研究実施体制図

研究実施体制図



研究連携図

研究開発実施主体の体制表

PL等	氏名	所属・役職	
P/L	中畑 龍俊	京都大学 iPS 細胞研究所 副所長／特定拠点 教授	
サブP/L	阿久津 英憲	国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部・室長	
氏名	所属・役職		主な担当事業内容
阿久津 英憲	国立成育医療研究センター研究所 生殖・細胞医療研究部生殖技術研究室 室長		①-3
伊藤 弓弦	(独)産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 器官発生研究チーム・研究チーム長		①-3
小沼 泰子	同・主任研究員		①-3
平林 淳	同・糖鎖レクチン工学研究チーム・研究チーム長		①-3
舘野 浩章	同・主任研究員		①-3
豊田 雅士	東京都健康長寿医療センター研究所・老年病研究チーム血管医学・研究副部長		① -3

【研究開発の運営管理】

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している。

具体的には、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、研究開発に参加していない外部有識者で構成される運営会議を組織し、目標達成に向けた研究開発マネジメント体制を構築している。

本研究開発項目①—3「間葉系幹細胞品質管理・安定供給技術の開発」については、PL及びNEDO担当者を含めた、分科会を年数回開催し、研究の進捗状況について精査するとともに、研究者のみから構成される研究者会議を年数回開催し、分科会の指摘事項への対応等、研究の効率的推進について検討している。研究開発テーマでは、各機関が行う結果を統合し更に結果の検証を遅滞なく共同で担当し遂行する。本プロジェクトの成果が得られるのは、機能的なこの連携が基盤にあるためである(連携図)。

会議開催記録を以下に示す。

・会議開催記録

【平成23年度】

回	開催年月日及び場所	出席者数	議題
1	第1回間葉系分科会 H23.10.27 組合会議室	14	1. 経緯報告 2. 進捗報告 3. 今後の進め方
2	第2回間葉系分科会 H24.01.20 組合会議室	12	1. 全体進捗報告 2. 各機関進捗報告 3. 今後の進め方

【平成24年度】

回	開催年月日及び場所	出席者数	議題
1	第1回間葉系分科会 H24.05.31 組合会議室	11	1. 全体進捗報告 2. 各機関進捗報告 3. 今後の進め方(動向調査の実施等)
2	第1回間葉系研究者会議 H24.08.01 成育医療研究 センター会議室	4	1. 遺伝子発現解析に関する報告(産総) 2. 各機関からの進捗報告 3. 今後の進め方
3	第2回間葉系研究者会議 H24.12.13 成育医療研 究センター会議室	8	1. NEDO連絡(運営会議、予算査定) 2. NEDO課題提示 3. 今後の進め方(分科会対応)
4	第2回間葉系分科会 H25.01.24 組合会議室	12	1. 全体進捗報告 2. 各機関進捗報告 3. 今後の進め方(運営委員会対応)
5	第2回間葉系研究者会議 H25.03.04 成育医療研 究センター会議室	10	1. 進捗報告 2. NEDO課題提起 3. 今後の進め方(運営会議対応)

【平成25年度】

回	開催年月日及び場所	出席者数	議題
1	第1回間葉系研究者会議 H25.06.03 組合会議室	8	1. 中間評価対応(事業原簿、プレゼン原稿) 2. 今後の進め方

【研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性】

間葉系幹細胞は、骨髄や脂肪などの自己組織からでも採取可能な幹細胞であり、免疫拒絶がない自家移植など高い安全性から臨床応用が行われている。しかし、間葉系幹細胞を細胞治療法へ応用する際の特性として下記の点が考慮される。1)十分な細胞数を得るために拡大培養し継代を重ねる。さらに細胞は多種の組織由来が想定され、異なる組織由来・継代数・多分化能変化の関連性を理解する必要がある。2)間葉系幹細胞は非均一性(heterogeneity)な集団であるため、細胞品質や治療の有効性を評価するため判断が難しい。そのために、細胞同定として細胞表面抗原などのマーカー開発が行われてきた経緯があるが、唯一無二のマーカーは存在せず複数の組み合わせであり、そもそも細胞同定とその有効性を関連づけることはできていない。間葉系幹細胞の品質管理を可能とするバイオマーカーを提示できれば、細胞移植療法を事前に定量的評価が可能となる。さらに、幹細胞の由来となる組織別、個体(加齢等)別など様々な間葉系幹細胞の特性を評価したデータを統合的にした品質カタログデータを構築し、間葉系幹細胞の品質・特性判定キットを開発していくことは大きな意義がある。適切かつ効果的な本研究開発のために、間葉系幹細胞を中心とした幹細胞による再生医療の国内外市場動向調査を行う。

各品質データを組み合わせることで、細胞を非侵襲的に評価し個別ケース、疾患毎に治療デザインができる次世代再生医療が期待される。そのために、すでに応用化している様々な幹細胞リソースで検証を行う。細胞を非侵襲的に細胞移植療法を事前に定量的評価でき、さらに細胞培養製品(培地等)の開発など、間葉系細胞による再生医療領域の応用・開発が促進できると考えられ、実用化が期待される。本研究開発では、iPS細胞の特性も考慮したマーカーであるため、iPS細胞を用いた開発研究や産業応用にも有用である。

知財獲得については、先行特許調査の結果に基づいてバイオマーカーの特許性の確立と特許取得を積極的に進める。これらは、研究開発でも有用な道具となりうる特徴的なものであり、バイオメディカル分野の研究を加速する可能性も秘めている。

【情勢変化への対応】

- 1)「間葉系幹細胞を対象とした再生・細胞医療の動向調査」を実施して、間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療のビジネスの状況、再生・細胞医療に使用可能な同種間葉系幹細胞(株)及び間葉系幹細胞向け培地の臨床における使用状況等の有益な情報を入手し、それに基づいて培地開発の研究の方向性をより明確にすることができた。
- 2)糖鎖解析の有効性が明らかになり、糖鎖関連研究員を研究グループに加える措置をとった。
- 3)有力マーカーの同定に伴い、知財戦略を確立する必要性が出てきたため、先行特許調査を実施することとした。

1. 全体の成果

本研究開発の項目は、以下に示すように、6つの小項目からなる。

- 1) 細胞増殖能と生存率
- 2) 培養期間の妥当性
- 3) 細胞の安定性評価
- 4) 細胞の純度試験
- 5) 細胞の造腫瘍性
- 6) 間葉系幹細胞培地の開発

研究開発成果の説明は、6つの小項目を、研究開発の関連性から2つの中項目に整理し、以下で報告する。

- 1) 間葉系幹細胞品質管理マーカーの確立(上記項目 1-5)を包含)
- 2) 間葉系幹細胞品質カタログデータの構築(上記項目 1-5)のデータ解析に基づき項目 6): 間葉系幹細胞培地の開発に繋げる)

表 1-1 に中間目標と達成度を、表 1-2 に最終目標と達成見通しを、それぞれ上記分類に基づく2項目に対し示す。

表 1-1 中間目標と達成度

開発項目	目標	成果	達成度
① ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発 ①-3. 間葉系幹細胞品質管理・安定供給技術の開発			
1) 間葉系幹細胞品質管理マーカーの確立	選定した間葉系幹細胞による品質管理項目(細胞増殖能と生存率、培養期間の妥当性、細胞の安定性評価、細胞の純度試験、細胞の造腫瘍性)の判定基準設定を行う。	複数の培養実験(由来の違う間葉系幹細胞株の連続培養、血清/無血清培地による比較培養実験、複数機関での同時培養実験)から細胞品質管理項目データ(増殖曲線、分化能、遺伝子発現、糖鎖修飾等)を抽出し、細胞増殖能と生存率、培養期間の妥当性、細胞の安定性評価に関する評価を行った。それらのデータを元にして、間葉系幹細胞の増殖能と分化能低下の状態を評価する品質管理マーカー候補を同定した。	◎
2) 間葉系幹細胞品質カタログデータの構築	無血清及び成分組成明確な間葉系幹細胞培地開発を行う。 ↓ 培地市場調査及び試薬メーカーの参画がない等の理由から培地開発そのものは断念し、新規培地開発に寄与しうる「細胞品質カタログデータの収集」に研究方向を変更した。	間葉系幹細胞の増殖能と細胞の分化能低下の状態を評価する指標に基づき、それらの発現量などをスコア化する事で、培地開発にもつながる間葉系幹細胞品質カタログデータのプロトタイプを構築した。	培地開発 × カタログデータ △

◎ 大幅達成、○達成、△達成見込み、×未達

表 1-2 最終目標と達成見通し

開発項目	目標	課題とその解決方法	達成可能性
① ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発 ①-3. 間葉系幹細胞品質管理・安定供給技術の開発			
1 間葉系幹細胞品質管理マーカーの確立	細胞再生医療に関する間葉系幹細胞の品質管理上の判定基準を提示し、前臨床研究へ応用していく。	候補因子をすでに見出しており、品質評価指標となるマーカーを獲得できる見通し。今後は別検体群を用いての再現性と有効性の検証を行う予定。	◎
2) 間葉系幹細胞品質カタログデータの構築	無血清及び成分組成明確な間葉系幹細胞培地を製品化する。 ↓ 培地市場調査及び試薬メーカーの参画がない等の理由から「培地の製品化」から、新規培地開発に寄与しうる「細胞品質カタログデータの構築」に目標を変更	由来となる組織別、個体(加齢等)別など様々な間葉系幹細胞の特性を評価した品質カタログデータを構築し、品質・特性判定キットの基盤とする。今後、この評価系を活用して、試薬メーカー等と協議しながら培地開発に繋げていく。	○

◎ 達成確実、○達成可能性大、△達成見込み、×未達の見込み

2. 研究開発項目毎の成果

2.1 間葉系幹細胞品質管理マーカーの確立

再生医療で用いる細胞として、間葉系幹細胞が有力なソースの一つであることは、これまで多くの臨床例が蓄積していること等を見ても明らかである。しかしながらこれまでの知見は「先進医療」の名の元に行われた、限定的な臨床例のみであり(造血幹細胞を用いた骨髄移植は除く)、まだまだ万人が享受できる敷居の低い医療、周辺技術などを含め成熟した市場形成が見込まれる医療と呼ぶには至っていない。その理由として、ES/iPS細胞以上に大きいと言われる間葉系幹細胞の「品質のバラツキ」について検証が不十分であることが大きい。そもそも間葉系幹細胞はES/iPS細胞の様にクローン化されたセルラインになっておらず、Stemnessと言う観点からの品質管理は難しい。従って、間葉系幹細胞による細胞移植の「有効性の評価」、その機序の理解及び適用部位における機能に基づく「リスク評価」を念頭においた間葉系幹細胞の品質検証が必要である。

本開発項目では、これまで体系的に検証されてこなかった、①細胞増殖能と生存率、②培養期間の妥当性、③細胞の安定性評価、④細胞の純度試験、⑤細胞の造腫瘍性、の検証を目指し、間葉系幹細胞の長期培養実験を行った。まずはじめは、入手のしやすさ、免疫原性の低さなどから、脂肪組織及び胎児付属組織(卵膜と臍帯・胎盤組織)由来間葉系幹細胞を研究対象とした。(表 2.1-1)

細胞名	由来
Mim1508A	脂肪(耳)組織由来
Yub1815A	脂肪(指)組織由来
UC733C	臍帯膠質由来
PL549CM	胎盤絨毛組織由来
AM933EP-ep	羊膜組織由来

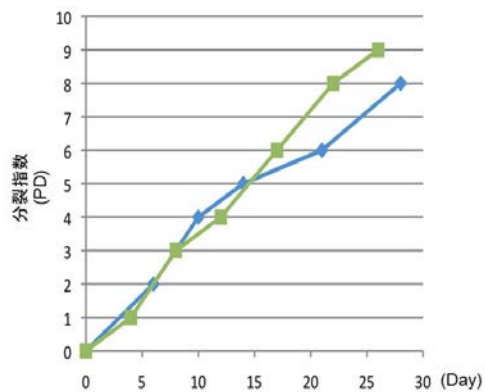
表 2.1-1：本開発事業において解析に用いた間葉系幹細胞サンプル
(UC733C、PL549CM、AM933EP-ep は同一個体由来)

上述の5株の間葉系幹細胞を、2機関に於いて、2種類の培地で長期培養し、各継代時の細胞数、遺伝子発現、糖鎖修飾を解析した。また、それ以外に対照サンプルとして、ヒト ES 細胞、iPS 細胞、繊維芽細胞そして、市販の脂肪組織由来間葉系幹細胞株 (StemPro human ADSC, Life Technologies) の培養及び各種解析も同時に行った。(合計95サンプル)

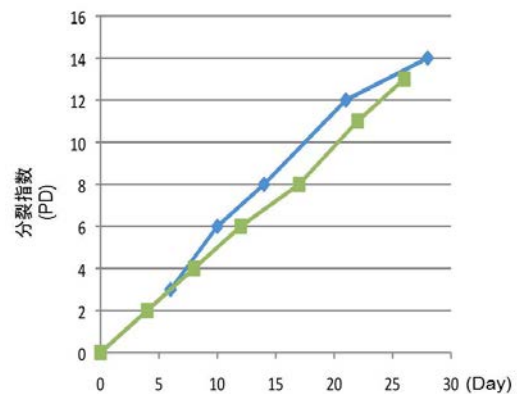
2.1.1 2機関での細胞培養過程における同等性の検討

細胞は培養過程において様々な要素(培地、継代法、播種密度等)によりその状態が変化することが知られており、集積した細胞の品質カタログデータの信頼性を担保することが先ず重要となる。本プロジェクトでは元となる細胞の供給を2機関(国立成育医療研究センターと東京都健康長寿医療センター)で行う。そこで細胞集積において機関毎の差がどの程度生じるかについて検証した。

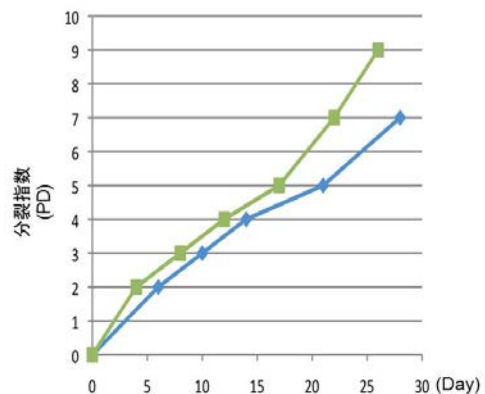
4株の間葉系幹細胞(脂肪(耳)組織由来、同一個体由来で臍帯膠質由来、胎盤絨毛組織由来、羊膜組織由来)について、同一培地条件(基礎培地、血清)で約1ヶ月間培養し、その間継代毎に細胞を回収し、細胞数(分裂指数)、遺伝子発現解析ならびに糖鎖解析を行った。その結果、細胞数(分裂指数)においては、4細胞ラインとも2機関による違いは認められなかった(図2.1.1-1)。



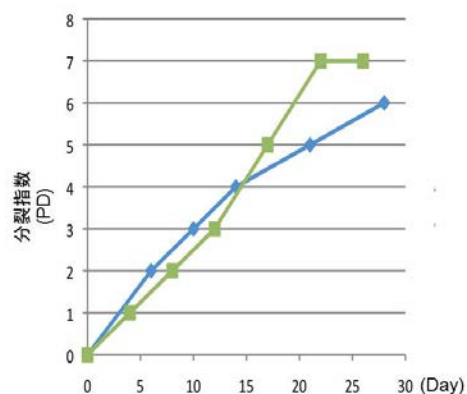
1) 2機関での Mim1508A 培養における分裂指数変化(緑;成育, 青;東健長)



2) 2機関での UC733C 培養における分裂指数変化(緑;成育, 青;東健長)



3) 2機関での PL549CM 培養における分裂指数変化(緑;成育, 青;東健長)



4) 2機関での AM933EP-ep 培養における分裂指数変化(緑;成育, 青;東健長)

図 2.1.1-1 各機関間の間葉系幹細胞増殖能

由来組織が異なる間葉系幹細胞を異なる 2 つの機関で細胞増殖能と生存率を検討した結果は、全く同等の細胞増殖能 (PD: population doubling, 集団倍加数で表示) を得ることができた。細胞を培養する場所(空間)と作業者が異なることで、間葉系幹細胞の基本特性である細胞増殖能には何ら影響を与えないことが判明した。つまり、本プロジェクトは安定した技術基盤の下に、行われている。

続いて、上述の4株に関して、播種直後と3継代後の細胞から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った(図 2.1.1-2)。アジレント DNA マイクロアレイ (SurePrint G3 Human GE 60K) による網羅的遺伝子発現解析をした後、全遺伝子平均の相関係数を算出し、その値をヒートマップ(赤の色が濃いほど相関係数が高い)の形で表した。

その結果、2機関に於いて「同じ株/同じ継代数の間葉系幹細胞」は相関係数 0.98 以上と極めて同等性の高い条件で培養することが出来たことから、培養方法の均一化により、充分安定した品質管理が可能と判明した→【③細胞の安定性評価】。今後は、実用化した場合に必須の「間

葉系幹細胞の凍結輸送」を想定し、凍結及び解凍操作により製品の解凍後の培養可能期間や品質への影響があるかどうかについても検証を進めたい。

上述の結果を元に培養系を2機関で統一し、得られたデータを統合して、①細胞増殖能と生存率、②培養期間の妥当性の観点からまずは増殖能/分化能を担保する間葉系幹細胞の品質管理マーカーの探索をする方針が定まった。

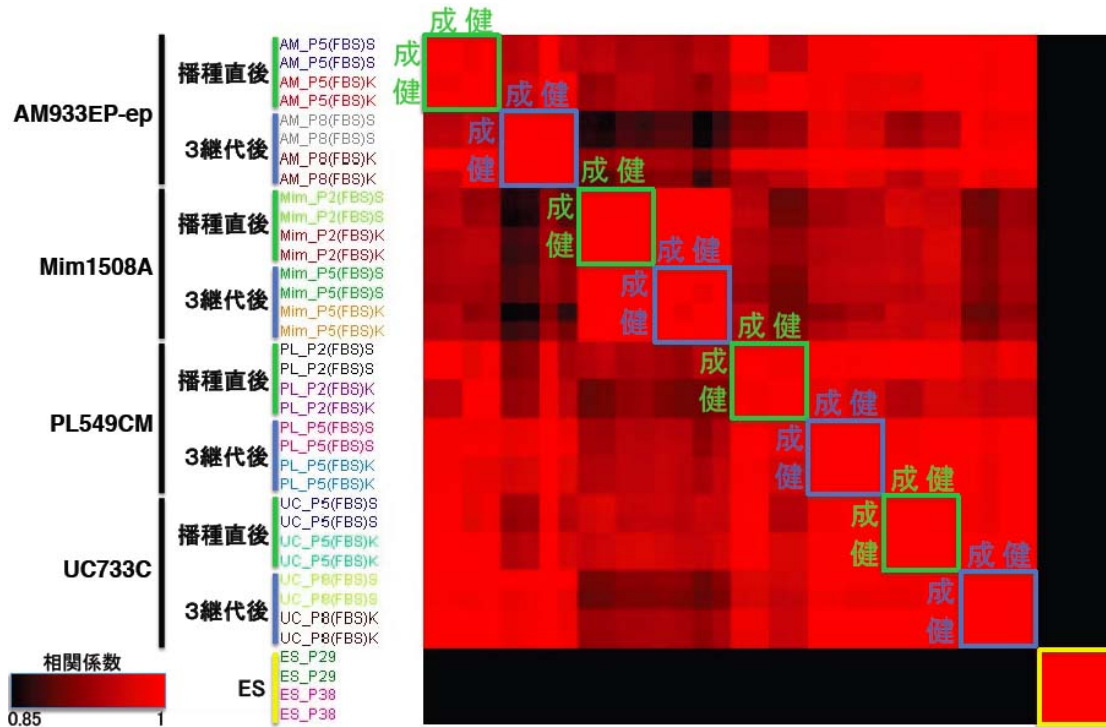


図 2.1.1-2 2機関における間葉系幹細胞の培養サンプルの遺伝子発現解析

2.1.2 培地条件、由来組織の違いによる間葉系幹細胞プロファイルの変化

培地条件の違い、由来組織の違いによる細胞の性質について、5株の間葉系幹細胞(脂肪由来(耳)(指)、同一個体由来で臍帯膠質由来、胎盤絨毛組織由来、羊膜組織由来)、2種類の培地(10%FBS含有DMEM培地ならびに無血清培地)で長期培養し、各継代時の細胞数、遺伝子発現、糖鎖修飾を解析した。なお、間葉系幹細胞無血清培地は、世界的な市場で初めての間葉系幹細胞無血清培地として市販された StemPro MSC SFM(Life Technologies)を用いた。培養期間は、それぞれの細胞で増殖停止が認められ細胞老化したと考えられるまでとし、そのマーカーである β ガラクトシダーゼによる染色により確認した。それぞれの細胞における増殖曲線を図 2.1.2-1 に示す。

医療廃棄物として非侵襲的な取得と安定した供給が可能であり、かつ抗原性の低さという有用性にも期待が集まる胎児付属組織由来の間葉系幹細胞(UC733C、PL549CM、AM933EP-ep)は血清の有無しによって大きく増殖能に違いが見られ、且つどちらの条件でもセネッセンス(細胞増殖停止)に達した。一方、成体からでも低い侵襲性で多量に得ることが出来る脂肪組織由来の間葉系幹細胞(Mim1508A、Yub1815A)は血清の有無しにはあまり影響されず、胎児付属物由来の細胞と比べて比較的安定した増殖能を示した。間葉系幹細胞は由来組織により細胞増殖能が大きく異なることが示された。さらに、培地によって同一組織由来の幹細胞であっても細胞増殖能に大きな差を生じることが明らかにされた。

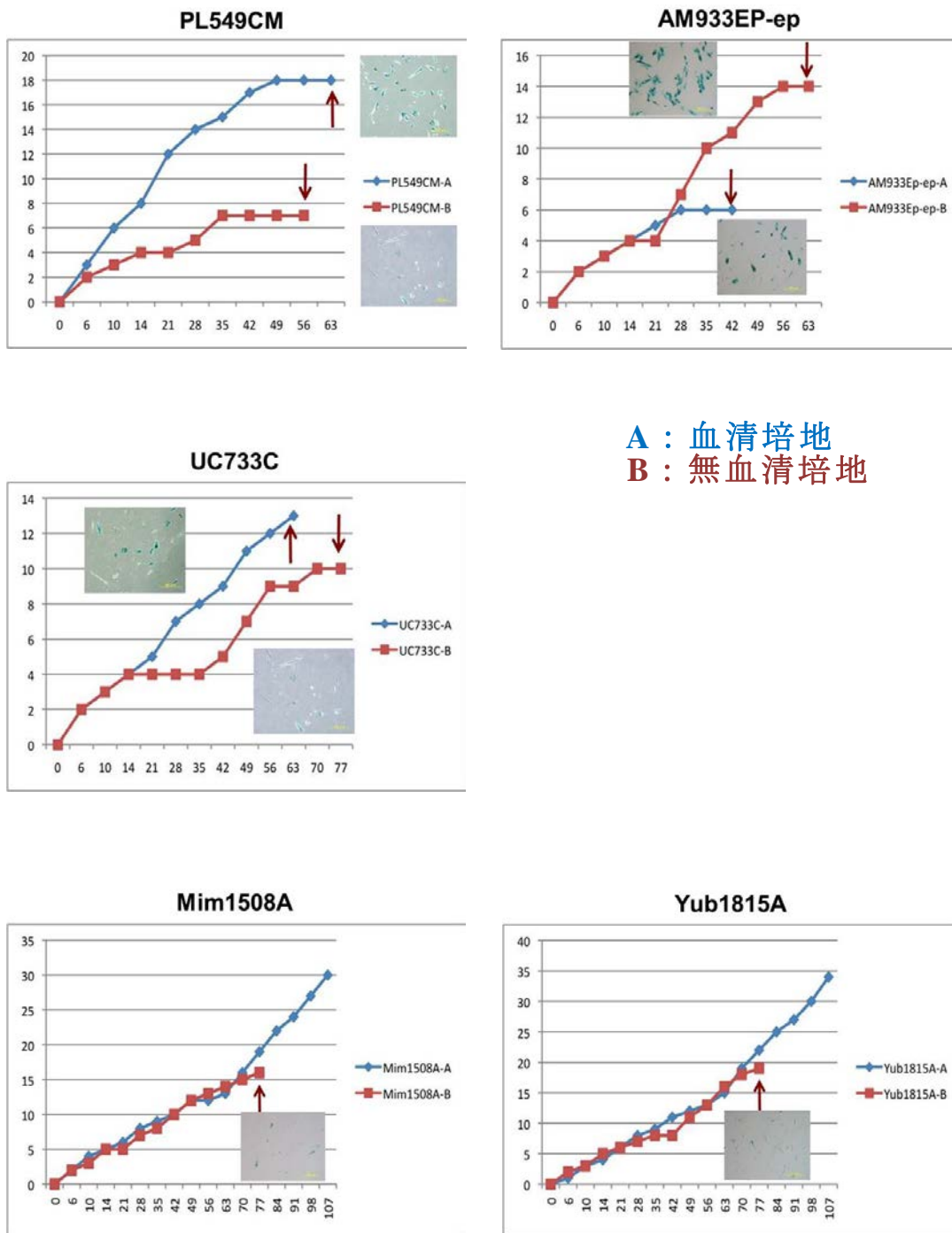


図 2.1.2-1 間葉系幹細胞の増殖曲線

無血清培地では、間葉系幹細胞の増殖能が落ち、FBS 含有培地に比し早期にセネッセンスに達してしまう。再生医療においては、異種由来成分を含まない(ゼノフリー)条件で細胞を培養する方法をとることが望まれる。そのため、現況、無血清培地やゼノフリー培地が開発され一部は販

売されている。しかし、間葉系幹細胞は樹立する組織が様々であり、培地の相性も異なることが示唆される。FBS 含有培地と比較すると無血清培地もまだ開発の余地が残ることが示唆された。

また、間葉系幹細胞の分化能を細胞継代数（細胞増殖能）と比較検討した。分化能については、セネッセンスに近づくにつれ、骨、軟骨、脂肪分化能が減少することも明らかとなった。分化能解析は、脂肪細胞分化（脂肪細胞分化キット、Lonza）、軟骨細胞分化（軟骨細胞分化キット、Lonza）と骨細胞分化（骨細胞分化キット、Lonza）を使用した。間葉系幹細胞の初期継代（P2）では、脂肪分化、軟骨分化、骨分化ともに認められ、多分化能を有している。しかし、継代を進めると分化能は明らかに低下する。脂肪組織由来の幹細胞 Yub1815A と Mim1508A、羊膜組織由来の幹細胞 AM933EP-ep の分化能を示す（図 2.1.2-2；脂肪組織 A は Yub1815A、脂肪組織 B は Mim1508A）。図では、脂肪分化をオイル赤 O 染色で判定し（赤色が陽性）、骨分化をアルカリホスファターゼ染色で判定している（青色が陽性）。

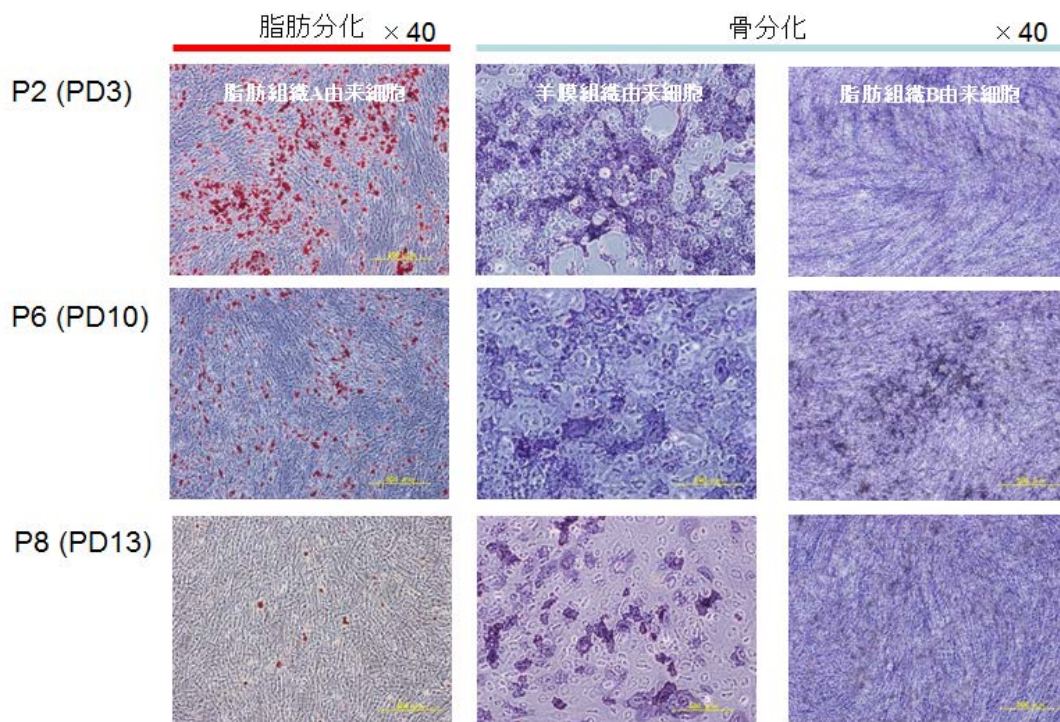


図 2.1.2-2 間葉系幹細胞の分化能減弱

間葉系幹細胞を用いた再生医療では、治療に必要な十分な細胞数を得るために拡大培養し継代を重ねなければならない。一方で、継代を進めると細胞の性質が大きく変化する。間葉系幹細胞のより効果的な応用のためには、異なる組織由来・継代数・多分化能変化の関連性を理解することが必須である。本プロジェクトでは、5つの異なる間葉系幹細胞の細胞増殖能・生存率や多分化能試験結果から細胞生物学的特性を明らかにした上、継代毎の細胞試料を採取し分子生物学的に特性を関連付けさせるため網羅的遺伝子発現および lincRNA 発現解析を行った。lincRNA は mRNA 同様 poly-A を持つ 2.3~17.2kb の長い non-coding RNA で、最近新たなバイオマーカーや新規治療標的因子として大変注目されている。様々な組織由来の細胞は何れにおいても、継代とともに細胞増殖能および分化能が低下していくことを見いだした。さらに最新のマイクロアレイ解析から、特徴的な遺伝子発現シグナルとバイオマーカーを見いだすことができた。

上述の5株、2培養条件、各継代時における細胞からそれぞれ RNA を抽出し、DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った後、ノリッジベースで収集した既知の間葉系幹細胞／造血幹細胞マーカーを用いてクラスタリング解析を行った(図 2.1.2-3)。

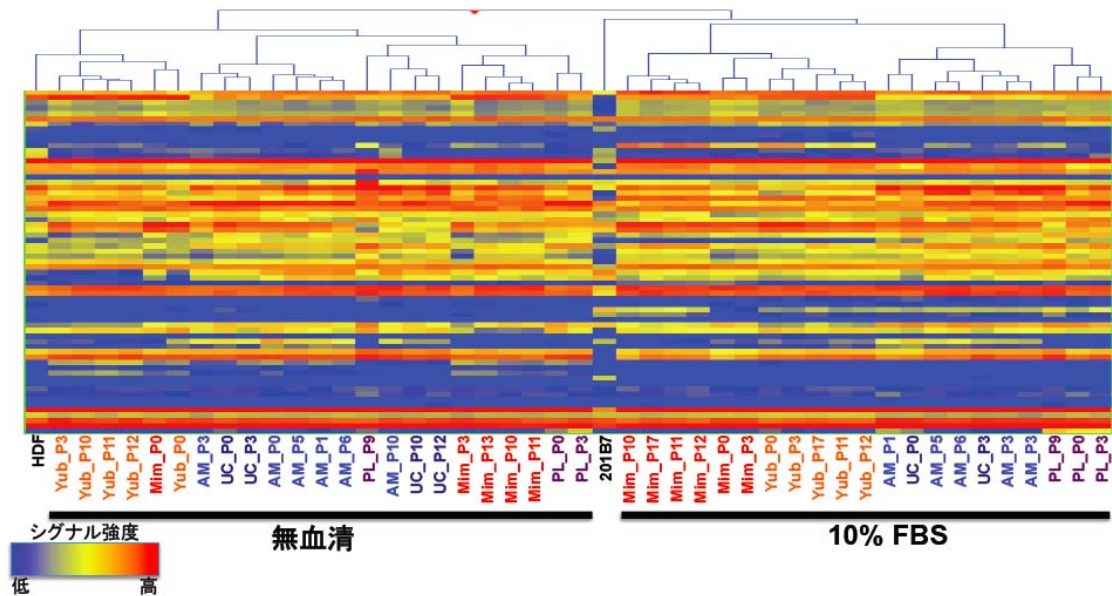


図 2.1.2-3 既知のマーカーを用いてのクラスタリング解析結果

5株の間葉系幹細胞(脂肪由来(耳)、(指)、同一個体由来で臍帯膠質由来、胎盤絨毛組織由来、羊膜組織由来)をそれぞれ、Mim, Yub, UC, PL, AM と略した。アンダーバー()の後ろにそれらの細胞の継代数を記した。比較対照群としてヒト iPS 細胞株(201B7 株)及び繊維芽細胞株(HDF)を用いた。

既知の間葉系幹細胞／造血幹細胞マーカーでクラスタライズしたところ、無血清培地で培養した群と 10% FBS で培養した群に大きく分類された。これより、培養方法をカスタマイズすることで、元の株の性質にある程度影響されない、品質管理が可能であることが明らかとなった。また、10% FBS で培養した細胞群においては、脂肪組織由来(Mim, Yub)と、胎児付属物由来(UC, PL, AM)とで大きくクラスターが分かれており、由来組織の違いであれば、ある程度は既知のマーカーで分類できる事が明らかとなった。しかしながら、継代数を反映度ラスタライズはされておらず、継代数(増殖能/分化能)を反映するマーカーの探索が、品質管理にとって重要であることも明らかとなった。

2.1.3 遺伝子発現解析からみた増殖能／分化能の維持を担保する品質管理マーカーの抽出

前章の結果を受け、増殖能／分化能の維持を担保する間葉系幹細胞品質管理マーカーを図 2.1.3-1 のスキームに従って探索した。

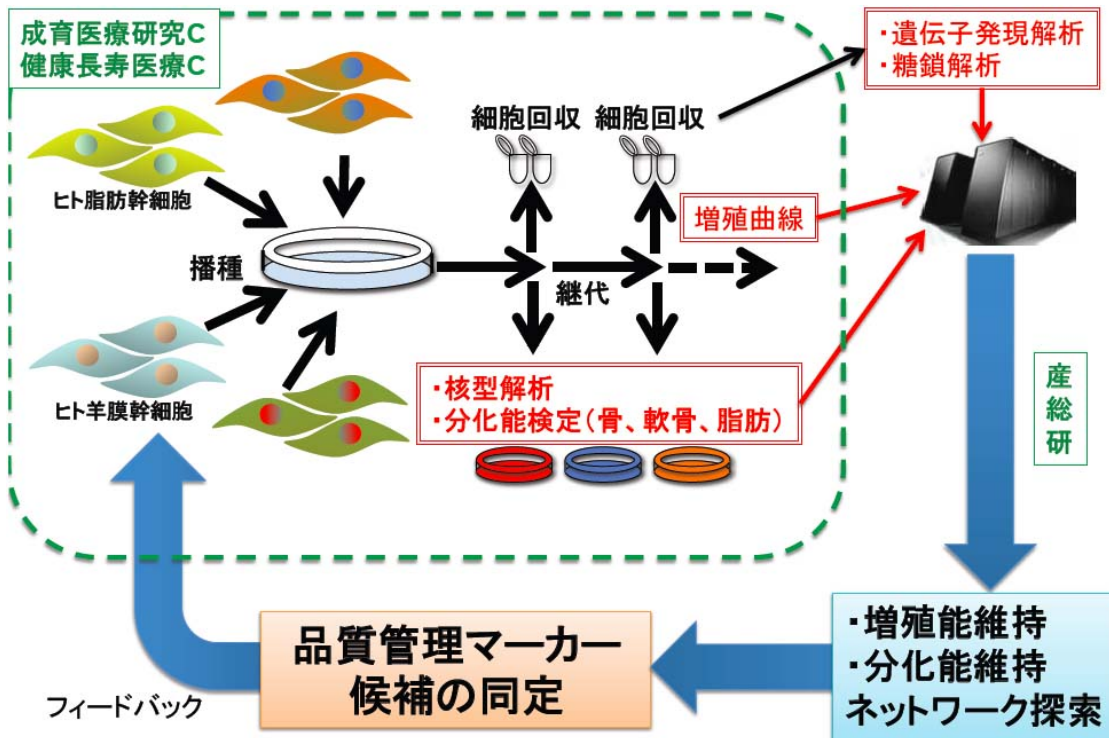


図 2.1.3-1 サンプル作成及びデータ解析のスキーム

間葉系幹細胞の増殖(継代)とともに、発現が低下とするもの及び逆に発現が増殖するもの(図 2.1.3-2)及び低下するもの(図 2.1.3-3)を抽出することができた。間葉系幹細胞のみならず、ヒト iPS 細胞と線維芽細胞も基盤データとしてマーカー候補の同定を行った。そのため、間葉系のみならず iPS 細胞応用へも適応可能な基準を設定し解析を行った。

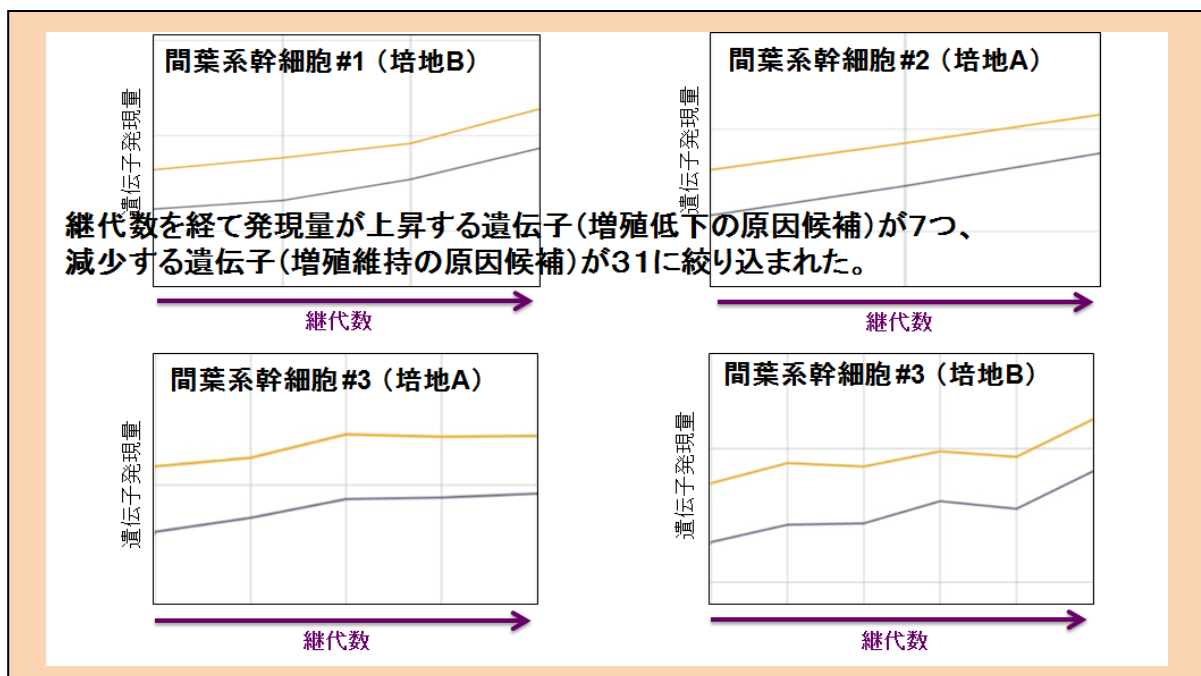


図 2.1.3-2 品質管理マーカーの選択

品質管理マーカー候補の一つ”gene X”(仮称)は、本開発研究で行われた細胞増殖能・生存率解析で細胞培養(継代)を行うと発現が低下する。gene XはヒトES細胞やiPS細胞でも発現量が大きく一方、分化能力がない線維芽細胞では低い値を示している(図 2.1.3-3)。この品質管理マーカーを検証するために、新たに間葉系幹細胞(臍帯膠質由来)を2つの培養条件下(培地 A:市販間葉系幹細胞培地、培地 B:市販ゼノフリー培地)に樹立し、継代初期(Early passage)と細胞増殖能が低い継代後期(Late passage)の細胞試料を用いて gene X の発現量をフローサイトメーターで解析した。geneX は培地 A と B 双方の条件下でも継代初期では高発現し、増殖能と分化能が劣る継代後期では非常に低い発現量であった(図 2.1.3-4)。

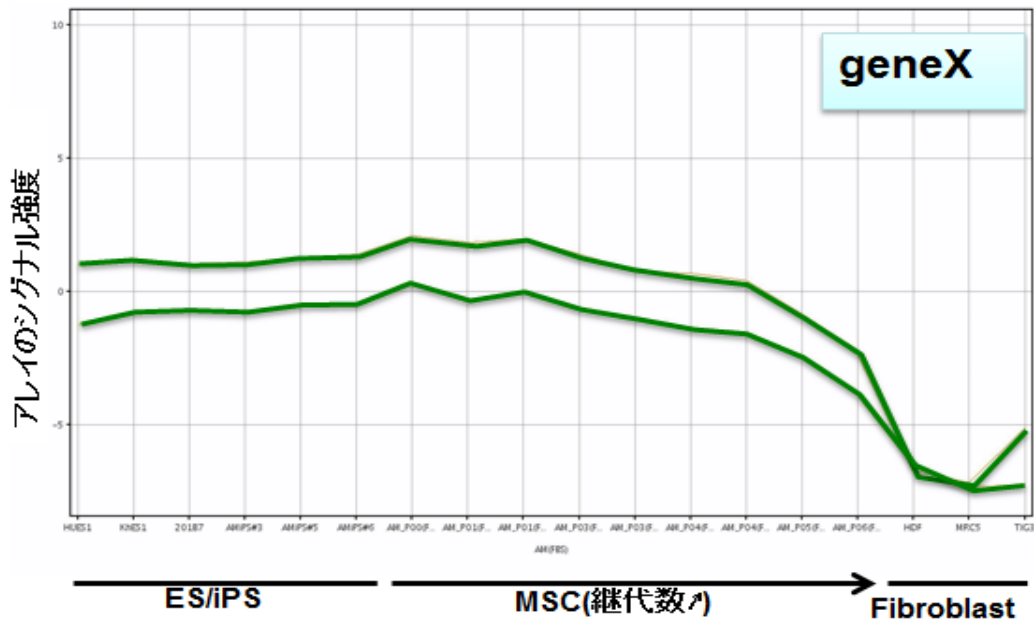


図 2.1.3-3 品質管理マーカー候補の発現動態

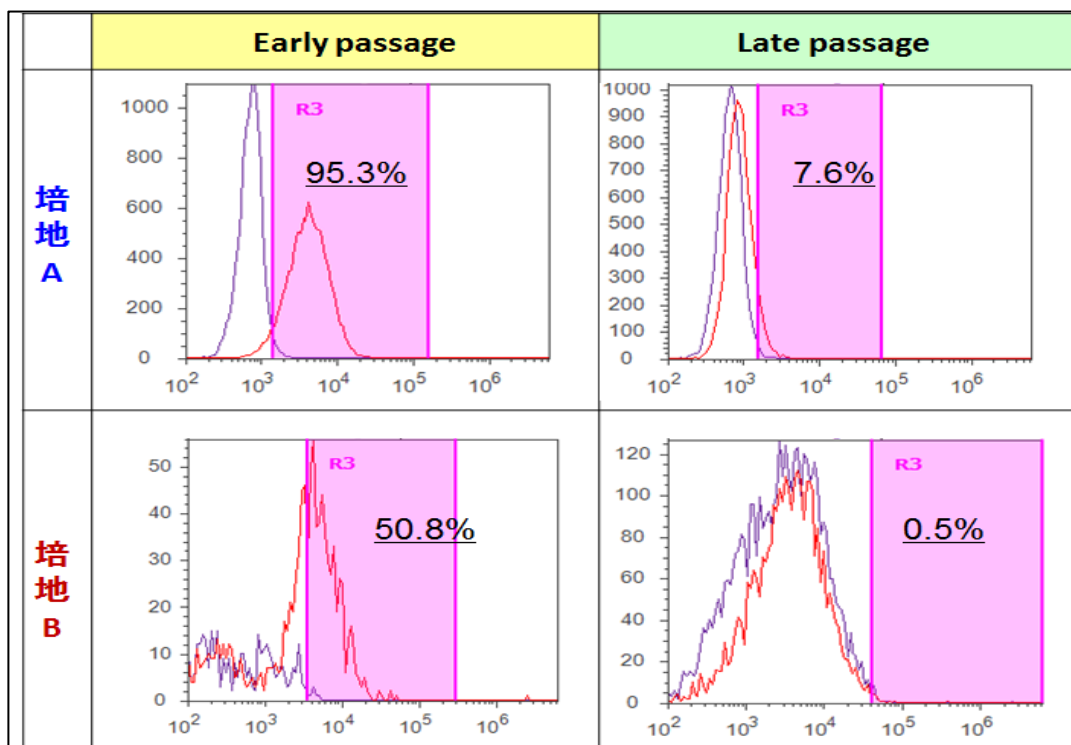


図 2.1.3-4 幹細胞継代とマーカーXの発現量

現在は、gene Xを始め、幾つか同定された品質管理マーカー候補に関して、別の細胞株、培養系を用いた実効性の検証を開始している。

2.1.4 糖鎖解析からみた増殖能の維持と相関性のある因子の抽出

高密度レクチンアレイを用いてヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSC) の糖鎖解析を実施した。各継代数のヒト脂肪由来間葉系幹細胞から膜画分を調製し、蛍光ラベル化後、高密度レクチンアレイに供した。比較として、ヒト iPS細胞 (hiPSC)、ヒトES細胞 (hESC)、ヒト繊維芽細胞 (hFib) の解析も行った。得られたデータを多変量解析の1種であるクラスター解析で解析した(図 2.1.4-1)。

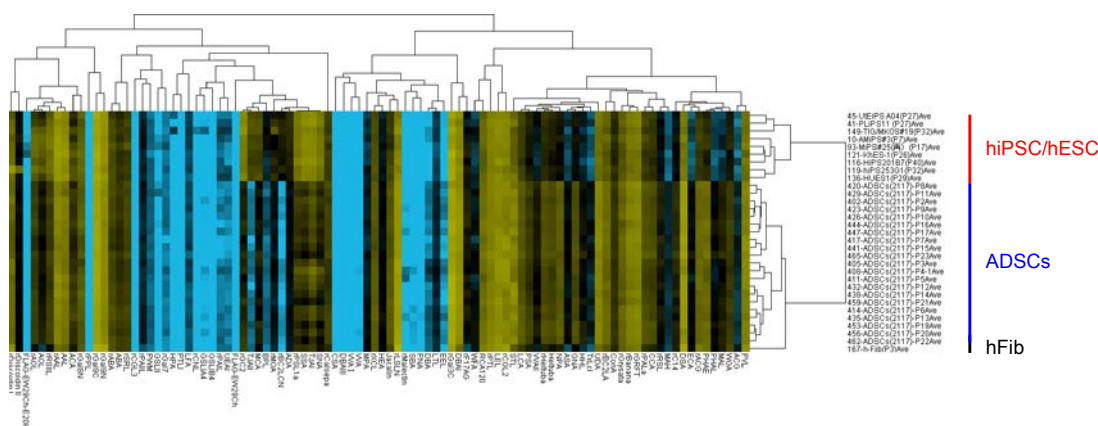


図 2.1.4-1 クラスター解析

高密度レクチンアレイ解析の結果、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞、ヒト iPS・ES 細胞、ヒト繊維芽細胞の大きく3つのクラスターに分類された。このことは、脂肪由来間葉系幹細胞の糖鎖構造は、ヒト iPS・ES 細胞、ヒト繊維芽細胞とは異なることを示している。一方、ヒト繊維芽細胞の遺伝子発現プロファイルは、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞と区別できないことがわかっている。これらの結果から、糖鎖は細胞の性質を判別するためのマーカーとして大変有効であり、その分解能は遺伝子よりも優れている可能性があることを意味している。

次に、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞を判別するためのマーカーの探索を行った。ヒト脂肪由来間葉系幹細胞に反応性を示すものの、ヒト iPS・ES 細胞やヒト繊維芽細胞には反応性を示さないレクチンを統計的に抽出した。ヒト脂肪由来間葉系幹細胞と、ヒト iPS・ES 細胞/ヒト繊維芽細胞の2群に分け、これら2群で大きく反応性の異なるレクチンをt検定で抽出した。その結果、96種類のレクチン中、70種類のレクチンが顕著に異なるレクチンとして抽出された ($p < 0.01$)。上位10種類のレクチンのうち、6種は同じ糖鎖結合特異性を示すことが分かった。これら6種のレクチンを lectin Y1～Y6 とよぶ。これらのレクチン6種の結合量についてグラフ化したものを図 2.1.4-2 に示す。lectin Y1～Y6 は、ヒト iPS・ES 細胞とヒト繊維芽細胞に比べて、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞に対して確かに高い反応性を示すことが分かり、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞マーカーの候補であることが分かった。

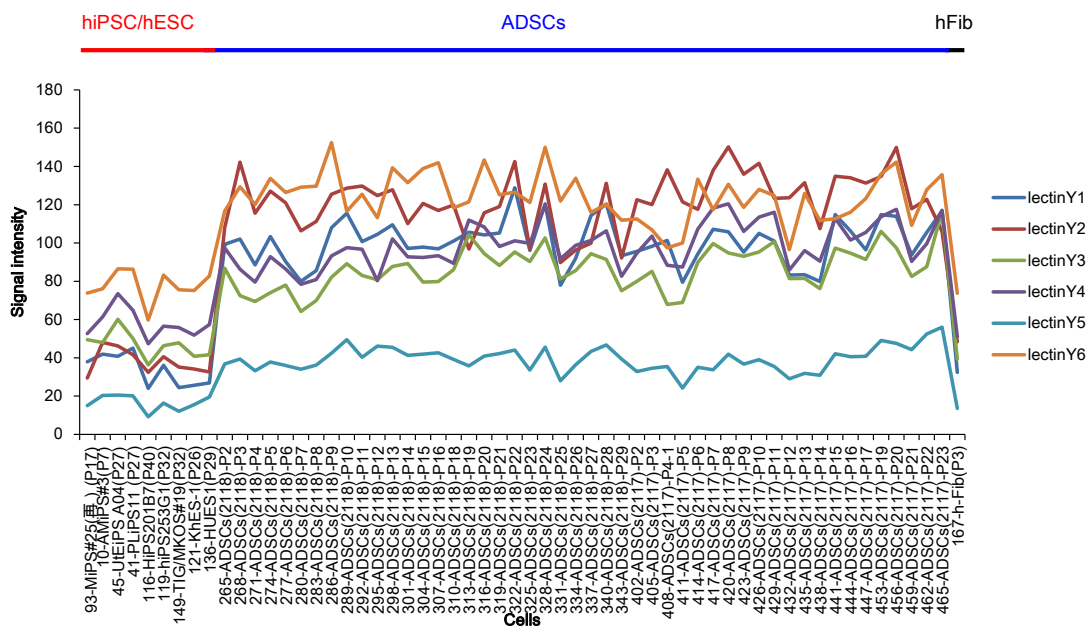
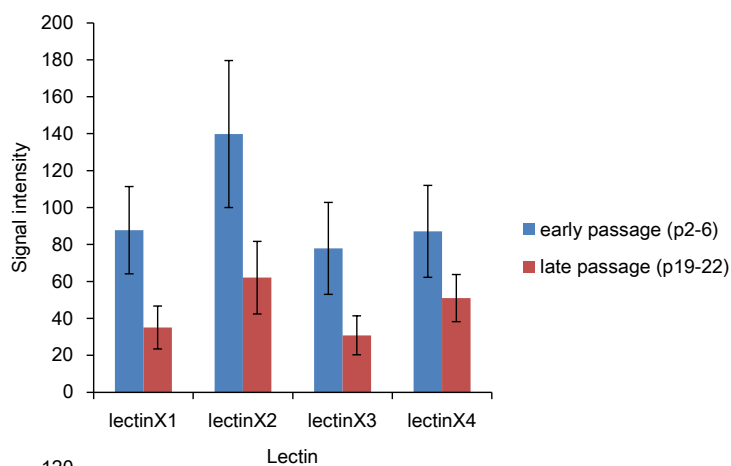


図 2.1.4-2 ヒト脂肪由来間葉系幹細胞に特異的に反応性を示すレクチン

さらに2種類の異なるロット(#2117、#2118)の脂肪由来間葉系幹細胞を長期培養し、増殖能が維持されている少ない継代数の細胞 (early passage) と、細胞分裂がほぼ停止した多い継代数の細胞 (late passage) で、大きく異なるレクチンを抽出した。その結果、96種類のレクチン中、#2117では12種類、#2118では8種類のレクチンが $p < 0.001$ で抽出された。これら2種類のロットで共通するレクチンを調べたところ、4種類のレクチン (lectin X1～X4 とよぶ) が抽出できた。lectin X1～X4 の糖結合特異性を調べてみると、いずれも類似の特異性を有することが分かった。すなわち、lectin X1～X4 の糖鎖リガンドの発現量が、細胞の増殖能と相関する可能性が示唆された。図 2.1.4-3 にグラフ化した結果を示す lectin X1～X4 は、いずれも細胞分裂がほぼ停止した多い継

代数の細胞 (late passage) と比べて、増殖能が維持されている少ない継代数の細胞 (early passage) に対して顕著に高い反応性を示すことが分かる。

ADSC (Lot#: 2117)



ADSC (Lot#: 2118)

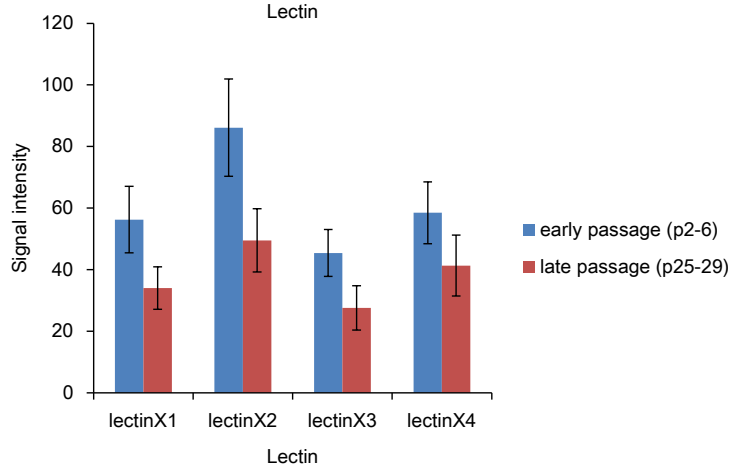
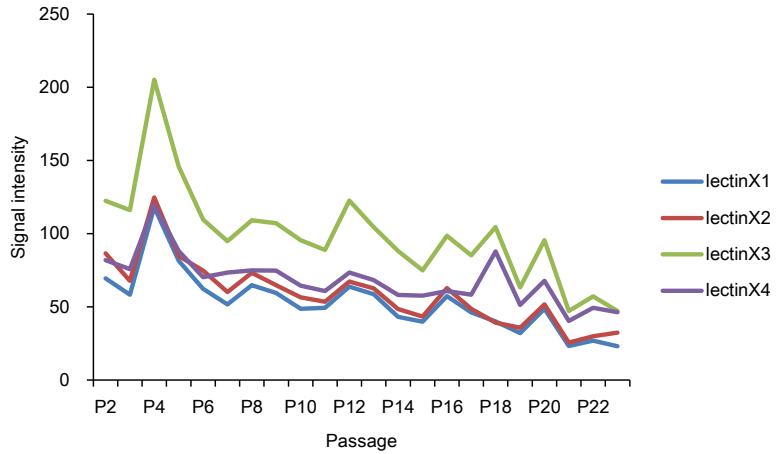


図 2.1.4-3 増殖能が維持されている少ない継代数の細胞 (early passage) と、細胞分裂がほぼ停止した多い継代数の細胞 (late passage) で、大きく異なるレクチン (lectin X1~X4) の抽出

ヒト脂肪由来間葉系幹細胞の継代数と lectin X1~X4 の反応性の相関性について調べた結果を図 2.1.4-4 に示す。いずれのロットの細胞においても、継代を重ねる毎に、lectin X1~X4 の反応性が徐々に低下することが分かった。

ADSC (Lot#: 2117)



ADSC (Lot#: 2118)

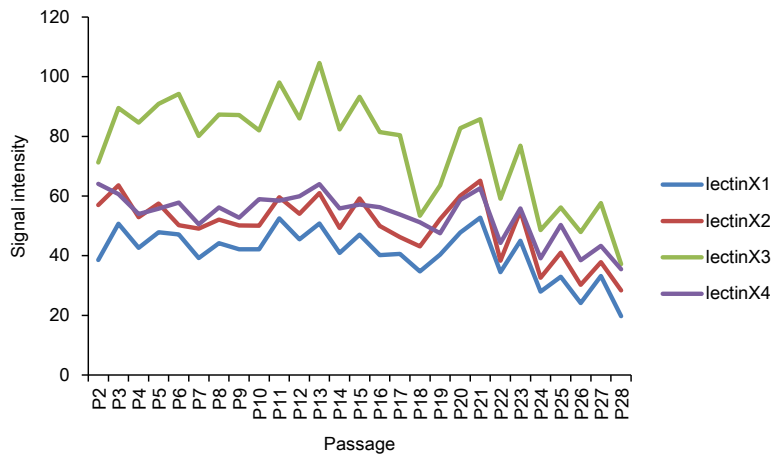


図 2.1.4-4 ヒト脂肪由来間葉系幹細胞の継代数と lectin X1～X4 の反応性の相関性

更に、本結果の検証を、フリーサイトメーターを用いて行った。その結果、lectin X1～X4 は継代数が多い細胞 (late passage) に比べて、増殖能が維持されている少ない継代数の細胞 (early passage) に対して顕著に高い反応性を示すことが分かった (図 2.1.4-5)。以上の結果から、lectin X1～X4 は、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞の増殖能/分化能を評価するためのマーカーとして有効である可能性があることが分かった。

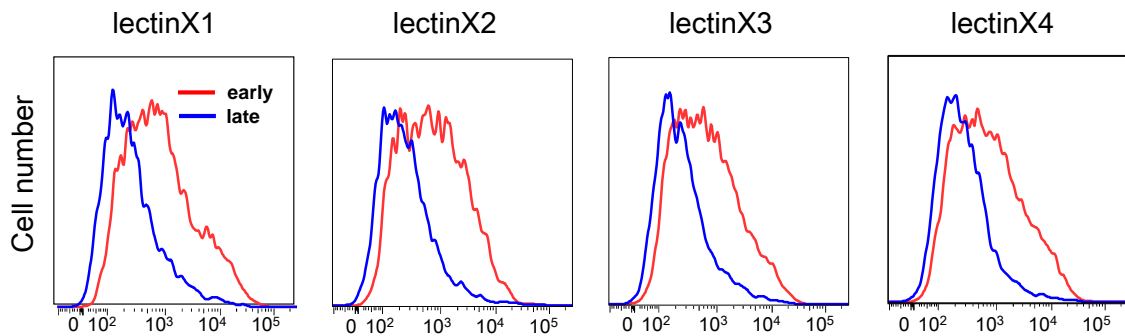


図-2.1.4-5 ヒト脂肪由来間葉系幹細胞へのレクチン lectin X1～X4 の反応性の検証

現在は、上述のレクチン由来品質管理マーカー候補に関して、別の細胞株、培養系を用いた実効性の検証を開始している。

2.2 間葉系幹細胞品質カタログデータの構築

本開発項目では、間葉系幹細胞培地の開発を目標として研究開発を開始したが、培地の世界的市場調査を行ったところ既に 60 近い培地が開発されており、それらの中には無血清の再生医療用のものまで含まれていることが分かった。このような激しい競争の中で新たな培地開発を行うためには、試薬メーカーあるいは培地をこれまで開発してきた経験のある会社の参入が不可欠である。しかしながら、本プロジェクトには試薬メーカーは参画しておらず、現状の戦力で開発を行うことは難しい状況にある。そこで、培地を直接開発することから新しい高機能付加型培地開発に必要な情報を独自の手法を用いて収集することにシフトした。これらの成果を今後試薬メーカー等と協議しながら新しい培地開発に繋げていくこととする。

2.2.1 間葉系幹細胞培地の市場調査に関して

再生医療の世界的な現況、特に間葉系幹細胞を中心として動きを専門調査会社に依頼し市場動向調査を行った(別添「間葉系幹細胞を対象とした再生・細胞医療の動向調査」報告書:株式会社シード・プランニング)。間葉系幹細胞を用いた臨床試験、および製品化に向けた取り組みの状況に関する情報を、①間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療の対象疾患別におけるビジネスの状況、②間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療に使用可能な他家細胞株、③間葉系幹細胞向け臨床用培地の状況の3項目についてまとめた。間葉系幹細胞は、再生医療製品・開発品の中でも最も多く開発されている細胞ソースであるが(表2.2.1-1)、その対象臓器は多種類にわたり(図2.2.1-1)、さらに、再生・細胞医療製品・開発品となる幹細胞の由来組織は多種類である(表2.2.1-2)。間葉系幹細胞を用いた細胞医療製品の開発フェーズでは、臨床試験のフェーズⅡ/Ⅲの割合が高く、今後間葉系幹細胞の上市増加することが予想される。その各国の情勢としては、米国、欧州、韓国が活発である。培地の販売では、国内外ですでに46種類もの培地が販売されている。ただし、臨床用という枠で販売されているものはなく、米国FDAでドラッグマスターファイル登録されているのは2種のみである。

細胞ソース	iPS 細胞	ES 細胞	間葉系幹細胞 ^{※1}	組織幹細胞・体細胞 ^{※2}	免疫細胞	計
自己	0		31	60	22	113
同種	0	4	40	40	8	92
計	0	4	71	100	30	205

(2012年10月時点集計、出典:シード・プランニング)

表 2.2.1-1 再生・細胞医療製品・開発品の細胞ソース

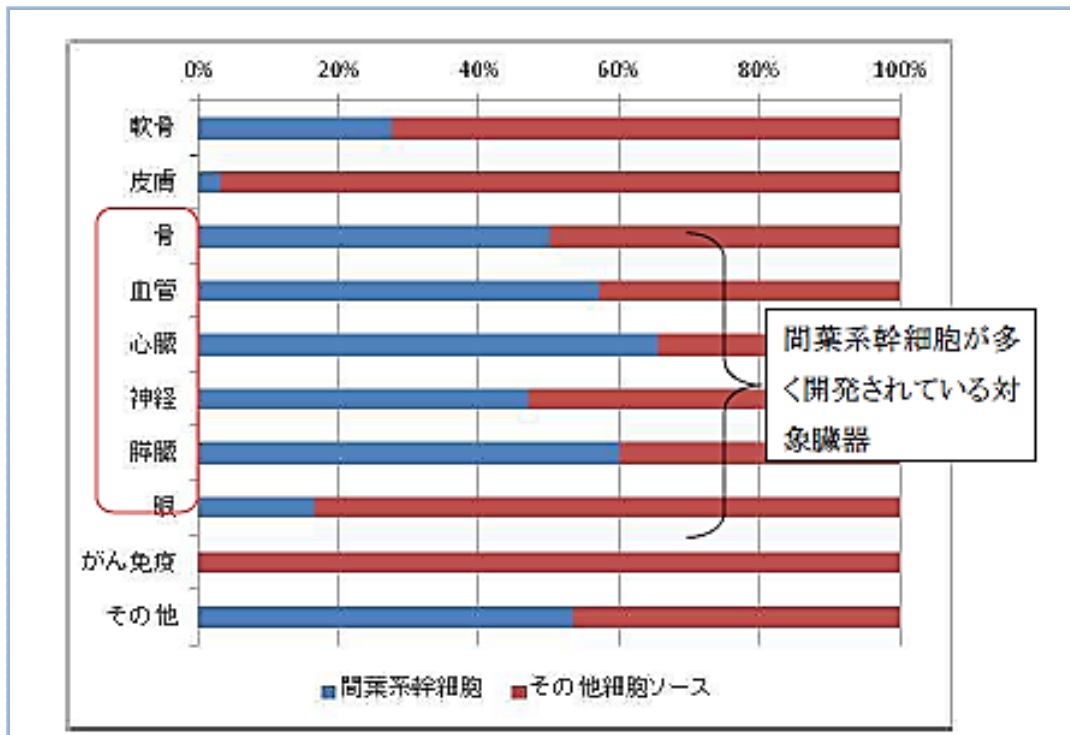


図 2.2.1-1 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品の対象臓器

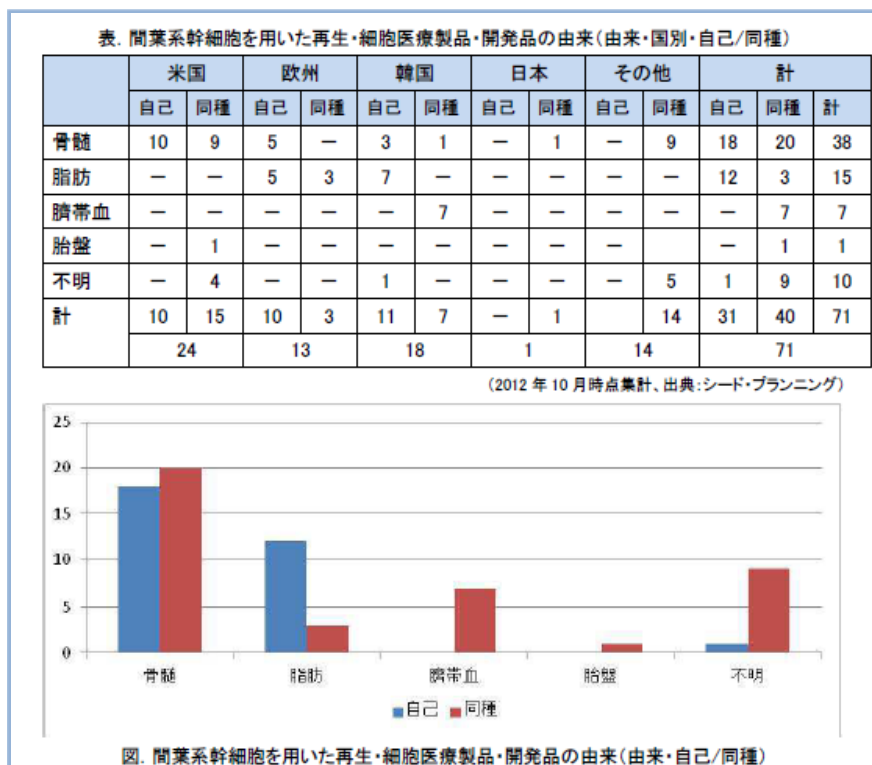


表 2.2.1-2 間葉系幹細胞の由来組織

上記の調査結果①、②からも分かるように、間葉系幹細胞を再生医療用のソースとして重要視している(実施例が増えつつある)世界の意識が再確認できた。一方、間葉系幹細胞を用いた再生

医療基盤技術開発においては、米国/欧州のみならずアジア圏でも韓国に遅れを取っている現状が浮き彫りとなり、このままでは日本の再生医療技術が「ガラパゴス化」する恐れも強く感じられた。また、調査結果③から、これまでの「取りあえず安定に増やす」という方針で開発された培地は国内外を含めて飽和状態にあることも明らかとなった。しかしながら、バラツキが最大の問題となっている由来となる組織別、個体(加齢等)別など様々な間葉系幹細胞の増殖能/分化能を最大限引き出すことが出来る、「医療応用実効性最大化培地」と言う観点からの培地開発は、まだ世界中何処でも行われていないことも明らかとなり、それこそがブレイクスルーを生み出す方策であると結論づけられた。よって先ず始めに、様々な間葉系幹細胞の増殖能/分化能データと品質管理マーカー情報とを体系化した「品質カタログデータ」を構築し、品質・特性判定キットの基盤とすることを第1目標とした。今後、この評価系を活用して、試薬メーカー等と協議しながら培地開発に繋げていくこととする。

2.2.2 間葉系幹細胞品質カタログデータの構築

間葉系幹細胞による再生医療は安全性が高いという利点はあるものの、幹細胞を得る組織が多種類あり非均一な細胞集団で移植のために細胞を増やさなくてはならない。これまで細胞を同定するためのマーカー開発研究は長年行われてきた。しかし、造血幹細胞のような治療効果と密接に関連する有用なマーカーは間葉系には存在しない。多種類の間葉系幹細胞に多種類の培地が存在し、有効性を判断するのは極めて困難である。故に、本開発研究では、多種類の間葉系幹細胞に対して品質と有効性情報(増殖能/分化能)を収集する。また、それらと強く関連するバイオマーカー(品質管理マーカー)を見出していく(2.1参照)。さらに培養条件による違い、年齢による違い、個体による違いに関する情報も整理する。それら間葉系細胞の特性をバイオマーカーとともに「品質カタログデータ化」する。そのカタログを用いれば、医療機関、研究機関において効率的な間葉系幹細胞の使用が実現され、間葉系幹細胞による再生医療領域の応用・開発が促進されると考えられる。

これまで間葉系幹細胞の増殖能/分化能、細胞の安定性に関する評価を行い、細胞品質管理項目データを抽出してきた。また、培養条件を血清/無血清培地により、間葉系幹細胞の増殖性・生存性、細胞の安定性に関する評価を行い、幹細胞の培養期間を規定するデータを抽出してきた。さらに間葉系幹細胞の増殖性と細胞の分化能低下の状態を評価する品質管理マーカー候補を見出してきた。それらデータを統合し、間葉系幹細胞品質カタログデータ(β版)を構築した(図2.2.2-1)。既知のマーカーだと同一細胞ラインであっても培地が異なるとマーカー判定が全く逆の結果になるなど、間葉系幹細胞の品質管理という観点からはその有用性は極めて低かった。例えば、図2.2.2-1に示すように、既存マーカーAと既存マーカーBは各細胞ラインにおいて血清培地と無血清培地とで全く逆の結果になってしまい、やはり品質管理のためにはさらなる体系化が必要であると示唆された。

本開発項目では、幹細胞の増殖能と分化能に相応する15個の新規品質管理マーカーに関して、品質カタログに格納した。それらは、培養条件や異なる組織由来に影響しない幹細胞の有効性に連関したマーカーであり有用性が極めて高いことが示唆される。そこで、これら15個のマーカーを用いた間葉系幹細胞の品質評価について知財戦略策定に生かすことを目的に先行特許調査を行った(外注先: 壬生弁理士事務所)。指定15遺伝子「バイオマーカー」に対する(1)物質特許、及び(2)幹細胞関連技術の出願動向調査を行った結果、5個で物質特許がとられていないものであった。今回、検証をおこなったマーカーである”gene X”は物質特許がとられていないこと

が判明した。現在、“gene X”の特許出願を鋭意準備している。

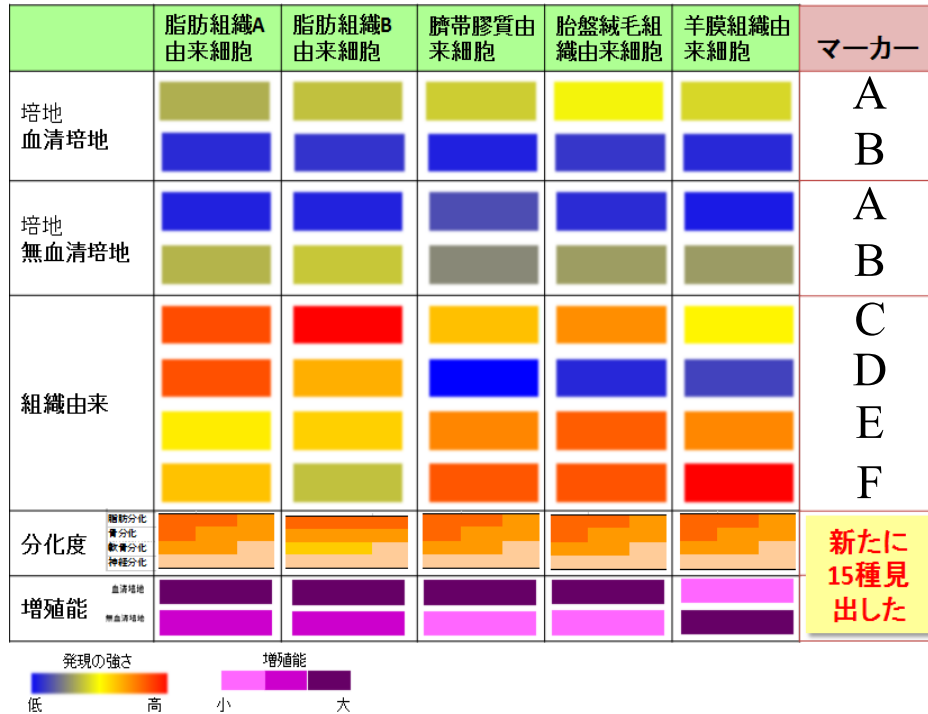


図 2.2.2-1 間葉系幹細胞の品質カタログデータ(β版)

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

特許、論文、外部発表等の件数(内訳)

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表 (g(学会発表・ブ レス発表等))
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
H23FY	2件	0件	0件	3件	0件	5件
H24FY	2件	0件	2件	3件	0件	10件

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)

2.3 実用化の見通しについて

下図のスキームに従い、これまでの成果に「PJ 内連携」「間葉系幹細胞株追加」による成果をプラスすることで、実証サイクルを強化する。その上で、下述の2項目に関して、実用化を加速する。

1) 間葉系幹細胞品質管理マーカーの確立

幹細胞増殖能と分化能に相応したマーカーが構築できると細胞を定量的評価でき、さらに細胞培養製品（培地等）の開発が促進できると考えられ、実用化が期待される。実用化出口に根ざしたバイオマーカーであるため、実用化までには、すでに応用化している様々なリソースで検証が行える。さらに、iPS 細胞の特性も考慮したマーカーであるため（未分化で高く線維芽細胞では極めて低い）、iPS 細胞を用いた開発研究や産業応用にも有用である。すでに行われている間葉系細胞の応用では定量的な評価が可能となり、産業応用が促進されることが期待される。臨床応用されている間葉系細胞との評価がマッチングされるマーカーで iPS 細胞の再生医療や創薬での広範な利用を促進できる。同定したマーカーの中には、物質特許がとられていないものもあり、各研究開発のなかで重要なバイオツールとなる可能性がある。

2) 間葉系幹細胞品質カタログデータの構築

各品質データを組み合わせたカタログを用いることで、細胞を評価し個別ケース、疾患毎に治療デザインができる次世代再生医療が期待される。これら貴重なデータが収集/体系化されることで、民間企業にとってもライセンス化への魅力を感じられる物となるであろう。その後、パートナーとなった企業と共に幹細胞品質・特性判定キットを開発することで、医療機関、研究機関における間葉系幹細胞研究の推進と、再生医療や製品開発促進へ大いに貢献できると考えられる。

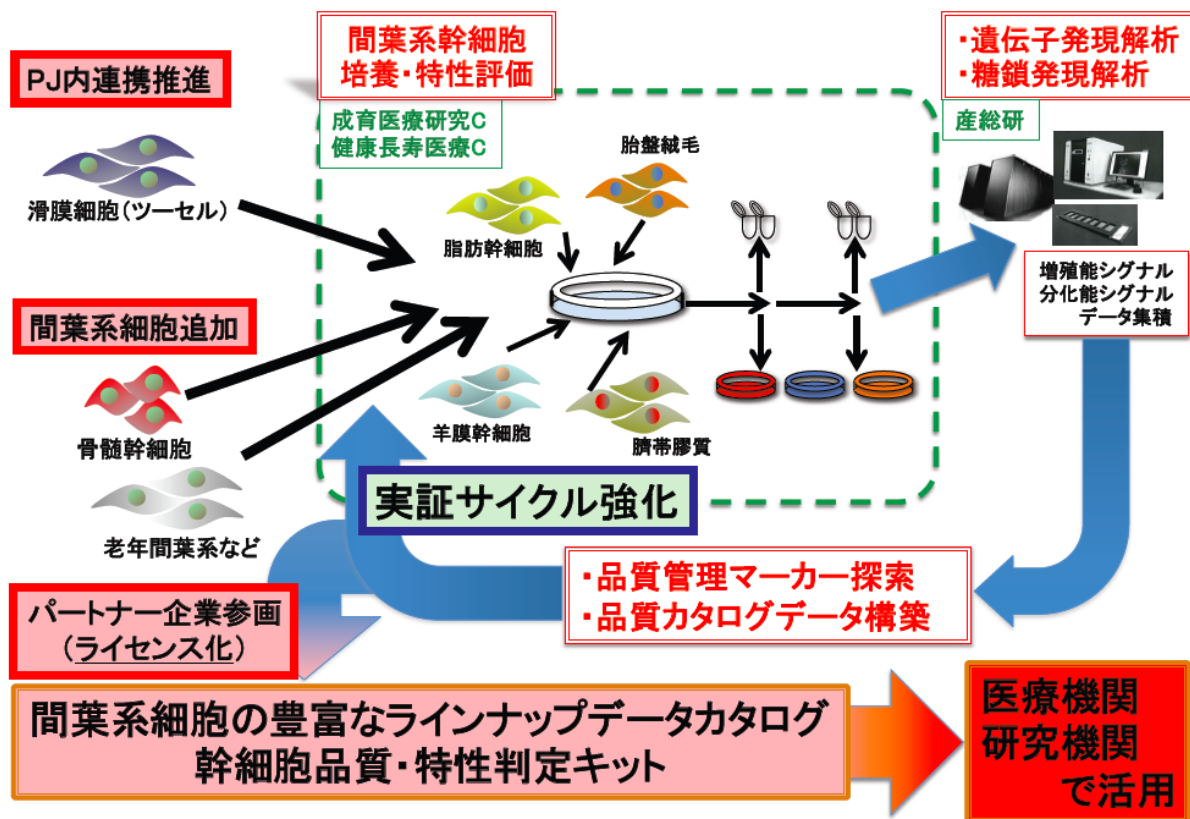


図 2.3-1 実用化に向けたスキーム

(添付資料)

・「間葉系幹細胞を対象とした再生・細胞医療の動向調査」報告書

間葉系幹細胞を対象とした 再生・細胞医療の動向調査

——— 報告書 ———

2012年12月18日

株式会社シード・プランニング
〒113-0034 東京都文京区湯島3丁目19番11号 湯島ファーストビル 4F
TEL:03-3835-9211 FAX:03-3831-0495

目次

I. 調査概要	3
1. 調査テーマ	3
2. 調査背景:	3
3. 調査目的:	3
4. 調査項目:	3
5. 調査方法	4
6. 調査期間	4
II. 調査結果	5
1. 再生・細胞医療製品における細胞ソースの動向	5
2. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品の開発フェーズ	6
①開発フェーズ(全体)	6
②開発フェーズ(国別・自己/同種)	8
3. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品で使用される、間葉系幹細胞の由来	9
4. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品の対象臓器	10
5. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品の対象疾患	12
①心疾患	12
②血管系疾患	14
③軟骨疾患	15
④神経系疾患	16
⑤膵臓(代謝系)疾患	16
⑥骨疾患	16
6. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品の開発企業一覧	18
①米国	18
②欧州	20
③韓国	21
④日本・その他	21
7. 再生・細胞医療に使用可能な同種間葉系幹細胞株	24
8. 間葉系幹細胞向け培地の、臨床における使用状況	25
①概要	25
②間葉系幹細胞に対する培地の主要製品一覧	26

I. 調査概要

1. 調査テーマ

「間葉系幹細胞を対象とした再生・細胞医療の動向調査」

2. 調査背景:

我が国発の革新的技術である、iPS 細胞の作成方法の発見以降、幹細胞研究に対する注目が集められており、国際的な熾烈な競争に我が国として対抗するため、「オールジャパン体制」での開発が加速している。そのような背景のもと、貴組合では、独立行政法人新エネルギー・産業技術開発機構(NEDO)より委託を受け、iPS・ES 細胞および間葉系幹細胞を対象とした幹細胞の産業利用を促進するための、安定した品質の幹細胞を大量培養・供給する細胞培養支援装置の開発を進めている。

間葉系幹細胞については、世界的にオサイリス社の骨髄間葉系幹細胞が提供・販売されているなど、すでに各国で臨床試験、および製品化に向けた取り組みがなされている状況にある。

3. 調査目的:

本調査では、間葉系幹細胞を用いた臨床試験、および製品化に向けた取り組みの状況に関する情報を提供し、貴組合の事業における適切な細胞株利用と培地開発にいかすことを目的とする。

4. 調査項目:

間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療に対する

- ・ 対象疾患別におけるビジネスの状況
- ・ 他家細胞バンクの情報

等

5. 調査方法

- ・臨床試験登録・公開レジストリからの情報収集

下記の臨床試験登録・公開レジストリから、間葉系幹細胞に関する内容を調査する。

- ClinicalTrials.gov (NIH 提供の臨床試験登録・公開レジストリ、米国内外の登録)

- WHO Primary Registry (治験・臨床研究を登録・公開する機関として、WHO が認めた機関に属する各国の臨床試験登録・公開レジストリ)

- ・その他公開情報の収集

- ・弊社蓄積情報の整理

6. 調査期間

2012年7月～12月

II. 調査結果

再生・細胞医療医療製品をを対象とし、ウェブサイトや各種公開情報から、商業的臨床試験を実施中、または上市品を保持する企業 74 社、205 製品の情報収集を収集し、分析を行った。

なお、臍帯血由来細胞、骨髄由来細胞のうち造血系の分化をおこなわないものについては「間葉系幹細胞」とカウントとした。また、「組織幹細胞・体細胞」は、「間葉系幹細胞」を除くその他のものとしてカウントした。さらに、207 製品のうち、自己/同種の混合 1 製品、異種の 1 製品については、本調査のカウントから除外した。

1. 再生・細胞医療製品における細胞ソースの動向

表. 再生・細胞医療製品・開発品の細胞ソース(自己/同種)

細胞ソース	iPS 細胞	ES 細胞	間葉系幹細胞※ ¹	組織幹細胞・体細胞※ ²	免疫細胞	計
自己	0		31	60	22	113
同種	0	4	40	40	8	92
計	0	4	71	100	30	205

(2012 年 10 月時点集計、出典:シード・プランニング)

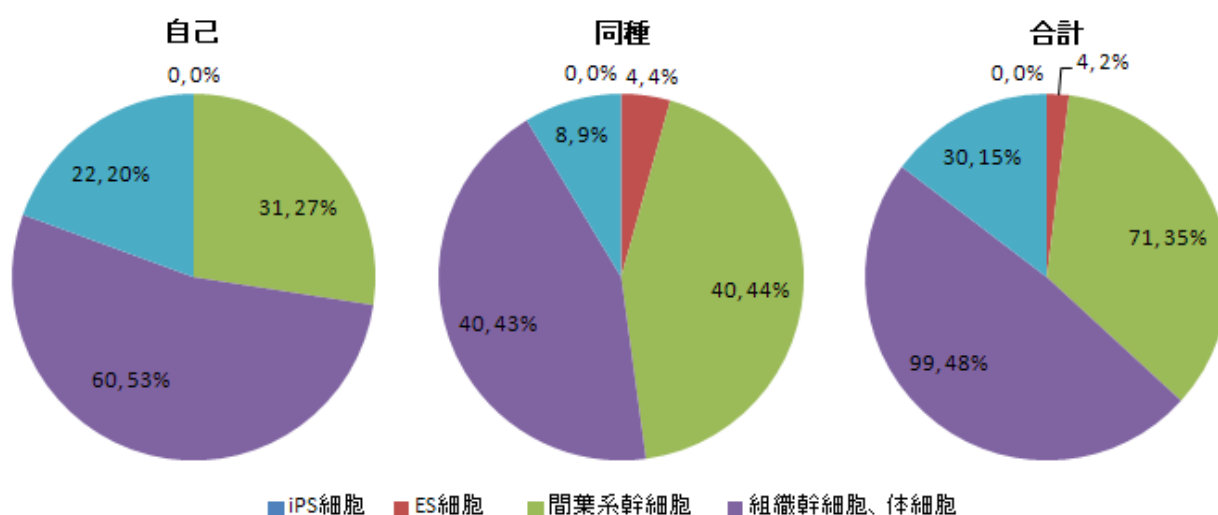


図. 再生・細胞医療製品・開発品の細胞ソース(自己/同種)

(2012 年 10 月時点集計、出典:シード・プランニング)

間葉系幹細胞については、全製品・開発品数(203 製品)のうち 36%を占める、72 品目(22 社)が確認できた。そのうち自己細胞をソースとするものは、32 品目で全体の 27%、同種細胞をソースとするものは、41 品目で全体の 46%であった。

組織幹細胞・体細胞には、様々な細胞ソースが含まれている。間葉系幹細胞は、再生医療製品・開発品の中でも最も多く開発されている細胞ソースであると言える。

2. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品の開発フェーズ

①開発フェーズ(全体)

表. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品の開発フェーズ

	全体	間葉系幹細胞 (%)	
上市/IV	47	6	(13%)
Ⅲ	29	10	(34%)
Ⅱ	68	38	(5%)
Ⅰ	61	17	(28%)
計	205	71	(35%)

(2012 年 10 月時点集計、出典:シード・プランニング)

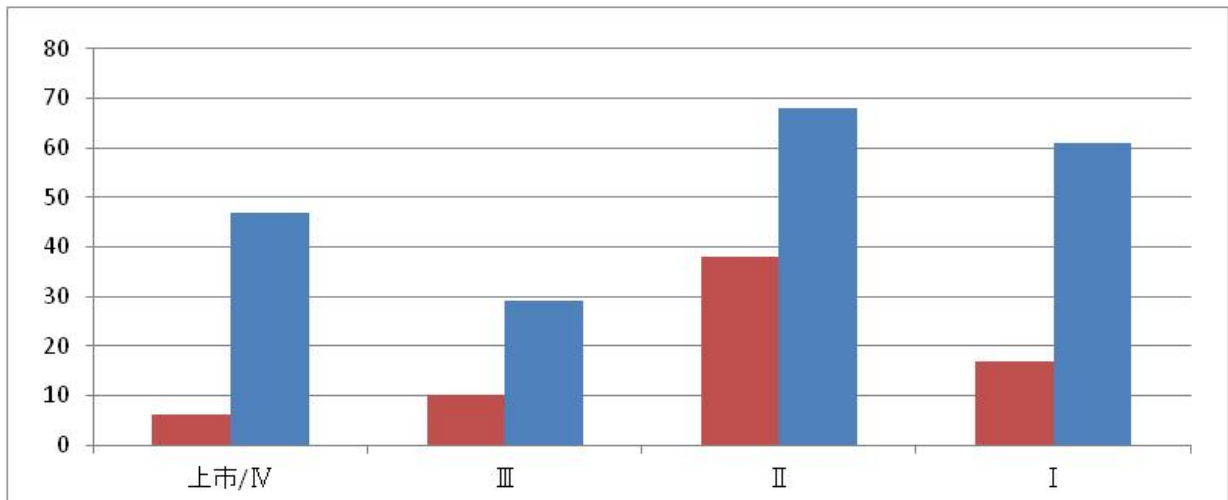


表. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品の開発フェーズ

(2012 年 10 月時点集計、出典:シード・プランニング)

上市品およびフェーズⅣについては、全体 47 品目のうち、間葉系幹細胞は 5 品目 (11%) を占めており、まだ品目数が少ない段階にある。一方、フェーズⅢでは、全体 29 品目のうち 12 品目 (41%)、フェーズⅡでは、全体 68 品目のうち 37 品目 (54%) を占めており、今後間葉系幹細胞の上市が相次ぐとともに、上市品およびフェーズⅣにおける間葉系幹細胞の割合が増加してくると考えられる。

間葉系幹細胞の開発品のうち、自己/同種による分類を行った。

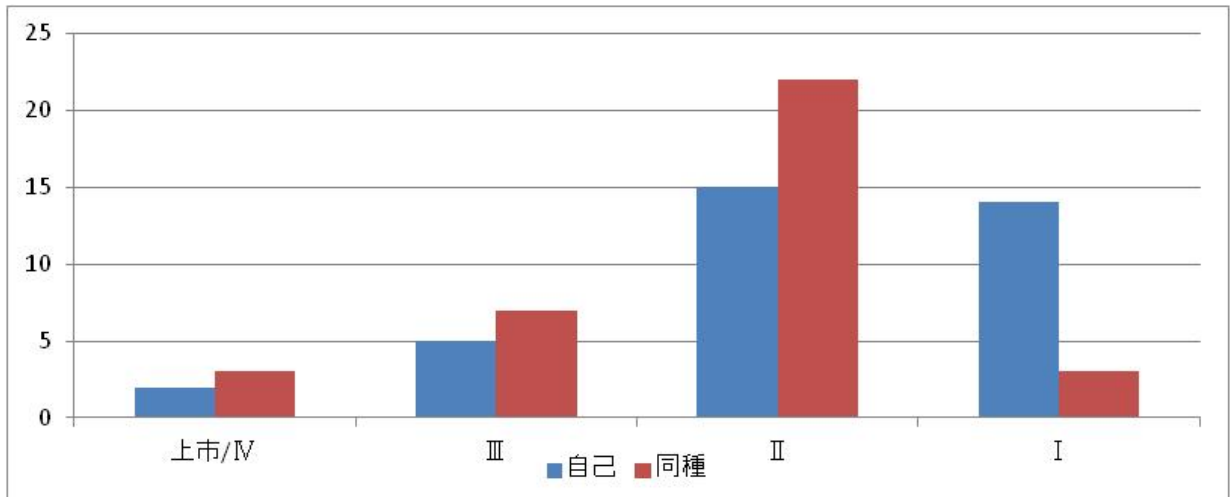


図. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品の開発フェーズ(自己/同種)
(2012年10月時点集計、出典:シード・プランニング)

上市品/フェーズⅣ、フェーズⅢ、フェーズⅡにおいて、同種細胞をソースとするものが、自己細胞をソースとするものより若干多い傾向にある。

②開発フェーズ(国別・自己/同種)

間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品を国別・自己/同種・開発フェーズ別に集計したものを下表・図に示す。

表. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品の開発フェーズ(国別・自己/同種)

	米国		欧州		韓国		日本		その他		計		
	自己	同種	自己	同種	自己	同種	自己	同種	自己	同種	自己	同種	計
上市/IV	—	1	2	—	1	1	—	—	—	1	3	3	6
Ⅲ	2	3	1	—	2	—	—	1	—	1	5	5	10
Ⅱ	4	9	5	2	6	1	—	—	—	11	15	23	38
I	4	1	2	1	2	6	—	—	—	1	8	9	17
計	10	14	10	3	11	8	—	1	—	14	31	40	71
	25		13		19		1		14		71		

(2012年10月時点集計、出典:シード・プランニング)

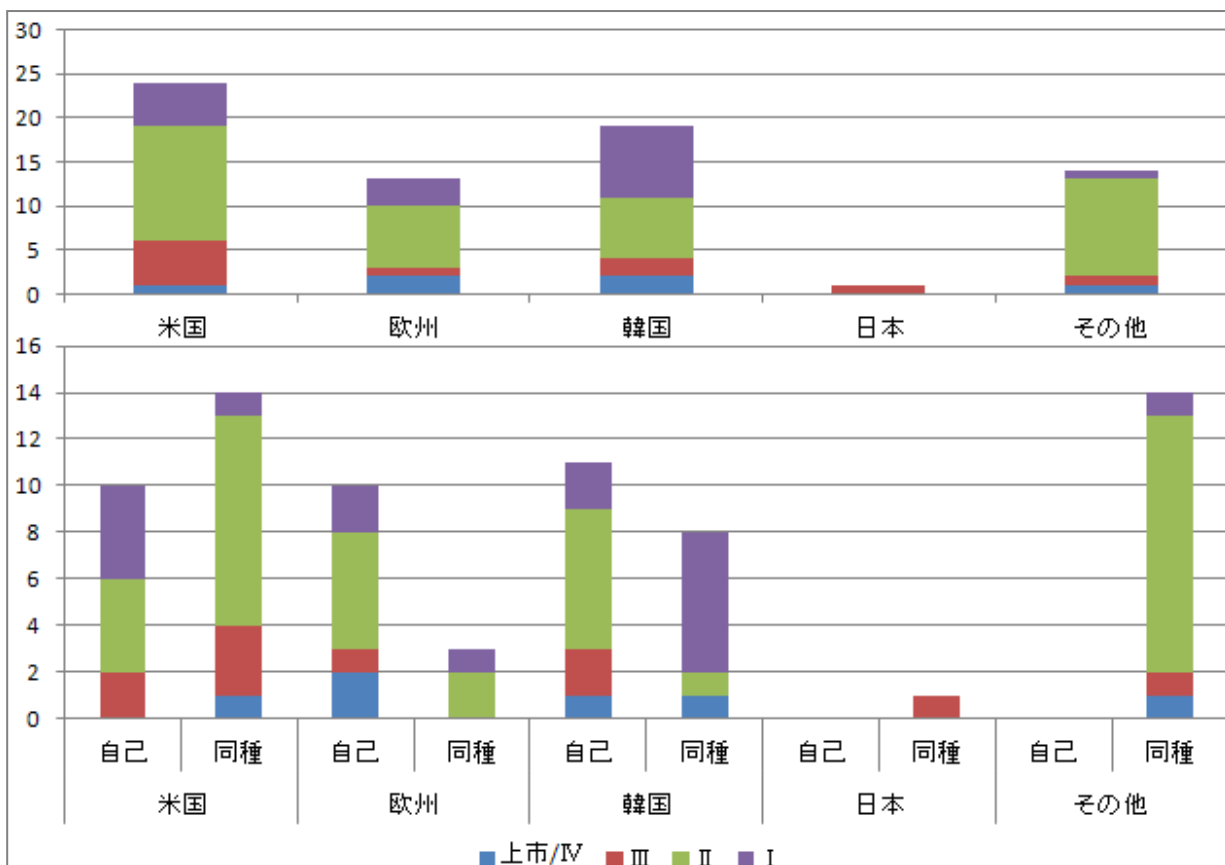


図. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品の開発フェーズ(国別・自己/同種)

(2012年10月時点集計、出典:シード・プランニング)

製品・開発品の上市およびフェーズⅣについては、米国(1品目)、欧州(2品目)、韓国(1品目)であり、これら地域はほぼ横並びの状態にある。製品・開発品の全体では、米国(25品目)、韓国(18品目)、欧州(13品目)の順が続いている。韓国における再生・細胞医療開発が非常に活発である様子が伺える。一方、日本はフェーズⅢ(Ⅱ/Ⅲ)にある1品目のみとなっている。

国別の自己/同種の分析からは、米国では同種細胞の割合が高い傾向にあるのに対し、欧州・韓国では自己細胞の割合が高い傾向にあることが分かる。その他の地域では、同種細胞を用いた製品・開発品のみしか確認ができなかった。

3. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品で使用される、間葉系幹細胞の由来

間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品について、由来細胞・国別・自己/同種別に集計したものを下表・図に示す。

表. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品の由来(由来・国別・自己/同種)

	米国		欧州		韓国		日本		その他		計		
	自己	同種	自己	同種	自己	同種	自己	同種	自己	同種	自己	同種	計
骨髄	10	9	5	—	3	1	—	1	—	9	18	20	38
脂肪	—	—	5	3	7	—	—	—	—	—	12	3	15
臍帯血	—	—	—	—	—	7	—	—	—	—	—	7	7
胎盤	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
不明	—	4	—	—	1	—	—	—	—	5	1	9	10
計	10	15	10	3	11	7	—	1	—	14	31	40	71
	24		13		18		1		14		71		

(2012年10月時点集計、出典:シード・プランニング)

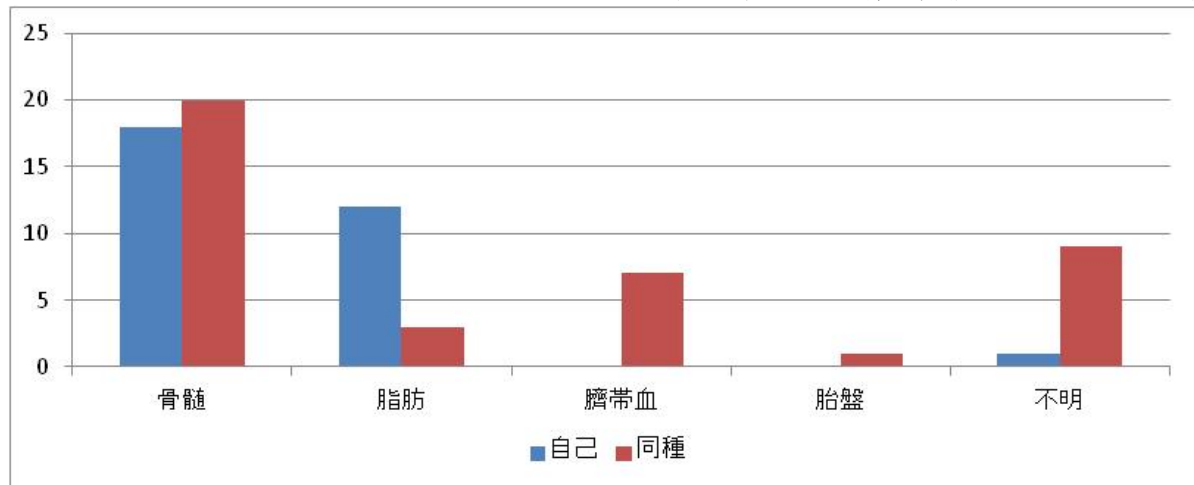


図. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品の由来(由来・自己/同種)

(2012年10月時点集計、出典:シード・プランニング)

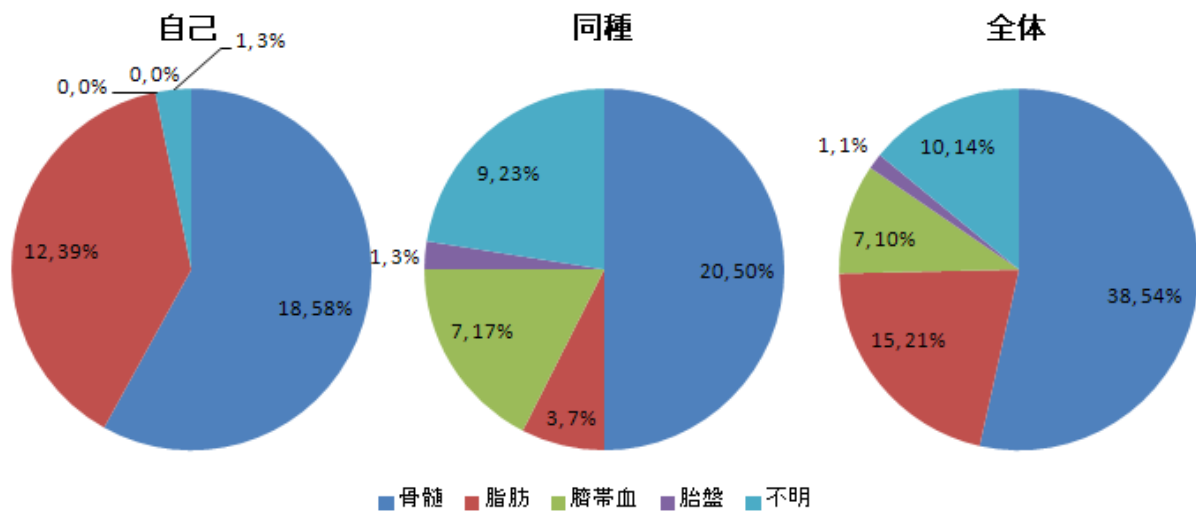


図. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品の由来(由来・自己/同種)
(2012年10月時点集計、出典:シード・プランニング)

全体としては、骨髄由来間葉系幹細胞が38品目(54%)を占めている。また、自己細胞をソースとする場合は、採取しやすい脂肪由来間葉系幹細胞も比較的多く使用されている。同種については、骨髄バンク、臍帯血バンクからの提供ではなく、健康者から直接開発企業が提供を受けているケースが多いと考えられる。

4. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品の対象臓器

間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品について、対象臓器別に集計したものを下表・図に示す。

表. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品の対象臓器

	軟骨	皮膚	骨	血管	心臓	神経	膝臓	眼	がん免疫	その他	計
再生・細胞医療全体	29	31	4	14	26	17	5	6	30	43	205
間葉系幹細胞	8	1	2	8	17	8	3	1	—	23	71
(%)	28%	3%	50%	57%	65%	47%	60%	17%	0%	53%	35%

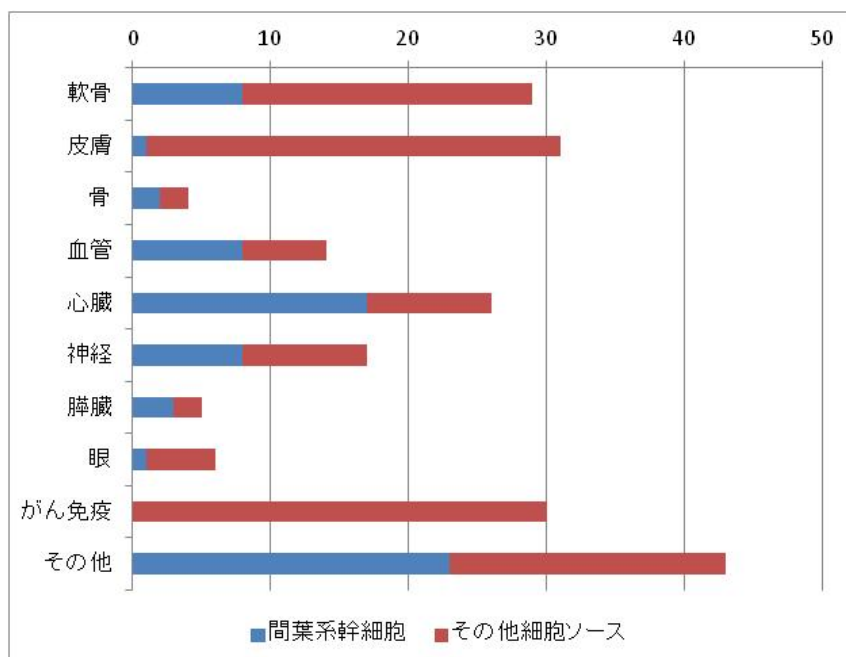


図. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品の対象臓器(品目数)

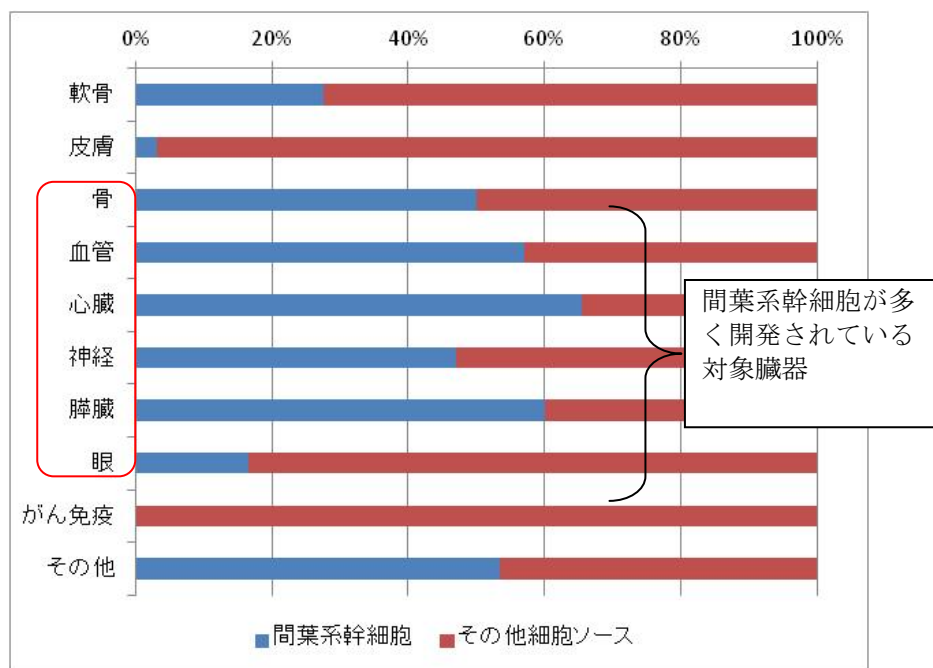


図. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品の対象臓器(割合)

間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品の品目数として最も多い対象臓器は、心臓(17品目)であり、軟骨、血管、神経(8品目)がその後に続いている。

再生・細胞医療製品・開発品の全体からみた間葉系幹細胞の特徴的な対象臓器は、心臓(65%)、脾臓(60%)、血管(57%)、骨(50%)であり、これらは全体のうち半数以上を占めている。

5. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品の対象疾患

①心疾患

心疾患領域において最も開発フェーズが進んでいるものは韓国 Pharmicell 社の「Hearticellgram-AMI」であり、現在 NDA (New Drug Application) 承認申請の段階にある。対象疾患としては、ほとんどが急性心筋梗塞である。また、17 品目のうち 12 品目が自己細胞をソースとしている。

表. 心疾患を対象とする間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品

企業名	実施国	対象疾患	細胞ソース		開発フェーズ	備考
Pharmicell	韓国	急性心筋梗塞	自己	自己骨髄間葉系幹細胞	NDA 承認	「Hearticellgram-AMI」
Cytori Therapeutics	欧州	急性心筋梗塞	自己	脂肪組織由来幹細胞(ADRCs)	II/III	「ADVANCE 試験」
Cardio3 BioSciences	ベルギー	心筋虚血による慢性心不全	自己	骨髄由来 心臓形成性細胞	II 完了	C-Cure®幹細胞療法。
Mesoblast	オーストラリア	急性心筋梗塞	同種	成人間葉系幹細胞	II	
Mesoblast	オーストラリア	うつ血性心不全	同種	成人間葉系幹細胞	II	「Revascor™」クラス 2~4 の患者へ II 実施。また、2009 年 8 月、補助人工心臓を用いている(クラス 4)患者にも II 開始。
Neostem	米国	急性心筋梗塞後の心機能保存	自己	自己 骨髄由来 CD34+幹細胞	II	AMR-001
Osiris Therapeutics	米国	急性心筋梗塞	同種	骨髄由来 成体間葉系幹細胞	II	Prochymal
t2cure	ドイツ	急性心筋梗塞	自己	自己 骨髄由来 前駆細胞	II	t2c001-AMI
TCA Cellular Therapy	米国	重症冠動脈虚血	自己	自己 骨髄由来 幹細胞の混合物	II	
t2cure	ドイツ	特発性拡張型心筋症	自己	自己 骨髄由来 前駆細胞	I/II	t2c001-DCM
t2cure	ドイツ	慢性虚血性心疾患	自己	自己 骨髄由来 前駆細胞	I/II	t2c001-SW または t2c001-CHD、t2c007-eCHD

企業名	実施国	対象疾患	細胞ソース		開発フェーズ	備考
Cytomedix	米国	虚血性心不全	自己	自己骨髄由来 高 ALDH 活性幹細胞(成体幹細胞と前駆細胞)	I	ALD-201
Cytori Therapeutics	欧州	慢性虚血性心筋症	自己	自己脂肪組織由来 幹細胞(ADRCs)	I	「PRECISE 臨床試験」(欧州)
Cytori Therapeutics	欧州	急性心筋梗塞、慢性心筋虚血	自己	自己脂肪組織由来 幹細胞(ADRCs)	I	「APOLLO 臨床試験」(欧州)
Garnet BioTherapeutics	米国	心筋梗塞	同種	骨髄由来 同種 成人幹細胞	I	GBT009。Neuronyx 社を 2009 年 5 月に買収
Stempeutics Reaserch	インド	ST 上昇型急性心筋梗塞	同種	同種 ヒト骨髄由来 間葉系幹細胞	I	

TCA Cellular Therapy	米国	急性心筋梗塞後の心筋修復	自己	自己 骨髄由来 幹細胞・前駆細胞	I	
----------------------	----	--------------	----	---------------------	---	--

②血管系疾患

血管系疾患では、主に重症虚血肢を対象とする製品の開発が進められている。

表. 血管系疾患を対象とする間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品

企業名	実施国	対象疾患	細胞ソース		開発フェーズ	備考
Aastrom Biosciences	米国	重症虚血肢	自己	骨髄 幹細胞	Ⅲ	REVIVE-CLI RESTORE-CLI trial はフェーズⅡ 幹細胞・前駆細胞の混合
Pharmicell	韓国	急性虚血性脳梗塞	自己	自家骨髄間葉系幹細胞	Ⅲ	
TCA Cellular Therapy	米国	重症虚血肢	自己	骨髄由来幹細胞の混合物	Ⅱ	
RNL Bio	韓国	バージャー病	自己	脂肪由来間葉系幹細胞	Ⅱ	
Stempeutics Reaserch	インド	重症虚血肢(下肢痛)	同種	骨髄由来 間葉系幹細胞	Ⅱ	
Stempeutics Reaserch	マレーシア	脳卒中	同種	骨髄由来 間葉系幹細胞	Ⅱ 開始認可	
Cytomedix	米国	重症虚血肢	自己	骨髄由来 高ALDH 活性幹細胞(成体幹細胞と前駆細胞)	I / Ⅱ	ALD-301
Pluristem Therapeutics	米国	重症虚血肢	同種	成人幹細胞 妊娠満期胎盤由来 間葉系幹細胞様の間質細胞	I / Ⅱ a	「PLX-PAD」 PluriXTM 3D Bioreactor System で増殖。
t2cure	ドイツ	慢性動脈閉塞症	自己	骨髄由来 前駆細胞	I / Ⅱ	t2c002-PAOD

③軟骨疾患

軟骨疾患に対しては、同種細胞をソースとした、変形性膝関節症を対象とする製品の開発が盛んである。

表. 軟骨疾患を対象とする間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品

企業名	実施国	対象疾患	細胞ソース		開発フェーズ	備考
Medipost	韓国	膝軟骨損傷	同種	臍帯血間葉系幹細胞	製造販売承認取得	「CARTISTEM」
Mesoblast	オーストラリア	変形性膝関節症	同種	同種 間葉系前駆細胞	II	「RepliCart」
Mesoblast	オーストラリア	腰椎後側方固定術対象者 (変形性脊椎症、脊椎すべり症、脊柱管狭窄)	同種	同種 間葉系前駆細胞	II	
Mesoblast	米国	腰椎後側方固定術対象者 (変形性脊椎症、脊椎すべり症、脊柱管狭窄)	同種	同種 間葉系前駆細胞	II	
Osiris Therapeutics	米国	半月板部分切除術後 (変形性関節炎予防)	同種	ヒト間葉系幹細胞	II	「Chondrogen」
RNL Bio	韓国	変形性関節症	自己	自家 脂肪由来間葉系幹細胞	II	
Stempeutics Reaserch	マレーシア	変形性関節症	同種	同種 ヒト骨髄由来 間葉系幹細胞	II	
Stempeutics Reaserch	インド	変形性関節症	同種	同種 ヒト骨髄由来 間葉系幹細胞	II 開始認可	

④神経系疾患

神経系疾患に対しては、特に韓国で数多く取り組まれている。

表. 神経系疾患を対象とする間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品

企業名	実施国	対象疾患	細胞ソース		開発フェーズ	備考
Pharmicell	韓国	慢性脊椎損傷	自己	自家間葉系幹細胞	II/III	
RNL Bio	韓国	ロンバーク病(進行性顔面片側萎縮症)	自己	自家 脂肪由来間葉系幹細胞	II	
TCA Cellular Therapy	米国	ALS	自己	自家 骨髄由来幹細胞・前駆細胞	I	
TCA Cellular Therapy	米国	脊髄損傷	自己	自家 骨髄由来幹細胞・前駆細胞	I	
RNL Bio	韓国	脊髄損傷	自己	自家 脂肪由来間葉系幹細胞	I	
Medipost	韓国	アルツハイマー型認知症	同種	臍帯血間葉系幹細胞	I	「NEUROSTEM」

⑤膵臓(代謝系)疾患

膵臓(代謝系)疾患領域では、糖尿病に対する製品の開発が進められている。再生・細胞医療製品全体では5品目しか治験に入っているものは見つからないが、そのうち3品目が間葉系幹細胞を用いた製品となっている。

表. 膵臓(代謝系)疾患を対象とする間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品

企業名	実施国	対象疾患	細胞ソース		開発フェーズ	備考
Mesoblast	米国	II型糖尿病	同種	間葉系前駆細胞	II	
Osiris Therapeutics	米国	I型糖尿病	同種	骨髄由来 成体間葉系幹細胞	II	Prochymal
Stempeutics Reaserch	インド	糖尿病	同種	骨髄由来 間葉系幹細胞	II開始認可	

⑥骨疾患

骨疾患領域では、米国にて「Osteocel® Plus」が上市されている。

表. 骨疾患を対象とする間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品・開発品

企業名	実施国	対象疾患	細胞ソース		開発フェーズ	備考
Nuvasive	米国	骨	同種	間葉系幹細胞、骨芽細胞	上市	「Osteocel® Plus」
Aastrom Biosciences	米国	大腿骨頭骨壊死	自己	骨髄 幹細胞	Ⅲ	ON-CORE trial、幹細胞・前駆細胞の混合
Cha Bio & Diostech	韓国	神経疾患	同種	臍帯血由来幹細胞	I	

6. 間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品の開発企業一覧

①米国

企業名	実施国	対象疾患	対象臓器	細胞ソース		開発フェーズ	備考
Nuvasive	米国	骨	骨	同種	他家 間葉系幹細胞、 骨芽細胞	上市	「Osteocel® Plus」
Osiris Therapeutics	カナダ NZ	急性 GVHD(小児用)	他	同種	骨髄由来 成体 間葉系幹細胞	製造販売 承認	Prochymal
	米国	ステロイド抵抗性急性 GVHD	他	同種	骨髄由来 成体 間葉系幹細胞	III	Prochymal
	米国	初回治療の急性 GVHD	他	同種	骨髄由来 成体 間葉系幹細胞	III	Prochymal
	米国	ステロイド抵抗性急性 GVHD(小児対象)	他	同種	骨髄由来 成体 間葉系幹細胞	II	Prochymal
	米国	慢性閉塞性肺疾患 (COPD)	他	同種	骨髄由来 成体 間葉系幹細胞	II	Prochymal
	米国	急性心筋梗塞	心臓	同種	骨髄由来 成体 間葉系幹細胞	II	Prochymal
	米国	半月板部分切除術後 (変形性関節炎予防)	軟骨	同種	ヒト間葉系幹細胞	II	「Chondrogen」
	米国	I型糖尿病	膵臓	同種	骨髄由来 成体 間葉系幹細胞	II	Prochymal
	米国	クローン病	他	同種	骨髄由来 成体 間葉系幹細胞	III	Prochymal
Aastrom Biosciences	米国	大腿骨頭骨壊死	骨	自己	骨髄 幹細胞	III	ON-CORE trial、幹細胞・前駆細胞 の混合
	米国	重症虚血肢	血管	自己	骨髄 幹細胞	III	REVIVE-CLI RESTORE-CLI trial (フェーズ II 幹細胞・前駆細胞の混合)
Cytomedix	米国	重症虚血肢	血管	自己	骨髄由来 高 ALDH 活性幹細胞 (成体幹細胞と 前駆細胞)	I / II	ALD-301
	米国	虚血性心不全	心臓	自己	骨髄由来 高 ALDH 活性幹細胞 (成体幹細胞と 前駆細胞)	I	ALD-201

企業名	実施国	対象疾患	対象臓器	細胞ソース		開発フェーズ	備考
Garnet BioTherapeutics	米国	心筋梗塞	心臓	同種	骨髄由来 同種 成人幹細胞	I	GBT009. Neuronix 社を 2009 年 5 月に買収
	米国	外傷防止と縮小	皮膚	同種	骨髄由来 同種 成人幹細胞	II	GBT009
Neostem	米国	急性心筋梗塞後の心 機能保存	心臓	自己	自己 骨髄由来 CD34+幹細胞	II	AMR-001
TCA Cellular Therapy	米国	重症冠動脈虚血	心臓	自己	骨髄由来幹細胞 の混合物	II	
	米国	重症虚血肢	血管	自己	骨髄由来幹細胞 の混合物	II	
	米国	急性心筋梗塞後の心 筋修復	心臓	自己	骨髄由来幹細胞 ・前駆細胞	I	
	米国	ALS	神経	自己	骨髄由来幹細胞 ・前駆細胞	I	
	米国	脊髄損傷	神経	自己	骨髄由来幹細胞	I	

					胞・前駆細胞	
Pluristem Therapeutics	米国	重症虚血肢	血管	同種	成人幹細胞 妊娠満期胎盤 由来 間葉系幹 細胞様の間質細 胞	I / II a 「PLX-PAD」 PluriXTM 3D Bioreactor System で増殖。

②欧州

企業名	実施国	対象疾患	対象臓器	細胞ソース		開発フェーズ	備考
Cytori Therapeutics	欧州	乳房部分切除後の乳房再建	他	自己	自己脂肪組織由来 幹細胞 (ADRCs)	IV	「RESTORE-2」(欧州)
	欧州	慢性虚血性心筋症	心臓	自己	自己脂肪組織由来 幹細胞 (ADRCs)	I	「PRECISE 臨床試験」(欧州)
	欧州	急性心筋梗塞、慢性心筋虚血	心臓	自己	自己脂肪組織由来 幹細胞 (ADRCs)	I	「APOLLO 臨床試験」(欧州)
	欧州	放射線治療を併用する乳房部分切除後の重度の障害や輪郭欠損	他	自己	自己脂肪組織由来 幹細胞 (ADRCs)	(IV予定)	「VENUS 試験」(欧州)
	欧州	急性心筋梗塞	心臓	自己	自己脂肪組織由来 幹細胞 (ADRCs)	II/III	「ADVANCE 試験」
Tigenix	欧州	クローン病の肛門周囲瘻症候群	他	同種	脂肪組織由来 間葉系幹細胞	II完了	欧州で実施。EMAよりオーファンドラッグ指定。Cx601
	ベルギー	リウマチ	他	同種	脂肪組織由来 間葉系幹細胞	I	
Cardio3 BioSciences	ベルギー	心筋虚血による慢性心不全	心臓	自己	骨髄由来 心臓形成性細胞	II完了	C-Cure®幹細胞療法。
Cellerix	スペイン	クローン病の肛門周囲瘻症候群	他	同種	脂肪組織由来 間葉系幹細胞	II	Cx601
t2cure	ドイツ	急性心筋梗塞	心臓	自己	骨髄由来 前駆細胞	II	t2c001-AMI
	ドイツ	特発性拡張型心筋症	心臓	自己	骨髄由来 前駆細胞	I/II	t2c001-DCM
	ドイツ	慢性虚血性心疾患	心臓	自己	骨髄由来 前駆細胞	I/II	t2c001-SW または t2c001-CHD、t2c007-eCHD
	ドイツ	慢性動脈閉塞症	血管	自己	骨髄由来 前駆細胞	I/II	t2c002-PAOD

③韓国

企業名	実施国	対象疾患	対象臓器	細胞ソース		開発フェーズ	備考
Medipost	韓国	膝軟骨損傷	軟骨	同種	臍帯血間葉系幹細胞	製造販売承認取得	「CARTISTEM」
	韓国	移植片対宿主病	他	同種	臍帯血間葉系幹細胞	I / II	「PROMOSTEM」
	韓国	アルツハイマー型認知症	神経	同種	臍帯血間葉系幹細胞	I	「NEUROSTEM」
	韓国	気管支肺異形成症	他	同種	臍帯血間葉系幹細胞	I 開始承認	「PNEUMOSTEM」
Pharmicell	韓国	急性虚血性脳梗塞	神経	自己	骨髄間葉系幹細胞	III	
	韓国	急性心筋梗塞	心臓	自己	骨髄間葉系幹細胞	NDA 承認	「Hearticellgram-AMI」
	韓国	慢性脊椎損傷	神経	自己	間葉系幹細胞	II / III	
RNL Bio	韓国	変形性関節症	軟骨	自己	脂肪由来間葉系幹細胞	II	
	韓国	バージャー病	血管	自己	脂肪由来間葉系幹細胞	II	
	韓国	脊髄損傷	神経	自己	脂肪由来間葉系幹細胞	I	
	韓国	ロンバーグ病(進行性顔面片側萎縮症)	神経	自己	脂肪由来間葉系幹細胞	II	
Anterogen	韓国	クローン病痔瘻	他	自己	脂肪由来幹細胞	II 終了	(ADIPOPLUS)
Anterogen	韓国	便失禁	他	自己	脂肪由来幹細胞	I	(ANT-SM)
	韓国	複雑痔瘻	他	自己	脂肪由来幹細胞	II	(ANTG-ASC)
	韓国	クローン病痔瘻	他	同種	脂肪由来幹細胞	I	(ALLO-ASC)
HomeoTherapy	韓国	移植片対宿主病	他	自己	GVHD の患者骨髄由来 間葉系幹細胞	I / II (a)	
Cha Bio & Diostech	韓国	神経疾患	神経	同種	臍帯血由来幹細胞	I	
	韓国	腹圧性尿失禁	他	同種	臍帯血由来幹細胞	I	
	韓国	白血病	他	同種	臍帯血由来幹細胞	I	

④日本・その他

企業名	実施国	対象疾患	対象臓器	細胞ソース		開発フェーズ	備考
JCR Pharmaceuticals (日本ケミカルリサーチ)	日本	移植片対宿主	他	同種	骨髄由来 成体間葉系幹細胞	II / III	
Mesoblast	オーストラリア	骨髄移植 (GVHD)	他	同種	同種 臍帯血由来 間葉系前駆	III	

					細胞		
オーストラリア	変形性膝関節症	軟骨	同種	同種 間葉系前駆細胞	II	「RepliCart」	
オーストラリア	急性心筋梗塞	心臓	同種	同種 成人間葉系幹細胞	II		
オーストラリア	うつ血性心不全	心臓	同種	同種 成人間葉系幹細胞	II	「Revascor™」 クラス2~4の患者へのフェーズII 試験実施。また、2009年8月、補 助人工心臓を用いている末期(クラ ス4)心不全患者にもフェーズII開 始。	
オーストラリア	腰椎後側方固定術対象者 (変形性脊椎症、脊椎すべり症、脊柱管狭窄)	軟骨	同種	同種 間葉系前駆細胞	II		
オーストラリア	ドライ型加齢黄斑変性症(AMD)	眼	同種	同種 間葉系前駆細胞	II		
米国	腰椎後側方固定術対象者 (変形性脊椎症、脊椎すべり症、脊柱管狭窄)	軟骨	同種	同種 間葉系前駆細胞	II		
米国	II型糖尿病	膵臓	同種	間葉系前駆細胞	II		

企業名	実施国	対象疾患	対象臓器	細胞ソース		開発フェーズ	備考
Stempeutics Reaserch	インド	ST上昇型急性心筋梗塞	心臓	同種	ヒト骨髄由来葉系幹細胞	間 I	
	インド	重症虚血肢(下肢痛)	血管	同種	ヒト骨髄由来葉系幹細胞	間 II	
	インド	変形性関節症	軟骨	同種	ヒト骨髄由来葉系幹細胞	間 II開始認可	
	インド	肝硬変	他	同種	ヒト骨髄由来葉系幹細胞	間 II開始認可	
	インド	COPD	他	同種	ヒト骨髄由来葉系幹細胞	間 II開始認可	
	インド	糖尿病	膵臓	同種	ヒト骨髄由来葉系幹細胞	間 II開始認可	
	マレーシア	変形性関節症	軟骨	同種	ヒト骨髄由来葉系幹細胞	間 II	
	マレーシア	脳卒中	血管	同種	ヒト骨髄由来葉系幹細胞	間 II開始認可	

7. 再生・細胞医療に使用可能な同種間葉系幹細胞株

同種間葉系幹細胞を臨床で使用する場合は、「ボランティアドナーから直接提供を受ける」、もしくは「細胞バンクから治療用株細胞を購入する」のどちらかが考えられる。

開発企業のほとんどは、ドナーの由来について HP 上では、「ボランティアドナーから提供を受ける」という記載になっており、「細胞バンクから治療用株細胞を購入する」に類似した記載は見つからなかった。また、「臨床利用が可能な同種細胞バンク」というものも、今回の調査では確認ができなかった。現在は、細胞バンクを介した臨床用の同種間葉系幹細胞株の提供は、未だ行われていない可能性が高い。

○小児患者における急性移植片対宿主病 (GVHD) に対する、骨髄由来 成体間葉系幹細胞「Prochymal」(remestemcel-L) を用いた治療薬の製造販売 (カナダ、ニュージーランドにて承認) を行なっている Osiris Therapeutics では、ドナーの由来については、米国の 18～30 歳の健康な成人ボランティアドナーであるとしている。

※Lonza は Osiris Therapeutics から提供を受けた間葉系幹細胞を制限付き使用許諾に基づき販売している。ここでは、臨床用の使用は禁止している。

○Osiris Therapeutics と提携し、日本で現在間葉系幹細胞を用いた再生・細胞医療製品の治験 phase II/III を進めている日本ケミカルリサーチは、ドナーの由来については、米国健康者ドナーからの提供を受けていることを明らかにしている。

※日本ケミカルリサーチは Osiris Therapeutics と提携関係にあるが、Osiris Therapeutics からの細胞の提供については明らかにしていない。

○韓国にて変形性関節症 (OA) (ICRS グレード IV) または反復外傷による膝関節軟骨欠損に対する治療薬 CARTISTEM® を上市させている Medipost は 臍帯血バンク (公共バンク・家族間バンク) の運営を行なっているが、製品については、個別にドナーとの合意のもとで提供を受けているとしている。

○島根大学医学部附属病院輸血部では、ヒト幹指針に適合した臨床研究として「低ホスファターゼ症に対する骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植」を実施しており、(2010 年 7 月 1 日～2013 年 3 月 31 日) ここでは、正常な ALP 活性を有する家族の中から最も適したドナーを選択するとしている。

8. 間葉系幹細胞向け培地の、臨床における使用状況

①概要

ドラッグマスターファイル(DMF; Drug Master File)は、原薬の製造関連情報に関する材料、製造、加工、包装、保管、品質などのデータをあらかじめ審査当局に登録しておく制度である。

間葉系幹細胞用培地として、Sigma-Aldrich社の「Stemline 間葉系幹細胞増殖培地」、Life technologies社の「MesenPRO RS キット」がFDAのDMFに登録されており、これらはDMFに登録していることを理由に「臨床的手法にも適用可能」と謳っている。

その他ほぼ全ての培地は「研究用」として製造販売されており、医療実施者(医師)や臨床試験実施者の各自の責任のもとで、臨床で使用されている。一方で、個々の企業で一定の品質を担保するために、製品に対して品質基準(cGMP、GLP等)を規定する取り組みや、Serum Free、XenoFree、Defind等、再生・細胞医療におけるリスクを軽減した製品の販売等がなされている。

複数の培地メーカーの担当者へのヒアリングにより、以下の指摘が挙げられている。

- ・現在、原材料サプライヤーからは主に試薬グレードの契約で原材料を調達している。現時点で、材料の安全性のレベルを問われても、企業として担保することは難しい。
- ・「臨床用」培地のために臨床試験を実施した場合、製品価格が高価となる。
- ・再生・細胞医療用の国内培地市場は、研究含めて5億円程度、世界含めて50億円程度。現時点でマーケットは非常に小さいため、開発費を大きくかけることができない。
- ・規制当局の判断も不明瞭。生物由来基準に関しては、再生・細胞医療の基準となっていない。
- ・再生・細胞医療では、培地は様々な使われ方がなされる。メーカーとして、それら全てに対するリスクを担保できない。

②間葉系幹細胞に対する培地の主要製品一覧

製造元	販売代理店(日本)	用途	Product	Quantity	Catalog #
AllCells	—	研究用	MSC Basal Medium BM MSC	500 ml	MSC-002
		研究用	MSC Stimulatory Supplement BM MSC	50ml ml	MSC-003
Becton, Dickinson and Company.	日本ベクトン・ディッキンソン株式会社	研究用	BD Mosaic™ ヒト間葉系幹細胞用 無血清・基礎培地	500 mL	355701
		研究用	BD Mosaic™ ヒト間葉系幹細胞用 無血清・培地添加剤	8.3 mL	355702
		研究用	BD Mosaic™ ヒト間葉系幹細胞用 無血清・表面コート剤	5 mg	—
Biological Industries Ltd.	コスモバイオ株式会社	研究用	MSC NutriStem® XF Basal Medium	100ml	05-200-1B
				500ml	05-200-1A
		研究用	MSC NutriStem® XF Supplement Mix	0.6ml	05-201-106
				3ml	05-201-1U
		研究用	Certified Fetal Bovine Serum (FBS), Qualified for Mesenchymal Stem Cells, Bovine	100 ML	04-400-1B
				500 ML	04-400-1A
		研究用	MSC Attachment Solution, Human	1 ML	05-752-1F
				5 ML	05-752-1H
CellGenix GmbH	(岩井化学薬品株式会社)	研究用	CellGro® MSC Medium	ml	24803-0500

製造元	販売代理店(日本)	用途	Product	Quantity	Catalog #
CELPROGEN Inc.	-	研究用	Human (Bone Marrow Derived) Mesenchymal Stem Cell Serum Free Med	500ml	M36094-21
		研究用	Human (Bone Marrow Derived) Mesenchymal Stem Cell Complete Media	500ml	M36094-21S
		研究用	H. Mesenchymal Bone Marrow (Adult) Derived Stem Cell Serum Free	500ml	M36094-22
		研究用	H. Mesenchymal Bone Marrow (Adult) Derived Stem Cell Serum Free	500ml	M36094-22D
		研究用	H. Mesenchymal Bone Marrow (Adult) Derived Stem Cell Serum Expan	500ml	M36094-22DS
		研究用	H. Mesenchymal Bone Marrow (Adult) Derived Stem Cell Serum Free	500ml	M36094-22E
		研究用	H. Mesenchymal Bone Marrow (Adult) Derived Stem Cell Expan. Medi	500ml	M36094-22ES
		研究用	H. Mesenchymal Bone Marrow (Adult) Derived Stem Cell Complete Media	500ml	M36094-22S
		研究用	H. Mesenchymal Bone Marrow (Adult) Derived Stem Cell Serum Free	500ml	M36094-22U
Chemicon (Millipore)	メルク株式会社メルクミリポア事業本部	研究用	Mesenchymal Stem Cell Expansion Medium (1x)	500 mL	SCM015
Corning/ Mediatech, Inc.	-	研究用	stemgro hMSC Medium	ml	40-410-KIT
Cyagen Biosciences	DS ファーマバイオメディカル株式会社	研究用	Mesenchymal Stem Cell Culture Medium	500mL	HUXMX-90011

製造元	販売代理店(日本)	用途	Product	Quantity	Catalog #
株式会社 GP バイオサイエンス	株式会社 GP バイオサイエンス	研究用	Poweredby10	250ml	

		研究用	001Plusoid-M	250ml	
		研究用	M061101	250ml	
Life technologies	Life technologies	DMF	MesenPRO RS™ Medium	1 kit	12746-012
		研究用	StemPro® MSC-SFM	1 kit	A1033201
Lonza Group	ロンザジャパン株式会社、タカラバイオ株式会社	研究用	MSCGM-CD™ BulletKit™ ヒト間葉系幹細胞専用完全合成培地キット	1 Kit	190632
		研究用	MSCBM-CD™ 基本培地 Mesenchymal Stem Cell Basal Medium, Chemically Defined	500 ml	190620
		研究用	MSCGM-CD™ SingleQuots™添加因子	5 ml	192125
		研究用	MSCGM™ BulletKit™	1 Kit	PT-3001
		研究用	MSCBM™	440 ml	PT-3238
		研究用	MSCGM™ 添加因子		PT-4105

製造元	販売代理店(日本)	用途	Product	Quantity	Catalog #
Miltenyi Biotec GmbH.	ミルテニーバイオテック株式会社	研究用	NH Expansion Medium	500ml	130-091-680
PromoCell	—	研究用	Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (Ready-to-use)	500 ml	C-28010
		研究用	Mesenchymal Stem Cell Growth Medium DXF (Ready-to-use)	500 ml	C-28019

ReachBio LLC	フナコン株式会社	研究用	Mesenchymal Stem Cells (MSC) Complete Medium	500ml	2121
		研究用	Mesenchymal Stem Cells (MSC) Base Medium	450ml	2121A
		研究用	Mesenchymal Stem Cells (MSC) Supplyment	50ml	2121B
		研究用	Mesenchymal Stem Cells (MSC) Complete kit (2121+02100)	1 kit	2130
ScienCell Research Laboratories	-	研究用	Mesenchymal Stem Cell Medium	500 ml	7501
		研究用	Mesenchymal Stem Cell Medium-basal	500 ml	7501-b
		研究用	Mesenchymal Stem Cell Medium-basal-phenol red free	500 ml	7501-b-prf
		研究用	Mesenchymal Stem Cell Medium-phenol red free	500 ml	7501-prf
		研究用	Mesenchymal Stem Cell Growth Supplement,	5 ml	7552

製造元	販売代理店(日本)	用途	Product	Quantity	Catalog #
Sigma-Aldrich	シグマアルドリッチジャパン株式会社	DMF	Stemline Mesenchymal Stem Cell Expansion Medium	1,000ml	S1569
Stemcell Technologies	株式会社ベリタス	研究用	MesenCult™-XF Culture Kit*	1 kit	ST-05429
		研究用	MesenCult-XF Medium	500 mL	ST-05420
		研究用	MesenCult-XF Attachment Substrate	1 mL	ST-05425
		研究用	MesenCult-ACF Dissociation Kit	2 x 250 mL	0 ST-05426

		研究用	MesenCult MSC Basal Medium (Human)	450mL	ST-05401
		研究用	Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements (Human)	50mL	ST-05402
System Biosciences, Inc./ StemRD, Inc.	フナコン株式会社	研究用	Chemically Defined Medium for MSC, MesenGro	500ml	MGro-500
Thermo Scientific/Hyclone	サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社	研究用	AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Expansion Kit	1 kit	SH30875.KT
		研究用	AdvanceSTEM Stem Cell Growth Supplement	50 mL	SH30878.01
				100ml	SH30878.01
		研究用	AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Basal Medium	500 mL	SH30879.01
1000 mL	SH30879.02				

製造元	販売代理店(日本)	用途	Product	Quantity	Catalog #
株式会社ツーセル	DS ファーマバイオメディカル株式会社	研究用	STK2	500mL	KBDSTC102
		研究用	STK1	100mL	KBDSTC101
東洋紡績株式会社	東洋紡績株式会社	研究用	MF-medium®間葉系幹細胞増殖培地	500ml	TMMFM-001
		研究用	MF-start™	225ml	TMMFS-001

DMF=Drug Master File 掲載製品

(健康安心イノベーションプログラム)
「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発」
基本計画

バイオテクノロジー・医療技術部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

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。また、2012年に「成熟細胞が初期化され多能性を獲得し得ることの発見」がノーベル生理学・医学賞の対象となり、社会的にもiPS細胞を始めとする各種のヒト幹細胞の活用の促進につなげることが注目され期待が高まっている。

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を安定的に大量供給する技術の開発を行う。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ヒトiPS細胞や、その他のヒト幹細胞等を、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」の中の「幹細胞産業応用促進基盤技術開発」の一環として実施する。また、「医療イノベーション5か年戦略」(平成24年6月医療イノベーション会議策定)においても、「再生医療やその他幹細胞関連産業の実現化のため、iPS細胞等幹細胞を安定的に大量供給可能とする基盤技術を開発」することや、「新薬開発の効率性の向上を図るため、iPS細胞を用いた医薬品の安全性評価システムを開発」することが位置づけられている。

(2) 研究開発の目標

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。

(3) 研究開発内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

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。なお、平成22年度補正予算により前倒しで着手する。)

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)

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

① 本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(以下、「NEDO」という)が、単独ないし複数の、国内に研究開発拠点を有する本邦企業及び大学等の研究機関(国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点からの国外企業との連携が必要な場合はこの限りではない。)から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託して実施する。

② 本研究開発に参加する各研究開発グループの有する研究ポテンシャルの最大限の活用により効率的な研究開発の推進を図る観点から、研究体にはNEDOが委託先決定後に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。

③ 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、国立大学法人京都大学iPS細胞研究所 副所長 中畑龍俊氏をプロジェクトリーダーとし、その下で細胞ソース毎に設置したサブプロジェクトリーダーが、それぞれの研究テーマの達成目標を実現すべく研究開発を実施するとともに、研究テーマ間に共通する事項に対しては連携の上で効率的に研究開発を進める。

細胞ソース毎に設置するサブプロジェクトリーダー

- ・ES細胞領域： 国立大学法人京都大学物質－細胞統合システム拠点 拠点長 中辻憲夫
- ・iPS細胞領域： 国立大学法人京都大学iPS細胞研究所 副所長 戸口田淳也
- ・滑膜由来間葉系幹細胞領域： 株式会社ツーセル 代表取締役社長 辻紘一郎
- ・Muse細胞領域： 国立大学法人東北大学大学院医学系研究科 教授 出澤真理
- ・間葉系幹細胞領域： 独立行政法人国立成育医療研究センター 研究所 生殖・細胞医療研究部 幹細胞・生殖学研究室 室長 阿久津英憲

- ④ 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、国立大学法人東京医科歯科大学生体材料工学研究所 教授 安田賢二氏をプロジェクトリーダーとし、その下に研究者を可能な限り結集して効率的な研究開発を実施する。

(2) 研究開発の運営管理

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、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、研究開発に参加していない外部有識者で構成される運営会議を組織し、目標達成に向けた研究開発マネジメント体制を構築する。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」については、機動的に会議を開催し変化に即応するとともに、研究開発に参加していない外部有識者で構成される運営会議を組織し、目標達成に向けた研究開発マネジメント体制を構築する。

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の実施期間は、平成20年度から平成27年度までの8年間とする。

4. 評価に関する事項

NEDOは、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による評価を実施する。

研究開発項目①については、中間評価を平成25年度、事後評価を平成28年度に実施する。

研究開発項目②については、中間評価を平成23年度、事後評価を平成26年度に実施する。なお、平成22年度を持って発展的に終了した研究開発項目については、終了時点までの成果をもって、平成23年度の中間評価の際に事後評価を実施するものとする。

中間評価結果を踏まえ必要に応じプロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

5. その他重要事項

(1) 研究開発成果の取り扱い

① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発成果のうち、下記共通基盤技術に係る研究開発成果については、NEDO、実施者とも普及に努めるものとする。

- a) 安全かつ高効率なヒトiPS細胞の作製技術
- b) 再生医療の細胞源として利用可能な品質を保持したヒト幹細胞の大量供給技術
- c) 各種幹細胞の性質に関する多次元情報を統合したデータベース

d) ヒト幹細胞から分化誘導した心筋細胞等を用いた安全性(毒性)等評価技術

②知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備又は標準化等との連携を図るため、データベースへのデータ提供、標準案の検討や提案を積極的に行う。

③知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、すべて委託先に帰属させることとする。

また、得られた研究開発成果の知財管理を適切に実施することとする。

④成果の産業化

a) 受託者は、本研究開発から得られる研究開発成果の産業面での着実な活用を図るため、本研究開発の終了後に実施すべき取り組みのあり方や研究開発成果の産業面での活用のビジネスモデルを念頭に置き研究開発を行うとともに、研究開発の進捗等を考慮し、これら取り組みのあり方とビジネスモデルについて必要な見直しを行う。

b) 受託者は、上記a)で立案した取り組みとビジネスモデルを本研究開発終了後、実行に移し、成果の産業面での活用に努めるものとする。

(2)基本計画の変更

NEDOは、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済状況、内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3)根拠法

本研究開発は、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号に基づき実施する。

(4)関連指針の厳守

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」、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、「ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律」、「特定胚の取扱いに関する指針」、「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」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」を厳守する。

6. 基本計画の改訂履歴

(1)平成21年1月、制定。

(2)平成23年1月、改訂。内外の研究開発動向に鑑み、研究開発項目①及び研究開発項目②を発展的に統合し、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」を新たに設定。再生医療への応用を可能とする細胞源の確立を目標として、平成23年度から5年計画で新規に着手すべく改訂。なお、平成22年度補正予算により前倒しで着手。

(3)平成24年3月、改訂。研究開発マネジメント体制の確定等を踏まえて改訂。

(4)平成25年2月、改訂。幹細胞研究を取り巻く現状を踏まえ、1.(1)研究開発の目的部分に加筆。

(別紙) 研究開発計画

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. 研究開発の必要性

幹細胞は、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。

しかし、ヒト幹細胞の示す性質は、提供者の年齢、由来する組織の違いや疾患の有無によって、特にiPS細胞においては樹立方法や樹立後の培養方法の違い等によっても異なることが指摘されている。こうした細胞源を産業応用、とりわけ再生医療のための細胞源として応用可能とするためには、安全かつ均一な性質をもった細胞の選別と、その品質を維持・管理することが必要である。

2. 研究開発の具体的内容

(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を開発する。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・培養基材を開発する。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併せて行う。

(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を開発する。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、2.(1)の技術を用いて継代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を構築するとともに、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を開発する。

(3) ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発

2.(1)と2.(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。

3. 達成目標

(1) 最終目標(平成27年度)

「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4種以上のヒト幹細胞を、安定的に大量供給可能とするシステムを確立する。加えて、確立した品質評価技術をベースとするヒト幹細胞の標準化原案を策定する。

(2)中間目標(平成25年度)

ヒト幹細胞の培養操作を自動化した安定培養装置のプロトタイプを完成させるとともに、本装置を用いて複数の異なる性質を持ったヒト幹細胞の培養実験を通じて、改良の基礎となる培養液・培養基材のプロトタイプを完成させる。また、融解後の生存率が80%以上となる結保存技術を構築する。

加えて、細胞から得られる多次元情報の統合によって説明される、ヒト幹細胞の品質管理に有効な評価指標候補を複数策定する。

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」

1. 研究開発の必要性

ヒトiPS細胞等幹細胞は、ヒトの疾患メカニズム解明や薬剤感受性の試験などの創薬研究や、再生医療で用いる細胞源など、様々な分野での活用が期待されている。

創薬分野においては、近年、研究開発費が大幅に伸びている一方で、新薬の承認数は低下する傾向にある。特に、臨床開発の最終フェーズにおいて、有効性が確認できないことや、安全性等が原因となって開発中止となるケースが増加している。また、従来、非臨床試験及び臨床試験において安全性に何ら問題のなかった薬剤でも、市販後に患者に実際に投与されてから初めて致死性不整脈を誘発することが判明したため急遽市場から撤退した事例もある。さらに制ガン剤や抗菌剤などの人体に毒性を持つことが知られている薬剤では、薬効と副作用は表裏一体の関係にあり、ヒトにおけ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非常に重要な技術課題となっている。そのため、前臨床の段階で開発候補薬の有効性が確認されいながら、従来の副作用評価技術では正確なヒトへの副作用の予測が困難だったため休眠化している多数の開発候補薬も、より安価で正確な評価技術が確立すれば上市できることが期待される。

こうした事態を改善し、より安全性の高い医薬品を効率良く開発することを可能とするため、創薬研究のより早い段階で、開発候補薬のヒト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を行うことが必要である。

2. 研究開発の具体的内容

(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.(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。

(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、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。

3. 達成目標

(1)最終目標(平成25年度末)

健常人由来、心疾患患者由来のヒトiPS細胞等幹細胞を活用し、心筋細胞等へ効率的に分化誘導を行い、これを用いて開発候補薬の心毒性等の有無を高い感度と特異度をもって予測できる、製薬企業等が利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。利用する心筋細胞については、通常のフェーズ I 試験における治験者数と同等の体制となるような数の、異なるヒトiPS細胞等幹細胞から分化させたものを用いることが可能な、細胞供給の準備体制を整えるものとする。

(2)中間目標(平成23年度末)

心筋細胞等へ効率よく分化させる技術を開発し、同等の性質を有した細胞の提供を可能にする。正常者及び遺伝性QT延長症候群患者各3名からiPS細胞を樹立し、これらの細胞から心筋細胞を

誘導し、創薬スクリーニングシステムを確立する。また、創薬スクリーニングシステムについては、ハードウェア及び解析ソフトウェアの試作を完了し、そのユーザー評価を受け、システムの確立に向けて必要となる開発課題を明確化する。

以下、平成22年度末をもって終了。得られた成果を発展的に統合し、新たに研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術開発」に着手。

(別紙)研究開発計画

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」

1. 研究開発の必要性

人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、疾患メカニズム解明のための優れた研究材料として、また、再生医療や創薬における安全性評価など様々な応用分野での活用が期待される新たな細胞源であり、多能性幹細胞の一つと位置づけられている。また、ヒト体細胞組織から樹立できることから、ES細胞に比べて倫理的な障壁が少ないと考えられている。

一方、複数の研究者によってiPS細胞誘導の再現性が示されたこと、樹立にかかるコストも小さく、その学術的・産業的なインパクトが大きいことから、世界各国でiPS細胞に関する研究が急速な勢いで進められている状況にある。京都大学のグループでは、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycの4因子(現在ではガン遺伝子c-Mycを除いた3因子によっても誘導されることが示されているが、4因子に比べて誘導効率が低い)を、一方、ウイスコンシン大学のグループでは別の4因子(Oct3/4、Sox2、Nanog、Lin28)をレトロウイルスベクターによってヒト体細胞へ導入し、ヒトiPS細胞が誘導可能であることが報告されている。また、ハーバード大学のグループでは、4因子のうちのc-Mycの代わりに低分子化合物を処理することでiPS細胞が誘導可能であることを報告している。

このように異なる遺伝子の組み合わせ、あるいは化合物との組み合わせによってiPS細胞が誘導可能であることが示されており、より誘導効率の高い因子やその組み合わせがあることが予想されることから、より安全かつ効率的なiPS細胞作製技術のいち早い開発が重要な課題である。

2. 研究開発の具体的内容

iPS細胞の誘導に関わる新規因子(遺伝子及び化合物)の探索を行うとともに、従来法に比べて誘導効率を向上させることが可能となる適切な組み合わせに関する検討を行う。

また、樹立される細胞源としての安全性を向上させ、将来の再生医療用途の細胞源としても活用可能とするため、宿主細胞の染色体上にランダムに遺伝子が導入されることによって生じる腫瘍化の懸念がない遺伝子導入技術の開発を併せて行う。

これら手法を組み合わせることによって、従来法に比べて誘導効率が高く、かつ、ガン化等の危険性が少ない、より安全性を向上させた細胞源の確立を可能とする新規iPS細胞誘導技術の開発を行う。

3. 達成目標

(1)最終目標(平成25年度末)

ヒトiPS細胞を誘導する遺伝子及び化合物等を複数種見だし、これらを組み合わせることにより、従来法に比べて安全で均一なヒトiPS細胞を効率よく作製する新規誘導技術を確立する。

(2)中間目標(平成23年度末)

これまでに報告されたヒトiPS細胞誘導因子に比べて誘導効率を高める遺伝子因子の探索を行い、少なくとも1つ以上の新規な誘導因子を同定する。また、遺伝子導入を代替し、ヒトiPS細胞の誘導を可能とする化合物等の探索・検討を行い、少なくとも1種以上の新規誘導因子を同定する。加えて、開発を進める遺伝子導入法、化合物等が腫瘍化を誘発する危険性が少ないことを確認する。

研究開発項目②「iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

1. 研究開発の必要性

iPS細胞や体性幹細胞等の自己由来の多能性幹細胞は、免疫拒絶反応を回避、あるいは軽減しうる再生医療用の細胞源として、さらには、疾患メカニズムの解明等の基礎研究や創薬スクリーニングへの応用が期待されている。

しかし、提供者の年齢、由来する組織の違いや疾患の有無によって、また、iPS細胞においては用いる誘導方法によっても、得られた細胞が示す性質が異なることが指摘されている。また、こうした細胞源を産業応用に供するためには、安定な幹細胞を確立・供給するための細胞操作技術の開発に加えて、個人及び集団によるゲノムの多様性も考慮しつつ、安全かつ均一な性質をもった細胞の選別と、その品質を維持・管理することが必要となる。

このため、こうした相関関係をゲノムレベルで詳細に解析し、その情報を活用することによって、iPS細胞等幹細胞を産業利用に繋げるために必要となる、安全かつ均一な性質を持った細胞源を供給可能とする、細胞の選別・評価・製造技術等の開発が重要である。

2. 研究開発の具体的内容

(1) iPS細胞等幹細胞の評価・選別技術の開発

由来が異なる細胞から誘導されたiPS細胞等の様々な多能性幹細胞間における性質の差や、その差がもたらす特定の誘導法に対する感受性の違いを明らかにするため、ギガシーケンサーを活用し、ゲノムの修飾、誘導因子のゲノム上の挿入箇所、遺伝子発現プロファイル解析等を組み合わせた手法、あるいは新規手法を用いて、細胞の性質や特徴を評価し、選別するために有用なマーカーを開発するとともに、マーカーを用いて効率的に細胞を操作し、評価・選別する技術の開発を行う。

(2) iPS細胞等幹細胞の品質管理、安定供給技術の開発

上記で開発した手法を用いて得られた特定の均質な細胞源を、均一な性質と品質を保持したまま長期間安定した維持・管理を行うとともに、利用者への安定した供給を可能とするために必要となる技術の開発を行う。

3. 達成目標

(1) 最終目標 (平成25年度末)

種々の解析により、iPS細胞等幹細胞の性質を特徴づけるマーカーを用いて各種幹細胞の状態を的確に判定し、特定の性質を有する細胞のみを選別する技術を確立する。また、性質と品質を長期間安定的に保持可能とする細胞の品質管理技術を確立する。これら技術を組み合わせ、細胞の選別・評価・製造技術を確立し、品質が管理された細胞の安定供給が可能なシステムを構築する。

(2) 中間目標 (平成23年度末)

iPS細胞等幹細胞について、樹立された株毎、あるいは各種幹細胞毎の性質を規定している因子を探索・同定するとともに、均質な細胞を選別・評価・製造するための基礎的知見を得る。

事前評価書

	作成日	平成22年12月28日
1. 事業名称 (コード番号)	ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発	
2. 推進部署名	バイオテクノロジー・医療技術部	
3. 事業概要	<p>(1) 概要：多能性を有するヒト幹細胞は様々な細胞に分化する能力を有していることから、再生医療や創薬など生命科学や医療への貢献が大きく期待されている。ヒト幹細胞の産業応用促進を目標に、以下の研究開発を実施する。</p> <p>①ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発 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</p> <p>(2) 事業規模：総事業費 113 億円 (予定) (3) 事業期間：平成 20 年度～27 年度 (8 年間)</p>	
4. 評価の検討状況	<p>(1) 事業の位置付け・必要性</p> <p>① 事業の位置付け</p> <p>本事業は、様々な細胞に分化する能力を有するヒト幹細胞をいち早く産業応用に繋げるために必要となる基盤技術の開発を目指すものであり、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ものである。</p> <p>iPS細胞等幹細胞の創薬分野への応用に繋げるべく平成20年度から技術開発を実施してきたところであるが、開始後約2年間におけるヒトiPS細胞等幹細胞に関する研究の著しい進展や、がん化の危険性が少なく多能性を有する新たな細胞源として間葉系幹細胞の一つとして分離されたMuse細胞の発見などを踏まえ、既存のプロジェクトの成果を踏まえた研究開発項目の見直しを行い、ヒト幹細胞の再生医療への産業応用も視野に入れたプロジェクトとして実施するものである。</p> <p>② 必要性</p> <p>幹細胞は、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。しかし、ヒト幹細胞の示す性質は、提供者の年齢、由来する組織の違いや疾患の有無によって、特にiPS細胞においては樹立方法や樹立後の培養方法の違い等によっても異なることが指摘されている。</p> <p>しかし、iPS細胞を含む各種幹細胞に関し、その安全性や性質を正確に評価する技術が十分確立されておらず、産業化への大きな障害となっている。このため、こうした細胞源を産業応用、とりわけ再生医療のための細胞源として応用可能とするためには、安全かつ均一な性質をもった細胞の選別と、その品質を維持・管理する評価基盤技術の開発が必要である。</p> <p>また、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おり、開発候補薬のヒト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を行うことが必要である。</p>	

(2) 研究開発目標の妥当性

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」

(目標)

「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4種以上のヒト幹細胞を、安定的に大量供給可能とするシステムを確立する。加えて、確立した品質評価技術をベースとするヒト幹細胞の標準化原案を策定する。

(妥当性)

- ・プロジェクト開始後約 2 年間で得られた成果及び内外の研究開発動向を踏まえ、研究開発項目を発展的に統合し、課題の明確化と成果の高度化を目指した設定である。
- ・培養・保存技術と品質評価指標を同時並行的に向上させ、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）の構築、さらには標準化原案にまで繋げるものであり、大きな開発要素があるため目標として妥当である。

なお、従来の研究開発項目を継承して実施する「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、当初設定のとおり研究開発目標により継続して実施する。

(3) 研究開発マネジメント

公募を通じて、高い技術を有する民間企業や大学等の研究機関を組み合わせた最適な研究開発体制を構築する。

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。

(4) 研究開発成果

策定した「ヒト幹細胞の品質評価指標」の活用により、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が可能となり、ヒト幹細胞の産業化の阻害要因を解消する技術の提供が可能となる。

さらに、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の提供が可能となり、創薬研究のより早い段階において、開発候補薬の効率的で的確な絞り込みを行うことが可能となり、創薬研究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。

(5) 実用化・事業化の見通し

再生医療への応用を可能とするレベルで品質を管理する評価基準の確立により、ヒト幹細胞を安定的に供給するために必要となる培養装置やモニタリング装置等の周辺産業が大きく発展することが期待される。これにより、ヒト幹細胞の産業応用が促進され、再生医療の早期実現や創薬応用、疾患メカニズムの解明などの基礎研究での利用等、市場の拡大が期待される。

(6) その他特記事項
特になし。

5. 総合評価

我が国が世界を先導している科学的成果であるiPS細胞を始めとするヒト幹細胞を、いち早く産業応用に結びつけるため、必要な基盤技術の開発を行うものである。再生医療を始めとする様々な分野への幹細胞の応用を早期に実現するために必要となる評価基盤技術の開発には、様々な分野の企業間連携に加え、アカデミアとの連携が必須である。民間企業単独で開発することは極めて困難であり、異なる事業体の連携推進というNEDOの保有する機能が貢献できる内容であるため、基本計画の変更により新たな開発項目を追加し、NEDOが実施する事業として適切であると判断する。

添付資料

【ES細胞領域】

特許論文リスト

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内 外国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	京都大学 日産化学工業	特願 2012-164227	国内	2012/07/24	出願	培地組成物及び当該組成物を用いた細胞又は組織の培養方法	西野泰斗他
2	京都大学 日産化学工業	特願 2012-263801	国内	2012/11/30	出願	培地組成物及び当該組成物を用いた細胞又は組織の培養方法	西野泰斗他
3	京都大学 日産化学工業	特願 2013-017836	国内	2013/1/31	出願	培地組成物及び当該組成物を用いた細胞又は組織の培養方法	西野泰斗他
4	京都大学 日産化学工業	61/675, 133	米国	2012/07/24	出願	CULTURE MEDIUM COMPOSITION AND METHOD OF CULTURING CELL OR TISSUE USING THEREOF	西野泰斗他
5	京都大学 日産化学工業	61/731, 824	米国	2012/11/30	出願	CULTURE MEDIUM COMPOSITION AND METHOD OF CULTURING CELL OR TISSUE USING THEREOF	西野泰斗他
6	京都大学 日産化学工業	61/759, 172	米国	2013/1/31	出願	CULTURE MEDIUM COMPOSITION AND METHOD OF CULTURING CELL OR TISSUE USING THEREOF	西野泰斗他
7	京都大学	特願 2012-127580	国内	2012/06/04	出願	多能性幹細胞の培養方法及びそのための基材	陳 勇、亀井 謙一郎、劉 莉
8	京都大学、ニプロ(株)	特願 2013-044727	国内	2013/3/6	出願	多能性幹細胞の培養システム及び多能性幹細胞の継代方法	京都大学 中辻憲夫 先生他
9	京都大学	特願 61/563, 643	外国	2011/11/25	出願	「多能性幹細胞の培養方法」	中辻憲夫
10	京都大学	PCT/JP2012/080364	PCT	2012/11/22	出願	多能性幹細胞の培養方法	中辻憲夫
11	住友ベーク	2013-059956	国内	2013/03/22	出	糖鎖試料の調製方法	豊田雅哲他

	ライト				願		
12	ユニバーサルバイオリサーチ(株)	特願 2013-005594	国内	2013/01/16	出願	細胞の識別方法	銀屋治巳他

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)

【論文・文献発表】

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
1	Kumagai, H., Suemori, H., Uesugi, M., Nakatsuj, N. and Kawase, E	Kyoto University	Identification of small molecules that promote human embryonic stem cell self-renewal.	Biochem. Biophys. Res. Commun. (in press). DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.061. [Epub ahead of print, 2013 Mar 27]	有	2013.3
2	Kouichi Hasegawa 他 11名	iCeMS, Kyoto University 他	Small molecule orchestration of Wnt signaling provides long-term xeno-free human pluripotent cell expansion	Stem Cells Translational Medicine 1 (1) 18-28	有	2012
3	K. Kamei, Y. Hirai, Y. Makino, M. Yoshioka, Q. Yuan, M. Nakajima, Y. Chen, and O. Tabata,	京都大学 物質-細胞統合システム拠点	Phenotypic and transcriptional modulation of human pluripotent stem cells induced by nano/microfabrication materials	Advanced Healthcare Materials ;2(2):287-91	有	2013
4	仙石慎太郎 中辻憲夫 他2名	京都大学	Redefining the concept of standardization for pluripotent stem cells. Sengoku S, Sumikura K, Oki T, Nakatsuji N.	Stem Cell Rev. Rep. 7(2):221-6.	有	2011年
5	仙石慎太郎	京都大学	多能性幹細胞の標準化コンセプトの再考	田中 正躬, 堀 友繁編著, 『幹細胞技術の標準化:再生医療への期待』, 日本規格協会, pp.155-164.	無	2012年

6	Itsunari Minami 他 14名	iCeMS, Kyoto University 他	A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions.	Cell Reports, 2012Nov29; 2(5):1448-60.	有	2012
---	-----------------------------	---------------------------------	---	---	---	------

【学会・研究発表】

番号	発表者	所属	タイトル (発表内容)	学会研究会名	発表年、開催地
1	<u>Kawase E.</u>		Applications of scalable culture system for clinical-grade undifferentiated human embryonic stem cells	Wednesday Industry Symposia, 10 th International Society for Stem Cell Research	Yokohama, 2012. 6. 15
2	Kouichi Hasegawa	iCeMS, kyoto Univ.	Small molecule orchestration of Wnt signaling provides long-term xeno-free human pluripotent cell expansion	Stem Cells and Developmental Biology seminar	University of Southern California, Los Angeles, California, May 27, 2011
3	Kouichi Hasegawa	iCeMS, kyoto Univ.	Wnt signaling in human pluripotent cell self-renewal and differentiation	Victor Chang Cardiac Research Institute	Sydney, Australia, February 20, 2012
4	Kouichi Hasegawa	iCeMS, kyoto Univ.	Wnt signaling in human pluripotent cell self-renewal and differentiation	Victor Chang Cardiac Research Institute	Sydney, Australia, February 20, 2012
5	Kouichi Hasegawa	iCeMS, kyoto Univ.	ibid	Stem Cell Australia, Melbourne Brain Centre	The University of Melbourne, Melbourne, Australia, February 23, 2012
6	Kouichi Hasegawa	iCeMS, kyoto Univ.	ibid	AIBN Special Seminar	The University of Queensland, Brisbane, Australia, March 1, 2012

7	Kouichi Hasegawa	iCeMS, kyoto Univ.	ibid	Children's Medical Research Institute, Westmead	Westmead, New South Wells, Australia, March 6, 2012
8	Kouichi Hasegawa	iCeMS, kyoto Univ.	Wnt-dependent and FGF/TGF β -independent human pluripotent stem cell renewal	Concurrent Session IVD - Chemical Control of Stem Cell Behavior	The International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June 16, 2012
9	Kouichi Hasegawa	iCeMS, kyoto Univ.	Wnt signaling in human pluripotent stem cell self-renewal and differentiation	International Conference on Stem Cells and Regenerative Medicine	The University College London, London, UK, July 12, 2012
10	Kouichi Hasegawa	iCeMS, kyoto Univ.	Technical innovation of human pluripotent stem cell biology towards regenerative medicine	6th Annual Symposium on Nanobiotechnology, Kyoto Cell-Material Integration	Kyoto University, Kyoto, Japan, November 9, 2012
11	Kouichi Hasegawa	iCeMS, kyoto Univ.	Control in human pluripotent stem cell self-renewal and differentiation	National Centre of Biological Sciences (NCBS) Annual Talks 2013	NCBS, Bangalore, India, January 5, 2013
12	Kouichi Hasegawa	iCeMS, kyoto Univ.	Wnt signaling in human pluripotent stem cell self-renewal and differentiation	Stem Cells Australia (SCA) - iCeMS Joint Symposium	The University of Melbourne. Melbourne, Australia. February 12, 2013
13	Suong-Hyu Hyon		Establishment of effective cryopreservation method of a human iPS cell and an embryonic stem cell.	The 3 rd Asian Biomaterials Congress	2011.9.16 Busan

14	Hyon, S-H., Matsumura, K.		Effective cryopreservation of human ES/ iPS cells using antifreeze polyamino-acid	Stem Cells & Cell Culture 2012	2012.2-3 San Diego
15	Tsuneo A. Takahashi		Strategy for manufacturing and banking of clinical-grade human embryonic stem cell lines.	UK-Japan Workshop on Stem Cells: Banking a Better Environment for Application	2013.3.7
16	Bin Jiang, Tomomi G Otsuji, Shin Kadota, Itsunari Minami, Norio Nakatsuji		A novel sphere culture system for human pluripotent stem cells	CLS-iCeMS Joint Symposium, Crossing Boundaries; Stem cells, Materials, Mesoscopic Sciences and Beyond	Peking University, Beijing, China, April 21, 2012
17	Tomomi G Otsuji, Bin Jiang, Azumi Yoshimura, John E Heuser, Kouichi Hasegawa, Norio Nakatsuji		A novel sphere culture system for human pluripotent stem cell expansion	RSC-iCeMS Joint International Symposium “Cell-Material Integration and Biomaterials Science”	Kyoto University iCeMS, Kyoto, Japan, March 18-19, 2013
18	仙石慎太郎	京都大学	幹細胞技術の標準化と産業応用の国際動向	政策研究大学院大学公開シンポジウム「標準化と知的財産権－情報通信分野等に関する最新動向及びバイオ分野における可能性－」	2011年
19	仙石慎太郎	京都大学	幹細胞技術の標準化と知財形成の国際動向	日本知的財産協会事業と標準化戦略研究委員会	2011年
20	仙石慎太郎	京都大学	ヒト幹細胞技術の標準化とプロイノベーション戦略	標準化と品質管理全国大会 2011, 財団法人日本規格協会	2011年

21	仙石慎太郎	京都大学	ES/iPS 細胞技術の産業化：知的財産・標準化の課題と展望	日本知的財産協会 関西支部	2012年
22	仙石慎太郎	京都大学	多能性幹細胞の標準化コンセプトの再考	政策研究大学院大学・日本規格協会・バイオインダストリー協会主催公開シンポジウム「幹細胞技術の標準化：再生医療への期待」	2012年
23	仙石慎太郎	京都大学	イノベーションマネジメントからみた製造販売承認のあり方	シンポジウム「医薬品・医療機器などの製造販売承認に関する意義とそれを改革するための政策ツール」, 第2回レギュラトリーサイエンス学会学術大会, 一橋大学	2012年
24	仙石慎太郎	京都大学	ライフサイエンス分野の知財・標準形成に関する現状と課題の事例分析	日本知財学会 第10回年次学術研究発表会 ライフサイエンス分科会セッション「バイオ知財の潮流 —我々はどこに向かうのか?」, 大阪工業大学	2012年
25	豊田雅哲	住友ベークライト	Quantitative Measurements of ES cell Glycan Profiles	World Stem Cell Summit (USA)	2012年12月4日
26	鈴木崇、三善雅広、中川勝博、未盛博文、中馬新一郎、中辻憲夫	島津製作所、京都大学	Metabolome profiling of human embryonic stem cells by gas chromatography-mass spectrometry	19th International Mass Spectrometry Conference	2012年
27	Norio Nakatsuji, et c	Kyoto University	INTERNATIONAL (Japan) Symposium Bridging Industry and Academia: The Vanguard of Stem Cell Research and Application in Japan	World Stem Cell Summit 2012 (US)	2012年12月4日

28	Takashi Asada	Kyoto University	Beyond the Academia-Industry Fusion in Jpn"Integrated System for High Quality and Large Scale Production of hPSCs and Derivative Cells	BIT's 4th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell 2011	2011年11月12日
29	Takashi Asada	Kyoto University	New Technology Approach for High Quality & Large Scale Production of hPSCs	World Stem Cells Regenerative Medicine Congress 2012(UK)	2012年5月21日
30	浅井 康行	リプロセル	多能性幹細胞由来機能細胞の創薬研究における応用	ダイアログセミナー ヒトES/iPS細胞：産業応用最前線セミナー ～細胞治療と創薬スクリーニング～	2011年12月12日 品川
31	水口 義則	浜松ホトニクス	ヒトES/iPS細胞関連ライブセルイメージング技術のご紹介	同上	2011年12月12日 品川
32	北川 正成	タカラバイオ株式会社	Genome-wide DNA methylation profiling of induced pluripotent stem cells reprogrammed by different factors	The 9th International Workshop on Advanced Genomics, 一橋記念講堂, 東京	2011年
33	北川 正成	タカラバイオ株式会社	ゲノム・エピゲノム解析から迫る幹細胞評価	ヒトES/iPS細胞：産業応用最前線セミナー～細胞治療と創薬スクリーニング～, 東京コンファレンスセンター・品川	2011年
34	北川 正成	タカラバイオ株式会社	定量 RT-PCR による幹細胞指標遺伝子の発現解析	幹細胞産業応用促進イニシアティブ(SSCI)ワークショップ, 京都大学	2012年
35	北川 正成	タカラバイオ株式会社	The Molecular biology reagents and services for stem cell research field provided by TAKARA BIO	World Stem Cell Summit 2012, West Palm Beach, Florida, USA	2012年
36	北川 正成	タカラバイオ株式会社	ES 細胞/iPS 細胞の未分化(多能性)維持状況を簡便に確認できる試薬を発売	京都商工会議所 京都経済記者クラブ	2012年

37	瀬尾 淳哉, 他	タカラバイ オ株式会社	A quantitative and comprehensive combination analysis of DNA Methylation with Human ES cell	第 35 回日本分子生 物学会年会, マリン メッセ福岡 (ポスタ ー発表およびショ ートトーク)	2012 年
38	北川 正成	タカラバイ オ株式会社	次世代シーケンサーと幹細胞 研究支援	F I R M 会員企業向 けセミナー	2013 年
39	北川 正成, 他	タカラバイ オ株式会社	The qPCR panel for evaluation of iPS/ES cells gene expression	CiRA International Symposium 2013, Kyoto University (ポスター発表)	2013 年
40	北川 正成	タカラバイ オ株式会社	幹細胞研究支援のためのゲノ ム解析関連サービス	第 12 回日本再生医 療学会総会ランチョ ンセミナー, 横浜	2013 年
41	銀屋 治巳	ジェネティ ン	エピジェネティクス自動化シ ステムのヒト幹細胞 品質評価への応用	ヒトES/iPS細胞: 産業応用最前線 セミナー	2011年12月12 日
42	銀屋 治巳	ジェネティ ン	Epigenetic analysis of stem cells using automated IP system	World Stem Cell Summit 2012 (US)	2012年12月4 日
43	Wado Akamatsu	Keio University	Rapid Induction of Neural Stem Cells from Human Pluripotent Stem Cells and Somatic Cells	World Stem Cell Summit 2012 (US)	2012年12月4 日

その他【プレス発表】

番号	発表者	所属	タイトル (発表内容)	開催場所	発表年
1	森田部長	NEDO	「ES/iPS 細胞などを大量生産するバッグ型の自動培養装置を開発。産学官連携により、日本企業のものづくり技術を幹細胞の実用化に活用」		2012年11月22 日 (木)
	中辻教授	京都大 iCeMS			
	増田常務取締役、吉川主席研究員	ニプロ			
2	森田部長	NEDO	ヒトES/iPS細胞などのエピゲノム自動解析システムと方法を開発、実用化へ	京都大学記者クラブ	2013年2月5日
	中辻教授	京都大 iCeMS			
	秋本社長	ジェネ ティン			
	高橋取締役 銀屋部長				
3	中辻教授	京都大 iCeMS	住友ベークライトとiCeMS、NEDO 事業で ES/iPS細胞の顔「糖鎖」		2013年4月11 日 (木)

藤原 常務執行 役員	住友ベ ークラ イト	の解析キットを開発、商品化へ		
須藤 S-バイオ 事業部長				
福島 S-バイオ 研究部長				

【iPS細胞領域】

特許論文リスト

【国内学会等】

番号	発表者	所属	タイトル	発表媒体	発表年
1	古江・楠田 美保	基盤研	創薬研究のためのES/iPS 細胞の培養法	大阪大学蛋白質研究所セミナー:幹細胞を制御する環境因子の分子基盤	平成 23
2	清田泰次郎	(株) ニコ ン	細胞培養観察装置～ライブシステムセルスクリーニングの可能性～	ヒトES/iPS 細胞:産業応用最前線セミナー	平成 23
3	中嶋勝己	川崎重 工業(株)	再生医療の産業化を促進する自動培養装置の開発	幹細胞技術の標準化:再生医療への期待	平成 24

【平成24年度】

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内 外国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	大阪大学・京都 大学	PCT/JP2012/0 59720	PCT	平成 24/4/9	出願	改変ラミニンおよびその利用	関口清俊他
2	川崎重工業(株)	特 願 2012-26717 2	国内	平成 24/12/6	出願	自動細胞剥離装置お よび細胞剥離システム	渡壁慶三他

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)

【論文】

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名	査読	発表年
1	Miyazaki, T., 他	阪大 他	Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells	Nature Communications, 3:1236. DOI: 10.1038/ncomms2231,	有	平成 24.
2	関口 清俊他	阪大	細胞外マトリックスと幹細胞ニッチ	再生医療	無	平成 24
3	清田 泰次郎	ニコ ン (株)	iPS 細胞培養手技標準化に向けた細胞培養観察装置	Medical Science Digest	有	平成 24
4	堀 友繁	JBA	幹細胞技術の標準化と産業化 part 1	バイオサイエンスとインダストリー	無	平成 24
5	堀 友繁	JBA	幹細胞技術の標準化と産業化 part 2	バイオサイエンスとインダストリー	無	平成 25
6	堀 友繁	JBA	幹細胞技術の標準化と産業化 part 3	バイオサイエンスとインダストリー	無	平成 25

【国際学会】

番号	発表者	所属	タイトル	発表媒体	発表年
1	K. Sekiguchi	阪大	Synthetic basement membrane for regenerative medicine	9th World Biomaterials Congress (Chengdu)	平成 24.
2	Miyazaki, T., 他	阪大	Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells	10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (Yokohama)	平成 24
3	Miho K Furue	基盤研	A growth factor defined serum-free culture condition for human pluripotent stem cells toward the development of pharmaceutical application	The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT 2012 Nagoya) Symposium: Cell culture technologies for stem cell	平成 24
4	Miyazaki, T., 他	阪大	Recombinant human laminin E8 fragments (LM-E8s) support the efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells under defined and xeno-free condition	World Stem Cell Summit 2012 (West Palm Beach, Florida)	平成 24

【国内学会等】

番号	発表者	所属	タイトル	発表媒体	発表年
1	関口清俊	阪大	細胞外マトリックスの多様性とテーラーメイド培養基材	第 85 回日本組織培養学会	平成 24
2	菅三佳他	基盤研	次世代型細胞評価システムの開発	第 85 回日本組織培養学会	平成 24
3	加藤竜司他,	名大	iPS 細胞培養手技標準化のためのコロニー形態評価モデル	第 11 回日本再生医療学会総会	平成 24
4	加藤竜司他	名大	iPS コロニー形態情報解析による細胞評価法	第 11 回日本再生医療学会総会	平成 24
5	松本恵他	名大	iPS 細胞コロニー形態の情報解析による細胞評価法	平成 24 年度 日本生物工学会若手研究者の集い	平成 24
6	堀 友繁	JBA	バイオテクノロジー技術と国際標準化:再生医療への期待	第 19 回日本遺伝子診療学会大会	平成 24

7	城戸 理紗 子他	名大	iPS 細胞培養手技標準化のためのコロニー形態評価法	第 64 回日本生物工学会	平成 24
8	菅 三佳他	基盤 研	IN Cell Analyzer2000を用いた次世代型幹細胞評価システムの開発	IN Cell User's Day	平成 24
9	清田泰次郎	ニコン (株)	ライブセルイメージングシステムによる幹細胞評価の可能性	ヒト多能性幹細胞:臨床応用最前線 細胞材料及び細胞接着技術の標準化	平成 24
10	古江・楠田 美保	基盤 研	臨床応用を目指したヒト多能性幹細胞用培地の標準化	ヒト多能性幹細胞:ヒト多能性幹細胞:臨床応用最前線セミナー	平成 24
11	Masato Nakagawa 他	京大	Establishment of human iPS cells under feeder-free conditions for clinical application	第35回日本分子生物学会	平成 24
12	松本恵	名大	細胞画像情報の多次元マッピングによる再生医療用細胞品質管理	化学工学会第 78 年会	平成 25
13	宮崎隆道他	阪大	ラミニン E8 フラグメントを用いたヒト ES/iPS 細胞の単一分散培養法	第 12 回日本再生医療学会	平成 25
14	城戸理紗子	名大	iPS 細胞培養プロトコル評価のための非破壊的細胞形態情報解析	第 12 回日本再生医療学会	平成 25

【プレス発表等】

番号	発表者	所属	タイトル	発表媒体	発表年月
1	川崎重工業(株)		iPS 細胞培養装置を開発	共同取材の結果以下の通り報道: 朝日新聞、毎日新聞、日本経済新聞、産経新聞、神戸新聞、ビジネスアイ、報道ステーション、Voice、朝バラ、バンキシャ、	平成 24.10
2	(株)ニコン		iPS 細胞培養観察装置	テレビ朝日	平成 24.10
3	幹細胞組合		BioJapan2012 出展	BioJapan2012(横浜)	平成 24.10
4	幹細胞組合		iPS 細胞効率よく作製、ニコンや島津再生医療装置	日本経済新聞	平成 24.10
5	幹細胞組合		幹細胞評価基盤技術研究組合 IPS 細胞の凍結装置 上 解凍後の生存率7割超 下 培養法の標準技術標準	日経産業新聞	平成 25.1
6	川崎重工業(株)		世界初、iPS 細胞実用化への秘密兵器	TBS全国ネット「夢の扉+」	平成 25.2

7	(株)ニコン		技術を結集した細胞培養観察装置で、医療に革命をもたらすiPS細胞の生成に貢献	ニコン CSR 報告書	平成 25.3
8	大陽日酸(株)		iPS細胞用全自動凍結保存システムの販売を開始	プレスリリース	平成 25.5
9	川崎重工業(株)		ブースにおいてPJ成果を紹介	バイオテック 2013	平成 25.5

【滑膜由来間葉系幹細胞領域】

特許論文リスト

【外部発表】

番号	発表者	所属	タイトル	発表媒体	発表年
1	辻 紘一郎	(株)ツーセル	展示ブース出展	BioJapan2011	平成 23

【平成 2 4 年度】

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内 外国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	大阪大学	特願 2013-12630	国内	2013年1月25 日	審 査 中	胚性幹細胞由来間 葉系幹細胞による 3次元人工組織の 作成とそれを用い た骨軟骨再生治療	中村憲正他
2	大阪大学	国際出願 PCT/JP2012/0 08410	国内	2012年12月 27日	審 査 中	骨軟骨再生の ためのスキャ フォールドフ リー自己組織 化三次元人工 組織と人工骨 複合体	中村憲正他
3	(株)スペ ース・バイオ ・ラボラトリ ーズ他	意匠登録出 願 2013-00628 4	国内	平成25年3 月22日	審 査 中	細胞培養容器	河原裕美他
4	(株)スペ ース・バイオ ・ラボラトリ ーズ他	特願 2013-059700	国内	平成25年3 月22日	審 査 中	細胞培養容器	河原裕美他
5	(株)スペ ース・バイオ ・ラボラトリ ーズ他	特願 2013- 059703	国内	平成25年 3月22日	審 査 中	細胞培養容器	河原裕美他

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)

【外部発表】

番号	発表者	所属	タイトル	発表媒体	発表年
1	加藤幸夫他	広島大学	幹細胞用無血清培地の開発/幹細胞医療の実用化技術と産業展望	(株)シーエムシ ー出版刊	平成 24
2	辻 紘一郎	(株)ツーセル	展示ブース出展	BioJapan2012	平成 24

【国際学会】

番号	発表者	所属	タイトル	発表媒体	発表年
1	Jinchang Shao et al.	(株)ツーセル	“Successful Isolation and Expansion of Human Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Grown Out from Tissue Explant by Using Chemically Defined Serum Free Media STK1® and STK2®”	10th ISSCR Annual Meeting	平成 24
2	Shimomura K et al.	大阪大学	“Osteochondral repair using a novel biphasic implant made of scaffold-free tissue engineered construct derived from synovial mesenchymal stem cells and hydroxyapatite-based artificial bone.”	Annual meeting of Orthopaedic Research Society2012	平成 24
3	Moriguchi Y et al.	大阪大学	“Development of scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) with chondrogenic differentiation capacity using rabbit embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells.”	International Cartilage Repair Society 2012	平成 24
4	K. Shimomura et al.	大阪大学	“Prostaglandin E2 upregulation by cyclic compressive loading on 3-D tissue of human synovial fibroblasts via COX-2 and IL-1 receptor signal pathway.”	International Cartilage Repair Society 2012	平成 24
5	Shimomura K et al.	大阪大学	“Osteochondral repair using a novel biphasic implant made of scaffold-free tissue engineered construct derived from synovial mesenchymal stem cells and hydroxyapatite-based artificial bone.”	International Society for the Study of the Lumbar Spine 2012	平成 24
6	Moriguchi Y et al.	大阪大学	“Tissue engineered construct (TEC) prevents disc degeneration after nucleotomy in a rat model.”	World Forum for Spine Research 2012	平成 24
7	Moriguchi Y et	大阪大	“Tissue engineering construct (TEC)	3rd TERMIS	平成 24

	al.	学	prevents disc degeneration after nucleotomy in a rat model”	Congress	
8	Nakamura N		“Scaffold-free Tissue engineered construct (TEC) derived from mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair and regeneration.”	Taiwan Arthroscopy and Knee Society International Symposium on Arthroscopic Cartilage Surgery and related research	
9	Nakamura N		“Stem cell therapy in joint repair -Current status and future perspective”	9th IFOSMA & 22nd Chinese Endoscopy (Arthroscopy) Doctor Conference	
10	Nakamura N		“Cartilage Committee Symposium: The ACL-Injured Knee with a Focal Cartilage Defect - Risk Factors Prognosis and Treatment Future options”	ESSKA 2012	
11	Nakamura N		“Cell-Based Therapy in Articular Cartilage Lesions of the Knee Evidence-based assessment”	La Patella ALRM	
12	Nakamura N		. “Cell-based therapy towards Cartilage Regeneration -Asian Experiences- “	World Sports Trauma Congress and 7th EFOST congress	
13	Nakamura N		“Current Stem cell based cartilage repair procedure in Japan”	UK Cartilage Club meeting	
14	Nakamura N		“Tissue engineering of cartilage”	The Combined 33rd SICOT & 17th PAOA Orthopaedic World Conference	
15	Myoui A et al.	大阪大学	Feasibility and limitations of the round robin test for assessment of in vitro chondrogenesis evaluation protocol in a tissue-engineered medical product.	J Tissue Eng Regen Med	平成 24
16	Kazuko Kitayama, Yukio Kato	広島大学	Enhanced Proliferation of Stem Cells from Deciduous Teeth in Serum-free Media, STK1/STK2	8th Biennial Conference PDAA	平成 24

	et al.				
17	Yukio Kato et al.	広島大学	Chemical Optimization of Both Culture Surfaces and Media Markedly Enhances MSC Proliferation	ISSCR Annual Meeting	平成 24

【国内学会等】

番号	発表者	所属	タイトル	発表媒体	発表年
1	長谷川森一他	(株)ツーセル	「各組織由来 MSC の均質性と細胞表面マーカーの発現に及ぼす無血清培地 (STK 培地) の影響」	第 11 回再生医療学会総会	平成 24
2	邵金昌他	(株)ツーセル	「無血清培地 (STK 培地) を用いた間葉系幹細胞からの Tissue engineered construct (TEC) 作成」	第 11 回再生医療学会総会	平成 24
3	中田恭輔、弓削類他	(株)スペース・バイオ・ラボラトリーズ	「無血清培地 (STK 培地) で培養したヒト滑膜由来 MSC の未分化性・軟骨分化能の検討」	第 11 回再生医療学会総会	平成 24
4	森口悠他	大阪大学	「ウサギ胚性幹細胞より誘導された間葉系幹細胞由来スキャフォールドフリー三次元人工組織の形成と軟骨分化」	第 11 回日本再生医療学会	平成 24
5	下村和範他	大阪大学	「スキャフォールドフリー滑膜間葉系幹細胞由来三次元人工組織・人工骨複合体を用いた骨軟骨再生」	第 11 回日本再生医療学会	平成 24
6	中村憲正	大阪保健医療大学	「関節軟骨再生への細胞治療 —その現状と展望—」	第 10 回運動器サイエンスセミナー	平成 24
7	中村憲正	大阪保健医療大学	「関節軟骨再生医療の現状と将来展望」	第 11 回日本再生医療学会学術総会	平成 24
8	中村憲正	大阪保健医療大学	「スポーツにおける軟骨損傷 —その問題点と治療の最先端—」	第 20 回長崎関節外科懇話会	平成 24
9	中村憲正	大阪保健医療大学	「関節軟骨再生 —基礎から臨床の懸け橋—」	第 3 回横浜膝関節研究会	平成 24
10	中村憲正	大阪保健医療大学	「スポーツにおける膝関節損傷治療のニューパラダイム」	大阪医科大学整形外科同門会 秋期教育研修会	平成 24
11	中村憲正他	大阪保健医療大学	「幹細胞を用いた半月板温存と関節症予防」	第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会	平成 24
12	中村憲正	大阪保健医療大学	「間葉系幹細胞由来スキャフォールドフリー三次元人工組織による軟骨再生」	第 15 回 大阪大学医工情報連携シンポジウム	平成 24
13	中村憲正	大阪保健医療	「軟骨損傷治療のパラダイム —	第 2 回 ちば運動器	平成 24

		大学	現在と未来ー」	疼痛フォーラム	
14	中村憲正	大阪保健医療 大学	「スポーツにおける軟骨損傷治療 のパラダイムー現在と未来ー」	第 38 回 三泗整形 医会	平成 24
15	加藤幸夫	広島大学	培養環境全体の化学的規定化によ る移植用間葉系幹細胞の増殖、分化 の促進	(公)新化学技術推 進協会ライフサイ エンス技術部会・材 料分科会	平成 24
16	加藤幸夫	広島大学	無血清で作製した他家ヒト滑膜 MSC (TEC) への期待	第 12 回 日本再生医 療学会	平成 24

【Muse細胞領域】

特許論文リスト

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内 外国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	出澤真理他	特願 2012-104994	国内	2012/05/01	公開	生体組織から単離できる多能性幹細胞	出澤真理他

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)

【論文】

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
1	Kuroda Y et al.	東北大	Isolation, culture and evaluation of Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse) cells.	Nature Protocols. (in press)	有	2013
2	Shigemoto S et al.	東北大	A novel approach to collect satellite cells from adult skeletal muscles based on their stress tolerance.	STEM CELLS Translational Medicine. (in press).	有	2013
3	Tschiyama K et al.	東北大	Functional melanocytes are readily reprogrammable from multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells, distinct stem cells in human fibroblasts.	J Invest. Dermatol. 2013 Apr 5. doi: 10.1038/jid.2013.172. [Epub ahead of print]	有	2013
4	Wakao S et al.	東北大 等	Morphologic and gene expression criteria for identifying human induced pluripotent stem cells	PLoS One. 2012;7(12):e48677. doi: 10.1371/journal.pone.0048677.	有	2012
5	Wakao S et al.	東北大 等	Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells: Contribution of Muse Cells, a Novel Pluripotent Stem Cell Type that Resides in Mesenchymal Cells. Cells.	Cells. 1: 1045-60	有	2012
6	Kitada M et al.	東北大	Muse cells and induced pluripotent stem cell: implication of the elite model.	Cell Mol Life Sci. 69(22):3739-50	有	2012
7	Wakao S et al.	東北大	The elite and stochastic	Cytometry A doi:	有	2012

			model for iPS cell generation: Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells are readily reprogrammable into iPS cells	10.1002/cyto. a. 22069		
8	Wakao S, et al.	東北大	Isolation of adult human pluripotent stem cells from mesenchymal cell populations and their application to liver damages.	Liver Stem Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Springer Protocols, vol. 826, 89-102	有	2012
9	出澤真理	東北大	神経再生研究の最前線—Muse 細胞	脳神経外科速報 22 : 550-559	無	2012
10	出澤真理	東北大	ヒト生体由来多能性幹細胞 Muse 細胞—再生医学と生物学における意義	実験医学 30 (2) : 180-188	無	2012
11	出澤真理	東北大	ヒト生体内に存在する多能性幹細胞 Muse 細胞と肝再生への可能性	肝胆膵 65 : 145-155,	無	2012
12	Kitada M et al,	東北大	Parkinson's disease and mesenchymal stem cells:potential for cell-based therapy	Parkinson's Disease. 2012:873706. doi: 10.1155/2012/873706	有	2012
13	Kuroda Y et al.	東北大等	Mesenchymal stem cells and umbilical cord as sources for Schwann cell differentiation: their potential in peripheral nerve repair.	The Open Tissue Engineering and Regenerative medicine Journal. 4:54-63	有	2011
14	Kuroda Y et al.	東北大	Bone Marrow Mesenchymal Cells: How Do They Contribute to Tissue Repair and Are They Really Stem Cells?	Arch Immunol Ther Exp. 59:369-378	有	2011
15	Wakao S et al.	東北大等	Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts.	Proc Natl Acad Sci U S A. 108 (24) :9875-80	有	2011
16	Matsuse D et al.	東北大等	Combined transplantation of bone marrow stromal	Tissue Eng 17(15-16) :1993-2004	有	2011

			cell-derived neural progenitor cells with a collagen sponge and basic fibroblast growth factor releasing microspheres enhances recovery after cerebral ischemia in rats.			
17	北田容章 et al.	東北大	間葉系幹細胞・Muse 細胞を用いた再生医療	再生医療叢書	無	2011
18	若尾昌平 et al.	東北大	iPS 細胞リソースとしての Muse 細胞	医学のあゆみ 1326-1331	無	2011
19	黒田康勝 et al.	東北大	間葉系幹細胞における多様な分化と組織修復能を担う Muse 細胞の発見	血液フロンティア、21: 1664-1669	無	2011
20	出澤真理	東北大	間葉系幹細胞の分化能と細胞治療への展望	日本臨床、12: 2128-2135	無	2011
21	出澤真理	東北大	生体由来の間葉系組織に内包される Muse 細胞の発見	実験医学、29:3077-3084	無	2011

【間葉系幹細胞領域】

● 特許論文リスト

【平成23年度】

【国内特許】

番号	出願人	所属	出願番号	出願日
1	館野浩章 他	産総研	特願 2011-239919	2011.11.01
2	伊藤弓弦 他	産総研	特願 2012-041418	2012.02.28

【原著論文】

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名	査読	発表年
1	Sugawara T 他	成育	Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells	1) Stem Cell Res Ther. 8:3(2):8, 2012.	有	2012
2	Saito S 他	産総研 成育 健康長 寿	Possible linkages between the inner and outer cellular states of human induced pluripotent stem cells	2) BMC Systems Biology, 5 Suppl 1, S17.	有	2011
3	Tateno H 他	産総研 成育 健康長 寿	Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray	3) Journal of Biological Chemistry, 286(23), 20345-53.	有	2011

【総説】

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名	査読	発表年
1	浅島誠 他	産総研	発生学から見た再生医療	再生医療 10(3), pp17-33	無	2011

【国際発表】

番号	発表者	所属	タイトル	学会名	発表年
1	館野浩章	産総研 成育 健康長 寿	New Evaluation System for Researcher and Engineer”, Glycome diagnosis of human stem cells using lectin microarray	第 31 回内藤コンファレンス(札幌)	2011

【国内発表】

番号	発表者	所属	タイトル	学会名	発表年
1	館野浩章	産総研	高密度レクチンアレイを用いた幹細胞評価	第 30 回日本糖質学会年会	2011

		成育 健康長 寿	技術の開発		
2	舘野浩章	産総研 成育 健康長 寿	高密度レクチンアレイを用いた新規未分化糖鎖マーカーの開発	GlycoTOKYO 2011	2011
3	伊藤弓弦	産総研	幹細胞評価基盤技術開発に向けたアプローチ	第11回産総研・産技連LS-BT 合同研究発表会(つくば)	2012

【平成24年度】

【国内特許】

番号	出願人	所属	出願番号	出願日
1	伊藤弓弦 他	産総研	特願 2012-234199	2012.10.23
2	舘野浩章 他	産総研	特願 2013-026946	2013.02.14

【国際特許】

番号	出願人	所属	出願番号	出願日
1	舘野浩章 他	産総研	PCT/JP2012/006983 (W I P O)	2012.10.31
2	伊藤弓弦 他	産総研	PCT/JP2013/001160 (W I P O)	2012.02.27

【論文】

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名	査読	発表年
1	Hasehira K 他	産総研	Structural and quantitative evidence for dynamic glycome shift on production of induced pluripotent stem cells	Molecular and Cellular Proteomics. 11(12), 1913-23.	有	2012
2	Onuma Y 他	産総研	rBC2LCN, a new probe for live cell imaging of human pluripotent stem cells	Biochemical and Biophysical Research Communications, 431(3):524-9.	有	2013
3	Tateno H 他	産総研 成育 健康長 寿	Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN	STEM CELLS Translational Medicine, 2(4):265-73.	有	2013

【国際発表】

番号	発表者	所属	タイトル	学会名	発表年
----	-----	----	------	-----	-----

1	Akutsu H.	成育	A novel xeno-free defined condition for culture of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells with novel human feeder layers	10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (Yokohama)	2012
2	Akutsu H.	成育	Human ES cells: acquired pluripotency from blastocysts.	Asia Pacific Initiative on Reproduction 2012 (Osaka)	2012
3	Onuma Y.	産総研	A new tool for detection of human ES/iPS cells	German-Japanese Colloquium (Karlsruhe, Germany)	2013

【国内発表】

番号	発表者	所属	タイトル	学会名	発表年
1	阿久津英憲	成育	ヒト ES 細胞～小児難治疾患へ挑む～	第 48 回大会日本小児循環器学会総会・学術集会	2012
2	館野浩章	産総研 成育 健康長 寿	高密度レクチンアレイを用いた新規未分化糖鎖マーカーの開発	JRIA 第 5 回 先導技術交流会	2012
3	伊藤弓弦	産総研 成育 健康長 寿	ヒト ES/iPS 細胞特異的な新規細胞表面染色マーカーの開発	第 12 回日本再生医療学会総会（横浜）	2013
4	館野浩章	産総研 成育 健康長 寿	高感度糖鎖プロファイラー・レクチンマイクロアレイによる新規未分化マーカーの発見	第 12 回日本再生医療学会総会（横浜）	2013
5	伊藤弓弦	産総研	iPS 細胞等幹細胞評価基盤技術開発に向けたアプローチ	第 3 回インテレクチャルカフェ広島（広島）	2013
6	小沼泰子	産総研	ヒト幹細胞の産業応用への展望	アフタヌーンカフェ（産総研オープンラボ 2012）	2012

【プレスリリース】

番号	発表者	所属	タイトル	リリース日
1	伊藤弓弦 他	産総研	ヒト iPS 細胞を生きのまま可視化できるプローブを開発 —細胞の状態を確認しながらの効率的な培養が可能に—	2013.03.19

以上

2. 分科会における説明資料

次ページより、プロジェクト推進・実施者が、分科会においてプロジェクトを説明する際に使用した資料を示す。

健康安心イノベーションプログラム
「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発／
ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」
平成22(2010)年度～平成27(2014)年度 6年間
(中間評価)

プロジェクトの概要

1. 事業の位置付け・必要性について
2. 研究開発マネジメントについて

NEDO

バイオテクノロジー・医療技術部

2012年6月26日

1/36

発表内容

公開

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1. 事業の位置付け・必要性について | (1) NEDOの事業としての妥当性
(2) 事業目的の妥当性 |
| 2. 研究開発マネジメントについて | (1) 研究開発目標の妥当性
(2) 研究開発計画の妥当性
(3) 研究開発実施の事業体制の妥当性
(4) 研究開発成果の実用化・事業化に向けた
マネジメントの妥当性
(5) 情勢変化への対応等 |
| 3. 研究開発成果について | (1) 目標の達成度と成果の意義
(2) 知的財産権等の取得および
標準化の取り組み
(3) 成果の普及
(4) 成果の最終目標の達成可能性 |
| 4. 実用化・事業化に向けての見通し
および取り組みについて | (1) 成果の実用化・事業化の見通し
(2) 実用化・事業化に向けた具体的取り組み |

2/36

事業の背景など

1. 幹細胞は、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。
2. 再生医療等の先進的な医療の実現化には、各種の規制等(薬事法・ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針等)を見据え、前臨床研究から臨床研究まで一貫した長期的な研究開発が必要
3. 米国では、国立衛生研究所(National Institutes of Health, NIH)の有する多くの研究機関や研究助成制度を活用し、基礎研究から臨床研究まで一貫した研究開発を支援・推進するフレームワークが存在。

省庁間の連携:「再生医療実現化ハイウェイ」



NEDOが関与する意義

- 幹細胞は、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。
- しかし、ヒト幹細胞の示す性質は、提供者の年齢、由来する組織の違いや疾患の有無によって、特にiPS細胞においては樹立方法や樹立後の培養方法の違い等によっても異なることが指摘されている。
- こうした細胞源を産業応用、とりわけ再生医療のための細胞源として応用可能とするためには、安全かつ均一な性質をもった細胞の選別と、その品質を維持・管理することが必要である。

- そのためには、法制度の整備や標準化などを見据えて、産官学一体となった研究開発基盤を国の支援のもとで構築することが不可欠である。

実施の効果(費用対効果)

平成25年2月に経済産業省が取りまとめた「再生医療の実用化・産業化に関する報告書」では、今後再生医療の実用化・産業化が促進されることに伴い、細胞そのものの製品・加工品に加えて試薬・培地や自動培養装置等の周辺産業の成長が期待され、双方を合算した2030年における国内の再生医療の市場を1.6兆円、世界市場を17兆円と試算している。

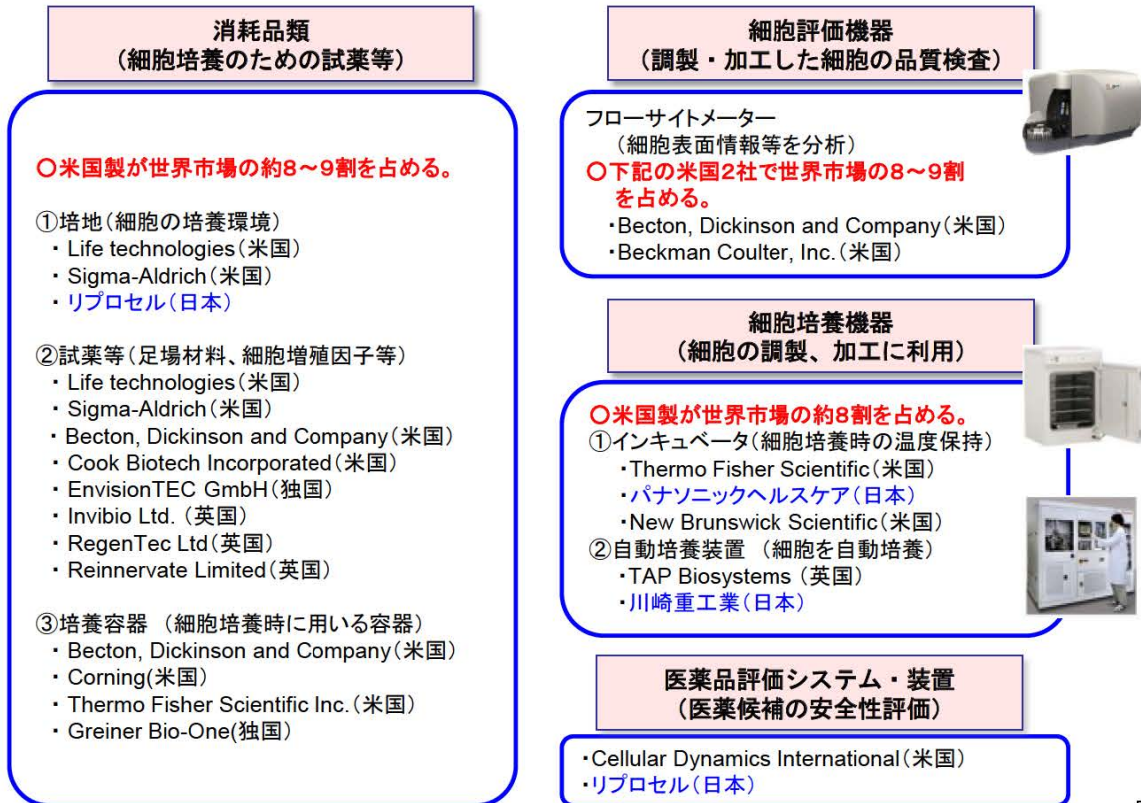
しかしながら、2012年時点では『ヒト幹細胞を利用した再生医療』は産業として確立していない。

本事業によって、治療の一般化や高精度の創薬支援ツール作製を可能とする、『品質および生産性の双方を兼ね備えたヒト幹細胞の実用化技術開発』が達成され、複数種類のヒト幹細胞に対応した自動培養装置・培地・品質評価用装置/試薬・冷凍保存装置などが市場で優位に立ち、数千億円規模のアウトカムが期待できる。

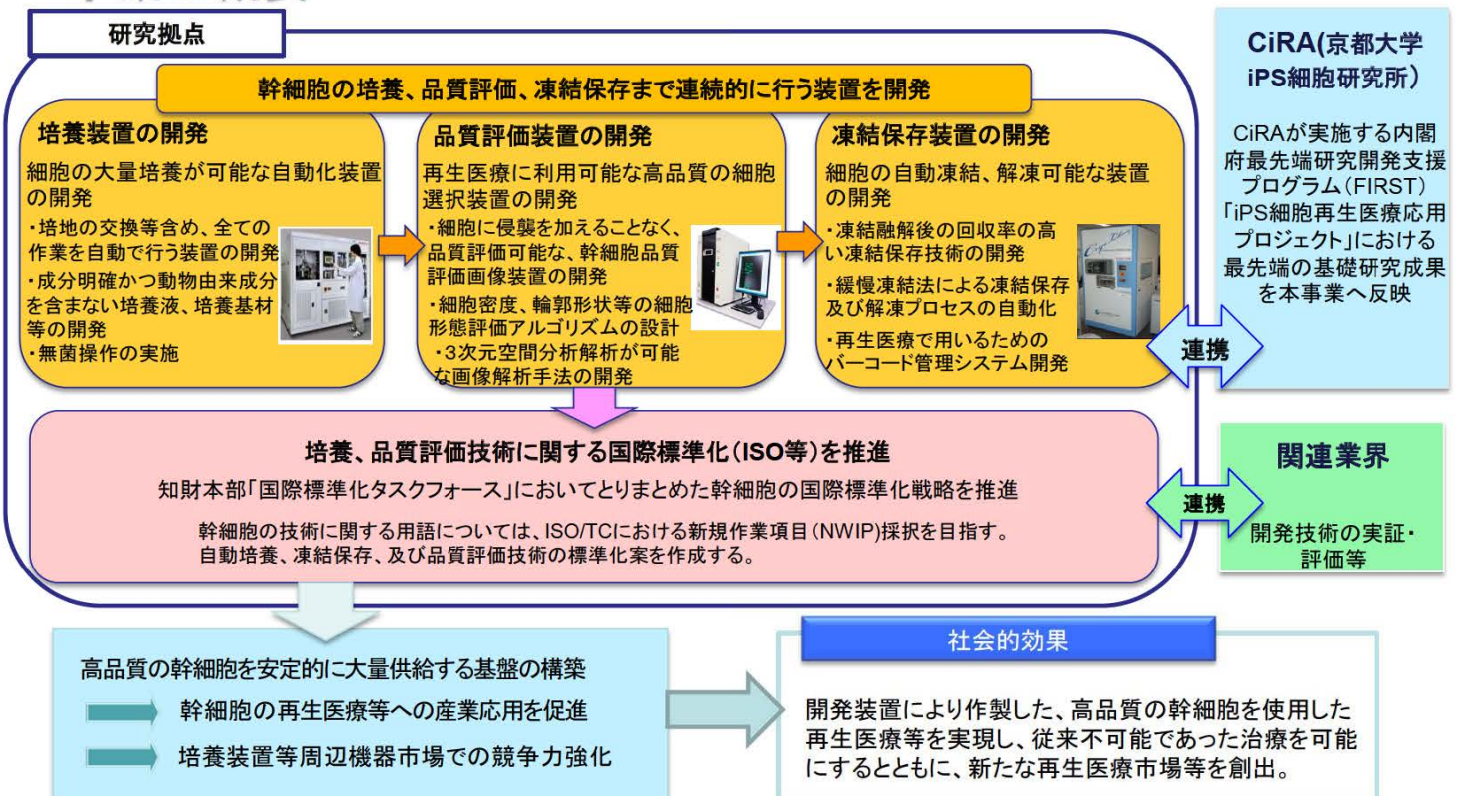
国内外の主な幹細胞・再生医療研究の動向

	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
経済産業省			NEDO幹細胞実用化に向けた評価基盤技術開発PJ 9.4~15億円/年				
		NEDO幹細胞産業応用促進基盤技術開発事業、5~10億円/年					
					再生医療等産業化促進事業(~17)		
文部科学省	再生医療の実現化プロジェクト(03~12)			再生医療実現拠点ネットワークプログラム→			
			再生医療の実現化ハイウェイ(11~)				
厚生労働省	再生医療実用化研究費						
	厚生労働科学研究費補助金						
諸外国	米 国立衛生研究所(NIH)再生医療センター、10~13億ドル/年(02~)						
	EU 第7次研究枠組み計画(FP7)、(07~13)						

再生医療周辺産業分野と参入企業



事業の概要



事業の目標

➤ 【最終目標】(平成27年度)

「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4種以上のヒト幹細胞を、安定的に大量供給可能とするシステムを確立する。

加えて、確立した品質評価技術をベースとするヒト幹細胞の標準化原案を策定する。

➤ 【中間目標】(平成25年度)

ヒト幹細胞の培養操作を自動化した安定培養装置のプロトタイプを完成させるとともに、本装置を用いて複数の異なる性質をもったヒト幹細胞の培養実験を通じて、改良の基礎となる培養液・培養基材のプロトタイプを完成させる。

加えて、細胞から得られる多次元情報の統合によって説明される、ヒト幹細胞の品質管理に有効な評価指標候補を複数策定する。

事業の目標

研究開発の内容	開発内容詳細
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を開発する。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・培養基材を開発する。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併せて行う。
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を開発する。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、2.(1)の技術を用いて継代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を構築するとともに、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を開発する。
③ ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発	2.(1)と2.(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。

サブPJごとの開発項目一覧

○: 該当、-: 該当せず

	iPS 細胞領域	ES 細胞領域	間葉系 細胞領域	滑膜由来間葉系 細胞領域	Muse 細胞領域
① ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発	○	○	-	○	-
② ヒト幹細胞の品質評価指標の開発	○	○	○	○	○
③ ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発	○	○	-	○	-
【評価基準】	標準	標準	基礎・基盤	標準	基礎・基盤

研究開発のスケジュールと予算

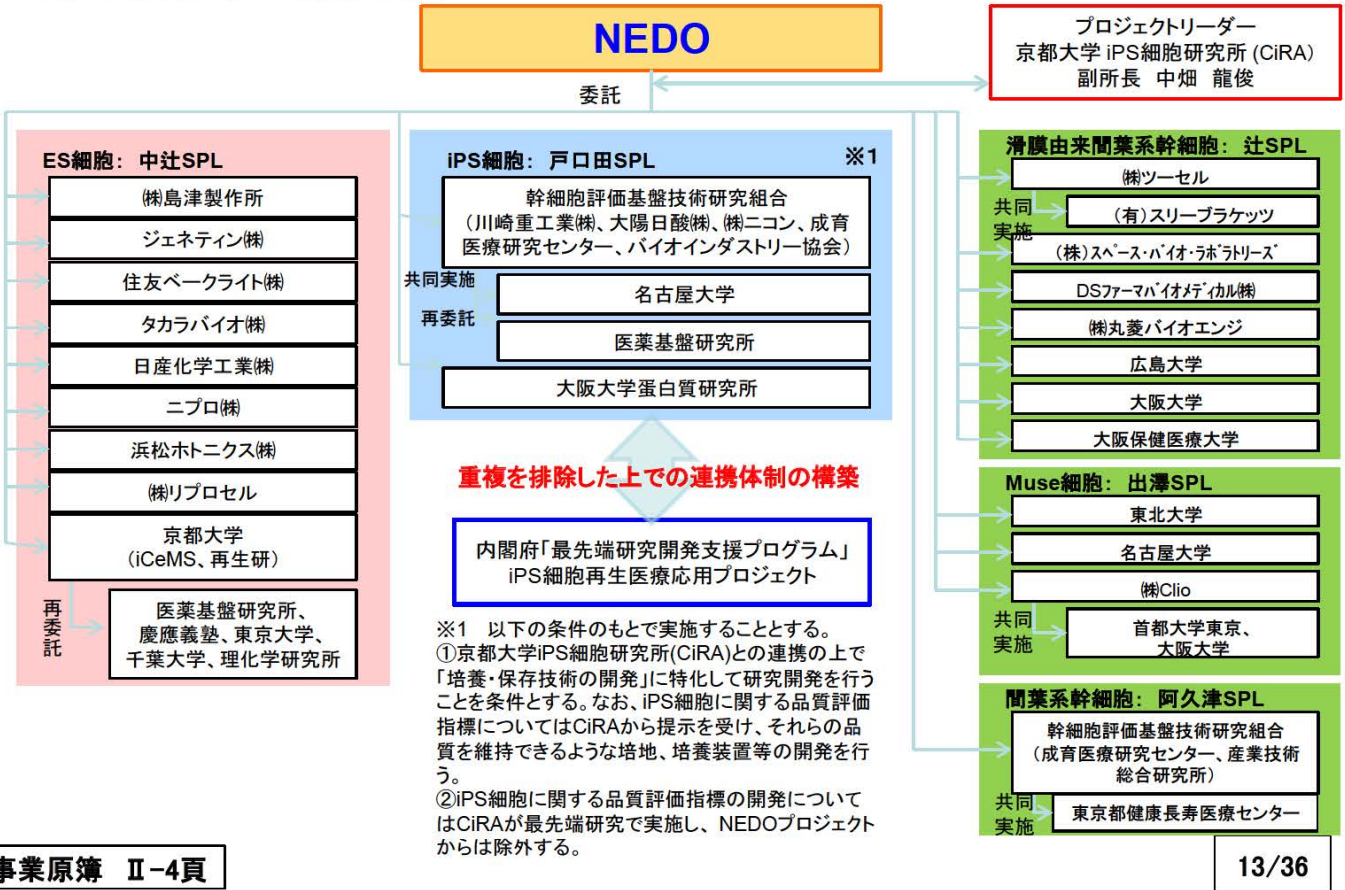
	2010	2011	2012	2013	2014	2015
研究開発予算(百万円)	(1,495) <small>(補正→)</small>	1,586	1222	935	-	-
① ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発						
② ヒト幹細胞の品質評価指標の開発						
③ ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発						

中間評価

2. 研究開発マネジメントについて (3) 研究開発実施の事業体制の妥当性

公開

研究開発の実施体制



2. 研究開発マネジメントについて (3) 研究開発実施の事業体制の妥当性

公開

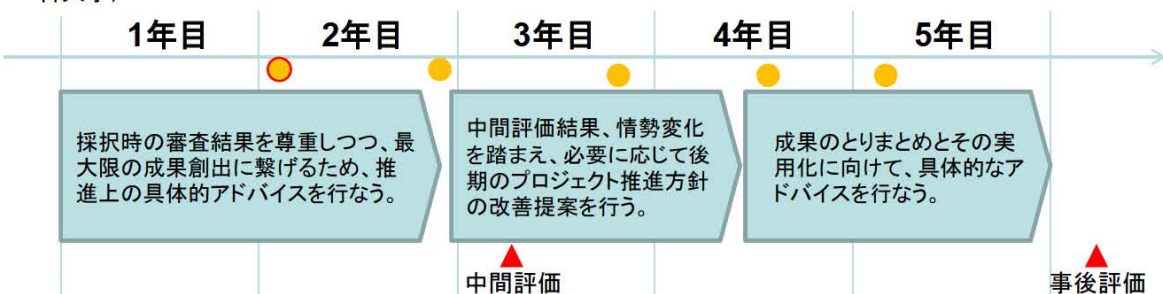
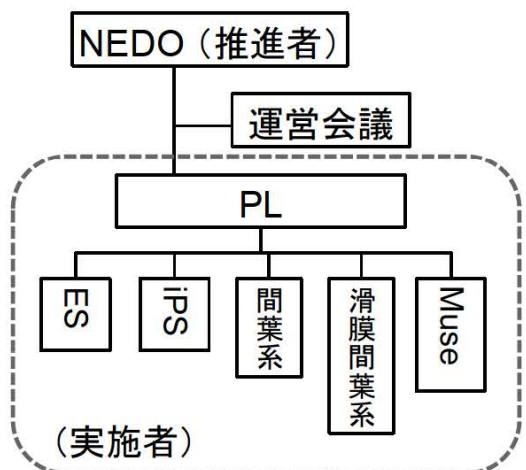
研究開発の運営管理(1/2)

○運営会議の設置

- ✓ 運営会議は、中立的な立場から、プロジェクトをより効率的かつ効果的に遂行するため、プロジェクト全体の運営に対する提言をNEDO及びPL・SPLに行なうことを目的としてNEDO内に設置する。
- ✓ 中立性を保つため、プロジェクトに直接携わらない外部有識者で運営会議を構成するものとする。なお、採択時の審査結果との連続性を担保するため、採択審査委員を複数名、委員に加えることとする。

○運営委員(敬称略、※は採択審査委員)

※齋藤英彦(委員長/名古屋医療センター)、江良拓実(熊本大学)、紀ノ岡正博(大阪大学)、※松岡厚子(国立医薬品食品衛生研究所)、大和雅之(東京女子医科大学)



- 別途、2年目にプロジェクト推進会議を開催し、プロジェクトの進捗、実施計画等の妥当性を確認した。
- 各Grにおいても、開発会議、連絡会等を定期的で開催している。

研究開発の運営管理(2/2)

第1回運営会議(平成25年3月28日開催)

事業全体に関する委員会コメント

- プロジェクトの構成(研究開発項目、体制等)もよく、概ね順調に進捗しており、今後の成果が期待できる。
- サブPJ間での横連携もNEDO主導で企画中とのこと。相乗効果を期待したい。
- 基盤技術を担うサブPJも、目標達成に向けて地道な検討を重ねていただきたい。

各論:委員からのコメント

- iPS細胞領域: 培養装置開発に関わる企業間の連携を深め、CiRAにおけるiPS細胞研究に資する装置となるよう進めていただきたい。
- ES細胞領域: 細胞培養方法、品質評価指標の開発とも順調と判断する。研究成果の製品化も実施され、参画企業と連携した事業化への取り組みを進めていただきたい。
- 間葉系細胞領域: 幹細胞の特性を見極めるためのマーカー探索を進め、測定精度向上や測定手法の汎用化等、基盤技術としての確立を目指していただきたい。
- 滑膜系細胞領域: 最も臨床に近いテーマであることから、求められる細胞を早く臨床に提供できるよう進めていただきたい。
- Muse細胞領域: 安全性が利点と考えられる細胞の基盤技術確立に向けて、着実に進めていただきたい。

知的財産の取り扱いについて

- 「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、全て受託先に帰属させるものとする。
- 各サブPJにおいてはそれぞれ知財に関する規約を定め、実用化に向けた戦略を踏まえて参画企業の権利範囲を明らかにした上で、参画企業とアカデミアの共同で特許出願することを原則としている。

成果の製品化の状況

「ES細胞領域」、「iPS細胞領域」および「滑膜由来間葉系幹細胞領域」の各グループには、技術力と事業化能力を有する複数の企業が参画しており、各社の事業戦略のもと研究成果を製品化している。

「ES細胞領域」

- ・ヒト幹細胞発現遺伝子リアルタイムPCR用プライマーセット:タカラバイオ
- ・接着培養用自動細胞培養装置(プロトタイプ):ニプロ
- ・ヒト幹細胞品質評価用エピジェネティクス自動化システム:ジェネテイン
- ・ヒト幹細胞糖鎖生成ラベル化キット:住友ベークライト

「滑膜由来間葉系幹細胞領域」

- ・滑膜由来間葉系幹細胞培養用培地:DSファーマ

標準化戦略について

- ES細胞領域で、「ヒトES細胞の品質評価技術をベースとした、ヒト幹細胞の標準化原案策定」を実施している。
- iPS細胞領域では、「ヒトiPS細胞に係る技術等の標準化案の策定」を実施している。
- 国際標準化機構(ISO)での新TC設立提案を受け、我が国では一般財団法人バイオインダストリー協会が主管する「幹細胞技術の用語と定義に関する国際規格(案)の作成」に関する委員会に、双方のグループから参画している。
- 本事業の成果を基に、ヒト幹細胞の国際標準化原案策定に貢献する。

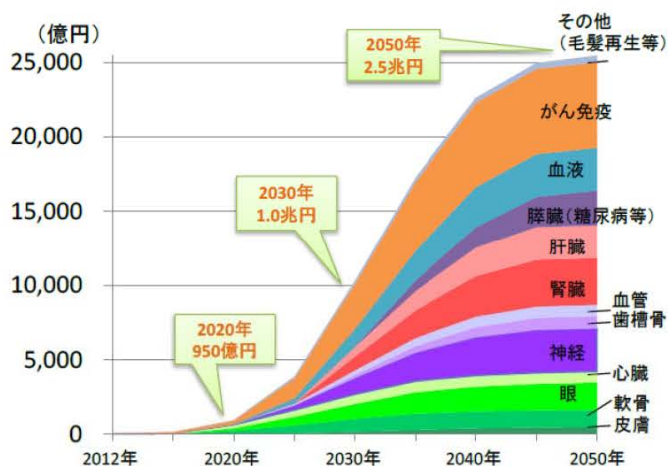
財源の追加について

- 2012年の山中伸弥 教授(京都大学iPS細胞研究所)のノーベル医学生理学賞受賞や、前政権/新政権を通しての再生医療分野を重視した政策など、社会的にもヒト幹細胞・再生医療研究にとって追い風となっている。
- 中間評価の結果を受けて、開発成果創出促進制度(旧:加速等追加配賦制度)による財源の追加を計画中。

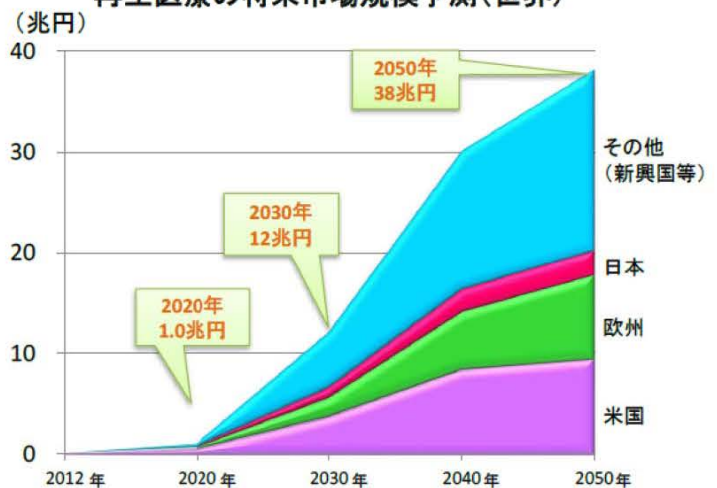
[参考] 再生医療 市場規模(予測)

		2012年	2020年	2030年	2050年
国内の再生医療の市場規模	製品・加工品	90 億円	950 億円	1.0 兆円	2.5 兆円
	周辺産業	170 億円	950 億円	5,500 億円	1.3 兆円
	合計	260 億円	1,900 億円	1.6 兆円	3.8 兆円
世界の再生医療の市場規模	製品・加工品	1,000 億円	1.0 兆円	12.0 兆円	38.0 兆円
	周辺産業	2,400 億円	1.0 兆円	5.2 兆円	15.0 兆円
	合計	3,400 億円	2.0 兆円	17.0 兆円	53.0 兆円

再生医療の将来市場予測 (国内)



再生医療の将来市場規模予測(世界)



健康安心イノベーションプログラム
「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発／
ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」
平成22(2010)年度～平成27(2014)年度 6年間
(中間評価)

プロジェクトの概要

3. 研究開発成果について 4. 実用化・事業化に向けての見通し および取り組みについて

NEDO

バイオテクノロジー・医療技術部

2012年6月26日

21/36

発表内容

公開

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1. 事業の位置付け・必要性について | (1) NEDOの事業としての妥当性
(2) 事業目的の妥当性 |
| 2. 研究開発マネジメントについて | (1) 研究開発目標の妥当性
(2) 研究開発計画の妥当性
(3) 研究開発実施の事業体制の妥当性
(4) 研究開発成果の実用化・事業化に向けた
マネジメントの妥当性
(5) 情勢変化への対応等 |
| 3. 研究開発成果について | (1) 目標の達成度と成果の意義
(2) 知的財産権等の取得および
標準化の取り組み
(3) 成果の普及
(4) 成果の最終目標の達成可能性 |
| 4. 実用化・事業化に向けての見通し
および取り組みについて | (1) 成果の実用化・事業化の見通し
(2) 実用化・事業化に向けた具体的取り組み |

22/36

3. 研究開発成果について (1)(中間)目標の達成度

(1)個別研究開発項目の目標と達成状況

	目標	成果	達成度	今後の課題
1) ヒトES細胞領域 ヒトES細胞の安定な培養・保存技術の開発、品質評価指標及び品質評価技術と安定供給技術の開発	閉鎖系自動培養システムの構築、低分子化合物を用いた新規培地開発、三次元培養法、凍結保存法及び細胞の品質評価指標ならびに検定技術の開発	閉鎖系自動培養装置の開発に成功した。また、bFGF代替低分子候補化合物を見出し、DMSOを用いない緩慢凍結法に成功した。更にヒト幹細胞関連発現遺伝子プロファイルキットならびにヒト幹細胞糖鎖解析キットを商品化した。	◎	①新規三次元スフェア培養法を組み込んだ閉鎖系自動化培養装置の開発 ②三次元大量培養を可能にするための培養基質および培養基材の開発 ③イメージング技術による生細胞検査技術の開発 ④ヒト幹細胞技術標準化に関するシステム構築 ⑤標準的な分化誘導法のプロトコルとキット構築
2) iPS細胞領域 安定した細胞培養に必要な自動培養装置、凍結保存装置の開発及び細胞の安定供給に最適化した培養基材および培地の開発	細胞培養、コロニー選別、凍結保存までの過程を全自動で処理できるシステム作りならびに自動培養装置に適した培地、培養容器などの開発	自動培養装置の性能評価機が完成するとともに、自動培養装置の培養に適した培地、培養基剤、培養容器などのプロトタイプが開発できた。	◎	①培養量の増大ならびに処理速度の向上 ②培養装置の小型化 ③バッグを用いた浮遊培養の自動化 ④細胞評価指標の規格化 ⑤高機能型培養基剤開発
3) 滑膜細胞領域 滑膜由来間葉系幹細胞の大量培養基盤技術・細胞保存技術の開発	培地原料のアニマルフリー化と大量培養法の樹立及び大量培養の自動化を可能とする培養装置のプロトタイプ試作	厚生労働省告示の「生物由来原料基準」の規定を満たす原材料のみを使用する無血清培地を開発し、その培地による大量培養法の樹立及び自動培養装置設計に必要な情報を入手した。	○	①GMP適応培地製造法の樹立 ②自動大量培養装置の試作と細胞の品質評価法樹立

事業原簿 III-1-3 III-2-4~6 III-3-6

◎ 大幅達成、○達成、△達成見込み、×未達

23/36

3. 研究開発成果について (1)(中間)目標の達成度

(1)個別研究開発項目の目標と達成状況

	目標	成果	達成度	今後の課題
4) 間葉系細胞領域 由来の異なる間葉系幹細胞の細胞品質管理マーカーの確立と細胞カタログデータ構築	マーカーの抽出と効果的な治療の設計や効果の検証などに応用できる細胞品質カタログデータの構築	増殖能と分化能評価マーカー候補を見出し、品質カタログデータのプロトタイプを作成した	○	①品質評価指標となるマーカーの獲得 ②品質カタログデータを構築し、品質・特性判定キットの基盤を作る。
5) Muse細胞領域 Muse細胞の評価基盤技術に基づく、再生医療に向けた培養・評価装置の研究開発	Muse細胞の遺伝子・蛋白質発現解析、評価指標開発及び細胞抽出・分離・培養技術のインブルーメント	従来のFACS法に改良を加えると共に細胞ソースを変えることで、より簡便かつ効率的にMuse細胞を分離できる技術基盤ができた。	○	①臨床応用に適した細胞分離・抽出法ならびにXeno-freeな培養法の樹立。 ②細胞分離ならびに細胞機能を評価しうるマーカーの同定

◎ 大幅達成、○達成、△達成見込み、×未達

事業原簿 III-4-3 III-5-6

24/36

事業目標

- ・ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発
- ・ヒト幹細胞の品質評価指標の開発
- ・ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発

成果

- ・安定的な培養を実現するために、自動培養装置の試作機及び機能評価機を開発した。また、生物由来成分を含まない培地及び培養基材等を開発すると共に、細胞の凍結保存についても基盤技術が構築出来た。本プロジェクトで開発された新規培養基材の一部については、プロジェクト内での横断的技術活用がなされた。
- ・細胞の分化能・増殖能に関連する複数のマーカー候補がそれぞれの細胞種において見いだされ、一部のマーカーについては測定器が商品化された。また、新たに見いだされたマーカーの一部については横断的技術活用を目的に種々の幹細胞における評価を開始した。更に、特定の細胞種において形態評価を基本とする非侵襲的なコロニー評価技術も開発できた。
- ・以上より、中間評価までの目標については、プロジェクト全体を通じてほぼ達成出来たと判断される。新たに開発された装置・技術等については更なる検証を行い、商品化を目指す。

事業原簿 III-1-3 III-2-4~6 III-3-6
III-4-3 III-5-6

25/36

3. 研究開発成果について (2)成果の意義

公開

ヒトES細胞領域の成果

事業原簿 III-1-4~
46

(1)培養増殖方法

【成果】ヒトES細胞維持に必須のbFGFを代替する低分子化合物候補化合物を見出した。また、ゼノフリーの合成培地を開発中。

(2)大量培養と品質管理

【成果】従来の世界標準である接着培養法で、閉鎖系培養バッグを用いて、培地交換や継代を自動化した培養装置の開発に成功した。更に大量培養を可能にする新規三次元スフェア培養法を開発した。

(3)細胞株の品質評価選別法

【成果】国際データベース等を活用したゲノム品質指標を設定し、解析技術関係ではヒト幹細胞エピゲノム自動解析システムの開発に成功した。またヒト幹細胞関連発現遺伝子プロファイルキットならびにヒト幹細胞糖鎖解析キットを商品化した。

(4)分化誘導、目的細胞の選択と選別、大量生産供給

【成果】外胚葉(神経系細胞)、中胚葉(血球系細胞、心筋細胞)及び内胚葉(肝臓細胞など)への分化能と分化指向性の評価を行い、株により分化能及び分化指向性に違いがあることを見出した。



接着細胞用自動培養装置



エピゲノム自動解析システム

ヒト幹細胞関連発現遺伝子
プロファイルキット

ヒト幹細胞糖鎖解析キット

26/36

iPS細胞領域の成果

(1)ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発

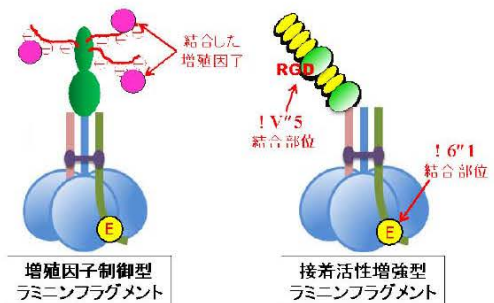
【成果】自動培養装置と連動した自動凍結保存装置の試作を完了。SNLを用いたヒトiPS細胞の培養において、予備凍結、凍結保存、解凍、再培養の一連の自動化処理評価試験を終了した。

(2)安定供給に最適な培養基材及び培地の開発

【成果】2種類の改良型ラミニン活性フラグメントのプロトタイプを作製した。また、プレコートしたラミニン活性フラグメントの活性を長期間安定に保持する条件を見出した

(3)ヒトiPS細胞に係る技術等の標準化案の策定

【成果】用語の国際標準化主導に向けて、国内体制の基盤を構築した。技術動向調査により本プロジェクト開発目標を確認した。



滑膜細胞領域の成果

(1)大量培養基盤技術の開発

①無血清培地の開発

【成果】「生物由来原料基準」(平成15年厚生労働省告示210号)の規定を満たす原材料のみを使用した無血清培地を開発した。その培地を用い、細胞増殖率が有血清培地に比べ100倍以上、培養期間が1/3に短縮できる培養法を開発した。

②大量培養技術の開発

【成果】無血清培地と新培養法による大量培養技術基盤が構築できた。

③評価基盤技術の開発

【成果】滑膜由来間葉系幹細胞特定遺伝子マーカーの発現レベルを継代培養毎に調査し、細胞の品質評価用となり得る遺伝子マーカーを選定した。

(2)細胞保存基盤技術の開発

【成果】1年保存時細胞生存率70%以上に維持できる細胞保存技術を開発した。

3. 研究開発成果について (2)成果の意義

Muse細胞領域の成果

(1) Muse細胞の抽出・分離・培養技術のインプルーブメント

【成果】FACSIによるMuse細胞の「標準的な採取・確認」のポイントが明らかになってきた。

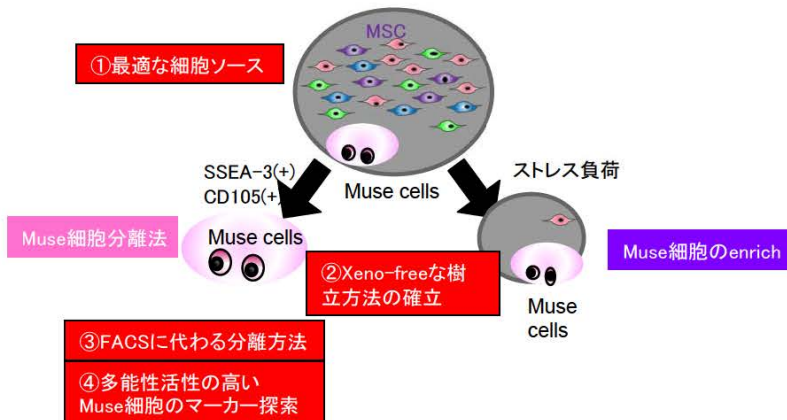
(2) Xeno-freeでのMuse細胞樹立方法の確立

【成果】ウシ血清を使わず、なおかつMuse細胞の多能性を失わない樹立方法を確立した。

(3) 最適な細胞ソースの検討

【成果】細胞ソース(骨髄、脂肪など)によって目的とする細胞への分化パターンが異なり、最適な細胞ソースを選択することで、より効率的に目的とする細胞を得ることができることが明らかになってきた。

(4) その他: 国内外数施設においてMuse細胞の再現性が示された。



3. 研究開発成果について (2)成果の意義

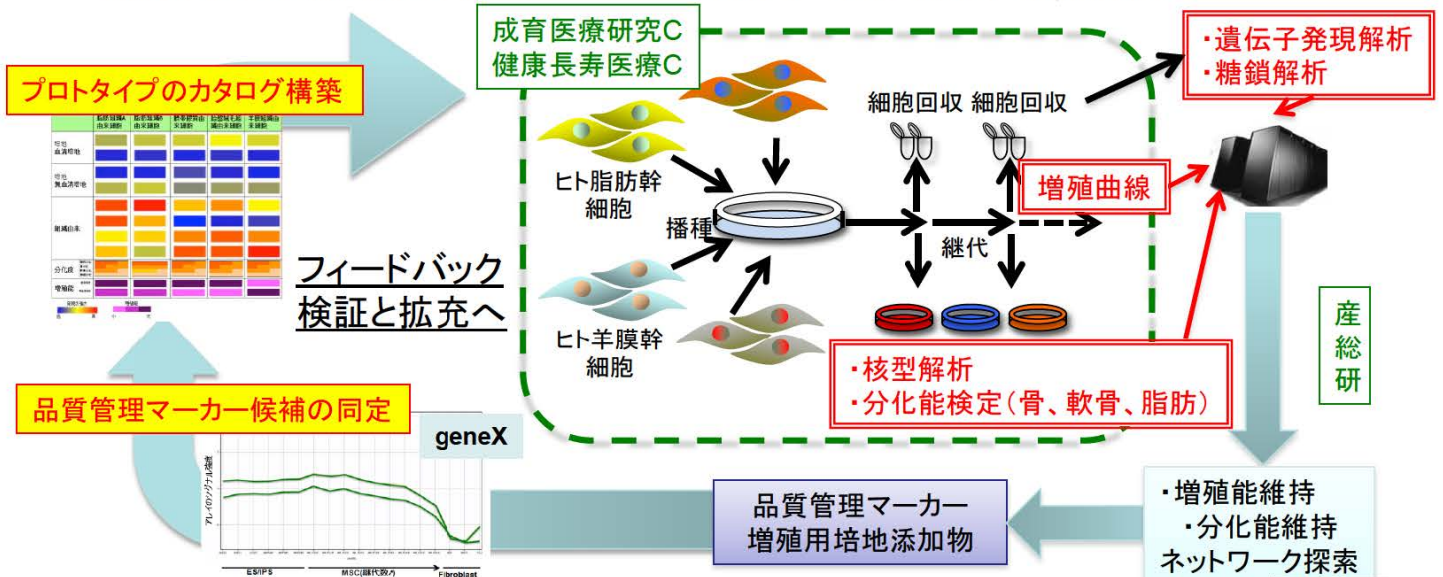
間葉系細胞領域の成果

(1) 間葉系幹細胞品質管理マーカーの確立

【成果】細胞品質管理項目データ(増殖曲線、分化能、遺伝子発現、糖鎖修飾等)を抽出し、細胞増殖能と生存率、培養期間の妥当性、細胞の安定性評価に関するデータを元に幹細胞の増殖能と分化能低下の状態を評価する品質管理マーカー候補を同定した。

(2) 間葉系幹細胞品質カタログデータの構築(間葉系幹細胞培地の開発)

【成果】間葉系幹細胞の増殖能と細胞の分化能低下の状態を評価する分子マーカー候補を抽出し、それらの発現量などをスコア化する事で、間葉系幹細胞品質カタログデータのプロトタイプを構築した。



(3) 知的財産権、成果の普及

平成23年4月～平成25年6月

	iPS細胞領域	ヒトES細胞領域	滑膜細胞領域	間葉系細胞領域	Muse細胞領域
特許出願(うち外国出願)	1(0)	9(5)	5(0)	4(0)	5(1)
論文(査読付き)	2	5	0	6	24
その他	29	57	36	15	70
計	32	71	41	25	99

事業原簿 Ⅲ-1-4 Ⅲ-2-69 Ⅲ-3-4
Ⅲ-4-10 Ⅲ-5-21

※ 平成25年6月26日現在 31/36

成果の公表(一例)

ヒトES細胞領域

- ・平成24年11月27日 日刊工業新聞(iPS・ES細胞の大量培養装置を開発)
- ・平成24年12月3日 米CBSテレビ「[World Stem Cell Summit Fuels Economy](#)」
- ・平成24年12月4日 フジテレビ「[「世界幹細胞サミット」開幕](#)」
- ・平成25年2月6日 日刊工業新聞(「[エピゲノム](#)」自動解析システム開発)
- ・平成25年4月12日 日刊工業新聞([ヒト幹細胞の糖鎖を解析するキット開発](#))

iPS細胞領域

- ・平成24年10月6日「日本経済新聞」「iPS細胞効率よく作製 ニコンや島津再生医療装置」(川崎重工業にも言及)
- ・平成24年10月9日 川崎重工業(株)においてiPS細胞自動培養装置開発の共同取材⇒多数のプレス、テレビで報道
- ・平成25年1月15日「日経産業新聞」「幹細胞評価基盤技術研究組合 IPS細胞の凍結装置 上 解凍後の生存率7割超」(組合のPJ概要表も掲載)
- ・平成25年1月16日 日経産業新聞「幹細胞評価基盤技術研究組合 IPS細胞の凍結装置 下 培養法の標準技術標準」(阪大の成果を紹介)
- ・平成25年5月9日 大陽日酸(株)がiPS細胞の凍結保存装置開発でプレスリリース

★テレビ

平成25年2月3日 TBS全国ネット「夢の扉+」川崎重工業(株) 中嶋勝己氏にスポットを当て、iPS細胞の自動培養装置開発の取組みを紹介

間葉系領域

平成24年10月10～12日

バイोजアパン2012(パシフィック横浜)本プロジェクトの成果を紹介

●平成23年10月13～14日

●平成24年10月25～26日

産総研オープンラボ(産総研つくばセンター)において本プロジェクトの成果を紹介

★パンフレット

●平成24年7月

「幹細胞評価基盤技術研究組合要覧」発行→プロジェクトの紹介

●平成24年8月

産総研TODAY(8月号)「幹細胞の評価基盤技術開発に向けたアプローチ」を投稿

★プレス

平成25年3月19日 産総研がプレスリリース「レクチンプローブの開発」→多数紙で報道

3. 研究開発成果について (5) 成果の最終目標の達成可能性

	目標	課題	達成可能性
ヒトES細胞領域	①低分子化合物による合成培地の開発 ②自動培養装置を用いた大量培養法確立 ③生細胞検査技術の確立 ④DMSOを用いない細胞凍結保存液と保存容器の開発 ⑤ヒトES細胞の品質評価法開発を目指した、分子生物学的情報取得及び解析技術の開発 ⑥ヒトES細胞の品質評価法開発を目指した、分化誘導法の確立	①候補低分子化合物の最適化 ②三次元スフェア培養装置の試作 ③試作装置の小型化・処理速度の向上 ④候補化合物の選定と保存容器の試作品設計 ⑤細胞品質評価法の自動化ならびにデータベース構築 ⑥品質保証された大量培養細胞株での分化能及び安全性評価法確立	○
iPS細胞領域	①装置の小型化を図り自動培養装置とマッチングさせた一連の自動化装置において、ヒトiPS細胞を安定的に自動凍結・解凍可能なシステムを確立する。 ②幹細胞の大量培養に適した高機能ラミニン活性フラグメントの完成 ③ヒトiPS細胞に係る技術等の標準化案の策定	①自動培養装置と画像解析装置・凍結保存装置の連動、試料の収納数増加への対応と装置全体の小型化 ②国内培地メーカーと連携して本フラグメントに最適化させた組成の培地を共同開発 ③CiRAと協調して確立した「ヒトiPS細胞の大量培養、凍結保存・解凍技術」をもとに標準化案の骨子を作成	○
滑膜細胞領域	①大量培養培地の開発 ②大量培養システムの構築 ③培養細胞評価基盤技術の確立 ④細胞保存液及び保存法の開発	①200L以上の大量生産が可能な技術の確立と生産された細胞の品質確認 ②播種から細胞回収までを自動化した大量培養システムの提案 ③未分化性の維持を評価する遺伝子マーカーの特定 ④動物由来成分を含まず、生存率80%以上で2年間保存できる保存法開発	○

事業原簿 Ⅲ-1-47 Ⅲ-2-5 Ⅲ-3-4

◎ 大幅達成、○達成、△達成見込み、×未達

33/36

3. 研究開発成果について (5) 成果の最終目標の達成可能性

	目標	課題	達成可能性
Muse細胞領域	①第三者評価 ②Muse細胞のcharacterization	①間葉系幹細胞を利用する第三者による客観的な評価を行う ②臨床応用に適した細胞ソースの決定、より効率的で、商業ベースに乗るMuse細胞の樹立方法の確立、臨床応用に適した分離方法の検討、分離に適した新たなマーカーの同定	○
間葉系領域	①間葉系幹細胞品質管理マーカーの確立 ②間葉系幹細胞品質カタログデータの構築	①細胞再生医療に関する間葉系幹細胞の品質管理上の判定基準の提示及び前臨床研究への応用 ②無血清及び成分組成明確な間葉系幹細胞培地の製品化	○

◎ 大幅達成、○達成、△達成見込み、×未達

事業原簿 Ⅲ-4-12 Ⅲ-5-7

34/36

領域	実用化、事業化の評価基準
ES細胞領域	<p>①再生医療や創薬スクリーニング等に用いるヒトES細胞等の多能性幹細胞を安定的かつ大量に供給するために、本プロジェクトの成果を基に自動培養技術、凍結保存技術を組み合わせたシステム等が製品化されること</p> <p>②各事業者が個々に保有する自動培養装置、細胞観察装置、凍結保存装置等の既製品に本プロジェクトの成果を取り込んだ改良品が製品化されること</p> <p>③幹細胞の特性解析及び品質評価に関する標準化技術を開発すると共に、ゲノム解析、エピゲノム解析、糖鎖解析、メタボローム解析及び分化能解析の標準的プロトコルを確立し、試薬等として製品化されること</p>
iPS細胞領域	<p>①再生医療や創薬スクリーニングに用いるヒトiPS細胞を京都大学iPS細胞研究所プロトコルに基づき安定的かつ大量に供給するため、本プロジェクトの成果を基に自動培養技術、細胞観察評価技術、凍結保存技術を組み合わせたシステム等が製品化されること</p> <p>②各事業者が個々に保有する自動培養装置、細胞観察装置、凍結保存装置等の既製品に本プロジェクトの成果を取り込んだ改良品が製品化されること</p>
滑膜細胞領域	本プロジェクトの成果である培地、大量培養技術等を用いて細胞の大量培養が行われると共に、これが臨床治験において利用されること
Muse細胞領域	第三者による細胞利用が容易に行える細胞の分離・採取・培養法が確立されること
間葉系領域	<p>①本プロジェクトの成果を基に構築された細胞品質カタログデータが幹細胞に係わる研究者や再生医療に係る医師等に利用されること</p> <p>②プロジェクトの成果として得られた細胞バイオマーカー等に関する特許が民間企業にライセンスされること</p>

事業原簿 Ⅲ-0-4

35/36

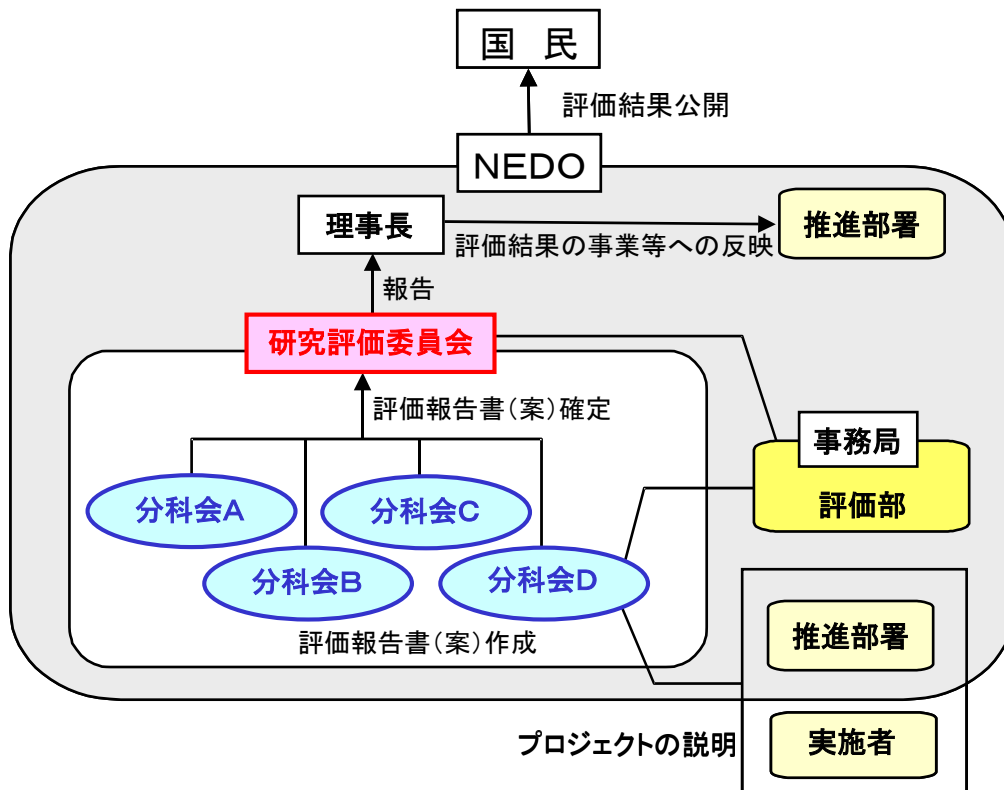
実用化項目	成果の実用化可能性	実用化までのシナリオ
ヒトES細胞領域 ①代替合成化合物による合成培地開発 ②ヒトES細胞の三次元培養を可能にする培養基質・基材開発 ③閉鎖系細胞培養容器と三次元培養法を組み合わせたヒトES細胞培養法開発 ④ヒトES細胞の品質評価法開発を目指した、分子生物学的情報の取得、解析	○	①第一世代化合物の最適化を図り商品化化合物を開発 ②機能性ポリマー及びナノファイバーの応用検討 ③三次元スフェア培養自動培養装置のプロトタイプ開発 ④ヒトES細胞品質評価系確立ならびに品質管理データベースシステム構築
iPS細胞領域 ①幹細胞自動培養装置 ②幹細胞培養基材	○	①自動培養装置と細胞自動凍結・解凍装置及び細胞評価画像解析装置の連携を図り製品化する。 ②企業へのライセンスアウトを経てcGMP規格の組換え蛋白質を製造・販売する
滑膜細胞領域 ①軟骨再生治療用の細胞源として利用可能な品質を担保したヒト滑膜由来MSCを安定的に大量供給する技術の開発	○	①無血清培地の安全性確認、培養細胞の安全性・有効性評価(非臨床・臨床)、大量培養及び製剤化の自動化、低コスト品質評価技術の開発・実用化

参考資料 1 評価の実施方法

本評価は、「技術評価実施規程」（平成 15 年 10 月制定）に基づいて研究評価を実施する。

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）における研究評価の手順は、以下のように被評価プロジェクトごとに分科会を設置し、同分科会にて研究評価を行い、評価報告書（案）を策定の上、研究評価委員会において確定している。

- 「NEDO 技術委員・技術委員会等規程」に基づき研究評価委員会を設置
- 研究評価委員会はその下に分科会を設置



1. 評価の目的

評価の目的は「技術評価実施規程」において。

- 業務の高度化等の自己改革を促進する
- 社会に対する説明責任を履行するとともに、経済・社会ニーズを取り込む
- 評価結果を資源配分に反映させ、資源の重点化及び業務の効率化を促進する

としている。

本評価においては、この趣旨を踏まえ、本事業の意義、研究開発目標・計画の妥当性、計画を比較した達成度、成果の意義、成果の実用化の可能性等について検討・評価した。

2. 評価者

技術評価実施規程に基づき、事業の目的や態様に即した外部の専門家、有識者からなる委員会方式により評価を行う。分科会委員選定に当たっては以下の事項に配慮して行う。

- 科学技術全般に知見のある専門家、有識者
- 当該研究開発の分野の知見を有する専門家
- 研究開発マネジメントの専門家、経済学、環境問題、国際標準、その他社会的ニーズ関連の専門家、有識者
- 産業界の専門家、有識者

また、評価に対する中立性確保の観点から事業の推進側関係者を選任対象から除外し、また、事前評価の妥当性を判断するとの側面にかんがみ、事前評価に関与していない者を主体とする。

これらに基づき、分科会委員名簿にある7名を選任した。

なお、本分科会の事務局については、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構評価部が担当した。

3. 評価対象

平成22年度に開始された「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発／ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」プロジェクトを評価対象とした。

なお、分科会においては、当該事業の推進部署から提出された事業原簿、プ

プロジェクトの内容、成果に関する資料をもって評価した。

4. 評価方法

分科会においては、当該事業の推進部署及び実施者からのヒアリングと、それを踏まえた分科会委員による評価コメント作成、評点法による評価及び実施者側等との議論等により評価作業を進めた。

なお、評価の透明性確保の観点から、知的財産保護の上で支障が生じると認められる場合等を除き、原則として分科会は公開とし、実施者と意見を交換する形で審議を行うこととした。

5. 評価項目・評価基準

分科会においては、次に掲げる「評価項目・評価基準」で評価を行った。これは、NEDOが定める「標準的評価項目・評価基準」（参考資料 1-9 頁参照）をもとに、当該事業の特性を踏まえ、評価事務局がカスタマイズしたものである。

プロジェクト全体に関わる評価について、主に事業の目的、計画、運営、達成度、成果の意義、実用化に向けての見通しや取り組み等を評価した。

評価項目・評価基準

1. 事業の位置付け・必要性について

(1) NEDO の事業としての妥当性

- ・ 健康安心イノベーションプログラムの目標達成のために寄与しているか。
- ・ 民間活動のみでは改善できないものであること、又は公共性が高いことにより、NEDO の関与が必要とされる事業か。
- ・ 当該事業を実施することによりもたらされる効果が、投じた予算との比較において十分であるか。

(2) 事業目的の妥当性

- ・ 内外の技術開発動向、国際競争力の状況、市場動向、政策動向、国際貢献の可能性等から見て、事業の目的は妥当か。

2. 研究開発マネジメントについて

(1) 研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断できる具体的かつ明確な開発目標を設定しているか。

(2) 研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマごとの配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3) 研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 適切な研究開発実施体制になっており、指揮命令系統及び責任体制が明確になっているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携が十分に行われ

る体制となっているか。

- ・ 知的財産取扱（実施者間の情報管理、秘密保持、出願・活用ルール含む）に関する考え方は整備され、適切に運用されているか。

(4) 研究開発成果の実用化・事業化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化・事業化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化・事業化シナリオに基づき、成果の活用・実用化の担い手、ユーザーが関与する体制を構築しているか。
- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダーが選任されている場合、成果の実用化・事業化シナリオに基づき、適切な研究開発のマネジメントが行われているか。
- ・ 成果の実用化・事業化につなげる知財戦略（オープン／クローズ戦略等）や標準化戦略が明確になっており、かつ妥当なものか。

(5) 情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向等に機敏かつ適切に対応しているか。

3. 研究開発成果について

(1) 目標の達成度と成果の意義

- ・ 成果は目標を達成しているか。
- ・ 成果は将来的に市場の拡大あるいは市場の創造につながることで期待できるか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。
- ・ 目標未達成の場合、達成できなかった原因が明らかで、かつ目標達成までの課題を把握し、この課題解決の方針が明確になっているなど、成果として評価できるか。
- ・ 設定された目標以外に技術的成果があれば付加的に評価する。
- ・ 世界初、世界最高水準、新たな技術領域の開拓、又は汎用性のある成果については、将来の産業につながる観点から特に顕著な成果が上がっている場合は、海外ベンチマークと比較の上で付加的に評価する。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 大学又は公的研究機関で企業の開発を支援する取り組みを行った場合には、具体的に企業の取り組みに貢献しているか。

(2) 知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、又は実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(3) 成果の普及

- ・ 論文等の対外的な発表は、将来の産業につながる観点から戦略的に行われているか。
- ・ 成果の活用・実用化の担い手・ユーザー等に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

(4) 成果の最終目標の達成可能性

- ・ 最終目標を達成できる見込みか。
- ・ 最終目標に向け、課題とその解決の道筋が明確に示され、かつ妥当なものか。

4. 実用化・事業化に向けての見通し及び取り組みについて

プロジェクト全体は、各研究開発項目の評価基準をもとに総合的に判断する。

研究開発項目「ES 細胞領域」、「iPS 細胞領域」、「滑膜由来間葉系幹細胞領域」については、以下の評価基準を用いる。

本項目における「実用化・事業化」の考え方

・ES 細胞領域

再生医療や創薬スクリーニング（これらに関わる研究用途含む）に用いるヒト ES 細胞等の多能性幹細胞を安定的かつ大量に供給するため、本プロジェクトの成果を基に自動培養技術、細胞観察評価技術、凍結保存技術を組み合わせたシステム等が製品化されること。或いは各事業者が個々に保有する自動培養装置、細胞観察装置、凍結保存装置等の既製品に本プロジェクトの成果を取り込んだ改良品が製品化されること。

また、ヒト ES 細胞等の多能性幹細胞の特性解析及び品質評価に関する標準化技術を開発すると共に、ゲノム解析、エピゲノム解析、糖鎖解析、メタボローム解析および分化能解析の標準的プロトコルを確立し、さらには試薬等として製品化されること。

・iPS 細胞領域

再生医療や創薬スクリーニング（これらに関わる研究用途含む）に用いるヒト iPS 細胞を京都大学 iPS 細胞研究所（CiRA）プロトコルに基づき安定的かつ大量に供給するため、本プロジェクトの成果を基に自動培養技術、細胞観察評価技術、凍結保存技術を組み合わせたシステム等が製品化されること。或いは各事業者が個々に保有する自動培養装置、細胞観察装置、凍結保存装置等の既製品に本プロジェクトの成果を取り込んだ改良品が製品化されること。

・滑膜由来間葉系幹細胞領域

本プロジェクトの成果である培地、大量培養技術等を用いて細胞の大量培養が行われると共に、これが臨床治験において利用されること。

(1) 成果の実用化・事業化の見通し

- ・ 産業技術としての見極め（適用可能性の明確化）ができているか。
- ・ 実用化に向けて課題が明確になっているか。課題解決の方針が明確になっているか。
- ・ 成果は市場やユーザーのニーズに合致しているか。
- ・ 実用化に向けて、競合技術と比較し性能面、コスト面を含み優位性は確保される見通しはあるか。
- ・ 量産化技術が確立される見通しはあるか。
- ・ 事業化した場合に対象となる市場規模や成長性等により経済効果等が見込めるものとなっているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備

に向けた見通しが得られているか。

- ・ プロジェクトの直接の成果ではないが、特に顕著な波及効果(技術的・経済的・社会的効果、人材育成等)がある場合には付加的に評価する。

(2) 実用化・事業化に向けた具体的取り組み

- ・ プロジェクト終了後において実用化・事業化に向けて取り組む者が明確になっているか。また、取り組み計画、事業化までのマイルストーン、事業化する製品・サービス等の具体的な見通し等は立っているか。

研究開発項目「Muse 細胞領域」及び「間葉系幹細胞領域」については、以下の評価基準を用いる。

本項目における「実用化」の考え方

・ Muse 細胞領域

第三者による細胞利用が容易に行える細胞の分離・採取・培養法が確立されること。

・ 間葉系幹細胞領域

本プロジェクトの成果を基に構築された細胞品質カタログデータが幹細胞に係る研究者や再生医療に係る医師等に利用されること。或いは本プロジェクトの成果として得られた細胞バイオマーカー等に関する特許が民間企業にライセンスされること。

(1) 成果の実用化の見通し

- ・ 実用化イメージに基づき、課題及びマイルストーンが明確になっているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。
- ・ プロジェクトの直接の成果ではないが、特に顕著な波及効果(技術的・経済的・社会的効果、人材育成等)がある場合には付加的に評価する。

(2) 実用化に向けた具体的取り組み

- ・ 成果の実用化に向けて、誰がどのように引き続き研究開発に取り組むのか明確になっているか。

はじめに

本「標準的評価項目・評価基準」は、「技術評価実施規程」に定める技術評価の目的※を踏まえ、NEDOとして評価を行う上での標準的な評価項目及び評価基準として用いる。

本文中の「実用化・事業化」に係る考え方及び評価の視点に関しては、対象となるプロジェクトの特性を踏まえ必要に応じ評価事務局がカスタマイズする。

※「技術評価実施規程」第5条(技術評価の目的) ①業務の高度化等自己改革の促進、②社会への説明責任、経済・社会ニーズの取り込み、③評価結果の資源配分反映による、資源の重点化及び業務の効率化促進

なお「評価項目」、「評価基準」、「評価の視点」は、以下のとおり。

- ◆評価項目：「1. . . .」
- ◆評価基準：上記、各項目中の「(1)」
- ◆評価の視点：上記、各基準中の「・」

評価項目・基準・視点

1. 事業の位置付け・必要性について

(1) NEDOの事業としての妥当性

- ・ 特定の施策（プログラム）、制度の下で実施する事業の場合、当該施策・制度の目標達成のために寄与しているか。
- ・ 民間活動のみでは改善できないものであること、又は公共性が高いことにより、NEDOの関与が必要とされる事業か。
- ・ 当該事業を実施することによりもたらされる効果が、投じた予算との比較において十分であるか。

(2) 事業目的の妥当性

- ・ 内外の技術開発動向、国際競争力の状況、エネルギー需給動向、市場動向、政策動向、国際貢献の可能性等から見て、事業の目的は妥当か。

2. 研究開発マネジメントについて

(1) 研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断できる具体的かつ明確な開発目標を設定しているか。

(2) 研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマごとの配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3) 研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 適切な研究開発実施体制になっており、指揮命令系統及び責任体制が明確になっているか。
- ・ 研究管理法人を經由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 知的財産取扱（実施者間の情報管理、秘密保持、出願・活用ルール含む）に関する考え方は整備され、適切に運用されているか。

(4) 研究開発成果の実用化・事業化に向けたマネジメントの妥当性

（基礎的・基盤的研究開発及び知的基盤・標準整備等研究開発の場合は、「事業化」を除く）

- ・ 成果の実用化・事業化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化・事業化シナリオに基づき、成果の活用・実用化の担い手、ユーザーが関与する体制を構築しているか。
- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダーが選任されている場合、成果の実用化・事業化シナリオに基づき、適切な研究開発のマネジメントが行われているか。

- ・ 成果の実用化・事業化につなげる知財戦略(オープン/クローズ戦略等) や標準化戦略が明確になっており、かつ妥当なものか。

(5) 情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向等に機敏かつ適切に対応しているか。

3. 研究開発成果について

(1) 目標の達成度と成果の意義

- ・ 成果は目標を達成しているか。
- ・ 成果は将来的に市場の拡大あるいは市場の創造につながることを期待できるか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。
- ・ 目標未達成の場合、達成できなかった原因が明らかで、かつ目標達成までの課題を把握し、この課題解決の方針が明確になっているなど、成果として評価できるか。
- ・ 設定された目標以外に技術的成果があれば付加的に評価する。
- ・ 世界初、世界最高水準、新たな技術領域の開拓、又は汎用性のある成果については、将来の産業につながる観点から特に顕著な成果が上がっている場合は、海外ベンチマークと比較の上で付加的に評価する。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 大学又は公的研究機関で企業の開発を支援する取り組みを行った場合には、具体的に企業の取り組みに貢献しているか。

(2) 知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、又は実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(3) 成果の普及

- ・ 論文等の対外的な発表は、将来の産業につながる観点から戦略的に行われているか。
- ・ 成果の活用・実用化の担い手・ユーザー等に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。

- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

(4) 成果の最終目標の達成可能性(中間評価のみ設定)

- ・ 最終目標を達成できる見込みか。
- ・ 最終目標に向け、課題とその解決の道筋が明確に示され、かつ妥当なものか。

4. 実用化・事業化に向けての見通し及び取り組みについて

本項目における「実用化・事業化」の考え方

当該研究開発に係る試作品、サービス等の社会的利用(顧客への提供等)が開始されることであり、さらに、当該研究開発に係る商品、製品、サービス等の販売や利用により、企業活動(売り上げ等)に貢献することを言う。

なお、評価の対象となるプロジェクトは、その意図する効果の範囲や時間軸に多様性を有することから、上記「実用化・事業化」の考え方はこうした各プロジェクトの性格を踏まえ必要に応じカスタマイズして用いる。

(1)成果の実用化・事業化の見通し

- ・ 産業技術としての見極め(適用可能性の明確化)ができているか。
- ・ 実用化に向けて課題が明確になっているか。課題解決の方針が明確になっているか。
- ・ 成果は市場やユーザーのニーズに合致しているか。
- ・ 実用化に向けて、競合技術と比較し性能面、コスト面を含み優位性は確保される見通しはあるか。
- ・ 量産化技術が確立される見通しはあるか。
- ・ 事業化した場合に対象となる市場規模や成長性等により経済効果等が見込めるものとなっているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。
- ・ プロジェクトの直接の成果ではないが、特に顕著な波及効果(技術的・経済的・社会的効果、人材育成等)がある場合には付加的に評価する。

(2)実用化・事業化に向けた具体的取り組み

- ・ プロジェクト終了後において実用化・事業化に向けて取り組む者が明確

になっているか。また、取り組み計画、事業化までのマイルストーン、事業化する製品・サービス等の具体的な見通し等は立っているか。

◆プロジェクトの性格が「**基礎的・基盤的研究開発**」である場合は以下を適用

4. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて

(1) 成果の実用化の見通し

- ・ 実用化イメージに基づき、課題及びマイルストーンが明確になっているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。
- ・ プロジェクトの直接の成果ではないが、特に顕著な波及効果(技術的・経済的・社会的効果、人材育成等)がある場合には付加的に評価する。

(2) 実用化に向けた具体的取り組み

- ・ 成果の実用化に向けて、誰がどのように引き続き研究開発に取り組むのか明確になっているか。

◆プロジェクトの性格が「**知的基盤・標準整備等の研究開発**」である場合は以下を適用

4. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて

(1) 成果の実用化の見通し

- ・ 整備した知的基盤についての利用は実際にあるか、その見通しが得られているか。
- ・ 公共財として知的基盤を供給、維持するための体制は整備されているか、その見込みはあるか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。
- ・ J I S 化、標準整備に向けた見通しが得られているか。注) 国内標準に限る
- ・ 一般向け広報は積極的になされているか。
- ・ プロジェクトの直接の成果ではないが、特に顕著な波及効果(技術的・経済的・社会的効果、人材育成等)がある場合には付加的に評価する。

(2) 実用化に向けた具体的取り組み

- ・ 成果の実用化に向けて、誰がどのように引き続き研究開発に取り組むのか

か明確になっているか。

参考資料 2 分科会議事録

研究評価委員会
「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発／
ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」(中間評価)分科会
議事録

日 時：平成25年6月26日(水) 10:00~18:10

場 所：WTC コンファレンスセンター RoomA

出席者(敬称略、順不同)

<分科会委員>

分科会長	上田 実	名古屋大学大学院 医学系研究科 頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学教授
分科会長代理	中西 淳	武田薬品工業株式会社 医学研究本部先端科学研究所 主席研究員
委員	赤澤 智宏	東京医科歯科大学大学院 保健衛生学研究科 分子生命情報解析学分野 教授/副医学部長
委員	國貞 隆弘	岐阜大学大学院 医学系研究科 組織・器官形成分野 教授
委員	桑 昭苑	熊本大学 発生医学研究所 幹細胞部門 多能性幹細胞分野 教授
委員	小室 一成	東京大学大学院 医学系研究科 循環器内科学 教授
委員	中村 幸夫	独立行政法人理化学研究所 バイオリソースセンター 細胞材料開発室 室長

<推進者>

森田 弘一	NEDO	バイオテクノロジー・医療技術部 部長
加藤 紘	NEDO	バイオテクノロジー・医療技術部 プログラムマネジャー
三代川洋一郎	NEDO	バイオテクノロジー・医療技術部 主任研究員
矢野 貴久	NEDO	バイオテクノロジー・医療技術部 主査
武井 良之	NEDO	バイオテクノロジー・医療技術部 主査
岡本 豊	NEDO	バイオテクノロジー・医療技術部 主査

<オブザーバー>

千葉 直紀	経済産業省	製造産業局 生物化学産業課 課長補佐
大濱 克行	経済産業省	製造産業局 生物化学産業課 係長
福井 克樹	経済産業省	産業技術環境局 研究開発課 研究開発専門職
油科 壮一	経済産業省	産業技術環境局 研究開発課 未来開拓研究 統括戦略官

<実施者>

中畑 龍俊 (PL)	京都大学	iPS細胞研究所/特定拠点 副所長/教授
------------	------	----------------------

中辻 憲夫 (SPL) 京都大学 再生医科学研究所/物質-細胞統合システム拠点 教授/拠点長

戸口田 淳也 (SPL) 京都大学 iPS 細胞研究所/再生医科学研究所 副所長/教授

辻 紘一郎 (SPL) 株式会社ツーセル 代表取締役社長

出澤 真理 (SPL) 東北大学大学院 医学系研究科 細胞組織学分野 教授

阿久津 英憲 (SPL) 国立成育医療研究センター 研究所生殖・細胞医療研究部 室長

浅田 孝 京都大学 物質-細胞統合システム拠点 特任教授

中馬 新一郎 京都大学 再生医科学研究所 准教授

北川 正成 タカラバイオ株式会社 バイオ研究所 執行役員/研究所長

中村 吉宏 幹細胞評価基盤技術研究組合 専務理事

沖花 裕行 幹細胞評価基盤技術研究組合 京都集中研究室 研究室長

中嶋 勝己 川崎重工株式会社 MD プロジェクト室長

櫻井 隆 川崎重工株式会社 基幹職

武内 雅弘 大陽日酸株式会社 統括マネジャー

吉村 滋弘 大陽日酸株式会社 プロジェクト・マネージャー

清田 泰次郎 株式会社ニコン 新事業推進課 マネージャー

堀 友繁 バイオインダストリー協会 先端技術・開発部 部長

森下 強 株式会社ツーセル 研究部長

藤吉 好則 名古屋大学 細胞生理学研究センター 特任教授

若尾 昌平 東北大学大学院 医学系研究科 助教

吉田 正順 株式会社 Clio 代表取締役社長

岩本 恭典 株式会社 Clio 総務部 マネージャー

伊藤 弓弦 産総研 研究チーム長

平林 淳 産総研 研究チーム長

舘野 浩章 産総研 主任研究員

三浦 康 産総研 幹細胞工学研究センター アドバイザー

豊田 雅士 東京都健康長寿医療センター 血管医学研究 研究副部長

注：「PL」はプロジェクトリーダー。「SPL」はサブプロジェクトリーダー

<企画調整>

林 智佳子 NEDO 総務企画部 主任

<事務局>

竹下 満 NEDO 評価部 部長

保坂 尚子 NEDO 評価部 主幹

加藤 芳範 NEDO 評価部 主査

一般傍聴者 8名

議事次第

<公開セッション>

1. 開会、分科会の設置、資料の確認
 2. 分科会の公開について
 3. 評価の実施方法
 4. 評価報告書の構成について
 5. プロジェクトの概要説明
 - 5.1 事業の位置づけ・必要性、研究開発マネジメントについて
 - 5.2 研究開発成果、実用化・事業化の見通しについて
- 非公開資料取り扱いの説明

<非公開セッション>

6. プロジェクトの詳細説明
 - 6.1. ES 細胞領域
 - 6.2. iPS 細胞領域
 - 6.3. 滑膜由来間葉系幹細胞領域
 - 6.4. Muse 細胞領域
 - 6.5. 間葉系幹細胞領域
7. 全体を通しての質疑

<公開セッション>

8. まとめ・講評
9. 今後の予定、その他
10. 閉会

議事要旨

<公開セッション>

1. 開会、分科会の設置、資料の確認
 - ・開会宣言（事務局）
 - ・研究評価委員会分科会の設置について、資料1-1、1-2に基づき事務局より説明。
 - ・上田分科会長挨拶
 - ・出席者（委員、推進者、実施者、事務局）の紹介（事務局、推進者）
 - ・配布資料確認（事務局）
2. 分科会の公開について

事務局より資料2-1及び2-2に基づき説明し、議題6.「プロジェクトの詳細説明」、議題7.「全体を通しての質疑」を非公開とすることが了承された。

3. 評価の実施方法

評価の手順を事務局より資料3-1～3-5に基づき説明し、了承された。

4. 評価報告書の構成について

評価報告書の構成を事務局より資料4に基づき説明し、事務局案どおり了承された。

5. プロジェクトの概要説明

5.1. 事業の位置づけ・必要性、研究開発マネジメントについて

推進者より資料5.1.「プロジェクトの概要（1.事業の位置付け・必要性について、2.研究開発マネジメントについて）」に基づき説明が行われた。

5.2. 研究開発成果、実用化・事業化の見通しについて

推進者より資料5.1.「プロジェクトの概要（3.研究開発成果について、4.実用化・事業化に向けての見通しおよび取り組みについて）」に基づき説明が行われた。

【上田分科会長】 ありがとうございます。ただいまの説明に対してご意見、ご質問をお願いします。技術の詳細は議題6で議論しますので、主に事業の位置づけ、必要性、マネジメントについてお願いします。

【中西分科会長代理】 プロジェクトを始めるに当たり、いろいろな経緯があったと思います。ES細胞とiPS細胞は共通の性質を持っています。今は分けて技術開発を行っていますが、共通のものが多いと思います。今後、相互に共通利用していくという考え方、各プロジェクトの位置づけと今後の考え方を聞かせてください。

【NEDO:森田部長】 制度の最初の議論と進め方を任されたNEDOからご説明申し上げます。

先生のご指摘のとおり、多能性で汎用性の高い細胞としてES細胞とiPS細胞が従来から言われていました。このプロジェクトの立ち上げ当初は細胞種ごとに整理していくことで始めました。他の細胞種との関係性は、この中間評価でご指摘いただきたいと思います。どういうものは共通性が高いので後半の研究開発でどのような乗り入れを行うなど、そうしたご示唆をいただく必要があると考えています。これから、そのあたりの相互関係性をどう深めていくかを議論していただくものと理解しています。

【中西分科会長代理】 もう1点お伺いします。この事業全体の最終目標と中間目標があり、今回は中間目標に対する評価を行うということです。それは9ページに載っています。次の11ページにサブプロジェクトごとの開発項目を記載しています。その中間葉系領域とMuse細胞領域は基盤的な開発を行うことになっており、品質評価指標の開発を評価することになっています。これは中間目標としての位置づけですか。最終目標としてもこの部分だけを目指すと考えてよいですか。

【NEDO:森田部長】 こころ少し説明が必要です。まずMuse細胞の項目は、採択時から基礎的な部分を確立し、その後で汎用的展開をどうするかを考えるという条件が付いていました。当初から大量培養を行うところまではコミットせずに現状まで来ています。そのため、現段階の技術的評価によると、今後どのような継続的展開を行うべきか、示唆及び評価をしていただくこととなります。このMuse細胞は中間評価の際の目標と、最終的な目標が今後変わる可能性があります。ここで、これならここまで進めるべきだという話があれば、最終目標を修正します。

ES細胞とiPS細胞に関しては、ある程度最初から目的を決めています。特に産業化という意味で、最初の役割分担論として、培養技術、保存技術、評価技術の製品化を課題としています。最終評価の際

は、そうしたものが市場で優位性をもって展開することができるかが評価されます。今は中間評価ですので、まずプロトタイプがしっかりできているか、ここまでできていればさらなる改良・改善を行うことで市場競争力があるものを残し2年で絞り込むなり磨き上げていくこととなります。こうした視点で見えていただくこととなります。

間葉系細胞についても採択の際にいろいろと議論がありました。一番のポイントは、多様な間葉系組織の特色や利用可能性をまず探索し、その中から有用な事実を整理していくことでした。これも午後の議論になると思いますが、間葉系のこうしたマーカーやカタログデータを作ることの実用化の意味は少し違います。今後、薬事法が改正されて、いろいろな組織細胞を培養していく場合、何を見ながら品質のトレースを行うのかといった時に、このプロジェクトで見つけてきた多様なマーカーを使ってもらい。例えば継代数何回になっているとマーカーがどう揺れるなどのことについて、PMDA や政策当局が判断する際にこれらを使うことになれば、それは非常に大きな実用化、産業化、まさに個別の評価をする際にこのデータが使われるという意味での実用化になります。

そうしたことについて、このプロジェクトが終わった段階で到達するかを現状で見据えてもらう。このままのアプローチを進めていくと、そうしたことができるのか、この中間評価で見ってもらう。最終評価では、いろいろ見つけ出したマーカーがそれぞれの品質管理を行う上で有意義であるかどうかを判断してもらう。こういう整理になると考えています。

【上田分科会長】 ほかの委員の方は、いかがでしょうか。

【小室委員】 個々のプロジェクトも自動培養や大量培養などほぼ同じ課題を抱えていると思います。プロジェクト間の連携はどうなっていますか。それに関連して、再生医療周辺産業分野への参入企業はほとんどがアメリカの企業であるという話でした。個々のプロジェクトがそれぞれある企業と組んで進めていても、その企業はなかなか大きくなり、アメリカの大企業に負けてしまうと思います。その辺をまとめる役割は誰が担っているのですか。NEDO が担っているのか、そのあたりはいかがですか。

【NEDO：森田部長】 技術的には、午後、先生方から詳細な説明があります。

経済産業省からも我々は宿題をもらっています。一にも二にも、最終的には製品として海外のものに勝つことのできる製品を作ることが我々のミッションです。そのために、特許的に見ても、今の海外の競合技術に勝つことのできるものを押さえているかなど、それぞれの培養方法、いろいろなノウハウを個々のプロジェクトで磨いています。先ほど PL からもありましたが、接着性の培養でも、装置の形状としては接着面積を増やす技術や、培地の交換をする閉鎖性の維持をしながらうまく交換するなどの研究を行っています。それらは、それぞれにお任せして、その中で強いものをしっかり押さえてほしい。それができた後に、細胞種をまたいで培養する技術は作り込みをし直さないといけないと思います。こうした細胞であればこういう作り方をしたほうがよいといったことが見えてきます。そうすると、NEDO がプロジェクトをまたいで、こういう機能はこういう培養に使うことができるのではないかと、プロジェクト後半あるいは終わった後、横展開していくことを今は想定しています。

【赤澤委員】 知的財産権の結果を表にまとめていました。ある程度細胞領域によってばらつきがあるとは思いますが、我が国独自の技術であるはずの iPS 細胞領域の特許が1件というのは心もとないと思います。また、国際競争力という観点から見ると、知財権の獲得は、ほかの省庁の事業と比べると最優先課題にすべきであったと思います。その点について若干の不満が残る数字と思いますが、いかがですか。

【NEDO：森田部長】 iPS 細胞に限定した話をしますと、赤澤委員も採択時に参画していただいたのでご承知と思いますが、iPS 細胞の基本的な品質・性能の探索は京大が行うと決めています。先生が今ご指摘

された細胞の部分の知財権は、今日紹介している中にはカウントしていません。CiRA で培養方法の改善などは日々起こっています。CiRA のそうした新手法にも我々の装置をきちんと組み込んでいくことを、この2年間で意思疎通を図り、実施してきました。それに伴って、CiRA で新しい因子や、培地の新しいプロトコルができた場合、それらに合わせた培養システムを知財権として取得していくことを想定しています。現状知財権の数が少ないことには、そういう理由があります。

【赤澤委員】 プロトタイプ的大量培養装置ができていたということでした。その過程で様々な派生する技術がなかったのか、この数字を見ると不安に陥る可能性があることを指摘しておきます。

それから、プロトタイプができていたということでしたので、いくつか大量培養を試みていると思います。それらに対するコミュニティの評価、研究者からの評価が必要です。ここは使い勝手が悪いといった声をどのようにしてこの事業の中に反映させますか。

【NEDO：森田部長】 それは、今のiPS細胞に限定したご質問でしょうか。

【赤澤委員】 この事業で作っている大量培養装置のプロトタイプに、研究者の声をどう反映させていく仕組みを構築するかということです。

【NEDO：森田部長】 これは、NEDOのプロジェクトマネジメント全般に対する回答の一つになりますが、実際にユーザーが見えてくると、そのユーザーフォーラムを設置します。NEDOの他のプロジェクトでも、そういうユーザーフォーラムを設けて、製薬メーカーや培地企業に参加してもらい評価することをマネジメントとして行います。本件に関してそれを行うか、よく考えなければいけないと思っています。まずは、そのiPS細胞をどういうユーザーが、どういう用途で使いたいか分かってくると、それに対してどういうフォーラムを作り、どういうフィードバックを行うかを考えなければいけません。先生もご承知と思いますが、iPS細胞をどう使うかという議論は別途進めています。例えばバンキングするならばバンキングの対応を行う必要があります。創薬スクリーニングであればそういうものを作る。そこは試行錯誤の状態です。

滑膜組織の培養などは出口側の応用展開を踏まえて製品設計を進めていますので、午後のセッションでご指摘いただければと思います。

【赤澤委員】 この事業は良品質の原料を大量に製造する事業だと思います。例えば滑膜間葉系幹細胞などの場合は、どちらかというとな骨を標的にしている。一般の間葉系幹細胞に関しては分化能も検定するという形の評価だと思います。特にiPS細胞、ES細胞に関しては、品質管理の点で分化能は切っても切れない関係だと思います。そのため、原料だけ良いものを作ればいい、大量にできたらいいということにはなりません。そのエンドプロダクトとして、最終的に、創薬や治療に使うことのできるクオリティが確保できるか、できないかはどう検証しますか。それを目標設定に反映しているのか、お聞きします。

【NEDO：森田部長】 エンドプロダクトの関係において目的が設定されるかというご質問には、まだないという回答になります。午後のセッションで、先生方がそうではないと言われるならば、私の発言は訂正したいと思いますが、我々は基本的に物を作る、標準的な手法で何ができるかを、まず確認しなければなりません。その後ユーザーが明確になってきた段階で、成果をきちんと組み込んで進めていく、ステージアップすることをプロジェクトとして行いたいと考えています。しないということではありません。我々のリソースにも限りがあります。本日評価を受けた上でそうしたものを絞り込み、勝てるところに狙いを定めていきたいと考えています。経産省からもそう言われています。

【國貞委員】 まず、コメントから述べます。赤澤委員の発言の補足ですが、経済産業省が今年募集したiPSの自動培養装置のテストに9件が採択されました。そういう試み、紐付きのお金ということですが、装

置を配って評価を行うというものがあります。もちろん、どのようにして選ぶかなど様々な問題があると思いますし、このプロジェクトとは関係ないと思いますが、そういう試みは大変良いことです。我々のような一ユーザーがチェックすると何も知らない、とんでもないコメントが出てくるかもしれませんが、そういうコメントも含めていろいろ改良が行われながら物事が進むと良いと思います。

もう一つ、それに関連したパブリシティについてです。その9件は、たった9件ですが、パブリシティの拡大に重要だと思います。例えば、iPSの培地などは、我々はリプロセルのものを利用しています。やはりmTeSR1が世界標準です。なぜかという、我々の分野で標準となる論文を見ると、この培地を使っているいろいろなことを行っているからです。接着培養から浮遊培養まで全てこの培地で大丈夫となると、我々のような裕福ではない研究者は、これを1個買っておけば全てできるから、ということも含めて使用することになります。論文への掲載は大変良いパブリシティになります。

それを日本で一から行うのは難しいので、例えば、このプロジェクトで開発した培地を初回に限りでかまわないので、無料で配布する。研究費が不足しているのであれば多少のお金を付けてモニター的に配る。そうすると使用してみて、同等の製品か、多少悪くても、それを使って論文を書くと思います。そういう形で日本人がこのプロジェクトでできた製品を普及させていく、多少のハンディがあっても良いと思いますので、そういうことが可能かと思いました。

あと、コメントですが、ES細胞とiPS細胞の統合ですが、現在のところ、再生医療で成功しているのはES細胞だけです。私は情報が古いので新しいことは知らないのですが、網膜色素上皮の治療をしたES細胞由来の網膜色素上皮細胞を網膜に入れた治療が唯一だと思います。今のところ、iPS細胞が本当にうまくいくかどうかは実施してみないとわからないという問題もあります。やはりES細胞は独立に、言い方は悪いですが、保険として連携しつつ進めることも重要だと思います。

【上田分科会長】 ありがとうございます。まだ時間がありますので、委員の先生方、いかがでしょうか。

【中村委員】 細かいことですが、体制の説明の中で、幹細胞評価基盤技術研究組合というものが出てきました。これはどういう存在ですか。

【NEDO：森田部長】 基本的にはiPS細胞大量培養装置を協力して作ってもらうという意味で、川崎重工業、大陽日酸、ニコン、産総研、成育医療研究センターで構成する技術研究組合というものです。

【中村委員】 「組合」という名前がついていますが、協働して研究を進めていくということですか。

【NEDO：森田部長】 この組合は京都に集中研究所を設置しています。場所は、京都のサイエンスパークです。そこに3社、4社の研究者が集まっています。CiRAの近くに行くと、いろいろと交流も行いながらということで、基本的に京都で研究を進める体制で活動しています。

【中村委員】 基本的にはここに参画している企業等がお金を出して実施している組合であることを理解しました。このプロジェクトとの関係では、このプロジェクトから出ている予算を使って何か一緒に連携して進めているのでしょうか。

【NEDO：森田部長】 はい。私どもは資金を組合に出します。組合の中で関係者に負担金などを含めた適切な体制を構築して研究を行っています。

【中村委員】 わかりました。先ほど、ES細胞は独立してという意見もありましたが、ES細胞とiPS細胞はかなり近い細胞です。ES細胞はこの組合と全く関係なく進めていて、連携はないということですか。

【NEDO：森田部長】 ES細胞については、午後、中辻先生からも話があると思いますが、基本的に、京都大学のiCeMS（物質-細胞統合システム拠点）が全体を統括し、対応しています。

【中村委員】 ES細胞は組合に入っていないことはわかりました。細胞の評価や標準化は、国内においても

世界においてもスタンドアロンということはあり得ません。せつかくこういう組合があるのならば、もっと深い連携を図るべきかと思えます。少なくとも日本国内では統合して進めていくほうが良いと思えます。コメントです。

【NEDO：森田部長】 ありがとうございます。

【糸委員】 先ほどから出ている意見ですけれども、ES細胞は安全性という面では信頼できる。iPS細胞は、安全性の面で若干の懸念があると皆さん思っていると思えます。当初は別々に研究するということがわかりますが、開発している項目には共通している部分が多いので、お互いに連携しつつ進めたほうが良いと思えます。また、普及するという面においても、早く論文を出してもらい、多くのユーザーに使ってもらうのがよいと思えます。

質問です。ここに多くの企業が出ていますが、それぞれの担当は決まっているのか、技術的な連携はどうか。例えば中辻先生のところの企業もいくつか出ています。滑膜も出ています。その辺はどうなのでしょう。

【NEDO：森田部長】 企業がそれぞれ自社で進めてきた技術をベースにしています。例えばES細胞のチームであれば、培養する技術はニプロが担当する、ゲノム評価のための試薬を作るのはタカラであるなど、分担して進めています。そうした横の情報の連携は中辻先生にコントロールしてもらっています。この装置で測定した結果と、ここで実施したデータを、横と縦をあわせてどのような評価を行うかということは鋭意検討しています。ただ、それぞれの専門の知見を伸ばし、最終的に商売を行うのは企業です。企業が商売をするところに出ていくという流れになります。

【上田分科会長】 ほかによろしいですか。

【中西分科会長代理】 先ほど、赤澤先生から知財に関する質問がありました。それに関連して、世界に勝つ、世界でも標準を取ることを目標としているため、特許の外国出願が重要になると思えます。先ほどの表を見ると、外国出願の数が非常に少ない。外国出願を判断する時期に来ていないのか、あるいは、国内だけ出願して外国出願しないという判断をしたのか。もし後者だとすると、日本でしか通用しない技術になり、不満が残ります。そこはどうですか。

【NEDO：森田部長】 恐らく、個々の企業の戦略もありますので、午後のセッションで、お気づきの点があれば、特許はどうか深掘りしてお聞きいただければと思います。

私どもの基本的な考え方は、特許を取得するにしても支援可能な範囲には限界があるので、基本的な、取るべきところをきちんと取得する。当然、国際特許の取得までお願いすることが基本です。個々のものについては、このセッションでは詳細にお答えできません。申しわけありません。

【國貞委員】 これはたぶん個別議論の対象ではないと思えますので、1点だけお聞きします。

間葉系細胞の対象について、この資料を見ると、世界中で一番用いられているのは骨髄の間葉系細胞です。それが入っていないのは何か特別な理由があるのですか。

【NEDO：森田部長】 間葉系細胞のテーマを担っていただいているのは成育医療研究センターと健康長寿医療センターの2機関です。ご指摘のとおり、全部の間葉系細胞種を研究できれば良いのですが、この2機関の強みが、成育医療研究センターは母体に伴うフレッシュな組織が採れること、健康長寿医療センターは加齢の効果があるお年を召した方の組織を見ることができたことでした。将来、どういう細胞種で何を研究するかという議論はあるものの、それぞれ特徴的なものを見つけて、それをどういう尺度で比較するのがよいか、私たちがなりに模索しています。骨髄を研究すれば早いかもしれませんが、骨髄移植で対応するよりも、その中のどういうものを絞り込み、どういうものを増やす、どういうものは止め

るということを、戦略的に展開できるベースを作ろうとしている状況です。

【上野分科会長】 いかがでしょうか。ほかにはよろしいですか。午後の詳しい説明の後にも議論が出ると思っています。ありがとうございました。

<非公開セッション>

6. プロジェクトの詳細説明

- 6.1. ES 細胞領域
- 6.2. iPS 細胞領域
- 6.3. 滑膜由来間葉系幹細胞領域
- 6.4. Muse 細胞領域
- 6.5. 間葉系幹細胞領域

7. 全体を通しての質疑

省略

<公開セッション>

8. まとめ・講評

【上田分科会長】 委員の皆様から講評をいただきます。中村委員からお願いして、最後に私が話します。

【中村委員】 ES 細胞、iPS 細胞は大量培養、培養方法、標準化等が進展していることがよくわかりました。

このプロジェクトの目的は達成していると思いました。

ただ、このプロジェクトの目的にはなっていないのですが、腫瘍形成の克服が課題の一つです。今日は ES 細胞、iPS 細胞と体性幹細胞に分けられていました。ES 細胞、iPS 細胞の大きな問題点は腫瘍形成能です。実用化を考えた場合、大量培養をする一方で、大量培養によって腫瘍形成能が高まるのではないかという点は、もう少し厳しくチェックしていく必要があると思います。もちろん、携わっている方々はそういうことを考えていると思いますが、このプロジェクトの中でも、腫瘍をどうクリアするかが直接的な目的ではないにしても、大量培養、自動培養の後に腫瘍形成もない培養法ができたことを検証する必要があります。

後半の体性幹細胞は、iPS 細胞が脚光を浴びている中で体性幹細胞もこのプロジェクトでは双璧をなして進めていることは見識が高いと評価しています。それぞれに進展があったこと、特に Muse 細胞は複数の研究者が再現性を示したことは進展があったと評価しています。

【小室委員】 全般的に順調に進んでいると思いました。ES 細胞と iPS 細胞は一部製品化され、産業に結びついている点は高く評価できます。

滑膜細胞は、ヒトへの応用を考えているので、また違った高いハードルがあります。臨床的にかなり有用そうなので、是非いろいろなハードルを越えて、臨床に進むことができればと思います。

Muse 細胞は、先ほども質問しましたが、増えることもわかりました。姿形がかなりはっきり見えてきたので、これからさらに研究も進むと期待します。

間葉系細胞は、臨床という面ではかなり使われていますが、間葉系の stem cell (ステムセル) とは何かという基本的な部分が明らかにならないままでした。このプロジェクトで、その点をかなりの部分明らかにしたことは非常に評価できます。

【糸委員】 今日の発表を聞き、このプロジェクト当初の目的がかなり達成できていると個人的には思います。

ヒト ES 細胞と iPS 細胞は共通している部分が多いので、今後とも連携したほうが、相乗効果が生まれ

ると思います。ここで生まれた成果を早く世の中で利用できるようにしてもらおうと、一利用者としては非常にうれしいです。

Muse 細胞は、安全性が高いと期待されるので、今後の研究が期待できます。今後ともキャラクターゼーションなど進めてほしいと思います。

間葉系幹細胞も、いろいろなマーカーの解析で明らかになってきた知見を利用して、今後、研究に活用すると良いと思います。

【國貞委員】 ご苦労さまでした。私は、論文のレフェリーをした時でもリジェクトはめったに付けない人間です。そのような人間が審査していいかどうか疑問な点もありますが、皆さんが指摘されたように、当初の目標に関してほぼ順調に進んでいると思います。先ほど赤澤先生ともお話ししていたのですが、機械の評価は私には無理ではないかと思うほど、やはり難しい。なぜなら、売れていくら、みんなが使っていくらと評価される機械のプロトタイプを製作している状況での評価は大変難しい。私の個人的な資質と経験で、まあいいだろうと判断するしかない部分があります。その程度ですが、ここで全員がだめと言うのであれば、だめである可能性が高いと思います。客観的な評価ではないかもしれませんが、その分、評価委員の見識が問われる大変厳しい評価だと思いました。

【赤澤委員】 赤澤です。私は、あえて辛口のコメントを先生方に申し上げて、大変聞き苦しかったと思います。私はこの課題の採択にかかわっており、懐かしく思い出しました。そのころから比較すると隔世の感があります。先生方のご努力がここまで結実していることを痛感しました。

ただ、先生方の発表の中に、いくつか「市場調査」が出てきましたが、先生方がそれをどの程度活かし、企業の方たちがそれを実践したのかについては少し疑問を持っています。本来の需要、どのくらいの数の人たちが、どういう形で、この再生医療に期待しているのかを、本当に斟酌した課題運営が行われたのかどうか。また、それに合致する調査が行われたのか、本日聞いていて違和感を覚えました。

開発した機器に関して、あるいは、培養技術に関して、本当に需要に合致しているのか、事業の後半でしっかり見せてほしいと思います。日本は技術開発で勝っても産業化で負けることが多くなっています。本当の意味での産業競争力とは何か。機械を作るまでは誰でもできると言っては失礼ですが、作ることを自己目的にしてはいけません。どのような展開を考えた技術で機器を開発していくかを、ぜひともこれから念頭に置いてほしいと思いました。

【中西分科会長代理】 本日は、素晴らしい発表をありがとうございました。各プロジェクトが多くの素晴らしい技術を開発しており、全体として順調に進んでいると思います。今後は、これらの技術について、再生医療を目指す様々な拠点と、今後は新たな拠点も採択されると思うので、そういう現場と密に連携して、実際に生かしていく方向に進んでほしいと思います。

その際に、このプロジェクトはあと半分の期間が残っています。順調に進んでいますが、全てのテーマに関して、やはり世界の中で勝ち残ることも大事です。本当に競争力がある、さらに開発を加速すべきものはどれかという優先順位もつけて、メリハリを持って開発してほしいと思います。

あと、全体のプロジェクトで、やはり標準化が一つの重要なコンセプトだと思います。その標準化は大事ですが、特に日本の場合は標準化を丁寧にしすぎるところがあります。あまり過度な標準化は産業化を遅らせる局面があるので、本当に重要な要素に対して標準化していく。あと、スピード感と産業化を目指す上ではコスト意識が大事です。現在開発中のものは良いものできていると思います。しかし、世界を見た時に先行品があり、それがデファクトスタンダードになっている時に、それと同じ品質では

絶対に勝てません。それよりもはるかに良い品質、コストを目指して進めてほしいと思います。

今後も、ぜひがんばってください。期待しています。よろしくお願いいたします。

【上田分科会長】 ありがとうございます。私も、経産省関係の会議、NEDO のような性格の、資金を出すところの分科会の会長を務めるのは初めてですが、非常に気持ちが良いです。実現する目的が明確ですし、経産省ならではの合理的な発言が随所に出ていた印象を受けました。

問題は、赤澤委員も言われたように、最後には患者に使用できないといけないということです。できないと、培養機なども全くのおもちゃになります。そこをもう少し、患者の数や、難病ばかりを狙わなくても良い気がします。実現するためのターゲット選びを工夫して、一つでも突破口を開いていく必要があります。自動培養装置は 10 年も 20 年も前にも出たテーマという気もしながら聞いていましたが、実用化に向けた姿勢を続けてほしいと感じました。

以上ですが、最後に、推進部長、プロジェクトリーダーから何か一言ありますか。

【NEDO:森田部長】 本日はどうもありがとうございました。プロジェクトリーダーの中畑先生はご多忙で、厚労省の会議のために中座しました。よろしくお伝えくださいと恐縮していましたので、改めて私から一言申し上げます。私に関しましては、先ほど来、何度も発言しましたし、本日は先生から非常に示唆に富むご意見をいただきましたので、我々として、しっかりとマネジメントに生かしたいと思います。

本日はどうもありがとうございました。

【上田分科会長】 長時間、ご苦労さまでした。これで分科会を終わらせていただきます。

9. 今後の予定、その他

10. 閉会

配布資料

- 資料 1-1 研究評価委員会分科会の設置について
- 資料 1-2 NEDO 技術委員・技術委員会等規程
- 資料 2-1 研究評価委員会分科会の公開について (案)
- 資料 2-2 研究評価委員会関係の公開について
- 資料 2-3 研究評価委員会分科会における秘密情報の守秘について
- 資料 2-4 研究評価委員会分科会における非公開資料の取り扱いについて
- 資料 3-1 NEDO における研究評価について
- 資料 3-2 技術評価実施規程
- 資料 3-3 評価項目・評価基準
- 資料 3-4 評点法の実施について (案)
- 資料 3-5 評価コメント及び評点票 (案)
- 資料 4 評価報告書の構成について (案)
- 資料 5-1 プロジェクトの概要説明
- 資料 5-2 事業原簿 (公開)
- 資料 6-1 プロジェクトの詳細説明 (非公開)
 - [1]ES 細胞領域
- 資料 6-2 プロジェクトの詳細説明 (非公開)
 - [2]iPS 細胞領域
- 資料 6-3 プロジェクトの詳細説明 (非公開)
 - [3] 滑膜由来間葉系幹細胞領域
- 資料 6-4 プロジェクトの詳細説明 (非公開)
 - [4]Muse 細胞領域
- 資料 6-5 プロジェクトの詳細説明 (非公開)
 - [5]間葉系幹細胞領域
- 資料 7 事業原簿 (非公開)
- 資料 8 今後の予定

以上

本研究評価委員会報告は、独立行政法人新エネルギー・産業技術
総合開発機構（NEDO）評価部が委員会の事務局として編集して
います。

平成25年12月

NEDO 評価部

部長 竹下 満

主幹 保坂 尚子

担当 加藤 芳範

* 研究評価委員会に関する情報は NEDO のホームページに掲載していま
す。

(http://www.nedo.go.jp/introducing/iinkai/kenkyuu_index.html)

〒212-8554 神奈川県川崎市幸区大宮町1310番地

ミュージア川崎セントラルタワー20F

TEL 044-520-5161 FAX 044-520-5162