

健康安心プログラム 「研究用モデル細胞の創製技術開発」

事業原簿（公開）

| | |
|-----|--|
| 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・医療技術開発部 |
|-----|--|

—目次—

| | |
|-------------------------------|-----|
| 概要 | 5 |
| プロジェクト用語集 | 9 |
| I. 事業の位置付け・必要性について | 16 |
| 1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性 | 16 |
| 1.1 NEDO が関与することの意義 | 16 |
| 1.2 実施の効果(費用対効果) | 16 |
| 2. 事業の背景・目的・位置づけ | 17 |
| II. 研究開発マネジメントについて | 19 |
| 1. 事業の目標 | 19 |
| 2. 事業の計画内容 | 19 |
| 2.1 研究開発の内容 | 19 |
| 2.2 研究開発の実施体制 | 20 |
| 2.3 研究開発の運営管理 | 22 |
| 3. 情勢変化への対応 | 24 |
| 4. 中間評価結果への対応 | 24 |
| 5. 評価に関する事項 | 24 |
| III. 研究開発成果について | 25 |
| 1. 事業全体の成果 | 25 |
| 2. 研究開発項目毎の成果 | 47 |
| IV. 実用化の見通しについて | 200 |
| 1. 実用化の見通し | 200 |
| 2. 今後の展開 | 215 |

(添付資料)

- ① イノベーションプログラム基本計画
- ② 技術戦略マップ(分野別技術ロードマップ)
- ③ プロジェクト基本計画
- ④ プロジェクト実施方針
- ⑤ 特許/論文/発表リスト
- ⑥ NEDO 公開シンポジウム Abstracts

平成22年6月8日発行

編集:大友 純

余白

概要

最終更新日

平成 22 年 6 月 8 日

| | | | | | | | |
|--------------------|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| プログラム名 | 健康安心プログラム | | | | | | |
| プロジェクト名 | 研究用モデル細胞の創製技術開発 | プロジェクト番号：P05010 | | | | | |
| 担当推進部/担当者 | バイオテクノロジー・医療技術開発部 担当者氏名 大友 純（平成 22 年 6 月 8 日現在） バイオテクノロジー・医療技術開発部 担当者氏名 新田 実（平成 17 年 4 月～平成 21 年 8 月） | | | | | | |
| 0. 事業の概要 | <p>ゲノム情報を利用した創薬プロセスの導入によって、新薬の開発プロセスを効率化し、安価な医薬品を迅速に上市することが可能になると期待されている。また、遺伝子機能の解明や新薬の安全性や効果を評価する際には、従来、マウスやウサギなどの動物や長期間にわたって培養されている株化されたヒト細胞を利用して評価を行っていたが、これらの細胞とヒト生体内の細胞は異なった性質を持っているため、実際の生体内の細胞に近い状態の細胞を用いた評価系の確立が望まれている。</p> <p>本プロジェクトでは、無限に増殖できるとともに、あらゆる細胞組織に分化できる多能性を有するヒト ES 細胞（ヒト胚性幹細胞）由来の、均質な遺伝的背景を有したモデル細胞を樹立し利用することによって、前臨床試験の段階で臨床試験に進めるかどうかを、より早期に判断することを可能とする有用な研究用モデル細胞の構築を行う。さらに、モデル細胞と各種デバイス技術とを融合させることにより薬物の効果・毒性・副作用等の定量的な評価を可能とする創薬支援システムの構築をめざす。</p> | | | | | | |
| I. 事業の位置付け・必要性について | 健康安心プログラムの一環として、モデル細胞の創製技術を行うものである。 所要の整備を図っていくため、国（NEDO）の積極的な関与が必要なものとする。 | | | | | | |
| II. 研究開発マネジメントについて | | | | | | | |
| 事業の目標 | ヒト ES 細胞の加工技術、分化誘導制御技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価、創薬研究の効率化のための技術基盤として有用な研究用モデル細胞を創製する。 | | | | | | |
| 事業の計画内容 | 主な実施事項 | H17fy | H18fy | H19fy | H20fy | H21fy | |
| | ヒト ES 細胞加工技術開発 | → | | | | | -- |
| | ヒト ES 細胞分化誘導制御技術開発 | → | | | | | -- |
| | 研究用モデル細胞構築技術開発 | → | | | | | -- |
| | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| 開発予算 (単位：百万円) | 会計・勘定 | H17fy | H18fy | H19fy | H20fy | H21fy | 総額 |
| | 一般会計 | 287 | 321 | 686 | 519 | 487 | 2,300 |
| | 特別会計 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | 加速予算 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | 総予算額 | 287 | 321 | 686 | 519 | 487 | 2,300 |
| 開発体制 | 経産省担当原課 | 経済産業省製造産業局生物化学産業課 経済産業省産業技術環境局研究開発課 | | | | | |
| | プロジェクトリーダー | 国立大学法人 京都大学 物質-細胞統合システム 拠点長 教授 中辻 憲夫 | | | | | |

| | | |
|------------|---|--|
| | 委託先 | <p>国立大学法人京都大学再生医科学研究所、特定非営利活動法人幹細胞創薬研究所、国立大学法人大阪大学蛋白質研究所、国立大学法人東京医科歯科大学、国立大学法人東京大学、独立行政法人国立環境研究所、財団法人日本皮革研究所</p> |
| 情勢変化への対応 | <p>研究の進捗に伴い、以下のような対応を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 平成17年スタートした後、研究開発を促進するために、平成18年度は研究内容を追加充実して委託先の追加公募を実施した。 平成18年度は、研究内容の追加による大幅な増額変更を実施した。 | |
| 中間評価結果への対応 | <p>中間評価結果への評価書指摘事項に対し、以下のような対応を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> ヒトES細胞研究の大臣確認は必要なグループで取得を完了した。8月の「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」の改定により、使用研究が進められるようになったことを踏まえ、研究を推進していく。 創薬産業利用に資する実用化を目指して、ニーズに基づいた優先課題を現時点で再確認し、モデル細胞の評価基準を明確化するとともに、情報交換・意思統一の強化を進める。なお肝細胞研究については関係者でチームを作り毎月ミーティングを行うなど、統一的に評価できる体制を整えた。 研究実施体制を有効に活用しながら、モデル細胞の評価基準を明確化することにより、具体的に実用化に近いモデル細胞の絞り込みとその創製に向けたマイルストーンの見直し（優先課題の明確化）を平成20年度中に行うこととする。さらに、必要があれば最終目標の見直しも行う。 ヒトES細胞の産業利用に関するニーズ把握は既に行っているところであるが、iPS細胞への適用も含め随時見直し、その状況を踏まえて、社会に向けてプロジェクトの成果を積極的に発信していく。 継続して特許情報を把握し、国際的な競争力が薄保できるように特許出願に努める。 個々のテーマに対しES細胞での実用化に止まらずiPS細胞への適用も含めて現時点で実用化の道筋（ロードマップ）を見直し、実用化の姿について具体例を示しつつ、プレスへの広報等を通じて広く一般に示し、この研究および実用化についての理解を得るように努めていく。 プロジェクトリーダーと連携しつつ、引き続き研究推進委員会や開発担当者会議を活用し、実施者間の情報交換、意思疎通に努め、技術展開を図る。既に肝細胞チームを作って連携強化を図る等の具体的な活動に着手した。 創薬産業界において研究に資することが可能となるモデル細胞の創製順位を明確に設定し、そのモデル細胞を着実に創製していく。 ヒトES細胞の加工技術開発については遺伝子機能の解明や創薬研究での利用に対するニーズを踏まえ、既に明確化している具体的なターゲット（遺伝子、細胞等）について引き続き検討する。 遺伝子導入法については導入効率等／組換え効率等を各手法間で比較できるように研究を進めているところであるが、今後も長所短所を明確にしつつ系統化・体系化し、外部の研究者から見ても分かりやすく示していく。 ヒトES細胞の加工技術を何に应用するかについては産業技術としての実用化ニーズ等を踏まえて決定しているところであるが、具体的な有用性を示せる応用例の研究成果を示せるよう研究を進めていく。 遺伝子導入技術や相同組み換え技術については、まずは組換え効率を上げることに注力し、その後、汎用性について京大の保有する3種のヒトES細胞株において同様の成果を得られることを確認していく。 HPRT 遺伝子座以外の遺伝子座の相同組み換え法についても、全体の優先課題を見直す中で、取り組みの可能性を検討し、実施内容に反映させる。 相同組み換え技術については、まだ、組換え効率向上等の技術改良が必要な段階であるが、研究後半に向けては、分化誘導技術等との組み合わせも含め、具体的な有用性を示す研究を中心に重点化する。 遺伝子機能の解明や創薬研究での応用を目指し、既に実用化プランを作成しているが、本研究開発の進捗や顧客ニーズを踏まえて、必要な見直しを行い、着実な産業利用へつなげることに努める。 中間評価を受け、これまでに開発してきた要素技術の統合を目的として関連ある実施機関をまとめ肝細胞チームを作り、創薬現場等の産業利用で求められる肝細胞の機能の評価基準と到達目標を明確化するとともに、創出した肝細胞を評価することによって以降の開発にデータをフィードバックしながら実用化にむけた開発を順次すすめる。 分化誘導制御技術の優先課題（再現性、効率向上等）に留意して研究を進めているところであるが、指摘事項を踏まえ、引き続き、より注意して進める。 | |

| | | |
|------------|---|--------------|
| 中間評価結果への対応 | <p>18. 人工基底膜による分化誘導法の開発は、まずは機能の検証を進めることが第一であるが、技術の進展を踏まえつつ有用な技術については適宜取り入れていく。</p> <p>19. 優先課題を重点化し誘導効率を高めた技術の確立を関係するグループの連携のもとで前倒しして進めいち早い提供を目指す。</p> <p>20. 実用化可能性を重視して優先課題を整理し、研究が必要な技術課題について絞込み実施していく。</p> <p>21. 人工基底膜および擬似基底膜についてはヒト ES 細胞を用いた検討を行うべく、京大グループ等に提供し、計画通り機能評価を進める。</p> <p>22. 分化誘導制御技術について進めている様々な方法について、引き続き長所短所を明確にし系統化・体系化に取り組む。</p> <p>23. 指摘事項は構築したモデル細胞の実用化に向けたプロジェクト後半での重要な課題であり、その証明に向けたデータを取得し、その評価に努める。</p> <p>24. ヒト ES 細胞からの神経変性疾患モデル細胞の構築は、先行する類似研究との比較評価を行い、引き続き、研究内容の見直しや前倒し実施も含め優位性の維持に努める。</p> <p>25. ES 細胞由来の心筋細胞を用いた毒性試験はヒト ES 細胞から分化誘導された細胞を用いた研究への展開を進める。</p> <p>26. 肝細胞の機能の評価方法・評価基準等の作成などの取り組みを強化すべく、既に着手した。</p> <p>27. 既に肝細胞チームを立ち上げる等実施しているところであるが、今後とも、グループ間で進行スケジュール等の確認・すり合わせを行い、研究計画を柔軟に効率的に運用していく。</p> <p>28. 個々の技術について、創薬メーカーのニーズを捉えつつ実用化までの課題を整理し、実用化可能性を考慮し、優先順位をつけて目標および配分を見直していく。</p> <p>29. 生命倫理問題についてのアプローチについては 8 月に指針の改定があり研究の制約は緩和されたところであるが、iPS 細胞の利用も視野に入れ実用化を検討していく。</p> <p>30. DNA センサー、細胞センサーなどを用いた生物学的評価分野で用いられる計測技術は、本プロジェクトにおける細胞評価技術とも関連するので、今後も先行する技術については積極的に導入していく。</p> <p>31. これまでも成果発信を行っているところであるが、特に本テーマの成果については一般向けにも広報を進め、本研究への理解を広めていく。</p> <p>なお、本研究の ES 細胞の分化誘導を中心とする技術は iPS 細胞に対しても適用可能な技術と考えられるため、本研究の成果は、iPS 細胞の実用化促進および我が国の優位性確立にも貢献するものであり、実施意義はさらに大きいものになったと考えら。その現状を踏まえ、iPS 細胞に関する技術進歩を踏まえつつ、実用化のロードマップを見直すなど、今後も引き続き柔軟に情勢を捉えて計画を見直していく。</p> | |
| 評価に関する事項 | 事前評価 | なし |
| | 中間評価 | 19 年度 中間評価実施 |
| | 事後評価 | 22 年度 事後評価実施 |

| | | |
|---------------------|---|---|
| III. 研究開発成果について | <p>1. ヒトES細胞の加工技術開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒトES細胞への遺伝子導入による安定Tet-On株の作出に成功（導入遺伝子発現制御に成功） ・ヒトES細胞の相同組み換え技術を確立 世界的な高効率優位技術 <p>2. ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・神経幹細胞・神経前駆細胞への高効率分化誘導に成功（日本人由来のヒトES細胞株を利用） ・心筋細胞、肝細胞、血管系細胞及びアストロサイトへの分化誘導技術を確立 <p>3. 研究用モデル細胞の構築技術の開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・神経変性疾患原因遺伝子の発現ベクターを構築 ・疾患関連遺伝子導入安定発現株樹立（株数増加中） ・BBBモデル構築技術確立（3次元モデル培養系構築技術進展） ・ハイスループットスクリーニング（HTS）技術構築 <p>4. 細胞外環境の人工制御技術開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・マウス基底膜分子構成をデータベース化「Mouse Basement Membrane Bodymap」 ・人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術開発に着手 ・基底膜構造体培養基質を創製 ・脳血流閥門培養系コラーゲン繊維基質開発 <p>5. モデル細胞を利用した創薬支援ツールの開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・薬物動態研究用モデルである肝細胞を用いるサンドイッチ培養法技術を構築 ・無染色画像処理型細胞精製技術開発、データベース化 ・アプタマー可逆修飾細胞精製技術確立 | |
| | 論文/文献/学会発表等 | 「論文/文献」193件、「学会/研究会」332件 |
| | 特許 | 「出願済」24件（うち国際出願6件） |
| | その他の外部発表（プレス発表等） | 「新聞/マスコミ」45件 平成22年5月18日に、「NEDO公開シンポジウム」を開催し、研究開発成果を広く一般に公表した。 |
| IV. 実用化、事業化の見通しについて | <p>1. ヒトES細胞の加工技術開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・作業効率と付加機能性が向上するとともに細胞医療・細胞加工ビジネスへ期待 <p>2. ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・日本人由来のヒトES細胞を利用したことで日本人における薬効、安全性の確認等への利用に期待 <p>3. 研究用モデル細胞の構築技術の開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・神経変性疾患モデル神経細胞を用いた医薬品候補化合物スクリーニング系への利用に期待 <p>4. 細胞外環境の人工制御技術開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・世界的標準リファレンスとなりうる成果であり一部製品化された他、技術移転交渉中 <p>5. モデル細胞を利用した創薬支援ツールの開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒト肝細胞に適用し創薬プロセスの効率化への期待 ・心筋毒性スクリーニングビジネス | |
| V. 基本計画に関する事項 | 作成時期 | 平成17年3月制定 |
| | 変更履歴 | 平成18年1月一部改訂。 平成20年1月一部改訂。プロジェクトリーダー名の記載 平成20年7月、イノベーションプログラム基本計画の制定により、「(1)研究開発の目的」の記載を改訂 |

プロジェクト用語集

[プロジェクト用語集]

| 項番 | 分類 | 用語 | 説明 |
|-----|-----|---|--|
| 001 | ①-1 | 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。 |
| 002 | | エレクトロポレーション法 | 高電圧パルスで一時的に脂質二重層の細胞膜構造を不安定化して穴をあけ、そこから外来の核酸を取り込ませる方法。 |
| 003 | | リポフェクション法 | 導入する核酸を陽性荷電脂質などと電気的な相互作用により複合体を形成させ、エンドサイトーシスや膜融合により細胞に取り込ませる方法。 |
| 004 | | ウイルスベクター(アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター) | ウイルスが元来持っている細胞侵入機構を利用して、効率良く遺伝子を細胞内に導入するベクター(遺伝子の運び屋)。増殖や病原性を司る遺伝子は除かれており、代わりに発現させたい遺伝子を組み込んで使用する。 |
| 005 | | 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。 |
| 006 | | 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。 |
| 007 | | 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。 |
| 008 | | 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。 |
| 009 | | 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。 |
| 010 | | IRES | internal ribosome entry site のこと。リボソームがこの site に結合して翻訳が開始される。 |
| 011 | | Tet-On/Off システム | テトラサイクリンという化学物質により遺伝子の発現を On/Off するシステム。 |
| 012 | | エンベロープ | レンチウイルスなどを覆う膜構造より突き出ているタンパク質。ベクター作製の際にこのタンパク質を変えることにより、感染する細胞種を変えることが出来る。 |
| 013 | | ウイルス受容体 | ウイルスが細胞に感染する際に、最初に結合する膜タンパク質。 |
| 014 | | 薬剤(NEO、Hyg)耐性遺伝子 | ネオマイシン(NEO)やハイグロマイシン(Hyg)などの薬剤の作用から逃れる機能を持った遺伝子。発現させたい遺伝子と繋げて細胞内に導入し、各薬剤で選択することにより、その遺伝子が染色体上に安定に組み込まれた細胞を得ることが出来る。 |
| 015 | | ヘルパー依存型アデノウイルスベクター | すべてのウイルス遺伝子を除いた、挿入できる DNA のサイズがより大きく、細胞へのダメージがより少ない、改良型アデノウイルスベクター。 |
| 016 | | カプシド | AAV などのウイルス粒子の殻タンパク質のこと。ベクター作製の際にこのタンパク質をを変えることにより、感染する細胞種を変えることが出来る。 |
| 017 | ①-2 | 相同組み換え | 2遺伝子の相同的な配列が組み換わること。本文中では特に、ヒト ES 細胞のゲノム DNA と相同的な配列を持つベクターを用いて人為的に相同組み換えを起こし、狙った部位の遺伝子を改変することを指す。 |

| | | | |
|-----|-----|------------------------------------|---|
| 018 | | サイレンシング | 遺伝子の発現が抑制される現象。 |
| 019 | | HPRT | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase の略称。いかなる細胞でも遺伝子がオープンで、常に転写が行なわれていると考えられている。 |
| 020 | | 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。 |
| 021 | | 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。 |
| 022 | | ノックアウト | 標的とした遺伝子を改変し、発現できないようにすること。 |
| 023 | | ノックイン | 標的とした遺伝子を改変し、内在プロモーターの支配下に任意の遺伝子を挿入すること。 |
| 024 | | アレル | 父親と母親の染色体それぞれ一本ずつから由来する対立遺伝子。 |
| 025 | | 遺伝子発現カセット | 蛋白質をコードする遺伝子にプロモーターとターミネーターを連結した DNA 断片。 |
| 026 | | サザン法 | 制限酵素で切断したゲノム DNA をゲル電気泳動で分画し、その泳動状態を保ったままニトロセルロースなどのフィルターに移し、標識した DNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行なってプローブと相補配列をもつ DNA 断片を検出する方法。 |
| 027 | ①-3 | RNA 干渉法 | 2本鎖 RNA によって、その2本鎖 RNA に相同な配列を有する RNA が切断され発現が抑制される現象。2006 年ノーベル医学生理学賞の対象となった現象。 |
| 028 | | shRNA | RNA 干渉を起こすことができる短いヘアピン状の RNA |
| 029 | | Cre-loxP システム | 遺伝子組み換え酵素 Cre と Cre の標的配列である loxP 配列を組み合わせることによって、Cre が発現している細胞だけで遺伝子組み換えを起こすシステム。 |
| 030 | | ROSA 領域 | マウスゲノム上において、遺伝子発現の抑制が起こらず、常に遺伝子発現を起こすことができることが知られている領域の一つ。 |
| 031 | | インスレーター配列 | 周囲のプロモーターからの発現制御やゲノム構造のリモデリングによる遺伝子発現抑制(サイレンシング)を受けないように、これらの影響をせき止める機能を持った遺伝子配列。 |
| 032 | | 誘導性ノックダウンレスキューシステム | shRNA による標的遺伝子の発現抑制と、標的遺伝子の cDNA 発現を tet-ON/OFF システムなどを用いて誘導性に回復させることの両方が可能な遺伝子発現制御システム。 |
| 033 | ②-1 | 細胞治療 | 機能不全に陥った細胞を機能が正常な細胞を移植することによって治療する再生医療のこと。 |
| 034 | | ストローマ細胞 | 支持細胞の一つ。 |
| 035 | | 神経変性疾患(アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病) | 神経系細胞が変性し欠失することによって引き起こされる疾患の総称。疾患ごとに異なった神経細胞が変性しそれぞれの神経変性疾患特有の症状を示す。 |
| 036 | | 神経幹細胞 | 神経系のすべての細胞を生み出す幹細胞。 |
| 037 | | 神経前駆細胞 | 幹細胞より分化し、神経細胞のみを生み出す細胞。 |
| 038 | | 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。 |
| 039 | | ロゼッタ | ES 細胞から分化してきた神経前駆細胞が作る特徴的な細胞群。 |
| 040 | | ソニックヘッジホッグ | ヘッジホッグファミリーの一つ。ES 細胞から運動神経細胞へ分化させるのに必要なタンパク質。 |

| | | | |
|-----|-----|--------------------|--|
| 041 | | ノギン | トランスフォーミング成長因子 β スーパーファミリーの一つ BMP の拮抗因子。ES 細胞の培養液にノギンを添加することによって、ES 細胞を神経前駆細胞へ分化させることができる。 |
| 042 | | Wnt | 細胞で観察される主要なシグナル伝達系の一つで胚発生において重要な機能を果たす。Dkk1 はその伝達系を阻害し、ES 細胞から神経前駆細胞への分化効率を向上させる。 |
| 043 | | Nodal | 細胞で観察される主要なシグナル伝達系の一つ。その活性は ES 細胞の未分化維持に必要とされる。 |
| 044 | ②-2 | QT 延長 | 心電図上の QRS 群(Q 波または R 波)の始まりから T 波の終了までを QT 間隔という。QT 間隔は心室の興奮が始まって(脱分極)から終わる(再分極)までの時間を示す。この QT 間隔が長くなることを QT 延長と言う。先天性・後天性のものが知られている。 |
| 045 | | HERG チャネル | human ether a-go-go-related gene の略。hERG は遅延整流性カリウムチャネルの早い成分(I_{Kr})をコードしており、 I_{Kr} が抑制されることにより QT 延長が起こり、QT 延長はさらに TdP につながることもある。薬剤惹起性 QT 延長作用のほとんどは I_{Kr} を抑制することによって生じている。 |
| 046 | | イオンチャネル | 細胞膜にある膜貫通タンパク質で、特定のイオンを通過させる性質を持つ。神経、心筋細胞等の興奮性細胞では、膜電位の維持、活動電位の発生等に関与する。 |
| 047 | | 細胞外電位 | 興奮性細胞の活動電位を記録する電気生理学的手法の一つ。神経や心筋の細胞に電極をあて電気活動を記録する。 |
| 048 | | ペースメーカー細胞 | 心筋には血液のポンプ作用を持つ固有心筋とそれを働かせるための興奮の発生と伝導を司る特殊心筋とがある。特殊心筋で最初に興奮を発生する部位は右心房にある洞房結節と呼ばれここから心臓全体に興奮が伝導して心臓の収縮リズムを作り出している。この部位の細胞をペースメーカー細胞と呼ぶ。 |
| 049 | | 心筋の自動能 | 心臓を構成する筋には自ら律動的に興奮を起こす性質を有するものがあり、その興奮により自動収縮を繰り返す。これを自動能と呼ぶ。 |
| 050 | ②-3 | 薬物毒性試験(薬物安全性試験) | 薬物の薬理作用または副作用の観察を目的として、該薬物のヒトでの安全性を予測するために行われる試験。 |
| 051 | | 薬物代謝酵素(CYP) | 私たちが飲んだ薬は体の中で主に小腸で吸収され血流に乗って体全体に分布し、必要な場所で作用した後に肝臓で分解され体外へと運び出される。この時、薬を分解する役割を果たす、肝臓で作られる薬物代謝酵素。 |
| 052 | | ミクロソーム | 細胞を破碎した後、遠心分離で得られる主に小胞体からなる細胞成分。生体肝細胞からえられるミクロソームは CYP 等の酵素を豊富に持ち、CYP 阻害実験に多く用いられる。 |
| 053 | | 不死化 | 初代培養細胞は通常分裂回数に限度があり、得られる細胞数に限界がある。細胞周期をチェック・制御する機構を阻害することにより細胞が無限増殖能を得、継代培養可能とすることを不死化という。 |
| 054 | | 温度感受性 SV40-T 抗原遺伝子 | SV40-T 抗原は、細胞周期を制御する働きを持つ癌抑制遺伝子 p53 の働きを阻害し、結果として細胞の増殖を促す作用を持つ。本抗原遺伝子の温度感受性変異株。 |
| 055 | | 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らるために用いられる遺伝子のこと。 |
| 056 | | BAC クローン | 大腸菌を宿主とするバクテリア人工染色体(Bacteria Artificial Chromosome; BAC)ベクターに入っている 100-200kb 程度の巨大な DNA 断片を指す。 |

| | | | |
|-----|-----|----------------|--|
| 057 | ②-4 | 基底膜 | 上皮組織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。上皮細胞に限らず、血管内皮細胞や筋細胞など、様々な細胞が基底膜を足場として利用している。 |
| 058 | | 免疫組織化学 | 組織標本における抗原分子の局在を抗体の特異的な反応性を利用して調べる方法。組織標本を特定の抗原に対する抗体と反応させ、結合した抗体を酵素抗体法などにより検出する。 |
| 059 | | in silico | in vivo (生体内で), in vitro (試験管内で)に対して、コンピューターを用いて行う解析を指すことば。コンピューターの半導体にシリコンが使われていることに由来する。 |
| 060 | | 分泌シグナル | タンパク質が細胞から外に分泌されるための目印となるアミノ酸配列。通常、タンパク質のアミノ末端領域に存在する疎水性アミノ酸に富んだ配列が分泌シグナルとして機能する。 |
| 061 | | エピブラスト | ほ乳類の胚発生初期に生じる分化多能性を有した細胞層で、単層の柱状上皮様構造を形成する。初期外胚葉、胚盤葉上層ともいう。 |
| 062 | | Ensembl データベース | EBI (European Bioinformatics Institute) と Sanger Institute による共同プロジェクトで様々な生物種のゲノム情報を収集・解析し、インターネット上に公開している。 http://www.ensembl.org/index.html |
| 063 | | PSORTII | 新たに合成されたタンパク質が細胞内のどの小器官に輸送されるかを、目印となるアミノ酸配列に基づいて予測する検索プログラム。 |
| 064 | | SOSUI | タンパク質のアミノ酸配列に基づいて膜結合領域を予測する検索プログラム。 |
| 065 | | ヒドロキシプロリン | コラーゲンに多く含まれる特殊なアミノ酸。プロリルヒドロキシラーゼの作用によってタンパク質中のプロリン残基が変化して生じる。 |
| 066 | | 円偏光二色性 | 内部構造がキラルな物質が円偏光を吸収する際に左円偏光と右円偏光に対して吸光度に差が生じる現象。 |
| 067 | | EHS 肉腫 | 周囲に基底膜様ゲルを大量に分泌・蓄積するマウス継代移植腫瘍。この腫瘍組織の抽出物は、ラミニン-111 を大量に含み、マトリゲルの商品名で培養基質として広く使われている。 |
| 068 | | マトリゲル | 038 に前述。 |
| 069 | | Hanging drop 法 | 少量の細胞懸濁液を培養皿の蓋などの基板の上にのせ、上下逆にして培養することで、懸垂状態の液滴中で細胞塊を形成させる方法。 |
| 070 | | 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。 |
| 071 | | ラミニン | 基底膜を構成する主要構成蛋白質。α鎖(分子量40万)、β鎖(分子量20万)、γ鎖(分子量20万)からなるヘテロ3量体の巨大蛋白質。ヒトでは5種類のα鎖、3種類のβ鎖とγ鎖があり、それらの組み合わせの異なる12種類のアイソフォームの存在が確認されている。組織ごと、細胞ごとに基底膜を構成するラミニンのサブユニット組成は異なる。 |
| 072 | | IV型コラーゲン | コラーゲンの一種で、基底膜だけに存在する。基底膜の特徴であるシート状メッシュワーク構造を形成すると考えられている。遺伝子としてはα1からα6までのタイプが知られており、臓器によってその構成が異なる。 |
| 073 | | I型コラーゲン | ほ乳類の体内に最も豊富に存在する蛋白質。コラーゲンのプロトタイプでもあり、約10万の分子量をもつα鎖3本が3重らせんをまいた直線状の分子である。生体内の皮膚、骨、腱等に大量に存在し、体を支えている。 |

| | | | |
|-----|-------|---------------------|---|
| 074 | | ラミニン E8 フラグメント | ラミニンをエラスターゼ消化した際に得られる断片の一つ。 α 、 β 、 γ 各鎖のC末端領域を含み、全長のラミニン分子の細胞接着活性をほぼ100%保持している。 |
| 075 | ③-1-1 | ポリグルタミン病 | 異常な長さのポリグルタミン鎖が原因で発症する神経変性疾患群の総称。原因遺伝子によってハンチントン病、球脊髄性筋萎縮症などがある。 |
| 076 | | アミロイド β タンパク質 | 40-42(3)アミノ酸からなるペプチドであり、 β -及び γ -セクレターゼの働きにより前駆体蛋白(APP: amyloid β protein precursor)から切り出されてくる。アルツハイマー病では $A\beta$ が凝集して不溶性の線維形成がなされてアミロイドとなり脳に沈着する(老人斑)。 |
| 077 | | CAG 繰り返し配列 | 正常な遺伝子で見られないほどのCAGの塩基配列を繰り返しすることによってポリグルタミン病の原因となる。遺伝子上のCAGはタンパク質ではグルタミンを意味しており、結果生成されるタンパク質でのグルタミン鎖が異常な長さになる。 |
| 078 | | ハウスキーピング遺伝子 | 多くの細胞で発現し、細胞の普遍的な機能維持に必要とされる遺伝子。 |
| 079 | ③-1-2 | 血液脳関門(BBB) | 物質(薬物)が血中と脳内との間の物質透過を制御する生体内のバリア機能。 水溶性の高い物質あるいはタンパク質などの大きな分子はこの関門を透過し難いが、栄養素(グルコース、アミノ酸、ヌクレオチドなど)は脳毛細血管に発現している多くのトランスポーターによって選択的に透過する。また、脳毛細血管内皮細胞に発現するP糖タンパク質などの排泄トランスポーターが毒素・薬物を脳内から血中へ汲み出す働きがある。 |
| 080 | | 密着結合 | 細胞間結合形態の一つ。細胞間が密着に結合して気密性を保ち、様々な分子(物質)が細胞間を通過するのを防ぐ。また、膜タンパク質の移動も制限し、頂端領域と基底領域のそれが違うために、細胞の極性が維持できる。 |
| 081 | | 薬物動態試験 | 薬物動態試験とは、投与された薬物が体内でどのように処理(吸収 Absorption, 分布 Distribution, 代謝 Metabolism, 排泄 Excretion)されるかを調べる試験。 略してADME(薬物動態)とも称される。 |
| 082 | | MACS | 磁気細胞分離法(Magnetic Cell Sorting)の略。抗体を担持した磁気ビーズを用いて、特定の細胞を磁石で捕集することにより分別する手法。大量の細胞を一度に処理できる特長をもつ。 |
| 083 | | 経内皮電気抵抗 | 単層培養された血管内皮細胞シートを挟む間での電氣的抵抗のこと。血管内皮細胞によるバリア形成の判断の一指標となる。強度のあるバリアが形成されるほど、電気抵抗は高い値を示す。 |
| 084 | ③-1-3 | ハイスループットスクリーニング | 創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と略される。 |
| 085 | | 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。 |
| 086 | ③-2 | アガロースマイクロチップ | 細胞接着基板上にアガロースを塗布し、集束赤外レーザーを用いて任意の部位のアガロースを溶解することによりチャンバーを作成した微小チップのこと。 |
| 087 | | QT 延長 | 044に前述。 |
| 088 | | アプタマー | タンパク質など標的物質と特異的に結合する能力を持った合成核酸分子。DNAを素材にしたDNAアプタマー、RNAを素材にしたRNAアプタマーなどがある。 |
| 089 | | リエントリー | リエントリー(巡回興奮)と呼ばれる電氣的興奮が消滅することなく、グルグルと回り続けることを言う。持続性不整脈の原因の多くはリエントリーによるものと考えられている。 |
| 090 | | アミロイド蛋白質 $A\beta$ | 076に前述。 |

| | | | |
|-----|--|---------------|---|
| 091 | | 視交叉上核 | 視交叉上核 (Suprachiasmatic Nucleus: SCN); 脳の視床下部に存在する神経核で生体リズムの中心を担う。 |
| 092 | | LTP | Long Term Potentiation の略。シナプス前ニューロンの軸索に、高頻度連続刺激(テタヌス刺激)を与える事により、それまでよりも大きなシナプス後電位(EPSP)が得られ、長時間にわたってシナプス伝達「効率」が上昇する現象。記憶、学習、シナプス可塑性の基礎とされる。 |
| 093 | | GAD-GFP マウス | GABA neuron に特異的に発現している酵素、グルタミン酸脱炭酸酵素(Glutamic Acid Decarboxylase (GAD))に GFP ラベルされたマウス。 |
| 094 | | オンチップ・セルソーター | 一般的なセルソーターは蛍光染色した細胞にレーザー光を照射して蛍光の色を基準に細胞を分離精製する装置であるが、オンチップ・セルソーターは光学画像処理により目的細胞を無染色で分離精製出来る装置である。 |
| 095 | | RT-PCR 法 | Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction 法: 逆転写-遺伝子増幅法, 細胞内に存在するメッセンジャーRNA の量を測定する方法。細胞内にどのような遺伝子がおおよそどれくらい発現しているか確認できる。 |
| 096 | | TdP | Torsades de pointes の略。致死性の心室頻拍で近年、遺伝性や薬剤惹起性で起こることがわかり注目されている。 |
| 097 | | hERG | 045 に前述 |
| 098 | | E4031 | エーザイが開発していた抗不整脈薬であるが、副作用(I_{Kr} 阻害作用)の為に開発を断念した。 I_{Kr} 阻害作用が強いので QT 延長作用の assay 系において陽性対象薬として汎用されている。 |
| 099 | | ソタロール | ブリistol・マイヤーズ株式会社からソタコールの商品名で販売されている抗不整脈薬。E4031 同様、 I_{Kr} 阻害作用が強いので QT 延長作用の assay 系において陽性対象薬として汎用されている。 |
| 100 | | ニフェカレント | 日本シェーリング株式会社からシンビットの商品名で販売されている抗不整脈薬。E4031 同様、 I_{Kr} 阻害作用が強いので QT 延長作用の assay 系において陽性対象薬として汎用されている。 |
| 101 | | Microfluidics | 生体内の微小環境を擬似的にチップ上に再現し、微小空間内で化学反応等を行う実験系。 |
| 102 | | 血液脳関門 (BBB) | 075 に前述。 |
| 103 | | AMPA 受容体 | グルタミン酸受容体の一種。人工アミノ酸である AMPA(α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メソオキサゾール-4-プロピオン酸)を選択的に受容することから名づけられた。中枢神経系に広く分布し、記憶や学習に大きく関与し、他の主要なグルタミン酸受容体である NMDA 受容体が通常不活性の性質を持つため、中枢神経系におけるグルタミン酸の興奮性シナプス伝達は、普段主にこの受容体によって行われている。 |
| 104 | | NMDA 受容体 | グルタミン酸受容体の一種。記憶や学習、また脳虚血などに深く関わる受容体であると考えられている。他のグルタミン酸受容体サブタイプである AMPA 受容体やカイニン酸受容体と異なり、NMDA(N-メチル-D-アスパラギン酸)をアゴニストとして選択的に受容することから分類された。NMDA 受容体は通常不活性な性質を持つ。これは、細胞外からのマグネシウムイオンがこの受容体の活動を阻害しているためである。刺激に応じて流す電流は、AMPA 受容体に比べて遅く、持続的である。 |
| 105 | | EPSC | 興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current) |

| | | | |
|-----|-----|--------------------|--|
| 106 | | mEPSC | 微小興奮性シナプス後電流 (miniature EPSC) |
| 107 | | Paired pulse ratio | 最初のシナプス電流に対する次の電流の比として定量化される。刺激間隔は数 10msからせいぜい 2-300ms。2発目が大きくなった時を paired-pulse facilitation(PPF)と呼び、小さくなったときは paired pulse depression(PPD)と言う。 |
| 108 | ③-3 | サンドイッチ培養 | 肝細胞をコラーゲンやマトリゲルなどにより上下をはさんで培養することで、極性誘導を図り、細胞間に胆管腔を形成させることができると共に、数日間のレベルで通常の培養では不可能であった異物解毒に関与するトランスポーターの発現を維持することができるという利点を有する培養系 |
| 109 | | OATP ファミリートランスポーター | OATP(organic anion transporting polypeptide)は、サブタイプにより肝臓、小腸など特定の臓器に局在するものと、全身に発現するものが存在する。基質としては主に有機アニオン類を中心に広範な基質を認識することが知られており、薬物についても HMG-CoA 還元酵素阻害剤や angiotensin 変換酵素阻害薬、angiotensin II 受容体拮抗薬など临床上重要な薬物を多数基質として受け入れる。肝臓においては、特に OATP1B1, OATP1B3 が重要であると考えられている。 |

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

創薬基盤研究に用いるヒト由来細胞として初代培養細胞や組織幹細胞が考えられるがこれらの細胞は分裂能が限られており、均質な細胞を大量に必要とするスクリーニング系には適当とはいえない。また、疾患モデル細胞構築には細胞の遺伝子改変が必要だが、遺伝子発現解析を行い利用可能な細胞数まで増殖させることは不可能である。さらに、ヒト由来細胞の利用については採取時の安全性の問題や提供者への説明等種々の制限がある。このような初代培養細胞や組織幹細胞を用いる場合の問題点は、ヒトES細胞を用いることで解決できる。ヒトES細胞を用いれば、大量に増殖させた後に必要とする正常細胞に分化させることが可能であるし、特定の遺伝子を導入した疾患モデル細胞を作ることも可能である。

よって本研究開発では、均質な遺伝的背景を有し、無限に増殖できるとともに、あらゆる細胞組織に分化できる多能性を有するヒト ES 細胞(ヒト胚性幹細胞)を対象に、遺伝子の相同組換え、RNA 干渉による遺伝子サイレンシング技術等を用いてヒトES細胞を加工し、様々な分化誘導因子や細胞外環境の制御によって目的細胞への分化誘導を制御する基盤技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能や細胞内ネットワークの解明、薬剤候補の安全性の向上といった創薬の基盤研究に資するヒト由来の細胞を用いた研究用モデル細胞の創製を行うことを目的として実施するものである。

しかし、本目的を達成するためには、基盤的な研究要素が多く、民間企業の力だけではその達成に多大の時間を要し、産学の知見を結集して開発を進めることが必要である。また、ヒト胚を滅失させて作製されたヒトES細胞を用いることから、その使用にあたっては倫理的な配慮が特に必要であるとともに、厳格な管理の下で研究を進める必要があり、使用の条件も厳しく、民間のみで推進するには研究開発リスクが大きい。その一方で、ヒトES細胞から作製されたヒトモデル細胞を利用することにより、ヒト特有の有害事象や薬効を臨床試験前に想定することも可能になると考えられ、有用性が高く汎用性の高い基盤技術として期待されることから、国が関与することにより研究の促進を図る意義がある。

1.2 実施の効果(費用対効果)

ヒトES細胞由来の研究用モデル細胞を創製するとともに、創製した研究用モデル細胞と各種デバイス技術とを融合し、①薬物の効果・毒性・副作用等の定量的な評価を可能とする創薬支援システムの開発によって、前臨床試験の段階で臨床試験に進めるかどうかを、より早期に判断することを可能とする他、②疾患メカニズムの解明を目指す基礎研究等に利用することによって、新たなコンセプトに基づく創薬ターゲットの創出が期待されるなど、創薬基盤を支える有効な技術の

開発が見込まれる。

これらの研究開発成果の実用化は、遺伝子機能・ネットワークや疾患メカニズムの解明を効率的に行うとともに、ヒト生体内において薬剤候補が示す反応を、従来に比べ、より高い精度で予測することが期待されるとともに、それによって新薬の安全性と医薬品開発の効率を向上させ、創薬の開発研究における製品化までの期間を短縮する効果が充分にあるものと判断され、医薬品の迅速かつ安価な提供により、高齢化社会における国民医療費の高騰化を抑制すると同時に、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現に寄与することが期待される。また、本研究で得られる成果は再生医療の分野にも生かされることが期待され、費用の投入に十分に答える大きな効果が得られると考えられる。

2. 事業の背景・目的・位置づけ

製薬産業界では、ライフサイエンス研究における近年の技術的な発展によって蓄積されたゲノムの塩基配列情報や遺伝子発現情報、タンパク質の立体構造情報、タンパク質と低分子化合物の相互作用情報など、様々なゲノムサイエンスの成果としての遺伝子情報を活用するゲノム創薬によって創薬プロセスが飛躍的に効率化し、安価な医薬品を迅速に上市することが可能となると期待されていた。

しかし、実際には投入する研究開発費が年々増加していつているにも関わらず、上市される医薬品の数はむしろ減少しており、ゲノム創薬におけるギャップが生じている。これは、近年のポストゲノム研究の進展により見出された創薬ターゲット候補から真の druggable gene を絞り込むことが困難であることや臨床試験以前での新薬の安全性評価及び薬理評価の制度が十分でないことが一因と考えられる。創薬プロセスの後期である臨床試験において薬剤候補がドロップアウトしてしまうと、それまでに投入した開発費が回収困難となってしまうことから、創薬プロセスの早い段階から効率的に候補化合物や創薬ターゲットを絞り込むことを可能とし、臨床試験に至るプロセスの効率化に有効な新規技術の開発が重要な課題となっていた。

遺伝子機能の解明や新薬の安全性や薬効を評価する際には、従来、マウスやウサギなどの動物や長期間にわたって培養が継続されている株化されたヒト細胞を用いて評価を行っている。しかし、これらの細胞と実際のヒト生体内の細胞は異なった性質を有しているため、実際の生体内での反応を高い精度で予測することが困難であることから、臨床試験において安全性と薬効評価でドロップアウトする確率が高くなっている。

このため、医薬品開発における安全性や薬理評価の確実性の向上等、創薬に向けた研究開発を加速するためには、ヒト生体内における様々な反応や遺伝子の機能をより高い精度で解析し、開発のより早い段階で評価することを可能とする人体の組織や疾病等の様々なヒトモデル細胞株を創製する基盤となる技術開発を行うことが必要であった。このような背景の下、本研究開発では、均質な遺伝的背景を有し、無限に増殖できるとともに、あらゆる細胞組織に分化できる多能性を

有するヒトES細胞(ヒト胚性幹細胞)を対象に、遺伝子の相同組換え、RNA干渉による遺伝子サイレンシング技術等を用いてヒトES細胞を加工し、様々な分化誘導因子を用いて分化誘導を制御する基盤技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能や細胞内ネットワークの解明、薬剤候補の安全性の向上といった創薬の基盤研究に資する研究用モデル細胞の創製を行うことを目的とする。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ックスの開発、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、テーラーメイド医療・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「健康安心プログラム」の一環として実施されるものであり、ゲノム創薬加速化支援技術開発の一つとして位置づけられている。

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

最終目標(平成21年度)

ヒトES細胞の加工技術、分化誘導制御技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価、創薬研究の効率化のための技術基盤として有用な研究用モデル細胞を創製する。

つまり、ヒトES細胞から、神経系細胞、心筋細胞、肝細胞への分化誘導技術を開発し、さらにこれらの細胞を加工した疾患モデル細胞を創製し、創薬の基盤研究における薬効評価系、安全性薬理試験系を確立する。

中間目標(平成19年度末)

ヒトES細胞の加工技術及び分化誘導制御技術の開発に目処をつける。

2. 事業の計画内容

2.1 研究開発の内容

遺伝子機能の解明や新薬の安全性や薬効を評価する際には、従来、マウスやウサギなどの動物や長期間にわたって培養が継続されている株化されたヒト細胞を用いて評価を行っている。しかし、これらの細胞と実際のヒト生体内の細胞は異なった性質を有しているため、実際の生体内での反応を高い精度で予測することが困難であることから、臨床試験において安全性と薬効評価でドロップアウトする確率が高くなっており、実際の生体内の細胞に近い状態の細胞を用いた評価系の確立が必要である。

このため、無限に増殖できるとともに、あらゆる細胞組織に分化できる多能性を有するヒトES細胞由来の、均質な遺伝的背景を有したモデル細胞を利用することによって、前臨床試験の段階で臨床試験に進めるかどうかを、新薬の安全性と薬効の観点から、より確実に判断することを可能とする有用な研究用モデル細胞の構築が必要である。

具体的研究開発内容

遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価及び創薬研究の効率化に有用なヒトES細胞由来の研究用モデル細胞の構築を行うため、以下の技術開発を行う。

(1)ヒトES細胞の加工技術開発

外来遺伝子の導入や内在性遺伝子の改変、siRNAによる遺伝子機能抑制などの手法を利用し、研究用モデル細胞として有用な性質をあらかじめヒトES細胞に持たせるための加工技術の開発を行う。

- ①遺伝子導入と発現制御技術の開発
- ②相同組換え技術の開発
- ③RNA干渉法による遺伝子発現制御技術の開発

(2)ヒト ES 細胞の分化誘導制御技術開発

特定の組織系統への分化誘導に重要な役割を果たす外因性因子や増殖因子、加工された特性等を利用して、ヒト ES 細胞を特定の経路に沿った分化誘導を制御する技術の開発を行う。

これに加え、生体内における細胞外環境を人工的に再構築し、細胞の生存する空間を制御することによって、目的とする特定の細胞への分化誘導を制御する技術等の開発を併せて行う。

①神経系細胞への分化誘導技術の開発

②心筋細胞への分化誘導技術の開発

③肝細胞への分化誘導技術の開発

(3)研究用モデル細胞の構築技術の開発

開発した技術を利用して、ヒト生体内において薬物候補物質が示す反応を高い確率で予測することを可能とし、遺伝子機能の解明や新薬の安全性と創薬研究の効率化のための基盤研究に重要な研究用モデル細胞を構築する。

また、構築した細胞を利用し生体組織が有する機能をデバイス上に再構築することによって、より生体内の反応に近い条件下で、有効性を示す候補物質の探索や、毒性試験を簡便・迅速にスクリーニング可能な創薬支援ツールの開発を行う。

①神経変性疾患モデル神経系細胞の作出技術の開発

②薬物安全性試験用・心臓チャネル病モデルの心筋細胞モデル系の開発

③薬物代謝毒性試験用の肝細胞モデル系の開発

実施期間

研究開発期間：平成17～21年度(5年間)

2.2 研究開発の実施体制

研究開発の実施にあたっては、策定した基本計画に対する具体的な提案を公募により募り、①外部有識者から構成され NEDO 内に設置される採択審査委員会による主に技術的な視点からの事前評価、及び、②事前評価結果を踏まえ、技術的な視点に加え財務面等、総合的な視点から契約・助成審査委員会による審議により、最終的な採否を決定し、研究開発体制を構築することとしている。

本プロジェクトでは、研究開発開始時に行った公募に対し、応募があった 11 件の提案の中から選定した2件の提案を核として研究開発体制を構築した。その後、プロジェクト成果の一層の向上のため、策定した基本計画を変更し、「①生体内における細胞外環境を人工的に再構築し、細胞の生存する空間を制御することによって、目的とする特定の細胞への分化誘導を制御する技術の開発」、及び、構築したモデル細胞の機能評価への活用を視野に「②構築した細胞を利用し生体組織が有する機能をデバイス上に再構築することによって、より生体内の反応に近い条件下で、有効性を示す候補物質の探索や、毒性試験を簡便・迅速にスクリーニング可能な創薬支援ツールの開発」を追加、当該技術に関する提案を追加公募により募り、応募があった 13 件の提案の

中から5件の提案を選定し、体制に加える変更を行った。更に、平成 18 年度に研究開発の一部を特定非営利活動法人幹細胞創薬研究所へ承継する体制変更を行い、現在に至っている。

事業開始時点(平成 17 年度)における実施体制

平成 17 年2月 14 日に公募の予告を行い、平成 17 年3月 22 日～4月 26 日に公募を実施した。なお、公募にあたっては、利用するヒトES細胞株は特定しないこととした他、ヒトES細胞株から分化誘導を行ったモデル細胞を研究に利用することがプロジェクトの目的であることから、使用するヒトES細胞株について、①細胞株名、②樹立機関、③利用にあたりどのような条件が存在するかについて、予め提案書に明示させることとした。応募のあった 11 件の提案について、NEDO内に設置した5名の学識経験者等から構成される採択審査委員会において、書面審査及びその結果を踏まえて選考した8件の提案を対象としたヒアリング審査によって採択候補を選考した後、NEDO内の契約・助成審査委員会によって採択審査委員会の選考結果を踏まえて、国立大学法人京都大学再生医科学研究所が樹立したヒトES細胞株を利用する、国立大学法人京都大学、アステラス製薬株式会社、株式会社リプロセルからの全体提案及び埼玉医科大学からの部分提案、計2件を採択とし、国立大学法人京都大学再生医科学研究所長 中辻憲夫氏をプロジェクトリーダーとして、平成17年6月より研究開発を開始した。

追加公募による実施体制の強化とNPO法人への承継による体制変更

(1)追加公募による実施体制の強化

本研究開発において創製する研究用モデル細胞が持つ課題は、「生体内の細胞とどの程度同じ挙動を示すものなのか」「何がどの程度まで言えるのか」を評価し、創製した研究用モデル細胞の特性を明らかとすることが実用化に向けた重要な課題であった。このための一つの方法として、生体由来の細胞や創薬プロセスにおいて使われている細胞株と比較し、どの程度類似した挙動を示すかを解析すること、例えば、心毒性のある既存の化合物を創製した研究用モデル細胞に作用させ、毒性に伴う拍動異常とその回復がこれまでに利用されている細胞株と同等であることを示すことによって細胞機能の評価ができるのではないかと考えた。また、その際には、単に細胞レベルで評価するのではなく、細胞間のインタラクションによって拍動が安定し、かつ、生体組織内の細胞と同等の拍動が再現できると期待され、樹立された研究用モデル細胞を単に細胞として評価するのではなく、創薬支援研究において細胞機能を持った細胞集団として取り扱えるようにすることを指向した。

また、従来から細胞の分化誘導等の研究に利用されている外因性因子は増殖因子や化学物質等の液性因子が主な研究対象となってきたが、細胞周囲に固相化される細胞外マトリクスが細胞の分化形質の維持や安定化に必要であること、また、我が国では細胞外マトリクスの一つであるコラーゲン等の生体組織分子に関する多くの研究の蓄積があり、これら細胞外マトリクスに関する研究成果を本プロジェクトに活かし、例えば生体内環境を模倣した細胞外マトリクスを生体外で再構築して従来から行われてきた液性因子研究の成果と組み合わせることにより、生体内にお

る細胞外環境を人工的に再構築し、細胞の生存する空間を制御することによって積極的にES細胞の分化誘導効率の向上と分化形質の安定化を図ることを指向し、開発テーマを追加した。

そこで、これら課題の解決に資する新規技術を取り込み、研究開発成果のより一層の向上を目的として基本計画を変更し、追加する技術要件を明示した上で、追加公募による提案の募集を行った。平成 18 年 1 月 13 日に公募の予告を行い、平成 18 年 1 月 27 日～2 月 27 日に公募を実施し、応募のあった 13 件の提案について、NEDO内に設置した5名の学識経験者等から構成される採択審査委員会において、書面審査及びその結果を踏まえて選考した7件の提案を対象としたヒアリング審査によって採択候補を選考した。なお、ヒアリング審査には中辻プロジェクトリーダーが委員長の承認のもとで意見を求めに応じて述べる事が可能なオブザーバーとして出席している。

その後、NEDO内の契約・助成審査委員会によって採択審査委員会の選考結果を踏まえて、大阪大学及び財団法人日本皮革研究所、国立環境研究所、田辺製薬株式会社、東京大学及び東京医科歯科大学の提案、計5件を採択した。なお、東京医科歯科大学は平成 19 年度で開発を終了した。

2.3 研究開発の運営管理

(1) 運営管理

原則として、半期に一度の割合で研究開発推進委員会を開催。上半期の研究開発推進委員会においては、研究成果の報告と今後の研究計画について検討を行う。下半期の研究開発推進委員会においては、1年間の研究成果報告と次年度の研究計画について報告を受けた後、実績とプロジェクト全体目標に照らした役割期待を加味し、次年度以降の研究計画と予算の配分決定を目的として開催する。

この他、京都大学、幹細胞創薬研究所、埼玉医科大学、熊本大学に、研究の進展等に応じて追加公募によりプロジェクトに参画した研究チームを交え、月1回の研究ミーティングを実施し、成果のチェックと問題点の早期発見・解決等による研究計画の円滑な推進を図っている。

平成 17 年度(初年度)は、部分提案として採択した埼玉医科大学の提案とのマッチングを行い、円滑な研究の実施に向けた研究計画の摺り合わせを行うとともに、京都リサーチパーク内に設置した集中研究拠点の立ち上げに注力した。平成 17 年 10 月に主要な設備の導入がほぼ完了し研究開発を本格的に開始した。また、本格稼働に伴い、平成 17 年 10 月 31 日、京都リサーチパークにおいて京都大学再生医科学研究所と共同で、プレス関係者を対象に、①プロジェクトの目的、②研究内容、③期待される効果等に関する説明会を開催し、広く一般にヒトES細胞を利用した研究計画の理解を求める活動を行った。なお、初年度はマウスやサル等の ES 細胞を用いて基礎的な検討を行い、その後「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針(平成13年文部科学省告示第155号)」に基づき、必要な手続きを経た後、ヒト ES 細胞を用いる研究を進める計画であった。

平成 18 年度においては、追加公募により採択した5件の提案内容と、平成 17 年度採択グ

ループとの研究計画の摺り合わせを目的として、中辻プロジェクトリーダーと追加した研究テーマの責任者との間で研究計画の摺り合わせを行うミーティングを設定し、研究目的を共有するとともに、プロジェクト全体計画の中での役割期待の明確化を行った。その後、プロジェクトに参加する各機関が一同に介し、相互の研究内容と研究計画の共有を第 1 の目的として第1回研究開発委員会を、平成 18 年 11 月7日京都市リサーチパークにおいて実施した。また、平成 19 年1月 29 日に、NEDO(川崎)において第2回研究開発委員会を実施し、これまでの研究成果と今後の研究計画についてディスカッションを行い、平成19年度研究計画を策定するとともに、予算配分の決定を行った。

平成 19 年度および平成 20 年度には、研究開発委員会を毎年 2 回開催し、研究進捗状況を各実施機関が発表し議論した。平成 21 年 8 月には、プロジェクト最後の研究推進委員会を開催し、これまでの成果の纏めと、今後の進め方を議論した。さらに、プロジェクト終了後の平成 22 年 5 月 18 日(火)に、「NEDO 公開シンポジウム」を開催し、研究成果を広く一般に発表した。ほぼすべての国内製薬企業から、多くの関係者が集まり活発な議論がなされた。

(2)ヒトES細胞の利用状況

プロジェクト開始後、以下の参加機関が各機関の倫理審査委員会での審議の後、文部科学省の確認を得て、ヒトES細胞を利用した研究に着手している。

○京都大学再生医科学研究所

国内で唯一ヒトES細胞を樹立した研究機関として京都大学再生医科学研究所は、既に平成 14 年 4 月から「樹立計画及び使用計画」に関する大臣確認を得ているが、このプロジェクトに関連して次の研究計画において追加または新たな大臣確認を得て開発研究を推進している。

- ・医学応用を目指したヒト胚性幹細胞(ES細胞)の安全かつ簡便な新規培養技術の開発研究
(平成 16 年 7 月 27 日確認、平成 17 年 7 月 19 日及び平成 18 年 3 月 10 日に追加等の確認)
- ・ヒトES細胞に対する遺伝子導入法の開発と遺伝子改変技術の確立
(平成 16 年 7 月 27 日確認、平成 17 年 7 月 19 日及び平成 18 年 3 月 10 日追加等の確認)
- ・ヒトES細胞からの神経分化誘導及び細胞移植後の機能と安全性の解析
(平成 17 年 3 月 10 日確認)
- ・ヒトES細胞を用いた心血管細胞分化機構に関する研究
(平成 17 年 3 月 10 日確認、平成 18 年 3 月 8 日及び平成 18 年 11 月 14 日追加等の確認)

○熊本大学発生医学研究所

- ・ヒト胚性幹細胞を用いた肝胆膵の発生分化と再生医学の基礎研究
(平成 17 年 12 月 16 日確認)
- ・ヒトES細胞から機能的内胚葉系細胞(肝細胞、膵β細胞)への分化誘導法の確率
(平成 18 年 11 月 14 日確認)

○特定非営利活動法人幹細胞創薬研究所

- ・ヒトES細胞からの創薬基礎研究のためのモデル細胞の創製(平成 18 年 10 月 5 日確認)

○埼玉医科大学

・ヒトES細胞に対する効率の高い遺伝子導入法と染色体操作技術の開発

(平成 18 年 11 月 14 日確認)

3. 情勢変化への対応

「2. 2 研究開発の実施体制」の項で述べたとおり、研究開発成果のより一層の向上を目的とした基本計画の変更を行い、研究加速財源を活用した追加公募の実施により、①細胞外環境制御技術及び②細集団ネットワーク構築技術を追加し、研究体制の変更を行った。

なお、本研究の ES 細胞の分化誘導を中心とする技術は、本プロジェクト実施期間中に発見された iPS 細胞に対しても適用可能な技術と考えられるため、本研究の成果は、iPS 細胞の実用化促進および我が国の優位性確立にも貢献しうるものであり、実施意義はさらに大きいものになったと考えらる。その現状を踏まえ、iPS 細胞に関する技術進歩を踏まえつつ、実用化のロードマップを見直すなど、引き続き柔軟に情勢を捉えて計画を見直し実施した。

4. 中間評価結果への対応

平成 19 年 7 月 27 日に中間評価が行われ、「ヒト ES 細胞を使ったモデル細胞の創出は、生命倫理の観点から解決すべき課題も大きいですが、世界的に見ても今後の大きなテーマであり、ES 細胞への遺伝子導入方法の検討や細胞株の作製に関して得られた成果は、創薬研究のみならず、再生医療などへの波及効果も期待できるので、意義は高い。」と、概ね高い評価を得た。なお、総合評価に対応し、本研究の ES 細胞の分化誘導を中心とする技術は iPS 細胞に対しても適用可能な技術と考えられるため、本研究の成果は、iPS 細胞の実用化促進、および我が国の優位性確立にも貢献しうるものであり、実施意義はさらに大きいものになったと考えた。そのため、iPS 細胞に関する技術進歩を踏まえつつ、実用化のロードマップを見直しなどを行いプロジェクトの後半を効率よく進めた。さらに、創薬産業利用に資する実用化を目指して、ニーズに基づいた優先課題を再確認し、モデル細胞の評価基準を明確化するとともに、情報交換・意思統一の強化を行った。なお、肝細胞研究については関係者でチームを作り毎月ミーティングを行うなど、統一的に評価できる体制を整え推進した。

5. 評価に関する事項

平成 19 年度に中間評価、平成 22 年度に事後評価を外部評価により、NEDO 研究評価部にて行われた。いずれの評価も NEDO が策定した「評価項目/評価基準」に従い進められた。

III. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

①ヒトES細胞の加工技術開発

ヒトES細胞由来の分化細胞を創薬基盤研究のためのモデル細胞として利用するには、例えば疾患遺伝子を目的の遺伝子部位に導入する、導入した遺伝子の発現を任意に制御する等のES細胞を使用目的に沿って加工する技術が必須である。本プロジェクトの基盤技術となるヒトES細胞の加工技術開発を進めた結果、その最も基盤となる遺伝子導入技術の開発に成功したこと、発現制御可能なTet-On株の作出に成功したこと、従来殆ど不可能であった相同組換え体を高効率に創出することに成功したこと、制御可能なRNAi技術の開発にマウスES細胞で成功したこと、ウイルスベクターを用い高効率な相同組換え導入技術を確立したことが主な成果としてあがった。これらの技術は次のステップのモデル細胞構築に向けて大きな推進力となるもので、既にモデル細胞の構築に応用し、③に記すように、いくつかの疾患モデル細胞株の作成に成功している。また、各種遺伝子導入法について諸条件を検討し、あらゆる遺伝子導入場面にも利用可能な世界をリードする技術を確立しつつある。具体的には遺伝子導入法として、それぞれの事業所においてリポフェクション法、エレクトロポレーション法、ウイルス法を用いて検討を行い、いずれにおいてもヒトES細胞で遺伝子導入が可能であることを見出した。これら三つの方法の使い分けとしては、一時的に高効率で遺伝子導入をする場合にはエレクトロポレーション法よりもリポフェクション法の法が優れており、逆に後述する遺伝子相同組換えにおいてはリポフェクション法では非常に難しく、エレクトロポレーション法が適していた。さらにウイルス法はこれら二つの方法よりは遺伝子導入効率あるいは相同組換え効率などの点で優れているが、その一方でベクターの構築やウイルスの調製という点でより手間がかかることから、上記の二つの方法でうまくいかない場合に、非常に有力な手段となる。さらに、複数薬剤による遺伝子改変ES細胞の選別が可能となる系や、制御可能なRNAi技術による標的遺伝子発現抑制技術がマウスES細胞で確立されており、これらのヒトES細胞を加工しうる基盤技術によりヒトES細胞をより利用価値の高い、付加機能を持った細胞に改変することが可能となった。また、このようなノウハウは技術移転が難しい場合もあるが、京都大学、幹細胞創薬研究所、埼玉医科大学においては、お互いに連絡を密にとり、技術移転についても確認を行った。

②ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発

ヒトES細胞由来の分化細胞を薬効評価・安全性薬理試験に利用することを目的として、神経細胞、心筋細胞、肝細胞、血管系細胞への分化誘導技術の開発を行った。

神経変性疾患モデル細胞構築のための神経細胞分化誘導については、疾患の種類により発症する神経の種類が異なること(アルツハイマー病、ハンチントン病:大脳の神経細胞、筋萎縮性側索硬化症:運動神経細胞)を踏まえ、それぞれの神経細胞への分化誘導条件を探索し、BMPシグナル伝達系拮抗因子ノギンを用い神経前駆細胞へ分化誘導する条件が固まり、そこから目的細胞

胞へさらに分化誘導させる方法を確立した。

心筋細胞はその興奮性に対する薬剤の影響を見る上で重要な細胞である。心筋への分化誘導を強力に支持するフィーダー細胞の利用及び新たに発見された分化誘導化合物を用いることにより、拍動性の心筋様細胞を安定して誘導することに成功した。また、サル ES 細胞を用いた技術開発では、心筋特異的プロモータで駆動される GFP を導入した ES 細胞を分化誘導することにより GFP 陽性の拍動細胞を作出することができた。この拍動細胞を用い、心副作用をもつ典型的薬物及び従来法で陰性であった薬物による QT 延長を再現することに成功した。

ヒト ES 細胞を用いた技術開発においても心筋特異的プロモータで駆動される GFP を導入したトランスジェニック ES 細胞株を樹立し、GFP 陽性拍動細胞の作出に成功した。また長期再接着培養法を確立し、浮遊培養法と組み合わせることでヒト ES 細胞由来心筋細胞(hESC-CMs)を成熟化でき、心副作用をもつ典型的薬物及び従来法で陰性であった薬物による QT 延長の適切な検出に成功した。遺伝子導入サル ES 細胞とハイコンテツ・ハイスループットスクリーニング技術を組み合わせることで、心筋分化誘導促進物質が同定できた。

肝細胞は、薬物代謝酵素の誘導や阻害等の薬物の副作用を検出するのに重要である。肝前駆細胞への分化誘導を強く支持するフィーダー細胞を用い共培養の後、さらに成熟肝細胞への進行を支持するマウス胎児肝ストローマ細胞との共培養を行うことにより主要な薬物代謝酵素(CYP)の発現の促進・維持が認められた。本ストローマ細胞を不死化細胞株として樹立することに成功し、ES 細胞由来の肝細胞様細胞を必要十分な量作成することが可能となった。さらに成熟を促進する条件を整え、安全性薬理試験への応用を目指す。

細胞外環境の人工制御技術開発及び創薬支援ツールの開発においては以下の3点において進展が認められた。

- 人工基底膜・擬似マトリックスを用いたサルES細胞の接着能、増殖能、未分化維持能の評価系を確立することに成功し、ヒトES細胞への応用に発展させる基盤を構築した。さらにヒトES細胞の未分化維持には特定のラミニンを用いることで可能になることを見出した。
- 肝細胞の機能を維持できるコラーゲンサンドイッチ法の最適化を進め、ラット肝細胞を用い胆管構造の形成に成功し、トランスポーター機能の評価系を確立した。本培養評価系をヒト肝臓由来細胞に適用し、各種薬物の代謝・輸送活性の評価系を確立した。
- 主要基底膜タンパク質の局在マッピングをWEB上に公開した。本情報はES細胞の分化誘導時の培養基質等の設計に役立つと考えられる。またゲル化能を保持したIV型コラーゲン、11種類のラミニンアイソフォームおよびヘパラン硫酸プロテオグリカの安定供給系を確立した。

③研究用モデル細胞の構築技術の開発

本プロジェクトの最終目標であるモデル細胞を用いた薬効評価系や微小循環動態試験系を構築することを目的として、神経変性疾患モデル細胞、BBB モデルの構築を目指した。本プロジェクトで創製するモデル細胞は、京都大学再生医科学研究所で樹立された日本人由来のヒト ES 細胞株で、成果として出来上がる薬効評価系・動態試験系は薬剤に対する反応が日本人の遺伝的背景に基づくものとなる。この点において、従来入手条件等の制約からやむなく欧米系の

ゲノムを持つ細胞を用いて行っていた試験系とは一線を画し、遺伝的背景に帰するリスクを回避することが可能となる。

神経変性疾患として、前述のアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病を選択し、疾患原因遺伝子としてそれぞれプレセニリン1、スーパーオキシドデスムターゼ1、ハンチンチンを選定した。それぞれの変異遺伝子の発現ベクターを構築し、①で開発された遺伝子導入技術を用いて目的遺伝子を安定に発現する細胞株の作成を試みた。この結果、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病の疾患遺伝子の安定発現ES細胞株が得られ、アルツハイマー病と筋萎縮側索硬化症のモデル細胞では、それぞれの疾患に見られる表現型を再現できていることを確認した。

BBB モデルは、脳内薬物動態をin vitro 予測する上で強力な創薬支援ツールとなり得る。BBB は、血管系細胞(血管内皮細胞、血管周皮細胞)と神経系細胞(アストロサイト)で構成されることから、ここでは、ヒトES 細胞の分化誘導によって調製されるこれらBBB 構成細胞を組み合わせ利用することでモデルを構築する。現在までに、ヒトES 細胞から、アストロサイト・神経前駆細胞の分化誘導と量産調製技術の確立に成功し、モデル構築に供することが可能となっている。血管内皮細胞・血管周皮細胞への分化誘導も確認できている。また、初代培養細胞等を用いてモデル構築形態に関する事前検討やモデル評価技術の取得準備も順調に進めている。さらに血管系細胞の量産化調製技術を確立し、最適なモデル構築形態を検討する中で、実用に堪える優れたヒト型BBB モデルの創製を目指す。

本プロジェクトの最終目標として、モデル細胞を用いたハイスループットスクリーニング系を構築することが挙げられる。ES 細胞の特性としてコロニー状の細胞を播種する必要があり、そのため細胞の調製方法、分注ノズルサイズ、測定プレート等の検討を行った。その結果、ES 細胞を用いるHTS 機器システムのプロトタイプが出来上がり、マウスES 細胞及びサルES 細胞を用いたスクリーニングの実施体制が整った。今後、本プロトタイプを基盤として本プロジェクトで創製されるヒトES 細胞から分化誘導されたモデル細胞を用いたHTS 系構築へと進める予定である。

| 目 標 | 研究開発成果 | 達成度 |
|--|---|---|
| <p>研究開発項目①「ヒトES細胞の加工技術開発」 ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発</p> <p>①ヒト ES 細胞への遺伝子導入法の検討(京都大学) ・30余種のリポフェクション試薬について試みる。 ・エレクトロポレーション法について試みる。</p> <p>②ヒト ES 細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学) ・Tet-On/Offシステムの導入を試みる。</p> <p>③ヒト ES 細胞へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入の検討(幹細胞創薬研究所) ・予備実験としてサルES細胞へのエレクトロポレーションの条件検討を行い、エレクトロポレーションが可能かどうか見極める。</p> <p>④ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法の開発(埼玉医科大学) ・アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、レンチウイルス由来のベクターを構築する。 ・それぞれのベクター系につき、異なる血清型やエンベロップを持つウイルスを産生・増殖する。</p> <p>⑤ヒトES細胞への遺伝子導入法の検討(京都大学) ・リポフェクション試薬について詳細な検討を試みる。</p> <p>⑥ヒトES細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学) ・Tet-On/Offシステムを導入したサルES細胞において導入遺伝子の発現制御に関する詳細な検討を試みる ・ヒトES細胞へのTet-On/Offシステムの導入を試みる。</p> <p>⑦加工技術開発に適したヒトES細胞株の樹立(京都大学) 加工技術開発に適したヒトES細胞株スクリーニングを試みる。</p> <p>⑧ヒトES細胞へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入の検討(幹細胞創薬研究所) ・ヒト ES 細胞へのエレクトロポレーションが可能かどうか見極める。不可能なようなら、他の方法を施行し、適当な方法を決定する。</p> <p>⑨ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学) ・アデノウイルスベクターと AAV ベクターを用いた一過性遺伝子発現を試みる。 ・レンチウイルスベクターを用いた安定な遺伝子発現を試みる。</p> <p>⑩ヒト ES 細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学) ・Tet-On/Off システムを導入したヒト ES 細胞株の樹立と導入遺伝子の発現制御に関する検討を試みる</p> | <p>①ヒト ES 細胞への遺伝子導入法の検討(京都大学) ・高遺伝子導入効率の試薬をいくつか見出した。 ・エレクトロポレーション法についてはいくつかの重要な知見を見出した。</p> <p>②ヒト ES 細胞における遺伝子発現制御の開発 ・Tet-On/Offシステムを導入したサルES細胞株の樹立に成功した。</p> <p>③ヒト ES 細胞へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入の検討(幹細胞創薬研究所) ・サルES細胞に対して40%以上の確率でEGFPの遺伝子導入ができた。サルES細胞へのエレクトロポレーションは可能であった。</p> <p>④ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法の開発(埼玉医科大学) ・各ベクター系につき、マーカー遺伝子をコードしたベクターDNAを構築した。 ・産生した各ベクターが機能的に遺伝子を発現することを確認した。</p> <p>⑤ヒトES細胞への遺伝子導入法の検討(京都大学) ・従来より数倍程度遺伝子導入効率の高いリポフェクション試薬を見出した。</p> <p>⑥ヒトES細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学) ・サルES細胞においてTet-On/Offシステムが十分機能することを見出す。 ・Tet-On/Offシステムを導入したヒトES細胞株の樹立に成功</p> <p>⑦加工技術開発に適したヒトES細胞株の樹立(京都大学) ・加工技術開発に適したヒト ES 細胞株(扱いやすいサブライン)の樹立に成功。</p> <p>⑧ヒトES細胞へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入の検討(幹細胞創薬研究所) ヒト ES 細胞へのエレクトロポレーションが可能であることを見出し、効率化に成功した。</p> <p>⑨ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学) ・アデノウイルスベクターと AAV ベクターとも用いて、それぞれヒト ES 細胞で~98%と~80%の遺伝子導入効率を得た。 ・レンチウイルスベクターを用いて~15%の細胞で安定な遺伝子導入効率を得た。</p> <p>⑩ヒトES細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学) ・Tet-On/Off システムを導入したヒト ES 細胞株が十分機能することを確認。 ・ヒト ES 細胞での新しい遺伝子発現制御2A システムを開発</p> | <p>○</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>○</p> |

| 目 標 | 研究開発成果 | 達成度 |
|---|---|-----|
| <p>⑪加工技術開発に適したヒトES細胞株の検討(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> 加工技術に適したヒトES細胞を用い、ヒトES細胞が扱いやすくなる分子の探索を試みる。 | <p>⑪加工技術開発に適したヒトES細胞株の検討(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> 加工技術に適したヒトES細胞株とその親株との間でトランスクリプトームによる比較解析法を見出した。 | ○ |
| <p>⑫ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> レンチウイルスベクターを用いた安定な遺伝子発現方法の最適化を試みる。 | <p>⑫ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> レンチウイルスベクターを用いて至適な条件を検討することによって、70~80%のヒトES細胞で安定な遺伝子導入効率を得た。 | ○ |
| <p>⑬ヒトES細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> Tet-On/Offシステムを導入した細胞株で特定の遺伝子を過剰発現することによりヒトES細胞株の分化誘導に関する検討を試みる。 | <p>⑬ヒトES細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> Tet-On./Offシステムによる特定遺伝子を過剰発現することでヒトES細胞が特定方向に分化誘導可能であることを見出す。 | ○ |
| <p>⑭加工技術開発に適したヒトES細胞株の検討(京都大学)</p> <p>加工技術開発に適したヒトES細胞を用い、ヒトES細胞が扱いやすくなる候補分子を探索する。</p> <ul style="list-style-type: none"> ヒトES細胞が扱いやすくなる候補分子の評価方法の検討を試みる | <p>⑭加工技術開発に適したヒトES細胞株の検討(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ヒトES細胞が扱いやすくなる候補分子を特定した。 ヒトES細胞が扱いやすくなる分子の評価方法を見出す頃に成功。 | ○ |
| <p>⑮ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> アデノウイルスベクターとAAVベクターを用いた一過性遺伝子発現がヒトiPS細胞にも応用できるか検討する。 肝細胞への分化誘導に関わる遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを作製し、肝細胞誘導技術の開発に応用する。 | <p>⑮ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学)</p> <p>アデノウイルスベクターとAAVベクターとを用いて、ヒトiPS細胞でそれぞれ95%と50%の遺伝子導入効率を得た。ヒトES細胞で確立した高効率一過遺伝子発現の条件がiPS細胞へも適用可能である事が示唆された。</p> <ul style="list-style-type: none"> 肝細胞への分化誘導を増進する候補遺伝子(HNF1α, HNF4α, LAP)及び阻害する候補遺伝子(LIP)を発現するアデノウイルスベクターをそれぞれ作製した。 | ◎ |
| <p>⑯ヒトES細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> Tet-On/Offシステムを導入した細胞株で特定の遺伝子を過剰発現することによりヒトES細胞株の分化誘導に関するさらに詳細な検討を試みる。 | <p>⑯ヒトES細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> Tet-On./Offシステムによる特定遺伝子を過剰発現することでヒトES細胞が特定方向への分化誘導が十分機能していることを見出す。 | ○ |
| <p>⑰加工技術開発に適したヒトES細胞株の検討(京都大学)</p> <p>加工技術開発に適したヒトES細胞を用い、ヒトES細胞が扱いやすくなる候補分子を探索する。</p> <ul style="list-style-type: none"> ヒトES細胞が扱いやすくなる候補分子の評価方法の検討を試みる | <p>⑰加工技術開発に適したヒトES細胞株の検討(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ヒトES細胞が扱いやすくなる分子について機能解析を進めた。 | △ |
| <p>⑱ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学)</p> <p>レンチウイルスベクターを用いた安定な遺伝子発現がヒトiPS細胞にも応用できるか検討する。</p> | <p>⑱ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> レンチウイルスベクターを用いて、ヒトiPS細胞で95%の遺伝子導入効率を得た。ヒトES細胞で確立した安定遺伝子発現の条件がiPS細胞へも適用可能である事が示唆された。 | ◎ |

| ヒトES細胞における相同組み換え技術の開発 | | |
|--|--|---|
| <p>①ヒト ES 細胞に適した相同組み換えベクターの構築(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒト ES 細胞に適したベクターカセットを検討する。 ・ヒト ES 細胞に適した遺伝子導入法を検討する。 ・サル HPRT 遺伝子を単離し、相同組み換えベクター構築を試みる。 ・ヒト HPRT 遺伝子を単離し、相同組み換えベクター構築を試みる。 | <p>①ヒトES細胞に適した相同組み換えベクターの構築(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒト ES 細胞に適したベクターカセットを見出した。 ・遺伝子導入効率を2倍上げること成功した。 ・サル HPRT 遺伝子を単離し、ベクターを構築した。 ・ヒト HPRT 遺伝子を単離し、ベクター構築をした。 | ○ |
| <p>②ヒト及びサル ES 細胞に対する相同組み換えベクターの構築(幹細胞創薬研究所)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・サル HPRT 遺伝子の 1st ATG 付近をターゲットとした相同組み換えベクターを構築する。 ・ヒト HPRT 遺伝子の 1st ATG 付近をターゲットとした相同組み換えベクターを構築する。 | <p>②ヒト及びサル ES 細胞に対する相同組み換えベクターの構築(幹細胞創薬研究所)</p> <p>サル HPRT 遺伝子の 1st ATG 付近をターゲットとした相同組み換えベクターを構築した。</p> <p>ヒト HPRT 遺伝子の 1st ATG 付近をターゲットとした相同組み換えベクターを構築した。</p> | ○ |
| <p>③ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・HPRTノックアウトカセットをコードしたアデノウイルスとAAVベクターを調製する。 | <p>③ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ベクターを構築し、多様な血清型由来のウイルスを調製した。 | ○ |
| <p>④ヒトES細胞での相同組み換え率の向上と相同組み換え技術の発展(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・リポフェクション試薬により、ヒトES細胞での相同組み換えを試みる。 ・相同組み換えのためのHPRT以外の遺伝子の単離を目指す。 | <p>④相同組み換えのために新たな遺伝子導入法の検討(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・リポフェクション試薬では相同組み換え率の向上に対して効果を見出せなかった。 ・ヒトES細胞の未分化維持不可欠と考えられている OCT-3/4遺伝子ゲノムの単離をほぼ終えた。 | ○ |
| <p>⑤ヒト ES 細胞に対する相同組み換えを試行するための基盤技術開発(幹細胞創薬研究所)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・エレクトロポレーション条件の至適化を図る。 ・迅速なスクリーニングシステムを確立する。 | <p>⑤ヒト ES 細胞に対する相同組み換えを試行するための基盤技術開発(幹細胞創薬研究所)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・エレクトロポレーション後の遺伝子導入コロニーの数を、従来の 10 倍以上に上昇させた。 ・スクリーニングに掛かる時間と費用の大幅な削減に成功した。 | ◎ |
| <p>⑥ヒト ES 細胞に対する相同組み換えの達成(幹細胞創薬研究所)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒト ES 細胞に適応しうる知見を手に入れるため、サル ES 細胞に対する相同組み換えを成功させる。 ・ヒト ES 細胞に対する相同組み換えを成功させる。 | <p>⑥ヒト ES 細胞に対する相同組み換えの達成(幹細胞創薬研究所)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・サル ES 細胞に対する相同組み換えに成功した。 ・ヒト ES 細胞に対する相同組み換えに成功し、組み換わった細胞を増幅、保存した。 | ◎ |
| <p>⑦組み換わった ES 細胞を有効利用するためのアプリケーションの開発(幹細胞創薬研究所)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・基本となるベクターを構築する。 | <p>⑦組み換わった ES 細胞を有効利用するためのアプリケーションの開発(幹細胞創薬研究所)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・基本となるベクターを構築した。 | ○ |
| <p>⑧ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・HPRT遺伝子座を標的とした相同組換え実験を行う。 | <p>⑧ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・サルES細胞を用いて、アデノウイルスベクターによる相同組換えに成功した。 | ◎ |
| <p>⑨ヒトES細胞での相同組み換え率の向上と相同組み換え技術の発展(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・幹細胞創薬研究所で開発されたヒト ES 細胞の相同組み換え技術の技術移転を行う | <p>⑨相同組み換えのために新たな遺伝子導入法の検討(京都大学)</p> <p>ヒトES細胞に対する遺伝子相同組み換え技術に成功(技術移転も成功)</p> <p>染色体解析を行い、相同組み換え後もヒトES細胞株で染色体異常が行っていないことを確認。</p> | ○ |
| <p>⑩相同組み換えヒト ES 細胞を用いた遺伝子置換技術の開発(幹細胞創薬研究所)</p> <p>Cre/LoxPシステムを応用し、相同組み換えを起こしたヒトES細胞のHPRT遺伝子座に好みの遺伝子を高効率で挿入する技術を確立する。</p> | <p>⑩相同組み換えヒト ES 細胞を用いた遺伝子置換技術の開発(幹細胞創薬研究所)</p> <p>セレクションの結果、100%の効率で HPRT 遺伝子座に遺伝子を挿入し、且つそれらを発現させることに成功した。</p> | ◎ |

| | | |
|---|--|--|
| <p>⑪ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学) ・ ヒトES細胞にアデノウイルスを使用し、相同組換え効率を検討する。</p> <p>⑫ヒトES細胞での相同組み換え率の向上と相同組み換え技術の発展(京都大学) ・複数のヒトES細胞株で、遺伝子相同組み換えを試みる。</p> <p>⑬遺伝子置換技術を応用した、単独遺伝子座改変での誘導的遺伝子発現系の構築(幹細胞創薬研究所) 遺伝子置換を用い、Tet-Onシステムに必要な2つのカセットをHPRT遺伝子座に挿入する。</p> <p>⑭ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学) HPRT 遺伝子座以外の実用的な遺伝子を標的とした相同組換え実験に必要なベクターを調整する。 ・ HPRT遺伝子座以外の実用的な遺伝子を標的とした相同組換え実験を行なう。</p> <p>⑮ヒトES細胞での相同組み換え率の向上と相同組み換え技術の発展(京都大学) ・ヒトES細胞で培った技術を用い、ヒトiPS細胞株でも試みる。</p> <p>⑯ヒトES細胞で発現していない遺伝子をコードする遺伝子座への相同組み換え(幹細胞創薬研究所) ・HB9遺伝子座を改変した相同組み換え体を少なくとも1クローン得る。</p> <p>⑰ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学) ・樹立したアルブミン及びHB9ノックインヒトES細胞を分配機関に寄託する。 ・アデノウイルスベクターとAAVベクターを用いた相同組換え技術がヒトiPS細胞にも応用できるか検討する。</p> | <p>⑪ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学) ・ 複数のヒトES細胞株において、アデノウイルスベクターを使用すると、33%-45%もの高効率で相同組換え体が得られた</p> <p>⑫相同組み換えのために新たな遺伝子導入法の検討(京都大学) ・複数のヒトES細胞株で遺伝子相同組み換え技術に成句、染色体の正常性についても確認。 ・幹細胞創薬研究所で開発されたヒトES細胞における遺伝子相同組み換え技術をさらに改良し、より効率を上げること成功。</p> <p>⑬遺伝子置換技術を応用した、単独遺伝子座改変での誘導的遺伝子発現系の構築(幹細胞創薬研究所) ・カセットの向きやInsulatorの配置を検討することで、HPRT遺伝子座単独でのTet-Onシステムの構築に成功した。</p> <p>⑭ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学) ・熊本大学との共同研究で、肝細胞で特異的に発現するヒトアルブミン遺伝子座に蛍光遺伝子mKO1を組み込んだアデノウイルスベクターと、幹細胞創薬研究所との共同研究で、運動神経細胞で特異的に発現するヒトHB9遺伝子座に蛍光遺伝子EGFPを組み込んだアデノウイルスベクターを作製した。また、未分化特異的マーカー遺伝子であるNANOG遺伝子を標的とした相同組換えベクターをAAVで作製した。 ・アルブミン及びHB9遺伝子座に蛍光遺伝子を組み込んだ分化誘導ヒトESアッセイ細胞を、それぞれ90%、57%の高効率で樹立できた。また、NANOG遺伝子ノックアウト細胞も20%-87%の高効率で作製できた。</p> <p>⑮相同組み換えのために新たな遺伝子導入法の検討(京都大学) ・ヒトiPS細胞でも遺伝子相同組み換え技術に成功。</p> <p>⑯ヒトES細胞で発現していない遺伝子をコードする遺伝子座への相同組み換え(幹細胞創薬研究所) ・HB9遺伝子座へのEGFPノックインを行い、エレクトロポレーションで3クローンの相同組み換え体を得た。</p> <p>⑰ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学) ・樹立したアルブミン及びHB9ノックインヒトES細胞の基本的な性質を確認し、分配機関である京都大学に寄託した。これにより、これらの細胞は各使用機関に分配可能となった。 ・ヒトiPS細胞で、アデノウイルスベクターとAAVベクターとを用いて、ヒトES細胞とほぼ同等の効率で相同組換え体を得られた。ヒトES細胞で確立した高効率相同組換え法がiPS細胞へも応用可能である事が示唆された。</p> | <p>◎</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>◎</p> |
|---|--|--|

| | | |
|---|--|---|
| <p>ヒトES細胞におけるRNA干渉法による遺伝子発現制御技術の開発</p> | | |
| <p>①テトラサイクリン誘導性shRNA発現ES細胞システムの構築(京都大学)</p> | <p>①テトラサイクリン誘導性shRNA発現マウスES細胞を構築した。種々の条件を検討し、shRNA発現システムの最適化を行った。</p> | ○ |
| <p>②Cre-loxP システムを用いた新しいタモキシフェン誘導性shRNA 発現システムの構築(京都大学)</p> | <p>②エストロゲン受容体-Cre融合タンパクを用いたタモキシフェン誘導性shRNA発現システムを構築した。</p> | ○ |
| <p>③テトラサイクリン誘導性shRNA発現ES細胞システムの構築(京都大学)</p> | <p>③テトラサイクリン誘導性shRNA発現マウスES細胞を構築した。ES細胞分化途上において標的遺伝子発現の特異的阻害と細胞分化方向の制御に成功した(Hiraoka-Kanie, <i>Biochem Biophys Res Commun</i>, 2006)。</p> | ○ |
| <p>④Cre-loxP システムを用いた新しいタモキシフェン誘導性shRNA 発現システムの構築(京都大学)</p> | <p>④エストロゲン受容体-Cre 融合タンパクを用いたタモキシフェン誘導性 shRNA 発現システムを構築した。ES細胞分化途上における標的遺伝子発現の特異的阻害に成功している。</p> | ○ |
| <p>⑤テトラサイクリン誘導性 cDNA 発現(Tet-OFF)ES 細胞システムの構築(京都大学)</p> | <p>⑤当初計画より遺伝子発現制御に有用な新しい可能性を見出し、これらのシステムの構築を行っている。</p> | ◎ |
| <p>⑥新しい ES 細胞における誘導性ノックダウンレスキューシステムの開発(京都大学)</p> | <p>⑥当初計画より遺伝子発現制御に有用な新しい可能性を見出し、これらのシステムの構築を行っている。</p> | ◎ |
| <p>⑦ヒト ES 細胞における shRNA 発現システムの構築</p> | <p>⑦ヒトES細胞培養及び分化実験を開始した。⑤のシステムがマウスES細胞において確立された後に同システムのヒトES細胞への導入を行う。</p> | △ |
| <p>⑧タモキシフェン誘導性shRNA発現システムを構築とテトラサイクリンシステムとの有用性比較</p> | <p>⑧エストロゲン受容体-Cre融合タンパクを用いたタモキシフェン誘導性shRNA発現システムを構築。テトラサイクリン誘導性システムより強力と考えられた。</p> | ○ |
| <p>⑨マイクロRNA発現による遺伝子発現抑制システムを構築</p> | <p>⑨タモキシフェン誘導性マイクロRNA発現ベクターの構築に成功。現在ES細胞に導入し機能確認中</p> | ○ |
| <p>⑩テトラサイクリン誘導性cDNA発現システムをshRNA発現系と組み合わせたノックダウンレスキューシステムの構築</p> | <p>⑩誘導性cDNA発現ベクターを構築した。HPRT遺伝子座への同ベクターの導入中。</p> | ○ |
| <p>⑪タモキシフェン誘導性マイクロRNA発現ES細胞分化システムの構築</p> | <p>⑪タモキシフェン誘導性マイクロRNA発現系をマウスES細胞に導入し、分化途上において標的遺伝子の特異的発現阻害を行うことに成功。</p> | ○ |
| <p>⑫テトラサイクリン誘導性cDNA発現系とタモキシフェン誘導性マイクロRNA発現系によるRNA pol.II系を用いた安定したノックダウンレスキューシステムの構築</p> | <p>⑫テトラサイクリン誘導性cDNA発現系を上記①のシステムに導入中。</p> | △ |
| <p>⑬誘導性shRNA発現ES細胞システムによる心筋分化関連遺伝子の機能解析</p> | <p>⑬DNAマイクロアレイにより同定した心筋分化候補遺伝子の機能をshRNA発現ES細胞システムにて検証。心筋分化阻害効果を認めた。</p> | ◎ |
| <p>⑭マウスES細胞ノックダウンレスキューシステムの構築と機能確認</p> | <p>⑭Flip-Inシステムを用いてレスキューcDNAの導入に成功。テトラサイクリン誘導性にGFP発現を誘導できることを確認。平成20年度③で機能確認した遺伝子のレスキュー実験施行中。</p> | ○ |
| <p>⑮遺伝子発現制御システムの分化研究への応用</p> | <p>⑮テトラサイクリン誘導性cDNA発現系を血管分化機構解析に応用し有用性を確認した(Yamamizu, <i>Blood</i>, 2009; Yamamizu, <i>J Cell Biol</i>, in press)。</p> | ◎ |
| <p>⑯ヒトES細胞におけるノックダウンレスキューシステムの構築</p> | <p>⑯マウスでの有用性確認後ヒトへの導入を行う。</p> | △ |

| 研究開発項目②「ヒトES細胞の分化誘導制御技術の開発」 ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発 | | |
|---|--|---|
| ① サルES細胞から神経系細胞への分化誘導(京都大学) ・神経系への分化誘導技術について幹細胞創薬研究所への技術移転を行う | ① ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導(京都大学) ・神経系への分化誘導技術の幹細胞創薬研究所への技術移転を達成。 | ○ |
| ②サル ES 細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・報告されている神経分化誘導方法の情報を集める。 ・神経誘導のための胚様体形成を試みる。 ・神経分化誘導を知るために、共培養系による方法を試みる。 | ②サルES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・様々な神経分化誘導方法の情報を収集した。 ・サルES細胞の胚様体形成の条件を整えた。 ・ストローマ細胞との共培養系による神経誘導を行い、サルES細胞が神経分化することを確認した。 ・ノギンによる神経誘導法の予備実験を行った。 | ○ |
| ③サルES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・報告されている胚様体を介した運動神経細胞への誘導方法が・サルES細胞に適応可能か調べる。 ノギンによる神経誘導方法がサルES細胞に適応可能か調べる。 | ③サルES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・適応できない方法があることを明らかにした。 ・胚様体を介した方法で運動神経の分化誘導に成功した。 ・ノギンによって効率よく神経幹細胞・神経前駆細胞に分化誘導させることに成功した。細胞塊を揃えることで均一な分化誘導が可能なお見いだした。 ・神経前駆細胞が凍結保存可能であることを確認した。 | ○ |
| ④ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・報告されている胚様体を介した運動神経細胞および大脳神経細胞への誘導方法がヒトES細胞に適応可能か調べる。 ・ノギンによる神経誘導方法がヒトES細胞に適応可能か調べる。 | ④ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・胚様体を介した方法で運動神経の分化誘導に成功した。 ・その分化誘導効率を向上させるため、培養日数、培養液の検討を行い、培養日数の短縮に成功した。 ・既報の運動神経細胞誘導方法に、そのままではKhES-11に適応できない方法があることを明らかにした。このことはヒトES細胞株に性質の違いがあるという考えを支持する。 ・ノギンによって神経幹細胞・神経前駆細胞に分化させることに成功し、他の因子と組み合わせることでさらに効率を上げることに成功した。 ・神経前駆細胞が、サルES細胞の場合と同様に凍結保存可能であることを確認した。 | ○ |
| ⑤ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・胚様体を介した方法とノギンを用いる分化誘導法の比較 ・誘導効率向上方法を探索 | ⑤ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) 神経幹細胞までの神経誘導をノギン神経分化誘導法に統一 ・ノギンによる神経分化誘導の効率を向上させることに成功した | ○ |
| ⑥運動神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ノギンによって分化誘導された神経幹細胞から分化誘導可能か調べる ・代替可能な低分子化合物の探索 | ⑥ノギンによる運動神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・マーカー分子、遺伝子発現陽性神経細胞への分化誘導に成功した。 ・分化誘導に必須な組換え蛋白質の代替することが可能な低分子化合物を見いだした。 ・生化学的データ、電気生理学的データによって、運送神経細胞の成熟度を確認した。 ・シナプス形成能を調べ、機能的であることを確認した。 | ◎ |
| ⑦ドーパミン作動性神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ノギンによって分化誘導された神経幹細胞から分化誘導可能か調べる。 | ⑦ドーパミン作動性神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・マーカー分子、遺伝子発現陽性神経細胞への分化誘導に成功した。 ・ドーパミンの放出、取り込み機能を確認した | ○ |

| | | |
|--|--|---|
| <p>⑧ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ノギンによって誘導される神経細胞の特徴付け</p> | <p>⑧ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ノギンによって誘導される神経細胞の特徴付けを生化学的、電気生理学的手法で行った。</p> | ○ |
| <p>⑨運動神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ヒトiPS細胞へ分化誘導方法が適応可能か調べる ・神経幹細胞の増幅を試す</p> | <p>⑨運動神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ヒトiPS細胞へ分化誘導方法が適応可能であることが分かった。 ・iPS細胞株による分化効率が大きく異なることを明らかにした。 ・ES細胞由来の神経幹細胞を運動神経細胞への分化能を低下させずに、増幅することに成功した。 ・レポーターなしでES細胞由来の運動神経細胞を濃縮することに成功した。</p> | ○ |
| <p>⑩中型有棘神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ノギンによって分化誘導された神経幹細胞から分化誘導可能か調べる。</p> | <p>⑩中型有棘神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・マーカー分子、遺伝子発現陽性神経細胞への分化誘導に成功した。</p> | ○ |
| <p>⑪グルタミン作動性神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ノギンによって分化誘導された神経幹細胞から分化誘導可能か調べる。</p> | <p>⑪グルタミン作動性神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・様々な試みを行ったが、プロジェクト終了時までには分化効率を上げることが出来なかった。</p> | △ |
| <p>⑫アストロサイトへの分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ノギンによって分化誘導された神経幹細胞から分化誘導可能か調べる。</p> | <p>⑫アストロサイトへの分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ニューロスフェアの継代およびES細胞由来神経幹細胞への因子添加によって効率良くアストロサイトへ分化させることに成功した。</p> | ○ |
| <p>ヒトES細胞から心筋細胞への分化誘導技術開発</p> | | |
| <p>①マウス ES 細胞における新しい心筋前駆細胞及び心筋細胞の分化誘導</p> | <p>①マウスES細胞を用いて効率的に心筋細胞を誘導する新しい2次元培養分化誘導法を開発した。新しい心筋前駆細胞を同定・純化した。Dkk1が心筋分化を促進することを明らかにした(Yamashita, FASEB J, 2005)。</p> | ○ |
| <p>②マウス ES 細胞を用いた心筋ペースメーカー細胞の分化誘導</p> | <p>②心筋ペースメーカー細胞誘導の基盤技術を開発。心筋自動能維持に必須なイオンチャンネルを同定した。イオンチャンネルの発現を制御する転写因子を見出した。同転写因子発現抑制により自己拍動心筋コロニーが増加した。</p> | ◎ |
| <p>③高効率心筋前駆細胞及び心筋細胞分化誘導法の開発</p> | <p>③心筋前駆細胞及び心筋細胞の誘導効率を約10倍促進させる化学物質を見出した。</p> | ◎ |
| <p>④ヒト ES 細胞を用いた心筋分化誘導</p> | <p>④ヒト ES 細胞(京大株)から2次元培養下に心筋細胞を分化誘導することに成功した。②③の成果を導入予定である。</p> | △ |
| <p>⑤END-2 細胞を用いたサル ES 細胞の心筋分化誘導系の構築(幹細胞創薬研究所)</p> | <p>⑤コロニーサイズ、血清濃度の検討により効率化実現(幹細胞創薬研究所)</p> | ◎ |
| <p>⑥サル ES 細胞由来心筋細胞の細胞外電位測定(東京医科歯科大学)</p> | <p>⑥細胞外電位の取得および QT 延長典型三化合物の評価および QT 延長応用への可能性示唆</p> | ○ |
| <p>⑦サル ES 細胞由来神経細胞に発現するイオンチャンネル遺伝子、心筋特異的遺伝子の発現解析(幹細胞創薬研究所、東京医科歯科大学)</p> | <p>⑦心筋特異的遺伝子およびイオンチャンネルの確認</p> | ○ |
| <p>⑧α-MHC-GFP 発現サル ES 細胞の構築およびソーティングの検討(幹細胞創薬研究所)</p> | <p>⑧細胞樹立。フローサイトメトリーによる細胞の純化。一細胞での拍動確認</p> | ◎ |
| <p>⑨END-2細胞を用いたヒトES細胞の心筋分化誘導系の構築(幹細胞創薬研究所)</p> | <p>⑨ヒトES細胞からの分化開始。</p> | ○ |

| | | |
|--|---|---|
| ⑩ES 細胞由来心筋の自動能維持機構の解明 | ⑩HCN 及び Cav3 イオンチャネルが ES 細胞由来心筋細胞自動能維持を担っていることを明らかにした(Yanagi, <i>Stem Cells</i> , 2007)。 | ○ |
| ⑪心筋ペースメーカー細胞の誘導・純化法の開発 | ⑪FACS 可能な抗 HCN4 抗体作製開始(受託研究) | ○ |
| ⑫輸入ヒト ES 細胞からの心筋分化誘導 | ⑫輸入ヒト ES 細胞株(H1, H9 株)からの心筋分化誘導に成功。 | ○ |
| ⑬END-2 細胞を用いたヒト ES 細胞の心筋分化誘導系の構築(幹細胞創薬研究所) | ⑬誘導初期における KSR 添加による誘導効率の増加。 | ○ |
| ⑭ α -MHC-GFP 発現ヒト ES 細胞の構築(幹細胞創薬研究所) | ⑭細胞樹立および特性解析 | ◎ |
| ⑮サイクロスポリン A による高効率心筋分化誘導法の開発 | ⑮サイクロスポリン A が ES 細胞及び iPS 細胞からの心筋前駆細胞及び心筋細胞分化を 10-20 倍促進することを報告(Yan, <i>Biochem Biophys Res Commun</i> , 2009; PCT 特許出願)。 | ◎ |
| ⑯マウス iPS 細胞からの心筋分化誘導法の開発 | ⑯マウス iPS 細胞からの系統的心血管分化誘導法を開発し報告(Narazaki, <i>Circulation</i> , 2008; <i>Best Paper Award</i> , Circulation2008)。 | ◎ |
| ⑰ヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導 | ⑰ヒト iPS 細胞から心筋分化誘導に成功 | ◎ |
| ⑱ヒト成体心筋モデル細胞取得法の確立(幹細胞創薬研究所) | ⑱ヒト ES 細胞由来心筋細胞の長期再接着培養法の確立と浮遊培養法による機能増強 | ◎ |
| ⑲ヒト ES 細胞由来心筋細胞を用いた QT 延長測定評価法の確立(安全性薬理試験への適応)(幹細胞創薬研究所) | ⑲細胞外電位の取得および in vivo を反映する薬剤応答性の検出 (⑩⑲Otsuji TG et al., <i>Stem Cell Res</i> , 2010) | ◎ |
| ⑳ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の機能評価・モデル細胞構築 | ⑳ヒト iPS 細胞由来心筋細胞において、遺伝子発現・電気生理学的検討・電子顕微鏡的検討等を行い、モデル細胞としての要件を満たすことを確認。 | ◎ |
| 21 ヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導の効率化 | 21 サイクロスポリン A 法を導入することにより、ヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導効率を約5倍促進。 | ◎ |
| 22 ヒト iPS 細胞への応用(幹細胞創薬研究所) | 22 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の取得および薬剤応答性の検出 | ○ |
| 23 化合物によるヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞の機能亢進(幹細胞創薬研究所) | 23 適切な薬剤応答性を示す心筋モデル細胞の短期間での取得 | ◎ |
| ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発 | | |
| ①マウスES細胞から肝細胞への分化誘導技術の検討(京都大学) ・成熟肝細胞への分化誘導に向けてより適した培養条件を調べる。 ・既存の細胞株による肝細胞の成熟化に対する効果を調べる。 | ①マウスES細胞から肝細胞への分化誘導技術開の検討(京都大学) ・効率よく肝前駆細胞を見出し、効率よく成熟化させるシステムを構築した。 ・既存の細胞株では肝細胞の成熟化に対する効果がほとんどないことを見出した。 | ○ |
| ②ヒトES細胞における肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子の導入(京都大学) ・ベクターの構築を進める。 | ②ヒトES細胞における肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子の導入(京都大学) ・4種類のベクターを構築した。 | ○ |
| ③フィーダー細胞の肝細胞分化誘導能の検討 ・マウス由来 Thy1 陽性細胞株のサル ES 細胞の肝細胞分化誘導能 を調べる。 | ③フィーダー細胞の肝細胞分化誘導能の検討 ・マウス由来細胞株の分化誘導能は認められなかった。 | △ |
| ④マウスES細胞から肝細胞への分化誘導技術の検討(熊本大学) | ④マウスES細胞から肝細胞への分化誘導技術開の検討(熊本大学) | ○ |

| | | |
|--|--|--|
| <p>・熊大が独自に開発した支持細胞を用いる新規な分化誘導方法について、成熟肝細胞への分化誘導に向けてより適した培養条件を調べる。</p> <p>・一連の分化誘導過程を数ステップに分けて、それぞれのステップにおいて分化誘導に適した成長増殖因子などの条件を調べた。</p> <p>⑤サルES細胞から肝細胞への分化誘導技術の検討(熊本大学) ヒトES細胞における肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子の導入(京都大学)</p> <p>⑥ヒト肝細胞株を用いて構築した4種のベクターについて調べる。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒトES細胞株への遺伝子導入を試みる。 ・ヒトES細胞の分化誘導に伴いレポーターの発現を調べる。 ・マウス胎児肝臓由来ストローマ細胞株の肝細胞誘導能の確認 <p>⑦マウス胎児肝臓由来ストローマ細胞株の樹立を試みる。</p> <p>⑧マウス胎児肝臓由来ストローマ細胞に温度感受性 SV40-T 抗原</p> <ul style="list-style-type: none"> ・遺伝子を安定導入し不死化を試みる。 <p>⑨ストローマ細胞株の肝成熟能を調べる。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・⑧でできた不死化細胞のヒト ES 細胞の肝細胞への成熟能を調べる。 <p>⑩成熟肝細胞への分化誘導方法の検討(熊本大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・マウスES細胞における成熟肝細胞への分化誘導方法の検討、及びその成熟度についての検討 ・ヒトES細胞における成熟肝細胞への分化誘導方法の検討、及びその成熟度についての検討 <p>⑪肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子の構築(熊本大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・BACベクターを用いる方法を進める。 <p>⑫成熟肝細胞への分化誘導方法の検討</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒトES細胞における成熟肝細胞への分化誘導方法の最適化、その成熟度についての検討 <p>⑬sBMを用いたマウスES細胞から肝細胞への分化誘導方法の検討</p> <ul style="list-style-type: none"> ・環境研の持立先生から提供を受け、sBMを用いた分化誘導についての効果を詳細に解析した。(熊本大学) <p>⑭sBMを用いたヒト成熟肝細胞への分化誘導方法の検討⑭</p> <ul style="list-style-type: none"> ・マウスES細胞で検討した条件をヒトES細胞に適用し、その有用性について検討した。 <p>⑮肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子をノックインしたヒトES細胞の樹立</p> <ul style="list-style-type: none"> ・BACベクターを用いる方法を進める。(熊本大学) <p>⑯M15細胞とsBMを用いた分化誘導方法を組み合わせた方法の構築</p> <p>⑰肝への分化誘導における特定の基底膜成分について検討した。</p> | <p>・支持細胞の系はマウスのみでなく、サルES細胞についても効率よく肝前駆細胞を効率よく分化誘導した。</p> <p>・肝細胞への分化誘導の一連の過程において促進因子、阻害因子についての知見を得た。</p> <p>⑤サルES細胞から肝細胞への分化誘導にも支持細胞を用いた系が応用できることが分った。</p> <p>⑥ヒトES細胞における肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子の導入(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒト肝細胞株を用いて正しく機能しているベクターを見出した。 ・遺伝子が安定導入されたヒトES細胞株の樹立に成功した。 ・肝細胞への分化誘導に伴い、レポーター遺伝子の発現を確認できる細胞株を樹立した。 <p>⑦マウス胎児肝臓由来のストローマ細胞株がマウスの肝成熟に対して効果があることを発見。</p> <p>⑧マウス胎児肝臓由来ストローマ細胞株の樹立。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・目的の細胞株を樹立した。 ・本細胞株からクローンを 73 個分離した。 <p>⑨ストローマ細胞株の肝成熟能の確認。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ストローマ細胞株が分化誘導をかけたヒト ES 細胞の肝細胞マーカー発現に有効であることを確認した。 <p>⑩成熟肝細胞への分化誘導方法の検討(熊本大学)マウスES細胞における成熟肝細胞への分化誘導に伴い多くの成熟肝細胞の分子マーカーを発現した。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒトES細胞における成熟肝細胞への分化誘導に伴い多くの成熟肝細胞の分子マーカーを発現した。 <p>⑪ヒトES細胞において、肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子についてBACベクターを用いて構築した(熊本大学)</p> <p>⑫成熟肝細胞への分化誘導方法の検討(熊本大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・培地組成について他のプロトコールと比較し、促進効果のある成分を検索した。培養液の組成を変更することで、ヒトES細胞由来の分化肝細胞が20%誘導できた。 <p>⑬sBMの方法を用いた培養系において、マウスES細胞が肝細胞へ分化誘導されることを見いだした。</p> <p>⑭sBMの方法を用いた長期培養において、ヒトES細胞が肝細胞へ分化誘導されることを見いだした。</p> <p>⑮BACクローンを用いて構築した肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子について、埼玉医大と共同研究によりヒトES細胞、ヒトIPS細胞へ導入した(熊本大学)</p> <p>⑯M15細胞からsBMへの二段階分化誘導方法を確立し、ヒトES細胞を効率よく分化誘導する方法を構築した。</p> <p>⑰肝への分化誘導における有効な基底膜成分を見出した。</p> | <p>○</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> |
|--|--|--|

| | | |
|---|--|--|
| <p>⑱肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子をノックインしたヒトESとヒトiPS細胞株の評価と分化細胞の純化・解析(熊本大学)</p> <p>人工基底膜、疑似マトリックスの評価</p> <p>①各人工基底膜・疑似マトリックスのES細胞の未分化維持に対する評価方法の検討を、サルES細胞を用いて行う。(京都大学)</p> <p>②ヒトES細胞の未分化維持培養に関する人工基底膜、疑似マトリックスの評価方法の検討を行う。</p> <p>③ヒトES細胞で発現しているラミニンについて検討を行う。</p> <p>④ヒトES細胞で優位に発現しているラミニン332, 511, 111のレコンビナントを用い、ヒトES細胞の未分化維持が可能であるかどうかを検討する。</p> <p>⑤ヒトレコンビナントラミニン 332, 511, 111を用いたヒトES細胞の未分化維持培養について、詳細な検討を行う。</p> <p>⑥ヒトレコンビナントラミニンを用いて、ヒトES細胞の分化誘導を試みる。</p> <p>分子構成を最適化した人工基底膜によるES細胞の分化誘導制御技術の開発</p> <p>①細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明</p> <p>②基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築</p> <p>③人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発</p> <p>④細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明</p> | <p>⑱肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子をノックインしたヒトESとヒトiPS細胞株の有効性について評価した。(熊本大学)</p> <p>①サルES細胞の未分化維持培養に関する人工基底膜・疑似マトリックスの評価方法を確立した。</p> <p>②ヒトES細胞の身分開示に関する人工基底膜・疑似マトリックスの評価方法を確立した。</p> <p>③ヒトES細胞で発現しているラミニンを同定した。</p> <p>④ヒトレコンビナントラミニン332,511,111で、ヒトES細胞の未分化維持培養が可能であることを見出した。</p> <p>⑤ヒトレコンビナントラミニン335, 511, 111を用いてヒトES細胞の長期間培養を行っても、ヒトES細胞の特性・品質に異常がないことを見出す。さらに大阪大学で改良されたラミニンを用いても同様な効果があることを見出した。</p> <p>⑥に特化するため、本プロジェクトに関する詳細な検討は行わなかった。</p> <p>①細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明 ・胎生125日および145日における主要基底膜蛋白質20種の免疫組織化学的解析を完了した。また、得られた染色結果を画像データベース化した。 ・マウス初期胚(胎生5.5~7.5日)の主要基底膜蛋白質20種の局在解析を完了した。マウス初期胚で構成的に発現する基底膜分子を同定した。 ・これにより、初期発生・器官形成に伴う基底膜分子構成の時空間制御の実体解明が大きく進捗した。 ・ゲノム情報を母集団として新規細胞外マトリックス蛋白質を探索し、肝臓類同に局在する新規蛋白質を同定した。</p> <p>②基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築 ・ゲル化能を保持した高純度V型コラーゲンをウシレンズ囊から非酵素的に調製する方法を確立した。 ・α鎖の組成の異なる5種類の主要ラミニンアイソフォームの高効率発現系を構築し、精製法を確立した。 ・第一世代人工基底膜の構築に必要な準備を完了した。</p> <p>③人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発 ・胚様体を介して、三胚葉(外胚葉、中胚葉、内胚葉)にそれぞれ分化誘導可能な実験評価系を立ち上げた。</p> <p>④細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明 ・主要基底膜蛋白質20種に加え、残り15種の基底膜蛋白質および基底膜関連蛋白質6種について、胎生125日および145日胚の免疫組織化学的解析を完了した。また、得られた染色結果を画像データベース化した。 ・マウス初期胚(胎生8.5~10.5日)の主要基底膜蛋白質20種の局在解析を完了した。 ・これにより、胎生5.5日から16.5日までの発生の各段階における基底膜分子構成を連続的に解析するための情報基盤が整</p> | <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>△</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> |
|---|--|--|

| | | |
|-------------------------------------|--|----------|
| <p>⑤基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築</p> | <p>備された。</p> <p>⑤基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築 ・β2型ラミニンAインフォーム5種を含む7種のラミニンAインフォームの組換え蛋白質発現系を構築し、精製法を確立した。 ・これにより、人工基底膜の構築に必要な全12種のラミニンAインフォームの組換え蛋白質の高発現・安定供給系が確立された。</p> | <p>○</p> |
| <p>⑥人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発</p> | <p>⑥人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発 ・IV型コラーゲンと特定のラミニンAインフォームを組み合わせた第一世代人工基底膜を構築し、マウスES細胞を用いる分化誘導評価系を立ち上げた。 ・組換えラミニン-511および-332がヒトES細胞のフィーダーフリー培養用基材として有効であることを見いだした(京都大学との共同研究)。 ・ヒトES細胞が発現しているラミニンおよびそのインテグリン受容体のタイプを明らかにした。</p> | <p>○</p> |
| <p>⑦細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明</p> | <p>⑦細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明 ・心臓、肝臓を対象を絞り、マウス胚発生の各段階および成体臓器での基底膜分子構成を詳細に解析した。 ・心臓の形成初期ではα4鎖ラミニンを主成分とする基底膜が構築され、発生が進むとα2鎖ラミニンが心筋細胞の基底膜に強く発現することを明らかにした。 ・肝臓の発生初期では、α1鎖およびα3鎖のラミニンが発現し、その局在パターンが血管内皮細胞のマーカーと類似していることを見いだした。</p> | <p>○</p> |
| <p>⑧基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築</p> | <p>⑧基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築 ・第二世代人工基底膜の構築に必要なニドゲン2種およびヘパラン硫酸プロテオグリカン(アグリリン)の発現系を構築し、精製法を確立した。 ・IV型コラーゲンの脆弱性を克服するI型/IV型コラーゲン混成ゲルの開発に成功した(平成21年に特許を申請した)。 ・第二世代人工基底膜の素材となるIV型コラーゲン、各種ラミニン、ニドゲン2種、およびヘパラン硫酸プロテオグリカンの間の親和性を網羅的に解析し、第二世代人工基底膜構築のための基本戦略を策定した。</p> | <p>◎</p> |
| <p>⑨人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発</p> | <p>⑨人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発 ・マウスES細胞の評価系を用い、I型/IV型コラーゲン混成ゲルがI型コラーゲン単独ゲルとは異なる活性をもつことを示した。 ・nogginを利用した心筋細胞への選択的分化誘導系を導入し、I型/IV型コラーゲン混成ゲルの評価を行った。</p> | <p>○</p> |
| <p>⑩細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明</p> | <p>⑩細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明 ・脳内毛細血管の基底膜分子構成を網羅的に解析し、他の毛細血管基底膜と発現が異なる基底膜分子を同定した。 ・成体神経幹細胞の足場となる基底膜様細網構造の分子組成を明らかにした。 ・成体臓器の幹細胞ニッチの解明に不可欠な臓器幹細胞の網羅的可視化技術を確立した。</p> | <p>○</p> |
| <p>⑪基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築</p> | <p>⑪基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築 ・基底膜の主要なヘパラン硫酸プロテオグリカンであるパールカンの発現系を構築し、組換え蛋白質の安定供給系を確立した。 ・I型/IV型コラーゲン混成ゲルを基材とし、これにラミニン、ニドゲン、パールカンを組み込んだ第二世代人工基底膜の構築</p> | <p>◎</p> |

| | | |
|---|---|--|
| <p>⑫人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発</p> | <p>技術を確立した。 ・ラミニンの活性部位¹だけを含む活性フラグメントの組換え蛋白質の発現系を構築し、このフラグメントが全長ラミニンの活性をほぼ100%保持しているだけでなく、収量が大幅に向上することを見いだした。</p> <p>⑫人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発 ・ラミニン活性フラグメントがヒトES細胞のフィーダーフリー培養基材として有効であることを京都大学との共同研究で明らかにした。 ・分子組成をカスタマイズした人工基底膜の有用性をヒトES細胞から肝臓への選択的分化誘導系を用いて評価した(熊本大学との共同研究)。</p> | <p>○</p> |
| <p>研究開発項目③「研究用モデル細胞の構築技術の開発」 ヒトES細胞から神経変性疾患モデル細胞の構築</p> <p>① 神経変性疾患の情報を収集(幹細胞創薬研究所) ・モデル構築に必要な神経細胞の種類などの情報収集</p> <p>②アルツハイマー病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・家族性アルツハイマー病原因遺伝子の入手 ・発現ベクターの構築 ・構築されたベクターをES細胞に導入</p> <p>③筋萎縮側索硬化症モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・家族性筋萎縮側索硬化症の原因遺伝子の入手 ・発現ベクターの構築 ・構築されたベクターをES細胞に導入</p> <p>④ハンチンチン病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・ハンチンチン病の原因遺伝子の入手 ・発現ベクターの構築</p> <p>⑤アルツハイマー病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・ランダム遺伝子導入法で得られたPS1安定発現細胞株の未分化状態や神経分化能を確認。 ・神経細胞へ分化させ、PS1発現量を確認</p> <p>⑥筋萎縮側索硬化症モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・ランダム遺伝子導入法で得られたPS1安定発現細胞株の未分化状態や神経分化能を確認。</p> <p>⑦ハンチンチン病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・Cre-loxP系の発現調節ベクターをES細胞へ導入</p> | <p>① 神経変性疾患の情報を収集(幹細胞創薬研究所) ・神経変性疾患モデルとして、アルツハイマー病、筋萎縮側索硬化症、ハンチンチン病を選定。 ・神経幹細胞・前駆細胞、運動神経細胞の分化方法の情報を取得。</p> <p>②アルツハイマー病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・家族性アルツハイマー病原因遺伝子プレセニリン1を京都大学医学部より入手。 ・EF1αプロモーター制御下の発現ベクターを構築。 ・上記ベクターをヒトES細胞に導入。</p> <p>③筋萎縮側索硬化症モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・家族性筋萎縮側索硬化症の原因遺伝子SOD1を京都大学から入手。 ・CMVプロモーターよりEF1αプロモーターがES細胞内でより強い活性を持つことを確認。 ・EF1αプロモーター制御下の発現ベクターを構築。 ・上記ベクターをヒトES細胞に導入、安定株を樹立。 ・Cre-loxP系の発現調節ベクターを構築中。</p> <p>④ハンチンチン病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・ハンチンチン病の原因遺伝子ハンチンチン(エクソン1領域)を東京大学から入手した。 ・Cre-loxP系の発現調節ベクターを構築。</p> <p>⑤アルツハイマー病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・過剰なPS1発現があっても、ES細胞の未分化状態や神経分化能に影響がないことを確認。 ・分化後の神経細胞でのベクター由来のPS1発現が比較的高い株を選択</p> <p>⑥筋萎縮側索硬化症モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・過剰なSOD1発現があっても、ES細胞の未分化状態や神経分化能に影響がないことを確認。 ・SOD酵素活性の上昇を確認。 ・分化後の神経細胞でのベクター由来のSOD1発現が比較的高い株を選択。</p> <p>⑦ハンチンチン病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・薬剤耐性株の樹立、Cre発現ベクター導入によって、HTT</p> | <p>○</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> |

| | | |
|--|---|-------------------------------------|
| <p>⑧部位特異的遺伝子挿入による疾患モデル細胞(第二世代)の構築(幹細胞創薬研究所) ・HPRT遺伝子座挿入用の発現ベクターの構築</p> <p>⑨アルツハイマー病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・神経細胞へ分化させ、ADモデルとしての特徴付け ・HPRT遺伝子座挿入用の発現ベクターのES細胞へ導入</p> <p>⑩筋萎縮側索硬化症モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・運動神経細胞へ分化させ、ALSモデルとしての特徴付け ・HPRT遺伝子座挿入用の発現ベクターのES細胞へ導入</p> <p>⑪ハンチンチン病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・HPRT遺伝子座挿入用の発現ベクターのES細胞へ導入</p> | <p>が発現したことを確認。 ・変異型HTTを発現していても未分化なES細胞の細胞死が起きないことを確認。</p> <p>⑧部位特異的遺伝子挿入による疾患モデル細胞(第二世代)の構築(幹細胞創薬研究所) ・遺伝子座挿入用の発現ベクターの構築完了</p> <p>⑨アルツハイマー病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・ES細胞由来の神経細胞の培養上清でのアミロイドβ42の比率変化を確認。 ・神経分化後のPS1タンパク質レベルの確認 ・第二世代のPS1発現ES細胞株を作成し、神経細胞への分化能を確認した。</p> <p>⑩筋萎縮側索硬化症モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・変異型SOD1発現運動神経細胞での細胞死を確認。 ・第二世代のSOD1発現ES細胞株を作成し、神経細胞への分化能を確認した。 ・第二世代のTDP43発現ES細胞株の作成を試みたが、変異型TDP43発現ES細胞株を得ることが出来なかったことが明らかになった。</p> <p>⑪ハンチンチン病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) 第二世代のHTT発現ES細胞株を作成し、神経細胞への分化能を確認した。</p> | <p>◎</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>○</p> |
| <p>血液脳関門(BBB)モデルの創製</p> <p>①血液脳関門(BBB)モデル構築用細胞の調製技術の確立</p> <p><u>神経系細胞への高効率な分化誘導技術</u> ・ヒトES細胞からアストロサイト、神経系前駆細胞を高効率に分化誘導する技術を検討し、量産調製技術として確立する。</p> <p><u>血管系細胞への分化誘導技術</u> ・ヒトES細胞から血管内皮細胞、血管周皮細胞を分化誘導する技術を検討し、量産調製技術として確立する。</p> <p>②in vitro 血液脳関門モデルの構築</p> <p><u>従来モデルの試作による性能評価とBBB特性評価技法の取得</u> ・非ヒト動物由来初代培養細胞等を用いて従来モデルを試作し、そのBBB特性の性能評価を通して、物質透過性をはじめとする血液脳関門特性の評価技法を技術取得する。 ・評価技法を技術取得の過程で得られる評価結果を、後に構築するヒトES細胞由来in vitro 血液脳関門モデルの特性解析の比較参照データとして蓄積する。</p> <p>③血液脳関門(BBB)モデル構築用細胞の調製技術の確立</p> <p><u>神経系細胞への高効率な分化誘導技術</u> ・ヒトES細胞からアストロサイト、神経系前駆細胞を高効率に分化誘導し、量産調製技術として確立する。</p> <p><u>血管系細胞への分化誘導技術</u> ・ヒトES細胞から血管内皮細胞、血管周皮細胞を分化誘導する技術を検討し、これら血管系細胞の量産調製技術として確立する。</p> | <p>①・BBBモデル構築用細胞の調製 ・神経系細胞分化誘導技術の確立 Neural Stem Sphere(NSS)法の改良/ヒトES細胞による高効率な神経系細胞の分化誘導に成功/ヒトES細胞由来神経系前駆細胞のin vitro増幅法と凍結保存法を確立した/アストロサイトの選択的調製法を確立した ・血管系細胞分化誘導技術の確立 OP9共培養系(計画)に加えて、新たに6種サイトカイン含有培地を用いる血管内皮細胞誘導技術を導入し、ヒトES細胞から血管内皮(前駆)細胞、血管周皮(平滑筋)細胞の誘導を確認した</p> <p>②in vitro 血液脳関門モデルの構築 ・従来モデルの性能評価とBBB特性評価技法の取得 ウシ脳微小血管内皮細胞やラット脳アストロサイト等の初代培養細胞の共培養系従来モデルを構築し、BBBモデルとしての性能を把握した また、TEER測定や物質透過性評価をはじめとする各種BBB特性評価技法を取得した</p> <p>③BBBモデル構築用細胞の調製 ・神経系細胞分化誘導技術の確立 前年度に確立したNSS改良法を用いてヒトES細胞由来の神経系前駆細胞およびアストロサイトを量産調製した ・血管系細胞分化誘導技術の確立 OP9共培養法、6種サイトカイン法によりヒトES細胞から血管内皮細胞、血管平滑筋、および血管前駆細胞の誘導し、分離・量産化に目処を立てた</p> | <p>◎</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>○</p> |

| | | |
|---|--|---|
| <p>④in vitro 血液脳関門モデルの構築</p> <p><u>BBB モデル構築形態に関する事前検討</u> ・初代培養細胞やマウス・サルES細胞から調製したBBB構成細胞等を用いて、モデル構築形態(共培養系)を予備検討し、最適な構築形態についての情報を蓄積する。</p> <p>⑤血液脳関門(BBB)モデル構築用細胞の調製技術の確立</p> <p><u>血管系細胞の分化誘導・量産調製技術の完全確立</u> ・血管系細胞(血管内皮細胞など)の量産化体制を完全確立する。 ・血管系/神経系細胞を量産調製してモデル構築に供する。</p> <p>⑥in vitro 血液脳関門モデルの構築</p> <p><u>ヒトES細胞由来BBB構成細胞によるモデル化検討</u> ・ヒトES細胞由来血管内皮細胞を基軸とした共培養系モデルを構築・評価してBBB機能発現に最適な構築形態を見出す</p> <p>⑦血液脳関門(BBB)モデル構築用細胞の調製技術の確立 ・モデル構築用細胞としての好適化を図る。</p> <p>⑧in vitro 血液脳関門モデルの構築</p> <p><u>ヒトES細胞由来BBB構成細胞を用いたモデル構築</u> ・ヒトES細胞由来血管内皮細胞を基軸とした共培養系モデルを構築・評価してBBB機能発現に最適な構築形態を見出す。 ・BBB特性の獲得に向けてモデル構築の最適化・高性能化を図る。 ・完成したヒトES細胞由来BBBモデルの精度を検証する。</p> <p>ハイスループットスクリーニング(HTS)技術の開発</p> <p>①HTS実施環境の整備</p> <p>②化合物ライブラリの整備</p> <p>③マウスES細胞を用いたHTSフローの確認</p> <p>④心筋分化誘導促進物質の探索スクリーニング系の構築(幹細胞創薬研究所)</p> <p>⑤心筋分化誘導促進物質探索HTS系への化合物ライブラリの適用と、αMHCプロモータGFP蛍光変化の解析手法の開発(幹細胞創薬研究所)</p> <p>⑥心筋分化誘導促進物質探索HTS系によって見出された心筋分化促進化合物Xの解析(幹細胞創薬研究所)</p> | <p>④in vitro 血液脳関門モデルの構築 ・BBBモデル構築化の事前検討 ウシ脳微小血管内皮細胞を用いて、Mesh-fib培養インサート(国立環境研究所技術)活用による近接共培養構築やES細胞由来神経系前駆細胞の共培養効果を検討した結果、単層培養したウシ脳微小血管内皮細胞に対してES細胞由来神経系前駆細胞の共培養によるバリア形成の促進効果を見出した</p> <p>⑤BBBモデル構築用細胞の調製 ・血管系細胞分化誘導技術の完全確立 更なる誘導効率の向上を図り、高率(>20%)かつ短期間(誘導日数5日)で血管内皮(前駆)細胞を誘導可能な高効率分化誘導法を新規に開発した MACSを用いるソーティング技術を確認し、高純度な血管内皮細胞の分離を実現した 継代による増幅/凍結保存技術を確認し、モデル構築に供する十分な量産体制を構築した</p> <p>⑥in vitro 血液脳関門モデルの構築 ・ヒトES細胞由来BBB構成細胞によるモデル化 ES細胞由来血管平滑筋細胞や神経前駆細胞の共培養効果を確認した/基底膜構造体上でも良好な内皮シート形成を確認した</p> <p>⑦BBBモデル構築用細胞の調製 ・モデル構築用細胞としての好適化 ヒトES細胞から量産調製された血管内皮前駆細胞を血管平滑筋細胞や神経前駆細胞の培養上清を用いてBBB特異的TJタンパク質Claudin-5を高発現する血管内皮細胞へ性状改変することができた</p> <p>⑧in vitro 血液脳関門モデルの構築 ・ヒトES細胞由来BBB構成細胞によるモデル化 性状改変したヒトES細胞由来血管内皮細胞を基軸とするモデルにおいて、脳毛細血管内皮細胞を使用する従来モデルに匹敵する静的バリア性能(細胞間物質透過性)の獲得に成功した</p> <p>①細胞分注機の改良開発完了。検体分注、培地交換システムの導入。検出機器の整備</p> <p>②京都大学上杉研からの供与12000化合物のDMSO溶液ライブラリの整備完了</p> <p>③基材、蛍光検出時の条件設定の完了</p> <p>④サルES細胞の96ウェルHTSプレート上での心筋分化系を確立、HTSプレートを選定、心筋分化シグナルの自動検出装置を構築。</p> <p>⑤HTSシステムにおけるGFP蛍光変化の検出方法を確立し、約1万検体の化合物ライブラリから活性化化合物を検出。</p> <p>⑥心筋分化促進物質として化合物Xを発見(用途特許申請)し、化合物X添加によるヒトES細胞由来心筋細胞の遺伝子発現変化、電気生理学的変化を解明。</p> | <p>○</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> |
|---|--|---|

| | | |
|---|--|----------|
| <p>擬似基底膜を利用したES細胞の分化誘導制御技術の開発 (非公開)</p> <p>①ヒトES細胞の維持・分化誘導に特化した基底膜構造体の培養基質の創製。</p> | <ul style="list-style-type: none"> ・上皮細胞や間充織系細胞を、コラーゲン分子の生合成と架橋沈着を促進させる因子を添加した培地を用い、プラスチック培養皿上に、基底膜成分が沈着した細胞外基質を試作した。この細胞外基質上にサルES細胞を播種し、細胞接着性を検討した。細胞外基質の作製に用いた細胞による違いはあるが、基本的にサルES細胞はどの培養基質にも接着できた。しかし、長期培養には適さなかった。 ・ES-hepatocyteを作製している研究グループに、LN-10 isoformの基底膜基質(LN10-sBM)の提供を開始した。ES細胞は、LN10-sBMに支障無く接着・生育した。この培養方法によってfeederが必要なくなり、その結果、messageにfeeder細胞混入の恐れが無くなった。更には、分化・成熟の誘導に適した細胞との共培養が適宜可能になった。 ・基底膜構造体の形成に関わると想定されるシンデカン接着受容体遺伝子4種類をクローニングし、各々の遺伝子を293細胞に強制発現させた安定発現株(rSN-1, -2, -3, -4)を作製した。それぞれの syndecan recombinantsを用い、基底膜形成を促進する程度を比較検討した。 ・LN10-sBMは、肝臓のマトリックスを構築する細胞群を考慮に入れていない。ラミニン-10を分泌する細胞を肝由来の不死化星細胞と共培養することで、発生期の肝臓における細胞外基質の固相環境に、一層近づけた基底膜培養基質(LN10/LI90-sBM)を作製し、ES-hepatocyteの研究グループに提供した。LN10/LI90-sBMを用いることで、ES細胞からdefinitive endodermへの分化誘導が一層促進された。 ・シンデカン安定発現株から、発現量の多いクローンを選抜した。その中から特に発現量の多いrSN-2のクローンをを用い、マトリゲル存在下で培養し、基底膜構造体(LN-111-sBM)の形成を確認した。 ・definitive endodermから成熟肝細胞への更なる分化誘導を促進するために、ヒト不死化肝実質細胞(T3-Alb7)を用いて、基底膜基質を作製した。また、肝成熟過程に於ける類洞形成と肝実質細胞の成熟を勘案し、ヒト不死化類洞内皮細胞(TMNK-1)との共培養による基底膜基質の作製も併せて行った。 ・異物であるマトリゲルに代わり、ヒトLN-511を供給する共培養細胞としてrLN-10を用い、rSN-2細胞による基底膜形成を検討した。 | <p>○</p> |
| <p>②ヒトES細胞に特化した細胞接着リガンドを結合した化学合成ポリマー(擬似マトリックス)の創製</p> | <ul style="list-style-type: none"> ・擬似マトリックスのレパートリーを充実させるため、市販品が無いoligo-GlcNAcをリガンドとする擬似マトリックスを開発した。 ・サルES細胞を、種々の擬似マトリックス上で培養したが、効果は思わしくなかった。 ・サルES細胞を、種々の擬似マトリックス上で培養した。ヒト間充織幹細胞(hMSC)クローンを入手し、その順化培地を添加することで、維持できた。擬似マトリックス間で特に大きな差異は無かった。 | <p>○</p> |
| <p>③基底膜構造体基質及び擬似マトリックスを用いた幹細胞の新規培養技術の開発</p> | <ul style="list-style-type: none"> ・脳血流閉門培養モデル作製に必要な培養基質を試作した。 ・十分な間隙を有するコラーゲン線維基質を極限の1μm程度の厚さにまで成形し、両面上皮細胞と間充織細胞または内皮細胞を播種・共培養できる極薄膜コラーゲン線維基質(mesh-fib)を開発した。 ・極薄膜基質の片面にそれぞれ牛脳血管内皮細胞(BBMVEC)及びラット肺線維芽細胞(RPF)を播種・共培 | <p>○</p> |

| | | |
|--|--|--|
| <p>ES細胞由来肝細胞を用いた、創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立</p> <p>①動物細胞並びにヒト肝細胞を用いたコラーゲン・サンドイッチ培養法の確立し、胆汁排泄の評価系を構築する。</p> <p>②ヒト凍結肝細胞を用いたヒトにおける肝取り込み・代謝能力の評価系の確立</p> <p>③肝細胞と腎スライスを同時に用いた薬物の肝腎振り分けの予測系の確立</p> <p>④ヒト肝細胞を用いた肝取り込み過程における個々のトランスポーターの寄与率の解析</p> <p>⑤サンドイッチ培養肝細胞を用いた胆汁排泄トランスポーターの寄与率の解析法の確立</p> | <p>養することで、内皮細胞直下に基底膜構造を有する薄膜基底膜基質 (BBMVEC/RPF mesh-sBM) を作製した。別の選択肢として、LN-511 を分泌する細胞を主に、共培養する細胞としては不死化星細胞 (LI90) を用いることで、薄膜基底膜基質 (LN10/LI90mesh-sBM) を作製した。BBBモデル開発グループに提供。</p> <p>・新たな細胞の組み合わせで、BBBモデルのための基底膜基質を作製した。HPAECは、不死化されていないことや、rLN10との共培養培地の条件設定が難しい。そこで、rLN10と同じ培地が使用可能なヒト不死化類洞内皮細胞 (TMNK-1) を、共培養細胞に選択した。mesh-fibの内面には、rLN-10細胞、外面にはTMNK-1細胞を播種し、2週間共培養することで、基底膜を形成させた。薄膜基底膜基質 (rLN10/TMNK1 mesh-sBM) のrLN-10側には血管内皮細胞を、TMNK-1側には、周皮細胞やastrocyteを播種することで、BBBモデル作製を想定。BBBモデル開発グループに提供。</p> <p>・大量スクリーニングを指向するマトリックスとして、mesh-fib の代わりに、多孔性のプラスチック薄膜上に作製したコラーゲン線維基質 (fib) を用いて、rLN10/TMNK1 mesh-sBMとほぼ同等の性能を発揮できる rLN10/ TMNK1-sBMやrLN10/LI90-sBMを作製した。これらのマトリックスは、BBBモデル開発グループに提供。</p> <p>・ヒトES細胞を成熟した肝実質細胞に分化誘導するための最適な基底膜基質は、成熟肝実質細胞の機能が最も安定して維持できるマトリックスと同義語であるとして、a) マトリックスの違いによるtransporterの遺伝子発現への影響、b) マトリゲルによるサンドイッチ培養の効果、c) AlbuminやCyp3a11 (ヒトCyp3a4に対応) 遺伝子発現へのサンドイッチ培養の影響を検討し、hLN-511基底膜基質が優れていること、及び、サンドイッチ培養によって、その効果が増強・安定化することが判明した。</p> <p>①</p> <p>・ラット肝細胞を用いてサンドイッチ培養系における胆管形成が進行する条件を最適化し、胆汁排泄される物質について胆管腔への排出を確認した。</p> <p>・ラット肝細胞において胆汁排泄に関与する個々のトランスポーターの寄与率を定量的に決める方法論のためのMdr1, Bcrpの選択的阻害剤を見つけ、評価に使うことを示した。</p> <p>・ヒト肝細胞においても同様の培養系により胆管腔への排出を確認した。</p> <p>②</p> <p>後実験を進める上で必須である、輸送活性を十分に有しており評価が可能なヒト凍結肝細胞のロットを複数見出した。</p> <p>③</p> <p>ラットにおいて、in vitro実験から得られた肝細胞・腎スライスにおける取り込みクリアランスを元に、in vivoにおける肝腎振り分け率を良好に推定できることを示した。</p> <p>④</p> <p>ヒト肝細胞において、複数の方法論を用いて各種薬物の肝取り込みにおけるOATPファミリートランスポーターの寄与率を定量的に示す実験系を用いて、複数の薬物について検討を行った。</p> <p>⑤</p> <p>・Mdr1, Bcrpに加え、Mrp2についても選択的な阻害を実現する薬剤の選択ができ、Mdr1, Bcrp, Mrp2といった薬</p> | <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> |
|--|--|--|

| | | |
|---|---|----------|
| <p>⑥凍結肝細胞を用いた in vivo レベルでの肝胆系輸送能力の評価系の確立および検証</p> | <p>剤の胆汁排泄に必要なトランスポーターの寄与を実験的に分けることに成功した。 ・ヒト肝細胞での検討を進める前段階として、市販されている肝細胞の中で、実際に胆汁排泄に関して十分な活性を持っており、in vitro実験系として適切なロット選択法を確立すると共に、ロットを確保することができた。</p> | <p>○</p> |
| <p>⑦凍結肝細胞と腎スライスを同時に用いた薬物の肝腎振り分けの予測系の確立</p> | <p>⑥昨年度に続き、薬物の種類を増やしてin vitro実験からin vivo肝クリアランスの予測が可能であるかどうか検討したところ、良好な相関関係が認められた。さらにヒト凍結肝細胞を用いて、ヒトにおけるin vivo腎外クリアランスの予測を実施したところ、良好に予測が可能であることが示された。</p> | <p>○</p> |
| <p>⑧ES細胞由来肝細胞のより定量的な性能評価のための代謝酵素・トランスポーター遺伝子のmRNA発現量の測定法の標準化および性能評価の支援</p> | <p>⑦年度に続き、薬物の種類をさらに増やして肝腎振り分け率の予測を実施したところ、良好な相関関係が認められた。さらにヒトサンプルを用いて、同様にヒトにおける肝腎振り分けの予測についても良好に成立することを見出した。</p> | <p>○</p> |
| <p>⑨ラット・ヒト肝細胞を用いたサンドイッチ培養系による胆汁排泄トランスポーターの寄与率の解析法の確立ならびに胆汁排泄クリアランスの予測</p> | <p>⑧CYP3A4, OATP1B1について、mRNAならびに蛋白発現量を定量化して、各施設間で比較できるような実験条件の統一化を図り、分化細胞を作製する拠点施設に対して、条件の提示・比較すべきヒト肝細胞の標準サンプルの発送を行った。</p> | <p>○</p> |
| <p>⑩サンドイッチ培養による薬物動態評価に利用可能なヒト肝細胞のロット確保のためのスクリーニング</p> | <p>⑨ ・bile pocketへの薬物の排出クリアランスを複数の薬物についてin vitro実験で求めると共に、in vivo動物実験により胆汁排泄クリアランスを算出したところ、in vitro実験から得られた結果と良好な相関関係が認められることを示した。さらに、in vitro実験からの絶対値の予測が、in vivo実験から求められた実測値と比較して、約1/10程度であることを見出し、その原因が取り込みトランスポーターの機能低下に起因することを見出した。 ・ヒト肝細胞においてラットで見出された条件でMrp2, Mdr1, Bcrpの阻害を実施したところ、ヒトにおいては、ラットとは異なる阻害プロファイルを示したことから、ヒト肝細胞にあった実験系を構築する必要性が認められた。</p> | <p>○</p> |
| <p>⑪肝細胞を含む動物・ヒト組織サンプルや動物・ヒト遺伝子発現系を併用した結果をもとにした、動物・ヒト全身の薬物の体内動態を予測可能な数理モデルの構築法に関する検討</p> | <p>⑩今後のヒトES細胞由来肝細胞と胆汁排泄機能に関して比較できる、ヒト肝細胞のロットを選択すべく、典型的基質のbile pocketへの排出クリアランスを算出することにより選択する方法論を構築し、複数のロット選択を行うことができた。</p> | <p>○</p> |
| <p>⑫ヒトES細胞由来肝細胞のより定量的な性能評価のための代謝酵素・トランスポーター遺伝子の mRNA および蛋白発現量の測定法の標準化および性能評価の支援</p> | <p>⑪in vitro実験から得られた代謝・輸送に関するパラメータを全身の薬物動態を表現するための適切な数理モデルを構築して、代入することにより、モデル化合物であるプラバスタチンのヒトおよびラットにおける血中ないしは臓器中濃度の時間推移をシミュレーションにより良好に予測することに成功した。</p> | <p>○</p> |
| <p>⑬肝細胞を用いた薬物間相互作用の予測のための方法論確立および検証(ラットin vivo実験ならびにin vitro実験の結果に基づく)</p> | <p>⑫昨年度に引き続き重要な代謝酵素CYP2C9およびトランスポーターMRP2に関して、mRNAおよび蛋白発現量の測定法の標準化を実施し、定量方法ならびに対照となるヒト肝臓サンプルについて分化細胞を作成する施設に情報・試料提供を実施した。</p> | <p>○</p> |
| <p>⑬肝細胞を用いた薬物間相互作用の予測のための方法論確立および検証(ラットin vivo実験ならびにin vitro実験の結果に基づく)</p> | <p>⑬肝臓の取り込み・排泄過程で起こる薬物間相互作用をin vitro実験系(肝細胞・胆管側膜ベシクル)を用いて予測するための方法論を構築すべく、Pravastatinをモデル化合物としてラットにおける複数の薬物間相互作用の</p> | <p>○</p> |

| | | |
|---|--|-------------------|
| <p>⑭代謝酵素・トランスポーターが同時に体内からの薬物消失に関わる場合の各分子の相対的重要性を評価するための実験系の確立</p> <p>⑮ヒトES細胞由来肝細胞のより定量的な性能評価のための代謝酵素・トランスポーター遺伝子の一般的な機能の測定法の標準化およびヒト肝細胞との比較試験</p> | <p>予測を試みたところ、良好に予測することができた。</p> <p>⑭代謝酵素ならびにトランスポーターの両方がクリアランスに関与する薬剤においても、これまでの方法論による薬物動態の予測が可能であるかどうかを検討すべく、2種類の非代謝性スタチンと2種類の代謝性スタチンについて、取り込みクリアランスから良好にin vivoにおける肝クリアランスを予測できることを示すことができた。</p> <p>⑮前年度までに構築した発現量を定量する実験系に加え、トランスポーターおよび代謝酵素の活性を簡便に測定するための方法論の構築を行った。また、それを用いて実際に幹細胞創薬研究所より提供されたヒトES細胞由来幹細胞の輸送・代謝活性を測った所、多少の輸送活性は見られたものの、ヒト肝細胞との比較においては、発現も機能も低値であることが示された。</p> | <p>○</p> <p>○</p> |
|---|--|-------------------|

| | | |
|---|--|--|
| <p>オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬技術の研究開発</p> <p>①動物細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築</p> <p>①-1 動物臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作・長期培養・薬剤添加技術の開発 ・1細胞単位での細胞状態の計測が可能となる計測システムとチップの構築を試みる。 ・薬剤の添加によって計測データがどのように変化するかを計測することで、その対策について検討する。</p> <p>①-2 オンチップ動物心筋モデルの構築と薬剤応答の機能評価 ・モデル「心筋細胞ネットワークチップ」を構築するために必要な細胞の特性(集団効果、繊維芽細胞の効果等)の基礎データを取得する。</p> <p>①-3 オンチップ動物神経モデルの構築と薬剤応答の機能評価 ・グリア細胞を共存させない神経細胞 1細胞単位でのチップ上での細胞培養技術の開発 ・細胞 1細胞レベルでの発火信号の計測、そしてさらに単一細胞から伸長する神経突起 1本単位での電気計測技術の開発</p> <p>②ヒト ES 細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築</p> <p>②-1 ヒト ES 細胞からの分化細胞を用いた健常(標準)臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作技術の開発 ・オンチップ・セルソーターを用いた無染色での心筋細胞、神経細胞の精製技術について検討を行う。 ・アプタマー等の可逆修飾技術を利用することで細胞を精製する技術についても検討を行う。</p> <p>②-2 オンチップ・ヒト心筋モデルの構築と薬剤応答の機能評価 ・サル ES 細胞由来の拍動細胞を用いた、薬剤に対する細胞の応答解析、細胞イオンチャンネルの発現状態の解析を行う。</p> <p>②-3 ヒト ES 細胞を用いた疾患臓器・組織モデル構築技術の開発 ・動物細胞ベースでの心筋細胞と繊維芽細胞の組合せによる「心肥大臓器モデルチップ」の構築の検討 ・細胞ネットワークの形状制御による不整脈発生機構モデルである「リエントリーモデルチップ」の構築を行うことで、表現型を再現したモデルチップの構築の検討</p> | <p>①動物細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築</p> <p>①-1 動物臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作・長期培養・薬剤添加技術の開発 ・1細胞単位での細胞状態の計測が可能となる計測システムとチップの構築に成功。 ・薬剤の添加によって変化するデータの計測法の対応策を開発。</p> <p>①-2 オンチップ動物心筋モデルの構築と薬剤応答の機能評価 ・モデル「心筋細胞ネットワークチップ」を構築するために必要な集団効果、繊維芽細胞の効果等の基礎データの取得に成功。</p> <p>①-3 オンチップ動物神経モデルの機能評価 ・グリア細胞を共存させない神経細胞 1細胞単位でのチップ上での細胞培養技術の開発に成功 ・細胞1細胞レベルでの発火信号の計測、そしてさらに単一細胞から伸長する神経突起1本単位での電気計測技術の開発に成功</p> <p>②ヒト ES 細胞を用いたオンチップ臓器モデル構築</p> <p>②-1 ヒト ES 細胞からの分化細胞を用いた健常臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作技術 ・オンチップ・セルソーターを用いた無染色での画像ベースでの心筋細胞、神経細胞の精製に成功。 ・アプタマーと磁気ビーズによる可逆修飾細胞精製技術の開発に成功。</p> <p>②-2 オンチップ・ヒト心筋モデルの機能評価 ・サル ES 細胞由来の拍動細胞を用いた、K,Ca,Na 薬剤に対する細胞の応答解析、細胞イオンチャンネルの発現状態の解析が可能であることを確認。</p> <p>②-3 ヒト疾患臓器・組織モデル構築技術の開発 ・心筋細胞と繊維芽細胞の組合せによる「心肥大臓器モデルチップ」の構築に成功 ・細胞ネットワークの形状制御による不整脈発生機構モデルである「リエントリーモデルチップ」の構築に成功</p> | <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>◎</p> |
|---|--|--|

2. 研究開発項目毎の成果

2.1 研究開発項目①「ヒトES細胞の加工技術開発」

2.1.1 ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発

京都大学

共同実施：幹細胞創薬研究所

埼玉医科大学

(1) 事業目的と背景

ヒトES細胞の応用研究において、遺伝子加工技術開発は不可欠なものである。例えば、特定の遺伝子の発現制御による分化誘導の効率化やマーカー遺伝子を利用した目的細胞種の分取、薬剤に対する反応の鋭敏な検出などが可能になると考えられる。しかし、一般的にヒトES細胞に対する遺伝子導入効率は低く、大規模なスクリーニングなどは困難である。

また、ヒトES細胞への遺伝子導入の場合、高い導入効率だけではなく、ES細胞に対して低毒性であることや、ES細胞の未分化性・増殖能を阻害しないことなどが要求される。さらにヒトES細胞では、その原因は未だ不明であるが導入された遺伝子が発現しなくなるというサイレンシングという問題も不可避である。

1998年にThomsonらによってヒトES細胞株の樹立がはじめて発表されて以降、遺伝子加工技術の開発はヒトES細胞の応用研究においてもまた基礎研究においてさえも重要であるにもかかわらず、本プロジェクトの開始時点であまり進展が見られていなかった。多くの研究は遺伝子加工技術開発をむしろ回避する方向で進められており、一部で試みられているものの単発的に発表されている程度であった。

(2) 事業内容と目標

① ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その1) 京都大学

事業目的と背景に述べたように、ヒトES細胞の応用研究において、遺伝子改変技術は不可欠であり、ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発はさらにその土台となっている。世界的な情勢としては、遺伝子加工技術開発の困難さもあってこれらを回避して研究が進められており、また遺伝子導入を用いた論文は単発的にある程度である。しかしながら、遺伝子導入技術開発の重要性は多くの研究者の共通な認識でもあり、本プロジェクトの開始時点では特にレンチウイルスによる遺伝子導入法の検討が世界中で盛んに行われていた。

そのような世界的な情勢の中で我々としては、中間目標として遺伝子導入技術に関してはシステムティックに展開できることとし、また導入遺伝子発現制御技術の開発に関しては調節可能な細胞株を樹立することとした。さらに、最終目標としてはこれらの技術をブラッシュアップし、さらなる遺伝子導入効率の向上を目指すとともに、同時に重要な周辺技術においてもさらなる開発を進め、ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術に関してさまざまなニーズ(特に本プロジェクトを進めるにあたり必要とされる技術)に積極的にフレキシブルに対応できるようにしていきたい。

② ヒト ES 細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その2)幹細胞創薬研究所
幹細胞創薬研究所では、相同組換えのための遺伝子導入技術の開発を目的としている。そのため、相同組換えの実績があるエレクトロポレーション法での遺伝子導入の技術開発が達成できることが望ましい。

中間目標:

エレクトロポレーション法で遺伝子導入が可能かどうかを見極める。不可能なようなら、リポフェクション法やウイルスベクターによる遺伝子導入方法を試し、最適な方法を決定する。

最終目標:

中間目標で選択した遺伝子導入方法を用いて、遺伝子相同組換えの実験遂行に耐えるだけの効率を持つ遺伝子導入条件を見出す。具体的には、1 回の試行で数十個のコロニーを得られるようにする。

③ ヒト ES 細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その3)埼玉医科大学

物理的もしくは化学的な遺伝子導入法と比較して、ウイルスベクターは細胞表面の受容体タンパク質に結合して細胞内に侵入するために、細胞に対するダメージは少なく、多様な細胞種に対して細胞数を問わず高効率に導入が可能である。そこで本研究では、ヒト ES 細胞に対して高い効率で一時的もしくは安定な遺伝子発現を得る方法論を確立する目的で、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター並びにレンチウイルスベクターを比較する。

中間目標:

- 1)一過性の遺伝子導入効率は、現在数%であるのを数十%にすることを目標とする。
- 2)安定な遺伝子導入効率に関しては、現在 10^7 個の細胞あたり数個程度であるのを数十個にする。

最終目標:

一過性な遺伝子導入と安定な遺伝子導入共に 100%の効率にすることを目標とする。

(3)研究成果

① ヒト ES 細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その1)京都大学

ア. ヒト ES 細胞に適した遺伝子導入法の検討

a. リポフェクション試薬の検討

入手可能な37種の遺伝子導入試薬について、遺伝子導入法を検討し、ヒトES 細胞に対して従来の数倍程度遺伝子導入効率が高い手法を確立できた。

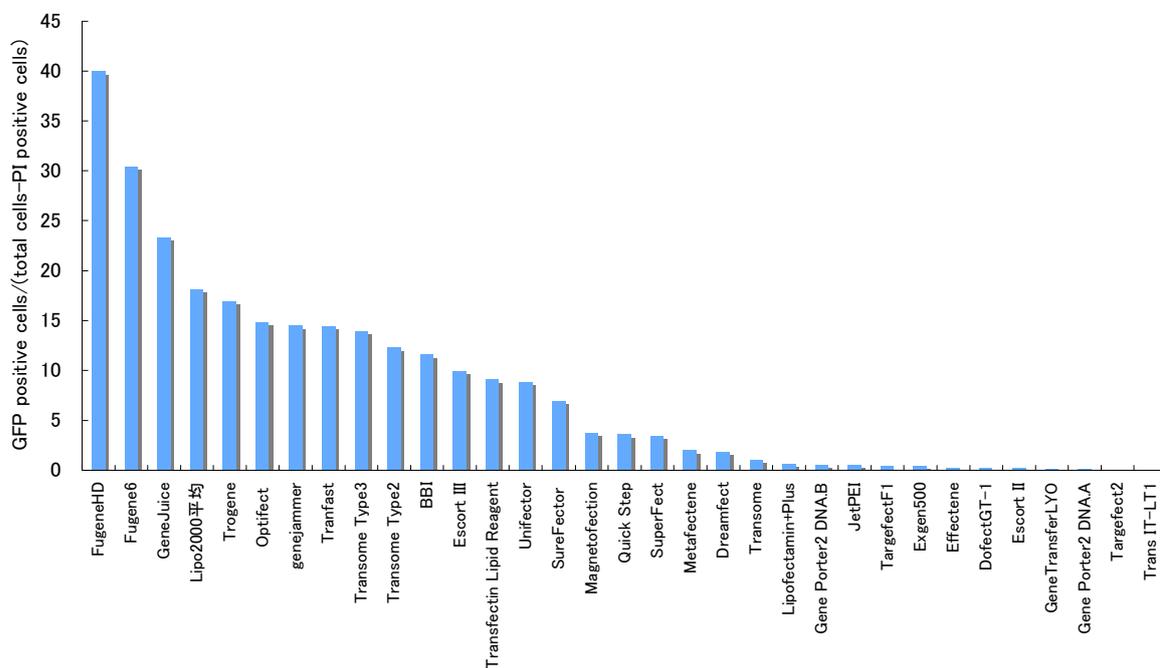
具体的には以下のような手順を進めた。まず入手可能な37種の遺伝子導入試薬について、pCAG-EGFP-SV40-Neo プラスミドを導入した。このプラスミドの利点として、導入された細胞はその遺伝子産物であるEGFP が蛍光を発するとともにneo 遺伝子産物により抗生物質であるG418に耐性を示すようになる。遺伝子導入後48時間後にEGFP 陽性細胞の割合を、蛍光を指標としてFACS を用いて解析し、遺伝子導入効率として評価した。ヒトES 細胞に対する効果を明確に測定するために、フィーダー細胞を用いない培養系でアッセイを行った。

その結果、ヒトES 細胞(KhES-1)に対する遺伝子導入効率はFuGENE HD を用いた場合が最も高かった(図1上段)。また、遺伝子導入効率を調べるのと同時にヒトES 細胞に対する細胞毒性についても遺伝子導入操作後の細胞の生存率で調べたところ、FuGENE HD では顕著な細胞毒性は認められなかった(図1下段)。このことから、FuGENE HD はヒトES 細胞に対して、低毒性でかつ高遺伝子導入効率の試薬であることが明らかになった。他のヒトES 細胞株であるKhES-2、KhES-3 細胞でも同様の検討を行った。その結果いずれの場合もFuGENE HD が最も高い遺伝子導入効率と良好な細胞生存率を示した。

導入遺伝子の発現様式と導入された細胞の形態についても検討を行った。他の試薬を使用した場合はES 細胞のコロニーの周辺部のみには導入遺伝子が高発現した細胞が認められない場合がほとんどであったのに対し、FuGENE HD では比較的コロニーの中央部にも導入遺伝子を高発現した細胞が認められた(図2)。このことから、FuGENE HD は遺伝子導入効率が優れているだけでなく、比較的均一に遺伝子導入が可能であることが分かった。解離等の物理的ダメージに弱く、細胞塊として扱うことを要求されるヒトES 細胞において、コロニー21内の細胞の位置によらず遺伝子導入が可能でFuGENE HDは非常に有効な遺伝子導入試薬であると考えられた。また、FuGENE HD による遺伝子導入後の細胞に顕著な形態の変化は認められず、FuGENE HD はヒトES 細胞の未分化性に対して影響を与えないことも示唆された。ES細胞の安定的な継代維持に必要なフィーダー細胞への影響もほとんど観察されなかった。

この成果は国際誌 *Biochemica* 4, 19-21(2006)に掲載された。

GFP positive



survival

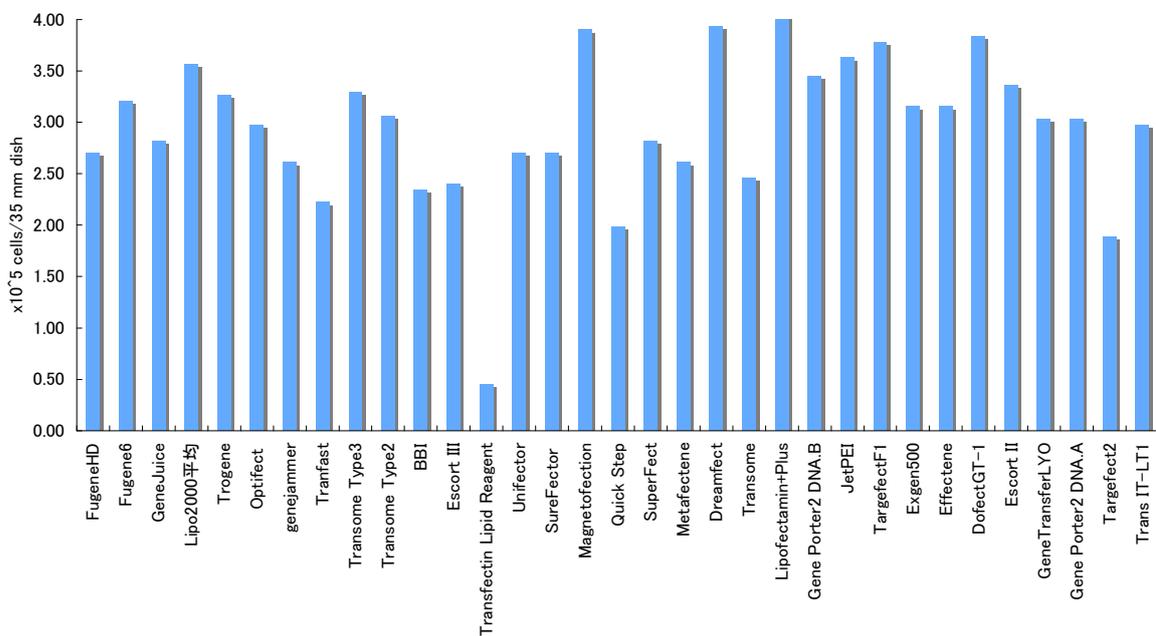
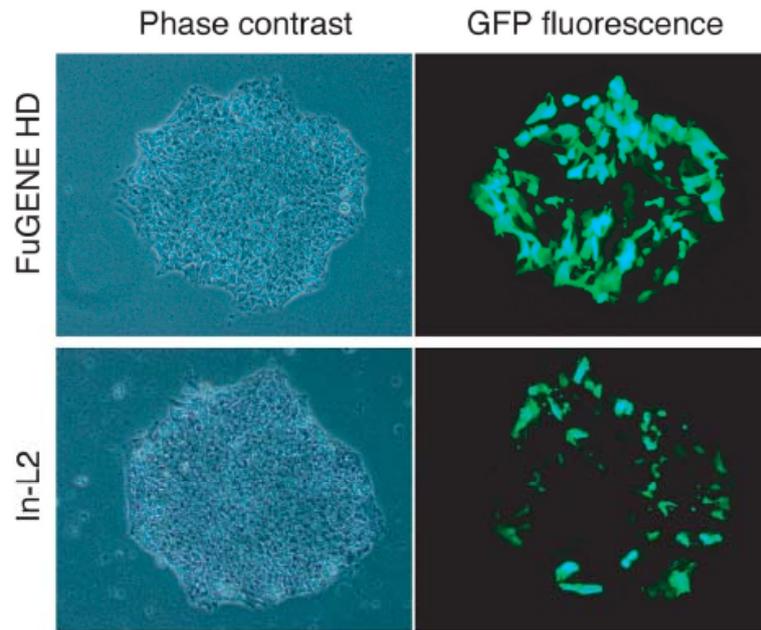


図 1 ヒト ES 細胞(KhES-1 株)における各遺伝子導入試薬による遺伝子導入効率(上段)と 48 時間後の生存率(下段)。Biochemica 4, 19-21(2006)から引用。

図 2 リポフェクション試薬による遺伝子導入の効率の比較。FuGENE HD と In-L2 (Invitrogen Lipofectamine 2000)。FuGENE HD ではほぼ半数近くの細胞で導入遺伝子の発現が確認できたが、In-L2 ではヒト ES 細胞のコロニーの周辺部分でのみ、その発現が確認できる程度であった。Biochemica 4, 19-21(2006)から引用。



b. エレクトロポレーション法

ヒトES 細胞におけるエレクトロポレーション法に対してエレクトロポレーション条件検討を行い、遺伝子導入細胞株を得たことを確認した。京都大学でも幹細胞創薬研究所からエレクトロポレーション法の技術移転を行い、ヒトES細胞においてHPRT遺伝子座での遺伝子相同組換えに成功しており、さらに独自に発展させ、効率の向上を達成した。より具体的な技術情報に関しては遺伝子相同組換えの項目で記述する。

イ. 加工技術開発に適したヒトES 細胞株の作出

ヒトES 細胞をマウスのES 細胞同様に維持を行うと、ヒトES 細胞は物理的操作、化学的操作に弱いこともあり、細胞の生存効率が1%ぐらいいままでに減少し、また核型異常の発生頻度が高くなる。現在、ヒトES 細胞で用いられている継代培養法はいずれも多大な時間と労力が要求されるために細胞数の拡大には不向きな操作であり、ヒトES 細胞の使用範囲が限定されてしまう要因となる。そこでこのような一連の操作に対してより耐性を持ったヒトES 細胞株を樹立することにより、ヒトES 細胞の加工技術開発の発展に大きな貢献が期待できる。以下にその技術内容を記載する。

京都大学再生医科学研究所で樹立されたヒトES 細胞株の3種全てをコロニー形状から完全分離させ、フィーダー細胞上で培養を繰り返すことにより複数のサブラインを作製した。サブラインそれぞれの継代回数に対するクローニング効率と核型異常の有無との関連性について長期に渡り検討した結果、核型に異常は無くクローニング効率が5%未満である状態が一定期間続いた後、正常核型を保持しながらもクローニング効率が約28%にまで上昇した状態が続き、最終的には約55%まで上昇するが核型異常を認める状態に変化する、段階的な形質の変化が継代培養中に生じていることを発見した。この成果を基に、正常核型を保持しながらもクローニング効率が上昇

した状態が長期的(約20継代)に継続されるサブラインを特定し、単離することに成功した。このサブラインの有用性を評価するため、親株とサブラインの倍加時間を測定して増殖効率を計測した結果、サブラインは親株に対して5倍の速度で拡大増殖することが判明した。

単離されたサブラインがES細胞としての特性を維持しているのかを検証するために、未分化状態の維持と多分化能の保持を評価した。未分化指標であるOct-3、SSEA-3、SSEA-4、TRA、NANOGの抗体を用いて免疫蛍光染色を施した結果、全抗体に対して陽性反応を示した。また別の未分化指標であるアルカリホスファターゼ活性を調べた結果でも陽性反応を示したことから、クローニング効率が良いサブラインは未分化状態を親株と同等に維持していることが確認できた。次に、サブラインの多分化能を調べるために胚様体の作成とテラトーマ作成による評価を行い、外胚葉、中胚葉、内胚葉いずれにも分化しうることを見出した。このようにサブラインはES細胞としての特性を損なわず、且つES細胞の加工技術に適した細胞株であることを見出した。この成果は国際誌Stem Cell 24, 2649-2660 (2006)に掲載された。

今後はクローニング効率の上昇に寄与した因子を探索し同定することで、ヒトES細胞の培養法の更なる改善を目指し、ヒトES細胞への加工技術をより簡便なものにしたい。

中間評価以後、使いやすいサブラインとその親株と間でマイクロアレイを行い、遺伝子発現の比較解析を進めた。さらに候補遺伝子を20個近くまでしぼることに成功した。この中でいくつかの遺伝子についてRNA干渉を用い、ヒトES細胞における機能解析を行った。

ウ. 導入遺伝子の効率的発現に向けた技術開発

ヒトES細胞における遺伝子導入法が我々のグループで大きく前進しているが、依然として遺伝子導入安定株の得られる率は低い。導入遺伝子が複数に及ぶ場合は、遺伝子導入を何段階も行う必要が生じ、時間的にもコスト的にも大きな壁となる。同一プロモーターで複数の遺伝子を発現させる場合、単一のプロモーターが複数の遺伝子を発現できるシステムの開発ができれば時間的な節約となり、またコストの削減にもなる。実際、単一の転写単位から2種類以上の遺伝子産物を作る方法としてIRES (internal ribosome entry site)がよく用いられている。しかしながらES細胞ではIRESが効率よく機能せず、下流側の遺伝子産物の産生効率が非常に悪いことが知られており、これに代わる方法の開発が必要と考えられてきた。そこで我々はヒトES細胞においても単一の転写単位から効率よく複数の遺伝子産物の産生を可能とする2Aベクターの開発を進めている(図3)。詳細な検討が必要であるが、現時点では当初の期待通り、ヒトES細胞でも2AがIRESよりも効率よく働くことを見出している。

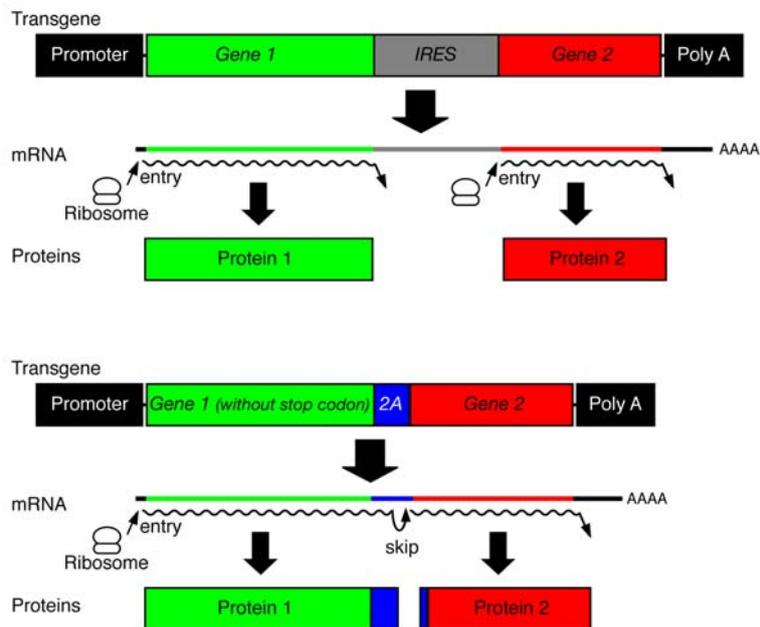


図3 IRESと2Aによる遺伝子発現システムの違い

エ. 導入遺伝子発現制御技術の開発

導入遺伝子の発現制御システムとして、Cre-loxP、ER(エストロゲンレセプター)、Tet-On/Offシステムなどが挙げられる。これらの中で可逆的にさまざまな遺伝子発現をOn/OffできるTet-On/Offシステムでの遺伝子発現制御を目指した。霊長類ES細胞を用いたTet-On/Offによる遺伝子発現制御の成功は世界ではじめてであり、その成果は国際誌Stem Cells 24, 2566-2572(2006)に掲載された。またヒトES細胞においても同様なシステムの開発に成功し、現在詳細な解析を積極的に進めている。以下にその技術内容を記載する。

ヒトES細胞におけるTet-On/Offシステムの開発に先だって同じ霊長類のカニクイザルES細胞株を用い検討を進めることにした。カニクイザルES細胞株に、調節プラスミドを導入し、次に目的遺伝子(本検討ではEGFP)を入れた応答プラスミドを導入した。Tet-Off遺伝子発現制御系が機能しているかどうかは、テトラサイクリンの誘導体であるドキシサイクリン(Dox)によって、導入した遺伝子の発現を量的に調節できるかどうかで検討した。Tet-Off遺伝子発現制御系を導入したサルES細胞でも、ES細胞の特性を保持していること、またDoxにより未分化状態だけではなく、さらには胚様体(EB)やテラトーマなどの分化状態でもOn/Offの制御ができていることを確認した。さらに詳細な検討を進め、ES細胞から分化誘導した、外胚葉、中胚葉、内胚葉にいずれにおいても、このOn/Offの制御ができることを確認した(図4、5)。このことは我々の当面の標的細胞である、神経細胞(外胚葉)、心筋細胞(中胚葉)、肝細胞(内胚葉)での遺伝子発現制御技術に向け大いに期待できる結果である。

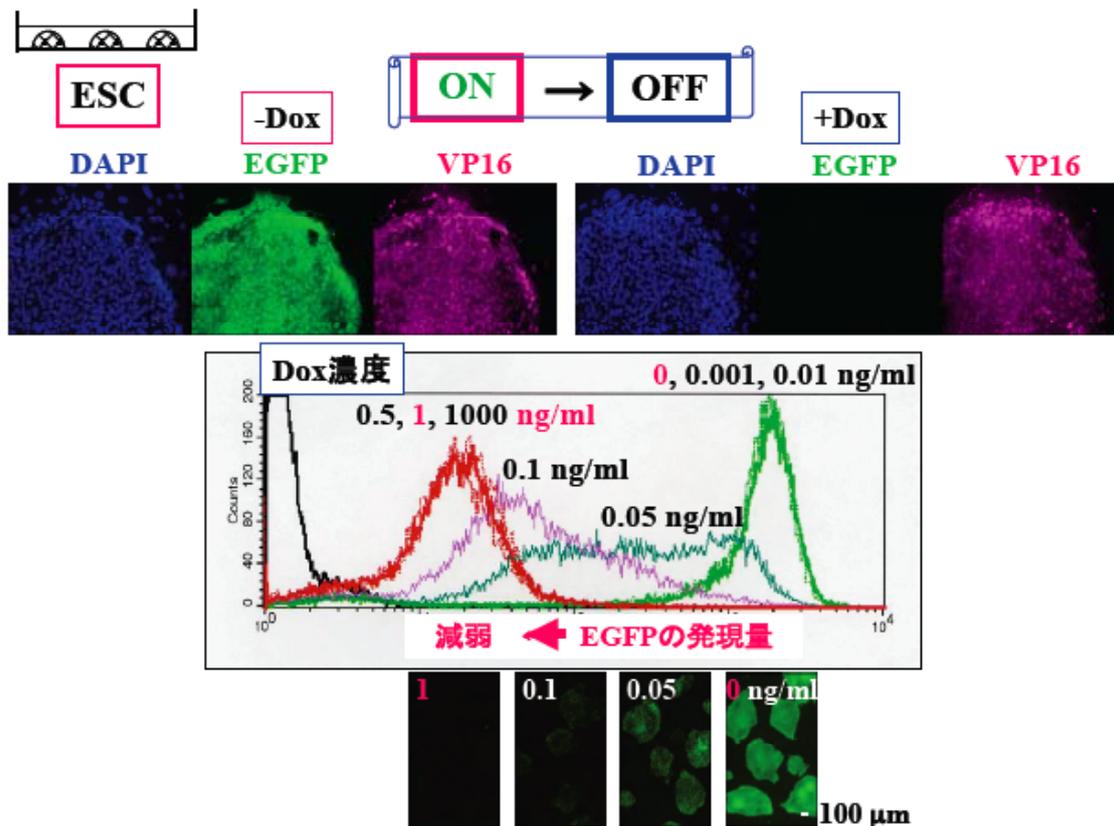


図4 カニクイザルES細胞でのDoxによるTet-Off発現制御(EGFPの発現抑制)
 培地中にDoxを添加することにより、EGFPの発現が抑制される。Doxは0.05 ng/mlの濃度以上で効果が見られ、1ng/ml以上の濃度では蛍光顕微鏡下でEGFPの発現は検出感度以下になった。Stem Cells 24, 2566-2572(2006)から引用。

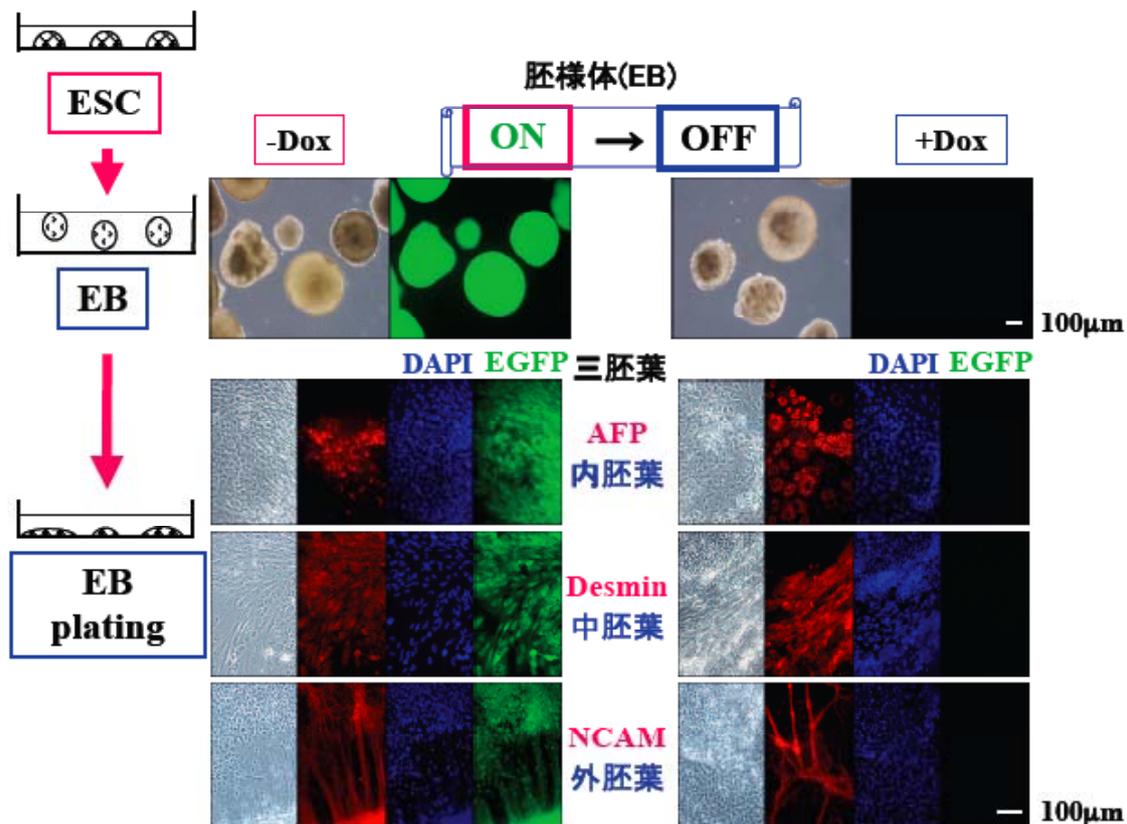


図 5 カニクイザル ES 細胞により分化誘導した、胚様体とさらに三胚葉分化した細胞における、Dox による Tet-Off 発現制御(EGFP の発現抑制)。胚様体及び三胚葉(外胚葉、中胚葉、内胚葉)に分化した細胞においても、Dox による Tet-Off 発現制御が機能し、EGFP の発現が抑制された。Stem Cells 24, 2566-2572(2006)から引用。

カニクイザルES 細胞株でのこれら培った経験と、ヒトES 細胞における遺伝子導入法の検討での結果を組み合わせ、ヒトES 細胞でも調節遺伝子導入細胞株の樹立ができた。今後詳細な解析を進め、同システムの確立を目指す。

上記で述べたように中間評価後、カニクイザル ES 細胞での検討を進めると同時に、その中で培った経験を生かし、ヒト ES 細胞株を用いて検討を行い、KhES-1 においては、Tet-On 遺伝子発現制御系を導入した正常染色体を有するヒト ES 細胞株を樹立することに成功した。

Tet-On 遺伝子発現制御システムをヒト ES 細胞で構築する場合、本プロジェクトを進める上で、確認すべき事項としては、(1)ヒト ES 細胞の未分化状態とそこから分化誘導した細胞の両方でこのシステムが働くか、(2)特定遺伝子の発現を制御することで、ヒト ES 細胞からより効率的に分化誘導を進められるかである。この両者が達成されることにより、創薬基盤研究のためのヒト ES 細胞由来の分化細胞の作出を前進させることが期待できる。前者においては、GFP というレポーター遺伝子を導入することによりカニクイザル ES 細胞株を用いて中間評価までで確認済みである、さらにヒト ES 細胞株でもその確認を行った。しかしながら、後者についてはまだ不明のまま

あった。そこで、まず特定の遺伝子を導入したヒト ES 細胞株を樹立し、その特定遺伝子を発現誘導させる系を確立した。さらに特定方向への分化誘導が可能かどうかの検討を行った。その結果、例えばある遺伝子(K)を誘導的に過剰発現することでヒト ES 細胞から神経及び腺上皮細胞への効率のよい分化誘導が可能であることを見出した(図 1)。このように後者の課題も達成することができた。

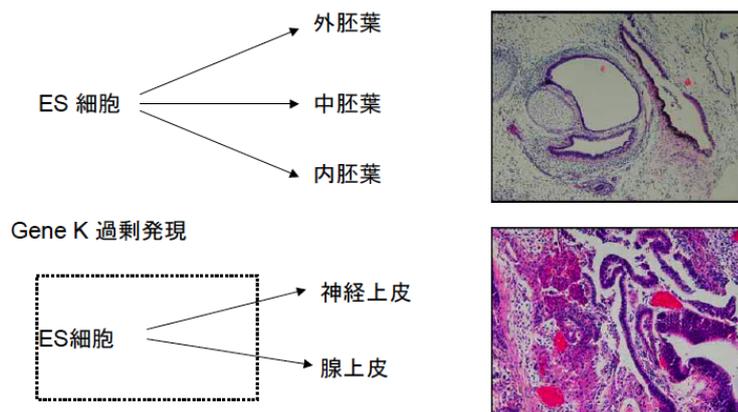


図 1 ヒト ES 細胞において遺伝子 K を過剰発現におけるテラトーマ形成。ヒト ES 細胞は、外胚葉、中胚葉、内胚葉とさまざまな細胞株に分化するが、遺伝子 K を過剰発現させることで神経上皮と腺上皮の特定方向に分化誘導させることができる。

② ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その2)幹細胞創薬研究所

細胞の分散方法、エレクトロポレーション時の細胞数、エレクトロポレーションのプログラム等を検討した結果、①イで樹立されたサブラインで1回の試行につき数百のコロニーが得られ、ヒトES細胞KhES-1でも1回の試行につき平均して数十のコロニーが得られるようになった。これは、遺伝子相同組換えの実験遂行に耐えうるだけの遺伝子導入効率といえる。

また、遺伝子導入を確認する手段として、これまでは専らネオマイシンによるセレクションが行なわれていたが、耐性遺伝子上流のプロモーターを工夫することで、ハイグロマイシンによるセレクションが可能であることを見出した。この成功は、複数の遺伝子の発現制御や、遺伝子置換の実験に応用できる。

③ ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その3)埼玉医科大学

以下に述べる各ベクター系において、一時的な遺伝子発現効率はGFP遺伝子をコードしたベクターを用いてGFPの発現をFACSで検出することによって解析した。また、染色体へのベクターの組み込みによる安定な遺伝子導入は、ネオマイシン耐性遺伝子をコードしたベクターを感染させた細胞におけるG418耐性コロニーの出現頻度によって検討した。

ア. ヘルパー依存型アデノウイルスベクター

我々はこれまでに、従来のアデノウイルスベクター上から全てのウイルス遺伝子を除いた、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを開発した。この改良型ベクターは、従来のアデノウイルスベクターと比べると、細胞毒性が低く挿入可能なDNAのサイズが36 kbと大きい(従来型ベクターでは8 kb)。また、現在用いられているヒト5型アデノウイルス由来のアデノウイルスベクターは、ウイルス受容体であるCARの発現が低い細胞への遺伝子導入は困難であった。そこで、その欠点を克服するために、ベクターの構造の一部をCD46を受容体として感染する35型ウイルスに変えたヘルパー依存型アデノウイルスベクターを開発した。

まず、高感度型GFP遺伝子を発現する5型もしくは35型由来のヘルパー依存型アデノウイルスベクターを産生し、カニクイザルES細胞(CMK6)における一過性遺伝子導入効率について比較した。その結果、5型と35型のどちらの血清型のベクターを使用した場合もほぼ同等の効率を示し、生細胞中最大80%以上の細胞での遺伝子発現に成功した。これらベクター感染細胞では未分化性が維持されていた。また、遺伝子発現を経時的に調べたところ、ベクター感染2日後にGFP発現は最大となり、その後発現が低下することがわかった。このベクターはネオマイシン耐性遺伝子もコードするため、薬剤選択によって安定な遺伝子導入効率も測定したところ、染色体に組み込まれる効率は 5.0×10^4 個の感染細胞あたり1個(細胞あたり 2.0×10^{-5})と低かった。

カニクイザルES細胞で得られた結果をヒトES細胞(①イで樹立されたサブライン)で再現するため、同様の実験によって一過性遺伝子発現効率を検討したところ、生細胞中最大98%もの細胞で遺伝子発現を確認した。この効率は一般的な遺伝子導入試薬を使用した場合(40-50%)に比べ高効率であった。また、KhES-1サブライン株とKhES-3株の両方で同様の効率が得られ、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターの汎用性が示された。これまでに他グループにより、従来のE1欠損型と呼ばれるアデノウイルスベクターを用いた場合に、一過性の遺伝子導入効率が11%であることが報告されているが、細胞毒性の低いヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いたことにより、それと比べて数倍の高効率での遺伝子導入に成功したことになる。これらの研究成果は国際誌 *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 13781-13786 (2008) に掲載された。また、ヒトiPS細胞への応用を検討したところ、生細胞中最大92%の細胞で遺伝子発現が見られ、ヒトES細胞の結果がそのままヒトiPS細胞へと反映される事が示唆された。

イ. アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター

AAVウイルスベクターについては、従来用いられている2型の血清型(AAV2)由来のベクターのみならず、計10種類の血清型由来のベクターを網羅的に比較した。これらの異なる血清型由来のベクターは細胞表面上の異なる受容体タンパク質に結合して細胞に感染するが、霊長類ES細胞においてどの血清型が最も感染効率が高いかについては、これまでは詳細な解析はなされていなかった。

まず、GFPをコードするベクターを用いてカニクイザルES細胞を感染させた結果、至適の血清型由来のベクターで最高約30%の細胞への遺伝子導入に成功した。その一方、染色体への組込み頻度をネオマイシン耐性遺伝子をコードするベクターを用いて比較検討した結果、最高でもその頻度は 6.0×10^3 個の感染細胞あたり1個(細胞あたり 1.7×10^{-4})と低い値であった。

ヒトES細胞 (KhES-1サブライン)においては、最適な血清型のベクターを用いて細胞当たり20000ウイルス粒子の濃度で感染させた場合に感染細胞の68%、60000ウイルス粒子で80%という高い一過性導入効率を達成した。一方、KhES-3株においては、同量のベクターを用いても最高25%程度の遺伝子導入効率であり、AAVによる遺伝子導入効率はヒトES細胞株間で大きく異なる事が示唆された。しかしながら、これらの結果は従来他グループにより報告されていた0.012%という効率に対して、1000-10000倍高い結果であり、これらの研究成果は国際誌 Biochemical and Biophysical Research Communications 388: 711-717 (2009) に掲載された。一方、染色体への組み込みについては、 4.5×10^3 個の感染細胞あたり1個(細胞あたり 2.2×10^{-4})の頻度であった。

ウ. レンチウイルスベクター

レンチウイルスベクターは、安定な遺伝子発現を得る目的で優れたベクターであり、得られる遺伝子発現の大部分は宿主染色体に組み込まれたベクターに由来する。また、ウイルスを産生する時に異なるウイルス由来のエンベロープ遺伝子を発現することにより、様々な感染能を示すベクターを調製することが可能である。そこで、HIV-1由来レンチウイルスベクターを用いて、カニクイザルES細胞とヒトES細胞に対して多様なエンベロープを網羅的に比較した。用いたエンベロープは、レトロウイルス由来、水疱性口内炎ウイルス由来、バキュロウイルス由来、狂犬病関連ウイルス由来、リンパ球系脈絡髄膜炎ウイルス由来等の計10種類である。その結果、カニクイザルES細胞では、最も効率の高いエンベロープで15%、その他4種類のエンベロープにおいても、1-5%の細胞で安定に遺伝子発現を得ることが可能であった。

HIV-1由来ベクターは、カニクイザル細胞では内在性のTRIM5 α 遺伝子により感染効率が落ちることが知られている。我々は、siRNAを用いてカニクイザルES細胞のTRIM5 α 遺伝子をノックダウンすることにより、ベクター感染効率が2倍程度上昇することを確認した。ヒトES細胞ではこの種間の制限がないため、実際に、ヒトES細胞においてはサルES細胞を用いたときよりも全般的に高頻度に遺伝子導入が可能であった。さらに超遠心法により濃縮したウイルス液を用いることにより、平成19年度の間評価までに49%の感染細胞で安定に遺伝子発現を得ることに成功した。また、エンベロープによってはマウス細胞に感染しないため、マウス由来のフィーダー細胞上でヒトES細胞のみに選択的に遺伝子導入が可能となることが示唆された。

平成 21 年度までに最終目標を達成するため、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入効率方法の更なる至適化を試みた。この結果、プロモーターは EF-1 α が一番発現強度が高く、エンベロープは VSVG とバキュロウイルス gp64 の 2 種類が最も遺伝子導入効率が高かった。これらの組み合わせにより、細胞当たり 300 ウイルス粒子の濃度で感染させた場合に、ヒト ES 細胞株 (KhES-1 サブライン)で最高 76%の遺伝子導入効率を得ることが出来た。また、ヒト iPS 細胞への応用を検討したところ、至適条件下で最大 95%の細胞で遺伝子発現が見られ、ヒト ES 細胞の結果がそのままヒト iPS 細胞へと反映される事が示唆された。

(4) 目標の達成度と意義

① ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その1)京都大学

本項目において、当チームは総括すると当初の計画は十分に達成されたといえる。初年度の平成17年度は本プロジェクトが7月27日よりスタートしたこともあり、遺伝子導入法の検討に焦点をあてて検討することになっていた。しかし平成18年度に開始予定であった遺伝子発現制御技術の開発、具体的にはTet-On/Off システムの開発を前倒して開始することができ、さらにそれにおいても成果を収めることができた。また平成18年度には加工技術に適したヒトES細胞株(使いやすいサブラインの樹立)というややチャンレンジ的なプロジェクトを開始したが、それについても研究成果を収めることができています。この勢いは平成19年度にも継続されており、本年度は既に同一プロモーターによる複数の遺伝子発現制御の開発をIRES 以外のシステムにおいても成果を上げてきている。さらに中間評価以後も確実に成果を上げています。

今回の成果を国際的なレベルで位置づけると、本プロジェクトが開始時点では世界的に行われていたレンチウイルスによる遺伝子導入法では遺伝子導入効率がよいものの、サイレンシングの問題が従来の方法に比べてさらに大きく、導入遺伝子の安定細胞株の樹立という側面では期待していたほど効果が得られていない。リポフェクション試薬を用い展開を進めているヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発については世界的にトップランクの位置を維持しており、その成果はいくつもの国際誌に掲載されていることで実証されている。

② ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その2) 幹細胞創薬研究所

計画通り終了した。エレクトロポレーション法によるヒトES細胞への遺伝子導入に成功したことは、相同組換えへの応用を視野に入れた場合、非常に強力な手段を手に入れることができたといえる。且つ、ネオマイシンだけでなくハイグロマイシンによるセレクションが可能であることを見出したことにより、複数の遺伝子カセットを細胞内に導入することが可能となっただけでなく、遺伝子置換の基盤技術が確立された。

③ ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その3) 埼玉医科大学

これまでに報告されていないスケールで、多様なアデノウイルスベクター、AAVベクター、レンチウイルスベクターを網羅的に比較することにより、過去に他グループにより報告されているよりも高い効率で遺伝子導入効率を得ることが出来、平成19年度の中間目標を計画通りに達成した。すなわち、一過性の遺伝子発現においては、目標とした効率である数十%に対し、アデノウイルスベクターとAAVベクターでそれぞれ98%と80%の高効率を達成した。安定な遺伝子導入に関しては、 10^7 個の細胞あたり数十個(～0.01%)までに改善する目標に対し、レンチウイルスベクターで49%の効率を達成した。特に、ヒトES細胞で約100%の効率で一過性の遺伝子発現を達成した報告は本研究が世界で最初であり、最終目標も達成できた。レンチウイルスベクターを用いた安定な遺伝子導入効率に関しても、ヒトES細胞で最高76%、ヒトiPS細胞で最高95%の効率を示し、最終目標を達成した。さらに、複数のヒトES細胞及びヒトiPS細胞でも同様の効率で一過性及び安定遺伝子発現が見られ、ウイルスベクターを使用した本技術の汎用性が証明された。また、本プロジェクトでの研究成果がそのまま今後ヒトiPS細胞を用いた研究へと応用可能である事も示唆された。

高効率の一過性もしくは安定に遺伝子を導入するベクター系を確立したことによって、本プロジェクトの他グループによって開発された遺伝子発現調節法や分化誘導法へと応用可能になった。

実際に、肝細胞への分化誘導を増進する候補遺伝子 (HNF1 α 、HNF4 α 、LAP)及び阻害する候補遺伝子 (LIP) を発現するアデノウイルスベクターをそれぞれ作製し、熊本大学条グループと連携し共同研究を行なった。このように本プロジェクト内の他グループの研究に貢献できた。

2. 1. 2 ヒトES細胞における相同組換え技術の開発

京都大学

共同実施：幹細胞創薬研究所

埼玉医科大学

(1)事業目的と背景

遺伝子相同組換え技術とは、細胞が持つゲノム遺伝子のうち、狙った部位の遺伝子を改変する技術のことである。これは、単に遺伝子を導入してそれを一過的に発現させたり、或いは、ゲノム領域に無作為に遺伝子を組み込んだりすることよりも遥かに難易度が高い。ヒトES 細胞に対する遺伝子相同組換えはいくつか報告があるものの、あくまでそれは偶然の産物であるようだ。世界中で多くの研究者やグループがヒトES 細胞に対する遺伝子相同組換えの追試を試みているものの、成功したという報告は学会レベルでさえ殆ど聞かない。とはいえ、世界中で多くの研究者やグループが試みているということからも容易に推測できるように、ヒトES 細胞への相同組換えに対するニーズは非常に大きい。理由は主に3つである。1つは、サイレンシングの心配が少ないということ。ゲノム領域に無作為に遺伝子を組み込む方法だと、組み込まれた領域によっては、その領域の影響を受け、転写が起こらないことがある。これをサイレンシングという。ヒトES 細胞への遺伝子導入では、理由はよく分かっていないが、サイレンシングを起こしやすいということが知られている。遺伝子相同組換え技術が確立されれば、サイレンシングが起こらないことが知られている領域に遺伝子を挿入でき、サイレンシングの問題が回避できる。2つ目は、予期せぬ遺伝子の異常な制御が起こりにくいということ。無作為に遺伝子が組み込まれた場合、もともとその領域が持っていた機能を壊すことになり、場合によっては細胞の癌化が惹起されることが報告されている。遺伝子相同組換え技術が確立されれば、機能を失っても問題ないことが知られている領域に遺伝子を挿入でき、予期せぬ遺伝子の異常な制御は起こらないはずである。3つ目は、遺伝子のノックアウト技術につながるということ。マウスES 細胞では日常茶飯事で行なわれている遺伝子のノックアウトだが、ヒトの細胞では報告がない。これはとりもなおさず、ヒトES 細胞での遺伝子相同組換えが成功していないことの証である。ヒトES細胞の遺伝子の両アレルへの相同組換えができれば、ヒト細胞のノックアウトも可能となるはずだ。

当プロジェクトでは、前段落で3つ挙げた理由のうち2つ、“サイレンシングの回避”と“予期せぬ遺伝子の異常な制御の回避”を可能とするため、常にオープンであり、ヘテロノックアウトをしても正常であることが知られているHPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) 遺伝子座を第一の標的として研究を行なっている。

さらにHPRT遺伝子座での遺伝子相同組換え技術開発が確立を発展させ、このHPRT遺伝子座へのレポーター遺伝子の導入あるいは遺伝子発現制御システムの開発を目指したい。また、HPRT以外の遺伝子座においても遺伝子相同組換え技術が可能かどうかの検討をおこなう。

(2)事業内容と目標

① ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その1)京都大学

マウスES細胞における相同組換え実験では、リポフェクション法よりもエレクトロポレーション法がよく用いられており、実績もある。そこで中間目標としては、エレクトロポレーションをはじめとするヒトES細胞での相同組換え技術の基盤づくりに目処をつける、また最終目標としてはヒトES細胞の分化誘導制御技術開発、研究用モデル細胞の構築技術の開発に有益な遺伝子での相同組換えヒトES細胞を構築する。

② ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その2)幹細胞創薬研究所

中間目標:

ヒトES細胞の加工技術開発に目処をつける。即ち、ヒトES細胞に対する相同組換えが可能かどうかを判断する。“事業目的と背景”にも記載したように、これまでもヒトES細胞への遺伝子相同組換えに成功したとの報告があるにはあるが、それらは全て単発で、偶然の産物に過ぎないようだ。そのため、複数回のトライアルで相同組換えが確認されるかどうかを見極めることができれば尚望ましい。そして相同組換えに成功したならば、組換え体を増幅、保存して、組換え体を有効利用するための体制を構築する。“事業目的と背景”にも記載した理由で、標的はHPRT遺伝子座とする。

最終目標:

本プロジェクトにとって有用な遺伝子組換えヒトES細胞を少なくとも1つ以上樹立する。目標達成のため、2つの手段を考案している。1つは、HPRT遺伝子座が組み換わったヒトES細胞の、組み換わった部位に望みの遺伝子カセットを置換できるシステムを構築し、このシステムを利用するものである。中間目標のための研究でも、このシステムに適合しうる形の遺伝子相同組換えを試行している。もう1つは、内在プロモーターの下流に望みの遺伝子カセットをノックインする方法である。

③ ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その3)埼玉医科大学

現在、ヒトES細胞における相同組換えについては論文2報しか報告がなく、これらの報告では、他の細胞種と同様エレクトロポレーションもしくはリポフェクションが用いられている。物理的もしくは化学的な遺伝子導入法と比較して、ウイルスベクターはウイルスの細胞侵入メカニズムを利用して細胞表面のウイルス受容体を介して細胞内に侵入するために、多様な細胞種で細胞の数を問わず高い効率を示し、特にヒトES細胞のような物理的に弱い細胞には適していると考えられる。我々はこれまでに、マウスES細胞においてヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いて高効率の相同組換えを達成した。そこで本研究では、ヒトES細胞に対して高い効率で相同組換えを得

る方法論を確立する目的で、アデノウイルスベクター、AAVベクターならびにレンチウイルスベクターを比較する。

中間目標:

主にカニクイザルES細胞を用いて相同組換えの実現化を目指し、疾患モデル細胞構築技術の基盤を確立する。

最終目標:

カニクイザルES細胞を用いて得た知見をヒトES細胞に応用し、より簡便に相同組換えを得る方法を確立し、特定の遺伝子座を標的としてマーカー遺伝子を組み込んだアッセイ細胞や遺伝子をノックアウトした疾患モデル細胞を創製する。

(3) 研究成果

① ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その1) 京都大学

ア. 相同組換えベクターの作製の検討

マウスES細胞における相同組換え体の作製において、様々なポジティブ選択用の遺伝子発現カセットとネガティブ選択用のカセットが用いられる。そこで、ヒトES細胞用の相同組換えベクターを作製するにあたって、これらの遺伝子発現カセットのヒトES細胞における効果の検討を行った。ポジティブ選択用カセットとして、ネオマイシン耐性カセット、ハイグロマイシン耐性カセット、ピューロマイシン耐性カセットを検討し、それぞれヒトES細胞における薬剤選択の至適薬剤濃度を決定した。ネガティブ選択用カセットとしてはチミジンキナーゼ発現カセット、ジフテリятキシンA断片発現カセットを検討した結果、チミジンキナーゼ発現カセットに適したガンシクロビル濃度を見出すことに成功したが、ジフテリятキシンA断片は細胞毒性が高く適していないことが判った。これらの結果をもとに、サルES細胞及びヒトES細胞から単離したHPRT遺伝子断片を選択用カセットと組み合わせ、相同組換えベクターを作製した。

イ. 相同組換えに向けた遺伝子導入法の検討

マウスES細胞における相同組換え実験では、リポフェクション法よりもエレクトロポレーション法がよく用いられており、実績もある。そこで、ヒトES細胞におけるエレクトロポレーション法の確立を目指し、種々の条件を決めることに成功した。

京都大学再生医科学研究所では最適化したりポフェクション法とマウスES細胞でよく用いられているエレクトロポレーション法と用い、遺伝子相同組換え技術を開発する計画であったが、中間評価時点で幹細胞創薬研究所及び埼玉医科大学では既にHPRT遺伝子座において遺伝子相同組換えに成功したことから、これらの技術を導入し、それをさらに発展させることという計画の変更を行った。特定非営利活動法人幹細胞創薬研究所で用いられているエレクトロポレーション法を用い、さらに改良することでHPRT遺伝子での遺伝子相同組換えについて成功をした(表1)。

表1に示したように使用したヒト細胞株の違い、またターゲティングベクターのコンストラクトの違いもあるが、ヒト ES 細胞における相同組換えにはじめての成功が発表された Nature Biotechnology の 2003 年の論文と遜色のないあるいはそれ以上の成功率で相同組換え体を作成することに成功した。また 3 つのプロトコールを比較し、効率が大きく異なることを見出した。さらに得られた5細胞株について、染色体解析を行い、正常な染色体をもつものがほとんどであり本研究目的に問題はないが、一部では変異が起こっている細胞も含んでいることから、定期的に染色体解析を行う必要性もあることを見出した(表 2)。さらに KhES-1 ヒト ES 細胞株以外でも成功し、ヒト iPS 細胞でも HPRT 遺伝子での遺伝子相同組換えに成功した。ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞とよく性質が似ていることが知られており、ヒト ES 細胞で培った技術は、ヒト iPS 細胞にそのまま適用できるということを見出すことに成功した。

| Exp. No. | locus | Insert | Cell line | cells | stable | HR | HR/stable (%) | HR/cells |
|-----------------|--------|----------|-----------|---------|--------|----|---------------|----------|
| Nature Biotech. | HPRT | tk-neo | H1.1 | 1.5E+07 | 350 | 7 | 2.00 | 4.67E-07 |
| | Oct3/4 | IRES-neo | H1.1 | 1.5E+07 | 103 | 28 | 27.18 | 1.87E-06 |
| Total | HPRT | PGK-neo | KhES1 | 4.4E+07 | 239 | 5 | 2.09 | 1.14E-07 |
| Protocol 1 | HPRT | PGK-neo | KhES1 | 2.2E+07 | 68 | 0 | 0 | 0 |
| Protocol 2 | HPRT | PKG-neo | KhES1 | 2.2E+07 | 171 | 5 | 2.92 | 2.27E-07 |
| Protocol 3 | HPRT | PKG-neo | KhES1 | 2.2E+07 | 238 | 7 | 2.94 | 3.18E-07 |

表1 ヒト ES 細胞における相同組換え効率

| 細胞株 | 核型 | 染色体数 | | | | | | | | | 合計 | 正常率 |
|---------------|----|------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| | | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | | |
| KHES1-HPRT36 | XX | | 1 | 1 | 1 | 26 | 3 | | | | 32 | 81% |
| KHES1-HPRT133 | XX | | 1 | | 2 | 36 | 1 | | | | 40 | 90% |
| KHES1-HPRT150 | XX | | | 2 | 1 | 34 | 1 | | | | 38 | 89% |
| KHES1-HPRT171 | XX | | | | 2 | 37 | | | | | 39 | 95% |
| KHES1-HPRT204 | XX | | | | 5 | 31 | 1 | | | | 37 | 84% |

表2 得られた相同組換え体における正常染色体の占める割合

ウ. HPRT 以外への遺伝子相同組換えに関する検討

HPRT 遺伝子以外のいくつかの遺伝子をターゲットとしてベクターの構築を行った。

② ヒト ES 細胞における相同組換え技術の開発(その2)幹細胞創薬研究所

ア. 技術革新

遺伝子相同組換えは非常に稀にしか起こらない現象であるが、それ以上に、相同組換えを試行した際の細胞の致死率が高いことや、相同組換えが起こったかどうかを判定することに多大な時間と労力を浪費することが、相同組換え体の取得を困難にしている。これらの問題点を克服するため、a. エレクトロポレーションによる遺伝子導入方法の改良と、b. スクリーニングシステムの改善を行なった。

a. エレクトロポレーションによる遺伝子導入方法の改良

ウイルスを使用しない遺伝子導入方法にはエレクトロポレーションとリポフェクションの2つがあるが、遺伝子導入後の相同組換えは、前者の方が遥かに効率良く起こることが知られている。しかし、霊長類 ES 細胞はエレクトロポレーションの電氣的刺激に弱く、従来法では遺伝子導入されたクローンを僅かしか得ることができなかった。この問題を解決するため、エレクトロポレーションに関する種々の条件を検討したところ、遺伝子導入されたクローンを従来法より 10 倍以上多く獲得する条件を見出すことに成功した。

b. スクリーニングシステムの改善

従来のスクリーニングシステムだと、コロニーの出現からファーストスクリーニングまでに 3 週間かかる。このため、スクリーニングまでの培養に多大な労力と費用が必要となり、これがボトルネックとなって、相同組換えのトライアルを数多く行なうことが不可能であった。この問題を解決するため、コロニーをピックアップする際に、そのコロニーの一部からスクリーニングのための PCR に使用しうるゲノム DNA を迅速に抽出する方法を確立した。同時に、コロニーの一部から抽出したゲノム DNA という僅かなテンプレート量でも、長距離の PCR を可能とする方法を確立した。これらの方法を用いることで、これまで 3 週間かかっていたファーストスクリーニングまでの期間を 10 時間にまで大幅に短縮でき、費用面からも、スクリーニングに掛かる費用だけをとっても年間約二千万円と試算されていたものが、多く見積もっても年間約五万円程度で済むようになった。これにより、トライアルを数多く行なうことが可能となった。

イ. HPRT 遺伝子座への相同組換え

アで確立された技術を基盤とし、常にオープンである HPRT 遺伝子座を標的として遺伝子相同組換えを試みた。その結果、ヒト ES 細胞 KhES-1 で 6 クローンの相同組換えを確認し、うち 5 クローンの増幅・保存に成功した(残り 1 クローンは継代時に死亡した)。“事業内容と目標”の中間目標にも記述したように、複数回のトライアルで相同組換えが起こったのならそれは更に望ましいのだが、確認された 6 回の相同組換えは、計 4 回のトライアルで起こったものであり、我々の行なった相同組換えが偶発的なものではないことが示された。相同組換えが起きた確率はヒト ES 細胞 KhES-1 で 1.42% である。この数字は、世界的な状況を鑑みると非常に高い確率だと考えられ、ヒト ES 細胞に対する相同組換えの実用化の目処が立ったといえる。また、2. 1. 1 で樹立さ

れた“加工技術開発に適したヒト ES 細胞株のサブライン”でも 0.89% の組換え効率を達成している。更に、サル ES 細胞 (CMK6) でも 1.34% の相同組換え効率を達成しており、世界で初めてサル ES 細胞への相同組換えに成功した。これらの事例からも、我々の確立した遺伝子相同組換え技術が優れていることが示されたといえる。各々の細胞における相同組換え試験の結果を以下

| に | ES細胞株 | No. of G-418 resistance | No. of homologous recombination | Efficiency(%) |
|---|--------------|-------------------------|---------------------------------|---------------|
| | ヒトES細胞KhES-1 | 424 | 6 | 1.42 |
| | ヒトES細胞サブライン | 336 | 3 | 0.89 |
| | サルES細胞CMK6 | 969 | 13 | 1.34 |

ウ. ベクター構築

ベクター構築は、マウス ES 細胞に対する遺伝子相同組換えと同様の戦略を用いて行なった。即ち、標的とする部位 (HPRT) 近傍のゲノム DNA 配列を両側に持ち、間にセレクションカセットを挟むというものである。セレクションカセットにはネオマイシン耐性カセットを用いた。また、ネオマイシン耐性カセットが外部の影響を受けないようにするため、カセットの両脇に insulator を挿入した。更に、“事業内容と目標”の最終目標で記述したように、HPRT 遺伝子座に望みの遺伝子カセットを置換できるようにするため、ネオマイシン耐性カセットの両側には LoxP を配し、更に下流側の LoxP の下流には、メチオニンを含まないハイグロマイシン耐性遺伝子を挿入している。このベクターが目論見通り HPRT 遺伝子座に相同組換えされれば、その組み換わった部位に望みの遺伝子を置換することができ、且つ置換されたものだけがネオマイシン耐性からハイグロマイシン耐性に変化する(図1参照)。このシステム確立のための基盤となる一連のベクターを構築した。

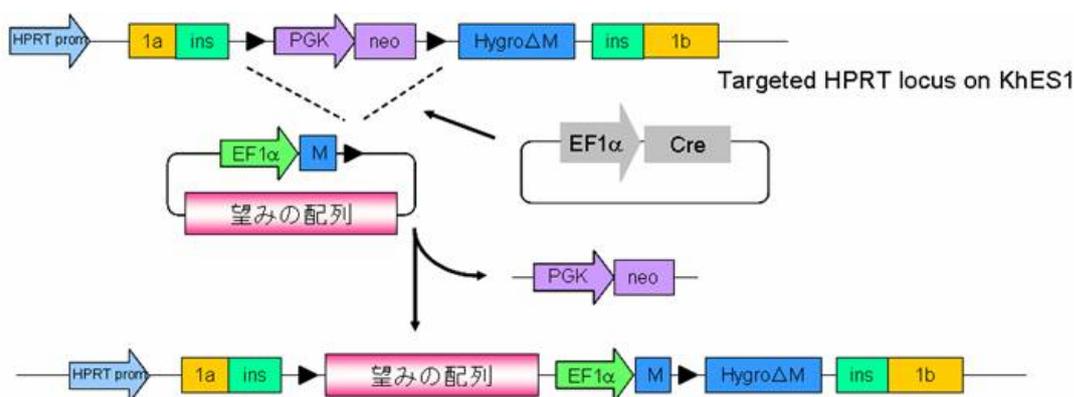


図 1

エ. 遺伝子置換

項目ウで作製したベクターを用いて、高効率で HPRT 遺伝子座に好みの遺伝子を挿入する遺伝子置換の技術を確認した。詳細は、Nucleic Acids Research, doi:10.1093/nar/gkp1234 に記載されている通りだが、図1中の“望みの配列”に CAG-EGFP 配列を用いた場合、出現したハイグロマイシン耐性クローンを 186 クローン調べたところ、186 全てのクローンが EGFP の蛍光を発していた。同時に、そのうち 80 クローンについてネオマイシン耐性を失っているか調べたところ、80

全てのクローンがネオマイシン耐性を失っていた。このことから、遺伝子置換を起こしたクローンを100%という高い効率でセクションすることができ、且つ、この方法で HPRT 遺伝子座に挿入された遺伝子はサイレンシングを受けにくいことが分かった。また、この細胞を神経に分化させた場合でも EGFP の発現が維持されることも明らかとなっている。

更に、遺伝子置換を応用して、誘導的遺伝子発現システムである Tet-On システムを HPRT 遺伝子座単独で機能させることにも成功した。Tet-On システムには、rtTA 発現カセットと、TRE プロモーター支配下の ORF 配列が必要だが、これら2つをまとめて環状のプラスミドに搭載することで、HPRT 遺伝子座単独での Tet-On システムを構築した。

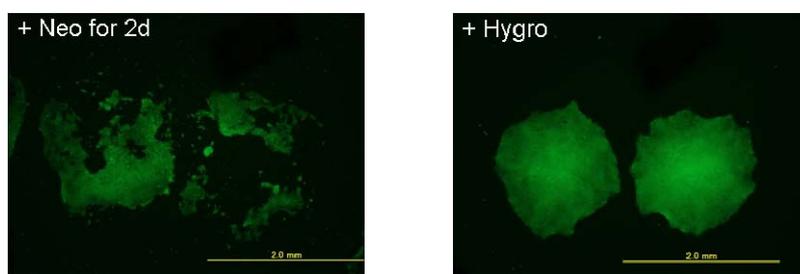


図 2

オ. HB9 遺伝子座への相同組換え

HB9 遺伝子は、運動神経特異的に発現する転写因子であり、運動神経マーカーとして一般的に知られている。HB9 遺伝子座は ES 細胞ではクローズドであるため、ここへの相同組換えは困難が予想されたが、本研究により、HB9 遺伝子座に対して EGFP をノックインした細胞株を取得した。ノックインのためのコンストラクトは HPRT 遺伝子座への相同組換えで用いたのと同様の戦略で、ターゲティングアームのみを替えて作製し、エレクトロポレーション後はネオマイシンとガンシクロビルとのダブルセクションで相同組換え体を得た。ジェノタイプングを行なった 136 クローンのうち、5 クローンについて相同組換えが確認され、3.68%の効率で相同組換え体をセクションすることができた。この成果により、運動神経を濃縮することが可能になると考えられ、神経変性疾患の治療薬開発を加速できると期待される。

③ ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その3) 埼玉医科大学

ア. ヘルパー依存型アデノウイルスベクター

はじめに、相同組換え技術を確立するためのモデル実験として、HPRT 遺伝子座ノックアウトカセットを組み込んだヘルパー依存型アデノウイルスベクターを作製し、ベクターをカニクイザル ES 細胞(CMK6)に感染させたところ、至適条件下では 3 個のネオマイシン耐性コロニーのうち 1 個が相同組換えにより HPRT が欠損した細胞であることを、6-チオグアニン耐性とサザンブロット法により確認した。このクローンが ES 細胞の未分化性を維持していることを、種々の未分化特異的マーカー遺伝子の発現で確認し、ヘルパー依存型アデノウイルスベクター感染により ES 細胞の本来持つ性質に影響を及ぼさない事を示し、中間目標を達成した。平成 19 年度以降には、カニクイザル ES 細胞での知見をヒトに応用するため、ヒト HPRT 遺伝子座ノックアウトカセットとネガティ

ブ選択マーカーHSV *tk* 遺伝子を組み込んだヘルパー依存型アデノウイルスベクターを作製し、ヒト ES 細胞を用いて同様の実験を行った。KhES-1 サブライン株を用いた実験では、ネオマイシン/ガンシクロビル二重耐性コロニー中最大 45%もの高効率(細胞あたり 2.7×10^{-6})で相同組換え体が得られた。ベクターDNA を感染ではなくエレクトロポレーションで細胞に導入した時と比較し、細胞当たりの相同組換え効率は約 300 倍近く高かった。また、KhES-3 から相同組換え体を得られ、複数の細胞株において応用可能であることを示した。これらの研究成果は国際誌 Proceedings of the National Academy of Sciences 105: 13781–13786 (2008) に掲載された。

次に、これまで確立した高効率相同組換え技術を用いて、*HPRT* 遺伝子座以外の分化特異的に発現する遺伝子座にヘルパー依存型アデノウイルスベクターを利用した相同組換えにより蛍光遺伝子を挿入する応用実験を進めた。具体的には熊本大学との共同研究で、肝細胞で特異的に発現するヒトアルブミン (*ALB*) 遺伝子座に蛍光遺伝子 mKO1 を組み込んだヒト ES 細胞株 (KhES-3 株)の樹立を、幹細胞創薬研究所との共同研究で、運動神経細胞で特異的に発現するヒト *HB9* 遺伝子座に蛍光遺伝子 EGFP を組み込んだヒト ES 細胞株を樹立する。これらのノックイン ES 細胞では特定細胞への分化を蛍光で容易にモニターできるため、分化誘導の条件検討に最適なアッセイ細胞の作製を試みた。ヒト *ALB* 遺伝子座ノックインカセットもしくはヒト *HB9* 遺伝子座ノックインカセットと HSV *tk* を組み込んだヘルパー依存型アデノウイルスベクターを作製し、KhES-3 に感染させたところ、ネオマイシン/ガンシクロビル二重耐性コロニー中それぞれ 90%、57%もの高効率で相同組換え体を得られた。この結果から、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いた相同組換えは ES 細胞では発現していない遺伝子座でも高効率で起こり、このベクターが様々な遺伝子座の相同組換えに応用可能であることが示唆され、最終目標を達成した。さらに、ヒト iPS 細胞でも同様の効率で相同組換え体を得られたため、本プロジェクトでの研究成果がそのまま今後ヒト iPS 細胞を用いた研究へと応用可能である事が示唆された。

これらの樹立した分化誘導アッセイ用ヒト ES 細胞について、未分化性・多分化能など ES 細胞としての基本的性質の維持を確認し、ヒト ES 細胞分配機関である京都大学に樹立した細胞株を寄託した。

イ. アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター

カニクイザル *HPRT* 遺伝子座ノックアウトカセットをコードしたベクターを網羅的に比較した。その結果、 1.5×10^6 個の感染細胞あたり 1 個(細胞あたり 6.7×10^{-7})の頻度で相同組換え体を得て、中間目標を達成した。

ヒト ES 細胞 (KhES-1 サブライン) の *HPRT* 遺伝子座に対しても、同様のノックアウトカセットを持つベクターを用いて、 5.8×10^6 個の感染細胞あたり 1 個(細胞あたり 1.7×10^{-7})の頻度で相同組換えを得た。また、KhES-3 株やヒト iPS 細胞からもほぼ同様の効率(染色体組み込みあたり約 1%、細胞あたり 5.3×10^{-7} ~ 7.0×10^{-6})で相同組換え体を得られ、複数の細胞株において応用可能であることを示した。

次に、AAV を用いた相同組換え技術を更に改良し染色体組み込み当たりの効率を上げるため、*HPRT* 遺伝子座以外の ES 細胞で高発現している *NANOG* 遺伝子座に遺伝子が本来持つプロ

モーターを活用する『プロモータートラップ法』を利用した相同組換えによりネオマイシン耐性遺伝子を挿入する相同組換え実験を行なった。この結果、KhES-3 株の *NANOG* 遺伝子座に対して、染色体組み込みあたり 20%~87%の高効率で相同組換えに成功し、ES 細胞で発現している遺伝子座における相同組換えには AAV ベクターが非常に有効である事を示した。これらの研究成果は国際誌 *Biochemical and Biophysical Research Communications* 388: 711-717 (2009) に掲載された。

ウ. レンチウイルスベクター

細胞に感染するが染色体へ組み込まれない変異型レンチウイルスベクターにカニクイザル *HPRT* 遺伝子座ノックアウトカセットを組み込み、相同組換えの効率を検討した。その結果、 1.8×10^6 個の感染細胞あたり 1 個(細胞あたり 5.5×10^{-7})の頻度で相同組換えを得て、中間目標を達成した。

ヒト ES 細胞 (KhES-1 サブライン) の *HPRT* 遺伝子座に対しても、同様のノックアウトカセットを持つベクターを用いて実験を行なったが、相同組換え体は得られなかったため、更なる改良が必要である事が示唆された。

(4) 目標の達成度と意義

① ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その1) 京都大学

本事業項目において、京都大学では従来方法の踏襲とその発展的なアプローチにより、ヒトES細胞での相同組換え相同組換え技術を進めてきた。その中でヒトES細胞に適したポジティブ選択用の遺伝子発現カセットとネガティブ選択用のカセットを同定することができた。これらをもとに *HPRT* の遺伝子での相同組換え用のベクターの構築に成功した。

また、ヒトES細胞の未分化維持に不可欠な遺伝子のクローニングを行い、相同組換えベクターを作成中である。目標達成についてはほぼ計画通りであるが、中間評価時点で幹細胞創薬研究所及び埼玉医科大学は、現在までに偶然以外ではほとんど不可能と考えられていた霊長類ES細胞での相同組換えに成功したことから、リポフェクションを使って遺伝子相同組換え技術のさらなる開発を目指すのではなく、幹細胞創薬研究所あるいは埼玉医科大で開発された技術を京都大学でも導入し、さらなる技術開発を目指すという計画の変更を行った。実際、独自に工夫をすることで、より効率が上がり、複数のヒトES細胞で達成されただけでなく、ヒトiPS細胞においても遺伝子相同組換えが可能であることを示した。ヒトiPS細胞はヒトES細胞とよく似た性質を持つことが知られており、我々が培ってきたノウハウがヒトiPS細胞にそのまま適用できるということを示すことができた。

② ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その2) 幹細胞創薬研究所

計画通り終了した。当事業項目は、世界中の多くの研究者やグループがチャレンジしては失敗を繰り返し、結局為しえていなかったヒトES細胞への相同組換えにチャレンジし、相同組換えに成功すれば計画通り、成功しなければ計画を下回ったという位置付けになる。*HPRT* 遺伝子座への

相同組換え、遺伝子置換と、遺伝子置換を応用した単一遺伝子座におけるTet-Onシステムの構築に成功しただけでなく、ES細胞でクローズドなHB9遺伝子座への相同組換えにも成功した。

③ ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その3) 埼玉医科大学

試したすべてのウイルスベクターで相同組換えを達成し、少ない細胞数又は多様な細胞種で相同組換えを得るための基盤を確立し、平成19年度の間目標を計画通りに達成した。

特に、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターは1) 最も相同組換え効率が高い。2) 大きなDNAを導入可能であり、マーカー遺伝子のノックインなど、複雑なカセットを用いた相同組換えに適している。といった特徴を持つ事から、実際にこのベクターを用いて、ES細胞で発現しておらず、肝細胞で特異的に発現するALB遺伝子座に蛍光遺伝子mKO1のノックインと、運動神経細胞で特異的に発現するヒトHB9遺伝子座に蛍光遺伝子EGFPのノックインとに高効率で成功した(染色体組み込みあたり57%~90%)。これらのノックインヒトES細胞は、特定細胞への分化を蛍光で容易にモニターできるため、分化誘導の条件検討に最適なアッセイ細胞の創製に成功し、予定通り最終目標を達成できた。今後これらの樹立したノックインヒトES細胞を分配する事で、様々な使用機関でヒトES細胞からの肝細胞や運動神経細胞の誘導条件の検討を容易に行なえるようになる。また、本研究で確立した、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いた分化特異的遺伝子座へのマーカー遺伝子のノックイン技術を用いる事で、様々な分化誘導アッセイ細胞の創製が可能となり、ヒトES及びヒトiPS細胞を用いた分化誘導技術の開発へ大きく貢献できると思われる。

一方、ES細胞で発現している遺伝子座への相同組換えに対しては、作製が容易であるAAVベクターが非常に有効である事を示し、相同組換えの目的に応じて使用するウイルスベクターの種類を選択できる事が示唆された。

2. 1. 3 ヒトES細胞における RNA 干渉法による遺伝子発現制御技術の開発

京都大学

(1) 事業目的と背景

京都大学再生医科学研究所の山下潤助教授(現・准教授)のグループは、すでにマウス ES 細胞を用いて RNA 干渉法による遺伝子発現抑制技術の開発を平成 17 年度より開始している。テトラサイクリン誘導性 short hair-pin RNA (shRNA)発現系を用いて、ES 細胞分化途上の任意の段階において標的遺伝子の発現抑制を起こすことにすでに成功している。また、cre-loxP システムを導入して、簡便に標的 shRNA を変換できるシステムの開発を開始している。これをヒト ES 細胞に適用して方法を最適化し確立するための研究を行う。これによって、多数の内在遺伝子発現の抑制を網羅的に実施して解析することが可能になる。

(2) 事業内容と目標

平成 19 年度まで: 基本的技術を確立する。すなわち、細胞分化途上で遺伝子発現抑制(サイ

レンシング)を受けない部位への遺伝子導入ヒト ES 細胞株(テトラサイクリン誘導性発現制御遺伝子および shRNA 遺伝子発現株)の作製、Cre-loxP 手法によるタモキシフェン誘導性 shRNA 発現システムの作製、およびヒト ES 細胞分化途上における shRNA 発現とその効果の評価システム構築を行う。これらにより、ヒト ES 細胞分化過程においても簡便に遺伝子機能解析が可能な遺伝子発現制御システムを構築する。

平成 21 年度まで:さらに、遺伝子発現抑制と促進の両方を独立して制御可能なシステムを構築し、多彩な遺伝子発現制御により分化における遺伝子機能評価と新たな分化誘導法への応用を可能とすることを試みる。上記タモキシフェン誘導性 shRNA 発現システムとテトラサイクリン誘導性 cDNA 発現システムを組み合わせたノックダウン-レスキューシステムを新たに構築する。このように構築した RNA 干渉システムを用いて神経、心筋、肝細胞等の分化における機能遺伝子を複数同定する解析手法を開発し、創薬ターゲットの探索など創薬研究技術として確立する。

(3)研究成果

①テトラサイクリン誘導性 shRNA 発現 ES 細胞システムの構築

ア. 効果的に shRNA を発現し標的遺伝子発現を抑制するために以下の種々の方法を組み合わせ、ES 細胞分化における最適条件の shRNA 発現システムの構築を行った。

- ・ shRNA 発現プロモーター:テトラサイクリン制御性配列 tetO を有する U6 プロモーター及び tRNA バリンプロモーター
⇒ tRNA バリンプロモーターの方が、shRNA 発現活性がやや高かった。
- ・ shRNA 発現プラスミドの ES 細胞への導入:電気穿孔法による多コピーの導入及びマウス ROSA 領域への相同組換えによる単一コピーの導入
⇒ ROSA 領域への単一コピーの導入では、shRNA による遺伝子発現抑制効果が不十分であった。電気穿孔法による多コピー導入法が遺伝子発現抑制効果に優れていた。
- ・ 遺伝子サイレンシングの抑制:サイレンシングを受けないとされる ROSA 領域への導入、及びサイレンシング抑制効果を有するとされるインスレーター配列で shRNA 発現ベクターを両側からはさむ
⇒ ROSA 領域への導入により shRNA の効果が減弱。インスレーター配列導入により shRNA の効果が減弱。サイレンシングを確実に抑制するのは困難であった。ただし、単純な電気穿孔法による導入でも全くサイレンシングを認めず正常に働く細胞株もあったのでそのような細胞株を選択することで問題回避可能と考えられる。
- ・ テトラサイクリン制御性タンパクの導入:テトラサイクリンの添加により shRNA 発現を誘導するテトラサイクリン制御性タンパク(tTS)を ROSA 領域に導入した。安定したテトラサイクリンによる制御が可能であった。

上記の検討により、「tRNA プロモーターによる shRNA 発現」、「電気穿孔法による多コピーの shRNA ベクターの導入」、「ROSA 領域への tTS 導入」の3者併用により効率的 shRNA の発現が可能と考えられた。

イ. ES 細胞分化途上における shRNA 発現による特異的遺伝子発現抑制

ア. において構築したシステムを用いて、ES 細胞分化途上において標的とした遺伝子の特異的発現抑制を試みた。中胚葉細胞マーカーである VEGFR2 (2型血管内皮増殖因子受容体) 及び血管内皮マーカーVE-カドヘリンの特異的発現抑制に成功した。

ウ. ES 細胞分化途上における shRNA 発現による ES 細胞分化方向の制御

イ.において構築したシステムを用いて、血管内皮細胞分化に必須である VEGFR2 遺伝子の発現を中胚葉段階において誘導性に shRNA により発現抑制したところ、血管内皮細胞分化を抑制することに成功した。shRNA を誘導性に発現させることにより、細胞分化の運命を制御できることが可能となった(Hiraoka-Kanie, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006)。

②Cre-loxP システムを用いた新しいタモキシフェン誘導性 shRNA 発現システムの構築

ROSA 領域にエストロゲン受容体(ER)と遺伝子組換えタンパク Cre の融合タンパク遺伝子(ER-Cre)を導入し、恒常的に ER-Cre を発現する細胞株を構築する。同細胞に loxP 配列には含まれた shRNA 発現ベクターを導入することにより、ER のリガンドであるタモキシフェン投与すると ER-Cre が核内に移行し loxP 配列を組換えることにより、誘導性に shRNA を発現させる新しいシステムを構築している。タモキシフェン誘導性に VEGFR2 遺伝子発現を選択的に抑制することに成功している。さらにマウス ES 細胞の心筋分化過程において発現が上昇する遺伝子群に対する shRNA を同システムを用いて発現させることにより、心筋分化が抑制できる予備的結果を得ている。

③テトラサイクリン誘導性 cDNA 発現(Tet-OFF)ES 細胞システムの構築

サイレンシングを受けないとされるマウス ROSA 遺伝子座に、テトラサイクリン制御性遺伝子 (tTA)、及びテトラサイクリン制御性プロモーター下に標的遺伝子 cDNA をつないだベクターを導入することにより、テトラサイクリン誘導性に標的遺伝子 cDNA を ES 細胞分化途上において発現させるシステムを構築した。同システムを用いて ES 細胞分化途上(中胚葉段階)において活性型 Protein kinase A (PKA)をテトラサイクリン誘導性に発現させることにより、PKA が VEGF 受容体の発現調節を介して内皮細胞分化を制御していることを明らかにした。従来の 1/10 量の VEGF により内皮細胞を分化誘導することに成功した(Yamamizu, *Blood*, 2009)。さらに同様に活性型 β -catenin を発現させるシステムを用いて、内皮細胞の動脈化が Notch と β -catenin の協調的作用により誘導されることを明らかにした(Yamamizu, *J Cell Biol*, in press)。このように本システムの有用性は確立された。

④新しい ES 細胞における誘導性ノックダウンレスキューシステムの構築

②③のシステムを組み合わせることにより、ES 細胞分化の任意の段階において、特定の遺伝子発現抑制と過剰発現を誘導することができる新しい機能解析システム、誘導性ノックダウンレスキューシステムを構築している。②で構築した細胞の ROSA 領域に FRT 配列を導入し、ROSA 領域にテトラサイクリン誘導性 cDNA を追加導入できるシステムを構築した。この FRT 配列部分にタモキシフェン誘導性 GFP 遺伝子を導入し、誘導性に GFP を発現させる予備的実験にすでに成功している。

⑤ヒト ES 細胞におけるノックダウン-レスキューシステムの構築

現在マウスにおいて最も効率的に遺伝子発現制御を行えるシステムを構築中であり、同システムが確立した上でヒト ES 細胞への導入を検討する。ヒト ES 細胞培養はすでに開始し、血管細胞及び心筋細胞の分化誘導にすでに成功している。

(4) 目標の達成度と意義

①テトラサイクリン誘導性 shRNA 発現 ES 細胞システムの構築

マウス ES 細胞において、テトラサイクリン誘導性 shRNA 発現 ES 細胞システムを構築することに計画通りに成功した。実際に ES 細胞分化方向を制御できることを明らかにし、本方法の有用性を示すことも計画通り行うことができた。

②Cre-loxP システムを用いた新しいタモキシフェン誘導性 shRNA 発現システムの構築

①とは別の新しい制御性 shRNA 発現システムもほぼ予定通り構築することに成功した。②を新たに構築したことにより、③④の新しい遺伝子発現制御システム開発を行うことができた点は当初計画を上回る成果と考えられる。

③テトラサイクリン誘導性 cDNA 発現(Tet-OFF)ES 細胞システムの構築

④新しい ES 細胞における誘導性ノックダウン-レスキューシステムの構築

上記は当初計画にはなかったが、より有効な遺伝子発現制御技術開発に有用であると考え研究を進めた。これにより、loss-of-function、gain-of-function の両面を恣意的に制御しながら組み合わせ、簡便かつ効率的に標的遺伝子の分化における機能的意義の検討が可能となる。実際テトラサイクリン誘導性 cDNA 発現 ES 細胞システムを用いた検討により、ES 細胞分化における新たな知見を見出し、論文を 2 報完成するに至っており(Yamamizu, **Blood**, 2009; Yamamizu, **J Cell Biol**, in press)、本方法の高い有用性を示すことに成功した。さらに ROSA 領域に FRT 配列を挿入し Flip-In 組換えシステムを用いてレスキューcDNA を導入できる ES 細胞を構築した。同 ES 細胞を用いて分化途上における種々の遺伝子の発現制御を行い、実際に ES 細胞分化を制御できるかの確認を開始している。ヒト ES 細胞に導入した場合、その機能解析や目的細胞の分化誘導などにおいてとりうる戦略は飛躍的に増大すると考えられ、その意義は非常に大きい。

⑤ヒト ES 細胞におけるノックダウン-レスキューシステムの構築

③④により、新しいより効率的な ES 細胞における遺伝子発現制御システムの可能性が見出されたため、ヒト ES 細胞における shRNA 発現システムの構築は現段階では見合わせている。③④で確立されたシステムをヒト ES 細胞に導入することにより、当初計画よりも柔軟性と応用範囲の広いヒト ES 細胞遺伝子発現制御システムの構築が期待される。

2. 2 研究開発項目②「ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発」

2. 2. 1 ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発

幹細胞創薬研究所

(1) 事業目的と背景

マウスやサル ES 細胞から各種の神経系細胞への分化誘導研究は国内外の研究室で、発生分化の基礎的研究や再生医療の細胞治療の目的として主に行われている。これらの分野ではマウス ES 細胞を用いた研究がもっとも進んでいるが、ヒト ES 細胞が樹立されてきて以来、現在ヒト ES 細胞からの分化誘導研究も国外では盛んに行われている。

ES 細胞から様々な神経系細胞への分化誘導方法は、大きく 2 つのタイプに分けることができる。一つは、ES 細胞から胚様体 (Embryoid body; EB) を形成させ、神経系細胞へと分化させる方法である。EB 内で内胚葉、中胚葉、外胚葉のそれぞれの細胞へ分化できる細胞が生じるが、外来因子の刺激により神経系細胞への分化と増幅を誘導し、神経分化細胞を得ることが出来る。二つめの方法は EB 形成を行わず、単層培養の ES 細胞に対し主に神経幹細胞・神経前駆細胞への神経誘導を行う方法で、この方法は他の細胞との共培養系と ES 細胞だけの培養系に分けることができる。具体的には、共培養系では ES 細胞を他生物由来のストローマ細胞上で培養し、未同定要因によって神経誘導させる方法であり、ES 細胞だけを培養する系では、既知の外来因子を細胞に作用させ分化誘導させる方法である。

ヒト ES 細胞の分化誘導では、マウス ES 細胞で確立された誘導方法を応用する機会が多いが、種の違いのせいか、そのままマウス ES 細胞の方法をヒト ES 細胞に適用することは難しく、神経誘導に要する培養日数、培養液など様々な条件を検討しなければならない。また、ヒト ES 細胞由来の神経系細胞を得ることが出来ても、その誘導効率はマウス ES 細胞の効率と比べると低いとされる報告もあり、ヒト ES 細胞の分化誘導効率をより高める技術開発が不可欠である。

また、既に報告されているヒト ES 細胞の分化誘導方法が、すべてのヒト ES 細胞株に適用できるわけではない。なぜなら、既存のヒト ES 細胞株は、同じ ES 細胞と称しているが互いに性格が異なっているためである。その違いは ES 細胞樹立時の培養条件等に起因しているのかもしれないが、遺伝的バックグラウンド (ゲノム DNA の塩基配列の違い) による違いもあると考えられる。

本事業では、創薬研究に利用できる研究用モデル細胞を、京都大学で樹立されたサル ES 細胞と日本人由来のヒト ES 細胞から創製することを目指しており、そのモデル細胞の一つとして、神経変性疾患モデル細胞を構築する。そのために必要とされる神経細胞を得るために、サルやヒト ES 細胞を様々な神経系細胞 (神経幹細胞・神経前駆細胞、運動神経細胞など) へ効率よく分化誘導させる基盤技術の確立を目指す。

(2) 事業内容と目標

神経系細胞には、形態的にも機能的にも異なった多くの種類が存在するといわれている。そして、例えば生理的機能が異なる二つの神経細胞では、互いに遺伝子やタンパク質の発現プロファイルが異なっていると考えられる。このことは、異なった機能をもつ神経細胞は外来因子に対し、違った反応性を示すであろうことは容易に考え得る。神経変性疾患では、それぞれの疾患で症状の現れる神経細胞の種類が異なっていることが知られている。よって、より良い神経変性疾患モ

デル細胞を構築するためには、目的とする疾患にあわせた神経細胞を ES 細胞から分化させる系を確立する必要がある。本プロジェクトでは、神経変性疾患として、アルツハイマー病(AD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、そしてハンチントン病(HD)の 3 疾患の研究用モデル細胞を創製しようとしているため、神経分化誘導の技術開発においては、AD と HD に対しは脳の神経細胞を、ALS では運動神経細胞を ES 細胞から分化させる系を確立することを目指す。

そのために、中間報告までには既に報告されている神経分化誘導法が京都大学で樹立されたサル ES 細胞(CMK6)と日本人由来の ES 細胞株(KhES-1)に適用可能かどうかを検討し、神経幹細胞・神経前駆細胞や分化神経細胞などの神経系細胞を得ることが出来る神経分化誘導方法を確立することを中間目標とした。その際、モデル細胞創製の目的(遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価、創薬研究の効率化)を考慮し、分化誘導過程において他生物細胞の混入を伴う共培養は行わない分化誘導技術の開発を目指した。そして、二つのタイプの分化誘導方法である、「EB を介した神経系細胞への分化誘導」と「ES 細胞だけの単層培養による神経前駆細胞への分化誘導」でもって神経分化誘導技術の開発を進めていった。

中間報告以後は、二つに分かれていた神経分化誘導方法のやり方、神経幹細胞までの神経分化誘導方法を統一し、そこから必要とされる因子を用いて目的神経細胞への分化誘導を行った。

(3) 研究成果

①-ア. ES 細胞から胚様体を介した運動神経細胞への分化誘導

EB を利用する分化誘導方法は、これまで多くの研究者によって行われており、研究結果も多数報告されている。京都大学から ES 細胞培養のための基礎的な培養技術(未分化維持、継代、凍結保存方法等)の移転を受けた際、分化誘導技術では必須技術にあたる EB の形成方法を、メソッド集には記載されないような細かい点を含め取得した。その後、これまでに既に発表されている方法が、サル ES 細胞(CMK6)と日本人由来のヒト ES 細胞(KhES-1)に適用可能かどうか調べてみた。まず、Zhang 研究室(米国 University of Wisconsin-Madison)で開発された方法を試みた。彼らの方法は未分化なヒト ES 細胞(使用株;H1 と H9 株)から EB を形成させ、培養 4 日目の EB をディッシュに接着させた後、神経前駆細胞へと分化させ、その後、様々な既知因子を添加することによって、ドーパミン産生神経細胞や運動神経細胞へと分化誘導させる方法である。運動神経細胞への分化誘導方法をサル ES 細胞(CMK6)とヒト ES 細胞(KhES-1)に対し適用したところ、用いた ES 細胞株の性質の違いの為か、EB のディッシュへの接着性や分化過程で観察された細胞コロニーの状態が報告されているような経過を CMK6、KhES-1 共にたどらなかった。まず EB のディッシュへの未接着性はマトリゲルを用いることで解決した。さらに彼らの報告では、接着後、コロニーの中心部にロゼッタと呼ばれる神経前駆細胞へと分化した細胞群が形成されてくるとされたが、CMK6 と KhES-1 では同じようなコロニー形態にならなかった。しかし、コロニーの周辺部に神経前駆細胞(PAX6 陽性及びロゼッタ形態)への分化は認められ、さらに、低濃度のプロテアーゼでコロニーを処理することによって、ロゼッタ構造が高頻度で得られることを見いだした。その後、彼らの方法に従い運動神経細胞への誘導を行なった。多数の β III-tubulin 陽性神経細胞を得る

ことには成功したが、運動神経細胞特異的な遺伝子マーカー(HB9)陽性の運動神経細胞への分化程度は良くなかった。彼らの方法では、運動神経細胞へと分化させる誘導因子の処理時期が重要であるとされている。しかし、CMK6 と KhES-1 には、H1 と H9 で示された処理時期が合致していなかったようである。これらの結果で示されたコロニー形態の違いや誘導因子の反応性の違いなどは事業背景の項で記述したヒト ES 細胞株間の性格の相違の実例を端的に表しているが、KhES-1 に適した方法にするためには、更なる条件検討が必要である。

次に Jessell 研究室(米国 Columbia University)の方法を試みた。彼らの方法は EB 形成後、外来因子による処理を EB に対し行い、運動神経細胞へと分化させる方法である。しかし、マウス ES 細胞を用いた分化誘導方法であるため、サル及びヒト ES 細胞に適用させるには培養条件等の検討が必要であった。ES 細胞を運動神経細胞へと分化させるためには、分化誘導途中でレチノイン酸による処理が必要であるが、マウス ES 細胞での方法を適用し培養初期の EB にレチノイン酸処理を行うと、EB の急激な死滅を引き起こすことを見いだした。EB の死滅を起こさないようにする条件検討を行った結果、EB を 12 日から 14 日間以上培養する必要があることを明らかにした。そして、レチノイン酸処理に続くソニックヘッジホッグ処理により、運動神経細胞特異的な遺伝子マーカー(HB9)を発現する分化細胞をサル ES 細胞で 7-25%(平均 17%)の頻度で得ることに成功し(Fig.1)、またヒト ES 細胞 KhES-1 からも同様に分化誘導に成功している。

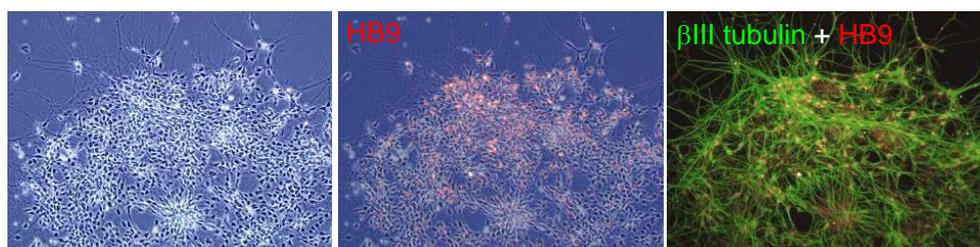


Fig.1 サル ES 細胞から運動神経細胞への分化誘導

サルとヒト ES 細胞に対し行った今回の方法では、運動神経細胞を得るまでに 5 週間という長期の培養を要する。また、分化効率も既に報告されている頻度(20-30%)に比べて、それほど高くない。そこで分化誘導時間短縮と分化効率向上のために、培養液や培養日数などの検討を行った。EB 内では神経系細胞以外の細胞も分化してくる。そのため分化効率を上げる一つの方法は EB 内部で非神経細胞への分化を抑制することである。EB の培養や分化誘導には ES 細胞培養培地(ES 培地)を用いていたが、非神経細胞への分化抑制を期待し、ES 培地から神経誘導用無血清培地に代えた。組成の異なる3種類の神経誘導培地(N2 培地、N2(2:1)培地、N2B27 培地)を用意した。EB を形成させる際、初めから神経誘導培地を用いた場合、多くの細胞が EB を形成できないことが分かったため、まず 4 日間 ES 培地で EB を形成させ、その後神経誘導培地に代えた。N2 培地では培養中一部 EB の死滅が起きてくるが、それ以外の神経誘導培地では EB は順調に増殖した。さらに長期培養を行っていくと、N2 培地、N2(2:1)培地では、EB のディッシュへの接着が認められてくるが、N2B27 培地では認められなかった。これらのことは培地による違いが明ら

かに細胞分化へ影響していることを示している。次にレチノイン酸に対する反応性に変化が起きているのか確かめた。レチノイン酸による EB の細胞死を起こさせない様にするには、ES 培地培養の EB では 14 日間以上要するのに対し、N2B27 培地を用いると 10 日間に短縮させることに成功した(Fig.2)。

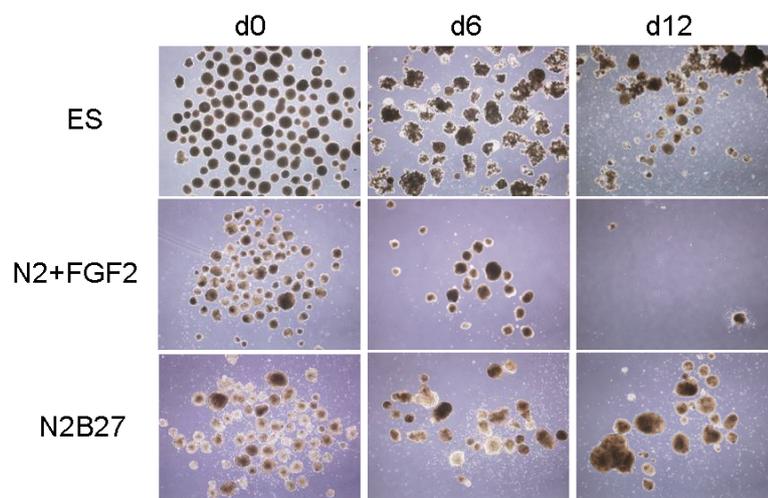


Fig.2 神経誘導培地で培養された KhES-1EB のレチノイン酸への反応性
4 日間培養した EB をその後 ES 培地、無血清培地(N2 培地と N2B27 培地)で 6 日間培養後、レチノイン酸を添加、添加直後(d0)、6 日後(d6)、12 日後(d12)の EB。

よって分化誘導時間の短縮が、ES 培地でなく神経誘導培地を用いることで僅かであるが可能になった。今後、他の各ステップでの詳細な条件検討を行う。また、神経誘導培地を用いているので運動神経細胞分化誘導で分化頻度向上が期待できると思われる。事実、原始内胚葉のマーカ遺伝子の発現を抑えることに成功している。さらに、マウス ES 細胞を用いた系では 10-20 ボルトの低電圧刺激が EB からの神経細胞分化誘導を有意に上昇させるとの報告があり、サル ES 細胞の EB を用いた場合は、30-40 ボルトで刺激したところ、無刺激および 10-20 ボルト処理培養と比べ、わずかながら Nestin 陽性神経幹細胞の増加が認められ、今後ヒト ES 細胞にも効果があるのか検討する。

①-I. ES 細胞から胚様体を介した大脳神経細胞への分化誘導

マウス ES 細胞から大脳神経細胞(錐体細胞)への分化誘導方法が報告されている。そこでヒト ES 細胞から大脳神経細胞の誘導にその方法が有効かどうか調べた。レチノイン酸処理を施す方法であるため、上記のように EB の長期培養が必要であった。結果としては、マウス ES 細胞を用いた場合、ほぼ均一な神経細胞(β III-tubulin、Tau 二重陽性)が得られるとされるのに対し、ヒト ES 細胞では、細胞形態と免疫染色の反応性の違いから少なくとも 3 種類の細胞(β III-tubulin 陽性、GFAP 陽性、両抗原陰性)に分化していたことが明らかになった。両抗原陰性細胞は大脳の発生過程で生じてくる神経細胞であるかもしれないが今の段階では不明である。今後は詳細な分化誘導の条件検討を行い、また生じてきた神経細胞の特徴付けを行う。

マウス ES 細胞の手法をヒト ES 細胞に適応させた場合、運動神経細胞への分化には培養条件を変えることで神経分化誘導に成功したが、大脳神経細胞への分化には単純には適応できず、得られた結果も異なったものであった。このことはマウス ES 細胞を用いた方法がヒト ES 細胞に容易に適用できない場合があることを明白に示している。

その後の研究において、後述の単層培養による分化誘導がより効率よく神経誘導が可能なことが判明したため、中間評価以降は EB を介した分化誘導方法は中止した。

②-ア. ES 細胞の単層培養による神経前駆細胞への分化誘導

EB を用いて、様々な神経細胞の分化方法が報告されてきているが、EB 内では非神経細胞の分化もあり、また外来因子が EB 内部にまで作用しないという欠点がある。その欠点を避けるために細胞に外来因子を均一に作用させることが可能である単層培養による分化誘導法を試みた。

マウス ES 細胞を単層培養で N2B27 培地を用い神経前駆細胞に分化させる方法が報告されていたが、その N2B27 培地を用いてサル ES 細胞を単に培養しても、上記のように種間差の為か神経細胞へ分化することはなく、多くの細胞は非神経細胞へと分化する。そこで、神経発生において非常に重要な働きをしている BMP シグナル伝達系の阻害因子であるノギンに注目した。本プロジェクトの一年目の 2005 年に、ノギンを用いてヒト ES 細胞(H1 と H7 株)を神経前駆細胞に分化誘導させた方法が報告された。そこでサル ES 細胞(CMK6)及びヒト ES 細胞(KhES-1)の神経分化誘導へのノギンの効果を調べた。

サル ES 細胞の場合、N2B27 培地へのノギンの添加によって、単層培養しているサル ES 細胞のほぼすべてを nestin 陽性神経前駆細胞に分化させることに成功した。その際、ES 細胞塊を 40-70 μm のサイズに揃えることにより、より均一な分化誘導が可能となることを見いだした。さらにこのノギン神経分化誘導法で得られた神経前駆細胞は凍結保存を行っても、若干の細胞死が観察されたが、細胞の増殖および神経細胞への分化能が損なわれていないことも確認した。このように神経分化誘導を未分化な ES 細胞から開始しなくてもよいことが判明し、通常一ヶ月ほど分化誘導にかかる時間を短縮できることが期待できる。さらに、各ステップで均一な細胞ストックを作製することで繰り返しの条件検討が可能となる。

サル ES 細胞での結果を踏まえ、ヒト ES 細胞(KhES-1)に対してもノギンに神経前駆細胞への分化誘導効果があるかどうかを確かめた。その結果サル ES 細胞の場合と異なり、未分化な細胞(Oct3/4 陽性)が残ったが、さらに培養を続けると、約 35%の割合で β III-tubulin 陽性の神経細胞へ分化誘導させることが出来た(Fig.3)。分化効率を向上させるために、ノギンと共に Dkk1(Wnt シグナル伝達系の阻害因子)と LeftyA(Nodal シグナル伝達系の阻害因子)を添加したところ、未分化な ES 細胞数が減少し、さらに β III-tubulin 陽性神経細胞への分化効率を約 70%まで向上させることに成功した(Fig.3)。さらに神経細胞数も約 5 倍に増加させることが出来た。LeftyA の代わりに Nodal シグナル伝達系の化学阻害剤でも、同様な効果があることも明らかにした。一方、bFGF のノギン神経誘導系への添加は、神経細胞の分化頻度を約 5%までに下げる結果になり、bFGF がノギンによる神経分化誘導に対し阻害的に働くことも見いだした。また、サル ES 細胞の場合同様、分化誘導途中で得られる神経前駆細胞の凍結保存が可能なることも確認した。

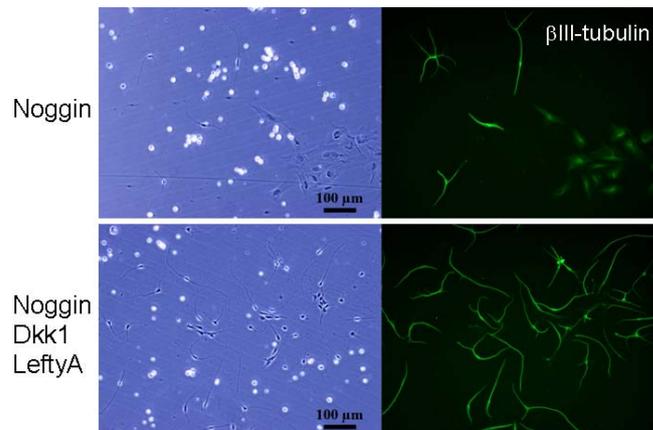


Fig.3 ヒト ES 細胞のノギンによる神経分化誘導

この方法で得られたヒト ES 細胞由来の神経前駆細胞の特徴を調べたところ、終脳の特異的遺伝子マーカーである FOXG1/BF1 を発現しており、終脳領域の神経前駆細胞であることが明らかになった。

②ーイ. 神経前駆細胞への分化誘導効率の向上

これらの結果を踏まえ、中間評価以後において、モデル細胞創製に必要とされる神経細胞(大脳神経細胞と運動神経細胞)を得るために、神経前駆細胞から目的神経細胞の分化誘導と成熟化の培養条件の検討および分化誘導率を向上させる条件の検討をさらに進めた。

前述したとおり、ノギンの添加によってヒト ES 細胞を神経系の細胞へと分化誘導が可能であったが、サル ES 細胞に較べて、未分化細胞が多く残り誘導効率が低かった。TGF- β /Activin 系シグナルの阻害剤である SB431542 または SB505124 をノギンと共添加することで、誘導初期の未分化細胞が減少して分化効率が増加した。さらに誘導途中での継代方法を工夫した結果、その後のコロニーの接着性が向上し、得られる分化細胞数を増やすことができた。誘導開始から継代を 2 回繰り返して 17-19 日後には、ロゼッタ状のコロニーが多数形成された。このロゼッタ状のコロニーをシングルセルにして播種することで、突起を伸展させた神経細胞へと分化した。

②ーウ. ノギン誘導神経細胞の特徴づけ

ノギンによって分化誘導された神経前駆細胞に、特異的な成長因子などを入れずに培養をつづけた神経細胞は、電気生理学的な解析からマイナス 50 mV から 60 mV の静止膜電位を有し自発的な活動電位も観測され、電位依存性の Na チャネルの発現が確認できた。さらに免疫染色の結果から、成熟神経細胞のマーカーである MAP2、NEUROFILAMENT の発現も確認できたことから、得られた神経細胞は比較的成熟していることが明らかとなった(Fig.4)。分化誘導されてくる神経細胞は終脳マーカーである FOXG1 を発現しており、さらに自発的シナプス応答では GABA のみに反応したことより GABA 作動性ニューロンが主な細胞種であることが分かった。

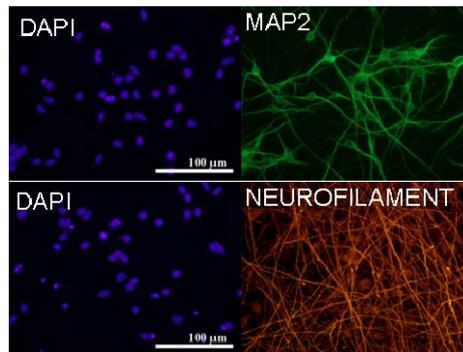


Fig.4 ヒト ES 細胞由来の成熟神経細胞

③ 特定タイプの神経細胞への分化誘導

③ーア. ドーパミン作動性神経細胞への分化誘導

上記のようにノギンと TGF- β /Activin 系シグナルの阻害剤である SB431542 処理によって分化誘導させた神経前駆細胞は、特に何の処理をせず培養しつづけると GABA 作動性神経細胞に分化成熟していく。このことは、ヒト ES 細胞を神経幹細胞まで分化させた後、目的とする神経細胞へ分化させるためには、何らかの因子が必要とされることを示している。我々はドーパミン作動性神経細胞へ分化誘導させるために FGF8 とソニックヘッジホッグによる処理をおこなうことで、ドーパミン神経細胞としての特徴を有する細胞へ分化させることに成功した。誘導から 53 日後、成熟ドーパミン作動性神経細胞に特徴的な形態を示し、Tyrosine Hydroxylase (TH) 陽性細胞を検出した。また、TH、Engrailed-1、Nurr-1 といったドーパミン作動性神経細胞のマーカー遺伝子の発現も確認され、さらにドーパミントランスポーターの遺伝子発現も認められた。また、この分化細胞が機能的かどうかの確認実験を行った。塩化カリウム処理によって、ドーパミン作動性神経細胞からドーパミンが放出されることが知られている。そこで、ES 細胞由来のドーパミン作動性神経細胞に塩化カリウム処理を行い、培養液中に含まれるドーパミン量を測定したところ、約 11 倍の濃度増加が見られ、ドーパミンの大幅な放出を確認した (Fig.5a)。放出されたドーパミンは、その後ドーパミン作動性神経細胞によって回収される。その際、ドーパミントランスポーター阻害剤で処理すると、蛍光色素で標識された神経伝達物質アナログの取り込みが阻害された (Fig.5)。これらのことは、ヒト ES 細胞から分化誘導させたドーパミン作動性神経細胞は、機能的であることを示唆している。

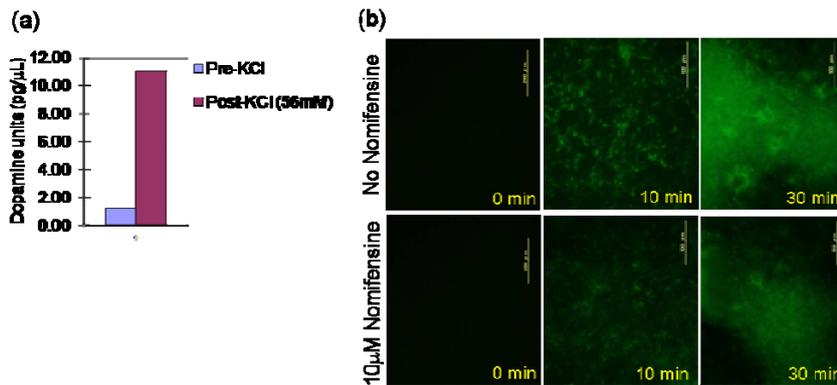


Fig.5 ヒト ES 細胞から分化したドーパミン作動性神経細胞

③ーイ. 脊髄運動神経細胞への分化誘導

ヒトおよびサル ES 細胞を Noggin 添加による培養を 17 日間行ったところ、ほぼ全ての細胞が Nestin 陽性神経上皮細胞となり Oct3/4 陽性未分化細胞は観察されなかった。さらにその後、レチノイン酸・ソニックヘッジホッグにより脊髄運動神経細胞へ効率よく分化させることに成功した。脊髄運動神経細胞の分化マーカーである HB9 や Isl1 の陽性細胞を指標にした分化効率は、サル ES 細胞で 40%、ヒト ES 細胞で 30%の分化効率であった(Fig.6)。

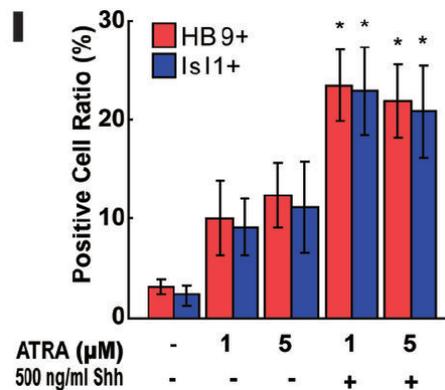


Fig.6 ヒト ES 細胞から運動神経細胞への分化効率

(Wada et al. PLoS ONE, 2009 より引用)

また、分化誘導された脊髄運動神経細胞の長期培養による成熟化についても試みた。BDNF/NT3/CNTF 添加培養条件で 2 週間培養後、電気生理学的実験を行ったところ活動電位等成熟神経細胞の特徴を観察した。また、アセチルコリン合成に必要とされるコリンアセチルトランスフェラーゼの発現が確認できた。さらに、電気生理実験以外での脊髄運動神経細胞の機能性・成熟度を調べるために、筋細胞との共培養を行った。ラット筋芽細胞 C2C12 を成熟筋へと分化誘導し、脊髄運動神経細胞と共培養させた。その結果、神経筋接合部に存在するアセチルコリン受容体に強く結合する α ブンガロトキシン(蛍光標識済み)は、神経細胞の末端に検出され、またシナ

プスマーカーであるシナプシンのシグナルと共局在した。これらのことは、ヒト ES 細胞から分化させた脊髄運動神経細胞が成熟しており機能的であることを示唆している。

最終目的であるモデル細胞を構築する上で、必要とされることの一つに目的細胞を多量に準備することが上げられる。そこで、ノギンによって分化誘導された神経幹細胞集団を運動神経細胞への分化能を保持したまま増幅が可能かどうかを、ニューロスフェア形成を介した浮遊培養系を試みた。FGF2 存在、もしくは FGF2 と EGF 存在下で、ニューロスフェア形成を行い、ニューロスフェアを継代し、その後、運動神経細胞への分化能を確認した。その結果、FGF2 存在下、FGF2 と EGF 存在下、共に細胞数を増やすことは出来たが、FGF2 と EGF 存在下では、3 継代目のニューロスフェア内の神経幹細胞の運動神経細胞への分化能が急激に落ち込んだ。一方、FGF2 存在下で培養したニューロスフェアでは、3 継代目のニューロスフェアでも、十分な運動神経細胞への分化能を維持しており、約 30 倍の神経幹細胞集団の増幅に成功した (Fig.7)。

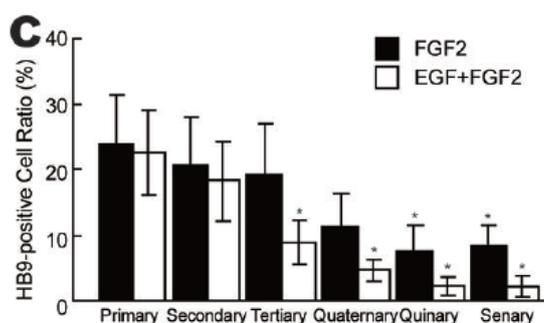


Fig.7 ES 細胞由来神経幹細胞の増幅
(Wada et al. PLoS ONE 2009 より引用)

また、産業化を考慮した場合、培養コストが大きな問題の一つになる。そこで、高価な組換え蛋白質を、安価な低分子化合物に代替可能かどうかを調べた。さらに、低分子化合物に代替可能であれば、ロット間による品質の違いがある組換え蛋白質とは異なり安定して、分化誘導を行える利点がある。そこで、我々の分化誘導系で使用されている組換え蛋白質であるノギンの代替化合物としてドルソモルフィン (Dorsomorphin) とソニックヘッジホッグの代替化合物としてソニックヘッジホッグアゴニストのそれぞれの分化誘導活性について検討を行った。ドルソモルフィンとノギンと同様に神経幹細胞にまで分化誘導できることを確認し、またソニックヘッジホッグアゴニストもソニックヘッジホッグ同様に脊髄運動神経細胞への分化を問題なく誘導する活性を持っていた。このような結果は、低分子化合物の使用によって、安定的にかつ低予算で分化誘導系を構築することが可能になることを示唆しており、将来の実用化において重要な結果を得ることが出来た。

さらに脊髄運動神経細胞の分化誘導効率は 100%ではない。つまり、目的外の神経細胞、非神経細胞が混在している。モデル細胞を用いたアッセイ系では必ずしも均一な細胞集団である必要はないが、ただアッセイ系としてのアウトプットの質を良くするためにも、目的細胞の濃度が高い方が望ましい。そこで、我々は GFP などのレポーター遺伝子を用いず、ヒト ES 細胞由来の脊髄運動神経細胞を濃縮する技術を開発した。密度勾配遠心法によって、約 30%の HB9 陽性細胞を約

80%までに濃縮することに成功した。しかし、現在の方法では濃縮後の細胞数の減少が大きいため、今後の改善が必要である。

③ーウ. アストロサイトへの分化誘導

アストロサイトは、過去の報告により ALS 発症に重要な役割を果たす細胞であると考えられている。これまでの研究では、ALS マウス脳由来のアストロサイトが利用されており、また ALS 患者脳からのアストロサイトの利用は様々な問題があり、モデル構築用の細胞ソースとしては現実的ではない。そのため、ヒト細胞だけからなる ALS モデル細胞構築を目指す場合、ヒト ES 細胞からのアストロサイトへの分化誘導系が必要となる。ニューロスフェアを数継代後には神経細胞分化能が低下する結果を上記のように得ていたが、その時のニューロスフェアでのアストロサイトへの分化能について調べた。その結果、ニューロスフェア継代に伴ってアストロサイト分化能が徐々に向上することがわかった。しかしながら、アストロサイトの分化マーカーである GFAP の陽性細胞割合は最大 50%程度であった。さらに、積極的にヒト ES 細胞由来の神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導効率を高める目的で、分化誘導法を検討した結果、最大約 80%GFAP または S100 陽性アストロサイトへの分化誘導が可能であることを見だし、効率よくアストロサイトへ分化誘導出来る系を確立した。

③ーエ. 中型有棘神経細胞への分化誘導

ノギンと SB431542 処理によってヒト ES 細胞から分化誘導させた神経前駆細胞を、中型有棘神経細胞へ分化させることを目指し、まずソニックヘッジホッグ、DKK1、BDNF で処理し、その後 BDNF、dbcAMP、バルプロ酸処理を行った。その結果、免疫染色によって中型有棘神経細胞のマーカー分子である DARPP32 の陽性細胞が観察され (Fig.8)、また、遺伝子発現解析においても、高レベルでの DARPP32 遺伝子の発現を検出した。一方 GABA 作動性神経細胞では、DARPP32 遺伝子の発現は検出出来なかった。このことは、さらなる解析を行う必要はあるが、中型有棘神経細胞への分化誘導が成功したことを示唆している。

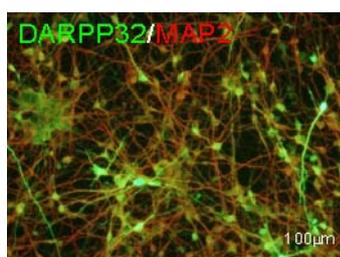


Fig.8 ヒト ES 細胞から中型有棘神経細胞への分化

④ 人工多能性幹細胞(iPS 細胞)への分化誘導法の適応

京都大学山中教授によって開発された iPS 細胞は、ES 細胞同様、多能性を持つことが示されており、今後の研究の展開が大いに期待されている。ヒト iPS 細胞においても、我々がヒト ES 細胞 (KhES-1) で確立した分化誘導技術が適応可能かどうかの検討を行った。

ウイスコンシン大学ヒト iPS 細胞3株および京都大学ヒト iPS 細胞2株を用い、運動神経細胞への分化誘導を行った。その結果、ノギンおよびドルソモルフィンでの神経幹細胞誘導、さらにレチノイン酸・ソニックヘッジホッグアゴニストによる脊髄運動神経細胞への分化が、ヒト ES 細胞と同等に観察され、我々の分化誘導技術が iPS 細胞へも適応可能であることが示された。しかしながら、iPS 細胞株によって、分化誘導割合がかなり低くなってしまいうものもあり、iPS 細胞でも研究に使用する最適な細胞株の選択が重要であることが分かった。

(4) 目標の達成度と意義

京都大学で樹立されたサル ES 細胞やヒト ES 細胞を用いて、ノギンと TGF- β /Activin 系シグナルの阻害剤である SB431542 を用いて神経前駆細胞へ効率よく分化誘導させ、その後、様々な蛋白質や因子を用いることで、ヒト ES 細胞を様々な神経系細胞へ分化誘導させる方法を確立し、計画通りに進んだ。また、モデル細胞構築のために必要とされる細胞の供給の際、問題とされる培養コストの低分子化合物による代替による低減や神経幹細胞を増幅させる方法、目的細胞の濃縮にも成功している。本プロジェクト期間中に見いだされたヒト iPS 細胞へも、我々が開発した分化誘導技術が問題なく適応可能であることも示された。今後、広く iPS 細胞研究にも応用されることが期待できる。

薬効や安全性は人種によって異なる場合があることが知られており、白人 (Caucasian) に効果ありとされた薬がアジア人に効果がない、またはその逆の場合もあり得る。よって、創薬や薬理学分野において本プロジェクトで用いている日本人由来の ES 細胞 KhES-1 の価値は非常に高く、その ES 細胞を用いて分化誘導方法を確立したことは非常に意義がある。

さらに他の研究者によって開発された神経誘導分化法を KhES-1 で検討した際に、KhES-1 に適用できない方法もあることを明らかにした。この結果は、既存のヒト ES 細胞株は、多分化能という基本的な性質は共通に持っているが、他面では ES 細胞株間で異なった性質を保持しているという考えを支持しており、今後の創薬や薬理学ばかりでなく幹細胞生物学、発生生物学などの基礎研究などの発展には、さらに多くのヒト ES 細胞株の数が必要であることを示唆している。このことは、ヒト iPS 細胞にも当てはまり、我々の方法では分化誘導できていない株があった。元々その iPS 細胞株が、in vitro では神経系細胞への分化能力を失っていた可能性もある。そのため、iPS 細胞においても数多くの株が必要であり、さらにヒト ES 細胞とヒト iPS 細胞との違いも最近報告されているため、今後、両者の比較研究が必要である。

2. 2. 2 ヒトES細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発

京都大学

共同実施：幹細胞創薬研究所

(1) 事業目的と背景

薬物がイオンチャンネルに作用し、心電図における QT 間隔を延長させ、重篤な不整脈を引き起

こすことはよく知られている。これは薬物誘発性 QT 延長症候群あるいは後天性 QT 延長症候群と呼ばれ、創薬の過程においてこのような副作用を惹起する可能性のある薬物をいかに排除し、安全な化合物を選択するかが非常に重要な課題となっている。QT 延長作用を持つ薬物の比較的多くが HERG (human ether-a-go-go related gene) チャンネルを抑制するものであることから、創薬の早い段階での後天性(薬物誘発性)QT 延長症候群のスクリーニングには哺乳類培養細胞に HERG チャンネルを発現させたものを用いることが多い。しかし、近年の電気生理学的、分子生物学的研究法の進歩によって、心筋細胞の再分極過程には多くのイオンチャンネルが関与することが明らかとなってきていることから、この方法は HERG チャンネルの過剰発現細胞を使用していることから、的確な評価をしているとは言い切れない例が報告されている。一方、微小電極法により活動電位に対する作用を検討する場合は、非霊長類の初代培養細胞をはじめとする心臓組織・心筋由来の細胞を用いることが多いが、ヒトへの外挿性や創薬前期で使用するほどの細胞量の供給の難しさや調製ロット差という問題が横たわっている。

すなわち本事業では、産業規模で供給可能な均一なヒトへの外挿性を有する細胞を使用し、創薬現場で使用可能な世界で最初の試験を事業化することを目的とした、ヒト ES 細胞から分化誘導した心筋細胞を用いた QT 間隔延長試験を構築する。

(2) 事業内容と目標

① ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発(その1) 京都大学

平成 19 年度まで: マウス ES 細胞からの効率的な心筋前駆細胞および心筋細胞の分化誘導法を確立し、その方法をサルやヒト ES 細胞へと応用して心筋細胞分化誘導技術を開発する。

平成 21 年度まで: ペースメーカー細胞等機能特異的心筋細胞の誘導・純化法を開発するなど、種々のヒト心筋細胞および前駆細胞の誘導・純化技術を確立する。平成 20 年度に新たに見出したサイクロスポリン A の強力な心筋分化誘導作用をヒト ES 細胞に応用し、ヒト ES 細胞の心筋分化の効率化を図る。新たに樹立された多能性幹細胞である iPS 細胞に関して、ES 細胞のノウハウを導入し心筋分化誘導法を開発する。

② ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発(その2) 幹細胞創薬研究所

本プロジェクトではヒト ES 細胞由来の心筋細胞を用いた QT 間隔延長薬物の *in vitro* での評価法を構築することを目標としている。QT 間隔測定系の完成には細胞技術およびデバイス、被評価化合物群、および解析方法との組み合わせが必須である。しかし、ヒト ES 細胞を用いた評価系は本プロジェクトの最終目標であるが、ヒト ES 細胞由来の分化細胞は、現在のところ他の機関に譲与することができないため、前述した評価系の完成に必要なこれらの要素が一箇所に集めることが不可能である。よって、事業化検討を実施するためにはヒト ES 細胞よりも、実施における制約が少なく、かつ有効性を確認するためにはヒトに近縁の動物種で実施することが適当であると考えた。

そのための中間目標としてヒト ES 細胞に先行してサル ES 細胞を用いて効率的な心筋分化技術を構築しデバイスに供与することにした。また、得られた心筋細胞のデバイスへの移行の方法

や拍動の持続性、維持性能の確認を行うとともにイオンチャンネルの発現プロファイリングを行い心筋細胞に分化しているかの確認を行う。

最終目標は、ヒト ES 細胞を用いた QT 延長評価系の確立である。そのためにサル ES 細胞で得られた知見のヒト ES 細胞への適応を目指す。その後、適切な QT 延長検出を可能とする為に、ヒト ES 細胞由来心筋細胞の成熟化法を確立し、成体心筋モデル細胞の取得を試みる。さらに、その発展型として成体心筋モデル細胞の短期間での取得法の確立を目指す。

(3) 研究成果

①ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発(その1) 京都大学

ア. マウス ES 細胞における新しい心筋前駆細胞及び心筋細胞の分化誘導

- a. マウス ES 細胞から誘導した VEGFR2 (2型血管増殖因子受容体) 陽性の中胚葉レベルの細胞を FACS により純化した後、マウスストローマ細胞株 OP9 上で培養することにより、効率的(従来の EB 法の約3倍)に心筋細胞が分化誘導されることを明らかにした。
- b. VEGFR2 陽性細胞から心筋細胞分化途上において種々のマーカーを用いて、特異的に心筋分化能を有する細胞分画の探索を行い、VEGFR2 陽性/CXCR4 陽性細胞 (FCV 細胞) が高い心筋分化能を有する新しい心筋前駆細胞であることを明らかにした。
- c. Wnt シグナル阻害物質である Dkk1 が VEGFR2 陽性細胞からの心筋分化を促進することを明らかにした。

以上、新しい心筋前駆細胞の同定と効率的な心筋細胞分化誘導法の開発に成功した(Yamashita, *FASEB J*, 2005)。

イ. マウス ES 細胞を用いた心筋ペースメーカー細胞の分化誘導

- a. 上記心筋分化誘導法を用いて、ES 細胞由来心筋の経時的性状解析を行い、ES 細胞由来心筋の自動能維持において、過分極誘発陽イオンチャンネル(HCN1,4)および電位依存型カルシウムチャンネル(Cav3.1, 3.2)が必須であることを明らかにした(Yanagi, *Stem Cells*, in revision)。
- b. 上記イオンチャンネルの発現を制御する転写因子(X)を見出している。
- c. 転写因子(X)の発現を、本プロジェクト2. 1. 3. RNA 干渉法による遺伝子発現制御技術を用いて抑制したところ、自己拍動心筋細胞コロニーが増加することを見出している。

以上により、心筋ペースメーカー細胞の特異的な分化誘導法開発の基盤となる技術構築に成功した。

ウ. 高効率心筋前駆細胞及び心筋細胞分化誘導法の開発

アの心筋分化誘導途上において、サイクロスポリン A を投与することにより、心筋前駆細胞及び心筋細胞の分化誘導効率を約 10 倍促進することに成功した(Yan, *Biochem Biophys Res Commun*, 2009; PCT 特許出願)。

エ. ヒト ES 細胞を用いた心筋分化誘導

ヒト ES 細胞をストローマ細胞上で培養することにより、自己拍動心筋細胞を誘導することに成功している。サイクロスポリン A の投与により、心筋分化誘導効率が有意に増加する予備的結果

を得ている。

オ. マウス iPS 細胞からの心筋分化誘導

マウス ES 細胞分化システムを iPS 細胞に導入することにより、iPS 細胞を種々の心血管細胞に分化誘導する系統的分化誘導法の樹立にいち早く成功した(Narazaki, *Circulation*, 2008)。

カ. ヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導

ヒト ES 細胞心筋分化誘導法を導入し、ヒト iPS 細胞から機能的な心筋細胞を誘導することに成功している。ヒト心筋細胞マーカーの発現、電気生理学的特性、電子顕微鏡的特徴等ヒト心筋細胞としての性質を満たすことを確認している。またサイクロスポリン A 法の導入により、ヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導効率も増加する予備的結果を得ている。

② ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発(その2) 幹細胞創薬研究所

ア. カニクイザル ES 細胞から心筋細胞への分化誘導

Mummery らによって報告された END-2 細胞との共培養系 (Stem Cells, 23: 772-780, 2006) を用いて、カニクイザル ES 細胞株 CMK6 を用いて心筋細胞への分化誘導系の確立を試みた。心筋分化誘導における牛胎仔血清 (FCS) の濃度依存性を 0、0.5、1、2.5、5、10、20%FCS で検討したところ、拍動心筋細胞は、2.5%FCS 存在下において最も多く得られた。また、拍動細胞は共培養開始の 8 日後から出現し始め、12 日から 15 日をピークとして検出された(図 1)。次に、共培養開始時の ES 細胞のコロニーの大きさを検討した。フィルターを用いて 100 μm 以上、70-100 μm 、40-70 μm の 3 種類の大きさに分けたところ、70-100 μm のコロニーを用いた場合において最も多く得られた。これら 2 つの条件を用いることで、コロニーの 10%以上が安定して拍動するようになった。さらに分化誘導効率を高めるために、心筋分化に効果があるとされる aFGF、oxytocin、京大山下准教授から供与された化学物質(Y)の効果を調べたところ、前二者では効果がなかったが、化学物質(Y)で約 1.4 倍誘導効率が上昇した。得られた拍動細胞は、END-2 細胞上での培養を続けると徐々に拍動しなくなるが、回収し撒き直すことで拍動し続けることを見出した。このことは拍動細胞を長期に維持でき、また適当なアッセイ系へ移行できることを意味し、実用化への大きな知見である。また、拍動細胞から RNA を回収し RT-PCR を行いイオンチャネル遺伝子の発現を調べたところ、ERG、Cav1.2、HCN-2、Nav1.2 の発現が認められた。

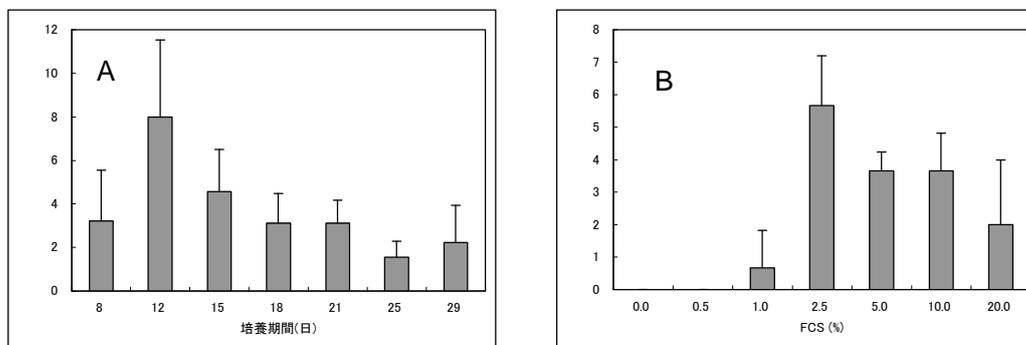


図 1 FCS の濃度依存性(A)と拍動細胞出現の日数(B)

イ. カニクイザル ES 細胞への心筋特異的遺伝子(α -MHC)-GFP の導入

心筋細胞をより効率的に回収するために、心筋特異的 GFP 発現株を作成した。心筋特異的遺伝子であるヒト α -MHC のプロモータを新たにクローニングし、pEGFP-1 (Clontech) に挿入した。これをカニクイザル ES 細胞に、遺伝子改変グループによって開発された遺伝子導入法を用いて導入し、 α -MHC::GFP 株を得た。得られたクローンを分化誘導し、拍動領域と GFP の発現が一致している細胞株を得ることができた。さらに免疫染色法において、GFP の発現は心筋特異的遺伝子である Troponin T、 α -actinin、 α -HMC の発現と一致していることを確認し、心筋様に分化していることを示唆する結果を得た(図 2)。

α -MHC::GFP 株を用いて、心筋細胞の回収方法を検討した。0.25% Trypsin-EDTA で処理し、21G の注射針に通して分散することで、1 細胞に分離でき、さらにフローサイトメトリーを用いた分取が可能となった。処理後 GFP の蛍光を指標にして観察すると、1 細胞でも拍動している細胞が検出された。さらに、この細胞を用いて、GFP 由来の蛍光を指標に、心筋分化を促進させる化合物の検索を行うための HTS 系の構築に着手した。

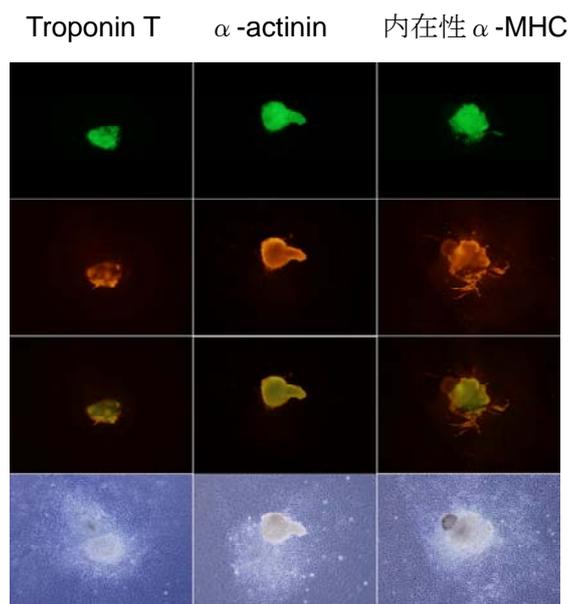


図 2 MHC::GFP の発現と心筋マーカー遺伝子の局在(免疫染色)

ウ. ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導

京大再生研で樹立されたヒト ES 細胞株 (KhES-1、KhES-2、KhES-3)を用いて、END-2 との共培養系の条件検討を行った。カニクイザル ES 細胞同様、コロニーの大きさと FCS の濃度を検討した結果、KhES-1 は誘導後 21 日において 70-100 μ m のコロニー、20% FCS 存在下で 7%のコロニーが、KhES-3 では誘導後 12 日において 100 μ m 以上のコロニー、5% FCS 存在下で 8%のコロ

ニーが拍動した。しかし、KhES-2 は安定して拍動する条件は得られなかった。

次にクローニングの効率や他の研究との比較を考慮して、KhES-1 を用いて更なる条件検討を試みた。ヒト ES 細胞の培養には KSR が用いられているのに対し、共培養系では FCS を用いている。そこで、誘導初期に FCS のみだけでなく、KSR の添加を検討した。FCS を含む共培養用培地に KSR を 0、1%、2.5%、5% の濃度で添加したところ、1%KSR 添加条件において拍動心筋様細胞数は著しく増加した。京大山下准教授より供与された CSA は、誘導後期において心筋誘導を促進することが明らかとなっているが、1%KSR 添加誘導系の後期に CSA を添加することで、さらに拍動心筋細胞コロニー数の増加に成功した。

エ. ヒト ES 細胞への心筋特異的遺伝子(α -MHC)-GFP の導入

均一なヒト心筋細胞を選別分取するために、サル ES 細胞同様心筋特異的遺伝子であるヒト α MHC プロモータにレポーター遺伝子である GFP をつないだベクターを KhES-1 に導入し、 α MHC::GFP 株を得た。得られた 35 株を分化誘導し、拍動領域と GFP の発現が一致している細胞株を 3 株樹立した。免疫染色法により、GFP の発現領域は内在性 α MHC の発現と一致し、さらに心筋特異的遺伝子である Troponin T や α -actinin、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)の発現と一致することを確認した(図 3)。以上の結果より、 α MHC::GFP の発現が拍動細胞の指標として使用可能であることが示された。

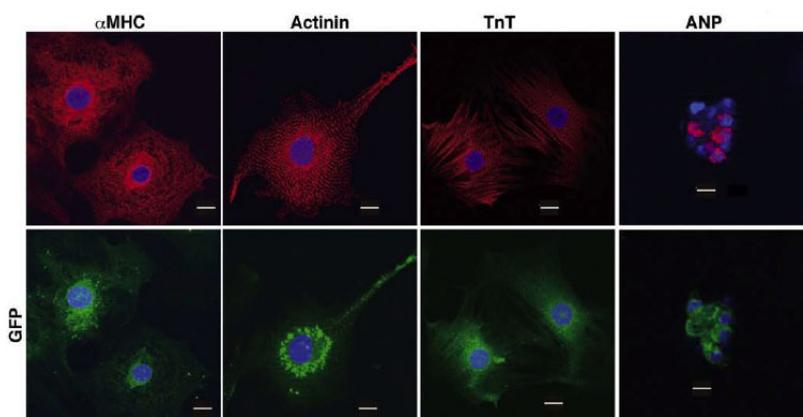


図 3. ヒト ES 細胞由来心筋細胞における α MHC::GFP の発現と心筋マーカー遺伝子の局在 (免疫染色)

オ. ヒト ES 細胞由来心筋細胞(hESC-CMs)の成熟化法の確立

END-2 細胞との共培養系を用いて得られた hESC-CMs の拍動性は誘導後徐々に失われる。そこで二週間毎の定期的な継代を行うことで、拍動性を維持したまま一年以上 hESC-CMs クラスターを長期培養できる「長期再接着培養法」を我々は確立した。得られた hESC-CMs の機能を定量 PCR 法、パッチクランプ法、細胞外電位測定を用いて評価した。8 ヶ月継代後の hESC-CMs に

において、心筋特異的遺伝子発現の著しい増加が認められ、特に QT 延長関連分子である ERG や KCNQ1 の高発現を定量 PCR で検出した。また、パッチクランプ法を用いた電気生理学的な特性解析では、単一の拍動 hESC-CM の活動電位の発火、Na 電流、Ca 電流、K 電流(HERG 電流)が検出され、長期培養維持によるそれぞれのイオンチャネル活性の増加が認められた。さらに、浮遊培養を介することで一過的な遺伝子発現の誘導が可能であった。このように、長期再接着培養・浮遊培養を行うことで、hESC-CMs の機能的成熟化を促すことができ、hESC-CMs が心筋モデル細胞としての性質を獲得していることを確認した。

カ. ヒト ES 細胞由来心筋細胞の QT 延長測定評価法の確立 (安全性薬理試験への適応)

薬剤候補化合物の心筋細胞に対する安全性を調べる QT 延長評価法を構築する目的で、多電極システムを用いた hESC-CMs クラスターの細胞外電位測定を行った。既知のチャネル阻害剤である E4031 に対する hESC-CMs の応答性(図 4)は、浮遊培養を介することにより格段に向上した。しかし、浮遊培養を介しても未熟な hESC-CMs クラスター(day21)では QT 延長を検出できなかった。よって、長期再接着培養による hESC-CMs の成熟化が適正な薬剤応答性の獲得に有効であることが明らかとなった(図 5)。次に既存の安全性試験である HERG 試験との比較を行った。hESC-CMs クラスターは、HERG 試験で QT 延長陽性であり in vivo でも陽性を示すニフェカレントに対して QT 延長を示した。一方、HERG 試験で QT 延長陰性に関わらず in vivo では陽性を示すソタロールに対する QT 延長も明確に検出できた(図 6)。ネガティブコントロールのアスピリンに対しては、波形に変化は見られず、陰性応答を的確に示した。このように、成熟型 hESC-CMs を用いることで、既存の HERG 試験より in vivo を反映する薬剤応答を示す QT 延長評価法を確立できた。

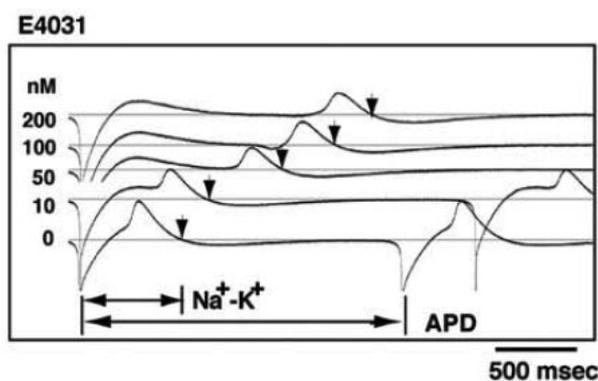


図 4. hESC-CMs クラスターの細胞外電位と E4031 による T 波の延長

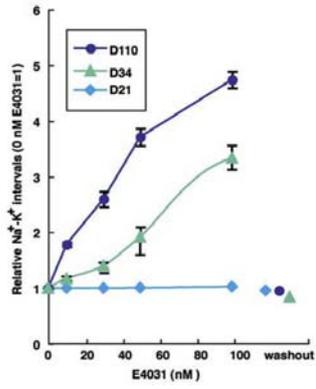


図 5. 長期再接着培養による
適正な薬剤応答の獲得

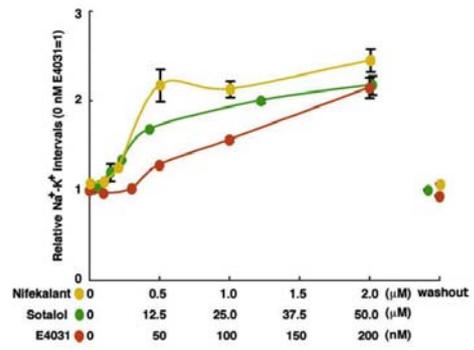


図 6. E4031, Nifekalant, Sotalol による
QT 延

キ. ヒト iPS 細胞への応用

上記で確立した心筋分化誘導法や長期再接着培養法をヒト iPS 細胞へ応用した。用いたヒト iPS 細胞株は、京都大学山中教授が樹立した株(253G1、201B7)と Wisconsin 大学 Thomson 教授が樹立した株(IMR90-1、IMR90-4、fskin-1)である。心筋細胞の誘導効率は細胞株毎に異なり、京都大学の株は、ヒト ES 細胞株の 3 倍以上であった。心筋特異的遺伝子である Troponin T や α -actinin、 α MHC は全ての iPS 細胞株由来の心筋細胞で発現していることを免疫染色法にて確認した。qRT-PCR による解析では、京都大学の 253G1 株は KhES-1 由来と同等もしくはそれ以上の発現レベルを示したが、他の 4 株の発現レベルは低かった。また浮遊培養法による心筋機能の増強はヒト iPS 細胞由来心筋細胞でも認められ、E4031 による QT 延長の検出も可能であった。このようにヒト ES 細胞を用いて確立した技術はヒト iPS 細胞への応用が可能である。

ク. 化合物によるヒト ES および iPS 細胞由来心筋細胞の機能亢進

長期再接着培養法によるヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞の成熟化には時間が必要であり、浮遊培養法による機能増強は一過的であることから、スクリーニング系を確立する為には、均一で生体心筋に近いモデル細胞の短期間での取得が求められる。そこで我々は化合物による心筋機能の亢進を試みた。初期誘導で得られた hESC-CMs を化合物 A で処理したところ、心筋特異的遺伝子発現の増強や一分間当たりの拍動数の増加が認められた。さらに細胞外電位による解析では、E4031 による QT 延長を検出できなかった未熟な hESC-CMs クラスターを化合物 A で処理すると、QT 延長の検出が可能となり、心筋機能の亢進が認められた。またニフェカントやソタロールによる QT 延長も検出できた。この化合物 A による心筋機能の亢進はヒト iPSC-CMs に対しても有効であった。このように、QT 延長を安定に検出できるヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞の短期間での取得が可能となった。

(4) 目標の達成度と意義

①ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発(その1)京都大学

ア. マウス ES 細胞における新しい心筋前駆細胞及び心筋細胞の分化誘導

心筋細胞を分化誘導する新しい方法を開発し、新規心筋前駆細胞の同定と心筋分化誘導シグナルの同定に成功した。効率的な心筋分化誘導法の確立に計画通りに成功した。

イ. マウス ES 細胞を用いた心筋ペースメーカー細胞の分化誘導

心筋ペースメーカー細胞分化誘導のための基本的技術・理論基盤の構築に成功した。自動能維持に必要なチャネルの同定と同チャネルの発現制御法を見出し、モデルペースメーカー細胞の誘導が技術的にも可能になったと思われる。当初計画よりも進んだと考えられる。

ウ. 高効率心筋前駆細胞及び心筋細胞分化誘導法の開発

全く新しい高効率心筋前駆細胞及び心筋細胞の誘導法を見出した。従来の分化誘導効率を 10 倍から 20 倍も増加させる画期的な技術であり、マウス ES 細胞よりも心筋分化誘導効率が低いヒト ES 細胞にも応用可能であれば、ヒト ES 細胞由来心筋細胞を潤沢に誘導する上で不可欠な技術基盤となる。当初計画には全くなかった新しい成果である。

エ. ヒト ES 細胞を用いた心筋分化誘導

ヒト ES 細胞から2次元培養下に心筋を誘導することに成功し、マウス ES 細胞と同様の分化シ

システムを構築できる可能性を見出している。ウの成果を導入することにより、分化誘導効率の改善に成功している。

オ. マウス iPS 細胞からの心筋分化誘導

研究分担者の持つ ES 細胞研究における先進性を iPS 細胞に応用し、iPS 細胞からの心血管分化誘導に世界に先駆けて成功した(Narazaki, *Circulation*, 2008)。同業績は、2008 年 *Circulation* 掲載全論文の中から、基礎科学部門第 1 位 **Best Paper Award** に選出され、非常に高い評価を受けている。

カ. ヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導

ヒト iPS 細胞からも機能的な心筋細胞の誘導にいち早く成功した。患者由来 iPS 細胞などからのモデル細胞構築に必要な基本的技術基盤となる。

当初計画に加え、新たに生まれてきた iPS 細胞に対しても迅速に対応し、従来計画を大きく上回る成果を上げた。

② ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発(その2)幹細胞創薬研究所

総括すると当初の計画より進んだと言える。一般にスクリーニング系は細胞技術、デバイス技術、被評価化合物、および解析技術のそれぞれが綿密に組み合わさって成立する。これら全てのリソースが一箇所に存在させるのが不可能な現段階では、使用制限がヒト ES 細胞より低くかつヒトに近い動物種であるサル ES 細胞を用いた技術を構築することが、事業応用化するためには効率的である。そのためサル ES 細胞を用いて技術の先行構築を行ったが、分化心筋細胞の取得および、分化心筋細胞の細胞外電位の測定、および既知薬剤による QT 延長に及ぼす影響を評価できたこと、さらにはその内容が現行法の弱点を補完できる可能性を示唆できたことは、細胞技術とデバイス技術の組合せが有効であることが示されただけでなく、本技術を創薬現場で応用できる可能性があり意義深いことである。霊長類 ES 細胞を実際の創薬現場で使用している報告は世界的にも例がないが、本研究が世界で最初の実用例となるために、本技術の事業化のためのライセンスアウトを進めた。

ヒト ES 細胞を用いた技術は、サル ES 細胞で得られた知見をさらに応用することで、既知薬剤による QT 延長に及ぼす影響を適切に評価できた。また、ヒト ES 細胞の指針改正によりヒト ES 由来分化細胞は譲与可能となったので、種差の違いによる影響を考慮しなくてよい本技術は、創薬現場での応用の可能性がより期待できる。さらにヒト iPS 細胞へ適応可能であることから、薬剤の安全性試験だけでなく薬効薬理試験に対する応用の可能性が示唆される。このように、本技術の幅広い応用の可能性を示せたことはとても意義深いことである。

2. 2. 3 ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発

京都大学
共同実施: 幹細胞創薬研究所
熊本大学

(1)事業目的と背景

肝細胞は創薬研究において中心的役割を果たす細胞であり、新薬候補物質の体内での代謝および薬物毒性試験などにおいて、動物肝細胞とヒト肝細胞では物質代謝の大きな違いがあることから、動物実験だけでは毒性と有効性の検定が不可能である。またヒト肝細胞の供給も極めて限定されており、多数の提供者から集められた細胞組織では試験データのばらつきが大きく有意な結果を得ることは困難である。

例えば、生体に投与された薬物は肝臓の薬物代謝酵素(CYP)により処理されるが、この酵素の活性を阻害する薬物はそれ自体の濃度のみならず、同時に投与された薬物の濃度も高く維持することになる。逆に、CYP の発現を誘導する薬物は、投与した薬物の濃度を下げる作用をもつ。このため、新規薬物候補は CYP 阻害・誘導作用の有無について厳格に調べられている。CYP には 50 種以上の分子種があることが確認されており、その発現レベルも個体、人種により異なることが知られている。現在、薬物の CYP 阻害作用のスクリーニングには、ヒト肝臓ミクロソームの CYP 活性を測定しているが、検体のロットにより活性が異なり安定した検証ができていない。

本事業におけるヒト ES 細胞から成熟肝細胞への分化誘導技術が確立できれば、創薬研究分野における極めて重要な技術革新となり、世界的にも大きなインパクトを生み出す。さらには、ヒト ES 細胞への遺伝子改変を行うことによって、肝臓における物質代謝に関わる個体差や疾患に対応して創薬試験に使用できる肝細胞モデル系の構築が可能になる。

(2)事業内容と目標

① ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その1)京都大学

京都大学再生医科学研究所では、京都大学大学院医学研究科肝胆膵・移植外科グループとのこれまでの共同研究において、マウス胎児肝臓由来のストローマ細胞との共培養系によって、未熟な肝前駆細胞を成熟肝細胞へと分化誘導することに成功している。ES 細胞から未熟な肝前駆細胞への分化誘導には活発に進められているが、そこから成熟肝細胞への分化はマウス ES 細胞でさえもほとんど成功がなく、世界的に見ても我々の開発した系はインパクトがある。そこで本プロジェクトではヒト ES 細胞から高効率で肝細胞への分化誘導を行う技術を確立することを最終目的として研究開発を行う。中間目標としては、(1) 肝前駆細胞を分離・生成することを可能とすべく、レポーターベクターを導入したヒト ES 細胞株の樹立、(2) 共培に必要なストローマ細胞は現段階では初代培養細胞のため調整が困難であるという問題点があり、調整の容易な細胞株で代用できるかに向けて目処をつける。また最終目標としてはこれらを組み合わせ、マウス ES 細胞から成熟肝細胞への分化誘導技術を、ヒト ES 細胞を用いての技術開発の確立を目指す。

② ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その2)幹細胞創薬研究所

幹細胞創薬研究所においては、次項③の熊本大学の高効率に ES 細胞を内胚葉系細胞～肝前駆細胞へと分化誘導する技術と、①の京都大学の肝前駆細胞へ分化誘導したマウス ES 細胞を成熟肝細胞へ誘導する技術を融合させ、ヒト ES 細胞から高効率に成熟肝細胞を分化誘導させる系を確立することを目指す。中間目標として、(1)マウス胎仔肝臓由来ストローマ細胞株の樹立：初めに、成熟誘導に用いるストローマ細胞が初代培養調製により細胞数に限りがあることや調製

の度に細胞の性質が異なる可能性があるなど本プロジェクトで目指している創薬支援のためのヒト ES 細胞由来の肝細胞を大量に得るには実用的ではないため、該細胞を不死化し十分量の細胞が準備できる系を構築することを試みる。(2)不死化ストローマ細胞との共培養によるヒト ES 細胞由来肝細胞の分化誘導:熊本大学の技術で肝前駆細胞へと分化誘導した細胞を(1)の細胞株と共培養し成熟肝細胞が誘導される培養条件を検討し、ヒト ES 細胞由来肝細胞分化誘導法の確立の目処をつける。最終目標としては、本技術により薬物安全性試験に利用可能な生体内の成熟肝細胞に近い性質を持つ細胞を誘導することを目指す。

③ ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その3)熊本大学

熊本大学発生医学研究センターでは、これまでマウス ES 細胞から内胚葉系の細胞への分化誘導法の技術開発研究を進めてきており、支持細胞を用いる独自の共培養系を開発した。本方法は肝臓を含む内胚葉系の細胞への分化誘導の効率が高く、しかも非常に簡便に、大規模に分化した細胞を得ることが出来る(国際出願 PCT/JP2005/310324)。本事業ではこの支持細胞との共培養方法を用いて、成熟肝臓への分化誘導に向けてより適した培養条件を検討する。最終的にヒト ES 細胞から高効率で肝細胞への分化誘導を行う技術確立することを目的として研究開発を行う。中間目標としては、(1) マウス ES 細胞から肝細胞への分化誘導技術の検討:一連の分化誘導過程を数ステップに分けて、それぞれのステップにおいて分化誘導に適した成長増殖因子などの条件検討を行い、分化誘導条件を最適化する。(2)ヒト ES 細胞を用いて成熟肝細胞への分化誘導方法を検討し、成熟肝細胞の誘導方法を確立する。最終目標として、開発した分化誘導技術を用いて、ヒト ES 細胞から正常な成熟肝細胞を誘導する。分化途上と分化最終段階の細胞について遺伝子発現プロファイル解析、ならびに機能解析を行い、正常な成熟肝細胞に近い肝細胞の創製を目指す。

(3) 研究成果

① ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その1)京都大学

ア. 未熟な肝前駆細胞から成熟肝細胞への分化誘導効果のあるマウス胎児肝臓由来のストローマ細胞の特性解析

京都大学ではマウス胎児肝臓に存在する間葉系細胞のThy1 陽性の細胞が共培養によって肝前駆細胞の成熟化を促進することを見出した^[1]。さらに詳細な検討を行いCD45⁻CD49f[±]Thy1⁺gp38⁺の分画の細胞(以下Thy1⁺gp38⁺細胞と称する)のみが、肝前駆細胞の成熟化を促進することをつきとめることに成功した^[2]。

イ. 未熟な肝前駆細胞から成熟肝細胞への分化誘導効果のある細胞株の探索

この共培養に必要なストローマ細胞の調整が困難であるという問題点があり、調整の容易な細胞株で代用できるならば肝細胞の分化誘導を効率よく行うことが期待できる。そこでマウスES 細胞由来内胚葉細胞と共培養し肝細胞への成熟化能を有する細胞株の探索を進めたが、どれも効果がないことを見出した。

ウ. マウス胎児肝臓由来のストローマ細胞株の樹立と肝成熟に関する効果の検討

ア, イの成果に基づき、幹細胞創薬研究所においてマウス胎児肝臓 (E13.5)の肝臓から、フローサイトメトリーでThy1⁺gp38⁺細胞分画をソート・アウトした。得られた細胞に温度感受性SV40 large

T antigen を遺伝子導入し、持続的に増殖する細胞をピック・アップして細胞株を得ることが出来た。この得られた細胞株と、マウス胎児肝前駆細胞あるいは、マウスES細胞由来alpha-fetoprotein (AFP)産生細胞とを実際に共培養してみると、共培養時のみRT-PCR では肝臓発生後期のマーカーであるTAT やG6P の発現が認められ、さらにはグリコーゲンの産生・蓄積を示すPAS 染色で陽性となった。これらの細胞株は依然としてヘテロな細胞集団であるため、この細胞株をクローン化しその中で最も肝細胞成熟可能を持つクローンを獲得することに成功した(以下MLSgt20細胞株と称する)。この細胞株と共培養することにより、マウス肝臓由来肝前駆細胞およびマウスES細胞由来AFP産生細胞が成熟肝細胞マーカーを発現することを示した。この肝成熟化能は、コンディションドメディウムだけでも固定した細胞でも示されることはなかった。さらに成熟化していることを確認するために、肝細胞機能として培地中のアンモニア除去能(図1A)、アルブミン分泌能(図1B)およびチトクローム酵素活性(図1C)で、形態観察として電子顕微鏡(図1D)で、検討した。その結果、我々の細胞株と共培養した群のみ肝細胞成熟化能を示した。以上の実験により、肝細胞成熟化能を有する細胞株を作製できたことが示された^[3]。

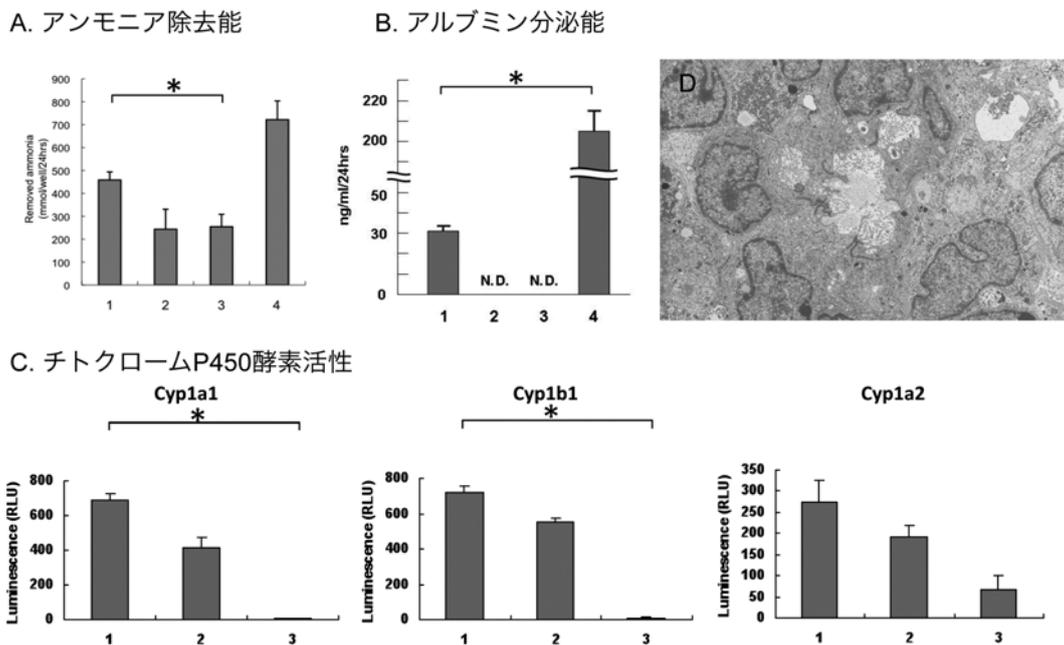


図1 MLSgt20細胞と共培養したマウスES細胞由来AFP産生細胞。(A) アンモニア除去能、および(B) アルブミン分泌能。1; MLSgt20細胞と共培養したマウスES細胞由来AFP産生細胞、2; マウスES細胞由来AFP産生細胞単独培養、3; MLSgt20細胞、4; 成体マウス肝細胞。(C) チトクロームP450酵素活性。1; MLSgt20細胞と共培養したマウスES細胞由来AFP産生細胞、2; マウスES細胞由来AFP産生細胞単独培養、3; MLSgt20細胞。(D) 共培養したマウスES細胞の電子顕微鏡像。成熟肝細胞に特徴的な像を呈している。文献3より改変して引用。

エ. 肝細胞特異的に発現するプロモーター/レポーターベクターの構築とその検定

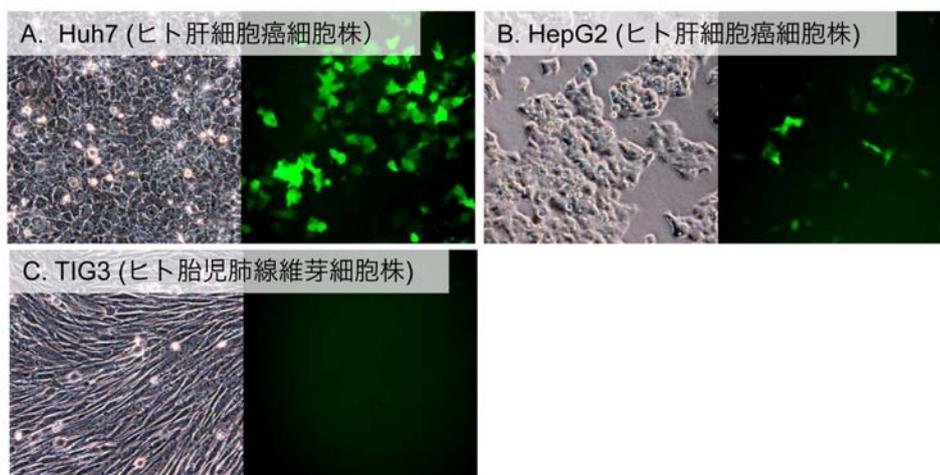


図2 ヒトAFPエンハンサー/プロモーターEGFPベクター導入ヒト各種細胞株. 文献4より改変して引用.

肝前駆細胞を分離・生成することを可能とするべく、レポーターベクターの構築を行った。内胚葉特異的なマーカーとして、AFP に注目して研究開発を進めた。AFP は胎児肝細胞や肝前駆細胞、腹側前腸内胚葉などに発現しており、胎児期の主要な血清蛋白質であることから同じ内胚葉マーカーであるアルブミンと比較して多量に発現していると考えられ、マーカーとして適当であると考えた。ヒト AFP のエンハンサー/プロモーター領域をクローニングし、そのプロモーター活性の下に、レポーター遺伝子である EGFP を導入した数種類のベクターを構築した。このベクターをヒト肝細胞癌由来細胞株である Huh7 や HepG2 に導入すると、AFP を発現しているため EGFP の蛍光を認めた(図 2A, B)。しかしながらヒト胎児肺由来線維芽細胞株である TIG3 へ遺伝子導入しても AFP を発現していないため、EGFP の発現は認めなかった(図 2C)。このように我々が構築したレポーターベクターは、これを遺伝子導入すると、AFP の発現に伴い EGFP が発現するという、意図した機能を有することが分かった。

オ. 肝細胞特異的に発現するプロモーター/レポーターベクターを導入したヒトES 細胞株の樹立
このAFP-EGFP ベクターを実際にヒトES 細胞へ遺伝子導入し、安定導入株をそれぞれ約30株得ることが出来た。しかしながら、ヒトES 細胞では頻繁に生じるsilencing という現象のためと思われるが、実際にヒトES 細胞を分化させてAFP を発現するようになってもEGFP の蛍光を認めないという株が多かったが、その中でAFP とEGFP とが同一細胞で発現する株をKhES-3株において樹立することに成功した(図3)。

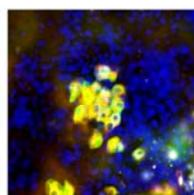


図3 遺伝子導入KhES-3ヒトES細胞株. 黄色い細胞はAFPとEGFPとが同一の細胞で発現していることを示す.文献4より改変して引用.

カ. ヒトES細胞から肝前駆細胞への分化誘導

上記、ヒトAFPエンハンサー／プロモーター下にEGFPを発現する遺伝子導入ヒトES細胞を用いて様々な細胞外基質と増殖因子との組み合わせで分化誘導効率を検討したところ、マトリゲル上でアクチビンAおよびhepatocyte growth factorを加えると21%程度のAFP-EGFP誘導効率を得ることができ、さらに細胞数収量も多く獲得できることが分かった(図4A-H)。この方法により得られた内胚葉細胞はまず中胚葉のマーカを出現してから内胚葉へと分化してきたことから、definitive endodermに相当することが示唆された(図4I)。さらに複数のヒトES細胞株においても我々の分化誘導法が有効であることが示された(図4J)^[4]。

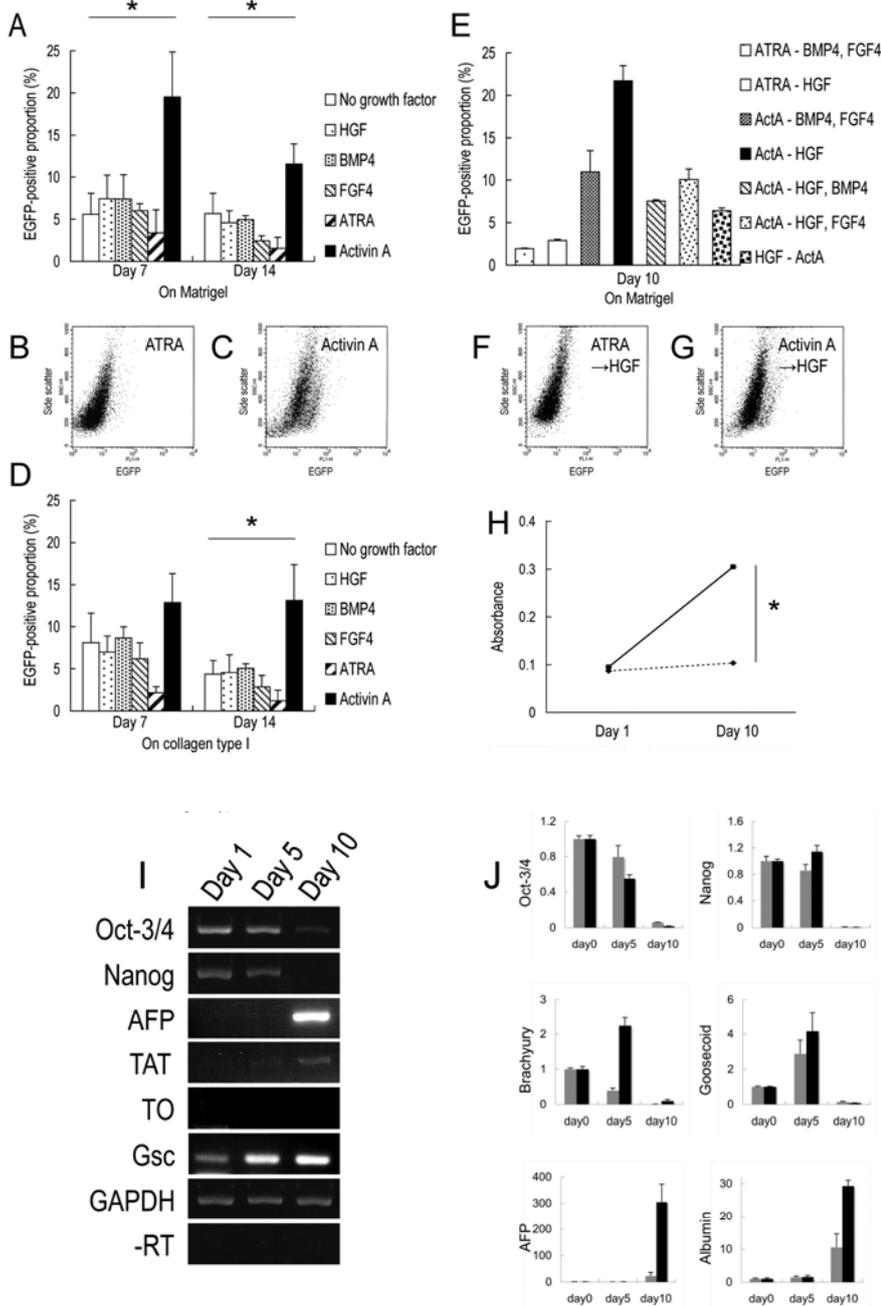


図4 (A-H) ヒトES細胞をマトリゲル上で、アクチビンAおよびhepatocyte growth factor添加により約21%の細胞がAFPを発現する。さらに細胞増殖も良い。(I) RT-PCR解析。(J) 定量的PCR。グレー；KhES-1細胞株、黒；KhES-2細胞株。文献4より改変して引用。

これらの結果は、ヒトES細胞からAFP産生肝前駆細胞様細胞への高効率かつ高収率の分化誘導法を確立したことを意味する。

キ. ヒトES細胞由来肝前駆細胞から機能性肝細胞への成熟化

MLSgt20細胞を用いてヒトES細胞から機能性肝細胞へと成熟させることを目的とした。前項で既述のごとく、AFPエンハンサー／プロモーター下にEGFPを発現するヒトES細胞をマトリゲル上でアクチビンAおよびhepatocyte growth factorを用いてAFPを産生する初期肝細胞へと分化させた。AFP産生細胞をフローサイトメトリーで分離した後に、MLSgt20細胞と混合し浮遊培養することにより共培養を行った(図5)。

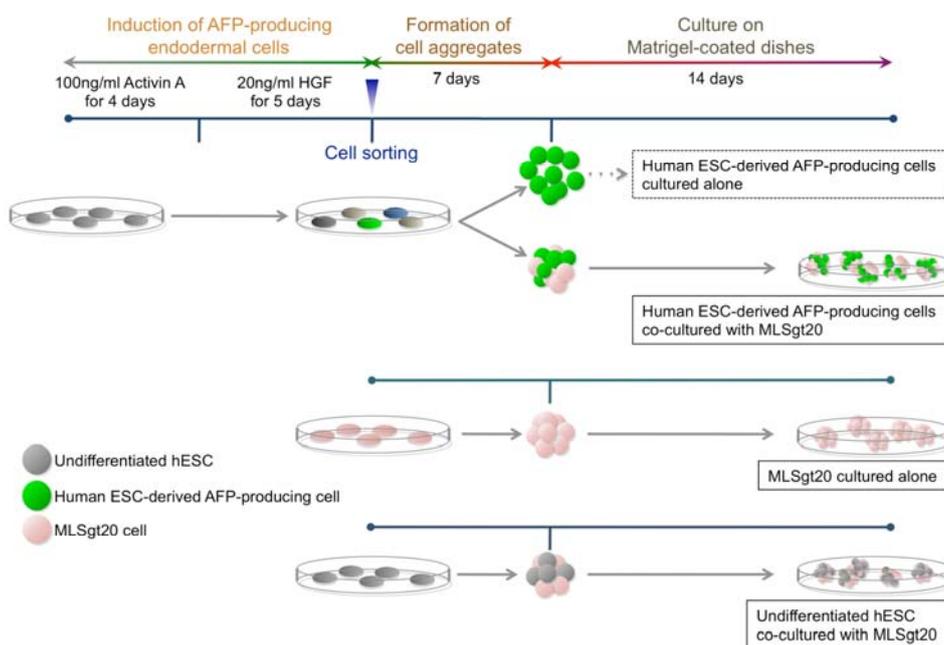


図5 MLSgt20を用いたヒトES細胞分化成熟化法の概要。文献5より引用。

共培養で得られた細胞は2核を有するアルブミン陽性の細胞であり(図6A), RT-PCRにて成熟肝細胞マーカーを発現していた(図6B)。

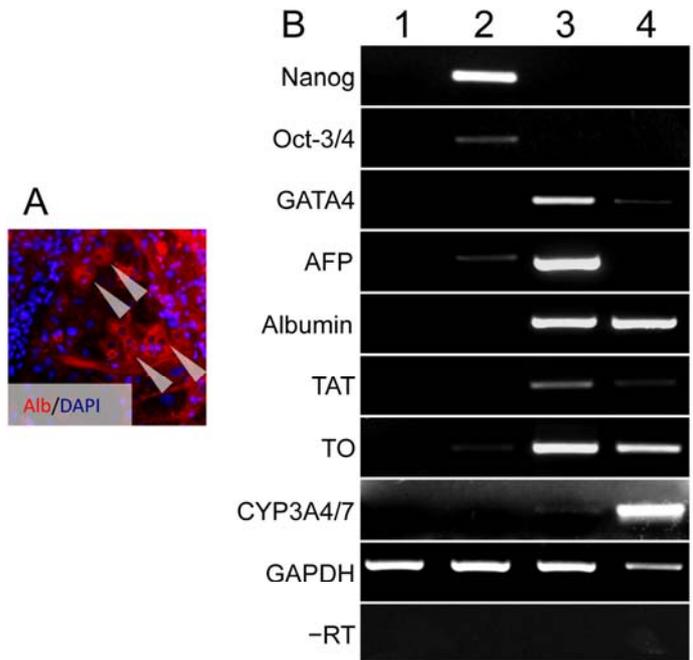


図6 MLSgt20細胞と共培養したヒトES細胞. (A) ヒトES細胞はヒトアルブミン陽性であり、ときに2核の形態を示す(矢頭). (B) RT-PCR. 1; MLSgt20細胞, 2; 未分化ヒトES細胞とMLSgt20細胞の共培養群, 3; MLSgt20細胞と共培養したヒトES細胞由来AFP産生細胞, 4; ヒト成体肝臓.文献5より改変して引用.

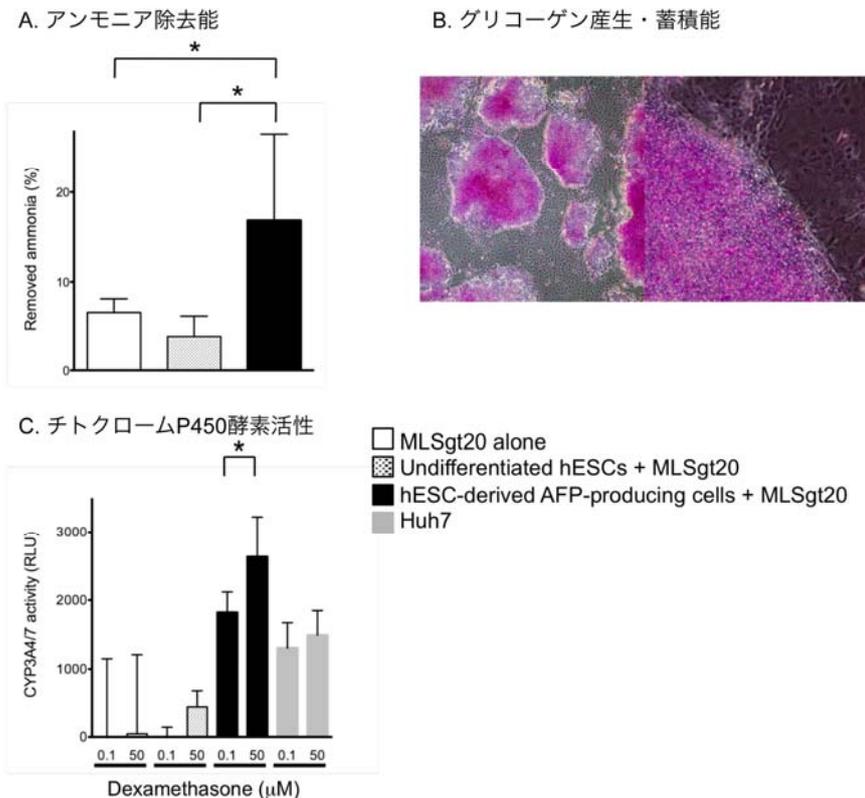


図7 MLSgt20細胞と共培養したヒトES細胞由来肝細胞の細胞機能. (A) アンモニア除去能, (B) PAS染色(赤色被染色部分がグリコーゲンの存在を示す), (C) チトクロームP450酵素活性. 文献5より引用.

さらには肝細胞機能であるアンモニア除去能(図7A)やグリコーゲン産生・蓄積能(図7B)を有していた. また, 高いチトクロームP450酵素活性を持ち, さらにはデキサメサゾンによるチトクローム

P450酵素が約1.45倍誘導されたことから、より生理的な肝細胞機能を有していることが示唆された(図7C)。このチトクロームP450酵素活性はヒト肝臓由来細胞株であるHuh7よりも高いことも示された。一方、未分化ヒトES細胞を直接MLSgt20細胞と共培養しても肝細胞成熟化を示さなかった。以上により、MLSgt20細胞を用いた共培養法により、ヒトES細胞由来初期肝細胞から機能性肝細胞へと成熟させることに成功した^[5]。

参考文献

1. Ishii T, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Baba S, Naito M, Machimoto T, Kamo N, Suemori H, Nakatsuji N, Ikai I. In vitro differentiation and maturation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Exp Cell Res.* 2005; 309(1): 68-77.
2. Kamo N, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Machimoto T, Ishii T, Fujita N, Tsuruo T, Yamashita JK, Kubo H, Ikai I. Two populations of Thy1-positive mesenchymal cells regulate in vitro maturation of hepatic progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292(2): G526-34.
3. Fukumitsu K, Ishii T, Yasuchika K, Amagai Y, Kawamura-Saito M, Kawamoto T, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Ikai I, Uemoto S. Establishment of a cell line derived from a mouse fetal liver that has the characteristic to promote the hepatic maturation of mouse embryonic stem cells by a coculture method. *Tissue Eng Part A.* 2009; 15(12): 3847-56.
4. Ishii T, Fukumitsu K, Yasuchika K, Adachi K, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Ikai I, Uemoto S. Effects of extracellular matrixes and growth factors on the hepatic differentiation of human embryonic stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008; 295(2): G313-21.
5. Ishii T, Yasuchika K, Fukumitsu K, Kawamoto T, Kawamura-Saitoh M, Amagai Y, Ikai I, Uemoto S, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N. In vitro hepatic maturation of human embryonic stem cells by using a mesenchymal cell line derived from murine fetal livers. *Cell Tissue Res.* 2009; *in press.*

② ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その2)幹細胞創薬研究所

ア. ヒト ES 細胞の内胚葉系・肝前駆細胞系への分化誘導

熊本大学・糸研究室で開発された支持細胞(M15細胞)を用いる肝前駆細胞分化誘導法を導入し、ヒトES細胞の内胚葉系・肝前駆細胞系への分化誘導の条件の検討を行った。KhES-1, KhES-2, KhES-3細胞株を支持細胞と共培養した結果、それぞれ肝前駆細胞の分化マーカーであるAFP、肝細胞マーカーのアルブミン、胆管マーカーのサイトケラチン19がそれぞれ免疫染色で陽性となった。また、部分的ではあるが細胞質が高密度で時に二核の細胞も現れ肝細胞に良く似た形態を示した。次に支持細胞へ播種する際のES細胞の細胞塊の大きさを $\sim 40\ \mu\text{m}$ 、 $40\sim 70\ \mu\text{m}$ 、 $70\sim 100\ \mu\text{m}$ 、 $100\ \mu\text{m}\sim$ に分けて分化マーカーをRT-PCRで比較したところ、 $40\sim 70\ \mu\text{m}$ に揃えた場合にAFP、アルブミンの発現が共培養7日目で確認でき早期に分化が誘導されることが認められた。分化マーカーの発現レベルや細胞の形態から、肝細胞分化誘導に用いる細胞株をKhES-3に決定した。KhES-3細胞をM15細胞と共培養すると、肝細胞様の細胞が数多く出現した。これらの細胞を回収しRT-PCRを行った結果、薬物代謝酵素のCYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4、CYP7A1が発現されていることが証明された。これらの薬物代謝酵素の発現パターンは共培養初期に現れ長期間発現が維持されるもの、培養期間途中で現れ消失するもの、培養期間に応じて発現が高くなるもの、の3通りに分かれた。これらの発現プロファイルが長期間高く維持される条件を検討することとし、ウ以下の実験を行った。

イ. マウス胎仔肝臓由来ストローマ細胞株の樹立

(2)②に記したように、肝細胞成熟支持能を持つマウス胎仔肝臓由来ストローマ細胞は初代培養

で調製しなければならず、細胞数の制限や細胞の性質の均一性などの問題点を残している。京都大学石井先生等の方法(Exp. Cell Res., 309: 68-77, 2005)に従ってマウス胎仔肝臓由来ストローマ細胞の初代培養から Thy1、gp38 共に陽性の細胞を得た後、Neomycin 耐性ベクターに組み込んだ温度感受性 SV40-T 抗原遺伝子を Lipofectamine 2000(Invitrogen)を用いてリポフェクション法により導入した。薬剤(G418)添加培地で継代培養することにより SV40-T 抗原遺伝子安定導入細胞株を樹立した。本細胞は低温条件(33°C)での培養で SV40-T 抗原の働きで高い増殖能を有し、継代を続けた後にも分取条件の Thy1、gp38 抗原を保持していた。また、①ウに記されているように、京都大学での解析で本細胞株は共培養下でマウス胎児肝前駆細胞やマウス ES 細胞由来 AFP 産生細胞を成熟肝細胞へ誘導する能力を持つことが明らかになった。このように、本細胞株は不死化後も期待された元々のストローマ細胞の性質を保持しており初代培養で調製することによる問題点は解決できた。本細胞株からクローンを 73 個分離したので、個々のクローンの肝細胞成熟支持能について京都大学でさらに詳細に調べ、より目的に合う細胞を選択した結果、クローン 20(MLSgt20:fetal mouse liver stroma gp38+ Thy1+ cell line clone 20)がマウス及びヒト ES 細胞由来肝前駆細胞を機能性肝細胞へ成熟誘導する能力を持つことが判明した。詳細は前項京都大学の記載を参照。

ウ. ヒト ES 細胞からの肝細胞分化・成熟誘導

ア、イにより当初目標としていた熊本大学と京都大学の技術を融合させ、ヒト ES 細胞由来の肝細胞を高効率に創出する可能性が高い培養条件が整ったので実行に移した。アに示した方法で KhES-3 細胞を肝細胞へ分化誘導を支持する M15 細胞上で共培養を行った後に細胞塊を回収し、さらにイの不死化ストローマ細胞株との共培養を行った結果、支持細胞上では 2~3 週間で発現がピークを迎えその後低下してしまった薬物代謝酵素(CYP1A2、CYP7A1)の発現が促進あるいは維持されていた。また、その他の酵素についても発現が強く促進されたものもあり(CYP2A19、CYP3A4)、本共培養系がヒト ES 細胞由来の肝細胞成熟支持に少なくとも主要な薬物代謝酵素の発現については有効であることが証明された。

M15 細胞との共培養による初期分化誘導条件を検討した結果、M15 細胞、KhES-3 細胞共に播種密度を上げることでアルブミン陽性細胞出現率が高まり分化効率が上がることが確認された。さらにこれらの細胞を回収しコラーゲンコート皿に再播種することにより肝前駆細胞が増殖しアルブミン、OATP1B1 の発現が高まることが分かった。また、M15 細胞上で薬物代謝酵素 CYP3A7 を主に発現していたものがコラーゲンコート皿に植え替え後 CYP3A4 も発現するようになることが PCR 産物の制限断片長多型解析で判明し、発生過程で胎児型 CYP3A7 から成人型 CYP3A4 へスイッチングが見られるのと同様な現象が生じることが認められた。次に、肝細胞初代培養において立体的な構造を取らせる方法で肝細胞としての機能が維持・増強できるとの情報に基づき、三次元培養を試みた。M15 細胞上で肝前駆細胞に初期分化誘導した KhES-3 細胞を回収後、コラーゲンコート皿上に再播種することで肝前駆細胞を増幅した。続いてこの肝前駆細胞と MLSgt20 細胞とを混合し超低接着性のプレートに植え込んだ。この状態で培養すると細胞は互いに集合して集塊を形成し、“スフェロイド”と呼ばれる構造を取るようになった。スフェロイド構造を取った肝細胞様細胞は薬物代謝酵素 CYP3A4 を高く発現する場合があります、本酵素を誘導するこ

とが知られているリファンピシンを投与することにより発現誘導も生じた。しかしながらスフェロイド培養による薬物代謝酵素発現亢進や化合物による発現誘導の再現性は低く、肝モデル細胞としての利用にはさらなる条件検討を要すると考えられた。

一方、M15 細胞との共培養による初期分化誘導、コラーゲンコート皿への再播種による肝前駆細胞の増幅というステップで得られる肝細胞様細胞は肝機能関連遺伝子発現について再現性が高く、大量の肝前駆細胞を調製する方法として発展させることとした。M15 細胞共培養、コラーゲンコート皿再播種で培養した細胞をさらに酵素処理で分散し、新たにコラーゲンコート皿に再播種したところ、スフェロイド状の細胞集塊が形成された。この細胞集塊中の細胞はアルブミン、CYP3A4/7 の免疫染色に強陽性を示し、肝機能保持細胞集団であることが示唆された。CYP3A4/7 陽性細胞の比率は FACS 解析の結果約 10%の割合であった。これらの細胞は薬物代謝酵素 CYP3A4 及び CYP3A7 とともにデキサメタゾン及びリファンピシンにより発現が誘導された。特に成人肝で薬物代謝に主要な役目を果たす CYP3A4 については遺伝子発現誘導とともに酵素活性そのものの亢進も認められた。さらにこの亢進現象は免疫染色で CYP3A4/7 陽性細胞集塊が数的に増えるということで捉えることに成功した。本プロジェクトの目標の一つとするところの創薬基盤研究に資するモデル細胞としての肝細胞に要求される薬剤応答性を備えたものが創出できたといえる。これらの細胞において、多糖類の貯蔵を PAS 染色で、排出型トランスポーター MRP2 活性を特異的基質の排出でそれぞれ確認できている。また、この細胞集塊はヒト ES 細胞用分散液とトリプシンとの段階処理で集塊のまま回収することが可能で機能保持細胞を大量に取得する目処がついた。

エ. 分化誘導技術のヒト iPS 細胞への適用

今回開発された肝細胞分化誘導技術をヒト iPS 細胞へ適用し、その汎用性を確認した。ヒト ES 細胞については KhES-1、2、3 を比較した結果 KhES-3 株が分化誘導効率が高いことが判明し、その後の実験に供した。今回試した iPS 細胞は WiCell 社の IMR90-1、IMR90-4、fskin-1、京大株の 201B7、253G1 の 5 株のうち、IMR90-1、IMR90-4、201B7 を用いた。これらのうち IMR90-4 細胞が最も KhES-3 株と挙動が類似しており、開発された分化誘導法を適用したところ、肝機能関連蛋白質の免疫染色及び遺伝子発現で KhES-3 株に匹敵する結果となった。これにより本研究で開発された分化誘導法が iPS 細胞へ適用であることが判明した。

③ ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その3)熊本大学

ア. マウス ES 細胞を用いた分化誘導の検討

熊本大学では、マウス ES 細胞から内胚葉系の細胞への分化誘導法の技術開発研究を進めてきており、ES 細胞から肝臓を含む内胚葉系の細胞へ分化誘導できる独自の共培養系を開発した(桑ら、国際出願 PCT/JP2005/310324)。

マウス ES 細胞を用いて中内胚葉、胚性内胚葉そして未熟肝臓への各分化誘導のステップについて検討を行った。今年度は特に肝細胞への分化が決定される時期特異的に、分化誘導因子を添加したり除去したりすることにより、肝臓細胞への臓器特異的な誘導条件の最適化に焦点を絞り検討を行った。その結果、支持細胞存在下において、まず肝臓への分化誘導への前段階として、中内胚葉と胚性内胚葉への分化誘導のステップにおいて添加する成長増殖因子、および分

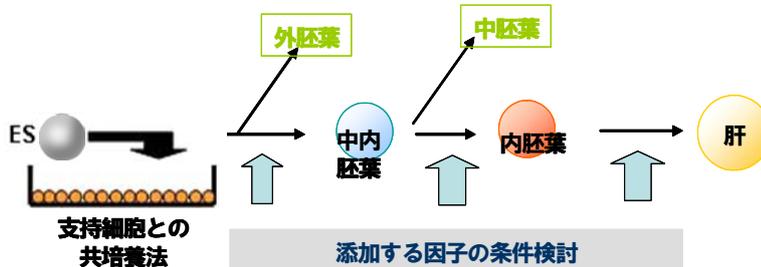
化誘導のタイミングの条件を最適化した。そしてその次段階として、胚性内胚葉から肝前駆細胞を誘導するための培養条件について、添加する因子の濃度、コンビネーション、タイミングを検討した(図1)。

その結果、高い効率で肝前駆細胞への分化誘導を達成できる培養条件を見出した。

誘導された肝細胞の成熟度について分子マーカーの発現により評価したところ、まず分

化誘導後 10 日目には α フェトプロテイン (AFP) 陽性 (+) の肝前駆細胞が出現してくるが、その後 18 日目頃には AFP+, アルブミン (Alb) + の肝芽細胞が検出され、さらに長期培養すると 30 日目頃には形態的にも、遺伝子マーカーの発現からでも区別できる、胆管細胞 (DBA; Dolichos biflorus agglutinin +) と肝細胞 (Alb+) のコロニーがそれぞれ分かれてくるのが観察された。このように、成熟段階の異なる肝細胞が正常発生に沿った形で分化誘導が達成されていることが強く示唆された(図2)。

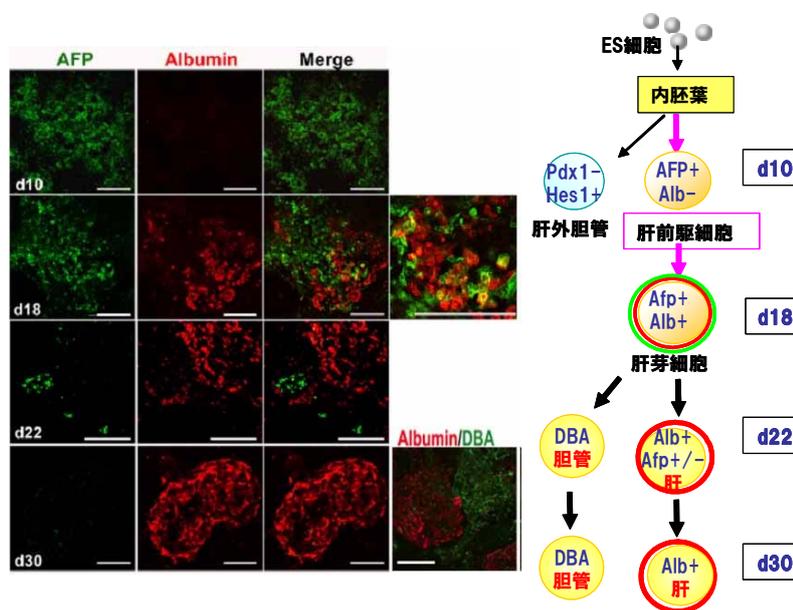
(図1) ES細胞から肝細胞までの分化誘導過程



(図2) 発生に沿った肝、胆管細胞系譜の分化

分化誘導された肝細胞の分化段階を調べるために、免疫組織染色、および real-time PCR を用いて、遺伝子発現について解析を行った。その結果、免疫組織染色法により、Alb 陽性細胞では α 1-trypsin、Cyp3A、Cyp7A1 が発現していることを確認した(図3A)。また、real-time PCR 法により、Alb、Keratin 19 (Krt19)、チトクロム P450 ファミリーの Cyp2b10、

Cyp3a11、Cyp3a13、hydroxysteroid sulfotransferase enzyme (Sult2a1)、UDP-glucuronosyltransferase (Ugt1a1)、organic anion transporting polypeptides (Slco1a4)、bile salt export pump (Abcb11) など解毒作用を有する酵素、チトクロム P450 代謝酵素、トランスポーターが発現していることを確認した(図3B)。さらに、グリコーゲンが蓄積されていることを PAS 染色により確認した(図3C)。



以上の結果を総合して考えると、本分化誘導方法により、分化成熟段階の高い肝細胞が誘導されていることが示唆された。

イ. サル

ES 細胞を

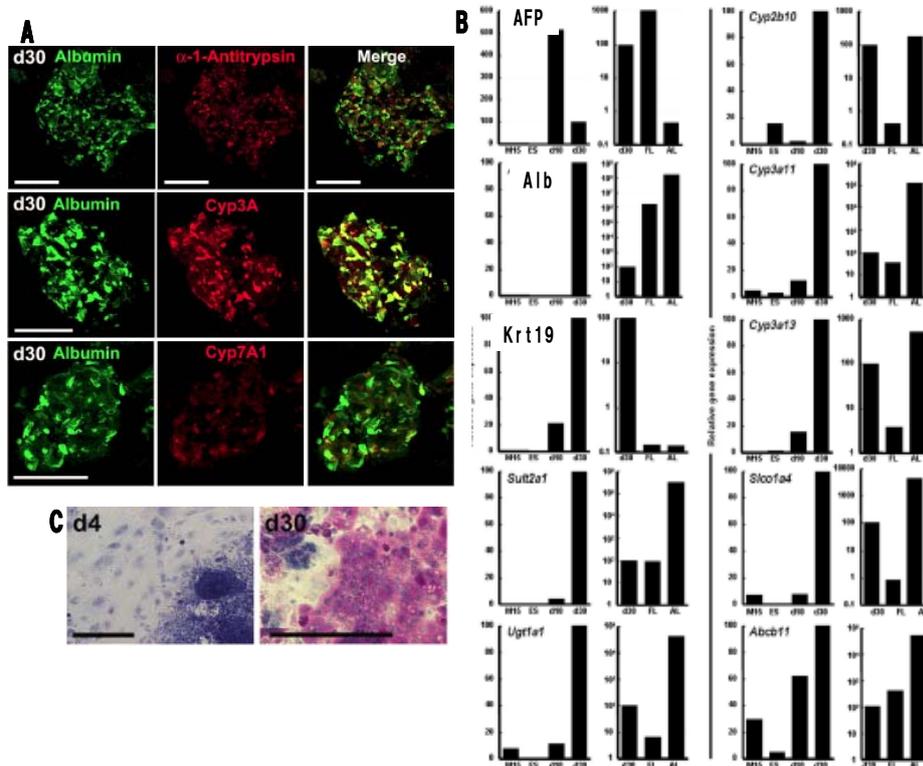
(図3) 成熟肝細胞の分子マーカーが誘導されている

用いた分
化誘導技
術の検討

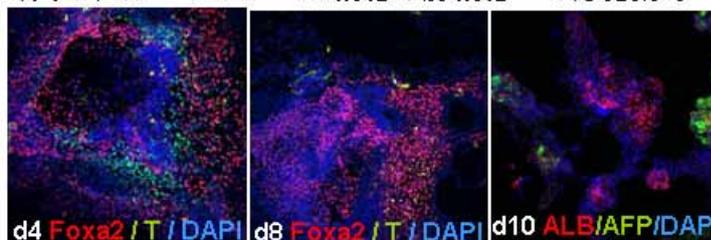
ヒト ES
細胞が使用
できるま
での間、カ
ニクイザル
ES 細胞を
用いて条件
検討を行っ
た。

図 4 には
サル ES 細胞につ
いての
4,8,10 日

目の分化細胞の染色像を示す。10日目にはすでに AFP, Alb 陽性細胞が誘導されている。以上の結果より、サル ES 細胞についても、マウス ES 細胞と同様に支持細胞を用いる誘導法が応用可能であることが明らかとなった。



(図4) カニクイザルES細胞の肝細胞への分化誘導



ウ. ヒト ES 細胞を用いた分化誘導技術の検討

マウス ES 細胞を用いた上記の培養条件を基にヒト ES 細胞を用いて検討を行った。その結果、ヒト ES 細胞の誘導には若干の日程の変更が必要であるが、基本的にはマウス ES 細胞と同様な条件で、正常発生に沿った形で、ヒト ES 細胞から肝細胞への分化したことが分かった。

現在の分化培養条件において、免疫組織染色法により、AFP 陽性細胞が非常に高い効率で分化誘導していることが分った。分化40日目には Alb 陽性の肝細胞のコロニーと DBA 陽性の胆管細胞のコロニーの2つの系譜に分かれる。マウス ES 細胞の場合に比べ、Alb 陽性の肝細胞のコロニーは DBA 陽性細胞のコロニーの割合よりも高いことから、ヒト ES 細胞ではより肝細胞へ分

化誘導されていることを示唆している(図5)。

ヒト ES 細胞から誘導された肝細胞について分子マーカーの発現を real-time PCR 法により検討を行った。かなり多くの分子マーカーの発現が確認できた。グリコーゲンの蓄積を示す PAS 染色が陽性であった(図5)。これらの成果を論文として報告している(Shiraki et al., Genes Cells, 2008)。論文発表後もヒト ES 細胞の分化誘導条件を至適化し、アルブミン分泌能がヒト成人肝初代培養細胞と同程度、10 日間ほど成熟培養でき、リファンピシンに反応して Cyp3A4 活性が上昇するヒト ES 由来肝細胞が得られるようになった(図6)。

以上の結果から総合すると、支持細胞を用いる分化誘導方法はヒト ES 細胞を成熟肝細胞に分化誘導へ分化誘導できることが明らかとなった。なお、この M15 細胞を用いた分化誘導系は従来法 plating 効率が 10 倍よいため、1/10のヒト ES 細胞で十分可能である(図6)。多数の肝細胞を効率よく分化誘導でき、かつヒト ES 細胞にも応用できることで大変有用である。M15 細胞で分化誘導後、第二段階として後述の sBM 基底膜培養基質に接続することで、成熟肝細胞を得ることができることも分かったので、大変有用な肝細胞の培養方法であることが大きな成果である。

(図5) ヒトES細胞の分化誘導

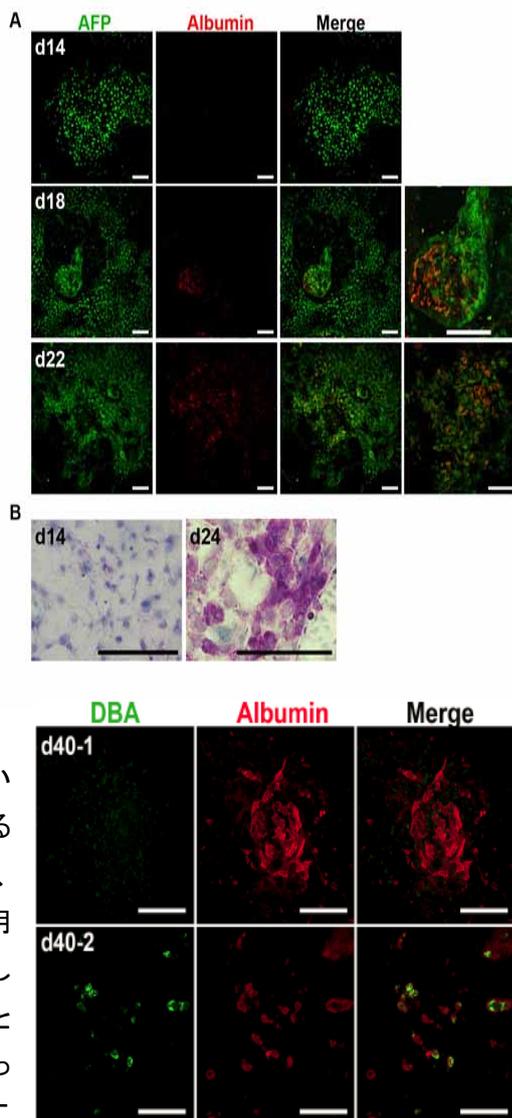
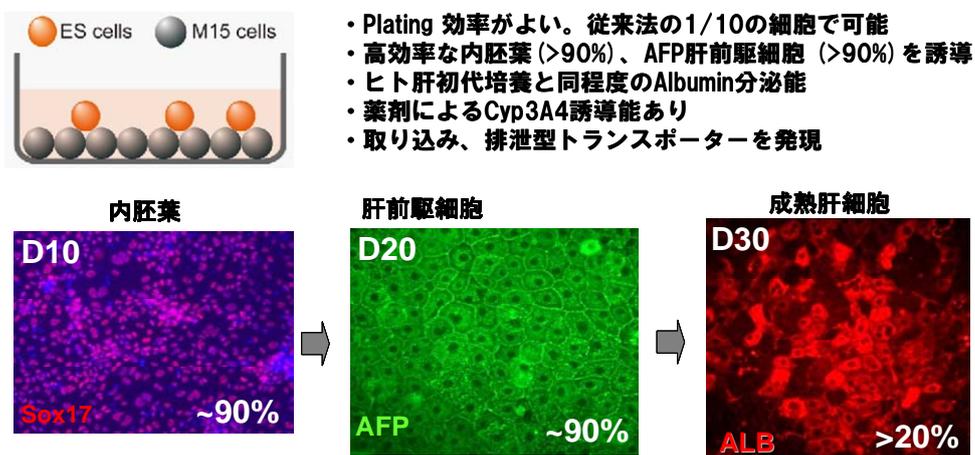


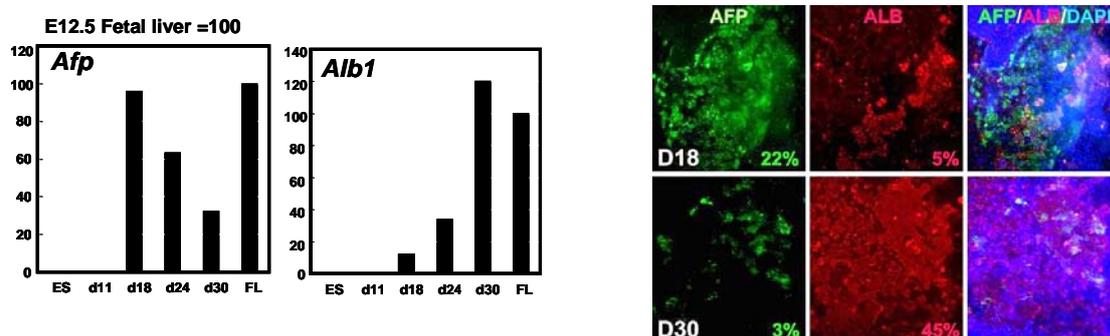
図6. M15細胞によるヒトES細胞から肝細胞の分化誘導



エ. 生きた状態で肝前駆細胞を追跡できる ES 細胞株の作成

肝前駆細胞を追跡できる ES 細胞株を創出するため、アルブミン遺伝子プロモーター200kb 程度を含む BAC クローンを用いて、アルブミンプロモーターの下流に蛍光タンパク質遺伝子(mKO1, monomeric Kusabira Orange1)を挿入した BAC コンストラクトを作成した。これをさらにアデノウイルスベクターに組み込み、埼玉医大三谷先生との共同研究により、ヘルパー依存性アデノウイルスの調製、ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞への導入による、ノックインヒト ES 細胞株及び iPS 細胞株を得た。これらのノックインヒト ES 細胞株から分化誘導した細胞におけるアルブミン蛋白と mKO1 の発現および他の機能分子の発現について検討を行った。

図7. sBM上でマウスES細胞が肝細胞へ分化誘導される



オ. sBMを用いた分化誘導の検討

オ-1. マウスES細胞

環境研の持立先生から提供された、ラミニン10安定発現株を用いた基底膜培養基質の作製技術により開発したsBMを用いて、分化誘導に対する効果について詳細に解析を進めた。sBM上で直接マウスES細胞を分化させることにより、マウスES細胞が効率良く内胚葉へ分化誘導されることを見いだした。図7に示すように、 α フェトプロテインの発現が18日目ピークに減少し、その後アルブミン発現が上昇した。30日目には45%程度のアルブミン陽性細胞が検出される。また、アルブミン分泌量はラット初代培養肝細胞の約1/10程度であった(特願2009-136520「細胞の分化誘導」)。M15細胞上で分化誘導した肝細胞とほぼ同程度であった。活性測定については、肝細胞へのインドシアニングリーン(ICG)の取り込み、肝細胞胆管側膜排泄型トランスポーター(Ntcp, Oatps)の基質であるCholyl-lysyl-fluorescein (CLF)蛍光色素のES細胞由来微細胆管への排出が観察された(図8)。

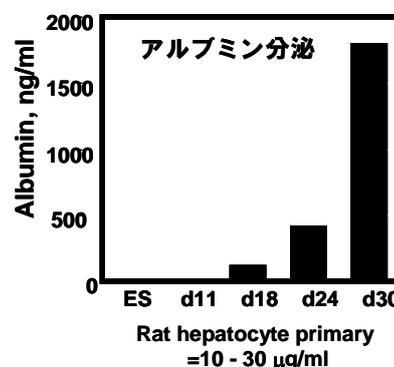
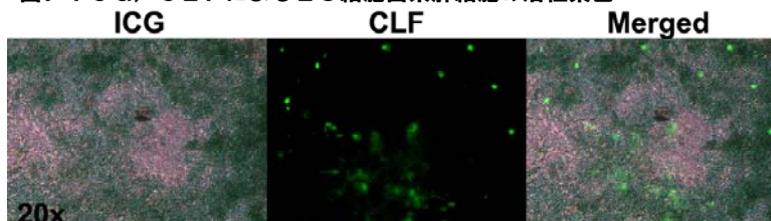


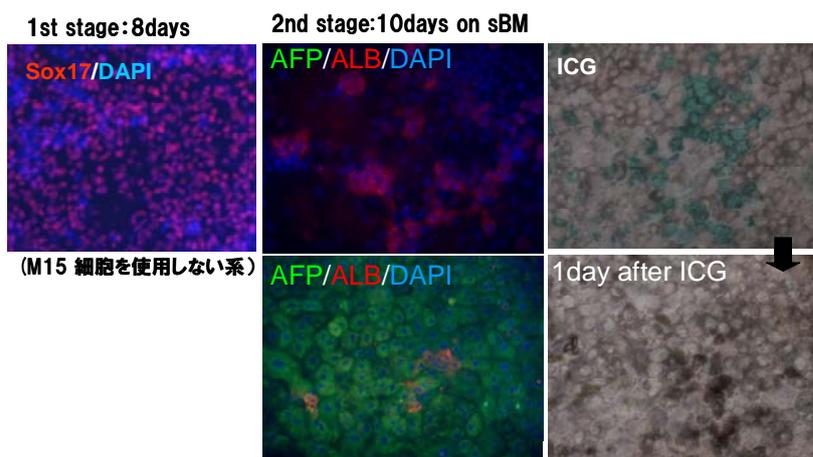
図8 ICG/CLFによるES細胞由来肝細胞の活性染色



オー2. ヒトES細胞の分化誘導

sBM上でのヒトES細胞の分化誘導も試みた。支持細胞を用いない系でまず内胚葉細胞を誘導し、sBM上に播種して10日間培養下細胞において、 α フェトプロテインの発現が見られ、アルブミン陽性細胞もその中に散在して存在した。機能アッセイとして、インドシアニンググリーン色素の取り込みおよびその排出が見られた。従って、支持細胞を使用せずに、sBMを用いることでヒトES細胞から肝細胞が誘導されることが言える。

図9. sBM上でヒトES細胞からアルブミン陽性細胞を分化誘導可能



キ. 人工基底膜の肝細胞への分化誘導における有用性

大阪大学から提供を受けて、肝細胞への分化誘導における特定な基底膜の成分の有用性について評価を行った。

(4) 目標の達成度と意義

① ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その1) 京都大学

これまでの文献報告の大半が単なる肝細胞マーカー発現のみで終わっていることでも示されている様に、ES細胞から肝細胞、特に成熟肝細胞への分化はきわめて困難であった。我々は、胎児肝に存在する間葉系細胞が肝成熟化能を持つという肝臓発生学の知見に基づき、肝前駆細胞ならびにES細胞を成熟肝細胞へと分化せしめる機能を有する細胞株MLSgt20を新たに樹立することに成功した。このような肝細胞成熟化能を持つ細胞株は他に報告がない。さらにMLSgt20細胞はマウス由来の細胞株であるが、ヒトES細胞に対しても肝細胞成熟化能を持つことが示された。本研究において作製されたヒトES細胞由来成熟肝細胞様細胞はチトクロームP450酵素活性を示した。しかも、この酵素活性は酵素誘導薬剤であるデキサメサゾンで増強するなど、生理的な応答を示していた。このような肝細胞機能を有するヒトES細胞由来肝細胞を得たとする報告はまだない。チトクロームP450酵素は肝臓における薬剤代謝の中心を担う酵素であり、この酵素活性を持つヒトES細胞由来肝細胞は創薬研究支援において大きな役割を持つことが予想される。

本研究で確立したMLSgt20細胞株の樹立やヒトES細胞の分化誘導法、肝細胞成熟化法は最終目標を達成していると同時に、世界的に見ても全く独創的かつ有益な成果であると思われる。そのことは本研究の成果がいくつもの国際誌に掲載されていることでも示されている。

② ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その2)幹細胞創薬研究所

中間目標の(1)に挙げているマウス胎仔肝臓由来のストローマ細胞株の樹立に成功し、本細胞株が上記①にあるように、マウス ES 細胞の肝細胞成熟誘導能を持つことが確認できた。これにより、熊本大学の技術でヒト ES 細胞から高効率に分化誘導した肝前駆細胞から必要とされる量の成熟肝細胞を安定して誘導する培養系が確立される目処が立った。

この系を用い、実際に熊本大学の技術で分化誘導したヒト ES 細胞を本ストローマ細胞に移植したところ、本技術開発で最終目標としている創薬基盤研究に資するモデル細胞として指標とする主要な薬物代謝酵素群の発現が強く促進された。これを受けて現在、本培養系で分化誘導された肝細胞様細胞の薬物代謝酵素の活性を測定する段階にあり、中間目標は達成できたと考える。

中間評価で指摘を受けた分化効率について FACS 解析で約 10%の細胞が CYP3A4/7 陽性と実測値を求めることができた。この細胞集塊は選択的に回収可能なので実質的には 100% CYP3A4/7 陽性細胞を得ることができる。また、機能を持った肝細胞として薬剤の影響を評価する系の構築が求められたが、本技術開発において成人肝で薬物代謝に主要な役目を果たす CYP3A4 について、その遺伝子発現並びに酵素活性がリファンピシン、デキサメサゾン投与により誘導されることを捉えることができた。また、多糖類貯蔵能、トランスポーター活性、アルブミン産生能、各種肝機能関連遺伝子発現レベル等を総合的に判断すると本技術開発で得られた肝細胞分化誘導法は、薬剤のスクリーニングに資するモデル細胞の要件をほぼ満たしており、さらに方法の精緻化を図ることで薬剤評価系を構築する基盤は確立できた。最終目標は達成できたと考える。

③ ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その3)熊本大学

中間目標の(1)に挙げているマウス ES 細胞から肝細胞への分化誘導技術の検討では、支持細胞の系はマウスのみでなく、サル ES 細胞についても効率よく肝前駆細胞を効率よく分化誘導したことが確認できた。肝細胞への分化誘導の一連の過程において促進因子、阻害因子についての知見を得た。自然胚発生過程における肝臓発生に関わる因子が、試験管内 ES 細胞を用いた分化誘導の系においても有効であることが確認できた。中間目標の(2)についても、サル及びヒト ES 細胞を用いて成熟肝細胞への分化誘導方法の検討を行った。また、現在の支持細胞を用いた分化誘導方法により、ヒト ES 細胞から成熟度の高い肝細胞が誘導できていることを確認している。従って、中間目標が達成できたと考える。今後は、幹細胞創薬研究所と連携し、誘導された肝細胞の活性測定、遺伝子発現パターンについての検討を行う段階に進められる状況になった。さらに、今後肝細胞系譜を生きた状態で追跡するために、BAC ベクターを用いた肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子コンストラクトを構築した。

本事業では、マウス ES 細胞を用いて、成熟肝臓への分化誘導過程において、各段階での必要な成長増殖因子の条件検討を行った。ヒト ES 細胞を用いて、支持細胞上で成熟化させる培養条