

健康安心プログラム

「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発」

（旧名称：「iPS細胞等幹細胞産業応用促進
基盤技術開発」）

事業原簿（公開版）

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

目次

概要	4
プロジェクト用語集	18
I. 事業の位置付け・必要性について	34
1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性	34
1.1 NEDOが関与することの意義	34
1.2 実施の効果（費用対効果）	35
2. 事業の背景・目的・位置づけ	36
II. 研究開発マネジメントについて	38
1. 事業の目的	38
2. 事業の計画内容	38
2.1 研究開発の内容	38
2.2 研究開発の実施体制	39
2.3 研究の運営管理	41
2.4 研究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメントの妥当性	41
3. 情勢変化への対応	41
4. 中間評価結果への対応	43
5. 評価に関する事項	43
III. 研究開発成果について	44
事業全体の成果の概要	44
III - A 一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム担当分	51
1. 事業全体の成果	51
2. 研究開発項目ごとの成果	59
III - B 独立行政法人産業技術総合研究所担当分	118
1. 事業全体の成果	118
2. 研究開発項目ごとの成果	122
III - C 国立大学法人東京大学担当分	181
1. 事業全体の成果	181
2. 研究開発項目ごとの成果	184
IV. 実用化、事業化の見通しについて	195
IV - A 一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム担当分	195
1. 実用化、事業化の見通し	195
2. 今後の展開	197
IV - B 独立行政法人産業技術総合研究所担当分	199
1. 実用化、事業化の見通し	199
2. 今後の展開	201

IV - C 国立大学法人東京大学担当分	203
1. 実用化、事業化の見通しと今後の展開	203

(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

概要

		最終更新日	平成 23 年 7 月 20 日
プログラム名	健康安心プログラム		
プロジェクト名/ 番号	ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発 (旧名称：iPS細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発)	P08030	
担当推進部/担当者	バイオテクノロジー・医療技術部 担当者氏名 吉羽 洋一 (平成 21 年 3 月 27 日～平成 21 年 9 月 30 日) 担当者氏名 上村 研一 (平成 21 年 3 月 27 日～平成 23 年 7 月 20 日現在) 担当者氏名 大友 純 (平成 21 年 10 月 1 日～平成 23 年 7 月 20 日現在)		
0. 事業の概要	<p>本プロジェクトは、様々な細胞組織に分化できるヒトiPS細胞等幹細胞の産業利用を促進することを目的として、iPS細胞への効率的な誘導因子の探索を行う。同時に、多様な幹細胞操作技術の成果を活用し、iPS細胞の新規誘導法開発に結びつける。また、細胞源としてiPS細胞等幹細胞を一般に供給する上で必要となる、細胞の性質や品質を評価する技術や細胞の安定供給を可能とする基盤技術を確立する。さらに、iPS細胞等幹細胞から心筋などの細胞に効率よく分化させ、これを利用して、開発候補薬の潜在的な致死性不整脈を誘発する可能性を、ヒト個体と高い相関性をもって予測する創薬スクリーニングシステムの開発を行う。これにより、我が国が世界を先導している科学的成果であるiPS細胞等幹細胞を、いち早く産業応用に繋げることが期待できるとともに、創薬研究のより早い段階において、開発候補薬の効率的で的確な絞り込みを行うことが可能となり、創薬研究の短縮や研究開発費の削減、さらにはより安全な医薬品の開発の促進が期待される。</p>		
I. 事業の位置付け・必要性について	<p>幹細胞は様々な組織に分化する能力を有しており、その性質を用いることで神経、心筋、膵臓β細胞等の様々な細胞を試験管内で得ることができる。これを用いることで従来は治療することが困難であった神経疾患や心臓疾患の根本的治療法の開発や、創薬分野におけるヒトの細胞を用いた薬効評価や安全性薬理試験などの創薬スクリーニングに利用できる利点を有する。中でもiPS細胞（人工多能性幹細胞）は、皮膚等の組織から作製可能であることから倫理的な障壁が低く、加えて遺伝的に多様な細胞が得られること、免疫拒絶反応を回避、あるいは軽減可能であること等から、有用な細胞源として期待が大きい。しかし、iPS細胞等幹細胞を産業で利用するためには、細胞の効率的な作製方法、腫瘍化の問題、様々な分化状態が混在したヘテロな分化細胞集団からの標的細胞の評価・選別、品質管理方法の確立、機能発現のための細胞から組織への再構築技術の開発など、様々な解決すべき課題がある。</p> <p>iPS細胞の早期な産業応用が期待される創薬分野においては、近年、研究開発費が大幅に伸びている一方で、新薬の承認数は低下する傾向にある。特に、臨床開発の最終フェーズにおいて、有効性が確認できないことや、安全性等が原因となって開発中止となるケースが増加している。また、従来の非臨床試験及び臨床試験において安全性に何ら問題のなかった薬物でも、市販後において患者に実際に投与されてから初めて致死性不整脈を誘発することが判明したため急遽市場から撤退した事例もある。さらに制ガン剤や抗菌剤などの人体に毒性を持つことが知られている薬剤では、薬効と副作用は表裏一体の関係にあり、ヒトに対する安全域の程度が許容範囲となるかどうかを的確に推測することが開発候補薬として臨床開発に進めるかどうかを判断する上で非常に重要な技術課題となっている。このような事態を改善し、より安全性の高い医薬品を効率良く開発するた</p>		

	<p>めには、創薬研究のより早い段階で、開発候補薬のヒトでの薬効と安全性をより精度高く予測する基盤技術の開発を行うことが求められている。</p> <p>よって、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に、低迷している国内外の創薬業界の活性化とこれにより期待されるバイオ・医療産業の発展に資する重要な課題であり、NEDOが関与し「健康安心イノベーションプログラム」の中の「幹細胞産業応用促進基盤技術開発」の一環として本プロジェクトを実施する。</p>				
<p>II. 研究開発マネジメントについて</p>					
<p>事業の目標</p>	<p>ヒト iPS 細胞等幹細胞の産業利用を促進することを目的として、iPS 細胞への効率的な誘導因子の探索を行うと同時に、多様な幹細胞操作技術の成果を活用し、iPS 細胞の新規誘導法開発に結びつける。また、細胞源として iPS 細胞等幹細胞を一般に供給する上で必要となる、細胞の性質や品質を評価する技術や細胞の安定供給を可能とする基盤技術を確立する。さらに、iPS 細胞等幹細胞から心筋などの細胞に効率よく分化させ、これを利用して、開発候補薬の潜在的な致死性不整脈を誘発する可能性を、ヒト個体と高い相関性をもって予測する創薬スクリーニングシステムの開発を行う。これにより、我が国が世界を先導している科学的成果である iPS 細胞等幹細胞を、いち早く産業応用に繋げることが期待できるとともに、創薬研究のより早い段階において、開発候補薬の効率的で的確な絞り込みを行うことが可能となり、創薬研究の短縮や研究開発費の削減、さらにはより安全な医薬品の開発の促進が期待され、我が国バイオ産業の競争力強化・新産業の創出を図り、国際的優位性を確保する。</p> <p>(1) 最終目標（平成 25 年度末）</p> <p>安全で均質な形質を持ち、高い効率で心筋細胞へ誘導可能なヒト iPS 細胞等幹細胞を活用し、性質と品質がそろったヒト心筋細胞等へ効率的に分化を行い、これを用いて開発候補薬の潜在的な致死性不整脈を誘発する可能性を、ヒト個体と高い相関性をもって予測する、産業上利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。</p> <p>(2) 中間目標（平成 23 年度末）</p> <p>従来法に比べ、より安全で高効率なヒト iPS 細胞の誘導を可能とする新規誘導因子、新たな細胞操作技術を含む新規誘導法を少なくとも 1 つ以上見いだす。また、iPS 細胞等幹細胞や分化誘導細胞の性質を規定する有用なマーカーの開発及び取得したマーカーを活用した選別、評価のための要素技術の開発に目途をつける。さらに、心筋細胞への誘導効率が高い分化技術の開発に目途をつけるとともに、同じ性質を持った細胞を選別し、毒性評価のための創薬スクリーニングツールとして活用する。毒性評価のための創薬スクリーニングシステムについては、ハードウェア及び解析ソフトウェアの試作を完了し、産業上実際に利用できるシステム構成となるよう目処をつける。</p>				
<p>事業の計画内容</p>	<p>主な実施事項</p>	<p>H20fy</p>	<p>H21fy</p>	<p>H22fy</p>	<p>H23fy</p>
	<p>研究開発項目① 「安全かつ効率的な iPS 細胞作製のための基盤技術の開発」</p>				

	研究開発項目② 「細胞の選別・評価・製造技術等の開発」				
	研究開発項目③ 「iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」				
開発予算 (単位:百万円)	会計・勘定	H20fy	H21fy	H22fy	H23fy
	交付金	--	995	855	648
	補助金	1000	--	--	--
	加速予算	--	15	55	--
	総予算額	1000	1010	910	648
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			
	プロジェクトリーダー	財団法人先端医療振興財団先端医療センター センター長 鍋島 陽一 (平成 23 年 3 月 31 日まで) 国立大学法人東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授 安田 賢二 (平成 23 年 4 月 1 日から)			

		委託先	<p>○一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム (JBIC)</p> <p>参画企業 天然化合物ライブラリー提供企業 8社 メルシャン株式会社、田邊三菱製薬株式会社、第一三共株式会社、武田薬品工業株式会社、味の素株式会社、明治製菓株式会社、合同酒精株式会社、財団法人微生物化学研究会</p> <p>技術開発系企業 3社 東レ株式会社、アスピオファーマ株式会社、三菱化学メディエンス株式会社</p> <p>共同研究機関 10機関 独立行政法人産業技術総合研究所 (バイオメディシナル情報研究センター、バイオセラピューテック研究ラボ、器官発生工学研究ラボ)、京都大学 iPS 細胞研究センター、東北大学大学院薬学研究科、大阪大学微生物病研究所、広島大学大学院医歯薬学総合研究科、慶応義塾大学医学部、京都大学大学院医学研究科、京都大学大学院理学研究科、東北大学大学院医学系研究科、東京医科歯科大学生体材料工学研究所</p> <p>○産業技術総合研究所/国立成育医療センター/川崎重工業(株)/大陽日酸(株)/アルブラスト(株)/(株)セルシード連携チーム</p> <p>共同研究機関 東京大学 (2009年4月1日より浅島誠副学長が産総研に異動のため委託先を外れる)、独立行政法人産業技術総合研究所 (糖鎖医工学研究センター)、国立成育医療センター</p> <p>参画企業 4社 川崎重工業株式会社、大陽日酸株式会社、アルブラスト株式会社、株式会社セルシード</p> <p>○東大チーム 共同研究機関 東京大学大学院総合文化研究科、東京大学大学院農学生命科学研究科</p>
情勢変化への対応	内外の研究開発動向に鑑み、研究開発項目①及び研究開発項目②を発展的に統合し、研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」を新たに設定。再生医療への応用を可能とする細胞源の確立を目標として、平成23年度から5年計画で新規に着手した。		
中間評価結果への対応	該当しない		
評価に関する事項	事前評価	なし	
	中間評価	23年度 中間評価実施	

		事後評価	26年度 事後評価実施予定
Ⅲ. 研究開発成果について		<p>研究開発項目① 「安全かつ効率的な iPS 細胞作製のための基盤技術の開発」</p> <p>1. ヒト cDNA 発現ライブラリーから、遺伝子発現調節に関与する転写因子、シグナル伝達系因子をコードする遺伝子群から MEF 細胞を用いて新規 iPS 細胞誘導遺伝子の探索を行い、18 種の新規 iPS 細胞誘導遺伝子を同定した。この中には Klf4 代替機能をもつ 4 遺伝子が含まれており、特に 3 遺伝子 Glis1、Dmrtb1、Pitx2 はヒト線維芽細胞でも Klf4 の代替機能を有しており、三胚葉分化能、キメラマウス作製能、ジャームライトランスミッションも確認できた。更に Klf4 の代替因子として同定した G6 は iPS 細胞作製効率の劇的な上昇をもたらし、c-Myc(M)を除いた山中 3 因子 Oct3/4 (O)、Sox2 (S)、Klf4 (K) (ガン化効率は非常に低い)が iPS 細胞作製効率は低い)に Glis1 遺伝子を組み合わせると、OSK と比較して数百倍の iPS 細胞誘導効率を示すことも明らかとなった。また、iPS 細胞誘導においては偽陽性細胞が発生することが知られているが、Glis1 遺伝子は真の iPS 細胞の取得率を顕著に増大させることも明らかとなった。なお、最近、OSK が相互に結合する報告されているが、Glis1 は OSK と結合することによって相乗効果をもたらしている可能性が示唆されている。</p> <p>2. レトロウイルスベクター等の挿入型ベクターを用いて樹立された iPS では染色体上に残った因子が再活性化される可能性があり、このリスクを解消するために、化合物による iPS の誘導を試み、カビから Klf4 遺伝子の発現を誘導する物質を見出したが、作用については今後の解析が必要である。</p> <p>3. 一方、誘導因子をタンパク質として導入する方法として、セミインタクト細胞リシール法を用いて iPS 細胞の誘導を試みた。GFP-Oct4 とそのプロモーター領域を含む上流配列と共にノックインしたマウスより MEF 細胞を調製し、山中 4 因子のリコンビナントタンパク質 (His-Oct4, GST-Sox2, GST-Klf4, GST-c-Myc) を導入後リシール(再封入)した。また、ES 細胞細胞質の導入など様々なカクテルの可能性を検討した。その結果、4 因子導入のリシール細胞でのみ、1 日目から Oct4-GFP 陽性の細胞が現れ始め、2~3 日後にはその細胞が細胞集団となって増殖して行く様子が観察されたが、コロニー形成はタンパク質導入後 5 日目頃から停止し、その殆どが脂肪細胞様に形態が変化した。本方法では、MEF 細胞の核が山中の 4 因子タンパク質と同時にしかも一気に暴露されることより Oct4、Nanog などが一度に発現してくると考えられるが、iPS 誘導にはそれらの発現時期、発現量の正確なコントロールが必要であると思われ、今後、本方法の利点を活かすには導入因子、その量比の考察等、多面的な検討を必要としている。</p> <p>4. 遺伝子に組み込まれない持続発現型センダイウイルスベクター (SeVdp ベクター) の開発、改良に取り組み、4 つの多能性誘導遺伝子を単一のベクターに搭載した SeVdp (<i>c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2</i>) を用いることによって高効率で、質的均一性が高い iPS 細胞を 3 週間程度で樹立することに成功した。</p> <p>5. 一方、SeVdp の残存が何らかの作用を引き起こす可能性が有り、ウイルスゲノムの除去に取り組んだ。SeVdp ゲノムはゲノム RNA を複製しながら動的な平衡を保っていると予想され、ゲノムを複製する RNA ポリメラーゼの活性を阻害することで除去できると推定し、RNA ポリメラーゼの活性ユニットと考えられる L タンパク mRNA に対する siRNA を用いて発現を抑制すると比較的早い速度で、不可逆的に除去できることが確認された。また、培養条件を検討し、40℃で 1 週間、培養することにより、細胞内の残存ウイルス RNA 量が顕著に減少することや、3 個のエンベロープタンパク質をコードする遺伝子 (M, F, HN) のうち、少なくとも</p>	

も2個の遺伝子を欠損させることによって自立複製可能なベクター粒子の出現を抑えることにも成功し、全体としてセンダイウイルスベクターによる誘導の効率化、安全性に関する多くの成果が得られた。

6. iPS細胞の実用化にあたってはどの組織から細胞を採取するかを考慮しなければならない。これまでiPS細胞は皮膚などの細胞より樹立してきた。今回、全血から単核球を比重分離し、抗CD3抗体、IL2でセレクションしたT細胞に、センダイウイルスベクターを用いて山中4因子を導入することによりiPS細胞の樹立に成功した。本方法は、T細胞提供者に苦痛を与えず、また短期間でiPS細胞を樹立できることから、有効なiPS細胞作製方法である。しかし、T細胞由来iPS細胞はT細胞レセプター遺伝子に不可逆な再構築が起こっており、完全な造血幹細胞を作製できず、T細胞白血病の発症の危険がある。そこで、遺伝子再構成が起こっていない末梢血由来単球細胞からiPS細胞を誘導する方法も併せて開発した。

7. 心筋疾患、遺伝性疾患を始め、多数の疾患特異的iPS細胞の誘導に成功した。これらの細胞を疾患/病態の理解に結びつけるには、的確に分化した細胞を誘導する技術が鍵である。

研究開発項目②「iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

本課題は多面的な解析、開発が必要な段階にあり、複数のグループにより以下に記載するような多面的な研究、解析を進めた。

(1) iPS細胞は株毎にその特性が異なっており、iPS細胞の特性・安全性を確認する技術、使用目的に適したiPS細胞を選定する技術の開発が重要である。そのためには、iPS細胞成立過程の遺伝子発現プロファイルデータと生物学的特性情報を統合したデータ解析アルゴリズムを開発し、樹立されたiPS細胞の特性や安全性を統一的に現す必要がある。本研究ではその基盤となる研究を進め、以下の結果を得た。

1. iPS細胞の生成過程の分子変化を解析するには効率良くiPS細胞を誘導できるシステムの開発が必要であり、その方法の開発を試み、以下の結果を得た。

(a) 始原生殖細胞から山中4遺伝子のうち1種類の遺伝子を導入することで、iPS細胞を誘導できることを見出し、始原生殖細胞に特異的発現する遺伝子と山中4遺伝子との組み合わせによるiPS誘導を検討した。その結果、MEF細胞にPrmt5、Klf4およびOct3/4を導入することでiPS細胞を効率よく誘導することに成功した。(b) c-Mycを導入して樹立したiPS細胞とそれ以外の遺伝子を導入して作製したiPS細胞の遺伝子発現パターンに違いがあることを見だし、c-Mycの意義解明へと進めている。(c) 幹細胞の自己複製、多能性維持に効果のあることが示唆されているシグナル伝達阻害剤の組み合わせを検討し、CHIR 99021 (GSK-3 β inhibitor)、PD325901 (MEK inhibitor) およびA83-01 (TGF- β type-1R inhibitor) を用いることで、遺伝子導入なしに効率的にiPS細胞が誘導できることを見いだした。

2. iPS細胞の生成過程を解析するため、細胞を溶解後、直接cDNAを合成、2回のRNAの増幅によりごく微量の細胞から網羅的遺伝子発現を解析する方法を開発した。この微量解析法では100個の細胞があれば解析でき、かつ、発現パターンは既存の方法と相関性が高いことが確認された。iPS生成過程で形成されるコロニーに含まれる細胞数は100-1,000個程度であり、本手法は今後のiPS化メカニズム解析に威力を発揮すると期待される。

3. 開発された方法によりマウス始原生殖細胞のiPS化過程で変動する遺伝

	<p>子の解析を行い、その過程で1) 分化特性の喪失、2) 多分化能の獲得、3) 多分化能の維持・安定化に関連する遺伝子を見出した。この研究がiPS細胞の特性を評価するマーカー遺伝子の同定、ヒトiPS細胞の解析方法の確立へと発展することが期待される。</p> <p>(2) iPS細胞は株毎にその特性が異なっており、多数の細胞／組織をオリジンとする多種類のiPS細胞を樹立し、遺伝子、糖鎖、形状、核型、エピジェネティクス等の各種性状からiPS細胞間の性質を比較し、iPS細胞標準化技術の開発を試みた。</p> <p>1. 4因子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入する方法によりヒト羊膜由来iPS(8細胞株)、ヒト子宮内膜由来iPS細胞株(4細胞株)、ヒト胎盤動脈由来iPS細胞株(4細胞株)、ヒト胎児肺組織由来繊維芽細胞iPS細胞株(3細胞株)を樹立、提供した。各細胞について、継代数5~10代、10代以上、さらに20代以上を経た細胞を供給した。</p> <p>2. これらの細胞の遺伝子発現解析、細胞表面糖鎖解析に供し、更にこれらのデータのバイオインフォマティクス解析を進め、細胞の樹立・培養方法が安定しており、安定供給、大量調整、保存技術の開発に貢献することができた。</p> <p>3. 開発してきたレクチンアレイを更に改良し、幹細胞評価に適するレクチンレパートリーを加え、96種類のレクチンを固定化した高密度レクチンアレイを開発し、iPS細胞誘導に伴うレクチンの変化を解析した。その結果、9種類のレクチンはiPS細胞で高いシグナルを示し、29種類のレクチンシグナルの低下が観察された。また、35種類のレクチンを糖鎖結合特異性に基づいて6グループに分類して、iPS誘導に伴う糖鎖構造の変化を抽出した。これらの結果を総合して、iPS細胞判別能向上、iPS新規マーカー発見に成功した。</p> <p>4. 各種iPS細胞の遺伝子発現プロファイルの網羅的解析、ならびにそのクラスタリング解析を行い、iPS細胞の未分化状態の判別及び分化指向性を解析した。特にばらつきの要因として樹立方法、親細胞、培養方法、継代数を解析し、(a) 2520種類のiPS細胞特異的な遺伝子マーカーを同定し、(b) これによりiPS細胞の性質に関与すると推定される親株毎の違いを見分けることに成功し、更に(c) 同一親株由来のiPS細胞株間の違いを見分けることにも成功した。また、(d) 継代による遺伝子発現の変化も確認された。なお、(e) 誘導したiPS細胞が由来細胞、作製方法などによるクラスターを形成する傾向も観察され、遺伝子発現パターンの網羅的解析がiPS細胞の分別標準化の有用な指標になることを示唆し、安定大量供給のための条件検討に大きく貢献する結果となった。</p> <p>5. 118種のiPS細胞のDNAマイクロアレイ解析データに基づき、特異的パスウェイ解析を行い、28のヒトiPS細胞特異的制御ネットワークを同定した。また、レクチンアレイ計測データと併せてヒトiPS細胞特異的な13の糖鎖転移酵素を同定した。</p> <p>(3) エピゲノムの変化はiPS細胞誘導の分子基盤であり、また、iPS細胞、幹細胞の生物学的な性質の理解、機能解析には、染色体の状態、エピゲノム解析が必須であることから、産総研チーム、東大チームによってその基礎研究を進めた。</p> <p>1. iPS細胞の核型解析、染色体解析のための細胞調製法の最適化、評価法を確立した。また、iPS細胞解析の鍵の一つであるエピジェネティクスの解析を進めるために、ヒト全ゲノムから27000カ所のCpGサイトの解析ができるアレイシステムを用いて、メチル化状態の解析を進め、iPS細胞評価法の開発を進めた(産総研)。</p> <p>2. エピジェネティクス解析を効率よく進めるための独創的な方法論の開発</p>
--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

を進め、体細胞、ES細胞、iPS細胞のゲノムの状態を解析し、その特徴を明らかにした。山中4因子によって誘導されたiPSはESとはメチル化パターンが異なっていると判断され、iPS誘導の分子基盤解析に役立つデータと考えている(東大)。

(4) iPS細胞自動培養装置による、安定供給・大量調製・保存技術の開発を目指して研究を進め、(a) 20継代以上にわたってヒトiPS細胞を自動連続培養装置で培養を継続すること、(b) 未分化のiPS細胞コロニーを判別し、選択的に剥離すること、(c) 10代以上にわたってヒトiPS細胞を酵素処理せずに継代培養すること等に成功した。また、(d) iPS細胞を凍結保存し、解凍後に平均生存率50%以上を達成できた。これらの成果はiPS細胞クローンを選別し、継代培養を自動的に進め、大量に培養すること、また、得られた細胞を安定に供給・保存する事が可能である事を示している。

(5) 幹細胞の医学応用は多面的であり、目的に最も相応しい細胞、分化誘導技術の開発を必要としており、その一環として成体由来幹細胞の可能性を検討し、ヒト成体由来の多能性幹細胞「Muse細胞」を発見し、その培養法を確立し、以下の結果を得た。

Muse細胞は、(a)3胚葉(内胚葉、外胚葉、中胚葉)の細胞に分化する能力を有する、(b)ヒト成体からSSEA-3をマーカーにしてセルソーティングにより簡単に分離することができる、(c)腫瘍性増殖を示さないが、特定の培養法により増殖させることが可能である、(d)ストレス耐性である、(e)劇症肝炎、脊髄損傷、筋変性等の各種モデル動物にMuse細胞を静脈内投与すると、損傷組織に遊走、正着し、遊走先の細胞に分化し、組織再生に寄与する、などの特徴を有する。Muse細胞は組織再生、損傷治癒、正常組織の再構築等において重要な役割を果たしていると推定され、その分子機構の解明、医学応用の可能性を検討することが今後の課題であり、その基盤となる研究の発展が期待される。

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

新規化合物の毒性を早期に確認することは新規薬剤開発の重要なステップであるが、特にQT延長、不整脈の発生等、心毒性、心筋細胞への影響を調べることは重要である。本プロジェクトではESあるいはiPS細胞から誘導した心筋細胞を用いて心毒性を効率よく検出するシステムの開発に取り組み、以下の成果を得た。

③-1 (a) ヒト iPS 細胞から効率よく心筋細胞を分化誘導する方法の開発

1. 心筋細胞を安定的に大量に供給するため、心筋細胞の発生メカニズムを調べ、心筋細胞はその発生過程でG-CSFの分泌が上昇し、また、その受容体であるG-CSFRの発現が顕著に増加し、自らその信号を受け取り、細胞増殖を誘導している事を示した。

2. ES細胞、iPS細胞由来の心筋細胞も同様の機構で著しく増殖することを観察した。また、投与時期、投与濃度の調節により、その増殖を調節できる。この成果は、心筋細胞に分化させることが難しいことが知られているヒトES細胞、あるいはヒトiPS細胞から心筋細胞を作成し、創薬のスクリーニングや再生医療に応用する際の鍵となる技へと発展すると期待され、心臓再生医療実現の大きな一歩と考えられる。

③-1 (b) スクリーニングシステムへのヒト iPS 細胞由来心筋細胞の供給

ヒトの心筋細胞を用いたスクリーニング系が待ち望まれており、ヒトiPS細胞

由来心筋細胞を用いたスクリーニング系を確立するため、定期的に東京医科歯科大学安田研にヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を供給し、MEA (Microelectrode Arrays) 法による活動電位の計測を行った。また、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いる事により、心筋細胞特異的 Na 電流、K 電流、Ca 電流を記録し、更に特異的チャンネル阻害薬により電流が阻害されることを確認し、評価班のユーザーフォーラムへ評価用心筋細胞として供給している。

③-2 (a) 心筋毒性を検出する装置システム (ハードウェア) の開発

1. ヒト細胞を利用して、バイオチップ上に心臓組織のネットワークモデルを構築して計測することができれば、ヒト個体の不整脈発生/心機能異常のモデルとして利用できる可能性がある。そこで、ヒト iPS 細胞等幹細胞からヒト心筋細胞を誘導し、これをチップ上に1細胞単位で構成的に配置することで、細胞間の興奮伝導や協同性 (コミュニティ・エフェクト) をチップ上に再現できる臓器・組織の応答をモデル化した *in vitro* 細胞ネットワークモデル (*quasi-in vivo* 系) を構築し、これを用いて致死性不整脈発生の発生原因となる心筋細胞間の興奮伝導の異常発生を直接定量的に観測できる創薬スクリーニングシステム (オンチップ・リエントリーモデル) の開発をめざした。その結果、「細胞ネットワーク興奮伝導 (空間伝達)」「1細胞波形ゆらぎ (時間変化)」の2つの観点を実現するチップの試作に成功し、更に多面的な課題を解決した第2世代装置システムの開発へと進んでいる。

2. 創薬スクリーニングシステムを実用化するためにはハードウェア (装置システム) の開発に続くソフトウェア (プロトコル) 開発を必要としており、(a) 1細胞レベルでの細胞外電位遅延 (FPD) 応答の「時間的ゆらぎ」計測法の開発とその評価、(b) 細胞ネットワークを用いた心室 (ST 領域) 「興奮伝導」の「空間伝導ゆらぎ」計測法の開発、(c) 強制拍動刺激系を用いた「時間ゆらぎ」「空間伝導ゆらぎ」計測法の開発を進めた。

③-2 (b) 解析・判断プロトコル・データベース (ソフトウェア) の開発

上記で開発した装置システムを利用して、薬物のヒトでの致死性不整脈誘発リスクの大きさを推定できる装置システムのプロトコル開発を行った。具体的には、(a) ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた既存 *in vitro* 計測法による偽陰性・偽陽性検査の改善の定量的評価、(b) 「時間ゆらぎ」とイオンチャンネルブロックの相関計測による「ゆらぎ」についての原理的解明、(c) 1細胞レベルでの細胞外電位遅延 (FPD) 応答の「時間的ゆらぎ」計測法の開発とその評価、(d) 強制拍動刺激系を用いた「時間ゆらぎ」「空間伝導ゆらぎ」計測法の開発、(e) ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いたトラフィッキング計測技術の開発を進め、正確で再現性のある装置システム、ソフトを開発しつつある。

③-2 (c) システム評価

ヒト臨床データと極めて近い試験結果を供することが期待されるヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞を用いて、開発システムの有効性を検証することを目標に設定した。

1. 既に *in vitro*/*in vivo* 試験から薬効が明らかにされている化合物を用い、開発システムのデータとこれまで取得された試験データの比較を行うために、(a) 東京医科歯科大技術の技術トランスファーを実施し、(b) 致死性不整脈 (TdP) を誘発するリスクの大きさが判明している薬剤を含む15薬剤、(c) Na⁺、Ca²⁺、K⁺チャンネルブロッカー、(d) hERG 偽陽性薬剤の評価を進め、(e) ヒト幹細胞由来モデル心筋の性状評価、比較を行った。

2. これらのデータに基づいてユーザーフォーラムの構築、製薬企業等との

	<p>情報交換を進め、同時にメガファーマとの交流と技術共同評価を進めた。この結果、当初目標としていた薬剤について、その評価を完了させた。</p> <p>3. この技術を三菱化学メディエンスに導入し追試に成功し、複数拠点での相同性確認にも成功した。</p> <p>4. 動物実験との比較評価を行い、本プロジェクトにて開発した2次元 FPD マップによる評価で十分に既存計測法と同等以上の精度での評価が可能であることを確認することに成功した。</p> <p>5. 国内外の製薬企業との情報交流、ビップファーマとの共同評価を開始しており、製薬企業が希望する化合物についての評価を推進している。</p>		
	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="472 551 759 624">論文/文献/学会発表等</td> <td data-bbox="759 551 1361 624">「論文/文献」121件、「学会/研究会」119件</td> </tr> </table>	論文/文献/学会発表等	「論文/文献」121件、「学会/研究会」119件
論文/文献/学会発表等	「論文/文献」121件、「学会/研究会」119件		
	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="472 624 759 698">特 許</td> <td data-bbox="759 624 1361 698">「出願済」14件（うち国際出願6件）</td> </tr> </table>	特 許	「出願済」14件（うち国際出願6件）
特 許	「出願済」14件（うち国際出願6件）		
	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="472 698 759 795">その他の外部発表 (プレス発表等)</td> <td data-bbox="759 698 1361 795">「新聞/マスコミ」43件</td> </tr> </table>	その他の外部発表 (プレス発表等)	「新聞/マスコミ」43件
その他の外部発表 (プレス発表等)	「新聞/マスコミ」43件		
<p>IV. 実用化、事業化の見通しについて</p>	<p>研究開発項目① 「安全かつ効率的な iPS 細胞作製のための基盤技術の開発」</p> <p>①-1 新規多能性誘導因子の探索</p> <p>新規 iPS 細胞誘導因子に関する特許出願 6 件(米国仮出願 4 件、PCT 出願 2 件)、高効率な iPS 細胞誘導法で米国仮出願を申請しており、知財確保を行っている。これらの知財のライセンスングについても検討しており、市場ニーズは大きい。現在、新規因子で作製されたマウスの長期の発がんテストを行っており、成果の実用化の可能性は極めて高い。</p> <p>①-2 多分化能誘導法を効率化する化合物の探索</p> <p>Klf4 プロモーター活性化化合物に関しては、現在専門家が詳細な検討を進めている。本検証において、有効性が確認された場合、マウス ES 細胞と同等な性質を持った、霊長類初の ES 細胞の確立が可能となり、市場ニーズは極めて高いと考えられる。</p> <p>また、センダイウイルス除去法に関しては、詳細な検証を①-3 グループで進めているが、再生医療での応用を考えないのであれば、開発した手法で十分応用が可能と考えられる。また、センダイウイルス除去物質に関しては、現在最終的な活性を確認中であるが、有効な活性が認められれば今後継続するグループへ予算に応じて提供することも可能である。</p> <p>①-3 安全な遺伝子導入法の開発</p> <p>安全な遺伝子導入法の実用化の進捗状況としては、産総研が開発した iPS 細胞作製用 SeVdp ベクターは、22 年度は iPS4 拠点の 1 つ東京大学・医科学研究所で評価が開始された。それに続いて 23 年度からは京都大学・iPS 細胞研究所での評価も開始される予定で、実用化に向けた評価は順調に進捗している。今後は、これらの専門家からフィードバックされた評価情報と、産総研独自の研究成果とを組み合わせ、さらに実用化に向けた改良を重ねる予定である。</p> <p>これまでは数多く樹立した iPS 細胞からごく少数の分化能が高い iPS 細胞を選び出す必要があったため、医療や創薬への応用はなかなか実現せず、いったん完成した良質の iPS 細胞を多くのユーザーが使うという状況であったためベクターそのものの市場ニーズが高いとはいえなかった。しかし、SeVdp ベクターが iPS 細胞作製の標準法として実用化されれば、個々の患者の末梢血から均質な iPS 細胞を樹立して医療や創薬・基礎研究に応用することが現実のものとなり、受託事業としても一気に普及することが期待されるので、幅広いニーズがあると予想される。</p>		

る。実際に、論文発表後は海外からの問い合わせもあるので、日本標準ではなく世界標準にできるように頑張りたい。

SeVdp ベクターによる iPS 細胞の作製は産総研独自の特許に基づく成果であり、他に例をみない効果を持ったシステムなので、実用化できる可能性は極めて高い。ただ、この分野は非常に競争が激しく、新たな技術が出て成果はすぐに陳腐化してしまう恐れがある。常に世界のトップレベルの成果を目指して今後とも気を許さずに研究を続けたい。

①-4 iPS 細胞の安定供給・大量調製・保存技術の開発

(1) iPS 細胞大量調製の自動化技術の開発

川崎重工業株式会社、独立行政法人 国立成育医療研究センター

iPS 細胞の自動培養機能については、先ずは一括方式（すべてのコロニーを継代する）にて継代するプロトコルを、川崎重工業製の自動培養装置のソフトウェアに組み込んだ。使用を希望する顧客に対しては、開発中の製品であるとの条件付で、使用いただくことにしている。より完成度が上がった段階で、正式に製品仕様に組み入れたい。その時期は 2011 年度後半を予定している。

(2) ガラス化法等を用いた iPS 細胞の自動凍結保存技術の開発

太陽日酸株式会社、独立行政法人 国立成育医療研究センター

これまでのプロジェクトの成果で、ヒト iPS 細胞でも緩慢法による予備凍結を経て凍結保存可能であることが判明した為、予備凍結から凍結保存、解凍まで可能な凍結保存装置の自動化は比較的短時間で実現可能と考えられる。さらに今後 iPS 細胞安定供給の実用化に向けた装置開発は、他品種のヒト iPS 細胞での評価及び、自動培養装置との連携、装置小型化に向けての開発を経て数年後には実現可能と考えられる。

(3) 安定供給・大量調製に適した温度応答性培養器材の開発

株式会社 セルシード、川崎重工業株式会社

本研究によって検討を行った iPS 細胞培養に適した温度応答性培養器材の製造条件を最適化することにより、iPS 細胞用の新たな培養器材としての製品化が見込まれる。

研究開発項目② 「iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

iPS細胞等幹細胞やそこから誘導した分化誘導細胞の性質を規定する有用なマーカーの開発及び取得したマーカーを活用した選別、評価のための要素技術の開発は、安定した一定基準の分化細胞を再生医療等に供給するためには必須の開発項目である。研究開発項目②では、これらのマーカー探索を実施しているが、そのアプローチは先端科学を応用した方法により行っている。ひとつはモデル細胞系を用いる遺伝子発現解析を網羅的に行い、細胞の性質や特徴を評価し、選別するために有用なマーカー遺伝子を開発することである。もうひとつは、新たに見出された Muse 細胞を用いて、細胞学的あるいは構造蛋白的な解析を行い、細胞の性質や特徴を評価し、選別するために有用なマーカー物質の確立を目指している。

②-1 高感度 DNA チップを用いた発現解析技術を基盤とした iPS 細胞の選別・評価・製造技術等の開発

モデル iPS 細胞において遺伝子導入後の初期遺伝子発現の解析が進んだので、今後ヒト iPS 細胞等で変化の普遍性を追及していく。すなわち、1) 分化特性の喪失、2) 多分化能の獲得、3) 多分化能の維持・安定化に関連する遺伝子に焦点を絞り、マーカーとなりえる遺伝子の選択を行う。このことにより、遺伝子導入後のリプログラミング過程を明らかにしていくことが可能となる。

マーカー遺伝子を同定してもそれを実用化するには多くの問題がある。特に iPS

細胞化過程の細胞がごく少数であるため、微量細胞からの網羅的遺伝子発現解析を行う技術の開発が必要となる。現在までに1,000個の細胞から、網羅的に遺伝子発現解析を行う技術を完成している。iPS細胞生成過程で形成されるコロニーの数は100-1,000個程度であり、コロニー毎に網羅的遺伝子発現解析することが重要であることから、本手法は今後のiPS細胞化メカニズム解析に威力を発揮すると期待される。

②-2 成体由来の多能性幹細胞の操作技術を基盤とした iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発

成人ヒトの間葉系細胞から新たな多能性幹細胞 Muse 細胞を見いだした。Muse 細胞は損傷組織に遊走、生着、分化し、組織修復に寄与することが明らかになった。多能性がありながら腫瘍性の無い Muse 細胞の特性は再生医療等の細胞移植において有効であると期待される。Muse 細胞の性質を解明することで再生医療等への応用の可能性を高めていく。

iPS 細胞のもつ最も画期的な臨床的側面は、さまざまな疾患の患者から皮膚などの組織を用いて疾患特異的 iPS 細胞を樹立できることである。疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究を進めるためには患者の病態を反映するような評価系を構築することが最も重要である。疾患特異的 iPS 細胞を用いて、患者の罹患している臓器の細胞に分化させ、その過程を分析することにより疾患の病因、病態解析につながると考えられる。この疾患モデル細胞は新規薬剤の開発、毒性の検定などに応用される。

②-3 iPS 細胞の各種性状解析

(1) 由来の異なる iPS 細胞の樹立

独立行政法人 国立成育医療研究センター

我々が樹立した iPS 細胞については、既に一部については医薬基盤研究所の細胞バンクに寄託しており、利用可能となっている。さらに今回新たに樹立した iPS 細胞についても順次公的バンクへの寄託を進め、バンクを通して希望する研究機関への配布を行っていく。

(2) iPS 細胞における遺伝子発現プロファイルの解析と特異的遺伝子マーカーの探索

独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター

研究ツールにすぎない iPS 細胞を真に社会に役立てるためには、iPS 細胞の規格を決定することが必須である。そして、本研究成果は iPS 細胞のみならず ES 細胞及び間葉系幹細胞を規格化する上での効果的な指標となる遺伝子マーカーを同定した。本研究はこれまでにない多くの幹細胞株を元に算出したものであり、汎用性も高く、ソフト化などの実用化の可能性は極めて高い。

(3) システム生物学的アプローチによる iPS 細胞における特異的パスウェイ及びマーカーの探索

独立行政法人 産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター

本課題で確立した少数分子候補絞り技術は、汎用性を持つ。絞り込みに際する利用者の設定項目は、1つの有意確率の設定のみであり、様々な状況で計測されたデータに関して適用可能である。適用を重ねることで、頑強な少数分子候補の安定的な選定が可能であり、実験検証のプロセスとの継続的な協調が可能である。また実際、本技術の適用可能性の検証のため、脂肪分化、糖尿病、大腸がん等の少数分子候補の選定を行い、実験検証段階にある。

以上のように、実験検証の結果を待つ必要はあるが、技術自体はほぼ確定しており、ソフトウェア化の段階に至っている。

	<p>(4) iPS 細胞の染色体安定性の検証 アルブラスト株式会社 (H21 年度まで) 独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 研究ツールにすぎない iPS 細胞を用いて、特に再生医療をゴールとして産業応用を進めるには、iPS 細胞の核型が正常であることを簡便に確認できるシステムを確立する必要がある。本研究の成果は核型解析の標準プロトコールとして実用化の見通しがある。</p> <p>(5) iPS 細胞のエピゲノム情報の解析 川崎重工業株式会社、 独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 本研究で得た、これまでに例を見ない数の iPS 細胞等幹細胞からのエピゲノムに関する基礎データは他の実施項目において得られる「遺伝子発現データ」「レクチンアレイデータ」と共に、幹細胞の性質である分化指向性を予測するためのデータの一つとして実用化されうる。</p> <p>研究開発項目③ 「iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」</p> <p>③-1 iPS 細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発 健常者および遺伝性 Q T 延長症候群由来のヒト iPS 細胞由来の樹立と心筋細胞への誘導は順調に経過しており、実用化は直前の状態まで進んでいると考えられる。これまで製薬業界では薬剤開発の際に、CHO 細胞等に hERG 遺伝子を発現させた細胞を用いて Ca⁺、Na⁺、K⁺ イオンチャンネルの内 K⁺ チャンネルへの作用を見ることで、薬剤の催不整脈作用を判定してきた。いままで用いられてきた動物細胞ではなくヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を用いることにより、hERG 試験の精度が向上することが期待できる。更に今回の研究で本邦初の健常者、遺伝性 Q T 延長症候群の心筋細胞が流通すれば、各種イオンチャンネルに対する作用を見ることも可能になる。</p> <p>③-2 iPS 細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発 すでにプロトタイプシステムは第2世代機プロトタイプまで完成しており、評価班での評価も進んでいる。引き続き、評価班、ユーザーフォーラム、外部製薬会社にプロトタイプを実際に評価してもらいながら、使用に際するさまざまな問題点のフィードバックを受ける。そのフィードバックを基にユーザーフレンドリーでより精度の高い実用機（第3世代機システム）の開発を目指す。更に国際標準化組織である HESI や ICH 等での標準化についての検討対象となることで国際機関とともに標準化を目指すとともに、並行して国内外の有力製薬企業と実用化評価を共同で行い、実質的に世界標準の心筋毒性試験とすることを目指す。すでに実用化されている既存動物実験（AV-block 犬モデル）と同程度以上の精度での結果が得られたことから、現状の技術においてすでに、成果の実用化の可能性は充分高いと思われる。そのためには、最適細胞、システム構築、システム評価を行う共同研究グループが協力して目標を達成することが必要である。創薬という観点では心毒性検査市場の規模は100億円—300億円以上あると考えられる。</p>
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

V. 基本計画に関する事項	作成時期	平成 21 年 1 月、制定
	変更履歴	平成 23 年 1 月改定。内外の研究開発動向に鑑み、研究開発項目①及び研究開発項目②を発展的に統合し、研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」を新たに設定。再生医療への応用を可能とする細胞源の確立を目標として、平成 23 年度から 5 年計画で新規に着手すべく改訂。なお、平成 22 年度補正予算により前倒しで着手。

プロジェクト用語集

[プロジェクト用語集] (一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム担当分)

項番	分類	用語	説明
001	①-1	BacMam 粒子	導入するマルチ遺伝子プラスミドがバキュロウイルスの外皮蛋白質で包込まれた粒子。
002		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。
003		マルチ遺伝子発現プラスミド	発現可能な複数個の遺伝子を一分子プラスミド上に構築したもの。
004		リポフュクシオン法	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。
005		レポーターアッセイ	遺伝子の発現を可視化することにより、容易に検出する方法。ルシフェラーゼや蛍光タンパク質遺伝子を、検出したいプロモーター下流に組み込み、細胞へ導入して用いる。
006		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。
007	①-3	EGFP	緑色蛍光タンパク質 (Enhanced Green Fluorescent Protein) の略称。遺伝子発現の検出に使われる。
008		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。
009		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。
010		KO	橙色蛍光タンパク質 (Kusabira Orange) の略称。EGFP と同様に遺伝子発現の検出に使われる。
011		MEF	マウス胎児線維芽細胞の略。
012		センダイウイルス	マウスパラインフルエンザ 1 型に分類される RNA ウイルス。細胞融合現象を誘導することで有名である。生きている細胞を改変する「細胞工学」のツールとして、また最近では遺伝子発現用ウイルスベクターとして使われている。
013		SeVdp	M,F,HN 遺伝子欠損持続発現型センダイウイルスベ

			クターの略称。産総研のオリジナル技術である。
014		siRNA	22 塩基程度の短い二本鎖 RNA で、配列特異的に mRNA を分解し、遺伝子発現を抑制する効果を持つ。
015		SSEA-1	マウス ES 細胞や iPS 細胞の表面に存在する糖鎖抗原
016		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。
017		Tra-1-60, SSEA-4	ヒト ES 細胞や iPS 細胞の表面に存在する糖鎖抗原
018		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。
019		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。
020		エピジェネティクス	遺伝子配列の違いに寄らない、後天的に獲得する性質
021		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。
022		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。
023		キメラマウス	2 種類以上の異系統のマウスの発生初期の肺を融合させることにより、人工的に作られるマウス。iPS 細胞の多能性の確認実験として使用される。
024		ジャームライントランスミッション	多能性幹細胞が生殖細胞系列へ分化し、多能性幹細胞由来の遺伝情報がキメラマウスなどを経て、次世代へ伝承されること。
025		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。
026		バクミド	外皮蛋白質が付着するシグナルを持つバキュロウイルス DNA にマルチ遺伝子発現プラスミドを接続させた複合体。
027		ヒストンデアセチ	リジン残基がアセチル化されたヒストンのアセチル

		ラーゼ	基を離脱させる酵素。これにより遺伝子の発現が促進される。
028		ヒストンメチル化酵素	ヒストンのリジン残基をメチル化する酵素。クロマチンの状態を制御することにより、エピジェネティクスを制御している。
029		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。
030		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。
031		三胚葉分化	個体形成ではなく、三胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）に属する細胞系列すべてへの分化。
032		自律複製能	ウイルスやウイルスベクターが、自己と同じ粒子を再生産する能力
033		生殖伝播	ES/iPS細胞から作製されたキメラマウスの子孫に、ES/iPS細胞の遺伝情報が伝播されること。優れた多能性を持つ ES/iPS細胞の指標である。
034		単球	Monocyte とも呼ばれる。末梢血中にある、樹状細胞やマクロファージの前駆細胞。白血球の一種で、全白血球の約 9%を占める。
035		天然物ライブラリー	微生物が生産する生理活性物質や、植物、海洋産物などに含まれる成分からなるライブラリー
036		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。
037		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。
038	②-1	始原生殖細胞	生殖細胞のもとになる細胞。発生の初期に出現し、将来の卵原細胞あるいは精原細胞になる。
039		DNA チップ	DNA マイクロアレイは DNA チップとも呼ばれ、細胞内の遺伝子発現量を測定するために、多数の DNA 断片をプラスチックやガラス等の基板上に高密度に配置した分析器具のこと。
040		網羅的遺伝子発現	ある生物の全ての遺伝子の転写産物 (mRNA) の量

		解析	を一度に測定する方法。通常、全遺伝子のプローブ（断片）が搭載されたチップ（DNA チップ）を使用して解析する。
041		スキッタープロット解析	散布図解析、群間のデータ比較の際に適したグラフの表示方法。各プロットは個々の遺伝子を示しており、幅広い発現領域と遺伝子プロファイルの概観を視覚的に把握することができる。
042		リプログラミング	終末分化した体細胞が脱分化し、未分化な細胞に変化すること。遺伝子導入などで人為的にリプログラミングをおこすことができる。その際様々なゲノム修飾が消去・再構築される変化がゲノム内で起こっている
043		Myc 遺伝子	Myc（あるいは c-Myc）は核内蛋白質を作る遺伝子で、できる蛋白質は DNA に結合して他の遺伝子を発現調節する機能を持っている
044		F9 細胞	マウス奇形腫（テラトーマ）由来の細胞。
045		STO 細胞	線維芽細胞由来細胞株、ES 細胞や iPS 細胞の培養の際のフィーダー細胞として使用する。
046		タイムラプス顕微鏡	長時間細胞を生きたまま観察するための顕微鏡
047		バイオインフォマティクス	応用数学、統計学、応用物理学、コンピューターサイエンス、計算機科学などの技術応用によって生物医学の問題を解こうとする学問である。
048		アルゴリズム	数学、コンピューティング、言語学、あるいは関連する分野において、問題を解くための効率的手順を定式化した形で表現したものをいう。
049	②-2	ウェスタンブロット	電気泳動によって分離したタンパク質を膜に転写し、任意のタンパク質に対する抗体でそのタンパク質の存在を検出する手法
050		ポルシンヤスコープ	井上信也博士が開発した長時間焦点のズレなどがなく安定に高分解能で観察できる光学顕微鏡に、Rudolf Oldenbourg 博士が開発した偏光を用いて均一に高いコントラストを与えるポルスコープをドッキングさせた独自の光学顕微鏡システム。
051		極低温電子顕微鏡	生物試料を液体ヘリウム温度にまで冷却して、2 Å 分解能の像を撮影できる電子顕微鏡で、氷に包埋した生物試料を凍結したまま高分解能で観察できる独自に開発した電子顕微鏡。

052		Bleb	細胞が分裂するときなどに見られる細胞表面の液胞状の形態で、その意味や実態はなぞである。
053		超薄切片	電子顕微鏡では厚い試料を観察することが出来ない ので、細胞や細胞塊などを観察する場合には、染色・ 固定、エポキシ樹脂に包埋し、マイクロームを用い て厚さミクロン以下の薄い切片を作製する。このよ うにして電子顕微鏡で観察すると、光学顕微鏡で観 察するよりはるかに詳細な微細構造を観察すること が出来る
054	③-1	homing	造血幹細胞などで知られた現象で、幹細胞が生まれ た場所から移動して組織で定着することをいう
055		hES 細胞	さまざまな細胞に分化し、増殖する能力を持つ、発 生初期のヒト胚由来の全能細胞。ヒトの受精卵の一 段階である胚盤胞から取り出した内部細胞塊から樹 立される。
056		hiPS 細胞	ES 細胞と同様に増殖して各種の細胞へと分化する ことが可能なヒト細胞由来の多分化能細胞。ES 細胞 は受精卵から採取して作るため倫理的に問題がある が、この細胞は皮膚細胞などから作り出すことがで きる。
057	③-2	幹細胞	発生の過程や、臓器・組織・器官の再生・維持の過 程で、細胞を供給するもととなる母細胞のこと。別 の組織細胞に変化する能力と、分裂しながら同じ細 胞を作り出す能力とがある。
058		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。
059		QT 延長症候群	QT 延長症候群は種々の原因で生じる比較的稀な疾 患であるが、TdP と呼ばれる多形性心室頻拍を引き 起こし、失神などの重篤な症状を認める。時に心室 細動に移行し、突然死の原因となり得る。
060		QT 間隔	体表面心電図の PQRST 波の内の、Q 波の開始から T 波の終了までの時間
061		QT 間隔延長	QT 間隔が長くなる事。薬剤の副作用や遺伝病の結 果として引き起こされる。致死性の不整脈等を誘発 する場合がある

062		hERG アッセイ	QT 延長のリスク評価の一般的な非臨床試験、 <i>in vitro</i> IKr 測定として hERG 発現細胞株において薬剤の IKr 阻害作用を評価する試験系。
063		E-4031	エーザイが開発していた抗不整脈薬であるが、副作用 (IKr 阻害作用) の為に開発を断念した。IKr 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。
064		EAD	Early After Depolization 早期後脱分極の略。心筋細胞が活動電位発生時に脱分極後、静止膜電位まで再分極する前に再び脱分極すること。
065		FPD	Field Potential Duration の略。細胞外電位持続時間を表し、多電極アレイ (MEA) 等の細胞外電極により記録した電位変化の APD に相当する時間。
066		TdP	Torsades de pointes の略。致死性の心室頻拍不規則で、通常反復性の心室頻拍の特殊型で、特有の原因をもち、発作時 QRS 軸が連続して変化するため、心電図誘導によっては心室波形が基線を中心に捻じれた形に見えるもの。非発作時には、QT 延長がよくみられる。
067		イオンチャネル	細胞の生体膜にある膜貫通タンパク質の一種で、受動的にイオンを透過させるタンパク質のこと。
068		イオンチャネルブロッカー	イオンチャネルに結合するなどして、イオンチャネルのイオンの流れを阻害する物質
069		マクロ	コンピュータのアプリケーションに自動処理を行わせるための簡易プログラム
070		ICH ガイドライン S7B	ICH は International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (日米 EU 医薬品規制調和国際会議) の略。ヒト用医薬品の心室再分極遅延 (QT 間隔延長) の潜在的可能性に関する非臨床的評価のためのガイドライン
071		<i>In vitro</i> 試験	試験管内などの人工的に構成された条件下、すなわち、各種の実験条件が人為的にコントロールされた環境で行われる試験
072		Node	節、結節、(特に)リンパ節
073		Pace maker	心臓に周期的な電気刺激を与えて、心拍動を起させる装置。縛生体器官の律動的興奮の起点となる部位。
074		モデル心筋細胞	生体の心筋細胞のモデルとなる細胞。心筋細胞では

			ない ES/iPS 細胞から誘導して作製される自律拍動する細胞
075		モルモット乳頭筋試験	モルモット右心室の乳頭筋を摘出し、活動電位を測定する <i>in vitro</i> 受託試験. APD90 等がパラメーター.
076		リエントリー	心臓の収縮伝播は通常一方向性で末端まで伝播した後収束する。これが、局所的な伝達異常等の原因により、収縮伝播の旋廻が発生し元の部分へ再流入してくること
077		リエントリーモデル	円状の構造など、心臓内でリエントリーが起こりやすくなる構造を、細胞を配列する事により再現したモデル
078		STV	Short Term Variability の略。短時間での揺らぎを示す指標。繰り返し測定される値の前後の差分の絶対値の平均
079		活動電位	心筋細胞、神経細胞などに認められる、心筋収縮・神経発火等の活動時に起こる電位の変化
080		期外収縮	異常な刺激によって心臓が本来の周期を外れて早く収縮する不整脈のこと
081	③-3	カレントクランプ	電流を固定して、電圧を測定する方法
082		ボルテージクランプ	電圧を固定して、電流を記録する方法
083		アステミゾール	持田製薬からヒスマナールの商品名で販売されている抗ヒスタミン薬。QT 延長作用の <i>in vitro</i> assay 系において hERG アッセイでは陽性を示すが、ブタ乳頭筋 APD アッセイでは陰性を示す
084		アミオダロン	日本ジェネリックなどからアミオダロン塩酸塩の商品名で販売されている抗不整脈薬。QT 延長作用の <i>in vitro</i> assay 系において陽性を示すが、 <i>in vivo</i> assay 系において QT 延長はあるものの TdP リスクに陰性を示す。QT 延長作用の assay 系において偽陽性薬として汎用されている
085		エバスチン	シオノケミカルからエバスチンの商品名で販売されている抗ヒスタミン薬（持続性選択 H1 受容体拮抗剤）。QT 延長作用の <i>in vitro</i> assay 系において hERG アッセイでは陽性を示すが、ブタ乳頭筋 APD アッセイでは陰性を示す。ヒトにおいて重篤な症状は報告されていない
086		シサプリド	消化管運動促進薬。現在、販売中止。QT 延長作用

			の <i>in vitro</i> assay 系において陽性を示す。ヒトでQT延長が報告されている
087		シタロプラム	海外で販売されている抗うつ薬（選択的セロトニン再取り込み阻害剤）。日本では未承認。高濃度で、TdP の報告がある。QT延長作用の <i>in vitro</i> assay 系において hERG アッセイでは陽性を示すが、ブタ乳頭筋 APD アッセイでは陰性を示す
088		ソタロール	ブリストル・マイヤーズ株式会社からソタロールの商品名で販売されている抗不整脈薬。E4031 同様、IKr 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
089		タミフル	ロシュ・中外製薬からタミフルの商品名で販売されている抗インフルエンザウィルス剤。ヒトでQT延長報告はない
090		タモキシフェン	アストラゼネカからノルバデックスの商品名で販売されている抗乳癌剤。海外において QT 延長、TdP の発現が報告されている
091		テルフェナジン	抗ヒスタミン剤。現在、販売中止。QT延長作用の <i>in vitro</i> assay 系において hERG アッセイでは陽性を示すが、ブタ乳頭筋 APD アッセイでは陰性を示す
092		ニフェカラン	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、IKr 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
093		パロキセチン	グラクソ・スミスクラインからパキシルの商品名で販売されている抗うつ薬（選択的セロトニン再取り込み阻害剤）。ヒトにおいて高濃度で心電図異常の発生、また他の抗うつ薬との併用によるQT延長、TdP の報告がある
094		ファモチジン	アステラス製薬からガスターの商品名で販売されている抗ヒスタミン薬。QT延長作用の <i>in vitro</i> assay 系において陰性を示し、ヒトで QT 延長、TdP の報告はほとんどない
095		ベプリジル	第一三共からベプリコールの商品名で販売されている抗不整脈薬。カルシウムチャンネルブロッカー。 <i>In vitro</i> assay 系において hERG アッセイでは陽性を示すが、ブタ乳頭筋 APD アッセイでは陰性を示す。

			ヒトで QT 延長、TdP の報告がある
096		ベラパミル	エーザイなどからベラパミル塩酸塩の商品名で販売されている抗不整脈薬及び虚血性心疾患治療剤。カルシウムチャンネルブロッカー。QT延長作用の <i>in vitro</i> assay 系において hERG アッセイでは陽性を示すが、ブタ乳頭筋 APD アッセイでは陰性を示す
097		モキシフロキサシン	バイエル薬品からアベロックスの商品名で販売されている抗菌薬。QT延長作用の <i>in vitro</i> assay 系において陽性を示し、QT延長のある患者においてQT延長、TdP の発生が報告されている
098		スクリーニング試験	条件に合うものを選び出す為の試験
099		偽陽性	何らかの効果を判別する為の試験で、本来の効果は陰性であるものを、誤って陽性と判定する事
100		偽陰性	何らかの効果を判別する為の試験で、本来の効果は陽性であるものを、誤って陰性と判定する事
101		安全域	薬剤の副作用により、ヒトに危害が現れない濃度範囲の事
102		安全性薬理試験	非臨床試験のうち、薬物の安全性評価のために行われる試験で、おもに心血管系、中枢神経系、呼吸器系のように生命維持に重要な機能に対する作用を評価する。臨床における目的とする作用を検討する薬効薬理試験とは別に行う
103		開発業務受託機関	contact research organization, CRO ともいう。製薬企業から、新医薬品の開発にかかわる業務を受託または代行する組織
104		ユーザーフォーラム	ユーザーフォーラムは、製薬企業(ユーザーメンバー)、受託研究機関(サポートメンバー)および大学(アカデミアメンバー)に所属する社員あるいは研究者より構成し、情報の共有、プロジェクトで得られた iPS 細胞の性能評価、毒性評価技術と手法についての議論を行なう

[プロジェクト用語集] (独立行政法人産業技術総合研究所担当分)

項番	分類	用語	解説
001	②-2	クリーンロボット	半導体のハンドリング等に用いられる動作時に排出するパーティクルの量を抑えたロボット。半導体用では、クリーン度10やクリーン度1の空間で使用可能なロボットがある。
002		画像処理	電子工学的(主に情報工学的)に画像を処理して、別の画像に変形したり、画像から何らかの情報を取り出すために行われる処理全般。

003		無菌空間	細菌やウイルスの存在しない空間で、CPC では常時、クリーン度 100 であることが求められる。
004		ケラレ	フードやフィルターなどの障害物に遮られて画像の一部が欠けること。
005		閾値	その値を境にして、動作や意味などが変わる値のこと。
006		ガラス化法	細胞の凍結保存法として、細胞に高濃度の凍害保護液を含んだ凍結培地を添加後、直ちに -196°C の液体窒素に直接浸漬し、氷晶形成温度帯を素早く通過させ、ガラス化状態で凍結して細胞を保存する方法。 ただし細胞の生存率は液状のガラス化用凍結保存液の存在下では急速に低下する。 (ヒト iPS 細胞のガラス化法に関する特許は㈱リプロセルが保有する)
007		緩慢法	細胞の凍結保存法として、細胞に比較的low濃度の凍害保護液を含んだ凍結培地を添加後、 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 程度の緩慢な冷却速度で凍結し、液体窒素式凍結保存容器やディープフリーザーに移し保存する方法。実験用細胞の凍結保存法として一般的に行われている。
008		細胞毒性	細胞膜の膨張・破壊による細胞死や、細胞機能障害、増殖障害を及ぼすような作用を与える性質。
009		凍害保護液	細胞の凍結過程において、氷晶の成長を抑制することにより、細胞の膜構造への物理的ダメージを緩和するもの。DMSO (ジメチルスルホキシド) やグリセリンなど。
010		Rock 阻害剤	細胞コロニーを個々の細胞に分散化するとき起こる細胞死のきっかけとなるリン酸化酵素 (Rho キナーゼ) の活性化を阻害し細胞コロニー形成を促進する薬剤。
011		ケーン	主に液体窒素式凍結保存容器で用いられる凍結保存用アンプルを縦列に並べて収納する用具。
012		温度応答性ポリマー	ポリマーに固有の転移温度を境に、その高次構造が変化する高分子材料。代表的な温度応答性ポリマーである、ポリ-Nイソプロピルアクリルアミド (PIPAAm) は水中で LCST (下限臨界溶解温度) である 32°C を境に急激に親・疎水性が変化する。
013		温度応答性培養器材	PIPAAm を器材表面に固定化した細胞培養器材で、温度制御により培養細胞の接着性を制御できる。この培養器材上で細胞を接着・増殖させたのち、培地温度を LCST 以下に下げること分解酵素等を用いることなく細胞を回収できる。

014		アポトーシス	多細胞生物の体を構成する細胞の死に方の一種で、個体をより良い状態に保つために積極的に引き起こされる、管理・調節された細胞の自殺すなわちプログラムされた細胞死のこと。
015		コラゲナーゼ	コラーゲンを加水分解するタンパク分解酵素。
016		細胞外マトリックス	細胞から分泌された物質によって細胞の外側に形成される構造物の総称。
017		分光エリプソメーター	薄膜に直線偏光を入射し、反射光の偏光状態の変化を観測することにより薄膜の構造（ナノメートルオーダーでの膜厚値など）を解析する装置。
018		Oct-4、Nanog	正常発生時における多能性の調節に関与するホメオドメイン転写因子であり、ES細胞および生殖細胞に存在している。
019		Tra-1-60、SSEA4	ヒトES細胞やiPS細胞の表面に存在する糖鎖抗原。
020		胚葉体	EB (embryoid body) ともいわれ、ES細胞やiPS細胞等を浮遊培養するとボール状の細胞塊を形成する。この状態で2週間程度培養すると、様々な細胞種への分化が観察される。
021		三胚葉	受精後の胚からできる細胞の塊で、内胚葉、中胚葉、外胚葉に分けられる。
022		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。
023		Gバンド法	ギムザ染色で染色体の欠失、転座などを判定する基本的な染色体検査法。
024		温度応答性ポリマー	ポリマーに固有の転移温度を境に、その高次構造が変化する高分子材料。代表的な温度応答性ポリマーである、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド (PIPAAm) は水中でLCST（下限臨界溶解温度）である32℃を境に急激に親・疎水性が変化する。
025	②-1(2)	奇形腫形成能試験	iPS細胞、ES細胞が持つ「多分化能」を検証するために、奇形種（テラトーマ）の形成能を解析する検証方法。一般的に、三胚葉それぞれへの分化を確認することにより、樹立した幹細胞株が多分化能を持つと判定する。
026		糖鎖	単糖が鎖状につながった生体分子で、核酸、タンパク質に続く第3の生命鎖として、その機能が注目されている。全ての細胞表面に高濃度に存在しており、細胞間相互作用を仲介していると考えられている。また多くのタンパク質に付加されており、タンパク質機能を多様化して、制御していると考えられている。感染、免疫、再生、分化など、様々な生命現象

			に密接に関係しているだけでなく、細胞の性質（分化度、悪性度など）を鋭敏に反映するマーカーとしての有用性が着目されている。
027		レクチン	ある特定の糖鎖構造を認識し、結合するタンパク質の総称。 1888年にロシアの Stillmark によりトウゴマの実の抽出液から発見された。全ての生物に存在する。糖鎖の情報を受信する主要な分子であり、様々な生命現象に関係。また、糖鎖構造を解析するための道具として古くから活用されてきた。
028		グライコーム	ゲノム、プロテオームに準じて、ある生物や細胞がもつ全ての糖鎖をグライコームとよぶ。グライコームはゲノムやプロテオームと比較すると各段に複雑であると考えられており、グライコームを網羅的に解析することは困難であるが、レクチンアレイを用いた糖鎖プロファイリングは、最近開発されたグライコームを高感度に解析するための1つの技術。
029		レクチンマイクロアレイ	複数のレクチンがスライドガラス上に高密度に固相化されている基盤をさす。レクチンの反応性から、生体サンプル中に存在する糖鎖の構造（プロファイル）を把握することができる。タンパク質や細胞表面の糖鎖構造を簡便に解析するための技術として、様々な分野への応用が行われている。
030		糖鎖複合体アレイ	糖鎖ポリマーや糖タンパク質など糖鎖複合体が高密度にスライドガラス上に固定化されて基盤。糖鎖結合タンパク質（レクチン、抗体）の糖鎖結合特異性を高感度に解析することが可能。新規レクチン探索やレクチン・プローブの品質評価として有効性を発揮している。
031		糖鎖プロファイリング	生体サンプル中（糖タンパク質やその混合物、細胞、組織など）の糖鎖の全体像を分析する技術で、特にレクチンマイクロアレイを用いて、レクチンの反応性から糖鎖構造を類推することを指す。糖鎖構造の完全決定は出来ないが、サンプル間の糖鎖構造の違いを迅速且つ簡便にとらえることができる。癌マーカーや未分化マーカー探索、各種細胞グライコームの解析などに応用されている。
032		cDNA マイクロアレイ	細胞内における遺伝子発現量を網羅的に測定するために、それらに相補的な DNA 断片を基板上に高密度に貼り付けたもの。DNA チップ。
033		分化指向性	特定の臓器・組織への分化しやすさ。
034		親株	iPS 細胞を樹立する際に元となる細胞。

035		Heat Map	遺伝子等の発現量を低い方から高い方に向かって、2色の勾配で表したグラフ。
036		センダイウイルス	1本鎖RNAを遺伝子として持つウイルス。iPS化因子を細胞に導入するベクターとしての利用が注目されている。レトロウイルスと異なり、ゲノムに挿入されないため、安全な樹立方法として期待される。
037		GO term	生物学的概念を記述するための、共通の語彙を策定しようとするプロジェクトである Gene Ontology Project が定義する用語のことで、biological process (生物学的プロセス)、cellular component (細胞の構成要素)、molecular function (分子機能) の3つのカテゴリーに分類されている。
038		Network Screening	生物機能により特徴づけられた既知の遺伝子制御ネットワーク群から、特異的条件下 (特定細胞種、疾患、外部刺激等) で活性化されていると推定されるネットワーク群を、統計的に抽出する独自数理技術。
039		パスウェイ	ある生物機能を担うために連続した関連性を示すと推定される一連の分子集合。
040		CGH アレイ	ゲノムの重複、欠損を網羅的に測定するために、ゲノム DNA 断片を基板上に高密度に貼り付けたもの。
041		SKY 法	spectral karyotyping 法。染色体ペインティングプローブを用いた FISH 法とスペクトル解析を組み合わせ、ヒト 24 種類の染色体すべてを異なる色調で識別できる。G-band 法、CGH アレイでは検出しにくい相互転座の解析に威力を発揮する。□
042		コルセミド	微小管の重合阻害と脱重合を引き起こし、細胞周期を M 期に同調するために用いられる。
043		Infinium アレイ	全ゲノム増幅を用い、ビーズチップ (BeadChip) 上でゲノム断片と試薬を反応させて行う SNP 型の判定 (ジェノタイピング) 法。バイサルファイト処理と組み合わせ、エピゲノム解析を行う。
044		バイサルファイト処理	重亜硫酸ナトリウム処理。重亜硫酸ナトリウムはシトシンをウラシルに変換するが、メチル化シトシンを変換できない。この性質を利用し、ゲノム上のシトシンメチル化を検出する。
045		CpG サイト	ゲノム上に存在するシトシン-リン酸-グアニンサイト。DNA メチル化が起きる領域。シトシンが 5-メチルシトシンに転換される。プロモーター近傍に CpG アイランドという形で見つかることが多い。

[プロジェクト用語集] (国立大学法人東京大学担当分)

項番	分類	用語	説明
001		エピジェネティクス	遺伝子配列の違いを伴わず、形質(表現系など)が世代、細胞世代を超えて伝達する生命現象 (エピジェネティック)・機構を研究する分野。主な分子機構は、染色体を構成する分子の化学的修飾 (DNA のメチル化、ヒストンの修飾)。一般に DNA メチル化はゲノム活性の抑制に関与し、転写の抑制、可動性遺伝因子の抑制、それによるゲノムの安定化に関与する。
002		エピゲノム	ゲノム全域の DNA メチル化、ヒストン修飾などの総体。
003		T-DMR	Tissue dependent and differentially methylated region の略。組織や細胞種に依存的に DNA のメチル化状況が変化する領域を云う。メチル化、脱メチル化の状況は、必ずしも組織・細胞種特異的ではない。マウス・ヒトではゲノム全域の転写開始点近傍に絞った解析ですら少なくとも数千カ所あることが示されている。
004		DNA メチル化プロフィール	ゲノム全域に存在する T-DMR のメチル化状況の組み合わせ。T-DMR のメチル化状況は細胞種・組織特異的とはいえないが、その組み合わせは細胞種・組織特異的である。また発生や分化に伴い変化し、さらに疾患・老化などに伴い変化することから、細胞種・組織の同定や正常・異常の判定に利用することができる。DNA メチル化プロフィールに基づく細胞・ゲノムの機能解析を DNA メチル化プロフィール解析という。
005		D-REAM 法	ゲノム全域に存在する T-DMR を網羅的に検索・解析する方法で、T-DMR profiling with restriction tag-mediated amplification の略。
006		CpG アイランド	進化の過程で、ほ乳類ゲノムはメチル化されている CpG に変異が起こった場合、修復されにくいいため、CpG が期待される出現頻度 (16 分の 1) に対して著しく低くなっている。しかしヒト・マウスゲノムには CpG 頻度が高く連続した領域が 1 万数千カ所存在し、その約半数は転写開始点を含む、プロモーターに位置する。

007		可動性遺伝因子	ゲノム上に存在し、その位置を変化させることができる配列で、未だに活動性のもの、すでに活動することができなくなって、その配列の痕跡のみが残されている場合があるが、これらを合わせ、ゲノムの半分以上の領域を占めている。転移により遺伝子の変異や発現調節の異常が誘発される場合がある。ほ乳類ゲノムではその多くは DNA メチル化により活動が抑制されている。
008		SINE	short interspersed element の略。可動性遺伝子のうち、一旦 RNA に転写されてからゲノムに組み込まれる、レトロトランスポゾン的一种で、それ自体で転移することはできない。転移には LINE の活性が必要である。
009		LINE	long interspersed element の略。レトロトランスポゾン的一种でそれ自体で転移を起こすことに必要な遺伝子をコードする。
010		メチル化感受性制限酵素	DNA のメチル化によって切断が阻害される制限酵素で、CpG のメチル化に感受性を示す代表的なものとして NotI, SmaI, HpaII, HpyCH4IV などがある。
011		マイクロアレイ	DNA 断片をガラス基板などの上に固定し、それとサンプルとハイブリダイズさせることにより、シグナルを検出し、ハイブリダイズした断片を定量するための器具。D-REAM 法に用いるのは約 400 万種類の 25 塩基長のゲノム断片を一枚のアレイ上に結合させたもので、転写調節領域解析に用いるプロモータータイリングアレイ、ゲノム全域を対象としたフルタイリングアレイ。D-REAM 法自体の原理はマイクロアレイに依存しないが、マイクロアレイの種類により、解析解像度、解析範囲が限定される。
012		COBRA	Combined bisulfite restriction assay の略。DNA をバイサルファイト反応に供することにより、メチル化されたシトシンはシトシンに、非メチル化シトシンはウラシルに変換される。その後 PCR 反応に供した後、変換によって生じる制限酵素配列、もしくは変換によって消失する制限酵素配列を利用し、制限酵素処理し、切断の有無によりメチル化状態を調べる方法。

013		バイサルファイトシーケンシング法	バイサルファイト反応した DNA 断片の配列を調べることにより、メチル化されているシトシンを決定する方法。
014		ストレプトリシン O	連鎖球菌の酵素感受性毒素であり、細胞膜上のコレステロールと複合体を形成して直径 30~40 μm のポアを形成する。セミインタクト細胞作成時に使用。
015		L5178Y 細胞	マウス胸腺リンパ腫由来細胞。浮遊培養細胞であるため、大量培養により簡便に細胞質の調製が可能となる。
016		セミインタクト細胞リシール法	生物毒素などを用い形質膜に穿孔して、オルガネラや細胞骨格はインタクトに保持したまま細胞質を流出させた細胞（セミインタクト細胞）を作製する。その後、適当な細胞質やタンパク質成分をセミインタクト細胞に導入後、カルシウムや細胞質を用いてその孔を閉じた細胞を作成する方法。

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

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

幹細胞は様々な組織に分化する能力を有しており、その性質を用いることで神経、心筋、膵臓β細胞等の様々な細胞を試験管内で得ることができる。これを用いることで従来は治療することが困難であった神経疾患や心臓疾患の根本的治療法の開発や、創薬分野におけるヒトの細胞を用いた薬効評価や安全性薬理試験などの創薬スクリーニングに利用できる利点を有する。中でもiPS細胞（人工多能性幹細胞）は、皮膚等の組織から作製可能であることから倫理的な障壁が低く、加えて遺伝的に多様な細胞が得られること、免疫拒絶反応を回避、あるいは軽減可能であること等から、有用な細胞源として期待が大きい。しかし、iPS細胞等幹細胞を産業で利用するためには、細胞の効率的な作製方法、腫瘍化の問題、様々な状態が混在したヘテロな細胞集団からの標的細胞の評価・選別、品質管理方法の確立、機能発現のための細胞から組織への再構築技術の開発など、様々な解決すべき課題がある。iPS細胞の早期な産業応用が期待される創薬分野においては、近年、研究開発費が大幅に伸びている一方で、新薬の承認数は低下する傾向にある。特に、臨床開発の最終フェーズにおいて、有効性が確認できないことや、安全性等が原因となって開発中止となるケースが増加している。また、従来の非臨床試験及び臨床試験において安全性に何ら問題のなかった薬物でも、市販後において患者に実際に投与されてから初めて致死性不整脈を誘発することが判明したため急遽市場から撤退した事例もある。さらに制ガン剤や抗菌剤などの人体に毒性を持つことが知られている薬剤では、薬効と副作用は表裏一体の関係にあり、ヒトに対する安全域の程度が許容範囲となるかどうかを的確に推測することが開発候補薬として臨床開発に進めるかどうかを判断する上で非常に重要な技術課題となっている。このような事態を改善し、より安全性の高い医薬品を効率良く開発するためには、創薬研究のより早い段階で、開発候補薬のヒトでの薬効と安全性をより精度高く予測する基盤技術の開発を行うことが求められている。

こうした状況を踏まえ、本研究開発は、様々な細胞組織に分化できるヒトiPS細胞等幹細胞の産業利用を促進することを目的として、iPS細胞への効率的な誘導因子の探索を行う。同時に、多様な幹細胞操作技術の成果を活用し、iPS細胞の新規誘導法開発に結びつける。また、細胞源としてiPS細胞等幹細胞を一般に供給する上で必要となる、細胞の性質や品質

を評価する技術や細胞の安定供給を可能とする基盤技術を確立する。さらに、iPS細胞等幹細胞から心筋などの細胞に効率よく分化させ、これを利用して、開発候補薬の潜在的な致死性不整脈を誘発する可能性を、ヒト個体と高い相関性をもって予測する創薬スクリーニングシステムの開発を行う。

これにより、我が国が世界を先導している科学的成果である iPS 細胞等幹細胞を、いち早く産業応用に繋げることが期待できるとともに、創薬研究のより早い段階において、開発候補薬の効率的で的確な絞り込みを行うことが可能となり、創薬研究の短縮や研究開発費の削減、さらにはより安全な医薬品の開発の促進が期待される。

これらの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、諸外国との競争と、当該分野での産業化の状況に鑑み、産学官の力を結集し、短期間で集中的な予算投下のもと早急に整備を行う必要があることから、NEDO事業として実施する意義が非常に高い課題である。

1.2 実施の効果（費用対効果）

本プロジェクトの研究開発成果により、創薬開発パイプラインにおける薬剤の安全性/毒性などを、従来と比較してより高い精度で評価することが可能となり、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る。このことにより、医薬品の迅速かつ安価な提供が可能となり、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。

なお、本プロジェクト費用の内訳は、研究開発項目ごと、および研究グループごとに、以下に示す通りである。

(単位:百万円)

年度	H20年度	H21年度	H22年度	実績合計	H23年度予算
一般会計	1000	1010	906	2916	648

予算配分(合計)

研究開発項目		研究開発費合計
研究開発項目①	安全かつ効率的な iPS細胞作製のための基盤技術の開発	599(20.5%)
研究開発項目②	iPS細胞の選別・評価・製造技術の開発	1275(43.7%)
研究開発項目③	創薬スクリーニングシステムの開発	1042(35.7%)

研究開発項目ごと

(単位:百万円)

年度	H20年度	H21年度	H22年度	実績合計	H23年度予算
一般会計	1000	1010	906	2916	648

予算配分(合計)

研究グループ	主な実施施設	研究開発費合計
JBIC	産総研、慶大、医科歯科大、東レ、アスピオファーマ、三菱化学メディエンス 等	1,935 (66.3%)
浅島	産総研、成育医療センター、川崎重工業、大陽日酸、セルシード 等	755 (25.9%)
東京大学	東大	226 (7.8%)

研究グループごと

2. 事業の背景・目的・位置づけ

2.1 事業の背景

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。

2. 2 事業の目的

このような背景の下、本研究開発は、様々な細胞組織に分化できるヒトiPS細胞等幹細胞の産業利用を促進することを目的として、iPS細胞への効率的な誘導因子の探索を行う。同時に、多様な幹細胞操作技術の成果を活用し、iPS細胞の新規誘導法開発に結びつける。また、細胞源としてiPS細胞等幹細胞を一般に供給する上で必要となる、細胞の性質や品質を評価する技術や細胞の安定供給を可能とする基盤技術を確立する。さらに、iPS細胞等幹細胞から心筋などの細胞に効率よく分化させ、これを利用して、開発候補薬の潜在的な致死性不整脈を誘発する可能性を、ヒト個体と高い相関性をもって予測する創薬スクリーニングシステムの開発を行う。

2. 3 事業の位置づけ

本研究開発は、遺伝子やタンパク質等の生体分子の機能・構造解析等を行うとともに、それらの研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に利用するためのデータベース整備や先端技術を応用した高度医療機器開発等により、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. 事業の目的

1. 1 最終目標（平成25年度末）

安全で均質な形質を持ち、高い効率で心筋細胞へ誘導可能なヒトiPS細胞等幹細胞を活用し、性質と品質がそろったヒト心筋細胞等へ効率的に分化を行い、これを用いて開発候補薬の潜在的な致死性不整脈を誘発する可能性を、ヒト個体と高い相関性をもって予測する、産業上利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。

1. 2 中間目標（平成23年度末）

従来法に比べ、より安全で高効率なヒトiPS細胞の誘導を可能とする新規な誘導因子、新たな細胞操作技術を含む新規誘導法を少なくとも1つ以上見いだす。また、iPS細胞等幹細胞の性質を規定する有用なマーカーの開発及び取得したマーカーを活用した選別、評価のための要素技術の開発の目途をつける。さらに、心筋細胞への誘導効率が高い分化技術の開発に目途をつけるとともに、同じ性質を持った細胞を選別し、毒性評価のための創薬スクリーニングツールとして活用する。毒性評価のための創薬スクリーニングシステムについては、ハードウェア及び解析ソフトウェアの試作を完了し、産業上実際に利用できるシステム構成となるよう目処をつける。

2. 事業の計画内容

2.1 研究開発の内容

以下の研究開発項目について、研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

① 安全かつ効率的なiPS細胞作製のための基盤技術の開発

iPS細胞の誘導に関わる新規因子（遺伝子及び化合物）の探索を行うとともに、従来法に比べて誘導効率を向上させることが可能となる適切な組み合わせに関する検討を行う。また、樹立される細胞源としての安全性を向上させ、将来の再生医療用途の細胞源としても活用可能とするため、宿主細胞の染色体上にランダムに遺伝子が導入されることによって生じる腫瘍化の懸念がない遺伝子導入技術の開発を併せて行う。これら手法を組み合わせることによって、従来法に比べて誘導効率が高く、かつ、ガン化等の危険性が少ない、より安全性を向上させた細胞源の確立を可能とする新規iPS細胞誘導技術の開発を行う。

② iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発

(1) iPS細胞等幹細胞の評価・選別技術の開発

由来が異なる細胞から誘導されたiPS細胞等の様々な多能性幹細胞間における性質の差や、その差がもたらす特定の誘導法に対する感受性の違いを明らかにするため、ギガシーケンサーを活用し、ゲノムの修飾、誘導因子のゲノム上の挿入箇所、遺伝子発現プロファイル解析等を組み合わせた手法、あるいは新規手法を用いて、細胞の性質や特徴を評価し、選別するために有用なマーカーを開発するとともに、マーカーを用いて効率的に細胞を操作し、評価・選別する技術の開発

を行う。

(2) iPS細胞等幹細胞の品質管理、安定供給技術の開発

上記で開発した手法を用いて得られた特定の均質な細胞源を、均一な性質と品質を保持したまま長期間安定した維持・管理を行うとともに、利用者への安定した供給を可能とするために必要となる技術の開発を行う。

③ iPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

(1) iPS細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

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

(2) iPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

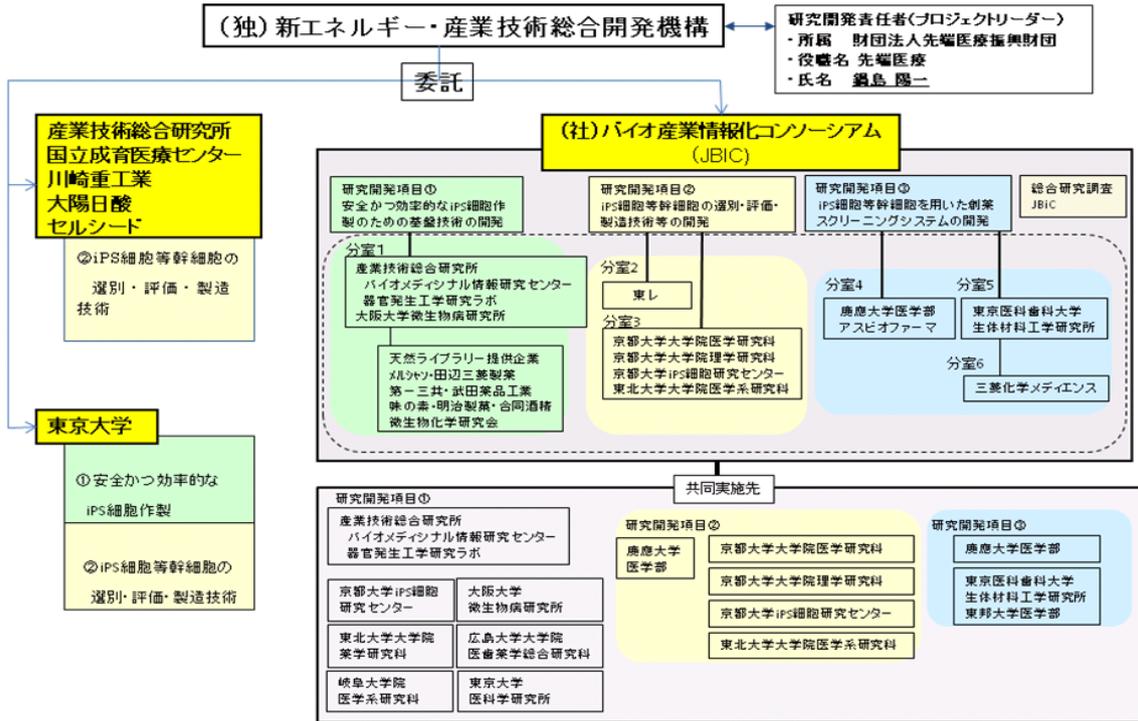
心毒性等が報告されている既存薬等を用いて、既存法との比較等によって心毒性等評価システムの有用性を評価するとともに、③(1)で分化誘導を行ったヒト心筋細胞の機能の検証を行う。また、製薬企業等によるユーザー評価結果を踏まえてシステムの改良を行う。これにより、健常人及び心疾患患者における薬物の心毒性等を高精度に予測可能な創薬スクリーニングシステムの開発を行う。

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。

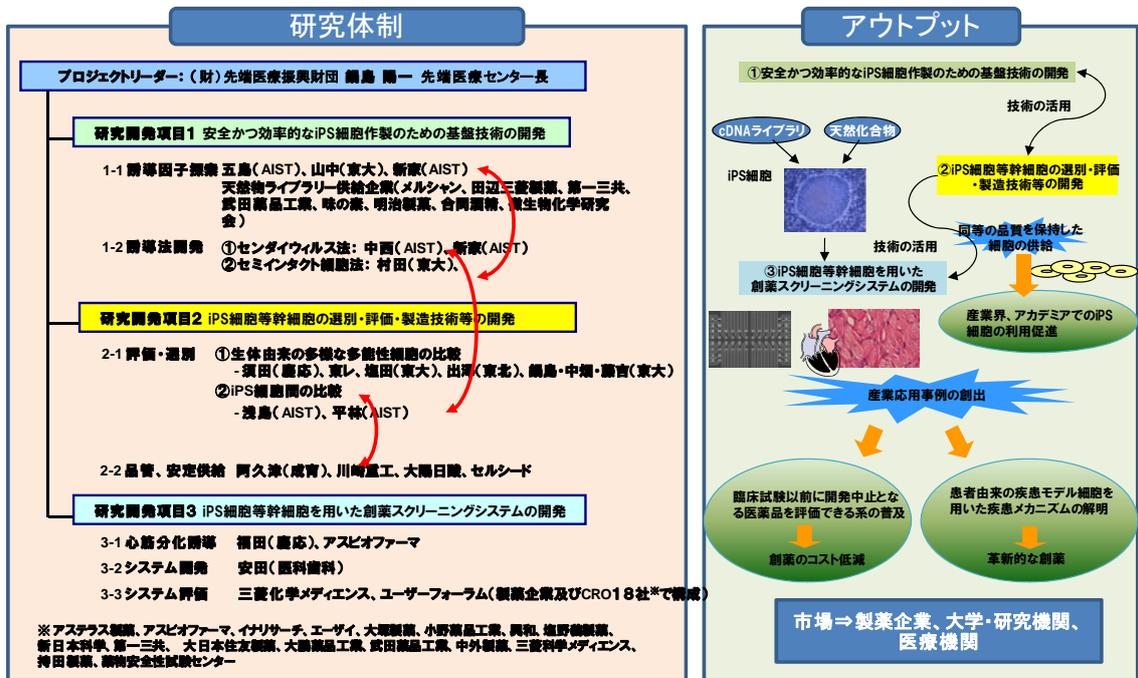
本プロジェクトでは、平成21年1月29日から2月27日の期間で公募を行った結果、25件の応募があった。外部専門家による事前書面審査及び採択審査委員会における審査を実施し、審査結果等を踏まえて、3件の採択候補を選定した。

全体提案で採択した一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム (JBIC) チームを中核に、部分提案で採択した産業技術総合研究所/国立成育医療センター/川崎重工業(株)/大陽日酸(株)/アルブラスト(株)/(株)セルシード連携チームと、東京大学チームの連携を視野に、最終的な体制を構築した。なお、本研究開発に参加する各研究開発グループの有するポテンシャルの最大限の活用により効率的な研究開発の推進を図る観点から、NEDOが指名した京都大学大学院医学研究科 鍋島陽一 教授を研究開発責任者（以下「プロジェクトリーダー」という。）とし研究開発を開始した。



プロジェクト実施体制図

なお、全体の研究体制の役割分担と研究成果のアウトプットイメージに関しては、以下に示す通りであり、研究項目間で適宜連携を取りながら研究開発を推進してきた。



研究体制と成果のアウトプットイメージ

2.3 研究の運営管理

プロジェクト実施者、NEDO関係者および経済産業省関係者で構成される研究開発推進委員会を定期的（年2回）に開催し、本プロジェクトの進捗と方向性の確認、技術内容の議論、情報交換を行い、効率的な事業の推進を図った。また、産業技術総合研究所/国立成育医療センター/川崎重工業(株)/大陽日酸(株)/アルプラスト(株)/(株)セルシード連携チームでは、個別の推進委員会を定期的（年2回）に行い、具体的な成果内容の活発な議論を行い、研究開発の円滑な推進を図った。具体的な研究会合、開催目的、実施回数は、以下に示した通りである。

研究会合	開催目的	実施回数
研究推進委員会 (含:キックオフミーティング)	研究内容、成果の共有と実施者間の連携	4回
分科会等	研究開発テーマやグループ内での成果の確認等	8回
ユーザーフォーラム	製薬メーカー等への成果の公表	4回
バイオジャパン展示	成果の公表	1回

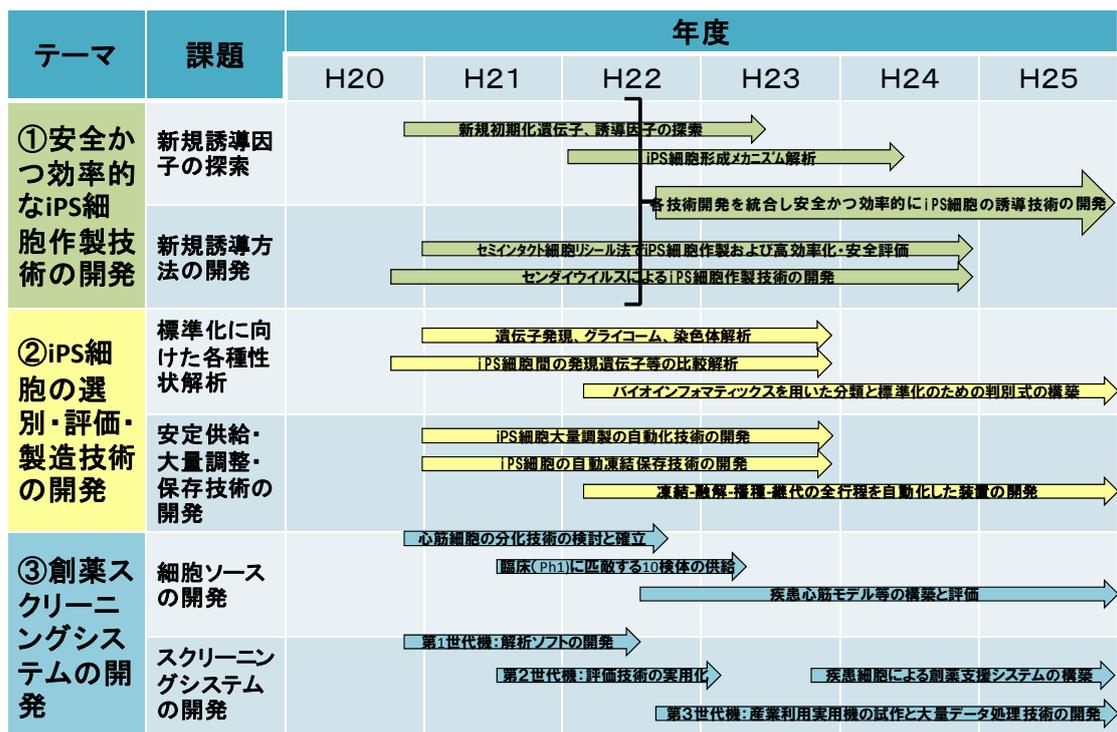
研究会合の実績

2.4 研究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメントの妥当性

本プロジェクトで開発される創薬スクリーニングシステム（以下「本システム」という）の将来のユーザーである製薬企業から、本システムの開発仕様・操作性、性能評価、毒性評価技術等に関する意見・要望を収集し、これらを本システムの開発に反映させるために、「ユーザーフォーラム」を設立した。ユーザーフォーラムでの活動では、本研究開発項目③での開発状況の報告会を定期的（年2回）に行い、製薬企業からの意見や要望を取り入れることとした。この様に、本システムの事業化へ向け、NEDOとして積極的に推進している。

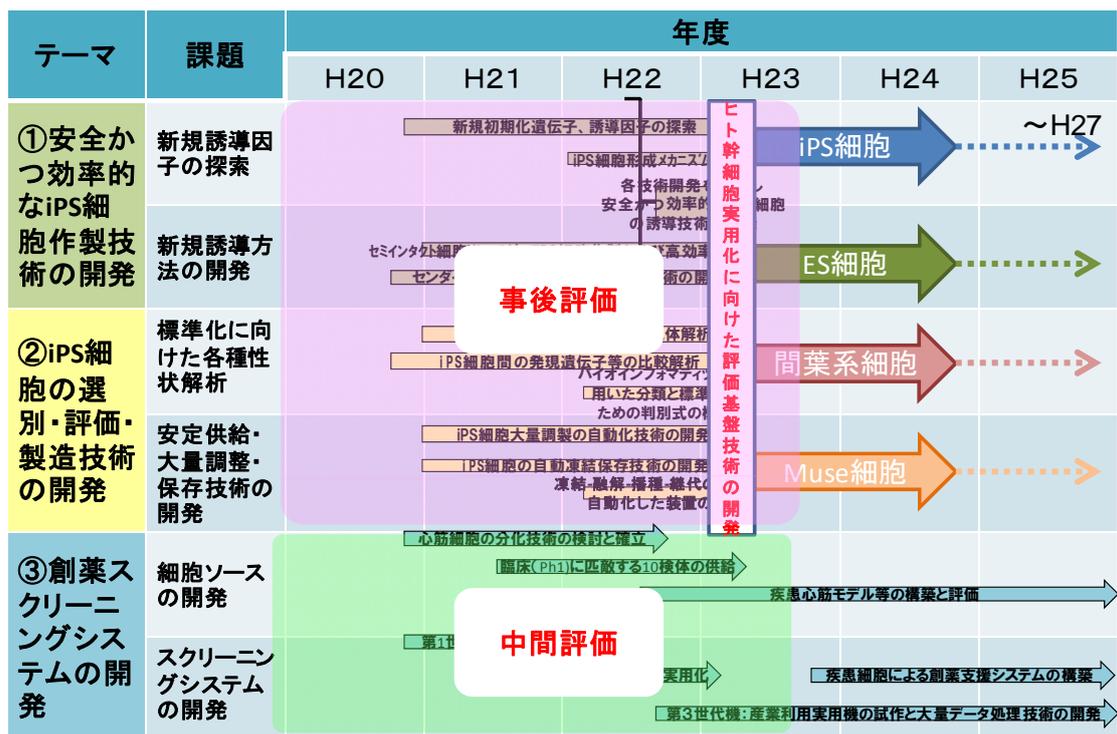
3. 情勢変化への対応

プロジェクト発足当初は、各研究項目とも以下に示す通り平成25年度までの計画で行った。



当初の研究開発計画

その後、内外の研究開発動向に鑑み、研究開発項目①及び研究開発項目②を発展的に統合し、研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」を新たに設定。再生医療への応用を可能とする細胞源の確立を目標として、平成23年度から5年計画で新規に着手すべく基本方針を改訂した。なお、平成22年度補正予算により前倒しで着手した。以下に、見直し後の研究開発計画を示すが、研究開発項目①と②に関しては、今回は「事後評価」としての評価とし、研究項目③に関しては、「中間評価」として対応することとした。



見直し後の研究開発計画

4. 中間評価結果への対応

該当せず。

5. 評価に関する事項

中間評価を平成23年度、事後評価を平成26年度に実施する。

Ⅲ. 研究開発成果について

事業全体の成果の概要

プロジェクトリーダー 鍋島 陽一
(財) 先端医療振興財団先端医療センター

本プロジェクトは iPS 細胞作製の基盤技術開発、その選別・評価・製造技術等の開発、および、iPS 細胞の創薬スクリーニングシステム開発への利用を目的として推進され、以下の結果を得た。

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

1. ヒト cDNA 発現ライブラリーから、遺伝子発現調節に関与する転写因子、シグナル伝達系因子をコードする遺伝子群から MEF 細胞を用いて新規 iPS 細胞誘導遺伝子の探索を行い、18 種の新規 iPS 細胞誘導遺伝子を同定した。この中には Klf4 代替機能をもつ 4 遺伝子が含まれており、特に 3 遺伝子 Glis1、Dmrtb1、Pitx2 はヒト線維芽細胞でも Klf4 の代替機能を有しており、三胚葉分化能、キメラマウス作製能、ジャームライントランスミッションも確認できた。更に Klf4 の代替因子として同定した G6 は iPS 細胞作製効率の劇的な上昇をもたらし、c-Myc (M) を除いた山中 3 因子 Oct3/4 (O)、Sox2 (S)、Klf4 (K) (ガン化効率は非常に低いがいPS細胞作製効率は低い) に Glis1 遺伝子を組み合わせると、OSK と比較して数百倍の iPS 細胞誘導効率を示すことも明らかとなった。また、iPS 細胞誘導においては偽陽性細胞が発生することが知られているが、Glis1 遺伝子は真の iPS 細胞の取得率を顕著に増大させることも明らかとなった。なお、最近、OSK が相互に結合する報告されているが、G6 は OSK と結合することによって相乗効果をもたらしている可能性が示唆されている。

2. レトロウイルスベクター等の挿入型ベクターを用いて樹立された iPS では染色体上に残った因子が再活性化される可能性があり、このリスクを解消するために、化合物による iPS の誘導を試み、カビから Klf4 遺伝子の発現を誘導する物質を見出したが、作用に付いては今後の解析が必要である。

3. 一方、誘導因子をタンパク質として導入する方法として、セミインタクト細胞リシール法を用いて iPS 細胞の誘導を試みた。GFP-Oct4 とそのプロモーター領域を含む上流配列と共にノックインしたマウスより MEF 細胞を調製し、山中 4 因子のリコンビナントタンパク質 (His-Oct4, GST-Sox2, GST-Klf4, GST-c-Myc) を導入後リシール(再封入)した。また、ES 細胞細胞質の導入など様々なカクテルの可能性を検討した。その結果、4 因子導入のリシール細胞でのみ、1 日目から Oct4-GFP 陽性の細胞が現れ始め、2~3 日後にはその細胞が細胞集団となって増殖して行く様子が観察されたが、コロニー形成はタンパク質導入後 5 日目頃から停止し、その殆どが脂肪細胞様に形態が変化した。本方法では、MEF 細胞の核が山中の 4 因子タンパク質と同時にしかも一気に暴露されることより Oct4、Nanog などが一度に発現してくると考えられるが、iPS 誘導にはそれらの発現時期、発現量の正確な

コントロールが必要であると思われ、今後、本方法の利点を活かすには導入因子、その量比の考察等、多面的な検討を必要としている。

4. 遺伝子に組み込まれない持続発現型センダイウイルスベクター (SeVdp ベクター) の開発、改良に取り組み、4つの多能性誘導遺伝子を単一のベクターに搭載した SeVdp (*c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2*) を用いることによって高効率で、質的均一性が高い iPS 細胞を3週間程度で樹立することに成功した。

5. 一方、SeVdp の残存が何らかの作用を引き起こす可能性が有り、ウイルスゲノムの除去に取り組んだ。SeVdp ゲノムはゲノム RNA を複製しながら動的な平衡を保っていると予想され、ゲノムを複製する RNA ポリメラーゼの活性を阻害することで除去できると推定し、RNA ポリメラーゼの活性ユニットと考えられる L タンパク mRNA に対する siRNA を用いて発現を抑制すると比較的早い速度で、不可逆的に除去できることが確認された。また、培養条件を検討し、40°C で1週間、培養することにより、細胞内の残存ウイルス RNA 量が顕著に減少することや、3個のエンベロープタンパク質をコードする遺伝子 (M, F, HN) のうち、少なくとも2個の遺伝子を欠損させることによって自立複製可能なベクター粒子の出現を抑えることにも成功し、全体としてセンダイウイルスベクターによる誘導の効率化、安全性に関する多くの成果が得られた。

6. iPS 細胞の実用化にあたってはどの組織から細胞を採取するかを考慮しなければならない。これまで iPS 細胞は皮膚などの細胞より樹立してきた。今回、全血から単核球を比重分離し、抗 CD3 抗体、IL2 でセレクションした T 細胞に、センダイウイルスベクターを用いて山中 4 因子を導入することにより iPS 細胞の樹立に成功した。本方法は、T 細胞提供者に苦痛を与えず、また短期間で iPS 細胞を樹立できることから、有効な iPS 細胞作製方法である。しかし、T 細胞由来 iPS 細胞は T 細胞レセプター遺伝子に不可逆な再構築が起こっており、完全な造血幹細胞を作製できず、T 細胞白血病の発症の危険がある。そこで、遺伝子再構成が起こっていない末梢血由来単球細胞から iPS 細胞を誘導する方法も併せて開発した。

7. 心筋疾患、遺伝性疾患を始め、多数の疾患特異的 iPS 細胞の誘導に成功した。これらの細胞を疾患/病態の理解に結びつけるには、的確に分化した細胞を誘導する技術が鍵である。

研究開発項目② 「iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

本課題は多面的な解析、開発が必要な段階にあり、複数のグループにより以下に記載するような多面的な研究、解析を進めた。

(1) iPS細胞は株毎にその特性が異なっており、iPS細胞の特性・安全性を確認する技術、使用目的に適したiPS細胞を選定する技術の開発が重要である。そのためには、iPS細胞成立過程の遺伝子発現プロファイルデータと生物学的特性情報を統合したデータ解析アルゴリズムを開発し、樹立されたiPS細胞の特性や安全性を統一的に現す必要がある。本研究ではその基盤となる研究を進め、以下の結果を得た。

1. iPS 細胞の生成過程の分子変化を解析するには効率良く iPS 細胞を誘導できるシ

ステムの開発が必要であり、その方法の開発を試み、以下の結果を得た。

(a) 始原生殖細胞から山中4遺伝子のうち1種類の遺伝子を導入することで、iPS細胞を誘導できることを見出し、始原生殖細胞に特異的発現する遺伝子と山中4遺伝子との組み合わせによるiPS誘導を検討した。その結果、MEF細胞にPrmt5、Klf4およびOct3/4を導入することでiPS細胞を効率よく誘導することに成功した。(b) c-Mycを導入して樹立したiPS細胞とそれ以外の遺伝子を導入して作製したiPS細胞の遺伝子発現パターンに違いがあることを見だし、c-Mycの意義解明へと進めている。(c) 幹細胞の自己複製、多能性維持に効果のあることが示唆されているシグナル伝達阻害剤の組み合わせを検討し、CHIR99021 (GSK-3 β inhibitor)、PD325901 (MEK inhibitor) および A83-01 (TGF- β type-1R inhibitor) を用いることで、遺伝子導入なしに効率的にiPS細胞が誘導できることを見出した。

2. iPS細胞の生成過程を解析するため、細胞を溶解後、直接cDNAを合成、2回のRNAの増幅によりごく微量の細胞から網羅的遺伝子発現を解析する方法を開発した。この微量解析法では100個の細胞があれば解析でき、かつ、発現パターンは既存の方法と相関性が高いことが確認された。iPS生成過程で形成されるコロニーに含まれる細胞数は100-1,000個程度であり、本手法は今後のiPS化メカニズム解析に威力を発揮すると期待される。

3. 開発された方法によりマウス始原生殖細胞のiPS化過程で変動する遺伝子の解析を行い、その過程で1) 分化特性の喪失、2) 多分化能の獲得、3) 多分化能の維持・安定化に関連する遺伝子を見出した。この研究がiPS細胞の特性を評価するマーカー遺伝子の同定、ヒトiPS細胞の解析方法の確立へと発展することが期待される。

(2) iPS細胞は株毎にその特性が異なっており、多数の細胞/組織をオリジンとする多種類のiPS細胞を樹立し、遺伝子、糖鎖、形状、核型、エピジェネティクス等の各種性状からiPS細胞間の性質を比較し、iPS細胞標準化技術の開発を試みた。

1. 4因子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入する方法によりヒト羊膜由来iPS(8細胞株)、ヒト子宮内膜由来iPS細胞株(4細胞株)、ヒト胎盤動脈由来iPS細胞株(4細胞株)、ヒト胎児肺組織由来繊維芽細胞iPS細胞株(3細胞株)を樹立、提供した。各細胞について、継代数5~10代、10代以上、さらに20代以上を経た細胞を供給した。

2. これらの細胞の遺伝子発現解析、細胞表面糖鎖解析に供し、更にこれらのデータのバイオインフォマティクス解析を進め、細胞の樹立・培養方法が安定しており、安定供給、大量調整、保存技術の開発に貢献することができた。

3. 開発してきたレクチンアレイを更に改良し、幹細胞評価に適するレクチンレパートリーを加え、96種類のレクチンを固定化した高密度レクチンアレイを開発し、iPS細胞誘導に伴うレクチンの変化を解析した。その結果、9種類のレクチンはiPS細胞で高いシグナルを示し、29種類のレクチンシグナルの低下が観察された。また、35種類のレクチンを糖鎖結合特異性に基づいて6グループに分類して、iPS誘導に伴う糖鎖構造の変化を抽出した。これらの結果を総合して、iPS細胞判別能向上、iPS新規マーカー発見に成功した。

4. 各種iPS細胞の遺伝子発現プロファイルの網羅的解析、ならびにそのクラスタリン

グ解析を行い、iPS細胞の未分化状態の判別及び分化指向性を解析した。特にばらつきの要因として樹立方法、親細胞、培養方法、継代数を解析し、(a) 2520種類のiPS細胞特異的な遺伝子マーカーを同定し、(b)これによりiPS細胞の性質に関与すると推定される親株毎の違いを見分けることに成功し、更に(c)同一親株由来のiPS細胞株間の違いを見分けることにも成功した。また、(d)継代による遺伝子発現の変化も確認された。なお、(e)誘導したiPS細胞が由来細胞、作製方法などによるクラスターを形成する傾向も観察され、遺伝子発現パターン網羅的解析がiPS細胞の分別標準化の有用な指標になることを示唆し、安定大量供給のための条件検討に大きく貢献する結果となった。

5. 118種のiPS細胞のDNAマイクロアレイ解析データに基づき、特異的パスイエイ解析を行い、28のヒトiPS細胞特異的制御ネットワークを同定した。また、レクチンアレイ計測データと併せてヒトiPS細胞特異的な13の糖鎖転移酵素を同定した。

(3) エピゲノムの変化はiPS細胞誘導の分子基盤であり、また、iPS細胞、幹細胞の生物学的な性質の理解、機能解析には、染色体の状態、エピゲノム解析が必須であることから、産総研チーム、東大チームによってその基礎研究を進めた。

1. iPS細胞の核型解析、染色体解析のための細胞調製法の最適化、評価法を確立した。また、iPS細胞解析の鍵の一つであるエピジェネティクスの解析を進めるために、ヒト全ゲノムから27000カ所のCpGサイトの解析ができるアレイシステムを用いて、メチル化状態の解析を進め、iPS細胞評価法の開発を進めた(産総研)。

2. エピジェネティクス解析を効率よく進めるための独創的な方法論の開発を進め、体細胞、ES細胞、iPS細胞のゲノム状態を解析し、その特徴を明らかにした。山中4因子によって誘導されたiPSはESとはメチル化パターンが異なっていると判断され、iPS誘導の分子基盤解析に役立つデータと考えている(東大)。

(4) iPS細胞自動培養装置による、安定供給・大量調製・保存技術の開発を目指して研究を進め、(a)20継代以上にわたってヒトiPS細胞を自動連続培養装置で培養を継続すること、(b)未分化のiPS細胞コロニーを判別し、選択的に剥離すること、(c)10代以上にわたってヒトiPS細胞を酵素処理せずに継代培養すること等に成功した。また、(d)iPS細胞を凍結保存し、解凍後に平均生存率50%以上を達成できた。これらの成果はiPS細胞クローンを選別し、継代培養を自動的に進め、大量に培養すること、また、得られた細胞を安定に供給・保存する事が可能である事を示している。

(5) 幹細胞の医学応用は多面的であり、目的に最も相応しい細胞、分化誘導技術の開発を必要としており、その一環として成体由来幹細胞の可能性を検討し、ヒト成体由来の多能性幹細胞「Muse細胞」を発見し、その培養法を確立し、以下の結果を得た。

Muse細胞は、(a)3胚葉(内胚葉、外胚葉、中胚葉)の細胞に分化する能力を有する、(b)ヒト成体からSSEA-3をマーカーにしてセルソーティングにより簡便に分離することができる、(c)腫瘍性増殖を示さないが、特定の培養法により増殖させることが可能である、(d)ストレス耐性である、(e)劇症肝炎、脊髄損傷、筋変性等の各種モデル動物にMuse細胞を静脈内投与すると、損傷組織に遊走、正着し、遊走先の細胞に分化し、組織再生に寄与する、などの特徴を有する。Muse細胞は組織再生、損傷治癒、正常組織の再構築等において重要な

役割を果たしていると推定され、その分子機構の解明、医学応用の可能性を検討することが今後の課題であり、その基盤となる研究の発展が期待される。

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

新規化合物の毒性を早期に確認することは新規薬剤開発の重要なステップであるが、特に QT 延長、不整脈の発生等、心毒性、心筋細胞への影響を調べることは重要である。本プロジェクトでは ES あるいは iPS 細胞から誘導した心筋細胞を用いて心毒性を効率よく検出するシステムの開発に取り組み、以下の成果を得た。

③-1 (a) ヒト iPS 細胞から効率よく心筋細胞を分化誘導する方法の開発

1. 心筋細胞を安定的に大量に供給するため、心筋細胞の発生メカニズムを調べ、心筋細胞はその発生過程で G-CSF の分泌が上昇し、また、その受容体である G-CSFR の発現が顕著に増加し、自らその信号を受け取り、細胞増殖を誘導している事を示した。

2. ES 細胞、iPS 細胞由来の心筋細胞も同様の機構で著しく増殖することを観察した。また、投与時期、投与濃度の調節により、その増殖を調節できる。この成果は、心筋細胞に分化させることが難しいことが知られているヒト ES 細胞、あるいはヒト iPS 細胞から心筋細胞を作成し、創薬のスクリーニングや再生医療に応用する際の鍵となる技へと発展すると期待され、心臓再生医療実現の大きな一歩と考えられる。

③-1 (b) スクリーニングシステムへのヒト iPS 細胞由来心筋細胞の供給

ヒトの心筋細胞を用いたスクリーニング系が待ち望まれており、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いたスクリーニング系を確立するため、定期的に東京医科歯科大学安田研にヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を供給し、MEA (Microelectrode Arrays) 法による活動電位の計測を行った。また、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いる事により、心筋細胞特異的 Na 電流、K 電流、Ca 電流を記録し、更に特異的チャネル阻害薬により電流が阻害されることを確認し、評価班のユーザーフォーラムへ評価用心筋細胞として供給している。

③-2 (a) 心筋毒性を検出する装置システム (ハードウェア) の開発

1. ヒト細胞を利用して、バイオチップ上に心臓組織のネットワークモデルを構築して計測することができれば、ヒト個体の不整脈発生/心機能異常のモデルとして利用できる可能性がある。そこで、ヒト iPS 細胞等幹細胞からヒト心筋細胞を誘導し、これをチップ上に 1 細胞単位で構成的に配置することで、細胞間の興奮伝導や協同性 (コミュニティ・エフェクト) をチップ上に再現できる臓器・組織の応答をモデル化した *in vitro* 細胞ネットワークモデル (*quasi-in vivo* 系) を構築し、これを用いて致死性不整脈発生の発生原因となる心筋細胞間の興奮伝導の異常発生を直接定量的に観測できる創薬スクリーニングシステム (オンチップ・リエントリーモデル) の開発をめざした。その結果、「細胞ネットワーク興奮伝導 (空間伝達)」「1 細胞波形ゆらぎ (時間変化)」の 2 つの観点を実現するチップの試作に成功し、更に多面的な課題を解決した第 2 世代装置システムの開発へと進んで

いる。

2. 創薬スクリーニングシステムを実用化するためにはハードウェア(装置システム)の開発に続くソフトウェア(プロトコル)開発を必要としており、(a)1細胞レベルでの細胞外電位遅延(FPD)応答の「時間的ゆらぎ」計測法の開発とその評価、(b)細胞ネットワークを用いた心室(ST領域)「興奮伝導」の「空間伝導ゆらぎ」計測法の開発、(c)強制拍動刺激系を用いた「時間ゆらぎ」「空間伝導ゆらぎ」計測法の開発を進めた。

③-2 (b) 解析・判断プロトコル・データベース(ソフトウェア)の開発

上記で開発した装置システムを利用して、薬物のヒトでの致死性不整脈誘発リスクの大きさを推定できる装置システムのプロトコル開発を行った。具体的には、(a)ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた既存 *in vitro* 計測法による偽陰性・偽陽性検査の改善の定量的評価、(b)「時間ゆらぎ」とイオンチャンネルブロックの相関計測による「ゆらぎ」についての原理的解明、(c)1細胞レベルでの細胞外電位遅延(FPD)応答の「時間的ゆらぎ」計測法の開発とその評価、(d)強制拍動刺激系を用いた「時間ゆらぎ」「空間伝導ゆらぎ」計測法の開発、(e)ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いたトラフィック計測技術の開発を進め、正確で再現性のある装置システム、ソフトを開発しつつある。

③-2 (c) システム評価

ヒト臨床データと極めて近い試験結果を供することが期待されるヒト iPS/ES 細胞由来心筋細胞を用いて、開発システムの有効性を検証することを目標に設定した。

1. 既に *in vitro*/*in vivo* 試験から薬効が明らかにされている化合物を用い、開発システムのデータとこれまで取得された試験データの比較を行うために、(a)東京医科歯科大技術の技術トランスファーを実施し、(b)致死性不整脈(TdP)を誘発するリスクの大きさが判明している薬剤を含む15薬剤、(c)Na⁺、Ca²⁺、K⁺チャンネルブロッカー、(d)hERG偽陽性薬剤の評価を進め、(e)ヒト幹細胞由来モデル心筋の性状評価、比較を行った。

2. これらのデータに基づいてユーザーフォーラムの構築、製薬企業等との情報交換を進め、同時にメガファーマとの交流と技術共同評価を進めた。この結果、当初目標としていた薬剤について、その評価を完了させた。

3. この技術を三菱化学メディエンスに導入し追試に成功し、複数拠点での同一性確認にも成功した。

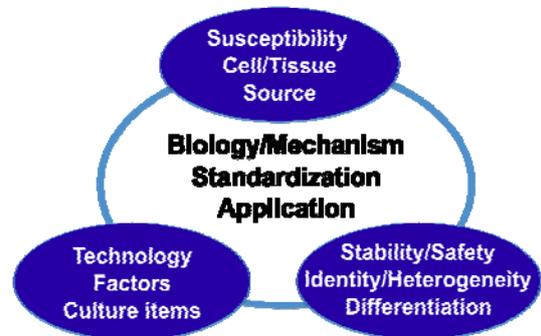
4. 動物実験との比較評価を行い、本プロジェクトにて開発した2次元 FPD マップによる評価で十分に既存計測法と同等以上の精度での評価が可能であることを確認することに成功した。

5. 国内外の製薬企業との情報交流、ビップファーマとの共同評価を開始しており、製薬企業が希望する化合物についての評価を推進している。

まとめ

誘導された iPS 細胞の性質はどのように規定されるか? 例えば、使用する細胞の性質が

誘導された iPS 細胞の性質に反映することが示唆されており、一方、新規誘導因子の発見、新規誘導技術の開発がその問題点の解決をもたらすことも示唆されている。おそらく幾つかの重要な要因がトータルとして作用し、誘導された細胞の性質が規定され、その安全性、均一性、分化特性が特徴づけられると推定される。また、得られた細胞の特徴を解析することが新たな課題を明確にし、細胞ソースの検討や誘導技術の更なる開発を促す。この相互作用の繰り返し、サイクルをまわす事により、一方で、誘導機構の理解と幹細胞生物学の発展がもたらされ、他方で、細胞の標準化、臨床医学、薬剤開発への応用の展望が拓かれる。



本プロジェクトは重要な成果をもたらし、確実に研究の前進をもたらした。とはいえ、研究成果が実を結び、国民にその果実が届けられるには、今後のたゆまぬ努力と多くの時間を必要としている。また、iPS 細胞研究は開発の初期段階にあり、その更なる発展のためには、多くの関連領域の発展を含めた調和のとれた長期戦略に基づく研究開発を必要としている。

Ⅲ - A 一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム担当分

1. 事業全体の成果

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

山中 4 因子と異なる新規な多能性誘導因子を探索し 18 種類発見した。これらの因子の遺伝子を細胞導入するプラスミッドの改変を行い高効率化、高品質な iPS 細胞作製を可能にした。線維芽細胞を iPS 細胞化する能力のある低分子化合物はヒト歯髄細胞の iPS 細胞化を検討中である。センダイウイルスベクターの改良を行い、iPS 細胞をより高品質、高効率に作製することに成功した。誘導された iPS 細胞から不必要になったセンダイウイルスを除去する化合物は得られなかったが、センダイウイルスを効率的に除去する条件を見出した。

1.1. ② 研究開発項目② 「iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

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

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

ヒト iPS 細胞から心筋細胞へ分化誘導する条件として、G-CSF が有効であることを見出した。更に分化した心筋細胞を純化する条件を確立した。心毒性検出システムの基幹技術である電気刺激計測技術、薬剤濃度制御・計測技術、ノイズ低減技術等の開発で目標を達成した。ヒト ES 細胞由来の心筋細胞クラスターを用い自律拍動下での心毒性評価を行い、偽陰性薬剤を含む 10 薬剤で正しく評価できるシステムであることを確認した。ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を用いた測定では 3 薬剤について評価し、ヒト ES 細胞由来心筋細胞の場合と同様の結果を得た。心毒性検出システム関連技術の東京医科歯科大から三菱化学メデイエンスへの移管・導入と心毒性既知薬剤 15 剤の評価、既存技術との相関性あるいは既存技術からの優位性を調べている。ユーザーフォーラムを開催し国内製薬企業、海外メガファーマへ技術紹介し、海外企業から提供された薬剤による評価を実施した。

1.2 達成状況

中間目標	達成度
研究開発項目① 「安全かつ効率的なiPS細胞作製のための基盤技術の開発」 これまでに報告されたヒトiPS細胞誘導因子に比べて誘導効率を高める遺伝子因子の探索を行い、少なくとも1つ以上の新規な誘導因子を同定する。また、遺伝子導入を代替し、ヒトiPS細胞の誘導を可能とする化合物等の探索・検討を行い、少なくとも1種以上の新規誘導因子を同定する。加えて、開発を進める遺伝子導入法、化合物等が腫瘍化を誘発する危険性が少ないことを確認する。	100%
研究開発項目② 「iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」 iPS細胞等幹細胞について、樹立された株毎、あるいは各種幹細胞毎の性質を規定している因子を探索・同定するとともに、均質な細胞を選別・評価・製造するための基礎的知見を得る。	100%
研究開発項目③ 「iPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」 ③-1) 心筋細胞等へ効率よく分化させる技術を開発し、同等の性質を有した細胞の提供を可能にする。正常者及び遺伝性QT延長症候群患者各3名からiPS細胞を樹立し、これらの細胞から心筋細胞を誘導する。	100%
③-2) 創薬スクリーニングシステムについては、ハードウェア及び解析ソフトウェアの試作を完了し、そのユーザー評価を受け、システムの確立に向けて必要となる開発課題を明確化する。	100%

以下に達成状況を記述する。

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

1.2. ①-1 新規多能性誘導遺伝子の探索

2年間で18種の新規iPS細胞誘導因子を発見した。これらの因子の一部を詳細に解析したところ、既知のiPS細胞誘導因子に比べて誘導効率が高く、山中4因子と相乗的に働く新規因子Glis1を発見した。本因子は、これまで遺伝子機能が全く報告されていない新規因子であった。

1.2. ①-2 多能性誘導法を効率化する化合物の探索

山中4因子のうち、Klf4遺伝子発現促進物質の探索の結果、糸状菌の二次代謝産物中より、Klf4遺伝子発現促進物質を見出した。センダイウイルス除去物質のスクリーニングの結果、4種類の化合物を見出した。また、高温下でセンダイウィル感染細胞を培養すること

により、センダイウイルスを検出限界以下まで除去する方法を開発した。

1.2. ①-3 安全な遺伝子導入技術の開発

山中 4 因子を同時に搭載した持続発現型センダイウイルスベクター (SeVdp) を用いて、初期化遺伝子を染色体上に残存することなくヒト及びマウス iPS 細胞を作製する技術確立した。iPS 細胞の作製効率は従来のレトロウイルスベクター法に比べて約 100 倍に向上し、作製したヒト iPS 細胞株の遺伝子発現解析からその性質が株間で非常に揃っていることが示された。また、作製したヒト及びマウス iPS 細胞を免疫不全マウスに接種しても浸潤を伴う悪性腫瘍の発生は観察されなかった。さらに、この技術を使って、末梢血単球から iPS 細胞を作製することに成功した。完全なゲノムを保持している末梢血細胞から外来遺伝子の残存が無い iPS 細胞を樹立したのは世界初の成果である。

1.2. ② 研究開発項目② 「iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

1.2. ②-1 高感度 DNA チップを用いた発現解析技術を基盤とした iPS 細胞の選別・評価・製造技術等の開発

始原生殖細胞に山中 4 遺伝子のうち、1 種類の遺伝子 (Prmt5) を導入すれば iPS 細胞化できることを見出した。1 種類の遺伝子導入で iPS 細胞化した細胞はテラトーマを形成することから多能性を獲得していることが明らかになった。また始原生殖細胞で特異的に発現する遺伝子 (Prmt5) と山中遺伝子 (Klf4、Oct3/4) を同時に導入したとき線維芽細胞からも iPS 細胞を誘導できた。この iPS 細胞もテラトーマを形成した。3 種類のシグナル伝達阻害剤(Ti)を用いることで、始原生殖細胞から、8-16%という高い効率で iPS 化できる実験系を構築した。始原生殖細胞から Ti を用いて効率的に iPS 細胞化する技術確立した。この方法で作成した iPS 細胞を用いて iPS 細胞生成過程の網羅的遺伝子発現の解析を行った。iPS 細胞化に伴って変動する遺伝子について、パスウェイ解析を中心に解析中である。

iPS 細胞生成過程で変動する遺伝子について、分化特性を示す遺伝子の喪失、多分化能の獲得、多分化能の維持・安定化に伴って発現する遺伝子を明らかにできた。iPS 細胞化における myc 遺伝子の役割を調べるために、myc を用いて作製した iPS 細胞と myc を用いないで作製した iPS 細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現プロファイルは異なったが、特徴的な遺伝子を選定できていない。

1,000 個の細胞から、網羅的に遺伝子発現解析を行う技術を構築した。微量法で検出される遺伝子は通常法で検出される遺伝子と 80%以上一致したので微量検出法は有効な手段であることがわかった。iPS 生成過程をタイムラプス顕微鏡で GFP コロニーの形成を追跡した。その結果、約 10%確率で近接するコロニーが融合して一つのコロニーになることを認めた。

1.2. ②-2 成体由来の多能性幹細胞の操作技術を基盤とした iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発

今回発見された Muse 細胞は、組織修復作用を担っている細胞と推定され、事実無処理の Muse 細胞を各種臓器に傷害を受けた免疫不全マウス (Nog マウス) の血中に投与することにより、劇症肝炎、筋変性等において組織に応じた細胞分化と機能修復への寄与が認められた。Muse 細胞は 40 年の実績を有する骨髄移植において、ごく僅かな割合で含まれて人に移植されてきた細胞であることが分かった。また現在世界中で行われている間葉系幹細胞移植においても、数パーセントの割合で含有されている。したがって、Muse 細胞はこれまでヒトに移植されてきた実績を有する細胞であり、安全性がある程度担保されることが考えられる。

Muse 細胞について、ES 細胞で行われている細胞塊生成の方法で作製された ES 細胞クラスターと Muse 細胞から作製された Muse 細胞クラスターとを比較検討して、Muse 細胞が浮遊培養で ES 細胞と同じようなクラスターを形成することを確認した。細胞分裂様式に着目し、一細胞レベルからのタイムラプス顕微鏡観察を高分解能で行うために、ポルシヤスコープをはじめとする光学顕微鏡観察のための装置を整備・最適化した。これらを用いて、Muse 細胞の細胞分裂過程を高分解能で観察し、非対称分裂などの状態を撮影することに成功した。Muse 細胞クラスターなどの超薄切片を作製して、細胞の特徴を高分解能で観察した。心筋において重要な働きをするギャップ結合タンパク質の構造を電子線結晶学で解析し、X線結晶学で行った高分解能の構造解析と合わせて、ギャップ結合の複雑なゲーティング機構の一端を解明し、心筋細胞への分化誘導グループへ分子レベルからの情報を提供する研究を進めた。

ヒト iPS 細胞が Primitive Streak, Mesoderm, Hemangioblast を経て血球系の前駆細胞、血管内皮前駆細胞へと順序だって分化していく系を確立した。この分化誘導が観察される培養方法は無血清、フィーダーフリーの培養系である。この分化系を用いることにより造血前駆細胞レベルでの詳細な検討も可能であり、生成される各種血球も正常の機能を持っていることから、疾患特異的 iPS 細胞から分化させた血球の解析に有用な系が構築されたと考えている。

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

1.2. ③-1 iPS 細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

ヒト iPS 細胞から効率よく心筋細胞に分化誘導する方法の開発を行っている。ES 細胞や iPS 細胞のような多能性幹細胞から心筋細胞へと分化誘導させた細胞集団をさらに細胞増殖させる因子を同定した。この因子を多能性細胞から分化させた細胞集団へと加えることで、心筋細胞を効率よく増殖させることが可能となり、心筋細胞を用いる心毒性スクリーニングシステムへのアッセイ細胞の安定供給が可能となった。更に心筋梗塞などの心臓疾患を対象とした再生医療のリソースとして活用できることが期待される。

これまで ES 細胞から心筋細胞へと効率良く分化させる研究を行っており、2005 年には、ES 細胞の培養液中に **Noggin** というタンパク質を加えることで、効率良く心筋細胞を分化誘導させられることを報告した。今回、**Noggin** というタンパク質の添加によって ES 細胞がどのような変化を生じさせるかということを観察した結果、**Noggin** を添加した ES 細胞では顆粒球コロニー刺激因子受容体 (**G-CSFR**) という遺伝子の発現が、**Noggin** を添加していないものに比べ 1000 倍近く上昇することを見出した。この結果をマウス胎仔においても確認したところ、妊娠 10 日目、胎生中期と呼ばれる時期の、心臓組織で **G-CSFR** 遺伝子の発現が高まっていることを確認し、同時にこの受容体に信号を入力する顆粒球コロニー刺激因子 (**G-CSF**) 自体も発現していることを確認した。胎生中期は胎仔の心臓が大きく発達している時期でもあり、ES 細胞で示された結果が実際のマウスの発生段階を再現しているものであることが確認した。また、マウス ES 細胞に **Noggin** と **G-CSF** を添加したところ、**Noggin** 単独で添加するよりも効率良く心筋細胞へと誘導を行うことができ、この結果はヒト iPS 細胞でも確認することができた。

今回、単純な工夫によって、分化誘導させた心筋細胞の収率を飛躍的に向上させることができたことは非常に大きな意味を持つ。加えて、**G-CSF** はこれまで血液系の研究において着目されていた分子であり、免疫を司る白血球のひとつである顆粒球の産生に関わったりすることは知られていたが、心筋細胞に対しては、これまで報告がなされていなかったことから、非常に新規性の高い発見であるということが出来る。昨今、世界中の研究者が、様々な種類の因子や体細胞を用いて iPS 細胞の樹立を報告しており、iPS 細胞の樹立法研究といった分野は徐々に成熟しつつある。このような状況下において、多能性細胞を用いた再生医療応用を加速するためには、細胞の分化法や臨床応用に向けた移植方法などの開発研究も重要になりつつあり、今回の成果は、目的とする組織への分化誘導の効率やその収率の向上という大きな問題に対し、重要な知見を得たものであると考えられる。

健常人 iPS 細胞由来心筋細胞の作製を試みた。iPS 細胞は、人工的に作製した、生体内のどのような細胞にでも分化できる「多能性幹細胞」である。センダイウイルスという特殊な遺伝子の運び屋を用いて末梢血液中に豊富に存在しているリンパ球から iPS 細胞を作製することを計画し、リンパ球のひとつであるヒト T 細胞から、ゲノム遺伝子を傷害することなく iPS 細胞を作製することに成功した。T 細胞は体外で簡単に培養・増幅させることができ、血液検査などで採取された血液などを利用することで患者に苦痛を与えることなく iPS 細胞を樹立することが出来るようになった。皮膚生検を必要としないため、女性や乳幼児等これまで iPS 細胞を樹立することが比較的困難であった方からでも容易に iPS 細胞を樹立できるようになった。再生医療のリソースとして有望であることはもちろん、遺伝子の再構成後の細胞でも iPS 細胞の樹立ができたことから、そのリプログラミングの機構を明らかにするためにも期待が持てる成果であるといえる。

スクリーニングシステムへのヒト iPS 細胞由来心筋細胞の供給を行っている。更に、心疾患を有さない健常者 10 名、遺伝性 QT 延長症候群 3 名から iPS 細胞を樹立することに

成功した。この3名の遺伝性QT延長症候群は1型、2型、3型であり、いずれも遺伝子変異部位を同定した。これらのヒトiPS細胞から心筋細胞の誘導に成功した。さらにこれらの再生心筋細胞の活動電位の測定にMEA法を利用することで成功した。

1.2. ③-2 iPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

非公開

1.3. 達成見込み

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

研究開発項目①「安全かつ効率的な iPS 細胞作製のための基盤技術の開発」については、実施体制の見直しにより、平成 23 年 3 月で終了した。

1.3.② 研究開発項目② 「iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

研究開発項目②「iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」については、実施体制の見直しにより、平成 23 年 3 月で終了した。

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

健康安心イノベーションプログラム「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発」の基本計画は、ヒト iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発（平成 20～25 年度）を研究開発内容として記載している。研究開発計画で現在の研究開発項目③「iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」は研究開発項目②「ヒト iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」となる。本事業原簿においては旧研究開発項目③として以下記載する。

本研究開発では、iPS 細胞技術を利用してヒト組織細胞より iPS 細胞にリプログラミング誘導し、さらにできた iPS 細胞を分化誘導することによりヒト心筋細胞を作出し、これを用いて開発候補薬の心毒性等の有無を高い感度と特異性をもって予測できる創薬スクリーニングシステムを開発する。このシステムで得られた結果と既存の動物モデルによる計測結果の比較解析を行い、製薬企業等で実用計測可能な信頼性の高いシステムを目指す。更に、本システムが国際標準になるよう世界の製薬企業あるいは規制当局などに働きかける。

1.3.③-1 iPS 細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

ヒト iPS 細胞を心筋細胞に効率的に分化誘導する方法を開発するとともに、大量の均一化されたヒト心筋細胞を作出する技術を開発する。さらに、健常人（及び研究の進展に応じて遺伝性心筋疾患患者）の iPS 細胞から心筋細胞に分化誘導し、両者を比較することにより創薬スクリーニングに如何に活用するかを解析する。具体的には、健常人由来および心疾患患者由来のヒト iPS 細胞を樹立する事に関しては、非常に順調に進捗しており、目標期間内に充分達成可能と考えられる。既に 1, 2, 3 型 QT 延長症候群の患者の iPS 細胞は樹立出来ており、心筋に誘導した後に詳細に解析を進めている。

1.3.③-2 iPS 細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

既に開発済みの「1 細胞レベル」「細胞ネットワークレベル」のシステムをベースとして、心臓内の回路を細胞ネットワークとして構成したモデルを構築し、薬物の不整脈誘発

リスクの大きさを正確に推定できる創薬スクリーニングシステムの開発を継続する。開発されたシステムと、従来の動物を用いて行う心毒性試験等の方法との間で比較検討を行い、ヒトiPS細胞由来の心筋細胞を用いたシステムの妥当性、優位性を実証する。

ユーザーフレンドリーなスペックを備えた創薬スクリーニングシステムを開発し、受託試験として上市する。世界標準としてICHガイドラインの安全性薬理試験ガイドライン（S7）への掲載を目指す。そのためには世界の製薬企業の合意を取り付けることが必要であるので、毒性学会等で積極的に結果公表を行うとともに国際的製薬企業（メガファーマ）や規制当局を積極的に訪問し、創薬スクリーニングシステムの紹介を行う。

最終目標	
<p>研究開発項目③「iPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」（新テーマ：研究開発項目②「ヒトiPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」）</p> <p>健常人由来、心疾患患者由来のヒトiPS細胞等幹細胞を活用し、心筋細胞等へ効率的に分化誘導を行い、これを用いて開発候補薬の心毒性等の有無を高い感度と特異度をもって予測できる、製薬企業等が利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。利用する心筋細胞については、通常フェーズI試験における治験者数と同等の体制となるような数の、異なるヒトiPS細胞等幹細胞から分化させたものを用いることが可能な、細胞供給の準備体制を整えるものとする。</p>	<p>達成の可能性大きい</p>

2. 研究開発項目ごとの成果

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

委託機関：一般社団法人 バイオ産業情報化コンソーシアム

2.①-1 新規多能性誘導遺伝子の探索

独立行政法人産業技術総合研究所 五島 直樹
京都大学 iPS 細胞研究所 山中 伸也

(1) 事業目的と背景

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、疾患メカニズム解明のための優れた研究材料として、また、再生医療や創薬における安全性評価など様々な応用分野での活用が期待される新たな細胞源であり、多能性幹細胞の一つと位置づけられている。京都大学のグループでは、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 因子 (現在ではガン遺伝子 c-Myc を除いた 3 因子によっても誘導されることが示されているが、4 因子に比べて誘導効率が低い) を、一方、ウイスコンシン大学のグループでは別の 4 因子 (Oct3/4、Sox2、Nanog、Lin28) をレトロウイルスベクターによってヒト体細胞へ導入し、ヒト iPS 細胞が誘導可能であることが報告されている。また、ハーバード大学のグループでは、4 因子のうちの c-Myc の代わりに低分子化合物を処理することで iPS 細胞が誘導可能であることを報告している。このように異なる遺伝子の組み合わせ、あるいは化合物との組み合わせによって iPS 細胞が誘導可能であることが示されており、より誘導効率の高い因子やその組み合わせがあることが予想されることから、より安全かつ効率的な iPS 細胞作製技術の早急な開発が重要な課題である。

(2) 事業内容と目標

ヒト cDNA 発現リソースから遺伝発現調節に関与する転写因子、キナーゼ、フォスファターゼのカテゴリーに絞り、集中的にこれらの遺伝子群から新規多能性誘導遺伝子の探索を行う。この 3 カテゴリーの遺伝子群は機能的に極めて重要なことから、未取得のクローンはクローン化を行って、上記探索を行う。また、ヒト cDNA クローン全体を幾つかのグループに分けたクローンミクスチャーを使用して、ヒト遺伝子全体から、新規 iPS 細胞誘導遺伝子の探索を行う。遺伝子探索としては、MEF に多能性誘導 4 遺伝子 (Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc) から 1 遺伝子を除いた 3 遺伝子と上記候補遺伝子またはクローンミクスチャーをレトロウイルスベクターで導入し、除いた多能性誘導遺伝子の機能を相補する遺伝子を探索する。また、既知多能性誘導遺伝子と新規多能性誘導遺伝子の組合せによって、安全、効率的な iPS 細胞作製法を開発し、知財化を目指す。

また、既知および新規多能性誘導因子の組合せによる効率、安全性、質的に高い iPS 細胞作製技術を開発する。そのために、因子組合せ解析のために汎用的マルチ遺伝子発現系による iPS 細胞誘導、マルチ遺伝子発現プラスミドを用いた非ウイルス性 iPS 細胞の効率的作製を試みる。

(3) 研究成果

2. ①-1 (a) 新規 iPS 細胞誘導因子の探索

ヒトcDNA発現リソースから、遺伝子発現調節に関与する転写因子、シグナル伝達系遺伝子のカテゴリーに絞り、集中的にこれらの遺伝子群から新規iPS細胞誘導遺伝子の探索を行った(図1)。その際標的細胞としてMEF細胞を用いた。

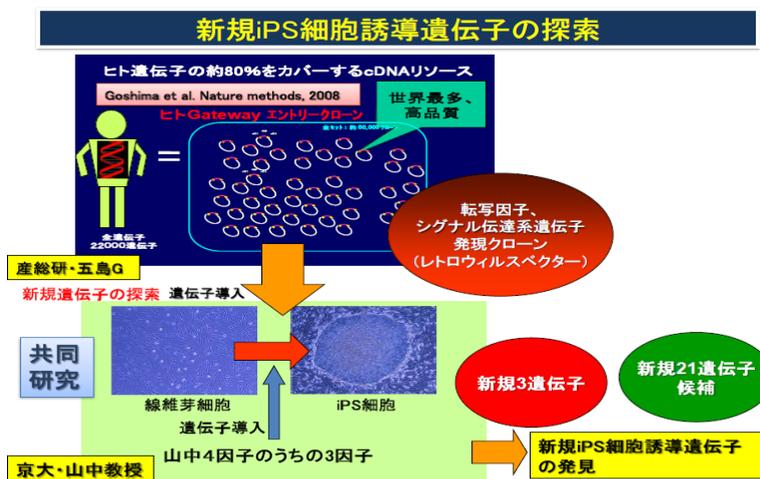


図 1 新規 iPS 細胞誘導因子の発見

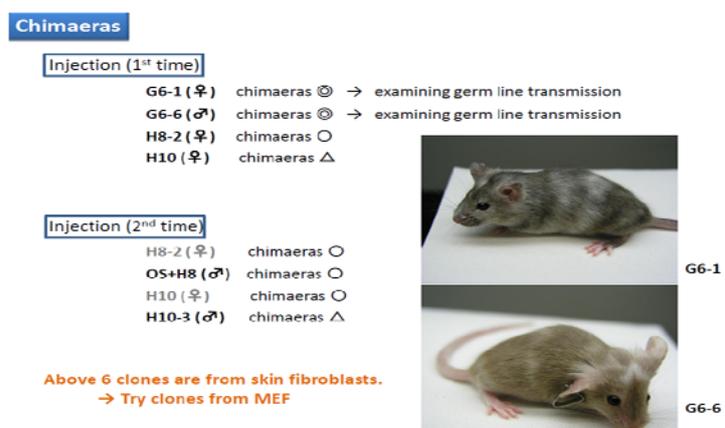


図 2 新規 iPS 細胞誘導因子によるキメラマウス作製
(G6:Glis1、H8:Dmrtb1、H10:Pitx2)

Klf4 代替機能をもつ新規 3 遺伝子を発見した。この 4 遺伝子のうち 3 遺伝子 Glis1、Dmrtb1、Pitx2 はヒト線維芽細胞でも Klf4 の代替機能を有しており、三胚葉分化、キメラマウス作製、ジャームライントランスミッションも確認できた。新規 4 遺伝子については米国仮出願を行った後、PCT 出願を行った。

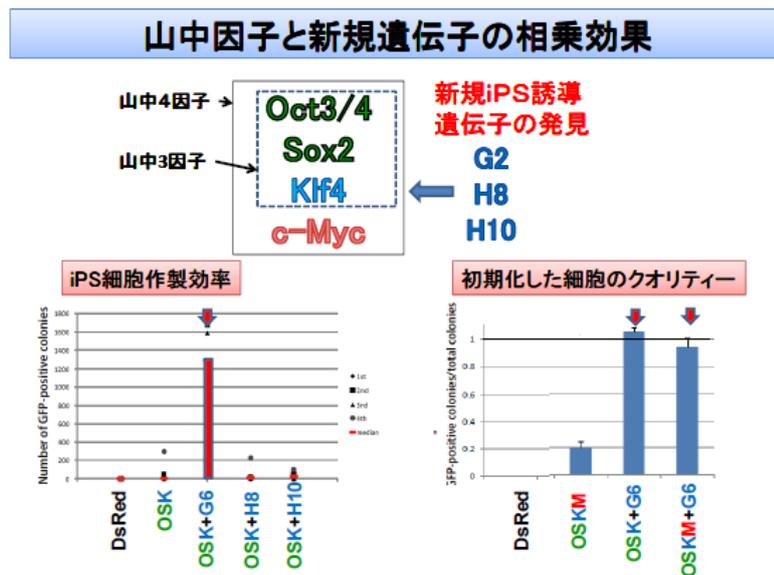


図 3 新規因子と山中因子の組合せによる iPS 作製
 (G6:Glis1、H8:Dmrtb1、H10:Pitx2)

これらの新規 3 遺伝子と既知の多能性誘導遺伝子の組合せを検討した。山中 4 因子からオンコジーンの c-Myc (M) を除いた山中 3 因子 Oct3/4 (O)、Sox2 (S)、Klf4 (K) は、ガン化効率は非常に低いがいPS細胞作製効率は低いという問題点がある。この山中 3 因子 OSK に遺伝子を組み合わせて iPS 細胞誘導を行ったところ、Glis1 遺伝子は山中 3 因子 OSK と相乗的に働き、OSK に比べて数百倍の iPS 細胞誘導効率を示した (図 3)。また、iPS 細胞誘導において偽陽性細胞が発生することが知られており、MEF での山中 4 因子 OSKM による iPS 細胞誘導の場合、僅か約 20% しか真の iPS 細胞にならない。iPS 細胞誘導における真の iPS 細胞の取得率を指標に Glis1 遺伝子の効果を調べた。その結果、山中 3 因子 OSK および山中 4 因子 OSKM に対して、Glis1 遺伝子の相乗効果が認められ、いずれの組み合わせでも Glis1 遺伝子によって 100% の真の iPS 細胞の取得率が得られた (図 3)。

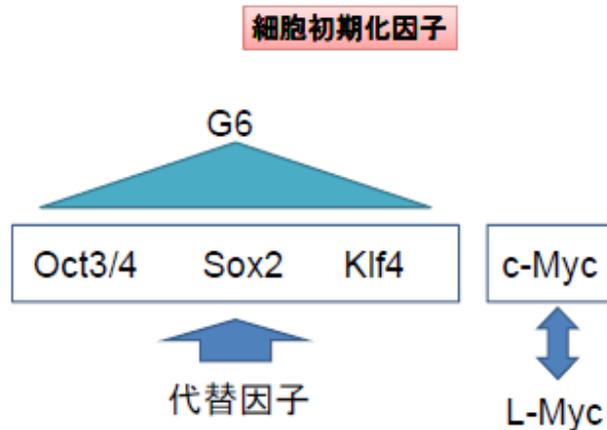


図 4 iPS 細胞誘導因子のまとめ
(G6:Glis1)

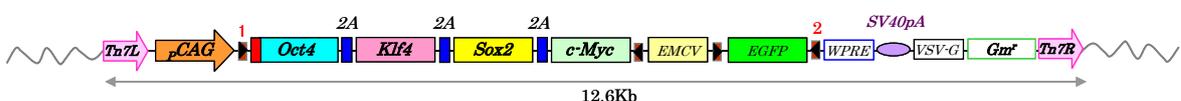
図 4にiPS細胞誘導因子のまとめを示す。これまでも山中因子の代替因子は報告されている。しかし、それらはいくまでも代替としての機能である。昨年、c-Mycの代替因子としてL-Mycが報告された。図 3の結果だけをみると今回発見されたGlis1 遺伝子はc-Mycの代替のようにもみられるが、タンパク質機能解析の結果、Glis1 遺伝子はOSKとタンパク質相互作用で結合することが分かっている。最近、OSKが相互に結合する報告もなされている。山中 4 因子とGlis1 遺伝子の相乗効果に関連していると考えている。

2. ①-1 (b) 汎用的マルチ遺伝子発現系による iPS 細胞誘導

マルチ遺伝子発現プラスミドを用いたiPS細胞の効率的作製を試みた。一分子プラスミドベクター上にヒト型Oct4, Klf4, Sox2, cMyc (hOKSM) をこの順序に配置した発現プラスミド・バクミドをBacMam粒子に封入し (図 5A)、これをMEF (Mouse Embryonic Fibroblast) へトランスダクションして、2~3週間でiPS細胞が良い効率で得られる条件を確立した。プラスミド・BacMam粒子の導入効率は約 90%であった。得られたiPS細胞の pluripotency markers (EOS(S4), Nanog, SSEA1) の発現性は良く、BacMam法で得られるiPS細胞の質的均一性は高いことが認められた。エレクトロポレーション法でマウスOKSM発現プラスミド (図 5B) を直接的にMEFへ導入し、SV40-LT遺伝子 (図 5B) との共導入することにより、3週間程度でiPS細胞が得られる方法を確立した。

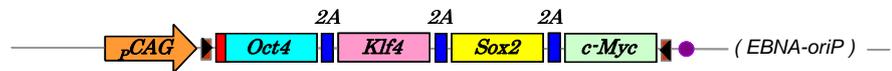
A

バクミド接続用のOKSM-2A2プラスミド (version 2)



B

直接導入に用いたOKSMプラスミド



SV40 LTプラスミド



図 5 マルチ遺伝子発現プラスミドベクター構築

(4) 目標の達成度と意義

新規 iPS 誘導因子を現在までに 18 種類発見し、知財確保を行っている。その内の 4 遺伝子について重点的に解析を行った。4 遺伝子の中の Glis1 遺伝子は、山中 4 因子と相乗的に働き、c-Myc を抜いた山中 3 因子 OSK に Glis1 遺伝子を加えることで OSK の数百倍以上の iPS 細胞誘導効率 (OSK での効率と比較) の上昇を可能にした。誘導効率だけでなく、質的に Glis1 遺伝子と山中 4 因子または山中 3 因子との組合せは、真の iPS 細胞取得率を上昇させ、従来の 20% から約 100% になった。また、現在、ガン化の影響を調べているが、極めて低く安全な iPS 細胞導入法といえる。基礎科学的にも産業化のうえでも極めて重要な発見といえる。今回の発見以外にも、未解析の新規クローンがある。本開発項目は今年度で終了するが、今後、フォローアップ研究でこれまでの結果を成果に結びつける。

マルチ Gateway によってタンデムに構築された複数遺伝子を BacMam 法で細胞内に導入し、iPS 細胞を構築している。得られた iPS 細胞の質的均一性は高いことが認められた。本開発項目は今年度で終了するが、今後、フォローアップ研究でこれまでの結果を成果に結びつける。

2. ①-2 多能性誘導法を効率化する化合物の探索

独立行政法人産業技術総合研究所 新家 一男

(1) 事業目的と背景

幹細胞は様々な組織に分化する能力を有しており、神経、心筋、膵臓細胞等の様々な細胞を試験管内で得ることができる。これを用いることで従来は治療することが困難であった神経疾患や心臓疾患の根本的治療法に応用可能である。将来の再生医療に応用される技術として、ES 細胞を利用するものが最も先端に行く技術であったが、ES 細胞はヒトの生命の萌芽である受精卵を壊して作製するため、技術的な開発以前に、倫理的な問題により実用化は問題視されている。このような中、京都大学山中教授らは、2006年にマウス皮膚細胞から iPS 細胞を、2007年にはヒト iPS 細胞の作製に成功した。iPS 細胞は、再生医療が必要とされる患者自身の体細胞から樹立するため、倫理的問題は低く、かつ移植後の拒絶反応も回避できるという優れた性質を持つ。このように iPS 細胞は、文字通り万能性を持つ夢のような細胞であるが、癌化の問題など安全性の問題を含め未だ解決すべき課題は多く残されている。iPS 細胞作製の最も基本的な手法は、転写因子である Oct3/4、Sox2、Klf4 および c-Myc の 4 因子を、ウイルス感染法により正常体細胞に導入する方法である。iPS 細胞作製のための 4 つの遺伝子のうち、特に c-Myc は癌遺伝子であり発がん性が懸念されている。iPS 作製のもう一つの問題は導入遺伝子が染色体に組み込まれてしまうレトロウイルスを用いていることである。現在、c-Myc 無しでも iPS 細胞作製は可能になっており、さらに導入遺伝子を減らす、あるいはウイルス感染を用いない手法による iPS 細胞作製が望まれている。そこで、本研究では癌化などが起きないように安全に iPS 細胞を作製するため、iPS 細胞作製あるいは効率化を上げるような化合物を探索することを本研究の目的とする。

(2) 事業内容と目標

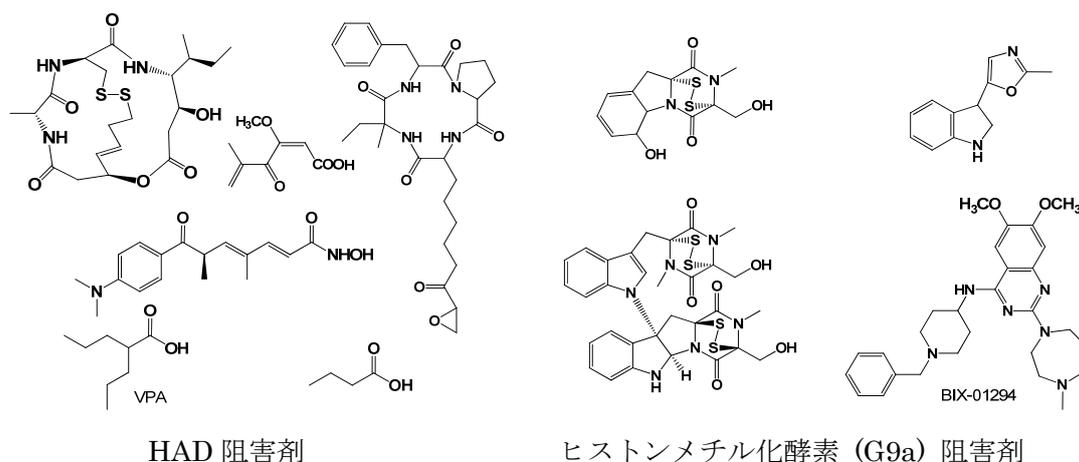
我々はこれまで、タンパク質相互作用制御物質のスクリーニングを実施する課程で、現時点で約 21 万サンプルもの天然物ライブラリーを確立している。これは、実際に運用しているライブラリー数として世界最大の物であり、天然物という観点からも他機関では得ることの出来ない化合物ライブラリーである。この世界最大の天然物ライブラリーに加え、細胞調製、サンプル添加、活性測定などのアッセイプロセスの効率化を図り、*in vitro* のタンパク質相互作用アッセイあるいは酵素アッセイでは、週に 5 万～10 万アッセイを行うことができる。レポーターアッセイや細胞増殖などのスクリーニングに対しては、週に 2 万アッセイ以上が可能なシステムを構築している。これらのアッセイシステムと世界最大の天

天然物ライブラリーのマッチングにより、極めて優位的かつ独創的なスクリーニングが可能である。この研究体制により、iPS 細胞あるいは他の ES 様細胞の実用化の問題となる課題を解決することにより、将来の幹細胞実用化に大きく貢献することが期待される。

ヒト iPS 細胞作製は、複数の遺伝子をレトロウイルスによって、体細胞へ導入することを基本技術とする。これは、分化した細胞が再度未分化能引いては万能性を持った細胞へ変換されることを示した優れた技術であるが、一方でウイルス導入を用いることによるガン化などの危険性、あるいは作製された iPS 細胞がヘテロな細胞群からなるというデメリットもある。こうした状況を踏まえ、本研究開発は、様々な細胞組織に分化できるヒト iPS 細胞等幹細胞の産業利用を促進することを目的として、iPS 細胞への効率的な誘導因子の探索を行うと同時に、多様な幹細胞操作技術の成果を活用し、iPS 細胞の新規誘導法開発に結びつける。

iPS 細胞作製について全く遺伝子を用いることなく、化合物のみで置き換えることが可能か否かは定かではないが、少なくとも遺伝子発現効率を上げる、あるいは幾つかの遺伝子を相補するような化合物は既に幾つか報告されている。代表的な化合物は、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) の阻害剤である VPA (valproic acid) であるが、この化合物はヒストンのアセチル化を亢進させることにより、クロマチン構造を変化させ、多くの遺伝子の発現を促進する。この他にも、クロマチン構造を変化させる化合物として、ヒストンメチル化酵素 G9a の阻害剤などが iPS 細胞作製には有効であると考えられる。最初の HDAC 阻害剤として知られる trichostatin A は天然由来の化合物であり、多くの HDAC 阻害剤が天然より見出されている。我々は、これまでの様々なスクリーニングにより、複数の HDAC 阻害剤を単離し、誘導体合成展開も行っている。また、これまでに遺伝子発現を指標とした複数のスクリーニングを行った結果、複数のヒストンメチル化酵素阻害剤を得ている。

このような化合物は、エピジェネティクスを制御することにより、遺伝子の発現を活性化あるいは抑制化する作用を示す。本研究では、正常ヒト線維芽細胞である NHF 細胞をテロメラーゼ遺伝子 (hTERT) で不死化した細胞である NHF/hTERT 細胞を用いて、Oct4、Sox2 および Klf4 遺伝子を発現誘導する活性を有する、上記の様な活性を示す化合物のスクリーニングを展開する。また、レトロウイルスの代わりに、染色体への組み込みが起きないことからセンダイウイルスを用いた iPS 細胞作製は、安全性を考えた上で有用な手法であると考えられるが、細胞質内に大量にセンダイウイルスが維持されることにより、何らかの副作用が現れることが懸念される。そこで、センダイウイルスを除去する化合物のスクリーニングも同時に実施する。以上のような、スクリーニングを展開し、iPS 細胞の作製を効率化する化合物を、天然物ライブラリーより一つ以上見出すことを目標とする。



(3) 研究成果

2. ①-2 (a) 遺伝子発現誘導物質

iPS 細胞作製効率化物質として、iPS 誘導因子 Oct4、Sox2 および Klf4 の発現誘導物質のスクリーニングを行った。遺伝子発現の指標としてレポーターアッセイ法を用いることを検討したが、通常遺伝子導入による機能解析は樹立細胞株、いわゆる癌細胞を用いることが一般的であるが、多くの癌細胞はゲノムに変異が入っている場合が多いこと、また DNA メチル化も大きく正常細胞からかけ離れているなどエピジェネティクス制御が破綻しているため、正常細胞での遺伝子発現誘導を観察する系としては不適切であると考えられる。そこで、ヒト正常細胞のモデルとして、ヒトテロメラーゼ遺伝子 hTERT を用いて不死化したヒト正常線維芽細胞に、Oct4、Sox2 および Klf4 のプロモーターにルシフェラーゼを組み込んだレポーター遺伝子を、ウイルス感染法により遺伝子導入した細胞を調製した（それぞれ、Oct4-NHF/hTERT 細胞、Sox2-NHF/hTERT 細胞、および Klf4-NHF/hTERT 細胞）。本細胞を用いて、約 20 万の天然物ライブラリーについて、iPS 誘導因子発現誘導物質のスクリーニングを行った結果、カビから Klf4 遺伝子の発現を誘導する物質（Klf4 プロモーターを活性化する物質）のヒットサンプルを唯一 1 つ見出した（ヒット率 0.0046%）。このカビの二次代謝産物について更に活性物質の単離・同定を行った。その結果、活性物質 A、B および JBIR-62（新規化合物）を単離することに成功した。

本 3 つの化合物について、Klf4-NHF/hTERT 細胞、Oct4-NHF/hTERT 細胞および Sox2-NHF/hTERT 細胞詳細な生物活性の検討を行った結果、本アッセイ系において、これらの化合物は、Klf4 および Oct プロモーターを強く活性化し、Sox2 プロモーターに対しては弱い誘導活性を示した。図 6 および図 7 に示すように、これらの化合物のうち、化合物 A が最も強力な活性を示したことから、以後化合物 A を用いて種々の活性試験を行った。

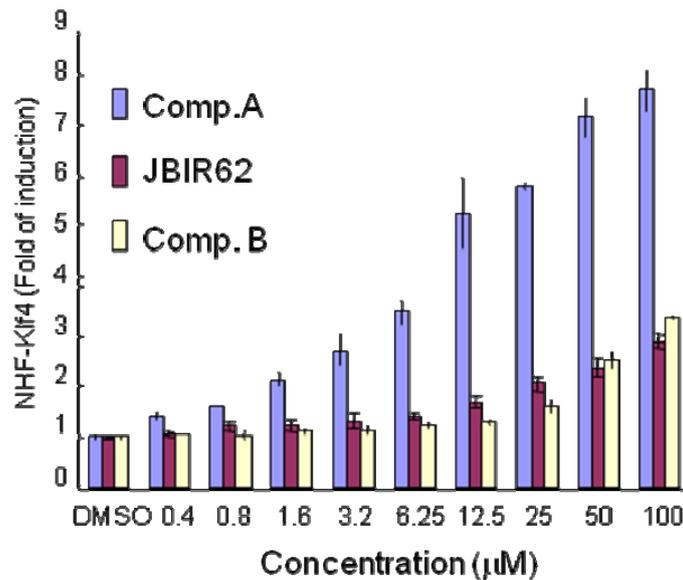


図 6 Klf4-NfY/hTERT 細胞におけるレポーター誘導活性

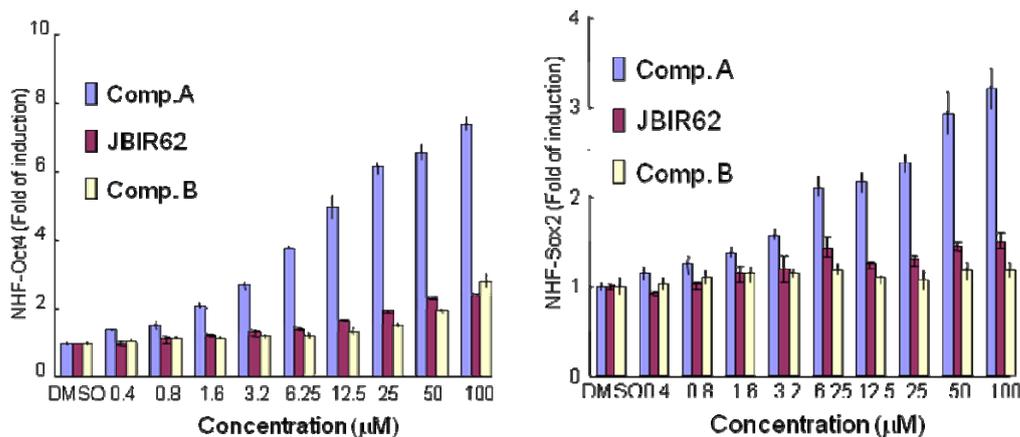


図 7 Oct4-NfY/hTERT 細胞 (左) および Sox2-NfY/hTERT 細胞 (右) におけるレポーター誘導活性

化合物Aは、スクリーニングではKlf4 プロモーターのみを活性化することで見出されたが、単離した化合物では活性の強弱は見られるが、全てのプロモーターを活性化した。そのため、化合物AはHDAC阻害剤のように、普遍的にプロモーターの活性化を促進する物質であることが懸念された。そこで、化合物AのCMVプロモーターの活性化に対する効果を検討した。その結果が図 8に示すものであるが、CMV/Luc-HEK293 細胞において、化合物Aは何らのプロモーター活性化作用を示さず、逆に癌細胞であるHEK293T細胞に対しては、細胞毒性を示すことが判明した。したがって、化合物AはHDAC (ヒストンデアセチラーゼ) 阻害剤のような、普遍的にプロモーターを活性化する化合物では無いことが示唆された。

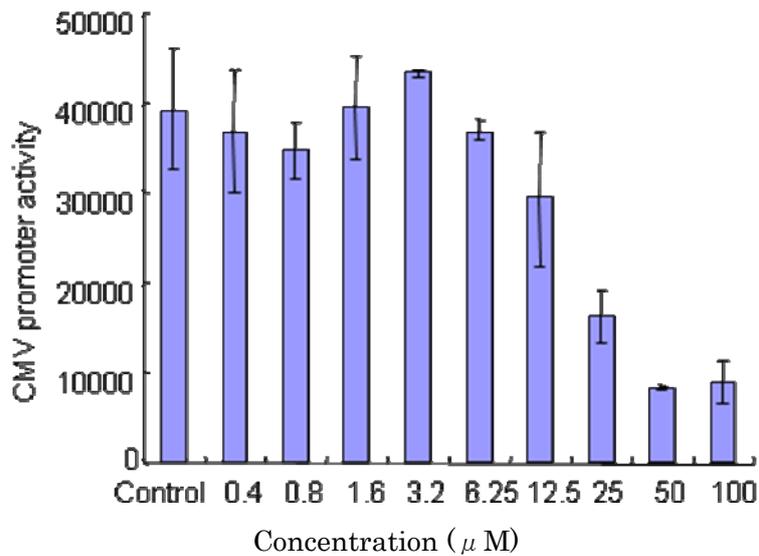


図 8 CMV/Luc-HEK293T 細胞におけるレポーター誘導活性

しかしながら、細胞によるプロモーター活性化機構の違いにより、このような異なる活性が発現する可能性も考えられたため、

表 1 化合物 A の各 HDAC 酵素に対する阻害効果 (活性%)

	HDAC1	HDAC 4	HDAC 6
TSA (1 μM)	1.8	2.5	4.3
化合物 A (500 μM)	100.9	92.7	99.7
化合物 C (500 μM)	100.0	85.1	82.0
JBIR-62 (500 μM)	98.2	83.7	95.6
DMSO	0.0	0.0	0.0

表 1に示すように、コントロールであるTSAは強くHDAC阻害活性を示したが、Klf4 プロモーター活性化物質は全く阻害活性を示さなかった。また、HDAC阻害剤同様、エピジェネティクスを制御するヒストンメチル化酵素である、G9aおよびSet9 に対する効果を検討した結果、何れの酵素に対しても何らの阻害活性は観察されなかった。これらの結果から、化合物Aは従来報告されているようなエピジェネティクス制御作用を示す化合物では無いことを明らかにした。

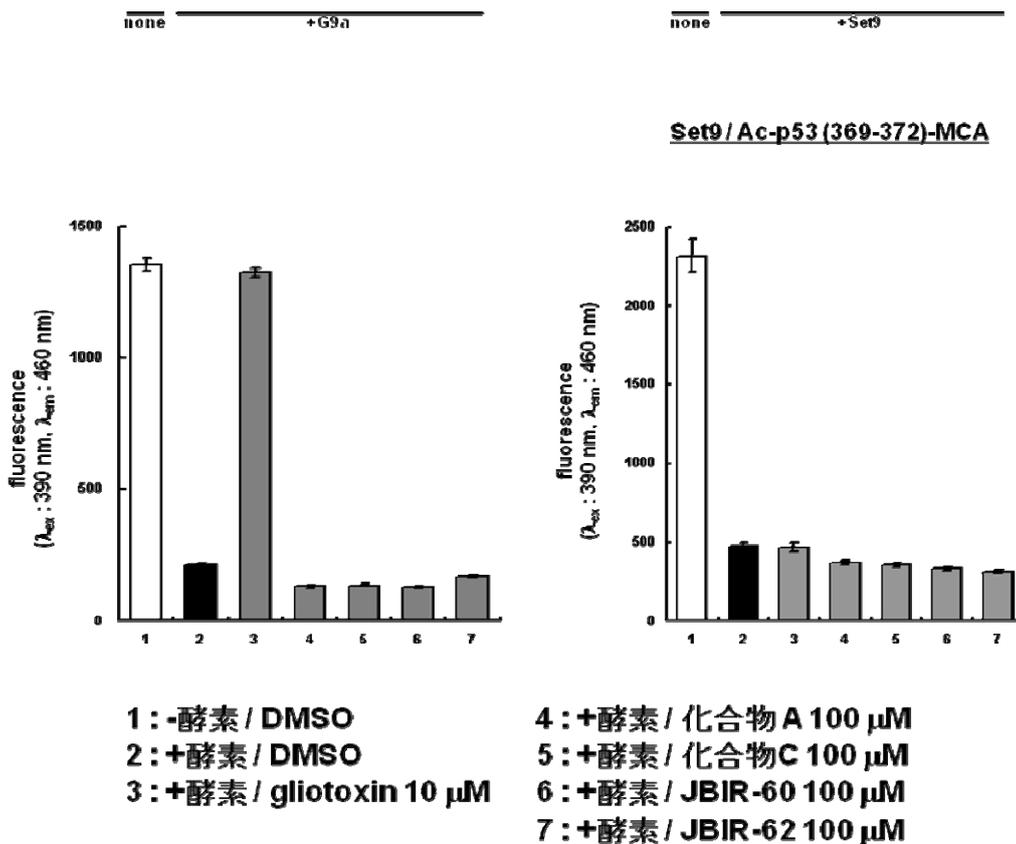


図 9 化合物 A およびその誘導体のヒストンメチル化酵素に対する阻害活性

次に、化合物 A がレポーター活性のみを上げるのではなく、内在性の Oct4、Sox2 および Klf4 プロモーターの活性化を誘導するか否かを検討した。ヒト正常線維芽細胞 BJ 細胞を用いて、化合物 A (50 μM) 添加 6 日後の Oct4、Sox2 および Klf4 遺伝子の mRNA 発現を、定量的 RT-PCR にて確認した結果、化合物 A は内在性の Sox2 および Klf4 の発現を誘導することが判明した。それに対し、化合物 A は Oct4 遺伝子の発現に関しては、何の作用も示さなかった。また、興味あることに MEF 細胞を用いて、転写因子の発現誘導活性を検討した結果、MEF においては遺伝子発現を促進しなかった。

本結果より、化合物 A はヒト細胞でのみ、Klf4 遺伝子の発現を誘導するという、極めて興味ある活性を示すことが示唆された。このことから、エピジェネティクスの違いが本物質の作用に関与することが示唆された。そこで、HDAC 阻害剤などのエピジェネティクス調節物質との併用効果を検討した結果、内在性の Sox2 および Klf4 遺伝子の発現を誘導することが判明した。本物質は、HDAC 阻害剤や DNA メチル化阻害剤などの既存のエピジェネティクス調節化合物とは異なる作用により遺伝子の発現を誘導する初めての化合物であり、今後の作用機作解析が望まれる。

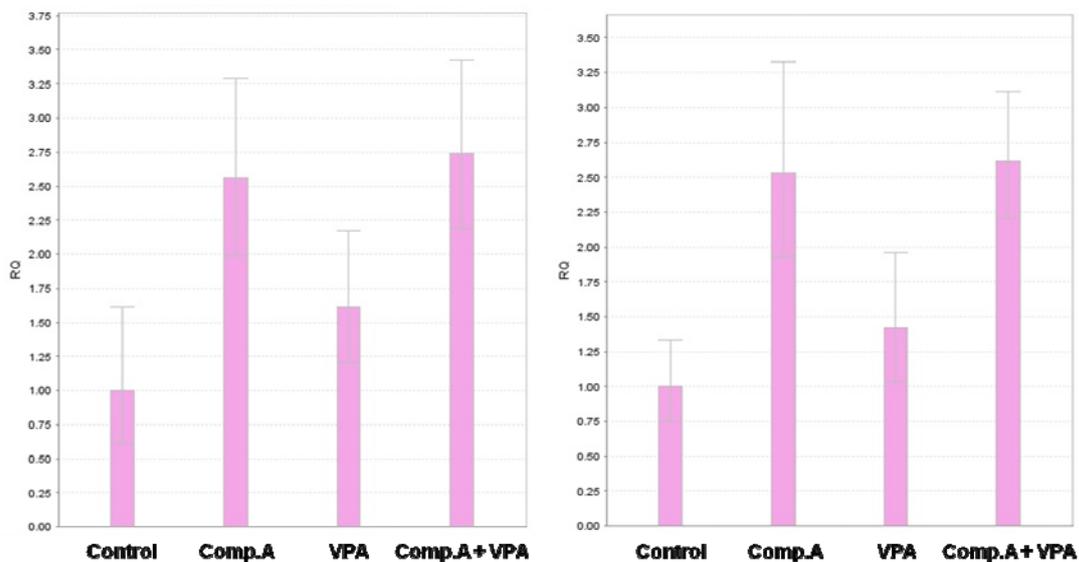


図 10 化合物 A の内在性 Klf4 (左) および Sox2 (右) 遺伝子発現誘導活性

次に、化合物 A の iPS 細胞作製への効果を検討した。対象とする細胞は、化合物 A により内在性の Sox2 および Klf4 の発現が誘導された、ヒト正常線維芽細胞 BJ 細胞を用いた。化合物 A が Klf4 の代償活性を示すことを期待し、化合物 A (50 μ M) + Oct4 遺伝子導入、あるいは化合物 A + Oct4/Sox2 遺伝子導入より、iPS 細胞作製を試みたが、残念ながら iPS 細胞様のコロニーの出現が観察されなかった。しかしながら、Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc 導入と化合物 A により、遺伝子のみ導入した群では、アルカリフォスファターゼ陽性コロニーでも、Nanog 陰性のコロニーの存在が見られるのに対し、強い Nanog 陽性のコロニーの出現が観察された。さらに、HDAC 阻害剤であるバルプロ酸 (1 mM) を同時に添加したところ、Nanog 陰性のコロニーは観察されなかった。本コロニーを継代培養したところ、ある段階で細胞分化が誘導されることが観察され、安定な iPS 細胞の取得は出来なかった。

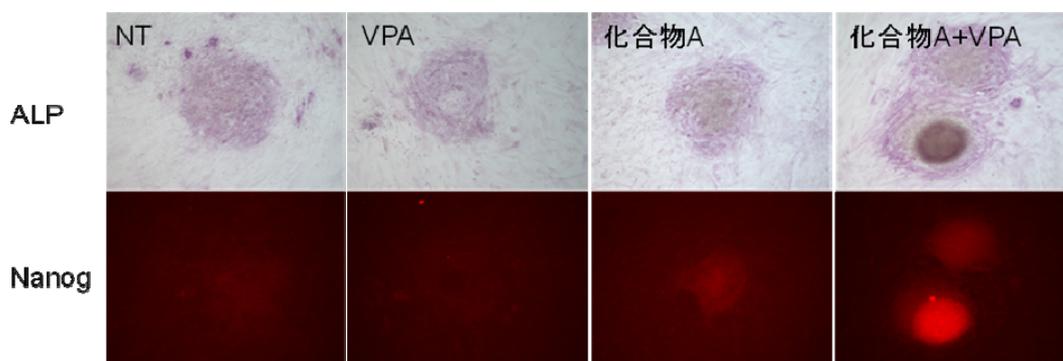


図 11 化合物 A の山中 4 因子導入 iPS 細胞作製への効果

また、Sox2 遺伝子が発現しており iPS 化の効率が良い歯髄細胞を用いて、化合物 A の効

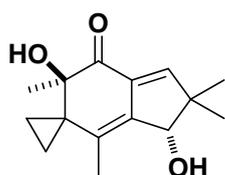
果を検討したが、残念ながら有意な差は認められなかった。

今日まで、霊長類では、マウス ES 細胞と同等の性質を持った ES 細胞は確立されていない。一方で、霊長類の中では最も原始的であると考えられているマーモセットの ES 細胞作製の過程で、Klf4 遺伝子の発現抑制が惹起されることが知られている。そこで現在、化合物 A により Klf4 遺伝子の発現が維持されることを期待して、霊長類初のマウス ES と同等の性質を持った ES 細胞の作成を進めている。

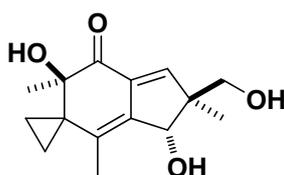
2. ①-2 (b) センダイウイルス除去物質の探索、および除去法の開発

センダイウイルス除去物質の探索を行った。センダイウイルスは、細胞内で増幅するがゲノムには組み込まれないこと、また遺伝子の発現強度が極めて高いという特異な性質を持つウイルスである。そのため、センダイウイルスにより山中 4 因子を導入することにより、安全かつ効率的に iPS 細胞の作製が可能であることが期待されており、本プロジェクトでも安全な導入方法として検討されている。しかしながら、細胞内で残留することで何らかの副作用が出るのではないかと懸念されている。そこで、天然物ライブラリーよりセンダイウイルス除去物質の探索を行うと共に、センダイウイルス除去法の開発を行った。スクリーニングは、同グループの中西博士により作製された EGFP を組み込んだセンダイウイルスベクターで感染させた、ヒト子宮頸癌 HeLa 細胞を用い、その EGFP の発現抑制を指標に行った。約 125,000 サンプルを用いて、スクリーニングを行った結果、5 つのヒット株を得ることに成功した。これらの株について、培養後、活性物質の単離・精製、および構造決定を行った結果、以下に示す化合物を見出した。現在、これらの化合物について詳細な活性を検討中である。

糸状菌 (担子菌、ツキヨタケ) NBRC008533 の生産する RNA 合成阻害物質

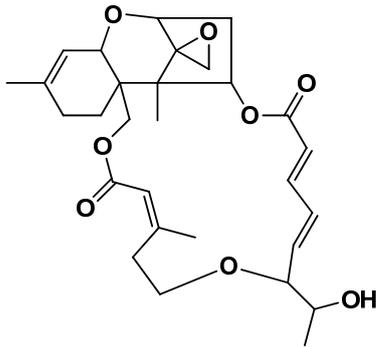


Illudin M



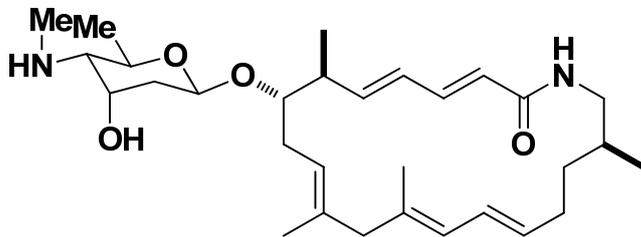
Illudin S

カビ BRC009005 の生産する細胞毒性物質、除草剤



Roridin E

放線菌 AK-BU73 が生産する細胞毒性物質



Vicenistatin

化合物によるセンダイウイルス除去に加え、さらに諸条件を加えることにより、より効率的にセンダイウイルスの除去を可能とする技術の開発を試みた。一般に、センダイウイルスは高温処理によりウイルス量の減少が観察されることが知られている。そこで、高温下での薬剤スクリーニングを行うことにより、より薬剤の効果が上がると考え、高温処理条件の検討を行った。その結果、高温処理のみで GFP 量、すなわちウイルス量の減少が観察された。高温処理による細胞へのダメージを観察するため 37°C に戻し、再び培養を継続した。その結果、細胞へのダメージは観察されなかったが、37°C で若干のウイルス保有細胞が観察された。高温処理 (40°C、144 時間) により劇的なウイルス量の減少が観察されたことから、本処理を繰り返すことによりウイルスの完全除去が可能ではないかと考え、37°C、一週間培養後、再び高温処理 (40°C、144 時間) を行った。その結果、GFP の検出ではウイルス保有細胞の存在が観察されなかった。そこで、さらに定量的 RT-PCR にてセンダイウイルス量を確認した結果、高温 2 回処理により検出限界以下までセンダイウイルス量を減少させることを明らかにした。この高温 2 回処理後、細胞を 37°C で一ヶ月間培養を行ってもセンダイウイルス保有細胞の発現は観察されなかった。

このように、高温処理によりセンダイウイルスの除去が可能であることが判明したため、次に山中 4 因子を含むセンダイウイルスで感染させたヒト正常線維芽細胞 TIG-3 より作製した iPS 細胞、SeV(+)-iPS 細胞を高温処理 (40°C、144 時間) した。その結果、SeV(+)-iPS を MEF 上で 40°C で培養すると、コロニー様の細胞塊の形成が観察され、正常ヒト iPS 細

胞に酷似した細胞が生じることが判明した。

次に高温処理した SeV(+)-iPS 細胞にセンダイウイルスが残存しているかを、免疫染色法を用いて検討した。その結果、高温処理した細胞ではセンダイウイルスの染色が認められなかった。これらの結果から、我々が使用しているセンダイウイルスは、高温処理により効率的に排除出来ることを明らかにした。

(3) 目標の達成度と意義

山中 4 因子のうち、Klf4 遺伝子発現促進物質の探索の結果、糸状菌の二次代謝産物中より、Klf4 遺伝子発現促進物質を見出した。本物質は、HDAC 阻害活性やヒストンメチル化酵素阻害などの、従来のエピジェネティクス制御物質とは全く異なる活性発現メカニズムにより、Klf4 遺伝子の発現を促進する。また、本物質はマウス細胞では活性を示さないと言う、極めて特異な活性を持った化合物であり、今後の活用が期待される。

センダイウイルス除去物質のスクリーニングの結果、4 種類の化合物を見出した。これらの化合物に関しては、現在効果を検討中であるが、より効率的にセンダイウイルスを排除するスクリーニング系の開発の過程で、高温下でセンダイウイルス感染細胞を培養することにより、センダイウイルスを検出限界以下まで除去する方法を見出した。

iPS 細胞の再生医学への応用までを見据えた安全性に関しては、今後の解析が必要であるが、iPS 細胞のスクリーニングへの応用などであれば十分であると考えられる。

2.①-3 安全な遺伝子導入技術の開発

独立行政法人 産業技術総合研究所

中西 真人

(1) 事業目的と背景

ヒト iPS 細胞を医療や創薬などの産業用途で実用化するためには、高い多分化能を維持しつつガン化しない高品質の iPS 細胞を再現性よく作製できる手法の確立が必要である。現在のヒト iPS 細胞の作製は、4つの初期化因子蛋白のアミノ酸に対応する遺伝子(Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc)を個別に搭載したレトロウイルスベクターを組織細胞に混合感染する手法が標準となっている。しかしながら、この方法で樹立された iPS 細胞の染色体には、使用した初期化遺伝子が不活化された状態で残っていて、細胞の分化に伴ってこれらの遺伝子(特に c-Myc)が再活性化されると細胞がガン化する。このため、iPS 細胞から分化させた細胞を再生医療に使う目的では、染色体上に初期化遺伝子を残さない作製法が必要とされている。また、染色体上に残された初期化遺伝子は樹立された iPS 細胞の品質にも影響を及ぼす。例えば、現在の iPS 細胞はその性質が非常に不揃いであることが知られているが、染色体上の初期化遺伝子の一部が完全に抑制されずに弱く発現していることが細胞の分化能に影響している可能性が指摘されている。さらに、4つの初期化遺伝子搭載ベクターを混合して iPS 細胞を作製する方法自体に初期化が不均一となる理由が存在する可能性も高い。以上の問題点を克服するために、染色体に外来遺伝子を残さない細胞初期化法が検討されているが、いずれも効率や作製した iPS 細胞の均質性・再現性で問題を残している。研究開発項目 3.2.1.3「安全な遺伝子導入法の開発」では、このような問題点を解決できる新しい遺伝子導入・発現法を開発することを目的とする。

(2) 事業内容と目標

研究項目 3.2.1.3「安全な遺伝子導入法の開発」では、(独)産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センターで開発されたユニークな遺伝子導入・発現系「M,F,HN 遺伝子欠損・持続発現型センダイウイルスベクター (SeVdp)」を使って、既存のヒト iPS 細胞の作製法が抱える問題点を解決することを目標としている。SeVdp は、4個の外来遺伝子を搭載して細胞質で長期(6ヶ月以上)にわたって持続的に発現することができる。そのため、2から3週間程度かかると言われている細胞の初期化過程で初期化因子すべての発現を維持できることが期待される。さらに、SeVdp ゲノムは細胞質で安定に保持され染色体に挿入されないため、初期化が完了した時点で SeVdp ゲノムを除去して外来遺伝子フリーの iPS

細胞を樹立することが理論的に可能である。そこで、本研究では、1) c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2 遺伝子を搭載した SeVdp を使ってヒトやマウスの組織細胞を初期化できることを証明する、2) 効率の良い SeVdp 除去法を開発して、実際にヒトやマウスの iPS 細胞が樹立できることを証明する、3) 大量生産が難しい初期化因子搭載 SeVdp の量産法を確立する、という 3 つの目標に取り組んだ。また最近、従来型の F 遺伝子単独欠損センダイウイルスベクターに初期化遺伝子を 1 個ずつ搭載したベクターが iPS 細胞作製のキットとして市販された。このキットではレトロウイルスベクターと同様に 4 種類のベクターを混合して使用し、高効率で染色体に遺伝子挿入が無いヒト iPS 細胞が樹立できるとされている。そのため、本研究では、市販されている F 遺伝子単独欠損センダイウイルスベクターと SeVdp の特性の違いについても評価した。

(3) 研究成果

2. ①-3 (a) iPS 細胞作製用持続発現型センダイウイルスベクターの作製

1) SeVdp ベクターの安全性と遺伝子発現活性の検証

持続発現型センダイウイルスベクターのプロトタイプは、野生型センダイウイルス Nagoya 株由来の持続感染変異株 Clone 151 のゲノムに外来遺伝子 1 個を挿入したものである (Nishimura, et al., *J. Biol. Chem.*, **282**, 27383-27391 (2007)、西村健・瀬川宏知・中西真人、特許第 4478788 号)。SeVdp はこのプロトタイプをさらに改良したもので、ウイルスの自律複製を完全に排除するために M、F、HN 遺伝子をすべて欠損し、4 個の外来遺伝子と置き換えたベクターである (図 12)。一方、市販されているキットになったセンダイウイルスベクターは、従来型の F 遺伝子単独欠損ベクターに初期化遺伝子を 1 個ずつ搭載したものである。本研究では、iPS 細胞樹立において SeVdp が持つ優位性について、安全性と、複数遺伝子を発現させる場合の発現パターン (図 12) について評価した。

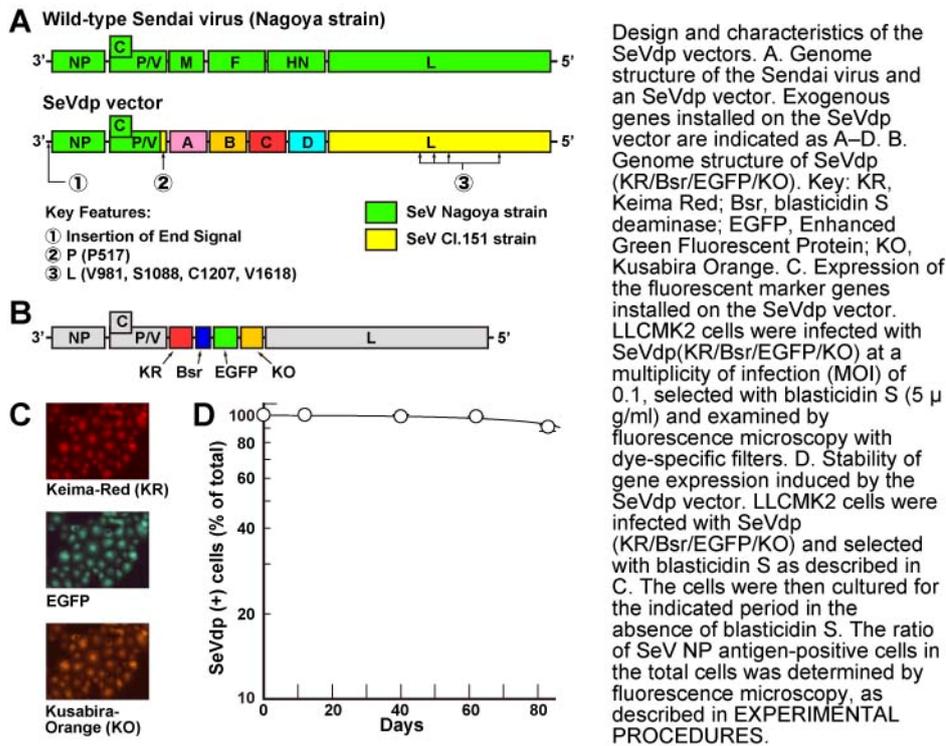


図 12 センダイウイルスベクターの設計とその性質

自律複製可能なウイルスベクターを使う実験は組換えDNA実験指針で定められた大臣確認実験に相当し、厳しい実験管理が要求される。特に、センダイウイルスベクターはヒトを含む極めて広い宿主特異性を持っているため、c-Mycのような発ガン遺伝子を搭載している細胞初期化用ベクターの安全性確保のためには、遺伝子導入細胞から感染性二次粒子が産生されるリスクを完全に排除する必要がある。センダイウイルスベクターではこれまでM、F、HN遺伝子のうち1つが欠損すれば自立複製可能な感染性粒子はできないとされてきた。しかし、M遺伝子、F遺伝子、HN遺伝子のうち1つが欠損しただけのベクターではウイルス抗原が大量に培養上清に放出されることが報告されており (Inoue, et al., *J. Virol.*, **77**, 3238-3246 (2003))、少量であっても感染性二次粒子ができていない可能性は否定できない。そのため、本研究では、M、F、HN遺伝子を単独、あるいは2個以上欠損させたベクターを作製して、ベクター感染細胞からの感染性二次粒子放出の有無を検討した。感染性粒子の検出はベクターに搭載したプラストサイジンS耐性遺伝子の伝播を指標に行った。また、細胞培養上清中のNPタンパク質の量はフィルタートラップアッセイで定量した。その結果、M、F、HN遺伝子のうち2個以上を欠損させれば感染性粒子やウイルス抗原の培地中への放出は検出できないのに対し、いずれか1個だけを欠損させた場合は自立複製可能な感染性粒子やウイルス抗原の培地中への放出が検出されることが明らかになった (表 2)。このことから、M、F、HN遺伝子をすべて欠損させたSeVdpは自律複製能が完全に欠失していて優れた安全性を示し、通常の機能承認実験で使用して差し支えないことが確認された。

一方、現在市販されているF遺伝子単独欠損センダイウイルスベクターの場合は、遺伝子導入細胞から自律複製可能な感染性二次粒子が生産されることが強く示唆された。

表 2 センダイウイルスベクターの感染性二次粒子放出に及ぼす M、F、HN 遺伝子の影響

感染性二次粒子の放出を完全に止めるためには
M,F,HN遺伝子のうち少なくとも2つを欠損させる必要がある

Vector Structure			NP protein (ng/day/ 10 ⁵ cells)	Bs ^r Colonies / 8mL
M	F	HN	8.75	> 10 ⁵
-	F	HN	5.36	366
M	-	HN	7.62	2
M	F	-	72.05	10
M	-	-	2.51	0
-	F	-	2.76	0
-	-	HN	2.61	0
-	-	-	2.56	0
Mock			0.98	0

産総研
ベクター

(Nishimura, et al., JBC, in press) 

次に、複数遺伝子の同時発現について検討した。iPS細胞の作製には、山中らが発見した4個の初期化因子(c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2)を1つの細胞で同時に発現することが必要である。通常は個々の初期化遺伝子を単独で搭載したレトロウイルスベクターを混合感染させてiPS細胞を樹立するが、この場合、同一細胞で4個の初期化遺伝子が同時に発現する可能性はかなり低いと予想される。また初期化遺伝子を単独で搭載した従来型のセンダイウイルスベクターの場合も同一細胞で4個の初期化遺伝子が同時に発現する可能性は低いと予想されるが、具体的なデータは示されていない。そこで本研究では、緑色蛍光タンパク質(EGFP)と赤色蛍光タンパク質(KO)の発現をモデルとして、2個の遺伝子を同一のベクターに搭載した場合と、別々のベクターに搭載して混合感染した場合のマーカー遺伝子の発現の違いについて検討した(図13)。EGFP遺伝子とKO遺伝子を同一のベクター上に搭載したSeVdpベクターでは、EGFP/KOの比はどの細胞でも常に一定であった(図13左側)。これに対し、市販ベクターのようにEGFP遺伝子とKO遺伝子を別々のベクターに搭載して混合感染すると、EGFP/KOの比は大きくばらつき、非常に幅広い分布を示した(図13右側)。均一なiPS細胞を高効率で再現性良く作製するためには山中4因子の発現バランスを一定にする必要があるが、すべての初期化因子を同一のベクター上に搭載したSeVdpはこの条件を満たしていることが明らかとなった。

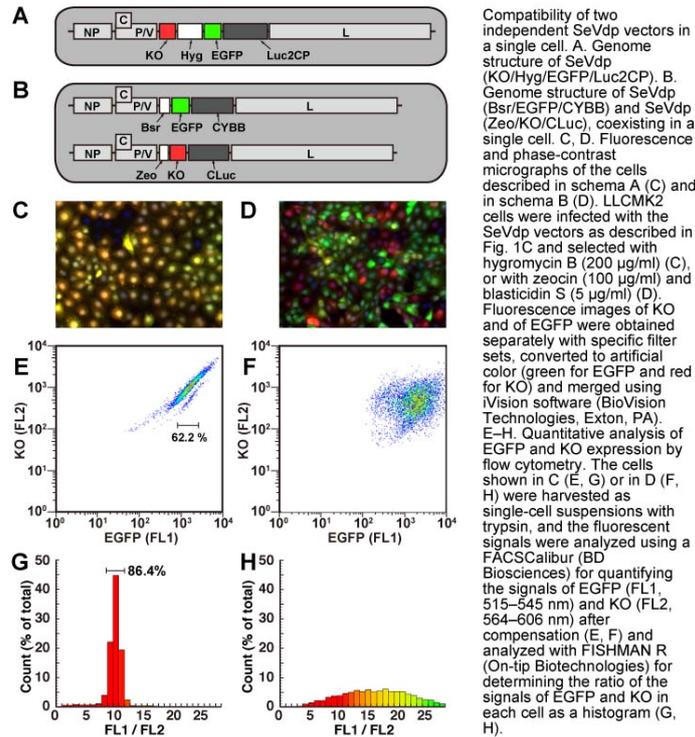
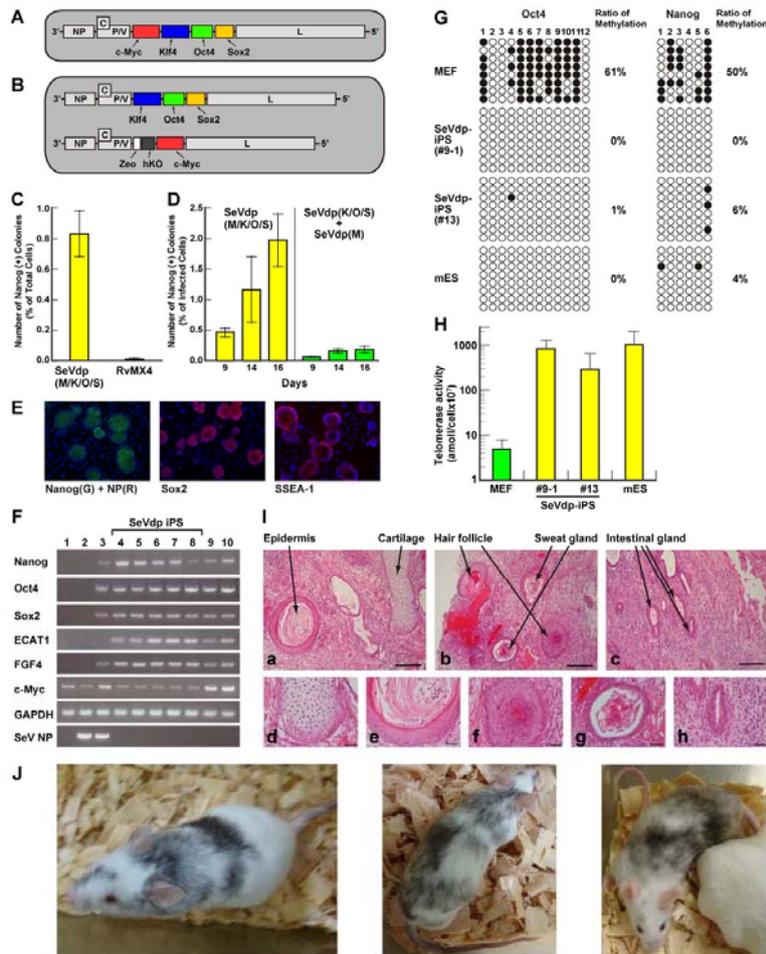


図 13 異なるセンダイウイルスベクターの細胞へ与える影響

2) 4 個の初期化因子を同時に搭載した SeVdp ベクターによるマウス iPS 細胞の樹立

1)において、4 個の初期化遺伝子をすべて同一の SeVdp 上に搭載したベクターの有用性が確認できたので、4 つの初期化遺伝子を搭載した SeVdp(c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2) を作製し、iPS 細胞の作製効率を検討した (図 14)。使用した細胞は、Nanog 遺伝子部位に EGFP の cDNA を挿入した Nanog-EGFP マウスの胎児由来線維芽細胞 (MEF/Nanog-EGFP) である。Nanog は未分化能の高い iPS 細胞のマーカーとして知られているが、この細胞では Nanog の誘導と連動して EGFP が発現するため、蛍光を指標に優れた iPS 細胞を検出できる。SeVdp(c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2) を MEF/Nanog-EGFP に感染させ、EGFP の蛍光を検出した後に (b) において記述する siRNA 法によって SeVdp を除去したところ、従来のレトロウイルスベクター法の約 100 倍の効率で iPS 細胞が樹立できた (図 14C)。また、初期化因子を c-Myc と Klf4/Oct4/Sox2 に別けて別々のベクターに搭載したところ、その効率は激減した (図 14D)。樹立した iPS 細胞は、Oct4, SSEA-1 等の iPS/ES マーカーを発現すると共に、主な iPS 細胞の基準をすべて満たしていた (図 14E~I)。また、この iPS 細胞をマウス胚に導入するとキメラマウスの組織に取り込まれることがわかった (図 14J)。



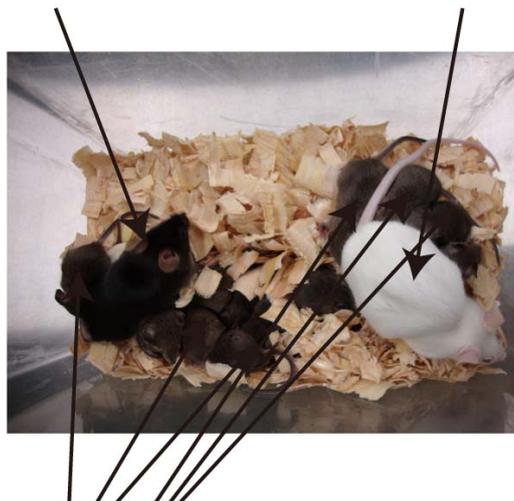
Reprogramming of mouse embryonic fibroblasts (MEFs) with SeVdp vectors installed with reprogramming genes. A. Genome structure of SeVdp(c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2). B. Genome structure of SeVdp(Klf4/Oct4/Sox2) and SeVdp(Zeo/hKO/c-Myc), coexisting in a single cell. C. D. Efficiency to reprogram MEF/Nanog-GFP. MEF/Nanog-GFP cells (1.25×10^5) were infected with SeVdp vectors and retroviral vectors were installed with c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2, as described in EXPERIMENTAL PROCEDURES. Then, 1.0×10^3 of infected cells were seeded onto the feeder cells in 6-well plates and cultured for 14 days (C) or for indicated days (D). The number of iPS colonies expressing GFP was determined under fluorescent microscopy. Reprogramming efficiency was indicated as the ratio of the number of GFP-positive colonies to that of MEF/Nanog-GFP seeded in the well (C) or to that of infected MEF/Nanog-GFP seeded in the well (D). C. Comparison of reprogramming efficiency with the SeVdp(c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2) vector and with retroviral vectors. SeVdp(M/K/O/S), SeVdp(c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2), pMX4, coinfection of ectopic retroviral vectors installed with c-Myc, Klf4, Oct4 and Sox2 separately. D. Comparison of reprogramming efficiency by a single infection of SeVdp(c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2) (SeVdp(M/K/O/S)) and by coinfections of SeVdp(Klf4/Oct4/Sox2) and SeVdp(Zeo/hKO/c-Myc) (SeVdp(K/O/S) + SeVdp(M)). E. Characterization of mouse iPS cells generated with SeVdp(c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2). The ES-like colonies emerging from MEF/Nanog-GFP cell lines were fixed, incubated with specific primary antibodies against SeV NP antigen (Left), Sox2 (Middle) and SSEA-1 (Right), then stained with secondary antibodies conjugated with Alexa 555. The cells were then counterstained with DAPI, and examined by fluorescence microscopy as described in EXPERIMENTAL PROCEDURES. Nanog (Left), expression of GFP driven by the Nanog promoter.

図 14 マウス胎生線維芽細胞 (MEF) のセンダイウイルスによるリプログラミング活性とできた iPS 細胞の奇形腫形成

さらに、山中 4 因子の発現バランスを変えた SeVdp(Klf4/Oct4/Sox2/c-Myc) を使って MEF/Nanog-EGFP を初期化し、平成 22 年度に導入したフローサイトメーターを使って定量的に解析したところ、SeVdp(c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2) では 14 日目にやっと 17.2% のコロニーで Nanog-EGFP の誘導が観察されたのに対し、SeVdp(Klf4/Oct4/Sox2/c-Myc) を感染させた細胞では、7 日目に既に 11.0% のコロニーで Nanog-EGFP の誘導が観察され、14 日目では約半数 (50.4%) のコロニーが Nanog-EGFP 陽性となった。さらに SeVdp(Klf4/Oct4/Sox2/c-Myc) を使って MEF/Nanog-EGFP から作製した iPS 細胞からは iPS 細胞の寄与率が高いキメラマウスが生まれ、次世代の個体に iPS 細胞の遺伝情報を伝える

る生殖伝播 (Germinal Transmission) も観察された (図 15)。

マウスA (iPS細胞 KOSM#24 由来のキメラマウス、オス) マウスB (ICRマウス、メス)



マウスAとマウスBの子供

マウスAとマウスBの子供の体毛は、マウスAの体毛の黒色を受け継いでおり、マウスAから生殖細胞伝播が起きたことを示している。

図 15 マウス iPS 細胞の遺伝情報の生殖伝播

3) 4 個の初期化因子を同時に搭載した SeVdp によるヒト iPS 細胞の樹立

2)で 4 個の初期化因子を同時に搭載したSeVdpによるマウス細胞の効率の良い初期化が観察されたので、次に同じベクターを使ってヒトiPS細胞の樹立を試みた。出発材料としてはヒト胎児由来正常線維芽細胞TIG-3株を用いた。マウスの場合と同様に後述するsiRNA法を用いてSeVdpを除去すると、iPS細胞マーカーであるOct4 やSSEA-4 を発現するヒトiPS細胞がマウスの場合と同様に感染細胞の 1%以上という高い効率で樹立された。このヒトiPS細胞を免疫不全マウスに接種したところ、三胚葉系列すべての組織ができていることが確認され、多能性を維持していることが確認された (図 16)。

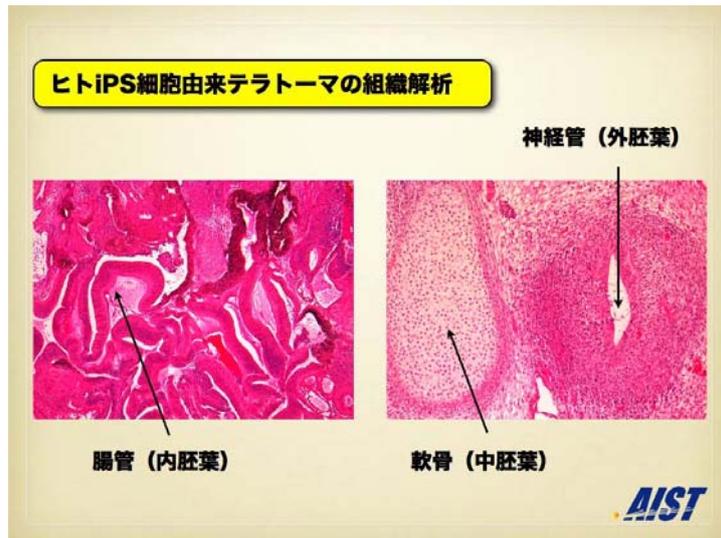


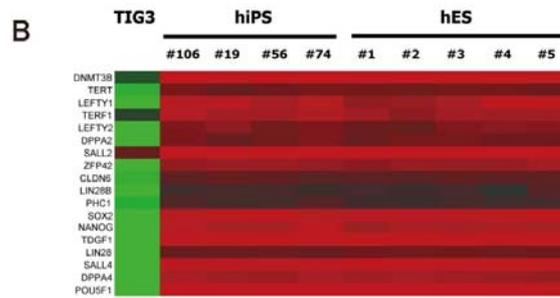
図 16 ヒト iPS 細胞由来奇形腫の組織解析

さらにSeVdpで作製したヒトiPS細胞の遺伝子発現を解析したところ、4つの細胞間でほぼ一致し、非常に均質なiPS細胞が樹立できたことが確認できた(図17)。これは従来のレトロウイルスベクター法によって作製されたiPS細胞の遺伝子発現が非常に不揃いであるのと対照的である。作製したiPS細胞はすべてヒトES細胞のマーカー遺伝子を発現しており(図17)、さらにヒトES細胞の遺伝子発現とも非常に高い相同性を示した(図17)。

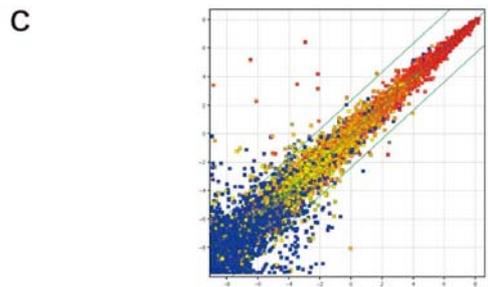
A

#19	1.000			
#56	0.995	1.000		
#74	0.989	0.990	1.000	
#106	0.988	0.989	0.998	1.000
	#19	#56	#74	#106

hOct4, hSox2, hKlf4, hc-Myc 持続発現用センダイウイルスベクターを使って樹立したヒト iPS マーカー発現細胞 4 株の遺伝子発現の相関係数



hOct4, hSox2, hKlf4, hc-Myc 持続発現用センダイウイルスベクターを使って樹立したヒト iPS マーカー発現細胞 4 株のヒト ES 細胞 5 株におけるヒト ES 細胞マーカー遺伝子の発現の比較。赤いほど発現が強い。



hOct4, hSox2, hKlf4, hc-Myc 持続発現用センダイウイルスベクターを使って樹立したヒト iPS マーカー発現細胞 (#56 株、X 軸) とヒト ES 細胞 (京大 #4 株、Y 軸) の遺伝子発現の相関

図 17 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 持続発現用センダイベクターによって作製されたヒト iPS 細胞の遺伝子発現解析

2. ①-3 (b) センダイウイルスベクターを細胞から除去する技術の開発

(a)で示したように、SeVdp はヒト細胞初期化用ベクターとして非常に優れた性能を持っている。しかし、単に遺伝子発現の持続性だけでは iPS 細胞を樹立することはできず、効率の良いベクター除去法が開発がその優れた性能に大きく貢献している。

SeVdpのゲノムは、染色体に挿入されず細胞質で安定に存在するRNAという非常に特殊な性質を持った世界で唯一の遺伝子発現プラットフォームであり、ゲノムRNAが染色体に挿入されないことからその安定性を阻害してやれば容易に細胞から除去できるはずである。SeVdpゲノムがどのようにして安定に存在しているのか不明な点が多いが、細胞分裂によってもコピー数が変わらないことから、細胞内では単に静的に存在しているのではなくゲノムRNAを複製しながら動的な平衡を保っていると予想される。このため、ゲノムを複製

するRNAポリメラーゼの活性を阻害することで除去できる可能性がある。センダイウイルスを含むパラミクソウイルスのRNAポリメラーゼの特異的な阻害剤は知られていない。そこで本研究では、RNAポリメラーゼの活性ユニットと考えられるLタンパク質に焦点を当て、L mRNAに対するsiRNAを用いてこのタンパク質の発現を抑制し、SeVdpゲノムの除去効果があるかどうかを検討した(図 18)。その結果、L mRNAに対するsiRNAはSeVdpゲノムを半減期 17 時間という比較的早い速度で除去できることが明らかになった。さらに、いったんRT-PCR法でNP mRNAが陰性となった細胞をsiRNA非存在下で 30 日培養してもSeVdpゲノムが検出できないことから、ベクターの除去は不可逆的であることが確認された(図 18)。

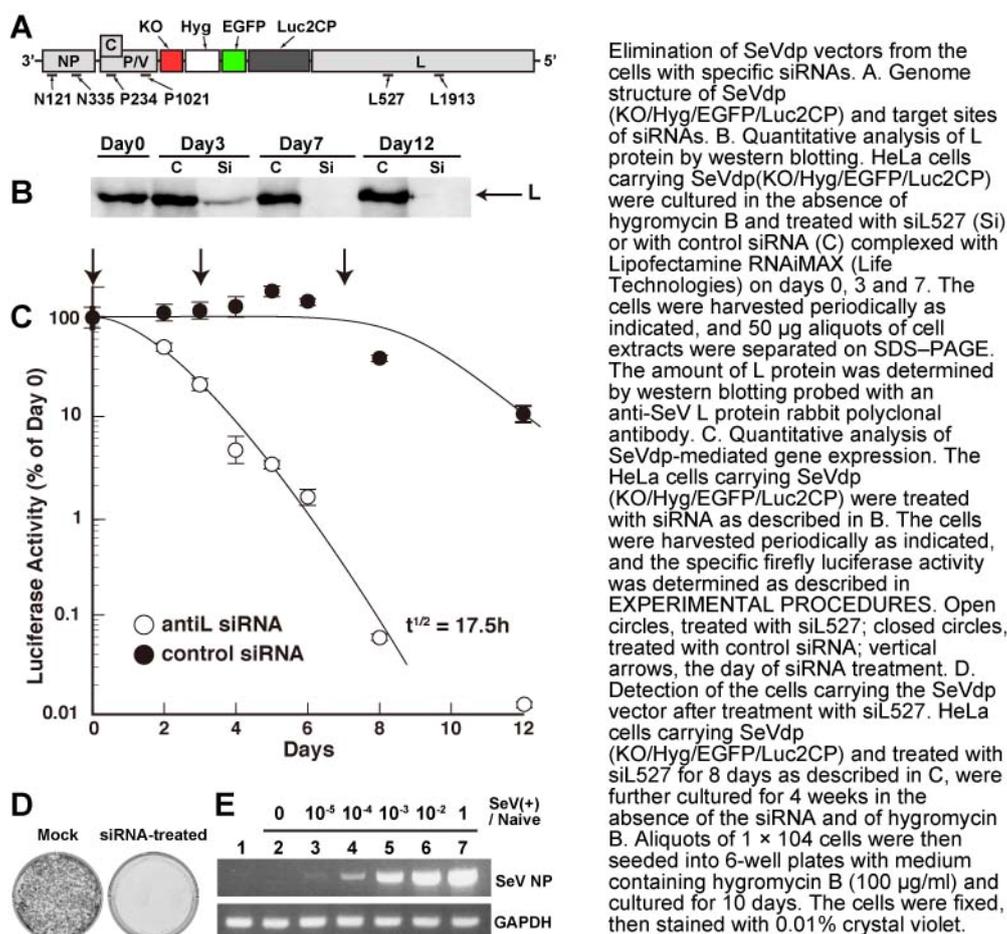


図 18 iPS 細胞からセンダイウイルスベクター除去

(3) 目標の達成度と意義

2年間で非常に多くの研究を行ったが、「染色体に初期化遺伝子を残していないため安全性が高く、分化能が高くて均質なヒト iPS 細胞を効率よく作製する」という当初目標はほぼ完全に達成できた。特に、世界で初めての末梢血単球からのヒト iPS 細胞の樹立は、

個々の患者からのオーダーメイド iPS 細胞の作製を現実的なものにしたもので非常に意義が高い。現在、23 年度から京都大学 iPS 細胞研究センターにおいても SeVdp ベクターの評価が始まる予定で、ヒト iPS 細胞作製の世界標準法とできるように今後も研究を継続する予定である。

2.② 研究開発項目② 「iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

2.②-1 高感度 DNA チップを用いた発現解析技術を基盤とした iPS 細胞の選別・評価・製造技術等の開発

慶應義塾大学 須田 年生
東レ株式会社 須藤 哲央

(1) 事業目的と背景

3～4種類の転写因子をマウスおよびヒト体細胞で発現させることにより、ES細胞の特徴を示す多能性幹細胞に初期化できることが可能となり、異なった研究機関から様々なiPS細胞が樹立されだしている。これらの報告から、それぞれのiPS細胞は株毎にその特性が異なることが分かり、細胞株ごとの違いが研究を混乱させる恐れのあることが示唆されている。

このような背景から、iPS細胞の特性・安全性を簡単に確認する技術が求められている。しかし、iPS細胞の特性を評価する技術の開発は始まったばかりで、個々のiPS細胞研究のなかで樹立されたiPS細胞の遺伝子発現解析が行われているだけで、統合的なデータベース化は行われていないのが現状である。また、産業化に必要なiPS細胞は、必ずしもES細胞と同等の性質を持たなくてもよい。たとえば、心筋細胞に分化させて化合物の心毒性を評価する創薬スクリーニングシステムに利用するのであれば、心筋細胞への分化特性が高いiPS細胞が良いし、神経幹細胞に分化させて脊椎損傷治療に使用するのであれば、神経幹細胞への分化特性が高く腫瘍形成能がないiPS細胞が好ましい。また、多分化能に関連する薬剤のスクリーニングに使用するのであればES細胞と同等な性質を持つiPS細胞が必要となる。従って、使用目的に応じたiPS細胞を選定する技術を提供することが重要な課題となる。

そこで本研究の目的は、申請者らが開発した高感度DNAチップと幹細胞の自己複製能や未分化性維持の分子機構の解明研究で培った幹細胞の分離・精製技術および幹細胞の生物学的特性評価技術とを融合させて、iPS細胞の特性を評価するための検証可能なマーカーを選定し、さらにこのマーカーを指標として、iPS細胞の安定供給技術を開発することである。具体的には、

- (1) 幹細胞マーカーSSEA1およびNanogの発現を指標に、iPS細胞生成過程の細胞を経時的に分離し、
- (2) 超高性能DNAチップを用いて、これらの細胞の網羅的遺伝子発現解析（mRNAとマイクロRNA）と特定遺伝子のメチル化解析・タンパク質発現解析を行い、

- (3) 未分化性、自己複製能、多分化能の発現に必要な遺伝子を見出しながら、これらの遺伝子解析データと細胞機能データを統合し、データベースを構築、データ解析システムを開発することにより、iPS細胞の特性や安全性に関するマーカーを選定し、
- (4) このマーカーを指標として、iPS細胞を安定に培養するための培養液・方法を開発する、

ことである。本研究は、レポーター遺伝子でiPS細胞を選別できるシステム、動物モデルを含めて幹細胞性評価系や安全性評価系の研究が進んでいるマウスiPS細胞を用いて開始し、これを基盤としてヒトiPS細胞の特性評価系の構築に発展させる。iPS細胞の安定培養に関する研究開発では、ヒトiPS細胞を使用して、化学的に明確な培地を用い、フィーダー細胞を用いない培養方法の開発を目指す。

さらに、本研究の特徴は、始原生殖細胞の多分化能獲得系を用いてiPS細胞の特性を評価する点である。特に、細胞に遺伝子を導入することなく、シグナル伝達阻害剤で始原生殖細胞のiPS化を誘導する系は、ウイルスベクター等によるiPS化で問題になる遺伝子が挿入されるゲノム上の場所の影響を排除できる点で、本申請研究は極めて独創的といえる。

(2) 事業内容と目標

iPS細胞成立過程の細胞の遺伝子発現プロファイル (mRNAおよびmiRNA) を作製し、これらのデータと生物学的特性情報を統合し、データ解析アルゴリズムを開発することによりiPS細胞の特性や安全性に関するマーカーを選定する。

この目的のために、iPS細胞への誘導初期で起こる：

- (1) 分化特性の喪失に関連する遺伝子、誘導中期でおこる
- (2) 多分化能の獲得に関連する遺伝子、誘導後期でおこる
- (3) 多分化能の維持・安定化に関連する遺伝子の発現に着目しながらiPS細胞の特性を評価できる

データを収集する。

(4) 研究成果

2. ②-1 (a) iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発

1) iPS細胞生成メカニズムの解析

iPS細胞の生成過程の分子変化を解析するには効率良くiPS細胞を誘導できるシステムの

開発が必要である。我々は始原生殖細胞が多分化能の獲得に必要な遺伝子の解析で、4種類のiPS誘導遺伝子（山中4遺伝子）のうち1種類の遺伝子を導入することで、iPS細胞を誘導できることを見出した（図 28）。本成果は国際誌*J. Biol. Chem.*に投稿中である。

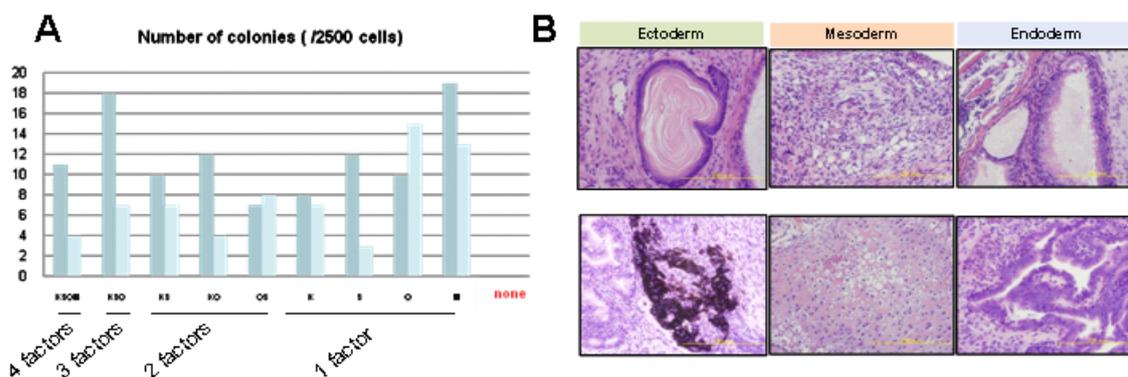


図 19 始原生殖細胞の多分化能獲得に必要な因子の解析

(A) 始原生殖細胞から誘導された ES 様コロニーの数、山中 4 遺伝子の内 1 種類を導入すれば iPS 化が可能である。(B) Klf4 を導入して作製した iPS 細胞、iPS-PGC(Klf4)はテラトーマを形成する。

この結果から、始原生殖細胞に特異的に発現する遺伝子と山中 4 遺伝子との組み合わせで体細胞の初期化を誘導できると考え、遺伝子の組み合わせを検討した結果、MEF細胞に Prmt5、Klf4およびOct3/4を導入することでiPS細胞を誘導することが可能であった（図 20）。この成果は国際誌 *J. Biol. Chem.* (2011) M110.216390[Epub ahead of print]に掲載された。

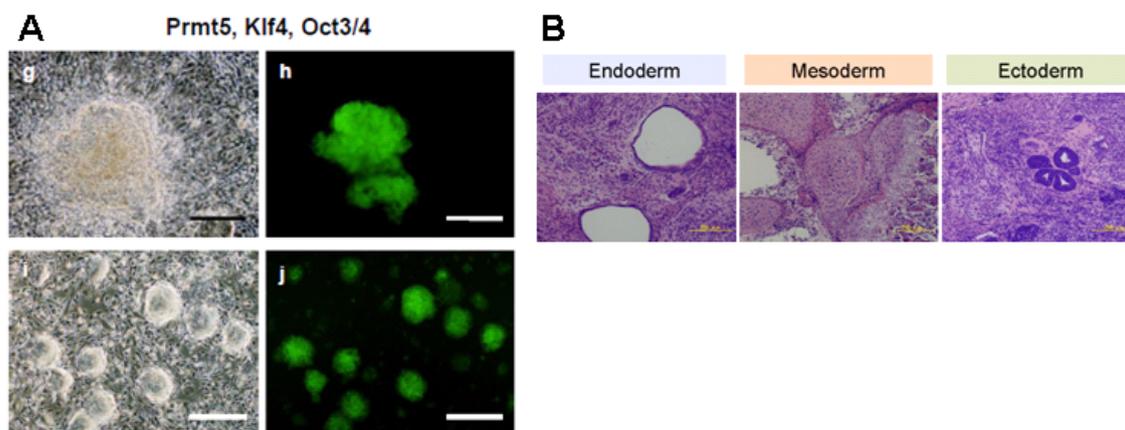


図 20 Prmt5、Klf4、Oct3/4 による MEF の初期化

MEFに Prmt5、Klf4、Oct3/4 を導入することで iPS 細胞を作製することができ (A)、この細胞はテラトーマを形成する (B)。

さらに、幹細胞の自己複製、多能性維持に効果のあることが示唆されているシグナル伝達阻害剤の組み合わせを検討した結果、CHIR 99021 (GSK-3 β inhibitor)、PD325901 (MEK inhibitor) およびA83-01 (TGF- β type-1R inhibitor) を用いることで、導入遺伝子を使用しなくても効率的にiPS細胞を誘導することが可能であった (図 21)。この手法は遺伝子を用いないため、遺伝子のゲノムへの挿入位置などによるiPS細胞のクローン間の差異など遺伝子導入で問題にことを回避できることから、iPS生成過程を解析する上で重要な知見である。

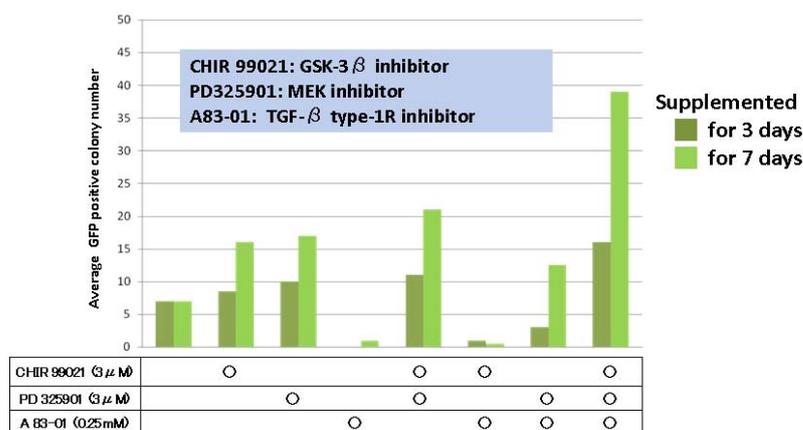


図 21 3種類のシグナル伝達阻害剤による iPS 細胞の作製

400 個の始原生殖細胞に 3 種類のシグナル伝達阻害剤を添加することで、10%という高効率で iPS 細胞を作製できる。

次に、この効率良く iPS細胞を誘導できるシステムを用いて、iPS細胞の生成過程の分子変化の解析を行った (図 22)。誘導後、培養 3 日目と 6 日目に SSEA1陽性、Nanog陽性細胞の解析を行うとそれぞれ、2.9%、1.54%であり、これらの細胞を再度フィーダー細胞上に播きなおすと、18.8%、43.6%と効率にiPS細胞が誘導されることが示され、本実験系は、iPS化のメカニズムを解析する上で有用な実験系であり、この成果は国際誌 *J. Biol. Chem.* (2011) M110.216390[Epub ahead of print]に掲載された。

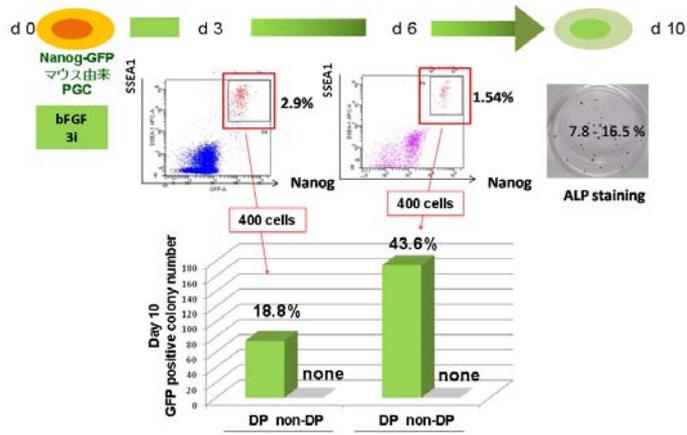


図 22 始原生殖細胞の 3 種類阻害剤による初期化課程の細胞の解析

始原生殖細胞に CHIR 99021 (GSK-3 β inhibitor)、PD325901 (MEK inhibitor) および A83-01 (TGF- β type-1R inhibitor) の 3 種類阻害剤と bFGF を加えて培養し、培養 3 日目と 6 日目に SSEA1 陽性、Nanog 陽性細胞の解析を行った。それぞれ、2.9%、1.54% であり、これらの細胞から効率的に iPS 細胞が誘導される。

この実験系を用いて、誘導前、誘導後 3 日目の SSEA1 陽性、Nanog 陽性細胞、誘導後 6 日目の SSEA1 陽性、Nanog 陽性細胞および誘導後 10 日目の iPS 細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った (図 23)。現在、遺伝子パスウェイ解析を中心として、詳細な解析を行っている。

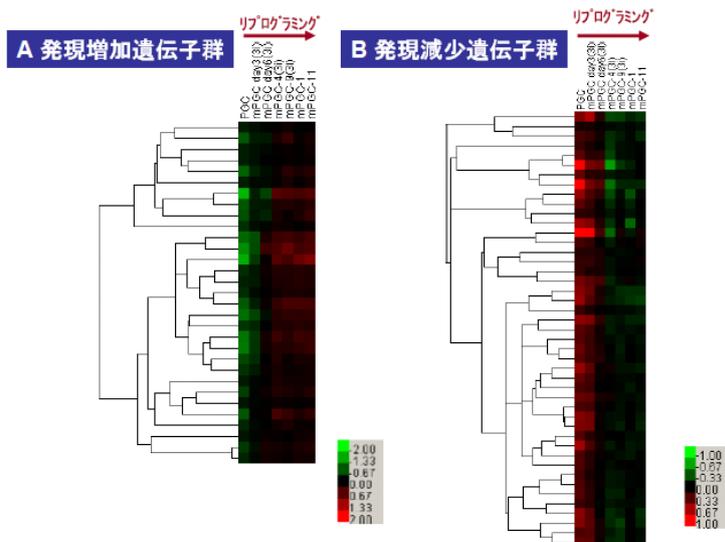
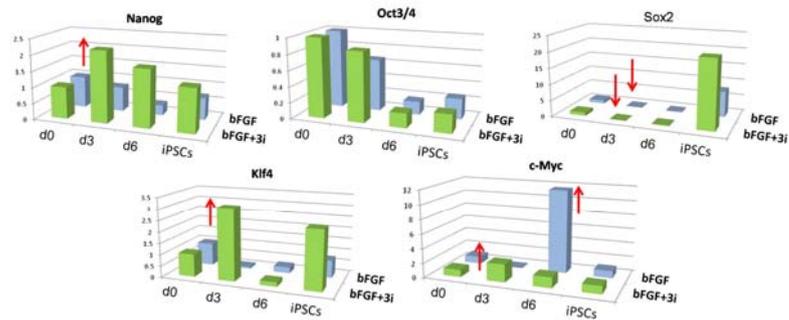


図 23 始原生殖細胞の初期化に伴って変動する遺伝子の解析結果

一方、ES 細胞マーカーであり、初期化に重要な Nanog、Sox2、Klf4、Oct3/4、c-Myc (図 24) および、生殖細胞関連の遺伝子マーカーである Sall4、Dnmt3b、Rex1、Tbx3、Prmt5 について定量的 PCR で解析した結果、図 25 に示すように変動することが分かった。すなわち、iPS 化に伴って、始原生殖細胞の特性を示す Blim-1、MVH は発現が低下し、Tbx3、Prmt5 の発現が多分化能の獲得に伴って一旦増加する。Klf4、SOX2 は iPS 化過程の後半で発現が高くなることから、) 多分化能の維持・安定化に関与すると考えられた。



ES-related marker gene expression profiles of group C (bFGF) and D (bFGF + 3i) at day 0, 3, 6, 10
Quantitative PCR analysis of ES marker genes on the progress to the pluripotent state were analyzed.

図 24 始生殖細胞から iPS 細胞生成過程で変動する ES 細胞マーカー遺伝子

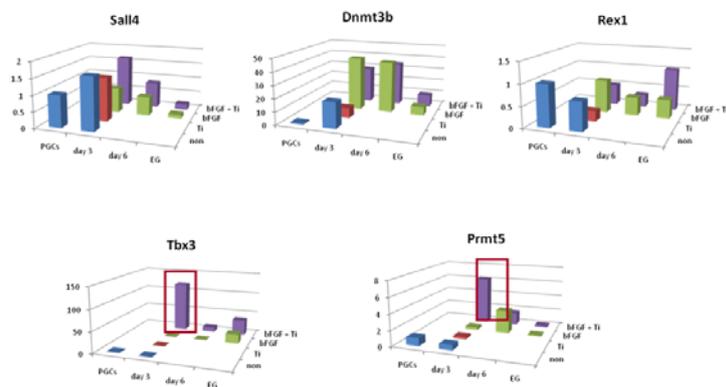


図 25 始生殖細胞から iPS 細胞生成過程で変動する生殖細胞関連マーカー遺伝子

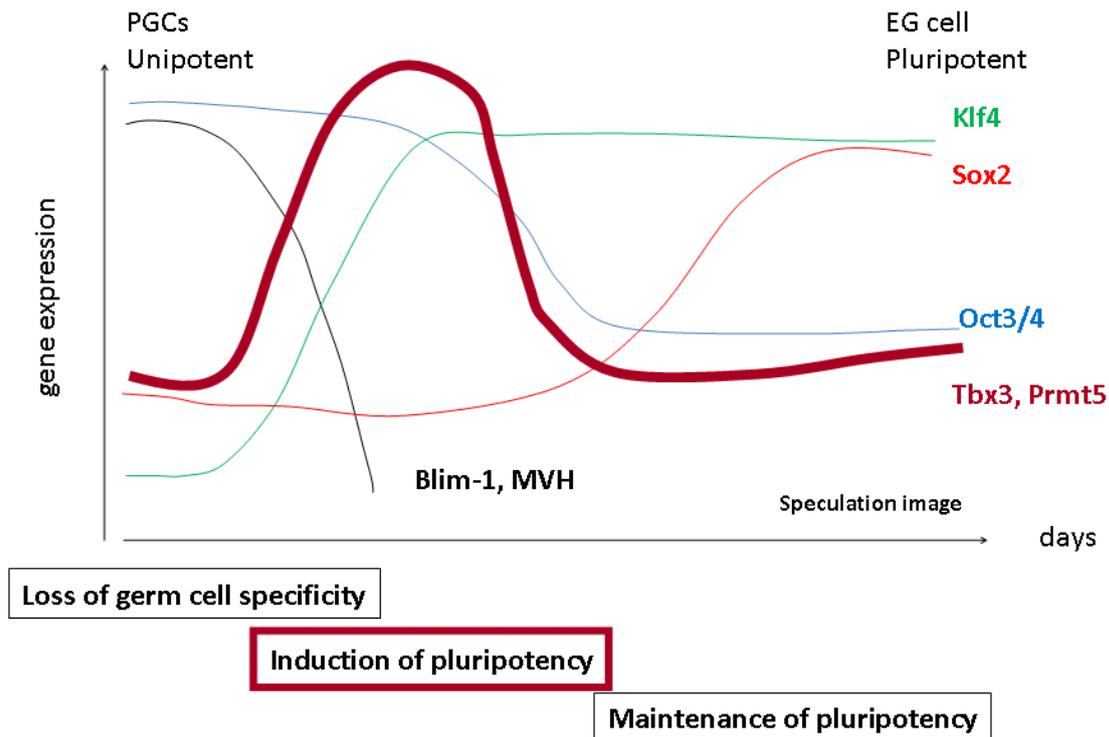


図 26 始原生殖細胞から iPS 細胞生成過程で変動する遺伝子のパターン

2) リプログラミング遺伝子としての c-Myc の役割探索

我々は、始原生殖細胞が多分化能の獲得に必要な遺伝子の解析で、4 種類の iPS 誘導遺伝子（山中 4 遺伝子）のうち 1 種類の遺伝子を導入することで、iPS 細胞を誘導できることを見出した（図 27）が、c-Myc を導入して樹立した iPS 細胞とそれ以外の遺伝子を導入して作製した iPS 細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った。それらのスキャッタープロット解析の結果を図 27 に示す。c-Myc を導入して iPS 化した細胞 (PGC(c-Myc)) とそれ以外の遺伝子を導入して作製した細胞の発現パターンには違いがあることが判明した。現在解析を行っているが、各 iPS 細胞の生物学的性状の違いが分かっていないことから、PGC(c-Myc) 細胞と他の細胞とで発現が変動する意味のある遺伝子を抽出することは困難な状態である

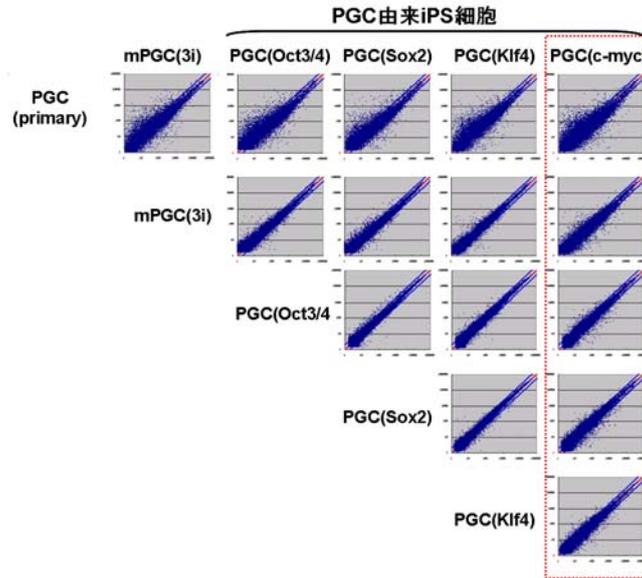


図 27 製造方法の異なる iPS 細胞のスクアタープロット解析

3) 微量細胞からの網羅的遺伝子発現解析

iPS細胞の生成過程の分子変化を解析するには、iPS化過程の細胞が微量なため、微量細胞からの網羅的遺伝子発現解析技術の開発が必要となる。そこでまず、1,000個の細胞から、網羅的に遺伝子発現解析を行う技術を作製した。細胞からRNAを調製することなく、細胞を溶解後、直接cDNA合成、2回のRNAの増幅を行うことにより、網羅的な遺伝子発現解析が可能となった。この微量法と1μgのRNAから解析する通常法で、F9細胞とSTO細胞の遺伝子発現比を比較した結果(図 28C)、2手法間で相関が高いことが示された。さらに、本手法で100個の細胞を解析できることが確認されている。iPS生成過程で形成されるコロニーの数は100-1,000個程度であり、コロニー毎に網羅的遺伝子発現解析することが重要であることから、本手法は今後のiPS化メカニズム解析に威力を発揮すると期待される。

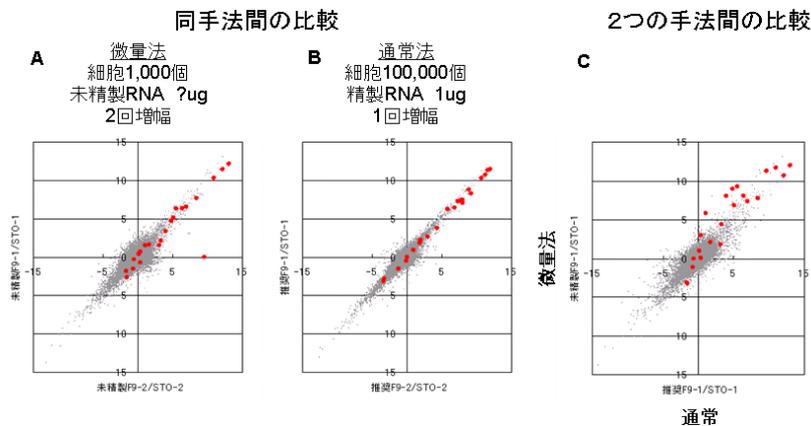


図 28 微量法と通常法の比較

変動比のスクアターと ES 細胞特異的 2 4 遺伝子 (赤スポット) の分布を示す。同手法比較では $y=x$ 上に

分布し、2手法間比較では、ほぼ $y=x$ 上に分布する。

さらに、F9細胞とSTO細胞で8倍以上変動する遺伝子にフォーカスすると、微量法で検出される遺伝子は通常法で検出される遺伝子と80%以上一致することが分かった。

2. ②-1 (b) iPS 細胞等幹細胞の品質管理、安定供給技術の開発

iPS細胞の生成過程を観察するには効率的なiPS細胞誘導法が必要である。我々は、CHIR 99021 (GSK-3 β inhibitor)、PD325901 (MEK inhibitor) およびA83-01 (TGF- β type-1R inhibitor) の3種類のシグナル伝達阻害剤(Ti)を用いることで始原生殖細胞を効率よく(8-16%) iPS化する技術を開発しており、この技術を用いて、始原生殖細胞がiPS細胞に誘導される過程を、GFPコロニーの形成を指標に、タイムラプス顕微鏡で追跡観察した(図 29)。その結果、約10%確率で近接するコロニーが融合して一つのコロニーになることを認めた(図 29b)。このことから、1つのiPS細胞株がクローンかどうかの判定には注意する必要があることが示唆された。

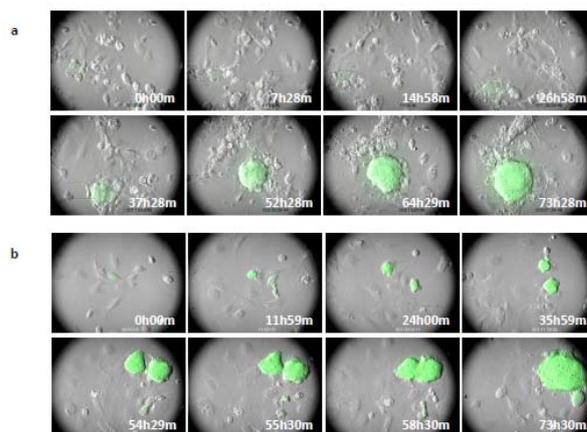


図 29 iPS 細胞生成過程のタイムラプス顕微鏡による観察

始原生殖細胞を Ti にて iPS 化を誘導し、タイムラプス顕微鏡にて GFP コロニーの形成を追跡した。1つの細胞から iPS 細胞のコロニーが形成されるが(a)、約 10%が近接するコロニーと融合して1つのコロニーとなる (b)。

(5) 目標の達成度と意義

本研究によりマウス始原生殖細胞のiPS化過程で変動する遺伝子の解析を行い、その過程で1) 分化特性の喪失、2) 多分化能の獲得、3) 多分化能の維持・安定化に関連する遺伝子を見出した。さらに3つのカテゴリーに分類される遺伝子群を明らかにすることにより、iPS細胞の特性を評価することのできる遺伝子を見出すことができると期待できる。これらマウスの知見は次に展開するヒトiPS細胞の解析のための重要なヒントとなる点で意

義がある。

2. ②-2 成体由来の多能性幹細胞の操作技術を基盤とした iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発

東北大学 出澤 真理
京都大学 藤吉 好則
京都大学 中畑 龍俊

(1) 事業目的と背景

東北大学出澤らは、成人ヒト間葉系組織（骨髄、皮膚などの組織）に3胚葉性の細胞に分化する能力を有し、しかも腫瘍形成能が無い多能性幹細胞を見出し **Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse)細胞** と名付けて発表した (*PNAS*, **107**, 8639-8643 (2010))。この細胞は1細胞から3胚葉性の細胞に分化する能力を有し、現在までのところ神経、表皮細胞、肝細胞、胆道系細胞、平滑筋、骨格筋、骨、軟骨、脂肪細胞等への分化が確認されている。自然に存在する幹細胞であり、造腫瘍性を持たない。

これらのコロニーは **ES 細胞** や **iPS 細胞** とは異なり、無限増殖せず、適当なサイズで増殖を停止するが、分散接着培養に移すことにより再度増殖させ、**Muse 細胞** へと導き、再び胚様体の形成を誘導することができる。このことは、ヒト成人には多能性幹細胞に極めて近い細胞、あるいは特定の条件下で多能性幹細胞へと転換する能力を潜在的に保持している細胞が存在することを示しており、我々はその分離、操作技術を開発し、ヒト成人由来の多能性幹細胞を手に入れている。

本研究開発では、これらの発見と確立された技術を更に発展させると共に、他のグループと協力して **iPS 細胞** 等幹細胞の増殖因子、分化誘導因子の開発、**iPS 細胞** 等幹細胞の選別・評価基準システムの開発を進める。同時に **iPS 細胞** 等幹細胞の大量製造技術の基礎となる技術開発を行う。これらの研究開発を発展させ早期に再生医療の実現を図り産業応用に結びつける。

(2) 事業内容と目標

ヒト間葉系細胞から分画した **Muse 細胞** を、高濃度に濃縮する方法を開発する。具体的には、遺伝子発現プロファイルの解析により、**Muse 細胞** 特異的な細胞表面マーカーを検索しており、一年以内に高濃縮の実現を目指す。 **iPS 細胞**、**ES 細胞**、**Muse 細胞**、あるいは **ICM**（内部細胞塊）などの遺伝子発現プロファイルの比較検討を開始し、さらに **Muse 細胞** の増殖機能と修復機能に関するメカニズム解明の検討を進める。また、**iPS 細胞**、**ES 細胞** 等で報告されている技術を参考に **Muse 細胞** から分化細胞（比較的ニーズの高い心筋細胞、神経細胞、筋肉細胞など）の誘導に着手する。**Muse 細胞**、各種の組織幹細胞は共に生体に存在しており、よく似た性質を保持している可能性がある。そこで、**Muse 細胞** の分離、濃縮、操作技術をアレンジして組織幹細胞の分離、濃縮、操作技術に応用できるかを

検討する。

(3) 研究成果

2. ②-2 (a) 新たな幹細胞操作技術の開発を基盤とした iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発

一般に我々の生体に存在する体性幹細胞は ES 細胞、iPS 細胞などの多能性幹細胞に比べて分化の幅が狭い。神経幹細胞や造血幹細胞に見られるように、幹細胞の存在する組織を構成する神経細胞・グリア細胞や造血系の細胞には分化するが、胚葉を超えた分化は原則として起きない。しかし骨髄における間葉系幹細胞は、一般の体性幹細胞とは異なり、骨・軟骨・脂肪、などの同じ中胚葉系の細胞だけでなく神経、グリア細胞、肝臓、膵臓など胚葉を超えた分化を見せるため、あたかも 3 胚葉へ分化する多能性幹細胞であるかのような現象が報告されている。この説明として、間葉系細胞の中に多能性幹細胞が存在することを示唆する論文が出されながらも、決定的な証拠がないまま現在に至っている。また上記の分化効率がよくはないこと、間葉系幹細胞が均質な細胞で構成されておらず、複数のタイプの細胞集団であることから、かかる分化を示す本態となる細胞に迫ることが困難であった。

そのような中で、骨髄だけでなく皮膚線維芽細胞などの成人ヒト間葉系組織に 3 胚葉性の細胞に分化する能力を有する新たな幹細胞 Muse 細胞を見出した。ヒト骨髄間葉系細胞や線維芽細胞を通常の培地で維持すると、特別な遺伝子導入やサイトカイン誘導をかけていないにも関わらず、極めて低い頻度で特徴的な細胞塊が自発的に形成されることを見出した。初期の細胞塊の外見は ES 細胞に酷似しているものの、無限増殖をせず、ある一定の大きさに到達すると増殖が停止し、さらに毛や色素細胞など種々の細胞を含む不均一な集団となる。この細胞塊を調べると、外胚葉、中胚葉、内胚葉マーカーに陽性の細胞が細胞塊内に混在して検出される。この結果より、ヒト骨髄間葉系細胞中には多能性幹細胞に相当する細胞が存在する可能性があると考えられた。

我々が着目したことは幹細胞がストレス耐性であるという性質である。この性質を利用し、間葉系細胞に長時間の消化酵素処理などのストレス条件下に置くことによって、幹細胞の性質を有する細胞を濃縮できると考えた。生き残った細胞を一細胞ずつ浮遊培養すると、ES細胞が浮遊培養で形成する胚葉体と同じ形態を示す細胞塊を得ることができた (図 30)。この細胞塊は形態的にES細胞様であるだけでなく、多能性マーカーを発現し、さらに一細胞から形成された細胞塊をゲラチン培養することにより、自発的な 3 胚葉性細胞への分化を確認することができた (図 31)。

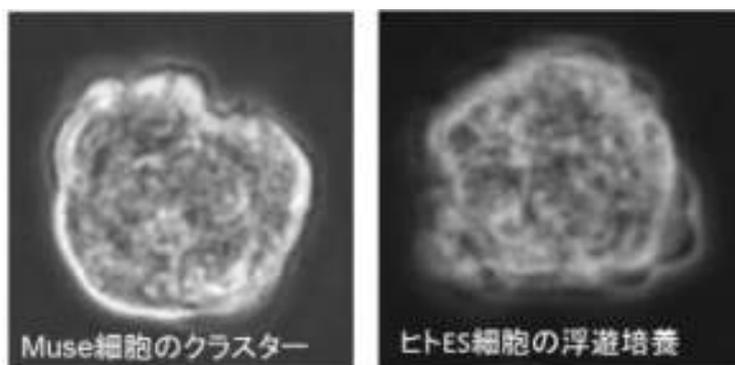


図 30 Muse 細胞とヒト ES 細胞が浮遊培地内で形成する特徴的な細胞塊

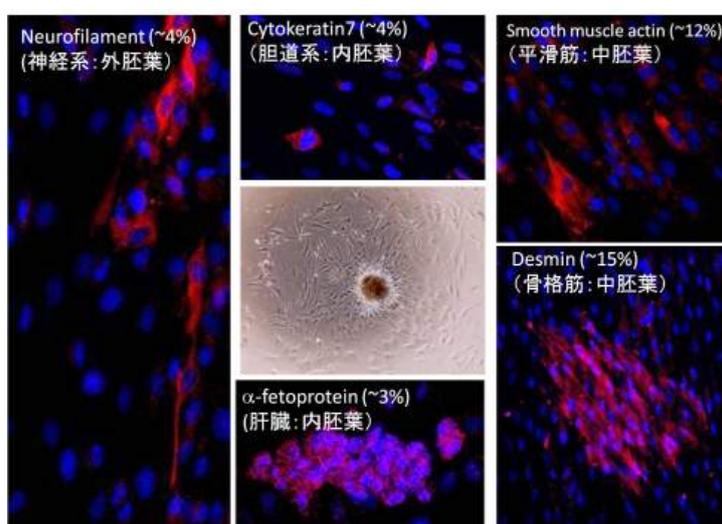


図 31 Muse 細胞が形成する細胞塊からの自発的な分化

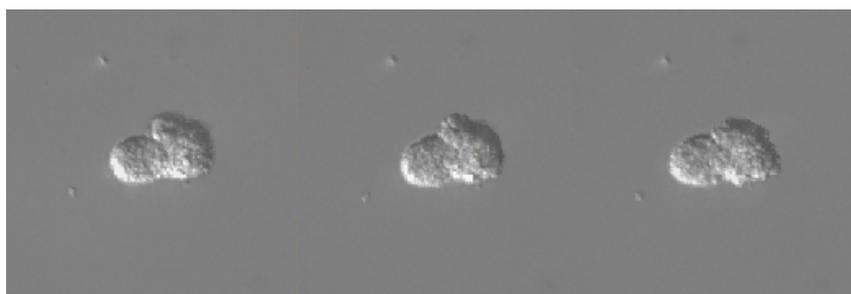


図 32 Muse 細胞の分裂過程の光学顕微鏡像

形態的にも非対称に分裂する様子が観察された。一方の方が多くの bleb が観察される。

さらに、Muse細胞の細胞分裂様式に着眼し、今回開発した一細胞レベルからのタイムラプス観察を高分解能で行うシステムを用いて、Muse細胞の細胞分裂過程を高分解能で観察した。また、非対称分裂などの状態を撮影することにも図 32に示すように成功した。

我々はこの細胞のマーカーに当たるものを探すためにストレス前と後の細胞群を FACS で解析した。マーカーとなるものであれば、ストレス後の濃縮によって陽性細胞率があがるはずである。多岐にわたる検討の結果、未分化ヒト ES 細胞のマーカーである SSEA-3 が候補となった。また SSEA-3 陽性細胞群を解析すると 100%の細胞が間葉系マーカー CD105, CD90 などに陽性を示した。骨髄間葉系細胞、あるいは線維芽細胞から SSEA-3/CD105 ダブル陽性細胞を採取すると上述の ES 細胞様の細胞塊を形成し、さらに 3 胚葉性細胞への分化を確認することができた。

この細胞を Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse) cell と名付けた。この細胞の特性をさらに解析すると以下のように集約できる。

- Nanog、Sox2、Oct3/4、PAR4 などの多能性幹細胞マーカーを発現している。
- 1 細胞から 3 胚葉性の細胞に分化する能力を有する。
- 自己複製能を持つ。また非対称分裂をする。
- ヒト ES 細胞のマーカー SSEA-3 と間葉系マーカー (CD105 など) のダブル陽性として、培養ヒト線維芽細胞、培養ヒト骨髄間葉系細胞の他、骨髄液、皮膚組織などの生体組織からも直接分離可能である。
- 腫瘍性がない。

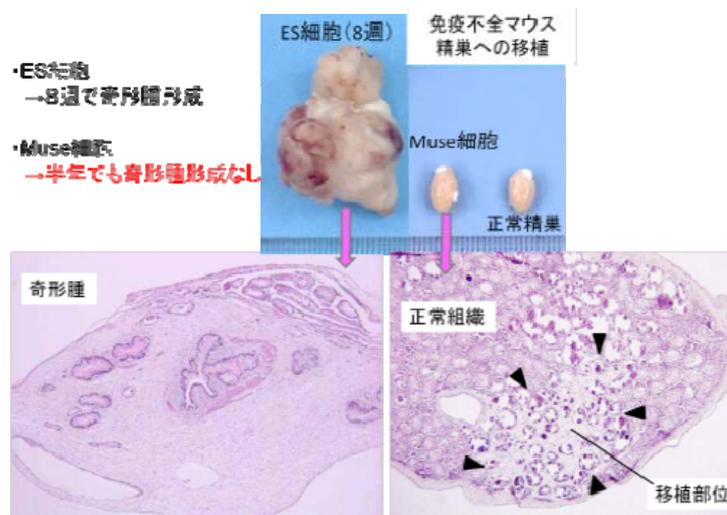
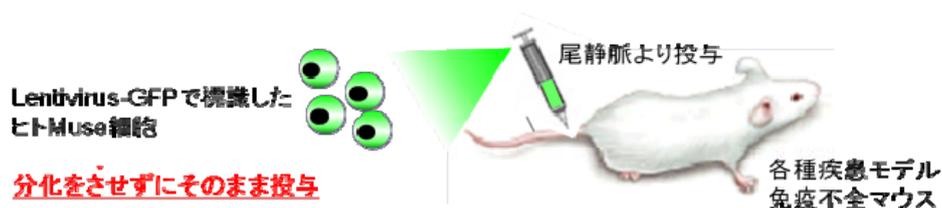


図 33 Muse 細胞と ES 細胞の腫瘍形成能の比較

ヒト骨髄液を用いて検証したところ、Muse 細胞は単核球成分の約 3000 細胞に 1 細胞という比率で存在する。さらに Lonza 社などから市販されている一般的な間葉系細胞、たとえば線維芽細胞では 2~5%前後で、骨髄間葉系細胞では 0.8%前後の比率で含まれていることが分かった。このことは、すでに 40 年の実施実績がある骨髄移植において、約 3,000 個に 1 個の割合で Muse 細胞が含まれていること、また現在世界中で行われている間葉系幹

細胞移植においても、数パーセントの割合で含有されていることを意味するので、Muse 細胞はヒトに移植されてきた安全性の実績があると言える。

さらに Muse 細胞は、これまで多くの研究者、臨床医が同定を試みていた間葉系幹細胞の中に存在すると推定されていた組織修復細胞(repairing cells) としての性質を示すことがわかった。免疫不全マウスに肝障害、神経損傷、筋変性などの障害を与えて静脈内にヒトの Muse 細胞を投与すると、損傷組織に細胞が遊走、生着し、組織に応じて組織を構成する細胞に分化し、機能修復をもたらすことが確認されている。このことから、これまで多くの研究者が見てきた間葉系幹細胞における分化転換や組織修復などの現象を Muse 細胞は説明するのではないかと思われる。



	対象とした組織	モデル (免疫不全マウス)	Muse 細胞の 投与経路
内胚葉	肝臓	肝障害 CCl ₄ 腹腔内投与	静脈内投与
外胚葉	皮膚	皮膚切除	
	脊髄	脊髄圧迫	
中胚葉	大腿筋	筋変性	

図 34 疾患モデルマウスへのヒト Muse 細胞投与

劇症肝炎モデルでは、尾静脈より投与されたヒト Muse 細胞は、損傷部位である肝臓に生着し、肝細胞へと分化して、マウスの体内でヒトアルブミンやヒトアンチトリプシン等を合成され、それらが血液中に供給することがウエスタンブロット等の実験データで示された。他の疾患モデルでも同様に、投与されたヒト Muse 細胞は、損傷部位に誘導され、そこで生着し、損傷部位の組織に応じて分化することで組織修復に関わっていることが確認された(図 35)。

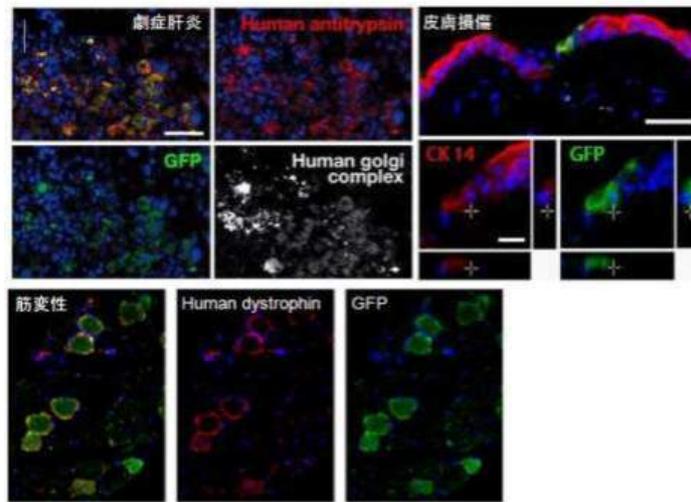


図 35 Muse 細胞とマウス劇症肝炎、皮膚損傷、筋変性における組織修復

上記の研究から、Muse 細胞がこれまで間葉系細胞移植で見られてきた組織修復細胞として機能を有することが示唆された。

2. ②-2 (b) 幹細胞の観察・選別・評価技術の開発を基盤とした iPS 細胞等幹細胞の評価基準の明確化

細胞分裂様式に着眼し、一細胞レベルからのタイムラプス観察を高分解能で行うために、原理図を図 36に示すポルシンヤスコープをはじめとする光学顕微鏡観察の基盤技術を整備・最適化した。

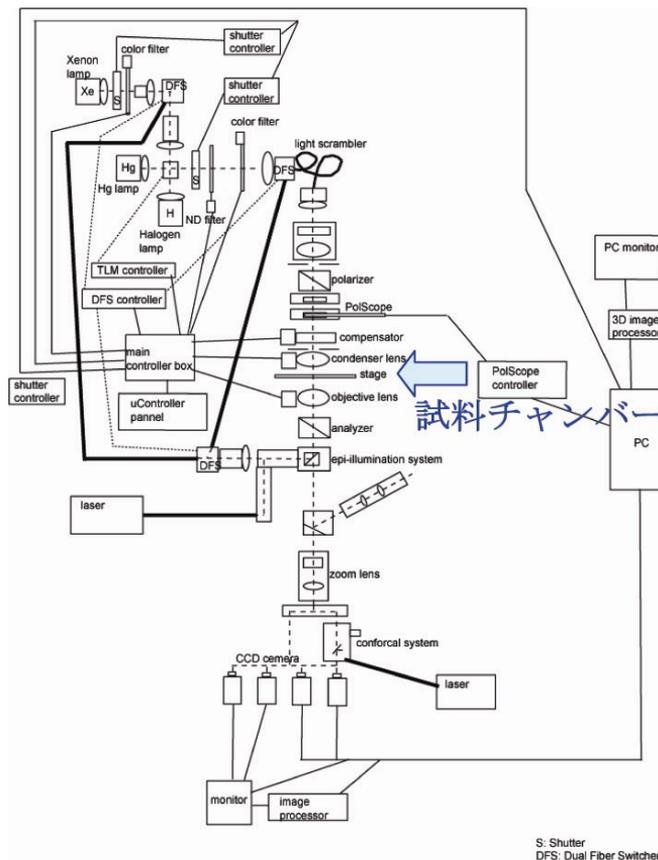


図 36 ポルシヤスコープの原理図

矢印のところに試料チャンバーを設置した。

細胞分裂過程を動的に高分解能で観察するためには、生きた状態で細胞タイムラプスを撮る必要がある。その場合、温度・培養液のpH・顕微鏡外部からの振動などに注意する必要がある。Muse細胞観察用チャンバーは、模式図を図 37に示すように、温度センサーを内蔵し、10分程度でチャンバーの温度を一定にすることができる。(温度のブレは $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ くらい) また、2枚のカバーガラスでチャンバーを挟む密封型(カバーガラスの間に細胞が存在)でもあるため、高分解能の観察が可能であるにも拘らず、室内の空気に触れることなくチャンバー内の培養液を還流することができる。

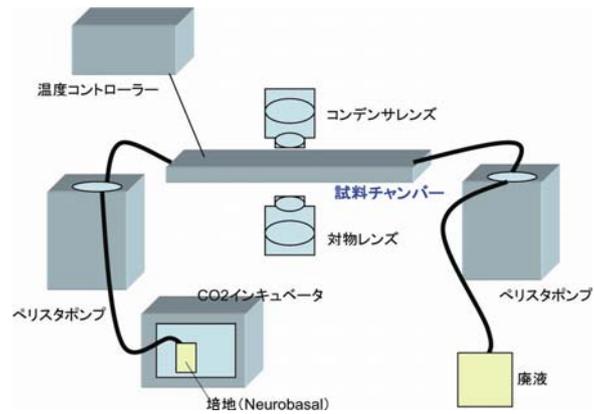


図 37 Muse 細胞観察のための試料チャンパーの模式図。

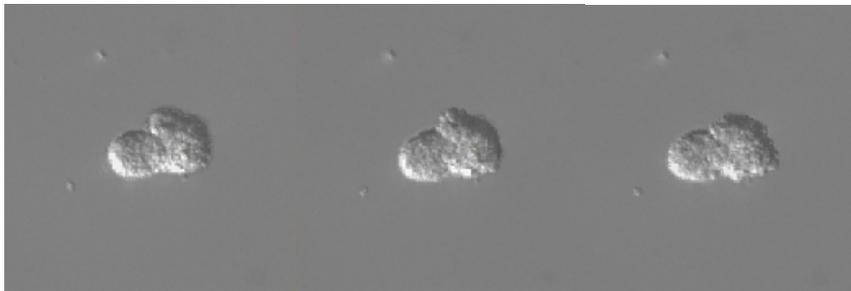


図 38 Muse 細胞の分裂過程の光学顕微鏡像

形態的にも非対称に分裂する様子が観察された。一方の方が多くの bleb が観察される。

Muse細胞の細胞分裂過程を上記に示したシステムなどを用いて、一細胞レベルからのタイムラプス観察に成功して高分解能で観察した。また、図 38に示したような非対称分裂などの状態を撮影することにも成功した。Muse細胞やMuse細胞クラスターなどの超薄切片を作製して、これらの細胞の特徴を観察した。その結果大変興味深いことに、Muse細胞が非常に薄い細胞により包まれている図 39のような像が頻繁に観察された。

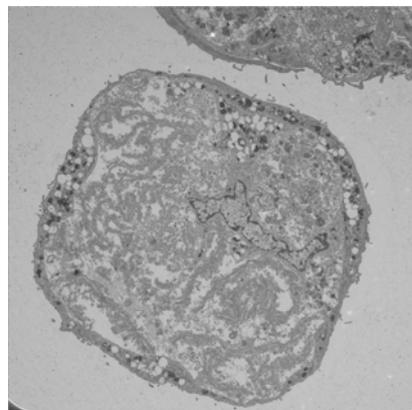


図 39 Muse 細胞クラスターの電子顕微鏡写真

Muse 細胞のクラスターは大きなクラスター（図の上部に一部見えている）でも、この図の中心のように

小さいものでも、非常に薄い形状の細胞によって包まれている様子が頻繁に観察された。

心筋において重要な働きをするギャップ結合タンパク質の一種であるコネキシン26の構造を電子線結晶学で解析し、X線結晶学で行った高分解能の構造解析 (*Nature*, **458**, 597-602 (2009)) と合わせて、ギャップ結合の複雑なゲーティング機構の一端を解明し (*J. Mol. Biol.*, **405**, 724-735 (2011))、心筋細胞への分化誘導グループの参考になるであろう分子構造を解析する研究を進めた。

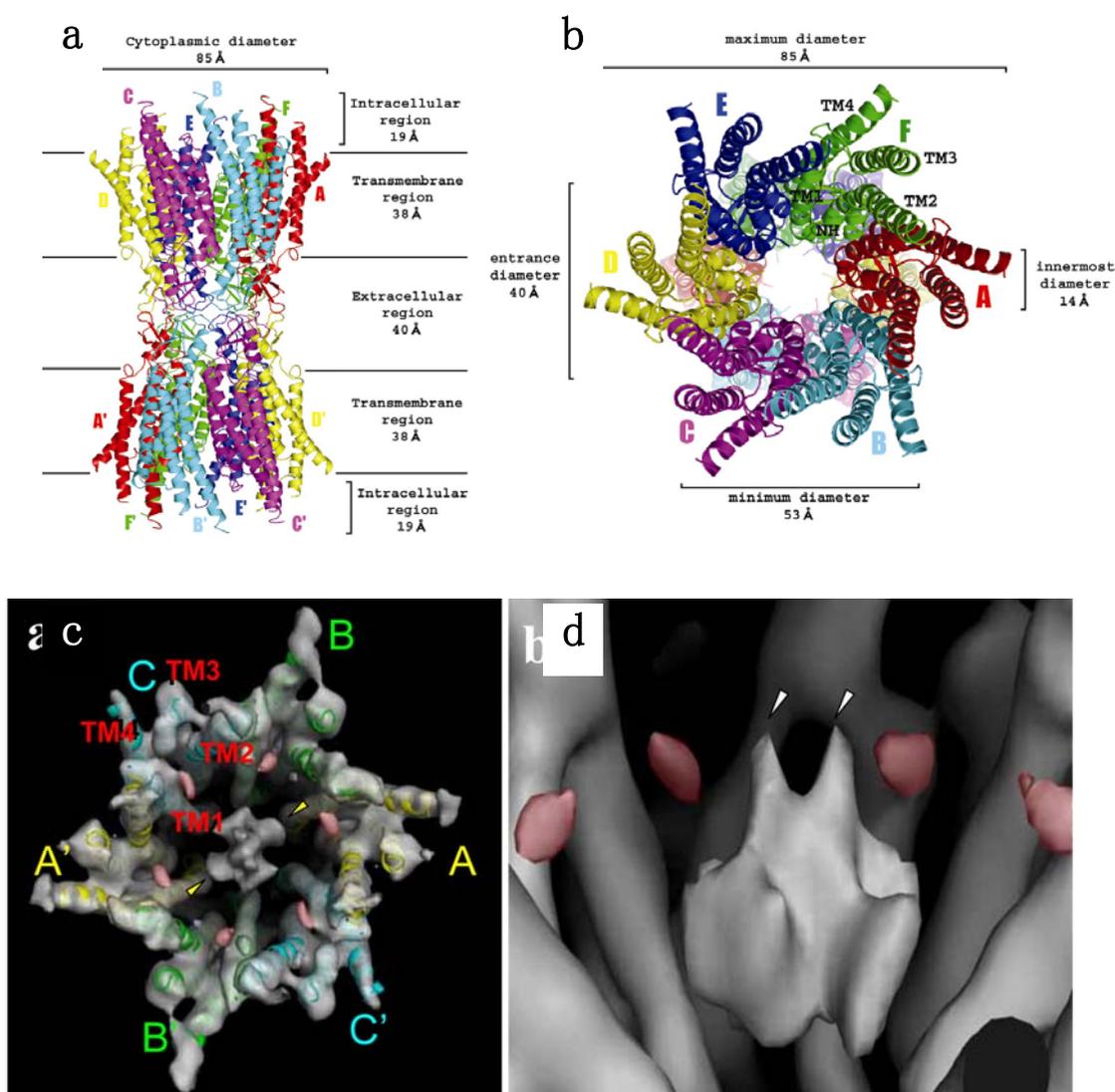


図 40. ギャップ結合タンパク質の X 線結晶構造

ギャップ結合タンパク質の構造を X 線結晶学で行った高分解能の構造を膜面に平行方向から見た構造 (a) と、膜面に垂直方向から見た構造 (b) をそれぞれリボンモデルで表した構造 (*Nature*, **458**, 597-602 (2009))。ギャップ結合の複雑なゲーティング機構に重要な複雑な細胞質側の構造 (c) と、ゲーティングに重要な 2 層構造をとるプラグの構造 (d) (*J. Mol. Biol.*, **405**, 724-735 (2011))。

2. ②-2 (c) 幹細胞の観察・選別・評価技術の開発を基盤とした iPS 細胞等幹細胞の評価基準の明確化

iPS 細胞は人工的に多能性を誘導された幹細胞である。この細胞は ES 細胞と同様に未分化な状態のまま増やせること、培養条件を変化させると、神経細胞、心筋、各種血液細胞など様々な細胞に *in vitro* で分化可能であることから、幅広い再生医療への応用が期待されている。一方、iPS 細胞のもつ最も画期的な臨床的側面は、さまざまな疾患の患者から皮膚などの組織を用いて疾患特異的 iPS 細胞を樹立できることである。

本研究において、我々は難治性血液疾患、免疫不全症患者から樹立した疾患特異的 iPS 細胞を解析するため、適切な血球分化系の構築を目指した検討を行い、以下の成果を得た。OP9 フィーダー細胞を用いた血球分化系を構築した。この培養系においてはヒト iPS 細胞を牛胎児血清、VEGF α 存在下に OP9 細胞と 10 日間共培養後、CD34 陽性 KDR 陽性細胞を FACS でソーティングし、新たな OP9 細胞上で SCF, TPO, FL, IL-3, EPO, M-CSF などのサイトカイン存在下で 16 日間培養する方法である。この方法により、形態的にも機能的にもほぼ正常な赤血球、好中球、マクロファージ、巨核球などの細胞が形成されたが、異種の血清を用いること、マウスのフィーダー細胞 (OP9) を用いるなどの欠点を有しているが問題である。

発生過程を模倣した分化系を構築した。ヒト iPS 細胞が Primitive Streak, Mesoderm, Hemangioblast を経て血球系の前駆細胞、血管内皮前駆細胞へと順序だつて分化していく系を確立した。無血清、フィーダーフリーの培養系を構築した。ヒト iPS 細胞を Growth factor-reduced Matrigel に埋め込み、bFGF から BMP4+Wnt3a+VEGF さらに各種サイトカイン (SCF, FL, IL-3, TPO, G-CSF, EPO, M-CSF) にシフトしていくことにより順序だつた発生が誘導されることが明らかとなった。この中での血球系の発達過程は卵黄嚢造血、胎児肝造血を経て成人型の骨髓造血に移行し、その過程は生成される赤血球の持つヘモグロビンのグロビン鎖の違いによって反映され、 ϵ 、 γ 、 β と *in vivo* と同じよう移行していくことが明らかとなった。この培養法によって産生される成人型赤血球の酸素乖離曲線は正常成人から得られた赤血球に近似し、ほぼ正常な酸素運搬能を持つことが明らかとなった。また、生成される好中球の形態、特殊顆粒の染色性、遊走能、貪食能、殺菌能は成人末梢好中球に匹敵した。生成されたマクロファージは刺激に反応し、各種サイトカインを産生した。さらに本培養法においては、培養途中の細胞を採取し、造血前駆細胞レベルでの FACS 解析、コロニー法による増殖分化能の検索が可能であった。本培養法は無血清、フィーダーフリーの培養系で、造血前駆細胞レベルでの詳細な検討も可能であり、生成される各種血球も正常の機能を持っていることから、疾患特異的 iPS 細胞から分化させた血球の解析に有用な系が構築されたと考えている。

この系を用いて、最近樹立された Kostmann 症候群 (先天性好中球減少症と中枢神経系異常の合併)、CINCA 症候群 (自己炎症性疾患一つ) などの患者から作成した疾患特異的 iPS

細胞を用いた疾患の病態解析が開始されている。患者病態を反映した結果が得られつつある。

(4) 目標の達成度と意義

新たに取得した Muse 細胞の細胞学的、構造学的解析を実施し、重要な発見を行った。これらの発見は再生医療への応用に直結しているだけでなく、iPS 細胞を初めとする多能性幹細胞研究に大きく貢献するものである。

更に、特定の疾患を持つ患者から iPS 細胞を樹立したことは、患者治療へ直接的な貢献であるばかりではなく、疾患に関する科学的解明が寄り一層促進されるものである。

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

2. ③-1 iPS 細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

慶應義塾大学

福田 恵一

2. ③-1 (a) ヒト iPS 細胞から効率よく心筋細胞に分化誘導する方法の開発

(1) 事業の目的と背景

心筋梗塞、拡張型心筋症などが重症化すると心筋細胞は失われてしまう。皮膚や肝臓など、再生能力を持つ臓器や組織とは違い、ヒトを含む哺乳類がもつ自己再生能力では失われた心筋細胞を元に戻すことはできない。ES 細胞や iPS 細胞のような多能性幹細胞は高い増殖能性と、成体を形成する様々な組織の細胞に分化できる多能性を併せ持つことから、こうした不可逆的な変性疾患に対する細胞移植治療などの、いわゆる再生医療への応用が期待されている。

これまで、マウスやサル、そしてヒトの多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導の成功が報告されており、2005 年には福田らの手により、ES 細胞の培養液中に *Noggin* というタンパク質を加えることで、効率良く心筋細胞を分化誘導させられることを報告している。しかし、*Noggin* 分子を添加することがどのようなメカニズムで心筋細胞への誘導効率を高めているのかは明らかになっていなかった。そこで、*Noggin* 分子の添加によってどのような遺伝子の活性化がみられるのかを調べたところ、顆粒球コロニー刺激因子受容体 (*G-CSFR*) という遺伝子の発現が、*Noggin* を加えていない ES 細胞と比較して顕著に上昇していることが判明した。そこで、心臓の発生において、*G-CSFR* がどのような役割を果たしているかを明らかにするため、研究を行った。

(2) 事業内容と目標

心臓の発生過程における *Noggin* および *G-CSF*、*G-CSFR* の生理的な役割を解明した。またこの知見をヒト iPS 細胞から心筋細胞に分化誘導することに応用し、安定的で大量の心筋細胞供給に貢献する。

(3) 研究成果

Noggin を添加した条件下で培養し、心筋細胞に分化した ES 細胞由来の細胞群では顆粒球コロニー刺激因子受容体 (*G-CSFR*) という遺伝子の発現が、*Noggin* を添加していない

ものに比べ 1000 倍近く上昇していた。そこで、実際のマウスの発生では G-CSFR の発現がどうなっているかを調べたところ、心臓が発達し始める妊娠 8.5 日目から、徐々に心臓原基の細胞で G-CSFR の発現が見られるようになり、心臓がもっとも増殖し成長する妊娠 10.5 日目に発現のピークを迎え、その後減少していくことが判明した。また、G-CSFR の刺激物質である顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) も同様に発現が上昇していることが明らかになった。

また、G-CSFR が発現しないように遺伝子改変を加えたマウス胎仔から心筋細胞採取し観察を行うと、これらの細胞が正常なものとは比べ細胞分裂する頻度が低下していることがあきらかになった。さらに G-CSF を加えて培養を行うと、正常なマウスでは細胞分裂する頻度が上昇するのにもかかわらず、遺伝子改変マウスではまったく変化がなかった。さらに、遺伝子改変マウスの個体発生を観察すると、約 50% のマウスが生まれることなく死んでしまうことが明らかとなった。こうしたマウスでは、心臓の心房と心室を作っている心筋細胞の層が薄くなっており、心筋細胞が正常に増殖できなくなっていた。こうした結果から、心筋細胞はその発生過程では G-CSF を分泌し、また心筋細胞自身が発現する G-CSFR によって自らその信号を受け取り、細胞増殖を行っている可能性が示された。

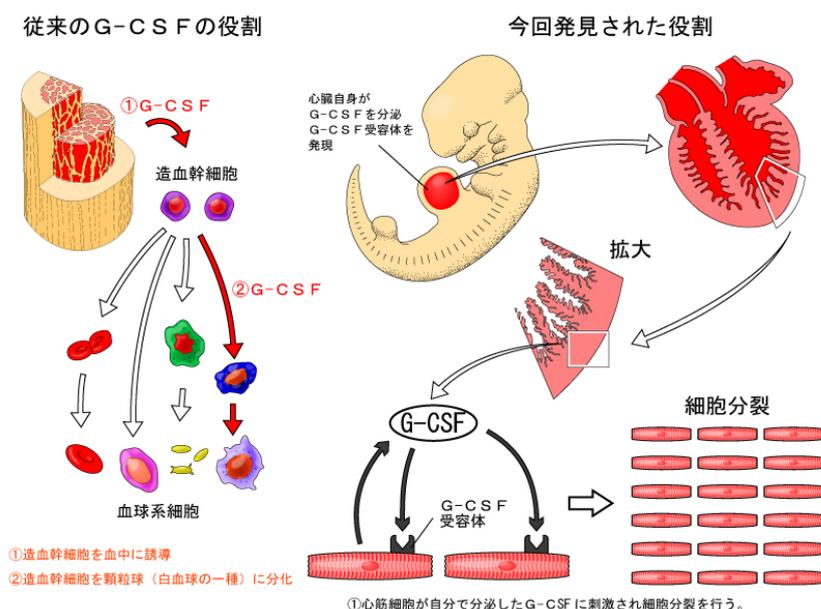


図 41 : G-CSF の心筋細胞増殖効果

G-CSF は従来造血幹細胞から顆粒球（白血球の 1 種）への分化、造血幹細胞の血液中への移行等の作用をされると考えられてきた。今回の発見により G-CSF は発生過程における心筋細胞自身が分泌し、自分自身に作用することにより胎仔期の心筋細胞の増殖に深く関与することが明らかとなった。

心筋再生医学における G-CSF の応用

Noggin を添加・不添加の ES 細胞を比較すると、やはり添加群では G-CSF、G-CSFR と

もに発現が上昇していることが確認された。ES 細胞、iPS 細胞でも個体発生と同様の現象が起こっている可能性が示されたため、ES 細胞、iPS 細胞を用いて、G-CSF が心筋細胞の増殖へどのように関与しているかを調べた。その結果、マウスの ES 細胞を心筋細胞に誘導した直後の時期に G-CSF を投与すると、細胞内のシグナル伝達系を介し心筋細胞が著しく細胞増殖する現象が観察された。また、投与時期、投与濃度を調節することにより、心筋細胞の増殖の程度は変化することが明らかとなった。非常に興味深いことに、マーマセツト ES 細胞を用いた実験、あるいはヒト iPS 細胞を用いた実験でも G-CSF の添加が心筋へと誘導される細胞を増加させていることが示され、霊長類においてもマウスと同様の仕組みが存在していることを示唆する結果となった。

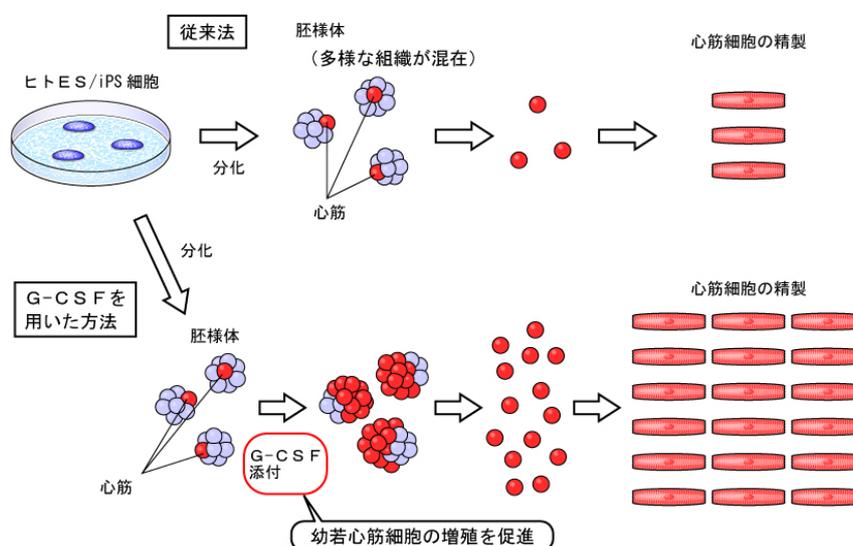


図 42 : G-CSF 添加による幼若心筋細胞の増殖

ヒト ES 細胞あるいはヒト iPS 細胞を心筋細胞に分化誘導させる際に、最終的に心筋細胞の収量を増やすには心筋細胞自身を細胞分裂させることは非常に効率的な手段となる。培養液中に G-CSF を添加するだけでヒト再生心筋細胞の収量を大幅に増やすことが可能となる。

(4) 目標の達成度と意義

今回のこの発見は、近い将来ヒト ES 細胞あるいはヒト iPS 細胞を用いて心筋細胞を作成し、これを創薬のスクリーニングや再生医療に応用する際に心筋細胞の集率・収量を大きく改善させ、臨床応用する際に鍵となる技術であると考えられる。マウス ES 細胞等と異なり、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞は心筋細胞に分化させることが難しいことが知られている。これを解決する意味に於いても、本研究結果は心臓再生医療を現実のものに近づける大きな一歩であると考えられる。

2. ③-1 (b) 健康人 iPS 細胞由来心筋細胞の作製

(1) 事業目的と背景

2006年に京都大学の山中伸弥教授らがマウスで、そして2007年にヒト iPS 細胞の樹立を成功させ、体細胞を直接的に初期化することが可能であることを示した。それ以降、iPS 細胞が持つ高い増殖能と、成体を形成する様々な組織の細胞に分化できる多能性によって、ES 細胞同様に不可逆的な変性疾患に対する細胞移植治療、いわゆる再生医療への応用が期待されてきた。

2007年、山中教授らによる最初のヒト iPS 細胞の報告では成人の皮膚由来の線維芽細胞を用いていたが、最近の研究では造血幹細胞や神経幹細胞、ケラチノサイト（角化細胞）など、さまざまな体細胞を用いる iPS 細胞の樹立が報告されている。しかし、これらの細胞を得るためには、生検（バイオプシー）などの外科的な手法を用いて患者から組織を採取しなければならず、ごくわずかとはいえ外科的な侵襲を与えなければならなかった。

また、山中教授らが確立したレトロウイルスベクターを用いて Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc という4つの遺伝子を導入する方法では、導入される細胞の染色体に外来遺伝子がランダムに組み込まれるため、遺伝情報が損傷される可能性もあり、移植を受けた患者の体内で腫瘍化する危険を持っていた。iPS 細胞からさまざまな細胞への分化成功が報告されているが、ソースの確保や安全性の向上という問題をクリアすることも、再生医療の実現化の大きな障壁の一つとなっていた。

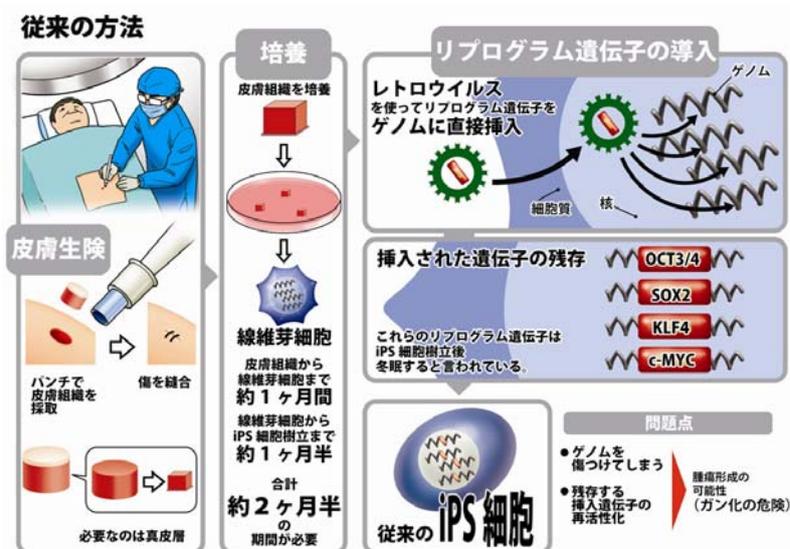


図 43：従来法による iPS 細胞作製過程とその問題点

これまでの方法の問題点として、(1)皮膚生検には患者に苦痛を与えること、(2)レトロウイルスではゲノムに損傷を与えるため、遺伝子破壊や腫瘍形成の可能性があること(3)ゲノムに残った遺伝子が再活性化され

る可能性が否定できず、奇形腫形成の可能性があったこと(4)iPS細胞の樹立に2ヶ月以上の時間がかかること等が挙げられていた。

(2) 事業内容と目標

健康人から皮膚バイオプシーを行うことなく、効率的にヒト iPS 細胞を樹立し、これを材料に健康者心筋細胞を複数樹立することを目標とする。

(3) 研究成果

日常、臨床の現場では広く採血が行われ、さまざまな検査が行われている。しかし、検査で使われなかった分は廃棄されている。今回の研究では、こうした廃棄される血液に着目し、その血液中に豊富に含まれる単核細胞である T 細胞を用いて iPS 細胞の樹立を試みた。

T 細胞は、抗 CD3 モノクローナル抗体を培養皿の表面に定着させ、IL-2 を添加した培養液を用いることで体外において培養や増幅が行えることが知られている。その一方、T 細胞は免疫を司る細胞であり、その表面にある T 細胞抗原レセプター (TCR) によって抗原を特異的に認識する機構を持つことも広く知られている。T 細胞は TCR が様々なレパートリーを持つことで抗原への特異性を持つのですが、このレパートリーを獲得する際に、1)抗原との結合に関与する遺伝子セグメントの組換え、2)遺伝子セグメント組換えの際に起こる鋳型遺伝子に存在しない塩基の挿入という2つの機構によってダイナミックに遺伝子が再構成されている。このため、T 細胞の核の中に存在する遺伝情報は、他の体細胞と異なっており、正常なヒト iPS 細胞が樹立できるかどうか明らかになっていなかった。

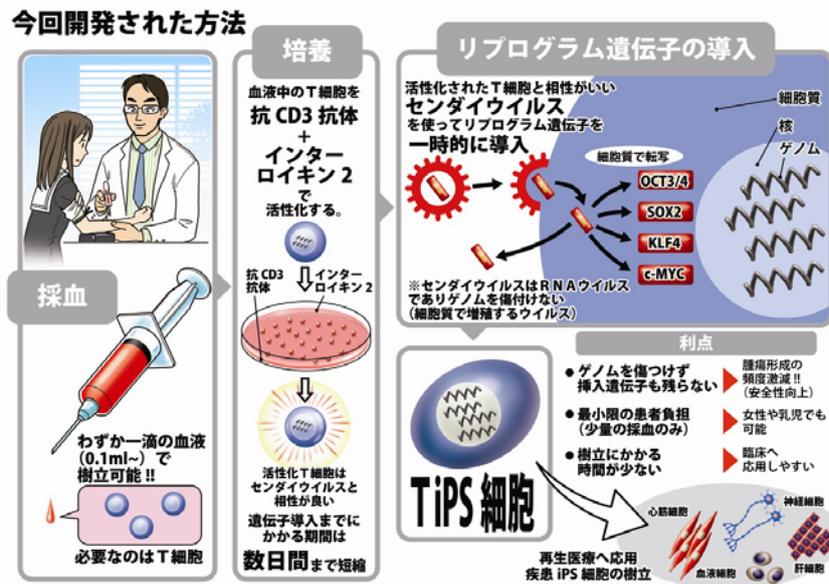


図 44：血液細胞から iPS 細胞の作成プロセス

今回の技術開発により、

- (1) 少量の採血で細胞を確保出来るため、患者の苦痛が最小限で済む、
- (2) ゲノムに遺伝子が挿入されないため、遺伝子の破壊がなく、腫瘍形成等の可能性が低くなる、
- (3) 挿入遺伝子の再活性化がなく、奇形腫等の心配がない、
- (4) 短期間で iPS 細胞が樹立できる

等の多くの利点がある。

今回、この T 細胞を対象に、センダイウイルスを用いて 4 つの遺伝子、すなわち Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の導入を行った。センダイウイルスは、細胞質にとどまって、RNA を転写、複製して蛋白質を合成することから、導入された細胞の染色体に影響を与えず、挿入による遺伝子の変異や染色体構造変化の危険性もないなどの特徴を持っている。また、哺乳類の多くの細胞、組織に効率良く遺伝子を導入できるため、iPS 細胞の臨床応用に向けて非常に期待される技術とされている。

まず採血された 1ml (最小では 0.1ml) の末梢血から遠心分離により赤血球や顆粒球を除き、T 細胞用の培養皿で培養・増幅を行った (セルソーターで T 細胞のみを単離し培養・増幅をおこなったものと外見的には、T 細胞のみのものと同様のであることを確認した)。次いで、前掲の 4 遺伝子をセンダイウイルスベクターによって T 細胞へ導入したところ、ウイルス感染後 20 日後、採血した日から起算して 25 日目には ES 細胞様のコロニーが出現し、こうした細胞を T 細胞由来 iPS 細胞、すなわち TiPS 細胞と名付けました。詳細な

解析を行ったところ、センダイウイルスによって導入された4つの外来遺伝子は数回の継代を行うことで完全に消失していました。一方で NANOG、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、GDF3、REX1、DPPA2、DPPA4 といった内在的な ES 細胞のマーカーが mRNA レベルで発現していることが確認され、免疫染色レベルでも Nanog、Oct3/4、SSEA3、SSEA4、Tra-1-60、Tra-1-81 といった ES 細胞特異的なタンパク質が作られていることが確認した。また、分子のマーカーによる確認のほか、テロメラーゼの活性も高まっていることが確認した。加えて、他の体細胞からつくられた iPS 細胞と同様に TiPS 細胞もテラトーマ作成能をもっており、ヒトの体を構成するほとんどの細胞へと分化可能であることが示された。

興味深いことに、TiPS 細胞では、由来となった T 細胞で起こった TCR 関連遺伝子の組み替えパターンがそのまま維持されており、TiPS 細胞から分化した細胞にもそのパターンが引き継がれることも判明した。

健常者および遺伝性QT延長症候群の患者の皮膚あるいは血液中のT細胞から、iPS細胞株を多数樹立し、心筋細胞への分化誘導に成功している。現在遺伝性QT延長症候群はイオンチャンネルに関係する12種類の遺伝子異常が原因になりうることが報告されている。我々は心疾患を有さない健常者10名と共に遺伝性QT延長症候群3名からiPS細胞を樹立することに成功した。この3名の遺伝性QT延長症候群は1型、2型、3型であり、いずれも遺伝子変異部位を同定した。

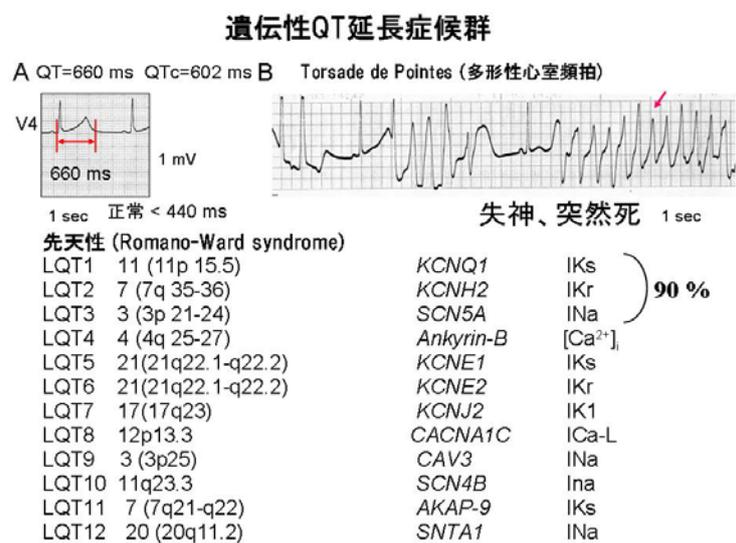
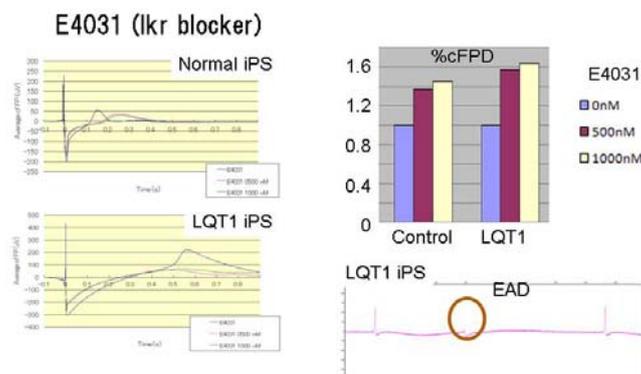


図 45 遺伝性 QT 延長症候群患者の遺伝子変異部位

これらの12種類のうち、現在LQT症候群の1型、2型、3型、7型の症例の皮膚あるいは血液からiPS細胞を樹立し、心筋細胞への分化誘導を行っているところである。既に1型からはデータの解析が始まった。これによると、1型LQT症候群ではIKsチャンネルが異常であることから、薬剤非投与下では健常者群に比してFDP (field potential duration) が延

長していることが観察された。

E4031投与による1型LQT患者由来心筋細胞の活動電位の変化

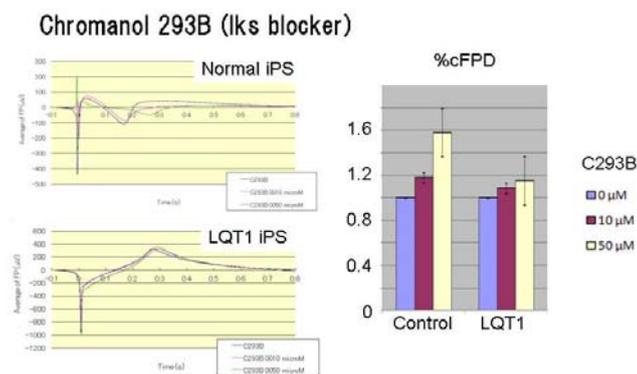


E4031は健常者、1型LQT患者由来心筋の活動電位を延長した

図 46 1型LQT患者由来心筋細胞のE4031による活動電位変化

この心筋にIkrチャンネルブロッカーのE4031を投与すると、FPD時間の延長が観察された。一方、IksチャンネルブロッカーのChromanol293Bを投与してもFPD時間の延長は観察されなかった。こうした解析を通じ、薬剤感受性薬剤の創薬スクリーニングは進むものと考えられた。

Chromanol293Bによる1型LQT患者由来心筋の活動電位の変化



Chromanol 293Bは1型LQT患者由来心筋の活動電位を延長しなかった

図 47 1型LQT患者由来心筋細胞のChromanol293Bによる活動電位変化

(4) 目標の達成度と意義

これまで、iPS 細胞から分化させた組織を動物モデルに移植する場合、GFP のような標識を組み込むことで体内での動態を追跡し、腫瘍原性などの研究を行ってきたが、標識そのものが持つ細胞毒性や抗原性といった要因を完全に排除することができなかった。しかし、TiPS 細胞由来の細胞や組織には TCR 関連遺伝子の組み替えパターンがそのまま維持されるため、宿主に影響を与えずに細胞を追跡できるものと期待されている。また、T 細胞は体外で簡単に培養・増幅させることができることから、血液検査などで採取された血液などを利用することで患者に必要以上の苦痛を与える必要がないため、再生医療のリソースとして有望であることはもちろん、遺伝子の再構成後の細胞でも iPS 細胞の樹立ができたことから、体細胞リプログラミングの機構研究にとっても、重要な知見を与えるものと期待されている。

2. ③-1 (c) スクリーニングシステムへのヒト iPS 細胞由来心筋細胞の供給

(1) 事業目的と背景

薬剤創薬スクリーニングはこれまで培養細胞に HERG 遺伝子を導入し、一部の K チャネルの回生期だけを行ってきたため、擬陽性・偽陰性の結果が多く、ヒトの心筋細胞を用いたスクリーニング系が待ち望まれていた。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いたスクリーニング系を確立するため、これを安定的に提供し、研究を行うことが求められていた。

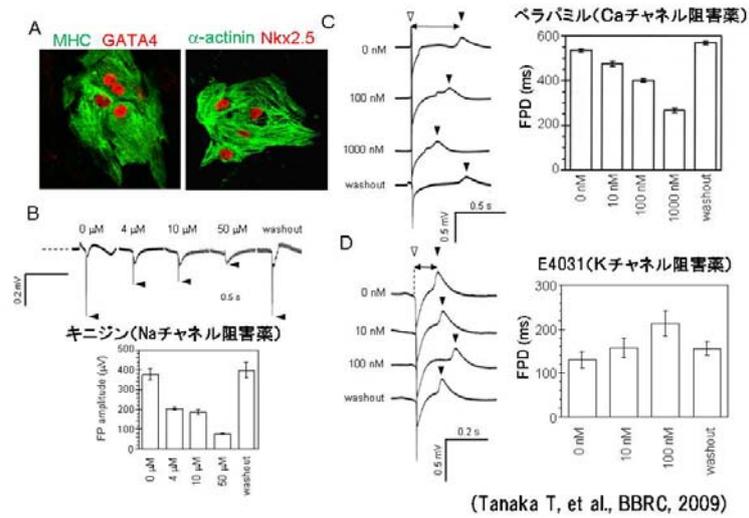
(2) 事業内容と目標

東京医科歯科大学安田研究室にスクリーニングシステムへのヒト iPS 細胞由来心筋細胞の供給を行うことを目標とする。

(3) 研究成果

毎週定期的に東京医科歯科大学安田研にヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を供給し、MEA (Microelectrode Arrays) 法による活動電位の計測を行った。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞から心筋細胞特異的 Na 電流、K 電流、Ca 電流の記録が可能であり、また特異的チャンネル阻害薬により電流は阻害された。その成果は 2010 年 BBRC 誌に発表した。評価班のユーザーフォーラムへの評価用心筋細胞の供給を行った。

ヒトiPS心筋細胞の電気生理学的解析



(Tanaka T, et al., BBRC, 2009)

図 48 供給されたヒト iPS 心筋細胞の電気生理学的性質

(4) 目標の達成度と意義

目標は 100%達成されていると考えられる。この技術の確立により、ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を均一な品質で大量に安定的に供給することが可能となった。

2. ③-2 iPS 細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

Ⅲ. 2. ③-2 iPS 細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

東京医科歯科大学	安田 賢二
三菱化学メディエンス	関島 勝
東邦大学（山梨大学）	杉山 篤

2. ③-2 (a) 装置システム（ハードウェア）の開発

非公開

2. ③-2 (a) -2. 細胞ネットワークを用いた心室（ST 領域）「興奮伝導」の「空間伝導ゆらぎ」計測法の開発

非公開

2. ③-2 (b) 解析・判断プロトコル・データベース（ソフトウェア）の開発

非公開

2. ③-2 (b) -1. ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた既存 *in vitro* 計測法による偽陰性・偽陽性検査の改善の定量的評価

非公開

2. ③-2 (b) -2. 「時間ゆらぎ」とイオンチャンネルブロックの相関計測による「ゆらぎ」についての原理的解明

非公開

2. ③-2 (b) -3. 1 細胞レベルでの細胞外電位遅延（FPD）応答の「時間的ゆらぎ」計測法の開発とその評価

非公開

2. ③-2 (b) -4. 強制拍動刺激系を用いた「時間ゆらぎ」「空間伝導ゆらぎ」計測法の開発

非公開

2.③-2 (b) -5.ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いたトラフィック計測技術の開発

非公開

2.③-2 (c) システム評価

非公開

2.③-2 (c) -1. 東京医科歯科大技術からの技術トランスファー

非公開

2.③-2 (c) -2. (第1段階) 諸条件の15薬剤についての評価

非公開

2.③-2 (c) -3. Na⁺, Ca²⁺, K⁺チャンネルブロッカー

非公開

2.③-2 (c) -4. hERG 偽陽性薬剤

非公開

2.③-2 (c) -5. ヒト幹細胞由来モデル心筋の性状評価、比較

非公開

2.③-2 (c) -6. ユーザーフォーラムの構築と、製薬企業等との情報交換

非公開

2.③-2 (c) -7. メガファーマとの交流と技術共同評価の推進

非公開

Ⅲ - B 独立行政法人産業技術総合研究所担当分

1. 事業全体の成果

1. 1 研究開発項目①「iPS細胞の安定供給・大量調製・保存技術の開発」

ヒト iPS 細胞の安定供給システムを構築し産業化に向けて展開を図るため、安定的な培養技術とヒト iPS 細胞の大量調整、保存の自動化装置開発を行う。

国立成育医療研究センター研究所において、川崎重工業の自動培養装置（1 台）および大陽日酸の凍結保存装置（2 台）を設置し、稼働させ、手培養との比較検討と自動凍結保存の安定性に関する開発研究を行い、装置・培養器材の開発にフィードバックする体制を構築してきた。自動培養装置では iPS 細胞のコロニーの選択に画像処理技術を使用する。培養容器中の iPS 細胞を可視化し、位相差顕微鏡相当の画像から細胞の質判定基準設定を行い、細胞集団（コロニー）の画像的特徴の判定基準を画像処理ソフトウェアに組み込み、画像の特徴量と研究者の判断の相関を取り細胞コロニー選定の判定基準を作成し、画像処理による細胞コロニー選定の自動化を開発した。手培養による培養環境評価をもとに、培養操作部の環境制御を自動培養装置に実装し、播種から回収までの一連の工程を実現することができた。国立成育医療研究センターで樹立されたヒト iPS 細胞（MRC5-iPS）を用いて、自動培養装置により継代を繰り返した細胞は、未分化性及び分化多能性を検定するヒト多能性幹細胞検定試験により幹細胞性質を担保されていることを示した。これにより、ヒト iPS 細胞培養工程の明確化と大量培養調整法の基盤となる培養システムを構築することに成功した。

自動凍結保存システムの開発では、まず、ヒト iPS 細胞の予備凍結自動化を行うに当たってガラス化法に代わり緩慢法による実用化が可能であることを見出し、予備凍結法として緩慢凍結法を選定した。適正な凍結培地を選択することにより緩慢法で MRC5-iPS 細胞平均 70%以上の生存率を達成した。iPS 細胞の凍結保存完全自動化にむけ、凍結チューブ（アンプル）個別のバーコード自動読取による管理が可能な凍結保存システム“クライオライブラリー”を 2 台製作した。本装置ではアンプルをセットすることにより自動的にバーコードが確認され、ケーンが自動的に凍結保存容器内に搬送され、出庫の際は、必要な細胞試料を検索・出庫登録した後、装置本体のタッチパネルを操作することによりパスボックスまで自動搬送することができる。ヒト iPS 細胞の予備凍結自動化評価用装置として緩慢法による予備凍結の自動化が可能な装置を試作し、クライオライブラリー組込み型予備凍結装置による自動予備凍結、凍結保存後、解凍処理を行った結果、MRC5-iPS 細胞において平均生存率 50%以上の生存率を確保した。緩慢法が使えることにより、解凍についても解凍後自動化の実現が容易になり今後の装置開発の加速が可能となる成果を得た。

ヒト iPS 細胞大量培養調整法の基盤となる培養システムと品質と安全性を担保する凍結保存システムの自動化を構築することに成功した。

1. 2 研究開発項目②「iPS細胞の各種性状解析」

様々な組織からヒト iPS 細胞を樹立しその性状解析を行うとともに、安定した基本培養システムを開発することと、プロジェクトグループ内へ品質が担保された iPS 細胞株を提供することが委託業務であり、品質が担保された iPS 細胞を用いることによりプロジェクト全体の研究を促進

する。Yamanaka 因子 (OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC) をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入する方法を用いて、4 種の親細胞株に対して iPS 細胞を作成した。各細胞株に対して、未分化マーカー遺伝子の発現を免疫組織染色法と定量 PCR 法により解析し、分化多能性に関しては *in vivo* において奇形腫形成能試験と *in vitro* において胚様体 (EB) 作成による外胚葉、内胚葉、中胚葉組織への分化を確認する解析を行った。染色体核型解析では全ての細胞株が正常ヒト染色体核型を有することを確認した。ヒト羊膜由来 iPS 細胞株 (8 細胞株)、ヒト子宮内膜由来 iPS 細胞株 (4 細胞株)、ヒト胎盤動脈由来 iPS 細胞株 (4 細胞株) とヒト胎児肺組織由来繊維芽細胞 iPS 細胞株 (3 細胞株) を提供することができた。各細胞株はバイオリジカルサンプルとして 3 サンプル回収し、さらに細胞継代による影響を解析するために、細胞継代数 5~10 と 10 以上培養を経たサンプルを回収し網羅的遺伝子発現解析とレクチンアレイ解析を行った。ヒト iPS 細胞の分化特性を解析するために、*in vitro* による分化サンプルとして 14 日間培養した EB サンプルを各 iPS 細胞株から作成し遺伝子発現解析へ提供した。これらデータをバイオインフォマティクスによる解析結果から、我々の樹立・培養法が安定したものであることが示されたことは大きな意義がある。さらにこうした培養法が基盤技術として安定供給・大量調製・保存技術の開発に反映される役割も担うことができた。

目標	研究開発成果	達成度
<p>研究開発項目①「iPS 細胞の安定供給・大量調製・保存技術の開発」</p> <p>1. iPS 細胞大量調製の自動化技術の開発 (川崎重工業、国立成育医療センター)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒト iPS 細胞を自動培養できる装置を開発する。 ・自動培養装置によりヒト iPS 細胞の連続継代培養を行う。 ・自動培養装置により培養したヒト iPS 細胞の性質を評価する。 <p>2. ガラス化法等を用いた iPS 細胞の自動凍結保存技術の開発 (大陽日酸、国立成育医療センター)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・自動凍結保存装置に最適化した凍結保存技術を検討する。 ・ヒト iPS 細胞の凍結保存液を選定する。 	<p>1. iPS 細胞大量調製の自動化技術の開発 (川崎重工業、国立成育医療センター)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・iPS 細胞を自動培養装置で培養し、未分化の iPS 細胞を維持し、24 継代の連続培養に成功した。また、iPS 細胞のコロニーの分化/未分化を画像で識別する画像処理技術を開発した。 ・自動培養装置によるヒト iPS 細胞の連続継代培養に成功した。 ・自動培養装置により培養したヒト iPS 細胞の幹細胞評価により幹細胞性質が担保されることを確認した。 <p>2. ガラス化法等を用いた iPS 細胞の自動凍結保存技術の開発 (大陽日酸、国立成育医療センター)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・自動凍結保存装置に最適化した凍結保存技術として緩慢法が有用であることを見出した。 ・ヒト iPS 細胞の緩慢法凍結による生存率と幹細胞機能検定から凍結保存液を選定し高い生存率を確保する方法を見出した。 	<p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p>

<p>3. 安定供給・大量調製に適した温度応答性培養器材の開発（セルシード、川崎重工業）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・iPS 細胞の培養に適した温度応答性培養器材の開発を試みる。 ・温度応答性培養器材上での iPS 細胞長期安定性に関する検討を試みる。 	<p>3. 安定供給・大量調製に適した温度応答性培養器材の開発（セルシード、川崎重工業）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ナノレベルでの温度応答性培養器材の表面構造解析に成功し、iPS 細胞の培養に適した温度応答性培養器材の開発に成功した。 ・最適化した温度応答性培養器材上で 10 継代以上培養した iPS 細胞の安定性(未分化状態および多分化能維持、染色体異常なし)を確認した。 	<p>○</p> <p>○</p>
<p>研究開発項目②「iPS 細胞の各種性状解析」</p> <p>1. 由来の異なる iPS 細胞の樹立（国立成育医療センター）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・様々な組織からヒト iPS 細胞を樹立する。 ・ヒト iPS 細胞の安定した樹立・培養法を確立する ・安定供給・大量調製・保存技術を開発する。 <p>2. iPS 細胞グライコーム解析並びに細胞評価技術の開発（産業技術総合研究所糖鎖医工学研究センター）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒト iPS 細胞の糖鎖を網羅的に解析する。 <p>3. iPS 細胞における遺伝子発現プロファイルの解析と特異的遺伝子マーカーの探索（産業技術総合研究所 幹細胞工学</p>	<p>1. 由来の異なる iPS 細胞の樹立（国立成育医療センター）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Yamanaka 法により様々な組織からヒト iPS 細胞を樹立することができた。 ・ヒト iPS 細胞の安定した樹立・培養法を確立することができ、プロジェクト内へ技術移転に成功した。 ・品質が担保されたヒト iPS 細胞と培養法が基盤試料及び技術として提供でき、安定供給・大量調製・保存技術の開発に反映された。 <p>2. iPS 細胞グライコーム解析並びに細胞評価技術の開発（産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・レクチン・プローブ分子数を 96 種類に倍加させた「高密度レクチンアレイ」を開発して、計 114 種の iPS 細胞の糖鎖を網羅的に解析した。その結果、元来異なる糖鎖プロファイルを有していた体細胞が、未分化状態となり多能性を獲得すると、ES 細胞と類似の糖鎖プロファイルに収束化することを明らかにした。また、未分化細胞に特徴的な糖鎖の構造的な特徴を明らかにした。最終的には、未分化（iPS/ES 細胞）と分化（体細胞）を完全に判別することができるレクチン（rBC2LCN）の発見に至った。 <p>iPS 細胞における遺伝子発現プロファイルの解析と特異的遺伝子マーカーの探索（産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター）</p>	<p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p>

<p>研究センター)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ cDNA マイクロアレイによるヒト iPS 細胞の未分化状態における遺伝子発現の網羅的解析 ・ ヒト iPS 細胞の分化傾向性の評価 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 58 種類の iPS 細胞、ES 細胞、親株細胞に関してどれも 3 例以上の解析を行い、遺伝子発現パターンを用いた幹細胞の分類及び、2 5 2 0 種の特異的なマーカーを発見した。 ・ 8 種類の幹細胞株に関して分化指向性を明らかにした。 	<p>◎</p> <p>◎</p>
<p>4. システム生物学的アプローチによる iPS 細胞における特異的パスウェイ及びマーカーの探索 (産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ヒト iPS 細胞の特異的制御ネットワークを解析する。 ・ ヒト iPS 細胞の細胞表面糖鎖を計測したレクチンマイクロアレイデータを統計解析する。 	<p>4. システム生物学的アプローチによる iPS 細胞における特異的パスウェイ及びマーカーの探索 (産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 独自技術である Network Screening により解析し、28 ヒト iPS 細胞特異的制御ネットワークを同定した。 ・ レクチンマイクロアレイ計測データの標準的統計解析の結果と併せ、ヒト iPS 細胞特異的な 13 糖転移酵素を同定した。 	<p>◎</p> <p>◎</p>
<p>5. iPS 細胞の染色体安定性の検証 (アルブラスト、産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ iPS 細胞の染色体解析のための細胞調製方法を最適化する。 ・ 樹立された iPS 細胞について 50 株の染色体解析を行い、iPS 細胞の染色体核型解析の評価法を検討する。 	<p>iPS 細胞の染色体安定性の検証 (アルブラスト、産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 細胞調製方法の最適条件をシステムティックに決定する方法を確立した。 ・ 11 種類の iPS/ES 細胞を用いて染色体解析を完了した。核型解析の評価法の検討も完了した。 	<p>◎</p> <p>◎</p>
<p>6. iPS 細胞のエピゲノム情報の解析 (川崎重工業、産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 樹立された未分化状態の iPS 細胞の DNA メチル化情報解析を完了する。 ・ 樹立された未分化状態の iPS 細胞のヒストン修飾情報の解析を実施する。 	<p>iPS 細胞のエピゲノム情報の解析 (川崎重工業、産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 網羅的に DNA メチル化情報を取得した。 ・ ヒストン修飾情報の解析に着手した。 	<p>◎</p> <p>○</p>

2. 研究開発項目ごとの成果

2. 1 研究開発項目①「iPS 細胞の安定供給・大量調製・保存技術の開発」

2. 1. 1 iPS 細胞大量調製の自動化技術の開発

川崎重工業株式会社

独立行政法人 国立成育医療研究センター

(1) 事業目的と背景

ヒト iPS 細胞は創薬スクリーニングや疾患メカニズム解明への応用、更には次世代の再生医療材料として世界中の注目を集めている。ヒト iPS 細胞の安定な培養システムを基盤にして大量培養調製する製造技術を開発する。

ヒト iPS 細胞の安定培養維持法の確立は、国内で最初に再生医療対応ヒト ES 細胞樹立研究が承認され、世界先端の知見及び技術をいち早く獲得することが可能なヒト幹細胞研究基盤が整備されている（独）国立成育医療研究センターが行う。創薬や医療などの確固とした産業応用促進のため iPS 細胞の大量培養調製の自動化システムの開発を川崎重工業（株）が（独）国立成育医療研究センターとともに先行細胞の安定供給システムを構築する。ロボット技術と画像処理技術を用い、コロニーを選択的に自動継代可能な大量調製技術の開発を行う。

(2) 事業内容と目標

川崎重工業（株）が保有する自動培養装置の技術をベースに、クリーンロボットと画像処理の技術を生かし、iPS 細胞のコロニーを選択的に自動継代する大量調製技術の開発を行なう。

iPS 細胞のコロニーの選択には、画像処理技術を使用する。第一段階では、培養容器中の iPS 細胞を可視化し、位相差顕微鏡相当の画像を研究者に提供し、研究者が画面上で指定したコロニーを、別途開発する自動継代機構にて継代可能とする。第二段階では、研究者が判断するコロニーの画像的特徴の判定基準を画像処理ソフトウェアに組み込み、画像の特徴量と研究者の判断の相関を取り、データを採取することで、コロニー選定の判定基準を作り、画像処理によるコロニー選定の自動化を目指す。

選択したコロニーの継代については、第一段階では、現状、手培養において行なわれている 2 つの方法、剥離剤と継代したいコロニーの場所のみへの部分的なピペッティングの相互作用による方法と、機械的剥離手段（ローラ）を使い、継代したいコロニーの場所のみを剥離させる方法を、培養結果と自動化の適否の面から評価した上で、いずれかの自動継代機構を試作する。第二段階で画像処理装置との連携動作を行い、培養評価と改良を実施する。

iPS 細胞の培養には、一般的な細胞（株化細胞等）と比べ、培養環境の変化に対する余裕度が低い。手培養では、培養操作に要する時間を短縮することで、培養品質の維持が図られているが、自動培養装置では、培養操作（培地交換、継代）を行なう培養空間の環境を積極的に制御することで、培養品質をさらに高められる可能性がある。そこで、温度、CO₂ 濃度、O₂ 濃度、等の培養に影響する環境条件を変更できる培養操作部を試作し、自動培養に適した培養条件の制御を可能とする。第一段階では、手培養による評価で環境制御すべき対象を絞った後、培養操作部単体での評価が可能な環境制御装置を試作する。第二段階では、実際の培養操作に適用し、制御すべき環境条件を決定する。第三段階として、画像処理によるコロニー選択、選択したコロニーの自動継代、培養操作部の環境制御を、自動培養装置に実装し、播種から回収までの一連の工程を実

現する。

自動凍結保存装置との連携では、自動凍結装置、自動解凍装置の開発後に、凍結保存する細胞の懸濁液を自動凍結装置に提供し、自動解凍装置で解凍された細胞懸濁液を入庫し、播種するために、自動培養装置と凍結保存装置の機械的 I/F を設け、一体運用を可能とする。

画像処理、自動継代、培養操作部環境制御の開発時における試験用に使用するため、iPS 細胞の手培養を川崎重工業神戸工場内で実施する。

中間目標（平成 23 年度末）

- ・ 継代するコロニーの選択のため、画像処理技術を使って、コロニーの抽出と設定した判定基準による選択が行なえること。
- ・ 画像処理により選択されたコロニーを、培養操作に適した環境下で自動で継代できること。

最終目標（平成 25 年度末）

- ・ 画像処理を使って継代するコロニーを自動選択し、選択したコロニーの自動継代を行なう自動培養が、播種から回収までの一連の工程として実現されること。
- ・ 自動凍結保存装置と連携し、培養細胞の凍結保存と、解凍細胞の培養開始が自動で行なえること。

（3）研究成果

川崎重工業（株）が保有する自動培養装置の技術をベースに、クリーンロボットと画像処理の技術を生かし、iPS 細胞のコロニーを選択的に自動継代する大量調製技術の開発を行なう。

①ベースとする自動培養装置と自動化技術開発の戦略

iPS 細胞の自動培養技術開発のベースとした自動培養装置は川崎重工業(株)が製品発売している細胞自動培養システム「オートカルチャー®」である。図 1-1 に示す。



図 1-1 細胞自動培養システム「オートカルチャー®」

「オートカルチャー®」は、筐体内をクリーン度 100 の無菌空間とし、クリーンロボットや専用機械が筐体内で培養操作を行う。筐体内にはインキュベータ、冷蔵庫、保管庫があり、約 1 週間の無人・無補給での運転が可能である。細胞観察装置も組み込まれているため、培養容器を筐体外に出さずに細胞の顕微鏡観察が行える。図 1-2 は「オートカルチャー®」で行う培養の流れを示したものである。コンピュータのスケジューリングによって、指定した日時に培地交換、継代培養、細胞出庫、細胞観察等を行う。スケジューリング時に、細胞の種類を指定すれば、装置に組み込まれたプロトコルに従い、細胞毎の個別の培養操作を行い、対応した培地を使用する。プロトコルはパラメータを変えることがユーザーにも可能であり、別の細胞種に拡張できる。

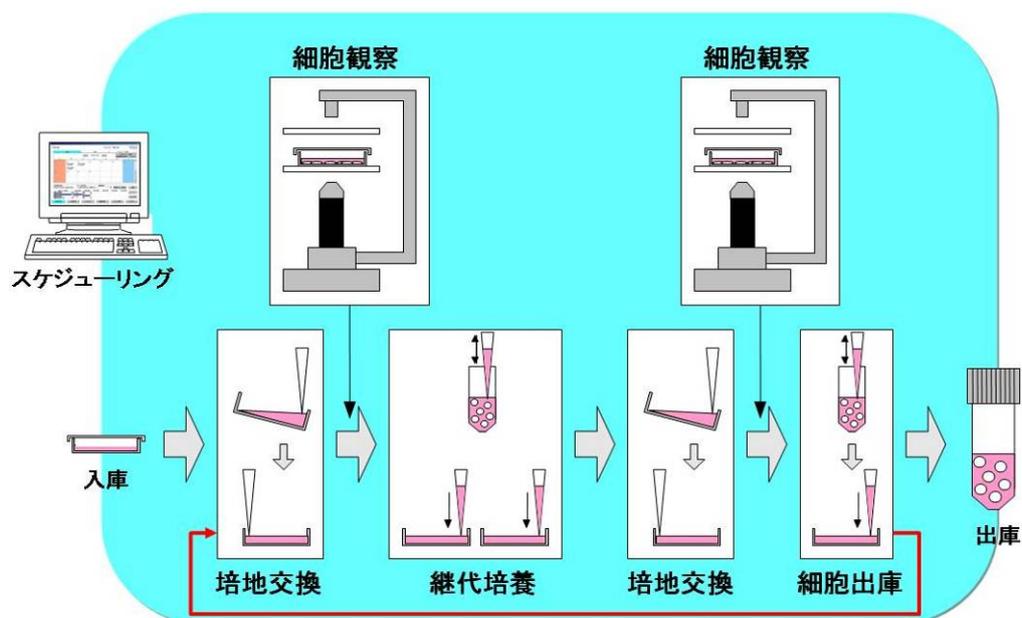


図 1-2 「オートカルチャー®」で行う培養の流れ

本プロジェクトでは、「オートカルチャー®」をベース機とし、iPS 細胞の自動培養プロトコルを開発し、組み込むとともに、培養した細胞を凍結保存し、あるいは、凍結保存していた細胞を解凍して培養を再開できる自動培養装置と凍結保存装置の連携を開発する。凍結保存装置側の開発は大陽日酸(株)の担当である。一方、継代培養には、一般的には剥離剤を使うが、剥離剤は細胞を痛めるデメリットがある。(株)セルシードは、温度応答性器材を開発・販売しており、培養容器の温度を変えることで、剥離剤を使わずに細胞の剥離が可能となる。iPS 細胞用の温度応答性器材を開発し、自動培養装置での継代培養に使用する。これら、2社の技術との連携を示したのが図 1-3 である。

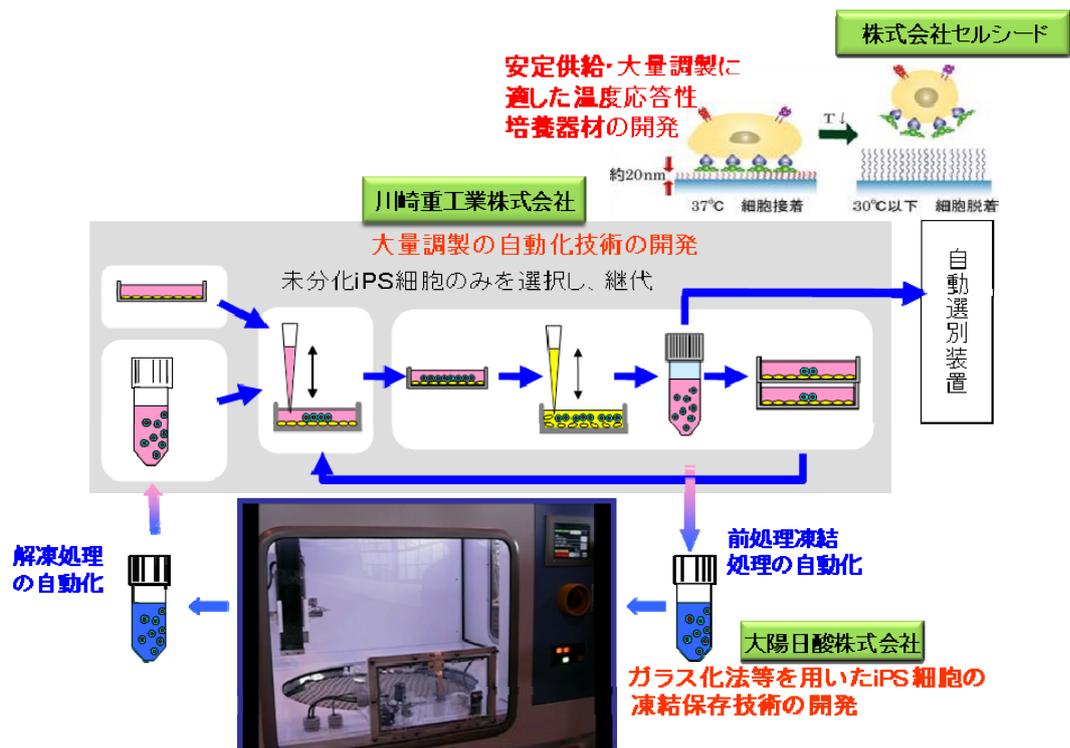


図 1-3 自動培養装置と凍結保存装置、温度応答性器材との連携

②一括継代方式による自動培養技術の開発と連続培養試験

まず、iPS 細胞のコロニーを区別せず、すべてを回収し、継代する一括継代方式による自動培養を試みた。使用した株は、成育医療研究センターが樹立した MRC5 由来の#25 株である。剥離は剥離剤を使用する方式とし、自動培養装置のプロトコルを新たに作成した。継代は、収穫した細胞を MEF のフィーダー細胞が培養されたディッシュ上に播種する。フィーダー細胞として使用する MEF は、手培養で増殖し、マイトマイシン処理したものを凍結保存しておき、継代前日に解凍し、ディッシュに播種し、自動培養装置に入庫しておいた。継代翌日は培地交換を行わないが、継代翌々日から、毎日、培地交換を行う。継代は週に 1 回である。自動培養の流れを図 1-4 に示す。連続培養は 15 継代実施を目標としたが、実際には 24 継代まで実施し、8 月のお盆休みで終了とした。

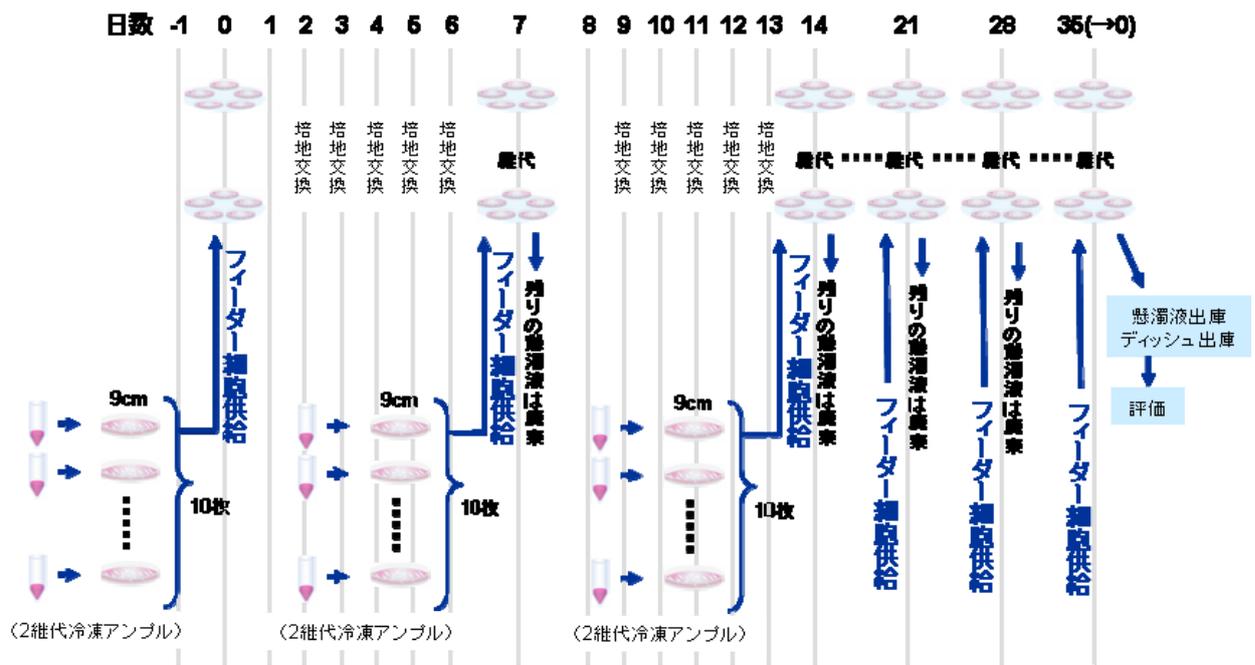


図 1-4 iPS 細胞の自動培養の流れ

図 1-5 は、連続培養中の 1 枚のディッシュを AP 染色したものである。AP 染色では、未分化のコロニーが着色される。染色後のディッシュを位相差顕微鏡でくまなく観察し、分化したコロニーがないか、確認した。図 1-5 で、ディッシュの周辺に示した 8 枚の位相差顕微鏡写真は、その箇所のみ、分化したコロニーが見つかったことを示す。総コロニー数に対し、未分化のコロニーの割合をコロニー数の比で求めると、未分化率は 98%であった。

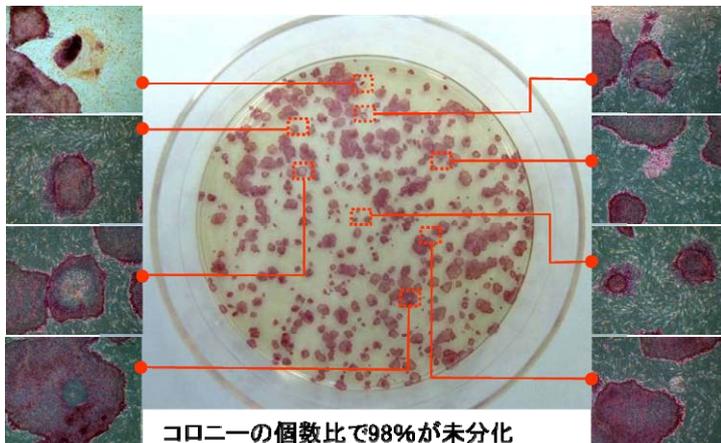
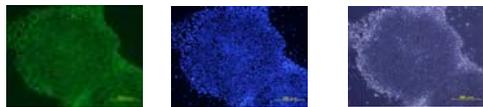
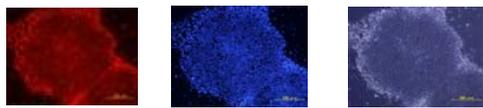
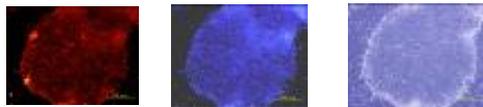
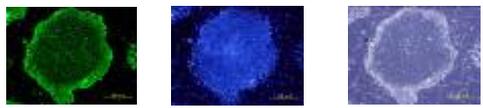
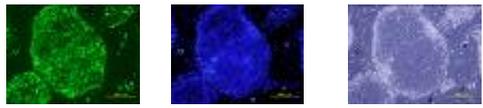
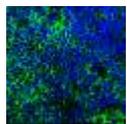
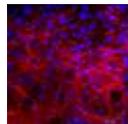
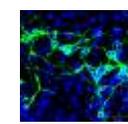


図 1-5 AP 染色した連続培養中のディッシュ

連続培養した iPS 細胞が、iPS 細胞としての性質を保っているかを確認するため、表 1-2 に示す各種検査を実施した。免疫染色、分化能確認、核型解析である。表では、免疫染色と分化能確認は 12 継代終了後、核型解析は 8 継代終了後を示す。いずれも、培養された細胞が iPS 細胞の性質を保っていることを示した。これらより、自動培養装置を使った連続培養で、iPS 細胞が未分化性を維持し、かつ、iPS 細胞の性質を保ったまま、自動培養ができることが示された。iPS

細胞の自動培養成功は世界初である。

表 1-2 iPS 細胞の性質を確認するための各種検査結果

検査内容	区分	結果	判定
免疫染色 (12回継代後)	Oct3/4		代表的な未分化マーカーの発現を確認
	Nanog		
	Sox2		
	SSEA4		
	Tra-1-60		
分化能 確認試験 (12回継代後)	EB 形成	   AFP alpha-SMA Tuj1 内胚葉 中胚葉 外胚葉	多分化能を 確認
核型解析 (8回継代後)	G バンド法	46,XY	異常無し

③画像処理を用いたコロニーの分化/未分化判定技術の開発

研究者が iPS 細胞を培養する場合、継代前に顕微鏡で観察し、未分化のコロニーが多い、よい状態の場合はディッシュ全体の iPS 細胞を一括で継代し、分化したコロニーが多い場合は、未分化のコロニーのみを選び、継代する。このようにすることによって、よい状態の iPS 細胞を効率よく増やし、状態が悪くなった場合は、よい状態に戻して培養を続ける。よい状態の iPS 細胞のみを継代することを選択的継代と名付け、自動培養装置での実現を目指すこととした。

そのためには、ディッシュ内のコロニーを観察し、各コロニーの分化/未分化を判定する必要がある。画像処理技術を用い、iPS 細胞のコロニーの分化/未分化の自動識別技術を開発することとした。

図 1-13 は iPS 細胞の画像を取り込むためのカメラ・照明系である。ディッシュの上方から照明を当て、透過光を、レンズを通して CCD カメラに取り込む。レンズの倍率は、ディッシュ 1 枚

を数個の視野でカバーする広視野画像とコロニー単位で観察できる精細画像を準備することとし、それぞれ対応したレンズを持つ光学系を切替え可能とした。図 1-14 に示すように、広視野画像で分化/未分化の 1 次スクリーニングを行った後、スクリーニング困難なコロニーを精細画像で判定する戦略である。

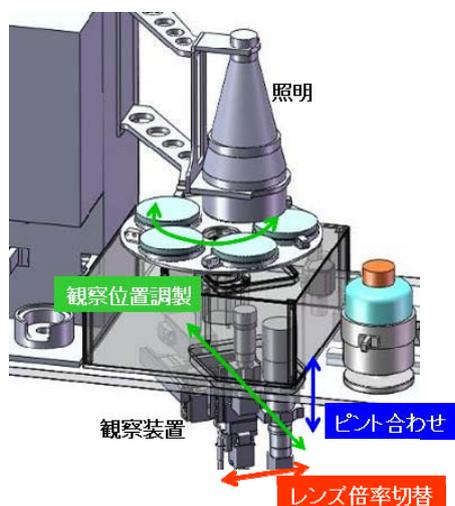


図 1-13 iPS 細胞の画像を取り込むためのカメラ・照明系

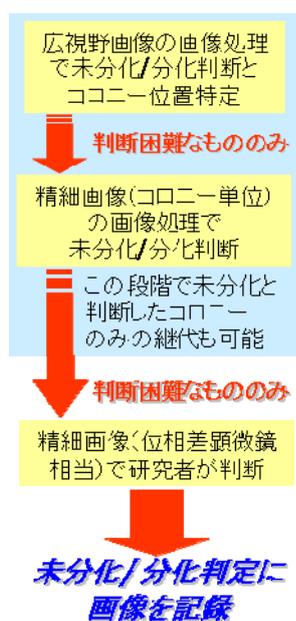


図 1-14 画像処理を使った分化/未分化判定戦略

図 1-15 は、広視野画像の 1 例である。iPS 細胞のコロニーは、やや濃く見え、その輪郭を抽出することで、コロニーの形状が検出できる。図 1-15 の上半分は広視野画像であり、コロニーの輪郭線は画像処理により、自動抽出されたものである。また数字はコロニーを区別するために入れた。図 1-15 の下半分の左側は、広視野画像の中の 1 つのコロニーをそのまま拡大したものであり、図 1-15 の下半分の右側は、該当するコロニーの位相差顕微鏡画像である。この結果から、画像処理技術により、コロニーの輪郭が抽出されていることが示される。

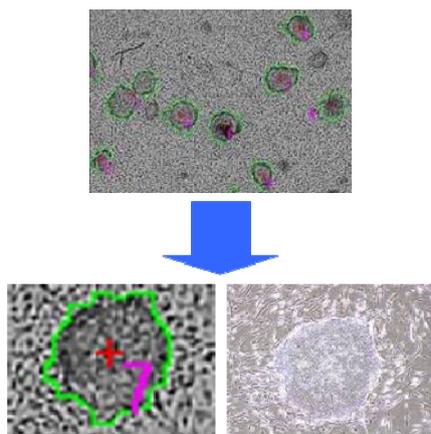


図 1-15 広視野画像と画像処理技術によるコロニー輪郭の抽出

表 1-3 は広視野画像を画像処理技術で解析することにより、分化/未分化判定を試みた結果である。判定はコロニーの形の異常(形異常)、コロニー内の細胞の大きさや核の割合(分化疑)、コロニー内の細胞の重なり(多層疑)の3つの観点で行い、それぞれの観点で分化が疑われる場合は×、疑われない場合は○とし、すべての項目が○であった場合を自動判定○-未分化であると判定した。一方、目視判定は、該当のコロニーを位相差顕微鏡で見て、研究者が判定した結果である。22 ケースの内、目視判定が△(研究者も判定を迷った)を除く 15 ケースに対し、正解である自動判定○目視判定○、および自動判定×目視判定×は 12 ケースであり、正解率 80%となる。画像処理の目的が、よいコロニーのみを継代したいことであるので、最も避けるべきは自動判定○目視判定×であるが、1 例もない。そういう意味では、本自動識別は、安全側に判定できていると言える。

表 1-3 広視野画像を使った iPS 細胞のコロニーの分化/未分化判定

	面積	形異常	分化疑	多層疑	自動判定	目視判定		面積	形異常	分化疑	多層疑	自動判定	目視判定
0	1.26	○	○	○	○	○	11	1.24	×	×	○	×	×
1	1.04	×	×	○	×	○	12	0.50	×	×	○	×	×
2	1.52	○	○	○	○	○	13	1.23	○	×	○	×	×
3	2.45	×	×	○	×	○	14	1.08	○	×	○	×	△
4	1.04	×	×	○	×	×	15	1.93	×	×	○	×	△
5	1.61	×	×	○	×	○	16	2.23	×	×	○	×	×
6	1.52	○	×	×	×	×	17	0.69	○	○	○	○	△
7	1.12	○	○	○	○	○	18	1.67	○	×	○	×	△
8	0.70	○	×	○	×	△	19	1.03	○	×	○	×	×
9	0.88	○	○	○	○	△	20	0.73	○	○	○	○	○
10	0.92	○	×	○	×	△	21	0.49	×	×	○	×	×

図 1-16 は精細画像を位相差顕微鏡画像と比較したものである。より詳細にコロニーの状況が観察できるので、精細画像を使えば、判定精度の向上が期待できる。

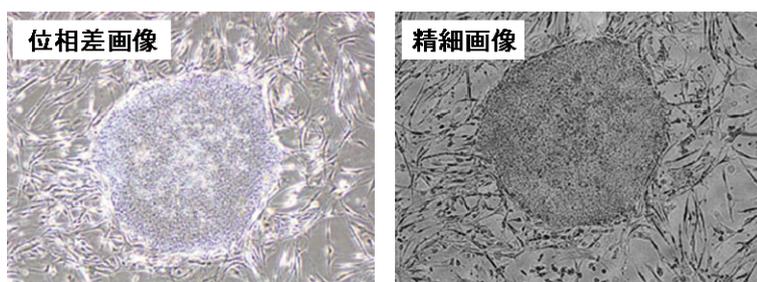


図 1-16 位相差顕微鏡画像と精細画像の比較

④ 選択的ピペッティングによる未分化コロニーのみの自動継代技術の開発

選択的な自動継代の使用が想定される状況は、培養中の iPS 細胞のコロニーの内、分化したコロニーが多くなったと考えられる場合である。図 1-24 に示すように、画像処理で分化/未分化判定を行った結果に対し、自動培養装置を使用するユーザーが設定した設定値—未分化のコロニーの割合—に対し、未分化のコロニーが多い場合は一括継代し、分化したコロニーが多い場合は、未分化のコロニーのみを選択的継代する。

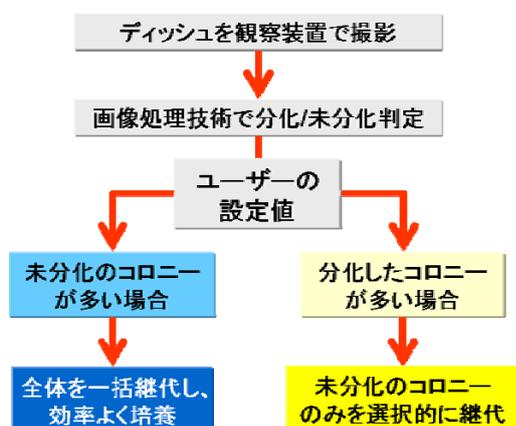


図 1-24 選択的継代と一括継代の条件分岐

選択的継代を行う場合、未分化のコロニーのみを確実に剥がす必要がある。図 1-25 に示すように、分化/未分化判定されたコロニーを分類した。1 は未分化のコロニーが単独で存在する場合、2 は分化したコロニーが単独で存在する場合、3 はコロニーの周辺部が分化している場合、4 はコロニーの中心部が分化している場合、5 と 6 は、分化したコロニーと未分化のコロニーが隣接している場合である。選択的継代で剥離すべきコロニーは、未分化のコロニーであって、剥離時に分化したコロニーと一緒に剥がす心配のないコロニーであり、図 1-25 の場合は 1 のコロニーとなる。

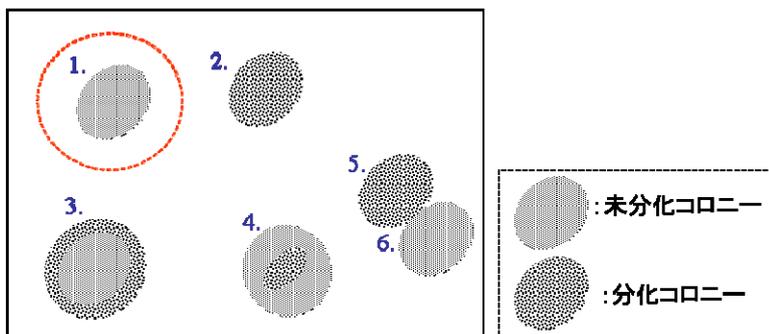


図 1-25 選択的継代で対象とするコロニー

次に、継代すべきコロニーの剥がし方である。手培養の場合、剥離剤を加え、しばらく時間がたつとピペッティングで特定のコロニーを剥がせる。この場合、ピペッティングで狙うのは、剥がしたいコロニーの中心ではなく、周辺部である。図 1-26 に示すように、ディッシュを傾け、剥がす対象とするコロニーの周辺部の内、もっとも上になる部分を狙ってピペッティングを行う。このピペッティングを選択的ピペッティングと呼ぶ。

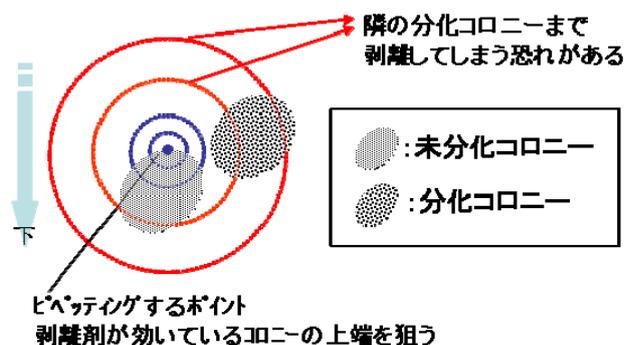


図 1-26 選択的ピペッティングによるコロニーの狙い位置

図 1-27 に選択的ピペッティングによるコロニーの剥離結果を示す。

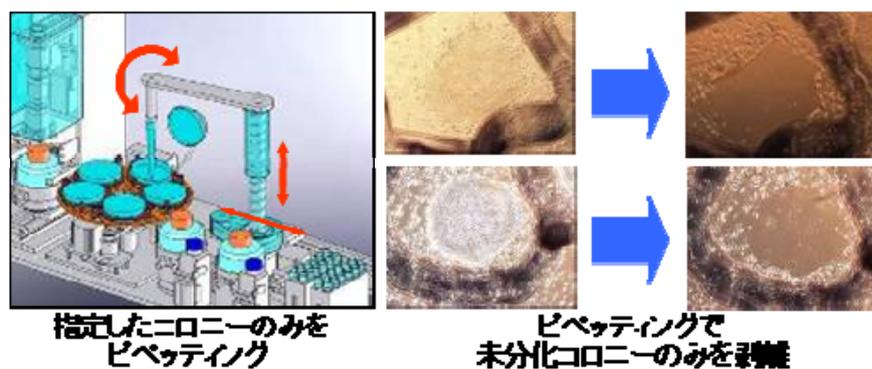


図 1-27 選択的ピペッティングによるコロニーの剥離結果

⑤iPS 細胞の多株対応の自動培養技術の開発

これまで自動培養装置で対象としたのは成育医療研究センターで樹立された MRC5 由来の#25

株である。iPS 細胞は株間で差があると言われ、自動培養装置で対応する上でも差が出る可能性がある。そこで、より広範な種類の iPS 細胞株を使用し、自動培養を行うことにした。使用するのは、#16 と#40 株で、比較のために#25 の培養も行う。さらには、より多種類の株の培養を目指す。

ベースとした自動培養装置は、インキュベータ内に 6 枚のプレートがあり、1 枚のプレート上に 5 個のディッシュが搭載されている。これまでの iPS 細胞の自動培養では、1 枚のプレートは iPS 細胞のディッシュ専用で使用し、継代時に播種する対象のフィーダー細胞の入ったディッシュは別のプレート上に置かれていた。そのため、図 1-35 の左半分に示すように、同時に培養できる iPS 細胞は 3 株となる。今回、新しいプロトコルを開発し、iPS 細胞の入ったディッシュとフィーダー細胞の入ったディッシュのプレート上の混在を許した。その場合、図 1-35 の右半分に示すように、インキュベータ 1 台で最大 6 株の iPS 細胞が同時培養できるようになる。

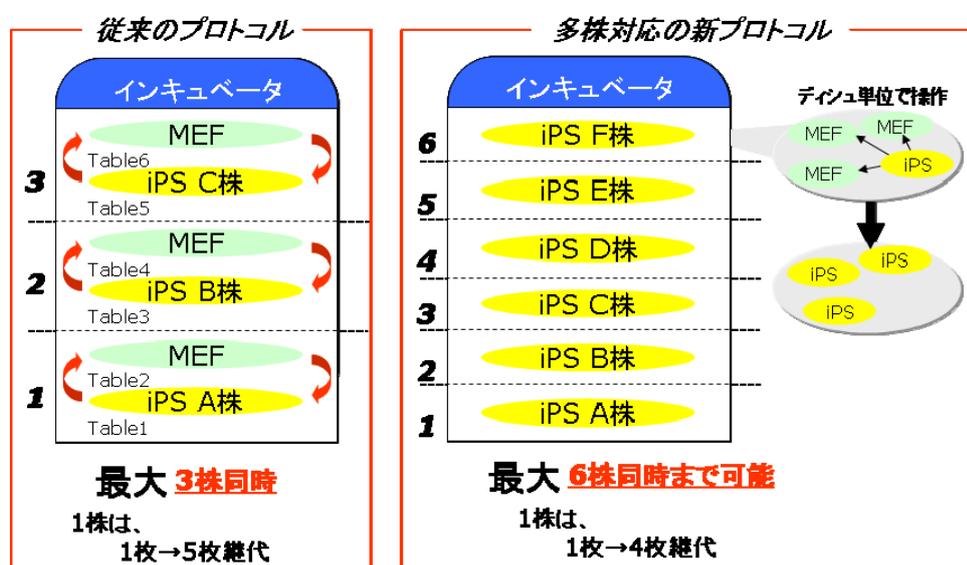


図 1-35 多株対応のためのプロトコル改良

⑥凍結保存装置連携のための細胞ハンドリング技術の開発

図 1-41 に示すように自動培養装置と凍結保存装置を連携し、一体運用できるようにする。凍結には、凍結する細胞懸濁液に凍結保護液を加えた後、徐々に温度を下げる予備凍結を行うが、細胞懸濁液に凍結保護液を加える作業は無菌空間で行う必要があり、凍結保存装置ではできない。一方、解凍側では、凍結していたアンプルを湯煎し、温度を上げた後、温めた培地を加えた後、遠心分離を行い、凍結保護剤の成分を除去する。温めた培地を加える操作以降は無菌空間で行う必要があり、凍結保存装置ではできない。凍結保存装置の入口側に当たる予備凍結と、出口側に当たる解凍で、凍結保存装置でできない部分を自動培養装置側で補い、凍結保存装置との連携を可能とする必要がある。



図 1-41 自動培養装置と凍結保存装置の連携イメージ

図 1-41 は予備凍結における自動培養装置内での作業を整理したものである。通常の継代と同じで、ディッシュから剥がした細胞を遠心分離するが、上清を廃棄した後、独自の工程となる。上清を廃棄した遠心管に凍結保護剤を加え、ピペッティングで攪拌の後、凍結アンプルに分注する。アンプルのキャップを閉めるまでが、自動培養装置側の役割となる。

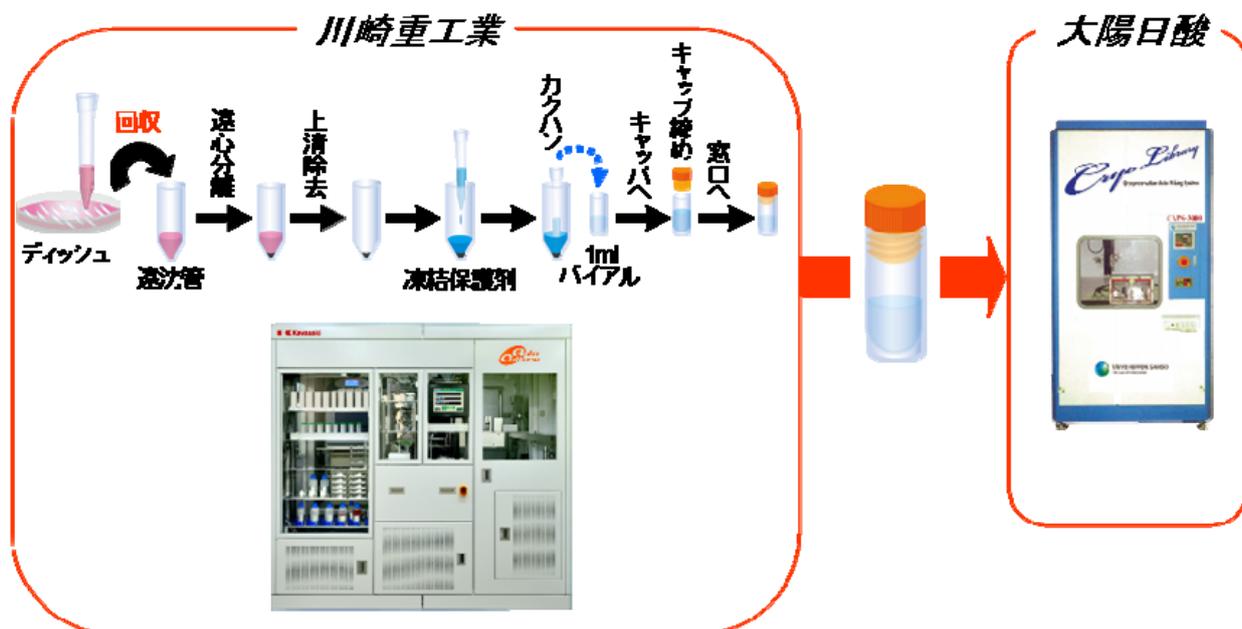


図 1-41 予備凍結における自動培養装置内での作業

⑦温度応答性器材を使用した自動継代技術の開発

温度応答性器材を、iPS 細胞を培養するディッシュに使用すると剥離剤の使用が不要となる。継代における工程の変更を図 1-45 に示す。

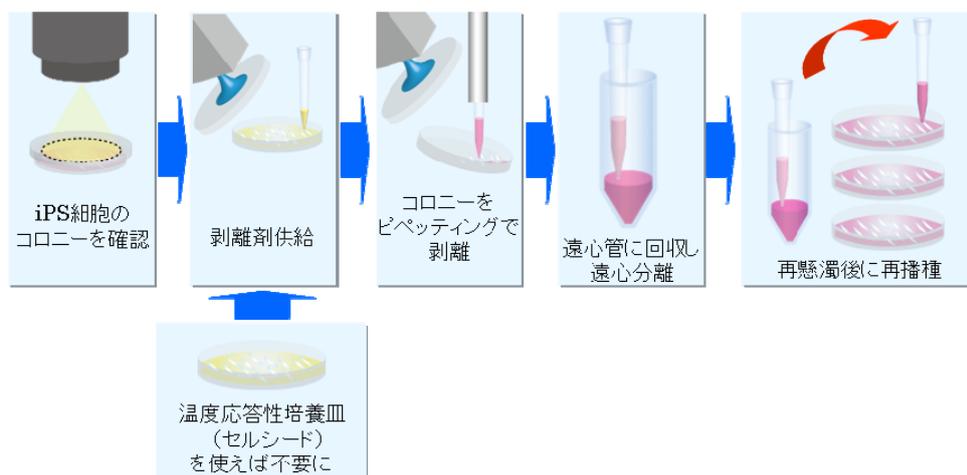


図 1-45 温度応答性器材を使った場合の継代工程の変更

図 1-46 を使用し、温度応答性器材を使う場合に検討すべき課題を説明する。図 1-46 の最上段は、通常の培養における温度応答性器材の使い方を示す。インキュベータから取り出し、室温に置くと、30 分程度分程度経過すると細胞がシート状に剥がれる。そのまま、iPS 細胞に使うと、図 1-46 の二段目に示すように、5～10 分程度分程度経過すると一部の細胞が剥がれ始め、ピペッティングを行っても、選択した以外の細胞も剥がれてしまう。これでは、選択的ピペッティングは行えず、選択的継代ができない。

一方、剥離剤を使った継代のイメージを図 1-46 の三段目に示す。剥離剤を加え、3～10 分程度経過するとピペッティングで剥がれる状態になるが、ピペッティングで剥がせる時間帯は限られ、制約が厳しい。また、MEF や iPS 細胞の状態によって、剥離剤の効き方が一定しない可能性がある。今回、セルシードが開発した iPS 細胞用の温度応答性器材を使った場合の状況を図 1-46 の最下段に示す。インキュベータから室温に取り出し、10 分程度経過するとピペッティングで剥がれるようになり、その状態が 30 分程度持続する。このため、選択的ピペッティングが行える時間が 30 分程度、確保できる。

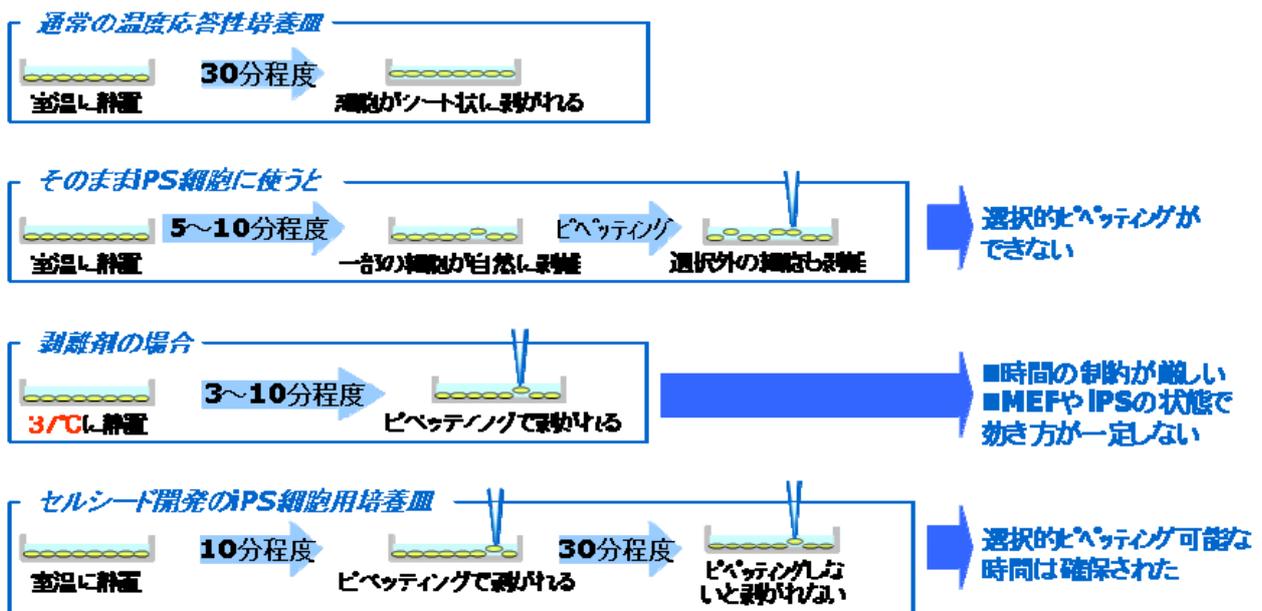


図 1-46 温度応答性器材の使用法の整理

自動培養装置に温度応答性器材を使う場合、確認しておかなければならないのは、望ましい条件が一定時間、同じ状況で保持できるかどうかである。以下について、自動培養装置を使用し、確認することが必要である。

(1)機械的なピペッティングでコロニー1個単位の剥離が可能か。

(2)時間が経過しても剥離させる特性が変わらないか。

(悪い例：時間が経つと同じピペッティングでも広い範囲が剥離する)

(3)MEF や iPS の Lot や株によって剥離させる特性が変わらないか。

(4) 目標の達成度と意義

中間目標（平成 23 年度末）は以下であった。

- ・継代するコロニーの選択のため、画像処理技術を使って、コロニーの抽出と設定した判定基準による選択が行なえること。

- ・画像処理により選択されたコロニーを、培養操作に適した環境下で自動で継代できること。

目標設定年度より、1年早い平成 22 年度末の時点で、以下を達成した。

- ・継代するコロニーの選択のため、画像処理技術を使って、コロニーの抽出と設定した判定基準による選択が行なえるようになった。ただし、判定基準のブラッシュアップは今後、必要となる。

それゆえ、達成とする。

- ・画像処理による判断でコロニー全てを選択するという結論となった場合は、培養操作に適した環境下で自動で継代できるようになった。しかし、コロニー単位で選択された場合に、培養操作に適した環境下で自動で継代することは、十分にはできていない。それゆえ、ほぼ達成とする。

2. 1. 2 ガラス化法等を用いた iPS 細胞の自動凍結保存技術の開発

大陽日酸株式会社

独立行政法人 国立成育医療研究センター

(1) 事業目的と背景

iPS 細胞の製造技術を考えた場合、細胞凍結保存の必要性は非常に高い。しかも、ほとんど人の手を介さずに自動的に目的の細胞を凍結保存し、また自動的に、そして正確にその情報を管理できる事はたいへん重要である。大陽日酸では、2009 年液化窒素式保存容器で世界で初めて凍結用アンプル一本一本を各々自動的に入出庫（自動格納）が可能で、さらにバーコードの自動読み取りにより管理ができる自動凍結保存システム“クライオライブラリー”を開発した。再生医療で細胞移植に使用する細胞量は、一定量を確保する必要がある、細胞移植による治療を行った場合、必ずしも一回の移植で細胞が定着し、効果があるとは限らず、繰り返し移植を行う必要がある。その際、移植に必要な一定量の細胞を常に確保しておく必要がある。しかしながら、常時移植できる一定量の細胞を確保することは実際には容易ではない。継代培養を繰り返す事は、突然変異の可能性が高まるばかりでなく、多大なコストがかかることになる。そこで、一定量の細胞を凍結保存しておくことにより、必要に応じて培養すれば、短期間で相当量細胞を調製することが可能となる。再生医療技術の進捗は、現在、日進月歩、著しい勢いで進んでいるものの、まだまだ未解明な事が多い。特に細胞移植後の長期的な状態を見据えた場合、将来、再生医療による治療を行った部分に関係する重篤な疾患が起こった場合に、その原因が移植により引き起こされたものなのか、そうでないかを検証するには、移植時のオリジナルの細胞を保存しておくことは非常に重要であると考えられる。一度患者自身が自己細胞で iPS 細胞を作成しその細胞を凍結保存しておけば、将来的に細胞移植を必要とするような疾患、或いは事故にあった場合において、患者から細胞の採取、iPS 細胞の作製、培養による一定量の細胞確保などの手間と時間が省くことが可能となり、短期間で移植に必要な細胞を準備することが可能となる。

(2) 事業内容と目標

iPS 細胞の最適な自動化への凍結保存方法の基本プロセスを開発し生存率と細胞量等を勘案し最適な凍結保存プロセスを確立する。また、共同研究者である川崎重工業が開発した自動培養装置とマッチングを検討し、細胞培養から凍結保存に至る完全自動化を目指す。

中間目標（平成 23 年度末）：

- ・ iPS 細胞の凍結・融解後の細胞生存率細胞生存率向上可能なプロセスを考案し、細胞生存率が 20%以上を確保できること。
- ・ iPS 細胞等幹細胞の予備凍結・融解プロセスの自動化装置を開発する。

最終目標（平成 25 年度末）：

- ・ iPS 細胞の凍結・融解後の細胞生存率細胞生存率向上可能なプロセスを考案し、細胞生存率が 50%以上を確保できること。
- ・ iPS 細胞等幹細胞の前処理凍結・格納・融解のプロセス及び自動培養装置とマッチングを検討し一連の自動化プロセスを考案する。

(3) 研究成果

①iPS 細胞の凍結保存後の細胞生存率向上可能なプロセスの考案

iPS 細胞の予備凍結自動化を行うに当たってガラス化法に代わり緩慢法による実用化が可能であることを見出し、予備凍結法として緩慢凍結法を選定した。

これまで一般的に iPS 細胞の予備凍結には凍結培地として DAP213 を用いるガラス化法が用いられてきたが、DAP213 には細胞毒性が高い高濃度の凍害保護液が含まれる為、予備凍結時及び解凍時の作業の迅速性により、解凍後の細胞生存率に著しい差を生じ、自動化は極めて困難であった。ガラス化法に替る予備凍結法として、適正な凍結培地を選択することにより緩慢法（手作業による処理）でヒト iPS 細胞平均 70%以上の生存率を達成した。また、ROCK 阻害剤の添加により凍結解凍後の細胞増殖が向上することが判明した（図 2-1～2-3）。



図 2-1 緩慢法による iPS 細胞の予備凍結・解凍（手作業）

予備凍結は細胞に凍結培地を添加後、予備凍結用容器を -80°C デュープフリーザーに入庫する。解凍は 37°C 恒温槽で半解凍したのち 37°C に暖めた培地を添加して解凍・洗浄後培養する。

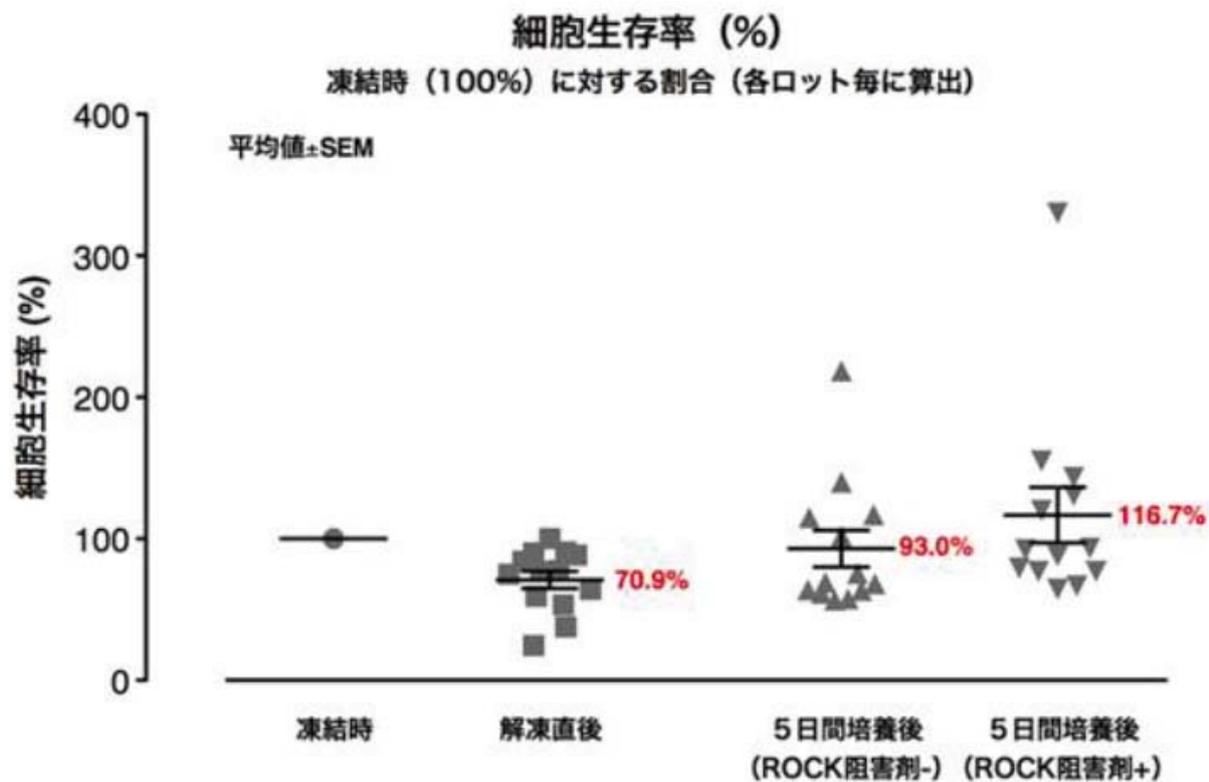


図 2-2 緩慢法による凍結・解凍後細胞生存率

凍結直前の細胞数と解凍直後の生存細胞数を比較した結果平均で 70%以上の生存率が確認できた。

更に解凍後 5 日間培養し ROCK 阻害剤の有無による細胞数の増加状況を比較したところ ROCK 阻害剤有りの優位性が確認できた。

細胞 : MRC5-iPS

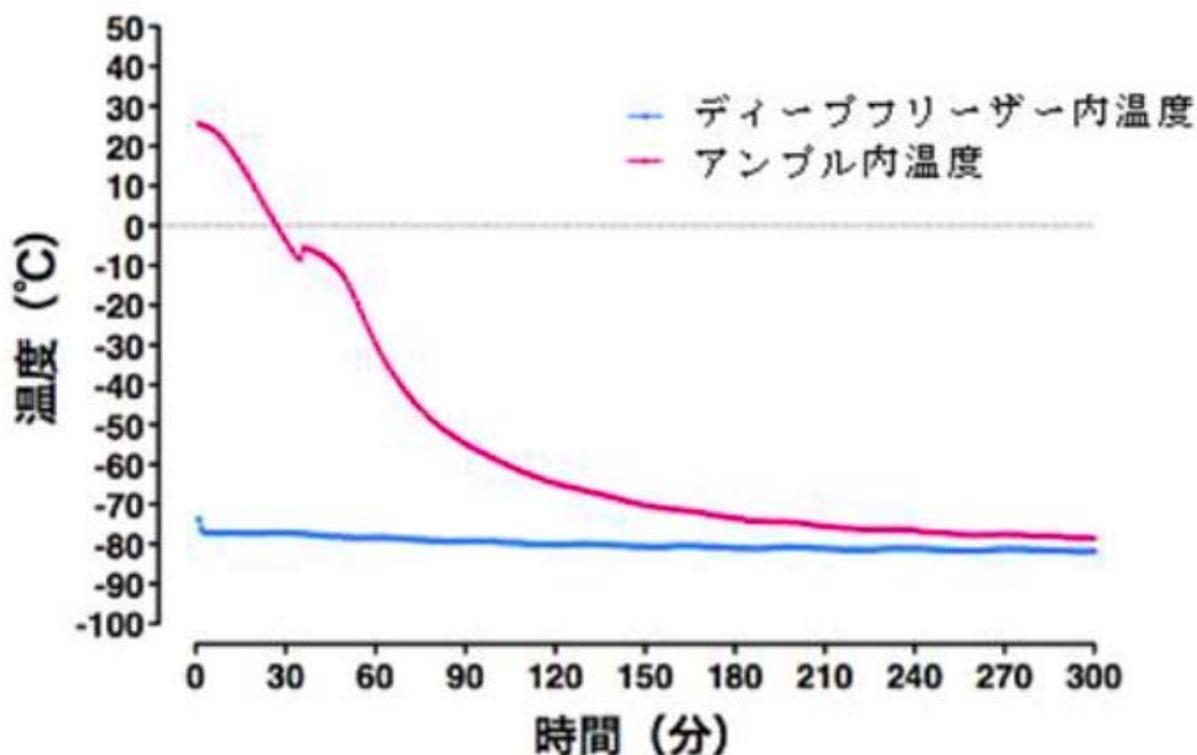


図 2-3 緩慢法による予備凍結の冷却パターン

②自動凍結保存システム“クライオライブラリー”の製作

iPS 細胞の凍結保存完全自動化にむけ、2009 年に製品化された凍結用アンプルを 1 本毎それぞれ自動的に入出庫が可能で、バーコード自動読取による管理が可能な凍結保存システム“クライオライブラリー”を 2 台製作した。

“クライオライブラリー”では試料入庫の際、専用のパソコンで予めバーコード及び管理項目の登録を行った凍結試料（アンプル）を装置本体のタッチパネルを操作することによりパスボックスまで空の収納具（ケーン）が自動搬送される。次にケーンにアンプルをセットすることにより自動的にバーコードが確認され、ケーンが自動的に凍結保存容器内に搬送される。また出庫の際は、パソコンで必要な凍結試料（アンプル）を検索・出庫登録した後、装置本体のタッチパネルを操作することによりパスボックスまで目的のアンプルが収納されたケーンが自動搬送される。次にケーンから目的のアンプルを受け取ることにより出庫が完了する。

1 台目は予め予備凍結を行った iPS 細胞を凍結保存するために継続運用し（図 2-4）、2 台目は予備凍結自動化機構開発のため改造・評価用装置として運用した（図 2-5）。



図 2-4 クライオライブラリー CAPS-3100（継続運用分）
（独）成育医療研究センター殿 8 F 設置



図 2-5 クライオライブラリー CAPS-3100 (改造用)

(独) 成育医療研究センター殿 7F 設置

③予備凍結自動化機構の開発

ヒト iPS 細胞の予備凍結自動化評価用装置として緩慢法による予備凍結の自動化が可能な“クライオライブラリー”(改造用)をベースとした予備凍結機能の改造による試作を行った(図 2-6)。また、凍結プログラム最適化検討の為、スタンドアロン型自動予備凍結装置を試作した(図 2-7)。“クライオライブラリー”による予備凍結は以下の(1)~(6)の手順で行われる。

- (1)パソコンに未凍結の試料(アンプル)を登録
- (2)装置本体のタッチパネル操作の操作より空のケーンがパスボックス搬送される。
- (3)パスボックスでケーンにアンプルを収納(アンプルが複数の場合繰り返す)
- (4)タッチパネルの操作でケーンが予備凍結槽に搬送される。
- (5)予備凍結制御盤により、予めプログラムされた冷却パターンの制御が開始される。
- (6)冷却制御完了後、ケーンは保存容器槽内(約 -180°C)に自動搬送される。



図 2-6 予備凍結制御盤／予備凍結槽



図 2-7 スタンドアロン型予備凍結装置

アンプル収納具の自動昇降による入手庫が可能な小型予備凍結装置

④自動予備凍結装置によるヒト iPS 細胞凍結

“クライオライブラリー” 組込み型予備凍結装置による自動予備凍結、凍結保存後、解凍処理（手作業）を行った結果、ヒト iPS 細胞（MRC5-iPS）において平均生存率 50%以上を達成した（図 2-8、2-9）。

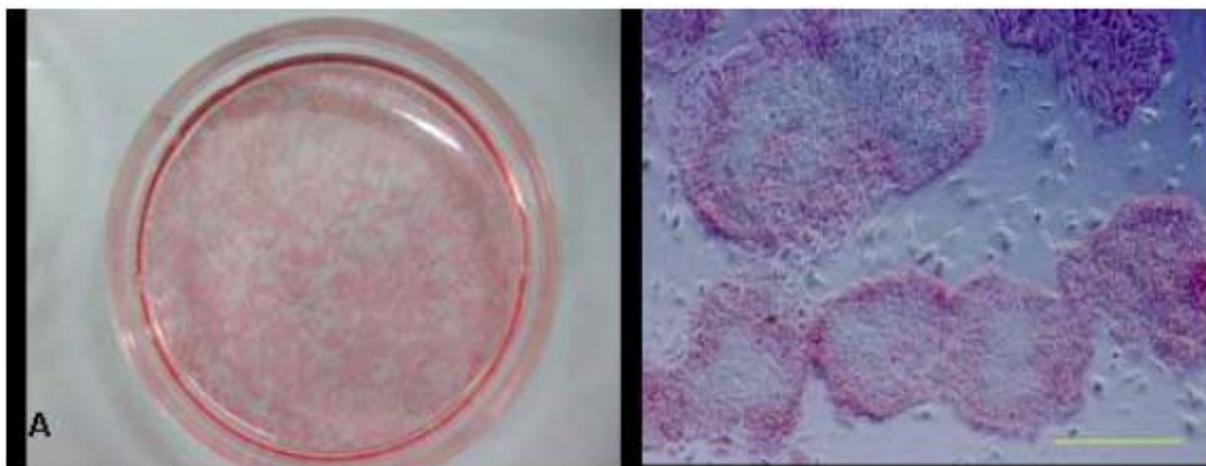


図 2-8 緩慢法による凍結・解凍後のヒト iPS 細胞 (MRC5-iPS) ALP 染色

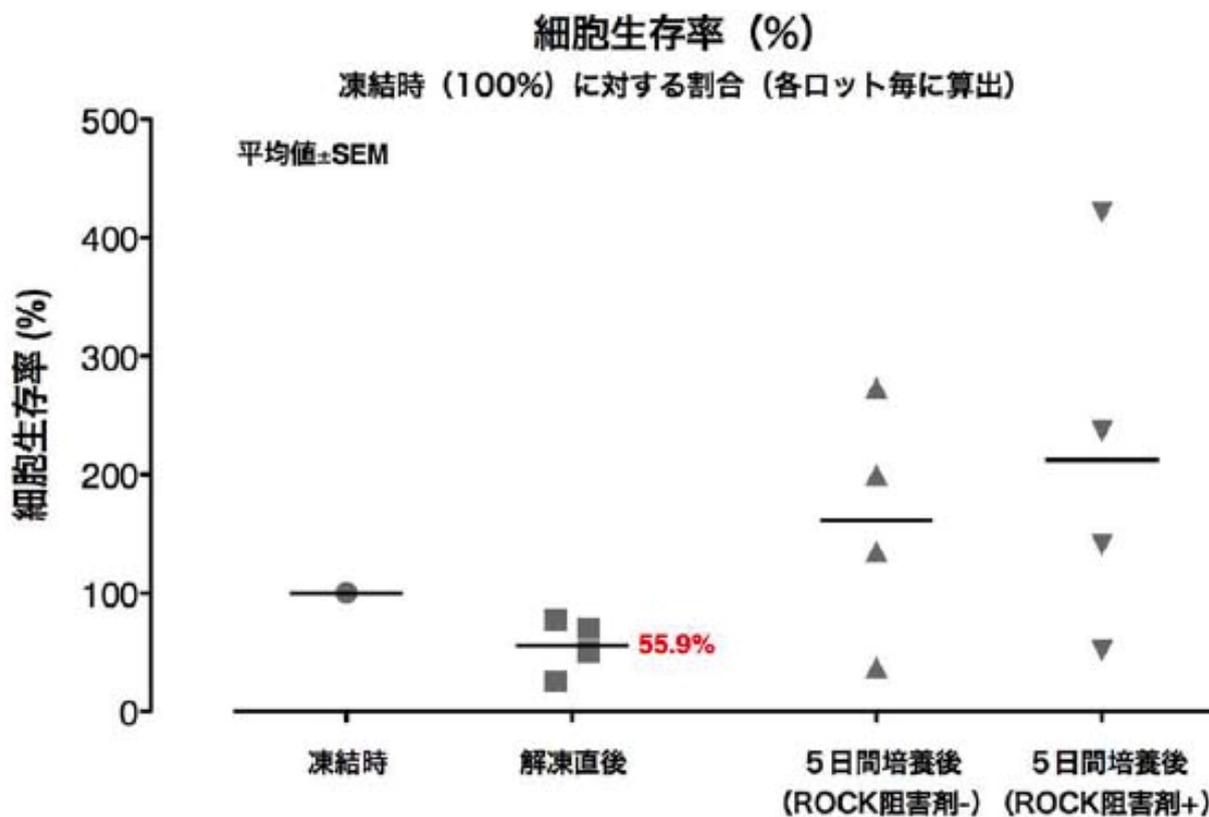


図 2-9 “クライオライブラリー” による自動予備凍結・解凍後細胞生存率

凍結直前の細胞数と解凍直後の生存細胞数を比較した結果平均で 50%以上の生存率が確認できた。更に解凍後 5 日間培養し ROCK 阻害剤の有無による細胞数の増加状況を比較したところ ROCK 阻害剤有りの優位性が確認できた。

細胞 : MRC5-iPS

(4) 目標の達成度と意義

当初既存のガラス化法出の自動化を検討したが、凍結保護添加からガラス化温度域までの冷却時間が 30 秒程度と時間に余裕がなく、秒単位での冷却時間のバラつきが解凍後の生存率に大きな影響をおよぼした為、自動化に用いることは断念した。替わって、作業毎の生存率のバラつきが少ない緩慢法での実用化を目指した結果、当初の計画を大幅に前倒して達成することができた。当初の計画では平成 23 年度末の中間目標で、iPS 細胞の凍結・融解後の生存率は 20%以上、平成 25 年度の最終目標で 50%としていたが、適正な凍結培地の選択・培養法と適正な iPS 細胞選択を行うことによって、緩慢法による予備凍結自動化において解凍後の細胞数で平均 50%以上の生存率を確保した。緩慢法が使えることにより、解凍についても解凍後自動化の実現が容易になり今後の装置開発の加速が可能となった。

2. 1. 3 安定供給・大量調製に適した温度応答性培養器材の開発

株式会社セルシード
川崎重工業株式会社

(1) 事業目的と背景

iPS 細胞の継代維持培養において、細胞の分散方法によって iPS 細胞の性質への影響が特に大きく現れると考えられる。iPS 細胞をシングルセルにしてしまうと、アポトーシスにより生存できないため、数十個程度の細胞塊にして継代を行う必要がある。iPS 細胞の分散方法は、機械的方法と酵素による方法に大別されている。機械的方法は染色体変異が少なく、未分化細胞のみを選択して継代出来る。しかしながら、この手法は熟練と時間を要し、大量処理は困難と考えられる。一方、酵素による方法は、簡便に多量処理できるが、染色体異常が生じるなどの現象が知られている。

(2) 事業内容と目標

iPS 細胞の安定供給および大量調製に関わる課題として、継代維持における iPS 細胞本来の性質を損なわないコロニーの回収操作の確立・効率化、未分化細胞と分化細胞の分離方法の確率などが上げられる。

iPS 細胞の継代維持培養において、その方法によって iPS 細胞の性質への影響が特に大きく現れると考えられる。iPS 細胞のコロニー回収を、コラゲナーゼなどの酵素処理を行わずに、また、スクレーピング等の強い物理的操作を加えることなく、温度応答性器材を用いて行うことにより、iPS 細胞に障害を与えることなく行うことを可能とする操作方法の開発を行う。

このように、酵素を用いずに iPS 細胞を回収することにより、膜蛋白質の細胞外ドメインや細胞外マトリックスが蛋白質分解酵素による損傷を免れ、回収後播種時の細胞生存率や接着性が向上することや、糖蛋白質の糖鎖修飾や受容体の細胞外ドメインが無傷のまま細胞を回収することにより、成長因子や生理活性物質による分化誘導の効率が向上することなども期待される。また、酵素処理による外界ストレスが減少し、継代培養維持中の分化が抑制され、iPS 細胞の利用可能な継代数が増加する可能性も考えられる。

温度応答性器材を用いる場合、各細胞種への適用性や、その分離・回収の効率は、温度応答性高分子が固定化された器材の表面状態に依存する。本課題においては、これまでの培養表面構築技術の蓄積を活かして、iPS 細胞の培養操作に適した培養器材表面を構築することにより、酵素処理を行わずに簡便に iPS 細胞を継代し、大量調製出来る手法を確立する。

中間目標（平成 23 年度末）

- ・各種表面特性を有する培養器材を試作し、iPS 細胞のコロニー回収に適した培養表面の構築検討を行う。

最終目標（平成 25 年度末）

- ・温度応答性器材を用いて、至適培養条件及び培養器材の最適化検討を行い、より安定で、大量調製できる培養条件を確立する。
- ・温度応答性器材使用の継代法の、他の継代法との比較試験を実施し、優位性が認められた場合は自動培養装置に組み込み、継代手段として使用すること。

（3）研究成果

本プロジェクトにて各種表面特性を有する培養器材を試作し、iPS 細胞の培養への適合性を評価することで、iPS 細胞の培養に適した温度応答性培養器材を開発した。

開発した温度応答性器材上で培養した iPS 細胞は、室温下で静置後、ピペッティング操作により分散化が可能であった。その際、iPS 細胞の自然剥離は確認できず、未分化細胞のみをピペッティングにより選択的に分散することも可能であった。

次に、温度応答性器材上で iPS 細胞を連続培養（10 継代以上）可能か検討した。ピペッティング操作により維持培養した iPS 細胞は、連続 10 継代後も Oct-4、Nanog 等の未分化マーカーが発現しており、染色体異常もなく、三胚葉分化も確認された（図 3-1）。

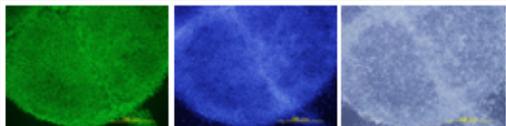
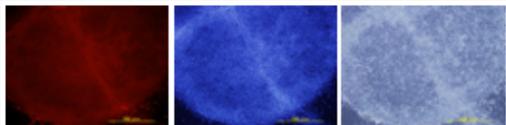
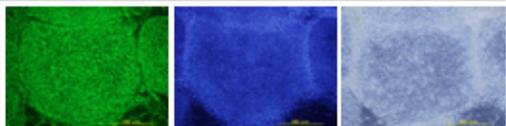
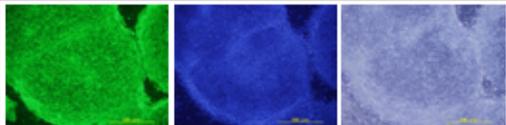
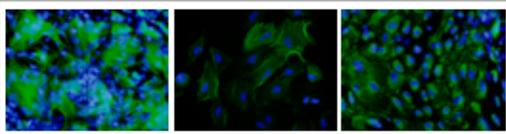
評価内容	方法	温度応答性培養皿試作品
免疫染色 (10継代目)	Oct3/4	
	Nanog	
	Tra-1-60	
	SSEA4	
多分化能確認 (17継代目)	EB形成	 β Ⅲ-Tubulin (外胚葉) α -SMA (中胚葉) AFP (内胚葉)
核型解析 (12継代目)	Gバンド法	46, XY (異常なし)

図 3-1 温度応答性培養器材上で培養した iPS 細胞解析

温度応答性培養器材上で連続培養した iPS 細胞を免疫染色、胚様体 (EB) 形成および核型解析 (Gバンド法) により評価した。

以上の結果から、本研究にて最適化した温度応答性培養器材が iPS 細胞の大量調製に応用可能であることが確認できた。

(4) 目標の達成度と意義

iPS 細胞の培養に適した温度応答性培養器材を開発し、iPS 細胞を 10 継代以上連続培養できることを確認できた。開発した温度応答性培養器材を用いた継代手法は、従来の機械的手法と酵素処理双方の利点を有しており、染色体異常なく、簡便に iPS 細胞を分散可能であり、iPS 細胞の安定供給および大量調製に適しているといえる。

2. 2 研究開発項目②「iPS 細胞の各種性状解析」

2. 2. 1 由来の異なる iPS 細胞の樹立

独立行政法人 国立成育医療研究センター

(1) 事業目的と背景

ヒト iPS 細胞は創薬スクリーニングや疾患メカニズム解明への応用、更には次世代の再生医療材料として世界中の注目を集めている。ヒト iPS 細胞は 2007 年 11 月に初めて樹立が報告されて以来、日本のみならず米国を中心とした世界各地で急速に研究が進められ、現在では国内外で多数樹立されている。しかしながら、ドナー細胞の条件や由来組織の違い、また用いる誘導方法によっても、得られる iPS 細胞の性質が異なることが指摘されており、標準化が明確に示されていない。この創成間もないヒト iPS 細胞を適切に実用化へと導くために、まずヒト iPS 細胞の性質に関連する網羅的な基礎データをエビデンスとして、様々な状態が混在したヘテロな細胞集団から最適な細胞を見極めるためのプロファイルと選別技術を開発することが必要である。そこで本研究プロジェクトでは、これらの課題を解決するために、ヒト iPS 細胞を多数樹立し性状解析することで標準化に貢献するとともに、iPS 細胞の選別評価システムを確立する。さらに iPS 細胞ガイドライン等に利用可能な基盤データを蓄積し、国際普及を視野に入れた iPS 細胞等幹細胞の標準化を図ることを目標とし、幹細胞産業応用を促進する。

(2) 事業内容と目標

これまで、(独) 国立成育医療研究センターの阿久津は、ヒト ES 細胞樹立をハーバード大学で行ってきた実績があり、ヒト ES 細胞樹立・培養方法の世界的な標準化に貢献してきている (Akutsu H, et al., *Methods Enzymol*, 2006)。更に、ハーバード大学幹細胞研究所と共同研究体制を構築しており、ヒト ES 細胞を含めたヒト多能性幹細胞研究で世界先端の知見及び技術をいち早く獲得することが可能であり、新たな知見について報告もしている (Chen A, Akutsu H, et al., *Cell Stem Cell*, 2009)。そこでヒト ES 細胞樹立・培養法を基盤に本研究を遂行していく。これまで、国立成育医療研究センターでは生殖・細胞医療研究部が中心となって、周産期組織及び小児期組織より多大な初代培養細胞株 (“成育バイオリソース”) を構築し、細胞の機能解析や分化能検定等により細胞規格化を行ってきた。規格化された成育バイオリソースの中からドナー細胞を選定し、ヒト iPS 細胞を 500 細胞株以上樹立する。導入遺伝子やウイルスベクターは、Yamanaka 因子 (OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC) とレトロウイルスベクター等を使用する。さらに樹立したヒト iPS 細胞を安定的に培養維持するシステムを構築する。Yamanaka らによるヒト iPS 細胞樹立法に従う方法により基本培養システムを構築することで、本邦で行われるヒト iPS 細胞の標準化に対応可能である。

中間目標 (平成 23 年度末)

・ 性質の確定が定着していないヒト iPS 細胞に対して、複数種類の 100 細胞株以上を樹立し iPS 細胞同定検定を行い、標準化へ貢献する。安定的な培養システムを確立し、プロジェクトグループ内へ iPS 細胞株を提供するとともに安定的な培養システムを提供しプロジェクト全体の推進に貢献する。

最終目標 (平成 25 年度末)

・10種類以上の細胞および組織から多数の細胞株を樹立し iPS 細胞同定検定を行い標準化に対する基盤データを示し、本邦の iPS 細胞研究推進に貢献するとともに、未分化維持や特定組織の分化誘導に優れた優良 iPS 細胞株を提供する。安定した培養方法とともに、iPS 細胞の安定供給システムを構築する。

(3) 研究成果

Yamanaka 因子 (OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC) をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入する方法を用いて、4種の親細胞株に対して iPS 細胞を作成した。各細胞株に対して、未分化マーカー遺伝子の発現を免疫組織染色法と定量 PCR 法により解析し、分化多能性に関しては *in vivo* において奇形腫形成能試験と *in vitro* において胚様体 (EB) 作成による外胚葉、内胚葉、中胚葉組織への分化を確認する解析を行った。染色体核型解析では全ての細胞株が正常ヒト染色体核型を有することを確認した。ヒト羊膜由来 iPS 細胞株 (8細胞株)、ヒト子宮内膜由来 iPS 細胞株 (4細胞株)、ヒト胎盤動脈由来 iPS 細胞株 (4細胞株) とヒト胎児肺組織由来繊維芽細胞 iPS 細胞株 (3細胞株) を提供することができた。各ヒト iPS 細胞株サンプルの提供した細胞株はバイオリジカルサンプルとして3サンプル回収し、さらに細胞継代による影響を解析するために、細胞継代数 5~10 と 10 以上培養を経たサンプルを回収し網羅的遺伝子発現解析とレクチンアレイ解析を行った。さらにヒト iPS 細胞の分化特性を解析するために、*in vitro* による分化サンプルとして 14 日間培養した EB サンプルを各 iPS 細胞株から作製し、遺伝子発現解析へ提供した。

(4) 目標の達成度と意義

本プロジェクト期間(H21-22)に5つ以上の組織から約50細胞株のiPS細胞を安定的に培養できた形で樹立した。プロジェクト開始前に樹立した細胞とあわせて、その中から細胞継代数5~10と10以上、さらに20以上培養を経たバイオリジカルサンプルとして3サンプルを回収した。これら試料を遺伝子発現解析、細胞表面糖鎖解析に供した。これらデータをバイオインフォマティクスによる解析結果から、我々の樹立・培養法が安定したものであることが示されたことは大きな意義がある。またこれらの結果は、論文2報にまとめ発表した。さらにこうした培養法が基盤技術として安定供給・大量調製・保存技術の開発に反映される役割も担うことができた。以上、本研究での成果は、当初の目標を十分達成していると考えられる。

2. 2. 2 iPS 細胞糖鎖解析並びに細胞評価技術の開発

独立行政法人 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター

(1) 事業目的と背景

ヒト iPS 細胞は創薬スクリーニングや疾患メカニズム解明への応用、更には次世代の再生医療材料として世界中の注目を集めている。ヒト iPS 細胞は 2007 年 11 月に初めて樹立が報告されて以来、日本のみならず米国を中心とした世界各地で急速に研究が進められ、現在では国内外で多数樹立されている。しかしながら、ドナー細胞の条件や由来組織の違い、また用いる誘導方法によっても、得られる iPS 細胞の性質が異なることが指摘されており、iPS 細胞の基準が明確に示

されていない。この創成間もないヒト iPS 細胞を適切に実用化へと導くために、まずヒト iPS 細胞の性質に関連する網羅的な基礎データをエビデンスとして、様々な状態が混在したヘテロな細胞集団から最適な細胞を見極めるためのプロファイルと選別技術を開発することが必要である。そこで本研究プロジェクトでは、これらの課題を解決するために、ヒト iPS 細胞を多数樹立し性状解析することで標準化に貢献するとともに、iPS 細胞の選別評価システムを確立する。特に本研究項目では、産総研・糖鎖医工学研究センターが開発してきた高感度糖鎖プロファイラー・レクチンマイクロアレイを用いて、由来の異なる iPS 細胞株のグリコーム解析を行い、iPS 細胞の性質を詳細に評価するための細胞評価技術を開発することを目的とする。

(2) 事業内容と目標

本研究ではレクチンマイクロアレイを用いた糖鎖プロファイリング技術を主軸とし、糖鎖を標的とした iPS 細胞の評価・選別技術の開発を行う。産総研・糖鎖医工学研究センター・レクチン応用開発チーム（平林チーム長）は 2005 年に糖鎖プロファイリングのための新しい技術としてレクチンマイクロアレイを開発、その後も糖鎖関連癌マーカー探索や幹細胞評価技術など様々な分野への応用技術開発を積極的に行い、「レクチンを用いた糖鎖プロファイリング技術」の有用性を世界に証明してきた。事実、当チーム主体のレクチンマイクロアレイに関連する原著論文は 10 編以上にのぼる。現在では様々な生体サンプルの糖鎖プロファイリングが可能となり、オリゴ糖、糖タンパク質、細胞抽出液、組織切片、生細胞など様々な生体サンプルの糖鎖構造を迅速、簡便、高感度かつ再現性高くプロファイリングするためのプロトコルの確立に至っている。本研究では、特に国立成育医療センターと密接に協力して進めてきた NEDO 関連プロジェクト (MG プロジェクト[H18~H22 年度]、TR プロジェクト[H19~H20 年度]) で蓄積してきた技術と経験を活用して iPS 細胞の新しい評価・選別技術を開発する。これら研究プロジェクトにおいて、すでに間葉系幹細胞や ES 細胞などの幹細胞糖鎖の比較プロファイリングを行うためのプロトコル、ソフトウェア (GP バイオサイエンスから販売、<http://www.gpbio.jp/products.html>)、データマイニング技術の確立に至っている (Kuno and Itakura et al. 2009)。また、多サンプル処理の際に問題となるレクチンマイクロアレイ基盤のロット間差の問題解決にも取り組み、現在ではロット間差の問題がなく、かつ高感度な解析が可能となっている。具体的には下記の研究項目を実施する。

A : 標準化に向けた高信頼性レクチンマイクロアレイ基盤並びに解析プロトコルの確立

今後、iPS 等を含めた多種類の細胞株を解析するためには、異なるロットのレクチンアレイスライドで得られたデータを標準化する必要がある。標準化を目指し、レクチンマイクロアレイで得られたデータのノーマライゼーション方法の確立を行う。即ち、標準プローブを用いたレクチンチップの検定方法の検討を行う。また、iPS 細胞を解析する際に問題となりうる血液型に反応するレクチンを除いたデータマイニング手法の検討なども行い、多サンプル解析に対応可能な体制の構築を目指す。

B : 性質の異なる iPS 細胞を識別するための「細胞判別技術」の確立

由来の異なる iPS 細胞株を対象にレクチンマイクロアレイを用いて比較糖鎖プロファイリングを

実行し、まず分化・未分化を識別するための「分化判別式」を確立する。得られた糖鎖プロファイルは親株（ネガティブコントロールとなる繊維芽細胞）のプロファイルと比較して、TR プロジェクトで開発済みのソフトウェアとデータマイニングシステムで解析を行う。確立した分化判別式は中間までに計 100 種の iPS 細胞株を用いて検証を行い、性状の異なる iPS 細胞の判別手法を確立する。また、由来する株の血液型などの個人差による違いに影響されない判別式を確立し、iPS 細胞の未分化度を判定するための評価技術として知財化する。また一方で、iPS 細胞間で個性（分化方向性など）が異なることが指摘されているために、糖鎖プロファイルの違いで規定できるかどうかについても検討する。各種 iPS 細胞の調製と供給は国立成育医療センターが担当する。確立した細胞判別式を用いて、国立成育医療センター、川崎重工業、大陽日酸が確立する「iPS 細胞の大量・安定供給技術」や「iPS 細胞の凍結技術」で作製した iPS 細胞の評価を行う。また、分化誘導をかけた iPS 細胞に対してもレクチンマイクロアレイ解析も行い「分化方向性」を規定する分化判別式の構築も視野に入れる。分化誘導をかけた iPS 細胞の供給は国立成育医療センターが担当する。

C：細胞マーカーを用いた細胞判別技術の開発

研究項目 B においてレクチンマイクロアレイを用いて iPS 細胞糖鎖プロファイルを解析することにより、iPS 細胞を規定する糖鎖プロファイルを明らかにする。また、産総研・器官発生ラボが実行する cDNA アレイを用いた iPS 細胞の遺伝子解析から、細胞表層タンパク質の発現プロファイルが明らかになる。最終的にはこれら情報を活用して、iPS 細胞表層の糖タンパク質を標的として、iPS 細胞の性質を詳細に評価するために有用な細胞マーカーを用いた細胞判別技術の開発にも従事する。

現在評価基準のまったく定まっていない iPS 等幹細胞群について、世界に先駆けデファクト化することは、わが国の医療技術の先進性を確保する上で大変大きなインパクトをもたらすと考えられる。従来、欧米追従で標準化を追いかけてきたライフサイエンス分野であるが、本提案は世界最新の糖鎖解析技術を確実、かつタイムリーに実用展開できる研究である。糖鎖プロファイリングの切り口で「iPS 細胞基準糖鎖プロファイル」の適正鑑別が可能となれば、医薬品開発分野の各ステージにおける「各種 iPS 細胞の品質管理、評価」に多大な貢献をすることが期待される。

中間目標（平成 23 年度末）

- ・計 50 種類の iPS 細胞株の糖鎖プロファイル解析を行い、iPS 細胞判別式を構築する。
- ・標準化に向けたレクチンマイクロアレイデータのノーマライゼーション方法を構築する。

最終目標（平成 25 年度末）

- ・基盤に依存しないデータ解析手法を確立し、iPS 細胞糖鎖プロファイルのデータベース化を行う目途をたてる。
- ・100 種類以上の iPS 細胞を用いて判別式の検証を行い、iPS 細胞の性質を評価するための判別式を確立する。
- ・iPS 細胞の性質を詳細に評価するために有用な細胞マーカーを用いた細胞判別技術を開発する。

(3) 研究成果

本研究ではまず高密度レクチンマイクロアレイを開発することによりレクチンマイクロアレイの質的改良を行った。次に、高性能化したレクチンマイクロアレイを用いて各種幹細胞糖鎖を網羅的に解析して、幹細胞糖鎖の構造的特徴を抽出した。最終的には、分化・未分化を判別するプローブ分子（レクチン）及びフィーダー細胞のコンタミを検知可能なプローブ分子（レクチン）の開発に成功した。

①高密度レクチンマイクロアレイの開発

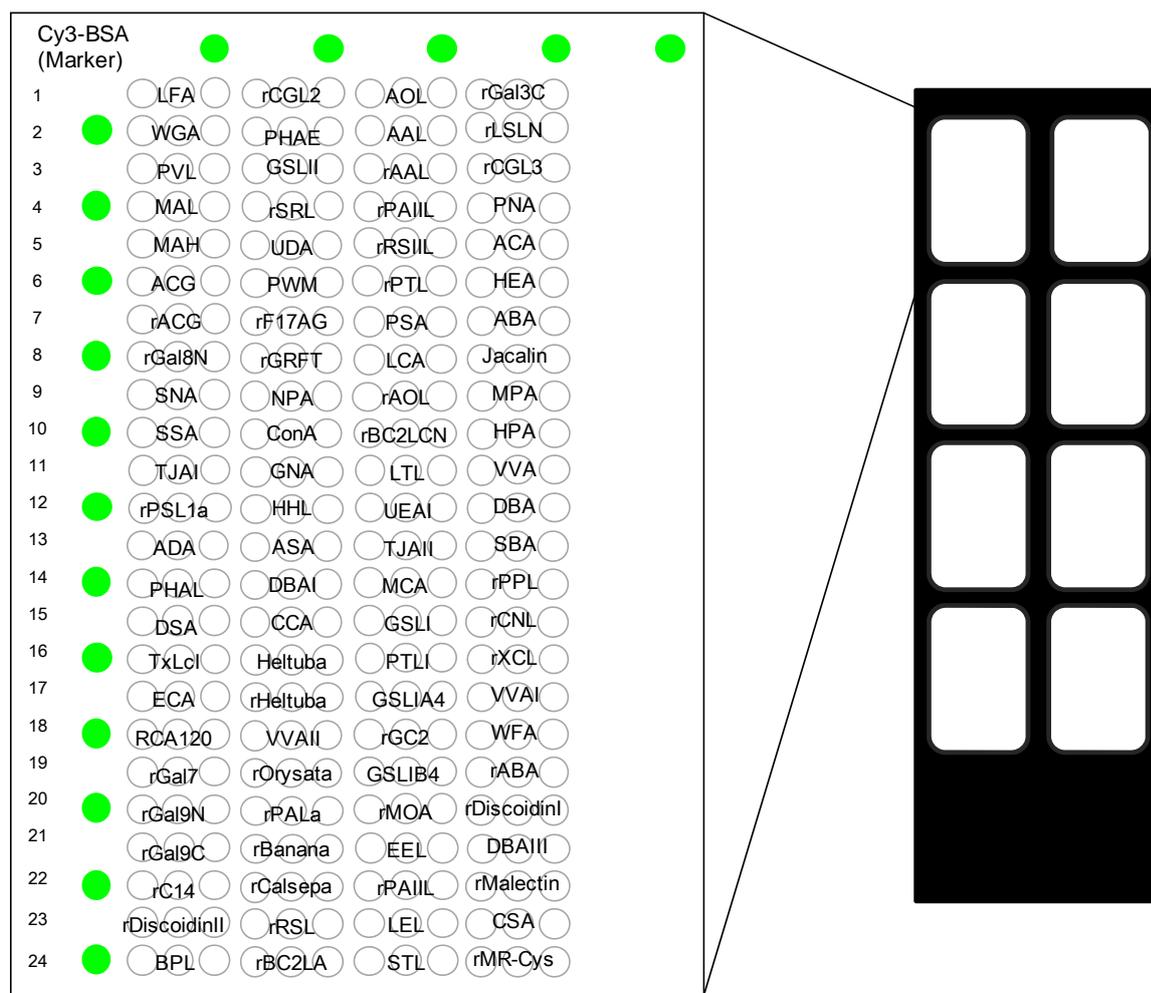


図 5-1 高密度レクチンマイクロアレイ

従来のレクチンマイクロアレイでは43種類のレクチンが使用されているが、幹細胞糖鎖を全て検出することができるわけではない。そこで本研究では、幹細胞糖鎖のカバレッジ率を拡大させ、幹細胞評価に適するレクチン・レパートリーを増加させるために、38種類の組換えレクチンを含む計96種類のレクチンを固定化した高密度レクチンアレイを開発した（図 5-1）。この目的のために既に構造が明らかになっているレクチンをレクチンファミリーに分類して、様々なレクチンファミリーからレクチンを選択した。類似の構造を有するレクチンは類似の糖鎖結合特異性を示す傾向があることから、これにより、様々な糖鎖結合特異性を有するレクチン分子を選択した。中でも、特に、細胞の性質変化に伴い劇的に変化することが知られてい

るシアル酸やフコースのような末端修飾に特異的に反応するレクチンを選択した。組換えレクチンの調製には、対象とするサンプル中のレクチン様分子への非特異的結合の原因となりうる糖鎖付加を避けるために、大腸菌発現系を選択した。組換えレクチンは、適切な糖鎖固定化セファローズを用いて、アフィニティークロマトグラフィーで精製した。本研究で用いた96種類のレクチンの糖鎖結合特異性は糖鎖複合体アレイで確認した（図5-2）。

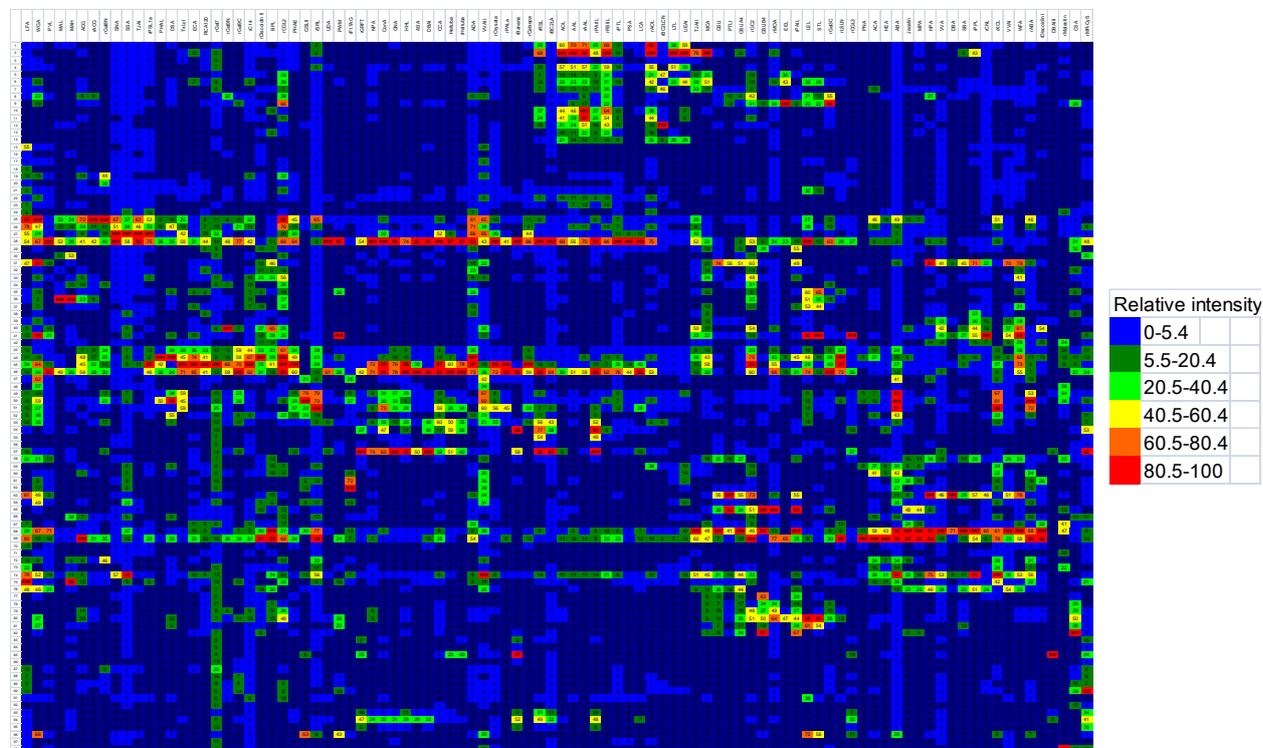


図 5-2 96種類のレクチンの糖鎖複合体アレイ解析結果

96種類のレクチンは非接触型スポットターを用いてエポキシ活性化スライドガラスに固定化して、高密度レクチンアレイを作製した。解析に使用したアレイのバラつき(CV値)は、mean-normalize後には14%程度であることを確認し、バラつきの少ないアレイであることを確認した。

②高密度レクチンマイクロアレイを用いた各種幹細胞の網羅的解析

高密度レクチンマイクロアレイを用いて、成育医療センターで調製された114種類のiPS細胞と、9種類のES細胞を含む計135種類の細胞の網羅的糖鎖プロファイリングを実施した。iPS細胞に関しては4種類の異なる体細胞（ヒト胎児肺、子宮内膜、胎盤動脈）から調製したものを解析した。京都大学山中教授により初めて樹立されたiPS細胞である201B7、その後3因子で作製された253G1もリファレンスとして解析した。解析には細胞疎水性画分を調製して使用した。

Mean-normalization後に、得られたデータをクラスター解析した。その結果、マウスフィーダー細胞、体細胞、未分化細胞(iPS、ES)の大きな3つのクラスターに分類されることがわかった。一方で、体細胞はそれぞれ異なるクラスターに分かれた(図5-3)。これらの結果から、体細胞はそれぞれ異なる糖鎖プロファイルを有するものの、4種の転写因子を導入してリプログラミングすると、ES細胞に類似の糖鎖プロファイルを獲得することがわかった。以上の結果から、転

写因子誘導型リプログラミングにより、細胞表層糖鎖もリプログラムされることが分かった。

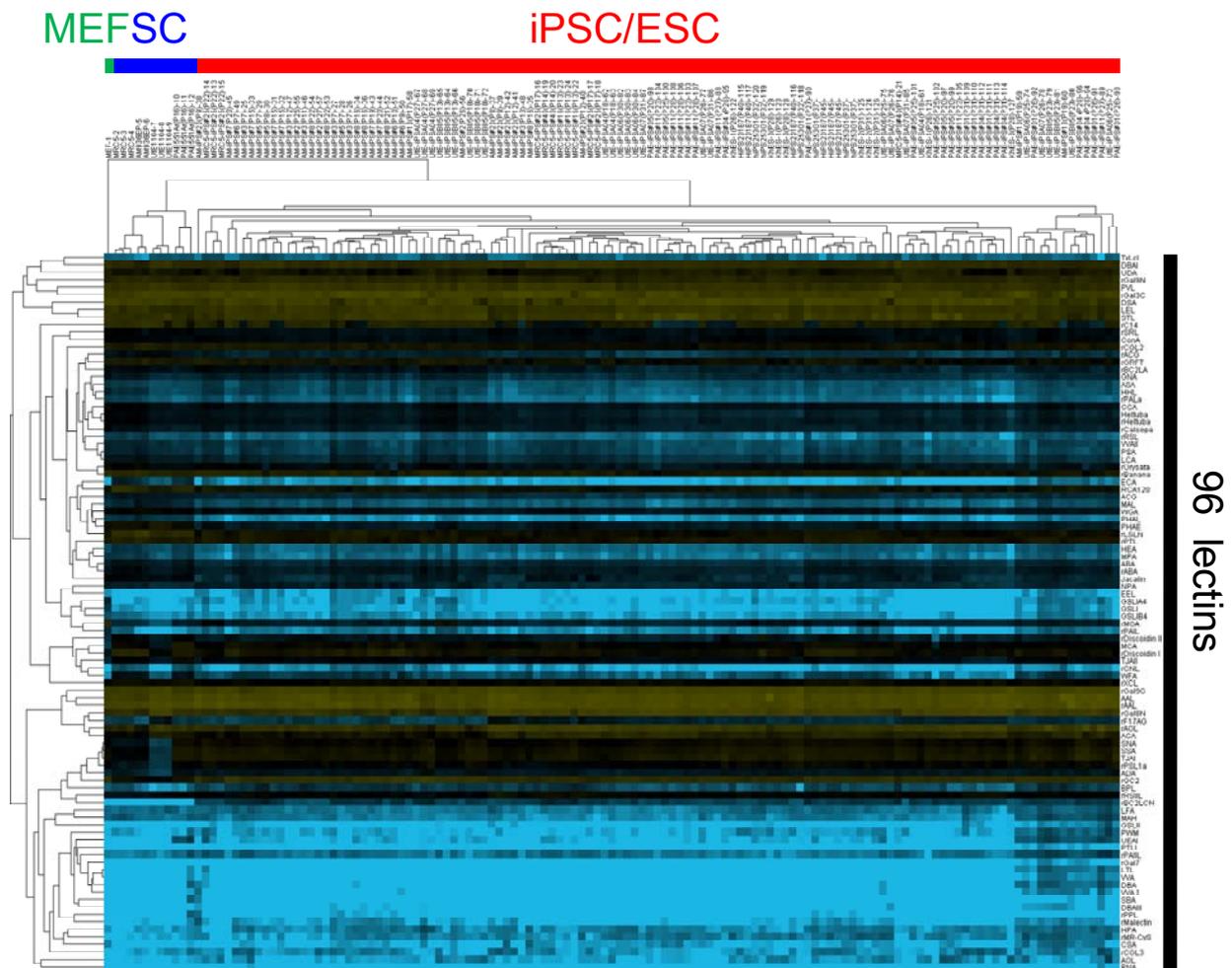


図 5-3 フィーダー細胞、iPS 細胞、ES 細胞の糖鎖プロファイルをクラスター解析した結果

③iPS 細胞と親細胞（分化細胞）間で有意差を示したレクチンと、そこから推定される特徴的な糖鎖構造変化

次に、分化細胞と未分化細胞でどのような糖鎖構造の違いがあるかを解析した。Mean-normalize したデータを T 検定で解析して、分化細胞と未分化細胞間で顕著に異なるレクチンを抽出した。結果として、38 種類のレクチンを FWER<0.001 で選択した。これらのうち、9 種類のレクチンは体細胞と比較して iPS 細胞で高いシグナルを示し、29 種類のレクチンは低いシグナルを示した。38 種類のレクチンのうち、35 種類のレクチンを糖鎖結合特異性に基づいて6つのグループに分類して、リプログラミングに伴う糖鎖構造変化を抽出した。

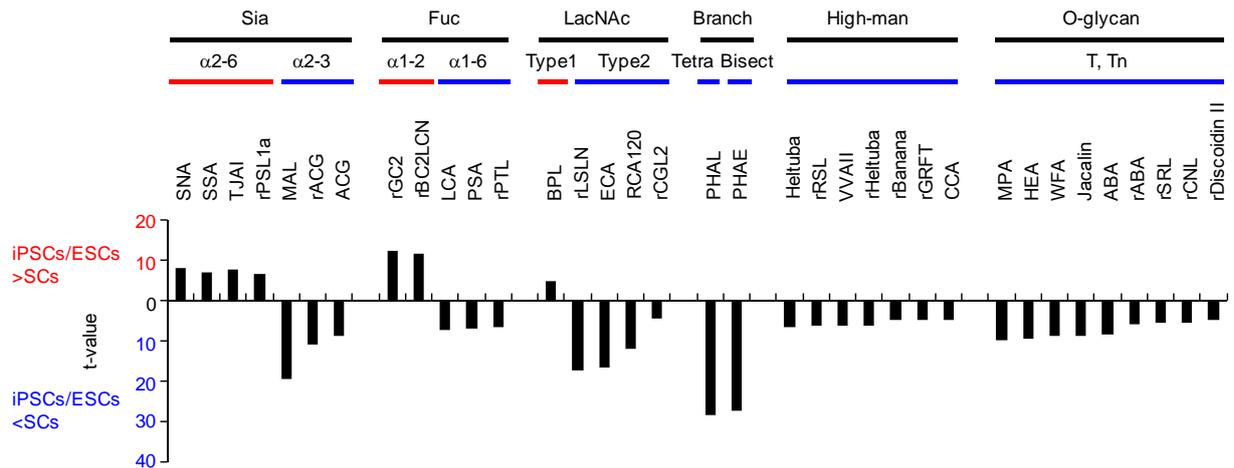


図 5-4 iPSC 細胞と親細胞（分化細胞）間で有意差を示したレクチン

その結果、リプログラミングに伴い、

- 1) シアル酸の結合様式が α 2-3 型から α 2-6 型へ
 - 2) フコスの結合型が α 1-6 型（コア）から α 1-2 型へ
 - 3) ラクトサミン 2 糖構造が 2 型から 1 型へ
 - 4) N-結合型糖鎖が高分岐型から低分岐型へ
- という糖鎖構造変化が起こることを見出した。

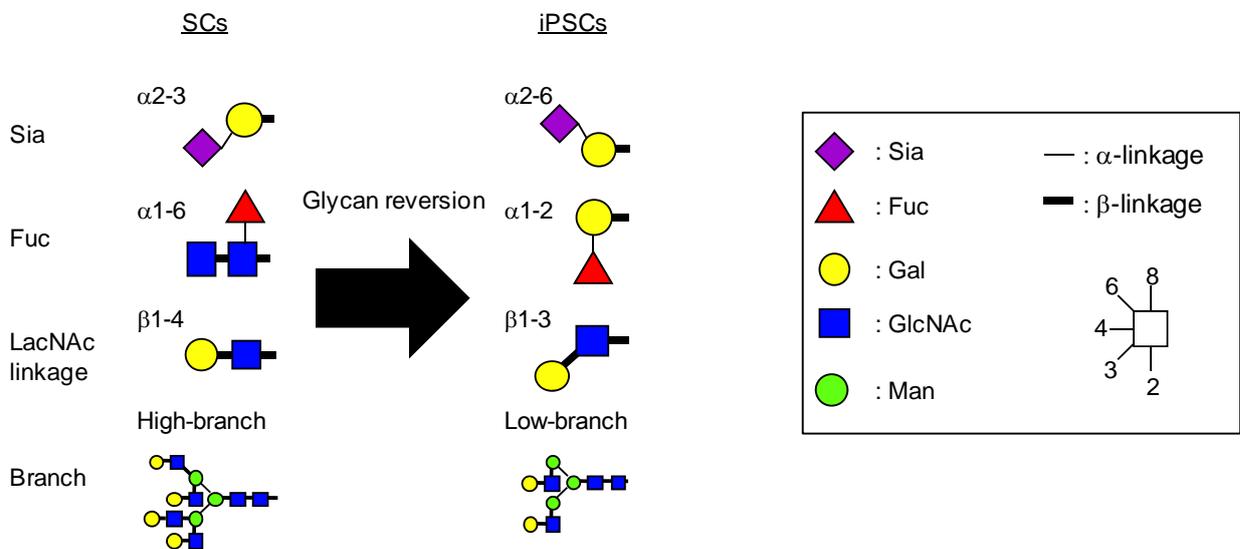


図 5-5 体細胞（親）から iPSC 細胞への糖鎖構造変化（シフト）のまとめ

糖転移酵素の発現プロファイルもレクチンアレイのプロファイルと同様の結果を得た。

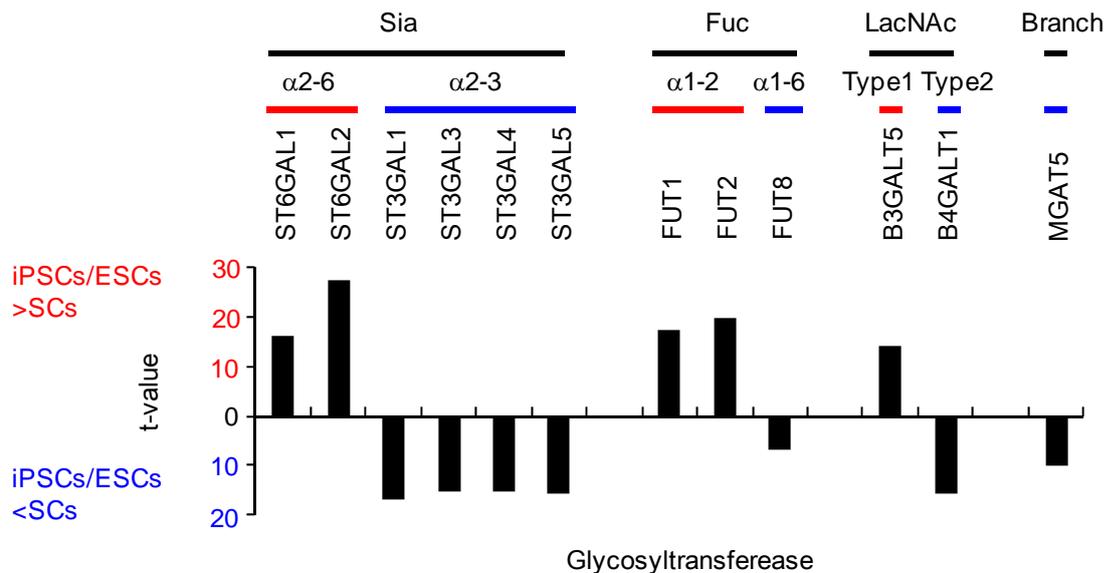


図 5-6 糖鎖プロファイルに呼応した糖鎖合成関連遺伝子の発現解析結果

④未分化細胞を特異的に見分ける最適なプローブ分子（レクチン）の選択

分化細胞（体細胞）と未分化細胞（iPS、ES 細胞）を識別するための最適なレクチンを抽出した。9 種類のレクチンが分化細胞に比べて未分化細胞で顕著に強く反応した（FWER<0.001）。そのうち rBC2LCN は4 種類のヒト体細胞（胎児肺、羊膜、子宮内膜、胎盤動脈）、マウス・フィーダー細胞（MEF）いずれとも全く反応せず、かつこれらから調製したヒト iPS 細胞全てと鋭敏に反応したため、iPS 細胞の未分化性判断に有効なプローブとなる可能性が示唆された。

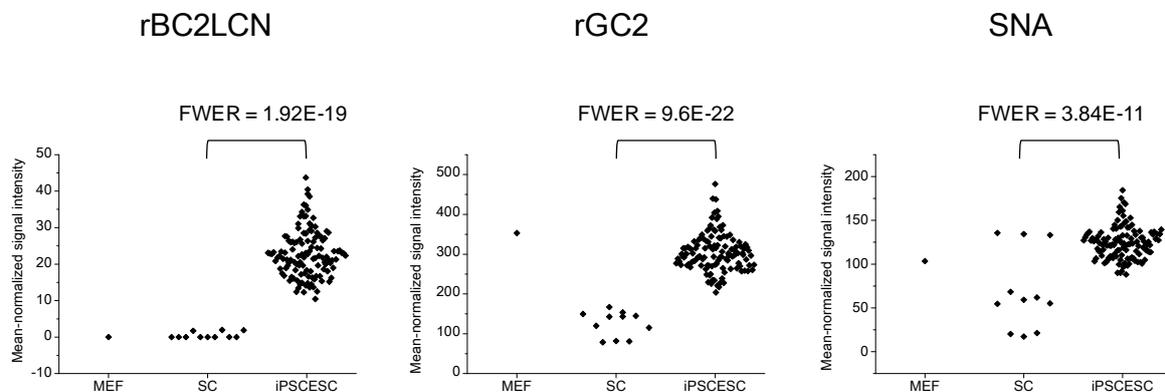


図 5-7 未分化細胞を特異的に見分ける最適なプローブ分子（レクチン）の選択

⑤マウスフィーダー細胞のコンタミを検知可能なレクチン（rMOA）の開発

実用的な視点から、iPS 細胞や ES 細胞への異種抗原のコンタミをモニタリングすることが再生医療で求められている。rMOA はほとんどの新世界猿やマウスには存在するものの、ヒトには発現していない Gal β 1-3Gal β 1-4GlcNAc エピトープに結合特異性を有する。事実、rMOA はマウスのフィーダー細胞には反応するものの体細胞には反応しない。それ故、iPS 細胞には反応しないはずであるが、2 種類の iPS 細胞株 MRC5-iPS#25(P22)と UtE-iPSB05(P13)には反応性が確認され、これら iPS 細胞にはマウスのフィーダー細胞がコンタミしていると考えられた。

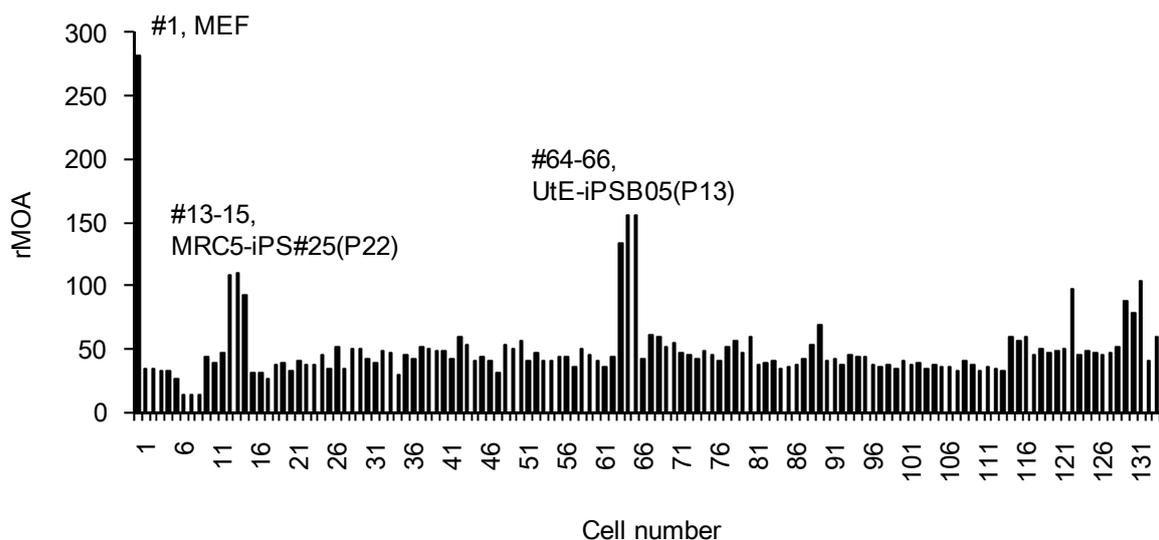


図 5-8 フィーダー細胞のコンタミを検知可能なレクチン (rMOA) を発見

(4) 目標の達成度と意義

中間目標 (平成 23 年度末) は以下であった。

- ・ 計 50 種類の iPS 細胞株のグライコム解析を行い、iPS 細胞判別式を構築する。
- ・ 標準化に向けたレクチンマイクロアレイデータのノーマライゼーション方法を構築する。

今回、5 種類の体細胞由来の iPS 細胞株、計 114 種類のグライコム解析を実施し、未分化細胞に特徴的な糖鎖プロファイルの抽出に成功し、未分化細胞を検出するための新規レクチン・プローブ (rBC2LCN) の開発と、マウス・フィーダー細胞のコンタミを検出するためのレクチン (rMOA) の開発に成功した。更に、ノーマライゼーションに関しては、各種の方法を検討し、mean-normalization がバラツキを軽減させる上で最適であることを見出した。これらの研究成果は J. Biol. Chem に発表した (Tateno, H., Toyoda, M., Saito, S., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Fukumura, M., Nakasu, A., Nakanishi, M., Ohnuma, K., Akutsu, H., Umezawa, A., Horimoto, K., Hirabayashi, J., and Asashima, M. (2011) Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. J. Biol. Chem. in press.)。従って、設定した中間目標を十分達成できたといえる。

2. 2. 3 iPS 細胞における遺伝子発現プロファイルの解析と特異的遺伝子マーカーの探索

独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター

(1) 事業目的と背景

iPS 細胞等の幹細胞の産業応用を実現していく上では、iPS 細胞の未分化状態を統一的に評価・判別するための標準規格の作成が必要とされている。iPS 細胞は株に依存してその未分化状態や分化傾向に差があることが知られているが、数多くの iPS 細胞株に関する網羅的な遺伝子発現プロファイルを明らかにし、各遺伝子の発現状態を比較することにより、iPS 細胞の未分化状態を正確に規定するための基準となる発現パターンを抽出することが可能になる。これは、今後 iPS

細胞等幹細胞の応用技術を開発する上で必須となる「幹細胞の標準化」に直結する極めて重要なアプローチである。また、iPS 細胞が分化状態特異的に発現する遺伝子マーカーに加え、蛋白質や糖鎖プロファイルを探索・解析することにより、細胞分化状態の評価判別だけでなく細胞種の単離にも利用可能な細胞表面マーカーを同定することができると期待される。さらに上記2種のデータを統合し、「未分化状態のiPS細胞の発現プロファイル」と「それらが持つ分化傾向」を対応づけることにより、ニーズごとに対応したiPS細胞株標準規格を作成することを目指す。

(2) 事業内容と目標

本事業では由来の異なるiPS細胞株からRNAを抽出し、cDNAマイクロアレイによって遺伝子の発現状態を網羅的に解析・比較することによって、iPS細胞の性質を評価するための指標となるマーカー遺伝子の探索・解析等を行う。具体的には下記の研究項目を実施する。

A：cDNAマイクロアレイによるヒトiPS細胞の未分化状態における遺伝子発現の網羅的解析

まず(独)国立成育医療研究センターで樹立されている50株のヒトiPS細胞株を手始めに、各株の遺伝子発現状態の網羅的解析を生命情報工学研究センターと共同で進める。このデータをもとにクラスタリング解析を行い、iPS細胞の規格の指標となるような候補遺伝子群の絞り込みを行う。この時、ヒトES細胞をポジティブ・コントロールとして用いることも検討する。また、糖鎖解析の手法を用いて細胞表面の糖鎖の発現パターンの網羅的解析データをつき合わせ、未分化状態における遺伝子発現プロファイルと糖鎖プロファイルの対応づけを行う。それにより糖鎖プロファイルによる細胞分別の基準となる指標の確立をサポートし、未分化iPS細胞を評価する技術の開発を行う。

B：ヒトiPS細胞の分化傾向性の評価

有用なiPS細胞は高い分化能力を持ち合わせていることが重要である。そこで、Aで良質であると予想されたiPS細胞を利用して、iPS細胞を分化させる条件下で培養し、その分化能力についても検討を加える。この時用いる分化条件の決定は既存の分化誘導系を基本とするが、必要に応じてより適した最新の分化誘導技術も取り入れ、解析に最適な条件の調整も行う。また、分化した細胞の評価には既存の分子マーカーの他にもその精度をより確かなものにするため、必要に応じて新規マーカーを加え、より確実な細胞評価技術を開発することを目的とする。

以上2つの課題を進めることにより、iPS細胞株に依存する未分化状態のばらつきや、その後の分化傾向を予測・評価する上での指標となる基準が確立される。また、特に遺伝子発現プロファイルと糖鎖プロファイルの対応づけを行う事により、細胞の状態を統一的に理解する上で必要とされる未分化状態の基準となる遺伝子・糖鎖の統合的なプロファイルを確立できる。

中間目標（平成23年度末）

・既存のiPS細胞株を中心として50株以上のiPS細胞の遺伝子発現プロファイルを解析し、未分化状態のiPS細胞群の遺伝子発現の基礎データを得ることで、iPS細胞株の性質のばらつきを検証する。

最終目標（平成 25 年度末）

・残りの多数の iPS 細胞株の解析を行うことで、さらに確実な iPS 細胞の評価技術を構築する。
また、iPS 細胞の未分化状態における糖鎖発現プロファイルと遺伝子発現プロファイルの対応づけを行う。さらに、iPS 細胞から特定組織への細胞分化の傾向性を評価するための指標となる基準（プロファイル）や有用マーカーを選別し、それを用いた細胞評価技術を開発する。

（3）研究成果

iPS 細胞株の性質（本研究開発項目では、性質の一つのカテゴリーとして分化指向性に注目する）のばらつきの原因として、以下の項目が考えられる。

- ・iPS 細胞樹立方法の違いによるばらつき。
- ・iPS 細胞を樹立する際に用いた親株細胞の違いによるばらつき。
- ・iPS 細胞の培養方法の違いによるばらつき。
- ・iPS 細胞の継代数の違いによるばらつき。

それらの違いを遺伝子発現の観点から検証するために以下の iPS 細胞株から total RNA を抽出し（表 6-1）、アジレント社 Whole Human Genome オリゴ DNA マイクロアレイキット（4x44K）（G4112F）を用いて網羅的に遺伝子発現解析を行った。

	細胞株名	継代数	種類	由来	作製方法	備考
1	AMiPS#2	P25	iPS株	羊膜(AM)由来	レトロウイルス	
2	AMiPS#3	P7	iPS株	羊膜(AM)由来	レトロウイルス	
3	AMiPS#3	P13	iPS株	羊膜(AM)由来	レトロウイルス	
4	AMiPS#5	P7	iPS株	羊膜(AM)由来	レトロウイルス	
5	AMiPS#6	P10	iPS株	羊膜(AM)由来	レトロウイルス	
6	AMiPS#7	P15	iPS株	羊膜(AM)由来	レトロウイルス	
7	AMiPS#7	P20	iPS株	羊膜(AM)由来	レトロウイルス	
8	AMiPS#8	P16	iPS株	羊膜(AM)由来	レトロウイルス	
9	AMiPS#8	P22	iPS株	羊膜(AM)由来	レトロウイルス	
10	AMiPS#13	P19	iPS株	羊膜(AM)由来	レトロウイルス	
11	AMiPS#20	P12	iPS株	羊膜(AM)由来	レトロウイルス	
12	AMiPS#20	P9	iPS株	羊膜(AM)由来	レトロウイルス	
13	hiPS201B7	P45	iPS株	皮膚繊維芽細胞(HDF)由来	レトロウイルス	
14	hiPS201B7	P53	iPS株	皮膚繊維芽細胞(HDF)由来	レトロウイルス	
15	HiPS253G1	P37	iPS株	皮膚繊維芽細胞(HDF)由来	レトロウイルス	3因子
16	hiPS253G1	P42	iPS株	皮膚繊維芽細胞(HDF)由来	レトロウイルス	3因子
17	MiPS#16	P13	iPS株	胎児肺(MRC5)由来	レトロウイルス	
18	MiPS#16	P30	iPS株	胎児肺(MRC5)由来	レトロウイルス	
19	MiPS#25	P17	iPS株	胎児肺(MRC5)由来	レトロウイルス	
20	MiPS#25	P22	iPS株	胎児肺(MRC5)由来	レトロウイルス	
21	MiPS#40	P14	iPS株	胎児肺(MRC5)由来	レトロウイルス	
22	MiPS#40	P30	iPS株	胎児肺(MRC5)由来	レトロウイルス	
23	PAE01	P26	iPS株	胎盤動脈(PL)由来	レトロウイルス	
24	PAE01	P31	iPS株	胎盤動脈(PL)由来	レトロウイルス	
25	PAE04	P26	iPS株	胎盤動脈(PL)由来	レトロウイルス	
26	PAE04	P31	iPS株	胎盤動脈(PL)由来	レトロウイルス	
27	PAE05	P20	iPS株	胎盤動脈(PL)由来	レトロウイルス	
28	PAE05	P25	iPS株	胎盤動脈(PL)由来	レトロウイルス	
29	PAE11	P18	iPS株	胎盤動脈(PL)由来	レトロウイルス	
30	PAE11	P23	iPS株	胎盤動脈(PL)由来	レトロウイルス	
31	PAE11	P28	iPS株	胎盤動脈(PL)由来	レトロウイルス	
32	UtEA04	P18	iPS株	子宮内膜(UtE)由来	レトロウイルス	
33	UtEA04	P27	iPS株	子宮内膜(UtE)由来	レトロウイルス	
34	UtEA06	P25	iPS株	子宮内膜(UtE)由来	レトロウイルス	
35	UtEA06	P30	iPS株	子宮内膜(UtE)由来	レトロウイルス	
36	UtEA07	P26	iPS株	子宮内膜(UtE)由来	レトロウイルス	
37	UtEA07	P31	iPS株	子宮内膜(UtE)由来	レトロウイルス	
38	UtEB05	P13	iPS株	子宮内膜(UtE)由来	レトロウイルス	
39	UtEB05	P18	iPS株	子宮内膜(UtE)由来	レトロウイルス	
40	UtEB05	P23	iPS株	子宮内膜(UtE)由来	レトロウイルス	
41	sendaiTIG3#19	P32	iPS株	胎児肺(TIG3)由来	センダイウイルス	
42	sendaiTIG3#19	P37	iPS株	胎児肺(TIG3)由来	センダイウイルス	
43	sendaiTIG3#19	P43	iPS株	胎児肺(TIG3)由来	センダイウイルス	
44	sendaiTIG3#56	P25	iPS株	胎児肺(TIG3)由来	センダイウイルス	
45	sendaiTIG3#56	P30	iPS株	胎児肺(TIG3)由来	センダイウイルス	
46	sendaiTIG3#56	P38	iPS株	胎児肺(TIG3)由来	センダイウイルス	
47	sendaiTIG3#56	P42	iPS株	胎児肺(TIG3)由来	センダイウイルス	
48	sendaiTIG3#106	P35	iPS株	胎児肺(TIG3)由来	センダイウイルス	
49	sendaiTIG3#106	P40	iPS株	胎児肺(TIG3)由来	センダイウイルス	
50	sendaiTIG3#106	P47	iPS株	胎児肺(TIG3)由来	センダイウイルス	
51	KhES1	P31	ES株			
52	KhES2	P28	ES株			
53	KhES3	P26	ES株			
54	TIG3		親株	胎児肺由来		
55	UtE1104	P8	親株	子宮内膜由来		
56	AM936EP	P13	親株	羊膜由来		
57	PL551Ar	P16	親株	胎盤動脈由来		
58	MRC5		親株	胎児肺由来		

表 6-1 解析した株名

各株とも統計解析を行うために「例数 3」で凍結サンプリング後、解析した。

iPS 株、その iPS 株の作製元となった親株、ヒト幹細胞のコントロールとして 3 種類の ES 株を解析した。株の選択理由は以下の通り。

- ・「iPS 細胞樹立方法の違いによるばらつき」を検証するために、レトロウイルスで作製の iPS 細胞とセンダイウイルスで作製の iPS 細胞を比較した。
 - ・「iPS 細胞を樹立する際に用いた親株細胞の違いによるばらつき」を検証するために、5 種類の親株由来の iPS 細胞及びその親株細胞を比較した。
 - ・「iPS 細胞の培養方法の違いによるばらつき」を検証するために、hiPS201B7 を 2 種類の方法で培養した。
 - ・「iPS 細胞の継代数の違いによるばらつき」を検証するために、同一株で複数の継代時における解析及び比較を行った。
- 以下にその結果を示す。

①未分化状態を維持中の網羅的遺伝子発現解析

先ず始めに 4 種類の親株から iPS 細胞を多数作製した。その上で各株とも安定に継代できるようになったことを確認した上で、複数の継代数時のサンプルを凍結し、total RNA を抽出した。複数の継代数時からサンプリングする場合、少なくとも 5 継代は間をあけることとした。生命情報工学研究センターと共同で網羅的遺伝子発現解析を行い、その結果から各サンプルのクラスタリングを行った (図 6-1)。

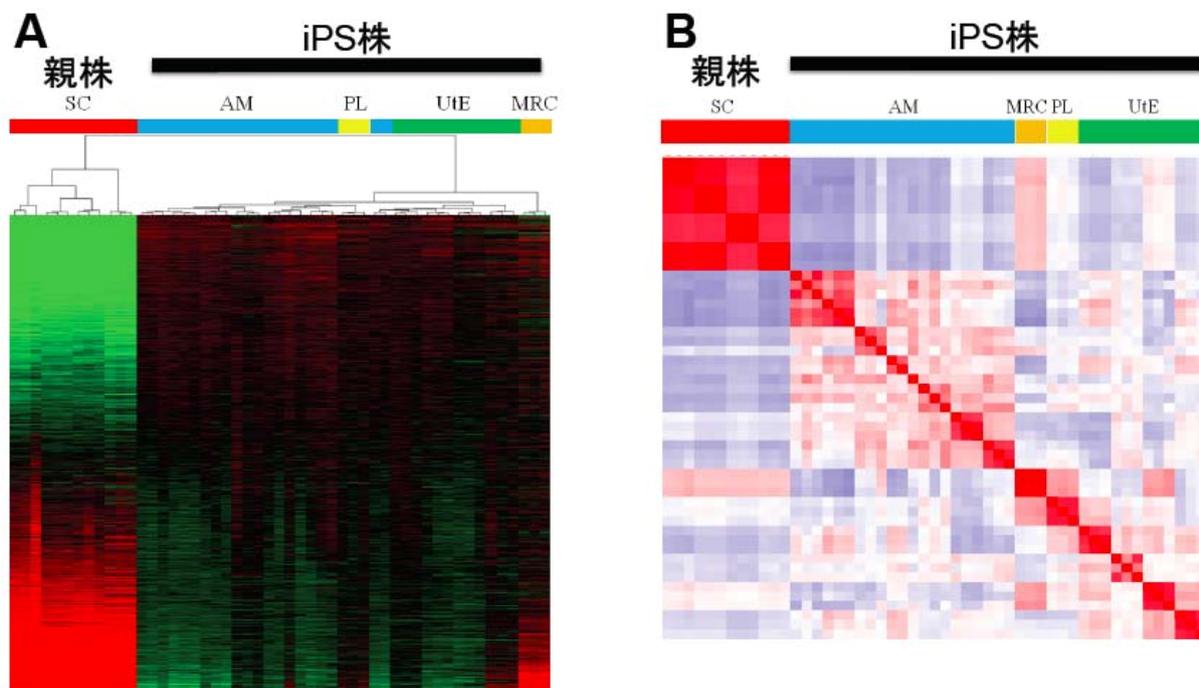


図 6-1 1 4 種類の iPS 細胞株及びそれらの親株 4 種の網羅的遺伝子発現解析

A: 17620 種類の遺伝子発現解析を行い、双方向の (縦軸&横軸) クラスタリングを行った結果の

HeatMap。赤は発現量が高く、緑は発現量が低い。縦軸は 17620 種類の遺伝子が並び、横軸には各株が並ぶ。

B: 17620 種類の遺伝子すべてを用いて、各株総当たりで相関係数の平均値を出し作成した HeatMap。赤は相関係数が高く、青は低い。横軸縦軸共に各株が並び、総当たりの相関係数を視覚化した。

すると以下の成果が得られた。

- ・網羅的な遺伝子発現解析をすることにより、明確に親株細胞と iPS 細胞を見分けることに成功した。特にこれまで報告されていた数 10 種類の未分化細胞特異的なマーカー (nanog 等) 数を大きく上回る、2520 種類の iPS 細胞特異的な遺伝子マーカーを同定できた。

- ・おそらく iPS 細胞の性質に関与すると思われる、親株毎の違いを見分けることに成功した。

- ・これまでは報告されていなかった、同一親由来の iPS 細胞株間の違いを見分けることに成功した。

- ・継代数を変えても iPS 細胞の遺伝子発現パターンに優位な差異がないことを明らかにした。(ただしその後の研究により、継代数間をさらに大きく開けると、遺伝子発現パターンが変化して行くことも発見)

以上、山中 4 因子 (Sox2, Oct3/4, Klf4, Myc) を搭載したレトロウイルスを用いて作製した iPS 細胞のクラスター化に成功し、遺伝子発現パターンが iPS 細胞の標準化において有用な指標となることを示唆した。

さらに同様の網羅的解析をセンダイウイルスで作製された iPS 細胞、3 因子 (山中 3 因子から Myc を除いたもの) で作成された iPS 細胞を含める形で行った。

以上の結果から、iPS 細胞の未分化状態でのばらつきは、

「親株細胞と iPS 細胞の違い」

V

「親株の違い／作製方法の違い／培養方法の違い」

V

「同一親株&同一方法で作製され、同一方法で培養された株間のばらつき」

V

「全条件が同一の場合、5 継代数程度の違いによるばらつき」

の順番に振れ幅が少ないことが明らかとなった。

これより、今後の iPS 細胞等幹細胞の標準化をする上で、既に樹立されている幹細胞を規格化された形で大量安定供給するためには、

- ・培養方法の固定
- ・継代数を経ることによる変化のコントロール

が最重点課題であることを明らかにした。

②分化指向性解析及びその検証

幹細胞を「創薬スクリーニング」、「病因解明」、「再生医療」どの目的で利用するにしても、未分化状態から何らかの臓器特異的細胞（例：心筋細胞、肝細胞、膵臓β細胞、神経細胞）に分化させる必要がある。そしてガン化等のリスクを回避するためにも、その分化はなるべく高効率で行われなければならないが、非常に困難である。その原因としてこれまで、培地組成等などの分化誘導条件検討が不十分だからと考えられてきた。一方で近年、幹細胞の性質は多様であり、それ故最適な幹細胞を分化実験に供する必要があると考えられるようになってきた。特に iPS 細胞は親株の性質を引き継いでおり、それによって分化指向性が左右されることが報告されつつある (Polo et al., Nat Biotechnol, 28:848, 2010)。一方で内部細胞塊由来の ES 細胞も、その株毎に分化指向性が異なることも報告されており (Osafune et al., Nat Biotechnol, 26:313, 2008)、分化指向性を決定する実体はまったく分かっていない。そこで、表 6-1 で解析した iPS 細胞株の一部を用いて、分化指向性の検証を行い、各種幹細胞の未分化時の性状と分化指向性の因果関係を明らかにすることを旨とした。

具体的な手法としては、手始めに胚様体を作製し bFGF 非存在下で自由分化させることにより発現が上昇する遺伝子を、DNA マイクロアレイを用いて解析し、各種特異的遺伝子マーカー発現から、どの様な細胞腫が誘導されているかを網羅的に検証する。一般に胚様体形成を行う時は細胞数をそろえ、分化の程度が胚様体間でばらつかないようにする。しかしながら多くの iPS 細胞株が、コロニーを解離再集合させることが困難であることが明らかになりつつあり、細胞数をカウントすることが難しい。そこでコロニーを均一な大きさにカットすることによって胚様体形成を行い、自由分化実験のクオリティーをコントロールする(図 6-2)。

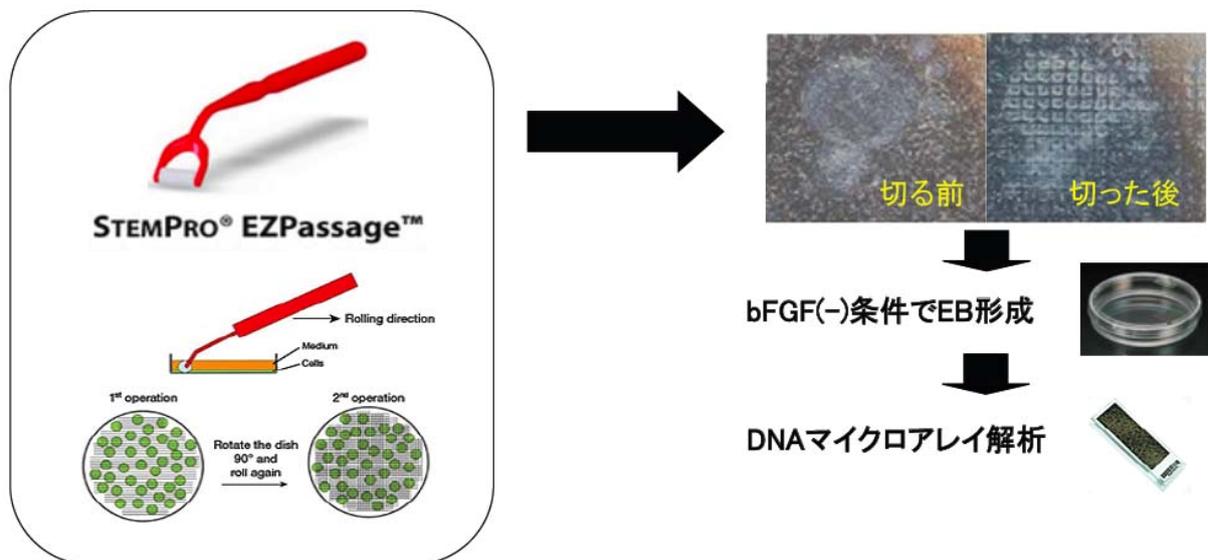


図 6-2 分化指向性解析の方法

未分化状態を安定に保っている iPS 細胞のコロニーを同じサイズに切り、bFGF 非存在下で胚葉体を形成させ、株ごとの性質に従った自律分化をさせる。2 週間後に胚葉体を凍結サンプリングし、遺伝子発現解析を DNA マイクロアレイを用いて行う。

図 6-2 の方法により、すべての iPS 細胞株で胚葉体を形成することに成功した。それらを 2 週間培養することにより、図 6-3 のような形態変化をした。

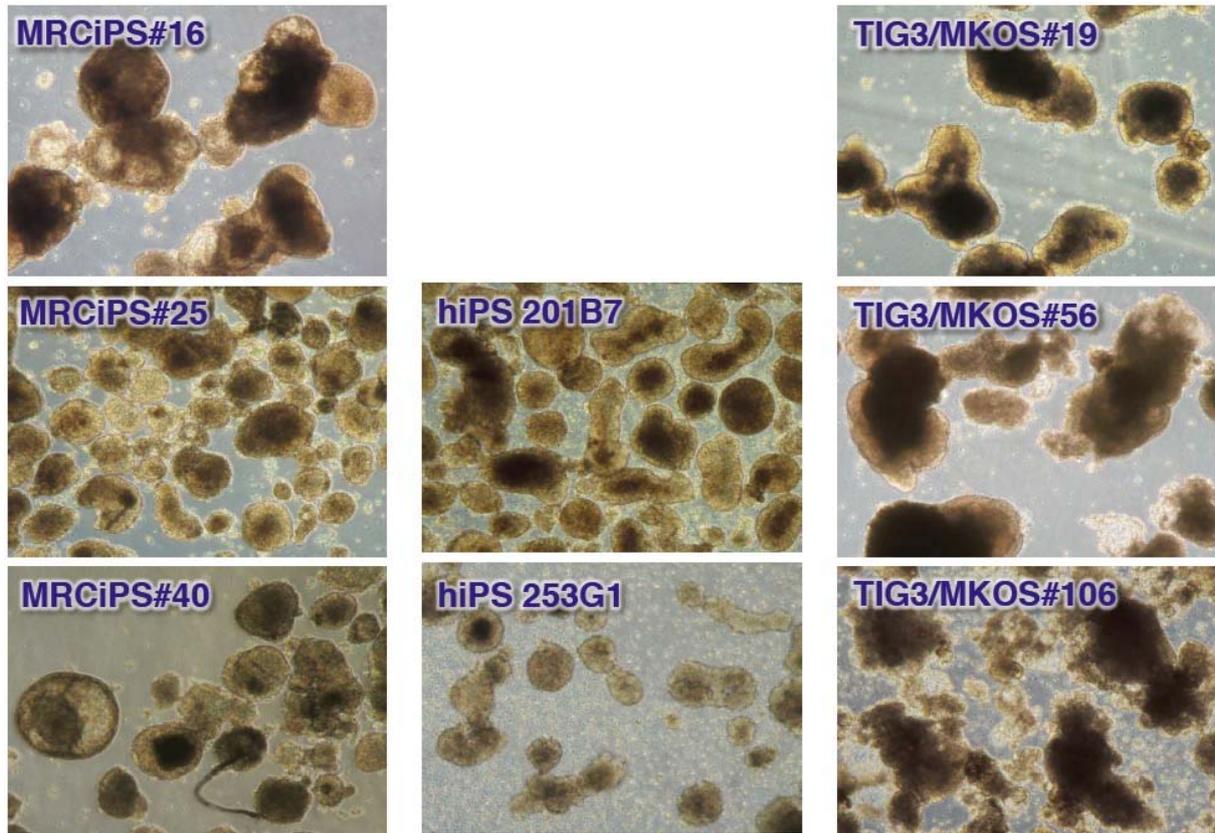


図 6-3 胚葉体形成後、2週間後の形態比較

MiPS#16, #25, #40 株から作製した胚葉体は、中に中空構造を持った構造体が誘導された。hiPS201B7 株から作製した胚葉体は、空豆様に融合した。sendaiTIG3#19, #56, #106 は不定形に多数の胚葉体が融合した。それらの胚葉体から抽出した total RNA を用いて、網羅的に遺伝子発現解析を行った

その結果は、図 6-1 のクラスタリングの結果とは違っていた。つまり、これまで先行研究で注目されていた「幹細胞特異的マーカーの発現パターン」では、分化指向性の予測はできないことが明らかになった。また、同一親株から同一方法で作製しても、分化指向性の違いが生まれることが明らかとなった。

(4) 目標の達成度と意義

中間目標（平成 23 年度末）としては、「既存の iPS 細胞株を中心として 50 株以上の iPS 細胞の遺伝子発現プロファイルを解析し、未分化状態の iPS 細胞群の遺伝子発現の基礎データを得ることで、iPS 細胞株の性質のばらつきを検証する。」を掲げていた。表 6-1 に示したとおり、より多くの幹細胞株を解析し、様々な局面からばらつきを検証することに、1 年前倒しして達成した。その成果はこれまで五里霧中であった幹細胞の標準化に道筋をつける画期的なものであった。

2.2.4 システム生物学的アプローチによる iPS 細胞における特異的パスウェイ及びマーカーの探索

独立行政法人 産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター

(1) 事業目的と背景

iPS 細胞の発見以来、多数の研究の報告がある。現在、iPS 細胞に関する分子科学における基礎的な理解が不十分であるため、iPS 細胞の効率的樹立等産業・工学的な展開には至っていない。実際、世界的様々な研究が進められている iPS 細胞の分子科学的な基礎研究では、最新の計測により細胞内の分子情報を取得し、それらから多能性等の iPS 細胞を特徴づけるメカニズムを探索している。これらの研究にみられる共通の問題点は、網羅的な計測データから重要なパスウェイなど定性的かつマクロな特徴づけに成功しているが、さらに具体的な分子候補の選定においては、直観的な絞り込みに依存しており、場当たりの「発見」の集積に過ぎないことである。このような状況を鑑み、計測データから合理的な絞り込みを可能にする数理技術を確立することを目的とする。さらに、再現可能な合理的な絞り込み技術による少数分子候補を選定することにより、それらを実験検証するプロセスに寄与する。これにより、iPS 細胞研究において理学から工学への橋渡しを促進することが期待される。

(2) 事業内容と目標

iPS 細胞及び ES 細胞について、その分子計測データからそれぞれの細胞の性状を数理解析し、多能性に関する新規分子メカニズムに関する知見を発見することが最終目標である。特に、最新計測データから、実験検証可能な少数分子候補を合理的かつ体系的に選定・絞り込む技術を開発し、細胞を局所的もしくは限定的な理解からシステムの理解へ前進させ、産業・工学の研究への橋渡しを可能にする。その最終目標に関し、中間段階の現在、十分な成果を得ることができた。その具体的内容は以下の通りである。

中間目標（平成 23 年度末）

- ・親株から iPS 細胞株への細胞状態変異に関する特異的遺伝子制御ネットワークの候補を特定すると共に、iPS 細胞株の分化傾向に特徴的なネットワーク候補の絞り込みを実施する。この際、遺伝子発現プロファイルに加え、糖鎖プロファイルも実施のための計測データとして採用する。

最終目標（平成 25 年度末）

- ・iPS 細胞株の多能性及び分化能の評価を、特徴的遺伝子群のリスト及びそれらの相互作用形態の形で特定する。

(3) 研究成果

iPS 細胞について以下の解析を行った。MRC5、羊膜、胎盤動脈、子宮内膜由来 118 種ヒト iPS 細胞に関する DNA マイロアレイ計測データについて、標準的な統計解析による特徴遺伝子群の抽出とそれらの生物機能推定をおこなった。その結果、特徴遺伝子として約 3000 遺伝子を抽出し、またその機能として約 150 GOterm で解釈される機能推定を行った。通常の上記解析のみでは実験検証を実行するのに絞り込みが不十分であるため、独自技術である Network Screening に

より解析し (図 7-1)、28 ヒト iPS 細胞特異的制御ネットワークを同定した (図 7-2)。さらに、レクチンマイクロアレイ計測データの標準的統計解析の結果と併せ、ヒト iPS 細胞特異的な 13 糖転移酵素を同定した (図 7-3)。

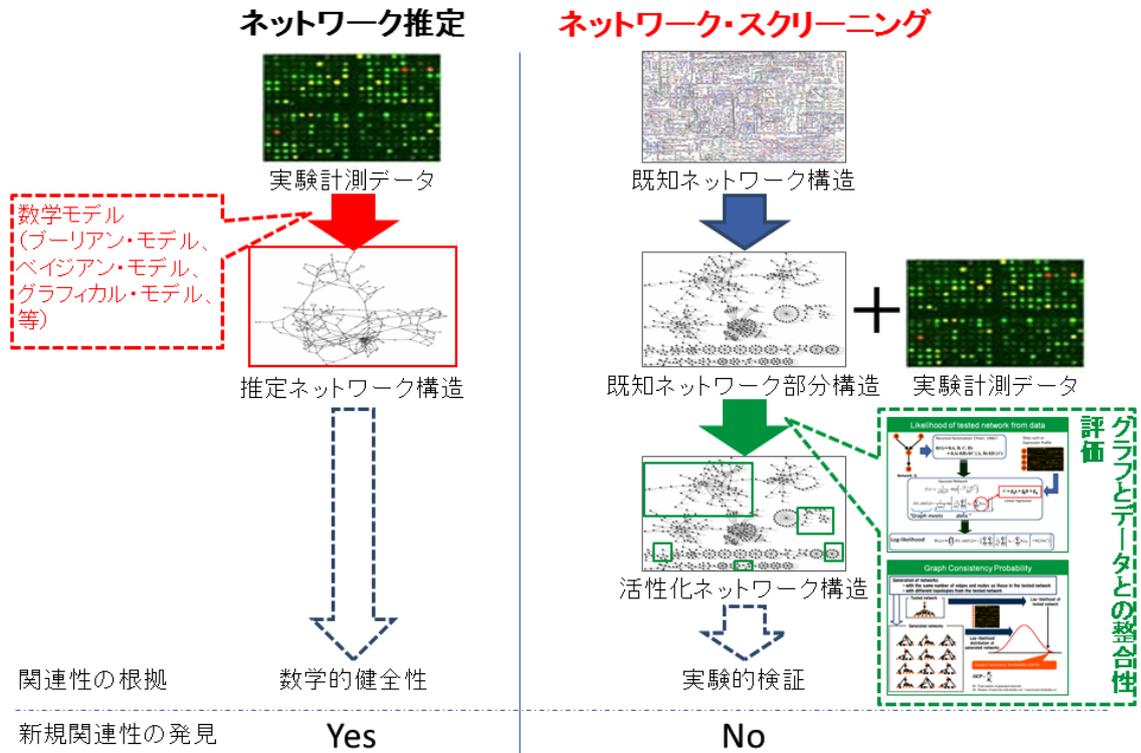


図 7-1 ネットワークスクリーニングの概略

Network Signature

Pathway	Expression
HSA04010-MAKP_SIGNALING_PATHWAY	+
HSA04115-P33_SIGNALING_PATHWAY	+
HSA04310-WNT_SIGNALING_PATHWAY	+
HSA04340-HEDGEHOG_SIGNALING_PATHWAY	+
HSA04350-TGF_BETA_SIGNALING_PATHWAY	+
HSA04630-JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY	+
HSA01430-CELL_COMMUNICATION	+
HSA04520-ADHERENS_JUNCTION	±
HSA04530-TIGHT_JUNCTION	+
HSA04540-GAP_JUNCTION	+
HSA04810-REGULATION_OF_ACTIN_CYTOSKELETON	+
HSA01030-GLYCAN_STRUCTURES_BIOSYNTHESIS_1	+
HSA01031-GLYCAN_STRUCTURES_BIOSYNTHESIS_2	+
HSA04916-MELANOGENESIS	+
HSA05210-COLORECTAL_CANCER	+
HSA05213-ENDOMETRIAL_CANCER	+
HSA05215-PROSTATE_CANCER	+
HSA05216-THYROID_CANCER	+
HSA05217-BASAL_CELL_CARCINOMA	+
HSA05218-MELANOMA	+
APOPTOSIS	+
APOPTOSIS_GENMAPF	+
CALCIUM_REGULATION_IN_CARDIAC_CELLS	+
HSA04060-CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	+
HSA04110-CELL_CYCLE	+
HSA04670-LEUKOCYTE_TRANSENDOTHELIAL_MIGRATION	-
HSA05120-EPITHELIAL_CELL_SIGNALING_IN_HELICOBACTER_PYLORI_INFECTION	+
SMOOTH_MUSCLE_CONTRACTION	+

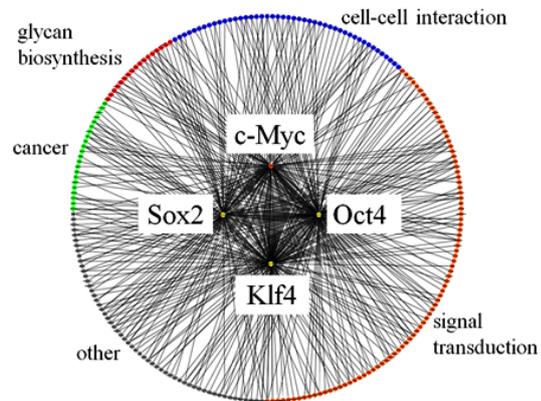


図 7-2 iPS 細胞特異的の活性化制御遺伝子ネットワーク候補。シグナル伝達系等既知 iPS 関連パスウェイを含む、28 パスウェイ (Network Signature) を検出し、特に、糖鎖構造に直結する Glycan-Structure Biosynthesis パスウェイを検出した。

Expression & Network Signature	Expression & Glycan Signature
ST6GAL1	GLB1
B3GNT3	FUT2
GCNT2	ST3GAL1
	GALNT6
	GALNT8
	GALNT10
	GALNT12
	GALNT14
	GALNTL2
	ST6GAL1
	B3GALT5
	B3GALT1
	B3GNT2

図 7-3 iPS 特異的活性化糖鎖転移酵素。遺伝子発現比較とネットワークスクリーニングによる候補（左）と遺伝子発現比較とレクチンアレイ解析による候補（右）

（4）目標の達成度と意義

本研究課題について、我々の担当は実験計測データの数理解析である。通常の数理解析では、幹細胞特異的遺伝子候補を数百のレベルで抽出するのが限度であるが、Network Screening 等の実験計測法や幹細胞の生物学的知見を考慮した独自の解析法の開発・改良により、数十のレベルまで候補遺伝子を絞り込むことに成功した。特異的遺伝子群が少数であることで、性状解析の次のステップである特異的遺伝子の実験的検証の実現可能性および効率化に対して十分な成果を得ることができた。実際、我々が開発した実験的検証可能な少数分子候補の体系的・合理的絞り込み数理技術は、世界的にも稀である。また、その技術は汎用性をもつため、他の生命現象を担う分子候補の絞り込みに有効であり、現在、国内外 4 研究施設により我々の技術の適用により絞り込まれた分子候補の実験検証が進行中である。今後、その適用範囲はさらに広がるものと期待される。

上記のように、新規絞り技術の有効性及び汎用性が、国内外で理学的見地から立証されつつあり、今後、科学的根拠に基づく実用化が実施されると見込まれる。また同時に、国際標準化に向けた分子候補選定について強力な支援を可能にすると確信する。

2. 2. 5 iPS 細胞の染色体安定性の検証

アルプラスト株式会社 (H21 年度まで)

独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター

(1) 事業目的と背景

iPS 細胞等幹細胞は分化細胞と異なり、長期間培養によって核型が変化するなどの不安定性を有している。今後、iPS 細胞を産業応用（特に再生医療グレードで使用）するためには、それらの規格化において核型を正確に評価せねばならない。よって染色体数の変化のみならず、ゲノム全域にわたってのコピー数の変化（重複・欠損）及び転座をモニタリングする必要があり、100 万に及ぶ多型情報に基づいて、親株と iPS 細胞株共に CGH アレイや SKY 法を用いた解析を行う。これにより、iPS 細胞性状解析として染色体核型を検証していく。

(2) 事業内容と目標

実用可能な iPS 細胞は、正常な核型を有する必要がある。そこで、樹立された iPS 細胞の染色体核型解析を行う。具体的には、樹立された各種 iPS 細胞についてマルチカラー染色体解析装置を用いて SKY 法、CGH アレイ法を組み合わせた包括的な核型解析を行う。他の性状解析を含めたデータを蓄積し総合的に解析することにより、iPS 細胞の遺伝学的性状及び染色体安定性の評価法・判定法を開発する。更に、開発された凍結保存法により保存された iPS 細胞についても試験を実施し、保存による影響の有無を検証する。

中間目標（平成 23 年度末）

・iPS 細胞の染色体解析のための細胞調製方法を最適化し、樹立された iPS 細胞について 50 株の染色体解析を行う。その評価結果をプロジェクトチーム内の他の性状解析結果と合わせて総合的に解析することにより、iPS 細胞の染色体核型解析の評価法を検討する。

最終目標（平成 25 年度末）

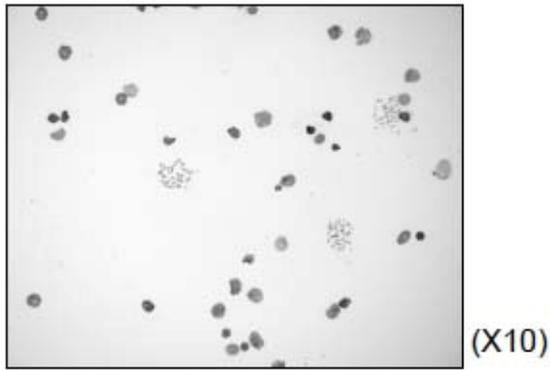
・樹立された優良 iPS 細胞株を中心として合計 100 株の染色体解析を行う。また、凍結保存融解前後の iPS 細胞における染色体の性状を比較解析する。これにより iPS 細胞の染色体解析法とその評価法（iPS 細胞核型解析システム）を確立する。

(3) 研究成果

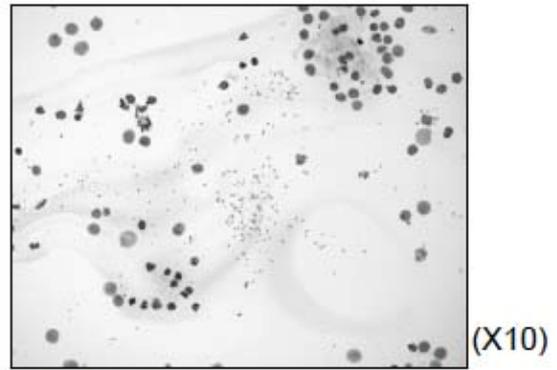
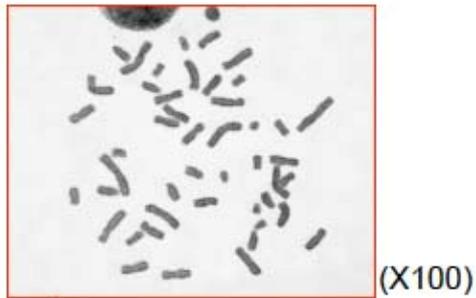
G-band 法や SKY 法に代表される、マクロな視点からの核型解析をする上で重要なポイントは、いかに解析に適した染色体標本を作るかにある。解析に適した染色体標本は、図 8-1 に示したように、

- ・染色体が適度に散在していて、重なりがない。
- ・隣の細胞と十分に離れていて、隣の細胞からの染色体混入がない。
- ・個々の染色体の長さにばらつきが見られ、染色体番号を容易に判断できる。

であることが望ましい。



良い標本



悪い標本

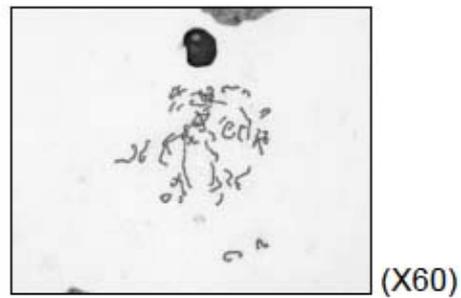


図 8-1 染色体標本の例

左が染色体解析に適した標本例、右が適さない標本の例

染色体標本を作製するプロトコールは図 8-2 のようになっており、図 8-1 で示した「核型解析に適した標本」を作製するには、細胞株ごとに「低張液組成」「温度」「時間」「固定液組成」「展開細胞濃度」などを条件設定する必要がある。HeLa 細胞のように、これまでノウハウが蓄積している細胞は既に最適条件が確立されているが、近年注目されているヒト iPS/ES 細胞は、細胞の大きさ、それを占める核の比率、セルサイクル、細胞膜/核膜の性質などが異なっており、最適な条件は分かっていない。

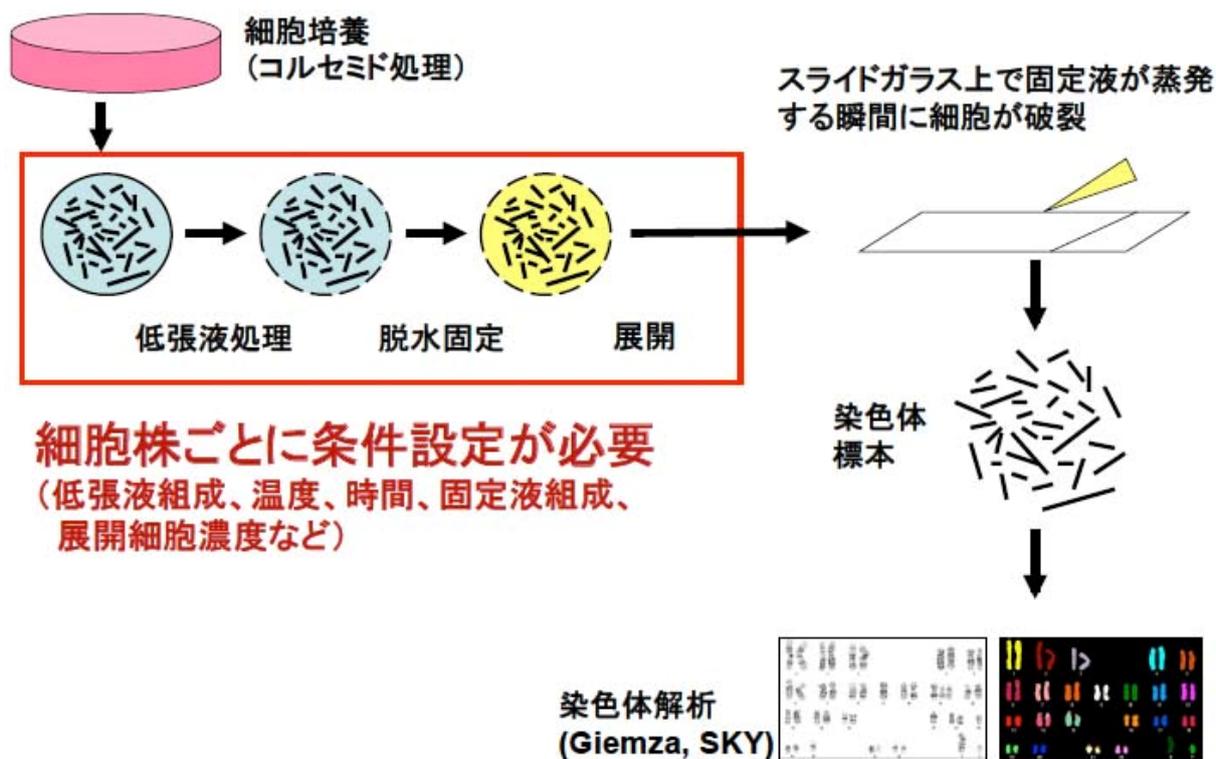


図 8-2 染色体標本作製のながれ

そこで我々は、ヒト iPS/ES 細胞株に関して表 8-1 の条件で染色体標本作製することにより、至適条件を検討した。

低張液組成 (KCl:クエン酸)		1:0		5:2		
低張処理時間		20分	40分	20分	40分	60分
処理 温度	室温	①	③	⑤	⑦	⑨
	37°C	②	④	⑥	⑧	⑩

表 8-1 染色体標本条件検討

総じて HeLa 細胞と比べて強い条件での低張液処理が iPS 細胞には必要であった。代表的な染色体標本の例を図 8-3,4 に示す。

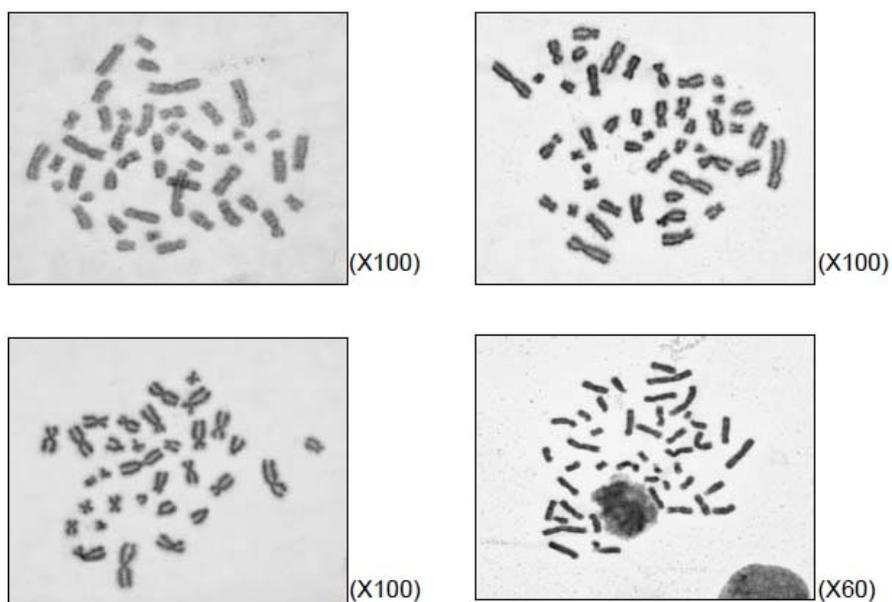


図 8-3 MiPS#25 の染色体標本

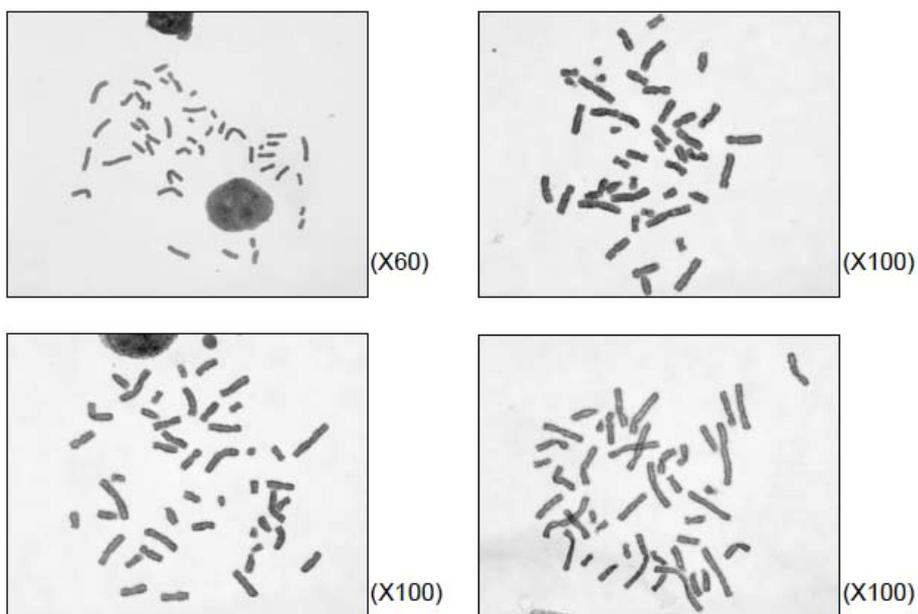


図 8-4 hiPS201B7 の染色体標本

図 8-3,4 に示したような標本を、1 株あたり 50 核版以上調べて染色体数異常の有無を解析した (表 8-2)。

	継代数 (P)	2n=44	2n=45	2n=46	2n=47	2n=48	正常率 (%)
AM#3	P 67	0	0	55	0	0	100
AM#5	P 47	0	0	57	0	0	100
AM#6	P 58	0	0	50	1	0	98
SendaiTIG3#19	P 27	0	0	59	0	0	100
SendaiTIG3#56	P 20	0	1	49	0	0	98
SendaiTIG3#106	P 30	0	1	62	0	0	98
KhES1	P 40	1	3	53	1	0	91
KhES3	P 43	0	0	67	0	0	100

表 8-2 染色体標本判定結果

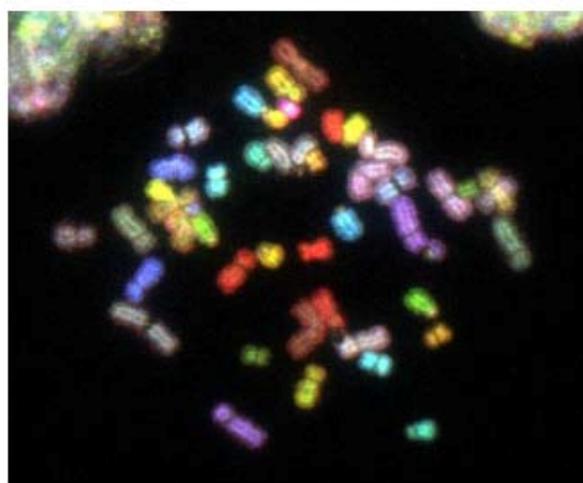
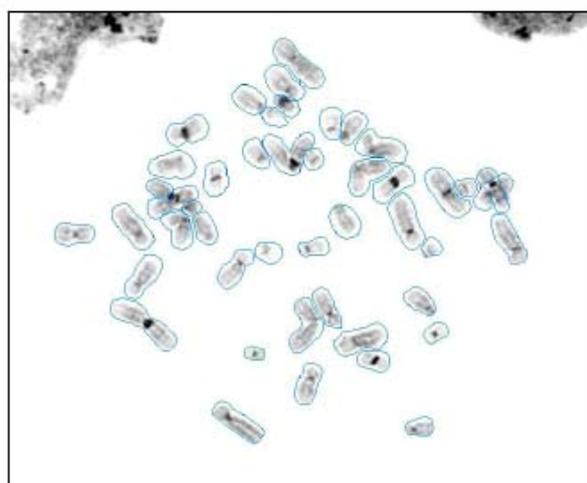
50核版中0～1核番程度の以上であれば、正常と見なす。

これまで解析した株は khES1 を除いて染色体数の異常はないと判定された。khES1 に見られた染色体異常の原因は培養条件のぶれによると思われる、現在はデータを取得し直している。

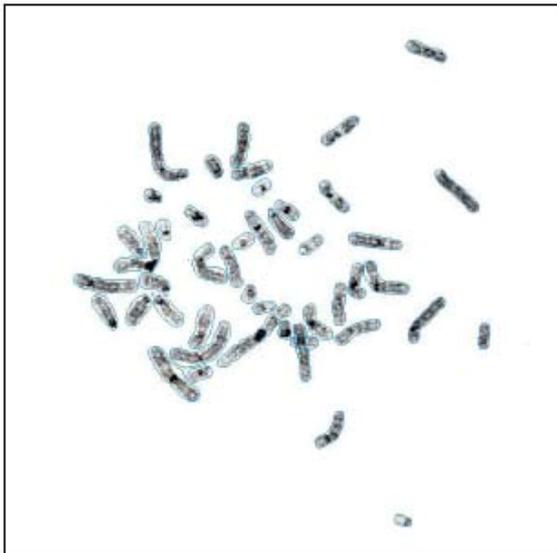
続いて標本作成条件の最適化及び染色体数の確認が完了した株に関しては、マルチカラー-FISH である SKY 法を行うことにより、相互転座等の変異の有無を検証した。まずは上述の方法を用いて染色体標本を作製し、染色体ごとを別の蛍光色素で染め分けた (図 8-5)。

DAPI image

color image



DAPI image



color image

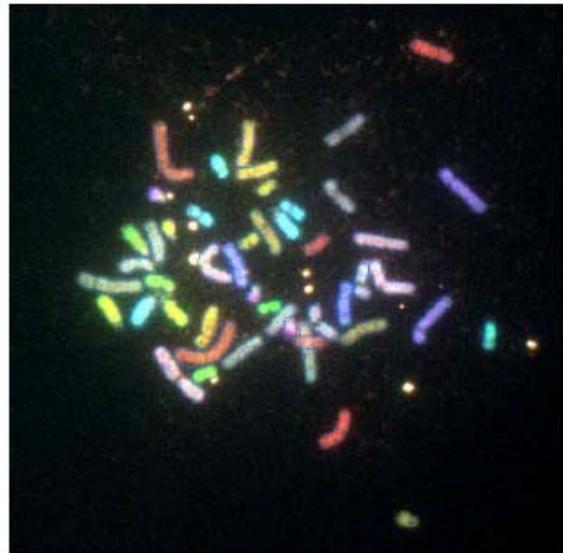
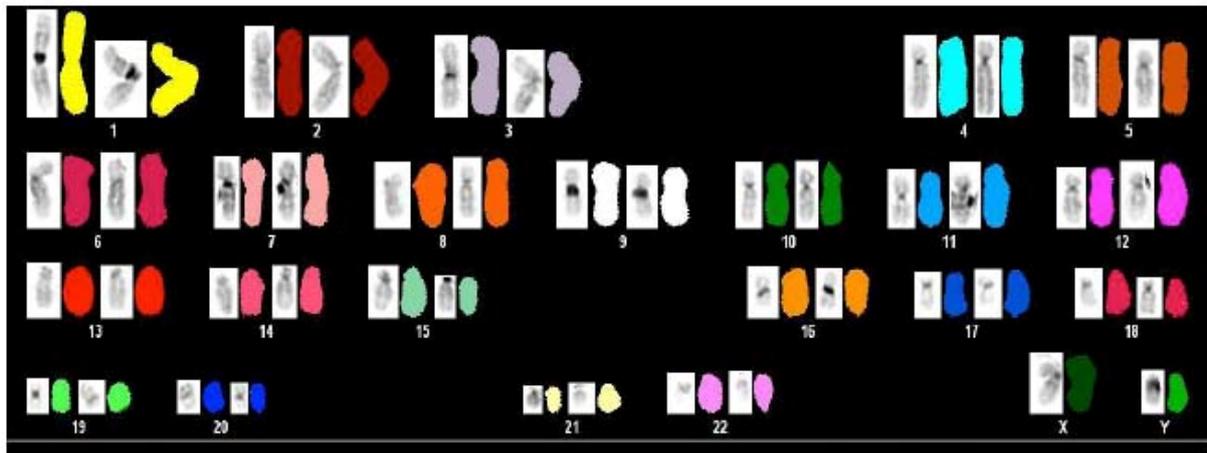


図 8-5 SKY 染色像代表例

上段は MiPS#25、下段は sendaiTIG3#56 のものである。

それらをマルチカラー染色体解析システム SD-300(Applied Spectral Imaging)を用いて解析した (図 8-6)。



[46,XY]

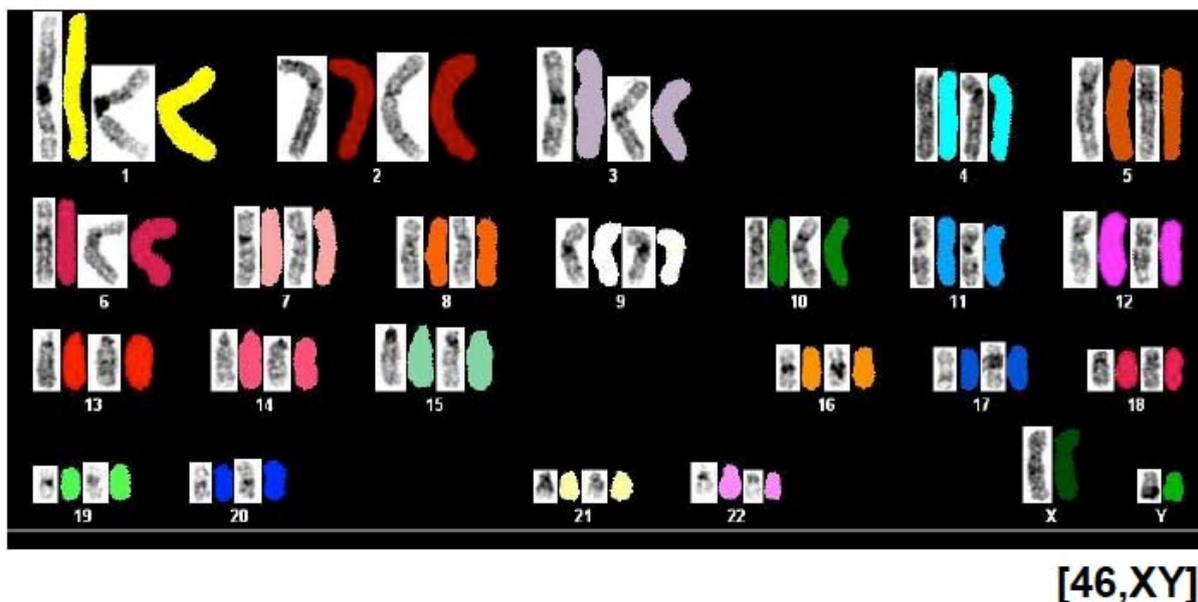


図 8-6 SKY 判定結果

結果として、MiPS#25、sendaiTIG3#56 には染色体転座は見られなかった。

以上、まだ確立されていなかったヒト幹細胞に最適な標本作成条件を決定し、システムティックに核型解析する系の立ち上げに成功した。

(4) 目標の達成度と意義

中間目標（平成 23 年度末）としては、「iPS 細胞の染色体解析のための細胞調製方法を最適化し、樹立された iPS 細胞について 50 株の染色体解析を行う。その評価結果をプロジェクトチーム内の他の性状解析結果と合わせて総合的に解析することにより、iPS 細胞の染色体核型解析の評価法を検討する。」であった。すでに 11 種類の iPS 細胞に関してそれぞれ 50 核版以上の標本作製し、染色体解析のための細胞調製方法確立及び実際の解析を行ってきた。今後、iPS 細胞等幹細胞の産業化を視野に入れた場合、核型解析を行うことは必須である。一方で、そのメソッドロジーは確立されていなかった。本研究開発の半ばにして、iPS 細胞の染色体核型解析の評価法を確立したことは、非常に有意義である。

2. 2. 6 iPS 細胞のエピゲノム情報の解析

川崎重工業株式会社

独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター

(1) 事業目的と背景

ヒト iPS 細胞は再生医療実用化や革新的創薬の鍵として期待されているが、その実用化を決定的に妨げている根本原因は「標準化の欠落」である。創薬応用や臨床試験に耐えうる iPS 細胞とはどういう幹細胞かを明確に規定できる幹細胞の測定法を確立し iPS 細胞を標準化することが、

現在待望されている。最近の幹細胞関連分野の世界的な競争により、幹細胞の多様な分化能力を決定づける幹細胞の「エピジェネティクス」指標が科学的エビデンスに基づく幹細胞標準化を達成するために必須であることが、この1年間で急速に明確となり、欧米では国家プロジェクトも始動した。従来のマイクロアレイによって実際に転写されている遺伝子群を同定することに加えて、幹細胞におけるエピゲノム情報を解析することによって、活性化されている遺伝子群を記述することは、分化の方向性を予測するうえで必須である。

本研究では第一に、高次の転写制御機序を記述するために必要な遺伝子のDNAメチル化情報を取得するために、**Infinium** アレイを用いたDNAメチル化解析を行う。その結果、クラスタリングなどの解析によって分化指向性情報と照合する。

第二に、ヒストン修飾などのアクティブマーク、インアクティブマークの分布を含むエピゲノム情報の取得を、分化の方向性を一層正確に記述するために逐次検討する。

(2) 事業内容と目標

iPS細胞のエピゲノム情報の解析を実施し、iPS細胞の品質管理に必要な評価ファクターの明確化を行うため、由来の異なるiPS細胞株を、開発中の自動培養装置も活用して培養し、培養されたiPS細胞のエピゲノム情報(DNAメチル化情報及びヒストン修飾)の解析を実施する。

中間目標 (平成23年度末)

- ・樹立された未分化状態のiPS細胞のDNAメチル化情報解析を完了する。
- ・樹立された未分化状態のiPS細胞のヒストン修飾情報の解析を実施する。

最終目標 (平成25年度末)

- ・樹立された未分化状態のiPS細胞のヒストン修飾情報の解析を完了する。
- ・得られたエピジェネティクス情報と遺伝子発現情報・糖鎖修飾情報・核型情報の統合化を行う。

(3) 研究成果

バイサルファイト処理したDNAにおける塩基変化の有無を調べることにより、CpGサイトのメチル化状態を多数同時に解析することが可能である。**Infinium** アッセイはSNP (Single Nucleotide Polymorphism)解析に開発されたプラットフォームであり、任意の塩基配列に対してアッセイをデザイン可能であり、その再現性および正確性についても定評がある。本研究では先ず手始めに、ヒト全ゲノムから27,000箇所のCpGサイトを解析可能なアレイシステムを用いた。MiPS#25株及びその親株であるMRC5株を用いて解析を行った結果の一部を図9-1, 2, 3に示す。

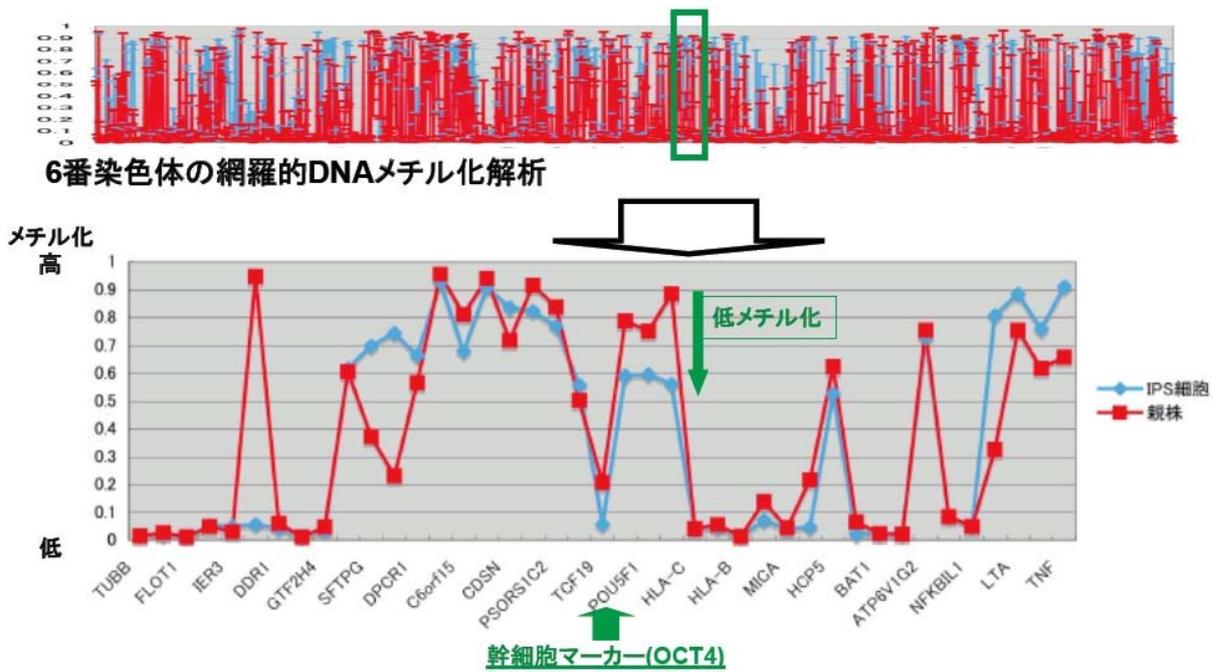


図 9-1 6 番染色体上に存在する幹細胞特異的マーカーPOU5F1(=Oct4)コード領域周辺のメチル化解析

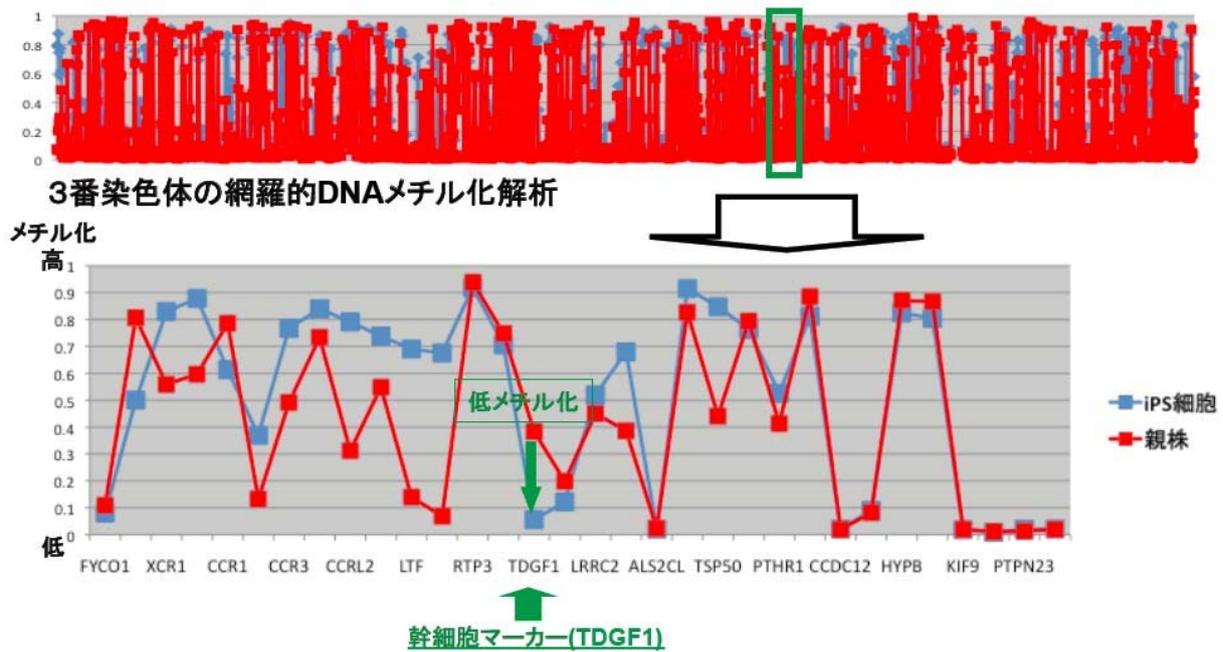


図 9-2 3 番染色体上に存在する幹細胞特異的マーカーTDGF1 コード領域周辺のメチル化解析

一般的に遺伝子コード領域近傍にある CpG アイランドが低メチル化状態にあると、転写量が高く、高メチル化状態にあるとその遺伝子の転写量が低くなると言われている。そして、図 9-1, 2 にあるように、POU5F1(Oct4)、TDGF1 は確かにゲノム DNA の低メチル化状態が検出された。

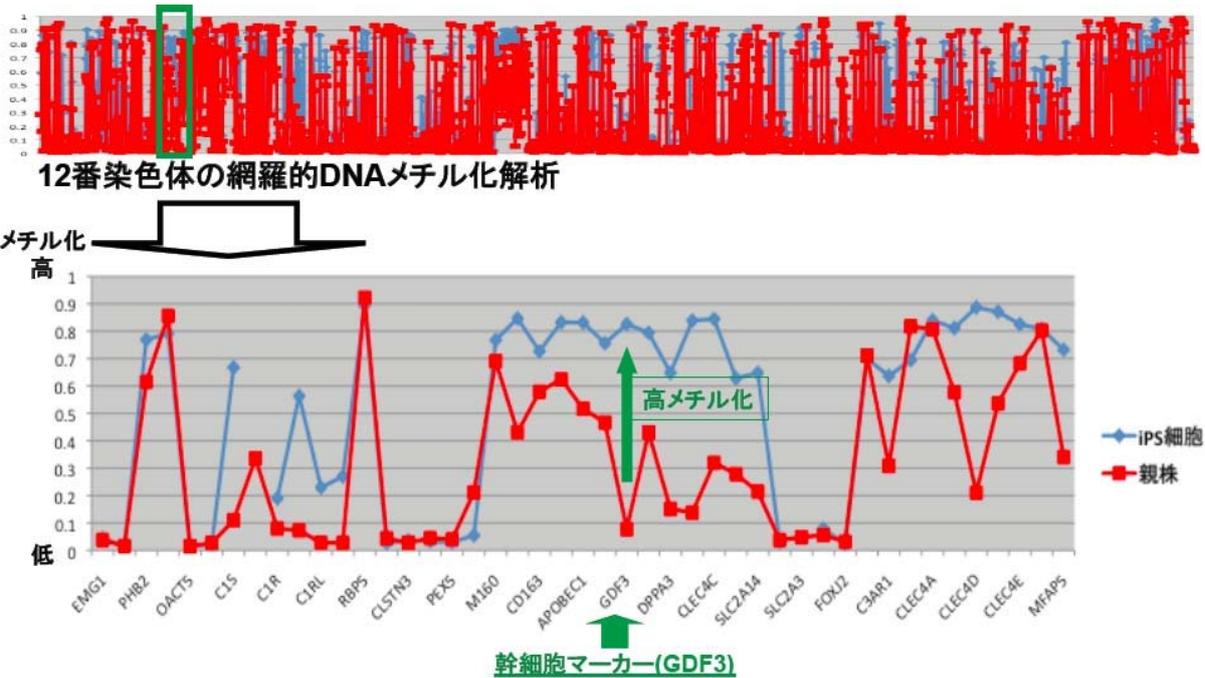


図 9-3 12番染色体上に存在する幹細胞特異的マーカーGDF3 コード領域周辺のメチル化解析

一方で、図 9-3 にあるように、遺伝子発現量は高いが、ゲノム DNA は高メチル化している GDF3 のような遺伝子も多数同定された。ISSI, Nat Biotechnol, 7:803, 2007 で示された、ヒト ES 細胞のマーカー遺伝子 2 3 種を用いて、同様の解析を行ったところ、表 9-1 に示したとおりの結果となった。

iPS細胞でメチル化が減少している遺伝子	iPS細胞でメチル化が増加している遺伝子	変化無し、またはプローブにより異なる挙動を示す遺伝子
<p style="text-align: center;"> TDGF POU5F1 FOXD3 GRB7 CD9 GAL IFITM1 NODAL </p>	<p style="text-align: center;"> GABRB3 GDF3 EBAF TERT </p>	<p style="text-align: center;"> DNMT3B LEFTB LIN28 PODXL FGF4 UTF1 </p>

表 9-1 18種類の幹細胞特異的マーカーコード領域周辺のメチル化状態

赤字の遺伝子は nanog の発現との相関係数が 0.75 以上ある遺伝子。緑字の遺伝子は相関係数が 0.5 ~ 0.75 の遺伝子。

上記の結果から、遺伝子発現量とゲノム DNA のメチル化は必ずしも一致した挙動を示さず、それ故両方の観点から iPS 細胞等幹細胞の標準化を進める必要があることが明らかとなった。

(4) 目標の達成度と意義

中間目標（平成 23 年度末）としては、「樹立された未分化状態の iPS 細胞の DNA メチル化情報解析を完了する。」「樹立された未分化状態の iPS 細胞のヒストン修飾情報の解析を実施する。」を挙げている。前者に関しては、既にルーチンとして解析をする体制を整えており、23 年度末までの達成は可能となった。後者についても適切な ChIP 用抗体の選別を進めつつあり、目標は達成されつつある。昨今の急速な研究の進展に伴い、計画時にはなかった実施内容を追加したことにより、iPS 細胞等幹細胞の標準化を加速化できたことは意義深い。

III - C 国立大学法人東京大学担当分

1. 事業全体の成果

1. 1 研究開発項目① 「iPS 細胞の安定供給・大量精製・保存技術の開発」

東京大学 村田グループ

ゲノムインテグレーションの危険が無い iPS 細胞作成法として、分解可能なタンパク質因子や排出可能な低分子化合物、または、これらを複雑に混合した細胞質因子（例えば、ある時期の ES 細胞の細胞質など）の体細胞への導入法が考えられる。実際、山中らによる万能性誘導に必要な 4 つのタンパク質因子の発見は、タンパク質の寿命や濃度を最適に制御することによって、核のリプログラミングが十分可能になることを示唆している。しかし、この 4 つのタンパク質因子を高濃度で同時に細胞に導入し機能させることは至難の業である。

本開発研究では、その問題克服のための有用な技術として「セミインタクト細胞リシーリング法」を用いた。また、核のリプログラミング誘導に関わるタンパク質因子や低分子化合物のスクリーニングやその作用メカニズムの解析に、「セミインタクト細胞可視化アッセイ」を用いた。セミインタクト細胞とは、連鎖球菌の酵素感受性毒素であるストレプトリシン 0 (streptolysin 0: SLO) などを形質膜に作用させることにより、形質膜を部分的に透過性にした細胞である。オルガネラや細胞骨格はインタクトに保持したまま、細胞質を流出させる、ここ（細胞を一個の試験管に見立てて）に新たに外部より分画した細胞質成分と ATP 再生系などを添加し、細胞質に依存的な様々な細胞内のイベント（転写、翻訳、タンパク質輸送、分解過程、タンパク質間相互作用など）を再構成できる。また、光学顕微鏡下の単一細胞内で生起する再構成された生命現象を生物物理学的、生化学的に解析できる。

本開発研究では、村田グループが独自に開発してきた「セミインタクト細胞リシール技術」の利点をフルに活用し、万能性誘導に関わる山中の 4 因子のリコンビナントタンパク質 (His-Oct4, GST-Sox2, GST-Klf4, GST-c-Myc) 導入によるインテグレーションの無いゲノムを持った iPS 細胞の作成を目指した。最終的に、GFP-Oct4 とその上流配列をノックインした調製したマウスに MEF 細胞 (MEF-GFP-Oct4) をセミインタクト MEF 細胞にし、そこに L5178Y 細胞質と山中の 4 因子タンパク質を導入したリシール細胞から、多数の iPS 様コロニーを勘弁に得る方法を構築した。光学顕微鏡による経時観察の結果、リシール後 10 時間経過頃から、GFP-Oct4 陽性細胞が観察されはじめ、その後、GFP-Oct4 陽性細胞が次々と集合して、リシール後 20 時間～30 時間頃には平均直径～100 μm の iPS 様コロニーが形成される様子が観察された。そして、リシール後 20 時間～30 時間頃には、Oct4/Nanog/SSEA1 などの iPS 細胞形成のマーカータンパク質全てに陽性の iPS 様コロニー (直径 100～200 μm) を形成したが、5～7 日後からは iPS 様コロニー内の細胞増殖は停止し、目的の iPS 細胞形成には至らなかった。しかしリシール法は細胞内環境の改変を再現性よく解析できることが分かり iPS 細胞樹立過程の解析に利用可能と考えられた。

1. 1 研究開発項目② 「iPS 細胞の各種性状解析」

東京大学 塩田グループ

<p>a) セミインタクト細胞リシーリング技術を用いた iPS 細胞の作成条件の検討</p> <p>③セミインタクト細胞可視化アッセイを用いた万能性誘導因子の作用機序の解析</p> <p>a) 万能性化誘導の初期過程に生起する核内イベントの可視化法の開発</p> <p>b) 万能性化誘導因子の作用メカニズムの可視化解析</p>	<p>や各種細胞質を導入したリシール MEF 細胞を様々な条件で培養し続けることにより、Oct4-GFP、内在性 Oct4、Nanog、膜タンパク質 SSEA1 などの万能性マーカータンパク質陽性細胞コロニー(直径 100~200 ミクロン)多数を、リシール後 3 日以内で作成する条件を発見した。しかし、5 日以降で細胞増殖が停止し、コロニーはそのまま脂肪細胞へと分化してしまう結果となった。リシール後 4 日以降のコロニーに対して、細胞増殖能獲得に様々な生育条件を試したが、最終的に iPS 細胞獲得には至らなかった。(しかし、少なくとも、タンパク質導入法により、導入タンパク質や細胞質の暴露による核内エピジェネティクス状況変化を誘導できたことで、今後の新しく安全な細胞形質転換法として利用できることがわかった。)</p> <p>GFP-Oct4 遺伝子をノックインしたマウス MEF 細胞を用い、山中 4 因子や各種細胞質を導入したセミインタクト MEF 細胞のリシール細胞を、リシール直後から単一細胞レベルで経時的に蛍光観察するアッセイ系を構築した。これにより、リシール初期過程における GFP-Oct4 の発現の時間的経過や GFP-Oct4 陽性細胞集団の動態解析を行い、セミインタクト細胞リシール法による iPS 細胞作成には、導入タンパク質の一時的な暴露によるマーカータンパク質の発現は十分可能であること、しかし、その細胞の増殖能を活性化するにはそれらタンパク質発現のタイミングを考慮すべきこと、などがわかった。むしろ、山中の 4 因子やウイルス法による iPS 細胞作成の条件にこだわらず、①で構築したスクリーニング系を用いた万能性誘導因子タンパク質選別のやり直しなど、全く新規の方法論を展開すべきであることがわかった。</p>	<p>○</p>
<p>研究開発項目②「iPS 細胞の各種性状解析」</p> <p>④作成・選別された iPS 細胞のエピゲノム解析を基礎とした細胞評価系の開発</p> <p>a) 既存の iPS 細胞の D-REAM 法によるエピゲノム解析とエピゲノム情報をベースとした細胞標準化のための検討</p> <p>b) セミインタクト細胞リシーリング法で作成した iPS 細胞のエピゲノムによる評価・選別</p> <p>c) D-REAM 法と高速メガ・シーケンスを組み合わせた改良法によるヒト iPS 細胞のエピゲノム解析と安全な iPS 細胞の作成法の改良・評価・選別法の開発</p>	<p>正常な ES 細胞の D-REAM 法に基づくエピゲノム解析の結果から、iPS 細胞の評価には、①分化多能性に関与することが知られている因子の遺伝子、②母細胞の組織・細胞特異的遺伝子、③反復配列を含む非遺伝子領域の DNA メチル化プロファイルの解析が重要であることが分かった。特に反復配列を含む分化多能性細胞の DNA メチル化プロファイルの特徴はマウス・ヒトで共通している部分が多く、D-REAM 法に基づくエピゲノム評価法はマウス・ヒトともに有効であり、標準 iPS 細胞の評価に成功した。エピゲノム解析結果を基にし、少量サンプルでのセミインタクト細胞リシーリング法での iPS 細胞の評価も可能になった。これらの情報を基盤とすることにより、安全な iPS 細胞の作成法の改良・評価・選別法の開発が可能になる。</p>	<p>○</p>

2. 研究開発項目ごとの成果

2. 1 研究開発項目① 「安全かつ効率的な iPS 細胞作製のための基盤技術の開発」

東京大学・大学院総合文化研究科
村田グループ

1. 事業の目的と背景

本事業の目的は、1) 東大・村田グループが独自に開発してきた「セミインタクト細胞リシール法(細胞質交換法)」を用い核内ゲノムの初期化を達成し、タンパク質導入だけによる、ゲノムインテグレーションのない安全な万能性幹細胞作成技術を確認する。2) その方法で得られた iPS 細胞の効率的作成と安全性・安定性の確保を目的とし、独自に開発したゲノム全域 DNA メチル化法 D-REAM とメガ・シーケンス法を組み合わせた「エピゲノム解析」を実行することで、エピゲノム情報を基盤にした全く新しい iPS 細胞作成・評価システムを創成することである。

万能性幹細胞の作成技術として、これまでは、細胞融合法、核移植法が主に用いられていたが、最近ではヒト卵子を扱うという倫理上の問題と安定な卵子の供給の困難さの問題を一度にクリアした山中らの確立した誘導法が使用されている。しかし、万能性誘導因子発現をレトロウイルスベクターに依存していること、細胞の形質転換に伴う癌化細胞の混在や iPS 細胞化の基本メカニズムが解明されていないこと、形質転換効率の低さによる十分な iPS 細胞数取得の困難さ、そして、その安全性と有用性の指標となる細胞評価法が無いことなどが、再生医療や遺伝子治療への応用を考える上での実質的な問題となっている。本研究では、村田グループが独自に開発してきた「セミインタクト細胞アッセイ」及び「セミインタクト細胞リシール技術」の利点をフルに活用し、万能性誘導因子(特に、タンパク質)のスクリーニング系を構築し、スクリーニングで得られた因子をもとにタンパク質誘導によるインテグレーションの無いゲノムを持った iPS 細胞の作成を目指す。

2. 事業内容と目標

ゲノムインテグレーションの危険が無い iPS 細胞作成法として、分解可能なタンパク質因子や排出可能な低分子化合物、または、これらを複雑に混合した細胞質因子(例えば、ある時期の ES 細胞の細胞質など)の体細胞への導入法が考えられる。実際、山中らの 4 つのタンパク質因子の発見は、タンパク質の寿命や濃度を最適に制御することによって、核のリプログラミングが十分可能になることを示唆している。しかし、上記 4 つのタンパク質因子の作用過程や細胞質・核内でのタンパク質ネットワークや相互作用カスケードが不明の現状では、iPS 細胞化に必要なタンパク質の種類とその機能発現のタイミングを制御すること、そして、多種類(数十種類が必要かもし

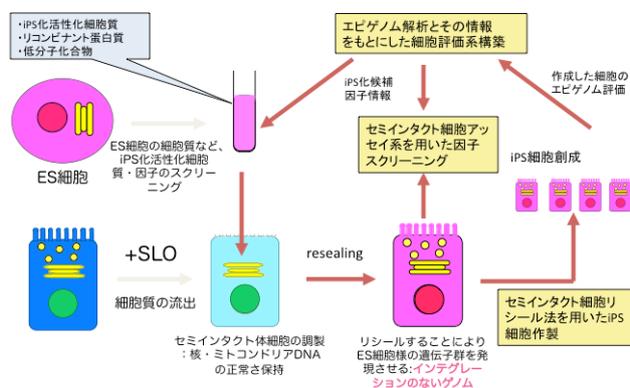


図1 セミインタクト細胞リシール法を用いた iPS 細胞創成の概念図:

れない!) のタンパク質を高濃度で同時に細胞に導入し機能させることは非常に困難である。

本開発研究では、その問題克服のための有用な技術として「セミインタクト細胞リシーリング法」を用いる。また、核のリプログラミング誘導に関わるタンパク質因子や低分子化合物のスクリーニングやその作用メカニズムの解析に、「セミインタクト細胞可視化アッセイ」を用いる。セミインタクト細胞とは、連鎖球菌の酵素感受性毒素であるストレプトリシン0 (streptolysin 0: SLO) などを形質膜に作用させることにより、形質膜を部分的に透過性にした細胞である。オルガネラや細胞骨格はインタクトに保持したまま、細胞質を流出させる、ここ(細胞を一個の試験管に見立てて)に新たに外部より分画した細胞質成分と ATP 再生系などを添加し、細胞質に依存的な様々な細胞内のイベント(転写、翻訳、タンパク質輸送、分解過程、タンパク質間相互作用など)を再構成できる(図1)。また、光学顕微鏡下の単一細胞内で生起する再構成された生命現象を生物物理学的、生化学的に解析できる。これらリシール技術を利用し、具体的には以下の項目について研究開発を進める。

①セミインタクト細胞を用いた万能性誘導因子の可視化スクリーニング系の開発と実行

セミインタクト細胞可視化アッセイ技術と Oct4-GFP をノックインした Mef 細胞株を用い、今までに報告されている誘導因子(タンパク質、化合物など)の有効性を、Oct4-GFP などの遺伝子産物の発現を指標に評価する実験系を構築する。それを用い、万能性化誘導タンパク質を含むタンパク質因子を中心に、万能性化誘導に関わるエピジェネティクス改変誘導因子のスクリーニング・評価を行う。

②セミインタクト細胞リシール法を用いた iPS 細胞の作成法の開発(村田グループ、塩田グループ) :

上記項目①で評価した万能性誘導因子(タンパク質、細胞質、低分子化合物など)やエピジェネティクス改変因子をセミインタクト細胞化した MEF 細胞またはマウス個体より調製した初代培養繊維芽細胞などに導入し、セミインタクト細胞リシーリング法を駆使してインテグレーションのない状態(タンパク質成分のみの導入)で iPS 細胞を実際に作成する。同時に、リシール後できるだけ早い時期に(少数の細胞で)導入したタンパク質が未分化マーカータンパク質(Oct4, Nanog や細胞表面タンパク質マーカー HESCA-1 等)の発現を誘起することを検出・解析・追跡する。

③セミインタクト細胞可視化アッセイを用いた万能性誘導因子の作用機序の解析(村田グループ、塩田グループ) :

上記項目①で構築した万能性化誘導タンパク質因子またはエピジェネティクス改変因子の評価系を用い、万能性化誘導の最も初期(誘導後1~2日目)に誘起される核内イベント(Oct4 遺伝子発現制御に関わるエピジェネティクス変化など)の可視化解析を行い、万能性化誘導のトリガー探索とその誘導メカニズム研究を行い、セミインタクト細胞リシール法を用いた iPS 細胞作成法にフィードバックし、安全でより効率的な iPS 細胞作成法を構築する。

3. 研究成果

①セミインタクト細胞を用いた万能性誘導因子の可視化スクリーニング系の開発と実行

セミインタクト細胞可視化アッセイ技術とGFP-Oct4ノックインしたMEF細胞株を用い、山中らの同定した4種の万能性化誘導タンパク質因子を用いた、万能性誘導細胞質・因子の評価及び解析系を構築した(図2)。具体的には、GFP-Oct4とそのプロモーター領域を含む上流配列と共にノックインしたマウスよりMEF細胞を調製した。この細胞を②で設定した条件下でセミインタクトMEF細胞にし、L5178Y細胞質と山中の4因子のリコンビナントタンパク質

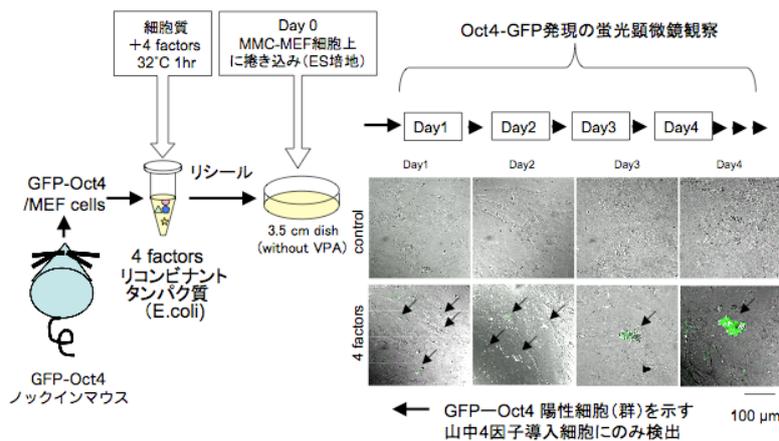


図2 GFP-Oct4 ノックイン MEF 細胞を用いた iPS 細胞化誘導因子の評価系とその作用機序解析系の構築

(His-Oct4, GST-Sox2, GST-Klf4, GST-c-Myc) を導入後リシール(再封入)した。この他の導入細胞質・タンパク質群として、L5178Y細胞質と山中の3因子(His-Oct4, GST-Sox2, GST-Klf4)を導入したもの、L5178Y細胞質の代わりにES細胞細胞質を導入したもの、ES細胞細胞質のみ導入したもの、などを用いた。リシール細胞をMMC処理したフィーダーMEF細胞が前培養されているφ35mm dishに巻き込み、直ぐにES細胞用培地で培養を開始した。細胞質が置換されたリシールMEF細胞におけるGFP-Oct4の発現(GFP蛍光)を蛍光顕微鏡下で経時的観察した。

その結果、4因子導入のリシール細胞でのみ、1日目からOct4-GFP陽性の細胞が現れ始め、2~3日後にはその細胞が細胞集団となって増殖して行く様子が観察された(③で詳述)。細胞集団(細胞数として~100個前後、コロニーには未だなっていない)数は、35mm dish 当たり約5個見いだされた。この他の条件では、GFP-Oct4のシグナルは見いだされるが、細胞塊ができる前に死滅することが多くみられた。興味深いことに、リシール後のGFP-Oct4発現細胞では、GFP-Oct4の細胞内局在パターンが2種類に分かれて観察された。一つは、核内への局在パターンであり、もう一方は細胞質に局在化するパターンである。後者のパターンの場合は、細胞の増殖前に死滅することが多かった。

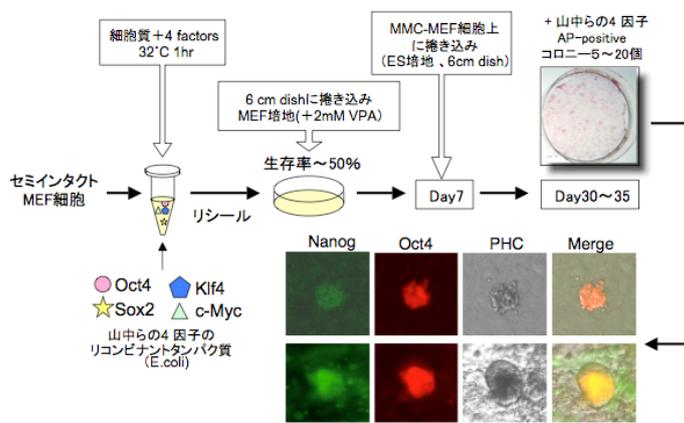


図3 セミインタクト細胞リシーリング法を用いた iPS 細胞作成技術の基本プロトコル

ここで構築した可視化スクリーニングシステムにより、24~96wellの細胞培養プレート内の単一~数十個の細胞内のGFP-Oct4発現状態を指標に、万能性誘導因子が簡便にスクリーニングすることが可能となった。

②セミインタクト細胞リシール法を用いた iPS 細胞の作成法の開発

まず、セミインタクト細胞リシール技術の再現性・効率向上の条件を検討した。その結果、図3に示すプロトコルを用いることにより、再現性が良く、生存率の高いリシールMEF細胞が得られることがわかった。次に、マウスES細胞質や山中らの4因子等を様々な条件下で具体的には、 $\sim 10^5$ 個のMEF細胞タンパク質因子導入・リシール後、60mm dishに巻き込み、2mM バルプロ酸(VPA)存在下のMEF用培地で7日間培養した。7日目に生存している細胞を全てdishからはがし、MMC処理したMEF細胞をフィーダー細胞として巻き込んだdishにおいてES細胞用培地でさらに30~35日培養した。その結果、L5178Y細胞質と山中のタンパク質4因子のリコンビナントタンパク質を導入したリシールMEF細胞において、リシール後30以後にiPS細胞様コロニー(直径<100 μ m)が観察された。このコロニーは、アルカリホスファターゼ染色陽性コロニーであったが、コロニー形成効率は約0.001%であった。このiPS細胞様コロニーをピックアップし、MMC処理したフィーダーMEF細胞が前培養されている ϕ 35mm dishに巻き込んだところ、5~10日後に同様なコロニーが多数形成されたが、Oct4/Nanog染色陽性のコロニーは3種だけであり(図3右下写真)、これらのコロニーはその後生育を止めたままの状態となった。以上の結果を踏まえて、その後、(1)リシーリングMEF細胞の選択、(2)MMC処理したフィーダーMEF細胞の種類と巻き込み数等の条件、(3)ES培地への交換時期、などに検討を重ね、以下の条件で得たリシールMEF細胞において、効率の良いiPS細胞様コロニー(Oct4染色陽性)をえることがわかった。リシール細胞はマウスより調製した新鮮なMEF細胞をP3~4の条件で用い(1)、同じくマウスより調製したフィーダーMEF細胞を薄く巻き込む(2)、そして、リシール細胞は調製後直ぐにES細胞用培地で培養する(3)などである。また、フィーダー細胞フリー用の市販のiPS細胞用培地(Millipore製)を用いることにより、リシール後の細胞の培養にはフィーダー細胞は不必要ともなった。しかし、リシール直後のタンパク質導入MEF細胞を経時観察するシステムを開発し、その増殖の様子を単一コロニー単位で追跡した結果、リシール後7日以降では、細胞増殖がほとんどのコロニーで停止していることもわかった(③結果で詳述)。

③セミインタクト細胞可視化アッセイを用いた万能性誘導因子の作用機序の解析：

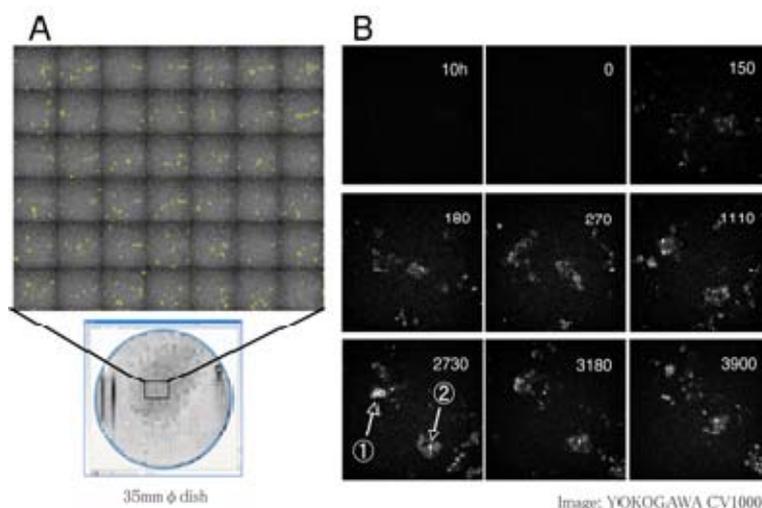


図4 セミインタクト細胞リシール法により形成された GFP-Oct4 陽性 iPS 様コロニーの形成過程の経時変化

今までの条件検討により、セミインタクト細胞リシール技術と用い、GFP-Oct4をノックインしたマウスより調製したMEF細胞に、山中の4種の万能性誘導タンパク質因子(Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc)を導入したリシール細胞を簡便に、しかも大量に調製できる基本プロトコルを確立した。この確立した方法によって、4因子タンパク質導入直後から、リシール細胞の形態・性状変化を

GFP-Oct4発現や発現細胞のコロニー形成状態の時間変化などを指標に追跡した。観察の結果、リシール後10時間経過頃から、単一のGFP-Oct4発現細胞が観察されはじめ、その後、GFP-Oct4陽性細胞が次々と集合して、リシール後20時間～30時間頃には平均直径～100 μm のiPS様コロニーが形成される様子が培養dishのいたるところで観察された(図4A)。このiPS様コロニーは、リシール後40時間経過頃から大きく2種類の運命をたどることが観察された。一つは、形成されたコロニーからGFP-Oct4細胞が分離して行き結果的にコロニーが崩壊するもの(図4B:矢印①)、一方は、コロニー形成が停止し、そのまま直径約～100 μm の大きさで増殖または細胞集合が停止するものである(図4B:矢印②)。後者のコロニーは、その殆どがリシール後5日経過頃から脂肪細胞様に形態が変化した。興味深いことに、リシール後20時間～30時間頃に形成されるiPS様コロニーは、Oct4/Nanog/SSEA1などのiPS細胞形成過程で段階的に発現が知られているマーカータンパク質全てに陽性を示した。この様な、同時的なマーカータンパク質の発現は、タンパク質導入法によるiPS細胞作成法の利点であると同時に、発現のタイミングを操作できないという難点でもある。そこで、次に、リシール操作自体が標的細胞の遺伝子発現にどのような影響を与えるかを調べるとともに、リシール操作だけによるOct4-GFPの発現が誘導されるかどうかを検証するため、野生型マウス(GFP-Oct4をノックインしていないマウス)から調製したMEF細胞の「リシール処理」による遺伝子発現への影響を検討した。まず、MEF細胞をセミインタクトにしL5178Y細胞質を添加したあとリシール操作を施した。一晚培養後mRNAを抽出し、Whole Mouse Genome Oligo Microarray (Agilent社)を用いて遺伝子発現解析を行った。マイクロアレイ解析の結果、リシールした細胞でも遺伝子発現パターンはインタクト細胞とほぼ同一であることがわかった(相関係数>0.98)。少数ではあるが、顕著に発現量が上昇した遺伝子は、Slc7a11(アミノ酸トランスポーター)、Gsta1~4(グルタチオン転移酵素)、Pr12c3(サイトカイン)、Hmox1(ヘムオキシゲナーゼ1)、Akr1c18(アルド-ケト還元酵素)であり、顕著に発現量が減少した遺伝子はMyh2(ミオシン重鎖)、My11(ミオシン軽鎖)、Cnn1(カルモジュリン・アクチン結合タンパク質)、Gjb2(ギャップジャンクション構成タンパク質)であった。しかし、リシール操作のみによってOct4など山中4因子の発現は見られなかった。

以上の結果から、山中4因子導入後のリシール細胞内では、iPS細胞マーカータンパク質が、導入タンパク質に依存して発現しているにもかかわらずiPS細胞となり得ない原因の一つは、リシール後約2日以後に細胞増殖が停止することであると判断した。そこで、山中4因子と様々な阻害剤の組み合わせ、万能性誘導培地の種類・添加時期、リシール細胞の数と巻き込むためのdish形状など、様々な条件下でのより大型で増殖能を持つiPS様コロニー生成条件を検討した。その結果、リシール後の細胞を巻き込むdishの底面積が小さく、逆ピラミッド型底面を持つdishにおいて、4因子導入のリシール細胞、及び、Oct4, Klf4のタンパク質因子2因子と三種阻害剤(VPA (final 0.5mM) : HDAC inhibitor, CHIR99021 (final 3 μM):GSK3 β inhibitor, RepSox (final 1 μM) : transforming growth factor (TGF)- β inhibitor) 混合処理細胞において、今までよりも高効率で直径の大きい(>200 μm) Oct4-GFP 陽性のiPS様コロニー形成を達成した。しかし、これらの大型コロニーの殆ども7日以降の増殖は停止し、脂肪細胞様に変化するものが多かった。

興味深いことに、GFP-Oct4発現細胞の核のGFP染色パターンは2種類有り、一つは、マウス細胞特有のサテライトDNA領域などを中心にヘテロなGFP染色像が観察されたが、他方の細胞群の核は均一なGFP染色像が見られた。今後、この核の状態が異なる2種類の細胞を本可視化システム

で追跡することで iPS 細胞形成過程の解析が十分可能であることがわかった。

2. 2 研究開発項目②「iPS 細胞の各種性状解析」

東京大学・大学院農学生命科学研究科

塩田グループ

1. 事業の目的と背景

これまでES細胞やiPS細胞、およびそれらを分化誘導させて作られる分化細胞の評価には主に少数の遺伝子セットからなるトランスクリプトーム解析が用いられてきた。しかし、転写はヒストン修飾とDNAメチル化によって制御されており、さらに主要な組織特異的遺伝子発現は、DNAメチル化プロファイルに反映される。DNAメチル化プロファイルは、ゲノム上に膨大にある細胞・組織依存的メチル化領域 (Tissue dependent differentially methylated region、T-DMR) の細胞ごとのメチル化状況の組み合わせからなり、マウス組織のDNAメチル化プロファイル解析から、細胞・組織特異的な遺伝子発現に重要な転写因子、そしてそれらが結合し制御する遺伝子の両者が協調的に制御されていることが分かった。また、DNAメチル化プロファイルは、分化多能性を示すES・EG間でも異なっており、さらに重要なことに、ほとんどは正常であるものの、一部に異常を呈すようになるクローン動物でも違いが検出される。すなわち、DNAメチル化プロファイルの解析は、細胞の特徴や細胞同士の類似性、違いを明確にすることを可能にし、細胞の評価に有用な情報を与える。

本研究では、塩田グループが開発したD-REAM法を中心としたエピゲノム解析法を駆使し、リシール法などで得られた iPS 細胞の DNA メチル化プロファイルを指標とした、効率的でシステムティックな細胞評価系を構築し、上に挙げた現在の iPS 細胞作成時の諸問題を改善し、品質が標準化された iPS 細胞の作成を目指す。

2. 事業内容と目標

本研究では、ゲノム上にある膨大なT-DMRから構成されるDNAメチル化プロファイルを解析するために、D-REAM法を主に用いる。塩田グループが独自に開発したD-REAM法は、メチル化感受性制限酵素とゲノムタイリングアレイを組み合わせ、低メチル化領域を検出する方法であり、すでにマウスES細胞とEG細胞の違いを、全体のDNAメチル化プロファイル違いを利用して区別することが可能であることを示しており、本研究で作製するiPS細胞のDNAメチル化を指標とした評価にも応用することが可能である。

D-REAM法は制限酵素を解析に用いるため、ヒト細胞ではゲノム変異 (SNP s) の影響を考慮する必要がある。そのため本研究においてD-REAM法と高速メガ・シーケンスを組み合わせ改良法を開発し、ヒトiPS細胞の評価を行う。具体的には以下の項目について研究開発を進める。

④作成・選別されたiPS細胞のエピゲノム解析を基礎とした細胞評価系の開発：

既存のiPS細胞と新たに作成・選別されたiPS細胞を、D-REAM法によるエピゲノム解析、さらに他のDNAメチル化解析 (COBRA法やバイサルファイトシーケンシング法など) やヒストン解析法

と組み合わせることにより、エピゲノム情報をベースとした細胞標準化のための検討を行う。同時に、セミインタクト細胞リシーリング法で作成したiPS細胞のエピゲノムによる評価・選別を、できるだけ早い時期（少量の細胞）に行うため、ES細胞のエピゲノム解析により選択したT-DMRからなるDNAメチル化プロファイルの解析を、マイクロチップリアルタイムPCR装置を用いて行う。

さらにD-REAM法と高速メガ・シーケンスを組み合わせた改良法を開発し、ヒトiPS細胞のエピゲノム解析の精度を向上させる。これらの情報をフィードバックさせることにより、安全なiPS細胞の作成法の改良を進めるとともに評価・選別法を開発する。

3. 研究成果

④作成・選別されたiPS細胞のエピゲノム解析を基礎とした細胞評価系の開発：

④-1 エピゲノム解析を基礎とした細胞評価系の開発：

これまでの解析から、成体を構成する細胞、組織がその特徴的な機能を発揮し、機能を維持していく基盤には DNA メチル化を含めたエピジェネティック機構が重要であることが分かってきている。また組織・細胞特異的な遺伝子の転写制御に重要な転写因子のプロモーターには、組織・細胞依存的にメチル化状況の変化する部位 T-DMR があり、T-DMR のメチル化状況と付随するヒストンの修飾状況の組み合わせにより転写が制御されている。T-DMR は少なくともゲノム上に数千カ所あり、それらのメチル化状況の組み合わせ、DNA メチル化プロファイルも組織・細胞特有のものである。

iPS 細胞という未知の細胞の正常性を評価するにあたり、基準となる正常な細胞を調べる必要がある。まず始めに、プロモーター領域に焦点を当てた D-REAM 法により、分化多能性の基準細胞である ES 細胞およびマウス正常組織のゲノムワイド DNA メチル化解析を進めた(図5)。さらに ES 細胞のエピゲノム解析の結果を基にした DNA メチル化プロファイルを用い、京都大学山中等によって樹立された、キメラ形成能を有することが確認されている iPS 細胞の解析を行った。

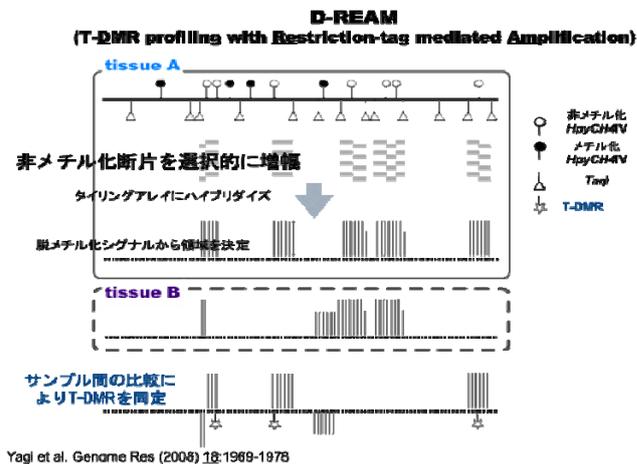


図5 D-REAM 法の原理。メチル化感受性酵素 HpyCH4IV で切断した断片を選択的に増幅させ、マイクロアレイとハイブリダイズさせた後、バイオインフォマティクスにより切断部位(脱メチル化サイト)を決定する。異なるサンプル間のシグナルを比較することにより、組織・細胞依存的にメチル化の度合いの異なる部位、T-DMR を同定する。

マウス ES 細胞の DNA メチル化解析は、正常個体の分化した組織（肝臓、脳、腎臓）を対照とすることにより行った（図6）。その結果、ES 細胞の DNA メチル化プロファイルは、1）分化多能性の獲得と維持に重要である山中 4 因子を含めた転写因子と、その標的遺伝子にある T-DMR が脱メチル化状況にあること、2）成体組織で組織特異的に発現する遺伝子の T-DMR がメチル化状況にあることを特徴とすることが分かった。また iPS 細胞の樹立を促進することが報告されている Sal14 の標的部位が、体細胞で発現するメチル化されている T-DMR を持つ遺伝子に集中している

ことが分かり(図7)、Sall14 が iPS 細胞樹立の課程で組織特異的遺伝子の抑制に関与することが示唆された。

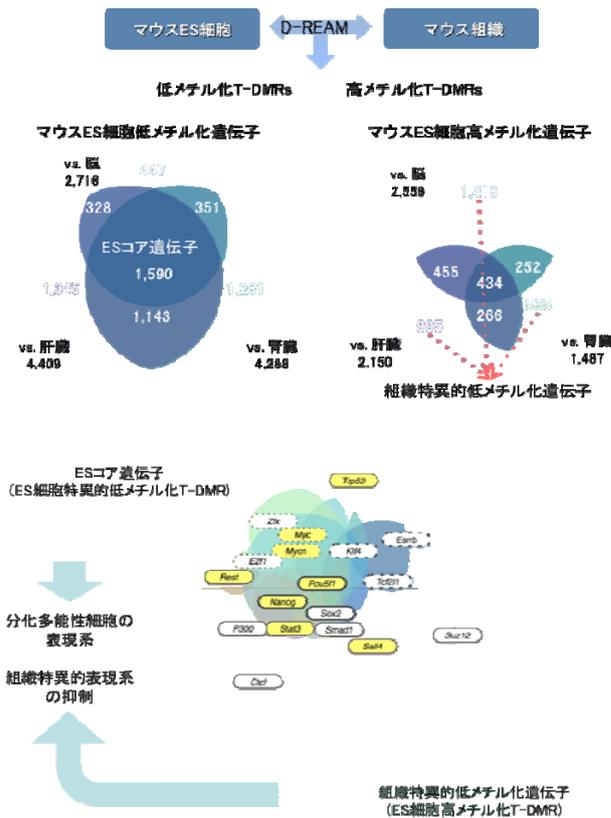


図6 マウスES細胞のT-DMRを持つ遺伝子の同定。マウスES細胞のD-REAMデータを脳、肝臓、腎臓と比較し、すべての臓器に対して脱メチル化しているT-DMRを持つ遺伝子をESコア遺伝子、それぞれの臓器に対してES細胞の方がメチル化されているT-DMRを持つ遺伝子を組織特異的低メチル化遺伝子とし、解析した。

明確になったES細胞のDNAメチル化プロフィールは、これまでに樹立された他の分化多能性細胞であるEC細胞にも共通しており、さらにキメラ形成能を示したiPS細胞でも高度に類似していた(図8)。特に分化多能性の発現・維持に関わる遺伝子はiPS細胞でも脱メチル化状況にあった。またiPS細胞の親株のメチル化状況を比較すると、ES脱メチル化T-DMRの多くはiPS細胞産生効率の良いMEFですでに脱メチル化状況にあることも分かり、親株のメチル化状況がiPS細胞産生効率に大きな影響を与えていることが示唆された。

その一方組織特異的発現遺伝子のT-DMRの一部は、iPS細胞の元細胞の特徴を一部残しており、ESと比較して不完全な状態にあることが分かった(図9)。そして不完全なT-DMRの割合は、キメラ形成率の低いiPS細胞により顕著であった。このことは、ES細胞のエピゲノムを基準にすることによりiPS細胞の評価が可能であることを示している。

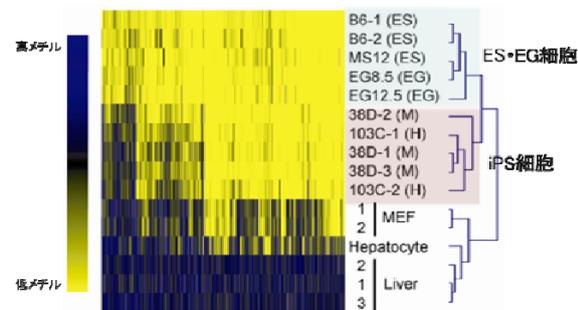


図8 ES細胞で脱メチル化されるT-DMR(ESコアT-DMR)によるiPS細胞の評価 iPS細胞では分化多能性幹細胞の機能発現に強く関与するESコアT-DMRの脱メチル化プロフィールはほぼ正常に形成されている。

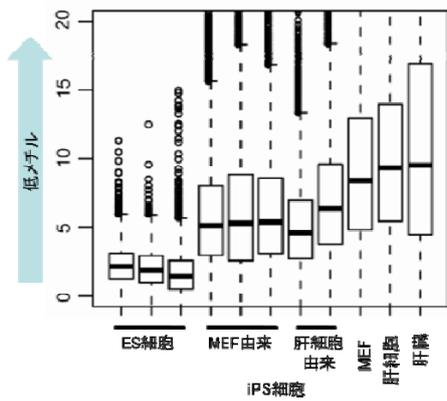


図9 iPS細胞の不完全なメチル化 iPS細胞ではES・EG細胞でメチル化され、iPS細胞の親細胞では脱メチル化されている領域のメチル化が不完全で有り、その状況は株によって異なっている。

④-2 マウス iPS 細胞の不完全な DNA メチル化プロフィールと分化多能性についての解析

マウス ES 細胞の DNA メチル化プロフィールに基づく解析による iPS 細胞の評価が可能であることを検証するため、京都大学山中研でキメラ形成能評価済みの、さらに複数の iPS 細胞の解析を行った。

キメラ形成能が著しく低く、高頻度に癌化するマウス尾部線維芽細胞由来株は、ゲノム全域に脱メチル化傾向を示し、その一方、分化多能性を代表する EShypo T-DMR の脱メチル化も不十分で有り、DNA メチル化プロフィールは分化多能性細胞の性質とも正常生体組織のものとも著しく異なる。一方高いキメラ能を示す胃上皮細胞由来株は、EShypo 遺伝子、EShyper 遺伝子領域ともに ES 細胞同様のメチル化状況を示した(図 10)。すなわち、解析に加えた iPS 細胞においても、キメラ形成能の低さとエピゲノムの不完全さに一定の関連があることを確認した。

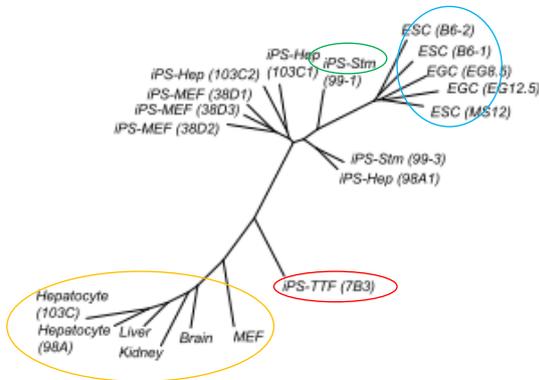


図10 マウス ES 細胞脱メチル化 T-DMR(コア T-DMR) による iPS 細胞の分類。尾部線維芽細胞由来 iPS 細胞は他の分化多能性細胞とは著しく異なる細胞として分類され(赤囲み)、体細胞のクラスター(黄囲み)近傍に配置される。一方胃上皮細胞由来の iPS 細胞(緑囲み)は ES・EG 細胞(青囲み)に最も近い位置に分類された

これらの株を試験管内神経分化培養系に供し、神経分化能を比較したところ、分化培養系のみでは判断できない情報を DNA メチル化プロフィールが表していると考えられる。

神経分化が正常でなかった株については、分化後の発現プロフィール解析を行った。発現異常を起こす染色体に偏りがあった。

④-3 ゲノム配列とエピゲノム情報についての解析

これまでに示したように、分化多能性を示す細胞である ES と iPS 細胞のエピゲノム上の特徴は高度に類似しているおり、遺伝子の機能で分類した場合に、分化多能性に関わる遺伝子の脱メチル化、最終分化した組織・細胞で発現する組織特異的遺伝子のメチル化が特徴である。しかしゲ

ノムのほとんどの領域は非遺伝子領域で有り、非遺伝子領域を含めたエピゲノムとゲノムとの関連を調べることにより、iPS 細胞におけるエピゲノム異常・染色体異常につながる有用な情報が得られるのでは無いかと考え、ES 細胞を特徴付ける T-DMR 近傍のゲノム配列の特徴を調べた。

配列上の大きな特徴の一つは、脱メチル化している T-DMR の近傍には、CpG が多いという共通する配列的特徴があり、脱メチル化している T-DMR を持つ遺伝子には、CpG アイランドを転写開始点付近に持つ遺伝子が有意に多く含まれることを見いだした。すなわち高い CpG 頻度が分化多能性の獲得と維持に重要なゲノムの特徴の一つである。

さらに驚いたことにこれまで分かってきた分化多能性の維持に重要な機能を担う遺伝子以外に、これまでその重要性が軽視されてきた可動性遺伝因子の分布に有意な偏りがあることが分かった。EShypo 遺伝子の周辺にはマウス優占種の SINE である B1, B2 が多く、EShyper 遺伝子周辺には LINE が有意に多かった (図 11)。この結果は、遺伝子領域だけでは無く非遺伝子領域を含めた解析が重要であることを強く示唆している。

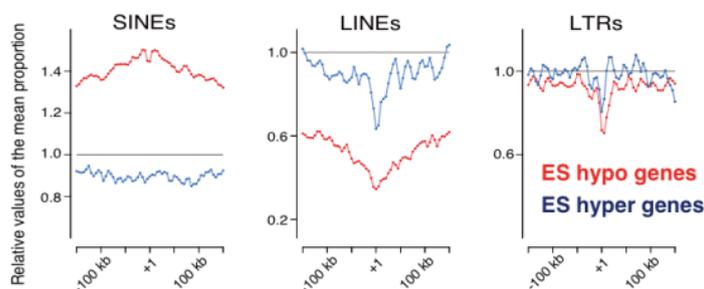


図11 マウス EShypo 遺伝子の周辺の可動性遺伝因子の密度。ES 脱メチル化 T-DMR の周辺に SINE が多く、LINE が少ない。

そこで T-DMR とゲノム配列の特徴を、非遺伝子領域を含め、より詳細に解析するため、フルタイリングアレイを用いた D-REAM 法を開発した。さらに D-REAM 法と高速メガ・シーケンス法を組み合わせた改良法によるマウス基準細胞のデータ取得を行った。フルタイリングアレイの結果はメガシーケンシングの結果を解析する上で重要な情報となり、また期待通りの解像度の結果を得ることができた。

これらの DNA メチル化プロフィールを構成する T-DMR を検索・可視化できるデータベースを作成した。

④-4 ヒト標準 iPS 細胞の D-REAM 解析

マウス ES 細胞の DNA メチル化プロフィール情報を基にマウス iPS 細胞のプロファイリングを行うことが可能となったことを受け、ヒト ES 細胞の DNA メチルプロフィール解析を基盤としたヒト iPS 細胞のプロファイリングを行った。

ヒト ES 細胞のゲノム DNA を京都大学中辻憲夫博士研究グループにより供与いただき、D-REAM 法により DNA メチル化プロフィール解析を行った。マウス ES 細胞で確認された分化多能性細胞のエピゲノムとゲノムの特徴があることが分かった。

これらの情報を基にヒト iPS 細胞を D-REAM 法で解析したところ、iPS が分化多能性細胞に分類され、エピゲノムに基づく細胞の分類が可能であることが確認された。

④-5 セミインタクト細胞リシーリング法による iPS 細胞の評価

マイクロチップ PCR 装置を用いた少量多検体解析

マイクロチップ PCR 装置 (BioMark) を用いた解析系の開発を進めた。マウス ES 細胞のエピゲノム情報に基づいた、マウス iPS 細胞評価のための、少量細胞による遺伝子発現解析系の確立に成功した。この系、および少量サンプルでの DNA メチル化解析を用い、セミインタクト細胞リシーリング法により作出した iPS 細胞様コロニーの解析を行った。

IV. 実用化、事業化の見通しについて

IV - A 一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム担当分

1. 実用化、事業化の見通し

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

1. ①-1 新規多能性誘導因子の探索

新規 iPS 細胞誘導因子に関する特許出願 2 件（米国仮出願 1 件、PCT 出願 1 件）、高効率な iPS 細胞誘導法で米国仮出願を申請しており、知財確保を行っている。これらの知財のライセンスングについても検討しており、市場ニーズは大きい。現在、新規因子で作製されたマウスの長期の発がんテストを行っており、成果の実用化の可能性は極めて高い。

1. ①-2 多分化能誘導法を効率化する化合物の探索

Klf4 プロモーター活性化化合物に関しては、現在専門家が詳細な検討を進めている。本検証において、有効性が確認された場合、マウス ES 細胞と同等な性質を持った、霊長類初の ES 細胞の確立が可能となり、市場ニーズは極めて高いと考えられる。

また、センダイウイルス除去法に関しては、詳細な検証を①-3 グループで進めているが、再生医療での応用を考えないのであれば、開発した手法で十分応用が可能と考えられる。また、センダイウイルス除去物質に関しては、現在最終的な活性を確認中であるが、有効な活性が認められれば今後継続するグループへ予算に応じて提供することも可能である。

1. ①-3 安全な遺伝子導入法の開発

安全な遺伝子導入法の実用化の進捗状況としては、産総研が開発した iPS 細胞作製用 SeVdp ベクターは、22 年度は iPS4 拠点の 1 つ東京大学・医科学研究所で評価が開始された。それに続いて 23 年度からは京都大学・iPS 細胞研究所での評価も開始される予定で、実用化に向けた評価は順調に進捗している。今後は、これらの専門家からフィードバックされた評価情報と、産総研独自の研究成果とを組み合わせ、さらに実用化に向けた改良を重ねる予定である。

これまででは数多く樹立した iPS 細胞からごく少数の分化能が高い iPS 細胞を選び出す必要があったため、医療や創薬への応用はなかなか実現せず、いったん完成した良質の iPS 細胞を多くのユーザーが使うという状況であったためベクターそのものの市場ニーズが高いとはいえなかった。しかし、SeVdp ベクターが iPS 細胞作製の標準法として実用化されれば、個々の患者の末梢血から均質な iPS 細胞を樹立して医療や創薬・基礎研究に応用することが現実のものとなり、受託事業としても一気に普及することが期待されるので、幅広いニーズがあると予想される。実際に、論文発表後は海外からの問い合わせもあるので、日本標準ではなく世界標準にできるように頑張りたい。

SeVdp ベクターによる iPS 細胞の作製は産総研独自の特許に基づく成果であり、他に例をみない効果を持ったシステムなので、実用化できる可能性は極めて高い。ただ、この分野は非常に競争が激しく、新たな技術が出て成果はすぐに陳腐化してしまう恐れがある。常に世界のトップレベルの成果を目指して今後とも気を許さずに研究を続けたい。

1.② 研究開発項目② 「iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

iPS細胞等幹細胞やそこから誘導した分化誘導細胞の性質を規定する有用なマーカーの開発及び取得したマーカーを活用した選別、評価のための要素技術の開発は、安定した一定基準の分化細胞を再生医療等に供給するためには必須の開発項目である。研究開発項目②では、これらのマーカー探索を実施しているが、そのアプローチは先端科学を応用した方法により行っている。ひとつはモデル細胞系を用いる遺伝子発現解析を網羅的に行い、細胞の性質や特徴を評価し、選別するために有用なマーカー遺伝子を開発することである。もうひとつは、新たに見出されたMuse細胞を用いて、細胞学的あるいは構造蛋白的な解析を行い、細胞の性質や特徴を評価し、選別するために有用なマーカー物質の確立を目指している。

1.②-1 高感度 DNA チップを用いた発現解析技術を基盤とした iPS 細胞の選別・評価・製造技術等の開発

モデルiPS細胞において遺伝子導入後の初期遺伝子発現の解析が進んだので、今後ヒトiPS細胞等で変化の普遍性を追及していく。すなわち、1) 分化特性の喪失、2) 多分化能の獲得、3) 多分化能の維持・安定化に関連する遺伝子に焦点を絞り、マーカーとなりえる遺伝子の選択を行う。このことにより、遺伝子導入後のリプログラミング過程を明らかにしていくことが可能となる。

マーカー遺伝子を同定してもそれを実用化するには多くの問題がある。特にiPS細胞化過程の細胞がごく少数であるため、微量細胞からの網羅的遺伝子発現解析を行う技術の開発が必要となる。現在までに1,000個の細胞から、網羅的に遺伝子発現解析を行う技術を完成している。iPS細胞生成過程で形成されるコロニーの数は100-1,000個程度であり、コロニー毎に網羅的遺伝子発現解析することが重要であることから、本手法は今後のiPS細胞化メカニズム解析に威力を発揮すると期待される。

1.②-2 成体由来の多能性幹細胞の操作技術を基盤とした iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発

成人ヒトの間葉系細胞から新たな多能性幹細胞 Muse 細胞を見いだした。Muse 細胞は損傷組織に遊走、生着、分化し、組織修復に寄与することが明らかになった。多能性がありながら腫瘍性の無い Muse 細胞の特性は再生医療等の細胞移植において有効であると期待される。Muse 細胞の性質を解明することで再生医療等への応用の可能性を高めていく。

iPS 細胞のもつ最も画期的な臨床的側面は、さまざまな疾患の患者から皮膚などの組織を用いて疾患特異的 iPS 細胞を樹立できることである。疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究を進めるためには患者の病態を反映するような評価系を構築することが最も重要である。疾患特異的 iPS 細胞を用いて、患者の罹患している臓器の細胞に分化させ、その過程を分析することにより疾患の病因、病態解析につながると考えられる。この疾患モデル細胞は新規薬剤の開発、毒性の検定などに応用される。

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

1. ③-1 iPS 細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

健常者および遺伝性QT延長症候群由来のヒト iPS 細胞由来の樹立と心筋細胞への誘導は順調に経過しており、実用化は直前の状態まで進んでいると考えられる。これまで製薬業界では薬剤開発の際に、CHO 細胞等に hERG 遺伝子を発現させた細胞を用いて Ca⁺、Na⁺、K⁺イオンチャンネルの内K⁺チャンネルへの作用を見ることで、薬剤の催不整脈作用を判定してきた。いままで用いられてきた動物細胞ではなくヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を用いることにより、hERG 試験の精度が向上することが期待できる。更に今回の研究で本邦初の健常者、遺伝性QT延長症候群の心筋細胞が流通すれば、各種イオンチャンネルに対する作用を見ることも可能になる。

1. ③-2 iPS 細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

すでにプロトタイプのシステムは第2世代機プロトタイプまで完成しており、評価班での評価も進んでいる。引き続き、評価班、ユーザーフォーラム、外部製薬会社にプロトタイプを実際に評価してもらいながら、使用に際するさまざまな問題点のフィードバックを受ける。そのフィードバックを基にユーザーフレンドリーでより精度の高い実用機（第3世代機システム）の開発を目指す。更に国際標準化組織であるHESIやICH等での標準化についての検討対象となることで国際機関とともに標準化を目指すとともに、並行して国内外の有力製薬企業と実用化評価を共同で行い、実質的に世界標準の心筋毒性試験とすることを目指す。すでに実用化されている既存動物実験（AV-block犬モデル）と同程度以上の精度での結果が得られたことから、現状の技術においてすでに、成果の実用化の可能性は充分高いと思われる。そのためには、最適細胞、システム構築、システム評価を行う共同研究グループが協力して目標を達成することが必要である。創薬という観点では心毒性検査市場の規模は100億円～300億円以上あると考えられる。

2. 今後の展開

研究開発項目①「安全かつ効率的な iPS 細胞作製のための基盤技術の開発」および研究開発項目②「iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」については、実施体制の見直しにより、平成23年3月で終了した。

健康安心イノベーションプログラム「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発」の基本計画では、ヒトiPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発（平成20～25年度）を研究開発内容として記載している。研究開発計画で現在の研究開発項目③は研究開発項目②となる。本事業原簿においては旧研究開発項目③として以下記載する。

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

2. ③-1 iPS 細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

健常者および遺伝性QT延長症候群症例から樹立したiPS細胞から心筋細胞を効率的に分化誘導し、最適な細胞を広くユーザーに供給する。そのために細胞を大量培養する仕組みを検討する。さらに、これを安価に提供するためには培養液を開発する必要がある。心筋細胞のメタボローム解析、フラクソーム解析を行い、心筋細胞の代謝学的特徴を解析することで心筋細胞の純化精製を向上させる方法を構築する。今後はこうした問題を中心に開発を進める予定である。

2. ③-2 iPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

強制拍動刺激を心筋細胞に与え、同時に拍動刺激によって発生するノイズを除去した状態で細胞応答の変化を多点で計測できるシステムに改造を行い、細胞電位推定機能、細胞間伝達ゆらぎ計測機能、全自動波形解析機能・分析機能、薬剤濃度制御・モニター機能を有する操作自動化が可能な実用化プロトタイプ機となる第2世代実用化システム（第3世代機プロトタイプ）の構築を行う。第2世代システム開発に伴い、全自動波形解析ソフトウェア、細胞電位解析用ソフトウェアの開発を行う。

ヒトiPS細胞由来心筋細胞による、偽陰性・偽陽性薬剤の応答結果の正確性の改善の可能性の検討と、新しい計測法による偽陰性、偽陽性薬剤に対する応答正確性の改善の程度の評価を、既知薬剤に加えて国内外の製薬企業からの協力を受けて行い、標準化に必要なデータの蓄積を推進する。さらに慶応大学から供給される複数の健常者心筋細胞および疾患心筋細胞の心筋機能进行评估し、薬物毒性評価に最適な細胞ラインの検討とパネル試験への対応の可能性を検討する。

また、システム開発評価に協力する国内外の製薬企業に本プロジェクトで開発したシステムを貸し出し、これを利用することによって技術の普及のために必須となる計測技術の外部機関での並行評価を実施する。その結果のフィードバックによって本開発技術の実用化に向けた改善を進める。国内外製薬企業の薬剤の評価に運用するシステム評価用装置として第2世代プロトタイプシステムを新規に一式購入する。装置技術開発の改善に伴って第2世代装置としての改良を行う。

ユーザーフォーラムの組織を活用し国内外製薬企業と緊密な情報交換および収集を進める。評価薬剤についてのリスト化と、開発するシステムのユーザーサイドから見た目指すべき装置仕様を決定する。また、開発する評価手法を最適化するための既存化合物情報等を精査し、それらの化合物から適切な検証化合物を選択し、開発システムの実用性を検証する。評価成果については、国際安全性薬理学会（SPS, オーストリア）、国際毒性学会（SOT, アメリカ）などの国内外の有力学会での発表を通じて広く技術紹介を行い、開発システムの創薬スクリーニングシステムとしての有効性を世界の製薬業界に広める。三菱化学メディエンスは平成23年度中を目処に自社事業判断に必要な一連の評価を完了させ事業化の見極めを行う。

ユーザーフォーラムの運営については、定期的な開催（年2回）を行い、開発システムの進捗状況を詳細に参加企業に伝える。ユーザー各社からの試験的な化合物供与を含めた個別の評価依頼に応じる体制を構築し、開発システムの有効性の認知、普及に努め、実用化への具体的な活動を展開する。

IV - B 独立行政法人産業技術総合研究所担当分

1. 実用化、事業化の見通し

1. 1 研究開発項目①「iPS細胞の安定供給・大量調製・保存技術の開発」

1. 1. 1 iPS細胞大量調製の自動化技術の開発

川崎重工業株式会社

独立行政法人 国立成育医療研究センター

iPS細胞の自動培養機能については、先ずは一括方式（すべてのコロニーを継代する）にて継代するプロトコルを、川崎重工業製の自動培養装置のソフトウェアに組み込んだ。使用を希望する顧客に対しては、開発中の製品であるとの条件付で、使用いただくことにしている。より完成度が上がった段階で、正式に製品仕様に組み入れたい。その時期は2011年度後半を予定している。

1. 1. 2 ガラス化法等を用いたiPS細胞の自動凍結保存技術の開発

大陽日酸株式会社

独立行政法人 国立成育医療研究センター

これまでのプロジェクトの成果で、ヒトiPS細胞でも緩慢法による予備凍結を経て凍結保存可能であることが判明した為、予備凍結から凍結保存、解凍まで可能な凍結保存装置の自動化は比較的短時間で実現可能と考えられる。さらに今後iPS細胞安定供給の実用化に向けた装置開発は、他品種のヒトiPS細胞での評価及び、自動培養装置との連携、装置小型化に向けての開発を経て数年後には実現可能と考えられる。

1. 1. 3 安定供給・大量調製に適した温度応答性培養器材の開発

株式会社 セルシード

川崎重工業株式会社

本研究によって検討を行ったiPS細胞培養に適した温度応答性培養器材の製造条件を最適化することにより、iPS細胞用の新たな培養器材としての製品化が見込まれる。

1. 2 研究開発項目②「iPS細胞の各種性状解析」

1. 2. 1 由来の異なるiPS細胞の樹立

独立行政法人 国立成育医療研究センター

我々が樹立したiPS細胞については、既に一部については医薬基盤研究所の細胞バンクに寄託しており、利用可能となっている。さらに今回新たに樹立したiPS細胞についても順次公的バンクへの寄託を進め、バンクを通して希望する研究機関への配布を行っていく。

1. 2. 2 iPS細胞グライコーム解析並びに細胞評価技術の開発

独立行政法人 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター

公開不可

1. 2. 3 iPS 細胞における遺伝子発現プロファイルの解析と特異的遺伝子マーカーの探索

独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター

研究ツールにすぎない iPS 細胞を真に社会に役立てるためには、iPS 細胞の規格を決定することが必須である。そして、本研究成果は iPS 細胞のみならず ES 細胞及び間葉系幹細胞を規格化する上での効果的な指標となる遺伝子マーカーを同定した。本研究はこれまでにない多くの幹細胞株を元に算出したものであり、汎用性も高く、ソフト化などの実用化の可能性は極めて高い。

1. 2. 4 システム生物学的アプローチによる iPS 細胞における特異的パスウェイ及びマーカーの探索

独立行政法人 産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター

本課題で確立した少数分子候補絞り技術は、汎用性を持つ。絞り込みに際する利用者の設定項目は、1つの有意確率の設定のみであり、様々な状況で計測されたデータに関して適用可能である。適用を重ねることで、頑強な少数分子候補の安定的な選定が可能であり、実験検証のプロセスとの継続的な協調が可能である。また実際、本技術の適用可能性の検証のため、脂肪分化、糖尿病、大腸がん等の少数分子候補の選定を行い、実験検証段階にある。

以上のように、実験検証の結果を待つ必要はあるが、技術自体はほぼ確定しており、ソフトウェア化の段階に至っている。

1. 2. 5 iPS 細胞の染色体安定性の検証

アルプラスト株式会社 (H21 年度まで)

独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター

研究ツールにすぎない iPS 細胞を用いて、特に再生医療をゴールとして産業応用を進めるには、iPS 細胞の核型が正常であることを簡便に確認できるシステムを確立する必要がある。本研究の成果は核型解析の標準プロトコールとして実用化の見通しがある。

1. 2. 6 iPS 細胞のエピゲノム情報の解析

川崎重工業株式会社

独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター

本研究で得た、これまでに例を見ない数の iPS 細胞等幹細胞からのエピゲノムに関する基礎データは他の実施項目において得られる「遺伝子発現データ」「レクチンアレイデータ」と共に、幹細胞の性質である分化指向性を予測するためのデータの一つとして実用化されうる。

2. 今後の展開

2. 1 研究開発項目①「iPS 細胞の安定供給・大量調製・保存技術の開発」

2. 1. 1 iPS 細胞大量調製の自動化技術の開発

川崎重工業株式会社

独立行政法人 国立成育医療研究センター

iPS 細胞の自動培養機能のさらなる機能アップを「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発／ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」において取り組む。取り組む内容の概要は以下の通りである。

- ・京都大学 CiRA により標準化された iPS 細胞株の自動培養の実現
- ・フィーダーフリーなどのより実用的な培養プロトコルへの対応
- ・自動凍結・保存装置との連携による iPS 細胞の自動凍結、および自動解凍の実現
同プロジェクトの中間評価を経た後のステップとして、以下を目指す。
- ・iPS 細胞の「樹立」を目指した自動化
- ・iPS 細胞の「分化」誘導を目指した自動化
- ・小型で大量培養が可能な自動培養装置の開発

2. 1. 2 ガラス化法等を用いた iPS 細胞の自動凍結保存技術の開発

大陽日酸株式会社

独立行政法人 国立成育医療研究センター

iPS 細胞安定供給のため自動凍結保存装置と自動培養装置の連携による装置開発については引き続き計画を進める。

自動凍結保存装置は緩慢法による予備凍結自動化機能の最適化、自動解凍機能の開発を行い、併せて自動培養装置との連携に必要な開発及び装置の小型化等を実現した後、製薬メーカー、研究機関等を対象とした装置導入実用化をめざす。

さらに、今後 iPS 細胞の実用化に伴う市場の拡大にあわせて国外市場への展開も検討する。

2. 1. 3 安定供給・大量調製に適した温度応答性培養器材の開発

株式会社セルシード

川崎重工業株式会社

本研究によって iPS 細胞培養に最適化した温度応答性培養器材を使用することにより、従来法の物理的手法および酵素処理双方の利点を有する、継代手法を開発した。本手法は熟練の手技を必要とせず簡便に iPS 細胞を培養できる。さらには自動培養装置と組み合わせ、安定かつ大量に iPS 細胞を供給するシステムが構築できれば、iPS 細胞を用いた研究がより加速できると期待される。

2. 2 研究開発項目②「iPS 細胞の各種性状解析」

2. 2. 1 由来の異なる iPS 細胞の樹立

独立行政法人 国立成育医療研究センター

iPS 細胞は極めて有用な幹細胞であるが、親株の由来、作製の方法、培養条件、保存条件など

により、未分化性、分化能、増殖能など幹細胞の性質や品質に影響するため、作製者や使用者が異なると、違った結果を生じかねず、実用化において信頼性に欠ける。したがって様々な由来を持つ iPS 細胞を作製し特性解析することは必須となる。このことから、今回作製提供した iPS 細胞は、今後の実用化／事業化となる未分化および分化細胞の測定技術、供給技術の開発研究の促進をもたらす。またどこでも、だれでも、再現性があり、信頼性のある同じ品質を保証できる標準化への構築へとつながり、実用化、事業化に大きく貢献すると考えられる。

2. 2. 2 iPS 細胞糖鎖解析並びに細胞評価技術の開発

独立行政法人 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター

公開不可

2. 2. 3 iPS 細胞における遺伝子発現プロファイルの解析と特異的遺伝子マーカーの探索

独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター

前述の自由分化系を用いた分化指向性解析を行いつつ、種々の分化誘導法に対する各種幹細胞株の応答性も評価し、幹細胞評価基盤技術への反映を検討する。また、自動培養・凍結解凍装置、培養液、培養基材等による分化指向性への影響も検討する。

現在は、未分化状態における遺伝子発現パターンで分化指向性を予測できる「新しいマーカー遺伝子」を同定しつつある。将来的にはこれらの遺伝子こそが幹細胞の標準化に必須のファクターとなるであろう。

2. 2. 4 システム生物学的アプローチによる iPS 細胞における特異的パスウェイ及びマーカーの探索

独立行政法人 産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター

本技術のソフトウェア化を行うことで、適用例を増加させることにより、少数分子候補選定の信頼性の検証をさらに実行する。これにより、樹立、培養、分化など様々な iPS 細胞研究の過程において、分子計測 - 分子候補選定 - 候補検証のプロセスを加速させることが可能となることが期待される。

2. 2. 5 iPS 細胞の染色体安定性の検証

アルプラスト株式会社 (H21 年度まで)

独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター

研究ツールにすぎない iPS 細胞を産業応用するためには、大量供給すべく継代数を重ねても核型異常が起きないような、自動培養・凍結解凍装置、培養液、培養基材等を開発する必要がある。これらの供給システムの使用による核型安定性への影響を検討する予定である。

2. 2. 6 iPS 細胞のエピゲノム情報の解析

川崎重工業株式会社

独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター

本研究では既に商品化されているヒト全ゲノムのうち網羅的に27,000箇所のDNAメチル化を解析するシステムを用いて、解析した。しかしながら、幹細胞の標準化をする上では、さらに解析箇所を増やし、より正確な規格化をできるようなシステムを構築する必要がある。現在は、460,000箇所の領域を解析できるシステムを構築し、同様の解析を行う予定である。

IV - C 国立大学法人東京大学担当分

1. 実用化、事業化の見通しと今後の展開

1. 1 研究開発項目① 「iPS 細胞の安定供給・大量精製・保存技術の開発」

セミインタクト細胞リシール法による iPS 細胞の作成とリシール細胞評価

東京大学 村田グループ

本研究期間中 (H22~H23) においては、セミインタクト細胞リシール法を用いて山中4因子タンパク質導入だけに依存した iPS 細胞の作成には至らなかった。しかし、タンパク質導入後~18時間以内に GFP-Oct4 の発現細胞が観察されはじめ、導入後2~3日目までには iPS 細胞様コロニーができた。しかも、そのコロニーを形成する細胞は各種 iPS 細胞のマーカータンパク質の発現が観察されたことなどより、次のことが考えられた。リシール法によるタンパク質導入法では、MEF 細胞の核が山中の4因子タンパク質に同時にしかも一気に暴露されることより Oct4、Nanog などが一度に発現してくると考えられるが、万能性獲得にはそれらの発現時期、発現量の正確なコントロールが必要であると思われる。本研究では、導入するタンパク質の種類も山中の4因子にこだわりすぎ、かつ、リシール直後の細胞の培養条件も既にウイルス法によって作成された iPS 細胞の初期培養条件を参考にしすぎた。セミインタクト細胞リシール法の最大の利点は、ゲノムインテグレーションのない形質転換が可能である他に、一度に多種類のタンパク質を様々な量比で細胞内に導入できることである。その利点を活かし、山中の4因子以外のタンパク質(特に、細胞増殖制御に関わるタンパク質因子など)のスクリーニングを徹底して行うことが必要であったと思われる。実際、本研究を通し、MEF 細胞における GFP-Oct4 発現を指標にした万能性誘導因子の簡単な可視化スクリーニングシステム(可視化スクリーニングは24~72時間)が完成しているため、これを用いてのタンパク質因子のスクリーニングは十分可能であると思われる。

本研究を通し、様々な細胞(培養細胞を含め約10種類以上)でのリシール細胞作成条件がほぼ最適化できた。また、もっとも危惧した「リシールの際のストレス応答による遺伝子発現状態」については、マイクロアレイ解析により正常細胞質導入やリシール処理により、酸化ストレス応答遺伝子の幾つかが発現上昇する以外に特異的遺伝子発現は殆ど見られないことを確認できた。逆に、病態モデルマウスから調製した病態細胞質などでは、リシール細胞での遺伝子発現や、様々

な細胞内情報伝達系の攪乱を検出できた(未発表データ)ことより、本セミインタクト細胞リシール法は、リシール直後の数時間～1日の細胞内環境の改変を十分再現性よく解析できることなどがわかった。今後、多様な病態環境下での細胞内現象の解析に十分利用できる可能性は高く、もし、導入細胞質やタンパク質群の組成が上記①の研究開発成果で構築したスクリーニングにより効果的に絞り込むことが可能であれば、そのリシール細胞の株化も可能であると考えている。

1. 2 研究開発項目②「iPS細胞の各種性状解析」

エピゲノムに基づく iPS 細胞の評価

東京大学・大学院農学生命科学研究科

東京大学 塩田グループ

エピゲノムによる細胞の評価により、試験管内分化能解析だけでは判別することが困難であった細胞の異常を示すことが可能となった。また非遺伝子領域を含めたゲノムワイド DNA メチル化プロファイル解析により、非遺伝子領域に存在する T-DMR も重要な機能を示すことが分かり、またこれまでの解析では軽視されてきた可動性遺伝因子を含む反復配列を含めたエピゲノム解析が重要であることも判明した。すなわち、市販の、限られた遺伝子の転写開始点付近だけを解析するような方法に基づくエピゲノム解析だけでは限界があり、独自技術の開発無くして適切な評価はできないことを示している。本研究によって開発された独自技術と明らかになった情報は、iPS細胞の評価に重要な基盤となり、実用可能な技術である。

添付資料①

イノベーションプログラム基本計画

健康安心イノベーションプログラム基本計画

平成22年4月1日
産業技術環境局
製造産業局

1. 目的

今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題である。具体的には、個の医療を通じて健康寿命の延伸、QOL（Quality of Life：生活の質）の向上を図ることが求められている。

この目的を達成するため、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現するほか、関連産業の競争力強化・ベンチャー企業の創出を図る。

2. 政策的位置付け

○新成長戦略（基本方針）（2009年12月30日）

強みを活かす成長分野として「グリーン・イノベーション」分野と「ライフ・イノベーション」分野を策定、人材育成や技術開発を後押しするほか、需要を創造すると同時に利用者の立場に立った社会ルールの変更に取り組む。また、政府は新たな分野に挑戦する人々を支援するとしている。

○革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略（2009年2月12日改訂）

内閣府、文部科学省、厚生労働省及び経済産業省の間において革新的な医薬品・医療機器の創出に向け、研究資金の集中投入、ベンチャー企業の育成、臨床研究・治験環境の整備、アジアとの連携、薬事法における審査の迅速化・質の向上、イノベーションの適切な評価、官民対話等、研究から上市に至る過程の一貫かつ集中的な支援を実施することとしている。

○「ドリームBTジャパン」（2008年12月11日BT戦略推進官民会議）

2002年に策定した「バイオテクノロジー戦略大綱」以降、バイオテクノロジーをめぐる状況が変化してきたことを背景に、新産業の育成・創出、食糧問題解決、バイオマス利活用等の課題に対処すべく、イノベーション強化11項目や官民が協働で取り組むべき最重点課題を策定した。

○新経済成長戦略のフォローアップと改訂（2008年9月19日閣議決定）

2006年6月に経済産業省がとりまとめた「新経済成長戦略」を、資源価格の高騰等の構造変化を踏まえフォローアップと改訂を行った。「資源生産性競争」時代における経済産業構造の構築、世界市場獲得と持続的発展のためのグローバル戦略の再構築、地域・中小企業・農林水産業・サービスの未来志向の活性化を3つの柱として、「新経済成長戦略」を強化した。

○「iPS細胞研究の推進について（第一次とりまとめ）」（2008年7月3日総合科学技術会議 iPS細胞研究WG）

iPS細胞研究の成果がもたらす医療への波及効果や新しいバイオインダストリーの進展等について検討を行い、iPS細胞研究を推進するための研究推進体制、国の支援の在り方、知的財産戦略、国際化協力の在り方等をとりとまとめた。

○「イノベーション25」（2007年6月閣議決定）

生涯健康な社会形成に向けて中長期的に取り組むべき課題として、治療重点の医療から予防・健康増進を重視する保健医療体系の転換、生命倫理・安全性と医療技術促進政策の調和などをとりあげ、再生医療及び在宅医療・介護に係る社会還元加速プロジェクトを実施するとともに、臨床研究・臨床への橋渡し研究をはじめとする研究開発ロードマップの提示により所要の措置を講じていくこととしている。

○がん対策推進基本計画（2007年6月閣議決定）

がん対策基本法に基づき、国、地方公共団体及び関係者等が、がん対策を総合的かつ計画的に推進するために策定された基本方針であり、取り組むべき施策の一つとして「がん研究」が取り上げられている。具体的には、現状、診断薬・診断機器の開発、治療薬・治療機器の開発等が推進されているが、さらに、有用な早期診断技術についての研究開発の推進等に取り組むことが提示されている。

○新健康フロンティア戦略（2007年4月新健康フロンティア戦略賢人会議）、同アクションプラン（2007年12月）

健康寿命の延伸や生活の質の向上を図ることを目的として策定された新健康フロンティア戦略及び新健康フロンティア戦略アクションプランの中で、「人間の活動領域の拡張に向けた取組」及び「医療・福祉技術のイノベーション」において、「先進的予防・診断・治療技術の開発」や「医薬等ベンチャー・基盤産業支援対策」等の施策が提示されている。

3. 達成目標

- ①医薬品開発の成功確率の向上に資する技術開発や、基礎研究から臨床への橋渡し研究等を通じた、医薬品の上市期間の短縮や開発コストの低減を図る。
- ②再生医療の早期実現を目標とし、産業化を促進する。
- ③医療機器¹など先進的な技術開発等の推進による国際競争力の強化、厚生労働省との連携事業（医療機器開発ガイドラインの策定など）による開発から製品に至るまでの期間の短縮等を達成する。
- ④高齢者・障害者の自立促進や介護者の負担軽減等のため、優れた技術や創意工夫のある福祉機器の実用化支援を行う。

¹ 医療機器は、画像診断システムなどの「診断機器」、内視鏡下手術支援システムなどの「治療機器」、その他家庭用医療機器、歯科材料、眼科用品を含む。

4. 研究開発内容

I. 創薬・診断

I-1. 革新的医薬品の創出

(1) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）

①概要

我が国が強みを持つ糖鎖工学分野において、これまでに取得・開発した「糖鎖遺伝子ライブラリー」「糖鎖構造解析技術」「糖鎖合成技術」を活用し、癌や感染症など様々な疾病に関与する糖鎖の機能を解析する基盤技術を確立し、我が国の優位性を維持するとともに、創薬・診断等の分野における糖鎖機能の産業利用の促進を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、糖鎖や糖タンパク質などの機能を分子レベルで効率的に解明するための基盤技術、糖鎖の機能解析・検証技術、及び、有用性が認められた糖鎖機能を産業利用するための基盤技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発）（運営費交付金）

①概要

我が国が強みとする完全長cDNAライブラリーやタンパク質相互作用解析技術等を最大限に活用し、重要なタンパク質ネットワーク解析等により創薬の対象となるタンパク質の効率的な絞り込みを行うとともに、疾患等の生物現象を制御する化合物の探索まで、一貫した技術開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術や疾患を制御する化合物の探索・評価技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(3) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）

①概要

創薬上重要な膜タンパク質は複合体を形成していることも多く、その構造解析及び相互作用の情報を取得することは創薬研究において重要であるが、その解析は非常に困難である。そこで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。

②技術目標及び達成時期

2011年度までに生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体の構造解析手法、リガンド分子との相互作用解析手法を確立するとともに、当該技術から得られた情報に基づく in silico スクリーニング手法を確立する。

③研究開発期間

2007年度～2011年度

(4) 新機能抗体創製技術開発 (運営費交付金)

①概要

ポストゲノム研究や診断・創薬等において重要となっている機能を有する抗体を創製するため、創薬標的として産業利用上重要だが、解析が困難な膜タンパク質やタンパク質複合体を特異的に認識できる抗体を系統的に作成する技術や抗体の分離・精製を高効率に行うための技術の開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、産業上有用と考えられるタンパク質やその複合体を特異的に認識する抗体を創製するための基盤技術、及び、製造コスト低減に向けた抗体の分離・精製を高効率に行う技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(5) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発 (運営費交付金)

①概要

がん対策等の国民医療高度化を目指し、急速に発展している多様なバイオ技術の融合と医療現場への円滑な橋渡しによるイノベーションの創出・加速のため、総合科学技術会議のもと文部科学省及び厚生労働省と連携し、橋渡し研究の強化に一体的に取り組む。具体的には、民間企業と臨床研究機関（文部科学省や厚生労働省が整備する橋渡し研究拠点等）が一体となって行う、医薬品、医療機器、診断ツール等の開発を推進する。

②技術目標及び達成時期

2011年度までに医療現場及び臨床研究からのフィードバックに基づく研究開発により、医薬品、医療機器、診断ツール等の研究開発成果を円滑に実用化につなげる仕組みを確立する。

③研究開発期間

2007年度～2012年度

(6) 幹細胞産業応用促進基盤技術開発 (運営費交付金)

①概要

創薬プロセス効率化や再生医療への応用が期待される iPS 細胞等幹細胞について、産業応用に不可欠な基盤技術の開発や、iPS 細胞に関連した産業応用事例創出の促進を行う。

②技術目標及び達成時期

2013年度までに、安全で効率的なiPS細胞の作製技術を開発するとともに、産業応用に繋げるために必要となるiPS等幹細胞の選別・評価・製造技術を開発し、産業上利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。

③研究開発期間

2009年度～2013年度

(7) 後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発

①概要

がんや生活習慣病などの後天的疾患の原因として重要な因子である「後天的な遺伝子の変化（後天的ゲノム修飾）」を解析する技術や疾患との関連づけにより診断の指標を特定する手法の開発等を実施する。

②技術目標及び到達時期

2014年度までに、後天的ゲノム修飾解析技術開発として、極微量サンプルに対応した解析技術の高精度・高感度化、システム化を行うとともに、開発した技術やモデル動物等を活用し、後天的ゲノム修飾と疾患との関連づけを行う。また、探索的実証研究として、制御因子の探索・同定、制御に関する検証を行う。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

I-2. 診断ツールの開発

(1) 個別化医療実現のための技術融合バイオ診断技術開発（運営費交付金）

①概要

我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、診断への応用を可能とする全自動解析システムの開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発する。さらに、臨床現場において、微量サンプル（数ナノグラム）から、12時間以内に染色体異常（増幅、欠失、コピー数多型等）を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）【再掲】

(3) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

I-3. 創薬・診断に係る基盤整備

(1) 統合データベースプロジェクト

①概要

ライフサイエンス分野では、自身の研究成果と既存の研究成果と対比することにより、自身の研究成果の仮説を考案する手がかりが得られたり、新しい実用化の発想が得られたりする可能性があるため、国家プロジェクト等により産生された研究データを一括して活用できるデータベースが、産業界や社会から要望されている。

このため、政府全体の“生命科学データベース統合化の取組”の一環として、経済産業省関連の公的資金研究から産出される研究データを、産業上の有用性を評価のうえ、統合化し、産業界等に提供する。

②技術目標及び達成時期

2010年までに経済産業省関連機関により実施されたライフサイエンス分野の研究開発プロジェクトの成果に関する情報提供サイトを構築・運用する。また、ヒト遺伝子に関連した各種研究成果に関しては、平成17～19年度に実施したゲノム情報統合プロジェクトにおいて構築した「ヒト全遺伝子のアノテーション統合データベース (H-Invitational)」を基礎として、経済産業省関連の研究成果を連携して利用できるシステムを構築する。

③研究開発期間

2008年度～2010年度Ⅱ. 再生医療

II. 再生医療

II-1. 再生医療の実用化

(1) 次世代機能代替技術研究開発事業（うち、次世代再生医療技術研究開発）（運営費交付金）

①概要

生体内で自己組織の再生を促すセルフフリー型再生デバイスや、少量の細胞により生体内で自律的に成熟する自律成熟型再生デバイスの実用化を促進するとともに、これら再生デバイスにおける有効性・安全性の評価技術等を確立する。

②技術目標及び達成時期

2014年度までに、生体内で自己組織の再生を促進するための細胞外マトリクス、幹細胞誘導・分化促進因子等の再生医療技術を確立し、工学的技術との組み合わせにより、セルフフリー型再生デバイス及び自律成熟型再生デバイスを作製する。また、それらを用いて再生した組織等の有効性・安全性に関して、低侵襲で高精度な評価技術の標準化に取り組む。さらに、開発する再生デバイスを低侵襲に植込む技術を確立する。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

(2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

II-2. 再生医療に係る基盤整備

(1) 医療機器開発ガイドライン策定事業

①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進及び薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て、個別の機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器産業に製品として、または部品・部材の供給として参入しやすい環境を整備するための方策を検討し、医療機器分野の活性化・国際競争力の強化を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、今後実用化が期待される先進的な医療機器について、工学的安定性や生物学的安定性等に関する詳細な評価基準を策定し、開発ガイドラインとして取りまとめる。また、平成21年度事業において検討・整理された医療機器産業への参入を促す方策や部材供給の活性化方策の具体化を図るため、様々なマッチング機会をコーディネートする人材育成や事業者の海外展開支援策並びに部材供給取引契約にかかるガイドラインの作成及びPL保険のあり方や普及方法等についてさらに検討を加え、医療機器産業の活性化に資するものとする。

③研究開発期間

2008年度～2010年度

III. 医療機器

III-1. 医療機器の開発

(1) がん超早期診断・治療機器総合研究開発プロジェクト（運営費交付金）

① 概要

がんの診断・治療の革新を一体の課題として捉え、多様な治療法選択が可能なより早期のステージのがんに対して、治療方針を決定するために必要ながん性状、並びに位置に関する正確な情報を確実に取得し、得られた診断情報に基づく侵襲性の低い治療を可能とすることで、患者のQOLを向上させる。

② 技術目標及び到達時期

診断機器システムとしては、分子プローブ等の薬剤並びにそれらの薬剤を用いる高感度・高解像度な画像診断システム、病理診断の効率・信頼性を向上させる病理画像等診断支援システム、遺伝子診断の信頼性を向上させる検体前処理技術を備えた血中がん分子・遺伝子診断システム等を開発する。

治療機器システムとしては、より侵襲性の低い外科的治療を実現する内視鏡下手術支援システム並びに高精度で容易なオペレーションを可能とするX線治療機器を開発する。

③ 研究開発期間

2010年度～2014年度

(うち、内視鏡下手術支援システムは 2007年度～2011年度)

(2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

(3) 次世代機能代替技術研究開発事業（うち次世代心機能代替治療技術研究開発）（運営交付金）

①概要

小柄な体格にも適用可能な小型の製品で、血栓形成や感染を防ぎ、長期在宅使用が可能な植込み型補助人工心臓を開発する。

②技術目標及び達成時期

2014年度までに、小児を含めた小柄な患者への適用を可能とする、長期使用可能な小型の植込み型補助人工心臓を作製するとともに、有効性及び機械的・電氣的・生物学的な安全性の評価を行う。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

Ⅲ－2. 医療機器の開発に係る基盤整備

(1) 医療機器開発ガイドライン策定事業【再掲】

①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進及び薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て、個別の医療機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器産業に製品として、または部品・部材の供給として参入しやすい環境を整備するための方策を検討し、医療機器分野の活性化・国際競争力の強化を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、今後実用化が期待される先進的な医療機器について、工学的安定性や生物学的安定性等に関する詳細な評価基準を策定し、開発ガイドラインとして取りまとめる。また、平成21年度事業において検討・整理された医療機器産業への参入を促す方策や部材供給の活性化方策の具体化を図るため、様々なマッチング機会をコーディネートする人材育成や事業者の海外展開支援策並びに部材供給取引契約にかかるガイドラインの作成及びPL保険のあり方や普及方法等についてさらに検討を加え、医療機器産業の活性化に資するものとする。

③研究開発期間

2008年度～2010年度

Ⅳ. 福祉機器

Ⅳ－1. 福祉機器の開発

(1) 福祉用具実用化開発推進事業（運営費交付金）

①概要

「福祉用具の研究開発及び普及の促進に関する法律」（福祉用具法）に基づき、高齢者・障害者及び介護者の生活の質の向上を目的として、生活支援分野、社会活動支援分野を中心とした福祉用具の実用化開発を行う民間企業等に対し、研究開発費

用の2/3以内を補助することで、多様な福祉ニーズに対応するとともに、当該分野における新産業の創出、成長の促進に資する。

②技術目標及び達成時期

高齢者、障害者の生活支援、社会参加支援に資する福祉用具の実用化開発を促進することにより、高齢者等の生活における負担の軽減を図り、安全で安心のできる生活を実現する。より具体的な目標として、各々の補助対象事業終了後3年経過した時点で50パーセント以上を製品化する。

③研究開発期間

1993年度～

IV-2. 福祉機器の開発に係る基盤整備

(1) 福祉機器情報収集・分析・提供事業

①概要

福祉用具法に基づき、民間による福祉機器の実用化のための研究開発を促進するため、福祉機器に関する産業技術に係る情報の収集・分析・提供事業を実施することで、当該分野における福祉機器の普及や新規産業の創出・成長の促進を図る。

②技術目標及び達成時期

各年において福祉機器に係るニーズ等の調査の実施及び福祉用具実用化推進事業で開発された福祉機器の各種展示会等への出展による情報収集・分析・情報の提供を実施する。

③研究開発期間

1993年度～

5. 政策目標の実現に向けた環境整備（成果の実用化、導入普及に向けた取組）

[標準化]

- ・各プロジェクトで得られた成果のうち、標準化すべきものについては、適切な標準化活動（国際規格（ISO/IEC）、日本工業規格（JIS）、その他国際的に認知された標準の提案等）を実施する。具体的には、統合データベースの情報やインターネットに公開されている情報資源等を相互運用するために、必要なデータ形式、フォーマット等の標準化を推進する。
- ・高齢者等支援機器については、関係省庁との緊密な連携の下、標準化等の手法による実用化及び普及の方策を検討する。

[導入普及促進]

- ・ゲノム研究の進展は、個人遺伝情報を用い、情報技術を駆使した幅広い医療・健康サービスによる人々の健康や福祉の向上、さらには新しい医療・健康サービス産業の育成に重要な役割を果たそうとしているが、その際、人権を尊重し、社会の理解と協力を得て、個人遺伝情報の厳格な管理の下で適正に事業を実施することが不可欠である。そのため、個

人遺伝情報を安全に保護するために作成した事業者が遵守すべきルール「経済産業分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン（2004年12月17日告示）」（個人遺伝情報保護ガイドラインという）を適切に運用する。

[産業間連携]

- ・バイオベンチャーは商品を市場に送り出すまでに長期間を要する、研究開発のために多額の資金調達を必要とする、事業を行うために様々な規制・審査を経る必要がある等、他業種のベンチャー企業と比較して困難な問題を抱えていることが多い。そのため、バイオベンチャーの様々な問題に対して施策への反映を検討し、補助金等の施策の紹介を通じてバイオベンチャー振興を図る。
- ・「産業クラスター計画」に基づき、全国のバイオクラスターにおいて、企業間のネットワーク形成の支援、産学連携による研究開発プロジェクトの支援、地域系ベンチャーファンドによる資金調達支援等を実施していく。
- ・医療の進歩・国民の健康に貢献する医療機器・用具の産業技術力向上及び国際競争力強化を目指し、研究開発から市場化までのすべてのプロセスにおけるマクロな戦略の検討と、医療機器の重要性について社会的認知の向上を実現するための仕組み及び個別プロジェクトの形成をはかることを使命とした「医療技術産業戦略コンソーシアム（METIS）」が平成13年に設立され、平成21年10月より第4期に入っている。

[プロジェクト等間の連携について]

- ・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発）については、タンパク質機能解析・活用プロジェクトの成果を活用することで、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術を開発する。
- ・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）については、「生体高分子立体構造情報解析」の成果を活用することで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。
- ・糖鎖機能活用技術開発については、糖鎖合成関連遺伝子ライブラリー構築、糖鎖エンジニアリングプロジェクトの成果を活用することで、糖鎖の機能を効率的に解析するための基盤技術を開発する。
- ・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発の「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」、「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」については、必要に応じ、各々の成果を活用し、効率的、効果的な研究開発を図る。

[関係機関との連携]

- ・総合科学技術会議が推進する基本政策推進専門調査会 分野別推進総合PT ライフサイエンスPT及び科学技術連携施策（「生命科学の基礎・基盤」、「臨床研究・臨床への橋渡し研究」）の下、各プロジェクトについて、関係府省との適切な連携を図る。

[その他]

・一段と激化する特許戦争の中、成果実用化・効率的な研究開発を推進するため、プロジェクト企画段階から、研究テーマ周辺の論文及び特許状況のサーベイ実施やプロジェクト実施段階における特許出願後の事業化構想等、特許に関する戦略的取組（プロパテントアプローチの導入）を実施する。

・医療機器の審査体制の強化による薬事法審査の迅速化の観点から、2004年より独立行政法人産業技術総合研究所の工学系研究者を独立行政法人医薬品医療機器総合機構へ派遣しているところである。

・福祉機器においても、中小企業等産業側の観点を福祉政策に活かすため2008年より独立行政法人産業技術総合研究所の職員を厚生労働省に派遣中である。

6. 研究開発の実施に当たっての留意事項

事業の全部又は一部について独立行政法人の運営費交付金により実施されるもの（事業名に（運営費交付金）と記載したものは、中期目標、中期計画等に基づき、運営費交付金の総額の範囲内で、当該独立行政法人の裁量によって実施されるものである。

なお、適切な時期に、実用化・市場化状況等について検証する。

7. 改訂履歴

- (1) 平成12年12月28日付けがん・心疾患等対応高度医療機器プログラム制定。
- (2) 平成14年2月26日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。
- (3) 平成14年2月28日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。がん・心疾患等対応高度医療機器プログラム（平成12・12・27工総第13号）は、廃止。
- (4) 平成15年1月27日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画（平成14・02・25産局第4号）は、廃止。
- (5) 平成15年3月10日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画（平成14・02・05産局第2号）は、廃止。
- (6) 平成16年2月3日付け制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画（平成15・01・23産局第4号）及び健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画（平成15・03・07産局第17号）は、本プログラム基本計画に統合することとし、廃止。
- (7) 平成17年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成16・02・03産局第12号）は、廃止。
- (8) 平成18年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成17・03・25産局第1号）は、廃止。
- (9) 平成19年4月2日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成18・03・31産局第2号）は、廃止。
- (10) 平成20年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成19・03・20産局第5号）は、廃止。

- (11) 平成21年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成20・03・25産局第6号）は廃止。
- (12) 平成22年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成21・03・26産局第3号）は廃止。

添付資料②

技術戦略マップ(分野別技術ロードマップ)

創薬・診断分野

健康寿命の延伸、QOL（Quality of Life：生活の質）の向上は世界全体の願いであり、特に、今後、少子高齢化が他国に先駆けて進行する日本にとっては、喫緊の課題である。このために創薬・診断分野では、2005年の技術戦略マップ策定当初から①「疾患の早期診断」、「適切な治療法の提供」によって、より良い医療サービスを提供していくとともに、②「予防医療による健康維持増進」によって、治療から予防へと転換し、より個人に適切に対応する「個の医療」を実現することを目標とし、技術動向や社会情勢の変化を踏まえ、毎年度改訂を行ってきた。これにより、本分野における技術の俯瞰や将来への道筋の提示については一定の役割を果たしてきたものと考えられる。

しかし、前述した目標を達成するためには、技術の延長にとどまらず、国民に深刻な影響を与えている疾患の克服への技術の貢献可能性を改めて検討することが必要なことから、技術戦略マップ2010においては、患者数・治療満足度の低さ等から「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」を選定し、各疾患の治療のあるべき将来像から導き出される必要な技術開発と、共通基盤技術の抽出を行った。

網羅性は技術戦略マップ2009に委ねつつ、課題解決に向けて特に必要となるであろう技術の抽出に注力した。本マップについては、関係者の意見を踏まえつつ、今後とも不断の見直しを行っていく予定である。

創薬・診断分野の技術戦略マップ

I. 導入シナリオ

(1) 創薬・診断分野の目標と将来実現する社会像

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を実現することは、喫緊の課題である。そのために創薬・診断分野が果たす役割は大きい。

2009年12月30日には新成長戦略（基本方針）が閣議決定され、その中で「ライフ・イノベーションによる健康大国戦略」として、医療・介護・健康関連産業の成長産業化、日本発の革新的な医薬品、医療・介護技術の研究開発等を通じて、2020年までに「医療・介護・健康関連サービスの需要に見合った産業育成と雇用の創出、新規市場約45兆円、新規雇用約280万人」とする目標が示されたところである。

技術戦略マップは、本目標の達成にも資する具体的な方策について、主に技術開発を視点に据えつつ記載したものであるが、導入シナリオにおいては、特に開発した技術を社会へ繋げていくために必要となるレギュレーション対応や社会基盤整備等を示した。

現在行われている疾患の予防や診断では、家族の病歴・自らの健診から得られる基礎的なデータや、集団健診から得られる平均値等の統計データが主として用いられている。また、各疾患と遺伝子発現等の関連を知る上で欠かせない臨床サンプルの数的不足や散逸もあって、現状では非臨床試験や少数のサンプルから得られたバイオマーカーを、画一的に利用している。さらには、発症メカニズムが不明な数多くの疾患については、正確な予防法は依然として確立していない。画像診断や病理組織診断についても、近年の多様化、小型化等により、疾患の早期診断に重要な役割を果たしつつあるが、まだ用途は限定的で、今後とも更なる技術開発の必要がある。

一方で、基礎研究の進展によって、ゲノム、エピゲノム、RNA、タンパク質、糖鎖、脂質等の様々な切り口や統合的なアプローチによって、生命現象や疾患メカニズムに関する研究が急激に進展しており、基礎的な研究成果が臨床の現場へと一刻も早く応用されるよう、切れ目のない研究開発体制の構築が求められている。

また近年、国民の健康に対する関心も高まり、今後、日常生活における生体情報の取得や自主的な健康管理が一層普及すると予想され、前述した技術の進展、臨床サンプルの収集やバンキングともあいまって、革新的な診断薬・治療薬の創出や個人に最適な医療の提供・普及が期待される。

こうした現状を踏まえ、今回の導入シナリオの策定にあたっては2009年までの改訂作業を継承し、我が国が取るべき具体的方策の一つとして重要な考え方として、「安全性が高く優れた日本発の革新的な医薬品を創出しつつ、健康寿命の延伸、最適な医療の実現、医療産業力の強化を図る」という考えをベースに、20年後のあるべき姿を見

据え、「より予防的な治療」の実現へと向かうことが重要であると分析した。

次いで、「より予防的な治療」を具体化し、将来実現すべき社会像として以下の方向性を提示した。

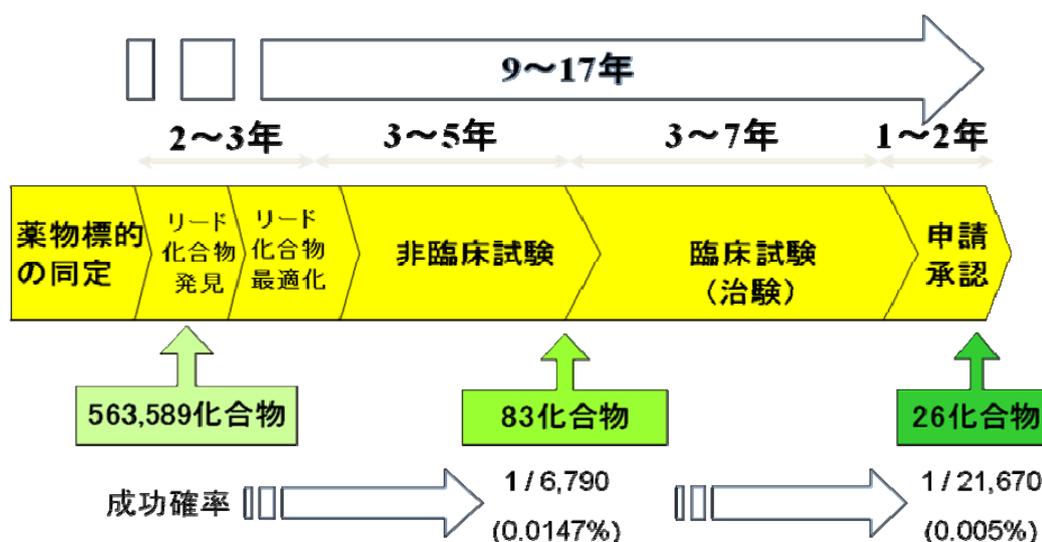
- ① 有効な予防が開発され、疾患発症年数を遅らせ、重症化を防ぐ
- ② エビデンスに基づく最適な診断治療が、より正確・安全に受けられる
- ③ 患者のQOLが向上し、高齢化社会を健康に過ごすことができる
- ④ 医療関連産業分野の技術革新により、安全性が高く優れた日本発の革新的な医薬品や医療サービスを創出し、世界への貢献を図りつつ国際競争力を強化する

さらに、創薬や診断技術の開発といった開発プロセスの改善という視点から、国民に深刻な影響を与えている疾患の克服への技術の貢献可能性を検討するため、患者数・治療満足度の低さ等から「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」を検討対象の疾患とし、課題解決のために必要な技術を抽出して、それぞれに導入シナリオを検討した。加えて、疾患ごとの検討結果を俯瞰し、あるべき将来像への変革に共通して必要となる産業波及性の高い重要技術課題を抽出して、共通の導入シナリオを作成した。共通する重要技術課題としてまとめた項目は、①ヒト臨床情報・サンプルのバンキング、②ヒト生体機能のモニタリング、③エビデンスに基づく創薬診断である。

(2) 研究開発の取組

現在の創薬プロセスにおいては、1つの医薬品が製品化されるまでに、9~17年程度の期間及び500億円を超える開発費が必要であるといわれている。研究開発費のうちの7割強は、臨床試験までに投入されている。

図1 新薬開発の特質 (03年~07年の例)



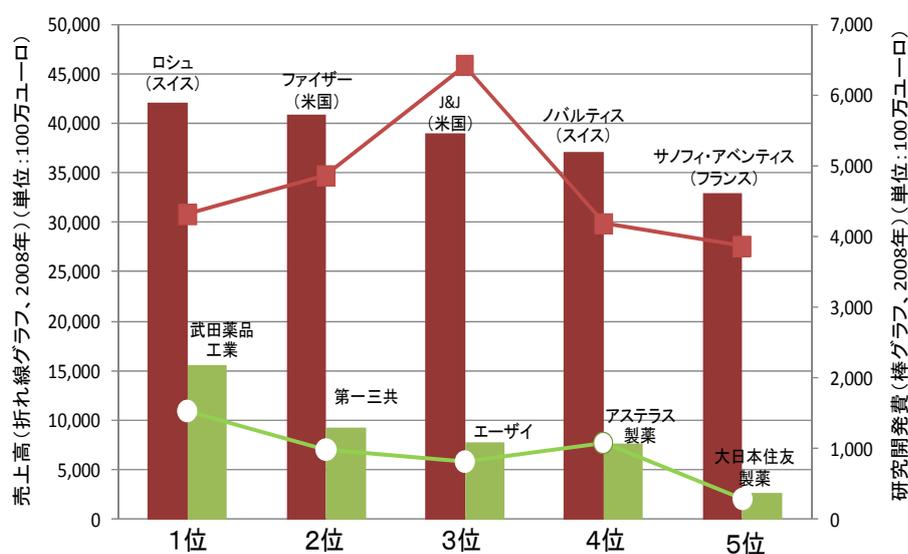
出典：てきすとぶつく 製薬産業 2009

また、研究開発領域の拡大とともに臨床試験開始後の成功確率が減少傾向にあるこ

とから、製薬企業における研究開発費の総額は増大し、創薬における研究開発リスクはますます高まる傾向にある。

我が国の企業の研究開発投資は、欧米と比べると規模で劣る。例えば全世界・日本の製薬企業の研究開発投資トップ5社を比べると、研究開発費・売上高ともに、規模の格差が顕著である。また、政府の研究開発規模も10倍近くの差がある。一方で、このような状況下、売上高は必ずしも大きくないが、医薬品の世界売り上げランキング50位以内に日本オリジンの医薬品が10品目入っており、限定的な領域での強みが伺われる。

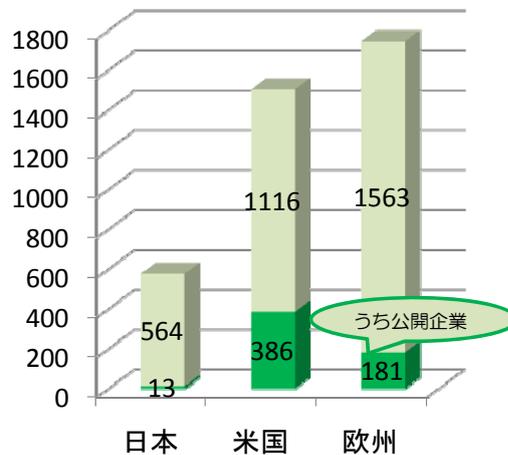
図2 全世界・日本の製薬企業トップ5社の比較



(出典)European Commission The 2009 EU Industrial R&D Investment Scoreboard より経済産業省作成

また、バイオベンチャーは、他分野ベンチャー企業以上に重要な役割を担うところであるが、企業数、ベンチャーキャピタルからの投資額、開発起源企業別にみたバイオ医薬品数において、我が国のバイオベンチャーは、欧米との比較において、質・量ともに不十分と言わざるを得ない。

図 3 バイオベンチャーの企業数海外比較



出典：E&Y「Global Biotechnology Report 2008」バイオインダストリー協会「2007年バイオベンチャー統計調査」

このため、我が国が少ない研究開発費で効率的な創薬を達成し、国際競争力を高めていくためには、基礎研究の成果を迅速に臨床に橋渡ししていくことを含め、産業界のニーズや我が国の強みを踏まえつつ、創薬の成功確率を向上し新薬を効率的に生み出す創薬力強化のための産業基盤の整備、診断と治療が一体化した新しい医療を実現する技術開発に加え、オープンイノベーション環境の整備などに政府予算を投入していくことが重要である。

このような状況の中、経済産業省においては、生体分子の機能・構造・ネットワーク解析や、それら研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に活用するためのデータベース整備等を行うことにより、個々に適切に対応した医療、予防医療の実現や画期的な新薬の開発、健康維持・増進につながる新しい産業の創出に向けた取組を行ってきた。今後とも、各省庁連携のもと、ゲノム、エピゲノム、RNA、タンパク質、糖鎖、脂質等、様々な切り口や統合的なアプローチによって、生命現象や疾患メカニズムに関する研究を進展させていくとともに、基礎研究の成果に基づく波及効果の高い革新的な診断・治療技術をいち早く産業応用へと繋げ、ライフ・イノベーションによる国際競争力の強化によって、日本の成長を牽引する産業セクターとすべく研究開発を行っていく。

(3) 関連施策の取組

創薬・診断分野における将来像を実現するためには、研究開発のみならず、開発の迅速化や成果普及につながる制度整備、将来の国際展開を見据えた標準化の取組等の関連施策を研究開発政策と一体的に推進する必要がある。このため、政府関係機関に

において以下の取組がなされている。

〔起業・事業支援〕

- ・ 「産業クラスター計画」に基づき、全国のバイオクラスターにおいて、企業間のネットワーク形成の支援、産学連携による研究開発プロジェクトの支援、地域系ベンチャーファンドによる資金調達支援等の実施。

〔導入補助・支援〕

- ・ 個人遺伝情報保護ガイドラインの適切な運用
- ・ バイオインダストリー安全対策調査の実施
- ・ バイオ事業化に伴う生命倫理問題等に関する研究の実施

〔ガイドライン整備〕

- ・ テーラーメイド医療用診断機器 (DNA チップ) 開発ガイドライン 2007—遺伝子型 (ジェノタイピング) 検定用 DNA チップに関して—」を 2007 年 5 月に公表。翌 2008 年 4 月に、厚生労働省より「DNA チップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標」が公表。
- ・ 発現解析 DNA チップガイドラインについて医療機器ガイドライン策定事業の中で継続審議中。

〔規制・制度改革、他省庁との連携〕

- ・ バイオ・イノベーション研究会の下での医薬品産業を発展拡大させるための方策の検討。
- ・ 内閣府、文部科学省、厚生労働省及び経済産業省の間で2009年2月に改訂した「革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略」に基づき、研究資金の集中投入、ベンチャー企業の育成、臨床研究・治験環境の整備、アジアとの連携、薬事法における審査の迅速化・質の向上、イノベーションの適切な評価等、本分野における研究から上市に至る過程の一貫かつ集中的な支援の実施。
- ・ 2008年7月22日に設置された「健康研究推進会議」による、先端医療開発特区（スーパー特区）」制度の推進と各省が実施している臨床研究や橋渡し研究を一体的に運用していくための司令塔機能の発揮。

〔基準・標準化〕

- ・ バイオチップのデータ信頼性・互換性向上のための基準・標準化活動の推進を目的として、2007年10月、特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアムが設立（参加企業68社）。

〔知的基盤整備〕

- ・ 研究開発の企画段階から、研究テーマ周辺の論文及び特許状況のサーベイ実施や研究開発の実施段階における特許出願後の事業化構想等、特許に関する戦略的取組の実施をサポート。

〔特許化〕

- ・特許庁は、2008年10月より、現行の早期審査よりも更に早期に審査を行う「スーパー早期審査制度」を創設、早期の事業化を目指す発明やライフサイクルが短い発明への早期審査のニーズを充足させるべく、制度を構築。

(4) 海外での取組

米国では、NIHにおける約3兆円の研究開発予算のうち、約90%が大学や病院といった外部へのグラントに充当され、10%がNIH クリニカルセンター等の内部研究に充てられている。2009年度においては、ARRA (American Recovery and Reinvestment Act; 米国再生・再投資法)により、NIH 予算は約1兆円上積みされ、生物医療学研究等の研究開発の加速が予想される。NIH では、NIH に属する27 研究所全体として取り組むべき研究分野を見極めることを目的に、NIH ロードマップを2003年9月に作成し、以下の主要テーマについて取組が行われている。

①New Pathways to Discovery :

生体メカニズムの理解を主眼とした、細胞や組織を構成する生体分子のネットワーク、分子イメージング、構造生物学、バイオインフォマティクス、ナノ医療等に係る研究開発。

②Research Team of the Future

専門分野を越えた学際的研究を行うチーム、新しい組織モデルの検討。特にハイリスク研究分野では、43の橋渡し研究、81の新規事業、115のニューイノベーター研究に資金が配分されている。

③Re-Engineering the Clinical Research Enterprise

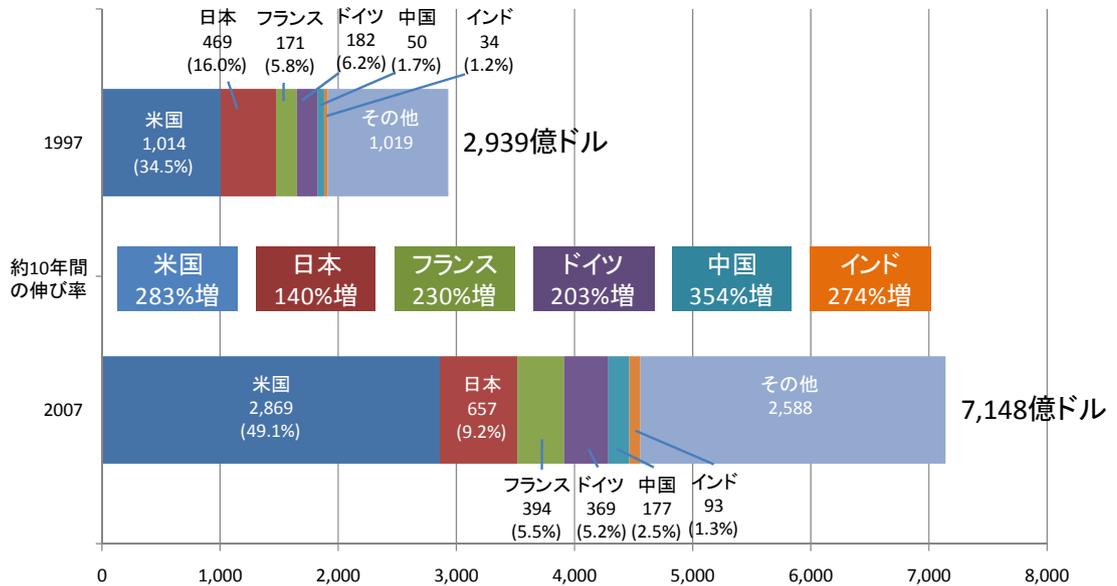
研究上の発見や諸成果を、迅速に臨床現場に展開するためのシステム構築。

欧州では、科学技術に関する総合的なプログラム (Framework Programme) を3~4年単位で実施している。2006年12月には、2007年~2013年の取組を示したFP7が策定・開始されている。FP7においては、欧州レベルでの官民パートナーシップを実現化する新たな手法として共同研究イニシアチブが取り組まれており、6領域のイニシアチブの1つとして、「革新的医薬品イニシアチブ」が展開されている。当該イニシアチブでは、十分な医療が提供されていない領域に、研究成果の迅速な橋渡しを促進する仕組みを構築することを狙いとしている。

(5) 民間での取組

過去10年で、世界の医薬品市場はおよそ2倍近く拡大しているが、日本市場の伸びは2割程度にとどまり、結果として日本が占める割合は半減している。

図 4 世界の医薬品市場の推移



出典：「第1回バイオ・イノベーション研究会」資料

こうした中、経営基盤の強化を図るため、企業間の再編や外部リソースの活用が進んでいる。

表 1：近年の再編動向（国内）

統合年	主たる企業名
2005年	・アステラス製薬（山之内製薬、藤沢薬品工業） ・大日本住友製薬（大日本製薬、住友製薬）
2007年	・第一三共（三共、第一製薬） ・田辺三菱製薬（田辺製薬、三菱ウェルファーマ）
2008年	・協和発酵キリン（協和発酵、キリンファーマ）

外部リソースの活用は、経営基盤の強化を図ることにとどまらず、企業にとってこれまで研究が立ち後れていた有用技術の早期導入に役立っているケースもあり、技術が国境を越える一つの契機にもなっている。

また、主要薬が相次いで特許切れになる「2010年問題」を見据え、米国企業を中心とした大規模な買収・合併の動きが加速していることも、今後の企業における研究開発に影響を与えることが予想される。

表 2：国境を越えた組織再編・技術提携

公表時期	内容
2008年5月	武田薬品工業がミレニアム・ファーマシューティカルズ社(米)を88億ドルで買収

2008年9月	ベーリンガーインゲルハイム(独)と北海道大学発ベンチャー、イーベックが5,500万ユーロで抗体作成技術のライセンス契約を締結
2009年1月	ファイザー(米)がワイス(米)を680億ドルで買収
2009年3月	メルク(米)がシェリング・プラウ(米)を411億ドルで買収
2009年3月	ロシュ(スイス)がジェネンティック(米)を468億ドルで買収

(6) 改訂のポイント

- 新たな創薬・診断分野の技術戦略マップを作成するに当たり、患者数・治療満足度の低さ等から「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」を選定、それぞれに導入シナリオを検討した後、そこから導かれる以下のあるべき姿・将来像と必要な技術開発を示した共通の導入シナリオを作成した。
- (1) 創薬・診断分野の目標と将来実現する社会像において、新成長戦略(基本方針)に関する記載を追加した。
- [ガイドライン整備]の欄にDNAチップガイドラインに関する記載を追加した。
- [規制・制度改革、他省庁との連携]の欄に経済産業省において開催した「バイオ・イノベーション研究会」に関する記載を追加した。
- [基準・標準化]の欄に特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアムに関する記載を追加した。
- (4) 海外での取組において、米国NIHの研究開発予算に関する記載を追加した。

II. 技術マップ

(1) 技術マップ

国民にとって最大の関心事項である健康とは、「病気になった場合に早期に健康状態に戻れること」、そして、「そもそも病気にならず健康であり続けること」に、大きく二分される。この2つのニーズに対応するためには、将来の疾患リスクを事前に把握した上で、予防的医療も視野に入れ、各人において日々の健康管理を可能とすること、また、より早期に適切な診断によって病気の兆候を捕まえるとともに、診断に基づき個々人に応じた副作用の少ない最適な医療を提供することが重要である。

このため、技術戦略マップ策定当初から、①「より良い医薬品の開発・提供」及び②「健康産業の創造(治療から予防への転換)」を2つの戦略として位置づけ、ニーズに従って必要な技術を技術マップ上に俯瞰してきた。しかし、前述したように、創薬や診断技術の開発といった開発プロセスの改善という視点から、国民に深刻な影響を与えている疾患の克服への技術の貢献可能性を検討することの重要性にかんがみ、患者数・治療満足度の低さ等から「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」を検討対象の疾患とし、「健常ー発症ー治療」というフェーズごとに、課題解決のために必要な技術を抽出した。さらに疾患ごとの検討結果を俯瞰し、あるべき将来像への変革に共通し

て必要となる産業波及性の高い重要技術課題を抽出した、「共通技術マップ」を作成した。

2009 年度まで改訂を重ねてきた技術戦略マップを下敷きとしつつ、「より予防的な医療へと変革を推し進めること」が重要であるとの考えに基づき、「現状」を「あるべき姿」へと変革を促していくうえでキーとなる産業波及性の高い重要技術を抽出した。具体的には、「共通技術マップ」としてまとめた項目は、①ヒト臨床情報・サンプルのバンキング、②ヒト生体機能のモニタリング、③エビデンスに基づく創薬診断である。より詳細に例示すると、臨床サンプルバンクの整備や疾患と生活習慣に関するコホート研究、バイオインフォマティクス・シミュレーションツールの開発等の *in silico* 解析の進展、エピゲノム情報等の解析、サロゲートマーカーの開発、イメージング技術の開発等、いずれも、健常なうちに疾患の兆候をいち早く予測するための技術が挙げられた。

(2) 重要技術の考え方

網羅的な技術の俯瞰と重要技術の抽出については、技術戦略マップ 2009 における作業結果を引き続き踏襲するものとし、技術戦略マップ 2010 については、前述したように 3 疾患に係る問題の解決に資する技術について記載した。

(3) 改訂のポイント

- 国民の生活の質に大きな影響を及ぼしている「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」と、そこから導き出される共通の技術マップを作成した。

Ⅲ. 技術ロードマップ

(1) 技術ロードマップ

導入シナリオ及び技術マップと同様に、「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」の 3 疾患の技術ロードマップに加え、各疾患の治療等のあるべき将来像から導き出される必要な技術を俯瞰する、共通の技術ロードマップも作成した。

「①ヒト臨床情報・サンプルのバンキング」について、アルツハイマー病等精神性疾患はヒトで特に発達した高次機能の障害であることから、イメージング技術等の基礎科学の発展を踏まえつつ、ヒトを対象として疾患メカニズムを探索することが極めて重要であるとした。加えて、がん等の領域においても、ヒト個体やヒト臨床サンプルを対象とした研究アプローチの重要性が示唆された。2030 年を目処に、ヒト臨床サンプルバンキングシステムが構築され、ヒトを対象とした解析から示唆された疾患メカニズムを、ヒトの病態を忠実に再現したモデル動物等を用いた創薬・診断技術開発に応用する等、大きな変革と進展が期待される。

また、「②ヒト生体機能のモニタリング」については、疾患の予防的な観点から重要な課題として取り上げた。将来、病気になるかどうかは遺伝子情報のみでは決まらず、その脆弱性や環境因子の影響によって左右される。環境因子等の影響を最初に受ける

のはゲノムのエピジェネティクス的な変化と考えられることから、パーソナルゲノムやエピゲノムに関する解析を一層進展させることが重要であると分析した。これにより、正確なリスク診断の実用化や、解析によって得られた情報を自己管理するシステムの構築が期待される。サロゲートマーカーや薬効評価のイメージングツールの開発を通じて、一層早期かつ適切な診断・治療の実現が望まれる。

「③エビデンスに基づく創薬診断」については、ファーマコゲノミクス解析による薬剤の応答性や有害事象高リスク群に対する治療が実施されることにより、新薬開発成功率が向上することが期待される。また、高性能な診断技術をベースに、診断と治療に対する一体的な研究開発に取り組むことが重要と分析した。

これらの技術開発の実現を通じて、現在の治療を中心とした医療から、予防を重視した医療へと変遷し、また、病気になった場合であっても、現在、治療困難な疾患も含め、患者の体質・遺伝情報や病態に応じた個別療法の提供が可能になる等、個別化医療が進展することが期待される。

(2) 改訂のポイント

- 国民の生活の質に大きな影響を及ぼしている「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」と、そこから導き出される共通の技術ロードマップを作成した。

IV. その他の改訂のポイント

○ 国際競争ポジション（ベンチマーキング）

- 図 3 に「バイオベンチャーの企業数海外比較」、図 4 に「世界の医薬品市場の推移」を追加した。

20年後の予防、診断、治療の姿（創薬診断技術）

あるべき
姿

- ◆ 有効な予防法が開発され、疾患発症年齢を遅らせ、重症化を防ぐ
- ◆ エビデンスに基づく最適な診断治療が、より正確・安全に受けられる
- ◆ 患者のQOLが向上し、高齢化社会を健康に過ごすことができる
- ◆ 医療関連産業分野の技術革新により、国際競争力が強化される

健康寿命延伸
最適な医療の実現
医療産業力の強化

現 状

技術開発

将 来 像

予
防

- 食事・運動・禁煙等、生活習慣の改善により予防する
- 家族の病歴や健診等の結果で、発病リスク・可能性を判断する
- 発病メカニズムが不明な疾患では、明確な予防法が存在しない

診
断

- 画一的な項目を対象とした集団健診で、平均値を指標に健康度を判断する
- 少数のバイオマーカーを、個別検診で利用する
- 画像や病理組織による診断は、限定的である

治
療

- 医薬品は対症療法が中心で、個々の患者に最適な効果を持つとは限らない
- 外科手術、薬物療法（分子標的薬・バイオ医薬）、放射線療法等、複数の治療法を組み合わせる

①ヒト臨床情報・サンプルのバンキング

- ◆ 健常人を含めたヒト臨床サンプルの効率的収集と、バンキングシステム
- ◆ 前向きコホート研究・大規模臨床データベースと、インテリジェントな情報処理基盤技術

②ヒト生体機能のモニタリング

- ◆ ゲノム、エピゲノム情報等の統合的解析
- ◆ 実用的バイオマーカー、サロゲートマーカー
- ◆ イメージング技術（画像診断技術）の向上と、多様な生体機能のモニタリング技術

③エビデンスに基づく創薬診断

- ◆ エビデンスに基づく予防・診断・治療の新たな方法と医薬の開発による選択肢の拡大

予
防

- ゲノム・エピゲノム情報解析等により、各個人の疾患発症リスクが的確に判断できる
- リアルタイム生活習慣計測や発症リスクバイオマーカー測定により、健康管理・食品・薬剤等、各自に最適な疾患の予防手段を選択し、発症を予防できる
- バイオマーカー・遺伝子検査、画像診断等を用い、複数の治療薬や治療法から各自に最適な薬や治療法が選択でき、治療効果の判定や再発等も、モニターできる
- 核酸医薬、次世代抗体医薬等、画期的な医薬品が実現する
- 部分的には、失われた臓器の機能再建等、再生医療による治療が受けられる
- 最適な治療により、社会復帰までの時間が短縮する
- 疾患と共存し、QOLを維持できる健康管理法が確立する

診
断・
治
療

20年後のアルツハイマー病(AD)の予防、診断、治療の姿

あるべき姿

- ◆ アルツハイマー病(AD)による神経変性メカニズムが解明され、制御可能な疾患となる
- ◆ 予防的治療法の確立により、発症年齢を5年遅らせる
- ◆ 高齢者が健康に過ごすことにより、本人・家族のQOLの向上、社会活力の維持につながる
- ◆ AD患者が大半を占める認知症の介護費(2000年度推計で約2.3兆円)を大幅に削減できる

現状

基礎・臨床研究

- 疾患メカニズムが解明されず、明確な予防法が存在しない
- 日本はADの疫学研究が不十分

診断

- 自覚(他覚)症状に伴う臨床心理学的検査が中心である
- 早期発見が困難で、加齢等による認知機能低下との区別が難しい

治療

- 医薬品による対症療法が中心
- 一度失われた認知機能の回復は困難である
- アミロイド仮説に基づいた医薬品等、根本治療を目指した薬が開発されている

社会環境

- 在宅介護や施設介護など、高齢者の介護様式は多様化している
- 認知症による社会的負担は深刻である

技術開発

①メカニズム解明に向けた基礎研究

- ◆ 病態解明のためのツール開発、及びヒトの病態を忠実に再現できる動物モデルの開発
- ◆ 大規模臨床データベースの構築・解析と、疫学をベースとした前向きコホート研究

②早期診断による早期治療への展開

- ◆ 血液などを用いたAD特異的バイオマーカーの開発
- ◆ 微量のアミロイド、神経回路異常を高感度に検出する機能画像検査法の開発

③認知機能維持・回復のための治療

- ◆ 新規作用機序を持つ医薬品の開発
- ◆ エビデンスに基づいた統合的医療と評価法の開発

社会環境の整備は診断・治療技術開発のドライバーとなる

将来像

予防

- AD発症リスクのメカニズムが解明され、発症年齢を遅らせる
- 画像診断等を用いた早期診断と予防的治療により、症状発現を未然に防ぐ
- 軽度認知機能障害を正確に診断し、進行防止治療を開始できる
- 体液バイオマーカー・遺伝子検査、画像診断等を活用し、複数の薬から最適な治療薬が選択できる
- 適切な治療とリハビリにより、一定レベルの認知機能を回復できる

診断・治療

社会環境

- 地域コミュニティがネットワーク化され、ADの早期発見・治療が実現するとともに、患者の認知機能の維持により、介護者等の負担も軽減される
- 治験拠点と支援体制の整備等により、診断・治療技術開発が効率化される
- 世界に先立って超高齢化社会となる日本の経験・技術を、海外に広める

20年後の糖尿病の予防、診断、治療の姿

あるべき姿

- ◆ 糖尿病の平均発症年齢を10年遅らせる
- ◆ 患者自身が合併症発症抑制の管理ができる
- ◆ 合併症発症まで至る人は現在の十分の一になる

現 状

技術開発

将来像

予 防

- 食事・運動・禁煙等、生活習慣改善による予防が中心

診 断

- <発症診断>
- 重症化するまで自覚症状がない
 - 血糖値による診断に加え、新診断基準でヘモグロビンA1cも追加へ
- <合併症リスク診断>
- 合併症の遺伝子多型検査を一部開始

治 療

- <糖尿病治療>
- 病態進展に伴い、食事・運動療法、治療薬、インスリン投与等を組み合わせる
 - 治療途中のドロップアウトが多い
 - 低血糖を起こさない血糖制御薬が上市された
- <合併症治療>
- 網膜症・脳血管障害・心血管障害は、動脈硬化前段階の制御により改善できる
 - 腎症は治療継続しても進行例がある

社会環境

- 特定健診・保健指導は低受診率が課題
- 健康日本21
- 一部地域での地域医療連携

①健康管理与予備軍の発症予防

- ◆ リアルタイム生体情報モニタリングと、遺伝・環境要因等多数の情報を扱うデータマイニングに基づく健康管理法
- ◆ ゲノム、エピゲノム情報等を統合したインテリジェント創薬等による予防薬
- ◆ 実用的サロゲートマーカー測定機器

②合併症リスクの発見

- ◆ 合併症リスク診断の有効なバイオマーカーの開発
- ◆ 動脈硬化等合併症リスクの簡便な診断技術

③合併症の予防と治療

- ◆ インテリジェント創薬等による糖尿病及び合併症治療薬の開発

<予 防>

- リアルタイムな生活習慣計測と発症リスクのバイオマーカーの測定等により、食事をはじめ、各個人に最適な生活習慣と予防手段を選択できる
- カロリー制限模倣薬、体重減少模倣薬、運動模倣薬等が開発され、予備軍の糖尿病発症が抑制できる

<合併症診断と予防>

- リアルタイムな生活習慣計測と発症リスクバイオマーカーの測定等により、糖尿病合併症リスク診断・予防ができる

<診断と治療>

- 血糖値を最適にコントロールし、糖尿病と共存できる
- 各個人の遺伝的背景と環境要因に適応した、糖尿病治療薬及び、一定の機能回復効果のある合併症治療薬を選択できる
- 再生医療による糖尿病治療が開始される

予 防

診 断・治療

20年後のがんの予防、診断、治療の姿

あるべき姿

- ◆ がん死亡率を40 %減(平成16年比、75歳以下年齢調整死亡率)
- ◆ 有効な予防法を50種類以上開発
- ◆ 生存率に加え、QOLを重視した治療の日常化

現状

予防

- 家族の病歴や健診等の結果で、発病リスクを推定する
- 禁煙・運動等、効果のある予防法は限定的である

診断

- 画一的な項目を対象とした集団健診で、平均値を指標に健康度を判断する
- 少数のバイオマーカーを、個別検診で利用する
- 病理組織による診断が主流である

治療

- 細胞毒性のある薬剤が中心である
- 外科手術、薬物療法(分子標的薬・バイオ医薬)、放射線療法等、複数の治療法を組み合わせる
- 医薬品の臨床開発に課題が多い

社会環境

- 第3次対がん10か年総合戦略(研究事業)
- がん対策基本法
- がん対策推進基本計画
- がん情報サービス
- 健康増進法

技術開発

① サロゲートマーカーの開発

- ◆ 正常組織も対象とした、多型解析を含むゲノム・エピゲノム解析
- ◆ ゲノム・エピゲノム情報等に基づくサロゲートマーカーの開発

② 早期がん病変の性質解明と検出

- ◆ 早期がん病変及び、がん細胞の特異的性質(転移、浸潤、がん幹細胞、細胞形質転換等)の生物学的機構の解明
- ◆ がん細胞及び免疫状態のモニタリング・イメージング技術の開発

③ 豊富かつ適切な治療法の選択

- ◆ がんの特異的性質を標的とした画期的医薬品及び治療法(がんワクチン、核酸医薬、予防薬、遺伝子・細胞治療、再生医療等)の開発
- ◆ ファーマコゲノミクスのマーカー開発

- ◆ 社会・政策的対応・支援の強化
- ◆ 新薬開発のスピードアップ

将来像

<エビデンスに基づく予防>

- ゲノム・エピゲノム情報等を統合し、リアルタイムに発病危険性を判定できる
- 危険性に応じた健康管理(生活習慣・食品・薬剤等)により、発症が予防できる

<超早期診断>

- 血液等のサロゲートマーカーが充実し、簡単に診断できる
- イメージング技術等により、超早期から病変が確認され、組織観察に依存せず治療の判断ができる

<個別化医療>

- 早期発見と治療法の充実により、完治するがんが大幅に増加する
- がんの病態や体質に加えて、QOLや経済性も考慮し、各個人に最適な治療が受けられる
- 治療に伴う苦痛が軽減され、社会復帰までの時間が短縮する
- 失われた臓器の機能回復など、一部のがんで再生医療が始まる

予防

診断・治療

創薬・診断分野の技術マップ(1/4)

健 常

発 症

治 療

①ヒト臨床情報・サンプルのバンキング

健常人を含めたヒト臨床サンプルの効率的収集と、バンキングシステム	臨床サンプルバンクの整備、高精度なサンプルの解析法
	ヒト細胞製造・培養技術 iPS細胞研究 ヒト病態を忠実に再現できる動物モデル、病態プロセスモデルの開発
前向きコホート研究・大規模臨床データベースと、インテリジェントな情報処理基盤技術	疾患と生活習慣に関するコホート研究 バイオインフォマティクス(統計・疫学的解析手法等)とデータマイニング技術 臨床研究データに基づくシミュレーションツールの開発 疾患の特異的性質の解明

②ヒト生体機能のモニタリング

ゲノム、エピゲノム情報等の統合的解析	ゲノムワイド解析などを用いた網羅的遺伝子解析
	エピゲノム情報等の変化の網羅的解析
	バイオインフォマティクス・データマイニング技術による統合的解析手法
実用的バイオマーカー、サロゲートマーカー	生活習慣(食事・運動量)バイオマーカー開発
	簡便でリアルタイム計測可能なバイオマーカー測定機器開発
	超早期診断のためのバイオマーカー・測定機器開発
	発症リスクバイオマーカー開発 合併症発症リスクバイオマーカー開発
イメージング技術(画像診断技術)の向上と、多様な生体機能のモニタリング技術	時系列 in vivo 1細胞計測技術
	体液バイオマーカーの検査技術
	異常などを早期から評価できるイメージング技術
	高感度機能画像検査法
	小型・簡易なゲノム・エピゲノム測定装置 ヒトを対象とした病態解明、薬効評価のためのツール開発

③エビデンスに基づく創薬診断

エビデンスに基づく予防・診断・治療の新たな方法と医薬の開発による選択肢の拡大	リアルタイムなリスク診断に基づく予防薬・予防法
	薬物動態、薬力学、ファーマコゲノミクス解析技術
	再生医療による治療法
	エビデンスに基づく分子標的薬(抗体医薬)
	核酸医薬
	免疫療法
	遺伝子治療・細胞治療法
	疼痛緩和薬

創薬・診断分野の技術マップ(2/4)

アルツハイマー病技術マップ

	健 常	発 症	治 療
①メカニズム解明に向けた基礎研究			
病態解明のためのツール開発、及びヒトの病態を忠実に再現できる動物モデルの開発		ヒトを対象とした病態解明、薬効評価のためのツール開発 動物モデル・病態プロセスモデルの開発	
大規模臨床データベースの構築・解析と、疫学をベースとした前向きコホート研究	コンピュータを利用した臨床心理学的試験法	ヒト脳バンクの整備と、剖検脳試料の高精度解析法 AD初期病変に対応した臨床心理検査の開発	
②早期診断による早期治療への展開			
血液などを用いたAD特異的バイオマーカーの開発		髄液中のアミロイドβ, tauなどADバイオマーカーの開発 尿・血液等由来のADバイオマーカーの開発 AD特異的体液バイオマーカーの測定装置・イメージング技術 ゲノムワイド解析などを用いた網羅的遺伝子解析	
微量のアミロイド、神経回路異常を高感度に検出する機能画像検査法の開発	神経回路異常等を早期から検出するイメージング技術	微量アミロイドを高感度に検出するイメージング技術 脳血流、脳萎縮のイメージング技術	
③認知機能維持・回復のための治療			
新規作用機序を持つ医薬品の開発	糖尿病などADリスク疾患の治療法	AchE阻害剤など対症療法 セクレターゼ阻害剤やアミロイドβ・tau免疫療法など根本治療薬 脳特異的な薬物送達(DDS)技術 幹細胞を利用した神経細胞再生医療	
エビデンスに基づいた統合的医療と評価法の開発	遺伝子検査等によるAD発症リスク評価	臨床研究データに基づくシミュレーションツールの開発 認知機能を維持・回復させるコンピュータ支援プログラムの開発 ITを活用した生涯健康管理データの蓄積と活用	

創薬・診断分野の技術マップ(3/4)

糖尿病 技術マップ

	健 常	発 症	治 療
①健康管理と予備軍の発症予防			
リアルタイム生体情報モニタリングと、遺伝・環境要因等多数の情報を扱うデータマイニングに基づく健康管理法	発症リスクバイオマーカーの開発 生活習慣計測マーカーの開発 糖尿病と生活習慣に関するコホート研究 バイオインフォマティクス・データマイニング技術		
ゲノム・エピゲノム情報等を統合したインテリジェント創薬による予防薬	アディポネクチン上昇薬（体重減少模倣薬） 基礎代謝上昇薬（運動模倣薬） カロリー制限模倣薬	血管病に向かうプロセス制御薬	
実用的サロゲートマーカー測定機器	各種パラメータ計測法(ゲノムワイド、パーソナルゲノム解析、生活習慣等) 次世代臨床検査機器、個別診断機器 時系列 in vivo 1細胞計測技術		
②合併症リスクの発見			
合併症リスク診断の有効なバイオマーカーの開発	簡便でリアルタイムに計測可能な生活習慣(食事・運動量)バイオマーカー・測定機器	合併症発症リスクバイオマーカーの開発	
動脈硬化等合併症リスクの簡便な診断技術	リアルタイム・非侵襲計測技術 パーソナルゲノム等を活用した診断機器 頸動脈エコーの自動測定		
③合併症の予防と治療			
インテリジェント創薬等による糖尿病及び合併症治療薬の開発	インテリジェント創薬(多数のパラメーターを統合) DDS技術	再生医療・遺伝子治療 β 細胞移植 腎再生誘導・線維化抑制技術 脂肪細胞の形質転換制御 AGE(終末糖化産物)除去技術	

創薬・診断分野の技術マップ(4/4)

がん 技術マップ

	健 常	発 症	治 療
①サロゲートマーカーの開発			
正常組織も対象とした、多型解析を含むゲノム・エピゲノム解析	バイオインフォマティクス、システム生物学		
	多型解析を中心としたゲノム解析		
ゲノム・エピゲノム情報等に基づくサロゲートマーカーの開発	超早期診断も可能なサロゲートマーカーの開発		
	個人に最適ながんスクリーニングマーカーの開発		
②早期がん病変の性質解明と検出法			
早期がん病変及び、がん細胞の特異的性質(転移、浸潤、がん幹細胞、細胞形質転換等)の生物学的機構の解明	頻度の高いがんのリスク解析		
	遺伝性腫瘍の遺伝子診断		
	がん細胞の特異的性質解明(転移、浸潤、がん幹細胞など)		
がん細胞および免疫状態のモニタリング・イメージング技術の開発	リアルタイムの発がんリスク診断装置		
	個人に最適ながんリスク自己診断システム		
	がん細胞および免疫機能のモニタリング・イメージング技術		
③豊富かつ適切な治療法の選択			
がんの特異的性質を標的とした画期的医薬品及び治療法(がんワクチン、核酸医薬、予防薬、遺伝子・細胞治療、再生医療等)の開発	発症リスクに合わせた予防薬・機能性食品		
	がん本態解明に基づく分子標的薬		
	浸潤転移等を抑制する免疫療法(ペプチド療法等)		
	核酸医薬		
	遺伝子治療・細胞治療		
	DDS		
	がん幹細胞を標的とした創薬・iPS細胞研究		
	再生医療		
がん疼痛緩和薬			
ファーマコゲノミクスのマーカー開発	ファーマコゲノミクスのマーカー		
	ファーマコゲノミクスによる治療法の有効性、安全性評価法		
	がん細胞の特性に基づいたがんの個別化医療		

添付資料③

プロジェクト基本計画

(健康安心イノベーションプログラム)
「iPS細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発」
基本計画

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

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

幹細胞は様々な組織に分化する能力を有しており、その性質を用いることで神経、心筋、膵臓β細胞等の様々な細胞を試験管内で得ることができる。これを用いることで従来は治療することが困難であった神経疾患や心臓疾患の根本的治療法の開発や、創薬分野におけるヒトの細胞を用いた薬効評価や安全性薬理試験などの創薬スクリーニングに利用できる利点を有する。中でもiPS細胞(人工多能性幹細胞)は、皮膚等の組織から作製可能であることから倫理的な障壁が低く、加えて遺伝的に多様な細胞が得られること、免疫拒絶反応を回避、あるいは軽減可能であること等から、有用な細胞源として期待が大きい。しかし、iPS細胞等幹細胞を産業で利用するためには、細胞の効率的な作製方法、腫瘍化の問題、様々な状態が混在したヘテロな細胞集団からの標的細胞の評価・選別、品質管理方法の確立、機能発現のための細胞から組織への再構築技術の開発など、様々な解決すべき課題がある。

iPS細胞の早期な産業応用が期待される創薬分野においては、近年、研究開発費が大幅に伸びている一方で、新薬の承認数は低下する傾向にある。特に、臨床開発の最終フェーズにおいて、有効性が確認できないことや、安全性等が原因となって開発中止となるケースが増加している。また、従来の非臨床試験及び臨床試験において安全性に何ら問題のなかった薬物でも、市販後において患者に実際に投与されてから初めて致死性不整脈を誘発することが判明したため急遽市場から撤退した事例もある。さらに制ガン剤や抗菌剤などの人体に毒性を持つことが知られている薬剤では、薬効と副作用は表裏一体の関係にあり、ヒトに対する安全域の程度が許容範囲となるかどうかを的確に推測することが開発候補薬として臨床開発に進めるかどうかを判断する上で非常に重要な技術課題となっている。このような事態を改善し、より安全性の高い医薬品を効率良く開発するためには、創薬研究のより早い段階で、開発候補薬のヒトでの薬効と安全性をより精度高く予測する基盤技術の開発を行うことが求められている。

こうした状況を踏まえ、本研究開発は、様々な細胞組織に分化できるヒトiPS細胞等幹細胞の産業利用を促進することを目的として、iPS細胞への効率的な誘導因子の探索を行う。同時に、多様な幹細胞操作技術の成果を活用し、iPS細胞の新規誘導法開発に結びつける。また、細胞源としてiPS細胞等幹細胞を一般に供給する上で必要となる、細胞の性質や品質を評価する技術や細胞の安定供給を可能とする基盤技術を確立する。さらに、iPS細胞等幹細胞から心筋などの細胞に効

率よく分化させ、これを利用して、開発候補薬の潜在的な致死性不整脈を誘発する可能性を、ヒト個体と高い相関性をもって予測する創薬スクリーニングシステムの開発を行う。

これにより、我が国が世界を先導している科学的成果であるiPS細胞等幹細胞を、いち早く産業応用に繋げることが期待できるとともに、創薬研究のより早い段階において、開発候補薬の効率的で確かな絞り込みを行うことが可能となり、創薬研究の短縮や研究開発費の削減、さらにはより安全な医薬品の開発の促進が期待される。

(2) 研究開発の目標

① 最終目標(平成25年度末)

安全で均質な形質を持ち、高い効率で心筋細胞へ誘導可能なヒトiPS細胞等幹細胞を活用し、性質と品質がそろったヒト心筋細胞等へ効率的に分化を行い、これを用いて開発候補薬の潜在的な致死性不整脈を誘発する可能性を、ヒト個体と高い相関性をもって予測する、産業上利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。

② 中間目標(平成23年度末)

従来法に比べ、より安全で高効率なヒトiPS細胞の誘導を可能とする新規な誘導因子、新たな細胞操作技術を含む新規誘導法を少なくとも1つ以上見いだす。また、iPS細胞等幹細胞の性質を規定する有用なマーカーの開発及び取得したマーカーを活用した選別、評価のための要素技術の開発の目途をつける。さらに、心筋細胞への誘導効率が高い分化技術の開発に目途をつけるとともに、同じ性質を持った細胞を選別し、毒性評価のための創薬スクリーニングツールとして活用する。毒性評価のための創薬スクリーニングシステムについては、ハードウェア及び解析ソフトウェアの試作を完了し、産業上実際に利用できるシステム構成となるよう目処をつける。

(3) 研究開発内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

- ① 安全かつ効率的なiPS細胞作製のための基盤技術の開発
- ② iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発
- ③ iPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

① 本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(以下、「NEDO技術開発機構」という)が、単独ないし複数の原則、本邦の企業、研究組合、公益法人等の研究機関(原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点からの国外企業との連携が必要な場合はこの限りではない。)から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託して実施する。

② 共同研究に参加する各研究開発グループの有する研究ポテンシャルの最大限の活用により効率的な研究開発の推進を図る観点から、研究体にはNEDO技術開発機構が委託先決定後に指名する研究開発責任者(プロジェクトリーダー)を置き、その下に各研究開発項目毎にサブプロジェクトリーダーを置くとともに研究者を可能な限り結集して効果的な研究開発を実施する。

(2) 研究開発の運営管理

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

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の実施期間は、平成20年度から平成25年度までの6年間とする。

4. 評価に関する事項

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成23年度、事後評価を平成26年度に実施する。また、中間評価結果を踏まえ必要に応じてプロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

5. その他重要事項

(1) 研究開発成果の取り扱い

① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発成果のうち、下記共通基盤技術に係る研究開発成果については、NEDO技術開発機構、実施者とも普及に努めるものとする。

- a) 安全かつ高効率なiPS細胞の作製技術
- b) iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術
- c) iPS細胞から分化させた心筋細胞等を用いた安全性(毒性)等評価技術

② 知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備事業又は標準化等との連携を図るため、データベースへのデータ提供、標準案の提案等を積極的に行う。

③ 知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、すべて受託先に帰属させることとする。

④ 成果の産業化

- a) 受託者は、本研究開発から得られる研究開発成果の産業面での着実な活用を図るため、本研究開発の終了後に実施すべき取り組みのあり方や研究開発成果の産業面での活用のビジネスモデルを念頭に置き研究開発を行うとともに、研究開発の進捗等を考慮し、これら取り組みのあり方とビジネスモデルについて必要な見直しを行う。
- b) 受託者は、上記a)で立案した取り組みとビジネスモデルを本研究開発終了後、実行に移し、成果の産業面での活用に努めるものとする。

(2) 基本計画の変更

NEDO技術開発機構は、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済状況、内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発

費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3) 根拠法

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号に基づき実施する。

(4) 関連指針の厳守

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成18年7月3日厚生労働省)、「ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律」(平成12年法律第146号)、「特定胚の取扱いに関する指針」(平成13年文部科学省告示第173号)、「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針(平成19年文部科学省告示第87号)」等、関連指針を厳守する。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24製局第1号)を厳守する。

6. 基本計画の改訂履歴

(1) 平成21年1月、制定。

(別紙)研究開発計画

研究開発項目①「安全かつ効率的なiPS細胞作製のための基盤技術の開発」

1. 研究開発の必要性

人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、疾患メカニズム解明のための優れた研究材料として、また、再生医療や創薬における安全性評価など様々な応用分野での活用が期待される新たな細胞源であり、多能性幹細胞の一つと位置づけられている。また、ヒト体細胞組織から樹立できることから、ES細胞に比べて倫理的な障壁が少ないと考えられている。

一方、複数の研究者によってiPS細胞誘導の再現性が示されたこと、樹立にかかるコストも小さく、その学術的・産業的なインパクトが大きいことから、世界各国でiPS細胞に関する研究が急速な勢いで進められている状況にある。京都大学のグループでは、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycの4因子(現在ではガン遺伝子c-Mycを除いた3因子によっても誘導されることが示されているが、4因子に比べて誘導効率が低い)を、一方、ウイスコンシン大学のグループでは別の4因子(Oct3/4、Sox2、Nanog、Lin28)をレトロウイルスベクターによってヒト体細胞へ導入し、ヒトiPS細胞が誘導可能であることが報告されている。また、ハーバード大学のグループでは、4因子のうちのc-Mycの代わりに低分子化合物を処理することでiPS細胞が誘導可能であることを報告している。

このように異なる遺伝子の組み合わせ、あるいは化合物との組み合わせによってiPS細胞が誘導可能であることが示されており、より誘導効率の高い因子やその組み合わせがあることが予想されることから、より安全かつ効率的なiPS細胞作製技術のいち早い開発が重要な課題である。

2. 研究開発の具体的内容

iPS細胞の誘導に関わる新規因子(遺伝子及び化合物)の探索を行うとともに、従来法に比べて誘導効率を向上させることが可能となる適切な組み合わせに関する検討を行う。

また、樹立される細胞源としての安全性を向上させ、将来の再生医療用途の細胞源としても活用可能とするため、宿主細胞の染色体上にランダムに遺伝子が導入されることによって生じる腫瘍化の懸念がない遺伝子導入技術の開発を併せて行う。

これら手法を組み合わせることによって、従来法に比べて誘導効率が高く、かつ、ガン化等の危険性が少ない、より安全性を向上させた細胞源の確立を可能とする新規iPS細胞誘導技術の開発を行う。

3. 達成目標

(1)最終目標(平成25年度末)

ヒトiPS細胞を誘導する遺伝子及び化合物等を複数種見だし、これらを組み合わせることにより、従来法に比べて安全で均一なヒトiPS細胞を効率よく作製する新規誘導技術を確立する。

(2)中間目標(平成23年度末)

これまでに報告されたヒトiPS細胞誘導因子に比べて誘導効率を高める遺伝子因子の探索を行い、少なくとも1つ以上の新規な誘導因子を同定する。また、遺伝子導入を代替し、ヒトiPS細胞の誘導を可能とする化合物等の探索・検討を行い、少なくとも1種以上の新規誘導因子を同定する。加えて、開発を進める遺伝子導入法、化合物等が腫瘍化を誘発する危険性が少ないことを確認する。

研究開発項目②「iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

1. 研究開発の必要性

iPS細胞や体性幹細胞等の自己由来の多能性幹細胞は、免疫拒絶反応を回避、あるいは軽減しうる再生医療用の細胞源として、さらには、疾患メカニズムの解明等の基礎研究や創薬スクリーニングへの応用が期待されている。

しかし、提供者の年齢、由来する組織の違いや疾患の有無によって、また、iPS細胞においては用いる誘導方法によっても、得られた細胞が示す性質が異なることが指摘されている。また、こうした細胞源を産業応用に供するためには、安定な幹細胞を確立・供給するための細胞操作技術の開発に加えて、個人及び集団によるゲノムの多様性も考慮しつつ、安全かつ均一な性質をもった細胞の選別と、その品質を維持・管理することが必要となる。

このため、こうした相関関係をゲノムレベルで詳細に解析し、その情報を活用することによって、iPS細胞等幹細胞を産業利用に繋げるために必要となる、安全かつ均一な性質を持った細胞源を供給可能とする、細胞の選別・評価・製造技術等の開発が重要である。

2. 研究開発の具体的内容

(1) iPS細胞等幹細胞の評価・選別技術の開発

由来が異なる細胞から誘導されたiPS細胞等の様々な多能性幹細胞間における性質の差や、その差がもたらす特定の誘導法に対する感受性の違いを明らかにするため、ギガシーケンサーを活用し、ゲノムの修飾、誘導因子のゲノム上の挿入箇所、遺伝子発現プロファイル解析等を組み合わせた手法、あるいは新規手法を用いて、細胞の性質や特徴を評価し、選別するために有用なマーカーを開発するとともに、マーカーを用いて効率的に細胞を操作し、評価・選別する技術の開発を行う。

(2) iPS細胞等幹細胞の品質管理、安定供給技術の開発

上記で開発した手法を用いて得られた特定の均質な細胞源を、均一な性質と品質を保持したまま長期間安定した維持・管理を行うとともに、利用者への安定した供給を可能とするために必要となる技術の開発を行う。

3. 達成目標

(1) 最終目標(平成25年度末)

種々の解析により、iPS細胞等幹細胞の性質を特徴づけるマーカーを用いて各種幹細胞の状態を的確に判定し、特定の性質を有する細胞のみを選別する技術を確立する。また、性質と品質を長期間安定的に保持可能とする細胞の品質管理技術を確立する。これら技術を組み合わせ、細胞の選別・評価・製造技術を確立し、品質が管理された細胞の安定供給が可能なシステムを構築する。

(2) 中間目標(平成23年度末)

iPS細胞等幹細胞について、樹立された株毎、あるいは各種幹細胞毎の性質を規定している因子を探索・同定するとともに、均質な細胞を選別・評価・製造するための基礎的知見を得る。

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

1. 研究開発の必要性

ヒトiPS細胞等幹細胞は、ヒトの疾患メカニズム解明や薬剤感受性の試験などの創薬研究や、再生医療で用いる細胞源など、様々な分野での活用が期待されている。

創薬分野においては、近年、研究開発費が大幅に伸びている一方で、新薬の承認数は低下する傾向にある。特に、臨床開発の最終フェーズにおいて、有効性が確認できないことや、安全性等が原因となって開発中止となるケースが増加している。また、従来 of 非臨床試験及び臨床試験において安全性に何ら問題のなかった薬物でも、市販後に患者に実際に投与されてから初めて致死性不整脈を誘発することが判明したため急遽市場から撤退した事例もある。さらに制ガン剤や抗菌剤などの人体に毒性を持つことが知られている薬剤では、薬効と副作用は表裏一体の関係にあり、ヒトにおける安全域の程度が許容範囲となるかどうかを的確に推測することが開発候補薬として臨床開発に進めるかどうかを判断する上で非常に重要な技術課題となっている。そのため、前臨床の段階で開発候補薬の有効性が確認されいながら、従来の副作用評価技術では正確なヒトへの副作用の予測が困難だったため休眠化している多数の開発候補薬も、より安価で正確な評価技術が確立すれば上市できることが期待される。

こうした事態を改善し、より安全性の高い医薬品を効率良く開発することを可能とするため、創薬研究のより早い段階で、開発候補薬のヒトでの薬効と安全性をより精度高く予測する基盤技術の開発を行うことが必要である。

2. 研究開発の具体的内容

(1) iPS細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

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

(2) iPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

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

3. 達成目標

(1) 最終目標(平成25年度末)

健常人由来、心疾患患者由来のヒトiPS細胞等幹細胞を活用し、心筋細胞等へ効率的に分化誘導を行い、これを用いて開発候補薬の心毒性等の有無を高い感度と特異度をもって予測できる、製薬企業等が利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。利用する心筋細胞については、通常 of フェーズ I 試験における治験者数と同等の体制となるような数の、異なるヒトiPS細胞等幹細胞から分化させたものを用いることが可能な、細胞供給の準備体制を整えるものとする。

(2) 中間目標(平成23年度末)

心筋細胞等へ効率よく分化させる技術を開発し、同等の性質を有した細胞の提供を可能にする。正常者及び遺伝性QT延長症候群患者各3名からiPS細胞を樹立し、これらの細胞から心筋細胞を

誘導し、創薬スクリーニングシステムを確立する。また、創薬スクリーニングシステムについては、ハードウェア及び解析ソフトウェアの試作を完了し、そのユーザー評価を受け、システムの確立に向けて必要となる開発課題を明確化する。

(健康安心イノベーションプログラム)
「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発」
基本計画

バイオテクノロジー・医療技術部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

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

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

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

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

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

これにより、我が国が世界を先導している科学的成果であるiPS細胞等幹細胞を、いち早く産業応用に繋げるとともに、培養装置や基材などの周辺産業を含めた国際市場への展開を図り、産業競争力の確保に繋げることが期待できる。加えて、①品質の管理された細胞源の安定的な供給体

制の構築が促進され、再生医療の早期実現の促進、②創薬研究のより早い段階において、開発候補薬を効率よく絞り込むことが可能となり、開発期間の短縮や研究開発費の削減、さらにはより安全な医薬品の開発の促進が期待される。

(2) 研究開発の目標

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

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

(3) 研究開発内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

- ① ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発（平成22～27年度）
（本研究開発項目は、平成20～22年度に実施した「安全かつ効率的なiPS細胞作製のための基盤技術の開発」及び「iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」を発展的に統合し、平成23年度から5年計画で新規に開始する。なお、平成22年度補正予算により前倒しで着手する。）
- ② ヒトiPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発（平成20～25年度）

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

- ① 本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下、「NEDO技術開発機構」という）が、単独ないし複数の、国内に研究開発拠点を有する本邦企業及び大学等の研究機関（国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点からの国外企業との連携が必要な場合はこの限りではない。）から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託して実施する。
- ② 共同研究に参加する各研究開発グループの有する研究ポテンシャルの最大限の活用により効率的な研究開発の推進を図る観点から、研究体にはNEDO技術開発機構が委託先決定後に指名する研究開発責任者（プロジェクトリーダー）を置き、その下に研究者を可能な限り結集して効果的な研究開発を実施する。

(2) 研究開発の運営管理

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

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の実施期間は、平成20年度から平成27年度までの8年間とする。

4. 評価に関する事項

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による評価を実施する。

研究開発項目①については、中間評価を平成25年度、事後評価を平成28年度に実施する。

研究開発項目②については、中間評価を平成23年度、事後評価を平成26年度に実施する。なお、平成22年度を持って発展的に終了した研究開発項目については、終了時点までの成果をもって、平成23年度の中間評価の際に事後評価を実施するものとする。

中間評価結果を踏まえ必要に応じプロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

5. その他重要事項

(1) 研究開発成果の取り扱い

① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発成果のうち、下記共通基盤技術に係る研究開発成果については、NEDO技術開発機構、実施者とも普及に努めるものとする。

- a) 安全かつ高効率なヒトiPS細胞の作製技術
- b) 再生医療の細胞源として利用可能な品質を保持したヒト幹細胞の大量供給技術
- c) 各種幹細胞の性質に関する多次元情報を統合したデータベース
- d) ヒト幹細胞から分化誘導した心筋細胞等を用いた安全性(毒性)等評価技術

② 知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備事業又は標準化等との連携を図るため、データベースへのデータ提供、標準案の提案等を積極的に行う。

③ 知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、すべて委託先に帰属させることとする。

④ 成果の産業化

- a) 受託者は、本研究開発から得られる研究開発成果の産業面での着実な活用を図るため、本研究開発の終了後に実施すべき取組みのあり方や研究開発成果の産業面での活用のビジネスモデルを念頭に置き研究開発を行うとともに、研究開発の進捗等を考慮し、これら取組みのあり方とビジネスモデルについて必要な見直しを行う。
- b) 受託者は、上記a)で立案した取組みとビジネスモデルを本研究開発終了後、実行に移し、成果の産業面での活用に努めるものとする。

(2) 基本計画の変更

NEDO技術開発機構は、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済状況、内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3) 根拠法

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号に基づき実施する。

(4) 関連指針の厳守

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

6. 基本計画の改訂履歴

(1) 平成21年1月、制定。

(2) 平成23年1月、改訂。内外の研究開発動向に鑑み、研究開発項目①及び研究開発項目②を発展的に統合し、研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」を新たに設定。再生医療への応用を可能とする細胞源の確立を目標として、平成23年度から5年計画で新規に着手すべく改訂。なお、平成22年度補正予算により前倒しで着手。

(別紙) 研究開発計画

研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」

1. 研究開発の必要性

幹細胞は、創薬における薬効評価や安全性薬理試験などの創薬スクリーニング、発生・分化や疾患メカニズムの解明、再生医療への応用など生命科学や医療への貢献が大きく期待されている。

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

2. 研究開発の具体的内容

(1) ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発

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

(2) ヒト幹細胞の品質評価指標の開発

由来する組織や樹立方法によってヒト幹細胞が示す異なる分化指向性や造腫瘍性等の性質の違いを、未分化な状態において簡便かつ迅速に評価・判別可能とする品質評価指標を開発する。具体的には、明らかにしようとする性質を設定し、様々なヒト幹細胞、iPS細胞の由来となる細胞、2.(1)の技術を用いて継代したヒト幹細胞などから、多次元の情報(核型、エピゲノム、ncRNA、遺伝子発現、タンパク発現、糖鎖など)を取得する。これらの情報をバイオインフォマティクス技術により統合的に関連づけたデータベースを構築するとともに、データの比較等によってヒト幹細胞の性質の記述に重要な項目をキーインデックスとして整理し、品質を評価する指標を開発する。

(3) ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発

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

3. 達成目標

(1) 最終目標(平成27年度)

「ヒト幹細胞の品質評価指標」を策定し、再生医療への応用を可能とする品質レベルで管理された4種以上のヒト幹細胞を、安定的に大量供給可能とするシステムを確立する。加えて、確立した品質評価技術をベースとするヒト幹細胞の標準化原案を策定する。

(2) 中間目標(平成25年度)

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

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

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

1. 研究開発の必要性

ヒトiPS細胞等幹細胞は、ヒトの疾患メカニズム解明や薬剤感受性の試験などの創薬研究や、再生医療で用いる細胞源など、様々な分野での活用が期待されている。

創薬分野においては、近年、研究開発費が大幅に伸びている一方で、新薬の承認数は低下する傾向にある。特に、臨床開発の最終フェーズにおいて、有効性が確認できないことや、安全性等が原因となって開発中止となるケースが増加している。また、従来 of 非臨床試験及び臨床試験において安全性に何ら問題のなかった薬剤でも、市販後に患者に実際に投与されてから初めて致死性不整脈を誘発することが判明したため急遽市場から撤退した事例もある。さらに制ガン剤や抗菌剤などの人体に毒性を持つことが知られている薬剤では、薬効と副作用は表裏一体の関係にあり、ヒトにおける安全域の程度が許容範囲となるかどうかを的確に推測することが開発候補薬として臨床開発に進めるかどうかを判断する上で非常に重要な技術課題となっている。そのため、前臨床の段階で開発候補薬の有効性が確認されいながら、従来の副作用評価技術では正確なヒトへの副作用の予測が困難だったため休眠化している多数の開発候補薬も、より安価で正確な評価技術が確立すれば上市できることが期待される。

こうした事態を改善し、より安全性の高い医薬品を効率良く開発することを可能とするため、創薬研究のより早い段階で、開発候補薬のヒトでの薬効と安全性をより精度高く予測する基盤技術の開発を行うことが必要である。

2. 研究開発の具体的内容

(1)ヒトiPS細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

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

(2)ヒトiPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

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

3. 達成目標

(1)最終目標(平成25年度末)

健常人由来、心疾患患者由来のヒトiPS細胞等幹細胞を活用し、心筋細胞等へ効率的に分化誘導を行い、これを用いて開発候補薬の心毒性等の有無を高い感度と特異度をもって予測できる、製薬企業等が利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。利用する心筋細胞については、通常 of フェーズ I 試験における治験者数と同等の体制となるような数の、異なるヒトiPS細胞等幹細胞から分化させたものを用いることが可能な、細胞供給の準備体制を整えるものとする。

(2)中間目標(平成23年度末)

心筋細胞等へ効率よく分化させる技術を開発し、同等の性質を有した細胞の提供を可能にする。正常者及び遺伝性QT延長症候群患者各3名からiPS細胞を樹立し、これらの細胞から心筋細胞を

誘導し、創薬スクリーニングシステムを確立する。また、創薬スクリーニングシステムについては、ハードウェア及び解析ソフトウェアの試作を完了し、そのユーザー評価を受け、システムの確立に向けて必要となる開発課題を明確化する。

以下、平成22年度末をもって終了。得られた成果を発展的に統合し、新たに研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術開発」に着手。

(別紙)研究開発計画

研究開発項目①「安全かつ効率的なiPS細胞作製のための基盤技術の開発」

1. 研究開発の必要性

人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、疾患メカニズム解明のための優れた研究材料として、また、再生医療や創薬における安全性評価など様々な応用分野での活用が期待される新たな細胞源であり、多能性幹細胞の一つと位置づけられている。また、ヒト体細胞組織から樹立できることから、ES細胞に比べて倫理的な障壁が少ないと考えられている。

一方、複数の研究者によってiPS細胞誘導の再現性が示されたこと、樹立にかかるコストも小さく、その学術的・産業的なインパクトが大きいことから、世界各国でiPS細胞に関する研究が急速な勢いで進められている状況にある。京都大学のグループでは、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycの4因子(現在ではガン遺伝子c-Mycを除いた3因子によっても誘導されることが示されているが、4因子に比べて誘導効率が低い)を、一方、ウイスコンシン大学のグループでは別の4因子(Oct3/4、Sox2、Nanog、Lin28)をレトロウイルスベクターによってヒト体細胞へ導入し、ヒトiPS細胞が誘導可能であることが報告されている。また、ハーバード大学のグループでは、4因子のうちのc-Mycの代わりに低分子化合物を処理することでiPS細胞が誘導可能であることを報告している。

このように異なる遺伝子の組み合わせ、あるいは化合物との組み合わせによってiPS細胞が誘導可能であることが示されており、より誘導効率の高い因子やその組み合わせがあることが予想されることから、より安全かつ効率的なiPS細胞作製技術のいち早い開発が重要な課題である。

2. 研究開発の具体的内容

iPS細胞の誘導に関わる新規因子(遺伝子及び化合物)の探索を行うとともに、従来法に比べて誘導効率を向上させることが可能となる適切な組み合わせに関する検討を行う。

また、樹立される細胞源としての安全性を向上させ、将来の再生医療用途の細胞源としても活用可能とするため、宿主細胞の染色体上にランダムに遺伝子が導入されることによって生じる腫瘍化の懸念がない遺伝子導入技術の開発を併せて行う。

これら手法を組み合わせることによって、従来法に比べて誘導効率が高く、かつ、ガン化等の危険性が少ない、より安全性を向上させた細胞源の確立を可能とする新規iPS細胞誘導技術の開発を行う。

3. 達成目標

(1)最終目標(平成25年度末)

ヒトiPS細胞を誘導する遺伝子及び化合物等を複数種見だし、これらを組み合わせることにより、従来法に比べて安全で均一なヒトiPS細胞を効率よく作製する新規誘導技術を確立する。

(2)中間目標(平成23年度末)

これまでに報告されたヒトiPS細胞誘導因子に比べて誘導効率を高める遺伝子因子の探索を行い、少なくとも1つ以上の新規な誘導因子を同定する。また、遺伝子導入を代替し、ヒトiPS細胞の誘導を可能とする化合物等の探索・検討を行い、少なくとも1種以上の新規誘導因子を同定する。加えて、開発を進める遺伝子導入法、化合物等が腫瘍化を誘発する危険性が少ないことを確認する。

研究開発項目②「iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

1. 研究開発の必要性

iPS細胞や体性幹細胞等の自己由来の多能性幹細胞は、免疫拒絶反応を回避、あるいは軽減しうる再生医療用の細胞源として、さらには、疾患メカニズムの解明等の基礎研究や創薬スクリーニングへの応用が期待されている。

しかし、提供者の年齢、由来する組織の違いや疾患の有無によって、また、iPS細胞においては用いる誘導方法によっても、得られた細胞が示す性質が異なることが指摘されている。また、こうした細胞源を産業応用に供するためには、安定な幹細胞を確立・供給するための細胞操作技術の開発に加えて、個人及び集団によるゲノムの多様性も考慮しつつ、安全かつ均一な性質をもった細胞の選別と、その品質を維持・管理することが必要となる。

このため、こうした相関関係をゲノムレベルで詳細に解析し、その情報を活用することによって、iPS細胞等幹細胞を産業利用に繋げるために必要となる、安全かつ均一な性質を持った細胞源を供給可能とする、細胞の選別・評価・製造技術等の開発が重要である。

2. 研究開発の具体的内容

(1) iPS細胞等幹細胞の評価・選別技術の開発

由来が異なる細胞から誘導されたiPS細胞等の様々な多能性幹細胞間における性質の差や、その差がもたらす特定の誘導法に対する感受性の違いを明らかにするため、ギガシーケンサーを活用し、ゲノムの修飾、誘導因子のゲノム上の挿入箇所、遺伝子発現プロファイル解析等を組み合わせた手法、あるいは新規手法を用いて、細胞の性質や特徴を評価し、選別するために有用なマーカーを開発するとともに、マーカーを用いて効率的に細胞を操作し、評価・選別する技術の開発を行う。

(2) iPS細胞等幹細胞の品質管理、安定供給技術の開発

上記で開発した手法を用いて得られた特定の均質な細胞源を、均一な性質と品質を保持したまま長期間安定した維持・管理を行うとともに、利用者への安定した供給を可能とするために必要となる技術の開発を行う。

3. 達成目標

(1) 最終目標(平成25年度末)

種々の解析により、iPS細胞等幹細胞の性質を特徴づけるマーカーを用いて各種幹細胞の状態を的確に判定し、特定の性質を有する細胞のみを選別する技術を確立する。また、性質と品質を長期間安定的に保持可能とする細胞の品質管理技術を確立する。これら技術を組み合わせ、細胞の選別・評価・製造技術を確立し、品質が管理された細胞の安定供給が可能なシステムを構築する。

(2) 中間目標(平成23年度末)

iPS細胞等幹細胞について、樹立された株毎、あるいは各種幹細胞毎の性質を規定している因子を探索・同定するとともに、均質な細胞を選別・評価・製造するための基礎的知見を得る。

添付資料④

プロジェクト実施方針

平成21年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名：(プログラム名) 健康安心イノベーションプログラム

(大項目) 幹細胞産業応用促進基盤技術開発

(中項目) iPS細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号

3. 背景及び目的・目標

幹細胞は様々な組織に分化する能力を有しており、その性質を用いることで神経、心筋、膵臓β細胞等の様々な細胞を試験管内で得ることができる。これを用いることで従来は治療することが困難であった神経疾患や心臓疾患の根本的治療法の開発や、創薬分野におけるヒトの細胞を用いた薬効評価や安全性薬理試験などの創薬スクリーニングに利用できる利点を有する。iPS細胞(人工多能性幹細胞)は、皮膚等の組織から作製可能であることから倫理的な障壁が低く、加えて遺伝的に多様な細胞が得られること、免疫拒絶反応を回避、あるいは軽減可能であること等から、有用な細胞源として期待が大きい。しかし、iPS細胞等幹細胞を産業で利用するためには、細胞の効率的な作製方法、腫瘍化の問題、様々な状態が混在したヘテロな細胞集団からの標的細胞の評価・選別、品質管理方法の確立、機能発現のための細胞から組織への再構築技術の開発など、様々な解決すべき課題がある。

iPS細胞の早期な産業応用が期待される創薬分野においては、近年、研究開発費が大幅に伸びている一方で、新薬の承認数は低下する傾向にある。特に、臨床開発の最終フェーズにおいて、有効性が確認できないことや、安全性等が原因となって開発中止となるケースが増加している。また、従来の非臨床試験及び臨床試験において安全性に何ら問題のなかった薬物でも、市販後において患者に実際に投与されてから初めて致死性不整脈を誘発することが判明したため急遽市場から撤退した事例もある。さらに制ガン剤や抗菌剤などの人体に毒性を持つことが知られている薬剤では、薬効と副作用は表裏一体の関係にあり、ヒトに対する安全域の程度が許容範囲となるかどうかを的確に推測することが開発候補薬として臨床開発に進めるかどうかを判断する上で非常に重要な技術課題となっている。このような事態を改善し、より安全性の高い医薬品を効率良く開発するためには、創薬研究のより早い段階で、開発候補薬のヒトでの薬効と安全性をより精度高く予測する基盤技術の開発を行うことが求められている。

こうした状況を踏まえ、本研究開発は、様々な細胞組織に分化できるヒトiPS細胞等幹細胞の産業利用を促進することを目的として、iPS細胞への効率的な誘導因子の探索を行う。同時に、多様な幹細胞操作技術の成果を活用し、iPS細胞の新規誘導法開発に結びつける。また、細胞源としてiPS細胞等幹細胞を一般に供給する上で必要となる、細胞の性質や品質を評価する技術や細胞

の安定供給を可能とする基盤技術を確立する。さらに、iPS細胞等幹細胞から心筋などの細胞に効率よく分化させ、これを利用して、開発候補薬の潜在的な致死性不整脈を誘発する可能性を、ヒト個体と高い相関性をもって予測する創薬スクリーニングシステムの開発を行う。

これにより、我が国が世界を先導している科学的成果である iPS 細胞等幹細胞を、いち早く産業応用に繋げることが期待できるとともに、創薬研究のより早い段階において、開発候補薬の効率的で的確な絞り込みを行うことが可能となり、創薬研究の短縮や研究開発費の削減、さらにはより安全な医薬品の開発の促進が期待される。

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

(1)最終目標(平成 25 年度末)

安全で均質な形質を持ち、高い効率で心筋細胞へ誘導可能なヒト iPS 細胞等幹細胞を活用し、性質と品質がそろったヒト心筋細胞等へ効率的に分化を行い、これを用いて開発候補薬の潜在的な致死性不整脈を誘発する可能性を、ヒト個体と高い相関性をもって予測する、産業上利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。

(2)中間目標(平成 23 年度末)

従来法に比べ、より安全で高効率なヒト iPS 細胞の誘導を可能とする新規誘導因子、新たな細胞操作技術を含む新規誘導法を少なくとも1つ以上見いだす。また、iPS 細胞等幹細胞や分化誘導細胞の性質を規定する有用なマーカーの開発及び取得したマーカーを活用した選別、評価のための要素技術の開発に目途をつける。さらに、心筋細胞への誘導効率が高い分化技術の開発に目途をつけるとともに、同じ性質を持った細胞を選別し、毒性評価のための創薬スクリーニングツールとして活用する。毒性評価のための創薬スクリーニングシステムについては、ハードウェア及び解析ソフトウェアの試作を完了し、産業上実際に利用できるシステム構成となるよう目途をつける。

4. 事業内容

京都大学大学院医学研究科 鍋島陽一 教授をプロジェクトリーダーとして(予定)、以下の研究開発を実施する。実施体制については別紙を参照のこと。

4.1 平成21年度委託事業内容

①「安全かつ効率的な iPS 細胞作製のための基盤技術の開発」

iPS細胞の誘導に関わる新規因子(遺伝子及び化合物)の探索を行うとともに、従来法に比べて誘導効率を向上させることが可能となる適切な組み合わせに関する検討を行うとともに、樹立される細胞源としての安全性を向上させ、将来の再生医療用途の細胞源としても活用可能とするため、宿主細胞の染色体上にランダムに遺伝子が導入されることによって生じる腫瘍化の懸念がない遺伝子導入技術の開発を進める。

②「細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

(a) iPS細胞等幹細胞の評価・選別技術の開発

由来が異なる細胞から誘導されたiPS細胞等の様々な多能性幹細胞間における性質の差や、その差がもたらす特定の誘導法に対する感受性の違い等を明らかにするため、ギガシーケンサーを活用し、ゲノムの修飾、誘導因子のゲノム上の挿入箇所、遺伝子発現プロファイル解析等を組み合わせた手法、あるいは新規手法を用いて、細胞の性質や特徴を評価し、選別するために有用なマーカーの開発及びこれらを用いて効率的に細胞を操作し、評価・選別する技術の開発を進める。

(b) iPS細胞等幹細胞の品質管理、安定供給技術の開発

上記で開発した手法を用いて得られた特定の均質な細胞源を、均一な性質と品質を保持したまま長期間安定した維持・管理を行うとともに、利用者への安定した供給を可能とするために必要となる、細胞の安定供給技術の開発を進める。

③「iPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」

(a) iPS細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

入手可能な健常人由来のヒトiPS等幹細胞及び心毒性等評価に有用な心疾患等患者由来のヒトiPS細胞等幹細胞から、心筋細胞への誘導効率を高める因子の探索を進めるとともに、心筋への効率的な分化誘導技術の開発を進める。

(b) iPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

心毒性等が報告されている既存薬等を用いて、既存法と比較等行うための心毒性評価システムの構築を開始するとともに、ヒト心筋細胞の機能検証を進める。

システム開発においては、実用化プロトタイプとなりうる装置システムの開発を最短で実現するため、チップ上にリエントリーモデルを構築し、その伝達速度や薬剤への応答特性を計測することで、よりヒトの応答に近いモデルの構築を進める。平成21年度中には創薬スクリーニングシステムとしての技術開発の基本的な部分については完了させる。

4.2 平成21年度事業規模

	委託事業
一般勘定(交付金)	495百万円(新規)

(注) 事業規模については、変動があり得る。

5. その他重要事項

(1) 評価の方法

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成23年度に実施する。

(2) 運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成18年7月3日厚生労働省)、「ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律」(平成12年法律第146号)、「特定胚の取扱いに関する指針」(平成13年文部科学省告示第173号)、「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」(平成19年文部科学省告示第87号)等、関連指針を厳守する。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24製局第1号)を厳守する。

(3) 複数年度契約の実施

平成20～21年度の複数年契約を行う。

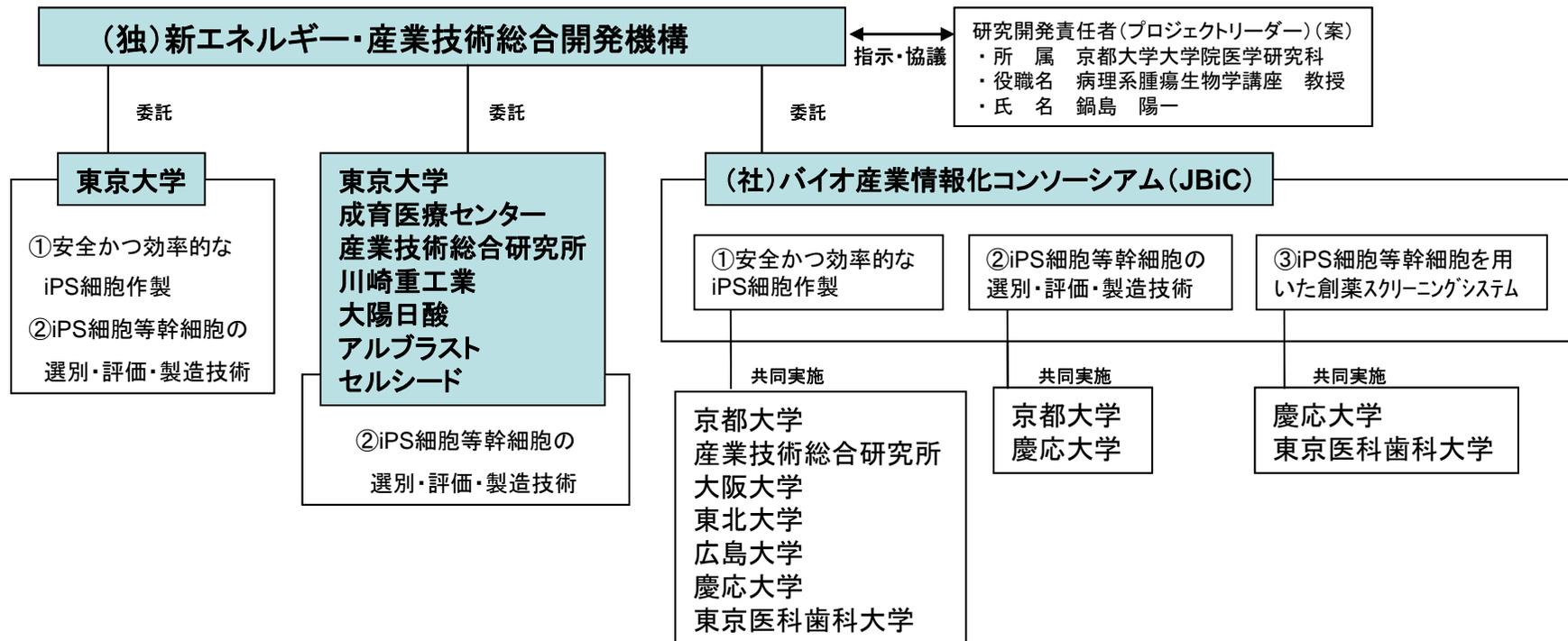
7. 年間スケジュール

平成21年9月	第1回研究開発推進委員会開催
平成22年1月	第2回研究開発推進委員会開催

8. 実施方針の改訂履歴

(1) 平成21年3月26日制定。

「iPS細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発」実施体制



平成22年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名：(プログラム名) 健康安心イノベーションプログラム

(大項目) 幹細胞産業応用促進基盤技術開発

(中項目) iPS細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号

3. 背景及び目的・目標

幹細胞は様々な組織に分化する能力を有しており、その性質を用いることで神経、心筋、膵臓β細胞等の様々な細胞を試験管内で得ることができる。これを用いることで従来は治療することが困難であった神経疾患や心臓疾患の根本的治療法の開発や、創薬分野におけるヒトの細胞を用いた薬効評価や安全性薬理試験などの創薬スクリーニングに利用できる利点を有する。iPS細胞(人工多能性幹細胞)は、皮膚等の組織から作製可能であることから倫理的な障壁が低く、加えて遺伝的に多様な細胞が得られること、免疫拒絶反応を回避、あるいは軽減可能であること等から、有用な細胞源として期待が大きい。しかし、iPS細胞等幹細胞を産業で利用するためには、細胞の効率的な作製方法、腫瘍化の問題、様々な状態が混在したヘテロな細胞集団からの標的細胞の評価・選別、品質管理方法の確立、機能発現のための細胞から組織への再構築技術の開発など、様々な解決すべき課題がある。

iPS細胞の早期な産業応用が期待される創薬分野においては、近年、研究開発費が大幅に伸びている一方で、新薬の承認数は低下する傾向にある。特に、臨床開発の最終フェーズにおいて、有効性が確認できないことや、安全性等が原因となって開発中止となるケースが増加している。また、従来の非臨床試験及び臨床試験において安全性に何ら問題のなかった薬物でも、市販後において患者に実際に投与されてから初めて致死性不整脈を誘発することが判明したため急遽市場から撤退した事例もある。さらに制ガン剤や抗菌剤などの人体に毒性を持つことが知られている薬剤では、薬効と副作用は表裏一体の関係にあり、ヒトに対する安全域の程度が許容範囲となるかどうかを的確に推測することが開発候補薬として臨床開発に進めるかどうかを判断する上で非常に重要な技術課題となっている。このような事態を改善し、より安全性の高い医薬品を効率良く開発するためには、創薬研究のより早い段階で、開発候補薬のヒトでの薬効と安全性をより精度高く予測する基盤技術の開発を行うことが求められている。

こうした状況を踏まえ、本研究開発は、様々な細胞組織に分化できるヒトiPS細胞等幹細胞の産業利用を促進することを目的として、iPS細胞への効率的な誘導因子の探索を行う。同時に、多様な幹細胞操作技術の成果を活用し、iPS細胞の新規誘導法開発に結びつける。また、細胞源としてiPS細胞等幹細胞を一般に供給する上で必要となる、細胞の性質や品質を評価する技術や細胞

の安定供給を可能とする基盤技術を確立する。さらに、iPS細胞等幹細胞から心筋などの細胞に効率よく分化させ、これを利用して、開発候補薬の潜在的な致死性不整脈を誘発する可能性を、ヒト個体と高い相関性をもって予測する創薬スクリーニングシステムの開発を行う。

これにより、我が国が世界を先導している科学的成果である iPS 細胞等幹細胞を、いち早く産業応用に繋げることが期待できるとともに、創薬研究のより早い段階において、開発候補薬の効率的で的確な絞り込みを行うことが可能となる。そのため、創薬研究の短縮や研究開発費の削減、さらにはより安全な医薬品の開発の促進が期待される。

なお、本研究開発は、「健康安心イノベーションプログラム」の中の「幹細胞産業応用促進基盤技術開発」の一環として実施する。これは、遺伝子やタンパク質等の生体分子の機能・構造解析等を行うとともに、それらの研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に利用するためのデータベース整備や先端技術を応用した高度医療機器開発等により、個別化医療・予防医療・再生医療の実現や画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指すことを目的とするものである。

(1)最終目標(平成 25 年度末)

安全で均質な形質を持ち、高い効率で心筋細胞へ誘導可能なヒト iPS 細胞等幹細胞を活用し、性質と品質がそろったヒト心筋細胞等へ効率的に分化を行い、これを用いて開発候補薬の潜在的な致死性不整脈を誘発する可能性を、ヒト個体と高い相関性をもって予測する、産業上利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。

(2)中間目標(平成 23 年度末)

従来法に比べ、より安全で高効率なヒト iPS 細胞の誘導を可能とする新規誘導因子、新たな細胞操作技術を含む新規誘導法を少なくとも1つ以上見いだす。また、iPS 細胞等幹細胞や分化誘導細胞の性質を規定する有用なマーカーの開発及び取得したマーカーを活用した選別、評価のための要素技術の開発に目途をつける。さらに、心筋細胞への誘導効率が高い分化技術の開発に目途をつけるとともに、同じ性質を持った細胞を選別し、毒性評価のための創薬スクリーニングツールとして活用する。毒性評価のための創薬スクリーニングシステムについては、ハードウェア及び解析ソフトウェアの試作を完了し、産業上実際に利用できるシステム構成となるよう目処をつける。

4. 実施内容および進捗状況

京都大学大学院医学研究科 鍋島陽一 教授をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施した。また、研究開発推進委員会を半期に一度の割合で開催し、研究開発目的・目標と照らし合わせながら、研究進捗の確認をおこなった。

4.1 平成21年度事業内容

研究開発項目①「安全かつ効率的な iPS 細胞作製のための基盤技術の開発」

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

山中4因子の順番を並び替え、一つのベクターに搭載した持続発現型センダイウイルスベクターを作成し、外来遺伝子が染色体に挿入されていないマウスおよびヒト iPS 細胞を作成することに成功した。

また、ウイルスベクターを使用しない iPS 細胞作製技術として、細胞質へ蛋白質を導入するセミインタクト細胞シーリング法をシステム化し、山中 4 因子の蛋白質を導入したところ iPS 様コロニー形成に成功した。

(実施体制: J B I C、東京大学)

研究開発項目②「細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

(1) iPS細胞等幹細胞の評価・選別技術の開発

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

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

(2) iPS 細胞等幹細胞の品質管理、安定供給技術の開発

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

(実施体制: 国立成育医療センター、川崎重工業(株)、大陽日酸(株)、(株)セルシード)

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

(1) iPS細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

従来法の30倍の効率(世界最高レベル)でiPS細胞を心筋細胞に誘導するプロトコールの構築を行い、さらにオンチップ創薬支援評価システムで利用するための品質の安定

したiPS細胞由来心筋細胞の大量供給体制の構築に成功した。

(実施体制: J B I C)

(2) iPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

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

(実施体制: J B I C)

4.2 実績推移

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

5. 事業内容

京都大学大学院医学研究科 鍋島陽一 教授をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施する。実施体制については別紙を参照のこと。

5.1 平成22 年度事業内容

研究開発項目①「安全かつ効率的な iPS 細胞作製のための基盤技術の開発」

iPS 細胞の誘導に関わる新規因子(遺伝子及び化合物)の探索を行うとともに、従来法に比べて誘導効率を向上させることが可能となる適切な組み合わせに関する検討を行う。樹立される細胞源としての安全性を向上させ、将来の再生医療用途の細胞源としても活用可能とするため、宿主細胞の染色体上にランダムに遺伝子が導入されることによって生じる腫瘍化の懸念がない遺伝子導入技術の開発を進める。

(実施体制: J B I C、東京大学)

研究開発項目②「細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

(1) iPS細胞等幹細胞の評価・選別技術の開発

由来が異なる細胞から誘導されたiPS細胞等の様々な多能性幹細胞間における性質の差

や、その差がもたらす特定の誘導法に対する感受性の違い等を明らかにするため、ゲノムの修飾、誘導因子のゲノム上の挿入箇所、遺伝子発現プロファイル解析等を組み合わせた手法、あるいは新規手法を用いて、細胞の性質や特徴さらに機能を評価し、選別するために有用なマーカーの開発を行う。また、これらを用いて効率的に細胞を操作し、評価・選別する技術の開発を進める。

(実施体制: J B I C、(独)産業技術総合研究所、国立成育医療センター、東京大学)

(2) iPS細胞等幹細胞の品質管理、安定供給技術の開発

上記で開発した手法を用いて得られた特定の均質な細胞源を、均一な性質と品質を保持したまま長期間安定した維持・管理を行うとともに、利用者への安定した供給を可能とするために必要となる、細胞の安定供給技術の開発を進める。

(実施体制: 国立成育医療センター、川崎重工業(株)、大陽日酸(株)、(株)セルシード)

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

(1) iPS細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

入手可能な健常人由来のヒトiPS等幹細胞及び心毒性等評価に有用な心疾患等患者由来のヒトiPS細胞等幹細胞から、心筋細胞への誘導効率を高める因子の探索を進めるとともに、心筋への効率的な分化誘導技術の開発をさらに進める。

(実施体制: J B I C)

(2) iPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

心毒性等が報告されている既存薬等を用いて、既存法と比較等行うための心毒性評価システムの構築を引き続き進めるとともに、ヒト心筋細胞の機能検証を進める。

システム開発においては、実用化プロトタイプとなりうる装置システムの開発を最短で実現するため、チップ上にリエントリーモデルを構築し、その伝達速度や薬剤への応答特性を計測することで、よりヒトの応答に近いモデルの構築をさらに進める。特に、ポワンカレ・プロッティング法(第一世代型計測法)を採用した実用化プロトタイプシステムの試作・評価を行うとともに、TdP発生メカニズムをより精緻に再現し、検証できる構成的オンチップ心筋細胞ネットワークモデルの構築と細胞間の伝達状態を評価する手法の開発(第2世代計測技術)を行う。

(実施体制: J B I C)

5.2 平成22年度事業規模

委託事業

一般勘定(交付金) 855百万円(継続)

(注) 事業規模については、変動があり得る。

6. その他重要事項

(1)評価の方法

NEDOは、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成23年度に実施する。

(2)運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成18年7月3日厚生労働省)、「ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律」(平成12年法律第146号)、「特定胚の取扱いに関する指針」(平成13年文部科学省告示第173号)、「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針(平成19年文部科学省告示第87号)」等、関連指針を厳守する。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24製局第1号)を厳守する。

7. スケジュール

本年度のスケジュール

平成22年7月

第3回研究開発推進委員会開催

平成23年1月

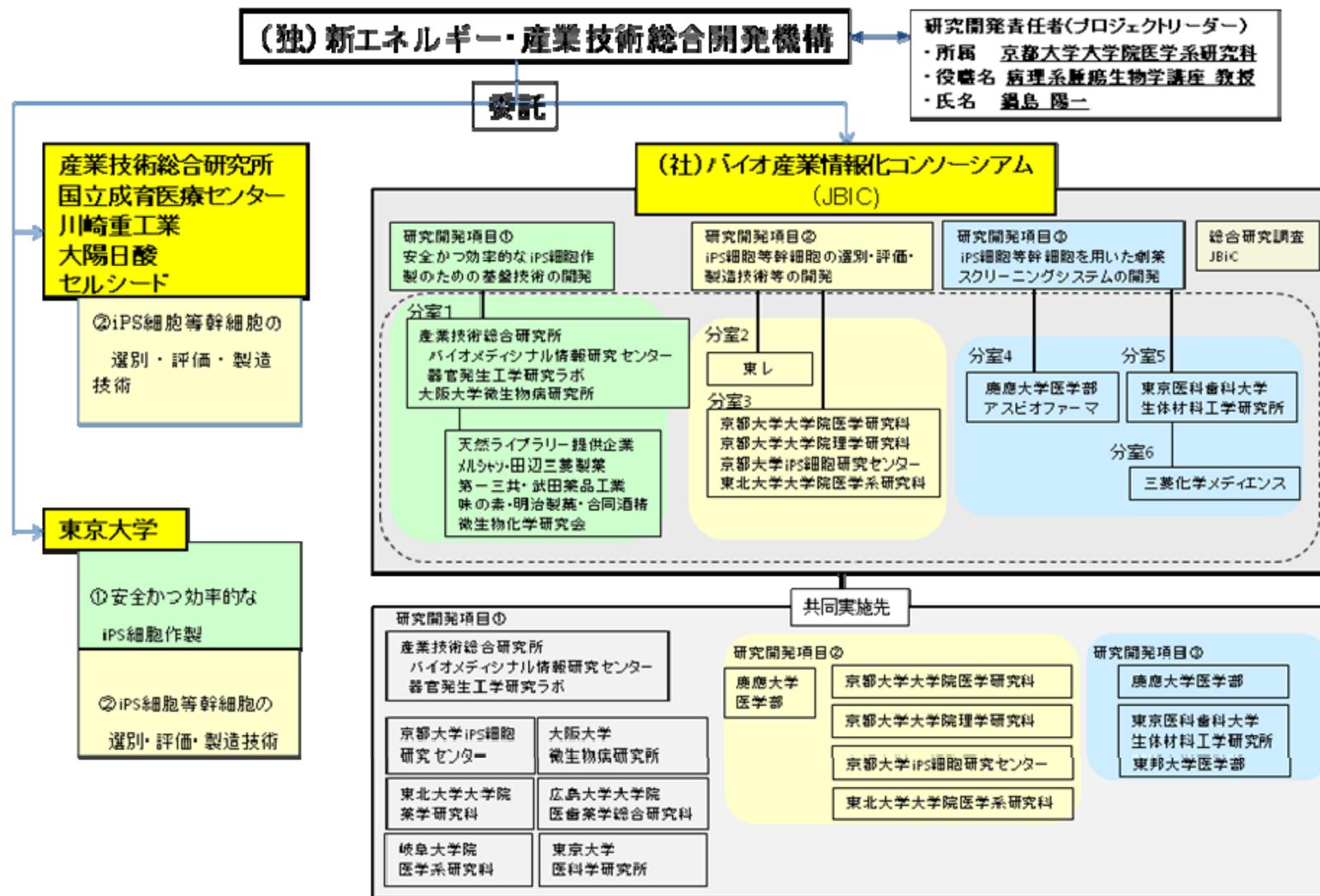
第4回研究開発推進委員会開催

8. 実施方針の改訂履歴

(1)平成22年3月9日、制定。

(別紙)

「iPS細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発」実施体制



平成 23 年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術部

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

2. 根拠法

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

3. 背景及び目的・目標

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

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

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

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

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

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

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

【最終目標】

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

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

4. 実施内容及び進捗（達成）状況

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

4. 1 平成 21～22 年度（委託）事業内容

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

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

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

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

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

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

（実施体制：東京大学、JBiC）

(2) 研究開発項目 2 「細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

① iPS 細胞等幹細胞の評価・選別技術の開発

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

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

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

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

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

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

② iPS 細胞等幹細胞の品質管理、安定供給技術の開発

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

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

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

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

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

置と自動凍結保存システムの一体化に着手した。

(実施体制：国立成育医療センター、川崎重工業㈱、大陽日酸㈱、㈱セルシード)

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

① iPS細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

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

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

② iPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

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

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

4. 2 実績推移

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

5. 事業内容

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

研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」

(平成22~27年度)

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

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

(平成20~25年度)

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

リーニングシステムの開発」を継続して推進する。)

5. 1 平成 23 年度（委託）事業内容

研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」

(1) ヒト幹細胞の安定な培養・保存技術の開発

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

(2) ヒト幹細胞の品質評価指標の開発

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

(3) ヒト幹細胞の品質管理・安定供給技術の開発

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

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

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

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

(実施体制：慶応大学、JBIC)

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

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

(実施体制：東京医科歯科大学、東邦大学、JBIC)

5. 2 平成 23 年度事業規模

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

※事業規模については、変動があり得る。

6. その他重要事項

(1) 評価の方法

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

(2) 運営・管理

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

(3) 複数年度契約の実施

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

7. スケジュール

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

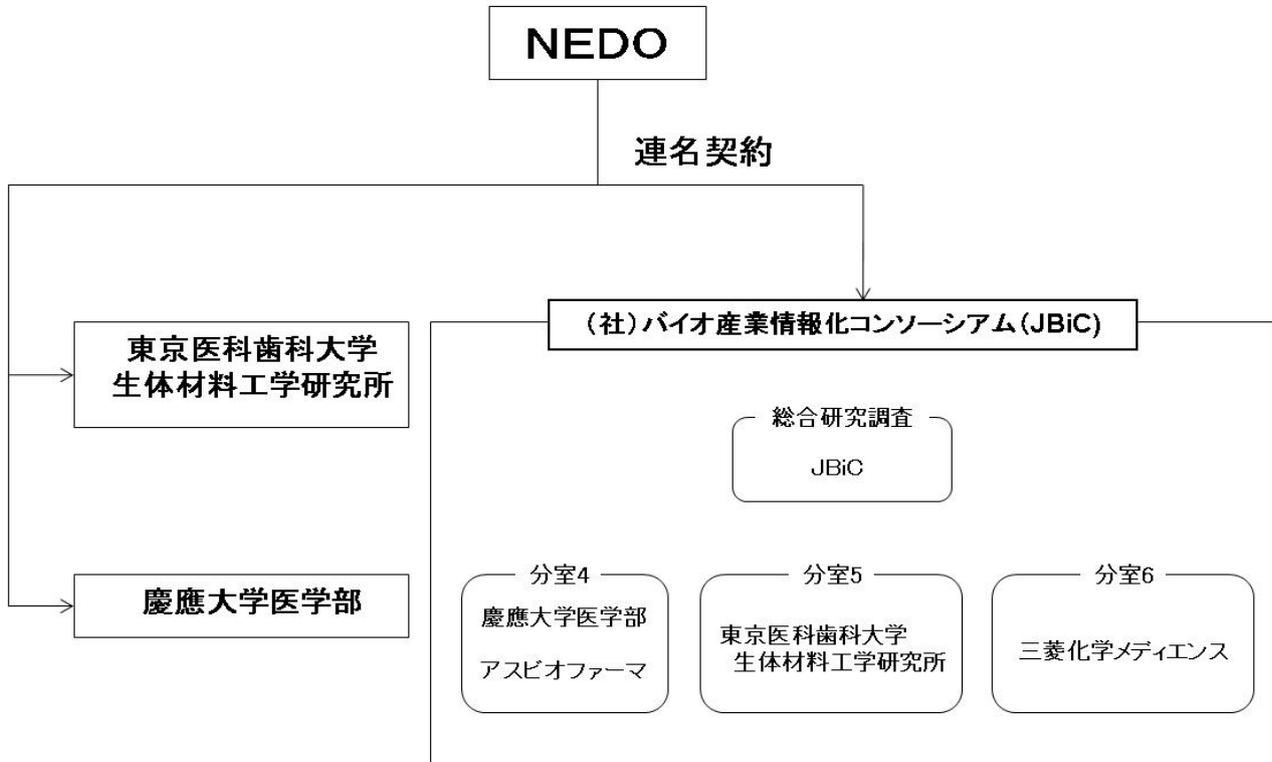
研究開発の進捗状況を把握し、目標達成に向けた着実な進展を図るため、半期に一度の頻度で研究開発推進委員会を開催する。

8. 実施方針の改定履歴

(1) 平成 23 年 3 月 10 日 制定。

(別紙) 事業実施体制の全体図

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



添付資料⑤

特許/論文/発表リスト

一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム担当分

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

【知的所有権】

新規多能性誘導因子の探索

番号	出願人	出願番号	出願日	状態	名称	発明人
001	京都大学 JBiC 産総研	米国仮出願 61/276123	2009年9月8日	出願済	新規核初期化物質	五島直樹(産総研)、山中伸弥(京大)、前川桃子(京大)、河村義史(JBiC) 望月宏美(JBiC)
002					非公開	
003					非公開	
004					非公開	
005					非公開	
006					非公開	

安全な遺伝子導入方の開発

番号	出願人	出願番号	出願日	状態	名称	発明人
001					非公開	

【論文・文献発表】

新規多能性誘導因子の探索

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	産総研	河村義史、 <u>五島直樹</u> 、野村信夫	ヒト蛋白質工場：網羅的なヒト蛋白質の発現基盤	<i>蛋白質核酸酵素</i> , 54 , No.9 1173-1181 (2009)	掲載	2009.6
002	産総研	<u>五島直樹</u>	Gatewayシステムを用いたヒト・インビトロプロテオームの構築	Gatewayを用いた遺伝子導入マニュアル(今本文男編)、シュプリングァー・ジャパン(株)、p.45-53	掲載	2009.8
003	大阪大学	曾根 岳史、西海 史子、岸根 弘依、安藤 太一、佐々木 ゆかり、井上 健、 <u>今本文男</u>	細胞への複数遺伝子の導入と発現量の制御	「Gatewayを用いた遺伝子導入マニュアル」今本文男編 シュプリングァー・ジャパン株式会社 東京 p.101-114	掲載	2009.8
004	産総研	<u>五島直樹</u> 、 <u>新家一男</u>	iPS 細胞作製における効率化、非遺伝子化に向けた取り組みについて	「iPS細胞の産業的応用技術」 山中伸弥(著、監修) (シーエムシー出版)	掲載	2009.9.1
005	大阪大学	Ken Inoue, Takefumi Sone, Chitose Oneyama, Fumiko Nishiumi, Hiroe Kishine, Yukari Sasaki, Taichi Andoh, Masato Okada, Jonathan D. Chesnut, <u>Fumio Imamoto</u>	A versatile nonviral vector system for tetracycline-dependent one-step conditional induction of transgene expression.	<i>Gene Therapy</i> 16 (12): 1383-1394 (2009)	掲載	2009
006	大阪大学	Fumiko Nishiumi, Takefumi Sone, Hiroe Kishine, Bhaskar Thyagarajan, Takako Kogure, Atsushi Miyawaki, Jonathan D. Chesnut, <u>Fumio Imamoto</u>	Simultaneous single cell stable expression of 2-4 cDNAs in HeLaS3 using ϕ C31 integrase system.	<i>Cell Structure and Function</i> , 34 (1), 47-59 (2009)	掲載	2009

007	大阪大学	Takefumi Sone, Fumiko Nishiumi, Kazuhide Yahata, Yukari Sasaki, Hiroe Kishine, Taichi Andoh, Ken Inoue, Bhaskar Thyagarajan, Jonathan D. Chesnut, <u>Fumio Imamoto</u>	Cell engineering using integrase and recombinase systems.	<i>Emerging Technology Platforms for Stem Cells</i> , eds. Uma Lakshmipathy, Jonathan D. Chesnut, Bhaskar Thyagarajan, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, p.379-394.	掲載	2009
008	産総研	<u>五島直樹</u> 、山口圭	無細胞翻訳系	「目的別で選べるプロトコール タンパク質発現」 (羊土社)	掲載	2010.3
009	産総研	<u>五島直樹</u>	機能解析用プロテインチップー網羅的ヒト・タンパク質を搭載したタンパク質チップの開発ー	バイオチップ実用化ハンドブック (エヌ・ティー・エス社)	掲載	2010.4
010	理化学研究所	K. Maeshima, H. Iino, S. Hihara, T. Funakoshi, A. Watanabe, M. Nishimura, R. Nakatomi, K. Yahata, <u>F. Imamoto</u> , T. Hashikawa, H. Yokota & N. Imamoto	Nuclear pore formation but not nuclear growth is governed by cyclin-dependent kinases (Cdks) during interphase	<i>Nature Structural & Molecular Biology</i> , 17 , 1065–1071 (2010)	掲載	2010.8.15
011	産総研	Momoko Maekawa, Kei Yamaguchi, Tomonori Nakamura, Ran Shibukawa, Ikumi Kodanaka, Tomoko Ichisaka, Yoshifumi Kawamura, Hiromi Mochizuki, <u>Naoki Goshima</u> , <u>Shinya Yamanaka</u>	Promotion of Direct Reprogramming by Maternal Transcription Factor Glis1.	<i>Nature</i> , 474 , 225–229, doi:10.1038/nature10106, 11 April 2011.	掲載	2011

3

012	大阪大学	T. Sone, Y. Takata, H. Kishine, A. Taichi, J. D. Chesnut, <u>F. Imamoto</u>	An optimized all-in-one expression construct of four reprogramming genes for generating mouse iPS cells using BacMam technology	Gene Transfer in Primary and Stem Cells: Methods and Applications (Wiley & Sons Inc.)	印刷中	2011
013	大阪大学	T. Sone, <u>F. Imamoto</u>	Methods for constructing clones for protein expression in mammalian cells	Protein Expression in Mammalian Cells: Methods and Protocols (Humana Press)	印刷中	2011

安全な遺伝子導入方の開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	産総研	中西真人・西村健・大高真奈美・佐野将之・酒井菜絵子	細胞質で持続的に遺伝子を発現できる新規ベクター開発と先端医療への応用	「iPS細胞の産業的応用技術」 (山中伸弥監修、シーエムシー出版)	掲載	2009.9
002	産総研	Ken Nishimura, Masayuki Sano, Manami Ohtaka, Birei Furuta, Yoko Umemura, Yoshihiro Nakajima, Yuzuru Ikehara, Toshihiro Kobayashi, Hideyuki Sato, Hiroaki Segawa, Satoko Takayasu, Kaori Motomura, Eriko Uchida, Toshie Kanayasu-Toyoda, Makoto Asashima, Hiromitsu Nakauchi, Teruhide Yamaguchi and <u>Mahito Nakanishi</u>	Development of Defective and Persistent Sendai Virus Vector: a Unique Gene Delivery/Expression System Ideal for Cell Reprogramming	<i>J. Bio. Chem.</i> , 286 , 4760-4771 (2011)	査読済み	2011.2.11.
003	産総研	中西真人・西村健	センダイウイルスベクターを使ったiPS細胞の作製	Medical Science Digest	査読無し	2011.1.25.

4

[学会・研究発表]

新規多能性誘導因子の探索

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	産総研	五島直樹	コムギ無細胞タンパク質合成系を用いたヒト・インビトロプロテオーム研究	日本蛋白質科学会	2009.5.20
002	産総研	五島直樹	ヒト・インビトロプロテオームを用いた抗体解析	理化学研究所よこはま NMR 構造生物学研究会シンポジウム	2009.10.6
003	産総研	五島直樹	Reverse proteomics approaches using genome-wide protein expression resources	EU NMR シンポジウム バーミンガム大学	2009.11.23
004	産総研 大阪大学	曾根 岳史、岸根 弘依、高田 葉子、安藤 太一、金 誠培、森 正敏、五島 直樹、今本 文男	Multisite Gateway 法を利用した <i>in vivo</i> タンパク質間相互作用検出系の開発: split luciferase アッセイ編	日本分子生物学会	2009.12.11
005	産総研	五島直樹	Biacore を用いた基質特異性の網羅的解析	日本分子生物学会	2009.12.11
006	産総研 京都大学	前川桃子、五島直樹、山中伸弥	ハイスループットスクリーニングによる新規多能性誘導因子の探索	第9回日本再生医療学会	2010.3.18

多分化能誘導法を効率化する化合物の探索

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	産総研 JBiC	橋本 絢子、今西 哲、Hwang Ji-Hwan、向井 啓、安藤 太一、曾根 岳史、今本 文男、高木 基樹、新家 一男	iPS細胞誘導遺伝子の発現を上昇させる天然物化合物のスクリーニング	第9回日本再生医療学会総会	2010.03.18

5

安全な遺伝子導入方の開発

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	産総研	中西真人	高品質iPS細胞の作製に向けた持続発現型RNAベクター (SeVdp) の開発	第10回日本再生医療学会総会	2011.3.1.
002	産総研 JBiC	大高 (小山) 真奈美	持続発現型RNAベクターを用いた簡便かつ高効率なヒトiPS細胞樹立方法の確立	第10回日本再生医療学会総会	2011.3.2.

[新聞・マスコミ・その他 発表]

安全な遺伝子導入方の開発

番号	会社名	内容	掲載物	掲載日
001	産総研 JBiC	第10 回日本再生医療学会総会ベストポスター賞受賞 2P-046 持続発現型RNA ベクターを用いた簡便かつ高効率なヒトiPS細胞樹立方法の確立 大高 真奈美 (産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター)	第10 回日本再生医療学会総会	2011.3.1-3.2
002	産総研	iPS作製効率100倍	日経産業新聞	2011.4.28
003	京都大学 i P S 細胞研究所 (C i R A) J S T、産総研、JBiC N E D O	転写因子 G l i s 1 により安全な i P S 細胞の高効率作製に成功	プレスリリース	2011.6.9
004	京都大学、産総研	iPS細胞の発がん防ぐ 新遺伝子活用再生医療へ前進	日本経済新聞、毎日新聞、朝日新聞、東京新聞、化学工業日報、日経産業新聞	2011.6.9

6

研究開発項目② 「iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

[論文・文献発表]

高感度DNAチップを用いた発現解析技術を基盤とした iPS 細胞の選別・評価・製造技術等の開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	慶應義塾大学 東レ株式会社	Nagamatsu G, Kosaka T, Kawasumi M, Kinoshita T, Takubo K, Akiyama H, <u>Sudo T</u> , Kobayashi T, Oya M, <u>Suda T</u> .	A germ cell specific gene, Prmt5 works as somatic cell reprogramming.	<i>J. Biol. Chem.</i> , 286 , 10641-10648 (2011)	掲載	2011.1.26
002	慶應義塾大学 東レ株式会社	Nagamatsu G, Kosaka T, Takubo K, Akiyama H, <u>Sudo T</u> , Oya M, <u>Suda T</u> .	Tracing the conversion from primordial germ cells to pluripotent stem cells.		投稿中	
003	慶應義塾大学 東レ株式会社	Nagamatsu G, Kosaka T, Takubo K, Akiyama H, <u>Sudo T</u> , Oya M, <u>Suda T</u> .	Induction of pluripotent stem cells from primordial germ cells by one of 4 reprogramming factors		投稿中	

成体由来の多能性幹細胞の操作技術を基盤とした iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	東北大学	Yasumasa Kuroda , Masaaki Kitada, Shohei Wakao, Kouki Nishikawa, Yukihiko Tanimura, Hideki Makinoshima, Makoto	Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations	<i>PNAS</i> , 107(19) , 8639-8643 (2010)	掲載	2010. 5.11

7

		Goda ^c , Hideo Akashi, Ayumu Inutsuka, Akira Niwa, Taeko Shigemoto, Yoko Nabeshima, Tatsutoshi Nakahata, Yo-ichi Nabeshima, Yoshinori Fujiyoshi, <u>Mari Dezawa</u>				
002	東北大学・京都 大学	Shohei Wakao, Masaaki Kitada, Yasumasa Kuroda, Taeko Shigemoto, Dai Matsuse, Hideo Akashi, Yukihiko Tanimura, Kenichiro Tsuchiyama, Tomohiko Kikuchi, Makoto Goda, Tatsutoshi Nakahata, Yoshinori Fujiyoshi, Mari Dezawa	Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts	<i>PNAS</i> , May 31, 2011, doi: 10.1073/pnas.11008161 08	掲載	2011.5.31

成体由来の多能性幹細胞の操作技術を基盤とした iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	京都大学	K. Abe, K. Tani, T. Nishizawa and <u>Y.</u> <u>Fujiyoshi</u> .	Inter-subunit interaction of gastric H ⁺ ,K ⁺ -ATPase prevents reverse reaction of the transport cycle.	<i>EMBO J.</i> , 28 , 1637-1643 (2009)	掲載	2009.6
002	京都大学	Y. Kuwahara, S. Unzai, T. Nagata, Y. Hiroaki,	Unusual thermal disassembly of the SPFH domain oligomer from	<i>Biophys. J.</i> , 97 , 2034-2043 (2009)	掲載	2009.10

8

		H. Yokoyama, I. Matsui, T. Ikegami, <u>Y. Fujiyoshi</u> and H. Hiroaki	<i>Pyrococcus horikoshii</i> .			
003	京都大学	K. Noma, K. Kimura, K. Minatohara, H. Nakashima, Y. Nagao, A. Mizoguchi and <u>Y. Fujiyoshi</u>	Triple N-Glycosylation in the Long S5-P Loop Regulates the Activation and Trafficking of the Kv12.2 Potassium Channel.	<i>J. Biol. Chem.</i> , 284 , 33139-33150 (2009)	掲載	2009.11
004	京都大学	A. Inutsuka, M. Goda and <u>Y. Fujiyoshi</u>	Calyculin A-induced neurite retraction is critically dependent on actomyosin activation but not on polymerization state of microtubules.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 390 , 1160-1166 (2009)	掲載	2009.12
005	京都大学	K. Irie, K. Kitagawa, H. Nagura, T. Imai, T. Shimomura and <u>Y. Fujiyoshi</u> .	Comparative study of the gating motif and C-type inactivation in prokaryotic voltage-gated sodium channels.	<i>J. Biol. Chem.</i> , 285 , 3685-3694 (2010)	掲載	2010.2
006	京都大学	K. Abe, K. Tani and <u>Y. Fujiyoshi</u> .	Structural and functional characterization of H ⁺ ,K ⁺ -ATPase with bound fluorinated phosphate analogs.	<i>J. Struct. Biol.</i> , 170 , 60-68 (2010)	掲載	2010.4
007	京都大学	Y. Kuroda, M. Kitada, S. Wakao, K. Nishikawa, Y. Tanimura, H. Makinoshima, M. Goda, H. Akashi, A. Inutsuka, A. Niwa, T. Shigemoto, Y. Nabeshima,	Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations.	<i>PNAS</i> , 107 , 8639-8643 (2010)	掲載	2010.5

9

		T. Nakahata, YI. Nabeshima, <u>Y. Fujiyoshi</u> and M. Dezawa				
008	京都大学	H. Nagura, K. Irie, T. Imai, T. Simomura, T. Hige and <u>Y. Fujiyoshi</u>	Evidence for lateral mobility of voltage sensors in prokaryotic voltage-gated sodium channels.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 399 , 341-346 (2010)	掲載	2010.8
009	京都大学	D. Matsuse, M. Kitada, M. Kohama, K. Nishikawa, H. Makinoshima, S. Wakao, <u>Y. Fujiyoshi</u> , T. Heike, T. Nakahata, H. Akutsu, A. Umezawa, H. Harigae, J. Kira and M. Dezawa	Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells Differentiate into Functional Schwann Cells that Sustain Peripheral Nerve Regeneration.	<i>J. Neuropathol. Exp. Neurol.</i> , 69 , 973-985 (2010)	掲載	2010.9
010	京都大学	T. Mitsuma, K. Tani, Y. Hiroaki, A. Kamegawa, H. Suzuki, H. Hibino, Y. Kurachi and <u>Y. Fujiyoshi</u>	Influence of the Cytoplasmic Domains of Aquaporin-4 on Water Conduction and Array Formation.	<i>J. Mol. Biol.</i> , 402 , 669-681 (2010)	掲載	2010.10
011	京都大学	A. D. Schenk, R. K. Hite, A. Engel, <u>Y. Fujiyoshi</u> and T. Walz	Electron crystallography and aquaporins.	<i>Methods in Enzymology</i> , 483 , 91-119 (2010)	掲載	2010
012	京都大学	A. Oshima, K. Tani, M. M. Toloue, Y. Hiroaki, A. Smock, S. Inukai, A. Cone, B. J. Nicholson, G. E. Sosinsky and <u>Y.</u>	Asymmetric configurations and N-terminal rearrangements in connexin26 gap junction channels.	<i>J. Mol. Biol.</i> , 405 , 724-735 (2011)	掲載	2011.1

10

		<u>Fujiyoshi</u>				
013	京都大学	K. Abe, K. Tani and <u>Y. Fujiyoshi</u>	Conformational rearrangement of gastric H ⁺ ,K ⁺ -ATPase induced by an acid suppressant.	<i>Nature Commun.</i> , 2 (155), 1-7 (2011)	掲載	2011.1
014	京都大学	T. Simomura, K. Irie, H. Nagura, T. Imai and <u>Y. Fujiyoshi</u>	Arrangement and mobility of the voltage sensor domain in prokaryotic voltage-gated sodium channels.	<i>J. Biol. Chem.</i> , 286 , 7409-7417 (2011)	掲載	2011.3.4
015	京都大学	K. Yakata, K. Tani and <u>Y. Fujiyoshi</u>	Water permeability and characterization of aquaporin-11.	<i>J. Struct. Biol.</i> , 174 (2), 315-320 (2011)	掲載	2011.1.18 (Epub)

成体由来の多能性幹細胞の操作技術を基盤とした iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	京都大学	Okafuji I, Nishikomori R, Kanazawa N, Kambe N, Fujisawa A, Yamazaki S, Saito M, Yoshioka T, Kawai T, Sakai H, Tanizaki H, Heike T, Miyachi Y, <u>Nakahata T.</u>	Role of the NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis.	<i>Arthritis Rheum.</i> , 60 (1), 242-50 (2009)	掲載	2009
002	京都大学	Niwa A, Umeda K, Awaya T, Yui Y, Matsubara H, Hiramatsu H, Watanabe KI, Adachi S, Itoh T, Uemoto S, <u>Nakahata T.</u>	Successful autologous peripheral blood stem cell transplantation with a double-conditioning regimen for recurrent hepatoblastoma after liver transplantation.	<i>Pediatr. Transplant.</i> , 13 (2), 259-262 (2009)	掲載	2009
003	京都大学	Hiraumi Y, Iwai-Kanai E, Baba S, Yui Y, Kamitsuji Y, Mizushima Y, Matsubara H, Watanabe M, Watanabe	Granulocyte colony-stimulating factor protects cardiac mitochondria in the early phase	<i>Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.</i> , 296 , H823-H832 (2009)	掲載	2009

11

		KI, Toyokuni S, Matsubara H, <u>Nakahata T.</u> , Adachi S.	of cardiac injury.			
004	京都大学	Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada SI, Yamamoto H, Motohashi N, Suzuki YM, Takeda S, Heike T, <u>Nakahata T.</u>	Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells.	<i>FASEB J.</i> , 23 ,1907-1919 (2009)	掲載	2009
005	京都大学	Fukushima-Shintani M, Suzuki KI, Iwatsuki Y, Abe M, Sugawara K, Hirayama F, Kawasaki T, <u>Nakahata T</u>	AKR-501 (YM477) a novel orally-active thrombopoietin receptor agonist.	<i>Eur. J. Haematol.</i> , 82 (4), 247-254 (2009)	掲載	2009
006	京都大学	Higashi A.Y., Ikawa T, Muramatsu M, Economides A.N., Niwa A, Okuda T, Murphy A.J., Rojas J, Heike T, <u>Nakahata T.</u> , Kawamoto H, Kita T, Yanagita M.	Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreERT2	<i>J. Immunol.</i> , 182 , 5633-5640 (2009)	掲載	2009
007	京都大学	Yokoo N., Baba S., Kaichi S., Niwa A., Mima T., Doi H., Yamanaka S., <u>Nakahata T.</u> , Heike T.	The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells.	<i>Biochem. Biophys. Res. Com.</i> , 387 (3), 482-488 (2009)	掲載	2009
008	京都大学	Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, Heike T, <u>Nakahata T.</u> , Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y	Selective infection of CD(4)+ effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-infected humanized NOD/SCID/IL-2R γ null mice.	<i>Virology</i> , 394 , 64-72 (2009)	掲載	2009
009	京都大学	Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y,	Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas.	<i>Nature</i> , 459 , 712-716 (2009)	掲載	2009

12

		Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, <u>Nakahata T</u> , Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S.				
010	京都大学	Niwa A., Umeda K., Chang H., Saito M., Okita K., Takahashi K., Nakagawa M., Yamanaka S., <u>Nakahata T.</u> , Heike T	Orderly Hematopoietic Development of Induced Pluripotent Stem Cells via Flk-1+ Hemoangiogenic Progenitors.	<i>J. Cell. Physiol.</i> , 221 , 367-377 (2009)	掲載	2009
011	京都大学	Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A., Shima T., Wing K., Niwa A., Perizot C., Taflin C., Heike T., Valeyre D., Mathian A., <u>Nakahata T.</u> , Yamaguchi T., Nomura T., Ono M., Amoura Z., Gorocho G., Sakaguchi S.	Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor.	<i>Immunity</i> , 30 , 899-911 (2009)	掲載	2009
012	京都大学	Yoshimoto M, Heike T, Chang H, Kanatsu-Shinohara M, Baba S, Varnau JT, Shinohara T, Yoder MC, <u>Nakahata T</u>	Bone marrow engraftment but limited expansion of hematopoietic cells from multipotent germline stem cells derived from neonatal mouse testis.	<i>Exp. Hematol.</i> , 37 , 1400-1410 (2009)	掲載	2009
013	京都大学	Kato I., Umeda K., Awaya T., Yui Y., Niwa A., Fujino H., Matsubara H.,	Successful treatment of refractory donor lymphocyte	<i>Pediatr. Blood Cancer.</i> , 54 , 329-331 (2010)	掲載	2010

13

		Watanabe K., Heike T., Adachi N., Endo H., Mizukami T., Nunoi H., <u>Nakahata T.</u> , Adachi S.	infusion-induced immune-mediated pancytopenia by Rituximab.			
014	京都大学	Takeuchi M., Kimura S., Kuroda J., Ashihara E., Kawatani M., Osada H., Umezawa K., Yasui E. Imoto M., Tsuruo T., Yokota A., Tanaka R., Nagao R., <u>Nakahata T.</u> , Fujiyama Y., Maekawa T.	Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl+ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in a hypoxic environment.	<i>Cell Death Diff.</i> , 17 , 1211-1220 (2010)	掲載	2010
015	京都大学	Mizuno Y., Chang H., Umeda K., Niwa A., Iwasa T., Awaya T., Fukada S., Hiroshi Yamamoto H., Yamanaka S., <u>Nakahata T.</u> , Heike T.	Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells.	<i>FASEB J.</i> , 24 , 2245-2253 (2010)	掲載	2010
016	京都大学	Kato I., Umeda K., Awaya T., Yui Y., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Watanabe K., Heike T., Adachi N., Endo H., Mizukami T., Nunoi H., <u>Nakahata T.</u> , Adachi S.	Successful treatment of refractory donor lymphocyte infusion-induced immune-mediated pancytopenia by Rituximab.	<i>Pediatr. Blood Cancer</i> , 54 , 329-331 (2010)	掲載	2010
017	京都大学	Takeuchi M., Kimura S., Kuroda J., Ashihara E., Kawatani M., Osada H., Umezawa K., Yasui E. Imoto M., Tsuruo T., Yokota A., Tanaka R., Nagao R., <u>Nakahata T.</u> , Fujiyama Y., Maekawa T.	Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl+ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in a hypoxic environment.	<i>Cell Death Diff.</i> , 17 , 1211-1220 (2010)	掲載	2010
018	京都大学	Kuroda Y., Kitada M., Wakao S., Nishikawa K., Tanimura Y.,	Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 107 , 8639-8643	掲載	2010

14

		Makinoshima H., Goda M., Akashi H., Inutsuka A., Niwa A., Nabeshima Y., <u>Nakahata T.</u> , Nabeshima Y., Fujiyoshi Y., Dezawa M.	populations.	(2010)		
019	京都大学	Matsuda K., Taira C., Sakashita K., Saito S., Yanagisawa MT., Yanagisawa R., Yozo Nakazawa Y., Shiohara M., Fukushima K., Oda M., Honda T., <u>Nakahata T.</u> , Koike K.	Long-term survival after non-intensive chemotherapy in some juvenile myelomonocytic leukemia patients with <i>CBL</i> mutations, and the possible presence of normal individuals with the mutations.	<i>Blood</i> , 115 , 5429-5431 (2010)	掲載	2010
020	京都大学	Matsuse D., Kitada M., Kohama M., Nishikawa K., Makinoshima H., Wakao S., Fujiyoshi Y., Heike T., <u>Nakahata T.</u> , Akutsu H., Umezawa A., Harigae H., Kita J., Dezawa M.	Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration.	<i>J. Neuropathol. Exp. Neurol.</i> , 69 , 973-985 (2010)	掲載	2010
021	京都大学	Kumada T., Yamanaka Y., Kitano A., Shibata M., Awaya T., Kato T., Okawa K., Abe T., Oshima N., <u>Nakahata T.</u> , Heike T.	Ttyh1, a Ca ²⁺ -binding protein localized to the endoplasmic reticulum, is required for early embryonic development.	<i>Develop. Dynam.</i> , 239 , 2233-2245 (2010)	掲載	2010
022	京都大学	Kaichi S., Hasegawa K., Takaya T., Yokoo N., Mima T., Kawamura T., Morimoto T., Baba S., Doi H., Yamanaka S., <u>Nakahata T.</u> , Heike T.	Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice.	<i>Cardiovascular Res.</i> , 88(2) , 314-323 (2010)	掲載	2010
023	京都大学	Iwasa T., Baba S., Doi H., Kaichi S., Yokoo N., Mima T.,	Neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells	<i>Biochem. Biophys. Res. Com.</i> 400 , 27-33 (2010)	掲載	2010

15

		Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T., <u>Nakahata T.</u> , Heike T.	improve the cardiac function of acute ischemic heart mouse model.			
024	京都大学	Morishima T., Watanabe K., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Adachi S., Suemori H., <u>Nakahata T.</u> , Heike T.	Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells.	<i>J. Cell. Physiol.</i> 226(5) , 1283-1291 (2011)	掲載	2011
025	京都大学	Yamanaka Y., Kitano A., Takao K., Prasansuklab A., Mushiroda T., Yamazaki K., Kumada T., Shibata M., Takaoka Y., Awaya T., Kato T., <u>Nakahata T.</u> , Heike T.	Inactivation of fibroblast growth factor binding protein 3 causes anxiety-related behaviors.	<i>Molecular and Cellular Neuroscience</i> , 46(1) , 200-2012 (2011)	掲載	2011

[学会・研究発表]

高感度DNAチップを用いた発現解析技術を基盤とした iPS 細胞の選別・評価・製造技術等の開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	慶応大学	永松剛、小坂威雄、田久保圭誉、大家基嗣、須田年生	Fundamental knowledge of germ cells to innovating technology for somatic cell reprogramming	国際幹細胞学会	発表	2009.7.9

成体由来の多能性幹細胞の操作技術を基盤とした iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	京都大学	<u>Y. Fujiyoshi</u>	Structural physiology of multifunctional channels (Special Lecture)	IUPS2009 (36th International Congress of Physiological Sciences)	2009.7.30

16

002	京都大学	<u>Y. Fujiyoshi</u>	Recent advancements in structural analysis of AQP4 water channels and Cx26 gap junction channels	CMBN guest lecture	2009.9.24
003	京都大学	<u>Y. Fujiyoshi</u>	Structural physiology based on electron crystallography (Plenary Lecture)	AsCA'09 (Joint Conference of the Asian Crystallographic Association & Chinese Crystallography Society)	2009.10.25
004	京都大学	藤吉 好則	脳の代表的水チャネル: アクアポリン-4の構造と機能	第39回慶應ニューロサイエンス研究会 『アクアポリン-4と神経疾患 - 新たな病態メカニズムの展開と治療への戦略-』	2009.10.31
005	京都大学	藤吉 好則	多機能性チャネルの構造生理学 (招待講演)	第14回ハイテク・リサーチセンター研究発表会	2009.11.7
006	京都大学	<u>Y. Fujiyoshi</u>	Structural and functional study of membrane proteins by Cryo-electron microscopy	JEOL/CURIE institute Meeting	2009.11.25
007	京都大学	<u>Y. Fujiyoshi</u>	Structural Physiology Based on Electron Crystallography	International Symposium Fifty Years of Biophysics Research at Nagoya University	2010.3.12
008	京都大学	藤吉 好則	膜タンパク質の構造と機能研究のための極低温電子顕微鏡技術	京都大学低温物質科学研究センター第8回講演会・研究交流会 「構造生物学の現状と未来」	2010.3.15
009	京都大学	<u>Y. Fujiyoshi</u>	Structural physiology of channels based on electron crystallography	Cold Spring Harbor Conference Asia (Membrane Protein: Structure & Function meeting)	2010.4.13
010	京都大学	<u>Y. Fujiyoshi</u>	Structural physiology of water and ion channels studied by electron crystallography (Plenary lecture)	SCANDEM2010	2010.6.10
011	京都大学	<u>Y. Fujiyoshi</u>	Development of cryo-electron microscopes for high resolution electron crystallography	Seminar at Stockholm University	2010.6.11

17

012	京都大学	<u>Y. Fujiyoshi</u>	Structural physiology of water and ion channels	Seminar at Stockholm University	2010.6.11
013	京都大学	<u>Y. Fujiyoshi</u>	Structural physiology based on electron crystallography (The Christian B. Anfinsen Award)	The 24th Annual Symposium of The Protein Society	2010.8.1
014	京都大学	<u>Y. Fujiyoshi</u>	Structural physiology of ion and water channels based on electron crystallography	The Third K. H. Kuo Summer School of Electron microscopy and Crystallography "International Workshop of 3D Molecular Imaging Cryo-Electron Microscopy"	2010.8.10
015	京都大学	<u>Y. Fujiyoshi</u>	Seeing is joy of discovering something new	JSPS Sweden-Japan Joint Colloquium "Direct Imaging in Bio/Medical Science"	2011.1.18
016	京都大学	藤吉 好則	多機能性チャネルの構造と機能	自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター「10周年記念シンポジウム」	2011.2.11
017	京都大学	<u>Y. Fujiyoshi</u>	Structure and function of water and ion channels	International Symposium on Bioimaging and Surface Sciences	2011.3.27

18

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

[知的所有権]

iPS細胞等幹細胞から心筋細胞への効率的な分化誘導技術の開発

番号	出願人	出願番号	出願日	状態	名称	発明人
001				非公開		

iPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

番号	出願人	出願番号	出願日	状態	名称	発明人
001				非公開		
002				非公開		
003				非公開		

[論文・文献発表]

iPS細胞等幹細胞から心筋細胞への効率的な分化誘導技術の開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	慶應義塾大学	Tomofumi Tanaka, Shugo Tohyama, Mitsushige Murata, Fumimasa Nomura, Tomoyuki Kaneko, Hao Chen, Fumiyuki Hattori, Toru Egashira, Tomohisa Seki, Yohei Ohno, Uichi Koshimizu, Shinsuke Yuasa,	<i>In vitro</i> pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i> , 385 , 497-502 (2009)	掲載	2009.5

		Satoshi Ogawa, Shinya Yamanaka, Kenji Yasuda, <u>Keiichi Fukuda</u> .				
002	慶應義塾大学	Ryo Suzuki, Fumiyuki Hattori, Yuji Itabashi, Masatoyo Yoshioka, Shinsuke Yuasa, Haruko Manabe-Kawaguchi, Shinji Makino, Kiyokazu Kokaji, Ryohei Yozu, <u>Keiichi Fukuda</u> .	Omentopexy accelerates graft function in myocardial cell sheet transplantation.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i> , 387 , 353-9 (2009)	掲載	2009.7
003	慶應義塾大学	Jin Endo, Takaharu Katayama, Motoaki Sano, Ikuroh Ohsawa, Takako Hishiki, Takeshi Adachi, Makoto Suematsu, Shigeo Ohta, Satoshi Ogawa, <u>Keiichi Fukuda</u> .	ATF4 regulating metabolic shift toward the Phgdh-mediated serine synthesis enhances cardioprotection to oxidative stress as hormesis-like response to aldehydes.	<i>Circ. Res.</i> , 105 , 1118-27 (2009)	掲載	2009.9
004	慶應義塾大学	Fumiyuki Hattori, Hao Chen, Hiromi Yamashita, Shugo Tohyama, Yu-suke Satoh, Shinsuke Yuasa, Weizhen Li, Motoaki Sano, Shinji Makino, Shinzo Oikawa, <u>Keiichi Fukuda</u>	Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes.	<i>Nature Methods</i> , 7 , 61-66 (2010)	掲載	2010.1
005	慶應義塾大学	Kenichiro Shimoji, Shinsuk Yuasa, Takeshi Onizuka, Fumiyuki Hattori, Tomofumi Tanaka, Mie Hara, Yohei Ohno, Hao Chen, Uichi Koshimizu, Satoshi Ogawa, <u>Keiichi</u>	G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ES and iPS cells.	<i>Cell Stem Cell</i> , 6 , 227-237 (2010)	掲載	2010.3

		<u>Fukuda</u>				
006	慶應義塾大学	Mitsushige Murata, Shugo Tohyama, <u>Keiichi Fukuda</u>	The impact of recent advances in cardiovascular regenerative medicine on clinical therapeutics and drug discovery.	<i>Pharmacology & Therapeutics</i> , 126 ,109-18 (2010)	掲載	2010
007	慶應義塾大学	Fumiyuki Hattori, <u>Keiichi Fukuda</u>	Strategies for making regenerative cardiomyocytes work properly and cooperatively with host myocardium.	<i>Experimental and Molecular Medicine</i> , 42 ,155-65 (2010)	掲載	2010.2
008	慶應義塾大学	Tomohisa Seki, Shinsuke Yuasa, Mayumi Oda, Toru Egashira, Kojiro Yae, Dai Kusumoto, Hikari Nakata, Shugo Tohyama, Hisayuki Hashimoto, Masaki Kodaira, Yohei Okada, Hiroyuki Seimiya, Noemi Fusaki, Mamoru Hasegawa, <u>Keiichi Fukuda</u>	Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells.	<i>Cell Stem Cell</i> , 7 , 11-4 (2010)	掲載	2010.7
009	慶應義塾大学	Li W, Yamashita H, Hattori F, Chen H, Tohyama S, Satoh Y, Sasaki E, Yuasa S, Makino S, Sano M, <u>Fukuda K</u>	Simple autogeneic feeder cell preparation for pluripotent stem cells.	<i>Stem Cell Res.</i> , 6 , 83-9 (2010)	掲載	2010.9

iPS 細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	東京医科歯科大学	<u>安田賢二</u>	オンチップ・セロミクス（細胞）デバイス	ヘルスケアとバイオ医療のための先端デバイス機器、(株)シーエムシー出版	掲載	2009.05
002	慶應義塾大学、東京医科歯科大学、京都大学、アスピオファーマ㈱	Tanaka T, Tohyama S, Murata M, Nomura F, Kaneko T, Chen H, Hattori F, Egashira T, Seki T, Ohno Y, Koshimizu U, Yuasa S, Ogawa S, Yamanaka S, <u>Yasuda K</u> , <u>Fukuda K</u>	In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 385 , 497-502 (2009)	掲載	2009.7.7
003	東京医科歯科大学	<u>Yasuda K</u> , Kaneko T, Nomura F	On-Chip Cellomics for Cardiotoxicity: Cell Network Model For Re-Construction of Higher Complexity of Organs	The Open Conference Proceedings Journal	掲載	2010.08.31
004	東京医科歯科大学	<u>安田賢二</u>	オンチップ・セロミクス技術を用いた細胞からのセンシング・バイオロジー	<i>BIOINDUSTRY</i> (バイオインダストリー) 2009/11/12発売号	掲載	2009.11.12
005	東京医科歯科大学	<u>安田賢二</u>	生命システムの構成的再構築の試み：オンチップ・セロミクス計測技術の開発	<i>日本物理学会誌</i> , 65 (3), 181-186, (2010)	掲載	2010.03.05
006	東京医科歯科大学	<u>安田賢二</u>	オンチップ・セロミクス・テクロロジーのヒト幹細胞由来	<i>薬学雑誌</i> , 130 (4), 545-557 (2010)	掲載	2010.04.01

			心筋細胞を用いた創薬スクリーニングシステムへの展開			
007	東京医科歯科大学	安田賢二	セロミクス解析システムチップ	バイオチップ実用化ハンドブック、(株)エヌ・ティー・エス	掲載	2010.04.08
008	東京医科歯科大学	安田賢二	細胞を並べる技術～再生医療研究からの示唆とその応用～	再生医療, 9(3) , 367-378, (2010)	掲載	2010.08.01
009	東京医科歯科大学	Yasuda K, Kaneko T, Nomura F	On-Chip Pre-Clinical Cardiac Toxicity: Testing Compounds Beyond hERG And QT Using hES/hiPS Cardiomyocyte Re-Entry Cell Network Model On a Chip	Proceeding of The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences	掲載	2010.10.05
010	東京医科歯科大学	Yasuda K	Algebraic and Geometric Understanding of Cells, Epigenetic Inheritance of Phenotypes Between Generation	<i>Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology</i> , 2011, 1-27, DOI: 10.1007/10_2010_97	掲載	2010.10
011	東京医科歯科大学	安田賢二	Pharmacogenomics for Cancer Therapy Pharmacogenomics for Cancer Therapy CTC計測技術の最前線	がん分子標的治療, 9(1) , 46-55 (2011)	掲載	2011.01.01
012	東京医科歯科大学	金子智行	iPS細胞研究からみえてきた未分化細胞と分化細胞の違い	バリティ, 26(1) , 70-72, (2011)	掲載	2011.01.01

[学会・研究発表]

iPS細胞等幹細胞から心筋細胞への効率的な分化誘導技術の開発

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	慶應義塾大学	Keiichi Fukuda	Future treatment of severe heart failure using regenerative medicine.	The 17 th Asian Pacific Cngress of Cardiology. Kyoto, Japan.	2009.5.23
002	慶應義塾大学	Keiichi Fukuda	Future treatment of severe heart failure using regenerative medicine.	The third international conference on cell therapy. Seoul, Korea.	2009.11.12
003	慶應義塾大学	Keiichi Fukuda	Symposium: Stem cell in cardiovascular Disease. Future treatment of severe heart failure using regenerative medicine.	The 3rd World Conference of International Academy of Cardiovascular Science.	2009.6.18
004	慶應義塾大学	Yohei Ohno, Shinsuke Yuasa, Toru Egashira, Tomohisa Seki, Hisayuki Hashimoto, Shugo Toyama, Sung Han Yoon, Takahide Arai, Chen Hao, Tomofumi Tanaka, Fumiyuki Hattori, Kojiro Yae, Mitsushige Murata, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda	Molecular Characterization of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cell-Derived Cardiomyocytes.	American Heart Association, 81th Scientific Meeting. Orlando, Florida, USA.	2009.11.14-18
005	慶應義塾大学	Toru Egashira, Shinsuke	Generation of Induced	American Heart Association,	2009.11.

		Yuasa, Yohei Ohno, Tomohisa Seki, Hisayuki Hashimoto, Shogo Toyama, Sung H Yoon, Chen Hao, Tomofumi Tanaka, Fumiyuki Hattori, Kojiro Yae, Mitsushige Murata, Satoshi Ogawa, <u>Keiichi Fukuda</u>	Pluripotent Stem Cells in Healthy Volunteers and Patients With Hereditary Heart Disease.	81th Scientific Meeting. Orlando, Florida, USA.	14-18
006	慶應義塾大学	Shugo Tohyama, Mitsushige Murata, Fumiyuki Hattori, Tomofumi Tanaka, Hao Chen, Hiromi Yamashita, Yusuke Sato, Toru Egashira, Tomohisa Seki, Hisayuki Hashimoto, Yohei Ohno, Yuichi Tamura, Shinsuke Yuasa, Satoshi Ogawa, <u>Keiichi Fukuda</u>	Functional Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes.	American Heart Association, 81th Scientific Meeting. Orlando, Florida, USA.	2009.11.14-18
007	慶應義塾大学	Takeshi Onizuka, Shinsuke Yuasa, Kenichiro Shimoji, Yohei Ohno, <u>Keiichi Fukuda</u>	Wnt2 Accelerates Cardiac Myocyte Differentiation From Es-cell Derived Mesodermal Cells Via Non-canonical Pathway.	The 74 th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Kyoto, Japan.	2010.3.5-7,
008	慶應義塾大学	Yohei Ohno, Shinsuke Yuasa, Toru Egashira, Tomohisa Seki, Hisayuki Hashimoto, Shugo Toyama, Takahide Arai, Tomofumi Tanaka, Fumiyuki Hattori, Kojiro Yae, Mitsushige Murata, Satoshi Ogawa, Shinya Yamanaka, <u>Keiichi Fukuda</u>	Molecular characterization of induced pluripotent stem (iPS) cell- derived cardiomyocytes.	The 74 th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Kyoto, Japan.	2010.3.5-7,
009	慶應義塾大学	Toru Egashira, Tomohisa Seki, Shinsuke Yuasa, Yohei Ohno,	Generation of Induced Pluripotent Stem Cells in	The 74 th Annual Scientific Meeting of the Japanese	2010.3.5-7,

25

		Shugo Tohyama, Kojiro Yae, Hisayuki Hashimoto, Masaki Kodaira, Dai Kusumoto, Tomofumi Tanaka, Fumiyuki Hattori, Mitsushige Murata, Shinya Yamanaka, Satoshi Ogawa, <u>Keiichi Fukuda</u>	Healthy Volunteers and Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy.	Circulation Society. Kyoto, Japan.	
010	慶應義塾大学	Shugo Tohyama, Mitsushige Murata, Fumiyuki Hattori, Toru Egashira, Tomohisa Seki, Hisayuki Hashimoto, Yohei Ohno, Yuichi Tamura, Hiroyuki Yamakawa, Shinsuke Yuasa, Motoaki Sano, Satoshi Ogawa, <u>Keiichi Fukuda</u>	Developmental Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes.	The 74 th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Kyoto, Japan.	2010.3.5-7,
011	慶應義塾大学	Tomohisa Seki, Egashira Toru, Yuasa Shinsuke, Ohno Yohei, Tohyama Shugo, Hashimoto Hisayuki, Kodaira Masaki, Kusumoto Dai, Yae Koujirou, Tanaka Tomofumi Hattori Fumiyuki, Aizawa Yoshiyasu, Murata Mitsushige, Satou Toshiaki, Kanki Hideaki, Yamanaka Shinya, Ogawa Satoshi, <u>Fukuda Keiichi</u>	Generation of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells from Patients with Congenital Long QT Syndrome.	The 74 th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Kyoto, Japan.	2010.3.5-7,
012	慶應義塾大学	Hisayuki Hashimoto, Shinsuke Yuasa, Shugo Tohyama, Tomohisa Seki, Toru Egashira, Yohei Ohno, Kojiro Yae, Dai Kusumoto, Masaki Kodaira,	Novel Method 'Fucci' Elucidated the Cell Cycle Dynamics in Developing and Maturing Cardiomyocytes.	The 74 th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Kyoto, Japan.	2010.3.5-7,

26

		Tomohiro Matsuhashi, Yuichi Tamura, Ruri Kaneda, Mayumi Oda, Asako Sakae, Atsushi Miyawaki, Satoshi Ogawa, <u>Keiichi Fukuda</u>			
013	慶應義塾大学	Shugo Tohyama, Fumiuyuki Hattori, Motoaki Sano, Takako Hishiki, Yoshiko Nagahata, Mitsushige Murata, Hiromi Yamashita, Yusuke Satoh, Hisayuki Hashimoto, Yasuyuki Ohgino, Toru Egashira, Tomohisa Seki, Yohei Ohno, Hiroyuki Yamakawa, Shinsuke Yuasa, Shinji Makino, Makoto Suematsu, <u>Keiichi Fukuda</u>	Metabolic Difference Between Embryonic Stem Cells and Cardiomyocytes	World Congress of the International Society for Heart Research 2010, Kyoto, Japan	2010.5.13-16
014	慶應義塾大学	Shugo Tohyama, Mitsushige Murata, Fumiuyuki Hattori, Mika Mizusawa, Hiroyuki Yamakawa, Yasuyuki Ohgino, Toru Egashira, Tomohisa Seki, Hisayuki Hashimoto, Yohei Ohno, Dai Kusumoto, Kojiro Yae, Shinsuke Yuasa, Shinji Makino, Motoaki Sano, <u>Keiichi Fukuda</u>	Intracellular Ca ²⁺ homeostasis in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes	World Congress of the International Society for Heart Research 2010, Kyoto, Japan	2010.5.13-16

015	慶應義塾大学	Seki T, Yuasa S, Egashira T, Yae K, Ohno Y, Tohyama S, Tanaka T, Hattori F, Aizawa Y, Murata M, Sato T, Yamanaka S, Ogawa S, <u>Fukuda K.</u>	Generation of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells from Patients with Congenital Long QT Syndrome.	World Congress of the International Society for Heart Research 2010, Kyoto, Japan	2010.5.13-16
016	慶應義塾大学	Shugo Tohyama, Fumiuyuki Hattori, Motoaki Sano, Takako Hishiki, Yoshiko Nagahata, Mitsushige Murata, Hisayuki Hashimoto, Toru Egashira, Tomohisa Seki, Yohei Ohno, Hiromi Yamashita, Shinsuke Yuasa, Makoto Suematsu, <u>Keiichi Fukuda</u>	Embryonic stem cell has a metabolic characteristic of cancer cells "Warburg effect"	第1回Molecular Cellular Conference II, Hokkaido, Japan	2010.9.3-5
017	慶應義塾大学	Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N, Hasegawa M, <u>Fukuda K.</u>	Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Terminally Differentiated Circulating T Cells.	第1回Molecular Cellular Conference II, Hokkaido, Japan	2010.9.3-5
018	慶應義塾大学	遠山周吾, 村田光繁, 黒川洵子, Lopez-Redondo Fernando, 服部文幸, 水澤実加, 山川裕之, 橋本寿之, 江頭徹, 関倫久, 扇野泰行, 八戸宏二郎, 湯浅慎介, <u>福田 恵一</u>	ヒト iPS 由来心筋細胞の電気生理学的特性について	第 27 回日本心電学会 大分	2010.10.8-10
019	慶應義塾大学	Hisayuki Hashimoto, Shinsuke Yuasa, Shugo Tohyama,	Novel Method 'Fucci' Elucidated the Cardiomyocyte Cell Cycle	American Heart Association, 82th Scientific Meeting.	2010.11.13-17,

		Tomohisa Seki, Toru Egashira, Kojiro Yae, Dai Kusumoto, Masaki Kodaira, Fumiyuki Hattori, Naoto Muraoka, Hidenori Tabata, Kazunori Nakajima, Asako Sakaue-Sawano, Atsushi Miyawaki, <u>Keiichi Fukuda</u>	Dynamics in Various Life Stages Control.	Chicago, Illinois, USA.	
--	--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------	-------------------------	--

iPS 細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	東京医科歯科大学、山梨大学、三菱化学メディエンス(株)、Cellartis AB	Atsushi Sugiyama, Tetsuo Kitamura, Fumimasa Nomura, Tomoyuki Kaneko, Yuji Nakamura, Peter Sartipy, <u>Kenji Yasuda</u>	A New In Vitro Model to Detect Proarrhythmic Effects of Drugs on Human Heart Cells	The 9th Annual Meeting of Safety Pharmacology Society	2009.9
002	東京医科歯科大学	巴悠記、金子智行、野村典正、高戸珠恵、 <u>安田賢二</u>	多電極チップを用いた心筋細胞小集団による長期的心毒性評価法の開発	第 47 回日本生物物理学会年会	2009.10
003	東京医科歯科大学	野村典正、金子智行、巴悠記、 <u>安田賢二</u>	オンチップ多電極電位計測システムを用いたマウス胎仔心筋細胞における細胞外電位の波形解析	第 47 回日本生物物理学会年会	2009.10
004	東京医科歯科大学	金子智行、野村典正、巴悠記、 <u>安田賢二</u>	多電極計測システムを用いた心筋細胞ネットワークの集団化効果の理解	第 47 回日本生物物理学会年会	2009.10

29

005	東京医科歯科大学	Tomoyuki Kaneko, Fumimasa Nomura, Yuki Tomoe, <u>Kenji Yasuda</u>	Community effects in cardiomyocyte networks analyzed with on-chip single-cell measurement system	49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology	2009.12
006	東京医科歯科大学、三菱化学メディエンス(株)	Fumimasa Nomura, Tetsuo Kitamura, Tomoyuki Kaneko, <u>Kenji Yasuda</u>	Development of Novel System for the Functional Analysis of the Cardiomyocytes Network Model Using On-Chip Cellomics Technology	Biophysical Society 54th Annual Meeting	2010.2
007	東京医科歯科大学	Yuki Tomoe, Tomoyuki Kaneko, Fumimasa Nomura, <u>Kenji Yasuda</u>	Community Effect to the External Electrical Stimulation on Cardiomyocytes by using On-Chip MEA System	Biophysical Society 54th Annual Meeting	2010.2
008	東京医科歯科大学	Sachie Ohhara, Fumimasa Nomura, Tomoyuki <u>Kaneko</u> , <u>Kenji Yasuda</u>	Community Effect on Drug Sensitivity of Cardiomyocytes Controlled Spatial Patterns by using On-Chip MEA System	Biophysical Society 54th Annual Meeting	2010.2
009	三菱化学メディエンス(株)、東京医科歯科大学、Cellartis AB、慶應義塾大学	Tetsuo Kitamura, Fumimasa Nomura, Tomoyuki Kaneko, Peter Sartipy, <u>Keiichi Fukuda</u> , <u>Atsushi Sugiyama</u> , <u>Masaru Sekijima</u> , <u>Kenji Yasuda</u>	In vitro preclinical cardiac safety pharmacology: Development of drug proarrhythmic measurement with human embryonic stem cell derived cardiomyocytes network	WorldPharma2010, 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology	2010.7
010	東京医科歯科大学、三菱	Atsushi Sugiyama, Tetsuo Kitamura, Fumimasa Nomura,	Analysis of proarrhythmic effects of typical IKr blockers	WorldPharma2010, 16th World Congress on Basic and Clinical	2010.7

30

	化学メディア エンス(株)、 Cellartis AB、慶應義 塾大学	Tomoyuki Kaneko, Peter Sartipy, <u>Keiichi Fukuda</u> , <u>Kenji Yasuda</u>	using human ES/iPS cell-derived cardiomyocytes	Pharmacology	
011	東京医科歯 科大学	<u>Kenji Yasuda</u>	Fast Cell Identification Using On-Chip Technologies for Cancer Research, Diagnosis, and Therapy	BIT's 3rd Annual World Cancer Congress 2010	2010.6
012	東京医科歯 科大学	<u>Kenji Yasuda</u>	Image cytometry	The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology	2010.9
013	東京医科歯 科大学	<u>Kenji Yasuda</u> , Tomoyuki Kaneko, Fumimasa Nomura	On-Chip Pre-Clinical Cardiac Toxicity: Testing Compounds Beyond hERG And QT Using hES/hiPS Cardiomyocyte Re-Entry Cell Network Model On A Chip	The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences	2010.10
014	東京医科歯 科大学	<u>Kenji Yasuda</u>	Development of in vitro drug-screening system exploiting human iPS cells and other pluripotent stem cells	NEDO-OSEO Workshop : Industrial application of iPS Cells	2010.11
015	東京医科歯 科大学	<u>Kenji Yasuda</u>	Frontier of single-cell-based on-chip screening assay: from single-cell-based purification to single-cell genome/proteome analysis	NEDO-OSEO Workshop : Industrial application of iPS Cells	2010.11

31

016	東京医科歯 科大学	<u>Kenji Yasuda</u>	Development of in vitro drug-screening system exploiting human iPS cells and other pluripotent stem cells	The Swiss-Japanese Meeting on Industrial Use of iPS	2010.11
017	東京医科歯 科大学	Tomoyuki Kaneko, Fumimasa Nomura, Yuki Tomoe, <u>Kenji Yasuda</u>	Entrainment of the beating rhythms of cardiomyocyte network with external electric stimulation	The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting	2010.12
018	東京医科歯 科大学	Fumimasa Nomura, Tomoyuki Kaneko, <u>Kenji Yasuda</u>	Spatiotemporal poincare plotting for torsades de pointes prediction <i>in vitro</i> drug-screening system exploiting human iPS cells and other pluripotent stem cells	Biophysical Society 55th Annual Meeting	2011.3
019	東京医科歯 科大学	<u>Kenji Yasuda</u>	Nanotechnology for On-chip Cellomics Screening	Pittcon Conference&EXPO 2011	2011.3

iPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	三菱化学メ ディエンス、 東京医科歯 科大学、慶応 大学、 Cellartis AB	Tetsuo Kitamura, Fumimasa Nomura, Tomoyuki Kaneko, Peter Sartipy, <u>Keiichi Fukuda</u> , <u>Atsushi Sugiyama</u> , <u>Masaru Sekijima</u> , <u>Kenji Yasuda</u>	In vitro preclinical cardiac safety pharmacology: Development of drug proarrhythmic measurement with human embryonic stem cell derived cardiomyocytes network	World Congress on Basic and Clinical Pharmacology 第16回 年会(コペンハーゲン)	2010.7.21
002	三菱化学メ ディエンス、	○Mototsugu Sakakibara, Mikiko Koike, Tetsuo Kitamura, Minoru	Availability of recording field potential of human stem	Safety Pharmacology Society 10th Annual Meeting (ポスト	2010.9.21

32

	東京医科歯科大学、慶応大学、Cellartis AB	Tateno, Tomoharu Osada, Fumimasa Nomura, Tomoyuki Kaneko, Peter Sartipy, Johan Hyllner, <u>Masaru Sekijima, Kenji Yasuda</u>	cell-derived cardiomyocytes by multi-electrode array system	ン)	
003	三菱化学メディエンス、東京医科歯科大学	Mototsugu Sakakibara, Mikiko Koike, Tetsuo Kitamura, Rui Kageyama, Yasunori Ihori, Minoru Tateno, Tomoharu Osada, Fumimasa Nomura, Tomoyuki Kaneko, <u>Masaru Sekijima, Kenji Yasuda</u>	Assessment of field potential of human stem cell-derived cardiomyocytes on the multi-electrode array system for the cardiotoxicity test	Stem Cells in Drug Discovery and Development (サンディエゴ)	2010.11.8
004	三菱化学メディエンス、東京医科歯科大学、Cellartis AB	Mikiko Koike, Mototsugu Sakakibara, Tetsuo Kitamura, Rui Kageyama, Yasunori Ihori, Minoru Tateno, Tomoharu Osada, Fumimasa Nomura, Tomoyuki Kaneko, Peter Sartipy, Johan Hyllner, <u>Masaru Sekijima, Kenji Yasuda</u>	Availability of a multi-electrode array system using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes as a preclinical cardiac toxicity test	Society of Toxicology 第50回年会 (ワシントンDC)	2011.3.

iPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	山梨大学、三菱化学メディエンス、東京医科歯科大学、セラテーティス	<u>Sugiyama A</u> , Kitamura T, Nomura F, Kaneko T, Nakamura Y, Sartipy P, <u>Yasuda K</u>	A new in vitro model to detect proarrhythmic effects of drugs on human heart cells	The 9th Annual Meeting of Safety Pharmacology Society, Strasburg, France	2009.9.15-18

33

002	山梨大学	<u>杉山 篤</u>	薬物性不整脈回避のための新たな戦略: ヒトiPS由来心筋細胞を用いたin vitroモデル	第1回安全性薬理研究会 東京	2010.2.20
003	東邦大学、三菱化学メディエンス、東京医科歯科大学、慶応大学	<u>Sugiyama A</u> , Kitamura T, Nomura F, Kaneko T, Sartipy P, <u>Fukuda K, Yasuda K</u>	Analysis of proarrhythmic effects of typical I _{Kr} blockers using human ES/iPS cell-derived cardiomyocytes.	16 th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, Denmark	2010.7.17-23
004	東邦大学	<u>Sugiyama A</u>	Current Strategy for Preventing Drug-Induced Long QT Syndrome in Japan: Potential Utility of New Assay Systems in vivo and in vitro	NEDO-OSEO Workshop on Industrial application of iPS cells. Paris, France	2010.11.22
005	東邦大学	<u>Sugiyama A</u>	Current Strategy for Preventing Drug-Induced Long QT Syndrome in Japan: Potential Utility of New Assay Systems in vivo and in vitro.	Swiss-Japanese Meeting on Industrial Use of iPS, Basel, Swiss	2010.11.24

[新聞・マスコミ・その他 発表]

iPS細胞等幹細胞から心筋細胞への効率的な分化誘導技術の開発

番号	会社名	内容	掲載物	掲載日
001	慶應義塾大学	心筋細胞、iPS細胞から効率的に作製 慶大、カギ握る物質解明	日本経済新聞	2010.3.5
002	慶應義塾大学	慶応大教授ら心筋細胞増殖に成功 再生医療へ前進	共同通信	2010.3.6
003	慶應義塾大学	慶応大教授ら心筋細胞増殖に成功 再生医療へ前進	47News	2010.3.6
004	慶應義塾大学	「血液1滴からiPS」の見出しで発表された。	朝日新聞	2010.7.2
005	慶應義塾大学	「ヒト血液からスピード作製」の見出しで発表された。	産経新聞	2010.7.2
006	慶應義塾大学	「血中のリンパ球からiPS細胞」の見出しで発表された	毎日新聞	2010.7.2

34

007	慶應義塾大学	「血中リンパ球から作製」の見出しで発表された	日経産業新聞	2010.7.2
008	慶應義塾大学	「微量血液からiPS細胞」の見出しで発表された。	日本経済新聞	2010.7.2
009	慶應義塾大学	「血液1mlからiPS細胞」の見出しで発表された。	日刊工業新聞	2010.7.2
010	慶應義塾大学	「iPS細胞 少量の血液で作る」の見出しで発表された。	NHK WEB版	2010.7.2
011	慶應義塾大学	「血液1滴からiPS細胞作製 世界最速25日間、慶応大」の見出しで発表された。	共同ニュースWEB版	2010.7.2

iPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

番号	会社名	内容	掲載物	掲載日
001	東京医科歯科大学	「iPS細胞による創薬支援 東京医科歯科大 企業18社・団体と協力」の見出しで発表された。	日刊工業新聞	2009.05.19
002	東京医科歯科大学	「幹細胞を医療現場へ 創薬に活躍するiPS細胞 心筋細胞ネットワークで心臓の反応を再現」の見出しで発表された。	日経サイエンス	2009.08.01
003	東京医科歯科大学	「副作用 万能細胞で把握 東京医歯大など成功 心臓細胞作り分析」の見出しで発表された。	読売新聞	2009.10.11
004	東京医科歯科大学	「3年目のiPS 日米最新報告2 新薬開発のリスク軽減」で発表された。	朝日新聞	2009.11.04
005	東京医科歯科大学	「万能細胞使う創薬研究活発 国内の大学・企業 東京医科歯科大 不整脈リスク把握」の見出しで発表された。	日本経済新聞	2009.12.21
006	東京医科歯科大学	「iPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングの新展開」の見出しで出展した。	BioJapan2010	2010.09.29 ～10.01
007	東京医科歯科大学	「iPS細胞 急進展する研究 期待される創薬への貢献 心筋細胞ネットワークで心臓の反応を再現」の見出しで発表された。	別冊日経サイエンス 先端医療をひらく	2011.01.17
008	東京医科歯科大学	iPS細胞で毒性検査チップ 心臓再現、新薬開発で利用	共同通信Webニュース	2011.2.27
009	東京医科歯科大学	iPSから毒性検査チップ 心臓に近い状態再現 東京医科歯科大学教授ら	北日本新聞	2011.2.28
010	東京医科歯科大学	iPS細胞で「心臓」再現 新薬の毒性検査チップ開発 東京医科歯科大	愛媛新聞	2011.2.28

35

iPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

番号	会社名	内容	掲載物	掲載日
001	三菱化学メディエンス	三菱化学メディエンス、iPS細胞使い心毒性評価システム開発	化学工業日報	2010.04.21

【招待講演】

番号	会社名	発表媒体	発表タイトル	発表者	発表年月
001	東京医科歯科大学	生物物理若手の会 夏の学校	1細胞からの構成的生命科学：オンチップ・セロミクス計測技術を用いた1細胞からの後天的情報解析	安田賢二	2009.8
002	東京医科歯科大学	第61回 生物工学会 年会シンポジウム（生物と機械の融合－バイオリボティクス－）	オンチップ・セロミクス計測技術を用いた心筋細胞ネットワーク計測	安田賢二	2009.9
003	東京医科歯科大学 慶応大学	JBIC2009	iPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発	安田賢二、福田恵一、杉山篤	2009.10
004	東京医科歯科大学	APBioChEC'09	Reconstructive approach for on-chip tissue/organ model screening system for drug discovery and toxicology	Kenji YASUDA	2009.11
005	東京医科歯科大学	2nd INTERNATIONAL CONFERENCE ON DRUG DISCOVERY & THERAPY	On-Chip Pre-Clinical Cardiac Toxicity: Testing Compounds Beyond hERG and QT using hES/hiPS Cardiomyocyte Cell Network Re-Entry Model on a Chip	Kenji YASUDA, Tomoyuki KANEKO, Fumimasa NOMURA, Atsushi SUGIYAMA	2010.2
006	東京医科歯科大学	第83回日本薬理学会年会 日本トキシコロジー学会・日本薬理学会合同シンポジウム 「安全性薬理試験の現状と将来」	「新ツール」iPS細胞を用いたQT延長・催不整脈評価	安田賢二、金子智行、野村典正、杉山篤	2010.3

36

【知的所有権】

【知的所有権】 研究開発項目①「iPS細胞の安定供給・大量調製・保存技術の開発」

番号	出願人	出願番号	出願日	状態	名称	発明人
001	川崎重工業株式会社	2009-231645	2009/10/05	審査未請求	透過光照明を用いた光学観察装置および光学観察方法	王子修, 中村洋一, 櫻井隆, 渡壁慶三
002	川崎重工業株式会社	2009-235306	2009/10/09	審査未請求	未分化多能性幹細胞の識別方法及び装置並びに自動培養方法及び装置	渡壁慶三, 中村洋一, 王子修, 中嶋勝己
003					非公開	

【論文・文献発表】

【論文・文献発表】 研究開発項目②「iPS細胞の各種性状解析」

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	産業技術総合研究所	Akutsu, T., Tamura, T. and Horimoto, K.	Complementing Networks Using Observed Data.	<i>Lecture Notes in Artificial Intelligence 5809</i> , pp. 126-140	査読済み	2009/
002	産業技術総合研究所	Nakatsui, M. and Horimoto, K.	Parameter Optimization in the network dynamics including unmeasured variables by the symbolic-numeric approach.	<i>Proceedings of the Third International Symposium on Optimization and Systems Biology (OSB'09)</i> , pp. 245-253	査読済み	2009/
003	産業技術総合研究所	Saito, S. and Horimoto, K.	Co-Expressed Gene Assessment Based on the Path Consistency Algorithm: Operon Detention in <i>Escherichia coli</i> .	<i>Proceedings of IEEE International Conference on Systems, Man and Cybernetics</i> , pp. 4280-4286	査読済み	2009/
004	産業技術総合研究所	Saito, S., Honda, M., Kaneko, S., and Horimoto, K.	Detection of network structure changes by graphical chain modeling: a case study of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma.	<i>Proceedings of 48th IEEE Conference on Decision and Control</i> , pp. 5624-5630	査読済み	2009/
005	産業技術総合研究所	Nakanishi M, Kurisaki A, Hayashi Y, Warashina M, Ishiura S, Kusuda-Furue M, Asashima M.	Directed induction of anterior and posterior primitive streak by Wnt from embryonic stem cells cultured in a chemically defined serum-free medium.	<i>FASEB J. 23</i> , 114-122.	査読済み	2009/1
006	産業技術総合研究所	Intoh A, Kurisaki A, Yamanaka Y, Hirano H, Fukuda H, Sugino H, Asashima M.	Proteomic analysis of membrane proteins expressed specifically in pluripotent murine embryonic stem cells.	<i>Proteomics. 9</i> , 126-137	査読済み	2009/1

007	産業技術総合研究所	Intoh A, Kurisaki A, Fukuda H, Asashima M.	Separation with zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography improves protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization-based proteomic analysis.	<i>Biomed Chromatogr.</i> 23, 607-614.	査読済み	2009/6
008	産業技術総合研究所	Kuwabara T, Hsieh J, Muotri A, Yeo G, Warashina M, Lie DC, Moore L, Nakashima K, Asashima M, Gage FH.	Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis.	<i>Nat Neurosci.</i> 12, 1097-1105.	査読済み	2009/9
009	産業技術総合研究所	Tateno, H., Kuno, A., Itakura, Y., Hirabayashi, J.	A versatile technology for cellular glycomics.	<i>Methods in Enzymology</i> 478, 181-95	査読済み	2010/
010	産業技術総合研究所	Zhou, H., Saito, S., Hu, R., Piao, G., Wang, J., Liu, Z., Horimoto, K. and Chen, L.	Significant Regulatory Networks from Goto-Kakizaki Rat Liver Microarray Data during Diabetic Progression.	<i>Proceedings of the 4th International Conference on Computational Systems Biology (ISB 2010)</i> , pp. 196-203	査読済み	2010/
011	産業技術総合研究所	Nakatsui, M. and Horimoto, K.	Improvement of Estimation Accuracy in Parameter Optimization by Symbolic Computation.	<i>Proceedings of IEEE Multi-conference on Systems and Control</i> , pp. 1720 - 1724	査読済み	2010/
012	産業技術総合研究所	Tamura, T., Yamanishi, Y., Tanabe, M., Goto, S., Kanehisa, M., Horimoto, K. and Akutsu, T	Integer Programming-based Method for Completing Signal Pathways and its Application to Analysis of Colorectal Cancer.	<i>Proceedings of The Tenth Annual International Workshop on Bioinformatics and Systems Biology</i> , pp. 193-203	査読済み	2010/
013	産業技術総合研究所	Wang, Y., Zhang, X.-Z., Horimoto, K., and Chen, L.	System Identification Models for Gene Regulation System.	<i>Proceedings of The 29th Chinese Control Conference (CCC), Beijing</i> , pp. 6239-6244	査読済み	2010/
014	産業技術総合研究所 ／国立成育医療研究センター	Saito, S., Onuma, Y., Ito, Y., Tateno, H., Toyoda, M., Akutsu, H., Nishino, K., Chikazawa, E.,	Potential Linkages Between the Inner and Outer Cellular States of Human Induced Pluripotent Stem Cells.	<i>Proceedings of the 4th International Conference on Computational Systems Biology (ISB 2010)</i> , pp. 381-388	査読済み	2010/

		Fukawatase, Y., Miyagawa, Y., Okita, H., Kiyokawa, N., Shimma, Y, Umezawa, A., Hirabayashi, J., Horimoto, K. and Asashima, M.				
015	産業技術総合研究所	Kajiyama H, Hamazaki TS, Tokuhara M, Masui S, Okabayashi K, Ohnuma K, Yabe S, Yasuda K, Ishiura S, Okochi H, Asashima M.	Pdx1-transfected adipose tissue-derived stem cells differentiate into insulin-producing cells in vivo and reduce hyperglycemia in diabetic mice.	<i>Int J Dev Biol.</i> 54(4): 699-705	査読済み	2010/
016	産業技術総合研究所	Aihara Y, Hayashi Y, Hirata M, Arika N, Shibata S, Nagoshi N, Nakanishi M, Ohnuma K, Warashina M, Michiue T, Uchiyama H, Okano H, Asashima M, Kusuda Furue M.	Induction of neural crest cells from mouse embryonic stem cells in a serum-free monolayer culture.	<i>Int J Dev Biol.</i> 2010;54(8-9):1287-1294.	査読済み	2010/
017	産業技術総合研究所	Kurisaki, A., Ito Y., Onuma, Y., Intoh, A., Asashima, M.	In vitro organogenesis using multipotent cells	<i>Human Cell</i> 23(1), 1-14	査読済み	2010/02
018	産業技術総合研究所	Hayashi Y, Furue MK, Tanaka S, Hirose M, Wakisaka N, Danno H, Ohnuma K, Oeda S, Aihara Y, Shiota K, Ogura A, Ishiura S, Asashima M.	BMP4 induction of trophoblast from mouse embryonic stem cells in defined culture conditions on laminin.	<i>In Vitro Cell Dev Biol Anim.</i> 46(5): 416-430	査読済み	2010/05
019	産業技術総合研究所	Seki Y, Kurisaki A, Watanabe-Susaki K, Nakajima Y, Nakanishi M, Arai Y, Shiota K, Sugino	TIF1beta regulates the pluripotency of embryonic stem cells in a phosphorylation-dependent manner.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 15;107(24):10926-31.	査読済み	2010/06

		H, Asashima M.				
020	産業技術総合研究所	Konno M, Hamazaki TS, Fukuda S, Tokuhara M, Uchiyama H, Okazawa H, Okochi H, Asashima M.	Efficiently Differentiating Vascular Endothelial Cells from Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells in Serum-Free Culture.	Biochem Biophys Res Commun. [Epub ahead of print]	査読済み	2010/08
021	産業技術総合研究所	Nishimura Y, Kurisaki A, Nakanishi M, Ohnuma K, Ninomiya N, Komazaki S, Ishiura S, Asashima M.	Inhibitory Smad proteins promote the differentiation of mouse embryonic stem cells into ependymal-like ciliated cells.	Biochem Biophys Res Commun. 401(1):1-6	査読済み	2010/10
022	産業技術総合研究所	Hayashi Y, Chan T-C, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, i Eto K, Kusuda Furue M, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M.	Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or Cultured under Feeder- and Serum-Free Defined Conditions.	PlosOne, 2010, 5(11), e14099	査読済み	2010/11
023	産業技術総合研究所	Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, Sato H, Motomura K, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Asashima M, Nakauchi H, Yamaguchi T, Nakanishi M.	Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming.	J Biol Chem. [Epub ahead of print]	査読済み	2010/12
024	産業技術総合研究所 ／国立成育医療研究センター	Tateno, H., Toyoda, M., Saito, S., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Fukumura, M., Nakasu, A., Nakanishi,	Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray.	J. Biol. Chem. in press.	査読済み	2011/

		M., Ohnuma, K., Akutsu, H., Umezawa, A., Horimoto, K., Hirabayashi, J., and Asashima, M.				
025	産業技術総合研究所 ／国立成育医療研究センター	Saito, S., Onuma, Y., Ito, Y., Tateno, H., Toyoda, M., Akutsu, H., Nishino, K., Chikazawa, E., Fukawatase, Y., Miyagawa, Y., Okita, H., Kiyokawa, N., Shimma, Y., Umezawa, A., Hirabayashi, J., Horimoto, K. and Asashima, M.	Potential Linkages Between the Inner and Outer Cellular States of Human Induced Pluripotent Stem Cells.	BMC Syst. Biol. in press	査読済み	2011/
026	産業技術総合研究所	Hirabayashi, J., Kuno, A., and Tateno, H.	Lectin-based structural glycomics: a practical approach to complex glycans.	Electrophoresis. in press.	査読済み	2011/
027	産業技術総合研究所	Saito, S., Zhou, X., Bae, T., Kim, S. and Horimoto, K.	A Procedure for Identifying Master Regulators in Conjunction with Network Screening and Inference.	<i>Proceedings of IEEE International Conference on Bioinformatics & Biomedicine</i> , in press.	査読済み	2011/
028	産業技術総合研究所	Nakatsui, M., Sedoglavic, A., Lemaire, F., Boulier, F., Urganli, A. and Horimoto, K.	A General Procedure for the Accurate Parameter Estimation in Dynamic Systems Using New Estimation Errors.	<i>Algebraic and Numeric Biology</i> , Springer, Heidelberg, in press.	査読済み	2011/
029	産業技術総合研究所	Saito, S., Hirokawa, T. and Horimoto, K.	Discovery of Chemical Compound Groups with Common Structures by a Network Analysis Approach.	<i>J. Chem. Inf. Model.</i> 51, 61-68	査読済み	2011/
030	産業技術総合研究所	Nakatsu, M., Horimoto, K., Lemaire, F., Ürgüplü, A., Sedoglavic, A. and	Brute force meets Bruno force in parameter optimization: Introduction of novel constraints for parameter	<i>IET Sys. Biol.</i> , in press	査読済み	2011/

		Boulier, F.	estimation by symbolic computation.			
031	産業技術総合研究所	Zhou, H., Saito, S., Hu, R., Piao, G., Wang, J., Liu, Z., Horimoto, K. and Chen, L.	Network Screening of Goto-Kakizaki Rat Liver Microarray Data during Diabetic Progression.	<i>BMC Sys. Biol.</i> in press.	査読済み	2011/
032	産業技術総合研究所	Saito, S., Zhou, X., Bae, T., Kim, S. and Horimoto, K.	A Procedure for Identifying Master Regulators in Conjunction with Network Screening and Inference.	<i>Int. J. Data Mining and Bioinformatics</i> , in press.	査読済み	2011/

【学会・研究発表】

[学会・研究発表] 研究開発項目①「iPS細胞の安定供給・大量調製・保存技術の開発」

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	川崎重工業株式会社	渡壁慶三、中嶋勝己、王子修、櫻井隆、阿久津英憲、豊田雅士、梅澤明弘、浅島誠	The development of the automated cell processing machine which can deal with human iPS cells in large amount for stable supply	International Society for Stem Cell Research 8 th Annual Meeting	2011/6/16

[学会・研究発表] 研究開発項目②「iPS細胞の各種性状解析」

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	産業技術総合研究所	浅島誠	ES細胞・iPS細胞・組織幹細胞研究の現状と再生医療実現に向けた課題	第2回羊膜再生医療研究会	2009/5/23
002	産業技術総合研究所	Intoh, A., Kurisaki, A., Sugino, H., Asashima, M.	Identification of cell surface markers expressed in pluripotent embryonic stem cells	The 9th World Congress of Inflammation	2009/7/8
003	産業技術総合研究所	Nakanishi, M., Kurisaki, A., Hayashi, Y., Warashina, M., Ishiura, S., Furue, MK., Asashima, M.	Directed induction of primitive streak from embryonic stem cells cultured in a chemically defined medium.	The 9th World Congress of Inflammation	2009/7/8
004	産業技術総合研究所	Horimoto, K.	Network Screening - Detection of Activated Pathways from the Data Measured in a Finite Condition	Computational Systems Biology Workshop	2009/9/19
005	産業技術総合研究所	浅島 誠	脊椎動物の未分化細胞からの臓器形成と分化制御	第28回日本運動器移植・再生医学研究会	2009/11/21

006	産業技術総合研究所	浅島 誠	脊椎動物の未分化細胞からの器官形成と分子機序	発生工学・疾患モデル研究会第79回定例会	2010/1/23
007	産業技術総合研究所	Asashima, M.	Organogenesis and control of differentiation in vertebrates	Japan-Israel Workshop on Stem Cells	2010/2/25
008	産業技術総合研究所	浅島 誠	脊椎動物の未分化細胞からの臓器形成と分化制御	第9回日本再生医療学会総会	2010/3/18
009	産業技術総合研究所	堀本勝久	ネットワーク・スクリーニング: RNAi実験を活用した活性化ネットワーク探索技術	CBI学会研究講演会「RNA創薬への道」	2010/4/12
010	産業技術総合研究所	浅島 誠	幹細胞研究の現状と今後について	幹細胞工学研究センターの発足	2010/4/16
011	産業技術総合研究所	Horimoto, K.	Network Screening Based on Graphical Gaussian Model	CSB Seminar Series 2010	2010/4/20
012	産業技術総合研究所	浅島 誠	発生と再生医療	東京大学EMP科学・技術と教養生命科学	2010/4/24
013	産業技術総合研究所	浅島 誠	脊椎動物の未分化細胞からの臓器形成と分化制御	第99回日本病理学会総会	2010/4/27
014	産業技術総合研究所	Asashima, M.	幹細胞研究とエピゲノム-課題と今後について	ゲノムテクノロジー第164委員会第33回研究会	2010/4/30
015	産業技術総合研究所	浅島 誠	脊椎動物の未分化細胞からの器官形成と分化制御	iPS・ES・体性幹細胞Forum2010—基礎研究から臨床応用・創薬研究へ—	2010/6/29
016	産業技術総合研究所	Hirabayashi, J.	Medical application of lectin microarray: a powerful technology for differential glycan profiling	The 28th NAITO Conference on Glycan Expression and Regulation [1]	2010/7/27
017	産業技術総合研究所	Nakatsui, M., Sedoglavic, A., Lemaire, F., Boulier, F., Urguplu,	A General Procedure for the Accurate Parameter Estimation in Dynamic Systems	Algebraic and Numeric Biology	2010/8/1

45

		A. and Horimoto, K	Using New Estimation Errors		
018	産業技術総合研究所	浅島 誠	Organogenesis in vitro using undifferentiated cells and their molecular approaches in vertebrate development - present and future-	2010 YCU Science Summer Program “Frontier Life Sciences towards Global Health”	2010/8/18
019	産業技術総合研究所	堀本勝久	システム生物学におけるネットワーク解析の精度向上	日本ソフトウェア科学会	2010/8/21
020	産業技術総合研究所	浅島 誠	再生科学と再生医療からの報告	(日本学術会議主催)公開シンポジウム 生命科学は人類に何をもたらすか?—生命科学各領域の挑戦	2010/8/27
021	産業技術総合研究所	Horimoto, K.	Two methods for network analysis inspired by the collaboration with experimental biologists	第3回若手研究者セミナー日本学術振興会アジア研究教育拠点事業「微生物の潜在能力と次世代発酵技術の構築」	2010/9/5
022	産業技術総合研究所	Asashima, M.	Organogenesis and control of differentiation in vertebrate development	International Conference on Functional Genomics	2010/10/02
023	産業技術総合研究所	Ito, Y.	Challenge the establishment of new fundamental technology in the regenerative medicine.	2nd Symposium on Systems and Synthetic Biology (TriSys)	2010/10/4
024	産業技術総合研究所	堀本勝久	システム生物学的アプローチによる合目的ネットワーク数理解析法の開発	平成22年度セルイノベーション公開セミナー「次n世代シーケンサーの急速な発展と生命科学への活用」	2010/11/3
025	産業技術総合研究所	浅島 誠	再生医療の現状と今後	平成22年度裁判基盤研究会「生命科学」	2010/10/27
026	産業技術総合研究所	Asashima, M.	Organogenesis and control of differentiation in vertebrates	Basic and Clinical Frontiers of Cancer Epigenetics (The 41 st International Symposium of The	2010/11/17-19

46

				Princess Takamatsu Cancer Research Fund)	
027	産業技術総合研究所	舘野浩章	レクチンアレイ基盤細胞グライコミクスによる細胞評価システムの開発	第8回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム	2010/11/30
028	産業技術総合研究所	平林淳	レクチンアレイ技術に基づく幹細胞表層糖鎖プロファイリング法の開発	日本分子生物学会日本生化学会合同年会(BMB2010)WS「幹細胞を糖鎖で決める:細胞規格化とその先にある分化メカニズム、構造ダイナミズムと生理機能の解明を目指して」	2010/12/7
029	産業技術総合研究所	平林淳	レクチンアレイ技術に基づく幹細胞表層糖鎖プロファイリング法の開発	日本分子生物学会日本生化学会合同年会(BMB2010)WS「幹細胞を糖鎖で決める:細胞規格化とその先にある分化メカニズム、構造ダイナミズムと生理機能の解明を目指して」	2010/12/7
030	産業技術総合研究所／国立成育医療研究センター	舘野浩章・豊田雅士・小沼泰子・伊藤弓弦・斎藤秀・阿久津英憲・梅澤明弘・堀本勝久・浅島誠・平林淳	高密度レクチンアレイの開発と細胞グライコミクスへの応用	日本分子生物学会日本生化学会合同年会(BMB2010)	2010/12/10
031	産業技術総合研究所	舘野浩章	レクチンマイクロアレイを活用した幹細胞評価技術の開発	第3回 JITA 交流会	2011/1/7
032	産業技術総合研究所	小沼泰子	再生医療・創薬に役立つ細胞品質管理への取り組み	第10回 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会	2011/2/1

47

033	産業技術総合研究所	西村健、大高真奈美、高安聡子、小林俊寛、小沼泰子、伊藤弓弦、大津真、中内啓光、浅島誠、中西真人	iPS細胞樹立に最適な形に進化させた持続発現型RNAベクターの開発	第10回日本再生医療学会総会	2011/3/1
-----	-----------	-------------------------------------------------	-----------------------------------	----------------	----------

48

【新聞・マスコミ・その他 発表】

【新聞・マスコミ・その他 発表】 研究開発項目①「iPS細胞の安定供給・大量調製・保存技術の開発」

番号	会社名	内容	掲載物	掲載日
001	川崎重工業株式会社／国立成育医療研究センター／産業技術総合研究所	ヒトiPS細胞自動培養化の内容が発表された。	毎日新聞 夕刊 8面 2段	2010/6/28
002	川崎重工業株式会社／国立成育医療研究センター／産業技術総合研究所	世界初のヒトiPS細胞自動培養の内容が発表された。	神戸新聞 夕刊 1面 4段	2010/6/28
003	川崎重工業株式会社／国立成育医療研究センター／産業技術総合研究所	『iPS細胞 自動培養装置 川崎重工業など開発…世界初』の見出しで発表された。	YAHOO JAPAN ニュース	2010/6/28
004	川崎重工業株式会社／国立成育医療研究センター／産業技術総合研究所	『世界初のiPS自動培養に成功 川重など』の見出しで発表された。	YAHOO JAPAN ニュース	2010/6/28
005	川崎重工業株式会社／国立成育医療研究センター／産業技術総合研究所	ヒトiPS細胞自動培養化の内容が発表された。	産経新聞 朝刊 9面 2段	2010/6/29
006	川崎重工業株式会社／国立成育医療研究センター／産業技術総合研究所	『iPS細胞、自動培養 川重や産総研』の見出しで発表された。	日本経済新聞 朝刊 5段	2010/6/29
007	川崎重工業株式会社／国立成育医療研究センター／	ヒトiPS細胞自動培養化の内容が発表された。	産経新聞(大阪) 朝刊 7面 2段	2010/6/29

49

	産業技術総合研究所			
008	川崎重工業株式会社／国立成育医療研究センター／産業技術総合研究所	『iPS細胞自動培養 川重・産総研など ロボットアームが作業』の見出しで発表された。	日刊工業新聞 朝刊 32面 3段	2010/6/29
009	川崎重工業株式会社／国立成育医療研究センター／産業技術総合研究所	ヒトiPS細胞自動培養化の内容が発表された。	日経産業新聞(日経テレコン21) 朝刊 11面 3段	2010/6/29
010	川崎重工業株式会社／国立成育医療研究センター／産業技術総合研究所	ヒトiPS細胞自動培養化の内容が発表された。	化学工業日報 朝刊 1面 2段	2010/6/29
011	川崎重工業株式会社／国立成育医療研究センター／産業技術総合研究所	ヒトiPS細胞自動培養化の内容が発表された。	日本農業新聞 朝刊 15面 1段	2010/6/29
012	川崎重工業株式会社／国立成育医療研究センター／産業技術総合研究所	ヒトiPS細胞自動培養化の内容が発表された。	大阪日日新聞 朝刊 20面 3段	2010/6/29
013	川崎重工業株式会社／国立成育医療研究センター／産業技術総合研究所	『iPS細胞 大量培養に道 川崎重工など開発、競争力を強化』の見出しで発表された。	YAHOO JAPAN ニュース	2010/6/29
014	川崎重工業株式会社	『製造業が医療に“熱視線”』の見出しで発表された。	日経ビジネス	2010/7/19
015	川崎重工業株式会社	『iPS細胞を自動培養』の見出しで技術&トレンド発表された。	日経ビジネス	2011/1/28

50

[新聞・マスコミ・その他 発表] 研究開発項目②「iPS細胞の各種性状解析」

番号	会社名	内容	掲載物	掲載日
001	産業技術総合研究所	『iPS細胞の作製効率100倍 産総研が新技術』の見出しで発表された。	日本経済新聞 朝刊 250文字	2011/4/28
002	産業技術総合研究所	『iPS細胞の作製効率100倍 産総研が新技術』の見出しで発表された。	日本経済新聞 電子版 422文字	2011/4/27
003	産業技術総合研究所	『安全なiPS細胞高効率で作製』の見出しで発表された。	日刊工業新聞	2011/4/28
004	産業技術総合研究所	『iPS細胞作製効率100倍 表面糖鎖で品質も評価』の見出しで発表された。	日経産業新聞	2011/4/28

東京大学担当分

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

研究開発項目② 「iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発」

[論文・文献発表]

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	東京大学 (院) 農	佐藤晋也、八木慎太郎 (他)	Genome-wide DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) residing in mouse pluripotent stem cells	Genes to Cells, 15 : p607-618	掲載	2010
002	東京大学 (院) 農	村本玄紀、八木慎太郎 (他)	Enrichment of short interspersed transposable elements to embryonic stem cell-specific hypomethylated gene regions	Genes to Cells, 15 : p855-865	掲載	2010
003	東京大学 (院) 農	村本玄紀 (他)	細胞・組織特異的 DNA メチル化領域-ES 細胞、iPS 細胞および組織の DNA メチル化プロファイル	実験医学 (増刊), 28 : p81-86	掲載	2010
004	東京大学 (院) 農	村本玄紀、八木慎太郎 (他)	Enrichment of Short interspersed transposable elements (SINEs) in hypomethylated genic regions in embryonic stem cells	Experimental Biology 2010	掲載	2010

005	東京大学 (院) 農	佐藤晋也、八木慎太郎 (他)	Genome-wide DNA methylation profile of pluripotent stem cells	Experimental Biology 2010	掲載	2010
-----	---------------	----------------	---------------------------------------------------------------	---------------------------	----	------

[学会・研究発表]

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	東京大学 (院) 農	村本玄紀、八木慎太郎 (他)	ES 細胞特異的低メチル化遺伝子領域は特徴的な反復配列分布を示す	第4回日本エビジェネティクス研究会年会	2010
002	東京大学 (院) 農	村本玄紀、八木慎太郎 (他)	Transposable elements are genomic landmarks for DNA hypomethylation specific to embryonic stem cells	75th Cold Spring Harbor Symposium: Nuclear Organization & Function	2010
003	東京大学・院総合文化	加納ふみ、荒井珠貴 (他)	Establishment of semi-intact cell system and application of its resealing technique: a study of membrane dynamics	第48回日本生物物理学会年会	2010
004	東京大学・院総合文化	村田昌之、(他)	セミインタクト細胞リシール法を用いた病態ミトコンドリアの形態解析システムの構築	細胞を創る研究会 3.0	2010
005	東京大学・院総合文化	加納ふみ、(他)	セミインタクト細胞リシール法を用いたシグナル伝達経路解析システムの構築	細胞を創る研究会 3.0	2010